

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE BEZSÉROVÉ BUNĚČNÉ KULTURY
POMOCÍ POLYETHYLENIMINŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

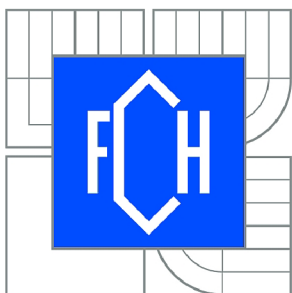
Bc. MICHAELA FRIČOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE BEZSÉROVÉ BUNĚČNÉ KULTURY POMOCÍ POLYETHYLENIMINŮ

TRANSIENT TRANSFECTION OF A SERUM FREE CELL CULTURE USING
POLYETHYLENEIMINES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MICHAELA FRIČOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. MOJMÍR ŠEVČÍK, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0356/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Michaela Fričová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Michaela Fričová
Student(ka)

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce studuje problematiku transienční transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů.

V teoretické části jsou obsaženy poznatky o vzniku rekombinantních molekul DNA, použití expresních vektorů, přenosu DNA a následné detekci rekombinantního proteinu.

Experimentální část byla zaměřena na nalezení vhodné transfekční metody pomocí polyethyleniminu, kdy hostitelskými buňkami byly buňky 293HEK/EBNA.

V první části byl zvolen nejúčinnější plazmid – pCEP4/SEAP. Dále byly zkoumány tři transfekční metody: Muller (2005), Durocher et al. (2007) a Backliwal et al. (2008). Nejvyšší dosažené exprese SEAP bylo dosaženo metodou Backliwal et al. (2008).

ABSTRACT

Master's thesis deals with the transient transfection of the serum free animal cell culture using polyethyleneimines.

In the theoretical part formation of recombinant DNA molecules, used expression vectors, used DNA transfer and detection of recombinant proteins are discussed.

The experimental part deals with efficiency of the polyethylenimine mediated transient transfection under various experimental conditions. 293HEK/EBNA cell line was chosen as an experimental model.

First the most effective plasmide - pCEP4/SEAP was selected. Then three transfection methodes were tested: Muller (2005), Durocher et al. (2007) and Backliwal et al. (2008). The highest recombinant protein expresion was reached using the method of Backliwal et al. (2008).

KLÍČOVÁ SLOVA

transienční transfekce, polyethylenimin, buňky 292HEK/EBNA , rekombinantní protein

KEYWORDS

transient transfection, polyethylenimine, 292HEK/EBNA cells, recombinant protein

FRIČOVÁ, M. *Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 75 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Mgr. Mojmíru Ševčíkovi, Ph.D za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu firmy *BioVendor – Laboratorní medicína a.s.* za odborné rady při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Třídění genomových knihoven	9
2.1.1	DNA/DNA hybridizace	9
2.1.2	Imunologické testy	9
2.1.3	Proteinová aktivita	9
2.1.4	Komplementární test	9
2.2	Klonovací vektory	10
2.3	Endodeoxyribonukleázy	12
2.4	Tvorba rekombinantní molekuly	12
2.5	Přenos DNA do buněk	12
2.5.1	Chemický přenos	12
2.5.2	Mikroinjekce	12
2.5.3	Přenos pomocí liposomů	13
2.5.4	Elektroporace	13
2.5.5	Syntetické komplexy DNA-ligand	14
2.6	Hostitelské buňky a organismy	16
2.6.1	Prokaryotní buňky	16
2.6.2	Kvasninky	16
2.6.3	Rostliny	17
2.6.4	Živočišné buňky	17
2.7	Reportérové geny	18
2.7.1	Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu	18
2.7.2	Transgen pro β -glukuronidázu	18
2.7.3	Transgen pro luciferázu	18
2.7.4	Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)	19
2.7.5	Transgen pro alkalickou fosfatázu	19
2.8	Transientní (přechodná) transfekce	19
3	Experimentální část	20
3.1	Materiály a metody	20
3.1.1	Chemikálie	20
3.1.2	Pomůcky a přístroje	20
3.1.3	Buňky a kultivační média	21
3.1.4	Metody	22
3.1.5	Rozmražení buněk a kultivace	22
3.1.6	Pasážování a zamražení buněk	23
3.1.7	Počítání buněk pomocí trypanové modři	24
3.1.8	Převedení na suspenzní linii	24
3.1.9	Izolace a purifikace plasmidové DNA	25
3.1.10	Plazmidy	26
3.1.11	Metoda transfekce 1 - Muller (2005)	30
3.1.12	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	30
3.1.13	Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)	31
3.1.14	Stanovení exprese reportérového genu	31
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Růst zásobní buněčné kultury	33
4.2	Růst buněk po transfekci	34
4.3	Volba plazmidu pro transientní expresi	35
4.3.1	Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce	36

4.4	Srovnání metod transientní transfekce	37
4.4.1	Metoda transfekce 1 - Muller (2005)	37
4.4.2	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	37
4.4.3	Metoda Backliwal (2008).....	37
5	Závěr.....	41
6	Seznam použitých zdrojů	42
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	45
8	Seznam příloh.....	46
9	Přílohy	47
9.1	Složení médií a pufrů	47
9.1.1	LB médium.....	47
9.1.2	Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA.....	47
9.1.3	DMEM/F-12 médium.....	48
9.1.4	BV 293s médium.....	49
9.2	Metoda transfekce 1 – Muller (2005).....	49
9.3	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	63
9.3.1	Bezsérová kultivace.....	63
9.3.2	Kultivace s 1% přídavkem koňského séra.....	64
9.4	Metoda transfekce 3 – Backliwal	66

1 ÚVOD

Stále významnějším odvětvím biotechnologického a farmaceutického průmyslu se stává výroba rekombinantních proteinů. Rekombinantní proteiny jsou často požadovány ve velkých množstvích, jde o stovky miligramů až gramy r-proteinů. Jedná se zejména o produkci antikoagulantů, vakcín, terapeutik, lidského insulínu, růstových hormonů apod.

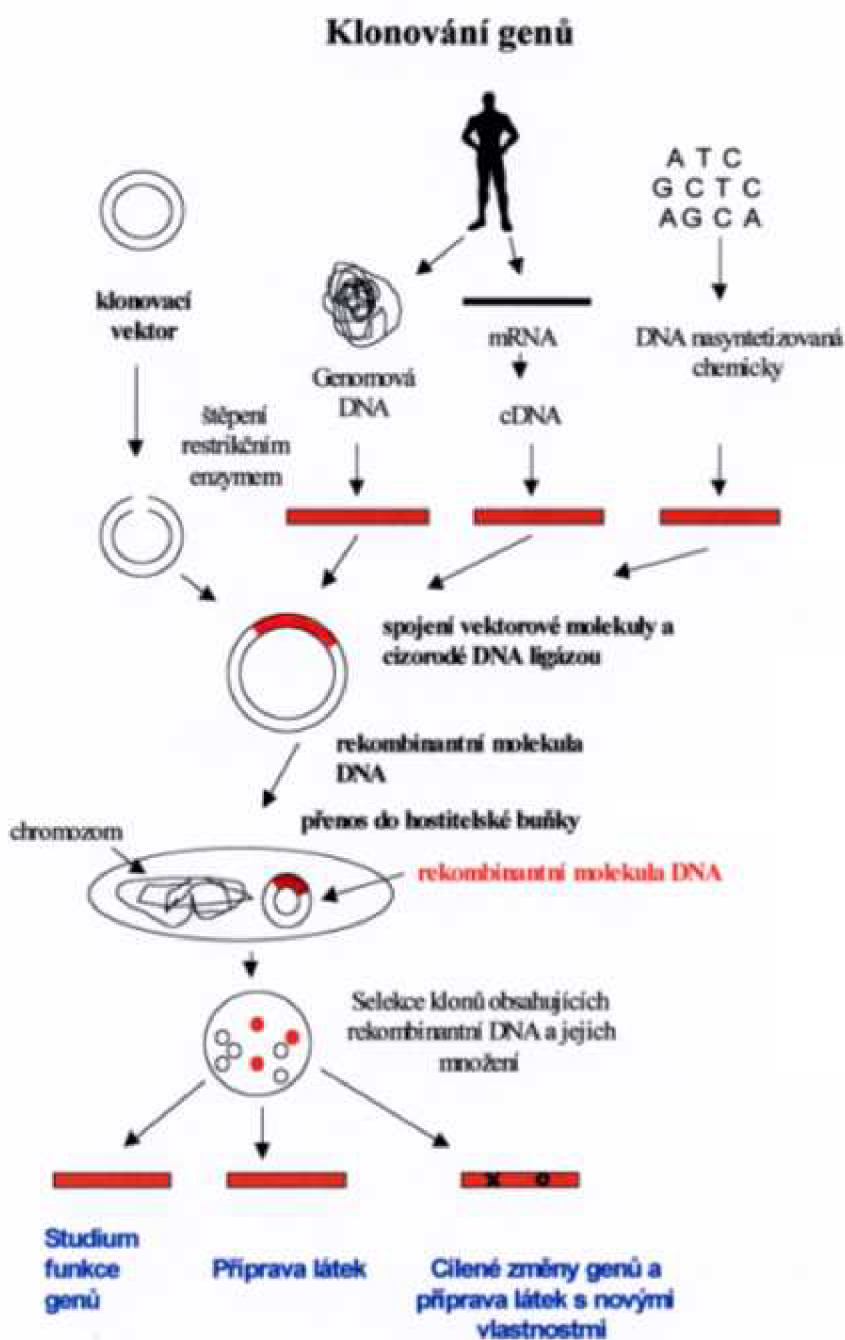
Pro správnou biologickou funkci r-proteinu je důležité, aby byl protein správně sbalen, a aby mu hostitelská buňka zajistila všechny posttranslační úpravy. Po dlouhodobých výzkumech bylo zjištěno, že vhodnými expresními systémy jsou savčí buňky.

Zatím bylo testováno více než 1000 sekvencí DNA kódujících proteiny potenciálně využitelných při léčbě lidských nemocí. Většina těchto molekul byla exprimována v hostitelských buňkách, přibližně 750 postoupilo do dalších klinických testů a 80 látek bylo schváleno jako léčiva v USA i EU. [1] [2]

Tato práce se zabývá problematikou přípravy r-proteinů pomocí transientní transfekce eukaryotních buněk 293 HEK/EBNA. Transfekce je proces cíleného přenosu nukleové kyseliny do hostitelských buněk. Při přechodné (transientní) transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. [2] Cílem práce je vývoj protokolu transientní transfekce na základě poznatků publikovaných dříve. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

Principem genového inženýrství je tvorba rekombinantních (chimérických) molekul DNA. V roce 1973 poprvé popsali Cohen a Boyer techniky tvorby rekombinantních molekul DNA. [3] Klonovaná DNA je získána buď z donorového organismu, jehož DNA kóduje nějakou zajímavou vlastnost, nebo je použit uměle syntetizovaný gen. Prvním krokem při tvorbě rekombinantních molekul je hledání a izolace klonovaného genu. K vyhledání cílové sekvence DNA se konstruují genomové knihovny. Genomová knihovna je soubor naklonovaných fragmentů DNA, které dohromady tvoří genom jednoho organismu. K vyhledání specifického genu se využívá metod třídění genomových knihoven. [4]



Obr. 1: Schéma klonování genů [5]

2.1 Třídění genomových knihoven

2.1.1 DNA/DNA hybridizace

Je založena na párování komplementárních dusíkatých bází jednořetězcových nukleových kyselin pomocí vodíkových můstků. K vyhledání specifického genu se použije krátký oligonukleotidový řetězec, který je částečně (heterologní sonda), nebo zcela (homologní sonda) komplementární s klonovanou sekvencí DNA. DNA sonda nese značku, která je snadno detekovatelná. V oligonukleotidovém řetězci sondy může být zakomponován radioaktivní izotop, který je po hybridizaci sondy se sekvencí DNA detekován např. radiograficky. Sonda může být značena i neradioaktivně, např. imunologicky. K hybridizaci lze použít fragmenty po agarózové gelové elektroforéze, kdy pomocí filtračních papírů a kapilárních sil jsou fragmenty přeneseny (přebíjovány) na nylonovou membránu. Poté jsou fragmenty denaturovány a přidá se sonda, která hybridizuje s cílovými sekvencemi DNA – Southernův blot.

2.1.2 Imunologické testy

Na sondu je navázán antigen. Poté je do roztoku DNA přidána směs primárních protilátek, které se specificky vážou k antigenům. Následně se přidají sekundární protilátky, které nasedají na primární protilátky a zároveň nesou značení, které je snadno detekovatelné, např. enzym (alkalická fosfatáza). Po přidání substrátu je substrát změněn enzymem na produkt a tato reakce je doprovázena barevnou změnou. Poté je signál sondy zjištěn fotometricky.

2.1.3 Proteinová aktivita

Tato metoda se využívá pokud klonovaný gen kóduje syntézu enzymu, který není normálně hostitelskou buňkou produkován. Kolonie jsou zaočkovány na misky s vhodným substrátem (škrob – kolonie obsahující gen pro alfa-amylázu) a na základě selektivního zbarvení se rozliší, které kolonie využívají substrát, a tudíž obsahují cílový gen.

2.1.4 Komplementární test

Komplementární test je využíván, pokud klonovaný gen kóduje syntézu esenciálního produktu (vitamín, antibiotikum, aminokyselina apod.) nezbytného pro přežití buňky. Gen se přenesou do buněk, které nejsou schopné růst na substrátech bez esenciální složky. Pokud buňky získaly rekombinantní plazmid, jsou schopné růst na minimálním médiu a esenciální složku si syntetizují samy.

2.2 Klonovací vektory

Klonovací vektory slouží k přenosu cizorodé DNA do hostitelských buněk. Čím je menší velikost klonovacího vektoru, tím se zvyšuje účinnost přenosu rekombinantní molekuly DNA. Vektory obsahují cílová místa pro restriční endonukleázy. Restriční endonukleázy jsou enzymy, které vektor naštěpí a do tohoto místa je vložen gen zájmu. Na vektoru je vždy jen jedno místo pro danou nukleázu. Dále vektoru obsahuje selekční marker, který umožňuje identifikovat, které buňky získaly vektor. Jako selekční markery se často využívají geny pro rezistenci k antibiotiku (např. ampicilin). Po provedení přenosu rekombinantní DNA do hostitelských buněk senzitivních na antibiotikum, jsou buňky vysety na médium s přídatkem antibiotika. Přežijí jen ty buňky, které získaly vektor.

Jako vektory se nejčastěji používají plazmidy. Jsou to kruhové samoreplikující se extrachromozomální molekuly DNA izolované z bakterií. Obsahují sekvenci ori, místo počátku replikace.

Dále fágové vektory odvozené od fága lambda a od fága M13. Cizorodá DNA se množí v lytickém cyklu fága jako rekombinantní DNA fága lambda. Poté se vytvoří viriony (fágové částice), které se skládají z DNA zabalené v hlavičce, ke které je připojen bičík. Za přítomnosti virionů se na vrstvě buněk začnou tvořit plaky.

Hybridy mezi plazmidy a fágy jsou kosmidy. Spojují výhody obou typů vektorů. Pomocí fágových částic je DNA injikována do hostitelských buněk. Kosmid obsahuje dvě cílová místa, které se v hostitelské buňce spojí a vznikne kruhová molekula DNA. V hostitelské buňce jsou poté uchovávány jako plazmidy. Dále kosmid obsahuje gen pro rezistenci na tetracyklin pro selekci v hostitelských buňkách, které jsou citlivé na tetracyklin. Výhodou kosmidů je velká klonovací kapacita (viz. tabulka č.1). Pomocí těchto vektorů lze klonovat i soubory genů (operony).

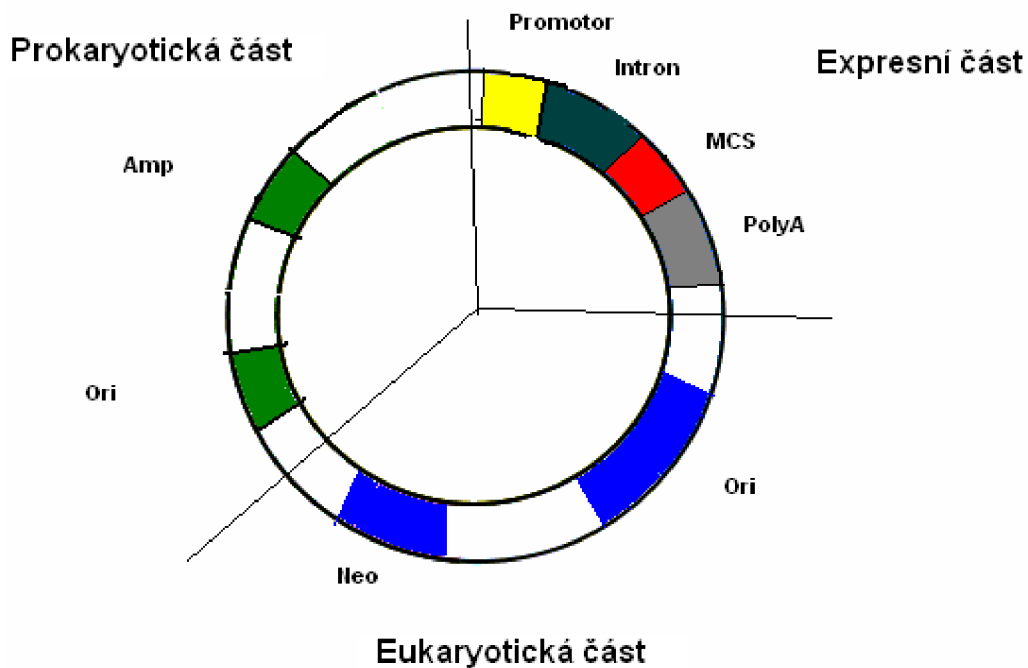
Tab. 1: Klonování kapacity vektorů [4]

vektor	Hostitelská buňka	Klonování kapacita (kb)
Plazmid	<i>E. coli</i>	0,1 – 10
Bakteriofág λ	λ / <i>E. coli</i>	10 – 20
Kosmid	<i>E. coli</i>	35 -45
Bakteriofág P1	<i>E. coli</i>	80 – 100
Bakteriální umělý chromozom	<i>E. coli</i>	50 – 300
P1 bakteriofágový umělý chromozom	<i>E. coli</i>	100 – 300
Kvasinkový umělý chromozom	kvasinky	100 – 2000
Lidský umělý chromozom	Lidské buňky	> 2000

Eukaryotické geny nemohou být správně exprimovány v bakteriálních vektorech. Eukaryotické geny obsahují introny a exony. Prokaryotické buňky nejsou schopny vystřihávat introny z přepsané RNA. Pro klonování eukaryotických genů v bakteriálních buňkách byly vytvořeny speciální postupy.

Z organismu se vyizoluje celková RNA. Eukaryotní mediátorová RNA nese na 3' konci polyadenylový konec. Mediátorová RNA se oddělí od celkové pomocí kolony, která obsahuje polythymínové zbytky, na které se navážou polyadenylové konce mRNA pomocí vodíkových můstků. Poté jsou štěpeny vodíkové můstky pomocí speciálního pufru a RNA je eluována ven z kolony. Mediátorová RNA je přepsána do DNA za pomoci enzymu reverzní transkriptázi. Výsledkem je fragment dvouřetzcové cDNA (komplementární DNA). Konstrukt vektor-cDNA může být vnesen do hostitelské buňky *E. coli*. Pro expresi eukaryotních genů jsou využívány kvasinkové, hmyzí a savčí vektory.

Eukaryotický expresní vektor obsahuje: eukaryotický markerový gen pro selekci v hostitelské buňce, promotorovou sekvenci, transkripční a translační stop signály, sekvence pro posttranskripční úpravy RNA, počátek replikace funkční v hostitelské buňce (extrachromozomálně replikující se DNA), nebo integrační místo pro rekombinaci do genomu hostitelské buňky. [4]



Obr. 2: Mapa plazmidu – plazmid se skládá ze tří částí. Prokaryotická oblast nese místo *ori* (počátek replikace) a gen pro rezistenci k ampiclinu funkční v buňkách *E. coli*. Pro eukaryotní buňky slouží sekvence *ori* a gen pro rezistenci k neomycinu. Expresní oblast obsahuje promotor, za kterým následuje klonovací místo (MCS = multiplecloning site).

Vektory pro expresi eukaryotních genů jsou konstruovány jako kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje *ori* místo a selekční marker funkční v *E. coli*. Dále obsahuje *ori* místo, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS (multiple cloning site) s promotorovou a terminátorovou sekvencí. [2]

2.3 Endodeoxyribonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které štěpí DNA ve specifických místech, rozpoznávají palindromické sekvence. Restrikční endonukleázy byly izolovány z různých bakteriálních kmenů. Jsou označeny zkratkami podle toho, z jaké bakterie byly získány (např. EcoRI z *Escherichia coli*). Původní význam těchto enzymů je ochrana před cizorodými DNA, např. virovými. Aby se zamezilo štěpení hostitelské DNA, je chráněna před působením enzymů methylací. Tyto enzymy se využívají při tvorbě rekombinantní (chimérické) DNA. Vektor i cílový fragment cizorodé DNA je naštěpen stejnou endonukleázou. Štěpení fragmentů probíhá za vzniku přečnívajících nebo tupých konců.

2.4 Tvorba rekombinantní molekuly

Z donorového organismu je izolována DNA. Poté je nalezen cílový gen a vyštěpen pomocí restrikční endonukleázy. Stejnou restrikční endonukleázou je naštěpen plasmid v cílovém místě pro enzym, které sousedí s klonovacím místem. Vznikne lineární molekula plasmidové DNA s přečnívajícími konci se sekvencemi nukleotidu podle použitého enzymu. Linearizované molekuly jsou smíchány s cílovou DNA a směs je inkubována s DNA ligázou za přítomnosti ATP. Vznikne rekombinantní molekula (plasmid-insert). [4]

2.5 Přenos DNA do buněk

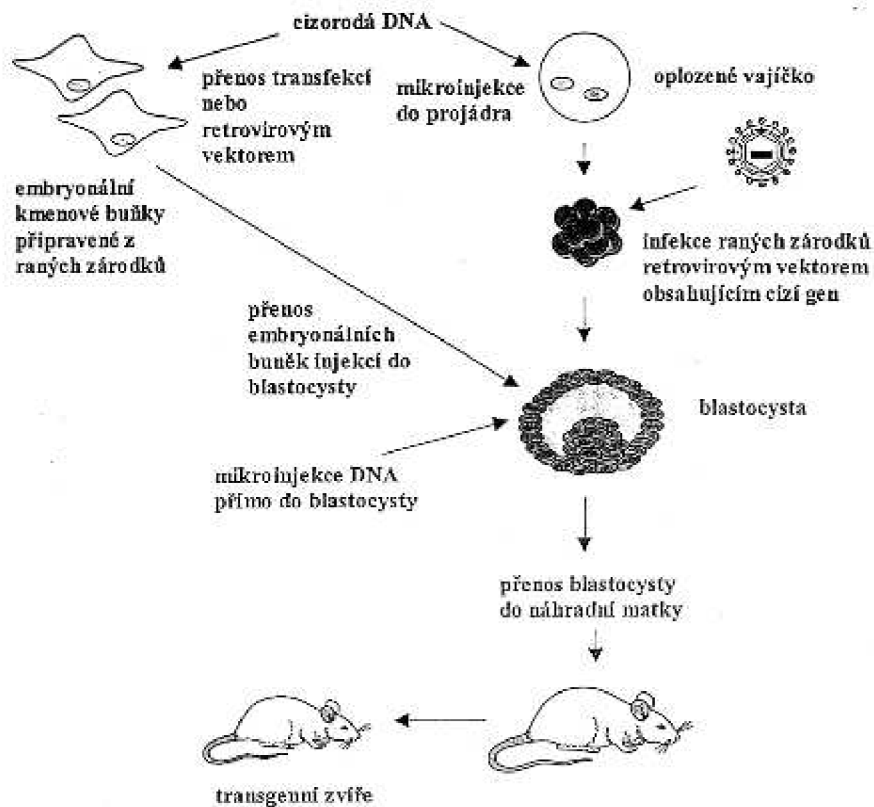
V přírodě často probíhá přirozený přenos DNA do hostitelských buněk. K tomu dochází při bakteriální konjugaci, přirozené transformaci nebo k přenosu DNA během virové infekce. DNA lze do buněk přenášet i za pomoci fyzikálních nebo chemických sil.

2.5.1 Chemický přenos

Buňky a roztok DNA jsou inkubovány v prostředí roztoku chloridu vápenatého při teplotě 0°C. Poté je roztok zahřát na teplotu 42°C. K roztoku obsahujícím DNA a CaCl₂ se postupně přidává HEPES-fosfátový pufr. Směs se inkubuje při laboratorní teplotě, a poté je vzniklá sraženina dispergována v prostředí buněk. Doba inkubace musí být optimalizována (je zpravidla kratší než 4 hod). [6]

2.5.2 Mikroinjekce

Pomocí mikroinjekce se DNA přenesou přímo do jádra buňky. Tato technika je velmi náročná a zabere mnoho času. Využívá se především při tvorbě transgenních zvířat, kdy je DNA mikroinjekcí vpravena buď do projádra nebo přímo do blastocysty. [5]



Obr. 3: Tvorba transgenních savců [5]

2.5.3 Přenos pomocí liposomů

Na základě hydrofobního efektu se lipidy ve vodném prostředí shlukují k sobě a vytváří duté struktury zvané lipozomy. Díky elektrostatickým interakcím se navzájem přitahují kladně nabití lipidy se záporně nabitou DNA za vzniku agregátů. Částice nesoucí kladný náboj interagují se záporně nabitou buněčnou membránou, která je rovněž hydrofobní, a poté je uskutečněn vstup do hostitelské buňky. Provedení této transfekce je drahé, protože ceny transfekčních lipidů jsou vysoké, a proto se tato transfekce uskutečňuje pouze v menších objemech. [2]

2.5.4 Elektroporace

Elektroporace je reverzní permeabilizace buněk elektrickým polem o vysokém napětí. Elektrotransformace probíhá za nefyziologických podmínek. Připraví se elektrokompetentní buňky a poté se na směs buněk a přenášených molekul aplikuje krátký elektrický puls při nízké teplotě. Následuje regenerace buněk. Optimální podmínky elektrotransformace se nalézají v úzkém rozmezí elektrického napětí a doby trvání pulzu.

Tab. 2: Rozmezí elektrického napětí pro různé typy buněk [6]

G -	7 – 15 kV/cm
G +	až 35 kV/cm
rostlinné, živočišné buňky	1 – 2 kV/cm

Během elektroporace zahyne velký počet buněk. Závisí na biologických faktorech jako je stáří buněk, velikost buněk, koncentrace a způsob regenerace buněk.

Molekulární mechanismus elektrotransformace není znám. Existuje teorie přechodné tvorby hydrofilních pórů, která dobře popisuje děje probíhající při pokusech s buňkami po stránce kvalitativní, ne však kvantitativní. Hlavními nevyřešenými problémy jsou: popis raného stadia tvorby pórů, transport molekul póry a návrat membrány do původního stavu.

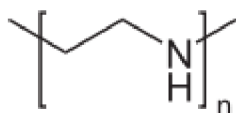
Z doposud známých experimentálních dat lze vyvozovat, že mechanismus přenosu zahrnuje interakci DNA s povrchem buňky, difúze DNA indukovaná elektrickým polem a pasivní difúze. Aplikace elektrického pole není podmínkou přenosu DNA, proces ale urychluje.

2.5.5 Syntetické komplexy DNA-ligand

DNA kondenzuje s polykationtem - poly-L-lysinem. Polykationt se váže jak s DNA, tak s ligandem. Vytvoří se komplex DNA-polykationt-ligand. Ligand je specifický pro povrchový receptor buňky a je zodpovědný za počáteční interakci komplexu s buňkou.

DNA je možné přenést také pomocí polymerního kationtu (DEAE-dextran, PEI), který asociuje se záporně nabitými molekulami DNA. Vzniklý komplex je kladně nabitý a váže se na záporně nabitou lipidovou dvojvrstvu. Následuje přenos komplexu pomocí endocytózy. [6]

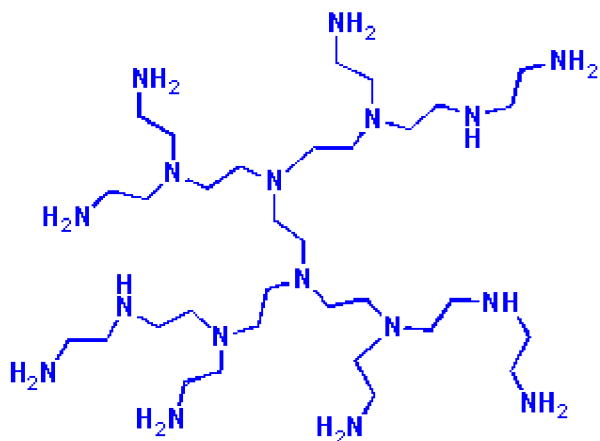
2.5.5.1 Polyethylenimin (PEI)



Obr. 4: Vzorec polyethyleniminu, zdroj internet: <http://commons.wikimedia.org/>

Polyethylenimin je polymerní sloučenina, jejíž základní jednotkou je ethylenimin. PEI se může vyskytovat jako lineární forma, která se nachází při pokojové teplotě v pevném stavu. Druhou formou je rozvětvený polyethylenimin, který je tekutý. Oba typy PEI se používají jako transfekční činidlo s různým stupněm polymerace a různou molekulovou hmotností. V roce 1995 byl PEI poprvé použit pro přenos DNA. [7]

Molekula PEI má pufrovací schopnosti. Rozvětvená forma tvoří primární, sekundární a terciální aminy. Atomy dusíku obsažené v molekule PEI mohou být protonovány, což udílí molekule náboj. Čím více atomů dusíku je v molekule obsaženo, tím je větší náboj. Informace o celkové pufrovací kapacitě je důležitější než určení disociační konstanty pKa molekuly polyethyleniminu. [2] [8]



Obr. 5: Rozvětvený polyethylenimin, zdroj internet: <http://www.hyperpolymers.com/>

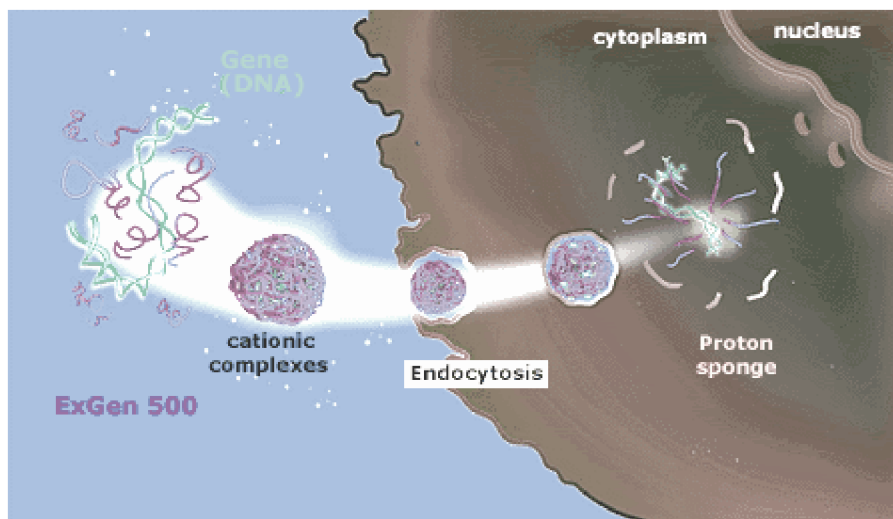
Před samotnou transfekcí se připraví roztoky DNA a PEI o přesné koncentraci a roztoky se smíchají. Poté dojde ke kondenzaci molekul a vzniku komplexu DNA/PEI na základě hydrofobních interakcí. [10] Komplexy DNA/PEI se shluknou k sobě a vzniknou kladně nabitě nanočástice. Nanočástice se poté naváží na buněčné záporně nabitě proteoglykany a glykoproteiny na povrchu buněčné membrány. [11] Dvnitř buněk pronikají pomocí endocytózy. PEI chrání endozóm před působením lysozomálních nukleáz. Uvnitř buňky se uvolní DNA z endozómu díky pufovací schopnosti PEI tím, že absorbuje protony při acidifikaci endozómu – tzv. houbový protonový efekt. [12] To vede k nahromadění kladného náboje, což způsobí influx chloridových aniontů a vody do endozómu. Endozóm nabobtná, uvnitř se zvyšuje osmotický tlak, což vede k prasknutí endozómu. [13]

Této domněnce však odporuje skutečnost, že v komplexu DNA/PEI je asi 85% molekul PEI volných [14], a také pKa PEI je přibližně 8,4 [15], takže po acidifikaci má PEI jen malou pufovací kapacitu. Z těchto důvodů je nepravděpodobné, že osmotické pnutí hraje významnou roli při prasknutí endozómu. [14]

Existuje teorie, že komplex DNA/PEI je transportován pomocí mikrotubulů k jádru, kde se část komplexu rozpadne díky přítomnosti RNA. RNA má vyšší afinitu k PEI než DNA. [10] DNA pak samostatně přechází přes jadernou membránu a poté se v jádře začlení do chromozomu. Mechanismus těchto pochodů není zatím zcela objasněn. [14] [16]

V průběhu transfekce a uvolnění DNA z komplexu záleží na předem zvoleném poměru DNA:PEI.

Pomocí AFM (atomic force microscopy – mikroskopie atomárních sil) byly studovány velikosti komplexu DNA/PEI. Velikost byla stanovena na 20 až 40 nm. Přesné poměrové zastoupení DNA v komplexech DNA/PEI zatím není známo. Transfekce pomocí PEI byly testovány v různých objem. [7] [17] [18]



Obr. 6: Schéma přenosu DNA do jádra buňky, zdroj Internet: <http://www.biomol.de/>

2.6 Hostitelské buňky a organismy

Při výběru hostitelského organismu je potřeba zvážit, zda chceme klonovat geny prokaryotní, nebo eukaryotní. Při expresi eukaryotních genů hostitelská buňka zajistí všechny posttranskripční a posttranslační úpravy. Vzniklý protein je často identický s přirozeně se vyskytujícím a je biologicky aktivní.

2.6.1 Prokaryotní buňky

Nejdetailněji prostudovaný organismus, který se používá pro klonování genů je *Escherichia coli*. Výhodou je vysoká účinnost transformace a fakt, že existuje řada expresních vektorů s regulovatelnými promotory funkčních v *E. coli*. Nevýhodou je, že řada cizorodých proteinů se nevytváří ve funkční podobě.

Jako další hostitelské organismy z řady G - bakterií se využívá *Bacillus sp.* Tyto nepatogenní mikroorganismy produkují množství extracelulárních enzymů, které lze lehce izolovat z média. Snadno se kultivují a adaptují na řadu podmínek kultivace. Lze připravit řadu mutantů hyperprodukcující enzymy i jiné látky.

2.6.2 Kvasníky

Jedná se o jednobuněčné eukaryotní organismy. Řada kvasinkových genů je homologních s geny mnohobuněčných eukaryotních organismů, mají podobnou buněčnou biochemii a regulaci genů. U kvasinek lze stanovit dominanci a recesivitu alel. Mají krátkou generační dobu a vysoký počet jedinců, kultivují se na definovaných půdách a také ve velkokapacitních bioreaktorech. Jsou považovány za bezpečný (GRAS – generally recognised as safe) biotechnologický organismus, což umožňuje přípravu léčiv pro humánní medicínu. Tvoří eukaryotické proteiny v aktivní podobě, lze dosáhnout sekrece do prostředí. K nejčastěji

používaným druhům patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* a *Hansenula polymorpha*. [4] [5]

2.6.3 Rostliny

Výhodou rostlin při genetických manipulacích je totipotence, což znamená, že celou rostlinu můžeme vypěstovat z jakékoliv její části. Mezi další výhody se řadí schopnost regenerace, velký počet semen, krátká generační doba a asexuální křížení. Rostlinné biochemické dráhy poskytují průmyslové suroviny a léčiva. Modelovým organismem pro účely molekulární genetiky je *Arabidopsis thaliana*.

Jednou z možností přenosu cizorodé DNA je přenos pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie přirozeně infikuje rostliny a vnese do nich Ti-plazmidy (tumor indukující plazmidy) obsahující cílové sekvence. [5]

2.6.4 Živočišné buňky

Jsou izolovány z tkání živočichů a poté kultivovány in vitro. Při kultivaci je nutné zajistit podmínky, které se podobají přirozeným, proto se udržují při teplotě 37°C a v modifikované atmosféře (5% CO₂). Veškeré manipulace s buňkami musí být prováděny ve sterilním prostředí. Většina buněk roste přisedlá k pevnému povrchu, jako v původní tkáni. K růstu je nutné použít kultivační médium, které buňkám dodává potřebné živiny a další pro život důležité látky.

K nejčastěji používaným patří CHO (Chinese Hamster ovary) – buňky původně izolované z křeččích vajíček a 3T3 – buňky z myších vajíček.

HEK 293 (humam embryonal kidney) – epiteliální lidské ledvinové buňky a HeLa (Henrietta Lacks) – epiteliální buňky z rakovinných buněk. [2] [19]

2.6.4.1 Buňky 293HEK/EBNA1

Tyto buňky byly poprvé připraveny roku 1970 v laboratoři Alexe van der Eba v holandském Leidenu. Byl získány ze zdravých potracených lidských plodů a poprvé kultivovány jako primární HEK buňky. Později byly upraveny pomocí pěti adenovirových genů. [20] Zkratka HEK označuje lidské embryonální ledvinové buňky a číslo 293 označuje 293. Grahamův pokus.

Tyto buňky se dobře kultivují a probíhá u nich relativně snadná transfekce, proto se využívají ke tvorbě rekombinantních proteinů. Protože se jedná o lidské buňky, jsou u exprese zajištěny správné posttranskripční a posttranslační modifikace. Jsou tedy vhodné pro klinický výzkum i pro tvorbu lidských terapeutik.

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů

do dceřinných buněk při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22] V dnešní době jsou buňky 293HEK/EBNA nejvíce používané buňky pro velkoobjemovou transienční expresi. [2]

2.7 Reportérové geny

Expresi těchto genů lze snadno detekovat a kvantitativně stanovit. Mohou tudíž sloužit jako měřítko exprese transgenů s různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypch a za různých podmínek.

2.7.1 Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu

Chloramfenikoltransferáza je bakteriální enzym, který nezpůsobuje rezistenci k chloramfenikolu, protože se používá u eukaryotních buněk, které jsou přirozeně rezistentní. Tento enzym acetyluje 14C-chloramfenikol. Po přidání extraktu z rostlin se značený chloramfenikol přeměňuje na značený acetylovaný chloramfenikol, který lze chromatograficky stanovit. Výsledek je možné hodnotit kvantitativně.

2.7.2 Transgen pro β -glukuronidázu

Jedná se o bakteriální enzym *E. coli*, který se označuje jako GUS. Zatím nejúspěšnější transgen používaný při tvorbě transgenních rostlin. Tento enzym mění vhodné substráty na modré produkty nebo fluoreskující látky. Existují dvě metody detekce aktivity.

Fluorescenční metoda, která se provádí v homogenátu se substrátem MUG (4-metyl umbelliferyl glukuronid). Po ozáření rozloženého MUG dlouhovlnným UV 365 nm dává modrou fluorescenci 570 nm.

Druhá metoda je histochemická. Používá se chromogenní substrát X-gluc (glukuronid), který po rozštěpení dává modrou barvu, která je nerozpustná a zůstává v buňkách.

2.7.3 Transgen pro luciferázu

Využívají se cDNA ze světlušky *Photinus pyralis* nebo kódující sekvence G - bakterie *Vibrio harvei*. Po dodání substrátu (luciferin, ATP) k buněčnému extraktu, nebo do kultivačního média dochází k emisi záření měřitelného luminometrem, scintilačním počítačem, nebo CCD kamerou. Nevýhodou je, že substrát je poměrně drahý.

2.7.4 Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)

Jedná se o gen z medúzy *Aequorea victoria*. Protein GFP přeměňuje modré světlo na zelené. Má schopnost emitovat zelené světlo po ozáření modrým světlem (440-480 nm). Je to jediný protein, který má schopnost fluoreskovat bez dodání substrátu nebo kofaktorů. Zachovává si schopnost fluoreskovat, i když je fúzován s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i N-konci. Mutacemi byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou vlnovou délku. [5]

2.7.5 Transgen pro alkalickou fosfatázu

Alkalická fosfatáza (ALP) je hydrolytický enzym optimálně působící při alkalickém pH, vyskytuje se v krvi v mnoha různých formách, které se vytváří v kostech a v játrech, ale i v jiných tkáních, jako např. v ledvinách, placentě, střevech, varlatech, brzlíku, plicích a tumorech. Fyziologické zvýšení ALP se vyskytují i u dětí při růstu kostí, v těhotenství, zatímco patologická zvýšení většinou souvisí s hepatobiliárním procesem a s kostním onemocněním. U hepatobiliárního onemocnění ukazuje na obstrukci žlučovodu, jako např. u cholesterázy vyvolané žlučovými kameny, nádory nebo zánětem. U kostních onemocnění je zvýšená činnost ALP vyvolána zvýšenou osteoblastickou činností, jako např. u Pagetovy nemoci, při měknutí kostí (rachitidě), kostních metastázích a hyperparatyreoidismu.

Za gen zájmu byl zařazen reportérový gen pro alkalickou fosfatázu, což je snadno detekovatelný protein. K buněčné suspenzi se přidává substrát, který je účinkem alkalické fosfatázy změněn na produkt. Tato reakce je provázena barevnou změnou a intenzita zbarvení je změřena fotometricky.

2.8 Transientní (přechodná) transfekce

Transientní transfekce se využívá k produkci rekombinantních proteinů. Výhodou přechodné transfekce je rychlost produkce r-proteinů.

Při přechodné transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. DNA se nepřenáší při mitóze na dceřinné buňky, tudíž je transientní transfekce časově omezená. Výtěžky této transfekce se řádově pohybují v miligramech až gramech.

Pro transientní transfekci do savčích buněk může být jako transfekční činidlo použit fosforečnan vápenatý, [23] nebo polyethylenimin. [24] Transfekce probíhá buď v malých objemech buněčné suspenze (ml), nebo v bioreaktorech, které dosahují objemů o velikosti až stovek litrů. Pátý až desátý den po provedení transfekce dochází k produkci několik miligramů až gramů r-proteinu. [17] [22] [18] [25] [26]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Chemikálie

Tab. 3: Použité chemikálie:

Plasmidové DNA: pCEP4, peBSV, pcDNA3,1, pcDNA 5, pCI, pEAK 8 , přečištěné
Polyethylenimin (PEI), lineární (1 mg/mL)
Fosfátový pufr (PBS)
DMEM/F-12 médium Biovendor
DMEM/F-12 médium Biowest
FCS (telecí sérum)
BV 293s médium
HYclone médium (CDM4 293)
Glukóza (25 %)
L-glutamin (2 mM)
HS (koňské sérum)
DMSO (dimethyl sulfoxid)
Trypsin (EDTA)
PBS pH 7,6 ± 0,2 (NaCl 7,75g; K ₂ HPO ₄ 1,50g; KH ₂ PO ₄ 0,20g v 1 l destilované vodě)
NaCl (150 mM)
Geneticin G418 (100 mg/ml)
Ampicilin (200 mg/ml)
Trypanová modř (0,4 % w/v)
PEI – polyethylenimin (1 mg/ml)
Pluronic (1% w/v)
Kit pro izolaci DNA
Kit pro stanovení alkalické fosfatázy

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Tab. 4: Použité přístroje a pomůcky

Laminární box pro sterilní práci
Centrifuga
Humidifikovaný CO ₂ inkubátor (5% CO ₂ , 37°C)
Orbitální třepačka
Spektrofotometr
Světelný mikroskop
Přístroj pro gelovou elektroforézu
Kultivační láhve T-75 cm ²
Sérologické pipety 1, 2, 5, 10, 25 ml
Mikropipety
Kryovialky na zamrazování
Jednorázové tuby 12–50 ml
Jednorázové zkumavky eppendorf
Sterilní rukavice
Sterilní filtry a dávkovače

3.1.3 Buňky a kultivační média

Pro tento experiment byly použity buňky 293HEK/EBNA1. Jak už bylo uvedeno v teoretické části, jedná se o lidské ledvinové buňky získané z potracených plodů. Do genomu těchto buněk byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transienční transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřinných buněk při buněčném dělení. [22]

Tyto buňky se snadno kultivují. Kultivace probíhá ve dvou fázích. Zpočátku se provádí kultivace v kultivačních lahvích T-75, kdy jsou buňky přisedlé na dně nádoby. Jako médium se používá DMEM/F-12 s 10% přidavkem telecího séra (FCS). Sérum udrží buňky přisedlé na dně nádoby. Jakmile buňky dosáhnou 80–90% konfluence pasážují se, rozsazují se do dalších lahví.

Druhou fází je suspenzní kultivace. Pro tuto kultivaci je používáno BV 293s médium s 1% přidavkem séra, nebo se kultivuje bezsérově. Buňky se uchovávají ve čtyřhranných skleněných lahvích. Důležité je zvolit správný objem, který činí asi 30% z objemu láhve, aby bylo zajištěno optimální množství kyslíku. Láhve se umísťují na orbitální třepačku, aby se buňky neshlukovaly, umístěnou v humidifikovaném inkubátoru. Rychlost rotace se pohybuje kolem 100 – 250 rpm při průměru otáčení 1,2; 2,5 a 5 cm. Po celou dobu kultivace se sleduje počet buněk a jejich nárůst. Odebírají se vzorky a pomocí trypanové modře a Bürknerovi komůrky se buňky spočítají. Jakmile buňky dosáhnou exponenciální fáze růstu, jsou připraveny pro transfekci. Pokud se počet buněk zdvojnásobí za 24 hod, jsou buňky v exponenciální fázi.



Obr. 7: Kultivační média (Lonza), zdroj internet: <http://www.eastport.cz/>

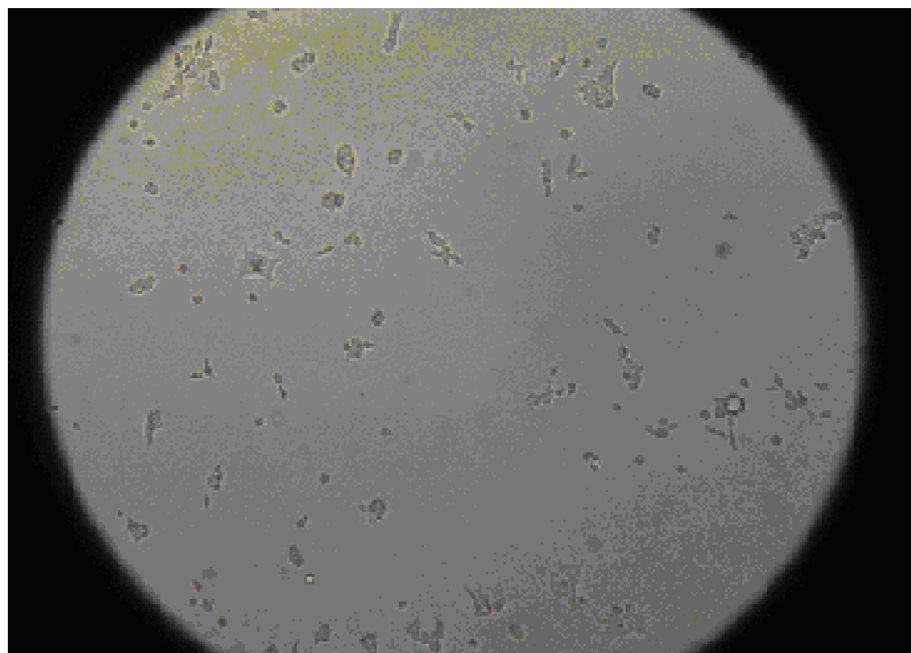
3.1.4 Metody

Rozmražení buněk a kultivace
Pasážování a zamražení buněk
Počítání buněk pomocí trypanové modři
Převedení na suspenzní linii
Izolace a purifikace plasmidové DNA
Metoda transfekce 1 - Muller (2005)
Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)
Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)
Stanovení exprese reportérového genu

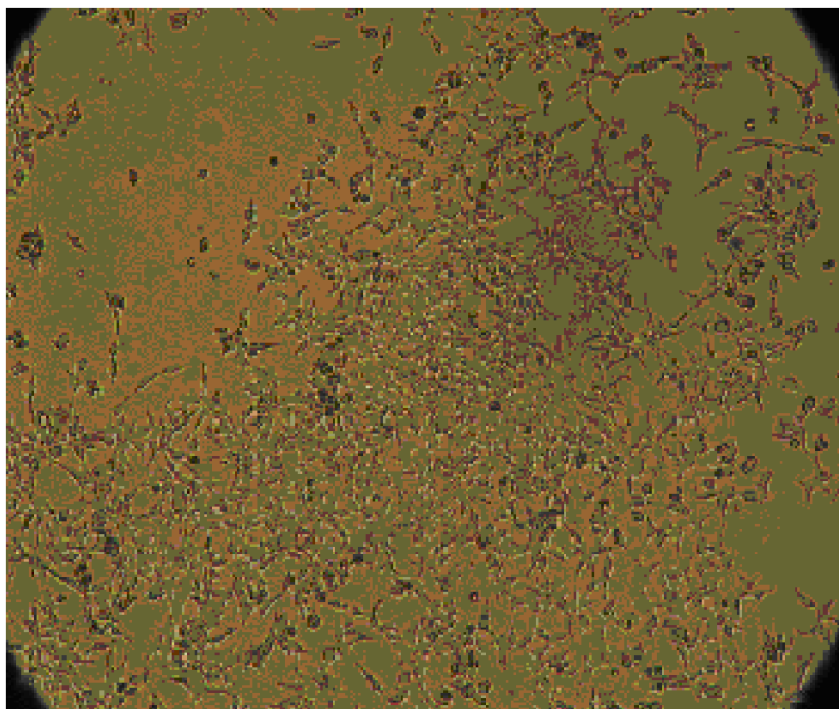
3.1.5 Rozmražení buněk a kultivace

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou dlouhodobě skladovány při nízkých teplotách (-196°C) pod tekutým dusíkem v kryogenním boxu.

Předem bylo připraveno 12 ml kompletního vyhřátého média do T-75 (75 cm²) kultivačních lahví, DMEM/F-12 s přidavkem 10% FCS, aby buňky přisedly ke dnu. Po 2 – 4 hod bylo vyměněno médium za nové kompletní médium, aby se z původního média odstranily zbytky zamrazovacího média dimethyl sulfoxid (DMSO), které je pro buňky toxické. Po 24 hod bylo staré médium odsáto a nahrazeno novým kompletním médiem s přidavkem antibiotika G418 (geneticin). Přidává se 250 µg na 1 ml. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ v humidifikovaném inkubátoru dokud nedosáhly 80-90 % konfluence (normálně 4 – 7 dní).



Obr. 8: Buňky po rozmražení



Obr. 9: Buňky HEK293 EBNA1 3. den po rozmražení

3.1.6 Pasážování a zamražení buněk

Po dosažení 80-90% konfluence bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidávkem 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné membrány.

Pro další kultivaci v T-75 lahvích bylo odebráno 0,25 – 1 ml ztrypsinizovaných buněk a přidáno do nové lahve T-75 s 15 – 20 ml kompletního média s antibiotiky.

Zbylá ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a RT. Byl odsát supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v předem na ledu vychlazeném zamrazovacím médiu (9 ml DMEM/F-12 s 10% FCS + 1 ml DMSO). Buněčná suspenze byla rozpipetována do kryovialek, které byly ihned postaveny do ledu. Poté byly kryovialky zabaleny do vrstvy buničiny, obaleny alobalem a přemístěny do mrazáku s teplotou - 80 °C. Po 24 hod byl rozmražen kontrolní vzorek, zda byly buňky správně zamraženy. Pokud bylo zamražení úspěšné, byly buňky přesunuty do kryogenního boxu.

3.1.7 Počítání buněk pomocí trypanové modři

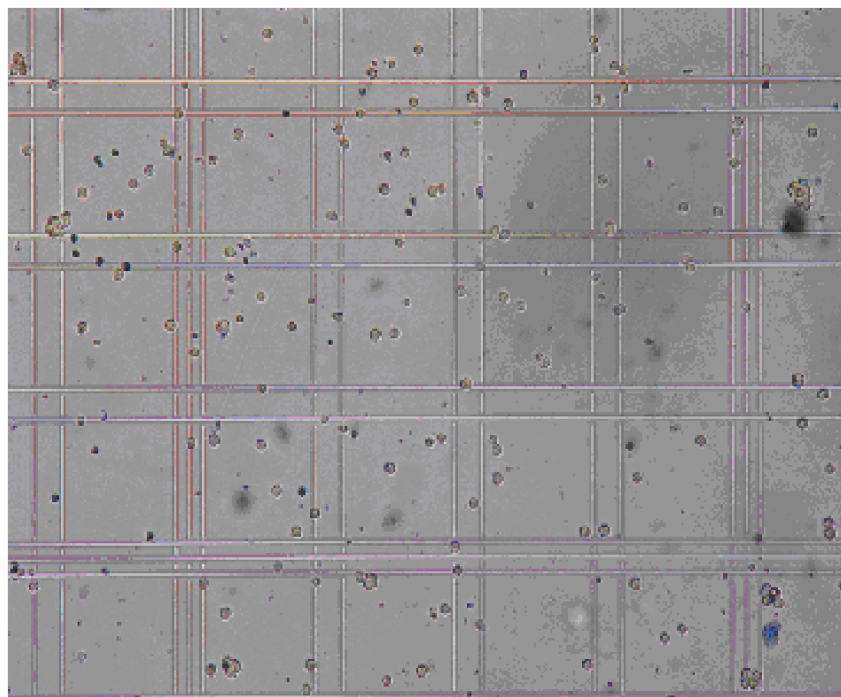
Bylo odebráno 100 μl z buněčné suspenze. Pomocí vortexu byly rozbity shluky buněk a bylo přidáno 100 μl 0,4% roztoku trypanové modře. Vše bylo řádně promícháno a suspenze byla inkubována po dobu asi 5 min. Do Bürkerovy komůrky s přikolopeným podložním sklíčkem byl napipetován vzorek a pod mikroskopem byly spočítány živé (žluté) a mrtvé (modré) buňky v 10 čtvercích a na levé a horní hranici čtverce. Počet buněk byl spočítán podle vzorce:

$$X = x \cdot 2 \cdot 2,5$$

X - denzita buněk v 1 ml

x – počet buněk v 10 čtvercích

(2 – vztaženo na ředění buněčné suspenze: trypanové modři = 1:1; 2,5 – vztaženo na rozměr jednoho čtverce)



Obr. 10: Počítání buněk v Bürkerově komůrce (hemocytometr) – žluté (živé) a modré (mrtvé) buňky

3.1.8 Převedení na suspenzní linii

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, který byl předem vyhřát na pokojovou teplotu, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován

pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné stěny.

Ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a při pokojové teplotě (RT – room temperature).

Poté byl odsát supernatant a bylo přidáno 20 ml BV 293s s 1% přidáním HS a buňky byly resuspendovány. Zpočátku byly buňky kultivovány v T-75 kultivačních lahvích v 20 ml média a po dosažení 90% konfluency byly zbaveny média se sérem a resuspendovány v čerstvém médiu bez séra. Poté přesazeny do 250ml čtyřhranných skleněných lahví s 50 ml média. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku o rychlosti míchání cca 100 rpm při průměru rotace 2,5 cm. Byl sledován počet buněk a s růstem počtu buněk bylo postupně navyšováno množství kultivačního média. Konečný objem buněčné suspenze byl 400 ml, kdy buňky byly kultivovány v 11 čtyřhranných skleněných lahvích. Denzita buněk se udržovala do 4 miliónů/ml a obsah HS se postupně snižoval až na nulu. Do kultivačního média bylo přidáváno antibiotikum – geneticin, který zajišťoval selekci buněk. Přídavek geneticinu do kultivačního média byl 250 µg/ml.

3.1.9 Izolace a purifikace plasmidové DNA

Byly izolovány plasmidové DNA pro pozdější transfekce: pEAK 8, pCEP4, pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, pBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1, což je gen kódující epitop Epstein-Barr viru (EB viru), sekvence ori P odpovídající počtu replikací EB viru a reportérový gen pro alkalickou fosfatázu.

Na izolaci byl použit kit Genomed pro izolaci plasmidové DNA.

Na Petriho misku byla zaočkována kultura *Escherichia coli* pomocí křížového roztěru a ponechána v termostatu (37°C). Po narostení kultury byla pomocí předem vyžíhané kličky přenesena jedna kolonie do 10 ml LB média s přidáním ampicilinu. Suspenze byla inkubována po dobu 24 hod na třepačce (220 rpm, rotační průměr 1,2 cm) při teplotě 37 °C – startovací kultura.

Po 24 hod byla kultura přesazena do 400 ml LB média s přidáním ampicilinu v poměru 1:1000, tedy 400 µl.

Další den byla změřena optická denzita (OD₆₀₀) suspenze a vypočten objem (V) pro izolaci každého plasmidu.

$$V[ml] = \frac{1200}{OD_{600}}$$

Vypočtený objem suspenze byl centrifugován za podmínek: 4 °C, 8000g po dobu 10 min. Buněčný pelet byl resuspendován 12 ml E1 pufru (složení viz. Přílohy) s přidáním Rnázy. Poté bylo přidáno 12 ml lyzačního pufru E2 do tuby obsahující buněčnou suspenzi a vše bylo promícháno lehkým otáčením tuby. Po 4 min byla lýze buněk zastavena přidáním neutralizačního E3 pufru a obsah tuby byly opět promíchány lehkým přetáčením. Tímto byly buňky permeabilizovány a dezintegrovány.

Suspenze byla nanášena na kolonu, která byla předem ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru E4. Po prokápání roztoku kolonou byl na filtr opět nanášen ekvilibrační pufr E4. Přímou

na kolonu bylo nanášeno 25 ml wash pufru E5 pro promytí kolony. Po promytí bylo použito 15 ml elučního pufru E6 a eluát byl jímán do tuby.

Během procesu lze provést tři kontroly na přítomnost DNA v roztoku pod kolonou a to po přidavku neutralizačního pufru E3, nebo po přidavku wash pufru E5, kdy kontroly na přítomnost DNA vychází negativně, nebo po přidavku elučního pufru E6, kdy kontrola vyjde pozitivně.

Poté bylo k eluátu přidáno 10,5 ml isopropanolu. Směs byla pořádně protřepána a centrifugována po dobu 45 min při 4°C a 8000 g. Poté byl slit supernatant a pelet byl převeden do 5 ml 70% ethanolu na přečištění, a dále byl centrifugován po dobu 10 min při RT a 10 000 g. Po centrifugaci byl pomocí pipety odsát ethanol a pelet byl vysušen proudem vzduch do doby, kdy bílá barva peletu byla změněna na sklovitou. Poté byla usazenina rozpuštěna v 200 µl TE pufru.

Vzorek byl zfiltrován pomocí sterilního filtru o velikosti pórů 0,2 µm a naředěn sterilním TE puftrem na koncentraci 500 µg/ml. K filtraci byly použity i sterilní kolonky, kdy byl vzorek nanášen na povrch kolonky a kolonky byla umístěn do odstředivky. Podmínky centrifugace: 1 - 4 min, 12 000 g. Pokud veškerý roztok DNA neprošel přes kolonku, byla centrifugace opakována.

Dále byla u vzorku změřena koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru a vzorek byl nanášen na agarózový gel a byla provedena kontrola čistoty na gelu.

Čistota vzorku by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 – 1,9. Pokud je čistota nižší než 1,8, vzorek je kontaminován proteiny. Pokud je čistota větší než 2, vzorek je kontaminován RNA. V případě kontaminace musí být vzorek purifikován a to opakováním posledních kroků izolace po eluci.

Sterilní vzorek byl uskladněn v lednici, ale pokud se jednalo o dlouhodobé uskladnění (déle než 3 dny) byl umístěn do mrazáku (-80°C).

3.1.10 Plazmidy

Na následujících obrázcích (*Obr. 11-16*) jsou uvedené plazmidy, které byly použity v pokusu – volba plazmidu, metoda Muller (2005).

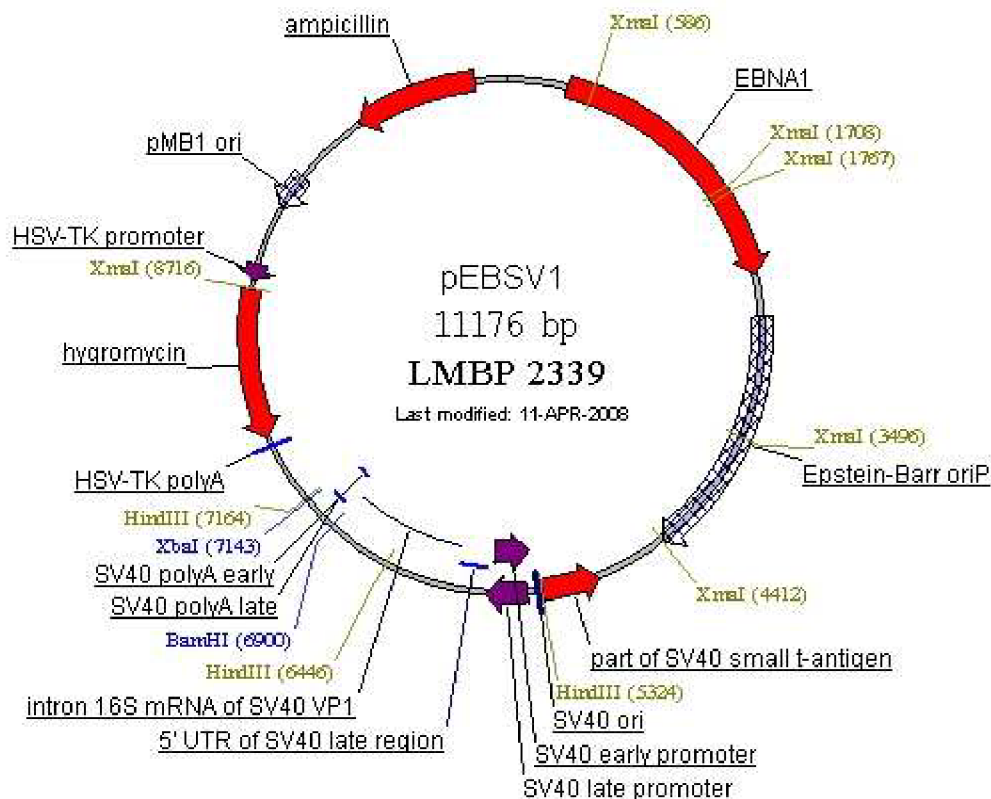
Tyto plazmidy jsou funkční jak v prokaryotních, tak i v eukaryotních buňkách. Jedná se tedy o kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje ori sekvenci a selekční marker funkční (rezistence na ampicilin) v *E. coli*. Dále obsahuje ori sekvenci, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS. Každý vektor obsahuje cílová místa pro restriční endonukleázy (např. Hind III, BamHI).

Jako hostitelské buňky byly zvoleny buňky 293HEK/EBNA1. Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukariotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřiných buněk

při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22]

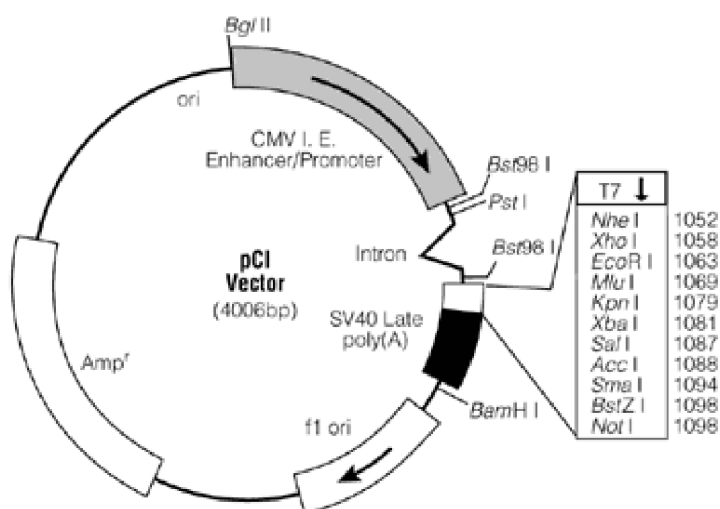
Níže jsou uvedené plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1 a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

3.1.10.1 Plazmid peBSV1/SEAP



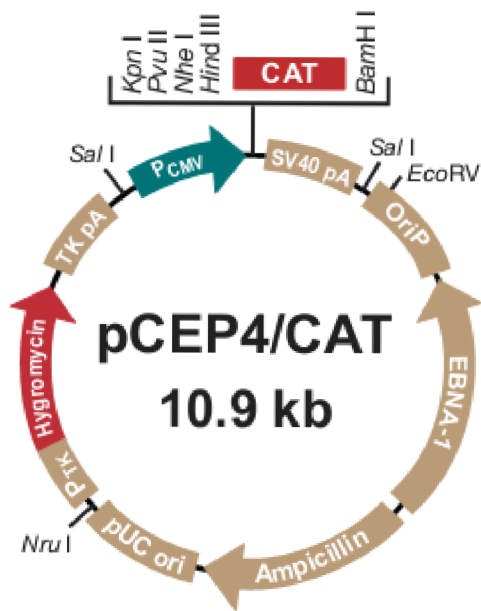
Obr. 11: Mapa plazmidu pEBSV1/SEAP, zdroj internet: <http://bccm.belspo.be/>

3.1.10.2 Plazmid pCI/SEAP



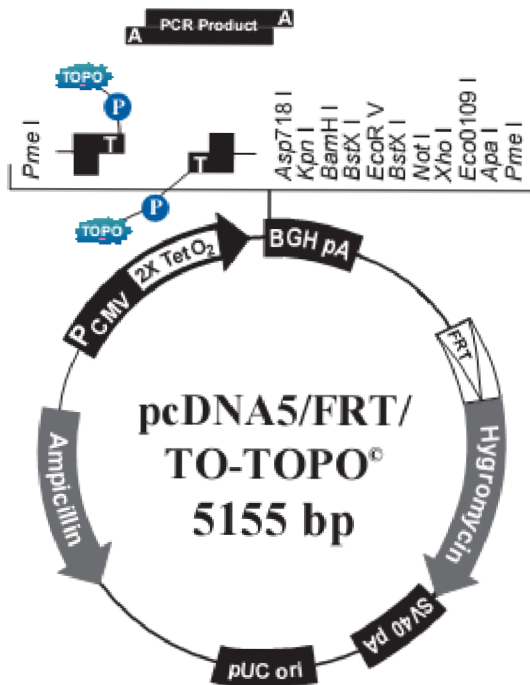
Obr. 12: Mapa plazmidu pCI/SEAP, zdroj internet: <http://www.promega.com/>

3.1.10.3 Plazmid pCEP4/SEAP



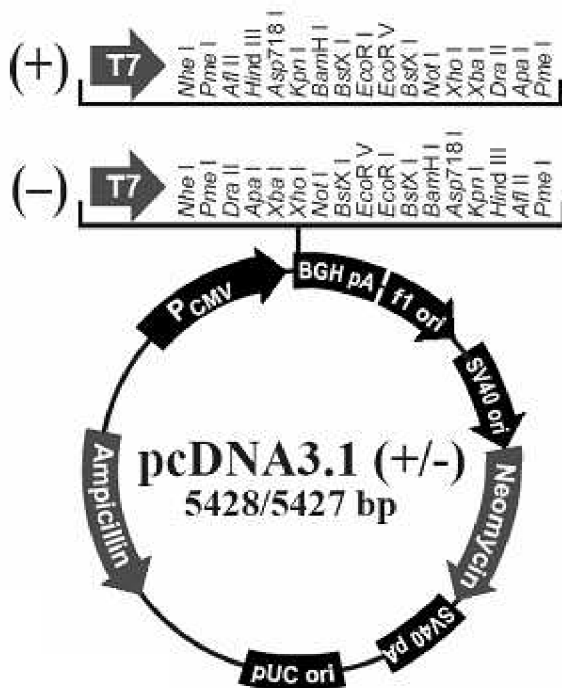
Obr. 13: Mapa plazmidu pCEP4/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.4 Plazmid pcDNA5/FTR/TO-TOPO/SEAP



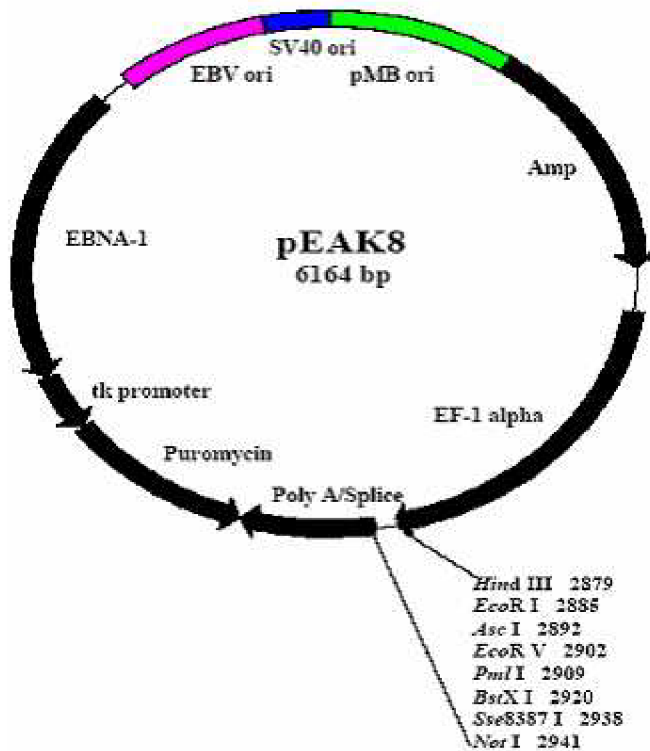
Obr. 14: Mapa plazmidu pcDNA5/FRT/TO-TOPO/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.5 Plazmid pcDNA 3.1/SEAP



Obr. 15: Mapa plazmidu pcDNA 3.1/SEAP [2]

3.1.10.6 Plazmid pEAK8/SEAP



Obr. 16: Mapa plazmidu pEAK8/SEAP [2]

3.1.11 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Jedná se o transfekční metodu při nízké buněčné denzitě s výměnou média před transfekcí. Byla použita buněčná suspenze (400 ml) tvořena buňkami HEK 293/EBNA, které byly kultivovány v BV 293s médiu.

Podmínka: buňky double time (čas zdvojnásobení počtu buněk) = 24 hod

Transfekce byla prováděna ve 100ml čtyřhraných lahvích.

Nejprve byly spočítány buňky, které poté byly centrifugovány (5 min, 500 rpm, RT). Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky byly resuspendovány ve 300 ml nového BV293s média. Suspenze byla rozpipetována do 100ml flašek po 20 ml.

V každé lahvi byly spočítány buňky.

Poté byla připravena transfekční směs v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, kdy finální koncentrace DNA v 20 ml média byla 2,5 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 2 ml : 20 ml

Původní koncentrace roztoku DNA byla 500 µg/ml a PEI 1mg/ml. Roztoky DNA a PEI byly zředěny na dané koncentrace pomocí 150mM roztoku NaCl.

Po smíchání PEI a DNA byla směs promíchána a doba inkubace byla 10 min. Poté bylo přidáno 2 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 160 rpm, rotační průměr 2,5 cm) a buňky byly inkubovány za podmínek 37°C, 5 % CO₂ . Po 4 hodinách bylo do každé láhve přidáno 20 ml předem vyhřátého média BV 293s.

Po transfekci byly každý den odebírány vzorky 100 µl a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.12 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Metoda Durocher je transfekční metoda s nízkou buněčnou denzitou bez výměny média před transfekcí.

Pokus byl proveden v 250ml čtyřhraných lahvích.

Podmínka: buňky double time = 24 hod

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk. Počet se pohyboval kolem 1 miliónů/ml. Z 0,5l zásobní láhve obsahující 200 ml buněčné suspenze bylo odebráno 100 ml a rozpipetováno do 250ml lahví po 22,5 ml a poté bylo do každé láhve přidáno 22,5 ml média (do transfekce v médiu s 1% koňského séra bylo přidáno odpovídné množství séra).

V každé láhvi byl spočítán počet buněk. Denzita buněčné suspenze byla přibližně 0,5 miliónů/ml. Láhve byly umístěny přes noc na třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

V den transfekce byl v každé láhvi spočítán počet buněk a byla připravena transfekční směs. Složení transfekční směsi bylo v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, přičemž finální koncentrace DNA v 50 ml byla 1 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 5 ml : 50 ml.

Po smíchání PEI a DNA byla směs vortexována 5 s a poté byla inkubována 15 min při RT. Po inkubaci bylo přidáno 5 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí a láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

Vzorky byly odebírány 5. a 7. den, min. 100 μ l a zamraženy se při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.13 Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)

Jedná se o metodu transfekce s buněčnou suspenzí o vysoké denzitě s výměnou média před transfekcí.

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk a buněčná suspenze byla naředěna na polovinu.

V den transfekce byl opět spočítán počet buněk v zásobní láhvi a poté byla ze zásobní láhve odebrána buněčná suspenze a rozpipetována do 12 falkon po 10 ml. Poté byla buněčná suspenze centrifugována při 100g po dobu 5 min. Po centrifugaci byl odsát supernatant a do každé falkony byl přidán 1 ml čerstvého média: DMEM/F12 - Biowest (s přidaným L-Glutaminem a Glukózou) + 0,1% Pluronic. Před použitím bylo médium s přídavkem Pluronicu zfiltrováno. Z původního objemu 10 ml byl objem snížen na 1 ml, čímž vznikla buněčná suspenze o vysoké hustotě.

V tomto pokuse byly provedeny 3 variant o různých koncentracích DNA (15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) a k ním dvojnásobných množství PEI.

K jednomililitrovým buněčným suspenzím byly přidány příslušné množství DNA a poté PEI. Směs byla inkubována po dobu 4 hod při teplotě 37°C na orbitální třepačce (250 rpm, rotační průměr 1,2 cm). Po 4 hodinách bylo do každé falkony přidáno 9 ml média HYclone. U 4. varianty bylo do média HYclone přidáno příslušně množství valproové kyseliny a u 5. varianty butyrátu sodného. Do kontrolních falkon nebyla nepřidána transfekční směs.

Vzorky byly odebírány 5., 7., 11. a 14. den, a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.14 Stanovení exprese reportérového genu

Metoda:

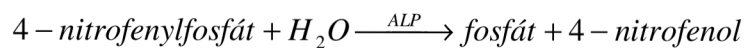
Kinetické fotometrické stanovení v souladu s International federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).

Aktivita SEAP byla zjišťována pomocí kitu pro stanovení alkalické fosfatázy. Reakční směs, substrát pro alkalickou fosfatázu, vznikla smícháním roztoků R1 a R2.

Z odebraného vzorku bylo pipetováno 4 μ l do 96ti jamkové desky, a poté bylo přidáno 200 μ l reakční směsi. Po minutové inkubaci byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 405 nm v časech 0, 1, 2 a 3 minuty. Data byla shromažďována pomocí programu Gen5 (Biotek).

Koncentrace exprimovaného proteinu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky sestavené na základě měření absorbance roztoků standardů (STD). Byly použity naředěné standardy o koncentraci SEAP: 1,92 mg/l (6000x), 1,44 mg/l (8000x), 1,15 mg/l (10 000x) a 0,96 mg/l (12 000x). [2]

Princip:



Složení a koncentrace roztoků

R1:

2-amino-2-methyl-1-propanol, octan hořečnatý, síran zinečnatý, EDTA

R2:

4-nitrofenylfosfát

Činidla smíchat v poměru 4 : 1 = R1 : R2, směsné činidlo je stabilní 4 týdny při 2 – 8°C nebo 5 dní při 15 – 25°C. Monoreagent chránit před světlem.

Výpočet

$$c_{ALP} = c_{St} \cdot (\Delta A_s / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) / (\Delta A_{st} / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) \quad [\mu\text{kat} / l]$$

c_{st}katalytická koncentrace standardu uvedená v atestu [$\mu\text{kat}/l$]

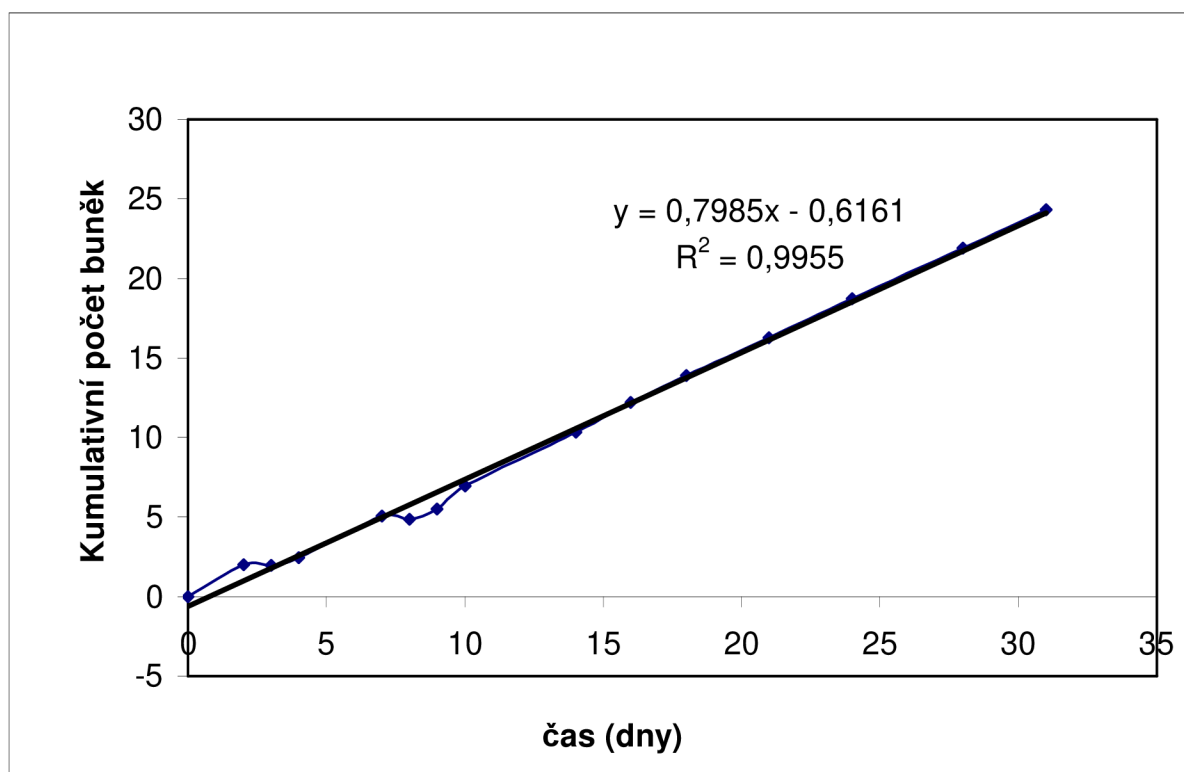
A_sabsorbance vzorku

A_{st}absorbance standardu

A_{bl}absorbance blanku

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

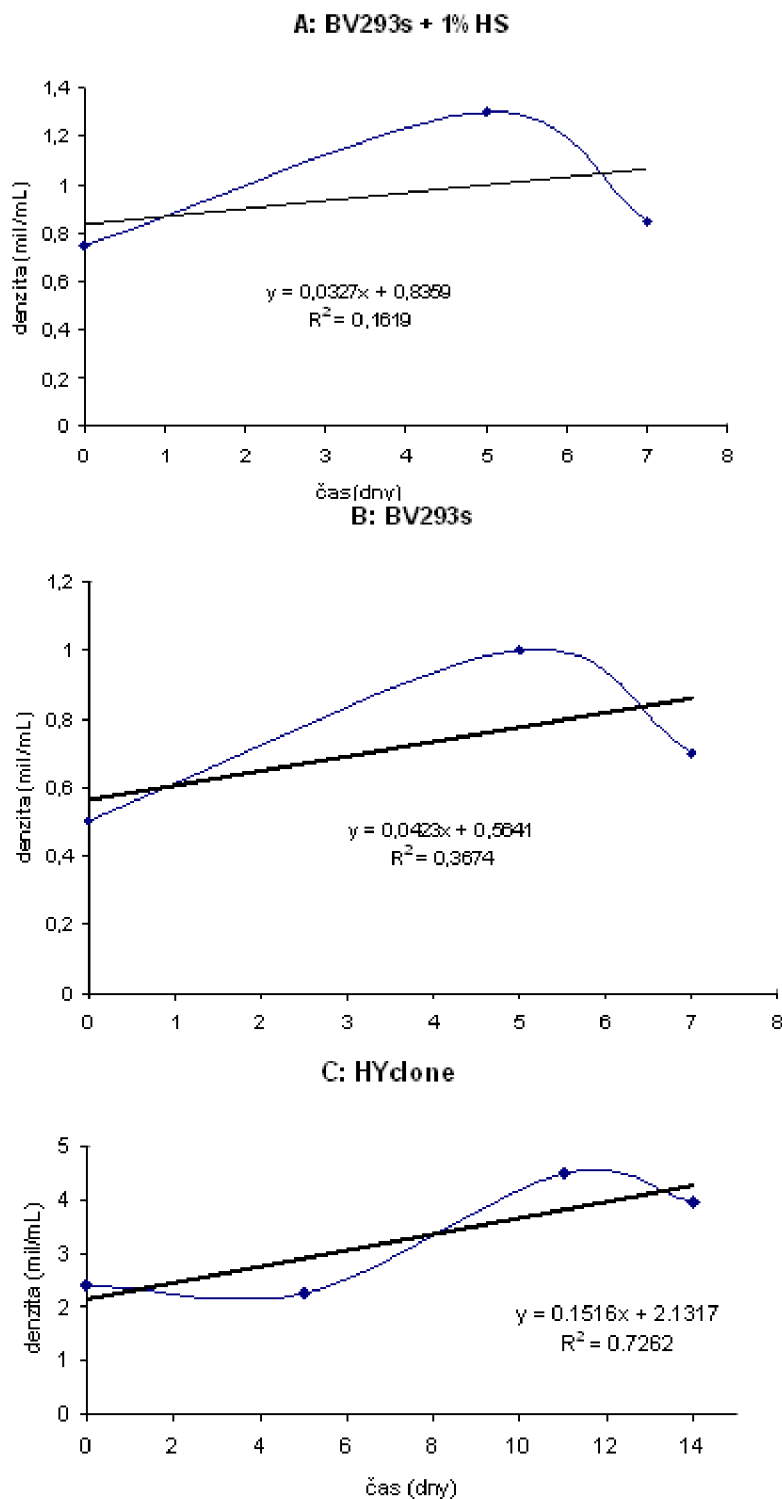
4.1 Růst zásobní buněčné kultury



Obr. 17: Kumulativní počet buněk HEK293/EBNA na 1 ml v závislosti na čase – Graf ukazuje kumulativní počet buněk ve sledovaném období. Byla sledována denzita buněčné suspenze v daných časových intervalech. Buňky byly počítány pomocí hemocytometru a byl sledován nárůst počtu buněk.

Po dobu experimentu byla udržována buněčná kultura, která sloužila jako zdroj buněk pro experimenty. Tato kultura byla kultivována za stejných podmínek jako posttransfekční kultury (médiu BV 293s, inkubována třepačka, 37°C). Růst buněk byl sledován, aby se zjistilo, zda buňky dosáhly exponenciální růstové fáze. Pokud se počet buněk za den zdvojnásobí dosáhly buňky exponenciální fáze a jsou připraveny na transfekci.

4.2 Růst buněk po transfekci



Obr. 18: Růstové křivky buněk HEK293/EBNA - Na obrázku jsou znázorněny růstové křivky buněk HEK 293/EBNA po transfekci pomocí PEI v různých médiích: A: BV 293s, B: BV 293s s 1% přídatkem koňského séra a C: Hyclone médium. Grafy A a B jsou velmi podobné, což svědčí o tom, že přítomnost HS neovlivňuje růst buněk po transfekci. Pátý den po transfekci u buněk kultivovaných v BV 293s médiu (popř. s 1% přídatkem HS) buňky dosáhly maximální

denzity, a poté se buněčná denzita začala snižovat z důvodů úmrtí buněk. V Hyclone médiu bylo maximálního počtu buněk dosaženo jedenáctý den po transfekci. V médiu Hyclone buňky rostly delší dobu a do vyšších hustot buněčných suspenzí.

4.3 Volba plazmidu pro transienční expresi

Nejdříve bylo potřeba ověřit volbu vektoru vhodného pro stanovení intenzity exprese a účinnosti transfekce. Pro transfekci byly použity vektory uvedené v tabulce č. 3. Měření bylo prováděno po dnech. U každého dne je uvedena kalibrační křivka SEAP standardů a tabulka s naměřenými koncentracemi (viz. Přílohy). Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy.

Pro transfekci byly použity plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen EBNA1, usnadňující expresi genu zájmu, a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů ve dvou sadách) + 2 kontrolní láhve.

Tab. 5: Použité plazmidy

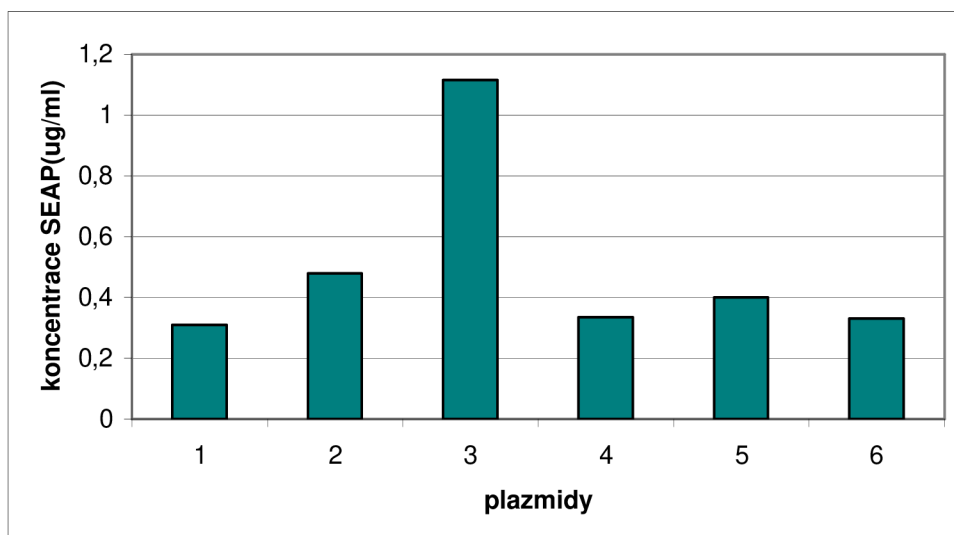
číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	pEAK8	4	pCI
2	pcDNA 5	5	pcDNA 3.1
3	pCEP4	6	peBSV

První den po transfekci nebyla detekována exprese SEAP. Hodnoty exprese SEAP byly na úrovni pozadí měření. Třetí den po transfekci se naměřené hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků, kde byl použit plazmid pCEP4 zdvojnásobily proti pozadí. Dále se hodnoty exprese zvýšily u vzorků s použitými plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Hodnoty exprese SEAP vzorků s použitými plazmidy pEAK 8, pCI a peBSV i nadále zůstaly na úrovni pozadí.

Nejvyšší hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků byly naměřeny pátý den po transfekci, kdy hodnoty u vzorku obsahující pCEP4 byly až trojnásobné proti hodnotám koncentrace SEAP v jiných vzorcích. Šestý a sedmý den po transfekci se hodnoty koncentrace začaly snižovat, což bylo způsobeno nejspíše úmrtím buněk a rozpadem SEAP.

Jako nejúčinnější se ukázal plazmid pCEP4. Další vhodné plazmidy pro transienční transfekci byly zvoleny plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Plazmidy peBSV, pEAK 8 a pCI se v daném pokusu nejevily jako vhodné plazmidy pro transfekci v buňkách HEK293/EBNA.

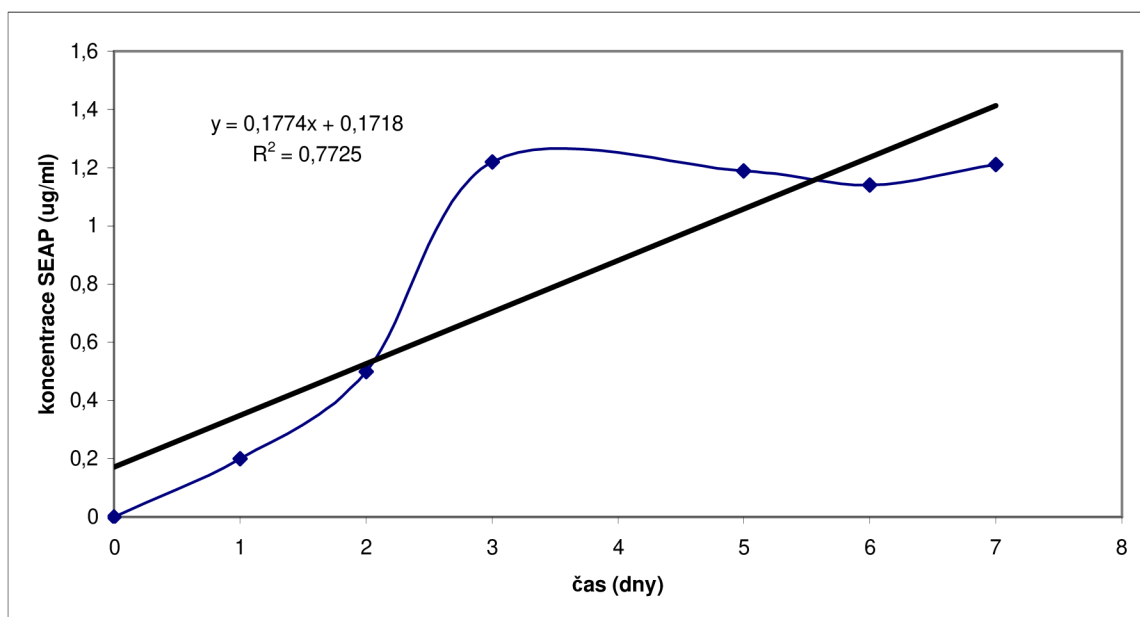
Plazmid pCEP4/SEAP byl vyhodnocen jako nejúčinnější plazmid pro transienční transfekci do buněk HEK293/EBNA i dříve. [2]



Obr. 19: Koncentrace SEAP 3. den po transfekci - obrázek znázorňuje koncentraci SEAP v jednotlivých vzorcích odebraných 3. den po provedení transfekce. Vzorek 1 (pEAK 8), vzorek 2 (pcDNA 5), vzorek 3 (pCEP4), vzorek 4 (pCI), vzorek 5 (pcDNA 3.1) a vzorek 6 (peBSV). Z obrázku je patrné, že nejvyšší koncentrace SEAP byla přítomna ve vzorku 3 (pCEP4). Proti pozadí byla zvýšená exprese i ve vzorcích 2 (pcDNA5) a 5 (pcDNA3.1). Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.3.1 Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce

Vedlejším produktem pokusu, při kterém byl určován nejúčinnější vektor pro transfekci je křivka průběhu exprese SEAP v závislosti na čase uplynulém od transfekce. Nejvyšší exprese bylo dosaženo sedmý den po transfekci.



Obr. 20: Závislost koncentrace SEAP na čase – graf znázorňuje nárůst exprese SEAP po transfekci u plazmidu pCEP4. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP bylo dosaženo 3 den

po transfekci. Koncentrace SEAP poté zůstala stejná až do posledního měřeného dne (7. den).

4.4 Srovnání metod transienční transfekce

Byla provedena série pokusů s cílem najít nejvhodnější metodu pro transienční transfekci pomocí PEI. Srovnávány byly metody podle Muller (2005), Durochera (2007) a Backliwala (2008). Metody jsou podrobněji popsány výše. Pro všechny pokusy ($n = 4$) byl jako reportérový plazmid použit pCEP4/SEAP.

4.4.1 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů po dvou sadách) + 2 kontrolní lahve. Nejvyšší naměřená koncentrace SEAPu vzorků byla naměřena 7. den po transfekci. Hodnoty jsou nižší než hodnoty naměřené dříve [2], což může být způsobeno úmrtím buněk.

4.4.2 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Pokus byl proveden v osmi 250ml čtyřhraných lahvích: 2 láhve na transfekci bezsérovou a 2 láhve na transfekci v médiu (293BVs) s 1% koňského séra + 4 kontrolní lahve. Pokus byl prováděn se suspenzí o nízké buněčné denzitě (0,5 milónů/ml), což mohlo být příčinou neúspěchu. Naměřené hodnoty absorbance se téměř shodovaly s hodnotami absorbance blanku (slepého vzorku). Metoda Durocher byla vyhodnocena jako neúčinná.

4.4.3 Metoda Backliwal (2008)

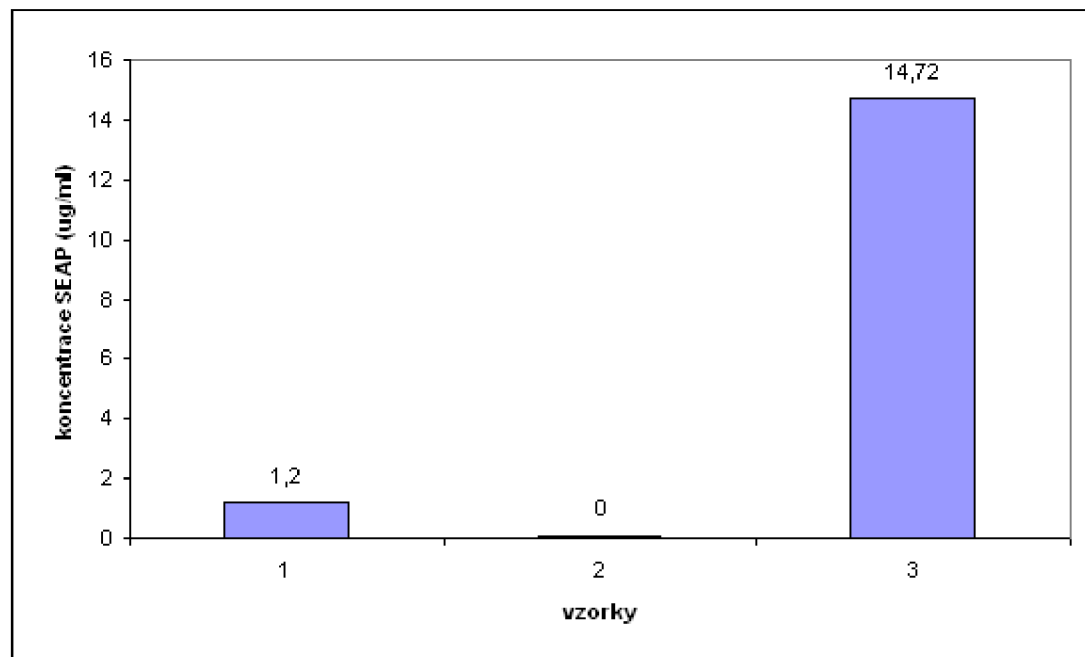
Byly použity buňky 293HEK/EBNA kultivované v médiu HYclone o denzitě 2,4 milónů/ml. Buněčná suspenze byla rozpipetována do falkon po 10 ml, odstředěna a poté bylo odsáto médium a nahrazeno 1 ml DMEM/F12 (Biowest) médiem doplněným o 0,1% Pluronic (Invitrogen). Denzita buněčné suspenze při transfekci byla 24×10^6 /ml. Transfekce byla úspěšná. Nejvyšší detekovaná exprese SEAP byla 14,7 $\mu\text{g/ml}$ při transfekci 20 $\mu\text{g/ml}$ DNA odebraném čtrnáctý den po transfekci. Hladina exprese může dosáhnout až 22 mg/ml pro rekombinantní protilátky u vzorku s koncentrací DNA při transfekci 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA. [27]

Tab. 6: Transfekční podmínky u jednotlivých metod

metoda	koncentrace DNA (µg/ml)	poměr DNA:PEI	transfekční médium	kultivační médium	poměr transfekční směs:médiu
Muller	2,5	1:5	BV 293s	BV 293s	1:10
Durocher	1	1:5	BV 293s (příp. + 1% HS)	BV 293s (příp. + 1% HS)	1:10
Backliwal	15	1:2	DMEM/F12 (Biowest) + 0,1% Pluronic	Hyclone + 3mM butyrát sodný + 4 mM kyselina valproová	-
	20				
	50				
	50				
	50				

Tab. 7: Míchání transfekčních směsí na jednu láhev

metoda	původní koncentrace DNA (µg/ml)	DNA (µl)	1 mg/ml PEI (µl)	ředění pomocí
Muller	500	100	500	150 mM NaCl
Durocher	5	25	1000	PBS
Backliwal	289,4	103,6	60	-
	830	120,4	200	
	289,4	138,2	80	



Obr. 21: Vliv metody transfekce na hladinu exprese SEAP (za použití plazmidu pCEP4) - vzorek 1: metoda Muller, vzorek 2: metoda Durocher, vzorek 3: metoda Backliwal. Nejvyšší hodnoty exprese SEAP bylo dosaženo za použití metody Backliwal. Asi desetinu výtěžku exprimovaného proteinu tvoří výtěžek získaný pomocí metody Muller. Na nulové hodnotě jsou hodnoty exprese SEAP u metody Durocher.

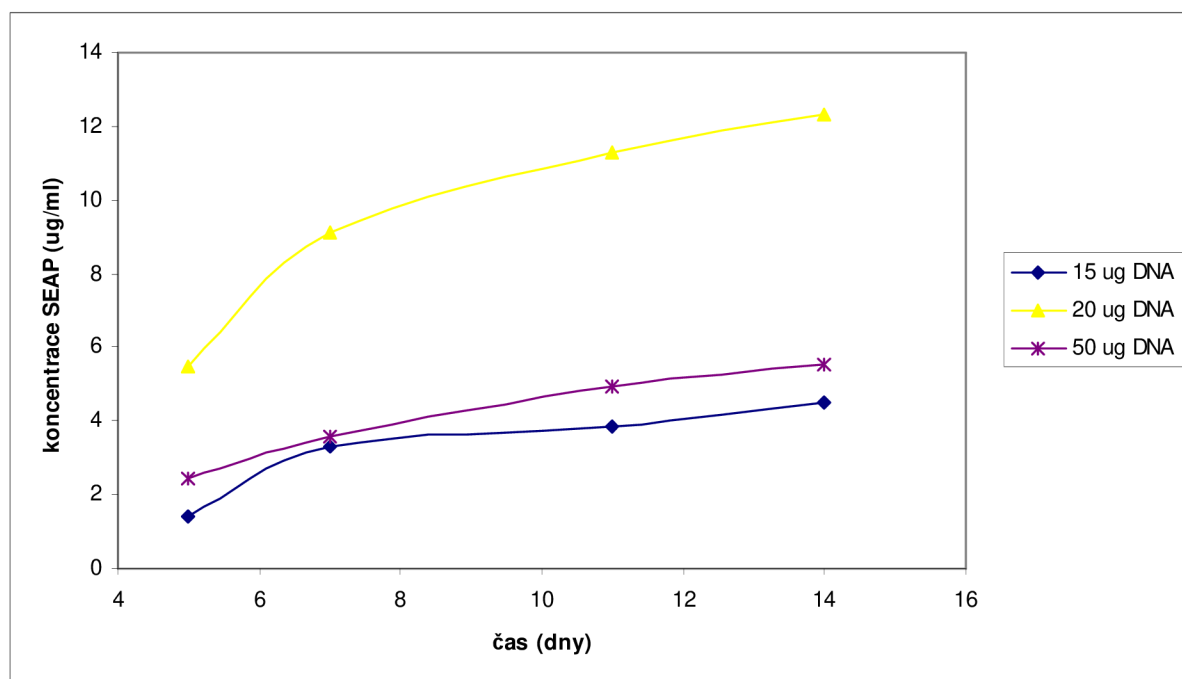
Na základě výsledků měření byl jako nejlepší metoda vyhodnocena metoda Backliwal (2008), kdy koncentrace SEAP dosahovaly několikanásobně vyšších hodnot než byly hodnoty koncentrace SEAP u vzorků metody Muller (2005). Úspěšnost transfekce u metody Backliwal byla zajištěna nejspíše vysokohustotní buněčnou suspenzí a také vyššími přídávky DNA a PEI.

Metoda Durocher byla vyhodnocena jako nejméně účinná. Důvodem může být používání buněčných suspenzí o nižší hustotě buněk a nízkými koncentracemi DNA přidávanými k buňkám. Také postup provedení transfekce se zcela odlišuje od předešlých dvou metod. Metoda Duroscher přidává transfekční směs do finálního objemu buněčné suspenze s médiem narozdíl od metod Muller a Backliwal, kdy je transfekce prováděna v menším objemu a následně je zastavena přídávkem média. U metody Muller byly detekovány hodnoty exprese SEAP, ale o velmi nízkých koncentracích.

Velký vliv má také kultivační médium, ve kterém jsou pěstovány buňky. V médiu HYclone buňky dosahovaly vyšší denzity a životnost buněk byla delší než v médiu BV 293s.

4.4.3.1 Vliv koncentrace DNA na účinnost transfekce

Pomocí metody Backliwal (2008) bylo ověřováno množství DNA vhodné pro transienční transfekci. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 μg DNA/ml transfekční směsi. To je méně než uvádí Backliwal et al. (2008), který zjistil nejvyšší účinnost při 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. [27]



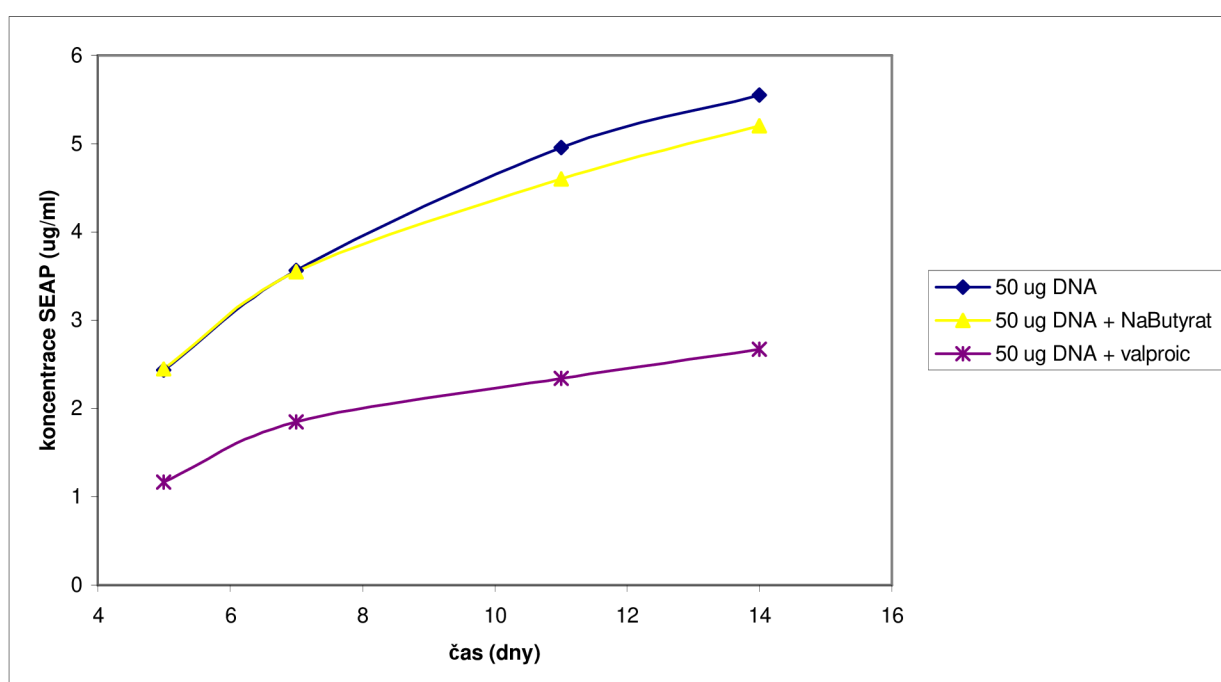
Obr. 22: Závislost koncentrace SEAP na koncentraci DNA při transfekci - graf ukazuje koncentrace SEAP u jednotlivých vzorků. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP byly naměřeny po transfekci 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.4.3.2 Vliv inhibitorů histon deacetyláz na hladinu exprese po transfekci

Pomocí metody Backliwal (2008) byl zjišťován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. [28]

Koncentrace SEAP u vzorku s přidavkem butyrátu sodného (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci) se výrazně nelišily od hodnot koncentrací vzorku kontrolního. Hodnoty koncentrace SEAP s přidavkem valproové kyseliny v médiu byly poloviční než hodnoty vzorku bez přidavku (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci).

I když počet buněk ve vzorcích obsahujících přidavek butyrátu sodného byl nízký, přesto hodnoty exprese SEAP byly srovnatelné s hodnotami SEAP u vzorků bez přidavku, kde byl počet buněk vyšší. To znamená, že přidavek butyrátu sodného zvýšil hladinu exprese, ale snížil viabilitu buněk.



Obr. 23: Závislost koncentrace SEAP na přítomnosti inhibitorů histon deacetyláz - graf ukazuje koncentrace SEAP u vzorků obsahujících 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA: bez přidavku, s přidavkem butyrátu sodného do média a s přidavkem kyseliny valproové do média. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci zabývající se problematikou transienční transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminu byla hledána optimální metoda transienční transfekce.

V první části bylo testováno šest plazmidů a cílem bylo nalézt plazmid, za jehož použití se dosáhne nejvyšších hodnot exprese SEAP. Nejúčinnějším plazmidem byl zvolen pCEP4/SEAP, který byl poté použit v následujících experimentech.

Byly testovány tři metody: Muller (2005), Durocher (2007) a Backliwal (2008). Jako nejúčinnější metoda byla zvolena metoda Backliwal (2008), která dává použitelné výsledky pro zavedení této metody do praxe.

Byl sledován vliv koncentrace DNA (15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) použité pro transfekci s vysokohustotní buněčnou suspenzí. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 $\mu\text{g DNA/ml}$ transfekční směsi.

Dále byl sledován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitorů v kultivačním médiu zvyšuje hladinu exprese, ale snižuje viabilitu buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. *Molecular Biotechnology: principles on application of recombinant DNA*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. ISBN 1-55581-269-4. 760 p.
- [2] ŠMÍD, J. Vývoj protokolu pro transienční transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009 57s.
- [3] COHNE, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*. 1973, 70: 3240-3244
- [4] ŠPANOVÁ, A. *Přednášky z molekulární biotechnologie 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [5] DOŠKAŘ, J. *Přednášky z molekulární genetiky II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [6] RITTICH, B. *Přednášky z bioinženýrství II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [7] BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1995, 92(16):7297-301.
- [8] GODBEY, W. T., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res*. 2000, 51(3):321-8.
- [9] GODBEY, W. T., BARRY, M. A., SAGGAU, P., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 1999a, 60(2-3): 149-60.
- [10] BERTSCHINGER, M., BACKLIWAL, G., SCHERTENLEIB, A., JORDAN, M., HACKE, D. L. R., WURM, F. M. Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: Implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery. *Journal of Controlled Release* 2006, 116 (2006): 96-104
- [11] LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 60 (2005): 247-266.
- [12] BEHR, J. P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospect for gene therapy. *Bioconjugate Chem*. 1994, 5 (1994) 382-389.

- [13] LINDELL, J., GIRARD, P., MULLER, N., JORDAN, M., WURM, F. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1676(2): 155-61.
- [14] CLAMME, J.-P., KRISHNAMOORTHY, G., ME'LY, Y. Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1617 (2003): 52-61.
- [15] VON HARPE, A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*. 2000, 69 (2): 309-22.
- [16] IIDA, T., MORI, T., KATAYAMA, Y, NIIDOME, T. Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex. *Journal of Controlled Release*. 2007, 118 (2007): 364-369.
- [17] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(2):e9
- [18] DEROUAZI, M., GIRARD, P., VAN TILBORGH, F., IGLESIAS, K., MULLER, N., BERTSCHINGER, M., WURM, F. M. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004, 87(4):537-45
- [19] MULLER, N. Transient gene expression for rapid protein production: Studies and optimization under serum-free conditions. PH.D. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005. 120 p.
- [20] GRAHAM, F. L., SMILLEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRU, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 1977, 36, 59-72.
- [21] AIYAR, A., ARAS, S., WASHINGTON, A., SINGH, G. AND LUFTIG, R. B. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of *oriP*-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology Journal*. 2009, 6:29
- [22] GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M. 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002, 38 (1-2): 15-21.

- [23] JORDAN, M., SCHALLHORN, A., WURM, F. M., Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24 (4): 596-601.
- [24] ERHARDT, C., SCHMOLKE, M., MATZKE, A., KNOBLAUCH, A., WILL, C., WIXLER, V., LUDWIG, S., Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction.* 2006, 6, 179-184
- [25] PHAM, P. L., PERRET, S., DOAN, H. C., CASS, B., ST-LAURENT, G., KAMEN, A., DUROCHER, Y. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol Bioeng.* 2003, 84(3): 332-42.
- [26] BLDI, L., MULLER, N., PICASSO, S., JACQUET, R., GIRARD, P., THANH, H. P., DEROW, E., WURM, F. M. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress.* 2005, 21(1): 148-153.
- [27] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., HASIJA, F., WURM, F. M., High-density transfection with HEK-293 cell allows doubling of transient titers and removes need for a prior DNA complex formation with PEI *Biotech. and Bioeng.* 2008, 99: 721-727.
- [28] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., KUETTEL, I., DELEGRANGE, F., HACKER, D. L., WURM, F. M., Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures *Biotech. and Bioeng.* 2008, 101: 182-189.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

r-protein	rekombinantní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	cyklická deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEK buňky	lidské embryonální ledvinové buňky
EBNA	jaderný antigen Epstein-Barr viru
EB-vir	Epstein-Barr vir
MCS	mnohočetné klonovací místo
ATP	adenosintrifosfát
DEAE	diethylaminoethyl
PEI	polyethylenimin
MCS	mnohočetné klonovací místo (multiple cloning sit)
AFM	mikroskopie atomárních sil (atomis force microscopy)
G -	Gram-negativní
G +	Gram-pozitivní
CHO	vajíčka křečka čínského
3T3	vajíčka myši švýcarské
HHV-4	herpesvirus 4
Gus	β -glukuronidáza
MUG	4-metyl umbelliferyl glukuronid
GFP	zeleně fluorekující protein
ALP	alkalická fosfatáza
HS	koňské sérum
FCS	telecí sérum
DMSO	dimethyl sulfoxid
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
STD	standard
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (Internationa federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

8 SEZNAM PŘÍLOH

Složení médií a pufrů

Metoda transfekce 1 - Muller (2005): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP, grafy srovnání koncentrací SEAP, růstové křivky

Metoda transfekce 2 - Durocher (2007): růstové křivky

Metoda transfekce 3 – Backliwal (2008): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP
růstové křivky

9 PŘÍLOHY

9.1 Složení médií a pufrů

9.1.1 LB médium

LB médium bylo použito pro kultivaci buněk kmene *Escherichia coli*. Z těchto buněk byla následně izolována plasmidová DNA.

Tab. 8: Složení LB média [2]

Složka	koncentrace (g/l)
trypton	10
kvasničný extrakt	5
NaCl	10

9.1.2 Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA

Tab. 9: Složení kitu Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA [2]

<u>Roztok E1</u> – resuspendační, uchováván při pokojové teplotě 50 mM Tris 10 mM EDTA přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 8 K roztoku je nutné přidat 100 µg/ml RNázy A, která je uchovávána při teplotě 4 °C
<u>Roztok E2</u> – lyzační, uchováván při pokojové teplotě 200 mM NaOH 1,0 % SDS (w/v)
<u>Roztok E3</u> – neutralizační, uchováván při pokojové teplotě 3,1 M octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,5
<u>Roztok E4</u> – ekvilibrační, uchováván při pokojové teplotě 600 mM NaCl 100 mM octan sodný 0,15 % TritonX- 100 přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E5</u> – promývací, uchováván při pokojové teplotě 800 mM NaCl 100 mM octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E6</u> – eluční, uchováván při pokojové teplotě 1250 mM NaCl 100 mM Tris přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 5,5

9.1.3 DMEM/F-12 médium

Toto médium bylo použito pro kultivaci přisedlých 293HEK/EBNA buněk.

Tab. 10: Složení DMEM/F-12 média [2]

Složka	koncentrace (mg/ml)
CaCl ₂ (anhydrid)	116,00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,42
KCl	311,83
MgCl ₂ · 6H ₂ O	61,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100,00
NaCl	6,9995
NaHCO ₃	1,20
Na ₂ H ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	134,00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	62,50
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,43
Glucose	3,1510
HEPES	3,5745
Hypoxanthine	2,04
Linoleic Acid	0,04
Lipoic Acid	0,10
Phenol Red · Na	8,00
Putrescine · 2HCl	0,08
Sodium Pyruvate	110,00
Thymidine	0,36
L-Alanine	4,46
L-Arginine · HCl	147,35
L-Asparagine · H ₂ O	7,50
L-Aspartic Acid	6,66
L-Cysteine · HCl · H ₂ O	17,56
L-Cystine	24,00
L-Glutamic Acid	7,36
L-Glutamine	365,1
L-Alanyl-L-Glutamine (UltraGlutamine 1)	868,00
Glycine	18,76
L-Histidine · HCl · H ₂ O	31,48
L-Isoleucine	54,37
L-Leucine	58,96
L-Lysine · HCl	91,37
L-Methionine	17,24
L-Phenylalanine	35,48
L-Proline	17,27
L-Serine	26,26
L-Threonine	53,56

9.1.4 BV 293s médium

Médium pro kultivaci suspenzní linie buněk 293HEK/EBNA

Tab. 11: Složení BV 293s média [2]

Složka	koncentrace
DMEM/F-12	1 litr
pantotenát vápenatý	4 mg/l
Pluronic F-68	1 g/l
diethanolamin	3 µg/l
fyton Difco select	2 g/l
pepton z laktalbuminu	2 g/l
lipidový koncentrát	1 mg/l
lidský insulin	5 g/l
lidský transferrin ATF	5 g/l

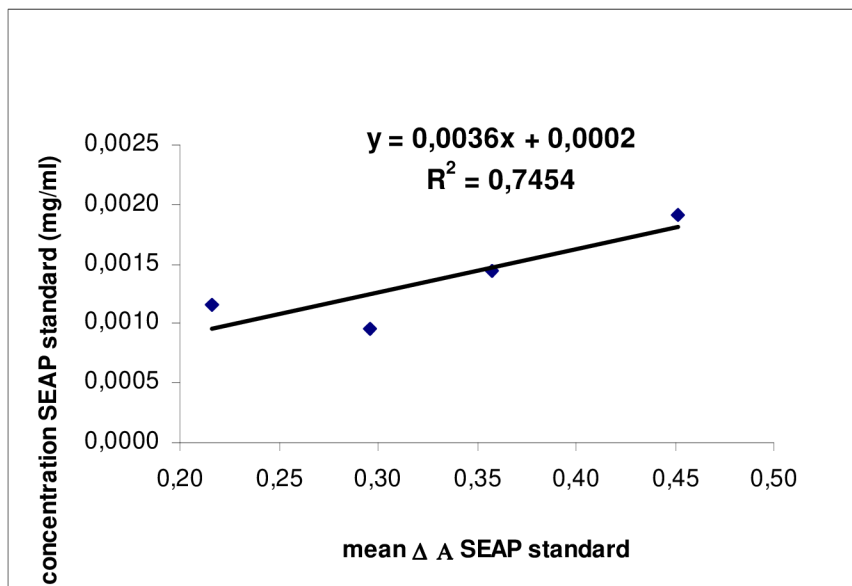
9.2 Metoda transfekce 1 – Muller (2005)

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích a srovnání koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

Tab.12: Použité plazmidy

číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	peak8	7	pCI
2	peak8	8	pCI
3	pcDNA 5	9	pcDNA 3.1
4	pcDNA 5	10	pcDNA 3.1
5	pCEP4	11	peBSV
6	pCEP4	12	peBSV

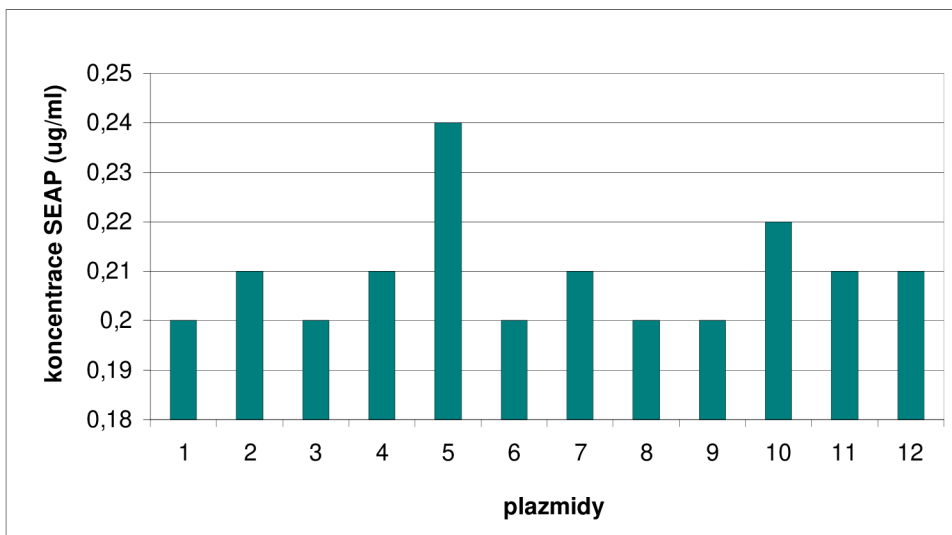
Transfekce – 1. den po transfekci



Obr. 24: Kalibrační křivka SEAP – 1. den po transfekci

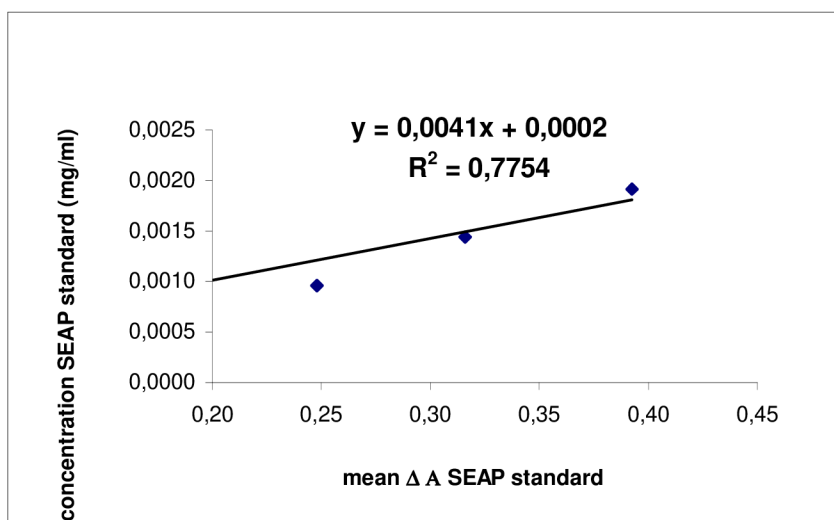
Tab.13: Koncentrace vzorků – 1. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,20	(ug/ml)
2	0,21	(ug/ml)
3	0,20	(ug/ml)
4	0,21	(ug/ml)
5	0,24	(ug/ml)
6	0,20	(ug/ml)
7	0,21	(ug/ml)
8	0,20	(ug/ml)
9	0,20	(ug/ml)
10	0,22	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,83	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,98	(ug/ml)
STD 12000x	1,27	(ug/ml)



Obr. 25: Koncentrace SEAP – 1. den po transfekci

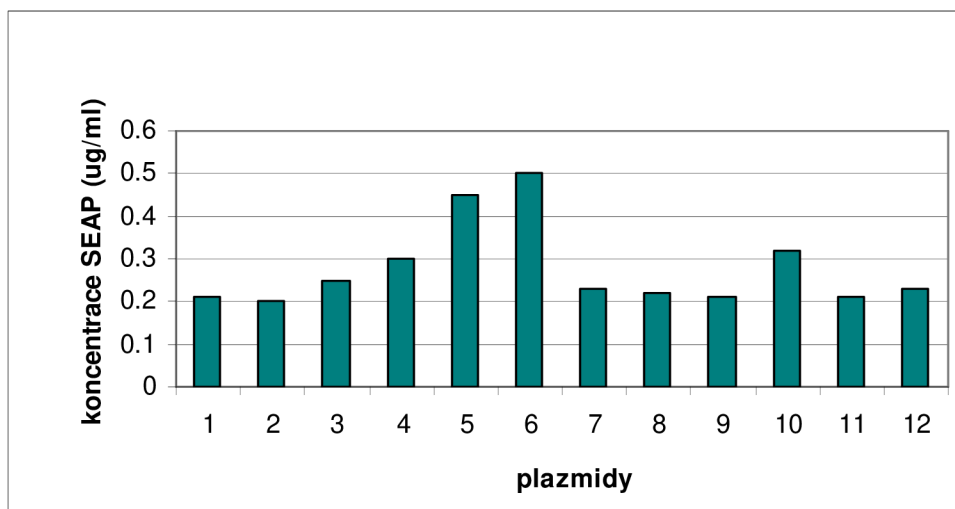
Transfekce – 2. den po transfekci



Obr. 26: Kalibrační křivka SEAP – 2. den po transfekci

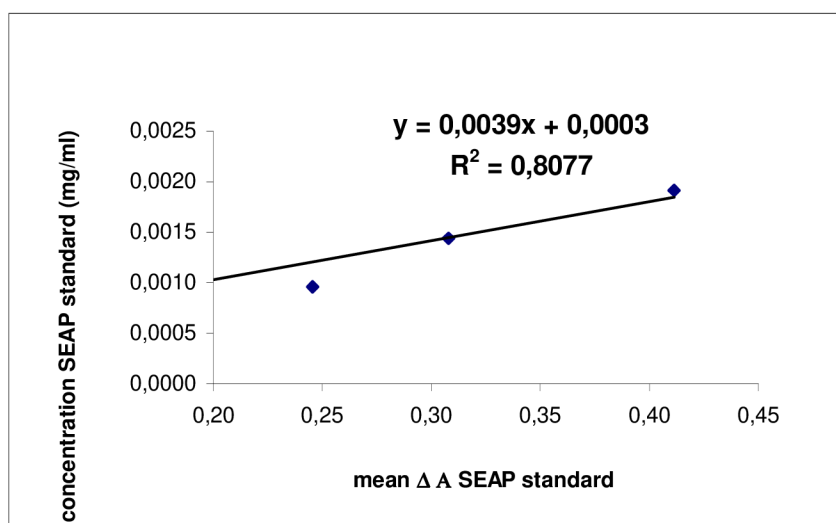
Tab. 14: Koncentrace vzorků – 2. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,20	(ug/ml)
3	0,25	(ug/ml)
4	0,30	(ug/ml)
5	0,45	(ug/ml)
6	0,50	(ug/ml)
7	0,23	(ug/ml)
8	0,22	(ug/ml)
9	0,21	(ug/ml)
10	0,32	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,23	(ug/ml)
STD 6000x	1,81	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,96	(ug/ml)
STD 12000x	1,22	(ug/ml)



Obr. 27: Koncentrace SEAP – 2. den po transfekci

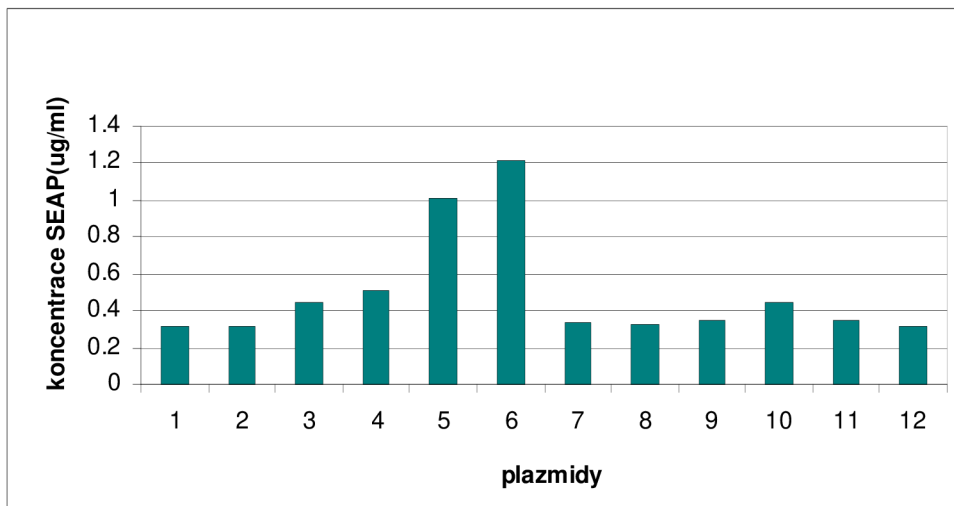
Transfekce – 3. den po transfekci



Obr. 28: Kalibrační křivka SEAP – 3. den po transfekci

Tab. 15: Koncentrace vzorků – 3. den po transfekci

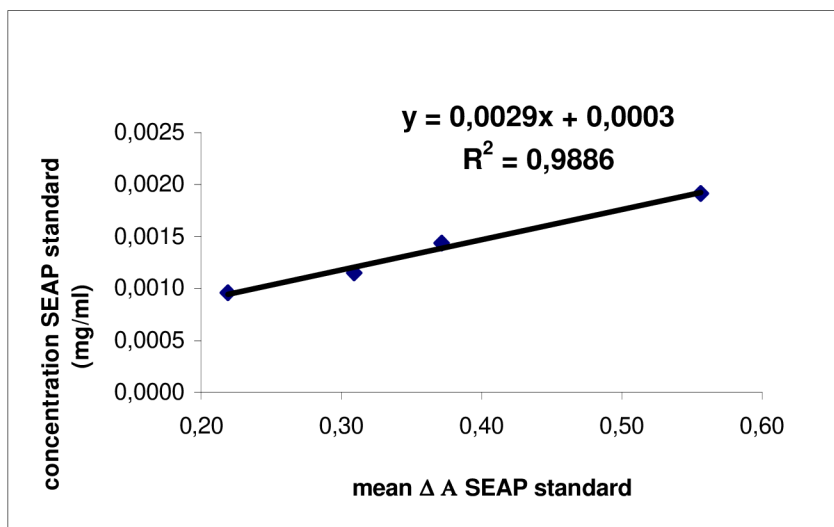
Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,31	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
4	0,51	(ug/ml)
5	1,01	(ug/ml)
6	1,22	(ug/ml)
7	0,34	(ug/ml)
8	0,33	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
10	0,45	(ug/ml)
11	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,50	(ug/ml)
STD 10000x	1,02	(ug/ml)
STD 12000x	1,26	(ug/ml)



Obr. 29: Koncentrace SEAP – 3. den po transfekci

Transfekce – 5. den po transfekci

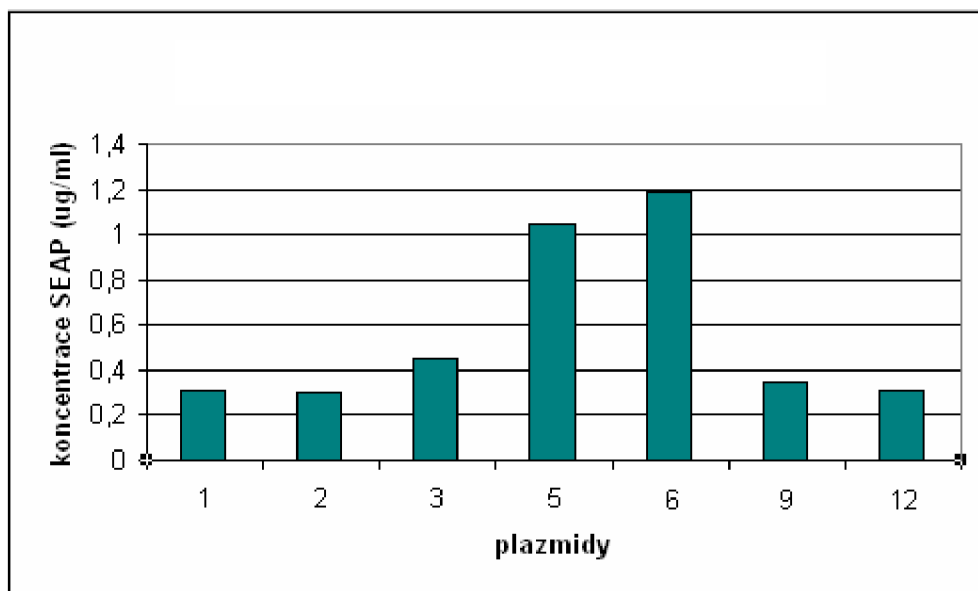
Na následujících grafech a v tabulkách jsou uvedeny jen některé hodnoty vzorků. U ostatních vzorků došlo ke kontaminaci a byly zlikvidovány.



Obr. 30: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

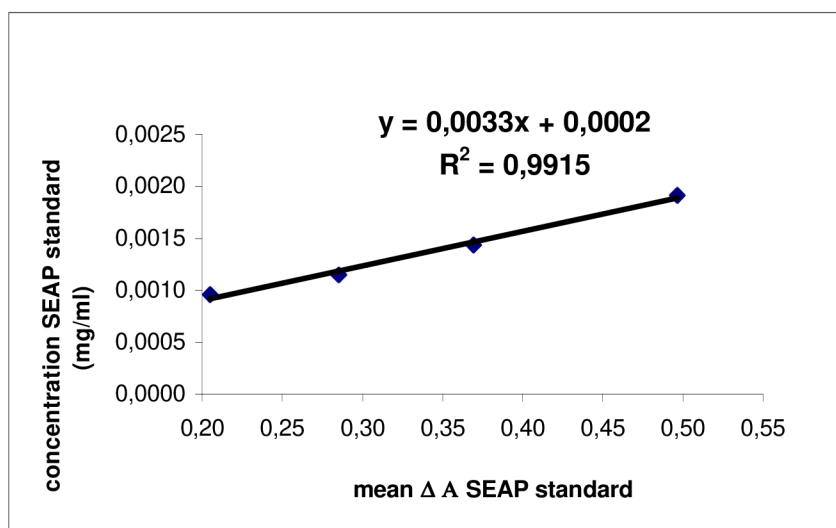
Tab. 16: Koncentrace vzorků – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,30	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
5	1,05	(ug/ml)
6	1,19	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,91	(ug/ml)
STD 8000x	1,38	(ug/ml)
STD 10000x	1,20	(ug/ml)
STD 12000x	0,94	(ug/ml)



Obr. 31: Koncentrace SEAP – 5. den po transfekci

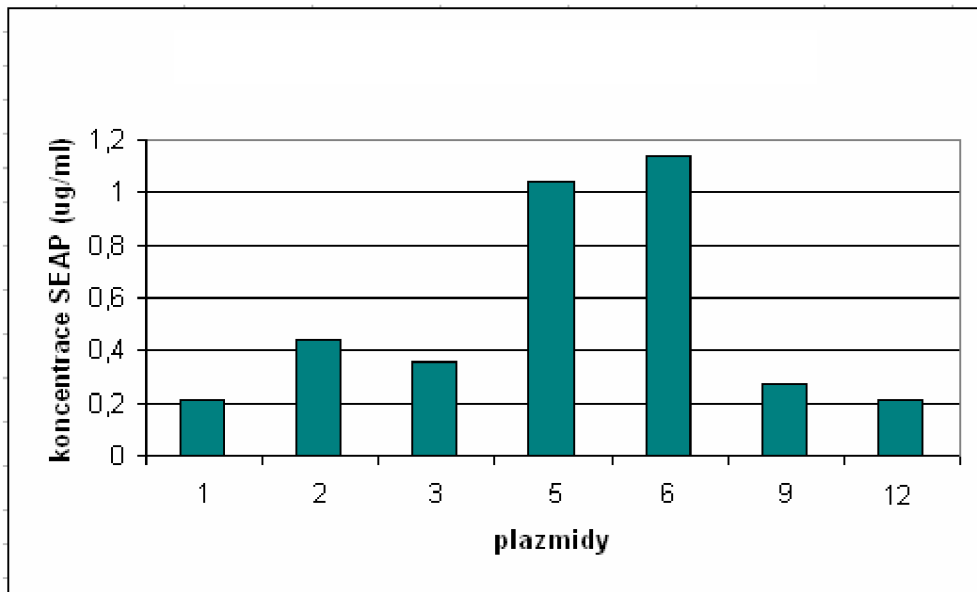
Transfekce – 6. den po transfekci



Obr. 32: Kalibrační křivka SEAP – 6. den po transfekci

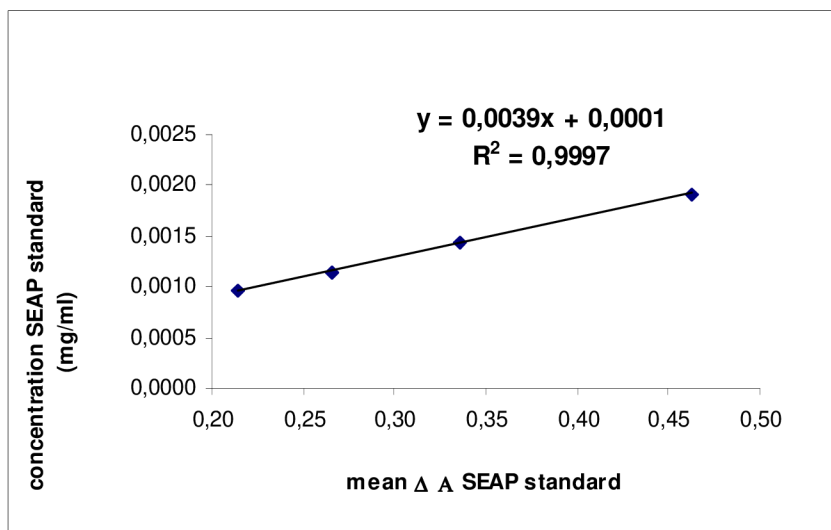
Tab.17: Koncentrace vzorků – 6. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,44	(ug/ml)
3	0,36	(ug/ml)
5	1,04	(ug/ml)
6	1,14	(ug/ml)
9	0,27	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,84	(ug/ml)
STD 8000x	1,42	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,88	(ug/ml)



Obr. 33: Koncentrace SEAP – 6. den po transfekci

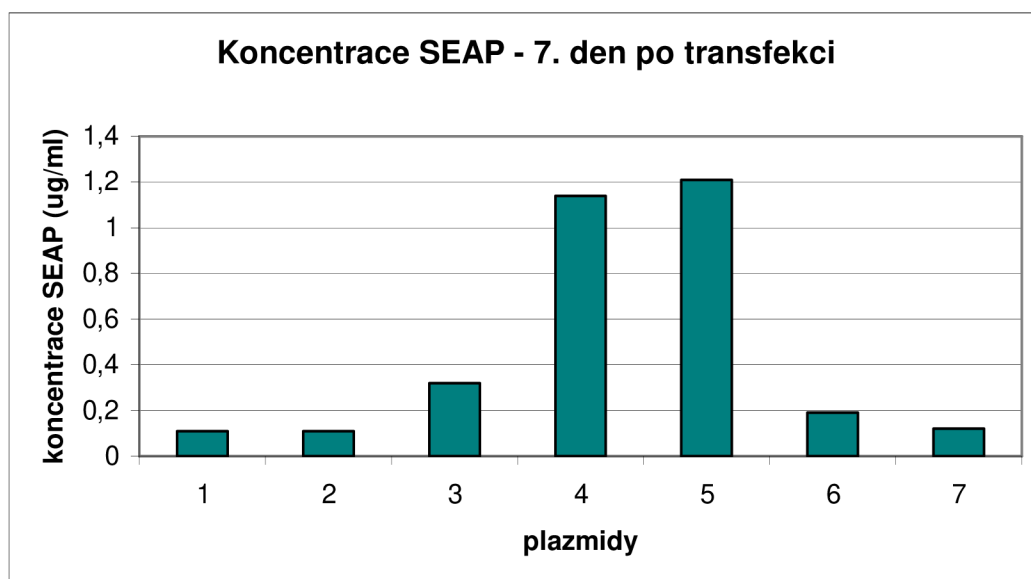
Transfekce – 7. den po transfekci



Obr. 34: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

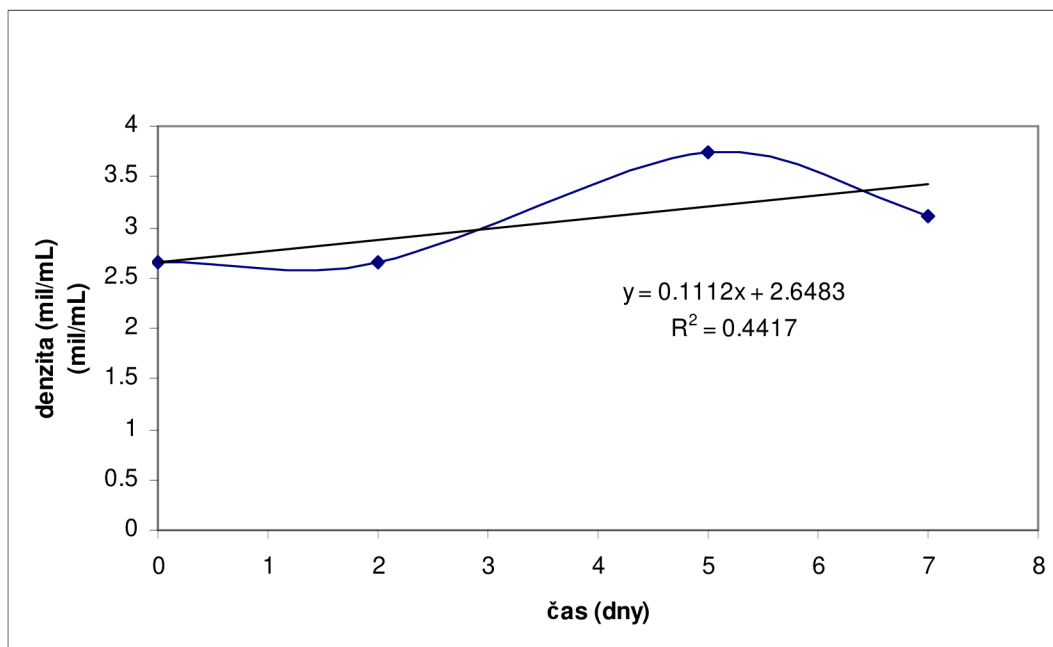
Tab.18: Koncentrace vzorků – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,11	(ug/ml)
2	0,11	(ug/ml)
3	0,32	(ug/ml)
5	1,14	(ug/ml)
6	1,21	(ug/ml)
9	0,19	(ug/ml)
12	0,12	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,41	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,93	(ug/ml)

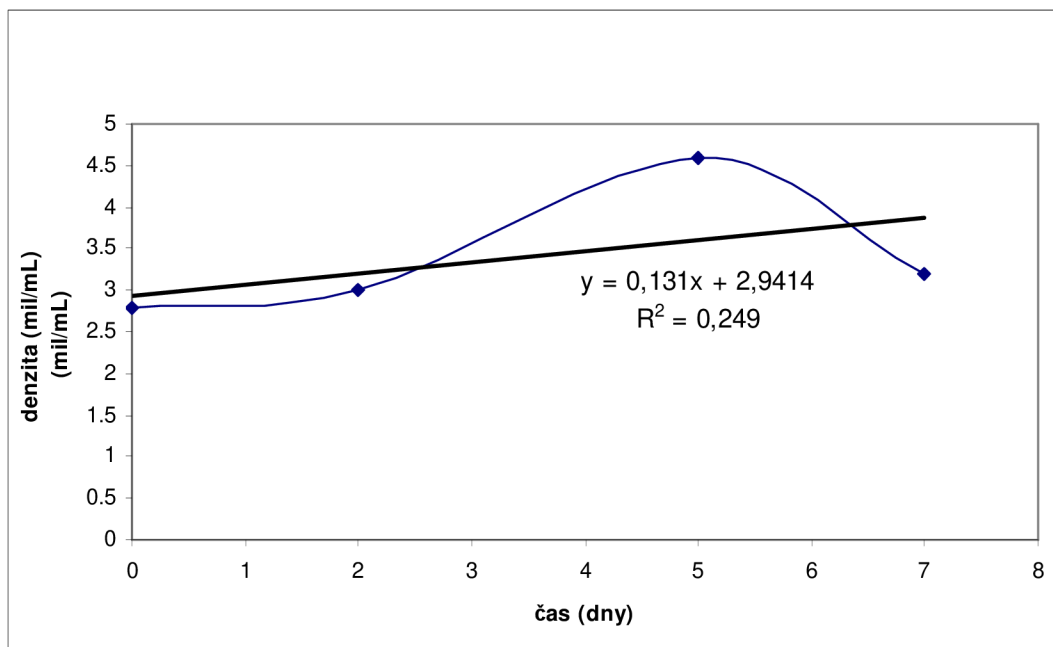


Obr. 35: Koncentrace SEAP – 7. den po transfekci

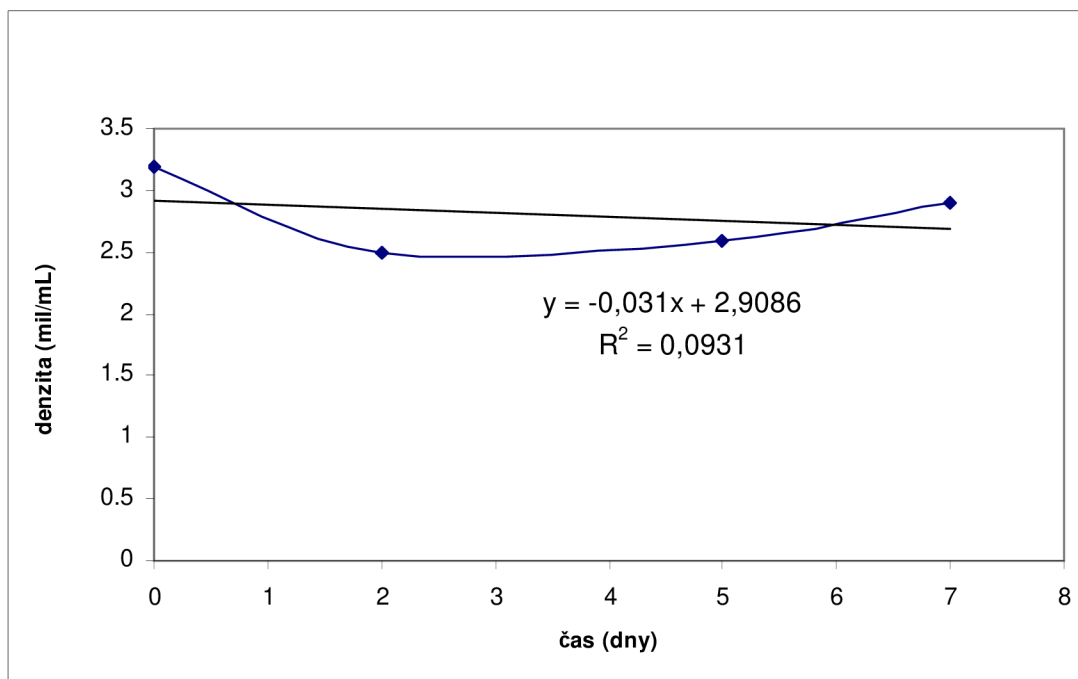
Níže jsou uvedené růstové křivky vzorků a kontroly, u kterých byly odebrány vzorky po celých sedm dní po transfekci.



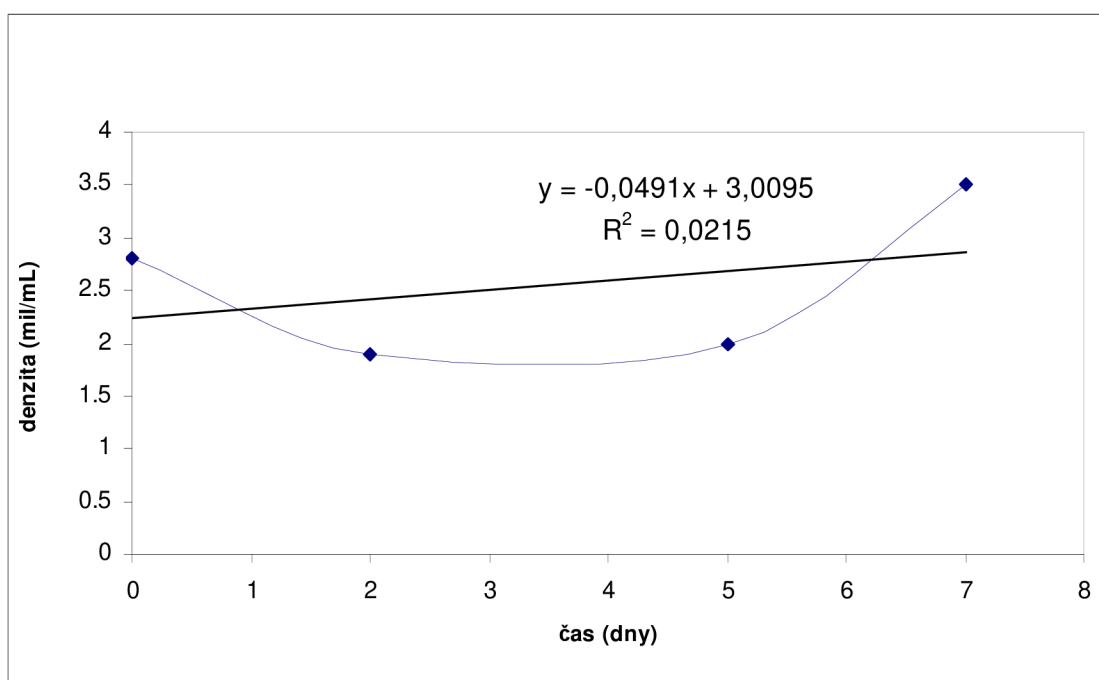
Obr 36: Růstová křivka – peak8, vzorek 1



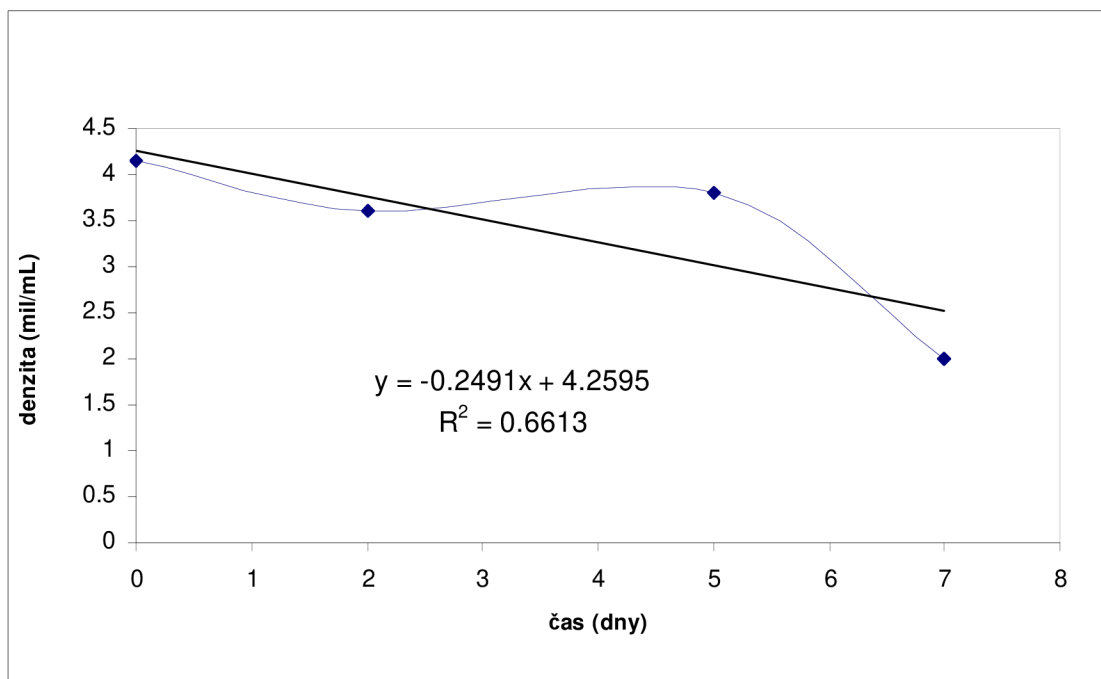
Obr. 37: Růstová křivka – peak8, vzorek 2



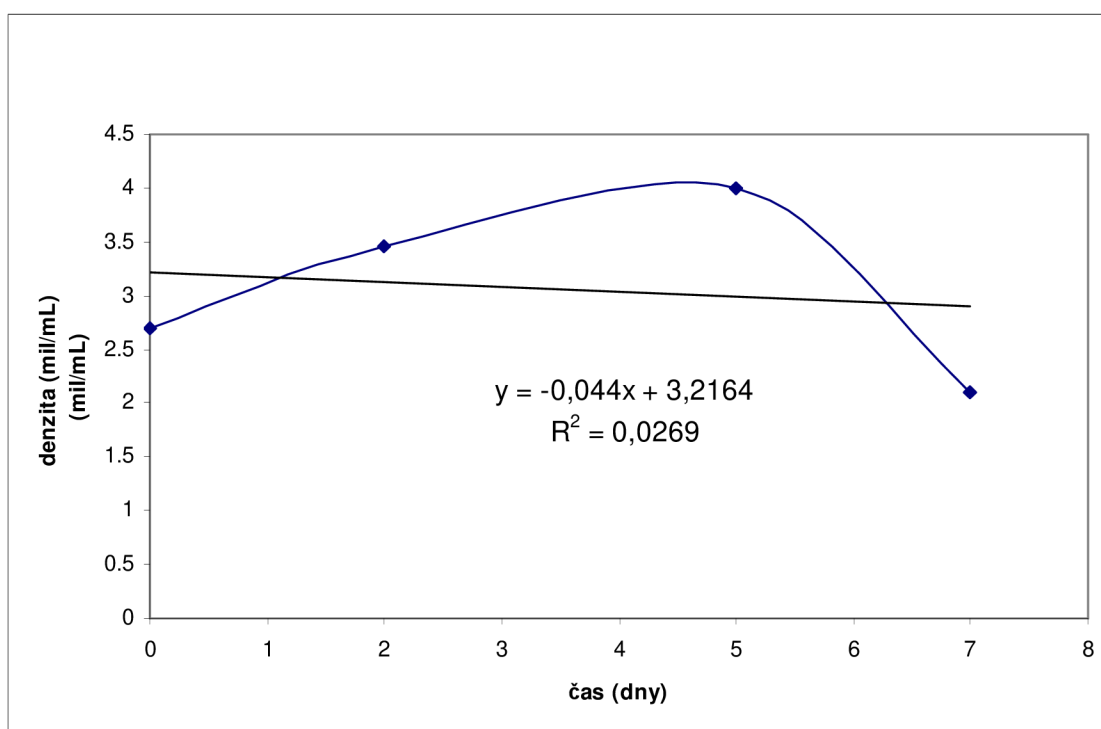
Obr. 38: Růstová křivka – pcDNA 5, vzorek 3



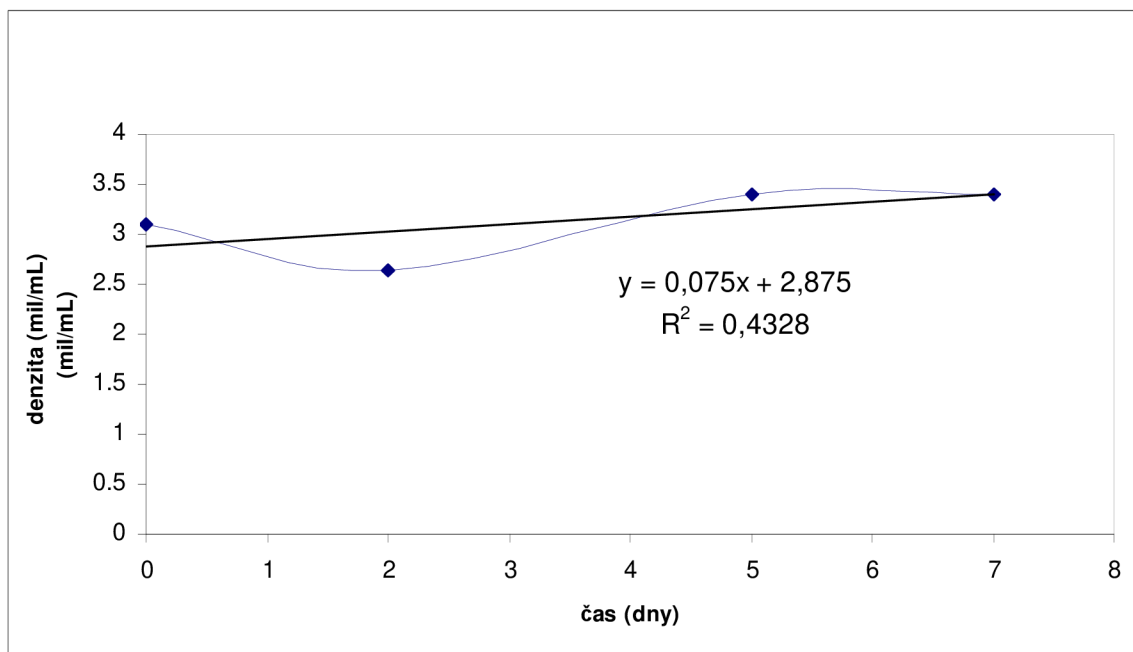
Obr. 39: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 5



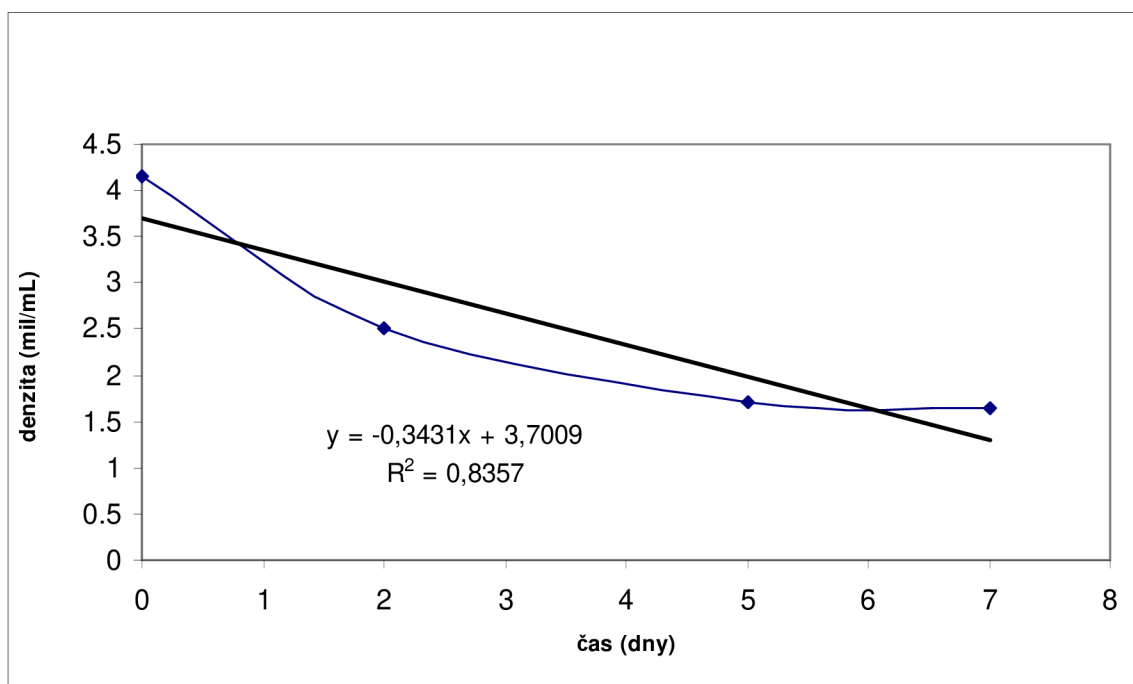
Obr. 40: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 6



Obr. 41: Růstová křivka – pcDNA 3.1, vzorek 9



Obr. 42: Růstová křivka – peBSV, vzorek 12

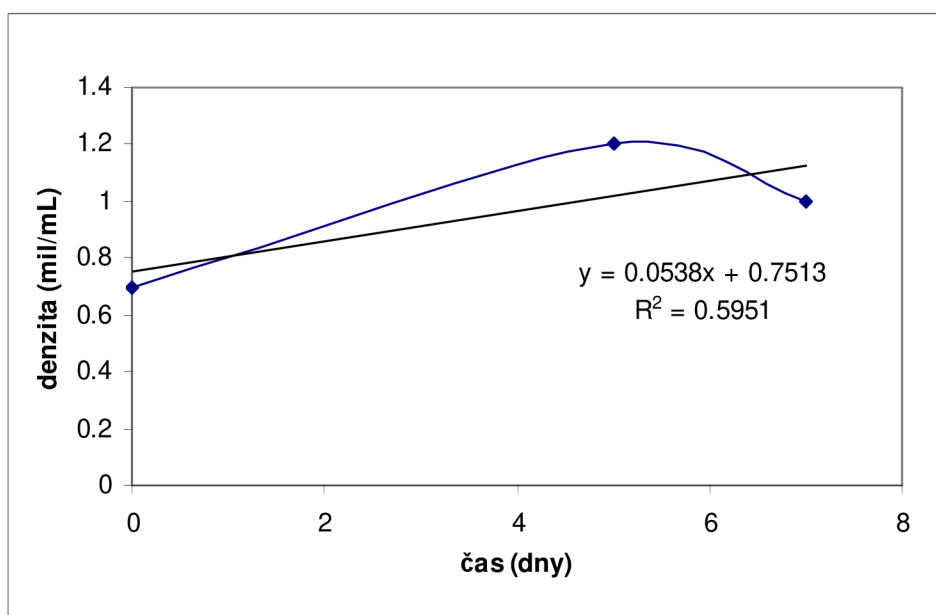


Obr. 43: Růstová křivka – kontrola

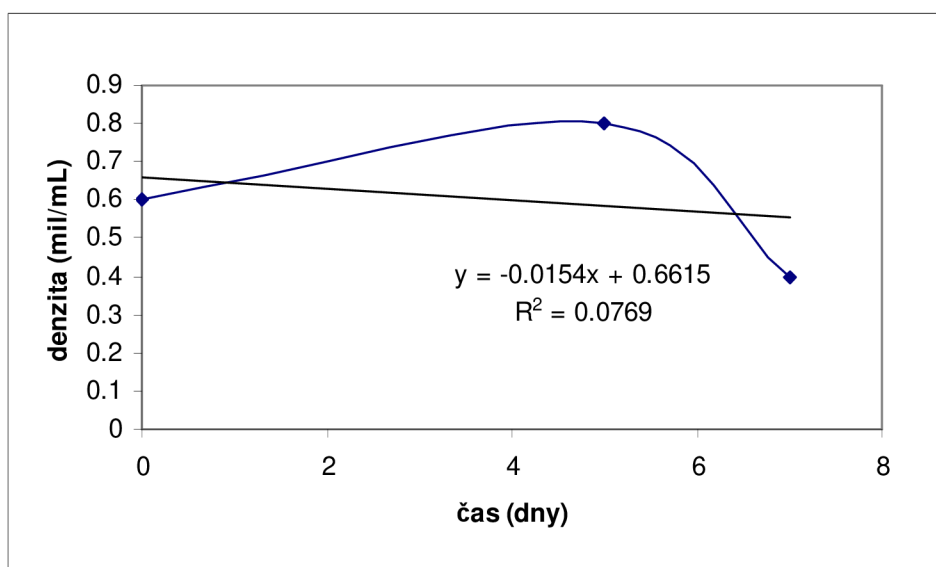
9.3 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Níže jsou uvedené grafy růstových křivek kontrolních vzorků u nichž nebyla provedena transfekce, dále růstové křivky měřené po transfekci bezsérových kultur a buněčných suspenzí udržovaných v 293BVs médiu s 1% přídavkem koňského séra.

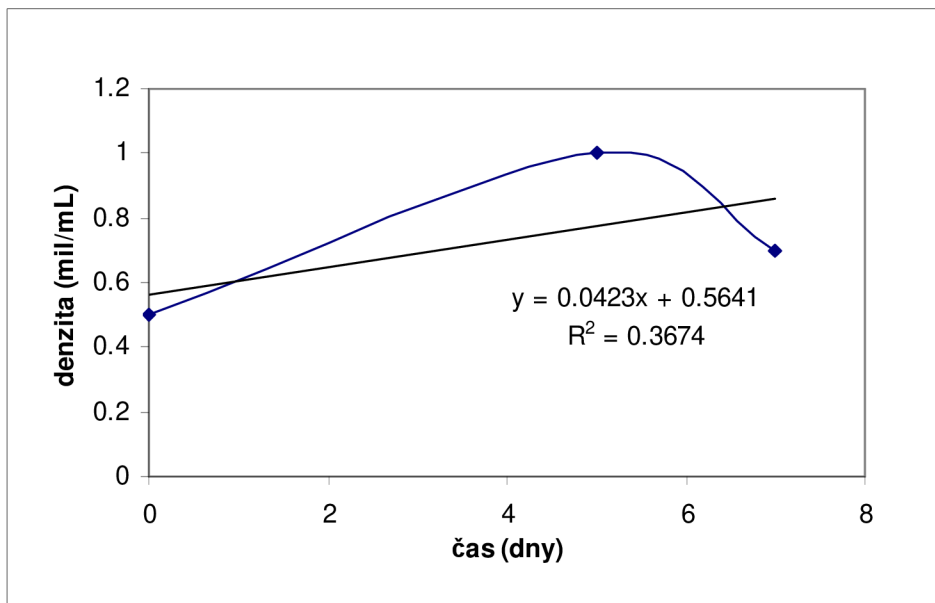
9.3.1 Bezsérová kultivace



Obr. 44: Růstová křivka – kontrolní vzorek (bezsérová kultura)

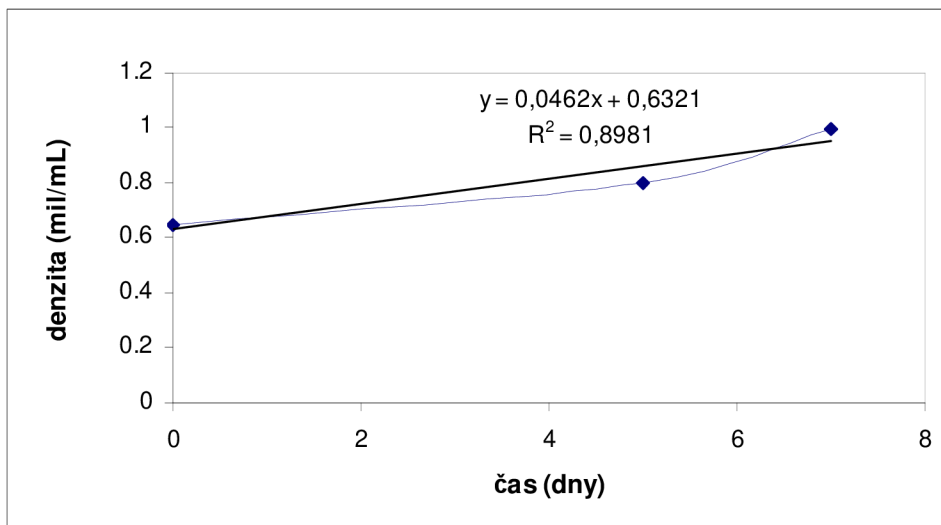


Obr. 45: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 1

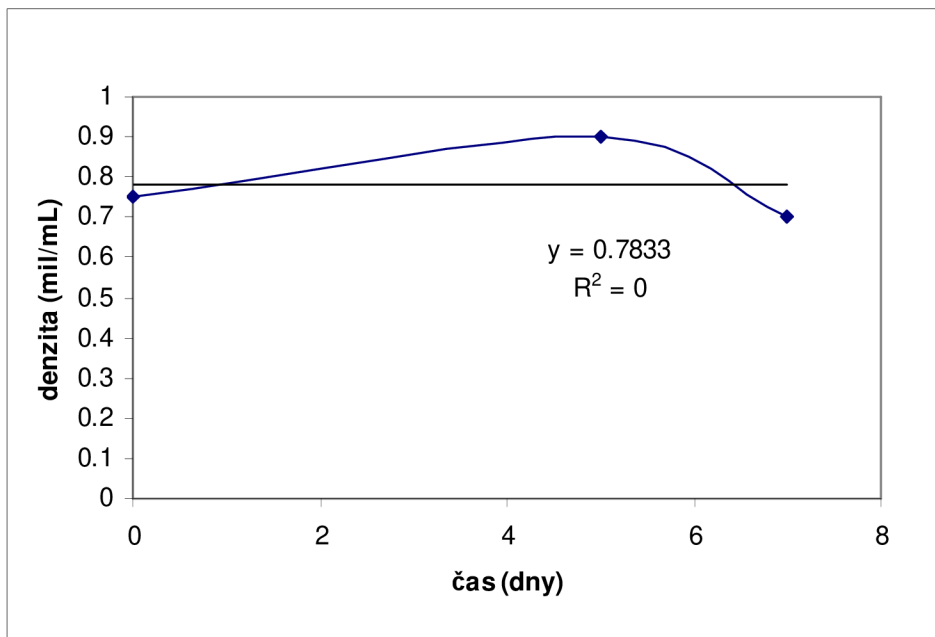


Obr. 46: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 2

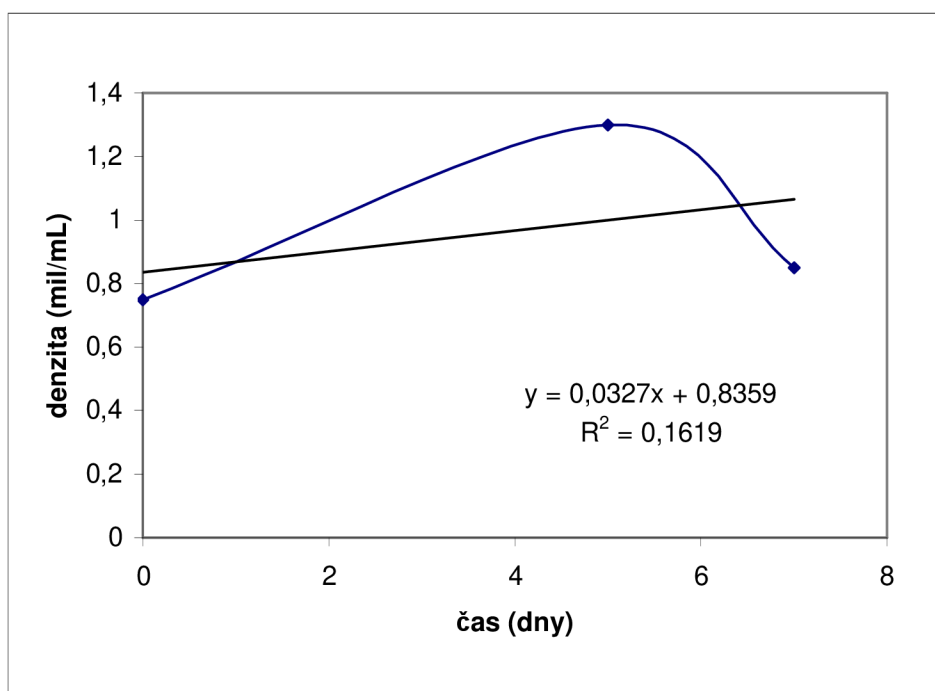
9.3.2 Kultivace s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 47: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 48: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 1

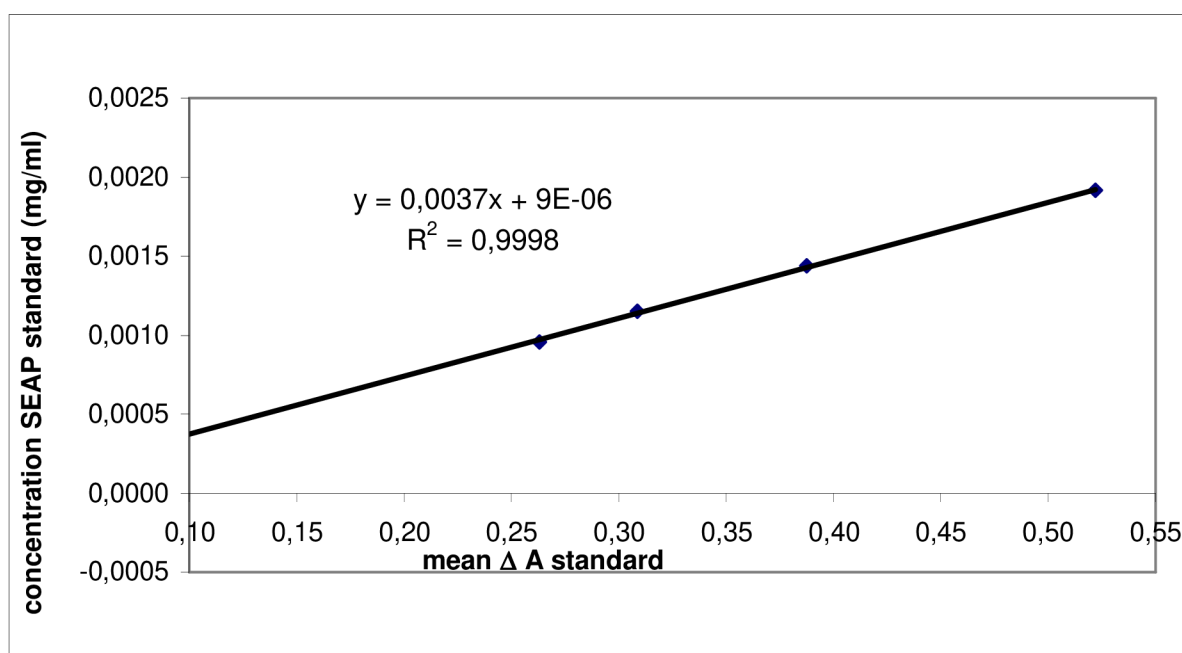


Obr. 49: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 2

9.4 Metoda transfekce 3 – Backliwal

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

5. den po transfekci

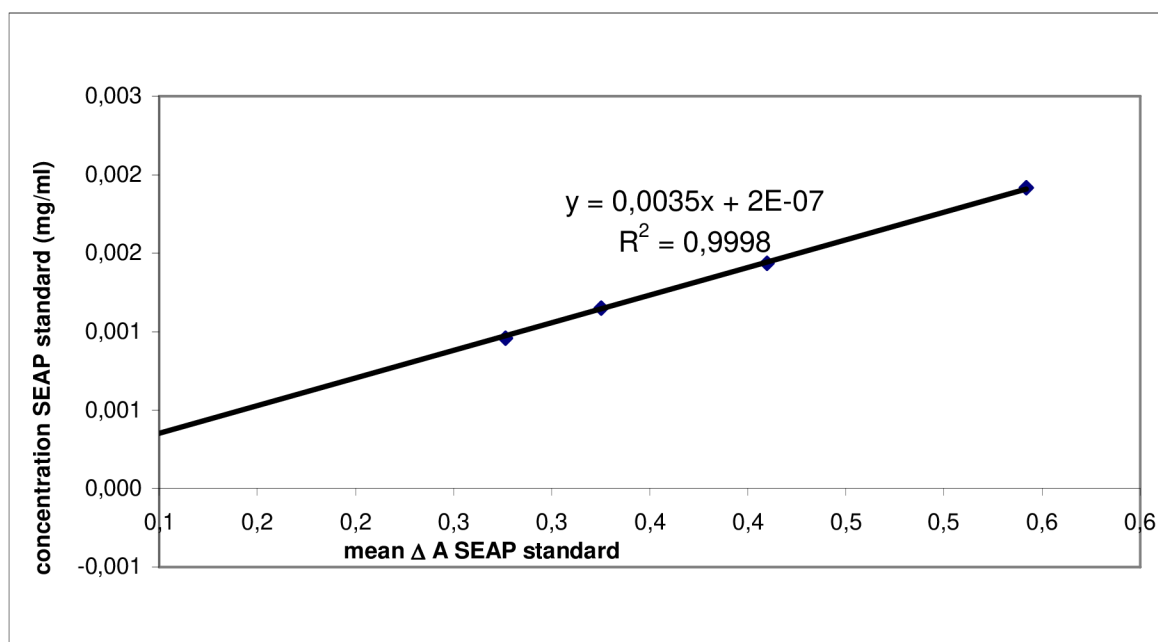


Obr. 50: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

Tab.19: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	2,016	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	0,85	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,03	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,9624	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	1,9235	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	2,9484	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4119	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4933	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	1,41	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	0,92	(ug/ml)

7.den po transfekci

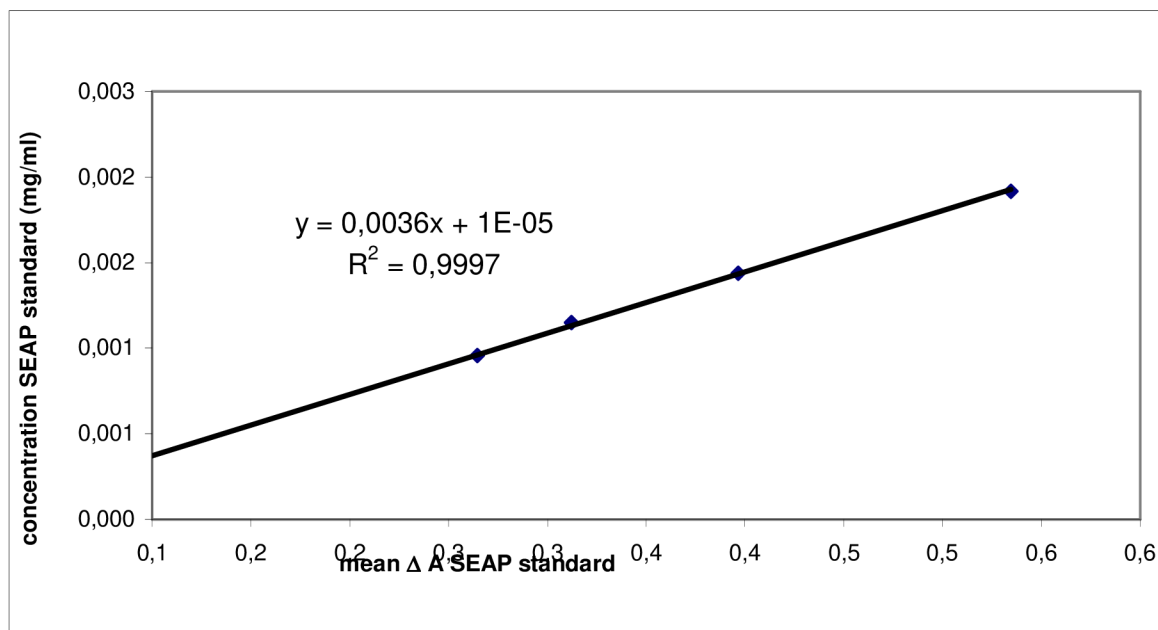


Obr. 51: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

Tab.20: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	5,5456	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,1204	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	7,3656	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,8516	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	3,1088	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,0258	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,8648	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,2348	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,4014	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,2919	(ug/ml)

11. den po transfekci

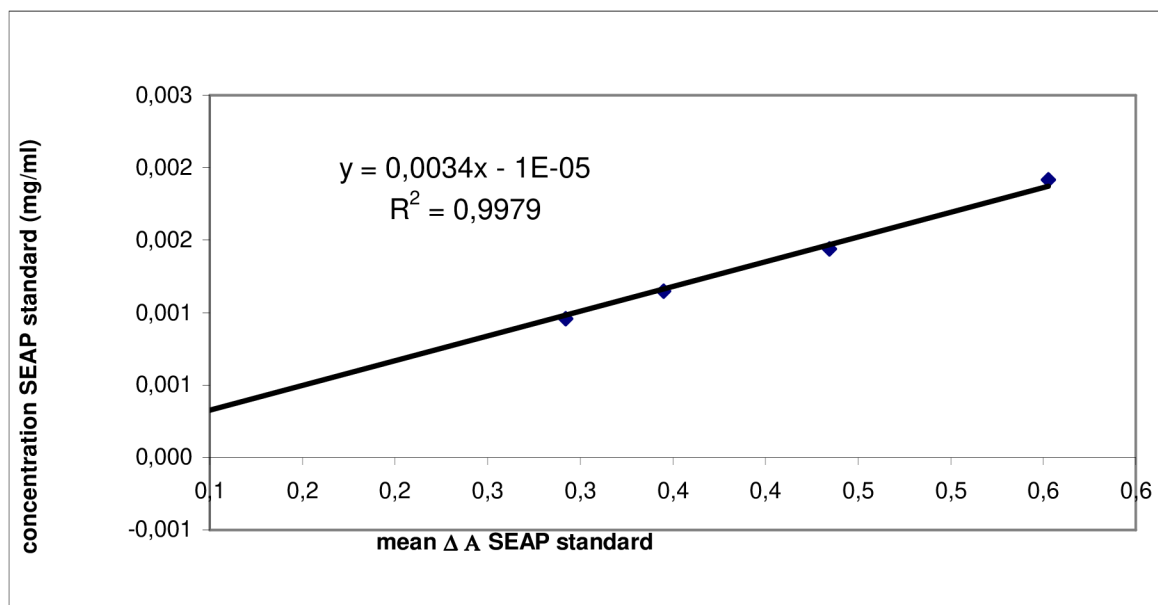


Obr. 52: Kalibrační křivka SEAP – 11. den po transfekci

Tab.21: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 11. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	6,488	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,25	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,18	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	12,34	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,6392	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	5,2764	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,5204	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,68	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,7246	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,9632	(ug/ml)

14. den po transfekci

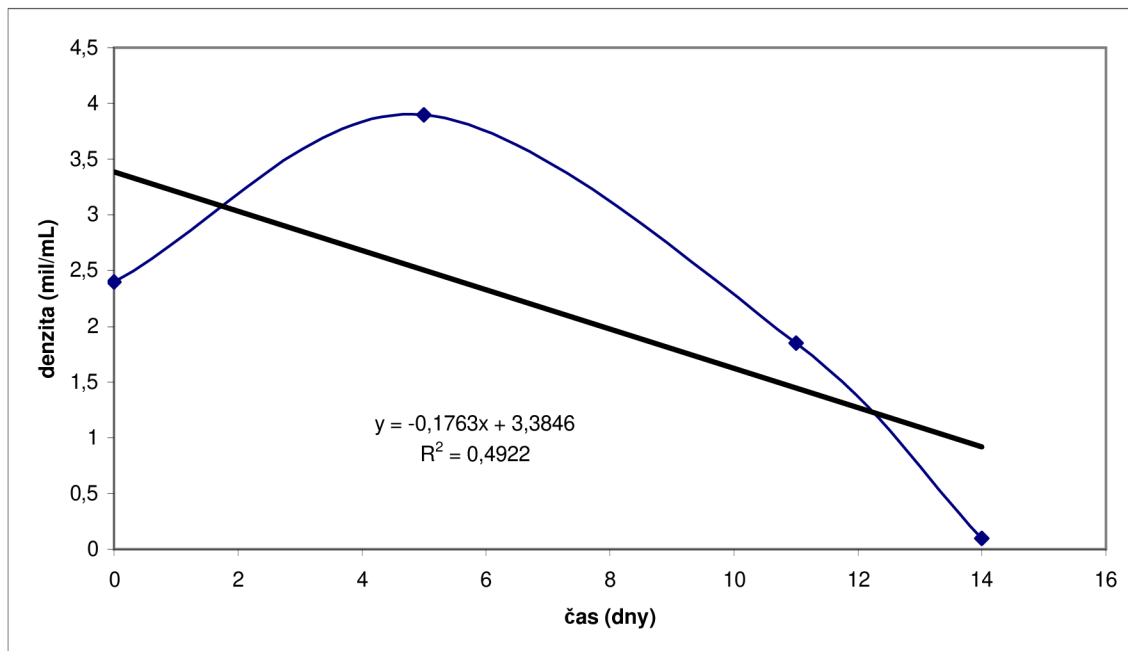


Obr. 53: Kalibrační křivka SEAP – 14. den po transfekci

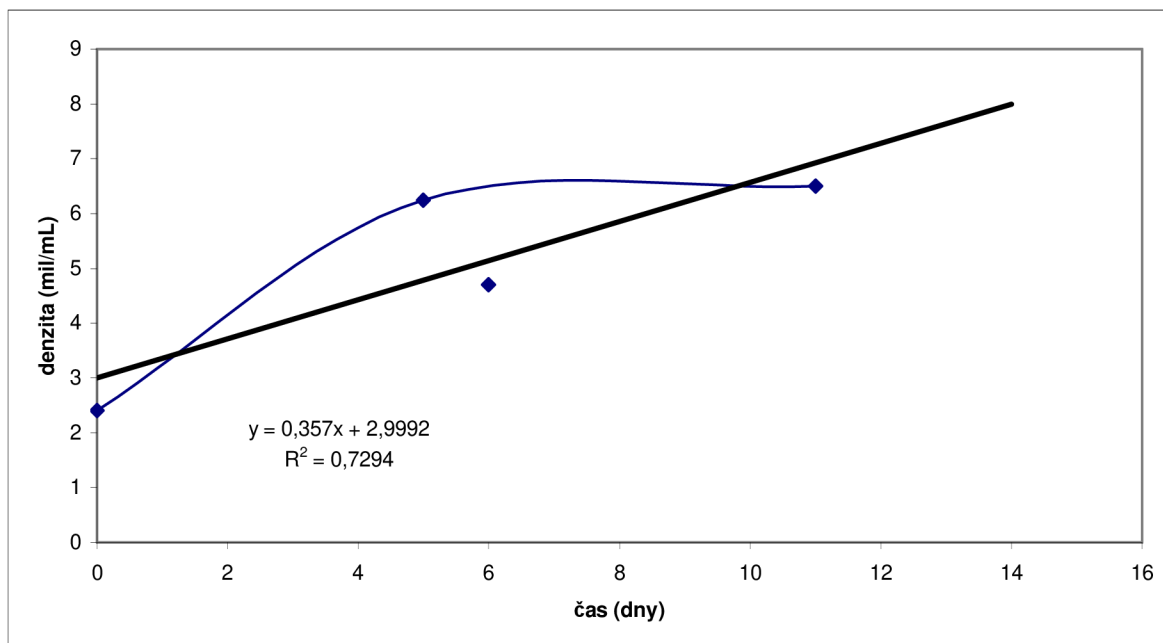
Tab.22: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 14. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug	7,8048	(ug/ml)
DNA 15ug	1,22	(ug/ml)
DNA 20ug	9,96	(ug/ml)
DNA 20ug	14,72	(ug/ml)
DNA 50ug	4,588	(ug/ml)
DNA 50ug	6,509	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,2344	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,1664	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	3,2226	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	2,1261	(ug/ml)

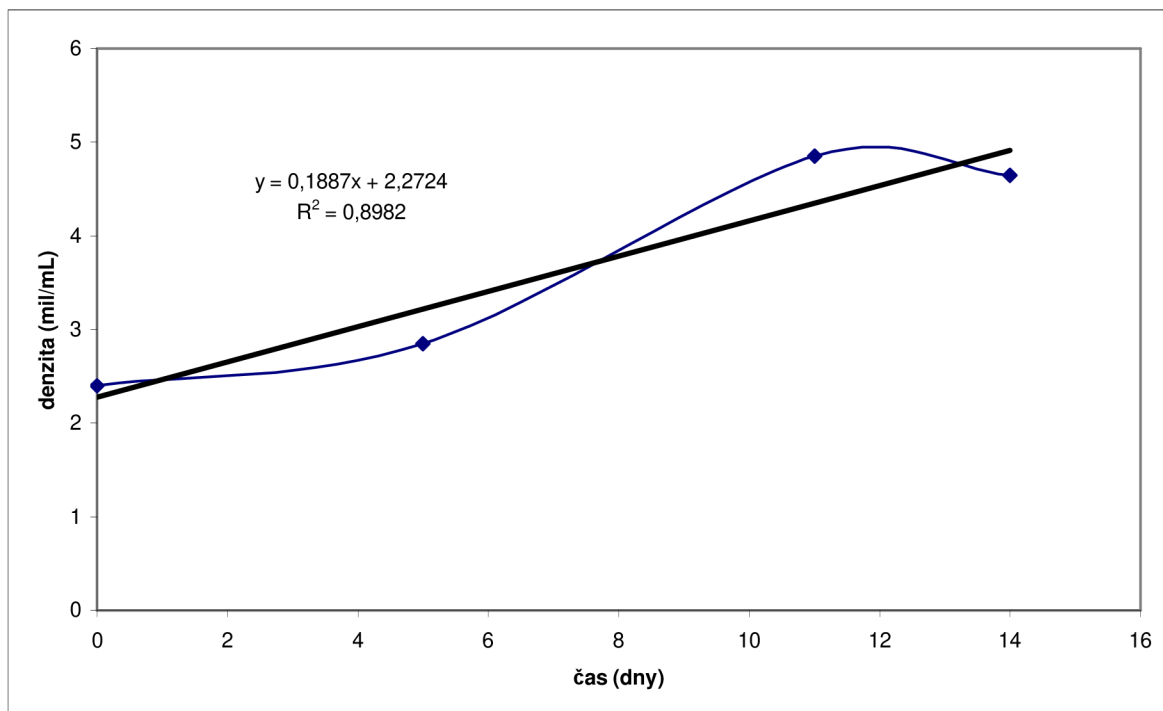
Níže jsou uvedené růstové křivky u vzorků a kontrol.



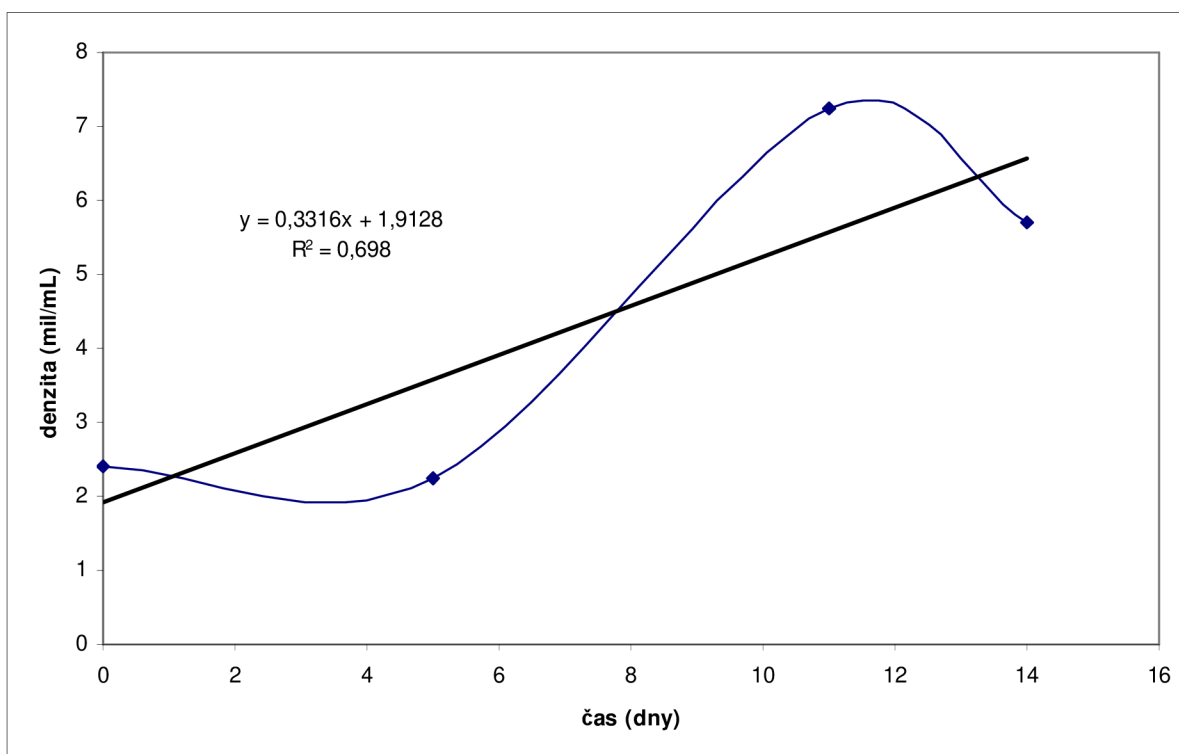
Obr. 54: Růstová křivka- kontrola 1



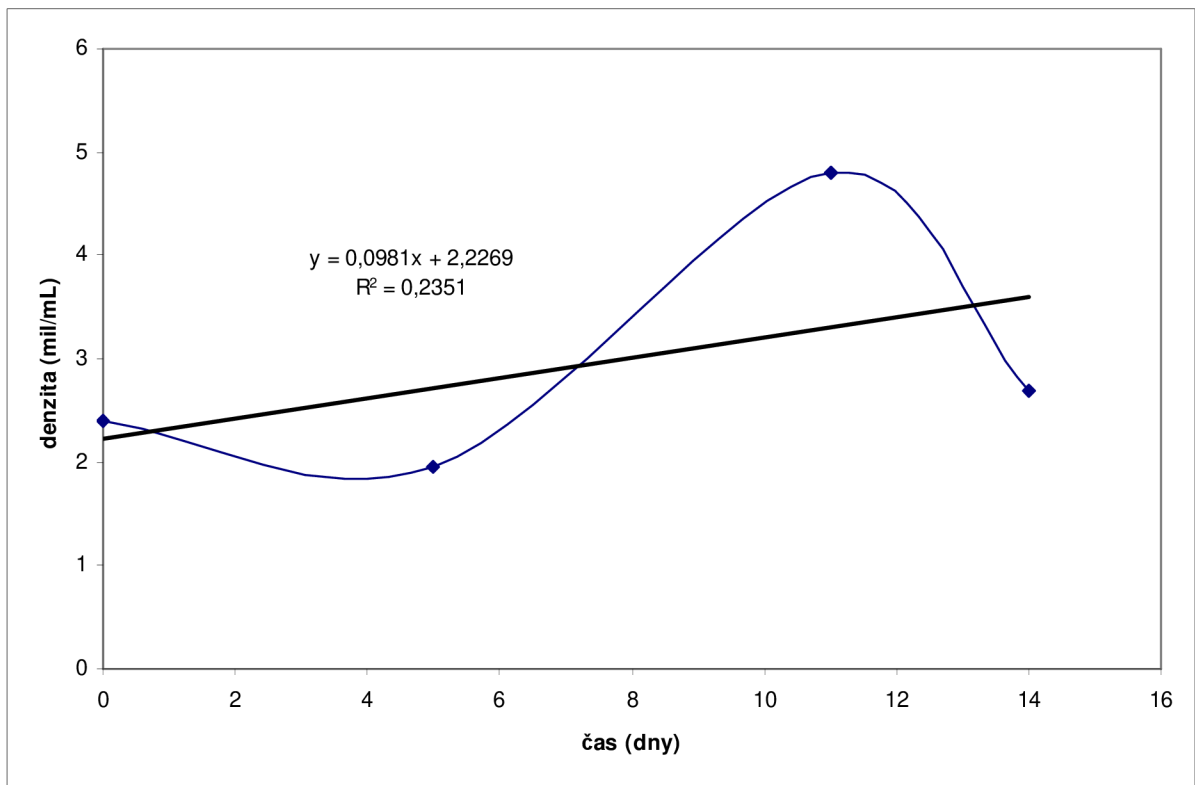
Obr. 55: Růstová křivka - kontrola 2



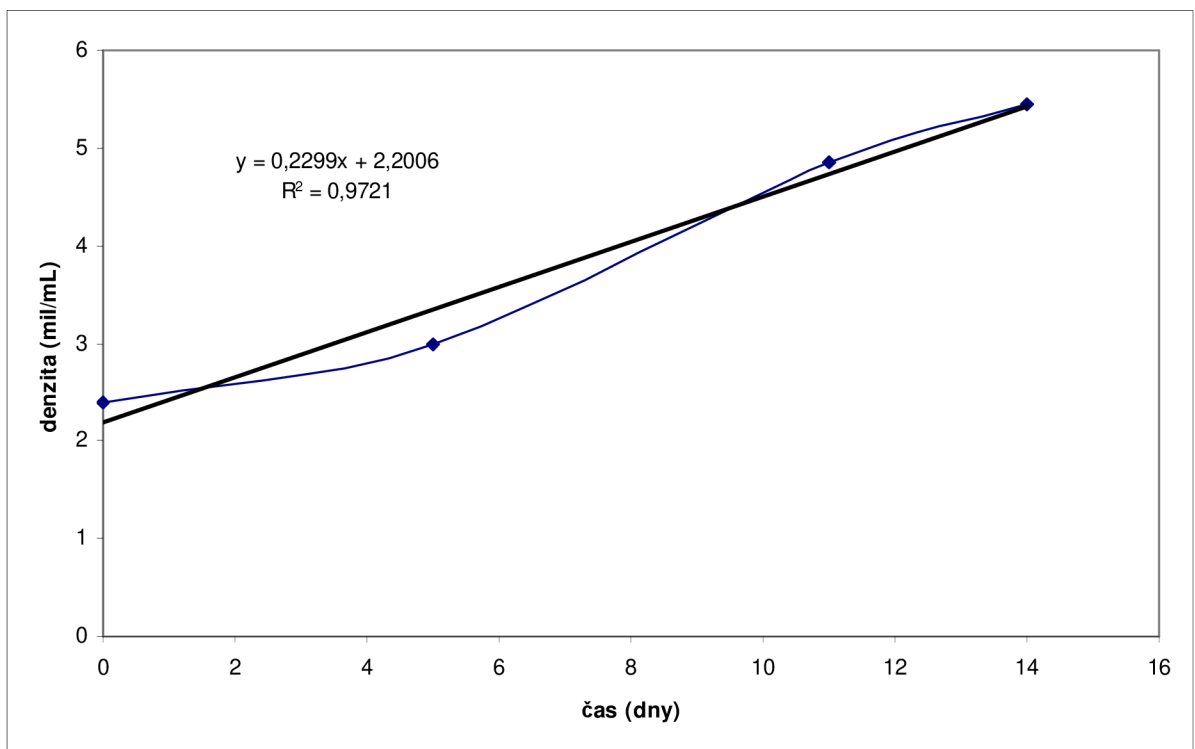
Obr. 56: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA A



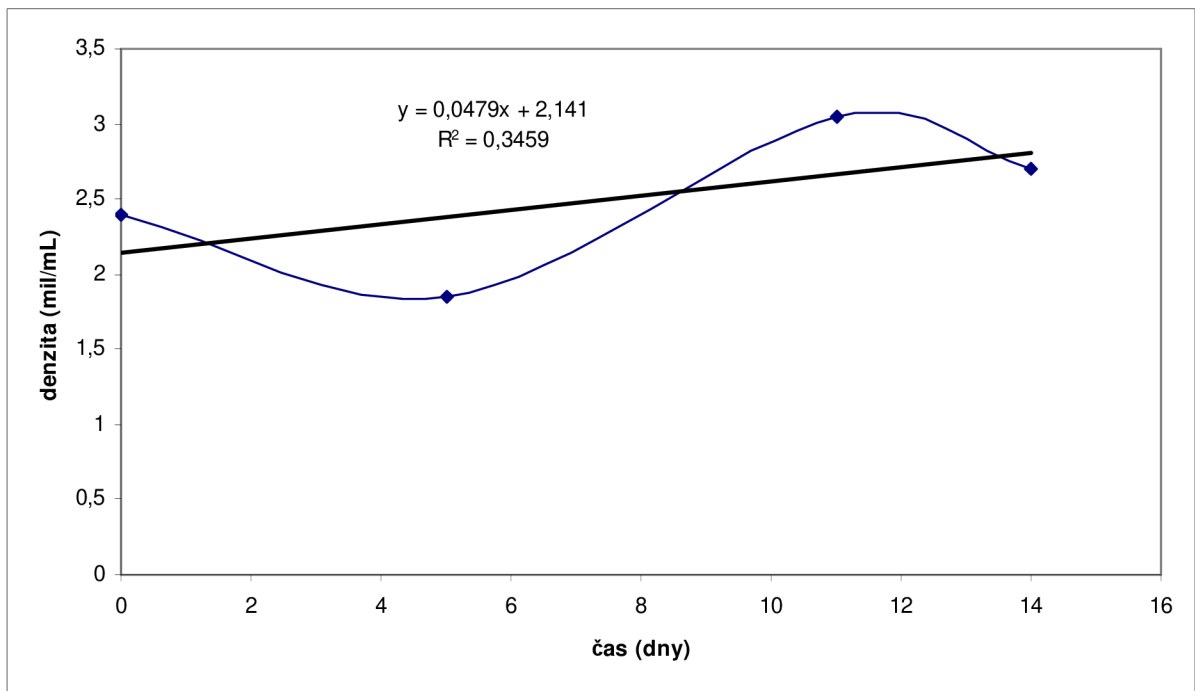
Obr. 57: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA B



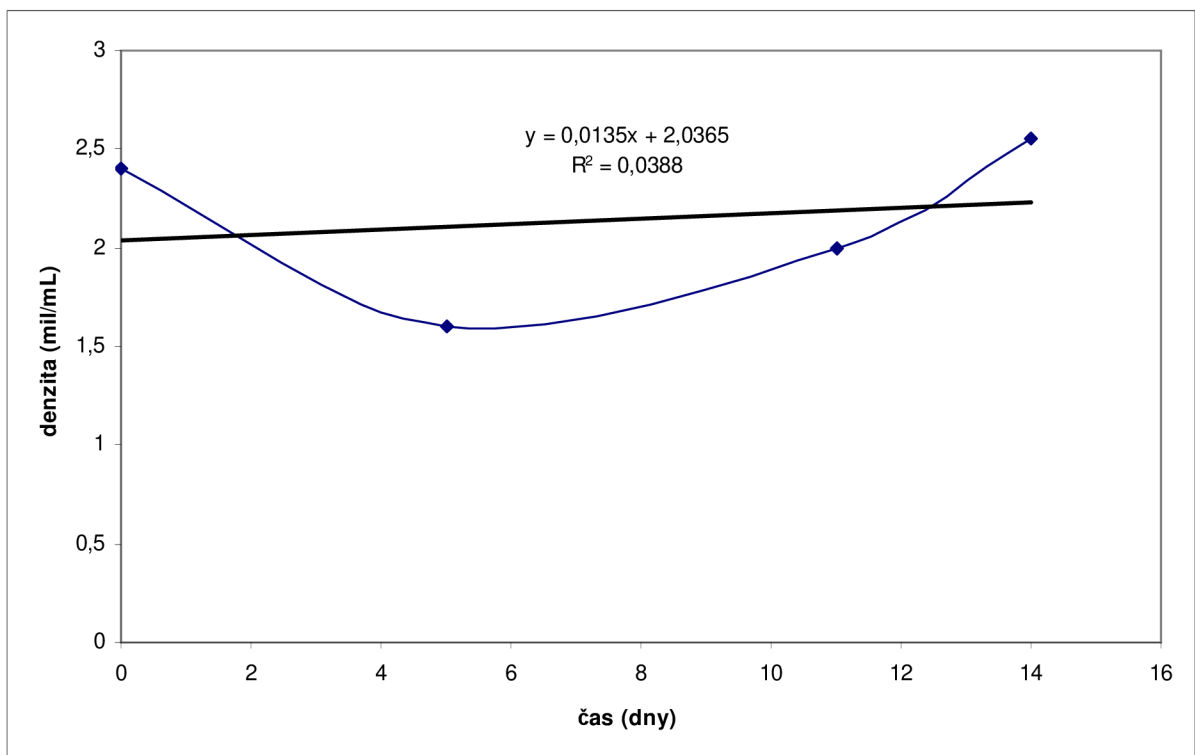
Obr. 58: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA A



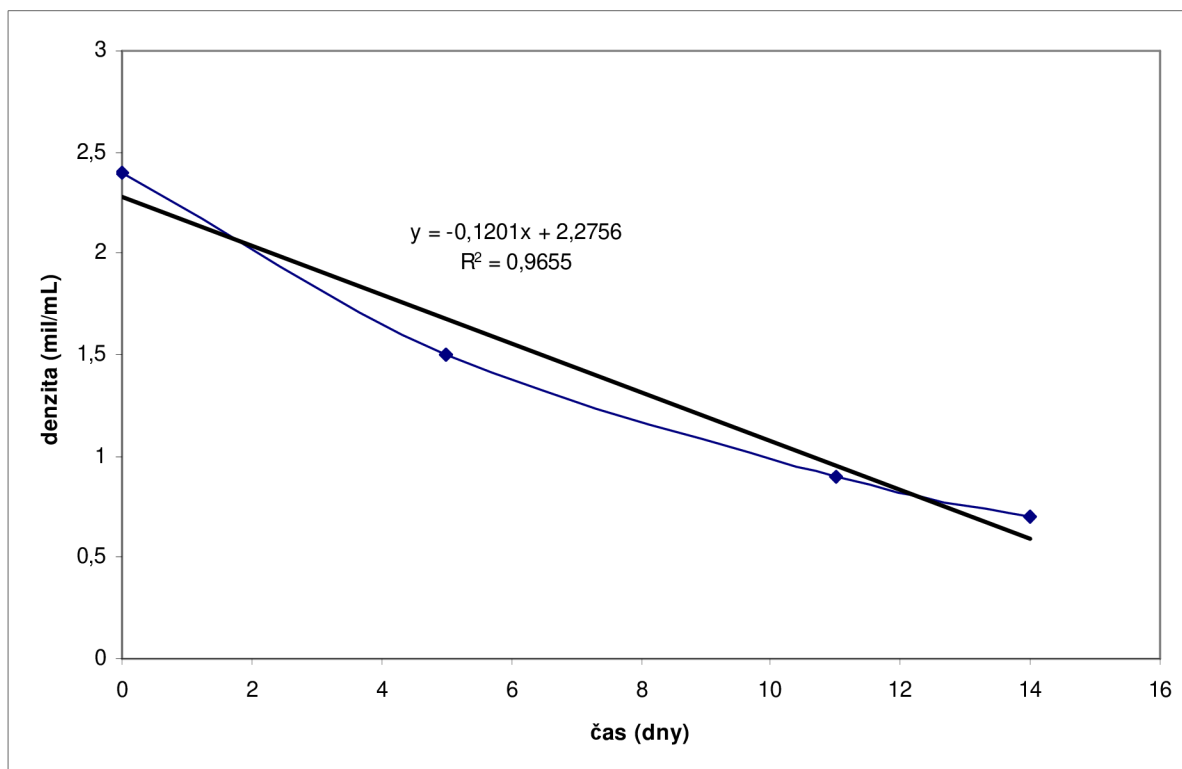
Obr. 59: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA B



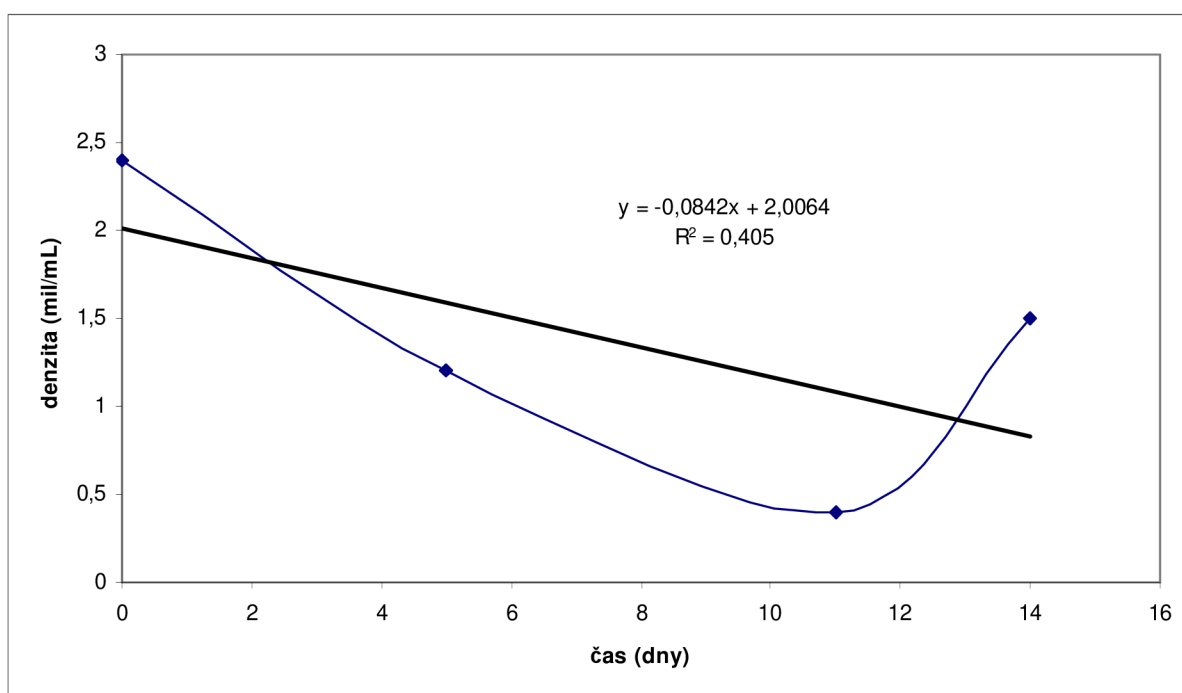
Obr. 60: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA A



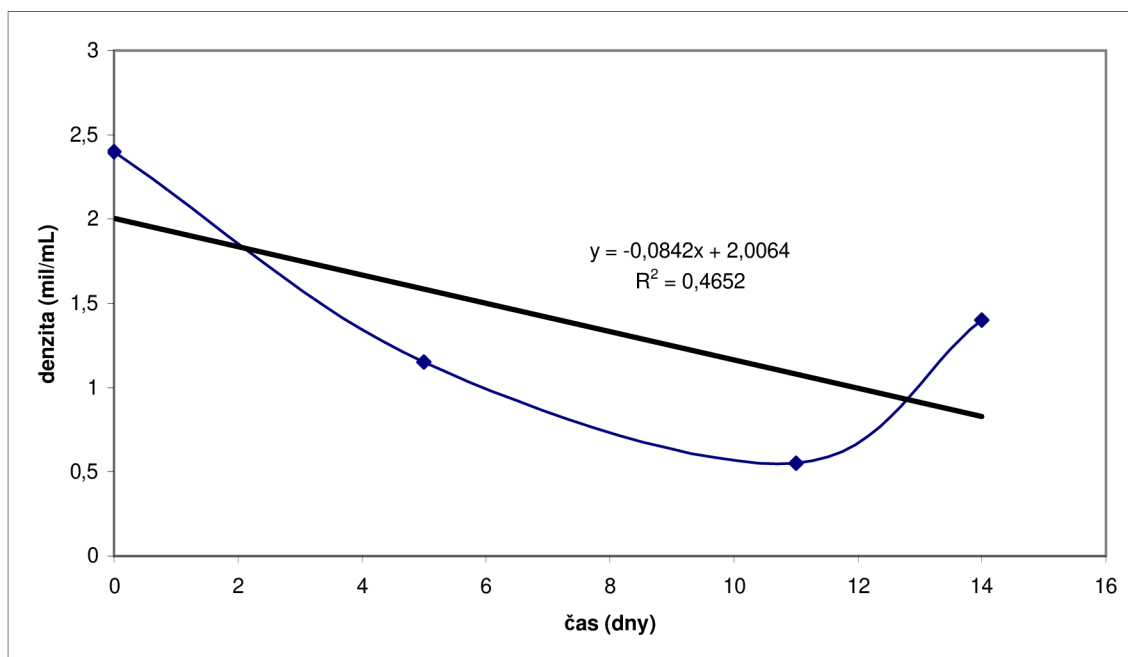
Obr. 61: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA B



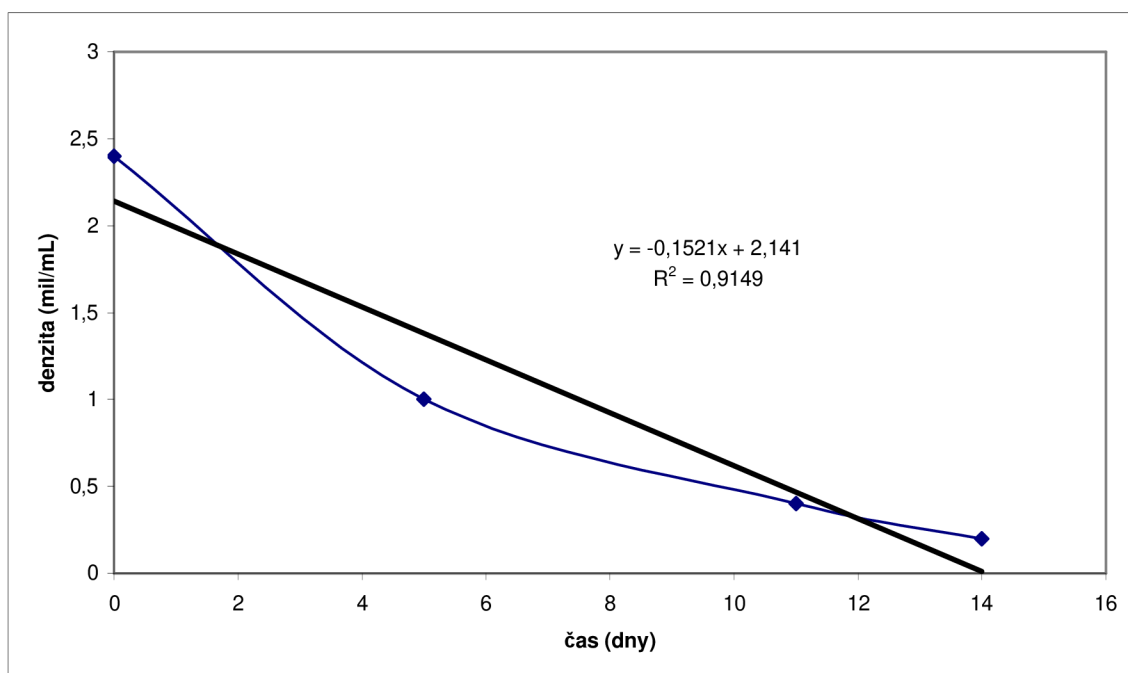
Obr. 62: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný A



Obr. 63: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný B



Obr. 64: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina A



Obr. 65: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina B

ABSTRAKT

Diplomová práce studuje problematiku transienční transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů.

V teoretické části jsou obsaženy poznatky o vzniku rekombinantních molekul DNA, použití expresních vektorů, přenosu DNA a následné detekci rekombinantního proteinu.

Experimentální část byla zaměřena na nalezení vhodné transfekční metody pomocí polyethyleniminu, kdy hostitelskými buňkami byly buňky 293HEK/EBNA.

V první části byl zvolen nejúčinnější plazmid – pCEP4/SEAP. Dále byly zkoumány tři transfekční metody: Muller (2005), Durocher et al. (2007) a Backliwal et al. (2008). Nejvyšší dosažené exprese SEAP bylo dosaženo metodou Backliwal et al. (2008).

ABSTRACT

Master's thesis deals with the transient transfection of the serum free animal cell culture using polyethyleneimines.

In the theoretical part formation of recombinant DNA molecules, used expression vectors, used DNA transfer and detection of recombinant proteins are discussed.

The experimental part deals with efficiency of the polyethylenimine mediated transient transfection under various experimental conditions. 293HEK/EBNA cell line was chosen as an experimental model.

First the most effective plasmide - pCEP4/SEAP was selected. Then three transfection methodes were tested: Muller (2005), Durocher et al. (2007) and Backliwal et al. (2008). The highest recombinant protein expresion was reached using the method of Backliwal et al. (2008).

KLÍČOVÁ SLOVA

transienční transfekce, polyethylenimin, buňky 292HEK/EBNA , rekombinantní protein

KEYWORDS

transient transfection, polyethylenimine, 292HEK/EBNA cells, recombinant protein

FRIČOVÁ, M. *Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 75 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Mgr. Mojmíru Ševčíkovi, Ph.D za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu firmy *BioVendor – Laboratorní medicína a.s.* za odborné rady při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Třídění genomových knihoven.....	9
2.1.1	DNA/DNA hybridizace.....	9
2.1.2	Imunologické testy.....	9
2.1.3	Proteinová aktivita.....	9
2.1.4	Komplementární test.....	9
2.2	Klonovací vektory.....	10
2.3	Endodeoxyribonukleázy.....	12
2.4	Tvorba rekombinantní molekuly.....	12
2.5	Přenos DNA do buněk.....	12
2.5.1	Chemický přenos.....	12
2.5.2	Mikroinjekce.....	12
2.5.3	Přenos pomocí liposomů.....	13
2.5.4	Elektroporace.....	13
2.5.5	Syntetické komplexy DNA-ligand.....	14
2.6	Hostitelské buňky a organismy.....	16
2.6.1	Prokaryotní buňky.....	16
2.6.2	Kvasninky.....	16
2.6.3	Rostliny.....	17
2.6.4	Živočišné buňky.....	17
2.7	Reportérové geny.....	18
2.7.1	Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu.....	18
2.7.2	Transgen pro β -glukuronidázu.....	18
2.7.3	Transgen pro luciferázu.....	18
2.7.4	Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP).....	19
2.7.5	Transgen pro alkalickou fosfatázu.....	19
2.8	Transientní (přechodná) transfekce.....	19
3	Experimentální část.....	20
3.1	Materiály a metody.....	20
3.1.1	Chemikálie.....	20
3.1.2	Pomůcky a přístroje.....	20
3.1.3	Buňky a kultivační média.....	21
3.1.4	Metody.....	22
3.1.5	Rozmražení buněk a kultivace.....	22
3.1.6	Pasážování a zamražení buněk.....	23
3.1.7	Počítání buněk pomocí trypanové modři.....	24
3.1.8	Převedení na suspenzní linii.....	24
3.1.9	Izolace a purifikace plasmidové DNA.....	25
3.1.10	Plazmidy.....	26
3.1.11	Metoda transfekce 1 - Muller (2005).....	30
3.1.12	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007).....	30
3.1.13	Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008).....	31
3.1.14	Stanovení exprese reportérového genu.....	31
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Růst zásobní buněčné kultury.....	33
4.2	Růst buněk po transfekci.....	34
4.3	Volba plazmidu pro transientní expresi.....	35
4.3.1	Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce.....	36

4.4	Srovnání metod transientní transfekce	37
4.4.1	Metoda transfekce 1 - Muller (2005)	37
4.4.2	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	37
4.4.3	Metoda Backliwal (2008).....	37
5	Závěr.....	41
6	Seznam použitých zdrojů	42
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	45
8	Seznam příloh.....	46
9	Přílohy	47
9.1	Složení médií a pufrů	47
9.1.1	LB médium.....	47
9.1.2	Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA.....	47
9.1.3	DMEM/F-12 médium.....	48
9.1.4	BV 293s médium.....	49
9.2	Metoda transfekce 1 – Muller (2005).....	49
9.3	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	63
9.3.1	Bezsérová kultivace.....	63
9.3.2	Kultivace s 1% přídavkem koňského séra.....	64
9.4	Metoda transfekce 3 – Backliwal	66

1 ÚVOD

Stále významnějším odvětvím biotechnologického a farmaceutického průmyslu se stává výroba rekombinantních proteinů. Rekombinantní proteiny jsou často požadovány ve velkých množstvích, jde o stovky miligramů až gramy r-proteinů. Jedná se zejména o produkci antikoagulantů, vakcín, terapeutik, lidského insulinu, růstových hormonů apod.

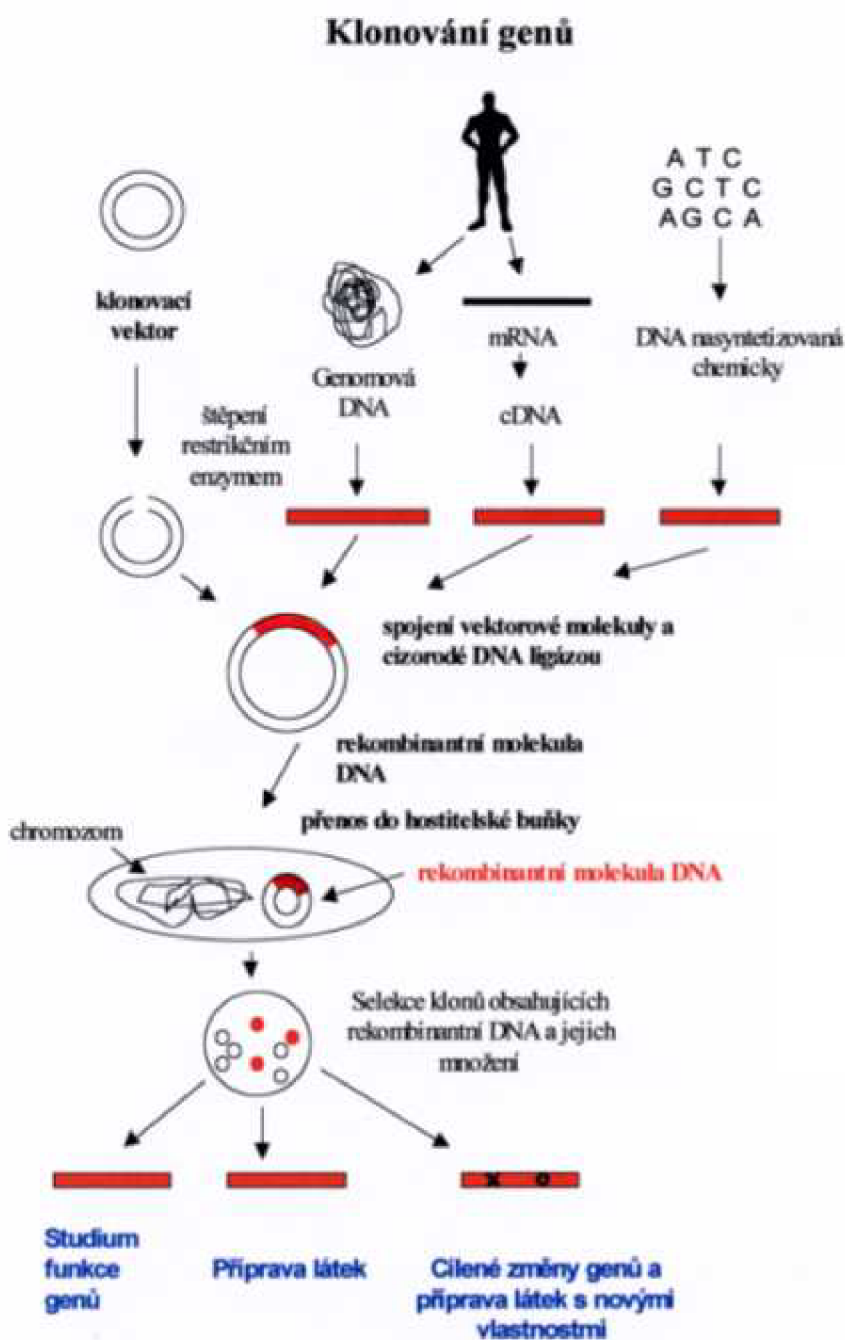
Pro správnou biologickou funkci r-proteinu je důležité, aby byl protein správně sbalen, a aby mu hostitelská buňka zajistila všechny posttranslační úpravy. Po dlouhodobých výzkumech bylo zjištěno, že vhodnými expresními systémy jsou savčí buňky.

Zatím bylo testováno více než 1000 sekvencí DNA kódujících proteiny potenciálně využitelných při léčbě lidských nemocí. Většina těchto molekul byla exprimována v hostitelských buňkách, přibližně 750 postoupilo do dalších klinických testů a 80 látek bylo schváleno jako léčiva v USA i EU. [1] [2]

Tato práce se zabývá problematikou přípravy r-proteinů pomocí transientní transfekce eukaryotních buněk 293 HEK/EBNA. Transfekce je proces cíleného přenosu nukleové kyseliny do hostitelských buněk. Při přechodné (transientní) transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. [2] Cílem práce je vývoj protokolu transientní transfekce na základě poznatků publikovaných dříve. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

Principem genového inženýrství je tvorba rekombinantních (chimérických) molekul DNA. V roce 1973 poprvé popsali Cohen a Boyer techniky tvorby rekombinantních molekul DNA. [3] Klonovaná DNA je získána buď z donorového organismu, jehož DNA kóduje nějakou zajímavou vlastnost, nebo je použit uměle syntetizovaný gen. Prvním krokem při tvorbě rekombinantních molekul je hledání a izolace klonovaného genu. K vyhledání cílové sekvence DNA se konstruuje genomové knihovny. Genomová knihovna je soubor naklonovaných fragmentů DNA, které dohromady tvoří genom jednoho organismu. K vyhledání specifického genu se využívá metod třídění genomových knihoven. [4]



Obr. 1: Schéma klonování genů [5]

2.1 Třídění genomových knihoven

2.1.1 DNA/DNA hybridizace

Je založena na párování komplementárních dusíkatých bází jednořetězcových nukleových kyselin pomocí vodíkových můstků. K vyhledání specifického genu se použije krátký oligonukleotidový řetězec, který je částečně (heterologní sonda), nebo zcela (homologní sonda) komplementární s klonovanou sekvencí DNA. DNA sonda nese značku, která je snadno detekovatelná. V oligonukleotidovém řetězci sondy může být zakomponován radioaktivní izotop, který je po hybridizaci sondy se sekvencí DNA detekován např. radiograficky. Sonda může být značena i neradioaktivně, např. imunologicky. K hybridizaci lze použít fragmenty po agarózové gelové elektroforéze, kdy pomocí filtračních papírů a kapilárních sil jsou fragmenty přeneseny (přebírány) na nylonovou membránu. Poté jsou fragmenty denaturovány a přidá se sonda, která hybridizuje s cílovými sekvencemi DNA – Southernův blot.

2.1.2 Imunologické testy

Na sondu je navázán antigen. Poté je do roztoku DNA přidána směs primárních protilátek, které se specificky vážou k antigenům. Následně se přidají sekundární protilátky, které nasedají na primární protilátky a zároveň nesou značení, které je snadno detekovatelné, např. enzym (alkalická fosfatáza). Po přidání substrátu je substrát změněn enzymem na produkt a tato reakce je doprovázena barevnou změnou. Poté je signál sondy zjištěn fotometricky.

2.1.3 Proteinová aktivita

Tato metoda se využívá pokud klonovaný gen kóduje syntézu enzymu, který není normálně hostitelskou buňkou produkován. Kolonie jsou zaočkovány na misky s vhodným substrátem (škrob – kolonie obsahující gen pro alfa-amylázu) a na základě selektivního zbarvení se rozliší, které kolonie využívají substrát, a tudíž obsahují cílový gen.

2.1.4 Komplementární test

Komplementární test je využíván, pokud klonovaný gen kóduje syntézu esenciálního produktu (vitamín, antibiotikum, aminokyselina apod.) nezbytného pro přežití buňky. Gen se přenesou do buněk, které nejsou schopné růst na substrátech bez esenciální složky. Pokud buňky získaly rekombinantní plazmid, jsou schopné růst na minimálním médiu a esenciální složku si syntetizují samy.

2.2 Klonovací vektory

Klonovací vektory slouží k přenosu cizorodé DNA do hostitelských buněk. Čím je menší velikost klonovacího vektoru, tím se zvyšuje účinnost přenosu rekombinantní molekuly DNA. Vektory obsahují cílová místa pro restriční endonukleázy. Restriční endonukleázy jsou enzymy, které vektor naštěpí a do tohoto místa je vložen gen zájmu. Na vektoru je vždy jen jedno místo pro danou nukleázu. Dále vektoru obsahuje selekční marker, který umožňuje identifikovat, které buňky získaly vektor. Jako selekční markery se často využívají geny pro rezistenci k antibiotiku (např. ampicilin). Po provedení přenosu rekombinantní DNA do hostitelských buněk senzitivních na antibiotikum, jsou buňky vysety na médium s přídatkem antibiotika. Přežijí jen ty buňky, které získaly vektor.

Jako vektory se nejčastěji používají plazmidy. Jsou to kruhové samoreplikující se extrachromozomální molekuly DNA izolované z bakterií. Obsahují sekvenci ori, místo počátku replikace.

Dále fágové vektory odvozené od fága lambda a od fága M13. Cizorodá DNA se množí v lytickém cyklu fága jako rekombinantní DNA fága lambda. Poté se vytvoří viriony (fágové částice), které se skládají z DNA zabalené v hlavičce, ke které je připojen bičík. Za přítomnosti virionů se na vrstvě buněk začnou tvořit plaky.

Hybridy mezi plazmidy a fágy jsou kosmidy. Spojují výhody obou typů vektorů. Pomocí fágových částic je DNA injikována do hostitelských buněk. Kosmid obsahuje dvě cílová místa, které se v hostitelské buňce spojí a vznikne kruhová molekula DNA. V hostitelské buňce jsou poté uchovávány jako plazmidy. Dále kosmid obsahuje gen pro rezistenci na tetracyklin pro selekci v hostitelských buňkách, které jsou citlivé na tetracyklin. Výhodou kosmidů je velká klonovací kapacita (viz. tabulka č.1). Pomocí těchto vektorů lze klonovat i soubory genů (operony).

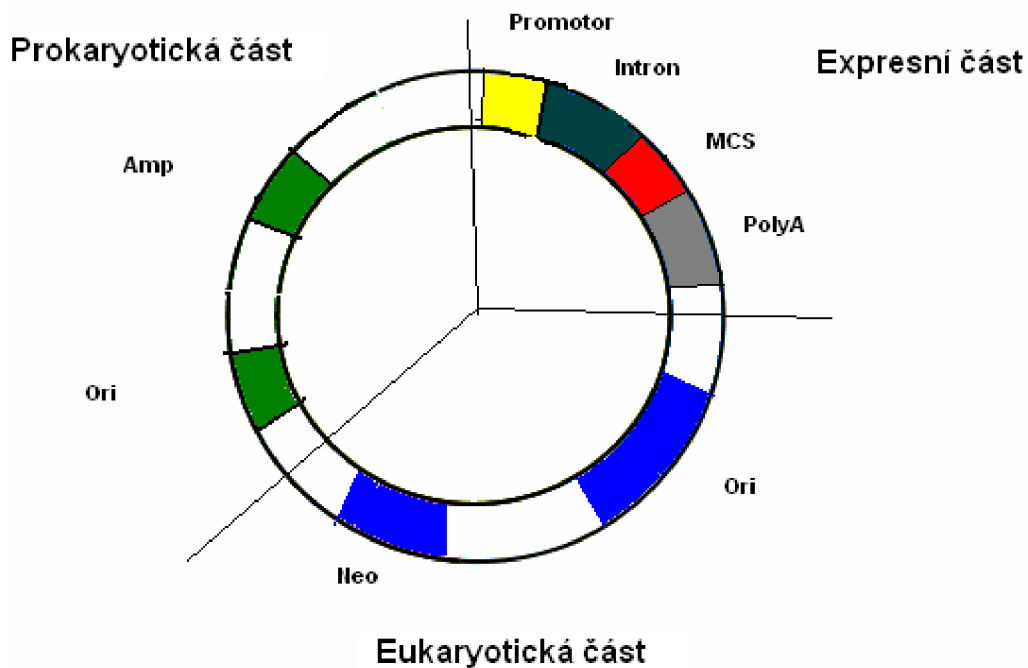
Tab. 1: Klonování kapacity vektorů [4]

vektor	Hostitelská buňka	Klonování kapacita (kb)
Plazmid	<i>E. coli</i>	0,1 – 10
Bakteriofág λ	λ / <i>E. coli</i>	10 – 20
Kosmid	<i>E. coli</i>	35 -45
Bakteriofág P1	<i>E. coli</i>	80 – 100
Bakteriální umělý chromozom	<i>E. coli</i>	50 – 300
P1 bakteriofágový umělý chromozom	<i>E. coli</i>	100 – 300
Kvasinkový umělý chromozom	kvasinky	100 – 2000
Lidský umělý chromozom	Lidské buňky	> 2000

Eukaryotické geny nemohou být správně exprimovány v bakteriálních vektorech. Eukaryotické geny obsahují introny a exony. Prokaryotické buňky nejsou schopny vystřihávat introny z přepsané RNA. Pro klonování eukaryotických genů v bakteriálních buňkách byly vytvořeny speciální postupy.

Z organismu se vyizoluje celková RNA. Eukaryotní mediátorová RNA nese na 3' konci polyadenylový konec. Mediátorová RNA se oddělí od celkové pomocí kolony, která obsahuje polythymínové zbytky, na které se navážou polyadenylové konce mRNA pomocí vodíkových můstků. Poté jsou štěpeny vodíkové můstky pomocí speciálního pufru a RNA je eluována ven z kolony. Mediátorová RNA je přepsána do DNA za pomoci enzymu reverzní transkriptázi. Výsledkem je fragment dvouřetzcové cDNA (komplementární DNA). Konstrukt vektor-cDNA může být vnesen do hostitelské buňky *E. coli*. Pro expresi eukaryotních genů jsou využívány kvasinkové, hmyzí a savčí vektory.

Eukaryotický expresní vektor obsahuje: eukaryotický markerový gen pro selekci v hostitelské buňce, promotorovou sekvenci, transkripční a translační stop signály, sekvence pro posttranskripční úpravy RNA, počátek replikace funkční v hostitelské buňce (extrachromozomálně replikující se DNA), nebo integrační místo pro rekombinaci do genomu hostitelské buňky. [4]



Obr. 2: Mapa plazmidu – plazmid se skládá ze tří částí. Prokaryotická oblast nese místo *ori* (počátek replikace) a gen pro rezistenci k ampiclinu funkční v buňkách *E. coli*. Pro eukaryotní buňky slouží sekvence *ori* a gen pro rezistenci k neomycinu. Expresní oblast obsahuje promotor, za kterým následuje klonovací místo (MCS = multiplecloning site).

Vektory pro expresi eukaryotních genů jsou konstruovány jako kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje *ori* místo a selekční marker funkční v *E. coli*. Dále obsahuje *ori* místo, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS (multiple cloning site) s promotorovou a terminátorovou sekvencí. [2]

2.3 Endodeoxyribonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které štěpí DNA ve specifických místech, rozpoznávají palindromické sekvence. Restrikční endonukleázy byly izolovány z různých bakteriálních kmenů. Jsou označeny zkratkami podle toho, z jaké bakterie byly získány (např. EcoRI z *Escherichia coli*). Původní význam těchto enzymů je ochrana před cizorodými DNA, např. virovými. Aby se zamezilo štěpení hostitelské DNA, je chráněna před působením enzymů methylací. Tyto enzymy se využívají při tvorbě rekombinantní (chimérické) DNA. Vektor i cílový fragment cizorodé DNA je naštěpen stejnou endonukleázou. Štěpení fragmentů probíhá za vzniku přečnívajících nebo tupých konců.

2.4 Tvorba rekombinantní molekuly

Z donorového organismu je izolována DNA. Poté je nalezen cílový gen a vyštěpen pomocí restrikční endonukleázy. Stejnou restrikční endonukleázou je naštěpen plasmid v cílovém místě pro enzym, které sousedí s klonovacím místem. Vznikne lineární molekula plasmidové DNA s přečnívajícími konci se sekvencemi nukleotidu podle použitého enzymu. Linearizované molekuly jsou smíchány s cílovou DNA a směs je inkubována s DNA ligázou za přítomnosti ATP. Vznikne rekombinantní molekula (plasmid-insert). [4]

2.5 Přenos DNA do buněk

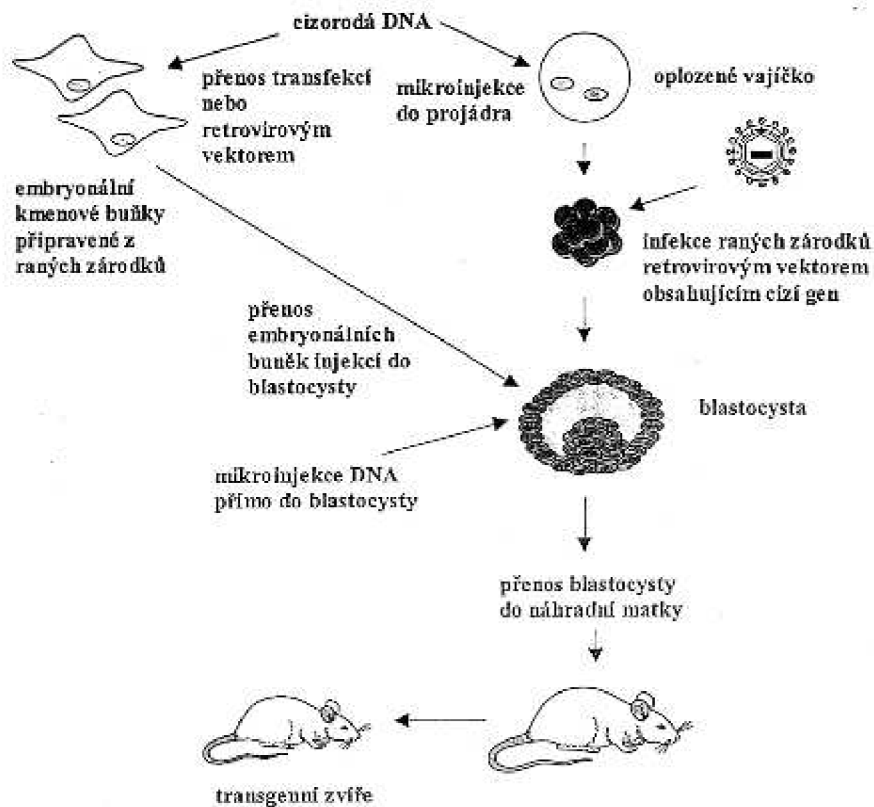
V přírodě často probíhá přirozený přenos DNA do hostitelských buněk. K tomu dochází při bakteriální konjugaci, přirozené transformaci nebo k přenosu DNA během virové infekce. DNA lze do buněk přenášet i za pomoci fyzikálních nebo chemických sil.

2.5.1 Chemický přenos

Buňky a roztok DNA jsou inkubovány v prostředí roztoku chloridu vápenatého při teplotě 0°C. Poté je roztok zahřát na teplotu 42°C. K roztoku obsahujícím DNA a CaCl₂ se postupně přidává HEPES-fosfátový pufr. Směs se inkubuje při laboratorní teplotě, a poté je vzniklá sraženina dispergována v prostředí buněk. Doba inkubace musí být optimalizována (je zpravidla kratší než 4 hod). [6]

2.5.2 Mikroinjekce

Pomocí mikroinjekce se DNA přenesou přímo do jádra buňky. Tato technika je velmi náročná a zabere mnoho času. Využívá se především při tvorbě transgenních zvířat, kdy je DNA mikroinjekcí vpravena buď do projádra nebo přímo do blastocysty. [5]



Obr. 3: Tvorba transgenních savců [5]

2.5.3 Přenos pomocí liposomů

Na základě hydrofobního efektu se lipidy ve vodném prostředí shlukují k sobě a vytváří duté struktury zvané lipozomy. Díky elektrostatickým interakcím se navzájem přitahují kladně nabití lipidy se záporně nabitou DNA za vzniku agregátů. Částice nesoucí kladný náboj interagují se záporně nabitou buněčnou membránou, která je rovněž hydrofobní, a poté je uskutečněn vstup do hostitelské buňky. Provedení této transfekce je drahé, protože ceny transfekčních lipidů jsou vysoké, a proto se tato transfekce uskutečňuje pouze v menších objemech. [2]

2.5.4 Elektroporace

Elektroporace je reverzní permeabilizace buněk elektrickým polem o vysokém napětí. Elektrotransformace probíhá za nefyziologických podmínek. Připraví se elektrokompetentní buňky a poté se na směs buněk a přenášených molekul aplikuje krátký elektrický puls při nízké teplotě. Následuje regenerace buněk. Optimální podmínky elektrotransformace se nalézají v úzkém rozmezí elektrického napětí a doby trvání pulzu.

Tab. 2: Rozmezí elektrického napětí pro různé typy buněk [6]

G -	7 – 15 kV/cm
G +	až 35 kV/cm
rostlinné, živočišné buňky	1 – 2 kV/cm

Během elektroporace zahyne velký počet buněk. Závisí na biologických faktorech jako je stáří buněk, velikost buněk, koncentrace a způsob regenerace buněk.

Molekulární mechanismus elektrotransformace není znám. Existuje teorie přechodné tvorby hydrofilních pórů, která dobře popisuje děje probíhající při pokusech s buňkami po stránce kvalitativní, ne však kvantitativní. Hlavními nevyřešenými problémy jsou: popis raného stadia tvorby pórů, transport molekul póry a návrat membrány do původního stavu.

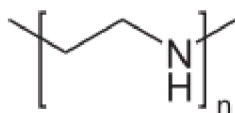
Z doposud známých experimentálních dat lze vyvozovat, že mechanismus přenosu zahrnuje interakci DNA s povrchem buňky, difúze DNA indukovaná elektrickým polem a pasivní difúze. Aplikace elektrického pole není podmínkou přenosu DNA, proces ale urychluje.

2.5.5 Syntetické komplexy DNA-ligand

DNA kondenzuje s polykationtem - poly-L-lysinem. Polykationt se váže jak s DNA, tak s ligandem. Vytvoří se komplex DNA-polykationt-ligand. Ligand je specifický pro povrchový receptor buňky a je zodpovědný za počáteční interakci komplexu s buňkou.

DNA je možné přenést také pomocí polymerního kationtu (DEAE-dextran, PEI), který asociuje se záporně nabitými molekulami DNA. Vzniklý komplex je kladně nabitý a váže se na záporně nabitou lipidovou dvojvrstvu. Následuje přenos komplexu pomocí endocytózy. [6]

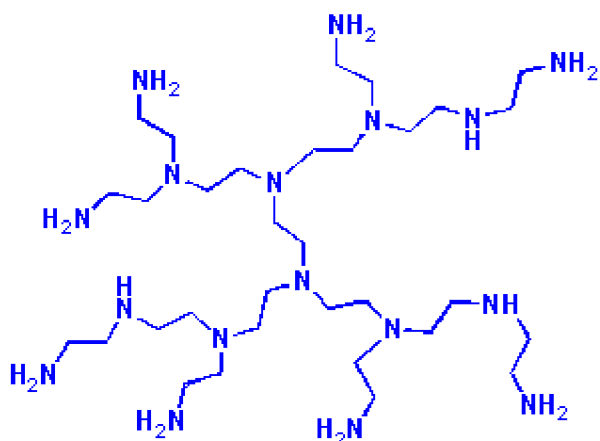
2.5.5.1 Polyethylenimin (PEI)



Obr. 4: Vzorec polyethyleniminu, zdroj internet: <http://commons.wikimedia.org/>

Polyethylenimin je polymerní sloučenina, jejíž základní jednotkou je ethylenimin. PEI se může vyskytovat jako lineární forma, která se nachází při pokojové teplotě v pevném stavu. Druhou formou je rozvětvený polyethylenimin, který je tekutý. Oba typy PEI se používají jako transfekční činidlo s různým stupněm polymerace a různou molekulovou hmotností. V roce 1995 byl PEI poprvé použit pro přenos DNA. [7]

Molekula PEI má pufrovací schopnosti. Rozvětvená forma tvoří primární, sekundární a terciální aminy. Atomy dusíku obsažené v molekule PEI mohou být protonovány, což udílí molekule náboj. Čím více atomů dusíku je v molekule obsaženo, tím je větší náboj. Informace o celkové pufrovací kapacitě je důležitější než určení disociační konstanty pKa molekuly polyethyleniminu. [2] [8]



Obr. 5: Rozvětvený polyethylenimin, zdroj internet: <http://www.hyperpolymers.com/>

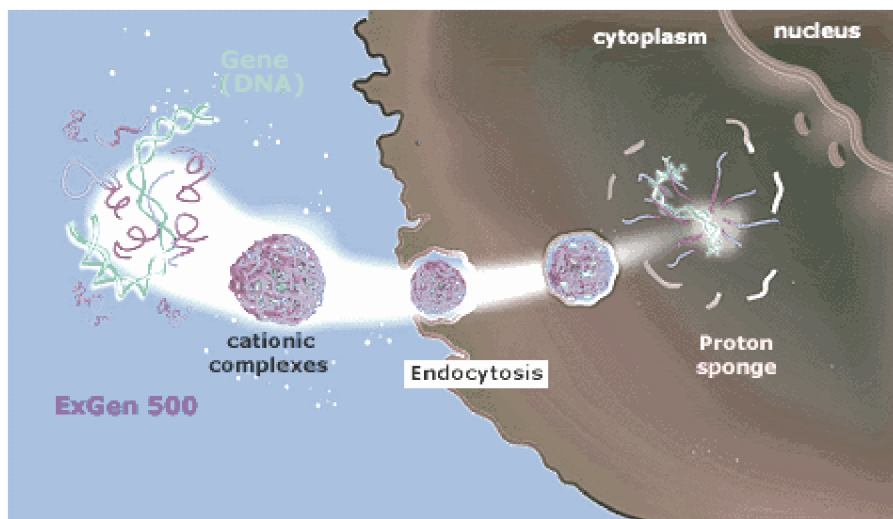
Před samotnou transfekcí se připraví roztoky DNA a PEI o přesné koncentraci a roztoky se smíchají. Poté dojde ke kondenzaci molekul a vzniku komplexu DNA/PEI na základě hydrofobních interakcí. [10] Komplexy DNA/PEI se shluknou k sobě a vzniknou kladně nabitě nanočástice. Nanočástice se poté naváží na buněčné záporně nabitě proteoglykany a glykoproteiny na povrchu buněčné membrány. [11] Dvnitř buněk pronikají pomocí endocytózy. PEI chrání endozóm před působením lysozomálních nukleáz. Uvnitř buňky se uvolní DNA z endozómu díky pufovací schopnosti PEI tím, že absorbuje protony při acidifikaci endozómu – tzv. houbový protonový efekt. [12] To vede k nahromadění kladného náboje, což způsobí influx chloridových aniontů a vody do endozómu. Endozóm nabobtná, uvnitř se zvyšuje osmotický tlak, což vede k prasknutí endozómu. [13]

Této domněnce však odporuje skutečnost, že v komplexu DNA/PEI je asi 85% molekul PEI volných [14], a také pKa PEI je přibližně 8,4 [15], takže po acidifikaci má PEI jen malou pufovací kapacitu. Z těchto důvodů je nepravděpodobné, že osmotické pnutí hraje významnou roli při prasknutí endozómu. [14]

Existuje teorie, že komplex DNA/PEI je transportován pomocí mikrotubulů k jádru, kde se část komplexu rozpadne díky přítomnosti RNA. RNA má vyšší afinitu k PEI než DNA. [10] DNA pak samostatně přechází přes jadernou membránu a poté se v jádře začlení do chromozomu. Mechanismus těchto pochodů není zatím zcela objasněn. [14] [16]

V průběhu transfekce a uvolnění DNA z komplexu záleží na předem zvoleném poměru DNA:PEI.

Pomocí AFM (atomic force microscopy – mikroskopie atomárních sil) byly studovány velikosti komplexu DNA/PEI. Velikost byla stanovena na 20 až 40 nm. Přesné poměrové zastoupení DNA v komplexech DNA/PEI zatím není známo. Transfekce pomocí PEI byly testovány v různých objem. [7] [17] [18]



Obr. 6: Schéma přenosu DNA do jádra buňky, zdroj Internet: <http://www.biomol.de/>

2.6 Hostitelské buňky a organismy

Při výběru hostitelského organismu je potřeba zvážit, zda chceme klonovat geny prokaryotní, nebo eukaryotní. Při expresi eukaryotních genů hostitelská buňka zajistí všechny posttranskripční a posttranslační úpravy. Vzniklý protein je často identický s přirozeně se vyskytujícím a je biologicky aktivní.

2.6.1 Prokaryotní buňky

Nejdetaillněji prostudovaný organismus, který se používá pro klonování genů je *Escherichia coli*. Výhodou je vysoká účinnost transformace a fakt, že existuje řada expresních vektorů s regulovatelnými promotory funkčních v *E. coli*. Nevýhodou je, že řada cizorodých proteinů se nevytváří ve funkční podobě.

Jako další hostitelské organismy z řady G - bakterií se využívá *Bacillus sp.* Tyto nepatogenní mikroorganismy produkují množství extracelulárních enzymů, které lze lehce izolovat z média. Snadno se kultivují a adaptují na řadu podmínek kultivace. Lze připravit řadu mutantů hyperprodukcující enzymy i jiné látky.

2.6.2 Kvasníky

Jedná se o jednobuněčné eukaryotní organismy. Řada kvasinkových genů je homologních s geny mnohobuněčných eukaryotních organismů, mají podobnou buněčnou biochemii a regulaci genů. U kvasinek lze stanovit dominanci a recesivitu alel. Mají krátkou generační dobu a vysoký počet jedinců, kultivují se na definovaných půdách a také ve velkokapacitních bioreaktorech. Jsou považovány za bezpečný (GRAS – generally recognised as safe) biotechnologický organismus, což umožňuje přípravu léčiv pro humánní medicínu. Tvoří eukaryotické proteiny v aktivní podobě, lze dosáhnout sekrece do prostředí. K nejčastěji

používaným druhům patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* a *Hansenula polymorpha*. [4] [5]

2.6.3 Rostliny

Výhodou rostlin při genetických manipulacích je totipotence, což znamená, že celou rostlinu můžeme vypěstovat z jakékoliv její části. Mezi další výhody se řadí schopnost regenerace, velký počet semen, krátká generační doba a asexuální křížení. Rostlinné biochemické dráhy poskytují průmyslové suroviny a léčiva. Modelovým organismem pro účely molekulární genetiky je *Arabidopsis thaliana*.

Jednou z možností přenosu cizorodé DNA je přenos pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie přirozeně infikuje rostliny a vnese do nich Ti-plazmidy (tumor indukující plazmidy) obsahující cílové sekvence. [5]

2.6.4 Živočišné buňky

Jsou izolovány z tkání živočichů a poté kultivovány in vitro. Při kultivaci je nutné zajistit podmínky, které se podobají přirozeným, proto se udržují při teplotě 37°C a v modifikované atmosféře (5% CO₂). Veškeré manipulace s buňkami musí být prováděny ve sterilním prostředí. Většina buněk roste přisedlá k pevnému povrchu, jako v původní tkáni. K růstu je nutné použít kultivační médium, které buňkám dodává potřebné živiny a další pro život důležité látky.

K nejčastěji používaným patří CHO (Chinese Hamster ovary) – buňky původně izolované z křeččích vajíček a 3T3 – buňky z myších vajíček.

HEK 293 (humam embryonal kidney) – epiteliální lidské ledvinové buňky a HeLa (Henrietta Lacks) – epiteliální buňky z rakovinných buněk. [2] [19]

2.6.4.1 Buňky 293HEK/EBNA1

Tyto buňky byly poprvé připraveny roku 1970 v laboratoři Alexe van der Eba v holandském Leidenu. Byl získány ze zdravých potrácených lidských plodů a poprvé kultivovány jako primární HEK buňky. Později byly upraveny pomocí pěti adenovirových genů. [20] Zkratka HEK označuje lidské embryonální ledvinové buňky a číslo 293 označuje 293. Grahamův pokus.

Tyto buňky se dobře kultivují a probíhá u nich relativně snadná transfekce, proto se využívají ke tvorbě rekombinantních proteinů. Protože se jedná o lidské buňky, jsou u exprese zajištěny správné posttranskripční a posttranslační modifikace. Jsou tedy vhodné pro klinický výzkum i pro tvorbu lidských terapeutik.

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů

do dceřinných buněk při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22] V dnešní době jsou buňky 293HEK/EBNA nejvíce používané buňky pro velkoobjemovou transienční expresi. [2]

2.7 Reportérové geny

Expresi těchto genů lze snadno detekovat a kvantitativně stanovit. Mohou tudíž sloužit jako měřítko exprese transgenů s různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypch a za různých podmínek.

2.7.1 Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu

Chloramfenikoltransferáza je bakteriální enzym, který nezpůsobuje rezistenci k chloramfenikolu, protože se používá u eukaryotních buněk, které jsou přirozeně rezistentní. Tento enzym acetyluje 14C-chloramfenikol. Po přidání extraktu z rostlin se značený chloramfenikol přeměňuje na značený acetylovaný chloramfenikol, který lze chromatograficky stanovit. Výsledek je možné hodnotit kvantitativně.

2.7.2 Transgen pro β -glukuronidázu

Jedná se o bakteriální enzym *E. coli*, který se označuje jako GUS. Zatím nejúspěšnější transgen používaný při tvorbě transgenních rostlin. Tento enzym mění vhodné substráty na modré produkty nebo fluoreskující látky. Existují dvě metody detekce aktivity.

Fluorescenční metoda, která se provádí v homogenátu se substrátem MUG (4-metyl umbelliferyl glukuronid). Po ozáření rozloženého MUG dlouhovlnným UV 365 nm dává modrou fluorescenci 570 nm.

Druhá metoda je histochemická. Používá se chromogenní substrát X-gluc (glukuronid), který po rozštěpení dává modrou barvu, která je nerozpustná a zůstává v buňkách.

2.7.3 Transgen pro luciferázu

Využívají se cDNA ze světlušky *Photinus pyralis* nebo kódující sekvence G - bakterie *Vibrio harvei*. Po dodání substrátu (luciferin, ATP) k buněčnému extraktu, nebo do kultivačního média dochází k emisi záření měřitelného luminometrem, scintilačním počítačem, nebo CCD kamerou. Nevýhodou je, že substrát je poměrně drahý.

2.7.4 Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)

Jedná se o gen z medúzy *Aequorea victoria*. Protein GFP přeměňuje modré světlo na zelené. Má schopnost emitovat zelené světlo po ozáření modrým světlem (440-480 nm). Je to jediný protein, který má schopnost fluoreskovat bez dodání substrátu nebo kofaktorů. Zachovává si schopnost fluoreskovat, i když je fúzován s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i N-konci. Mutacemi byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou vlnovou délku. [5]

2.7.5 Transgen pro alkalickou fosfatázu

Alkalická fosfatáza (ALP) je hydrolytický enzym optimálně působící při alkalickém pH, vyskytuje se v krvi v mnoha různých formách, které se vytváří v kostech a v játrech, ale i v jiných tkáních, jako např. v ledvinách, placentě, střevech, varlatech, brzlíku, plicích a tumorech. Fyziologické zvýšení ALP se vyskytují i u dětí při růstu kostí, v těhotenství, zatímco patologická zvýšení většinou souvisí s hepatobiliárním procesem a s kostním onemocněním. U hepatobiliárního onemocnění ukazuje na obstrukci žlučovodu, jako např. u cholesterázy vyvolané žlučovými kameny, nádory nebo zánětem. U kostních onemocnění je zvýšená činnost ALP vyvolána zvýšenou osteoblastickou činností, jako např. u Pagetovy nemoci, při měknutí kostí (rachitidě), kostních metastázích a hyperparatyreoidismu.

Za gen zájmu byl zařazen reportérový gen pro alkalickou fosfatázu, což je snadno detekovatelný protein. K buněčné suspenzi se přidává substrát, který je účinkem alkalické fosfatázy změněn na produkt. Tato reakce je provázena barevnou změnou a intenzita zbarvení je změřena fotometricky.

2.8 Transientní (přechodná) transfekce

Transientní transfekce se využívá k produkci rekombinantních proteinů. Výhodou přechodné transfekce je rychlost produkce r-proteinů.

Při přechodné transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. DNA se nepřenáší při mitóze na dceřinné buňky, tudíž je transientní transfekce časově omezená. Výťažky této transfekce se řádově pohybují v miligramech až gramech.

Pro transientní transfekci do savčích buněk může být jako transfekční činidlo použit fosforečnan vápenatý, [23] nebo polyethylenimin. [24] Transfekce probíhá buď v malých objemech buněčné suspenze (ml), nebo v bioreaktorech, které dosahují objemů o velikosti až stovek litrů. Pátý až desátý den po provedení transfekce dochází k produkci několik miligramů až gramů r-proteinu. [17] [22] [18] [25] [26]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Chemikálie

Tab. 3: Použité chemikálie:

Plasmidové DNA: pCEP4, peBSV, pcDNA3,1, pcDNA 5, pCI, pEAK 8 , přečištěné
Polyethylenimin (PEI), lineární (1 mg/mL)
Fosfátový pufr (PBS)
DMEM/F-12 médium Biovendor
DMEM/F-12 médium Biowest
FCS (telecí sérum)
BV 293s médium
HYclone médium (CDM4 293)
Glukóza (25 %)
L-glutamin (2 mM)
HS (koňské sérum)
DMSO (dimethyl sulfoxid)
Trypsin (EDTA)
PBS pH 7,6 ± 0,2 (NaCl 7,75g; K ₂ HPO ₄ 1,50g; KH ₂ PO ₄ 0,20g v 1 l destilované vodě)
NaCl (150 mM)
Geneticin G418 (100 mg/ml)
Ampicilin (200 mg/ml)
Trypanová modř (0,4 % w/v)
PEI – polyethylenimin (1 mg/ml)
Pluronic (1% w/v)
Kit pro izolaci DNA
Kit pro stanovení alkalické fosfatázy

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Tab. 4: Použité přístroje a pomůcky

Laminární box pro sterilní práci
Centrifuga
Humidifikovaný CO ₂ inkubátor (5% CO ₂ , 37°C)
Orbitální třepačka
Spektrofotometr
Světelný mikroskop
Přístroj pro gelovou elektroforézu
Kultivační láhve T-75 cm ²
Sérologické pipety 1, 2, 5, 10, 25 ml
Mikropipety
Kryovialky na zamrazování
Jednorázové tuby 12–50 ml
Jednorázové zkumavky eppendorf
Sterilní rukavice
Sterilní filtry a dávkovače

3.1.3 Buňky a kultivační média

Pro tento experiment byly použity buňky 293HEK/EBNA1. Jak už bylo uvedeno v teoretické části, jedná se o lidské ledvinové buňky získané z potracených plodů. Do genomu těchto buněk byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transienční transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřinných buněk při buněčném dělení. [22]

Tyto buňky se snadno kultivují. Kultivace probíhá ve dvou fázích. Zpočátku se provádí kultivace v kultivačních lahvích T-75, kdy jsou buňky přisedlé na dně nádoby. Jako médium se používá DMEM/F-12 s 10% přidavkem telecího séra (FCS). Sérum udrží buňky přisedlé na dně nádoby. Jakmile buňky dosáhnou 80–90% konfluence pasážují se, rozsazují se do dalších lahví.

Druhou fází je suspenzní kultivace. Pro tuto kultivaci je používáno BV 293s médium s 1% přidavkem séra, nebo se kultivuje bezsérově. Buňky se uchovávají ve čtyřhranných skleněných lahvích. Důležité je zvolit správný objem, který činí asi 30% z objemu láhve, aby bylo zajištěno optimální množství kyslíku. Láhve se umísťují na orbitální třepačku, aby se buňky neshlukovaly, umístěnou v humidifikovaném inkubátoru. Rychlost rotace se pohybuje kolem 100 – 250 rpm při průměru otáčení 1,2; 2,5 a 5 cm. Po celou dobu kultivace se sleduje počet buněk a jejich nárůst. Odebírají se vzorky a pomocí trypanové modře a Bürknerovi komůrky se buňky spočítají. Jakmile buňky dosáhnou exponenciální fáze růstu, jsou připraveny pro transfekci. Pokud se počet buněk zdvojnásobí za 24 hod, jsou buňky v exponenciální fázi.



Obr. 7: Kultivační média (Lonza), zdroj internet: <http://www.eastport.cz/>

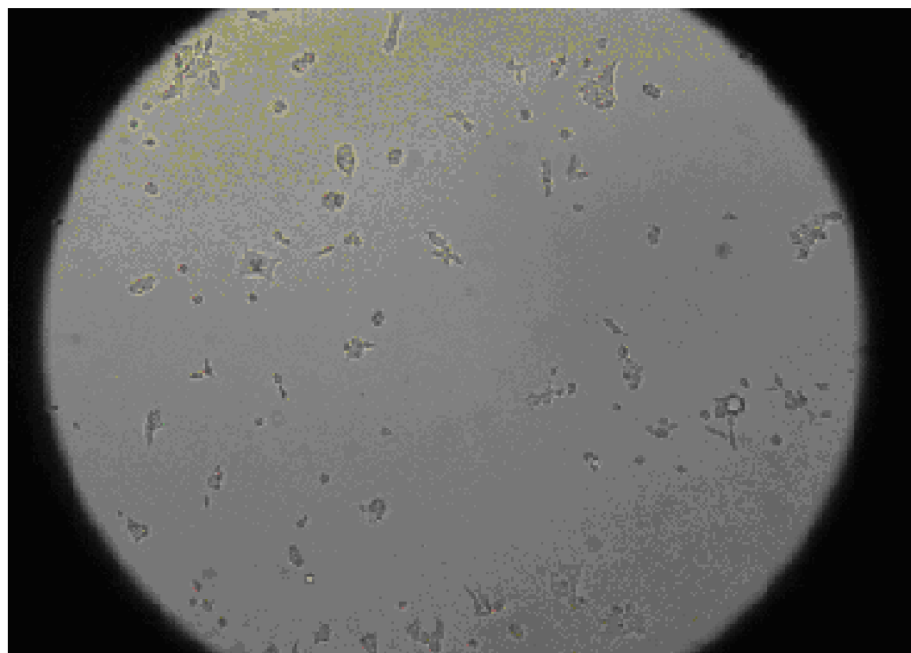
3.1.4 Metody

Rozmražení buněk a kultivace
Pasážování a zamražení buněk
Počítání buněk pomocí trypanové modři
Převedení na suspenzní linii
Izolace a purifikace plasmidové DNA
Metoda transfekce 1 - Muller (2005)
Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)
Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)
Stanovení exprese reportérového genu

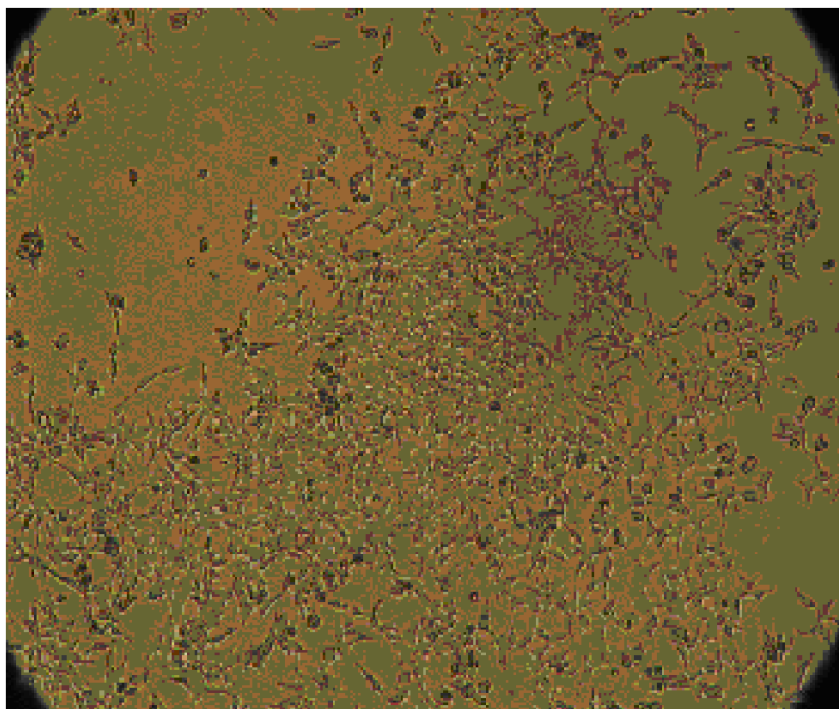
3.1.5 Rozmražení buněk a kultivace

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou dlouhodobě skladovány při nízkých teplotách (-196°C) pod tekutým dusíkem v kryogenním boxu.

Předem bylo připraveno 12 ml kompletního vyhřátého média do T-75 (75 cm²) kultivačních lahví, DMEM/F-12 s přidavkem 10% FCS, aby buňky přisedly ke dnu. Po 2 – 4 hod bylo vyměněno médium za nové kompletní médium, aby se z původního média odstranily zbytky zamrazovacího média dimethyl sulfoxid (DMSO), které je pro buňky toxické. Po 24 hod bylo staré médium odsáto a nahrazeno novým kompletním médiem s přidavkem antibiotika G418 (geneticin). Přidává se 250 µg na 1 ml. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ v humidifikovaném inkubátoru dokud nedosáhly 80-90 % konfluence (normálně 4 – 7 dní).



Obr. 8: Buňky po rozmražení



Obr. 9: Buňky HEK293 EBNA1 3. den po rozmražení

3.1.6 Pasážování a zamražení buněk

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné membrány.

Pro další kultivaci v T-75 lahvích bylo odebráno 0,25 – 1 ml ztrypsinizovaných buněk a přidáno do nové lahve T-75 s 15 – 20 ml kompletního média s antibiotiky.

Zbylá ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a RT. Byl odsát supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v předem na ledu vychlazeném zamrazovacím médiu (9 ml DMEM/F-12 s 10% FCS + 1 ml DMSO). Buněčná suspenze byla rozpipetována do kryovialek, které byly ihned postaveny do ledu. Poté byly kryovialky zabaleny do vrstvy buničiny, obaleny alobalem a přemístěny do mrazáku s teplotou - 80 °C. Po 24 hod byl rozmražen kontrolní vzorek, zda byly buňky správně zamrazeny. Pokud bylo zamražení úspěšné, byly buňky přesunuty do kryogenního boxu.

3.1.7 Počítání buněk pomocí trypanové modři

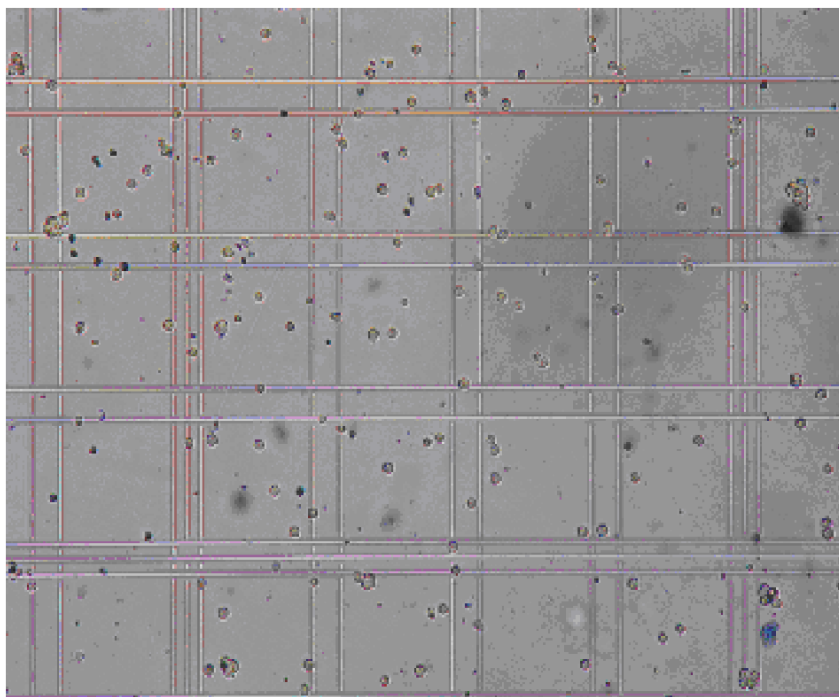
Bylo odebráno 100 μl z buněčné suspenze. Pomocí vortexu byly rozbity shluky buněk a bylo přidáno 100 μl 0,4% roztoku trypanové modře. Vše bylo řádně promícháno a suspenze byla inkubována po dobu asi 5 min. Do Bürkerovy komůrky s přikolopeným podložním sklíčkem byl napipetován vzorek a pod mikroskopem byly spočítány živé (žluté) a mrtvé (modré) buňky v 10 čtvercích a na levé a horní hranici čtverce. Počet buněk byl spočítán podle vzorce:

$$X = x \cdot 2 \cdot 2,5$$

X - denzita buněk v 1 ml

x – počet buněk v 10 čtvercích

(2 – vztaženo na ředění buněčné suspenze: trypanové modři = 1:1; 2,5 – vztaženo na rozměr jednoho čtverce)



Obr. 10: Počítání buněk v Bürkerově komůrce (hemocytometr) – žluté (živé) a modré (mrtvé) buňky

3.1.8 Převedení na suspenzní linii

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, který byl předem vyhřát na pokojovou teplotu, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován

pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné stěny.

Ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a při pokojové teplotě (RT – room temperature).

Poté byl odsát supernatant a bylo přidáno 20 ml BV 293s s 1% přidáním HS a buňky byly resuspendovány. Zpočátku byly buňky kultivovány v T-75 kultivačních lahvích v 20 ml média a po dosažení 90% konfluence byly zbaveny média se sérem a resuspendovány v čerstvém médiu bez séra. Poté přesazeny do 250ml čtyřhranných skleněných lahví s 50 ml média. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku o rychlosti míchání cca 100 rpm při průměru rotace 2,5 cm. Byl sledován počet buněk a s růstem počtu buněk bylo postupně navyšováno množství kultivačního média. Konečný objem buněčné suspenze byl 400 ml, kdy buňky byly kultivovány v 11 čtyřhranných skleněných lahvích. Denzita buněk se udržovala do 4 miliónů/ml a obsah HS se postupně snižoval až na nulu. Do kultivačního média bylo přidáváno antibiotikum – geneticin, který zajišťoval selekci buněk. Přídavek geneticinu do kultivačního média byl 250 µg/ml.

3.1.9 Izolace a purifikace plasmidové DNA

Byly izolovány plasmidové DNA pro pozdější transfekce: pEAK 8, pCEP4, pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1, což je gen kódující epitop Epstein-Barr viru (EB viru), sekvence ori P odpovídající počtu replikací EB viru a reportérový gen pro alkalickou fosfatázu.

Na izolaci byl použit kit Genomed pro izolaci plasmidové DNA.

Na Petriho misku byla zaočkována kultura *Escherichia coli* pomocí křížového roztěru a ponechána v termostatu (37°C). Po narostení kultury byla pomocí předem vyžíhané kličky přenesena jedna kolonie do 10 ml LB média s přidáním ampicilinu. Suspenze byla inkubována po dobu 24 hod na třepačce (220 rpm, rotační průměr 1,2 cm) při teplotě 37 °C – startovací kultura.

Po 24 hod byla kultura přesazena do 400 ml LB média s přidáním ampicilinu v poměru 1:1000, tedy 400 µl.

Další den byla změřena optická denzita (OD₆₀₀) suspenze a vypočten objem (V) pro izolaci každého plasmidu.

$$V[ml] = \frac{1200}{OD_{600}}$$

Vypočtený objem suspenze byl centrifugován za podmínek: 4 °C, 8000g po dobu 10 min. Buněčný pelet byl resuspendován 12 ml E1 pufru (složení viz. Přílohy) s přidáním Rnázy. Poté bylo přidáno 12 ml lyzačního pufru E2 do tuby obsahující buněčnou suspenzi a vše bylo promícháno lehkým otáčením tuby. Po 4 min byla lýze buněk zastavena přidáním neutralizačního E3 pufru a obsah tuby byly opět promíchány lehkým přetáčením. Tímto byly buňky permeabilizovány a dezintegrovány.

Suspenze byla nanášena na kolonu, která byla předem ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru E4. Po prokápání roztoku kolonou byl na filtr opět nanášen ekvilibrační pufr E4. Přímou

na kolonu bylo nanášeno 25 ml wash pufru E5 pro promytí kolony. Po promytí bylo použito 15 ml elučního pufru E6 a eluát byl jímán do tuby.

Během procesu lze provést tři kontroly na přítomnost DNA v roztoku pod kolonou a to po přidavku neutralizačního pufru E3, nebo po přidavku wash pufru E5, kdy kontroly na přítomnost DNA vychází negativně, nebo po přidavku elučního pufru E6, kdy kontrola vyjde pozitivně.

Poté bylo k eluátu přidáno 10,5 ml isopropanolu. Směs byla pořádně protřepána a centrifugována po dobu 45 min při 4°C a 8000 g. Poté byl slit supernatant a pelet byl převeden do 5 ml 70% ethanolu na přečištění, a dále byl centrifugován po dobu 10 min při RT a 10 000 g. Po centrifugaci byl pomocí pipety odsát ethanol a pelet byl vysušen proudem vzduch do doby, kdy bílá barva peletu byla změněna na sklovitou. Poté byla usazenina rozpuštěna v 200 µl TE pufru.

Vzorek byl zfiltrován pomocí sterilního filtru o velikosti pórů 0,2 µm a naředěn sterilním TE puftrem na koncentraci 500 µg/ml. K filtraci byly použity i sterilní kolonky, kdy byl vzorek nanášen na povrch kolonky a kolonky byla umístěn do odstředivky. Podmínky centrifugace: 1 - 4 min, 12 000 g. Pokud veškerý roztok DNA neprošel přes kolonku, byla centrifugace opakována.

Dále byla u vzorku změřena koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru a vzorek byl nanášen na agarózový gel a byla provedena kontrola čistoty na gelu.

Čistota vzorku by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 – 1,9. Pokud je čistota nižší než 1,8, vzorek je kontaminován proteiny. Pokud je čistota větší než 2, vzorek je kontaminován RNA. V případě kontaminace musí být vzorek purifikován a to opakováním posledních kroků izolace po eluci.

Sterilní vzorek byl uskladněn v lednici, ale pokud se jednalo o dlouhodobé uskladnění (déle než 3 dny) byl umístěn do mrazáku (-80°C).

3.1.10 Plazmidy

Na následujících obrázcích (*Obr. 11-16*) jsou uvedené plazmidy, které byly použity v pokusu – volba plazmidu, metoda Muller (2005).

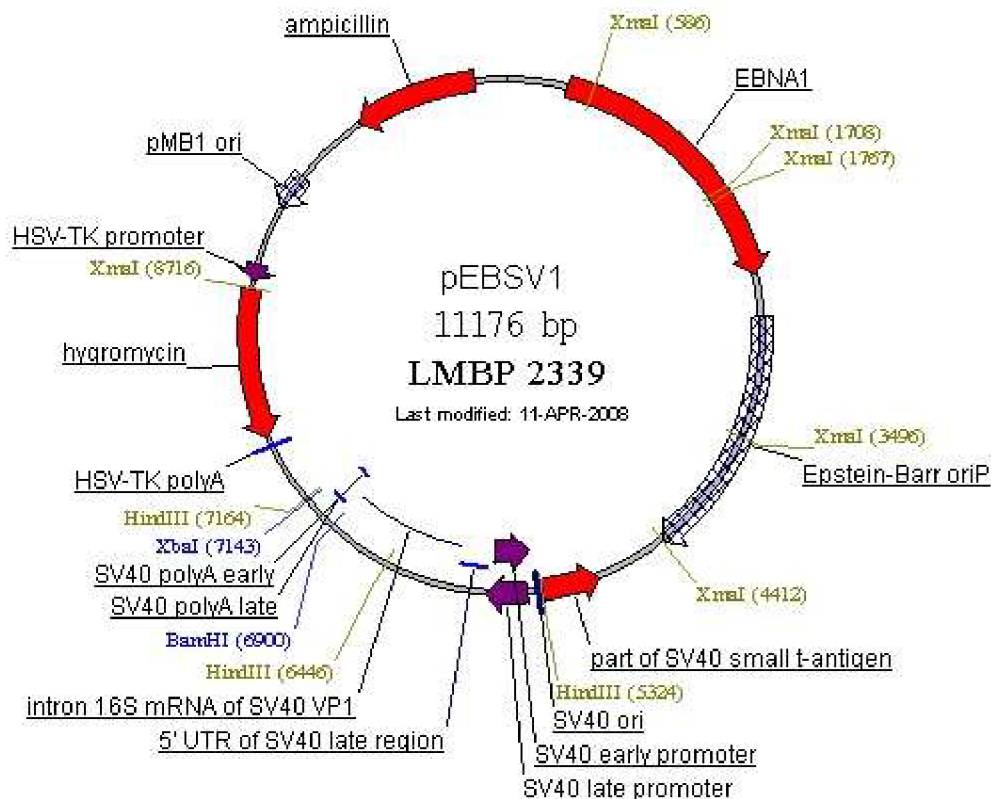
Tyto plazmidy jsou funkční jak v prokaryotních, tak i v eukaryotních buňkách. Jedná se tedy o kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje ori sekvenci a selekční marker funkční (rezistence na ampicilin) v *E. coli*. Dále obsahuje ori sekvenci, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS. Každý vektor obsahuje cílová místa pro restriční endonukleázy (např. Hind III, BamHI).

Jako hostitelské buňky byly zvoleny buňky 293HEK/EBNA1. Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukariotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřiných buněk

při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22]

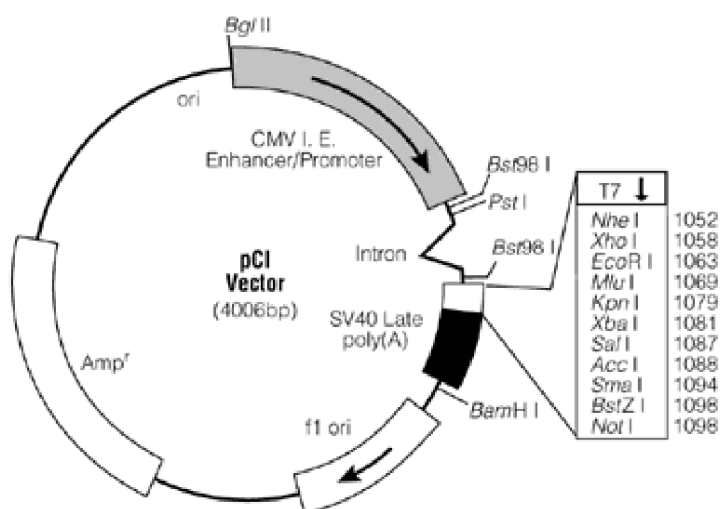
Níže jsou uvedené plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1 a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

3.1.10.1 Plazmid peBSV1/SEAP



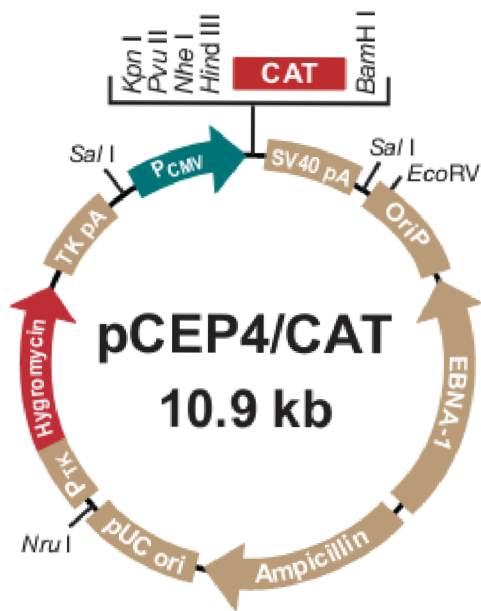
Obr. 11: Mapa plazmidu pEBSV1/SEAP, zdroj internet: <http://bccm.belspo.be/>

3.1.10.2 Plazmid pCI/SEAP



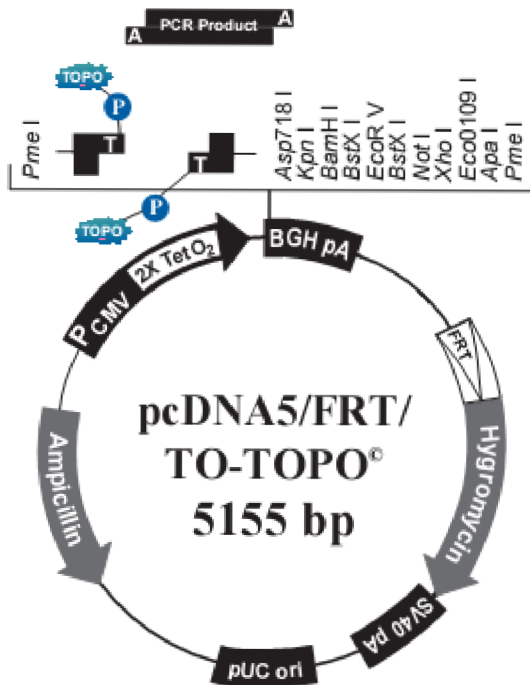
Obr. 12: Mapa plazmidu pCI/SEAP, zdroj internet: <http://www.promega.com/>

3.1.10.3 Plazmid pCEP4/SEAP



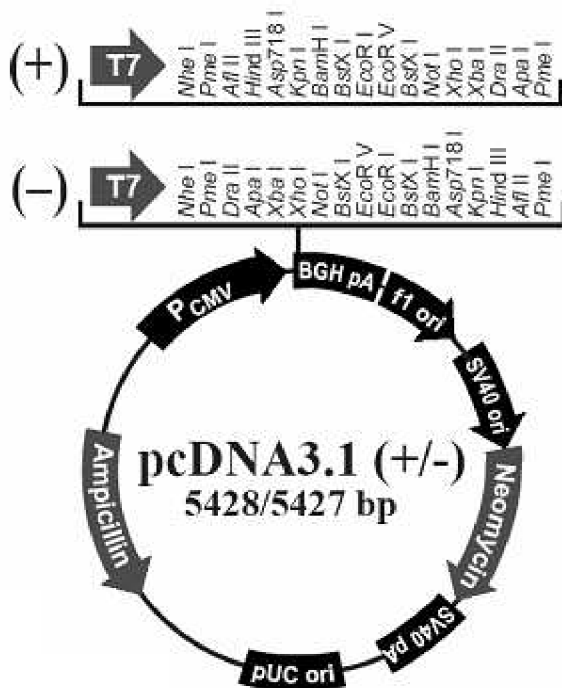
Obr. 13: Mapa plazmidu pCEP4/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.4 Plazmid pcDNA5/FTR/TO-TOPO/SEAP



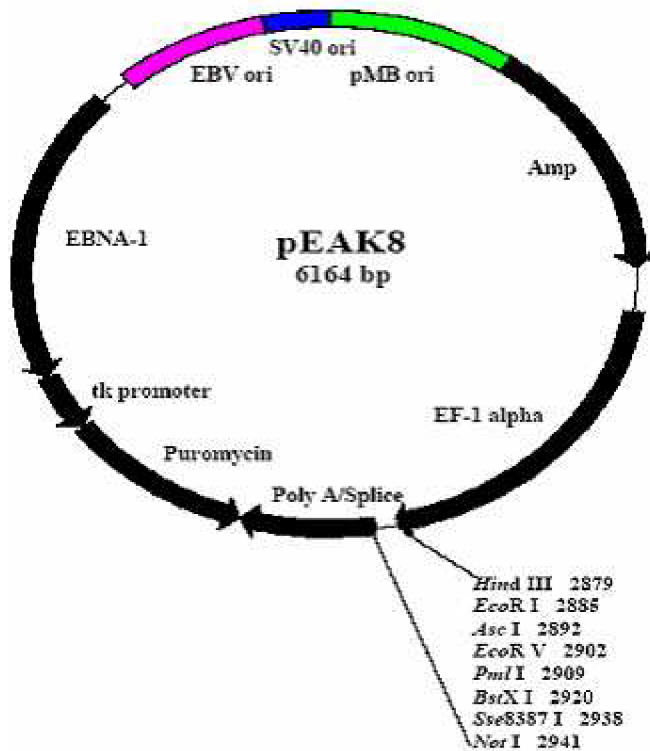
Obr. 14: Mapa plazmidu pcDNA5/FRT/TO-TOPO/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.5 Plazmid pcDNA 3.1/SEAP



Obr. 15: Mapa plazmidu pcDNA 3.1/SEAP [2]

3.1.10.6 Plazmid pEAK8/SEAP



Obr. 16: Mapa plazmidu pEAK8/SEAP [2]

3.1.11 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Jedná se o transfekční metodu při nízké buněčné denzitě s výměnou média před transfekcí. Byla použita buněčná suspenze (400 ml) tvořena buňkami HEK 293/EBNA, které byly kultivovány v BV 293s médiu.

Podmínka: buňky double time (čas zdvojnásobení počtu buněk) = 24 hod

Transfekce byla prováděna ve 100ml čtyřhraných lahvích.

Nejprve byly spočítány buňky, které poté byly centrifugovány (5 min, 500 rpm, RT). Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky byly resuspendovány ve 300 ml nového BV293s média. Suspenze byla rozpipetována do 100ml flašek po 20 ml.

V každé lahvi byly spočítány buňky.

Poté byla připravena transfekční směs v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, kdy finální koncentrace DNA v 20 ml média byla 2,5 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 2 ml : 20 ml

Původní koncentrace roztoku DNA byla 500 µg/ml a PEI 1mg/ml. Roztoky DNA a PEI byly zředěny na dané koncentrace pomocí 150mM roztoku NaCl.

Po smíchání PEI a DNA byla směs promíchána a doba inkubace byla 10 min. Poté bylo přidáno 2 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 160 rpm, rotační průměr 2,5 cm) a buňky byly inkubovány za podmínek 37°C, 5 % CO₂. Po 4 hodinách bylo do každé láhve přidáno 20 ml předem vyhřátého média BV 293s.

Po transfekci byly každý den odebírány vzorky 100 µl a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.12 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Metoda Durocher je transfekční metoda s nízkou buněčnou denzitou bez výměny média před transfekcí.

Pokus byl proveden v 250ml čtyřhraných lahvích.

Podmínka: buňky double time = 24 hod

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk. Počet se pohyboval kolem 1 miliónů/ml. Z 0,5l zásobní láhve obsahující 200 ml buněčné suspenze bylo odebráno 100 ml a rozpipetováno do 250ml lahví po 22,5 ml a poté bylo do každé láhve přidáno 22,5 ml média (do transfekce v médiu s 1% koňského séra bylo přidáno odpovídné množství séra).

V každé láhvi byl spočítán počet buněk. Denzita buněčné suspenze byla přibližně 0,5 miliónů/ml. Láhve byly umístěny přes noc na třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

V den transfekce byl v každé láhvi spočítán počet buněk a byla připravena transfekční směs. Složení transfekční směsi bylo v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, přičemž finální koncentrace DNA v 50 ml byla 1 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 5 ml : 50 ml.

Po smíchání PEI a DNA byla směs vortexována 5 s a poté byla inkubována 15 min při RT. Po inkubaci bylo přidáno 5 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí a láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

Vzorky byly odebírány 5. a 7. den, min. 100 µl a zamraženy se při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.13 Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)

Jedná se o metodu transfekce s buněčnou suspenzí o vysoké denzitě s výměnou média před transfekcí.

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk a buněčná suspenze byla naředěna na polovinu.

V den transfekce byl opět spočítán počet buněk v zásobní láhvi a poté byla ze zásobní láhve odebrána buněčná suspenze a rozpipetována do 12 falkon po 10 ml. Poté byla buněčná suspenze centrifugována při 100g po dobu 5 min. Po centrifugaci byl odsát supernatant a do každé falkony byl přidán 1 ml čerstvého média: DMEM/F12 - Biowest (s přidaným L-Glutaminem a Glukózou) + 0,1% Pluronic. Před použitím bylo médium s přídavkem Pluronicu zfiltrováno. Z původního objemu 10 ml byl objem snížen na 1 ml, čímž vznikla buněčná suspenze o vysoké hustotě.

V tomto pokuse byly provedeny 3 variant o různých koncentracích DNA (15 µg/ml, 20 µg/ml a 50 µg/ml) a k ním dvojnásobných množství PEI.

K jednomililitrovým buněčným suspenzím byly přidány příslušné množství DNA a poté PEI. Směs byla inkubována po dobu 4 hod při teplotě 37°C na orbitální třepačce (250 rpm, rotační průměr 1,2 cm). Po 4 hodinách bylo do každé falkony přidáno 9 ml média HYclone. U 4. varianty bylo do média HYclone přidáno příslušně množství valproové kyseliny a u 5. varianty butyrátu sodného. Do kontrolních falkon nebyla nepřidána transfekční směs.

Vzorky byly odebírány 5., 7., 11. a 14. den , a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.14 Stanovení exprese reportérového genu

Metoda:

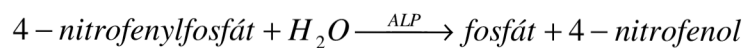
Kinetické fotometrické stanovení v souladu s International federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).

Aktivita SEAP byla zjišťována pomocí kitu pro stanovení alkalické fosfatázy. Reakční směs, substrát pro alkalickou fosfatázu, vznikla smícháním roztoků R1 a R2.

Z odebraného vzorku bylo pipetováno 4 µl do 96ti jamkové desky, a poté bylo přidáno 200 µl reakční směsi. Po minutové inkubaci byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 405 nm v časech 0, 1, 2 a 3 minuty. Data byla shromažďována pomocí programu Gen5 (Biotek).

Koncentrace exprimovaného proteinu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky sestavené na základě měření absorbance roztoků standardů (STD). Byly použity naředěné standardy o koncentraci SEAP: 1,92 mg/l (6000x), 1,44 mg/l (8000x), 1,15 mg/l (10 000x) a 0,96 mg/l (12 000x). [2]

Princip:



Složení a koncentrace roztoků

R1:

2-amino-2-methyl-1-propanol, octan hořečnatý, síran zinečnatý, EDTA

R2:

4-nitrofenylfosfát

Činidla smíchat v poměru 4 : 1 = R1 : R2, směsné činidlo je stabilní 4 týdny při 2 – 8°C nebo 5 dní při 15 – 25°C. Monoreagent chránit před světlem.

Výpočet

$$c_{ALP} = c_{St} \cdot (\Delta A_s / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) / (\Delta A_{st} / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) \quad [\mu\text{kat} / l]$$

c_{st}katalytická koncentrace standardu uvedená v atestu [$\mu\text{kat}/l$]

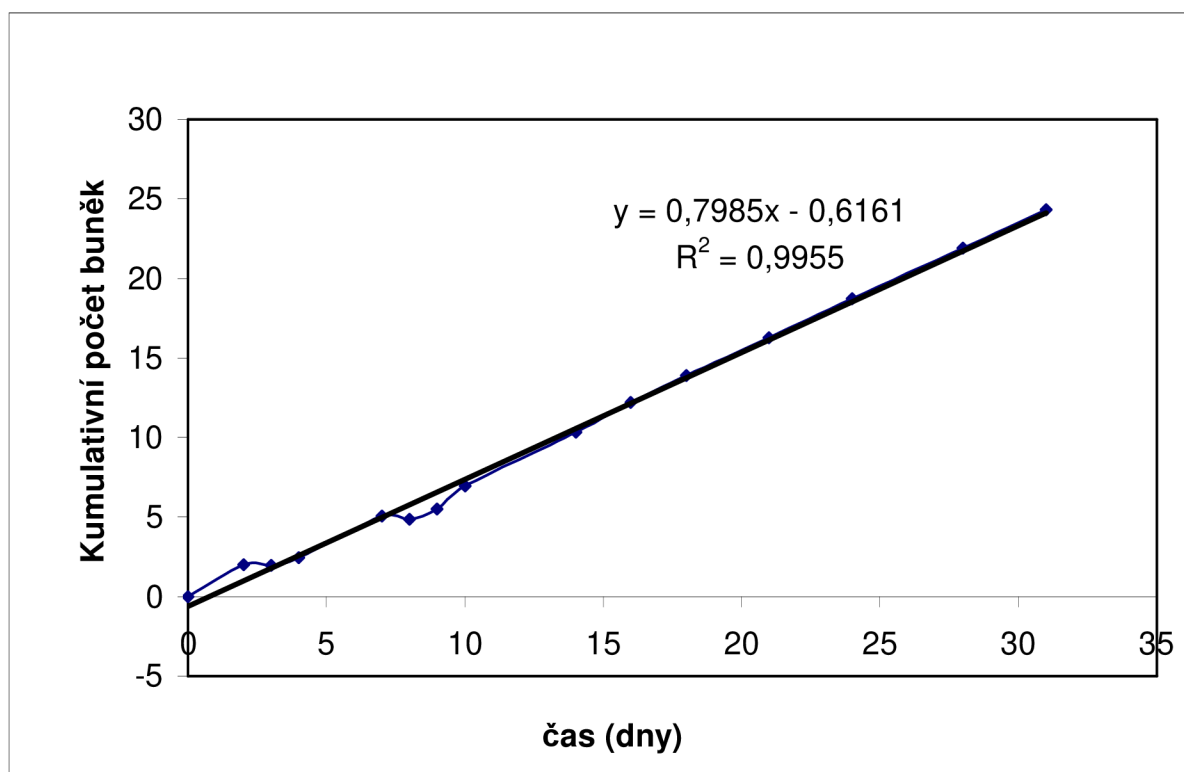
A_sabsorbance vzorku

A_{st}absorbance standardu

A_{bl}absorbance blanku

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

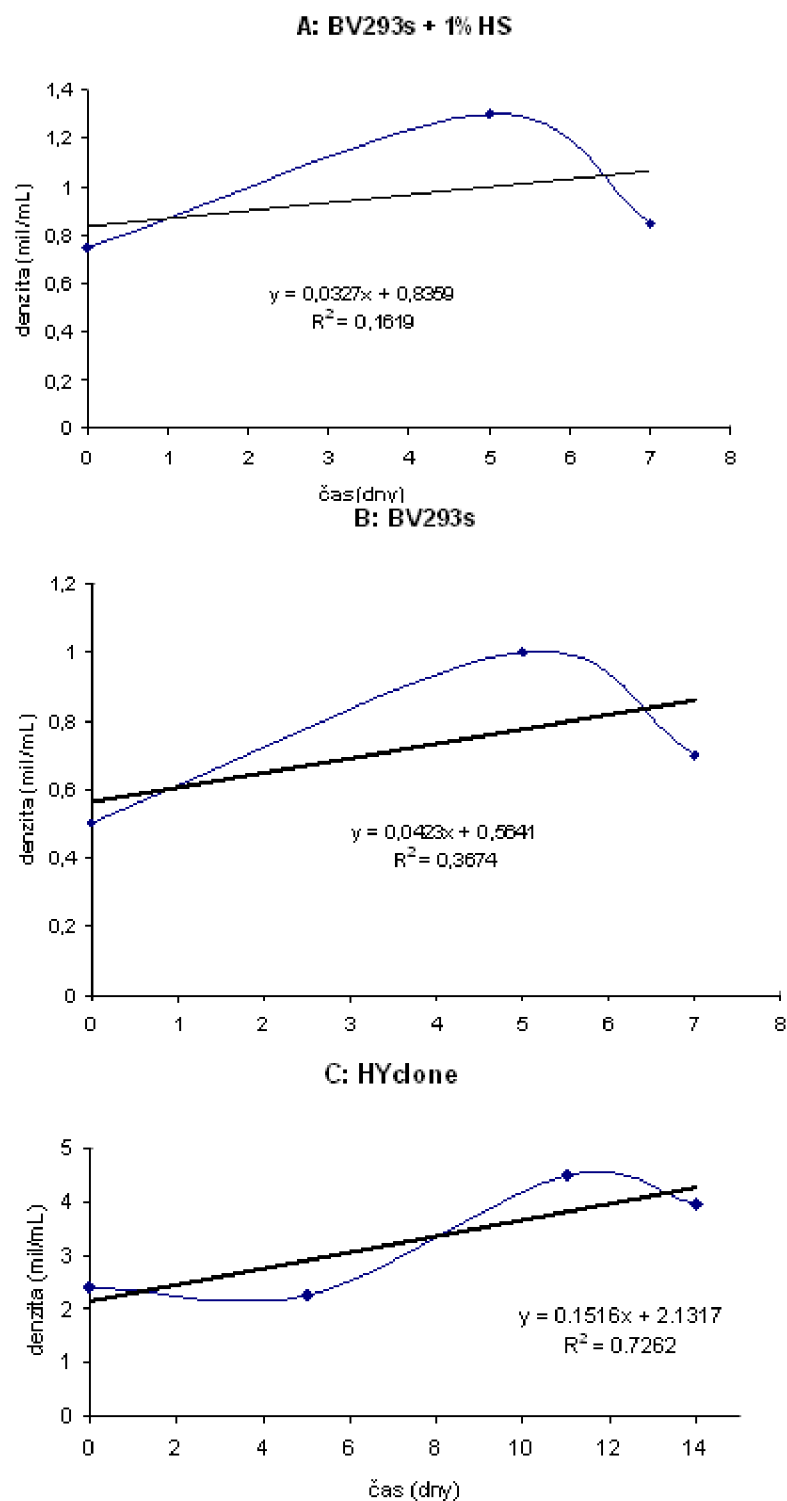
4.1 Růst zásobní buněčné kultury



Obr. 17: Kumulativní počet buněk HEK293/EBNA na 1 ml v závislosti na čase – Graf ukazuje kumulativní počet buněk ve sledovaném období. Byla sledována denzita buněčné suspenze v daných časových intervalech. Buňky byly počítány pomocí hemocytometru a byl sledován nárůst počtu buněk.

Po dobu experimentu byla udržována buněčná kultura, která sloužila jako zdroj buněk pro experimenty. Tato kultura byla kultivována za stejných podmínek jako posttransfekční kultury (médiu BV 293s, inkubována třepačka, 37°C). Růst buněk byl sledován, aby se zjistilo, zda buňky dosáhly exponenciální růstové fáze. Pokud se počet buněk za den zdvojnásobí dosáhly buňky exponenciální fáze a jsou připraveny na transfekci.

4.2 Růst buněk po transfekci



Obr. 18: Růstové křivky buněk HEK293/EBNA - Na obrázku jsou znázorněny růstové křivky buněk HEK 293/EBNA po transfekci pomocí PEI v různých médiích: A: BV 293s, B: BV 293s s 1% přídatkem koňského séra a C: Hyclone médium. Grafy A a B jsou velmi podobné, což svědčí o tom, že přítomnost HS neovlivňuje růst buněk po transfekci. Pátý den po transfekci u buněk kultivovaných v BV 293s médiu (popř. s 1% přídatkem HS) buňky dosáhly maximální

denzity, a poté se buněčná denzita začala snižovat z důvodů úmrtí buněk. V Hyclone médiu bylo maximálního počtu buněk dosaženo jedenáctý den po transfekci. V médiu Hyclone buňky rostly delší dobu a do vyšších hustot buněčných suspenzí.

4.3 Volba plazmidu pro transienční expresi

Nejdříve bylo potřeba ověřit volbu vektoru vhodného pro stanovení intenzity exprese a účinnosti transfekce. Pro transfekci byly použity vektory uvedené v tabulce č. 3. Měření bylo prováděno po dnech. U každého dne je uvedena kalibrační křivka SEAP standardů a tabulka s naměřenými koncentracemi (viz. Přílohy). Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy.

Pro transfekci byly použity plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen EBNA1, usnadňující expresi genu zájmu, a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů ve dvou sadách) + 2 kontrolní láhve.

Tab. 5: Použité plazmidy

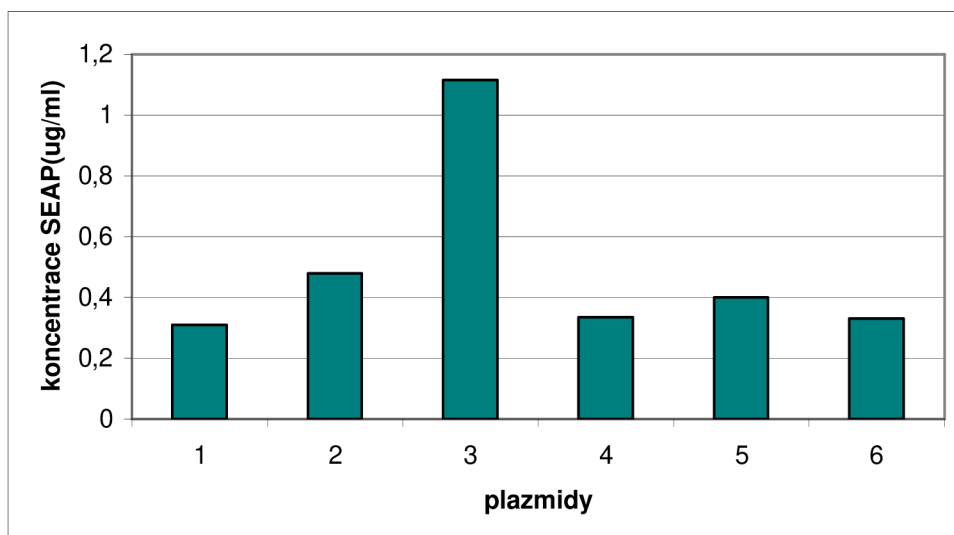
číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	pEAK8	4	pCI
2	pcDNA 5	5	pcDNA 3.1
3	pCEP4	6	peBSV

První den po transfekci nebyla detekována exprese SEAP. Hodnoty exprese SEAP byly na úrovni pozadí měření. Třetí den po transfekci se naměřené hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků, kde byl použit plazmid pCEP4 zdvojnásobily proti pozadí. Dále se hodnoty exprese zvýšily u vzorků s použitými plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Hodnoty exprese SEAP vzorků s použitými plazmidy pEAK 8, pCI a peBSV i nadále zůstaly na úrovni pozadí.

Nejvyšší hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků byly naměřeny pátý den po transfekci, kdy hodnoty u vzorku obsahující pCEP4 byly až trojnásobné proti hodnotám koncentrace SEAP v jiných vzorcích. Šestý a sedmý den po transfekci se hodnoty koncentrace začaly snižovat, což bylo způsobeno nejspíše úmrtím buněk a rozpadem SEAP.

Jako nejúčinnější se ukázal plazmid pCEP4. Další vhodné plazmidy pro transienční transfekci byly zvoleny plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Plazmidy peBSV, pEAK 8 a pCI se v daném pokusu nejevily jako vhodné plazmidy pro transfekci v buňkách HEK293/EBNA.

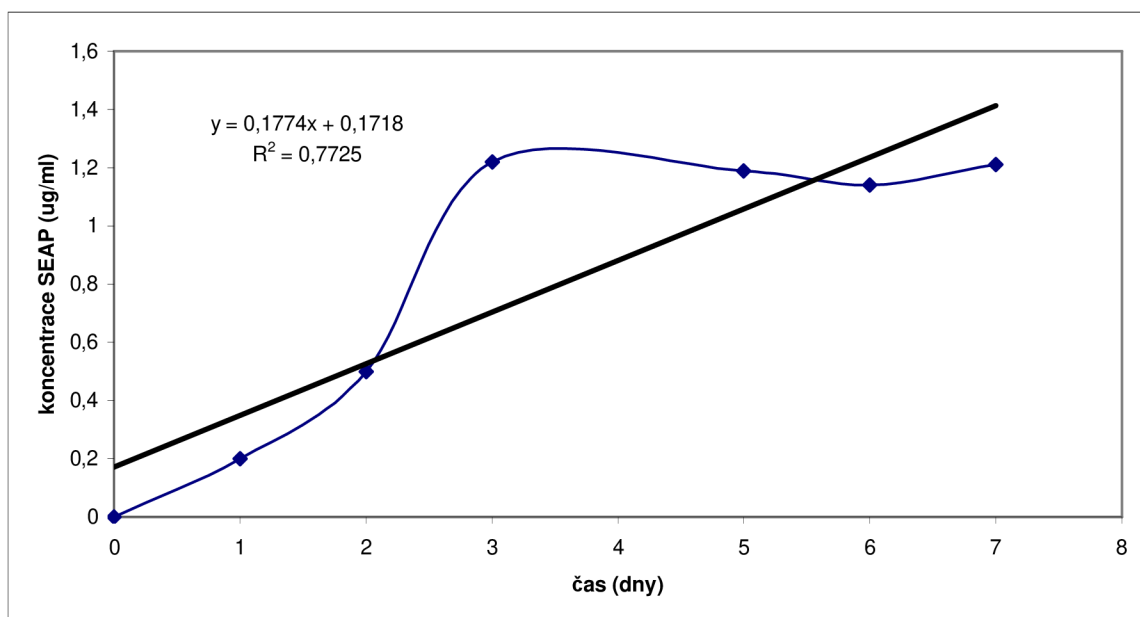
Plazmid pCEP4/SEAP byl vyhodnocen jako nejúčinnější plazmid pro transienční transfekci do buněk HEK293/EBNA i dříve. [2]



Obr. 19: Koncentrace SEAP 3. den po transfekci - obrázek znázorňuje koncentraci SEAP v jednotlivých vzorcích odebraných 3. den po provedení transfekce. Vzorek 1 (pEAK 8), vzorek 2 (pcDNA 5), vzorek 3 (pCEP4), vzorek 4 (pCI), vzorek 5 (pcDNA 3.1) a vzorek 6 (peBSV). Z obrázku je patrné, že nejvyšší koncentrace SEAP byla přítomna ve vzorku 3 (pCEP4). Proti pozadí byla zvýšená exprese i ve vzorcích 2 (pcDNA5) a 5 (pcDNA3.1). Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.3.1 Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce

Vedlejším produktem pokusu, při kterém byl určován nejúčinnější vektor pro transfekci je křivka průběhu exprese SEAP v závislosti na čase uplynulém od transfekce. Nejvyšší exprese bylo dosaženo sedmý den po transfekci.



Obr. 20: Závislost koncentrace SEAP na čase – graf znázorňuje nárůst exprese SEAP po transfekci u plazmidu pCEP4. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP bylo dosaženo 3 den

po transfekci. Koncentrace SEAP poté zůstala stejná až do posledního měřeného dne (7. den).

4.4 Srovnání metod transienční transfekce

Byla provedena série pokusů s cílem najít nejvhodnější metodu pro transienční transfekci pomocí PEI. Srovnávány byly metody podle Muller (2005), Durochera (2007) a Backliwala (2008). Metody jsou podrobněji popsány výše. Pro všechny pokusy (n = 4) byl jako reportérový plazmid použit pCEP4/SEAP.

4.4.1 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů po dvou sadách) + 2 kontrolní lahve. Nejvyšší naměřená koncentrace SEAPu vzorků byla naměřena 7. den po transfekci. Hodnoty jsou nižší než hodnoty naměřené dříve [2], což může být způsobeno úmrtím buněk.

4.4.2 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Pokus byl proveden v osmi 250ml čtyřhraných lahvích: 2 láhve na transfekci bezsérovou a 2 láhve na transfekci v médiu (293BVs) s 1% koňského séra + 4 kontrolní lahve. Pokus byl prováděn se suspenzí o nízké buněčné denzitě (0,5 milónů/ml), což mohlo být příčinou neúspěchu. Naměřené hodnoty absorbance se téměř shodovaly s hodnotami absorbance blanku (slepého vzorku). Metoda Durocher byla vyhodnocena jako neúčinná.

4.4.3 Metoda Backliwal (2008)

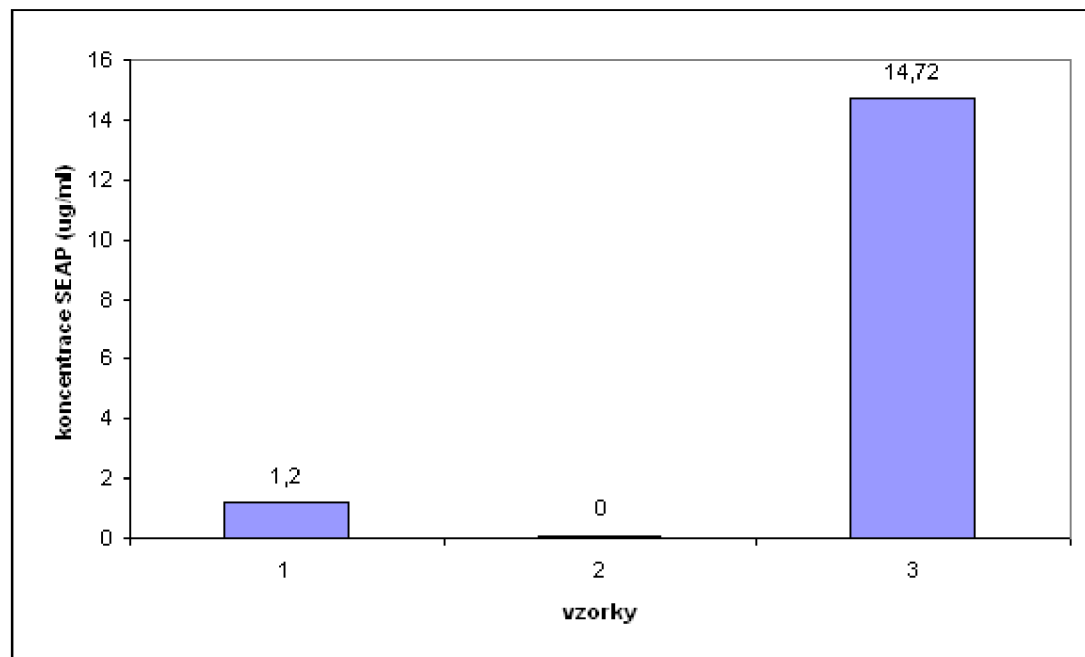
Byly použity buňky 293HEK/EBNA kultivované v médiu HYclone o denzitě 2,4 milónů/ml. Buněčná suspenze byla rozpipetována do falkon po 10 ml, odstředěna a poté bylo odsáto médium a nahrazeno 1 ml DMEM/F12 (Biowest) médiem doplněným o 0,1% Pluronic (Invitrogen). Denzita buněčné suspenze při transfekci byla 24×10^6 /ml. Transfekce byla úspěšná. Nejvyšší detekovaná exprese SEAP byla 14,7 $\mu\text{g/ml}$ při transfekci 20 $\mu\text{g/ml}$ DNA odebraném čtrnáctý den po transfekci. Hladina exprese může dosáhnout až 22 mg/ml pro rekombinantní protilátky u vzorku s koncentrací DNA při transfekci 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA. [27]

Tab. 6: Transfekční podmínky u jednotlivých metod

metoda	koncentrace DNA (µg/ml)	poměr DNA:PEI	transfekční médium	kultivační médium	poměr transfekční směs:médiu
Muller	2,5	1:5	BV 293s	BV 293s	1:10
Durocher	1	1:5	BV 293s (příp. + 1% HS)	BV 293s (příp. + 1% HS)	1:10
Backliwal	15	1:2	DMEM/F12 (Biowest) + 0,1% Pluronic	Hyclone + 3mM butyrát sodný + 4 mM kyselina valproová	-
	20				
	50				
	50				
	50				

Tab. 7: Míchání transfekčních směsí na jednu láhev

metoda	původní koncentrace DNA (µg/ml)	DNA (µl)	1 mg/ml PEI (µl)	ředění pomocí
Muller	500	100	500	150 mM NaCl
Durocher	5	25	1000	PBS
Backliwal	289,4	103,6	60	-
	830	120,4	200	
	289,4	138,2	80	



Obr. 21: Vliv metody transfekce na hladinu exprese SEAP (za použití plazmidu pCEP4) - vzorek 1: metoda Muller, vzorek 2: metoda Durocher, vzorek 3: metoda Backliwal. Nejvyšší hodnoty exprese SEAP bylo dosaženo za použití metody Backliwal. Asi desetinu výtěžku exprimovaného proteinu tvoří výtěžek získaný pomocí metody Muller. Na nulové hodnotě jsou hodnoty exprese SEAP u metody Durocher.

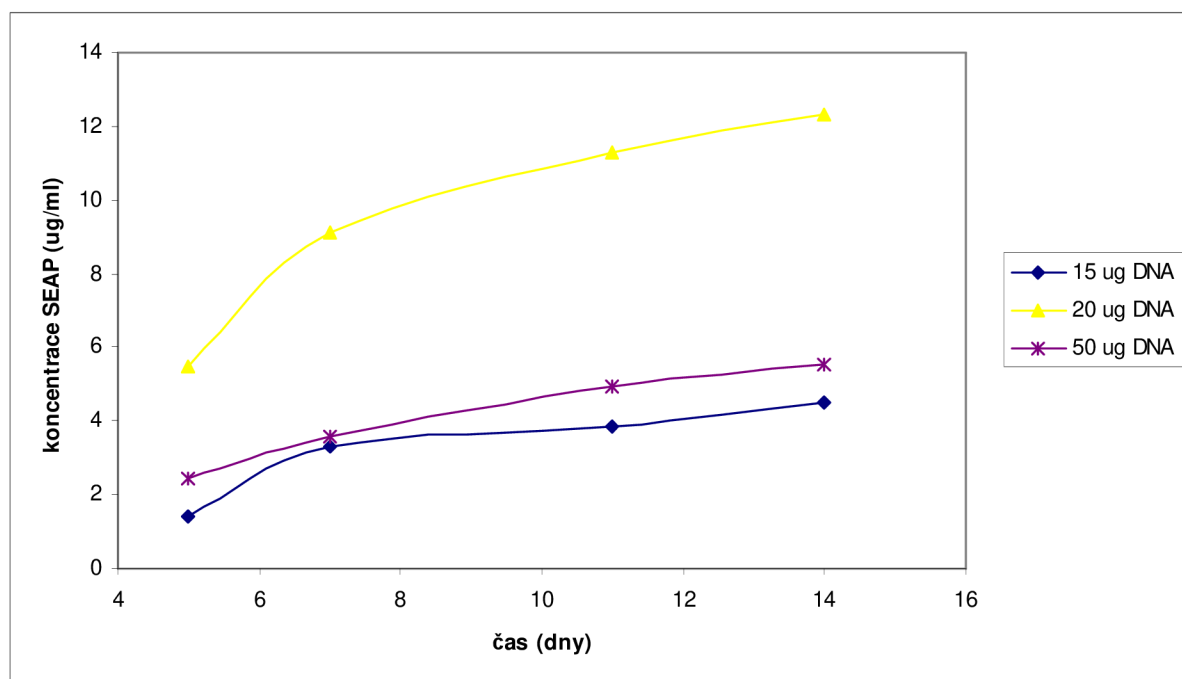
Na základě výsledků měření byl jako nejlepší metoda vyhodnocena metoda Backliwal (2008), kdy koncentrace SEAP dosahovaly několikanásobně vyšších hodnot než byly hodnoty koncentrace SEAP u vzorků metody Muller (2005). Úspěšnost transfekce u metody Backliwal byla zajištěna nejspíše vysokohustotní buněčnou suspenzí a také vyššími přídávky DNA a PEI.

Metoda Durocher byla vyhodnocena jako nejméně účinná. Důvodem může být používání buněčných suspenzí o nižší hustotě buněk a nízkými koncentracemi DNA přidávanými k buňkám. Také postup provedení transfekce se zcela odlišuje od předešlých dvou metod. Metoda Duroscher přidává transfekční směs do finálního objemu buněčné suspenze s médiem narozdíl od metod Muller a Backliwal, kdy je transfekce prováděna v menším objemu a následně je zastavena přídávkem média. U metody Muller byly detekovány hodnoty exprese SEAP, ale o velmi nízkých koncentracích.

Velký vliv má také kultivační médium, ve kterém jsou pěstovány buňky. V médiu HYclone buňky dosahovaly vyšší denzity a životnost buněk byla delší než v médiu BV 293s.

4.4.3.1 Vliv koncentrace DNA na účinnost transfekce

Pomocí metody Backliwal (2008) bylo ověřováno množství DNA vhodné pro transienční transfekci. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 μg DNA/ml transfekční směsi. To je méně než uvádí Backliwal et al. (2008), který zjistil nejvyšší účinnost při 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. [27]



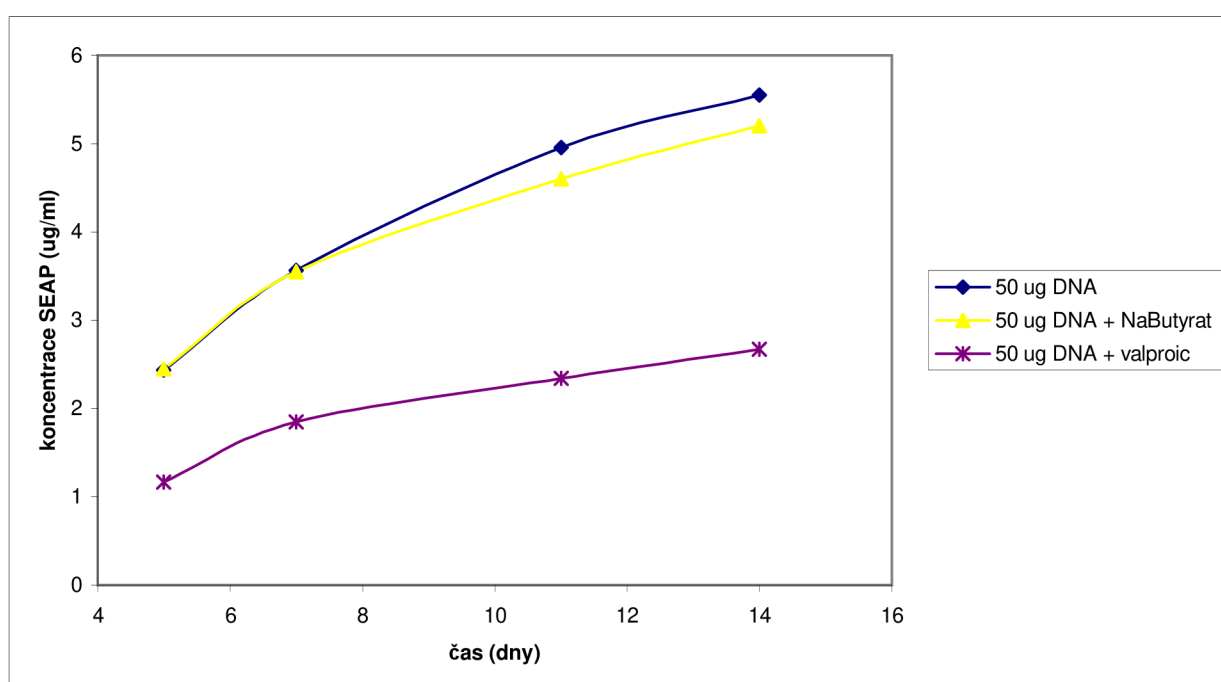
Obr. 22: Závislost koncentrace SEAP na koncentraci DNA při transfekci - graf ukazuje koncentrace SEAP u jednotlivých vzorků. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP byly naměřeny po transfekci 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.4.3.2 Vliv inhibitorů histon deacetyláz na hladinu exprese po transfekci

Pomocí metody Backliwal (2008) byl zjišťován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. [28]

Koncentrace SEAP u vzorku s přidavkem butyrátu sodného (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci) se výrazně nelišily od hodnot koncentrací vzorku kontrolního. Hodnoty koncentrace SEAP s přidavkem valproové kyseliny v médiu byly poloviční než hodnoty vzorku bez přidavku (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci).

I když počet buněk ve vzorcích obsahujících přidavek butyrátu sodného byl nízký, přesto hodnoty exprese SEAP byly srovnatelné s hodnotami SEAP u vzorků bez přidavku, kde byl počet buněk vyšší. To znamená, že přidavek butyrátu sodného zvýšil hladinu exprese, ale snížil viabilitu buněk.



Obr. 23: Závislost koncentrace SEAP na přítomnosti inhibitorů histon deacetyláz - graf ukazuje koncentrace SEAP u vzorků obsahujících 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA: bez přidavku, s přidavkem butyrátu sodného do média a s přidavkem kyseliny valproové do média. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci zabývající se problematikou transienční transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminu byla hledána optimální metoda transienční transfekce.

V první části bylo testováno šest plazmidů a cílem bylo nalézt plazmid, za jehož použití se dosáhne nejvyšších hodnot exprese SEAP. Nejúčinnějším plazmidem byl zvolen pCEP4/SEAP, který byl poté použit v následujících experimentech.

Byly testovány tři metody: Muller (2005), Durocher (2007) a Backliwal (2008). Jako nejúčinnější metoda byla zvolena metoda Backliwal (2008), která dává použitelné výsledky pro zavedení této metody do praxe.

Byl sledován vliv koncentrace DNA (15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) použité pro transfekci s vysokohustotní buněčnou suspenzí. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 $\mu\text{g DNA/ml}$ transfekční směsi.

Dále byl sledován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitorů v kultivačním médiu zvyšuje hladinu exprese, ale snižuje viabilitu buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. *Molecular Biotechnology: principles on application of recombinant DNA*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. ISBN 1-55581-269-4. 760 p.
- [2] ŠMÍD, J. Vývoj protokolu pro transienční transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009 57s.
- [3] COHNE, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*. 1973, 70: 3240-3244
- [4] ŠPANOVÁ, A. *Přednášky z molekulární biotechnologie 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [5] DOŠKAŘ, J. *Přednášky z molekulární genetiky II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [6] RITTICH, B. *Přednášky z bioinženýrství II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [7] BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1995, 92(16):7297-301.
- [8] GODBEY, W. T., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res*. 2000, 51(3):321-8.
- [9] GODBEY, W. T., BARRY, M. A., SAGGAU, P., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 1999a, 60(2-3): 149-60.
- [10] BERTSCHINGER, M., BACKLIWAL, G., SCHERTENLEIB, A., JORDAN, M., HACKE, D. L. R., WURM, F. M. Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: Implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery. *Journal of Controlled Release* 2006, 116 (2006): 96-104
- [11] LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 60 (2005): 247-266.
- [12] BEHR, J. P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospect for gene therapy. *Bioconjugate Chem*. 1994, 5 (1994) 382-389.

- [13] LINDELL, J., GIRARD, P., MULLER, N., JORDAN, M., WURM, F. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1676(2): 155-61.
- [14] CLAMME, J.-P., KRISHNAMOORTHY, G., ME'LY, Y. Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1617 (2003): 52-61.
- [15] VON HARPE, A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*. 2000, 69 (2): 309-22.
- [16] IIDA, T., MORI, T., KATAYAMA, Y, NIIDOME, T. Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex. *Journal of Controlled Release*. 2007, 118 (2007): 364-369.
- [17] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(2):e9
- [18] DEROUAZI, M., GIRARD, P., VAN TILBORGH, F., IGLESIAS, K., MULLER, N., BERTSCHINGER, M., WURM, F. M. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004, 87(4):537-45
- [19] MULLER, N. Transient gene expression for rapid protein production: Studies and optimization under serum-free conditions. PH.D. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005. 120 p.
- [20] GRAHAM, F. L., SMILLEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRU, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 1977, 36, 59-72.
- [21] AIYAR, A., ARAS, S., WASHINGTON, A., SINGH, G. AND LUFTIG, R. B. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of *oriP*-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology Journal*. 2009, 6:29
- [22] GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M. 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002, 38 (1-2): 15-21.

- [23] JORDAN, M., SCHALLHORN, A., WURM, F. M., Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24 (4): 596-601.
- [24] ERHARDT, C., SCHMOLKE, M., MATZKE, A., KNOBLAUCH, A., WILL, C., WIXLER, V., LUDWIG, S., Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction.* 2006, 6, 179-184
- [25] PHAM, P. L., PERRET, S., DOAN, H. C., CASS, B., ST-LAURENT, G., KAMEN, A., DUROCHER, Y. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol Bioeng.* 2003, 84(3): 332-42.
- [26] BLDI, L., MULLER, N., PICASSO, S., JACQUET, R., GIRARD, P., THANH, H. P., DEROW, E., WURM, F. M. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress.* 2005, 21(1): 148-153.
- [27] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., HASIJA, F., WURM, F. M., High-density transfection with HEK-293 cell allows doubling of transient titers and removes need for a prior DNA complex formation with PEI *Biotech. and Bioeng.* 2008, 99: 721-727.
- [28] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., KUETTEL, I., DELEGRANGE, F., HACKER, D. L., WURM, F. M., Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures *Biotech. and Bioeng.* 2008, 101: 182-189.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

r-protein	rekombinantní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	cyklická deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEK buňky	lidské embryonální ledvinové buňky
EBNA	jaderný antigen Epstein-Barr viru
EB-vir	Epstein-Barr vir
MCS	mnohočetné klonovací místo
ATP	adenosintrifosfát
DEAE	diethylaminoethyl
PEI	polyethylenimin
MCS	mnohočetné klonovací místo (multiple cloning sit)
AFM	mikroskopie atomárních sil (atomis force microscopy)
G -	Gram-negativní
G +	Gram-pozitivní
CHO	vajíčka křečka čínského
3T3	vajíčka myši švýcarské
HHV-4	herpesvirus 4
Gus	β -glukuronidáza
MUG	4-metyl umbelliferyl glukuronid
GFP	zeleně fluorekující protein
ALP	alkalická fosfatáza
HS	koňské sérum
FCS	telecí sérum
DMSO	dimethyl sulfoxid
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
STD	standard
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (Internationa federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

8 SEZNAM PŘÍLOH

Složení médií a pufrů

Metoda transfekce 1 - Muller (2005): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP, grafy srovnání koncentrací SEAP, růstové křivky

Metoda transfekce 2 - Durocher (2007): růstové křivky

Metoda transfekce 3 – Backliwal (2008): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP
růstové křivky

9 PŘÍLOHY

9.1 Složení médií a pufrů

9.1.1 LB médium

LB médium bylo použito pro kultivaci buněk kmene *Escherichia coli*. Z těchto buněk byla následně izolována plazmidová DNA.

Tab. 8: Složení LB média [2]

Složka	koncentrace (g/l)
trypton	10
kvasničný extrakt	5
NaCl	10

9.1.2 Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA

Tab. 9: Složení kitu Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA [2]

<u>Roztok E1</u> – resuspendační, uchováván při pokojové teplotě 50 mM Tris 10 mM EDTA přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 8 K roztoku je nutné přidat 100 µg/ml RNázy A, která je uchovávána při teplotě 4 °C
<u>Roztok E2</u> – lyzační, uchováván při pokojové teplotě 200 mM NaOH 1,0 % SDS (w/v)
<u>Roztok E3</u> – neutralizační, uchováván při pokojové teplotě 3,1 M octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,5
<u>Roztok E4</u> – ekvilibrační, uchováván při pokojové teplotě 600 mM NaCl 100 mM octan sodný 0,15 % TritonX- 100 přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E5</u> – promývací, uchováván při pokojové teplotě 800 mM NaCl 100 mM octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E6</u> – eluční, uchováván při pokojové teplotě 1250 mM NaCl 100 mM Tris přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 5,5

9.1.3 DMEM/F-12 médium

Toto médium bylo použito pro kultivaci přisedlých 293HEK/EBNA buněk.

Tab. 10: Složení DMEM/F-12 média [2]

Složka	koncentrace (mg/ml)
CaCl ₂ (anhydrid)	116,00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,42
KCl	311,83
MgCl ₂ · 6H ₂ O	61,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100,00
NaCl	6,9995
NaHCO ₃	1,20
Na ₂ H ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	134,00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	62,50
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,43
Glucose	3,1510
HEPES	3,5745
Hypoxanthine	2,04
Linoleic Acid	0,04
Lipoic Acid	0,10
Phenol Red · Na	8,00
Putrescine · 2HCl	0,08
Sodium Pyruvate	110,00
Thymidine	0,36
L-Alanine	4,46
L-Arginine · HCl	147,35
L-Asparagine · H ₂ O	7,50
L-Aspartic Acid	6,66
L-Cysteine · HCl · H ₂ O	17,56
L-Cystine	24,00
L-Glutamic Acid	7,36
L-Glutamine	365,1
L-Alanyl-L-Glutamine (UltraGlutamine 1)	868,00
Glycine	18,76
L-Histidine · HCl · H ₂ O	31,48
L-Isoleucine	54,37
L-Leucine	58,96
L-Lysine · HCl	91,37
L-Methionine	17,24
L-Phenylalanine	35,48
L-Proline	17,27
L-Serine	26,26
L-Threonine	53,56

9.1.4 BV 293s médium

Médium pro kultivaci suspenzní linie buněk 293HEK/EBNA

Tab. 11: Složení BV 293s média [2]

Složka	koncentrace
DMEM/F-12	1 litr
pantotenát vápenatý	4 mg/l
Pluronic F-68	1 g/l
diethanolamin	3 µg/l
fyton Difco select	2 g/l
pepton z laktalbuminu	2 g/l
lipidový koncentrát	1 mg/l
lidský insulin	5 g/l
lidský transferrin ATF	5 g/l

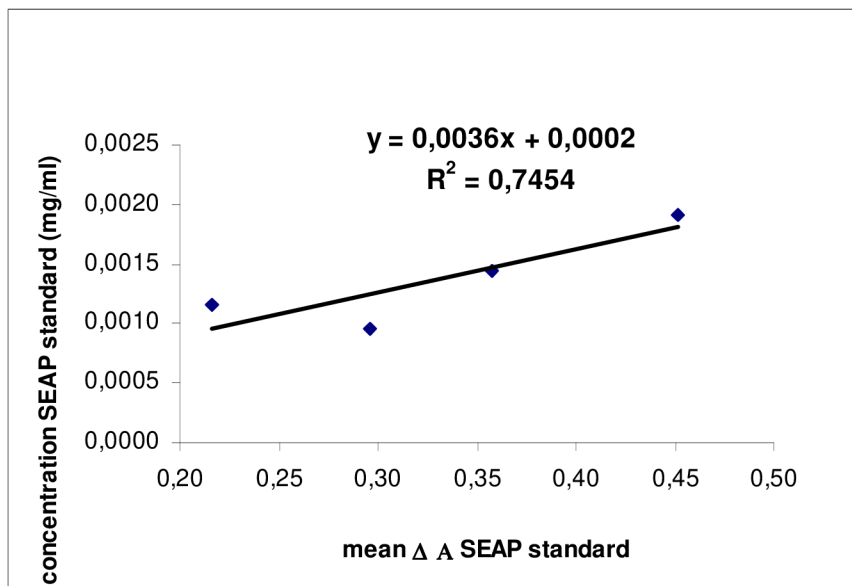
9.2 Metoda transfekce 1 – Muller (2005)

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích a srovnání koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

Tab.12: Použité plazmidy

číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	peak8	7	pCI
2	peak8	8	pCI
3	pcDNA 5	9	pcDNA 3.1
4	pcDNA 5	10	pcDNA 3.1
5	pCEP4	11	peBSV
6	pCEP4	12	peBSV

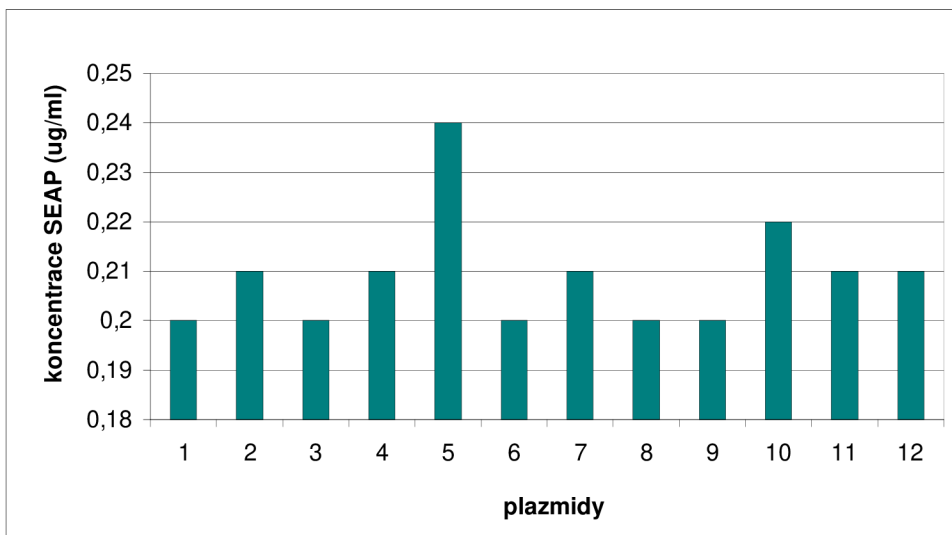
Transfekce – 1. den po transfekci



Obr. 24: Kalibrační křivka SEAP – 1. den po transfekci

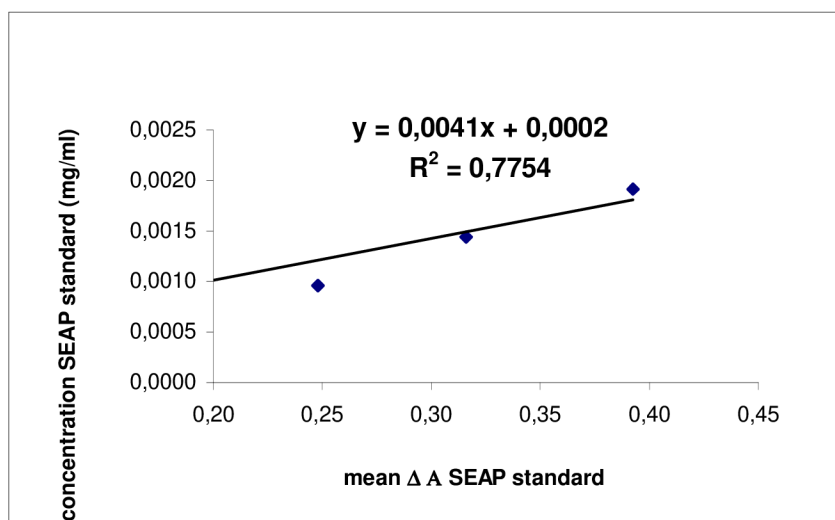
Tab.13: Koncentrace vzorků – 1. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,20	(ug/ml)
2	0,21	(ug/ml)
3	0,20	(ug/ml)
4	0,21	(ug/ml)
5	0,24	(ug/ml)
6	0,20	(ug/ml)
7	0,21	(ug/ml)
8	0,20	(ug/ml)
9	0,20	(ug/ml)
10	0,22	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,83	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,98	(ug/ml)
STD 12000x	1,27	(ug/ml)



Obr. 25: Koncentrace SEAP – 1. den po transfekci

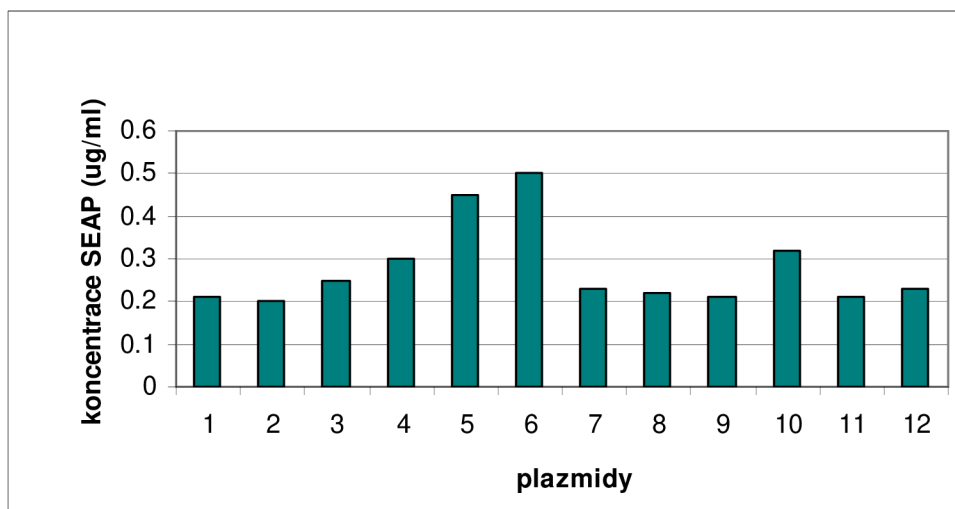
Transfekce – 2. den po transfekci



Obr. 26: Kalibrační křivka SEAP – 2. den po transfekci

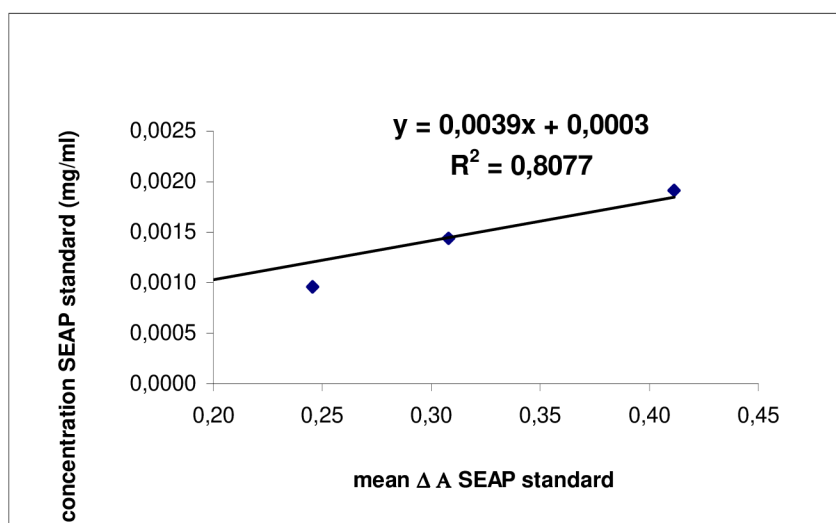
Tab. 14: Koncentrace vzorků – 2. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,20	(ug/ml)
3	0,25	(ug/ml)
4	0,30	(ug/ml)
5	0,45	(ug/ml)
6	0,50	(ug/ml)
7	0,23	(ug/ml)
8	0,22	(ug/ml)
9	0,21	(ug/ml)
10	0,32	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,23	(ug/ml)
STD 6000x	1,81	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,96	(ug/ml)
STD 12000x	1,22	(ug/ml)



Obr. 27: Koncentrace SEAP – 2. den po transfekci

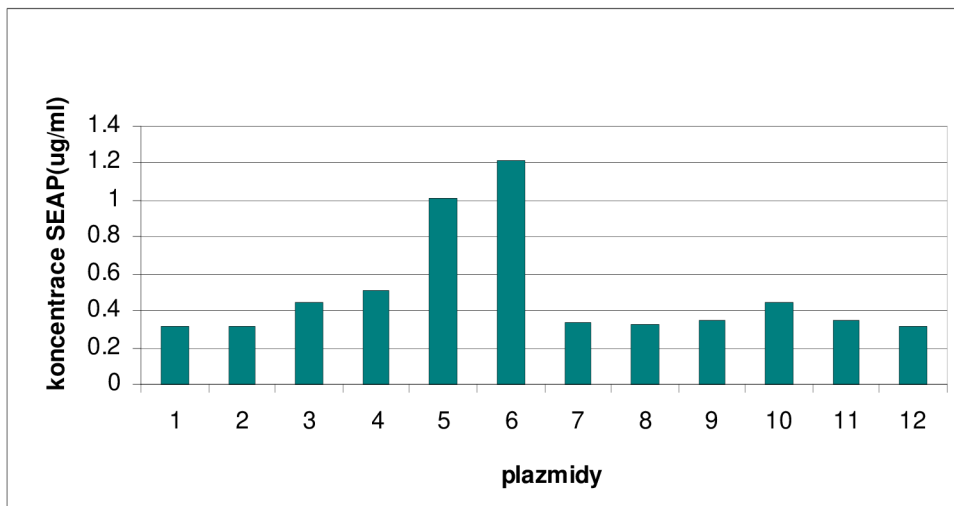
Transfekce – 3. den po transfekci



Obr. 28: Kalibrační křivka SEAP – 3. den po transfekci

Tab. 15: Koncentrace vzorků – 3. den po transfekci

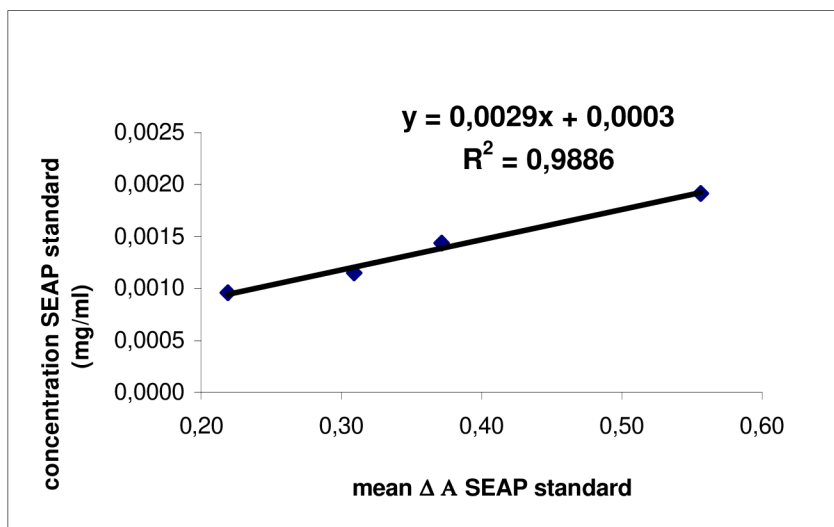
Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,31	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
4	0,51	(ug/ml)
5	1,01	(ug/ml)
6	1,22	(ug/ml)
7	0,34	(ug/ml)
8	0,33	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
10	0,45	(ug/ml)
11	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,50	(ug/ml)
STD 10000x	1,02	(ug/ml)
STD 12000x	1,26	(ug/ml)



Obr. 29: Koncentrace SEAP – 3. den po transfekci

Transfekce – 5. den po transfekci

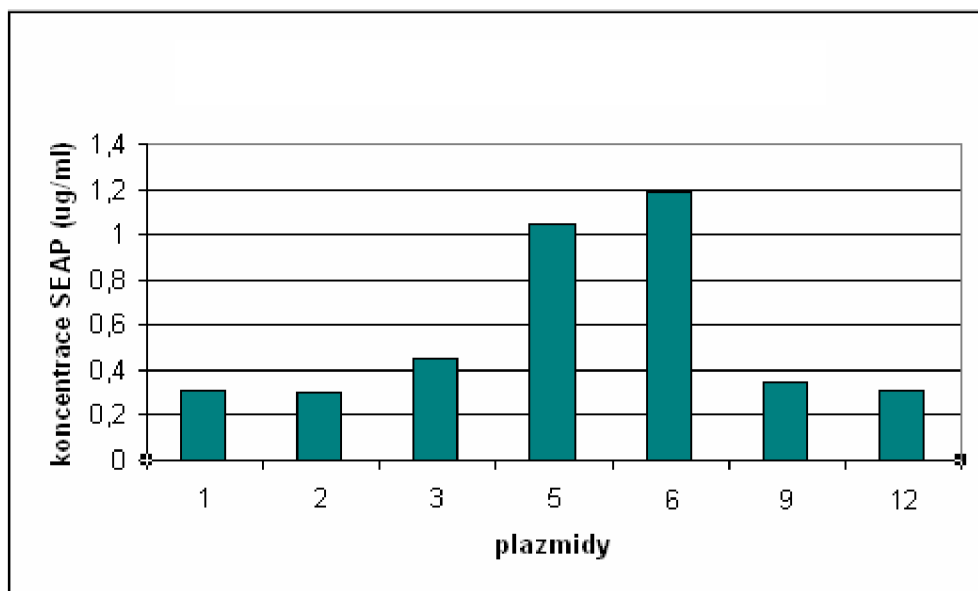
Na následujících grafech a v tabulkách jsou uvedeny jen některé hodnoty vzorků. U ostatních vzorků došlo ke kontaminaci a byly zlikvidovány.



Obr. 30: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

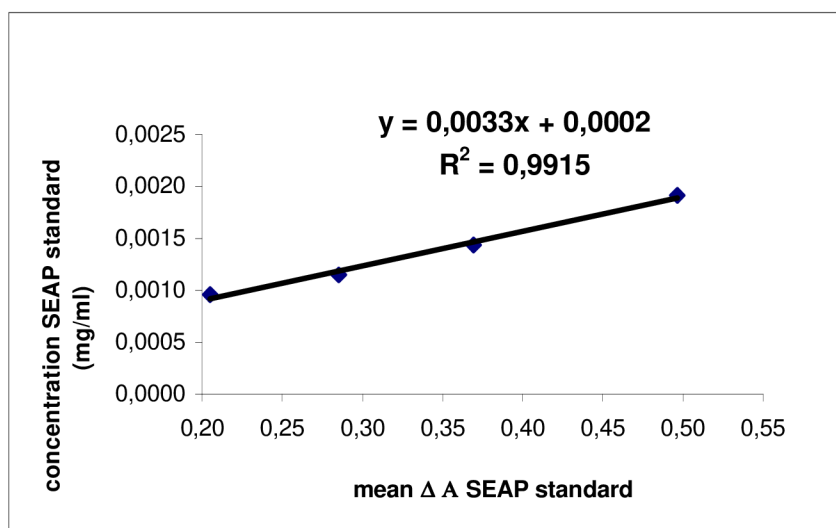
Tab. 16: Koncentrace vzorků – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,30	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
5	1,05	(ug/ml)
6	1,19	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,91	(ug/ml)
STD 8000x	1,38	(ug/ml)
STD 10000x	1,20	(ug/ml)
STD 12000x	0,94	(ug/ml)



Obr. 31: Koncentrace SEAP – 5. den po transfekci

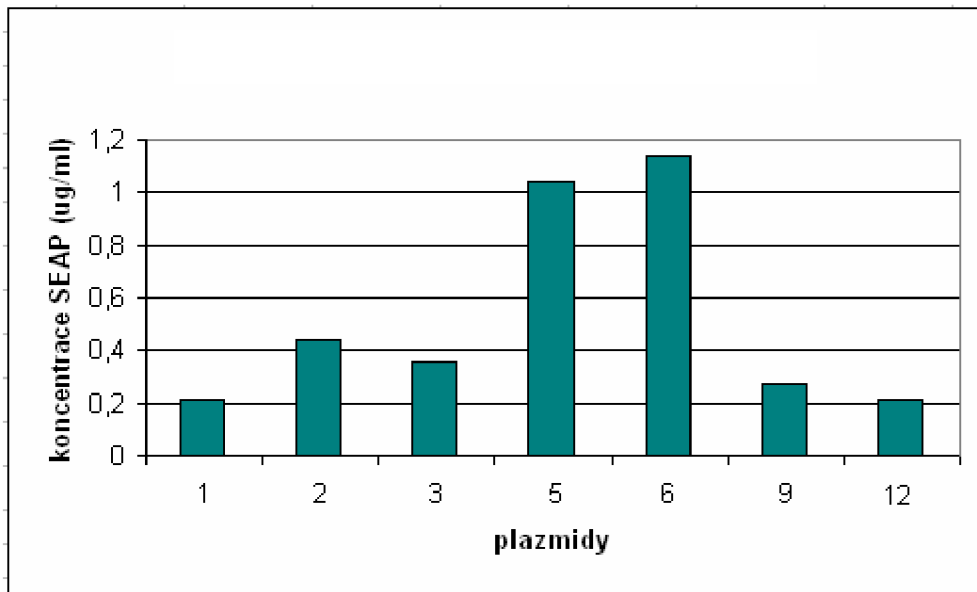
Transfekce – 6. den po transfekci



Obr. 32: Kalibrační křivka SEAP – 6. den po transfekci

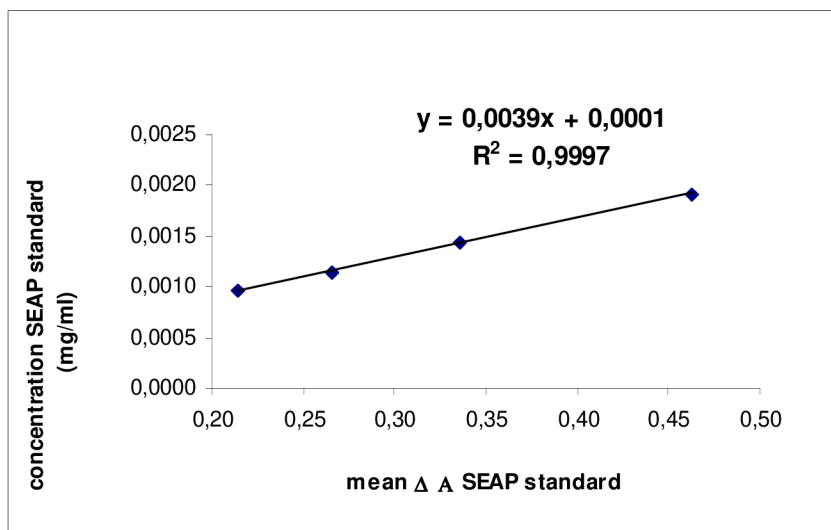
Tab.17: Koncentrace vzorků – 6. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,44	(ug/ml)
3	0,36	(ug/ml)
5	1,04	(ug/ml)
6	1,14	(ug/ml)
9	0,27	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,84	(ug/ml)
STD 8000x	1,42	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,88	(ug/ml)



Obr. 33: Koncentrace SEAP – 6. den po transfekci

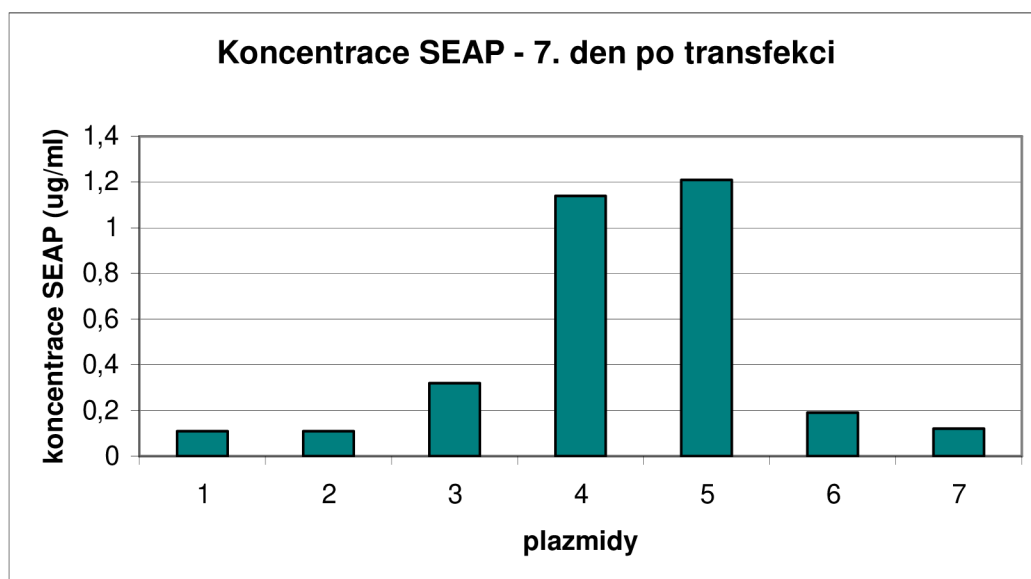
Transfekce – 7. den po transfekci



Obr. 34: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

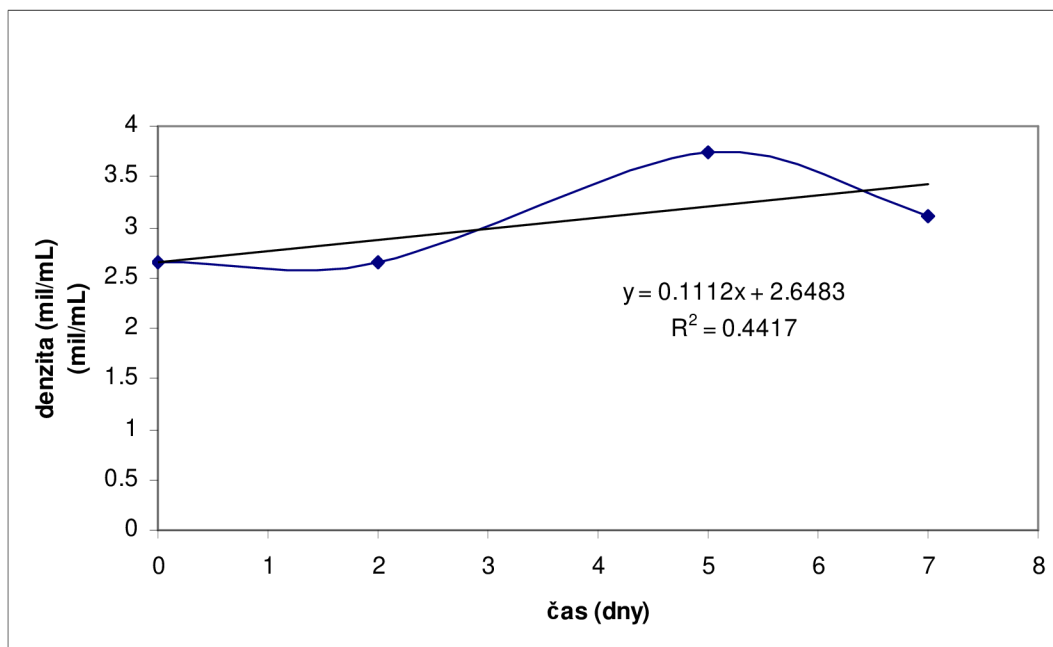
Tab.18: Koncentrace vzorků – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,11	(ug/ml)
2	0,11	(ug/ml)
3	0,32	(ug/ml)
5	1,14	(ug/ml)
6	1,21	(ug/ml)
9	0,19	(ug/ml)
12	0,12	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,41	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,93	(ug/ml)

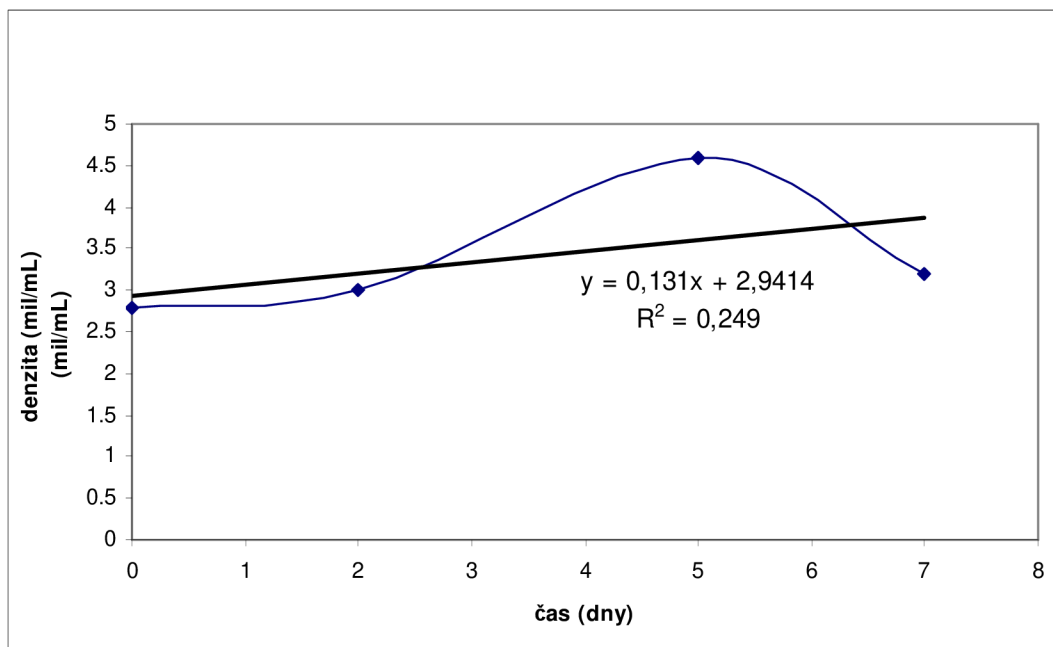


Obr. 35: Koncentrace SEAP – 7. den po transfekci

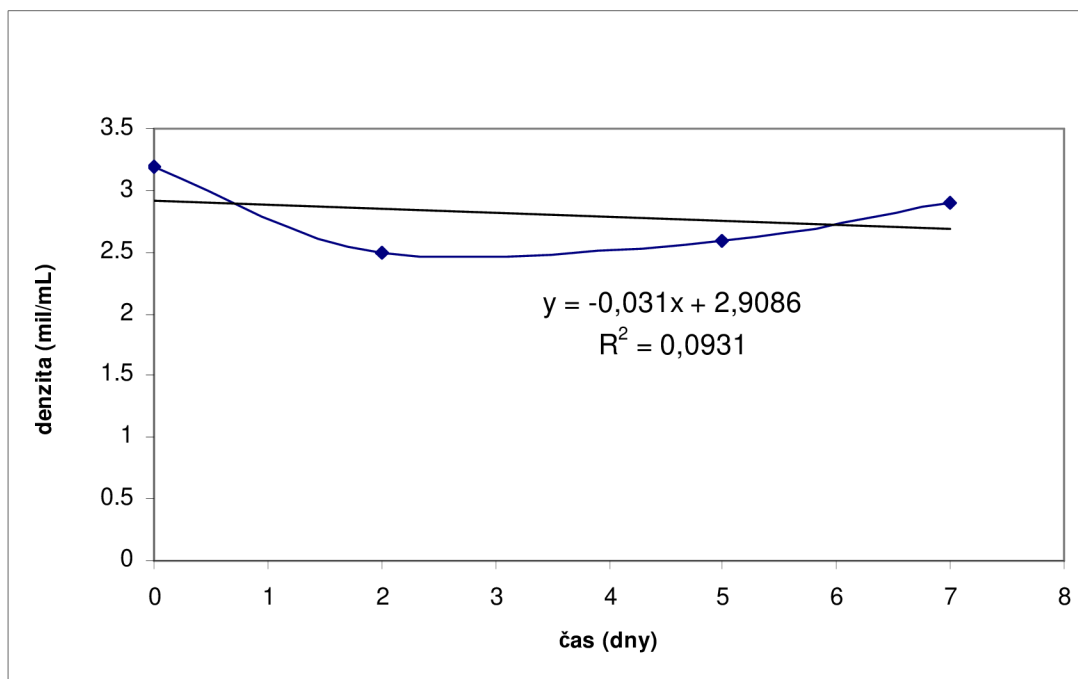
Níže jsou uvedené růstové křivky vzorků a kontroly, u kterých byly odebrány vzorky po celých sedm dní po transfekci.



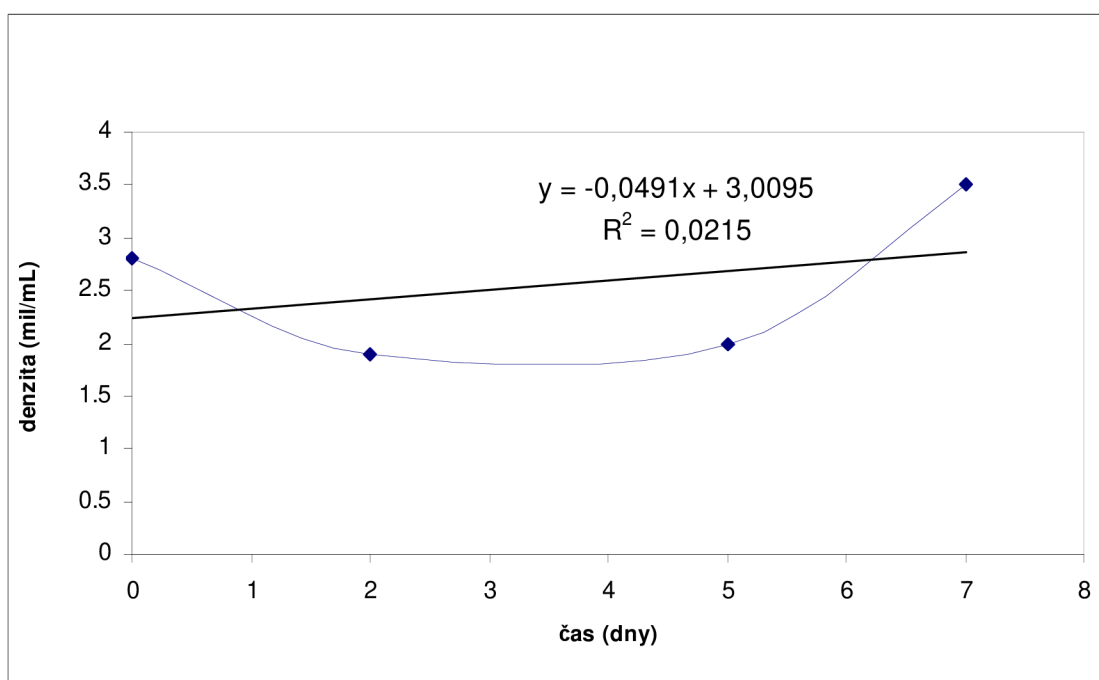
Obr 36: Růstová křivka – peak8, vzorek 1



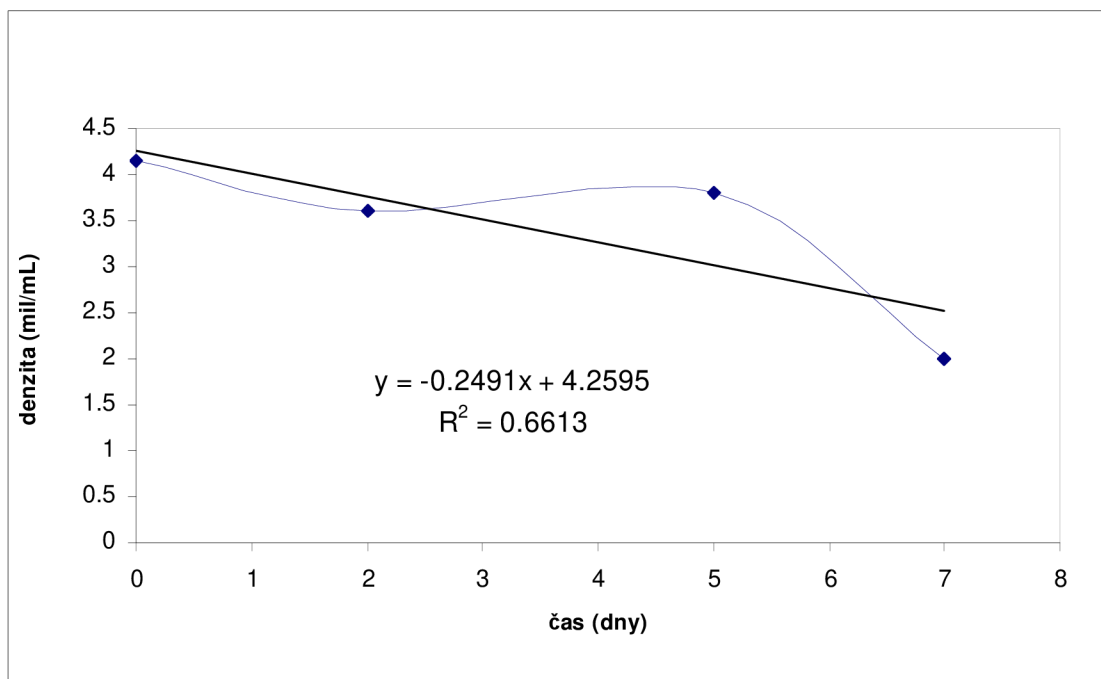
Obr. 37: Růstová křivka – peak8, vzorek 2



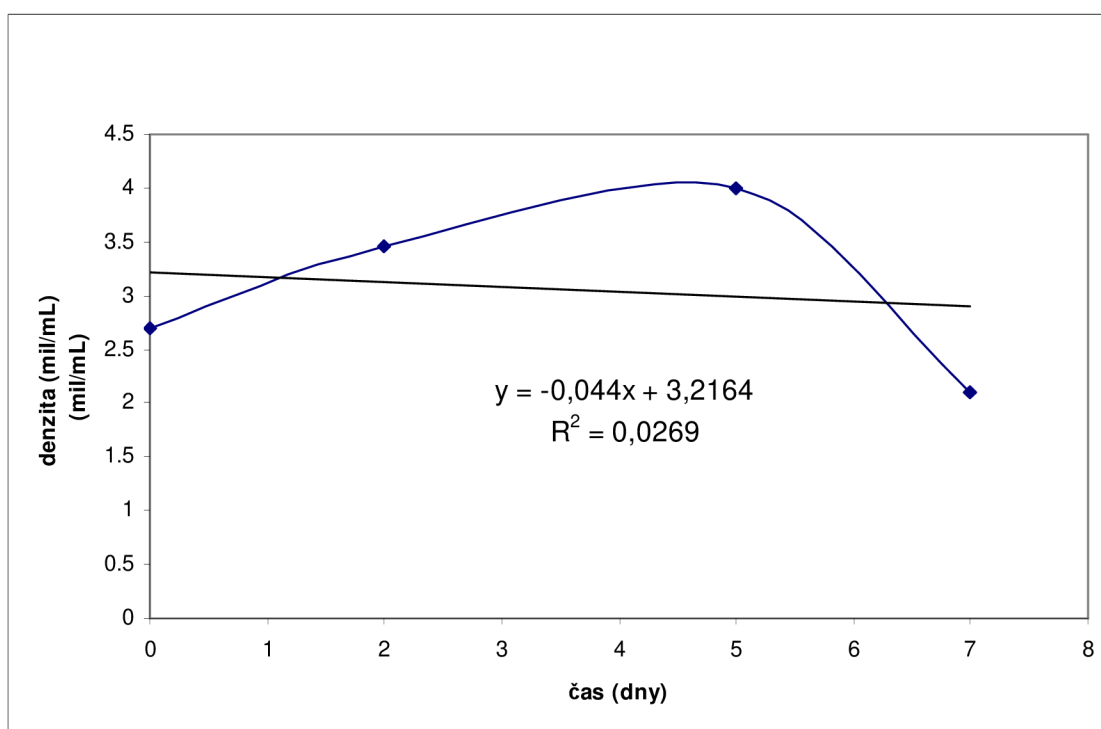
Obr. 38: Růstová křivka – pcDNA 5, vzorek 3



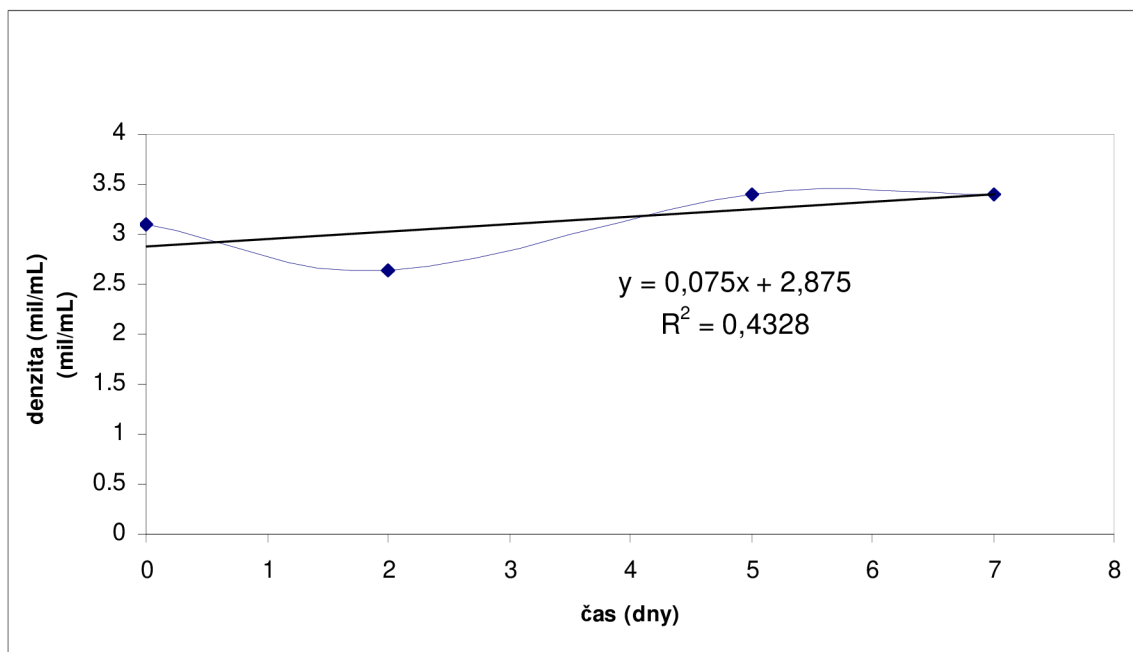
Obr. 39: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 5



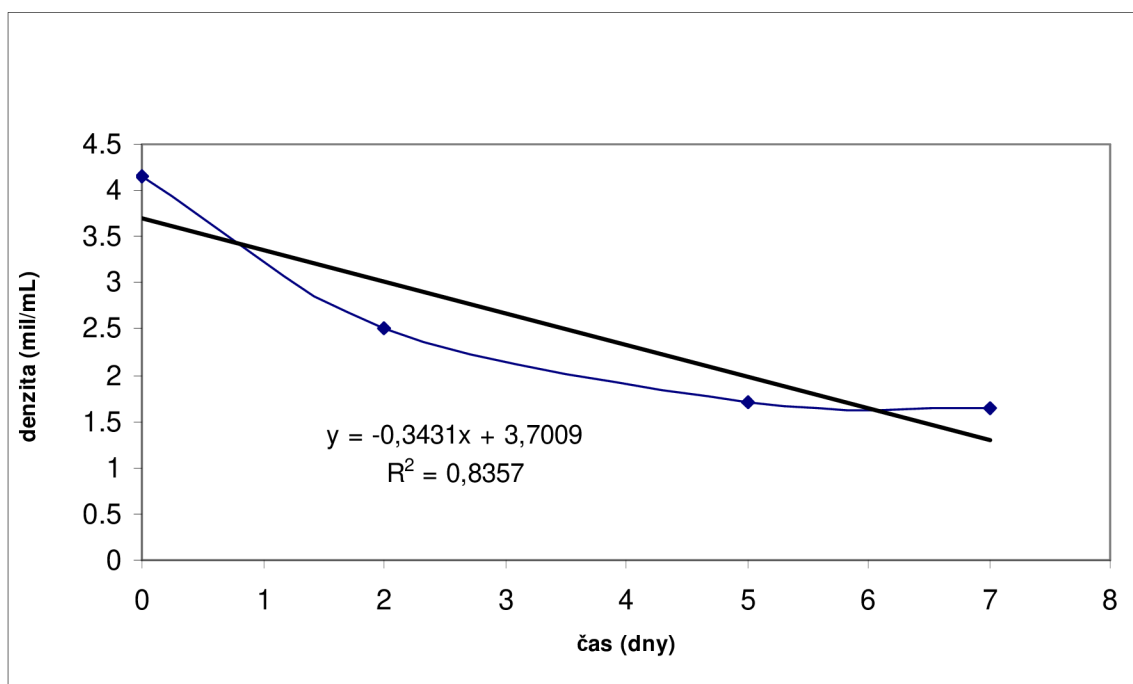
Obr. 40: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 6



Obr. 41: Růstová křivka – pcDNA 3.1, vzorek 9



Obr. 42: Růstová křivka – peBSV, vzorek 12

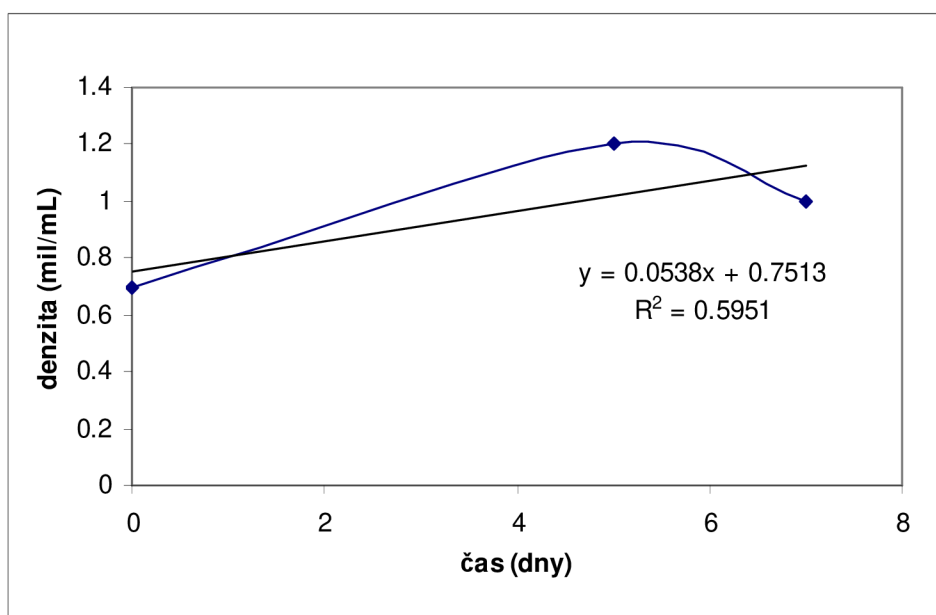


Obr. 43: Růstová křivka – kontrola

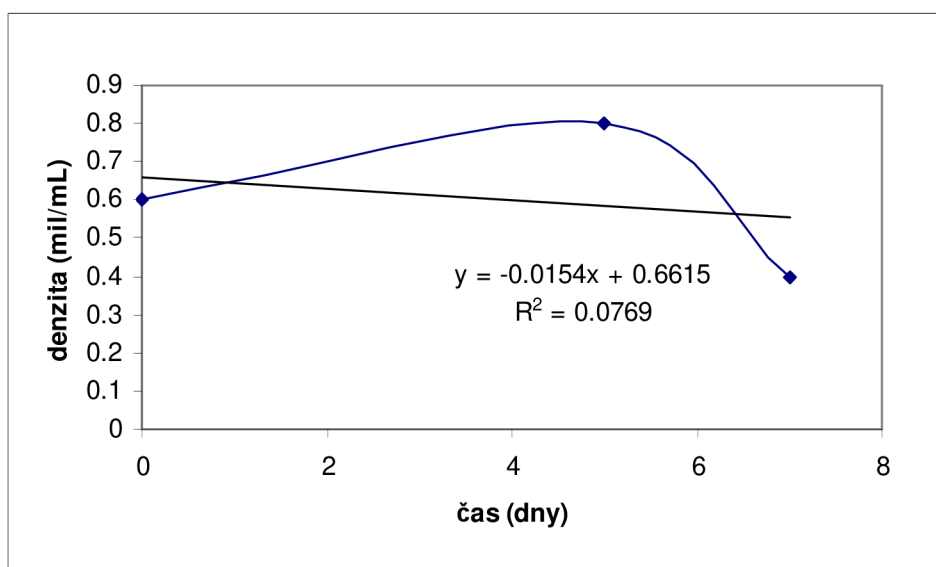
9.3 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Níže jsou uvedené grafy růstových křivek kontrolních vzorků u nichž nebyla provedena transfekce, dále růstové křivky měřené po transfekci bezsérových kultur a buněčných suspenzí udržovaných v 293BVs médiu s 1% přídavkem koňského séra.

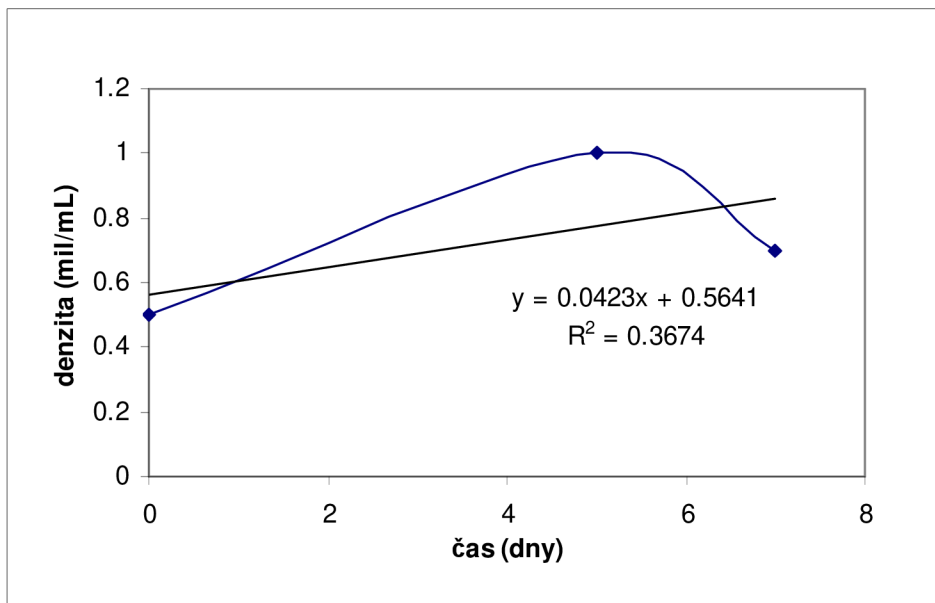
9.3.1 Bezsérová kultivace



Obr. 44: Růstová křivka – kontrolní vzorek (bezsérová kultura)

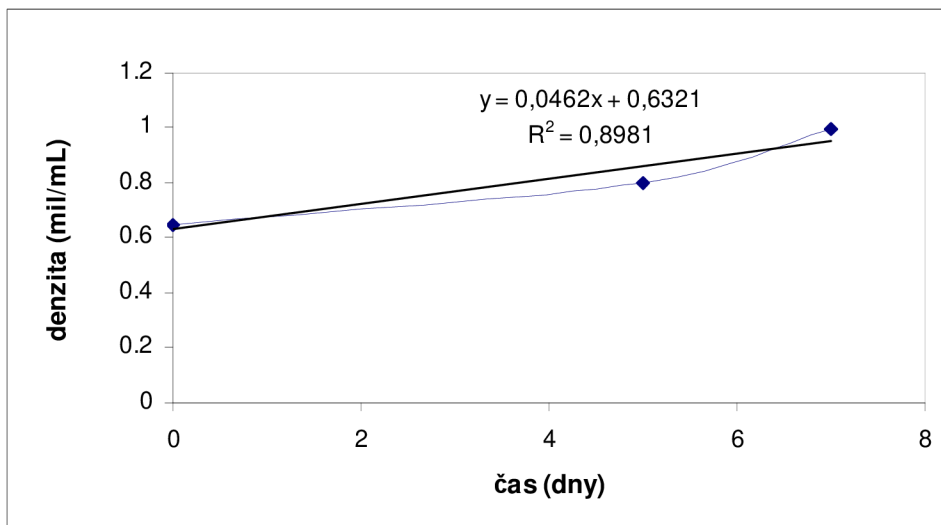


Obr. 45: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 1

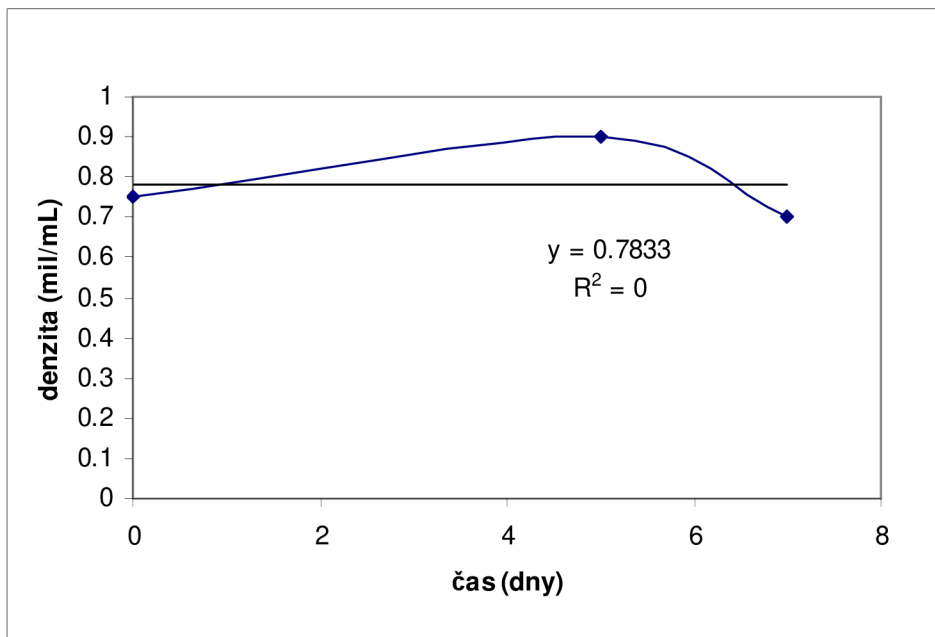


Obr. 46: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 2

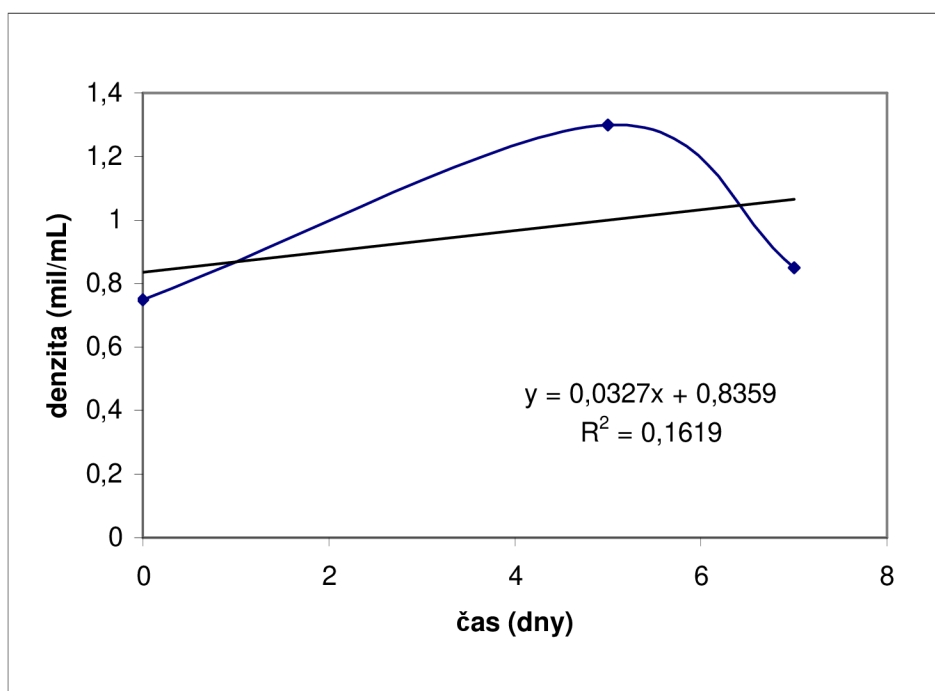
9.3.2 Kultivace s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 47: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 48: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 1

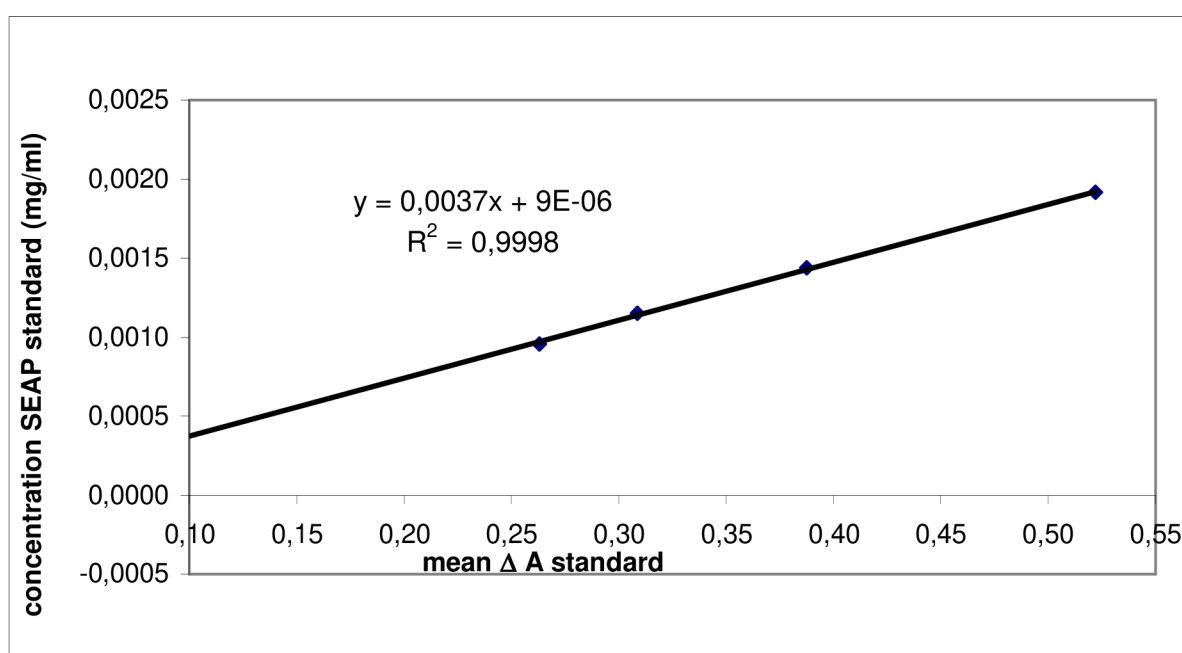


Obr. 49: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 2

9.4 Metoda transfekce 3 – Backliwal

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

5. den po transfekci

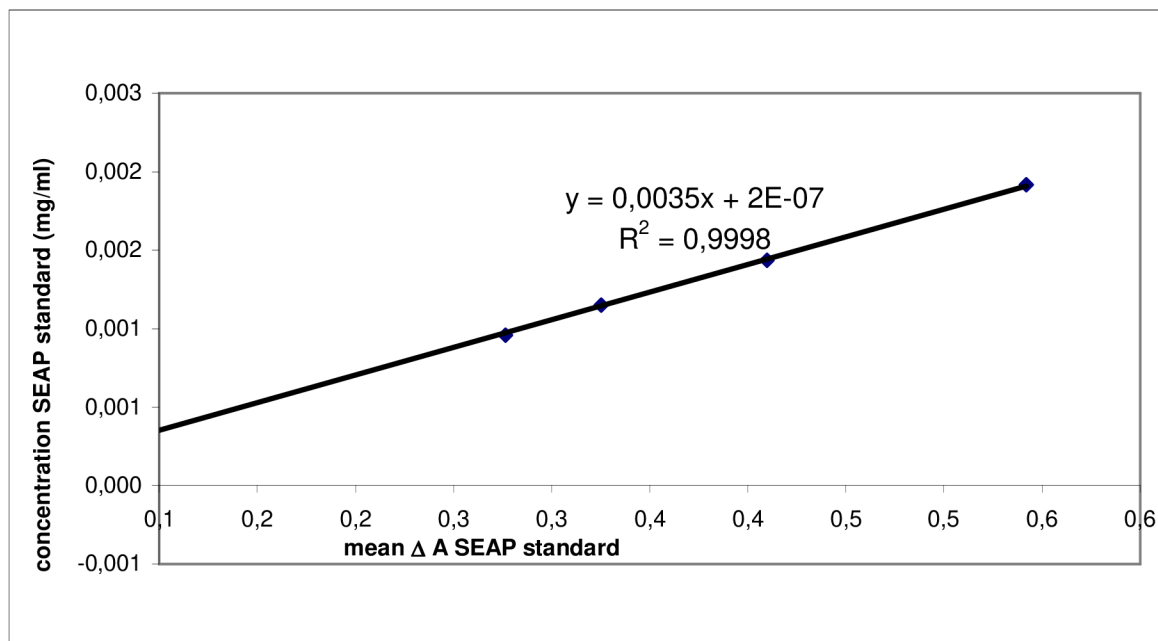


Obr. 50: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

Tab.19: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	2,016	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	0,85	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,03	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,9624	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	1,9235	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	2,9484	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4119	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4933	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	1,41	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	0,92	(ug/ml)

7.den po transfekci

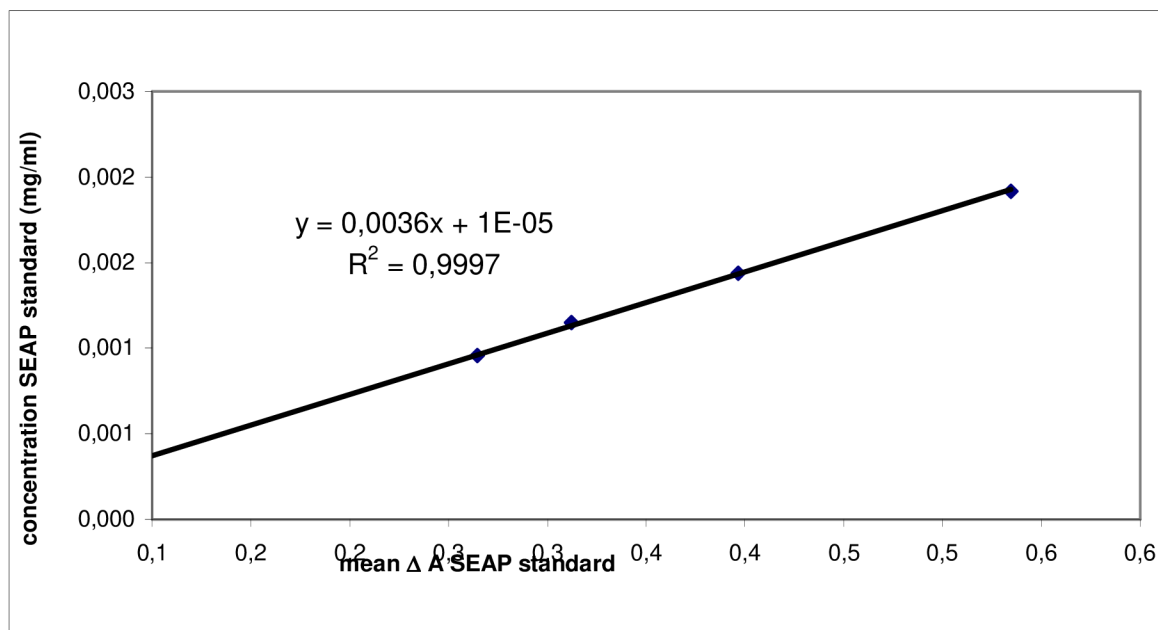


Obr. 51: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

Tab.20: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	5,5456	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,1204	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	7,3656	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,8516	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	3,1088	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,0258	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,8648	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,2348	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,4014	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,2919	(ug/ml)

11. den po transfekci

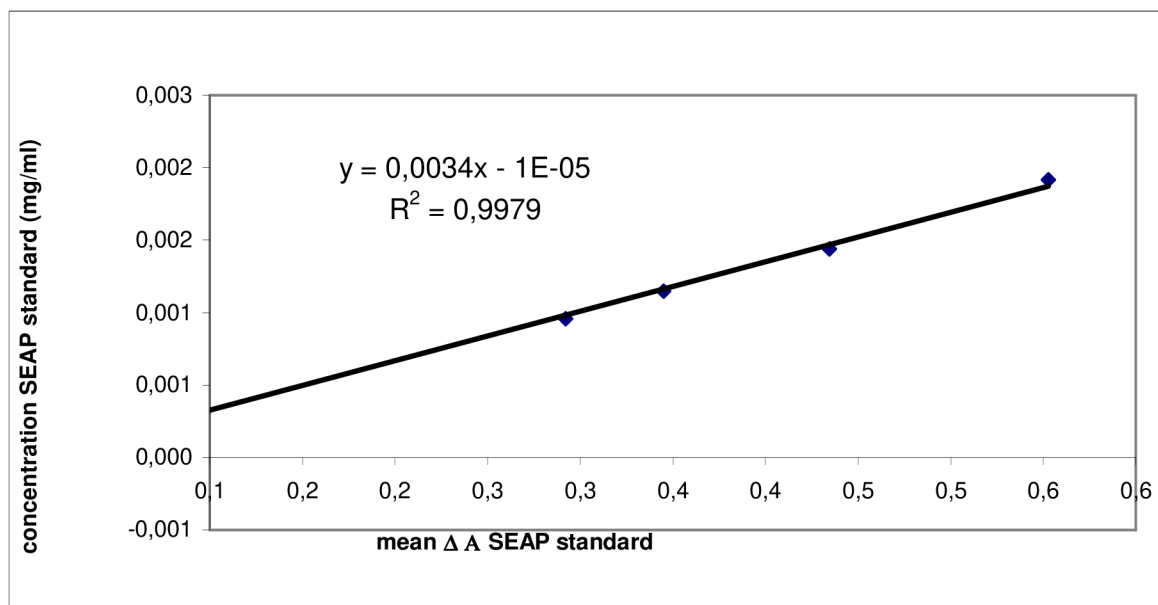


Obr. 52: Kalibrační křivka SEAP – 11. den po transfekci

Tab.21: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 11. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	6,488	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,25	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,18	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	12,34	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,6392	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	5,2764	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,5204	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,68	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,7246	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,9632	(ug/ml)

14. den po transfekci

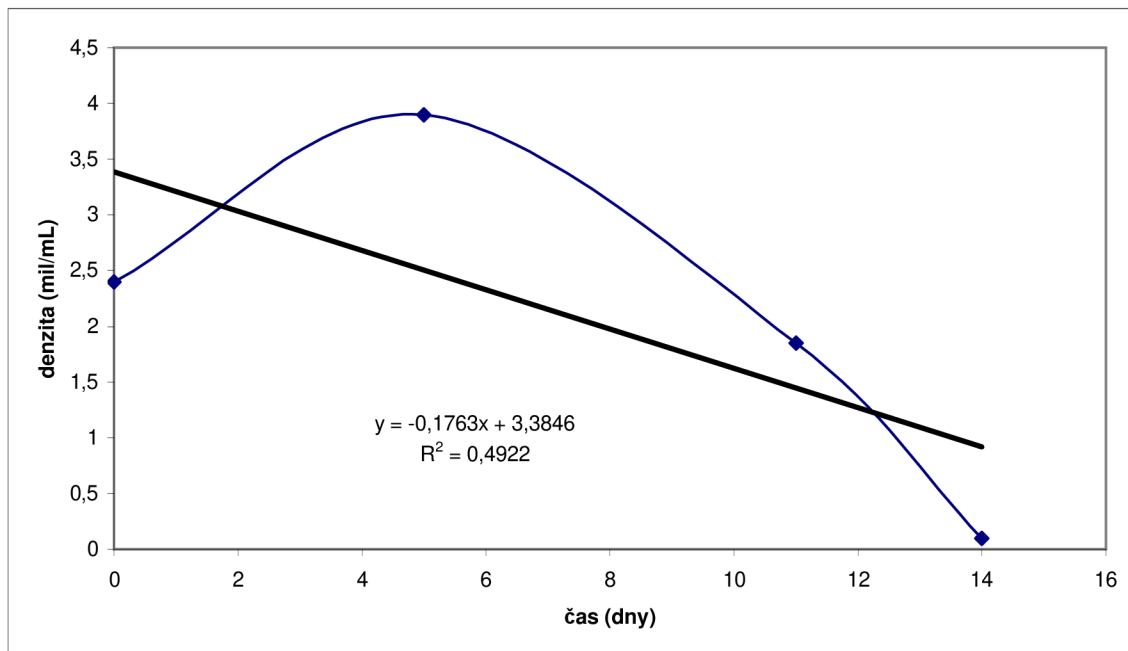


Obr. 53: Kalibrační křivka SEAP – 14. den po transfekci

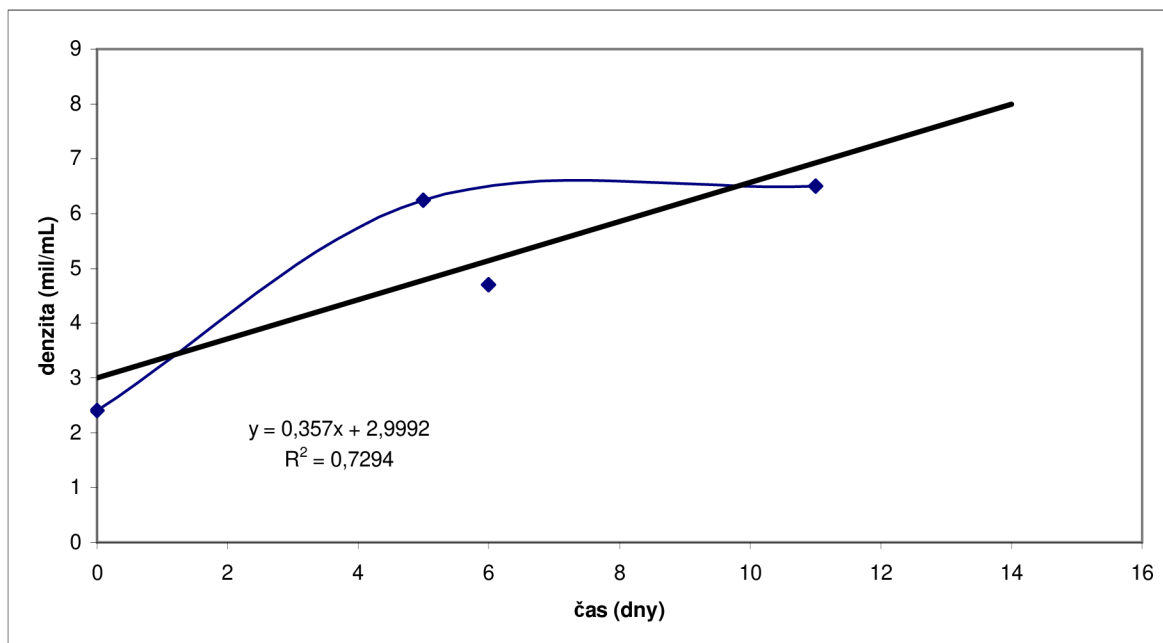
Tab.22: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 14. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug	7,8048	(ug/ml)
DNA 15ug	1,22	(ug/ml)
DNA 20ug	9,96	(ug/ml)
DNA 20ug	14,72	(ug/ml)
DNA 50ug	4,588	(ug/ml)
DNA 50ug	6,509	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,2344	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,1664	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	3,2226	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	2,1261	(ug/ml)

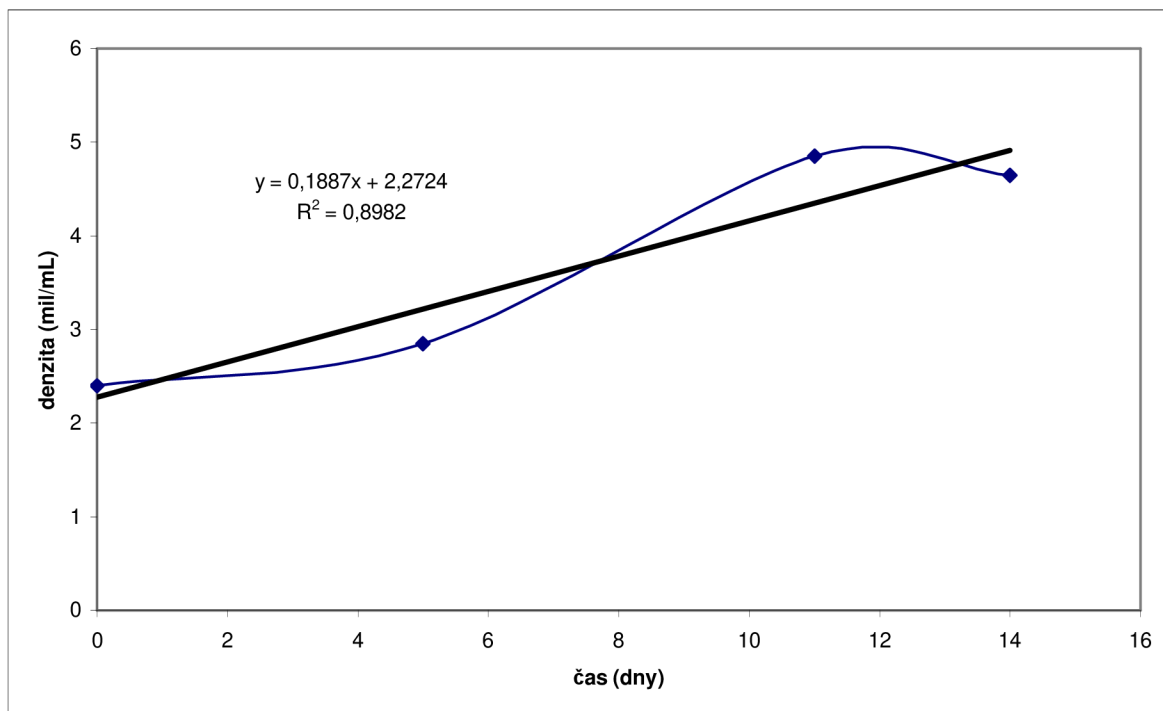
Níže jsou uvedené růstové křivky u vzorků a kontrol.



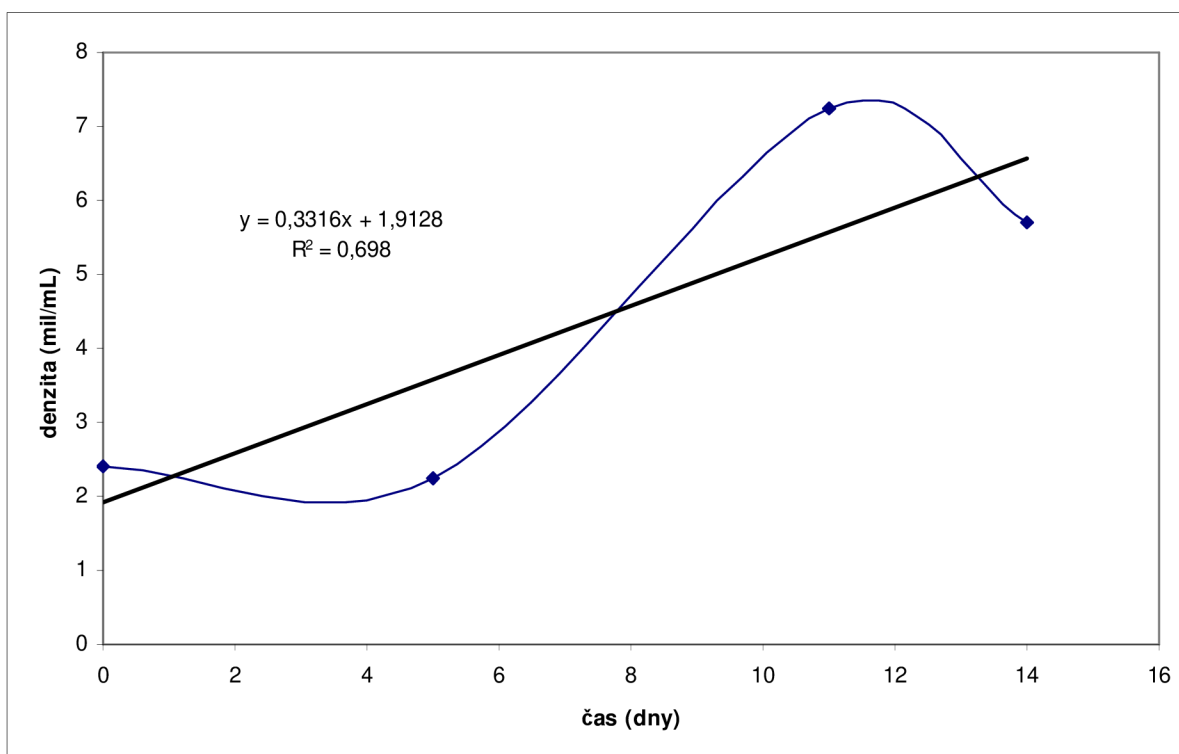
Obr. 54: Růstová křivka- kontrola 1



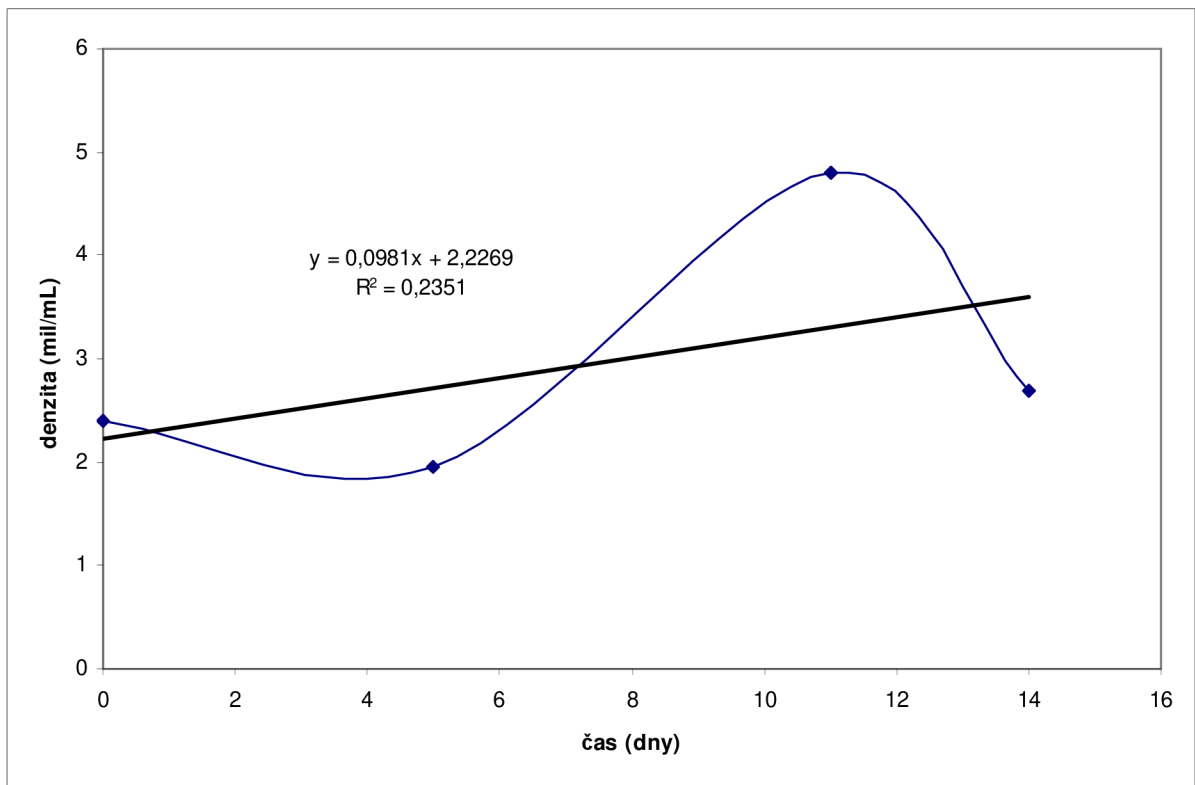
Obr. 55: Růstová křivka - kontrola 2



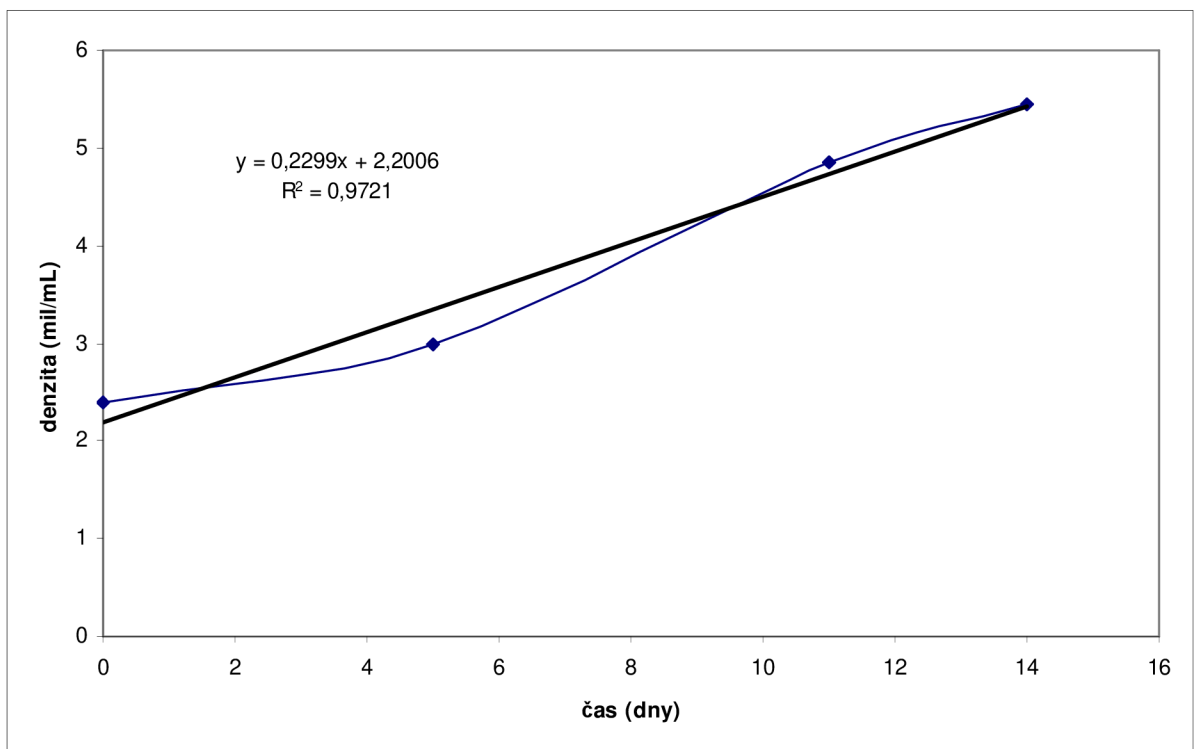
Obr. 56: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA A



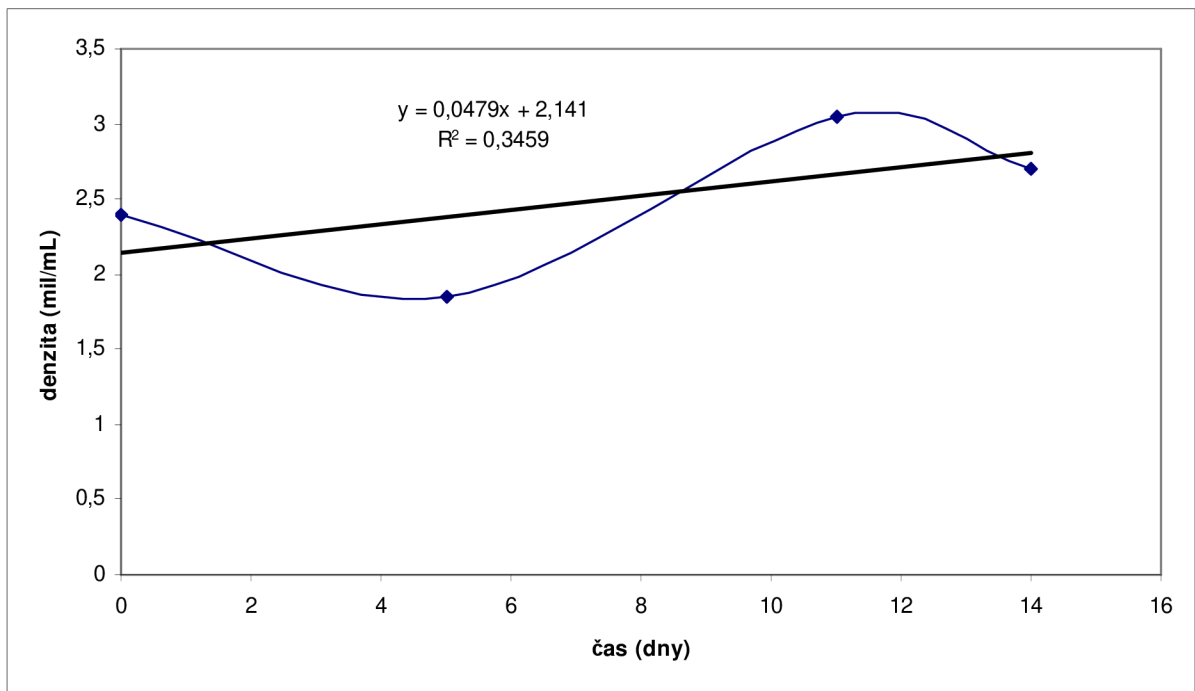
Obr. 57: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA B



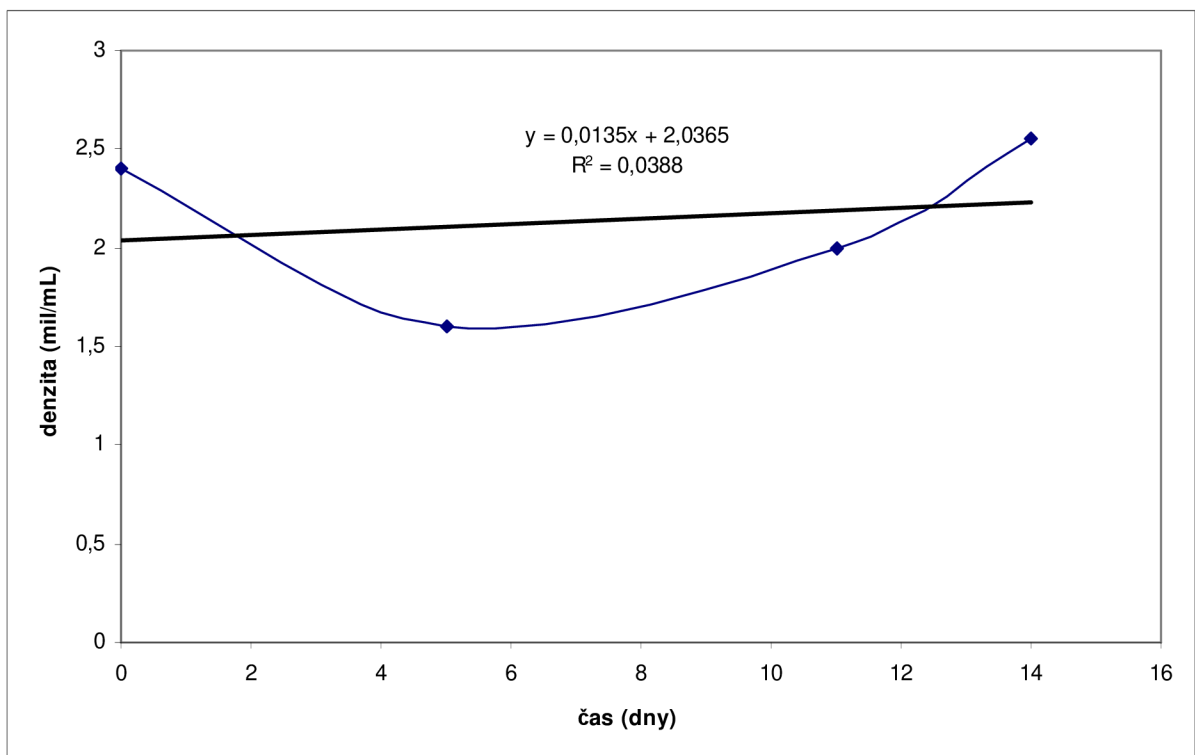
Obr. 58: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA A



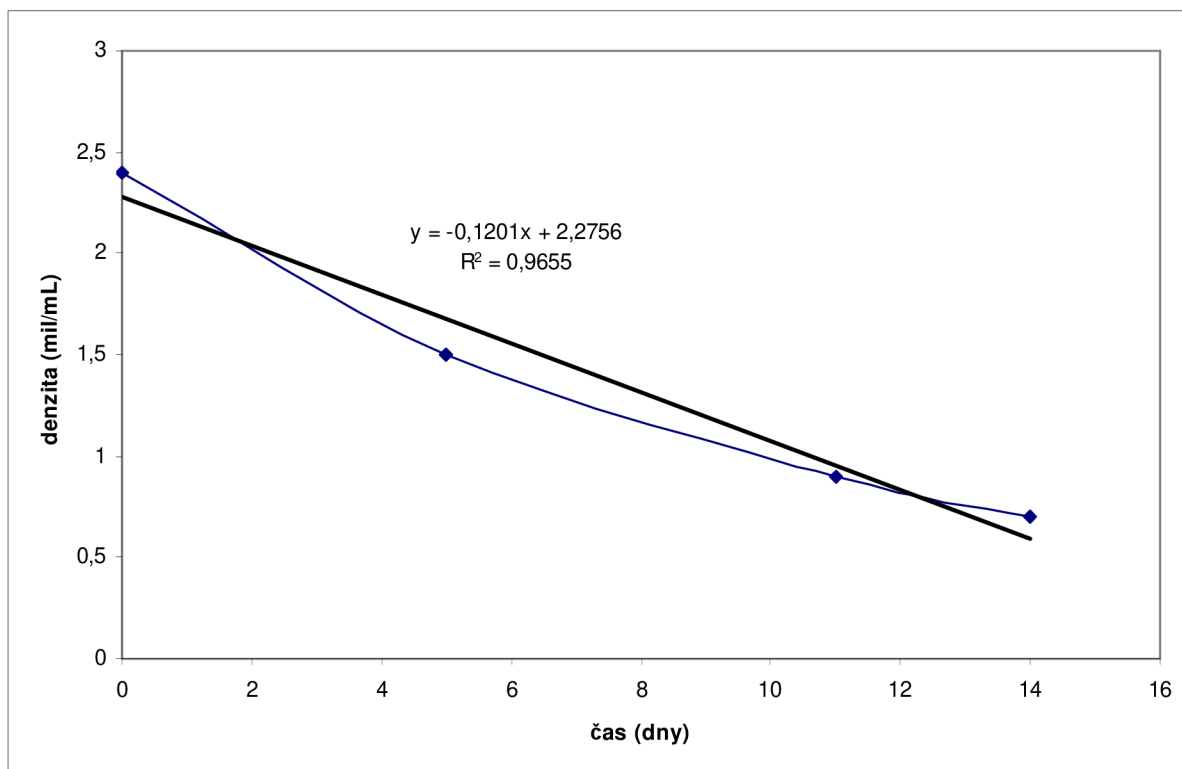
Obr. 59: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA B



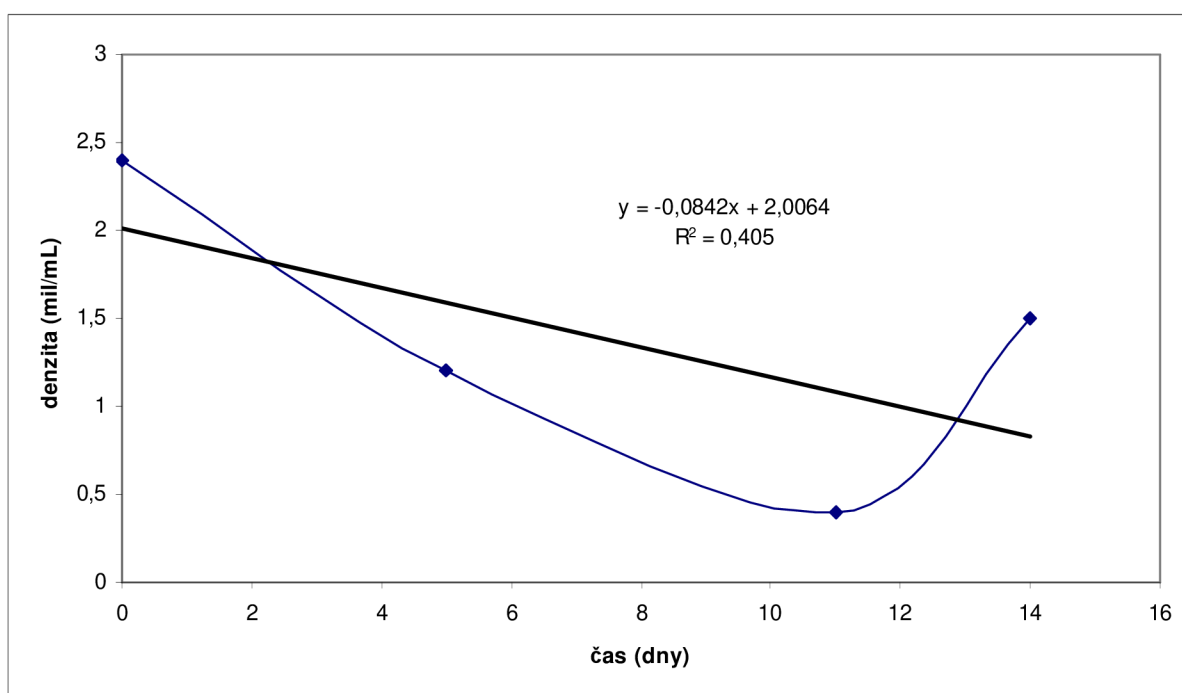
Obr. 60: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA A



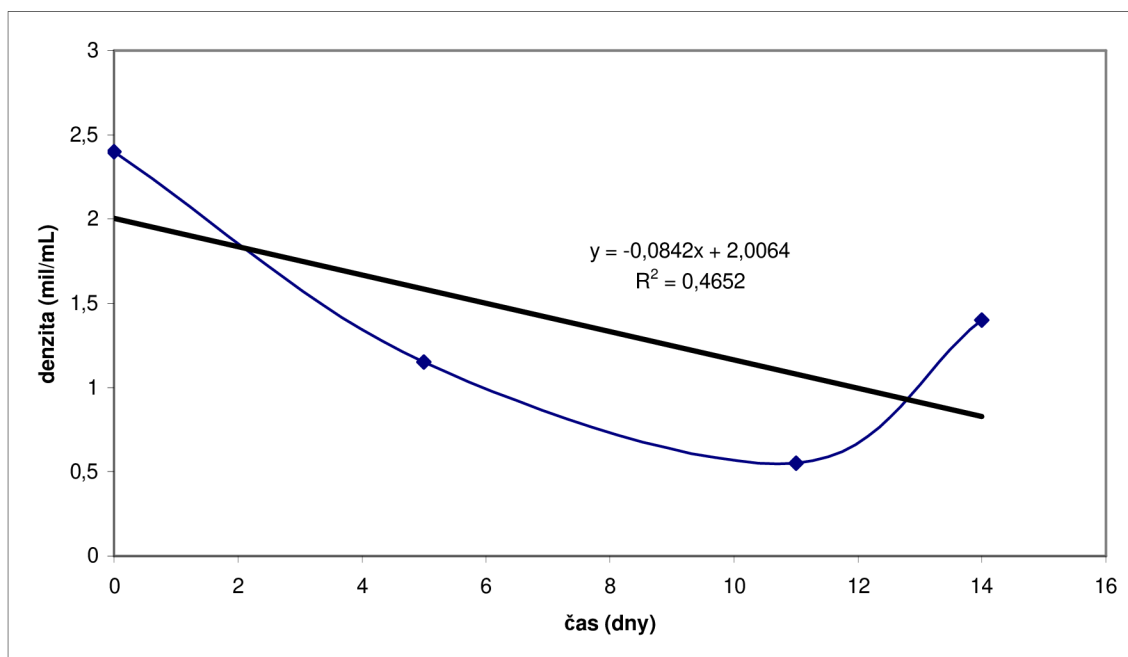
Obr. 61: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA B



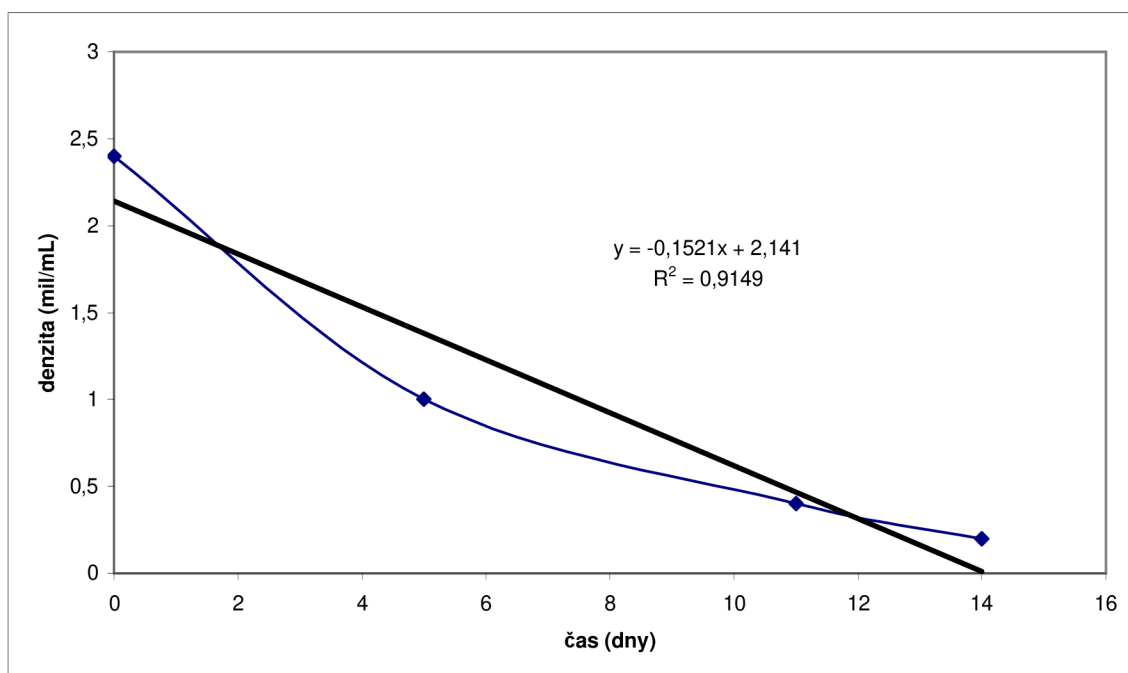
Obr. 62: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný A



Obr. 63: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný B



Obr. 64: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina A



Obr. 65: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina B

ABSTRAKT

Diplomová práce studuje problematiku transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů.

V teoretické části jsou obsaženy poznatky o vzniku rekombinantních molekul DNA, použití expresních vektorů, přenosu DNA a následné detekci rekombinantního proteinu.

Experimentální část byla zaměřena na nalezení vhodné transfekční metody pomocí polyethyleniminu, kdy hostitelskými buňkami byly buňky 293HEK/EBNA.

V první části byl zvolen nejúčinnější plazmid – pCEP4/SEAP. Dále byly zkoumány tři transfekční metody: Muller (2005), Durocher et al. (2007) a Backliwal et al. (2008). Nejvyšší dosažené exprese SEAP bylo dosaženo metodou Backliwal et al. (2008).

ABSTRACT

Master's thesis deals with the transient transfection of the serum free animal cell culture using polyethyleneimines.

In the theoretical part formation of recombinant DNA molecules, used expression vectors, used DNA transfer and detection of recombinant proteins are discussed.

The experimental part deals with efficiency of the polyethylenimine mediated transient transfection under various experimental conditions. 293HEK/EBNA cell line was chosen as an experimental model.

First the most effective plasmide - pCEP4/SEAP was selected. Then three transfection methodes were tested: Muller (2005), Durocher et al. (2007) and Backliwal et al. (2008). The highest recombinant protein expresion was reached using the method of Backliwal et al. (2008).

KLÍČOVÁ SLOVA

transientní transfekce, polyethylenimin, buňky 292HEK/EBNA , rekombinantní protein

KEYWORDS

transient transfection, polyethylenimine, 292HEK/EBNA cells, recombinant protein

FRIČOVÁ, M. *Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 75 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Mgr. Mojmíru Ševčíkovi, Ph.D za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu firmy *BioVendor – Laboratorní medicína a.s.* za odborné rady při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Třídění genomových knihoven.....	9
2.1.1	DNA/DNA hybridizace.....	9
2.1.2	Imunologické testy.....	9
2.1.3	Proteinová aktivita.....	9
2.1.4	Komplementární test.....	9
2.2	Klonovací vektory.....	10
2.3	Endodeoxyribonukleázy.....	12
2.4	Tvorba rekombinantní molekuly.....	12
2.5	Přenos DNA do buněk.....	12
2.5.1	Chemický přenos.....	12
2.5.2	Mikroinjekce.....	12
2.5.3	Přenos pomocí liposomů.....	13
2.5.4	Elektroporace.....	13
2.5.5	Syntetické komplexy DNA-ligand.....	14
2.6	Hostitelské buňky a organismy.....	16
2.6.1	Prokaryotní buňky.....	16
2.6.2	Kvasninky.....	16
2.6.3	Rostliny.....	17
2.6.4	Živočišné buňky.....	17
2.7	Reportérové geny.....	18
2.7.1	Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu.....	18
2.7.2	Transgen pro β -glukuronidázu.....	18
2.7.3	Transgen pro luciferázu.....	18
2.7.4	Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP).....	19
2.7.5	Transgen pro alkalickou fosfatázu.....	19
2.8	Transientní (přechodná) transfekce.....	19
3	Experimentální část.....	20
3.1	Materiály a metody.....	20
3.1.1	Chemikálie.....	20
3.1.2	Pomůcky a přístroje.....	20
3.1.3	Buňky a kultivační média.....	21
3.1.4	Metody.....	22
3.1.5	Rozmražení buněk a kultivace.....	22
3.1.6	Pasážování a zamražení buněk.....	23
3.1.7	Počítání buněk pomocí trypanové modři.....	24
3.1.8	Převedení na suspenzní linii.....	24
3.1.9	Izolace a purifikace plasmidové DNA.....	25
3.1.10	Plazmidy.....	26
3.1.11	Metoda transfekce 1 - Muller (2005).....	30
3.1.12	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007).....	30
3.1.13	Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008).....	31
3.1.14	Stanovení exprese reportérového genu.....	31
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Růst zásobní buněčné kultury.....	33
4.2	Růst buněk po transfekci.....	34
4.3	Volba plazmidu pro transientní expresi.....	35
4.3.1	Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce.....	36

4.4	Srovnání metod transientní transfekce	37
4.4.1	Metoda transfekce 1 - Muller (2005)	37
4.4.2	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	37
4.4.3	Metoda Backliwal (2008).....	37
5	Závěr.....	41
6	Seznam použitých zdrojů	42
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	45
8	Seznam příloh.....	46
9	Přílohy	47
9.1	Složení médií a pufrů	47
9.1.1	LB médium.....	47
9.1.2	Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA.....	47
9.1.3	DMEM/F-12 médium.....	48
9.1.4	BV 293s médium.....	49
9.2	Metoda transfekce 1 – Muller (2005).....	49
9.3	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	63
9.3.1	Bezsérová kultivace.....	63
9.3.2	Kultivace s 1% přídavkem koňského séra.....	64
9.4	Metoda transfekce 3 – Backliwal	66

1 ÚVOD

Stále významnějším odvětvím biotechnologického a farmaceutického průmyslu se stává výroba rekombinantních proteinů. Rekombinantní proteiny jsou často požadovány ve velkých množstvích, jde o stovky miligramů až gramy r-proteinů. Jedná se zejména o produkci antikoagulantů, vakcín, terapeutik, lidského insulínu, růstových hormonů apod.

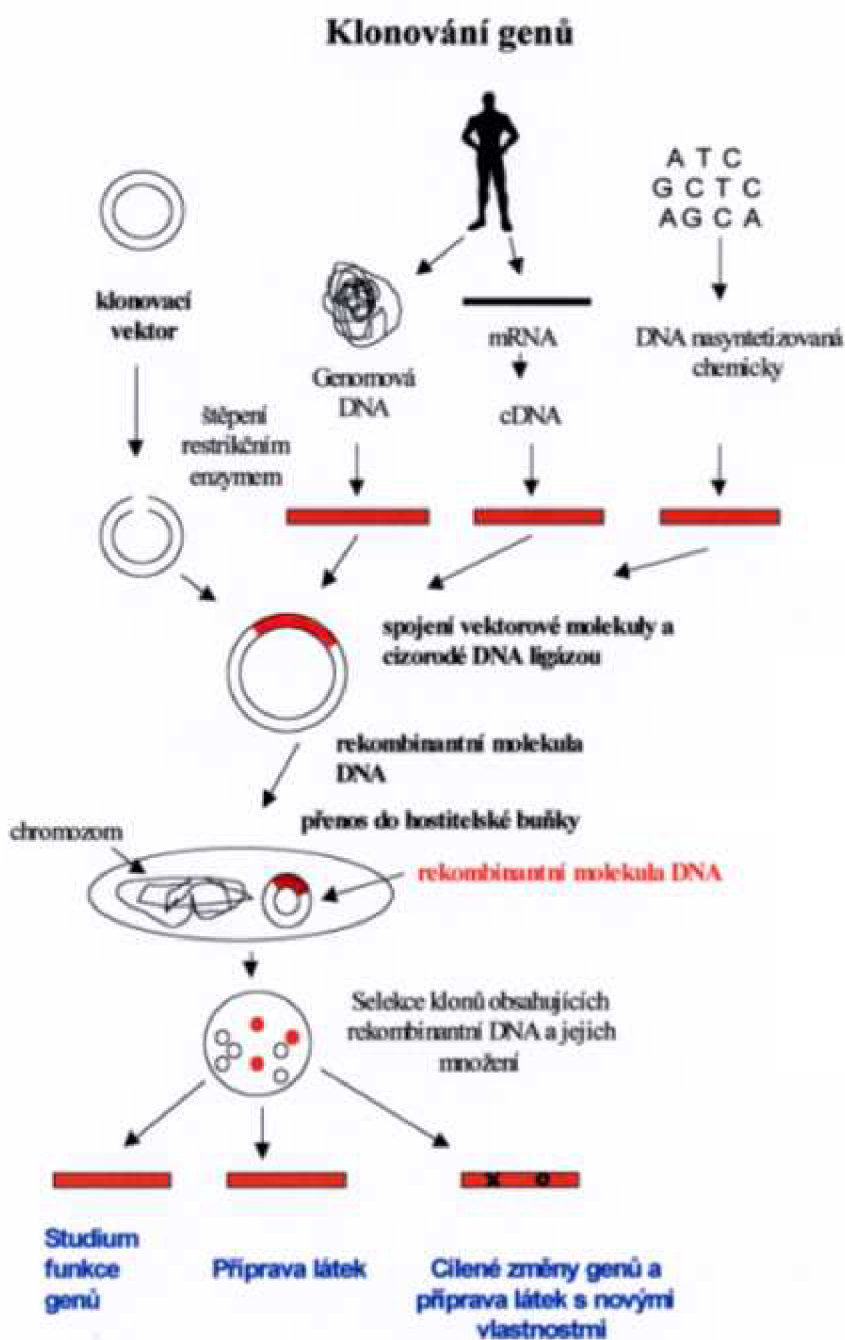
Pro správnou biologickou funkci r-proteinu je důležité, aby byl protein správně sbalen, a aby mu hostitelská buňka zajistila všechny posttranslační úpravy. Po dlouhodobých výzkumech bylo zjištěno, že vhodnými expresními systémy jsou savčí buňky.

Zatím bylo testováno více než 1000 sekvencí DNA kódujících proteiny potenciálně využitelných při léčbě lidských nemocí. Většina těchto molekul byla exprimována v hostitelských buňkách, přibližně 750 postoupilo do dalších klinických testů a 80 látek bylo schváleno jako léčiva v USA i EU. [1] [2]

Tato práce se zabývá problematikou přípravy r-proteinů pomocí transientní transfekce eukaryotních buněk 293 HEK/EBNA. Transfekce je proces cíleného přenosu nukleové kyseliny do hostitelských buněk. Při přechodné (transientní) transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. [2] Cílem práce je vývoj protokolu transientní transfekce na základě poznatků publikovaných dříve. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

Principem genového inženýrství je tvorba rekombinantních (chimérických) molekul DNA. V roce 1973 poprvé popsali Cohen a Boyer techniky tvorby rekombinantních molekul DNA. [3] Klonovaná DNA je získána buď z donorového organismu, jehož DNA kóduje nějakou zajímavou vlastnost, nebo je použit uměle syntetizovaný gen. Prvním krokem při tvorbě rekombinantních molekul je hledání a izolace klonovaného genu. K vyhledání cílové sekvence DNA se konstruují genomové knihovny. Genomová knihovna je soubor naklonovaných fragmentů DNA, které dohromady tvoří genom jednoho organismu. K vyhledání specifického genu se využívá metod třídění genomových knihoven. [4]



Obr. 1: Schéma klonování genů [5]

2.1 Třídění genomových knihoven

2.1.1 DNA/DNA hybridizace

Je založena na párování komplementárních dusíkatých bází jednořetězcových nukleových kyselin pomocí vodíkových můstků. K vyhledání specifického genu se použije krátký oligonukleotidový řetězec, který je částečně (heterologní sonda), nebo zcela (homologní sonda) komplementární s klonovanou sekvencí DNA. DNA sonda nese značku, která je snadno detekovatelná. V oligonukleotidovém řetězci sondy může být zakomponován radioaktivní izotop, který je po hybridizaci sondy se sekvencí DNA detekován např. radiograficky. Sonda může být značena i neradioaktivně, např. imunologicky. K hybridizaci lze použít fragmenty po agarózové gelové elektroforéze, kdy pomocí filtračních papírů a kapilárních sil jsou fragmenty přeneseny (přebírány) na nylonovou membránu. Poté jsou fragmenty denaturovány a přidá se sonda, která hybridizuje s cílovými sekvencemi DNA – Southernův blot.

2.1.2 Imunologické testy

Na sondu je navázán antigen. Poté je do roztoku DNA přidána směs primárních protilátek, které se specificky vážou k antigenům. Následně se přidají sekundární protilátky, které nasedají na primární protilátky a zároveň nesou značení, které je snadno detekovatelné, např. enzym (alkalická fosfatáza). Po přidání substrátu je substrát změněn enzymem na produkt a tato reakce je doprovázena barevnou změnou. Poté je signál sondy zjištěn fotometricky.

2.1.3 Proteinová aktivita

Tato metoda se využívá pokud klonovaný gen kóduje syntézu enzymu, který není normálně hostitelskou buňkou produkován. Kolonie jsou zaočkovány na misky s vhodným substrátem (škrob – kolonie obsahující gen pro alfa-amylázu) a na základě selektivního zbarvení se rozliší, které kolonie využívají substrát, a tudíž obsahují cílový gen.

2.1.4 Komplementární test

Komplementární test je využíván, pokud klonovaný gen kóduje syntézu esenciálního produktu (vitamín, antibiotikum, aminokyselina apod.) nezbytného pro přežití buňky. Gen se přenesou do buněk, které nejsou schopné růst na substrátech bez esenciální složky. Pokud buňky získaly rekombinantní plazmid, jsou schopné růst na minimálním médiu a esenciální složku si syntetizují samy.

2.2 Klonovací vektory

Klonovací vektory slouží k přenosu cizorodé DNA do hostitelských buněk. Čím je menší velikost klonovacího vektoru, tím se zvyšuje účinnost přenosu rekombinantní molekuly DNA. Vektory obsahují cílová místa pro restriční endonukleázy. Restriční endonukleázy jsou enzymy, které vektor naštěpí a do tohoto místa je vložen gen zájmu. Na vektoru je vždy jen jedno místo pro danou nukleázu. Dále vektoru obsahuje selekční marker, který umožňuje identifikovat, které buňky získaly vektor. Jako selekční markery se často využívají geny pro rezistenci k antibiotiku (např. ampicilin). Po provedení přenosu rekombinantní DNA do hostitelských buněk senzitivních na antibiotikum, jsou buňky vysety na médium s přídatkem antibiotika. Přežijí jen ty buňky, které získaly vektor.

Jako vektory se nejčastěji používají plazmidy. Jsou to kruhové samoreplikující se extrachromozomální molekuly DNA izolované z bakterií. Obsahují sekvenci *ori*, místo počátku replikace.

Dále fágové vektory odvozené od fága lambda a od fága M13. Cizorodá DNA se množí v lytickém cyklu fága jako rekombinantní DNA fága lambda. Poté se vytvoří viriony (fágové částice), které se skládají z DNA zabalené v hlavičce, ke které je připojen bičík. Za přítomnosti virionů se na vrstvě buněk začnou tvořit plaky.

Hybridy mezi plazmidy a fágy jsou kosmidy. Spojují výhody obou typů vektorů. Pomocí fágových částic je DNA injikována do hostitelských buněk. Kosmid obsahuje dvě *cos* místa, které se v hostitelské buňce spojí a vznikne kruhová molekula DNA. V hostitelské buňce jsou poté uchovávány jako plazmidy. Dále kosmid obsahuje gen pro rezistenci na tetracyklin pro selekci v hostitelských buňkách, které jsou senzitivní na tetracyklin. Výhodou kosmidů je velká klonovací kapacita (viz. tabulka č.1). Pomocí těchto vektorů lze klonovat i soubory genů (operony).

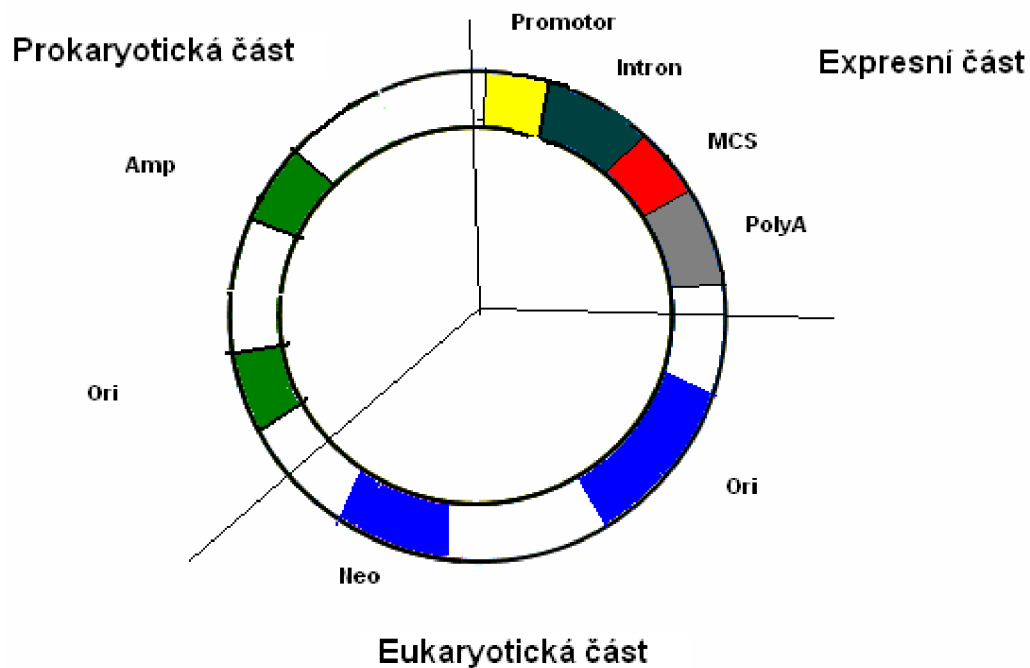
Tab. 1: Klonování kapacity vektorů [4]

vektor	Hostitelská buňka	Klonování kapacita (kb)
Plazmid	<i>E. coli</i>	0,1 – 10
Bakteriofág λ	λ / <i>E. coli</i>	10 – 20
Kosmid	<i>E. coli</i>	35 -45
Bakteriofág P1	<i>E. coli</i>	80 – 100
Bakteriální umělý chromozom	<i>E. coli</i>	50 – 300
P1 bakteriofágový umělý chromozom	<i>E. coli</i>	100 – 300
Kvasinkový umělý chromozom	kvasinky	100 – 2000
Lidský umělý chromozom	Lidské buňky	> 2000

Eukaryotické geny nemohou být správně exprimovány v bakteriálních vektorech. Eukaryotické geny obsahují introny a exony. Prokaryotické buňky nejsou schopny vystřihávat introny z přepsané RNA. Pro klonování eukaryotických genů v bakteriálních buňkách byly vytvořeny speciální postupy.

Z organismu se vyizoluje celková RNA. Eukaryotní mediátorová RNA nese na 3' konci polyadenylový konec. Mediátorová RNA se oddělí od celkové pomocí kolony, která obsahuje polythymínové zbytky, na které se navážou polyadenylové konce mRNA pomocí vodíkových můstků. Poté jsou štěpeny vodíkové můstky pomocí speciálního pufru a RNA je eluována ven z kolony. Mediátorová RNA je přepsána do DNA za pomoci enzymu reverzní transkriptázi. Výsledkem je fragment dvouřetzcové cDNA (komplementární DNA). Konstrukt vektor-cDNA může být vnesen do hostitelské buňky *E. coli*. Pro expresi eukaryotních genů jsou využívány kvasinkové, hmyzí a savčí vektory.

Eukaryotický expresní vektor obsahuje: eukaryotický markerový gen pro selekci v hostitelské buňce, promotorovou sekvenci, transkripční a translační stop signály, sekvence pro posttranskripční úpravy RNA, počátek replikace funkční v hostitelské buňce (extrachromozomálně replikující se DNA), nebo integrační místo pro rekombinaci do genomu hostitelské buňky. [4]



Obr. 2: Mapa plazmidu – plazmid se skládá ze tří částí. Prokaryotická oblast nese místo *ori* (počátek replikace) a gen pro rezistenci k ampiclinu funkční v buňkách *E. coli*. Pro eukaryotní buňky slouží sekvence *ori* a gen pro rezistenci k neomycinu. Expresní oblast obsahuje promotor, za kterým následuje klonovací místo (MCS = multiplecloning site).

Vektory pro expresi eukaryotních genů jsou konstruovány jako kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje *ori* místo a selekční marker funkční v *E. coli*. Dále obsahuje *ori* místo, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS (multiple cloning site) s promotorovou a terminátorovou sekvencí. [2]

2.3 Endodeoxyribonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které štěpí DNA ve specifických místech, rozpoznávají palindromické sekvence. Restrikční endonukleázy byly izolovány z různých bakteriálních kmenů. Jsou označeny zkratkami podle toho, z jaké bakterie byly získány (např. EcoRI z *Escherichia coli*). Původní význam těchto enzymů je ochrana před cizorodými DNA, např. virovými. Aby se zamezilo štěpení hostitelské DNA, je chráněna před působením enzymů methylací. Tyto enzymy se využívají při tvorbě rekombinantní (chimérické) DNA. Vektor i cílový fragment cizorodé DNA je naštěpen stejnou endonukleázou. Štěpení fragmentů probíhá za vzniku přečnívajících nebo tupých konců.

2.4 Tvorba rekombinantní molekuly

Z donorového organismu je izolována DNA. Poté je nalezen cílový gen a vyštěpen pomocí restrikční endonukleázy. Stejnou restrikční endonukleázou je naštěpen plasmid v cílovém místě pro enzym, které sousedí s klonovacím místem. Vznikne lineární molekula plasmidové DNA s přečnívajícími konci se sekvencemi nukleotidu podle použitého enzymu. Linearizované molekuly jsou smíchány s cílovou DNA a směs je inkubována s DNA ligázou za přítomnosti ATP. Vznikne rekombinantní molekula (plasmid-insert). [4]

2.5 Přenos DNA do buněk

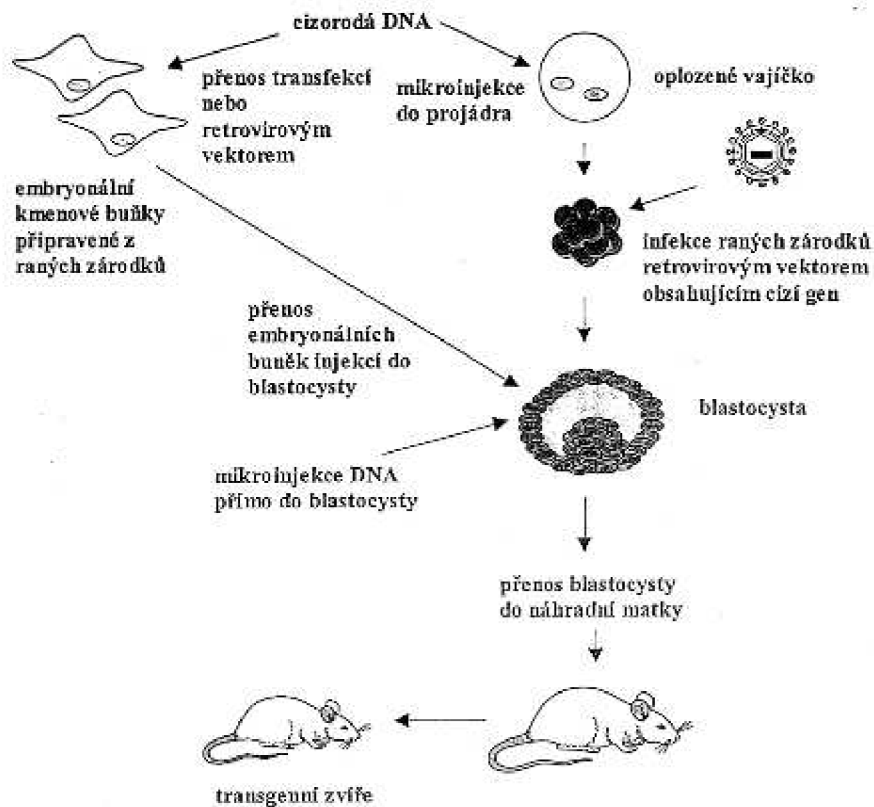
V přírodě často probíhá přirozený přenos DNA do hostitelských buněk. K tomu dochází při bakteriální konjugaci, přirozené transformaci nebo k přenosu DNA během virové infekce. DNA lze do buněk přenášet i za pomoci fyzikálních nebo chemických sil.

2.5.1 Chemický přenos

Buňky a roztok DNA jsou inkubovány v prostředí roztoku chloridu vápenatého při teplotě 0°C. Poté je roztok zahřát na teplotu 42°C. K roztoku obsahujícím DNA a CaCl₂ se postupně přidává HEPES-fosfátový pufr. Směs se inkubuje při laboratorní teplotě, a poté je vzniklá sraženina dispergována v prostředí buněk. Doba inkubace musí být optimalizována (je zpravidla kratší než 4 hod). [6]

2.5.2 Mikroinjekce

Pomocí mikroinjekce se DNA přenesou přímo do jádra buňky. Tato technika je velmi náročná a zabere mnoho času. Využívá se především při tvorbě transgenních zvířat, kdy je DNA mikroinjekcí vpravena buď do projádra nebo přímo do blastocysty. [5]



Obr. 3: Tvorba transgenních savců [5]

2.5.3 Přenos pomocí liposomů

Na základě hydrofobního efektu se lipidy ve vodném prostředí shlukují k sobě a vytváří duté struktury zvané lipozomy. Díky elektrostatickým interakcím se navzájem přitahují kladně nabití lipidy se záporně nabitou DNA za vzniku agregátů. Částice nesoucí kladný náboj interagují se záporně nabitou buněčnou membránou, která je rovněž hydrofobní, a poté je uskutečněn vstup do hostitelské buňky. Provedení této transfekce je drahé, protože ceny transfekčních lipidů jsou vysoké, a proto se tato transfekce uskutečňuje pouze v menších objemech. [2]

2.5.4 Elektroporace

Elektroporace je reverzní permeabilizace buněk elektrickým polem o vysokém napětí. Elektrotransformace probíhá za nefyziologických podmínek. Připraví se elektrokompetentní buňky a poté se na směs buněk a přenášených molekul aplikuje krátký elektrický puls při nízké teplotě. Následuje regenerace buněk. Optimální podmínky elektrotransformace se nalézají v úzkém rozmezí elektrického napětí a doby trvání pulzu.

Tab. 2: Rozmezí elektrického napětí pro různé typy buněk [6]

G -	7 – 15 kV/cm
G +	až 35 kV/cm
rostlinné, živočišné buňky	1 – 2 kV/cm

Během elektroporace zahyne velký počet buněk. Závisí na biologických faktorech jako je stáří buněk, velikost buněk, koncentrace a způsob regenerace buněk.

Molekulární mechanismus elektrotransformace není znám. Existuje teorie přechodné tvorby hydrofilních pórů, která dobře popisuje děje probíhající při pokusech s buňkami po stránce kvalitativní, ne však kvantitativní. Hlavními nevyřešenými problémy jsou: popis raného stadia tvorby pórů, transport molekul póry a návrat membrány do původního stavu.

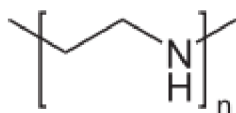
Z doposud známých experimentálních dat lze vyvozovat, že mechanismus přenosu zahrnuje interakci DNA s povrchem buňky, difúze DNA indukovaná elektrickým polem a pasivní difúze. Aplikace elektrického pole není podmínkou přenosu DNA, proces ale urychluje.

2.5.5 Syntetické komplexy DNA-ligand

DNA kondenzuje s polykationtem - poly-L-lysinem. Polykationt se váže jak s DNA, tak s ligandem. Vytvoří se komplex DNA-polykationt-ligand. Ligand je specifický pro povrchový receptor buňky a je zodpovědný za počáteční interakci komplexu s buňkou.

DNA je možné přenést také pomocí polymerního kationtu (DEAE-dextran, PEI), který asociuje se záporně nabitými molekulami DNA. Vzniklý komplex je kladně nabitý a váže se na záporně nabitou lipidovou dvojvrstvu. Následuje přenos komplexu pomocí endocytózy. [6]

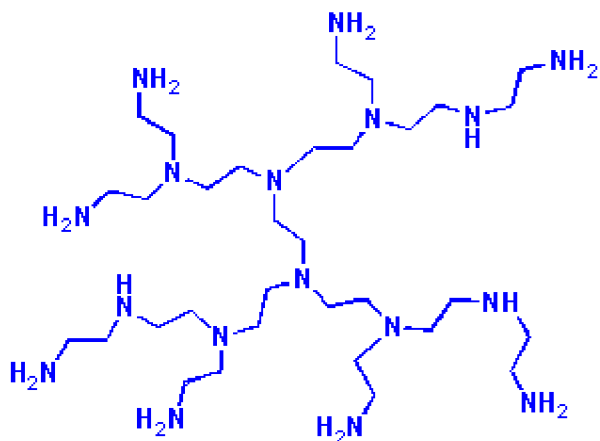
2.5.5.1 Polyethylenimin (PEI)



Obr. 4: Vzorec polyethyleniminu, zdroj internet: <http://commons.wikimedia.org/>

Polyethylenimin je polymerní sloučenina, jejíž základní jednotkou je ethylenimin. PEI se může vyskytovat jako lineární forma, která se nachází při pokojové teplotě v pevném stavu. Druhou formou je rozvětvený polyethylenimin, který je tekutý. Oba typy PEI se používají jako transfekční činidlo s různým stupněm polymerace a různou molekulovou hmotností. V roce 1995 byl PEI poprvé použit pro přenos DNA. [7]

Molekula PEI má pufrovací schopnosti. Rozvětvená forma tvoří primární, sekundární a terciální aminy. Atomy dusíku obsažené v molekule PEI mohou být protonovány, což udílí molekule náboj. Čím více atomů dusíku je v molekule obsaženo, tím je větší náboj. Informace o celkové pufrovací kapacitě je důležitější než určení disociační konstanty pKa molekuly polyethyleniminu. [2] [8]



Obr. 5: Rozvětvený polyethylenimin, zdroj internet: <http://www.hyperpolymers.com/>

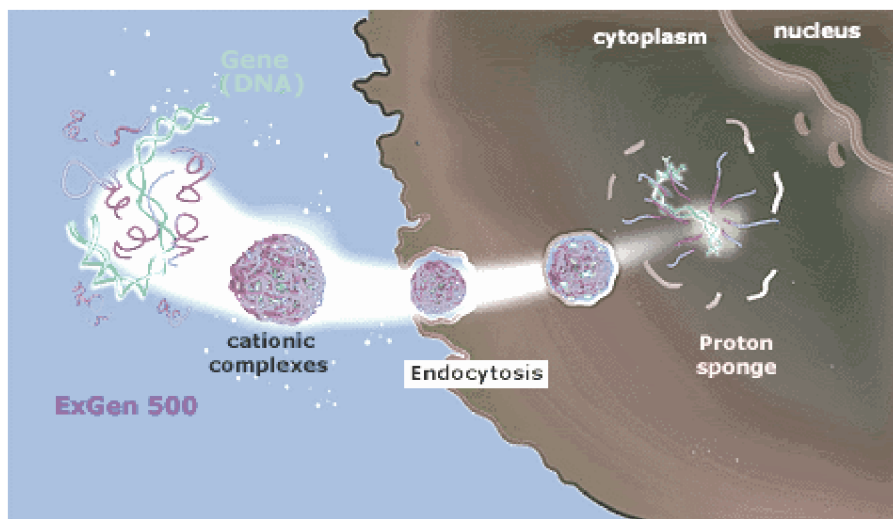
Před samotnou transfekcí se připraví roztoky DNA a PEI o přesné koncentraci a roztoky se smíchají. Poté dojde ke kondenzaci molekul a vzniku komplexu DNA/PEI na základě hydrofobních interakcí. [10] Komplexy DNA/PEI se shluknou k sobě a vzniknou kladně nabitě nanočástice. Nanočástice se poté naváží na buněčné záporně nabitě proteoglykany a glykoproteiny na povrchu buněčné membrány. [11] Dvnitř buněk pronikají pomocí endocytózy. PEI chrání endozóm před působením lysozomálních nukleáz. Uvnitř buňky se uvolní DNA z endozómu díky pufovací schopnosti PEI tím, že absorbuje protony při acidifikaci endozómu – tzv. houbový protonový efekt. [12] To vede k nahromadění kladného náboje, což způsobí influx chloridových aniontů a vody do endozómu. Endozóm nabobtná, uvnitř se zvyšuje osmotický tlak, což vede k prasknutí endozómu. [13]

Této domněnce však odporuje skutečnost, že v komplexu DNA/PEI je asi 85% molekul PEI volných [14], a také pKa PEI je přibližně 8,4 [15], takže po acidifikaci má PEI jen malou pufovací kapacitu. Z těchto důvodů je nepravděpodobné, že osmotické pnutí hraje významnou roli při prasknutí endozómu. [14]

Existuje teorie, že komplex DNA/PEI je transportován pomocí mikrotubulů k jádru, kde se část komplexu rozpadne díky přítomnosti RNA. RNA má vyšší afinitu k PEI než DNA. [10] DNA pak samostatně přechází přes jadernou membránu a poté se v jádře začlení do chromozomu. Mechanismus těchto pochodů není zatím zcela objasněn. [14] [16]

V průběhu transfekce a uvolnění DNA z komplexu záleží na předem zvoleném poměru DNA:PEI.

Pomocí AFM (atomic force microscopy – mikroskopie atomárních sil) byly studovány velikosti komplexu DNA/PEI. Velikost byla stanovena na 20 až 40 nm. Přesné poměrové zastoupení DNA v komplexech DNA/PEI zatím není známo. Transfekce pomocí PEI byly testovány v různých objem. [7] [17] [18]



Obr. 6: Schéma přenosu DNA do jádra buňky, zdroj Internet: <http://www.biomol.de/>

2.6 Hostitelské buňky a organismy

Při výběru hostitelského organismu je potřeba zvážit, zda chceme klonovat geny prokaryotní, nebo eukaryotní. Při expresi eukaryotních genů hostitelská buňka zajistí všechny posttranskripční a posttranslační úpravy. Vzniklý protein je často identický s přirozeně se vyskytujícím a je biologicky aktivní.

2.6.1 Prokaryotní buňky

Nejdetajněji prostudovaný organismus, který se používá pro klonování genů je *Escherichia coli*. Výhodou je vysoká účinnost transformace a fakt, že existuje řada expresních vektorů s regulovatelnými promotory funkčních v *E. coli*. Nevýhodou je, že řada cizorodých proteinů se nevytváří ve funkční podobě.

Jako další hostitelské organismy z řady G - bakterií se využívá *Bacillus sp.* Tyto nepatogenní mikroorganismy produkují množství extracelulárních enzymů, které lze lehce izolovat z média. Snadno se kultivují a adaptují na řadu podmínek kultivace. Lze připravit řadu mutantů hyperprodukcující enzymy i jiné látky.

2.6.2 Kvasníky

Jedná se o jednobuněčné eukaryotní organismy. Řada kvasinkových genů je homologních s geny mnohobuněčných eukaryotních organismů, mají podobnou buněčnou biochemii a regulaci genů. U kvasinek lze stanovit dominanci a recesivitu alel. Mají krátkou generační dobu a vysoký počet jedinců, kultivují se na definovaných půdách a také ve velkokapacitních bioreaktorech. Jsou považovány za bezpečný (GRAS – generally recognised as safe) biotechnologický organismus, což umožňuje přípravu léčiv pro humánní medicínu. Tvoří eukaryotické proteiny v aktivní podobě, lze dosáhnout sekrece do prostředí. K nejčastěji

používaným druhům patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* a *Hansenula polymorpha*. [4] [5]

2.6.3 Rostliny

Výhodou rostlin při genetických manipulacích je totipotence, což znamená, že celou rostlinu můžeme vypěstovat z jakékoliv její části. Mezi další výhody se řadí schopnost regenerace, velký počet semen, krátká generační doba a asexuální křížení. Rostlinné biochemické dráhy poskytují průmyslové suroviny a léčiva. Modelovým organismem pro účely molekulární genetiky je *Arabidopsis thaliana*.

Jednou z možností přenosu cizorodé DNA je přenos pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie přirozeně infikuje rostliny a vnese do nich Ti-plazmidy (tumor indukující plazmidy) obsahující cílové sekvence. [5]

2.6.4 Živočišné buňky

Jsou izolovány z tkání živočichů a poté kultivovány in vitro. Při kultivaci je nutné zajistit podmínky, které se podobají přirozeným, proto se udržují při teplotě 37°C a v modifikované atmosféře (5% CO₂). Veškeré manipulace s buňkami musí být prováděny ve sterilním prostředí. Většina buněk roste přisedlá k pevnému povrchu, jako v původní tkáni. K růstu je nutné použít kultivační médium, které buňkám dodává potřebné živiny a další pro život důležité látky.

K nejčastěji používaným patří CHO (Chinese Hamster ovary) – buňky původně izolované z křeččích vajíček a 3T3 – buňky z myších vajíček.

HEK 293 (humam embryonal kidney) – epiteliální lidské ledvinové buňky a HeLa (Henrietta Lacks) – epiteliální buňky z rakovinných buněk. [2] [19]

2.6.4.1 Buňky 293HEK/EBNA1

Tyto buňky byly poprvé připraveny roku 1970 v laboratoři Alexe van der Eba v holandském Leidenu. Byly získány ze zdravých potrácených lidských plodů a poprvé kultivovány jako primární HEK buňky. Později byly upraveny pomocí pěti adenovirových genů. [20] Zkratka HEK označuje lidské embryonální ledvinové buňky a číslo 293 označuje 293. Grahamův pokus.

Tyto buňky se dobře kultivují a probíhá u nich relativně snadná transfekce, proto se využívají ke tvorbě rekombinantních proteinů. Protože se jedná o lidské buňky, jsou u exprese zajištěny správné posttranskripční a posttranslační modifikace. Jsou tedy vhodné pro klinický výzkum i pro tvorbu lidských terapeutik.

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů

do dceřinných buněk při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22] V dnešní době jsou buňky 293HEK/EBNA nejvíce používané buňky pro velkoobjemovou transienční expresi. [2]

2.7 Reportérové geny

Expresi těchto genů lze snadno detekovat a kvantitativně stanovit. Mohou tudíž sloužit jako měřítko exprese transgenů s různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypch a za různých podmínek.

2.7.1 Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu

Chloramfenikoltransferáza je bakteriální enzym, který nezpůsobuje rezistenci k chloramfenikolu, protože se používá u eukaryotních buněk, které jsou přirozeně rezistentní. Tento enzym acetyluje 14C-chloramfenikol. Po přidání extraktu z rostlin se značený chloramfenikol přeměňuje na značený acetylovaný chloramfenikol, který lze chromatograficky stanovit. Výsledek je možné hodnotit kvantitativně.

2.7.2 Transgen pro β -glukuronidázu

Jedná se o bakteriální enzym *E. coli*, který se označuje jako GUS. Zatím nejúspěšnější transgen používaný při tvorbě transgenních rostlin. Tento enzym mění vhodné substráty na modré produkty nebo fluoreskující látky. Existují dvě metody detekce aktivity.

Fluorescenční metoda, která se provádí v homogenátu se substrátem MUG (4-metyl umbelliferyl glukuronid). Po ozáření rozloženého MUG dlouhovlnným UV 365 nm dává modrou fluorescenci 570 nm.

Druhá metoda je histochemická. Používá se chromogenní substrát X-gluc (glukuronid), který po rozštěpení dává modrou barvu, která je nerozpustná a zůstává v buňkách.

2.7.3 Transgen pro luciferázu

Využívají se cDNA ze světlušky *Photinus pyralis* nebo kódující sekvence G - bakterie *Vibrio harvei*. Po dodání substrátu (luciferin, ATP) k buněčnému extraktu, nebo do kultivačního média dochází k emisi záření měřitelného luminometrem, scintilačním počítačem, nebo CCD kamerou. Nevýhodou je, že substrát je poměrně drahý.

2.7.4 Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)

Jedná se o gen z medúzy *Aequorea victoria*. Protein GFP přeměňuje modré světlo na zelené. Má schopnost emitovat zelené světlo po ozáření modrým světlem (440-480 nm). Je to jediný protein, který má schopnost fluoreskovat bez dodání substrátu nebo kofaktorů. Zachovává si schopnost fluoreskovat, i když je fúzován s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i N-konci. Mutacemi byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou vlnovou délku. [5]

2.7.5 Transgen pro alkalickou fosfatázu

Alkalická fosfatáza (ALP) je hydrolytický enzym optimálně působící při alkalickém pH, vyskytuje se v krvi v mnoha různých formách, které se vytváří v kostech a v játrech, ale i v jiných tkáních, jako např. v ledvinách, placentě, střevech, varlatech, brzlíku, plicích a tumorech. Fyziologické zvýšení ALP se vyskytují i u dětí při růstu kostí, v těhotenství, zatímco patologická zvýšení většinou souvisí s hepatobiliárním procesem a s kostním onemocněním. U hepatobiliárního onemocnění ukazuje na obstrukci žlučovéhoodu, jako např. u cholesterázy vyvolané žlučovými kameny, nádory nebo zánětem. U kostních onemocnění je zvýšená činnost ALP vyvolána zvýšenou osteoblastickou činností, jako např. u Pagetovy nemoci, při měknutí kostí (rachitidě), kostních metastázích a hyperparatyreoidismu.

Za gen zájmu byl zařazen reportérový gen pro alkalickou fosfatázu, což je snadno detekovatelný protein. K buněčné suspenzi se přidává substrát, který je účinkem alkalické fosfatázy změněn na produkt. Tato reakce je provázena barevnou změnou a intenzita zbarvení je změřena fotometricky.

2.8 Transientní (přechodná) transfekce

Transientní transfekce se využívá k produkci rekombinantních proteinů. Výhodou přechodné transfekce je rychlost produkce r-proteinů.

Při přechodné transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. DNA se nepřenáší při mitóze na dceřinné buňky, tudíž je transientní transfekce časově omezená. Výtěžky této transfekce se řádově pohybují v miligramech až gramech.

Pro transientní transfekci do savčích buněk může být jako transfekční činidlo použit fosforečnan vápenatý, [23] nebo polyethylenimin. [24] Transfekce probíhá buď v malých objemech buněčné suspenze (ml), nebo v bioreaktorech, které dosahují objemů o velikosti až stovek litrů. Pátý až desátý den po provedení transfekce dochází k produkci několik miligramů až gramů r-proteinu. [17] [22] [18] [25] [26]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Chemikálie

Tab. 3: Použité chemikálie:

Plasmidové DNA: pCEP4, peBSV, pcDNA3,1, pcDNA 5, pCI, pEAK 8 , přečištěné
Polyethylenimin (PEI), lineární (1 mg/mL)
Fosfátový pufr (PBS)
DMEM/F-12 médium Biovendor
DMEM/F-12 médium Biowest
FCS (telecí sérum)
BV 293s médium
HYclone médium (CDM4 293)
Glukóza (25 %)
L-glutamin (2 mM)
HS (koňské sérum)
DMSO (dimethyl sulfoxid)
Trypsin (EDTA)
PBS pH 7,6 ± 0,2 (NaCl 7,75g; K ₂ HPO ₄ 1,50g; KH ₂ PO ₄ 0,20g v 1 l destilované vodě)
NaCl (150 mM)
Geneticin G418 (100 mg/ml)
Ampicilin (200 mg/ml)
Trypanová modř (0,4 % w/v)
PEI – polyethylenimin (1 mg/ml)
Pluronic (1% w/v)
Kit pro izolaci DNA
Kit pro stanovení alkalické fosfatázy

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Tab. 4: Použité přístroje a pomůcky

Laminární box pro sterilní práci
Centrifuga
Humidifikovaný CO ₂ inkubátor (5% CO ₂ , 37°C)
Orbitální třepačka
Spektrofotometr
Světelný mikroskop
Přístroj pro gelovou elektroforézu
Kultivační láhve T-75 cm ²
Sérologické pipety 1, 2, 5, 10, 25 ml
Mikropipety
Kryovialky na zamrazování
Jednorázové tuby 12–50 ml
Jednorázové zkumavky eppendorf
Sterilní rukavice
Sterilní filtry a dávkovače

3.1.3 Buňky a kultivační média

Pro tento experiment byly použity buňky 293HEK/EBNA1. Jak už bylo uvedeno v teoretické části, jedná se o lidské ledvinové buňky získané z potracených plodů. Do genomu těchto buněk byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transienční transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřiných buněk při buněčném dělení. [22]

Tyto buňky se snadno kultivují. Kultivace probíhá ve dvou fázích. Zpočátku se provádí kultivace v kultivačních lahvích T-75, kdy jsou buňky přisedlé na dně nádoby. Jako médium se používá DMEM/F-12 s 10% přidavkem telecího séra (FCS). Sérum udrží buňky přisedlé na dně nádoby. Jakmile buňky dosáhnou 80–90% konfluency pasážují se, rozsazují se do dalších lahví.

Druhou fází je suspenzní kultivace. Pro tuto kultivaci je používáno BV 293s médium s 1% přidavkem séra, nebo se kultivuje bezsérově. Buňky se uchovávají ve čtyřhranných skleněných lahvích. Důležité je zvolit správný objem, který činí asi 30% z objemu láhve, aby bylo zajištěno optimální množství kyslíku. Láhve se umísťují na orbitální třepačku, aby se buňky neshlukovaly, umístěnou v humidifikovaném inkubátoru. Rychlost rotace se pohybuje kolem 100 – 250 rpm při průměru otáčení 1,2; 2,5 a 5 cm. Po celou dobu kultivace se sleduje počet buněk a jejich nárůst. Odebírají se vzorky a pomocí trypanové modře a Bürknerovi komůrky se buňky spočítají. Jakmile buňky dosáhnou exponenciální fáze růstu, jsou připraveny pro transfekci. Pokud se počet buněk zdvojnásobí za 24 hod, jsou buňky v exponenciální fázi.



Obr. 7: Kultivační média (Lonza), zdroj internet: <http://www.eastport.cz/>

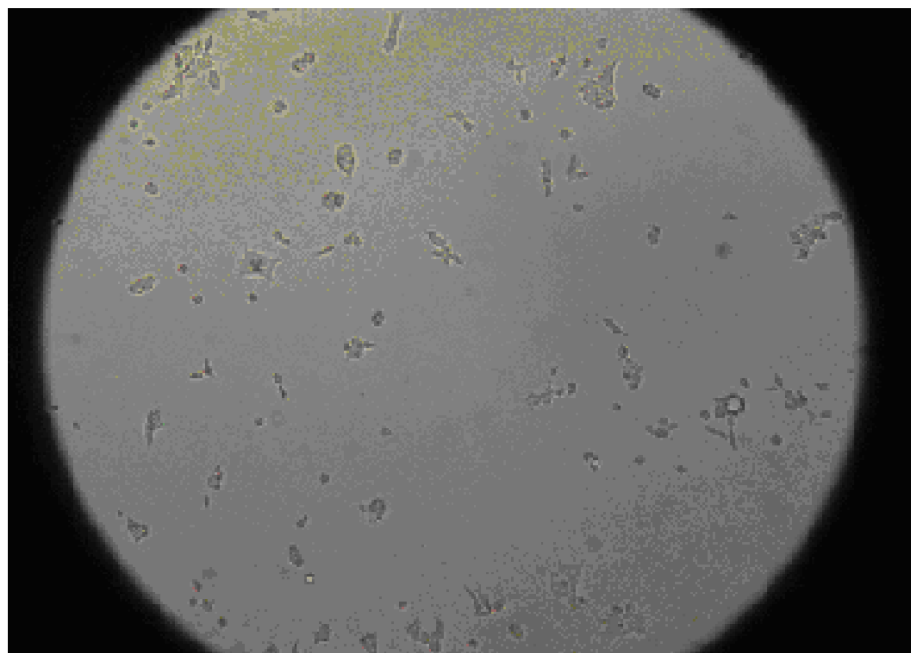
3.1.4 Metody

Rozmražení buněk a kultivace
Pasážování a zamražení buněk
Počítání buněk pomocí trypanové modři
Převedení na suspenzní linii
Izolace a purifikace plasmidové DNA
Metoda transfekce 1 - Muller (2005)
Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)
Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)
Stanovení exprese reportérového genu

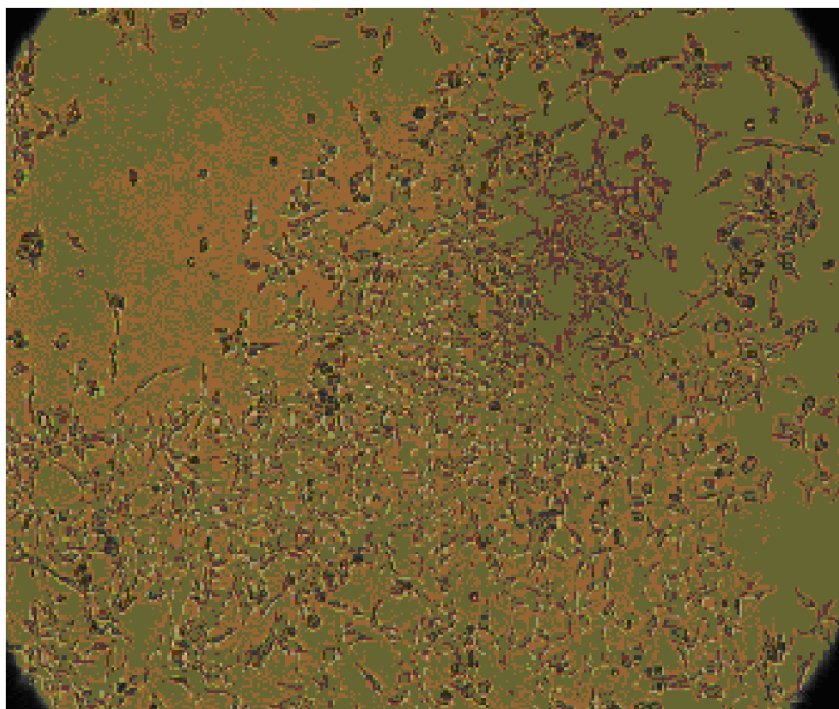
3.1.5 Rozmražení buněk a kultivace

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou dlouhodobě skladovány při nízkých teplotách (-196°C) pod tekutým dusíkem v kryogenním boxu.

Předem bylo připraveno 12 ml kompletního vyhřátého média do T-75 (75 cm²) kultivačních lahví, DMEM/F-12 s přidavkem 10% FCS, aby buňky přisedly ke dnu. Po 2 – 4 hod bylo vyměněno médium za nové kompletní médium, aby se z původního média odstranily zbytky zamrazovacího média dimethyl sulfoxid (DMSO), které je pro buňky toxické. Po 24 hod bylo staré médium odsáto a nahrazeno novým kompletním médiem s přidavkem antibiotika G418 (geneticin). Přidává se 250 µg na 1 ml. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ v humidifikovaném inkubátoru dokud nedosáhly 80-90 % konfluence (normálně 4 – 7 dní).



Obr. 8: Buňky po rozmražení



Obr. 9: Buňky HEK293 EBNA1 3. den po rozmražení

3.1.6 Pasážování a zamražení buněk

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné membrány.

Pro další kultivaci v T-75 lahvích bylo odebráno 0,25 – 1 ml ztrypsinizovaných buněk a přidáno do nové lahve T-75 s 15 – 20 ml kompletního média s antibiotiky.

Zbylá ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a RT. Byl odsát supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v předem na ledu vychlazeném zamrazovacím médiu (9 ml DMEM/F-12 s 10% FCS + 1 ml DMSO). Buněčná suspenze byla rozpipetována do kryovialek, které byly ihned postaveny do ledu. Poté byly kryovialky zabaleny do vrstvy buničiny, obaleny alobalem a přemístěny do mrazáku s teplotou - 80 °C. Po 24 hod byl rozmražen kontrolní vzorek, zda byly buňky správně zamrazeny. Pokud bylo zamražení úspěšné, byly buňky přesunuty do kryogenního boxu.

3.1.7 Počítání buněk pomocí trypanové modři

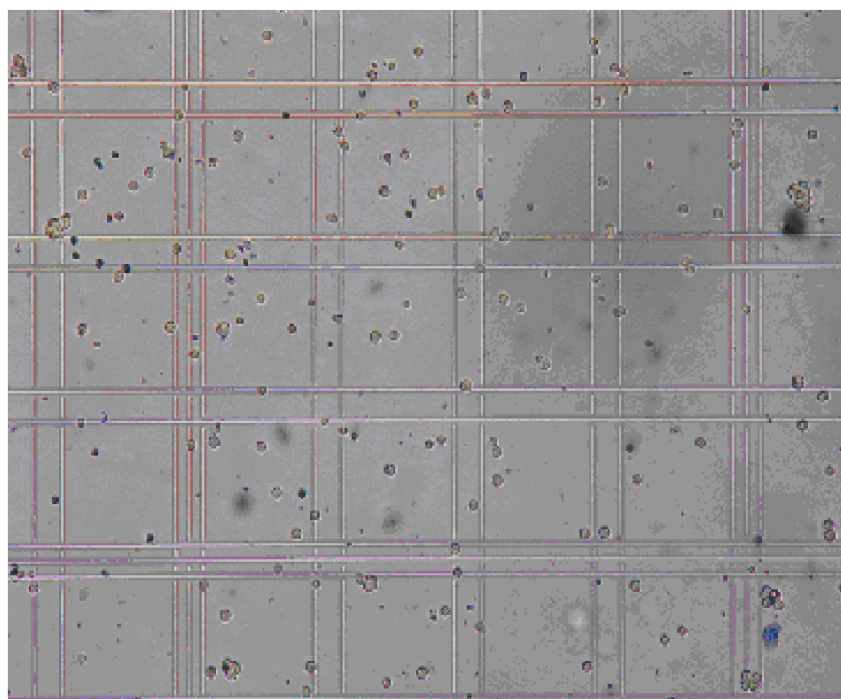
Bylo odebráno 100 μ l z buněčné suspenze. Pomocí vortexu byly rozbity shluky buněk a bylo přidáno 100 μ l 0,4% roztoku trypanové modře. Vše bylo řádně promícháno a suspenze byla inkubována po dobu asi 5 min. Do Bürkerovy komůrky s přikolopeným podložním sklíčkem byl napipetován vzorek a pod mikroskopem byly spočítány živé (žluté) a mrtvé (modré) buňky v 10 čtvercích a na levé a horní hranici čtverce. Počet buněk byl spočítán podle vzorce:

$$X = x \cdot 2 \cdot 2,5$$

X - denzita buněk v 1 ml

x – počet buněk v 10 čtvercích

(2 – vztaženo na ředění buněčné suspenze: trypanové modři = 1:1; 2,5 – vztaženo na rozměr jednoho čtverce)



Obr. 10: Počítání buněk v Bürkerově komůrce (hemocytometr) – žluté (živé) a modré (mrtvé) buňky

3.1.8 Převedení na suspenzní linii

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, který byl předem vyhřát na pokojovou teplotu, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován

pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidavkem 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbily buněčné stěny.

Ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a při pokojové teplotě (RT – room temperature).

Poté byl odsát supernatant a bylo přidáno 20 ml BV 293s s 1% přidavkem HS a buňky byly resuspendovány. Zpočátku byly buňky kultivovány v T-75 kultivačních lahvích v 20 ml média a po dosažení 90% konfluence byly zbaveny média se sérem a resuspendovány v čerstvém médiu bez séra. Poté přesazeny do 250ml čtyřhranných skleněných lahví s 50 ml média. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku o rychlosti míchání cca 100 rpm při průměru rotace 2,5 cm. Byl sledován počet buněk a s růstem počtu buněk bylo postupně navyšováno množství kultivačního média. Konečný objem buněčné suspenze byl 400 ml, kdy buňky byly kultivovány v 11 čtyřhranných skleněných lahví. Denzita buněk se udržovala do 4 miliónů/ml a obsah HS se postupně snižoval až na nulu. Do kultivačního média bylo přidáváno antibiotikum – geneticin, který zajišťil selekci buněk. Přídavek geneticinu do kultivačního média byl 250 µg/ml.

3.1.9 Izolace a purifikace plasmidové DNA

Byly izolovány plasmidové DNA pro pozdější transfekce: pEAK 8, pCEP4, pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1, což je gen kódující epitop Epstein-Barr viru (EB viru), sekvence ori P odpovídající počtu replikací EB viru a reportérový gen pro alkalickou fosfatázu.

Na izolaci byl použit kit Genomed pro izolaci plasmidové DNA.

Na Petriho misku byla zaočkována kultura *Escherichia coli* pomocí křížového roztěru a ponechána v termostatu (37°C). Po narostení kultury byla pomocí předem vyžíhané kličky přenesena jedna kolonie do 10 ml LB média s přidavkem ampicilinu. Suspenze byla inkubována po dobu 24 hod na třepačce (220 rpm, rotační průměr 1,2 cm) při teplotě 37 °C – startovací kultura.

Po 24 hod byla kultura přesazena do 400 ml LB média s přidavkem ampicilinu v poměru 1:1000, tedy 400 µl.

Další den byla změřena optická denzita (OD₆₀₀) suspenze a vypočten objem (V) pro izolaci každého plasmidu.

$$V[ml] = \frac{1200}{OD_{600}}$$

Vypočtený objem suspenze byl centrifugován za podmínek: 4 °C, 8000g po dobu 10 min. Buněčný pelet byl resuspendován 12 ml E1 pufru (složení viz. Přílohy) s přidavkem Rnázy. Poté bylo přidáno 12 ml lyzačního pufru E2 do tuby obsahující buněčnou suspenzi a vše bylo promícháno lehkým otáčením tuby. Po 4 min byla lýze buněk zastavena přidavkem neutralizačního E3 pufru a obsah tuby byly opět promíchán lehkým přetáčením. Tímto byly buňky permeabilizovány a dezintegrovány.

Suspenze byla nanášena na kolonu, která byla předem ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru E4. Po prokápání roztoku kolonou byl na filtr opět nanášen ekvilibrační pufr E4. Přímo

na kolonu bylo nanášeno 25 ml wash pufru E5 pro promytí kolony. Po promytí bylo použito 15 ml elučního pufru E6 a eluát byl jímán do tuby.

Během procesu lze provést tři kontroly na přítomnost DNA v roztoku pod kolonou a to po přidavku neutralizačního pufru E3, nebo po přidavku wash pufru E5, kdy kontroly na přítomnost DNA vychází negativně, nebo po přidavku elučního pufru E6, kdy kontrola vyjde pozitivně.

Poté bylo k eluátu přidáno 10,5 ml isopropanolu. Směs byla pořádně protřepána a centrifugována po dobu 45 min při 4°C a 8000 g. Poté byl slit supernatant a pelet byl převeden do 5 ml 70% ethanolu na přečištění, a dále byl centrifugován po dobu 10 min při RT a 10 000 g. Po centrifugaci byl pomocí pipety odsát ethanol a pelet byl vysušen proudem vzduch do doby, kdy bílá barva peletu byla změněna na sklovitou. Poté byla usazenina rozpuštěna v 200 µl TE pufru.

Vzorek byl zfiltrován pomocí sterilního filtru o velikosti pórů 0,2 µm a naředěn sterilním TE puftrem na koncentraci 500 µg/ml. K filtraci byly použity i sterilní kolonky, kdy byl vzorek nanášen na povrch kolonky a kolonky byla umístěn do odstředivky. Podmínky centrifugace: 1 - 4 min, 12 000 g. Pokud veškerý roztok DNA neprošel přes kolonku, byla centrifugace opakována.

Dále byla u vzorku změřena koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru a vzorek byl nanášen na agarózový gel a byla provedena kontrola čistoty na gelu.

Čistota vzorku by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 – 1,9. Pokud je čistota nižší než 1,8, vzorek je kontaminován proteiny. Pokud je čistota větší než 2, vzorek je kontaminován RNA. V případě kontaminace musí být vzorek purifikován a to opakováním posledních kroků izolace po eluci.

Sterilní vzorek byl uskladněn v lednici, ale pokud se jednalo o dlouhodobé uskladnění (déle než 3 dny) byl umístěn do mrazáku (-80°C).

3.1.10 Plazmidy

Na následujících obrázcích (*Obr. 11-16*) jsou uvedené plazmidy, které byly použity v pokusu – volba plazmidu, metoda Muller (2005).

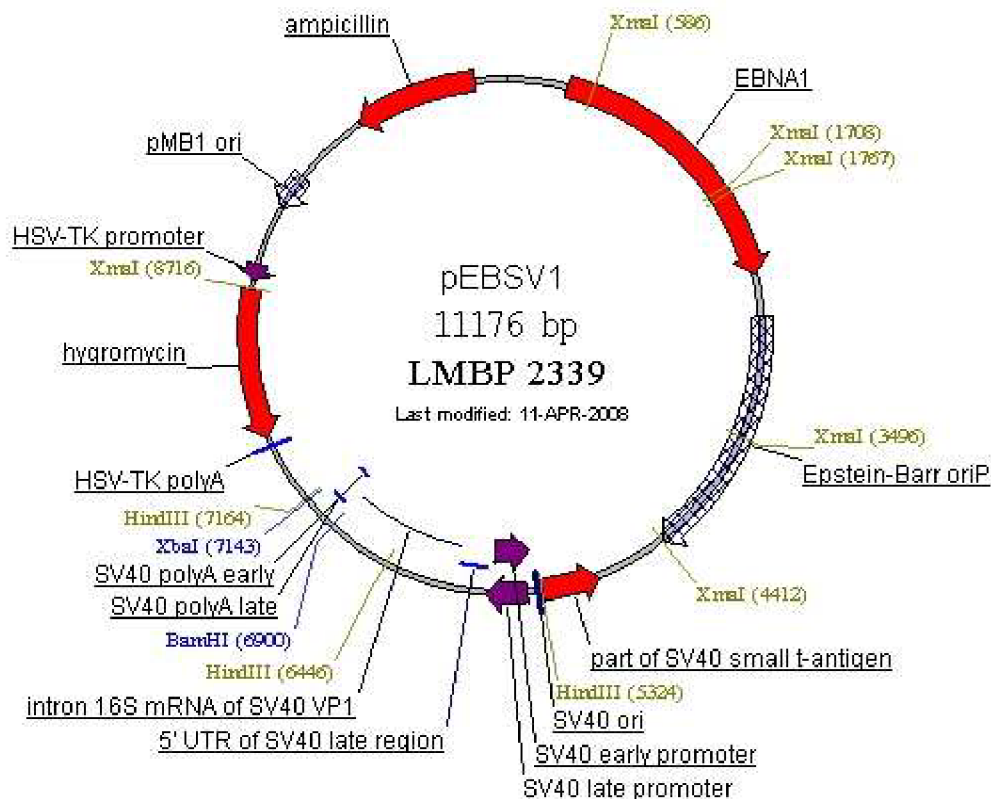
Tyto plazmidy jsou funkční jak v prokaryotních, tak i v eukaryotních buňkách. Jedná se tedy o kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje ori sekvenci a selekční marker funkční (rezistence na ampicilin) v *E. coli*. Dále obsahuje ori sekvenci, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS. Každý vektor obsahuje cílová místa pro restriční endonukleázy (např. Hind III, BamHI).

Jako hostitelské buňky byly zvoleny buňky 293HEK/EBNA1. Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukariotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřiných buněk

při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22]

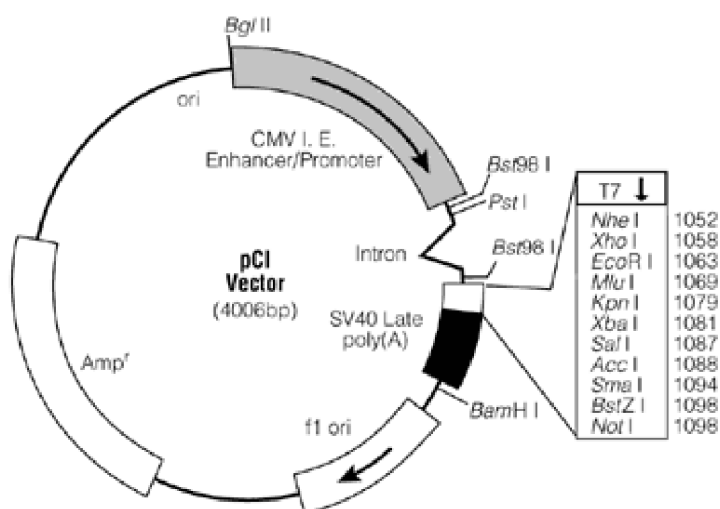
Níže jsou uvedené plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1 a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

3.1.10.1 Plazmid peBSV1/SEAP



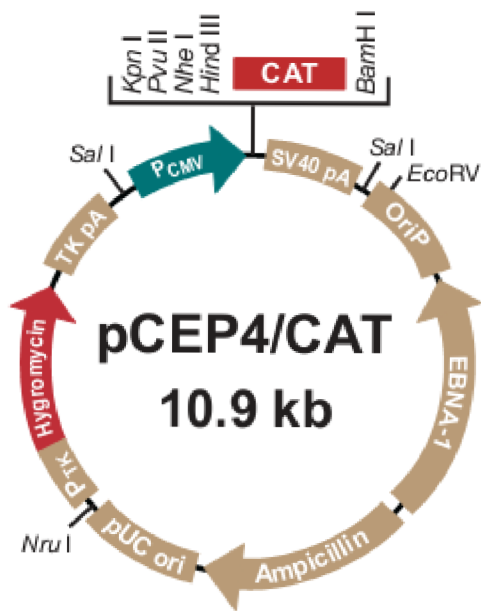
Obr. 11: Mapa plazmidu pEBSV1/SEAP, zdroj internet: <http://bccm.belspo.be/>

3.1.10.2 Plazmid pCI/SEAP



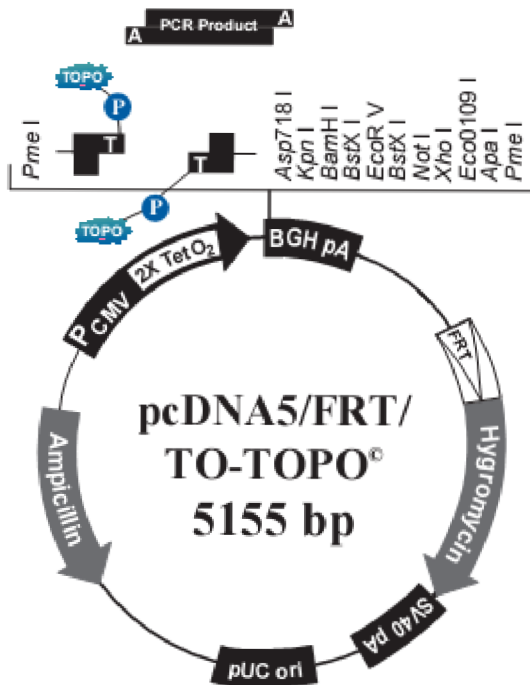
Obr. 12: Mapa plazmidu pCI/SEAP, zdroj internet: <http://www.promega.com/>

3.1.10.3 Plazmid pCEP4/SEAP



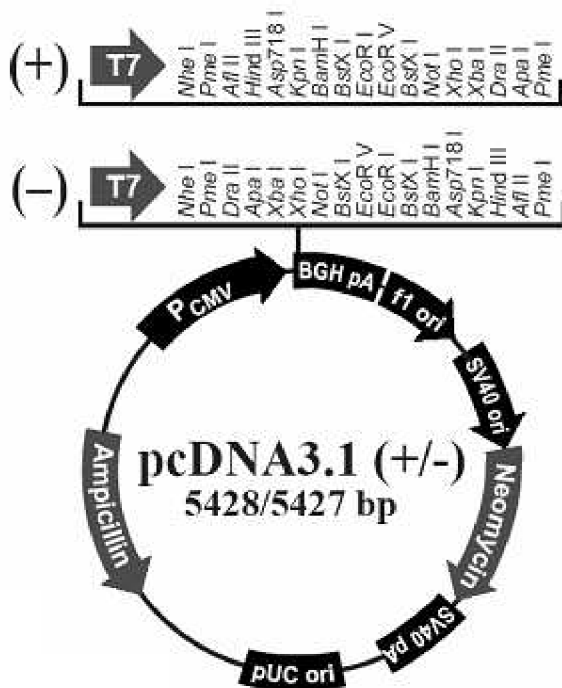
Obr. 13: Mapa plazmidu pCEP4/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.4 Plazmid pcDNA5/FTR/TO-TOPO/SEAP



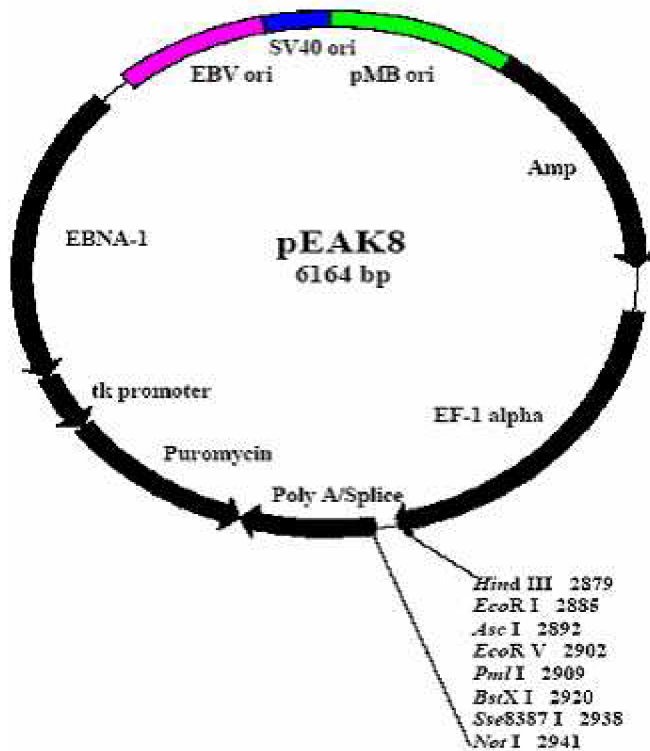
Obr. 14: Mapa plazmidu pcDNA5/FRT/TO-TOPO/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.5 Plazmid pcDNA 3.1/SEAP



Obr. 15: Mapa plazmidu pcDNA 3.1/SEAP [2]

3.1.10.6 Plazmid pEAK8/SEAP



Obr. 16: Mapa plazmidu pEAK8/SEAP [2]

3.1.11 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Jedná se o transfekční metodu při nízké buněčné denzitě s výměnou média před transfekcí. Byla použita buněčná suspenze (400 ml) tvořena buňkami HEK 293/EBNA, které byly kultivovány v BV 293s médiu.

Podmínka: buňky double time (čas zdvojnásobení počtu buněk) = 24 hod

Transfekce byla prováděna ve 100ml čtyřhraných lahvích.

Nejprve byly spočítány buňky, které poté byly centrifugovány (5 min, 500 rpm, RT). Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky byly resuspendovány ve 300 ml nového BV293s média. Suspenze byla rozpipetována do 100ml flašek po 20 ml.

V každé lahvi byly spočítány buňky.

Poté byla připravena transfekční směs v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, kdy finální koncentrace DNA v 20 ml média byla 2,5 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 2 ml : 20 ml

Původní koncentrace roztoku DNA byla 500 µg/ml a PEI 1mg/ml. Roztoky DNA a PEI byly zředěny na dané koncentrace pomocí 150mM roztoku NaCl.

Po smíchání PEI a DNA byla směs promíchána a doba inkubace byla 10 min. Poté bylo přidáno 2 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 160 rpm, rotační průměr 2,5 cm) a buňky byly inkubovány za podmínek 37°C, 5 % CO₂ . Po 4 hodinách bylo do každé láhve přidáno 20 ml předem vyhřátého média BV 293s.

Po transfekci byly každý den odebírány vzorky 100 µl a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.12 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Metoda Durocher je transfekční metoda s nízkou buněčnou denzitou bez výměny média před transfekcí.

Pokus byl proveden v 250ml čtyřhraných lahvích.

Podmínka: buňky double time = 24 hod

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk. Počet se pohyboval kolem 1 miliónů/ml. Z 0,5l zásobní láhve obsahující 200 ml buněčné suspenze bylo odebráno 100 ml a rozpipetováno do 250ml lahví po 22,5 ml a poté bylo do každé láhve přidáno 22,5 ml média (do transfekce v médiu s 1% koňského séra bylo přidáno odpovídné množství séra).

V každé lahvi byl spočítán počet buněk. Denzita buněčné suspenze byla přibližně 0,5 miliónů/ml. Láhve byly umístěny přes noc na třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

V den transfekce byl v každé lahvi spočítán počet buněk a byla připravena transfekční směs. Složení transfekční směsi bylo v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, přičemž finální koncentrace DNA v 50 ml byla 1 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 5 ml : 50 ml.

Po smíchání PEI a DNA byla směs vortexována 5 s a poté byla inkubována 15 min při RT. Po inkubaci bylo přidáno 5 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí a láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

Vzorky byly odebírány 5. a 7. den, min. 100 µl a zamraženy se při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.13 Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)

Jedná se o metodu transfekce s buněčnou suspenzí o vysoké denzitě s výměnou média před transfekcí.

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk a buněčná suspenze byla naředěna na polovinu.

V den transfekce byl opět spočítán počet buněk v zásobní láhvi a poté byla ze zásobní láhve odebrána buněčná suspenze a rozpipetována do 12 falkon po 10 ml. Poté byla buněčná suspenze centrifugována při 100g po dobu 5 min. Po centrifugaci byl odsát supernatant a do každé falkony byl přidán 1 ml čerstvého média: DMEM/F12 - Biowest (s přidaným L-Glutaminem a Glukózou) + 0,1% Pluronic. Před použitím bylo médium s přídavkem Pluronicu zfiltrováno. Z původního objemu 10 ml byl objem snížen na 1 ml, čímž vznikla buněčná suspenze o vysoké hustotě.

V tomto pokuse byly provedeny 3 variant o různých koncentracích DNA (15 µg/ml, 20 µg/ml a 50 µg/ml) a k ním dvojnásobných množství PEI.

K jednomililitrovým buněčným suspenzím byly přidány příslušné množství DNA a poté PEI. Směs byla inkubována po dobu 4 hod při teplotě 37°C na orbitální třepačce (250 rpm, rotační průměr 1,2 cm). Po 4 hodinách bylo do každé falkony přidáno 9 ml média HYclone. U 4. varianty bylo do média HYclone přidáno příslušně množství valproové kyseliny a u 5. varianty butyrátu sodného. Do kontrolních falkon nebyla nepřidána transfekční směs.

Vzorky byly odebírány 5., 7., 11. a 14. den , a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.14 Stanovení exprese reportérového genu

Metoda:

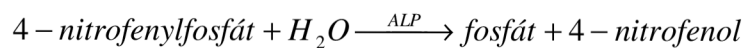
Kinetické fotometrické stanovení v souladu s International federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).

Aktivita SEAP byla zjišťována pomocí kitu pro stanovení alkalické fosfatázy. Reakční směs, substrát pro alkalickou fosfatázu, vznikla smícháním roztoků R1 a R2.

Z odebraného vzorku bylo pipetováno 4 µl do 96ti jamkové desky, a poté bylo přidáno 200 µl reakční směsi. Po minutové inkubaci byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 405 nm v časech 0, 1, 2 a 3 minuty. Data byla shromažďována pomocí programu Gen5 (Biotek).

Koncentrace exprimovaného proteinu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky sestavené na základě měření absorbance roztoků standardů (STD). Byly použity naředěné standardy o koncentraci SEAP: 1,92 mg/l (6000x), 1,44 mg/l (8000x), 1,15 mg/l (10 000x) a 0,96 mg/l (12 000x). [2]

Princip:



Složení a koncentrace roztoků

R1:

2-amino-2-methyl-1-propanol, octan hořečnatý, síran zinečnatý, EDTA

R2:

4-nitrofenylfosfát

Činidla smíchat v poměru 4 : 1 = R1 : R2, směsné činidlo je stabilní 4 týdny při 2 – 8°C nebo 5 dní při 15 – 25°C. Monoreagent chránit před světlem.

Výpočet

$$c_{ALP} = c_{St} \cdot (\Delta A_s / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) / (\Delta A_{st} / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) \quad [\mu\text{kat} / l]$$

c_{st}katalytická koncentrace standardu uvedená v atestu [$\mu\text{kat}/l$]

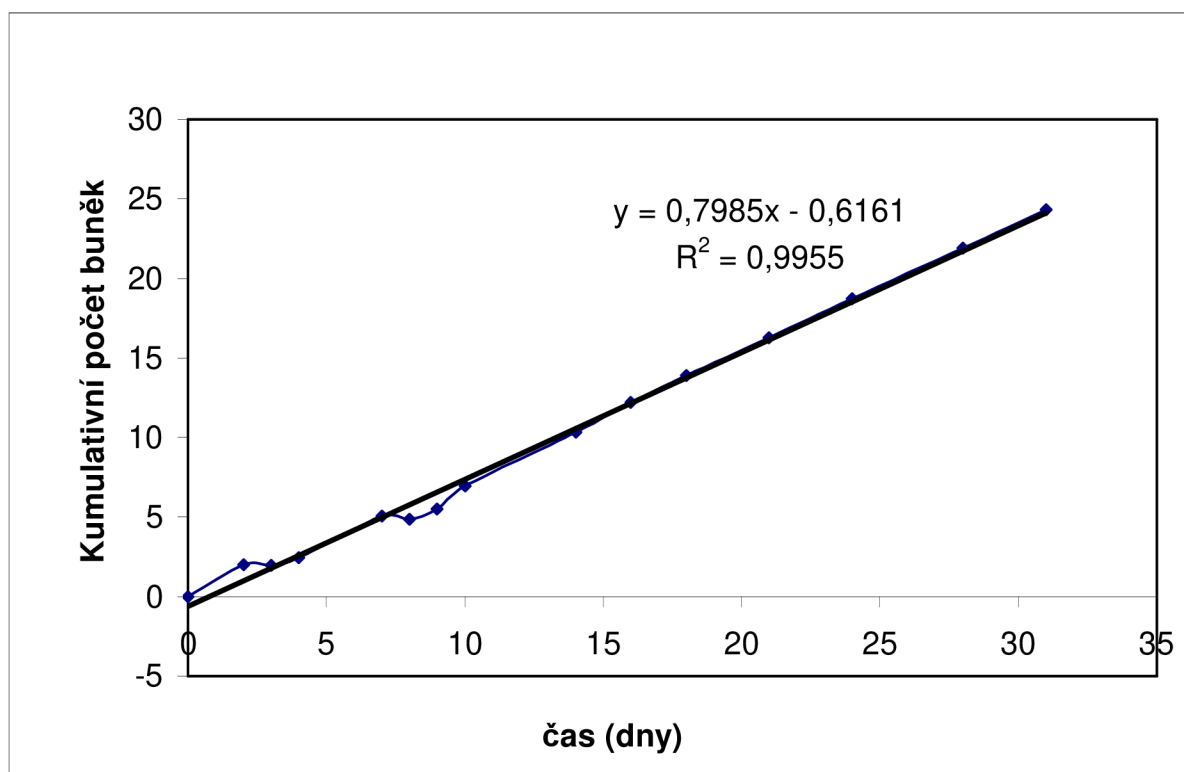
A_sabsorbance vzorku

A_{st}absorbance standardu

A_{bl}absorbance blanku

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

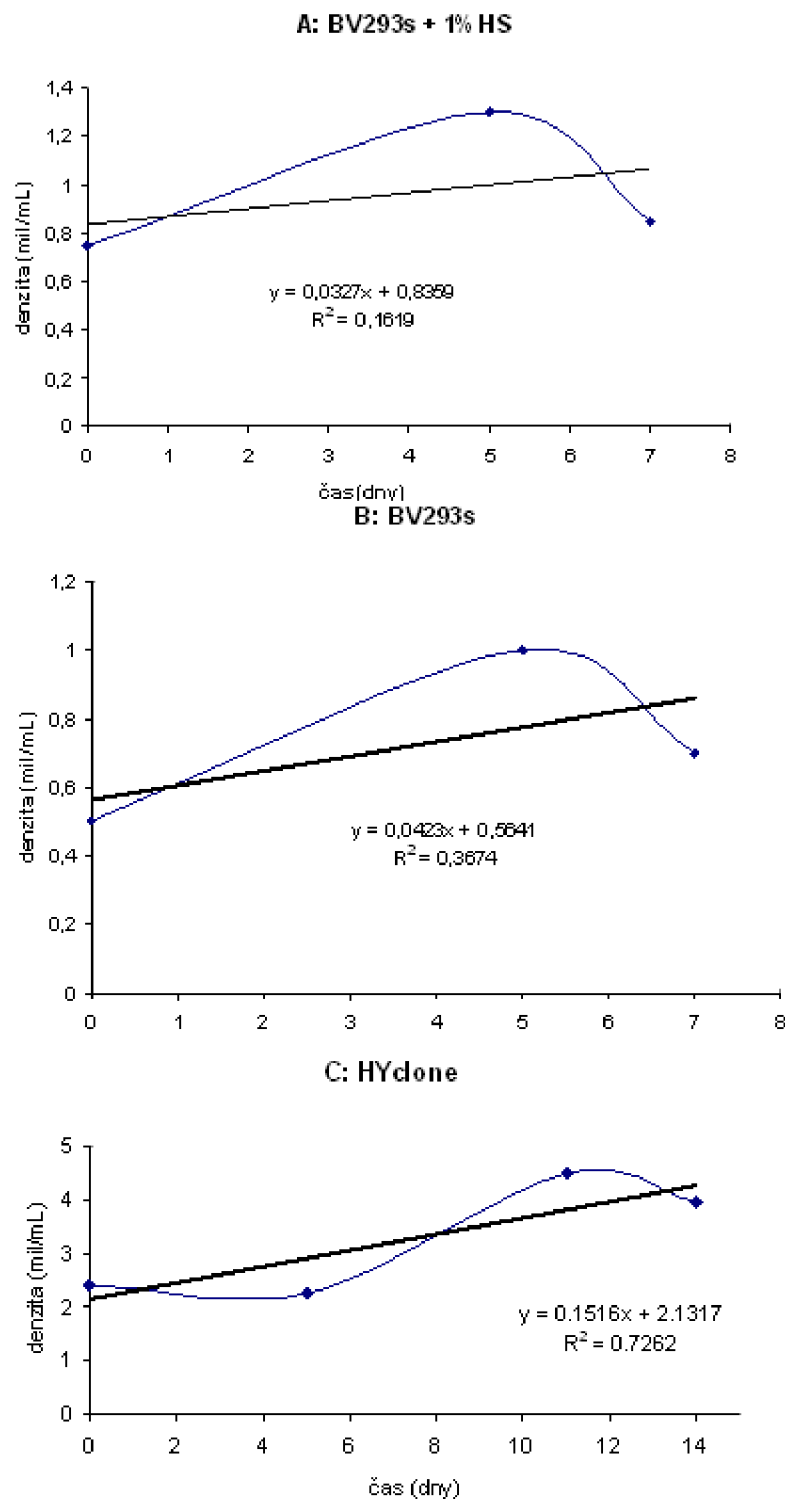
4.1 Růst zásobní buněčné kultury



Obr. 17: Kumulativní počet buněk HEK293/EBNA na 1 ml v závislosti na čase – Graf ukazuje kumulativní počet buněk ve sledovaném období. Byla sledována denzita buněčné suspenze v daných časových intervalech. Buňky byly počítány pomocí hemocytometru a byl sledován nárůst počtu buněk.

Po dobu experimentu byla udržována buněčná kultura, která sloužila jako zdroj buněk pro experimenty. Tato kultura byla kultivována za stejných podmínek jako posttransfekční kultury (médiu BV 293s, inkubována třepačka, 37°C). Růst buněk byl sledován, aby se zjistilo, zda buňky dosáhly exponenciální růstové fáze. Pokud se počet buněk za den zdvojnásobí dosáhly buňky exponenciální fáze a jsou připraveny na transfekci.

4.2 Růst buněk po transfekci



Obr. 18: Růstové křivky buněk HEK293/EBNA - Na obrázku jsou znázorněny růstové křivky buněk HEK 293/EBNA po transfekci pomocí PEI v různých médiích: A: BV 293s, B: BV 293s s 1% přidavkem koňského séra a C: Hyclone médium. Grafy A a B jsou velmi podobné, což svědčí o tom, že přítomnost HS neovlivňuje růst buněk po transfekci. Pátý den po transfekci u buněk kultivovaných v BV 293s médiu (popř. s 1% přidavkem HS) buňky dosáhly maximální

denzity, a poté se buněčná denzita začala snižovat z důvodů úmrtí buněk. V Hyclone médiu bylo maximálního počtu buněk dosaženo jedenáctý den po transfekci. V médiu Hyclone buňky rostly delší dobu a do vyšších hustot buněčných suspenzí.

4.3 Volba plazmidu pro transientní expresi

Nejdříve bylo potřeba ověřit volbu vektoru vhodného pro stanovení intenzity exprese a účinnosti transfekce. Pro transfekci byly použity vektory uvedené v tabulce č. 3. Měření bylo prováděno po dnech. U každého dne je uvedena kalibrační křivka SEAP standardů a tabulka s naměřenými koncentracemi (viz. Přílohy). Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy.

Pro transfekci byly použity plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen EBNA1, usnadňující expresi genu zájmu, a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů ve dvou sadách) + 2 kontrolní láhve.

Tab. 5: Použité plazmidy

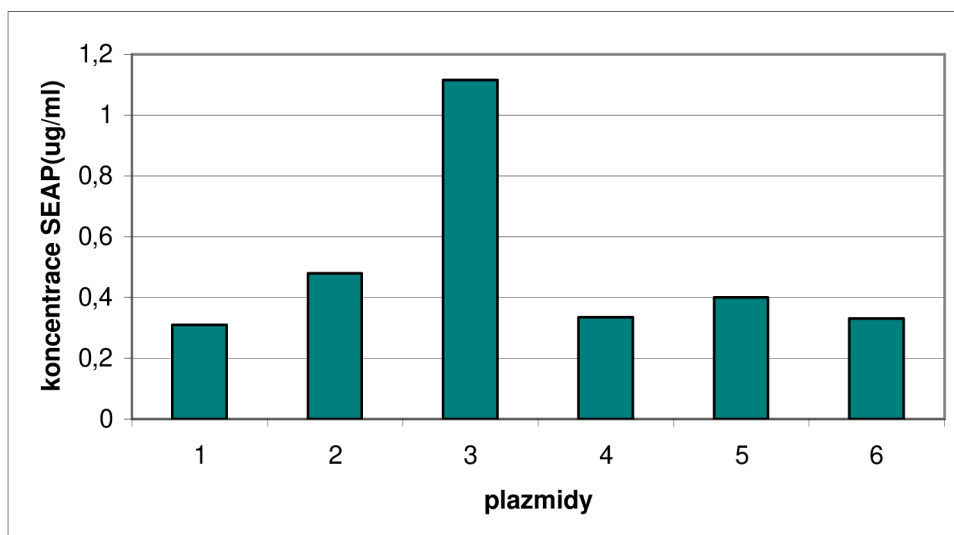
číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	pEAK8	4	pCI
2	pcDNA 5	5	pcDNA 3.1
3	pCEP4	6	peBSV

První den po transfekci nebyla detekována exprese SEAP. Hodnoty exprese SEAP byly na úrovni pozadí měření. Třetí den po transfekci se naměřené hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků, kde byl použit plazmid pCEP4 zdvojnásobily proti pozadí. Dále se hodnoty exprese zvýšily u vzorků s použitými plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Hodnoty exprese SEAP vzorků s použitými plazmidy pEAK 8, pCI a peBSV i nadále zůstaly na úrovni pozadí.

Nejvyšší hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků byly naměřeny pátý den po transfekci, kdy hodnoty u vzorku obsahující pCEP4 byly až trojnásobné proti hodnotám koncentrace SEAP v jiných vzorcích. Šestý a sedmý den po transfekci se hodnoty koncentrace začaly snižovat, což bylo způsobeno nejspíše úmrtím buněk a rozpadem SEAP.

Jako nejúčinnější se ukázal plazmid pCEP4. Další vhodné plazmidy pro transientní transfekci byly zvoleny plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Plazmidy peBSV, pEAK 8 a pCI se v daném pokusu nejevily jako vhodné plazmidy pro transfekci v buňkách HEK293/EBNA.

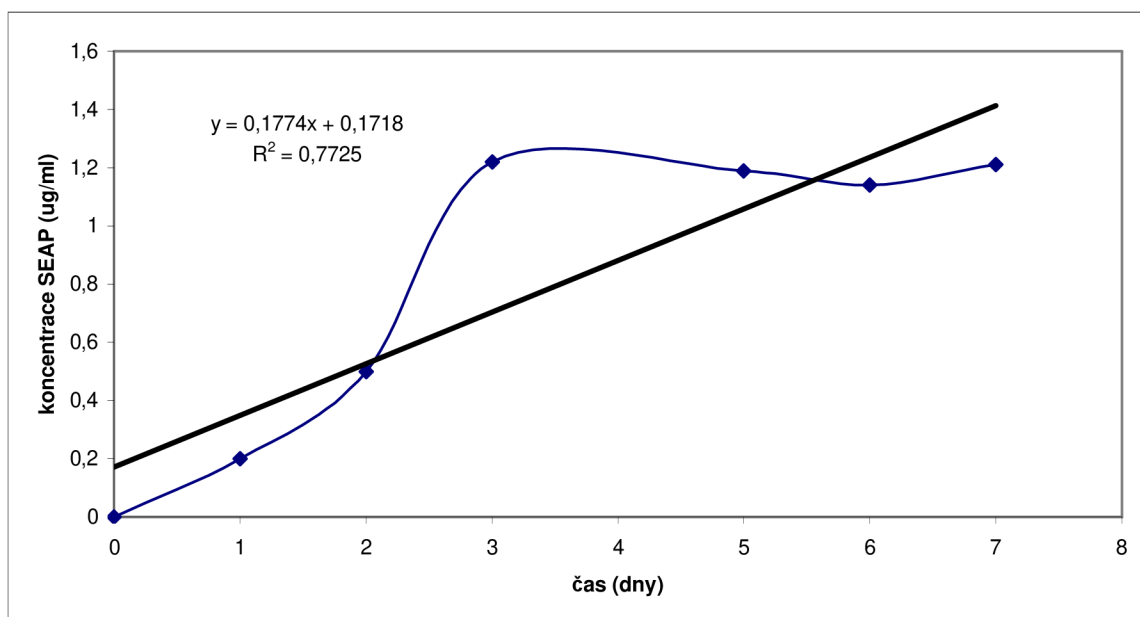
Plazmid pCEP4/SEAP byl vyhodnocen jako nejúčinnější plazmid pro transientní transfekci do buněk HEK293/EBNA i dříve. [2]



Obr. 19: Koncentrace SEAP 3. den po transfekci - obrázek znázorňuje koncentraci SEAP v jednotlivých vzorcích odebraných 3. den po provedení transfekce. Vzorek 1 (pEAK 8), vzorek 2 (pcDNA 5), vzorek 3 (pCEP4), vzorek 4 (pCI), vzorek 5 (pcDNA 3.1) a vzorek 6 (peBSV). Z obrázku je patrné, že nejvyšší koncentrace SEAP byla přítomna ve vzorku 3 (pCEP4). Proti pozadí byla zvýšená exprese i ve vzorcích 2 (pcDNA5) a 5 (pcDNA3.1). Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.3.1 Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce

Vedlejším produktem pokusu, při kterém byl určován nejúčinnější vektor pro transfekci je křivka průběhu exprese SEAP v závislosti na čase uplynulém od transfekce. Nejvyšší exprese bylo dosaženo sedmý den po transfekci.



Obr. 20: Závislost koncentrace SEAP na čase – graf znázorňuje nárůst exprese SEAP po transfekci u plazmidu pCEP4. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP bylo dosaženo 3 den

po transfekci. Koncentrace SEAP poté zůstala stejná až do posledního měřeného dne (7. den).

4.4 Srovnání metod transienční transfekce

Byla provedena série pokusů s cílem najít nejvhodnější metodu pro transienční transfekci pomocí PEI. Srovnávány byly metody podle Muller (2005), Durochera (2007) a Backliwala (2008). Metody jsou podrobněji popsány výše. Pro všechny pokusy ($n = 4$) byl jako reportérový plazmid použit pCEP4/SEAP.

4.4.1 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů po dvou sadách) + 2 kontrolní lahve. Nejvyšší naměřená koncentrace SEAPu vzorků byla naměřena 7. den po transfekci. Hodnoty jsou nižší než hodnoty naměřené dříve [2], což může být způsobeno úmrtím buněk.

4.4.2 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Pokus byl proveden v osmi 250ml čtyřhraných lahvích: 2 láhve na transfekci bezsérovou a 2 láhve na transfekci v médiu (293BVs) s 1% koňského séra + 4 kontrolní lahve. Pokus byl prováděn se suspenzí o nízké buněčné denzitě (0,5 milónů/ml), což mohlo být příčinou neúspěchu. Naměřené hodnoty absorbance se téměř shodovaly s hodnotami absorbance blanku (slepého vzorku). Metoda Durocher byla vyhodnocena jako neúčinná.

4.4.3 Metoda Backliwal (2008)

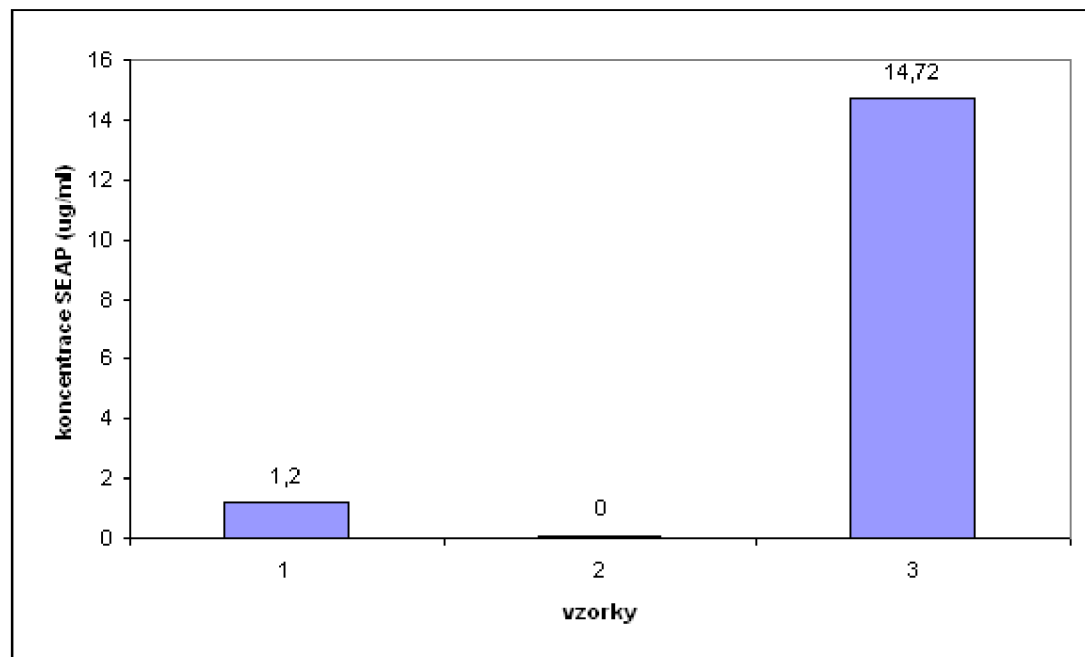
Byly použity buňky 293HEK/EBNA kultivované v médiu HYclone o denzitě 2,4 milónů/ml. Buněčná suspenze byla rozpipetována do falkon po 10 ml, odstředěna a poté bylo odsáto médium a nahrazeno 1 ml DMEM/F12 (Biowest) médiem doplněným o 0,1% Pluronic (Invitrogen). Denzita buněčné suspenze při transfekci byla 24×10^6 /ml. Transfekce byla úspěšná. Nejvyšší detekovaná exprese SEAP byla 14,7 $\mu\text{g/ml}$ při transfekci 20 $\mu\text{g/ml}$ DNA odebraném čtrnáctý den po transfekci. Hladina exprese může dosáhnout až 22 mg/ml pro rekombinantní protilátky u vzorku s koncentrací DNA při transfekci 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA. [27]

Tab. 6: Transfekční podmínky u jednotlivých metod

metoda	koncentrace DNA (µg/ml)	poměr DNA:PEI	transfekční médium	kultivační médium	poměr transfekční směs:médiu
Muller	2,5	1:5	BV 293s	BV 293s	1:10
Durocher	1	1:5	BV 293s (příp. + 1% HS)	BV 293s (příp. + 1% HS)	1:10
Backliwal	15	1:2	DMEM/F12 (Biowest) + 0,1% Pluronic	Hyclone + 3mM butyrát sodný + 4 mM kyselina valproová	-
	20				
	50				
	50				
	50				

Tab. 7: Míchání transfekčních směsí na jednu láhev

metoda	původní koncentrace DNA (µg/ml)	DNA (µl)	1 mg/ml PEI (µl)	ředění pomocí
Muller	500	100	500	150 mM NaCl
Durocher	5	25	1000	PBS
Backliwal	289,4	103,6	60	-
	830	120,4	200	
	289,4	138,2	80	



Obr. 21: Vliv metody transfekce na hladinu exprese SEAP (za použití plazmidu pCEP4) - vzorek 1: metoda Muller, vzorek 2: metoda Durocher, vzorek 3: metoda Backliwal. Nejvyšší hodnoty exprese SEAP bylo dosaženo za použití metody Backliwal. Asi desetinu výtěžku exprimovaného proteinu tvoří výtěžek získaný pomocí metody Muller. Na nulové hodnotě jsou hodnoty exprese SEAP u metody Durocher.

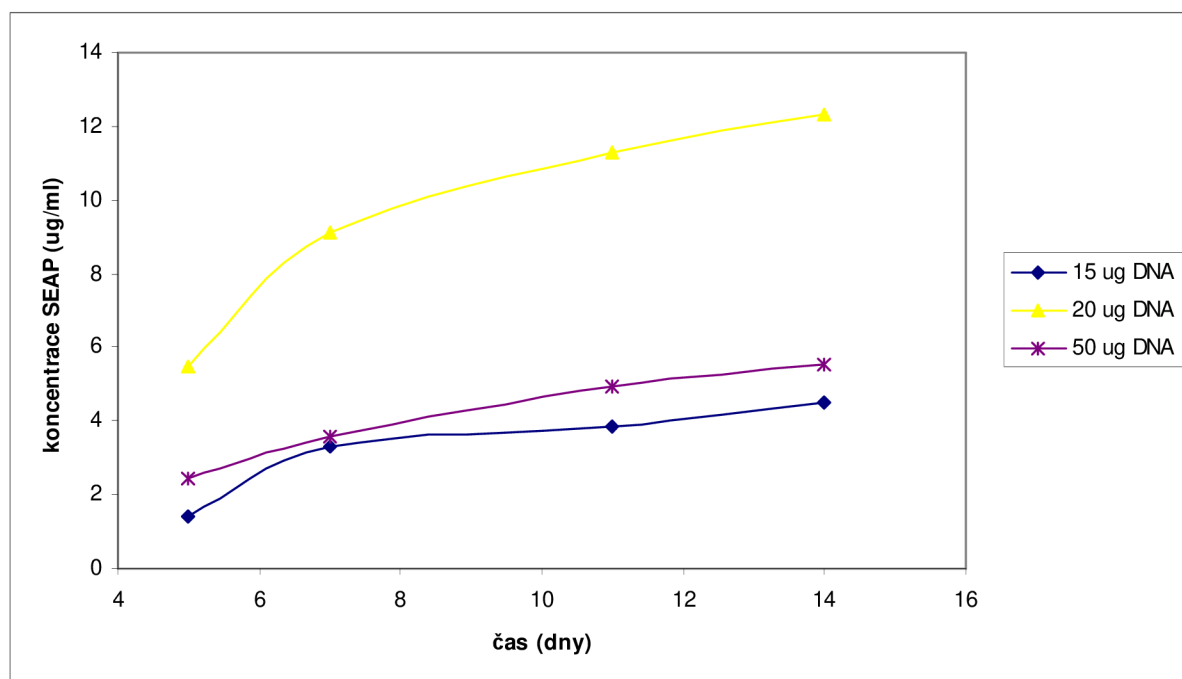
Na základě výsledků měření byl jako nejlepší metoda vyhodnocena metoda Backliwal (2008), kdy koncentrace SEAP dosahovaly několikanásobně vyšších hodnot než byly hodnoty koncentrace SEAP u vzorků metody Muller (2005). Úspěšnost transfekce u metody Backliwal byla zajištěna nejspíše vysokohustotní buněčnou suspenzí a také vyššími přídávky DNA a PEI.

Metoda Durocher byla vyhodnocena jako nejméně účinná. Důvodem může být používání buněčných suspenzí o nižší hustotě buněk a nízkými koncentracemi DNA přidávanými k buňkám. Také postup provedení transfekce se zcela odlišuje od předešlých dvou metod. Metoda Duroscher přidává transfekční směs do finálního objemu buněčné suspenze s médiem narozdíl od metod Muller a Backliwal, kdy je transfekce prováděna v menším objemu a následně je zastavena přídávkem média. U metody Muller byly detekovány hodnoty exprese SEAP, ale o velmi nízkých koncentracích.

Velký vliv má také kultivační médium, ve kterém jsou pěstovány buňky. V médiu HYclone buňky dosahovaly vyšší denzity a životnost buněk byla delší než v médiu BV 293s.

4.4.3.1 Vliv koncentrace DNA na účinnost transfekce

Pomocí metody Backliwal (2008) bylo ověřováno množství DNA vhodné pro transienční transfekci. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 μg DNA/ml transfekční směsi. To je méně než uvádí Backliwal et al. (2008), který zjistil nejvyšší účinnost při 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. [27]



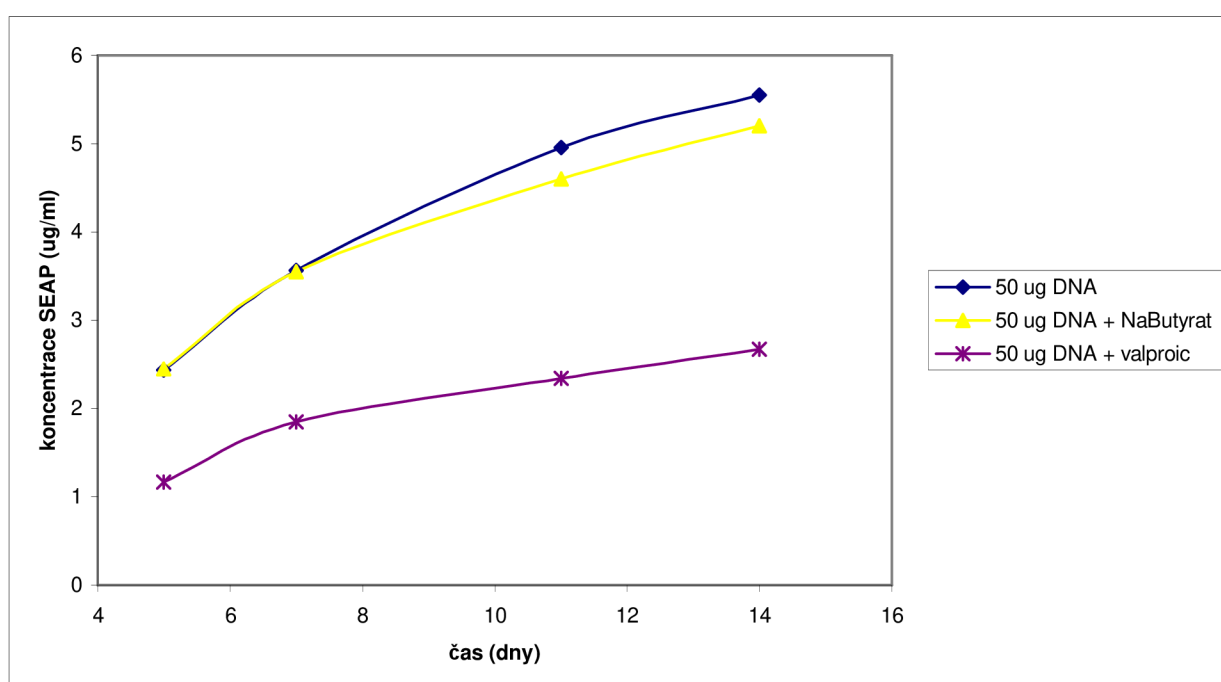
Obr. 22: Závislost koncentrace SEAP na koncentraci DNA při transfekci - graf ukazuje koncentrace SEAP u jednotlivých vzorků. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP byly naměřeny po transfekci 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.4.3.2 Vliv inhibitorů histon deacetyláz na hladinu exprese po transfekci

Pomocí metody Backliwal (2008) byl zjišťován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. [28]

Koncentrace SEAP u vzorku s přidavkem butyrátu sodného (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci) se výrazně nelišily od hodnot koncentrací vzorku kontrolního. Hodnoty koncentrace SEAP s přidavkem valproové kyseliny v médiu byly poloviční než hodnoty vzorku bez přidavku (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci).

I když počet buněk ve vzorcích obsahujících přidavek butyrátu sodného byl nízký, přesto hodnoty exprese SEAP byly srovnatelné s hodnotami SEAP u vzorků bez přidavku, kde byl počet buněk vyšší. To znamená, že přidavek butyrátu sodného zvýšil hladinu exprese, ale snížil viabilitu buněk.



Obr. 23: Závislost koncentrace SEAP na přítomnosti inhibitorů histon deacetyláz - graf ukazuje koncentrace SEAP u vzorků obsahujících 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA: bez přidavku, s přidavkem butyrátu sodného do média a s přidavkem kyseliny valproové do média. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci zabývající se problematikou transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminu byla hledána optimální metoda transientní transfekce.

V první části bylo testováno šest plazmidů a cílem bylo nalézt plazmid, za jehož použití se dosáhne nejvyšších hodnot exprese SEAP. Nejúčinnějším plazmidem byl zvolen pCEP4/SEAP, který byl poté použit v následujících experimentech.

Byly testovány tři metody: Muller (2005), Durocher (2007) a Backliwal (2008). Jako nejúčinnější metoda byla zvolena metoda Backliwal (2008), která dává použitelné výsledky pro zavedení této metody do praxe.

Byl sledován vliv koncentrace DNA (15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) použité pro transfekci s vysokohustotní buněčnou suspenzí. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 $\mu\text{g DNA/ml}$ transfekční směsi.

Dále byl sledován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitorů v kultivačním médiu zvyšuje hladinu exprese, ale snižuje viabilitu buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. *Molecular Biotechnology: principles on application of recombinant DNA*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. ISBN 1-55581-269-4. 760 p.
- [2] ŠMÍD, J. Vývoj protokolu pro transientní transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009 57s.
- [3] COHNE, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*. 1973, 70: 3240-3244
- [4] ŠPANOVÁ, A. *Přednášky z molekulární biotechnologie 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [5] DOŠKAŘ, J. *Přednášky z molekulární genetiky II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [6] RITTICH, B. *Přednášky z bioinženýrství II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [7] BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1995, 92(16):7297-301.
- [8] GODBEY, W. T., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res*. 2000, 51(3):321-8.
- [9] GODBEY, W. T., BARRY, M. A., SAGGAU, P., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 1999a, 60(2-3): 149-60.
- [10] BERTSCHINGER, M., BACKLIWAL, G., SCHERTENLEIB, A., JORDAN, M., HACKE, D. L. R., WURM, F. M. Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: Implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery. *Journal of Controlled Release* 2006, 116 (2006): 96-104
- [11] LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 60 (2005): 247-266.
- [12] BEHR, J. P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospect for gene therapy. *Bioconjugate Chem*. 1994, 5 (1994) 382-389.

- [13] LINDELL, J., GIRARD, P., MULLER, N., JORDAN, M., WURM, F. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1676(2): 155-61.
- [14] CLAMME, J.-P., KRISHNAMOORTHY, G., ME'LY, Y. Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1617 (2003): 52-61.
- [15] VON HARPE, A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*. 2000, 69 (2): 309-22.
- [16] IIDA, T., MORI, T., KATAYAMA, Y, NIIDOME, T. Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex. *Journal of Controlled Release*. 2007, 118 (2007): 364-369.
- [17] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(2):e9
- [18] DEROUAZI, M., GIRARD, P., VAN TILBORGH, F., IGLESIAS, K., MULLER, N., BERTSCHINGER, M., WURM, F. M. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004, 87(4):537-45
- [19] MULLER, N. Transient gene expression for rapid protein production: Studies and optimization under serum-free conditions. PH.D. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005. 120 p.
- [20] GRAHAM, F. L., SMILLEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRU, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 1977, 36, 59-72.
- [21] AIYAR, A., ARAS, S., WASHINGTON, A., SINGH, G. AND LUFTIG, R. B. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of *oriP*-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology Journal*. 2009, 6:29
- [22] GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M. 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002, 38 (1-2): 15-21.

- [23] JORDAN, M., SCHALLHORN, A., WURM, F. M., Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24 (4): 596-601.
- [24] ERHARDT, C., SCHMOLKE, M., MATZKE, A., KNOBLAUCH, A., WILL, C., WIXLER, V., LUDWIG, S., Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction.* 2006, 6, 179-184
- [25] PHAM, P. L., PERRET, S., DOAN, H. C., CASS, B., ST-LAURENT, G., KAMEN, A., DUROCHER, Y. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol Bioeng.* 2003, 84(3): 332-42.
- [26] BLDI, L., MULLER, N., PICASSO, S., JACQUET, R., GIRARD, P., THANH, H. P., DEROW, E., WURM, F. M. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress.* 2005, 21(1): 148-153.
- [27] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., HASIJA, F., WURM, F. M., High-density transfection with HEK-293 cell allows doubling of transient titers and removes need for a prior DNA complex formation with PEI *Biotech. and Bioeng.* 2008, 99: 721-727.
- [28] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., KUETTEL, I., DELEGRANGE, F., HACKER, D. L., WURM, F. M., Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures *Biotech. and Bioeng.* 2008, 101: 182-189.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

r-protein	rekombinantní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	cyklická deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEK buňky	lidské embryonální ledvinové buňky
EBNA	jaderný antigen Epstein-Barr viru
EB-vir	Epstein-Barr vir
MCS	mnohočetné klonovací místo
ATP	adenosintrifosfát
DEAE	diethylaminoethyl
PEI	polyethylenimin
MCS	mnohočetné klonovací místo (multiple cloning sit)
AFM	mikroskopie atomárních sil (atomis force microscopy)
G -	Gram-negativní
G +	Gram-pozitivní
CHO	vajíčka křečka čínského
3T3	vajíčka myši švýcarské
HHV-4	herpesvirus 4
Gus	β -glukuronidáza
MUG	4-metyl umbelliferyl glukuronid
GFP	zeleně fluorekující protein
ALP	alkalická fosfatáza
HS	koňské sérum
FCS	telecí sérum
DMSO	dimethyl sulfoxid
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
STD	standard
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (Internationa federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

8 SEZNAM PŘÍLOH

Složení médií a pufrů

Metoda transfekce 1 - Muller (2005): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP, grafy srovnání koncentrací SEAP, růstové křivky

Metoda transfekce 2 - Durocher (2007): růstové křivky

Metoda transfekce 3 – Backliwal (2008): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP
růstové křivky

9 PŘÍLOHY

9.1 Složení médií a pufrů

9.1.1 LB médium

LB médium bylo použito pro kultivaci buněk kmene *Escherichia coli*. Z těchto buněk byla následně izolována plazmidová DNA.

Tab. 8: Složení LB média [2]

Složka	koncentrace (g/l)
trypton	10
kvasničný extrakt	5
NaCl	10

9.1.2 Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA

Tab. 9: Složení kitu Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA [2]

<u>Roztok E1</u> – resuspendační, uchováván při pokojové teplotě 50 mM Tris 10 mM EDTA přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 8 K roztoku je nutné přidat 100 µg/ml RNázy A, která je uchovávána při teplotě 4 °C
<u>Roztok E2</u> – lyzační, uchováván při pokojové teplotě 200 mM NaOH 1,0 % SDS (w/v)
<u>Roztok E3</u> – neutralizační, uchováván při pokojové teplotě 3,1 M octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,5
<u>Roztok E4</u> – ekvilibrační, uchováván při pokojové teplotě 600 mM NaCl 100 mM octan sodný 0,15 % TritonX- 100 přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E5</u> – promývací, uchováván při pokojové teplotě 800 mM NaCl 100 mM octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E6</u> – eluční, uchováván při pokojové teplotě 1250 mM NaCl 100 mM Tris přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 5,5

9.1.3 DMEM/F-12 médium

Toto médium bylo použito pro kultivaci přisedlých 293HEK/EBNA buněk.

Tab. 10: Složení DMEM/F-12 média [2]

Složka	koncentrace (mg/ml)
CaCl ₂ (anhydrid)	116,00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,42
KCl	311,83
MgCl ₂ · 6H ₂ O	61,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100,00
NaCl	6,9995
NaHCO ₃	1,20
Na ₂ H ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	134,00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	62,50
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,43
Glucose	3,1510
HEPES	3,5745
Hypoxanthine	2,04
Linoleic Acid	0,04
Lipoic Acid	0,10
Phenol Red · Na	8,00
Putrescine · 2HCl	0,08
Sodium Pyruvate	110,00
Thymidine	0,36
L-Alanine	4,46
L-Arginine · HCl	147,35
L-Asparagine · H ₂ O	7,50
L-Aspartic Acid	6,66
L-Cysteine · HCl · H ₂ O	17,56
L-Cystine	24,00
L-Glutamic Acid	7,36
L-Glutamine	365,1
L-Alanyl-L-Glutamine (UltraGlutamine 1)	868,00
Glycine	18,76
L-Histidine · HCl · H ₂ O	31,48
L-Isoleucine	54,37
L-Leucine	58,96
L-Lysine · HCl	91,37
L-Methionine	17,24
L-Phenylalanine	35,48
L-Proline	17,27
L-Serine	26,26
L-Threonine	53,56

9.1.4 BV 293s médium

Médium pro kultivaci suspenzní linie buněk 293HEK/EBNA

Tab. 11: Složení BV 293s média [2]

Složka	koncentrace
DMEM/F-12	1 litr
pantotenát vápenatý	4 mg/l
Pluronic F-68	1 g/l
diethanolamin	3 µg/l
fyton Difco select	2 g/l
pepton z laktalbuminu	2 g/l
lipidový koncentrát	1 mg/l
lidský insulin	5 g/l
lidský transferrin ATF	5 g/l

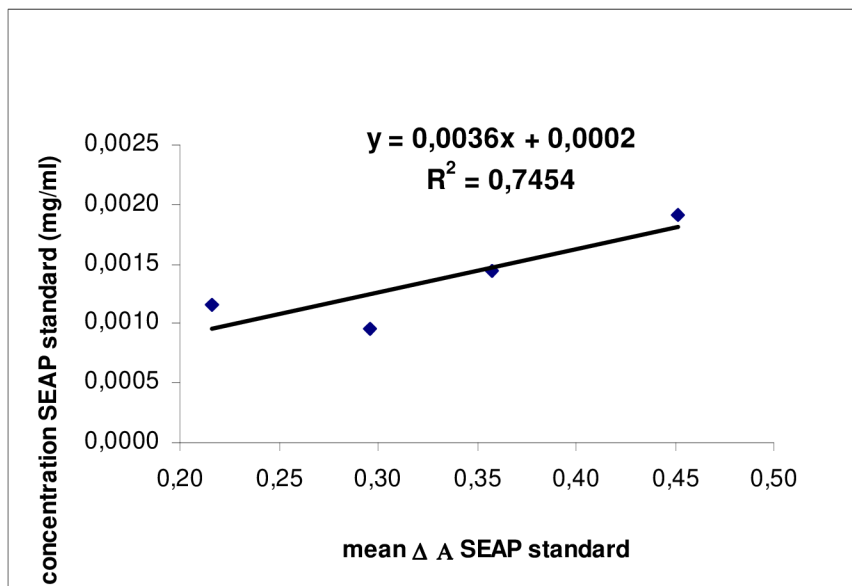
9.2 Metoda transfekce 1 – Muller (2005)

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích a srovnání koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

Tab.12: Použité plazmidy

číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	peak8	7	pCI
2	peak8	8	pCI
3	pcDNA 5	9	pcDNA 3.1
4	pcDNA 5	10	pcDNA 3.1
5	pCEP4	11	peBSV
6	pCEP4	12	peBSV

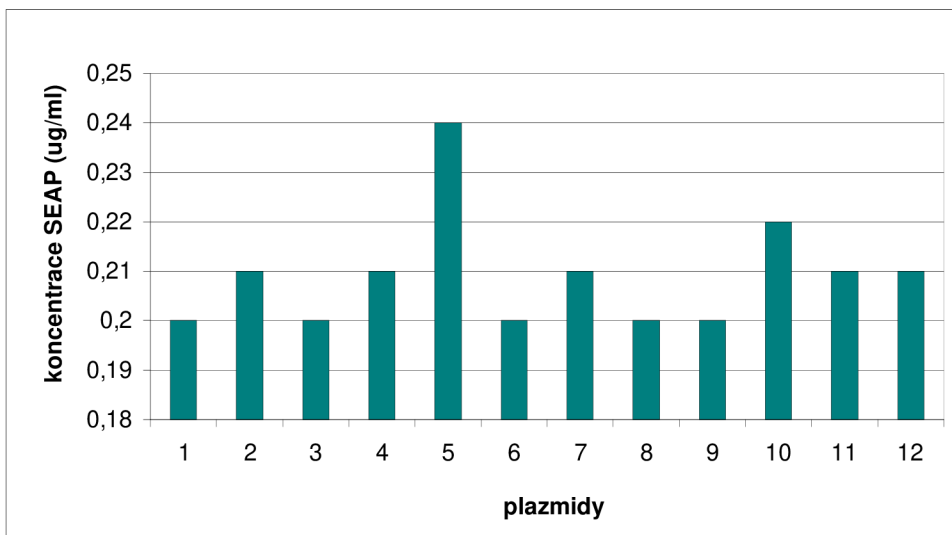
Transfekce – 1. den po transfekci



Obr. 24: Kalibrační křivka SEAP – 1. den po transfekci

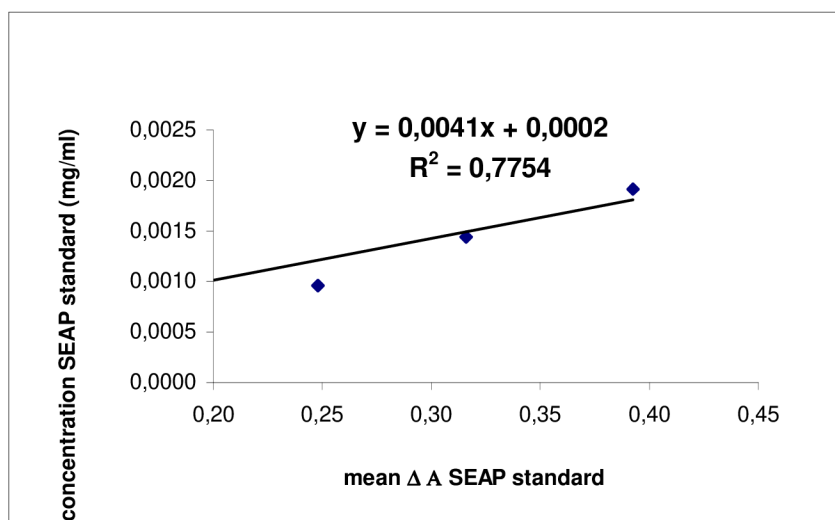
Tab.13: Koncentrace vzorků – 1. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,20	(ug/ml)
2	0,21	(ug/ml)
3	0,20	(ug/ml)
4	0,21	(ug/ml)
5	0,24	(ug/ml)
6	0,20	(ug/ml)
7	0,21	(ug/ml)
8	0,20	(ug/ml)
9	0,20	(ug/ml)
10	0,22	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,83	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,98	(ug/ml)
STD 12000x	1,27	(ug/ml)



Obr. 25: Koncentrace SEAP – 1. den po transfekci

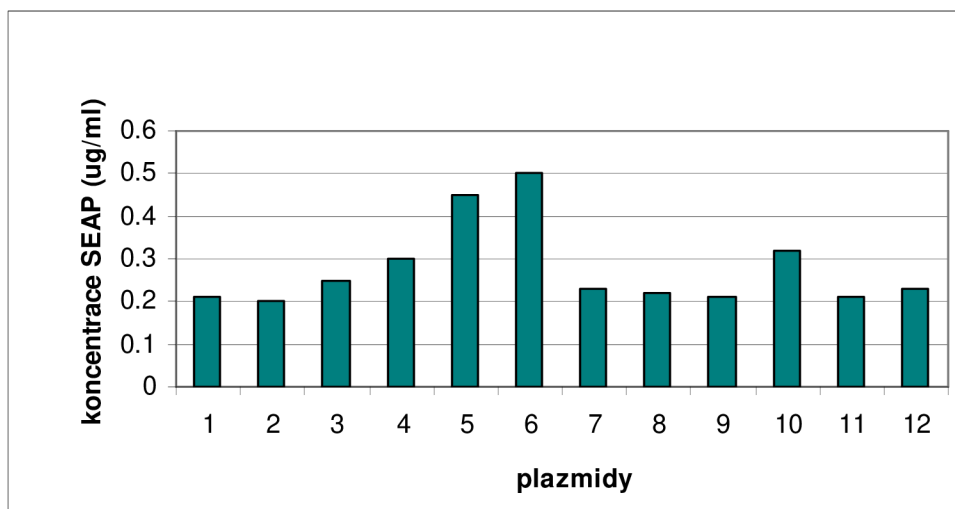
Transfekce – 2. den po transfekci



Obr. 26: Kalibrační křivka SEAP – 2. den po transfekci

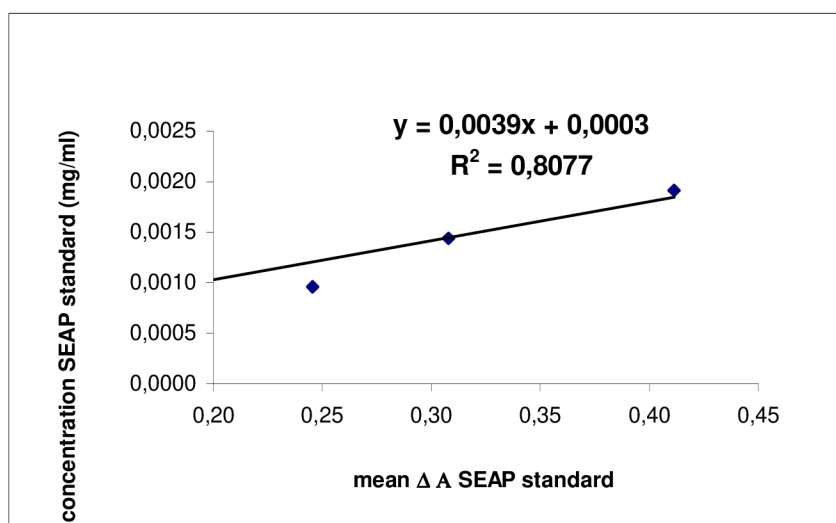
Tab. 14: Koncentrace vzorků – 2. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,20	(ug/ml)
3	0,25	(ug/ml)
4	0,30	(ug/ml)
5	0,45	(ug/ml)
6	0,50	(ug/ml)
7	0,23	(ug/ml)
8	0,22	(ug/ml)
9	0,21	(ug/ml)
10	0,32	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,23	(ug/ml)
STD 6000x	1,81	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,96	(ug/ml)
STD 12000x	1,22	(ug/ml)



Obr. 27: Koncentrace SEAP – 2. den po transfekci

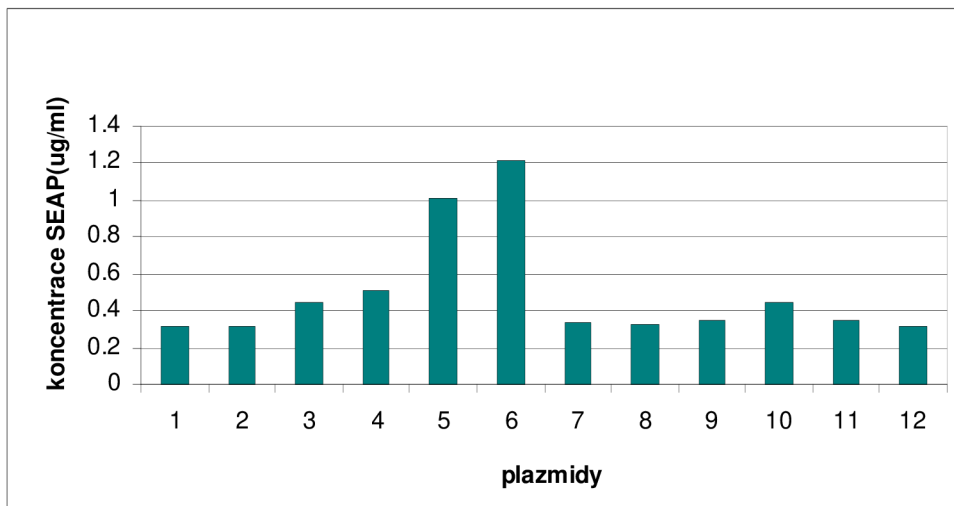
Transfekce – 3. den po transfekci



Obr. 28: Kalibrační křivka SEAP – 3. den po transfekci

Tab. 15: Koncentrace vzorků – 3. den po transfekci

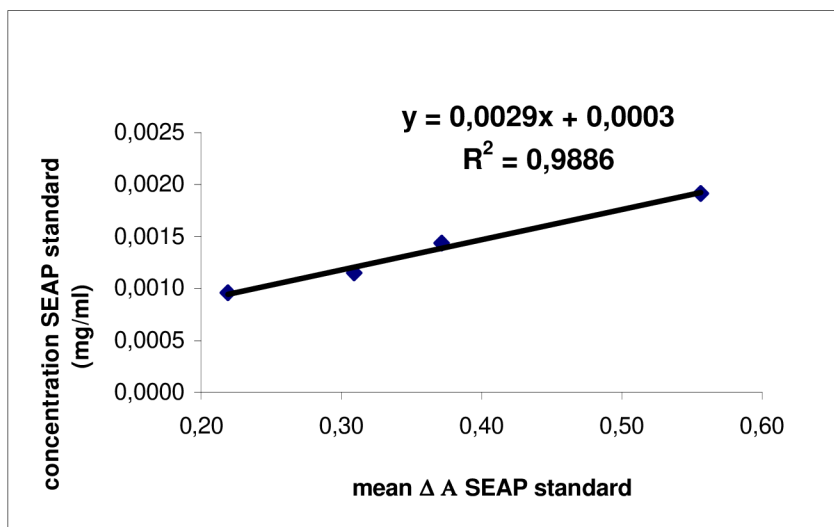
Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,31	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
4	0,51	(ug/ml)
5	1,01	(ug/ml)
6	1,22	(ug/ml)
7	0,34	(ug/ml)
8	0,33	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
10	0,45	(ug/ml)
11	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,50	(ug/ml)
STD 10000x	1,02	(ug/ml)
STD 12000x	1,26	(ug/ml)



Obr. 29: Koncentrace SEAP – 3. den po transfekci

Transfekce – 5. den po transfekci

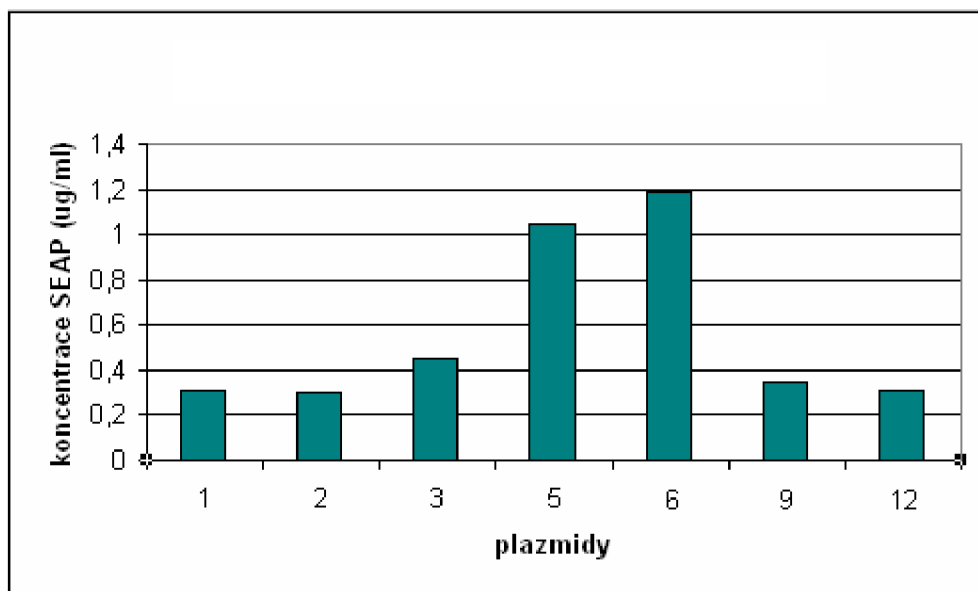
Na následujících grafech a v tabulkách jsou uvedeny jen některé hodnoty vzorků. U ostatních vzorků došlo ke kontaminaci a byly zlikvidovány.



Obr. 30: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

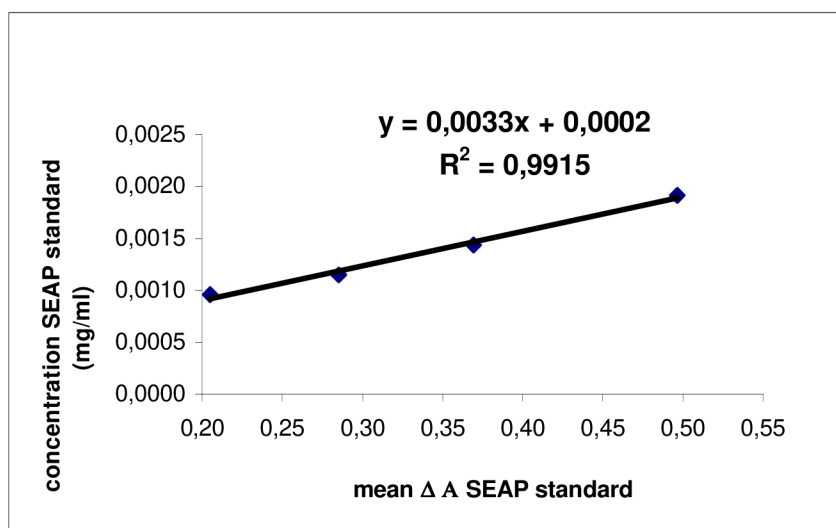
Tab. 16: Koncentrace vzorků – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,30	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
5	1,05	(ug/ml)
6	1,19	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,91	(ug/ml)
STD 8000x	1,38	(ug/ml)
STD 10000x	1,20	(ug/ml)
STD 12000x	0,94	(ug/ml)



Obr. 31: Koncentrace SEAP – 5. den po transfekci

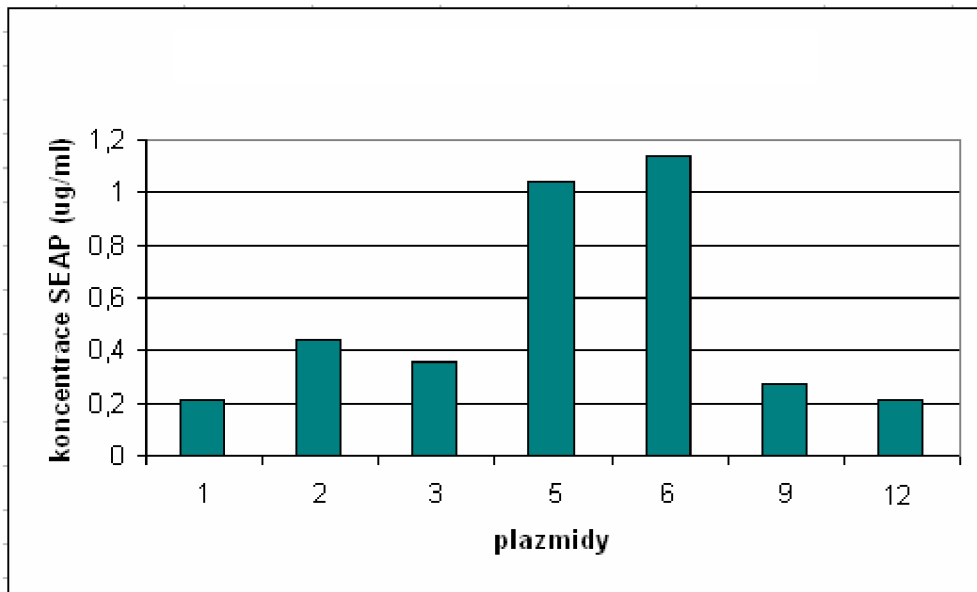
Transfekce – 6. den po transfekci



Obr. 32: Kalibrační křivka SEAP – 6. den po transfekci

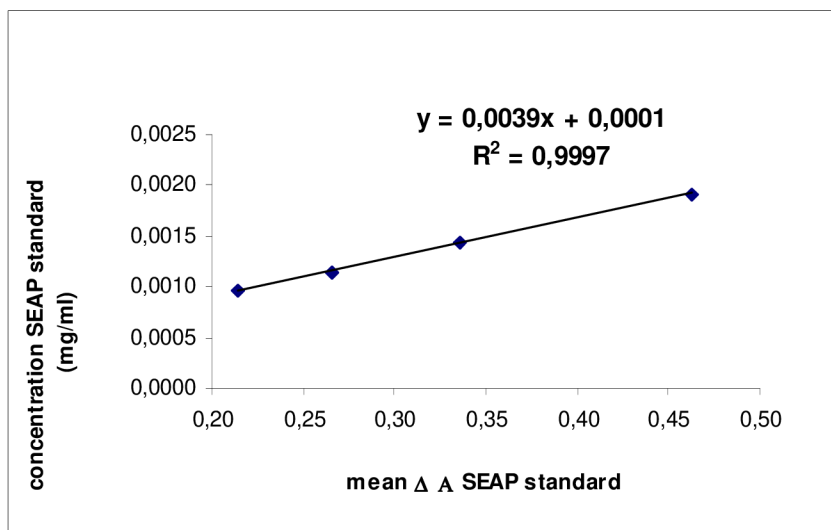
Tab.17: Koncentrace vzorků – 6. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,44	(ug/ml)
3	0,36	(ug/ml)
5	1,04	(ug/ml)
6	1,14	(ug/ml)
9	0,27	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,84	(ug/ml)
STD 8000x	1,42	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,88	(ug/ml)



Obr. 33: Koncentrace SEAP – 6. den po transfekci

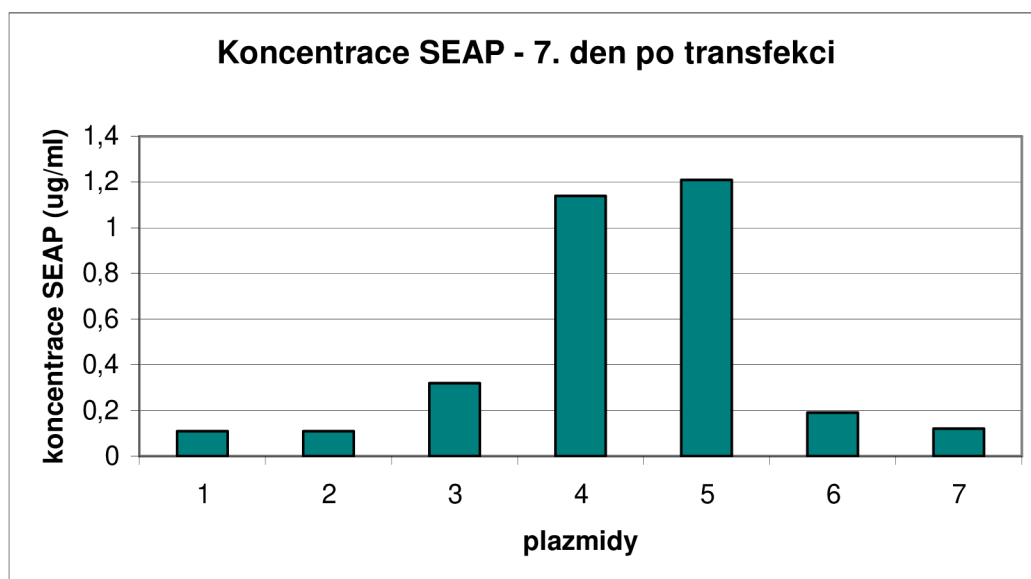
Transfekce – 7. den po transfekci



Obr. 34: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

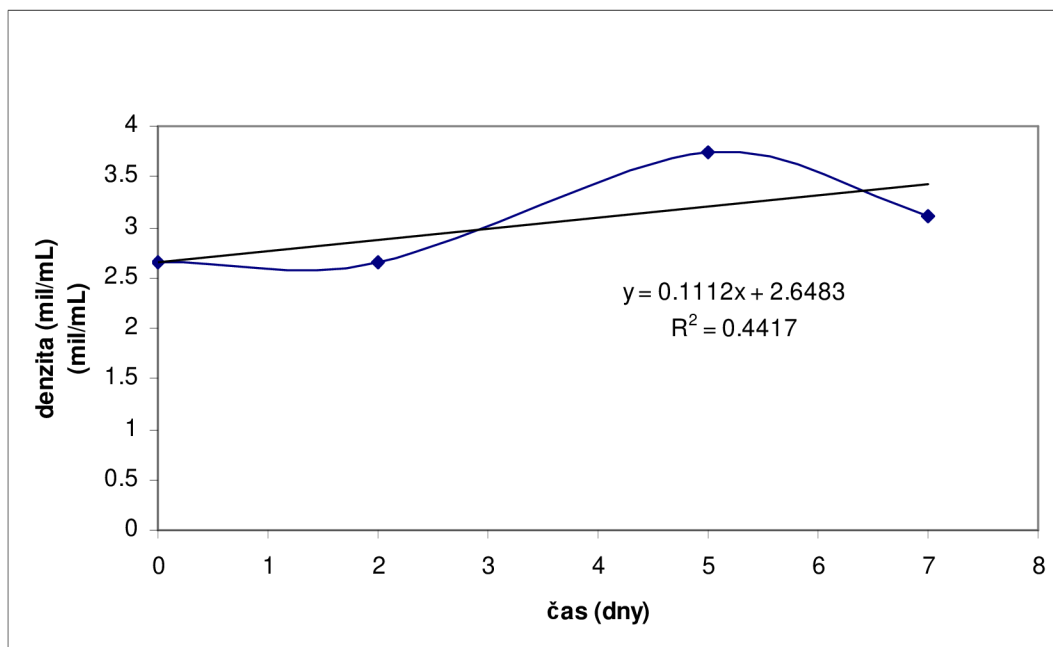
Tab.18: Koncentrace vzorků – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,11	(ug/ml)
2	0,11	(ug/ml)
3	0,32	(ug/ml)
5	1,14	(ug/ml)
6	1,21	(ug/ml)
9	0,19	(ug/ml)
12	0,12	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,41	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,93	(ug/ml)

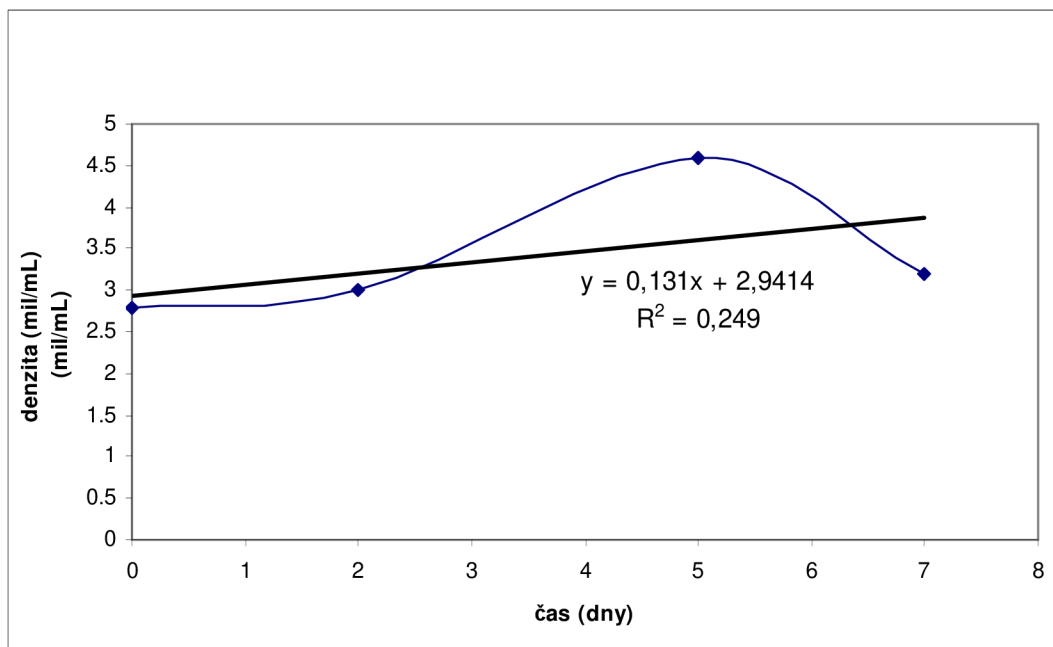


Obr. 35: Koncentrace SEAP – 7. den po transfekci

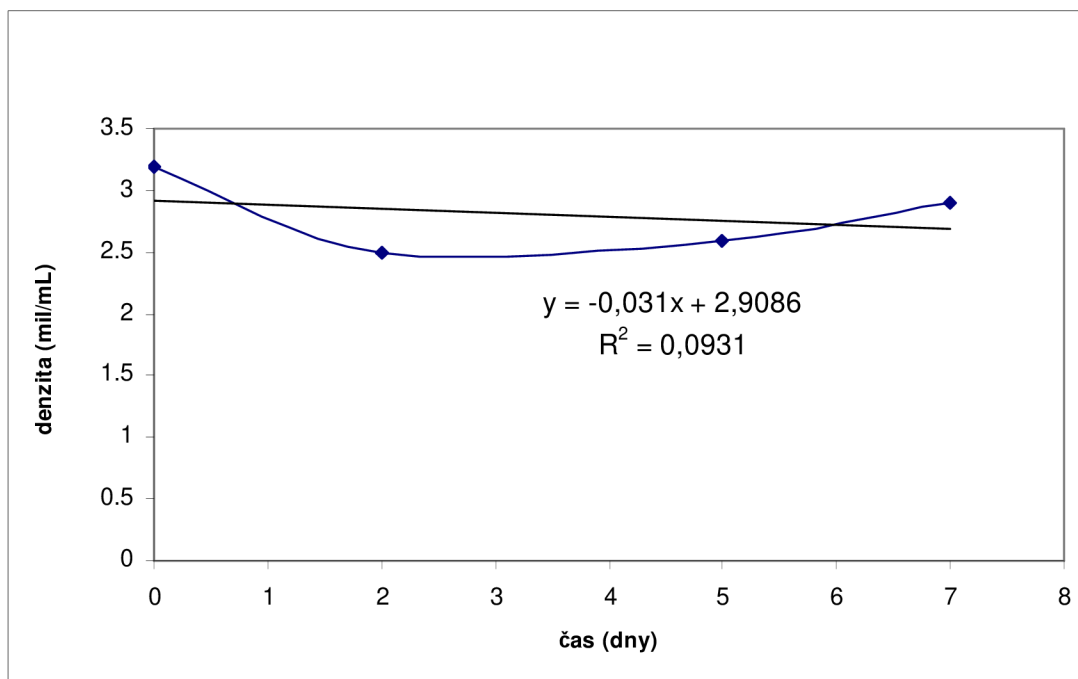
Níže jsou uvedené růstové křivky vzorků a kontroly, u kterých byly odebrány vzorky po celých sedm dní po transfekci.



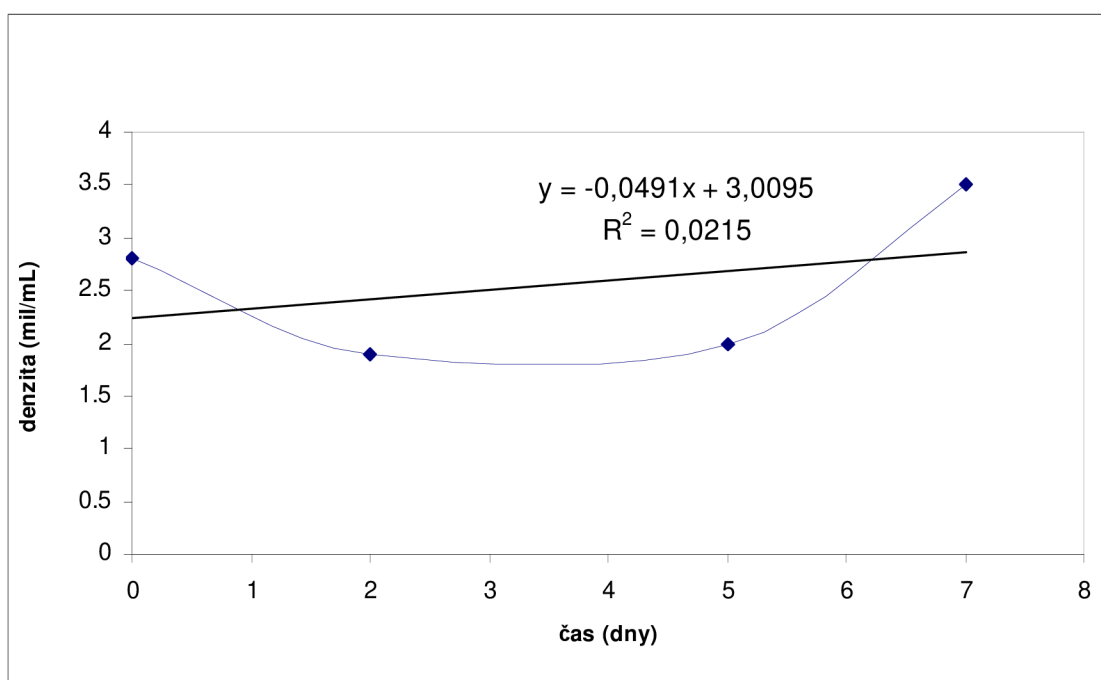
Obr 36: Růstová křivka – peak8, vzorek 1



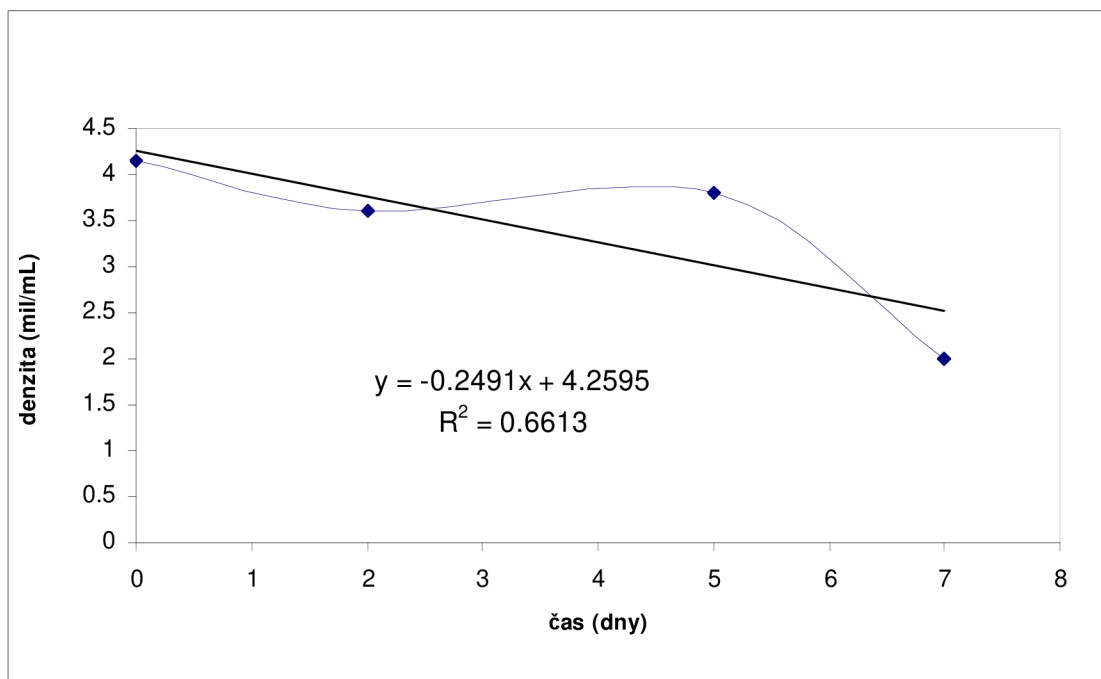
Obr. 37: Růstová křivka – peak8, vzorek 2



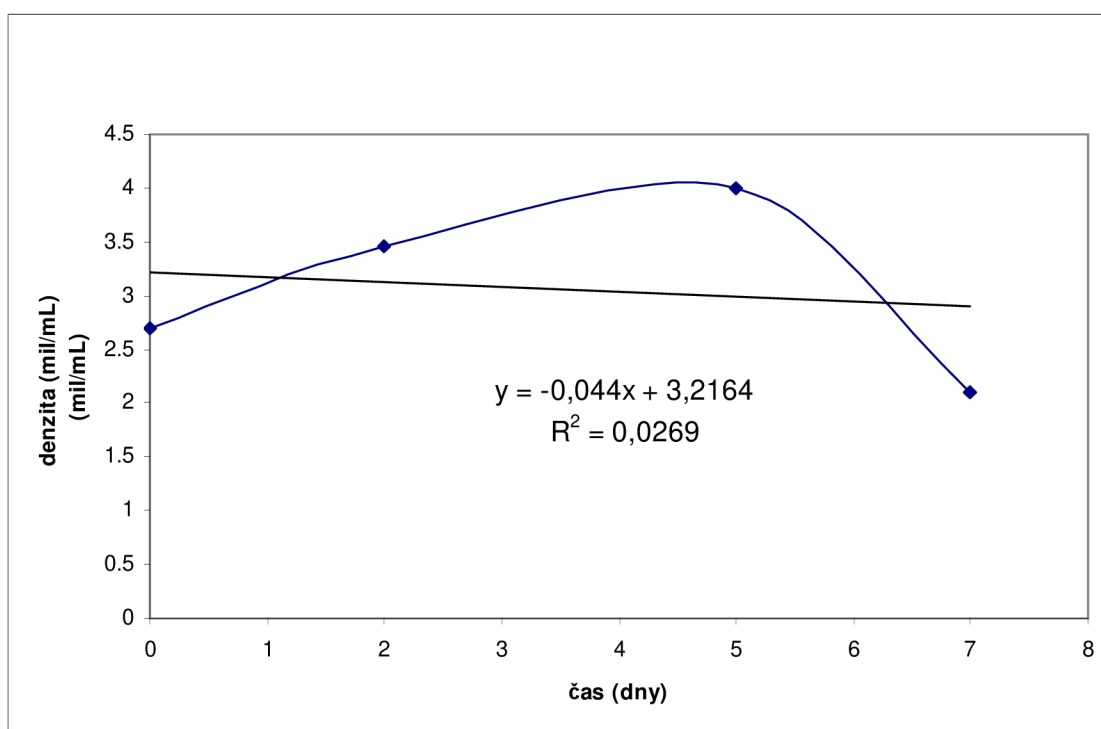
Obr. 38: Růstová křivka – pcDNA 5, vzorek 3



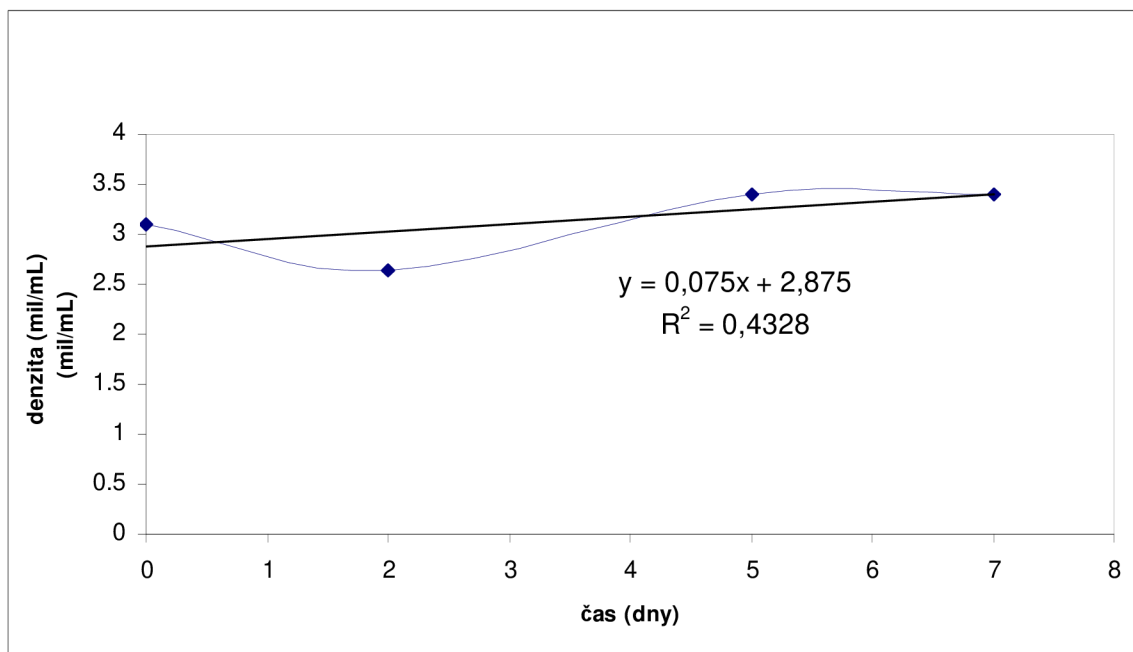
Obr. 39: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 5



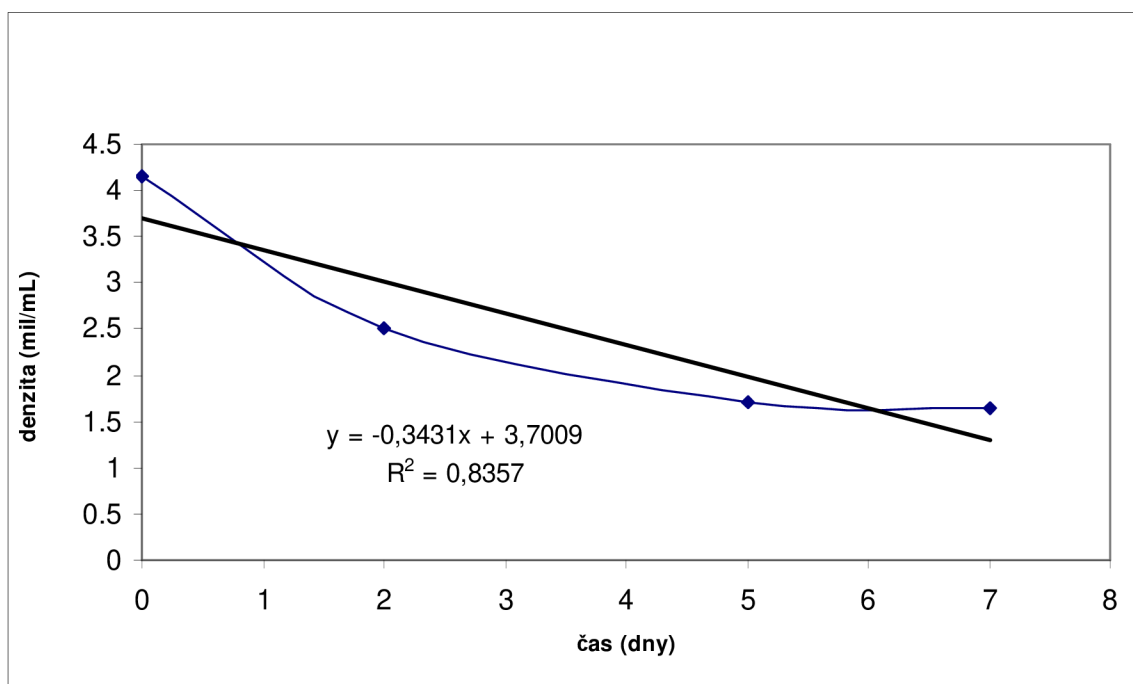
Obr. 40: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 6



Obr. 41: Růstová křivka – pcDNA 3.1, vzorek 9



Obr. 42: Růstová křivka – peBSV, vzorek 12

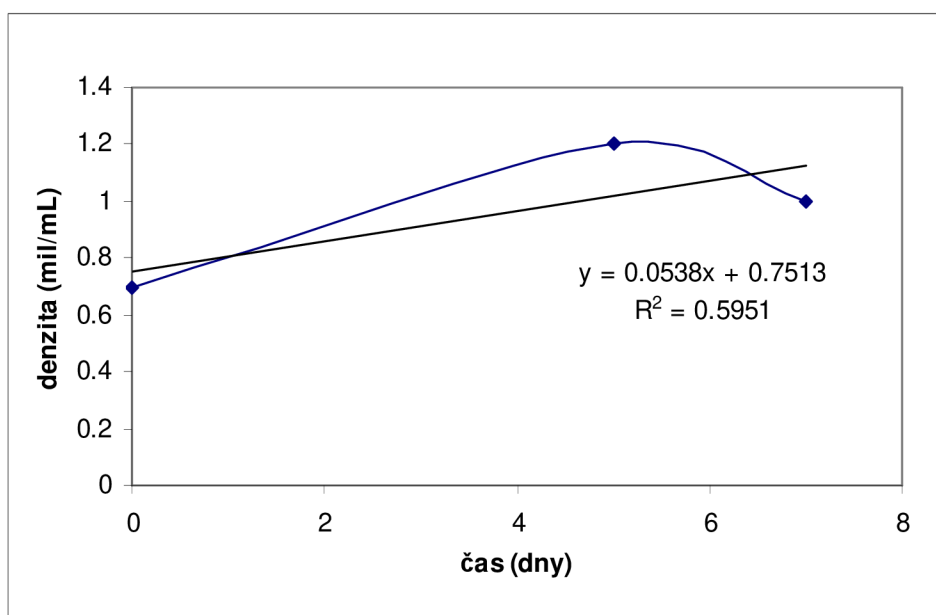


Obr. 43: Růstová křivka – kontrola

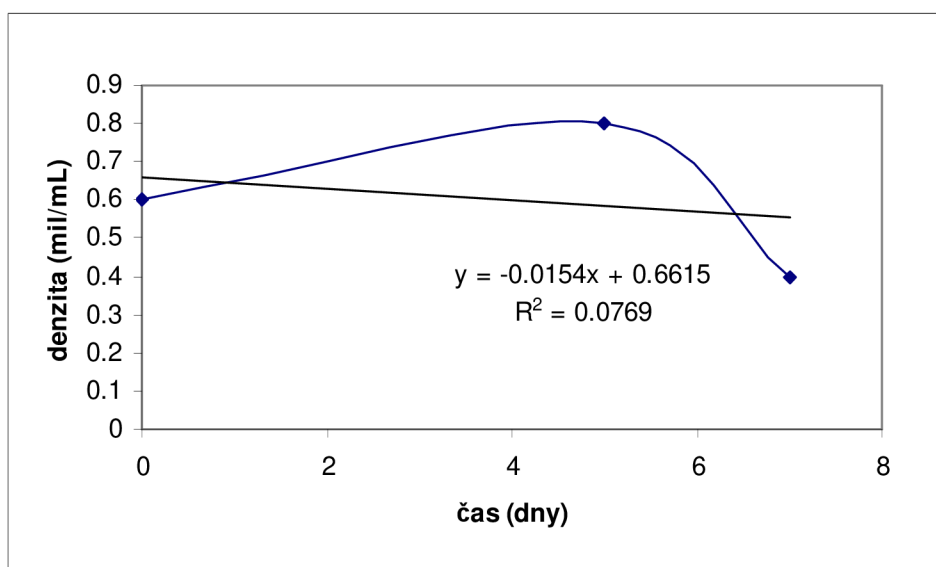
9.3 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Níže jsou uvedené grafy růstových křivek kontrolních vzorků u nichž nebyla provedena transfekce, dále růstové křivky měřené po transfekci bezsérových kultur a buněčných suspenzí udržovaných v 293BVs médiu s 1% přídavkem koňského séra.

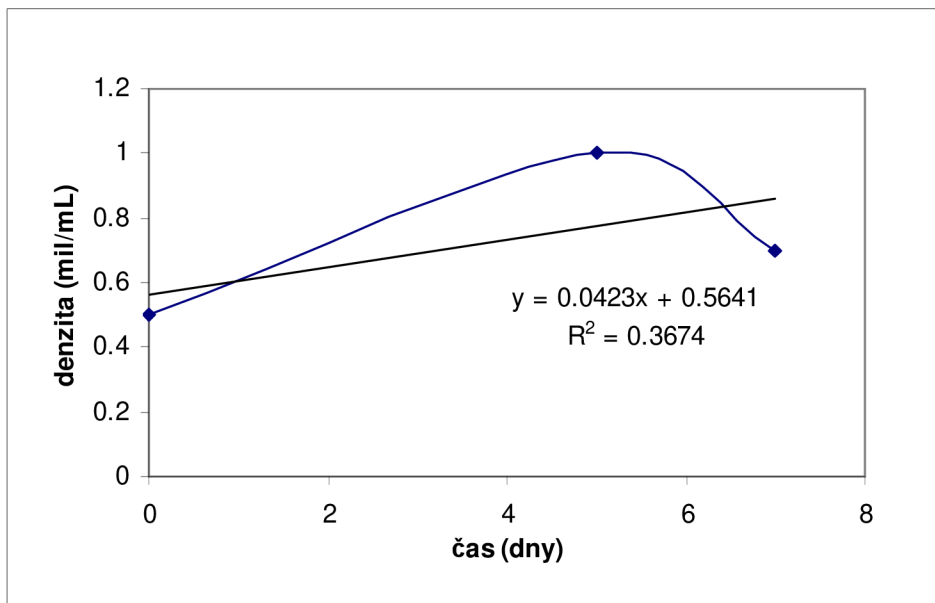
9.3.1 Bezsérová kultivace



Obr. 44: Růstová křivka – kontrolní vzorek (bezsérová kultura)

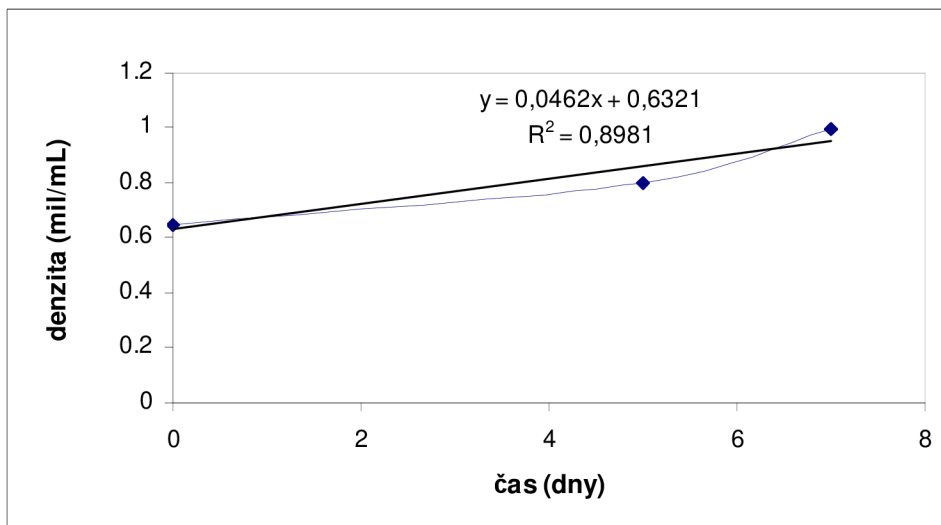


Obr. 45: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 1

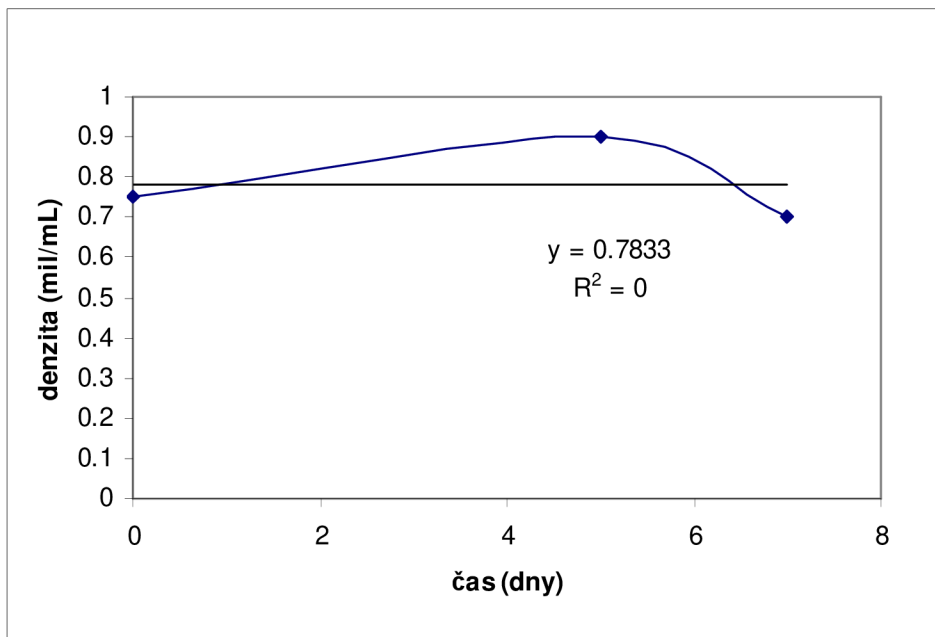


Obr. 46: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 2

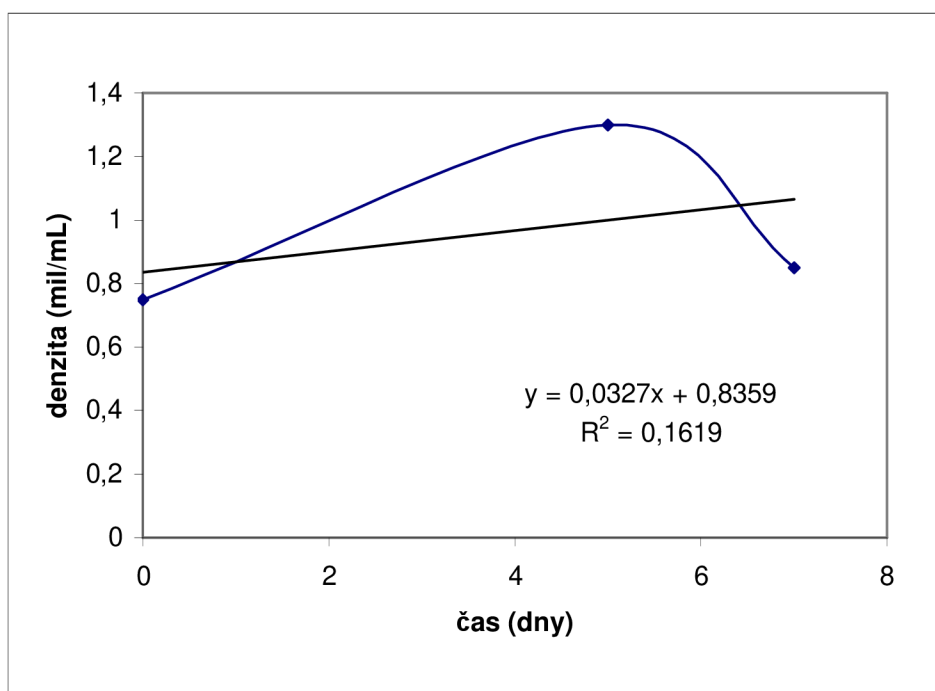
9.3.2 Kultivace s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 47: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 48: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 1

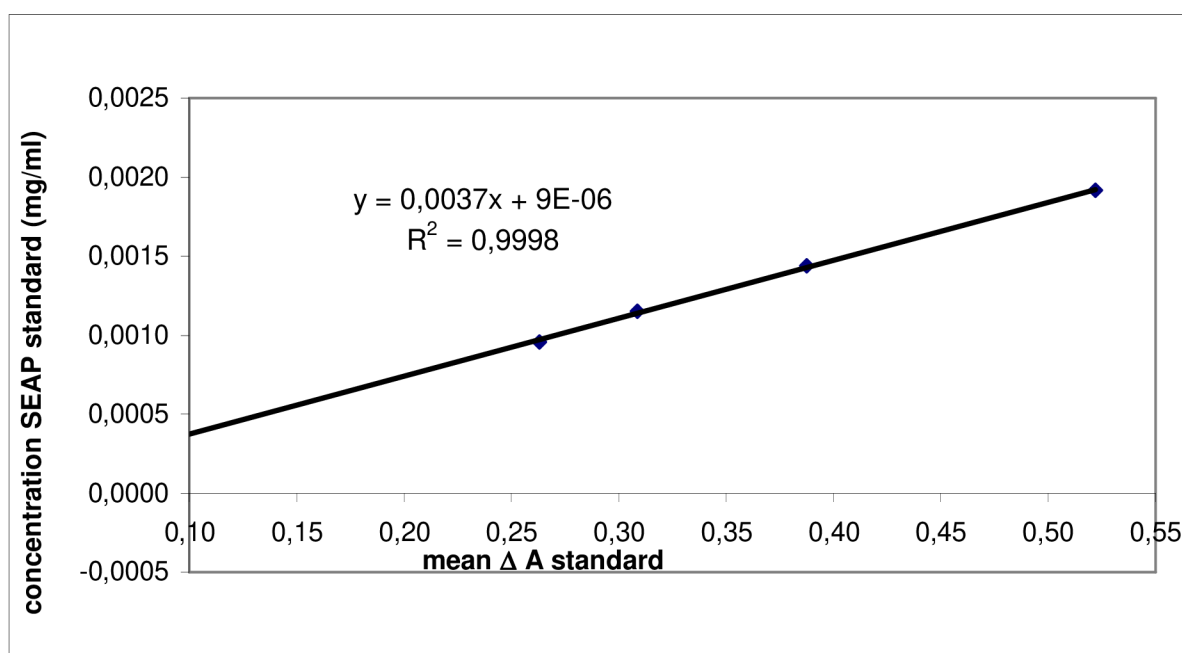


Obr. 49: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 2

9.4 Metoda transfekce 3 – Backliwal

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

5. den po transfekci

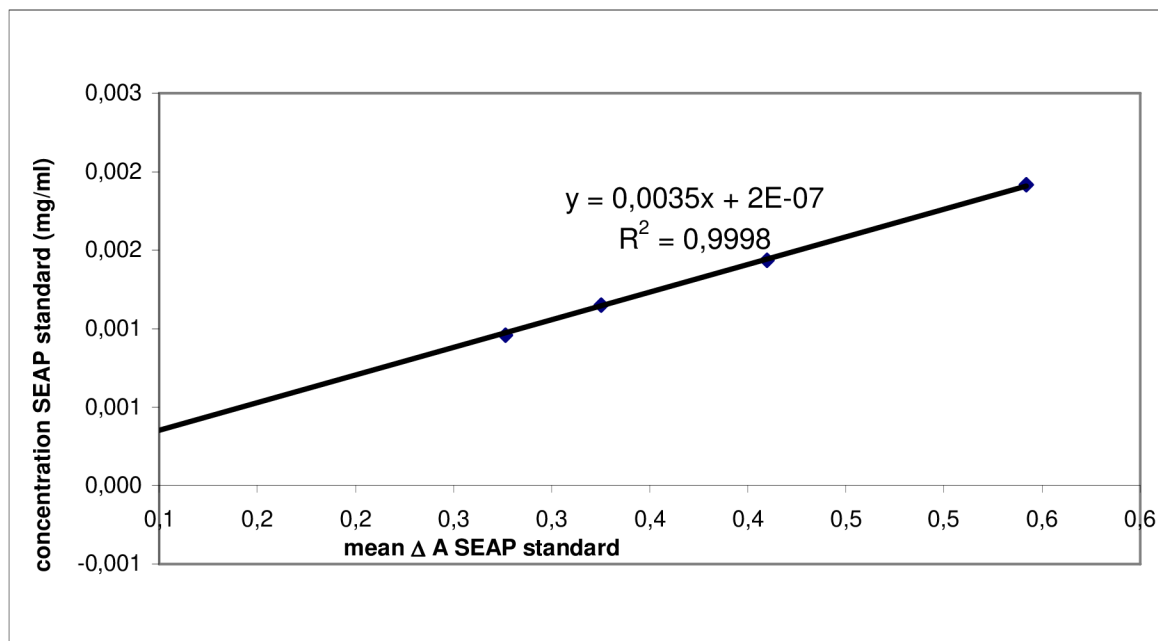


Obr. 50: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

Tab.19: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	2,016	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	0,85	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,03	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,9624	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	1,9235	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	2,9484	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4119	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4933	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	1,41	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	0,92	(ug/ml)

7.den po transfekci

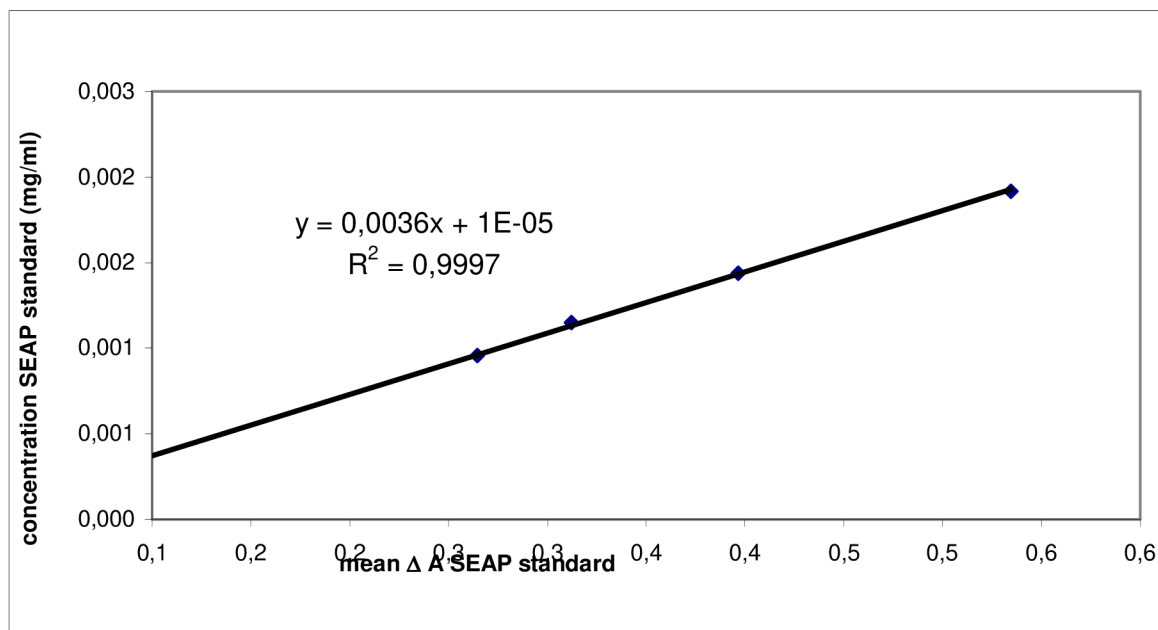


Obr. 51: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

Tab.20: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	5,5456	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,1204	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	7,3656	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,8516	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	3,1088	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,0258	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,8648	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,2348	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,4014	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,2919	(ug/ml)

11. den po transfekci

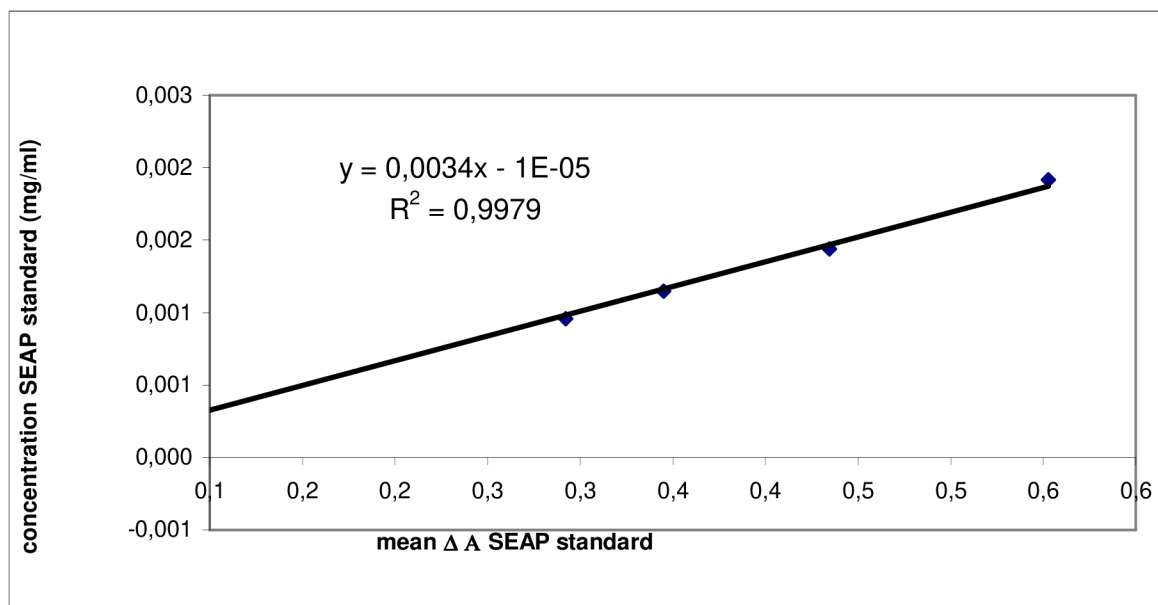


Obr. 52: Kalibrační křivka SEAP – 11. den po transfekci

Tab.21: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 11. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	6,488	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,25	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,18	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	12,34	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,6392	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	5,2764	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,5204	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,68	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,7246	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,9632	(ug/ml)

14. den po transfekci

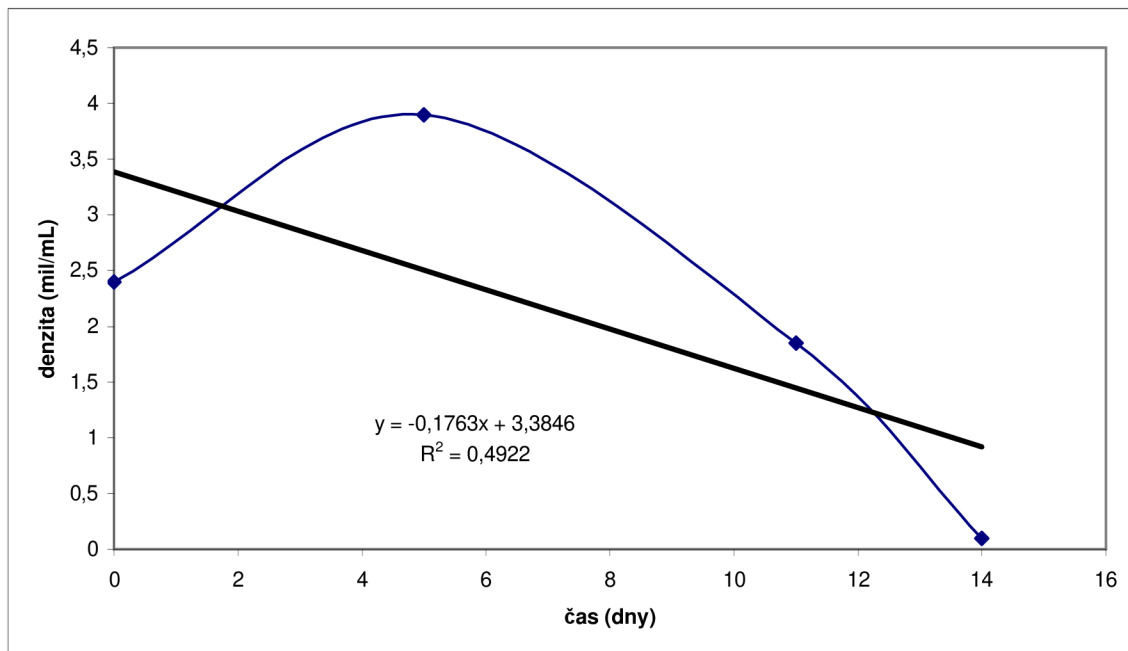


Obr. 53: Kalibrační křivka SEAP – 14. den po transfekci

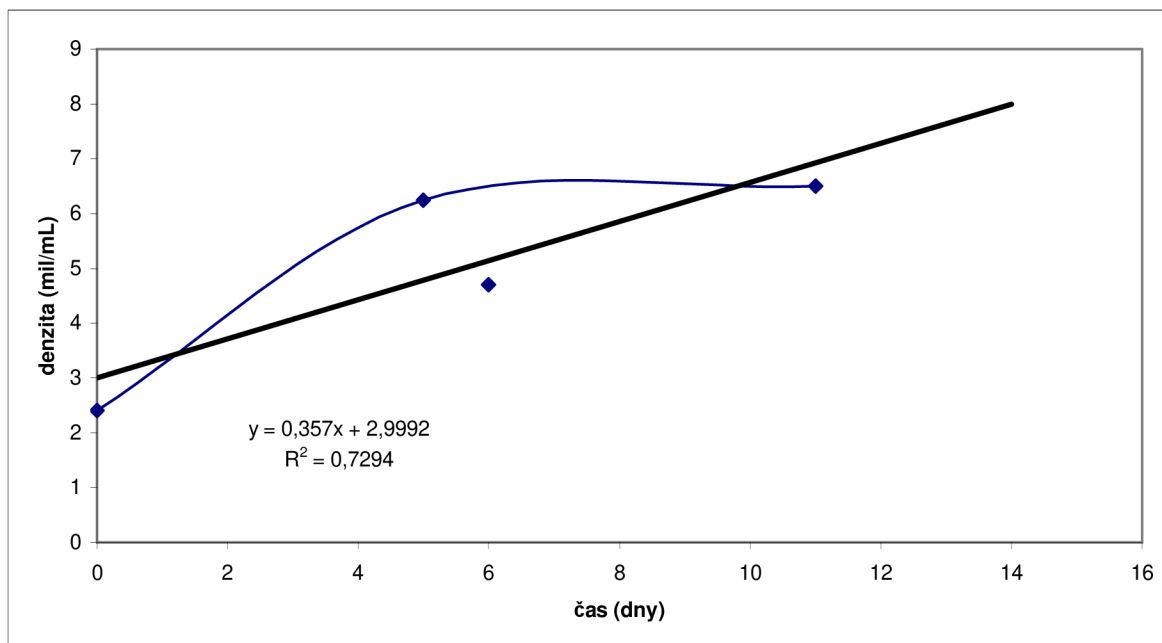
Tab.22: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 14. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug	7,8048	(ug/ml)
DNA 15ug	1,22	(ug/ml)
DNA 20ug	9,96	(ug/ml)
DNA 20ug	14,72	(ug/ml)
DNA 50ug	4,588	(ug/ml)
DNA 50ug	6,509	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,2344	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,1664	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	3,2226	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	2,1261	(ug/ml)

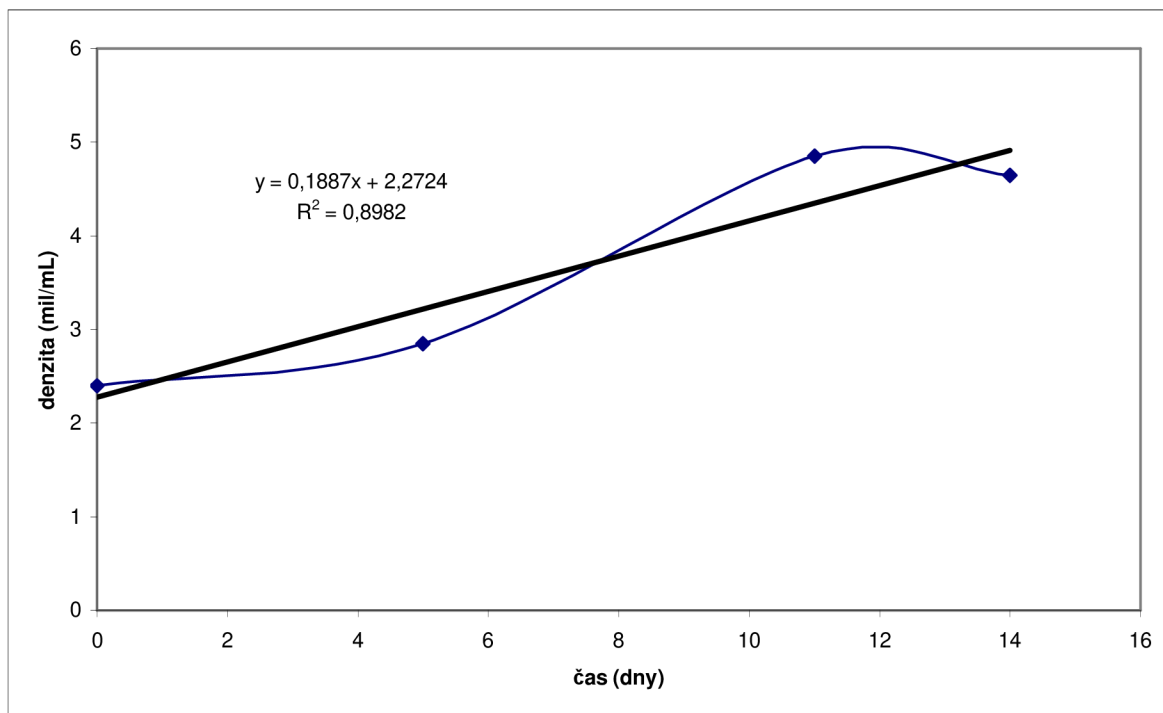
Níže jsou uvedené růstové křivky u vzorků a kontrol.



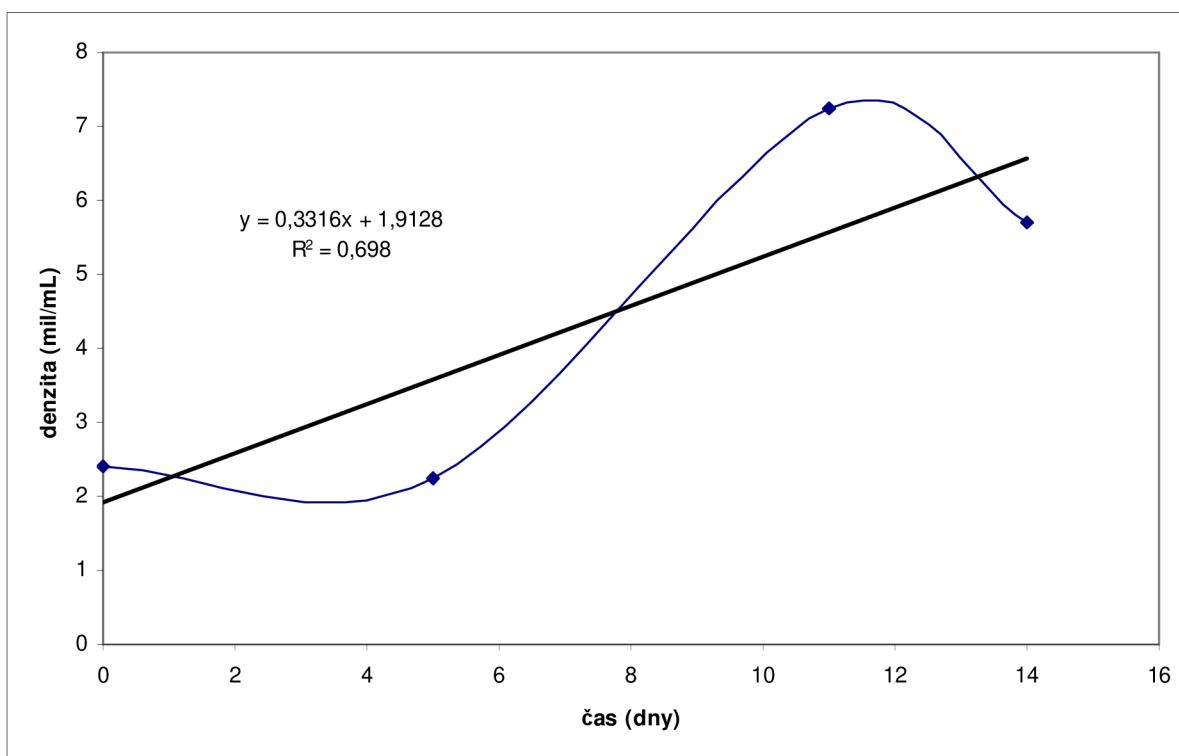
Obr. 54: Růstová křivka- kontrola 1



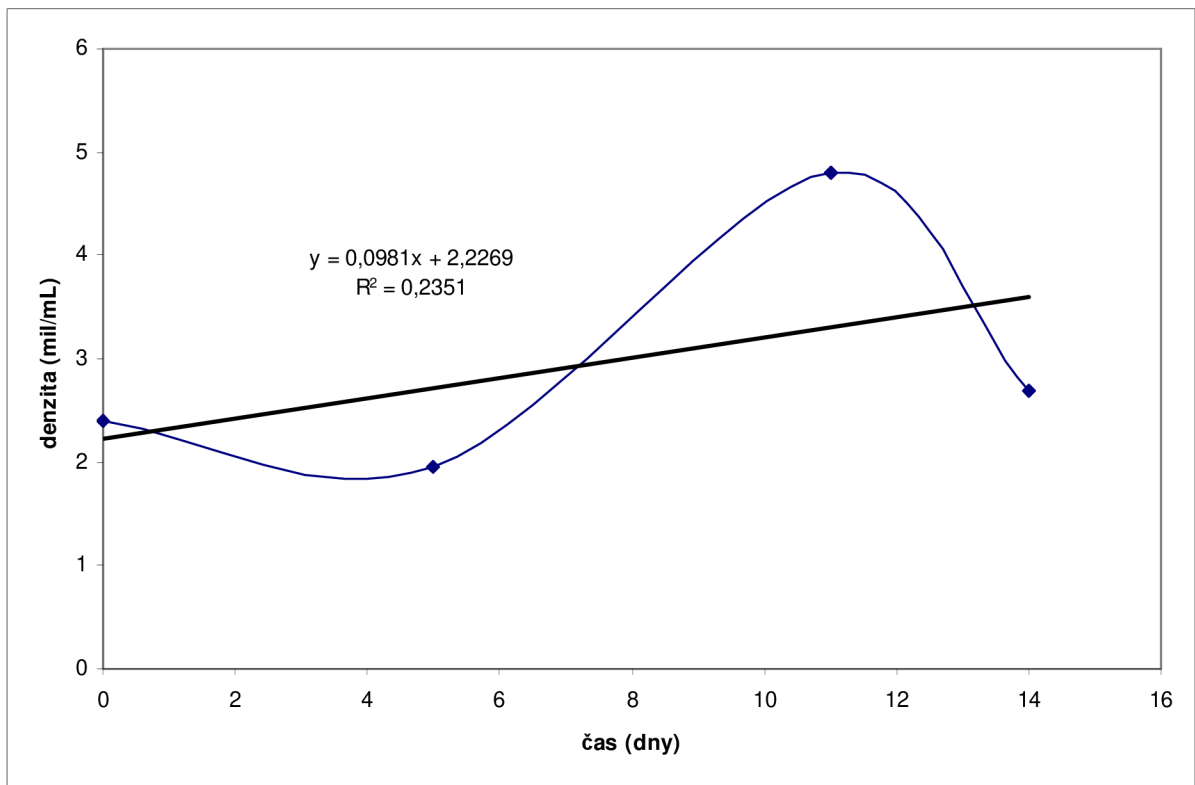
Obr. 55: Růstová křivka - kontrola 2



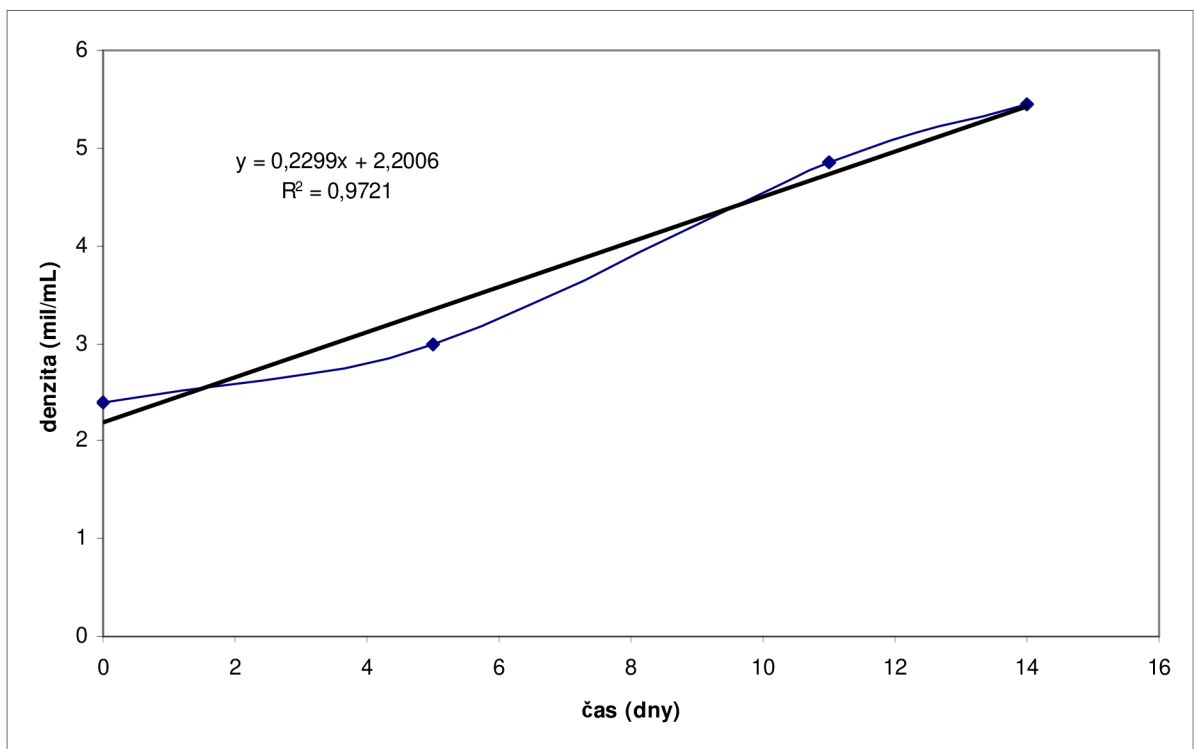
Obr. 56: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA A



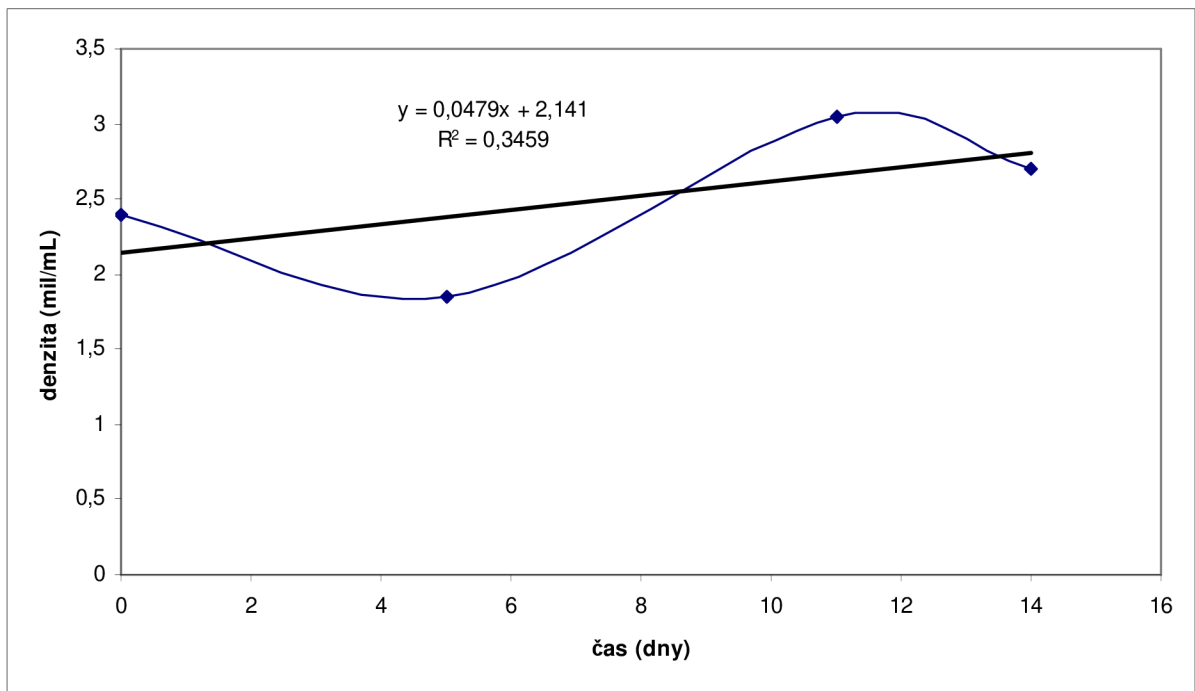
Obr. 57: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA B



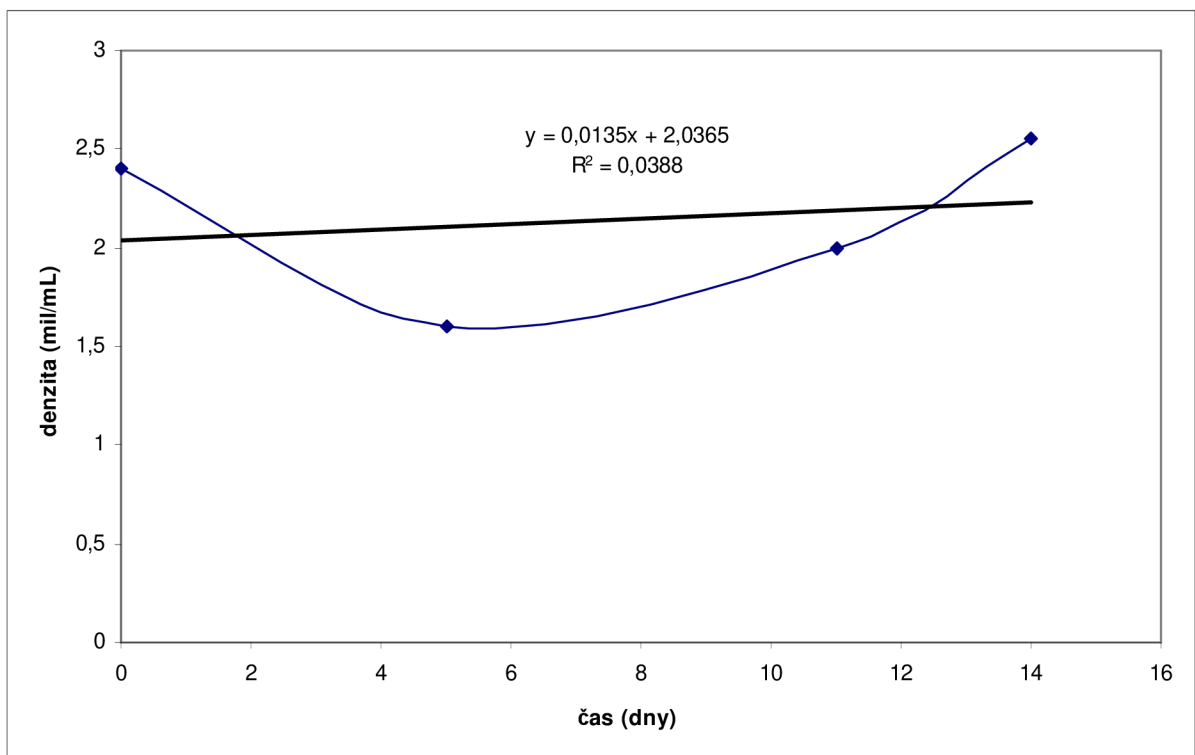
Obr. 58: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA A



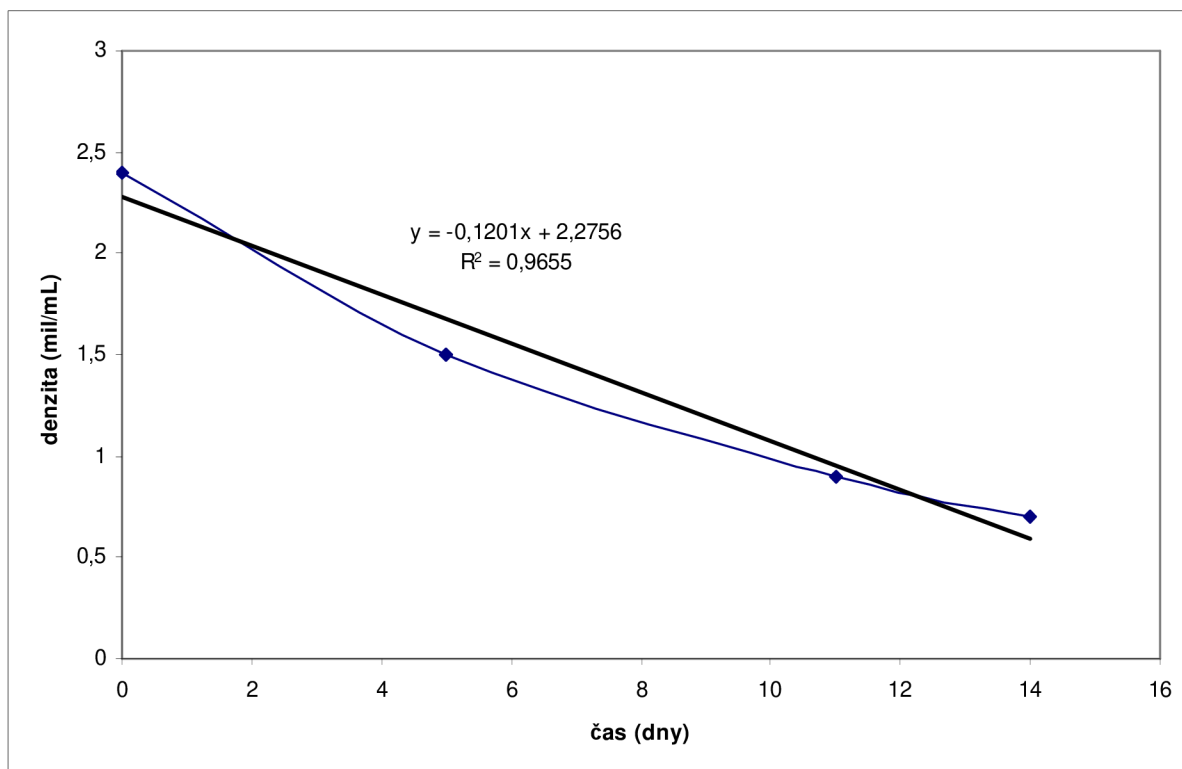
Obr. 59: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA B



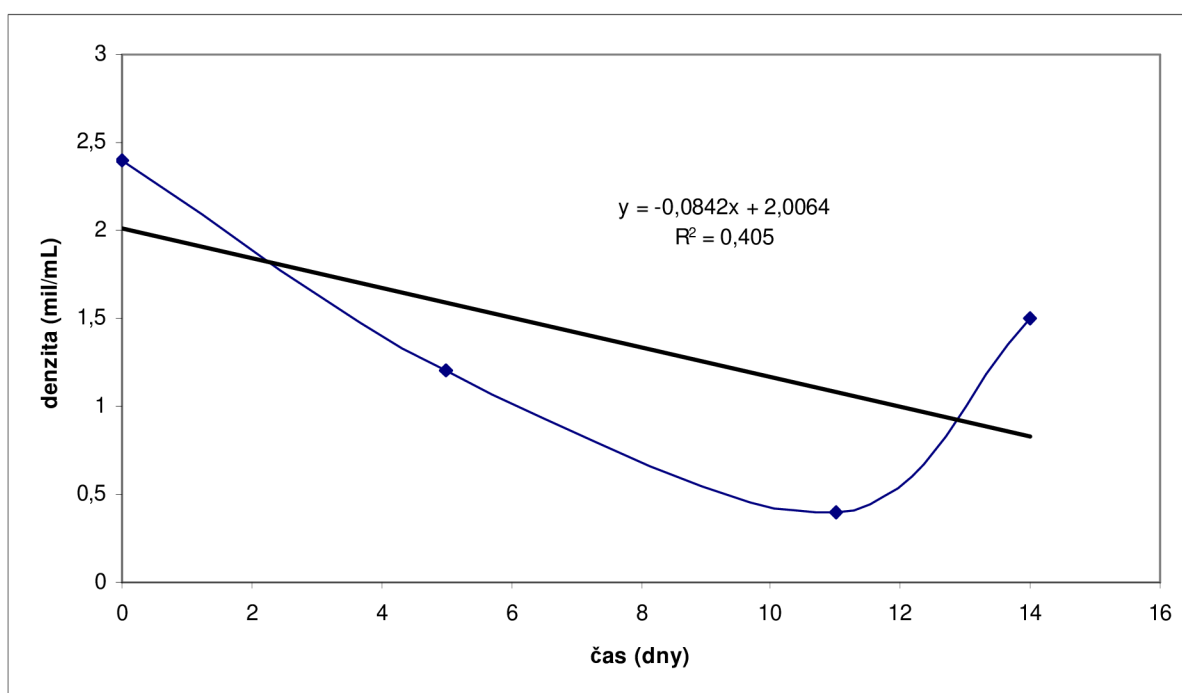
Obr. 60: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA A



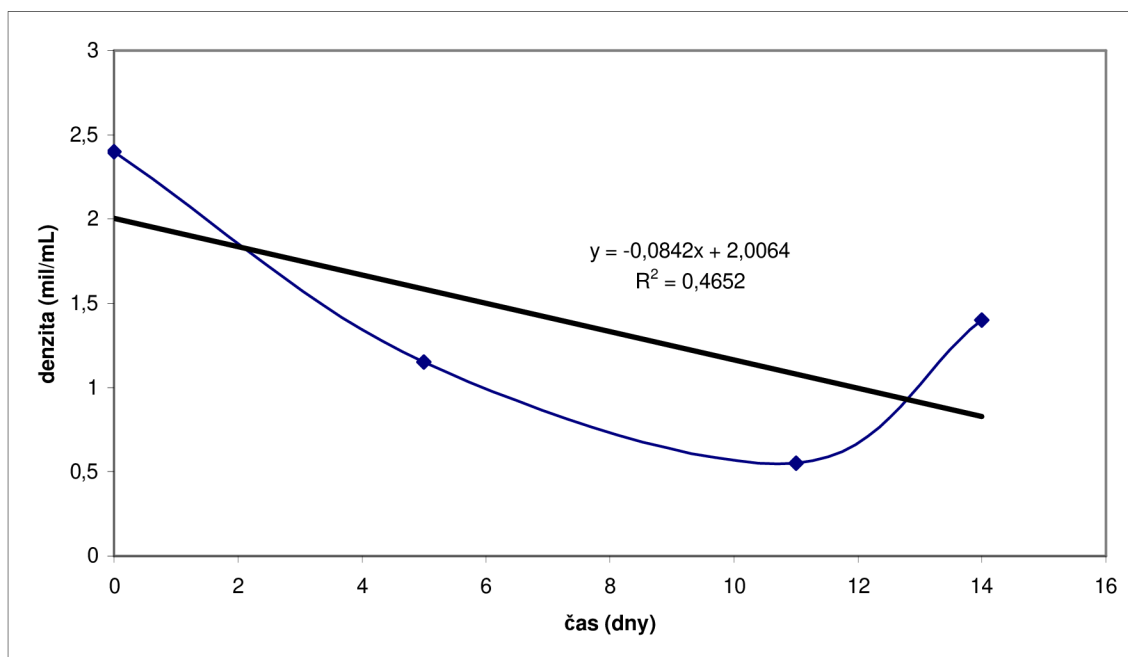
Obr. 61: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA B



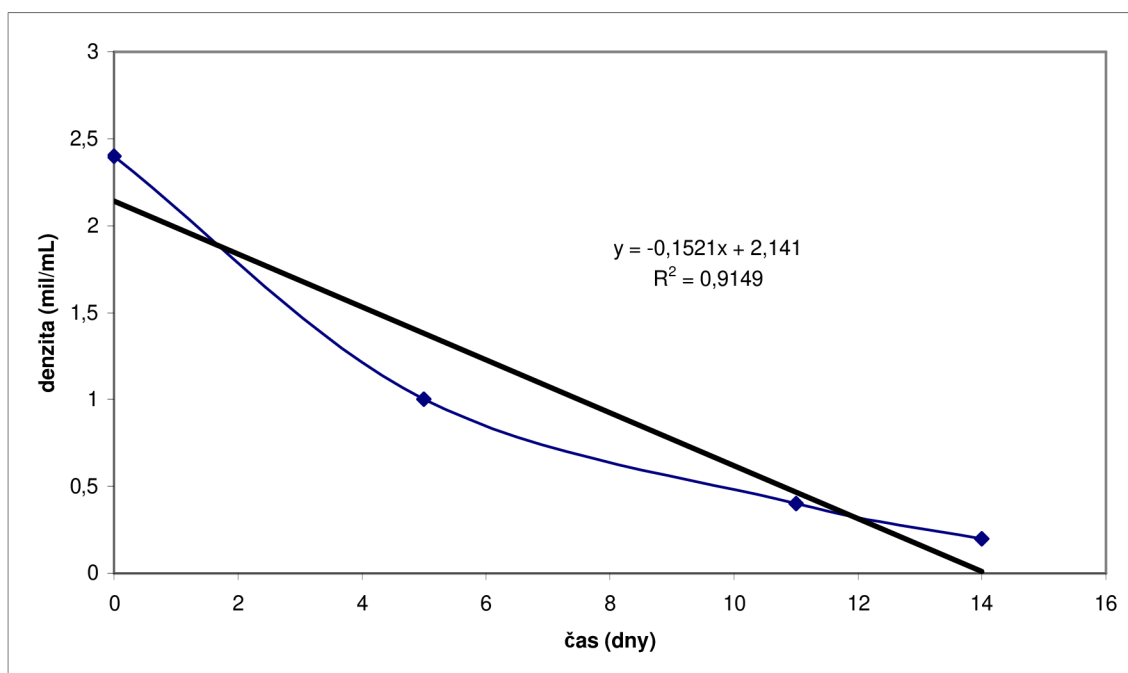
Obr. 62: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný A



Obr. 63: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný B



Obr. 64: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina A



Obr. 65: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina B

ABSTRAKT

Diplomová práce studuje problematiku transienční transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů.

V teoretické části jsou obsaženy poznatky o vzniku rekombinantních molekul DNA, použití expresních vektorů, přenosu DNA a následné detekci rekombinantního proteinu.

Experimentální část byla zaměřena na nalezení vhodné transfekční metody pomocí polyethyleniminu, kdy hostitelskými buňkami byly buňky 293HEK/EBNA.

V první části byl zvolen nejúčinnější plazmid – pCEP4/SEAP. Dále byly zkoumány tři transfekční metody: Muller (2005), Durocher et al. (2007) a Backliwal et al. (2008). Nejvyšší dosažené exprese SEAP bylo dosaženo metodou Backliwal et al. (2008).

ABSTRACT

Master's thesis deals with the transient transfection of the serum free animal cell culture using polyethyleneimines.

In the theoretical part formation of recombinant DNA molecules, used expression vectors, used DNA transfer and detection of recombinant proteins are discussed.

The experimental part deals with efficiency of the polyethylenimine mediated transient transfection under various experimental conditions. 293HEK/EBNA cell line was chosen as an experimental model.

First the most effective plasmide - pCEP4/SEAP was selected. Then three transfection methodes were tested: Muller (2005), Durocher et al. (2007) and Backliwal et al. (2008). The highest recombinant protein expresion was reached using the method of Backliwal et al. (2008).

KLÍČOVÁ SLOVA

transienční transfekce, polyethylenimin, buňky 292HEK/EBNA , rekombinantní protein

KEYWORDS

transient transfection, polyethylenimine, 292HEK/EBNA cells, recombinant protein

FRIČOVÁ, M. *Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 75 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Mgr. Mojmíru Ševčíkovi, Ph.D za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu firmy *BioVendor – Laboratorní medicína a.s.* za odborné rady při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Třídění genomových knihoven.....	9
2.1.1	DNA/DNA hybridizace.....	9
2.1.2	Imunologické testy.....	9
2.1.3	Proteinová aktivita.....	9
2.1.4	Komplementární test.....	9
2.2	Klonovací vektory.....	10
2.3	Endodeoxyribonukleázy.....	12
2.4	Tvorba rekombinantní molekuly.....	12
2.5	Přenos DNA do buněk.....	12
2.5.1	Chemický přenos.....	12
2.5.2	Mikroinjekce.....	12
2.5.3	Přenos pomocí liposomů.....	13
2.5.4	Elektroporace.....	13
2.5.5	Syntetické komplexy DNA-ligand.....	14
2.6	Hostitelské buňky a organismy.....	16
2.6.1	Prokaryotní buňky.....	16
2.6.2	Kvasninky.....	16
2.6.3	Rostliny.....	17
2.6.4	Živočišné buňky.....	17
2.7	Reportérové geny.....	18
2.7.1	Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu.....	18
2.7.2	Transgen pro β -glukuronidázu.....	18
2.7.3	Transgen pro luciferázu.....	18
2.7.4	Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP).....	19
2.7.5	Transgen pro alkalickou fosfatázu.....	19
2.8	Transientní (přechodná) transfekce.....	19
3	Experimentální část.....	20
3.1	Materiály a metody.....	20
3.1.1	Chemikálie.....	20
3.1.2	Pomůcky a přístroje.....	20
3.1.3	Buňky a kultivační média.....	21
3.1.4	Metody.....	22
3.1.5	Rozmražení buněk a kultivace.....	22
3.1.6	Pasážování a zamražení buněk.....	23
3.1.7	Počítání buněk pomocí trypanové modři.....	24
3.1.8	Převedení na suspenzní linii.....	24
3.1.9	Izolace a purifikace plasmidové DNA.....	25
3.1.10	Plazmidy.....	26
3.1.11	Metoda transfekce 1 - Muller (2005).....	30
3.1.12	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007).....	30
3.1.13	Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008).....	31
3.1.14	Stanovení exprese reportérového genu.....	31
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Růst zásobní buněčné kultury.....	33
4.2	Růst buněk po transfekci.....	34
4.3	Volba plazmidu pro transientní expresi.....	35
4.3.1	Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce.....	36

4.4	Srovnání metod transientní transfekce	37
4.4.1	Metoda transfekce 1 - Muller (2005)	37
4.4.2	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	37
4.4.3	Metoda Backliwal (2008).....	37
5	Závěr.....	41
6	Seznam použitých zdrojů	42
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	45
8	Seznam příloh.....	46
9	Přílohy	47
9.1	Složení médií a pufrů	47
9.1.1	LB médium.....	47
9.1.2	Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA.....	47
9.1.3	DMEM/F-12 médium.....	48
9.1.4	BV 293s médium.....	49
9.2	Metoda transfekce 1 – Muller (2005).....	49
9.3	Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)	63
9.3.1	Bezsérová kultivace.....	63
9.3.2	Kultivace s 1% přídavkem koňského séra.....	64
9.4	Metoda transfekce 3 – Backliwal	66

1 ÚVOD

Stále významnějším odvětvím biotechnologického a farmaceutického průmyslu se stává výroba rekombinantních proteinů. Rekombinantní proteiny jsou často požadovány ve velkých množstvích, jde o stovky miligramů až gramy r-proteinů. Jedná se zejména o produkci antikoagulantů, vakcín, terapeutik, lidského insulinu, růstových hormonů apod.

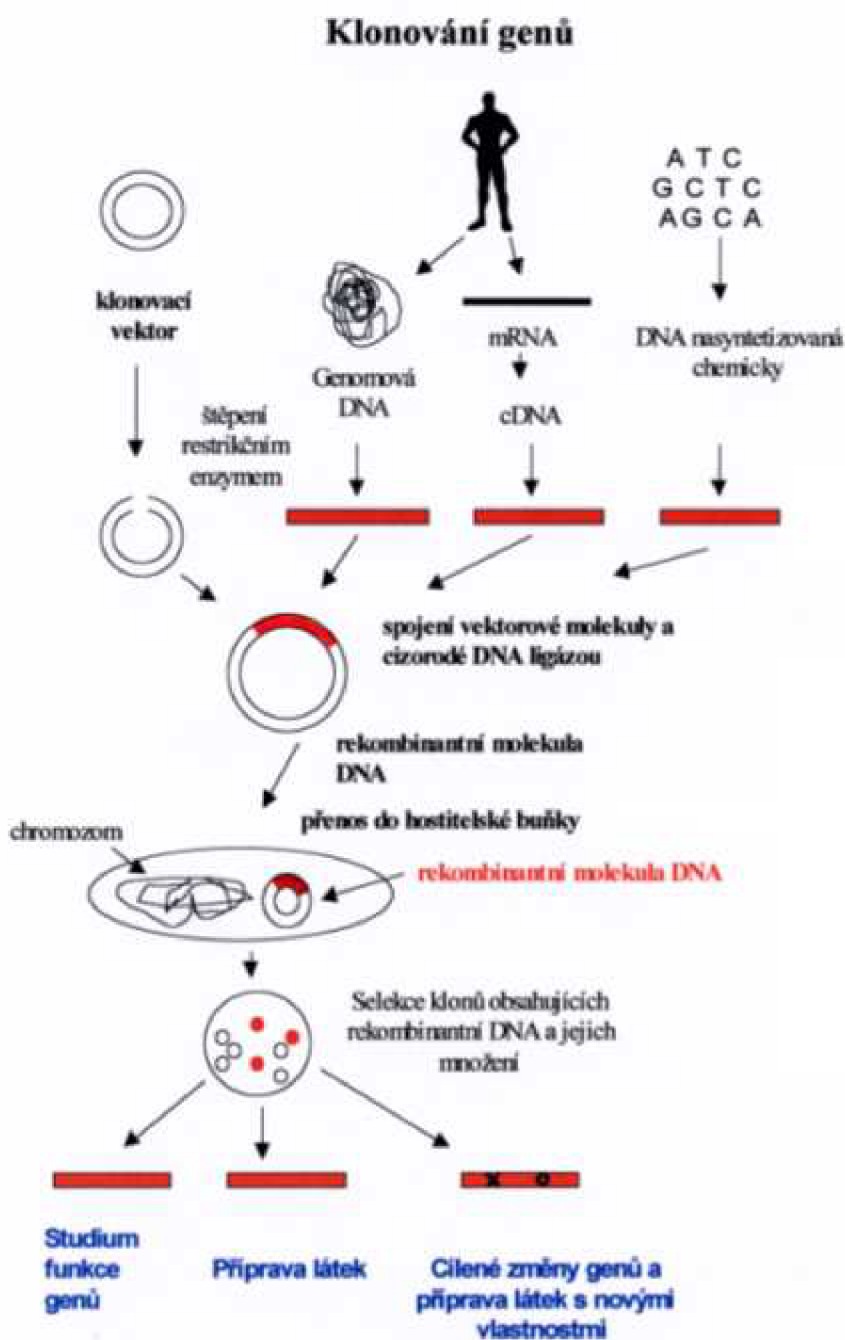
Pro správnou biologickou funkci r-proteinu je důležité, aby byl protein správně sbalen, a aby mu hostitelská buňka zajistila všechny posttranslační úpravy. Po dlouhodobých výzkumech bylo zjištěno, že vhodnými expresními systémy jsou savčí buňky.

Zatím bylo testováno více než 1000 sekvencí DNA kódujících proteiny potenciálně využitelných při léčbě lidských nemocí. Většina těchto molekul byla exprimována v hostitelských buňkách, přibližně 750 postoupilo do dalších klinických testů a 80 látek bylo schváleno jako léčiva v USA i EU. [1] [2]

Tato práce se zabývá problematikou přípravy r-proteinů pomocí transientní transfekce eukaryotních buněk 293 HEK/EBNA. Transfekce je proces cíleného přenosu nukleové kyseliny do hostitelských buněk. Při přechodné (transientní) transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. [2] Cílem práce je vývoj protokolu transientní transfekce na základě poznatků publikovaných dříve. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

Principem genového inženýrství je tvorba rekombinantních (chimérických) molekul DNA. V roce 1973 poprvé popsali Cohen a Boyer techniky tvorby rekombinantních molekul DNA. [3] Klonovaná DNA je získána buď z donorového organismu, jehož DNA kóduje nějakou zajímavou vlastnost, nebo je použit uměle syntetizovaný gen. Prvním krokem při tvorbě rekombinantních molekul je hledání a izolace klonovaného genu. K vyhledání cílové sekvence DNA se konstruují genomové knihovny. Genomová knihovna je soubor naklonovaných fragmentů DNA, které dohromady tvoří genom jednoho organismu. K vyhledání specifického genu se využívá metod třídění genomových knihoven. [4]



Obr. 1: Schéma klonování genů [5]

2.1 Třídění genomových knihoven

2.1.1 DNA/DNA hybridizace

Je založena na párování komplementárních dusíkatých bází jednořetězcových nukleových kyselin pomocí vodíkových můstků. K vyhledání specifického genu se použije krátký oligonukleotidový řetězec, který je částečně (heterologní sonda), nebo zcela (homologní sonda) komplementární s klonovanou sekvencí DNA. DNA sonda nese značku, která je snadno detekovatelná. V oligonukleotidovém řetězci sondy může být zakomponován radioaktivní izotop, který je po hybridizaci sondy se sekvencí DNA detekován např. radiograficky. Sonda může být značena i neradioaktivně, např. imunologicky. K hybridizaci lze použít fragmenty po agarózové gelové elektroforéze, kdy pomocí filtračních papírů a kapilárních sil jsou fragmenty přeneseny (přebíjovány) na nylonovou membránu. Poté jsou fragmenty denaturovány a přidá se sonda, která hybridizuje s cílovými sekvencemi DNA – Southernův blot.

2.1.2 Imunologické testy

Na sondu je navázán antigen. Poté je do roztoku DNA přidána směs primárních protilátek, které se specificky vážou k antigenům. Následně se přidají sekundární protilátky, které nasedají na primární protilátky a zároveň nesou značení, které je snadno detekovatelné, např. enzym (alkalická fosfatáza). Po přidání substrátu je substrát změněn enzymem na produkt a tato reakce je doprovázena barevnou změnou. Poté je signál sondy zjištěn fotometricky.

2.1.3 Proteinová aktivita

Tato metoda se využívá pokud klonovaný gen kóduje syntézu enzymu, který není normálně hostitelskou buňkou produkován. Kolonie jsou zaočkovány na misky s vhodným substrátem (škrob – kolonie obsahující gen pro alfa-amylázu) a na základě selektivního zbarvení se rozliší, které kolonie využívají substrát, a tudíž obsahují cílový gen.

2.1.4 Komplementární test

Komplementární test je využíván, pokud klonovaný gen kóduje syntézu esenciálního produktu (vitamín, antibiotikum, aminokyselina apod.) nezbytného pro přežití buňky. Gen se přenesou do buněk, které nejsou schopné růst na substrátech bez esenciální složky. Pokud buňky získaly rekombinantní plazmid, jsou schopné růst na minimálním médiu a esenciální složku si syntetizují samy.

2.2 Klonovací vektory

Klonovací vektory slouží k přenosu cizorodé DNA do hostitelských buněk. Čím je menší velikost klonovacího vektoru, tím se zvyšuje účinnost přenosu rekombinantní molekuly DNA. Vektory obsahují cílová místa pro restriční endonukleázy. Restriční endonukleázy jsou enzymy, které vektor naštěpí a do tohoto místa je vložen gen zájmu. Na vektoru je vždy jen jedno místo pro danou nukleázu. Dále vektoru obsahuje selekční marker, který umožňuje identifikovat, které buňky získaly vektor. Jako selekční markery se často využívají geny pro rezistenci k antibiotiku (např. ampicilin). Po provedení přenosu rekombinantní DNA do hostitelských buněk senzitivních na antibiotikum, jsou buňky vysety na médium s přídatkem antibiotika. Přežijí jen ty buňky, které získaly vektor.

Jako vektory se nejčastěji používají plazmidy. Jsou to kruhové samoreplikující se extrachromozomální molekuly DNA izolované z bakterií. Obsahují sekvenci ori, místo počátku replikace.

Dále fágové vektory odvozené od fága lambda a od fága M13. Cizorodá DNA se množí v lytickém cyklu fága jako rekombinantní DNA fága lambda. Poté se vytvoří viriony (fágové částice), které se skládají z DNA zabalené v hlavičce, ke které je připojen bičík. Za přítomnosti virionů se na vrstvě buněk začnou tvořit plaky.

Hybridy mezi plazmidy a fágy jsou kosmidy. Spojují výhody obou typů vektorů. Pomocí fágových částic je DNA injikována do hostitelských buněk. Kosmid obsahuje dvě cílová místa, které se v hostitelské buňce spojí a vznikne kruhová molekula DNA. V hostitelské buňce jsou poté uchovávány jako plazmidy. Dále kosmid obsahuje gen pro rezistenci na tetracyklin pro selekci v hostitelských buňkách, které jsou citlivé na tetracyklin. Výhodou kosmidů je velká klonovací kapacita (viz. tabulka č.1). Pomocí těchto vektorů lze klonovat i soubory genů (operony).

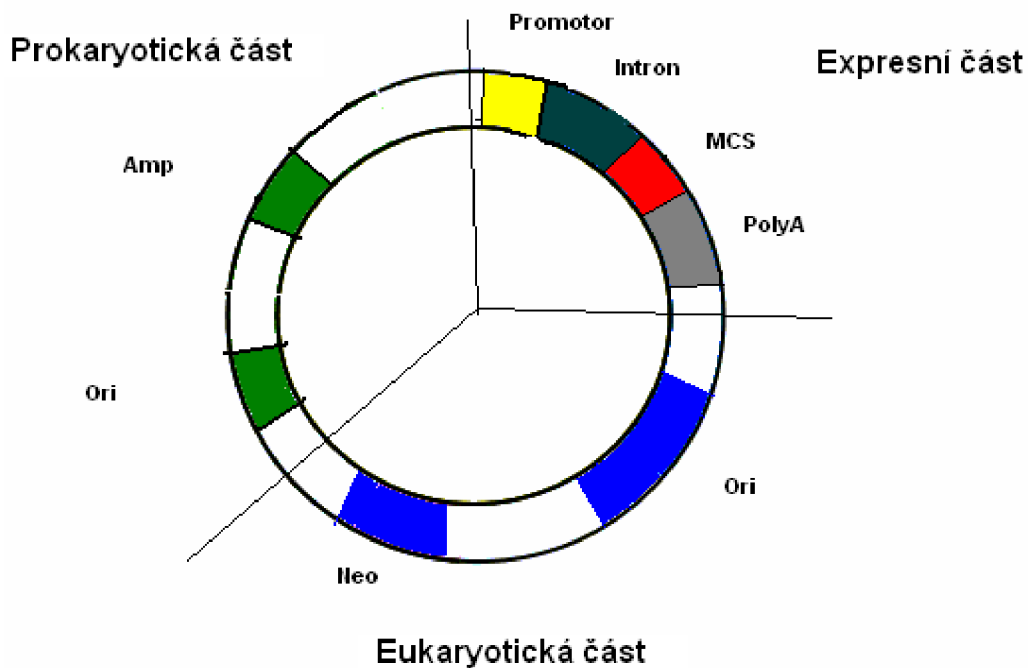
Tab. 1: Klonování kapacity vektorů [4]

vektor	Hostitelská buňka	Klonování kapacita (kb)
Plazmid	<i>E. coli</i>	0,1 – 10
Bakteriofág λ	λ / <i>E. coli</i>	10 – 20
Kosmid	<i>E. coli</i>	35 -45
Bakteriofág P1	<i>E. coli</i>	80 – 100
Bakteriální umělý chromozom	<i>E. coli</i>	50 – 300
P1 bakteriofágový umělý chromozom	<i>E. coli</i>	100 – 300
Kvasinkový umělý chromozom	kvasinky	100 – 2000
Lidský umělý chromozom	Lidské buňky	> 2000

Eukaryotické geny nemohou být správně exprimovány v bakteriálních vektorech. Eukaryotické geny obsahují introny a exony. Prokaryotické buňky nejsou schopny vystřihávat introny z přepsané RNA. Pro klonování eukaryotických genů v bakteriálních buňkách byly vytvořeny speciální postupy.

Z organismu se vyizoluje celková RNA. Eukaryotní mediátorová RNA nese na 3' konci polyadenylový konec. Mediátorová RNA se oddělí od celkové pomocí kolony, která obsahuje polythymínové zbytky, na které se navážou polyadenylové konce mRNA pomocí vodíkových můstků. Poté jsou štěpeny vodíkové můstky pomocí speciálního pufru a RNA je eluována ven z kolony. Mediátorová RNA je přepsána do DNA za pomoci enzymu reverzní transkriptázi. Výsledkem je fragment dvouřetzcové cDNA (komplementární DNA). Konstrukt vektor-cDNA může být vnesen do hostitelské buňky *E. coli*. Pro expresi eukaryotních genů jsou využívány kvasinkové, hmyzí a savčí vektory.

Eukaryotický expresní vektor obsahuje: eukaryotický markerový gen pro selekci v hostitelské buňce, promotorovou sekvenci, transkripční a translační stop signály, sekvence pro posttranskripční úpravy RNA, počátek replikace funkční v hostitelské buňce (extrachromozomálně replikující se DNA), nebo integrační místo pro rekombinaci do genomu hostitelské buňky. [4]



Obr. 2: Mapa plazmidu – plazmid se skládá ze tří částí. Prokaryotická oblast nese místo *ori* (počátek replikace) a gen pro rezistenci k ampiclinu funkční v buňkách *E. coli*. Pro eukaryotní buňky slouží sekvence *ori* a gen pro rezistenci k neomycinu. Expresní oblast obsahuje promotor, za kterým následuje klonovací místo (MCS = multiplecloning site).

Vektory pro expresi eukaryotních genů jsou konstruovány jako kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje *ori* místo a selekční marker funkční v *E. coli*. Dále obsahuje *ori* místo, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS (multiple cloning site) s promotorovou a terminátorovou sekvencí. [2]

2.3 Endodeoxyribonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které štěpí DNA ve specifických místech, rozpoznávají palindromické sekvence. Restrikční endonukleázy byly izolovány z různých bakteriálních kmenů. Jsou označeny zkratkami podle toho, z jaké bakterie byly získány (např. EcoRI z *Escherichia coli*). Původní význam těchto enzymů je ochrana před cizorodými DNA, např. virovými. Aby se zamezilo štěpení hostitelské DNA, je chráněna před působením enzymů methylací. Tyto enzymy se využívají při tvorbě rekombinantní (chimérické) DNA. Vektor i cílový fragment cizorodé DNA je naštěpen stejnou endonukleázou. Štěpení fragmentů probíhá za vzniku přečnívajících nebo tupých konců.

2.4 Tvorba rekombinantní molekuly

Z donorového organismu je izolována DNA. Poté je nalezen cílový gen a vyštěpen pomocí restrikční endonukleázy. Stejnou restrikční endonukleázou je naštěpen plasmid v cílovém místě pro enzym, které sousedí s klonovacím místem. Vznikne lineární molekula plasmidové DNA s přečnívajícími konci se sekvencemi nukleotidu podle použitého enzymu. Linearizované molekuly jsou smíchány s cílovou DNA a směs je inkubována s DNA ligázou za přítomnosti ATP. Vznikne rekombinantní molekula (plasmid-insert). [4]

2.5 Přenos DNA do buněk

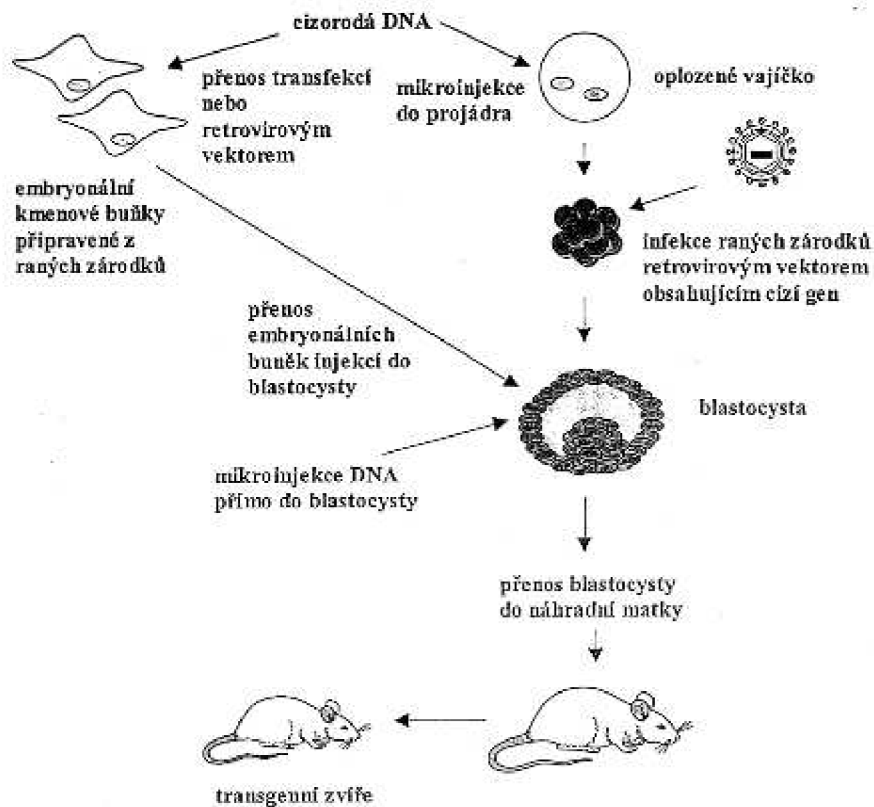
V přírodě často probíhá přirozený přenos DNA do hostitelských buněk. K tomu dochází při bakteriální konjugaci, přirozené transformaci nebo k přenosu DNA během virové infekce. DNA lze do buněk přenášet i za pomoci fyzikálních nebo chemických sil.

2.5.1 Chemický přenos

Buňky a roztok DNA jsou inkubovány v prostředí roztoku chloridu vápenatého při teplotě 0°C. Poté je roztok zahřát na teplotu 42°C. K roztoku obsahujícím DNA a CaCl₂ se postupně přidává HEPES-fosfátový pufr. Směs se inkubuje při laboratorní teplotě, a poté je vzniklá sraženina dispergována v prostředí buněk. Doba inkubace musí být optimalizována (je zpravidla kratší než 4 hod). [6]

2.5.2 Mikroinjekce

Pomocí mikroinjekce se DNA přenesou přímo do jádra buňky. Tato technika je velmi náročná a zabere mnoho času. Využívá se především při tvorbě transgenních zvířat, kdy je DNA mikroinjekcí vpravena buď do projádra nebo přímo do blastocysty. [5]



Obr. 3: Tvorba transgenních savců [5]

2.5.3 Přenos pomocí liposomů

Na základě hydrofobního efektu se lipidy ve vodném prostředí shlukují k sobě a vytváří duté struktury zvané lipozomy. Díky elektrostatickým interakcím se navzájem přitahují kladně nabití lipidy se záporně nabitou DNA za vzniku agregátů. Částice nesoucí kladný náboj interagují se záporně nabitou buněčnou membránou, která je rovněž hydrofobní, a poté je uskutečněn vstup do hostitelské buňky. Provedení této transfekce je drahé, protože ceny transfekčních lipidů jsou vysoké, a proto se tato transfekce uskutečňuje pouze v menších objemech. [2]

2.5.4 Elektroporace

Elektroporace je reverzní permeabilizace buněk elektrickým polem o vysokém napětí. Elektrotransformace probíhá za nefyziologických podmínek. Připraví se elektrokompetentní buňky a poté se na směs buněk a přenášených molekul aplikuje krátký elektrický puls při nízké teplotě. Následuje regenerace buněk. Optimální podmínky elektrotransformace se nalézají v úzkém rozmezí elektrického napětí a doby trvání pulzu.

Tab. 2: Rozmezí elektrického napětí pro různé typy buněk [6]

G -	7 – 15 kV/cm
G +	až 35 kV/cm
rostlinné, živočišné buňky	1 – 2 kV/cm

Během elektroporace zahyne velký počet buněk. Závisí na biologických faktorech jako je stáří buněk, velikost buněk, koncentrace a způsob regenerace buněk.

Molekulární mechanismus elektrotransformace není znám. Existuje teorie přechodné tvorby hydrofilních pórů, která dobře popisuje děje probíhající při pokusech s buňkami po stránce kvalitativní, ne však kvantitativní. Hlavními nevyřešenými problémy jsou: popis raného stadia tvorby pórů, transport molekul póry a návrat membrány do původního stavu.

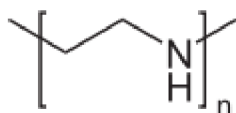
Z doposud známých experimentálních dat lze vyvozovat, že mechanismus přenosu zahrnuje interakci DNA s povrchem buňky, difúze DNA indukovaná elektrickým polem a pasivní difúze. Aplikace elektrického pole není podmínkou přenosu DNA, proces ale urychluje.

2.5.5 Syntetické komplexy DNA-ligand

DNA kondenzuje s polykationtem - poly-L-lysinem. Polykationt se váže jak s DNA, tak s ligandem. Vytvoří se komplex DNA-polykationt-ligand. Ligand je specifický pro povrchový receptor buňky a je zodpovědný za počáteční interakci komplexu s buňkou.

DNA je možné přenést také pomocí polymerního kationtu (DEAE-dextran, PEI), který asociuje se záporně nabitými molekulami DNA. Vzniklý komplex je kladně nabitý a váže se na záporně nabitou lipidovou dvojvrstvu. Následuje přenos komplexu pomocí endocytózy. [6]

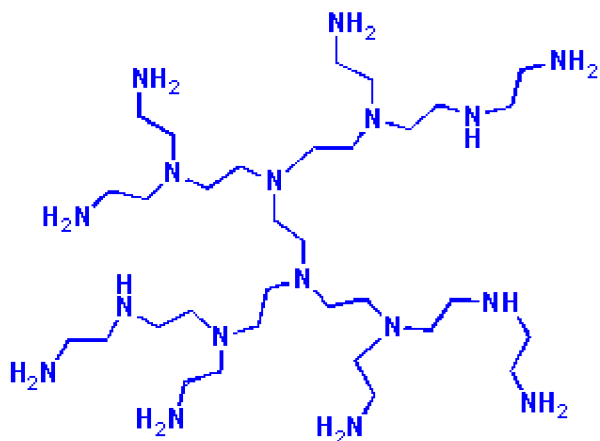
2.5.5.1 Polyethylenimin (PEI)



Obr. 4: Vzorec polyethyleniminu, zdroj internet: <http://commons.wikimedia.org/>

Polyethylenimin je polymerní sloučenina, jejíž základní jednotkou je ethylenimin. PEI se může vyskytovat jako lineární forma, která se nachází při pokojové teplotě v pevném stavu. Druhou formou je rozvětvený polyethylenimin, který je tekutý. Oba typy PEI se používají jako transfekční činidlo s různým stupněm polymerace a různou molekulovou hmotností. V roce 1995 byl PEI poprvé použit pro přenos DNA. [7]

Molekula PEI má pufovací schopnosti. Rozvětvená forma tvoří primární, sekundární a terciální aminy. Atomy dusíku obsažené v molekule PEI mohou být protonovány, což udílí molekule náboj. Čím více atomů dusíku je v molekule obsaženo, tím je větší náboj. Informace o celkové pufovací kapacitě je důležitější než určení disociační konstanty pKa molekuly polyethyleniminu. [2] [8]



Obr. 5: Rozvětvený polyethylenimin, zdroj internet: <http://www.hyperpolymers.com/>

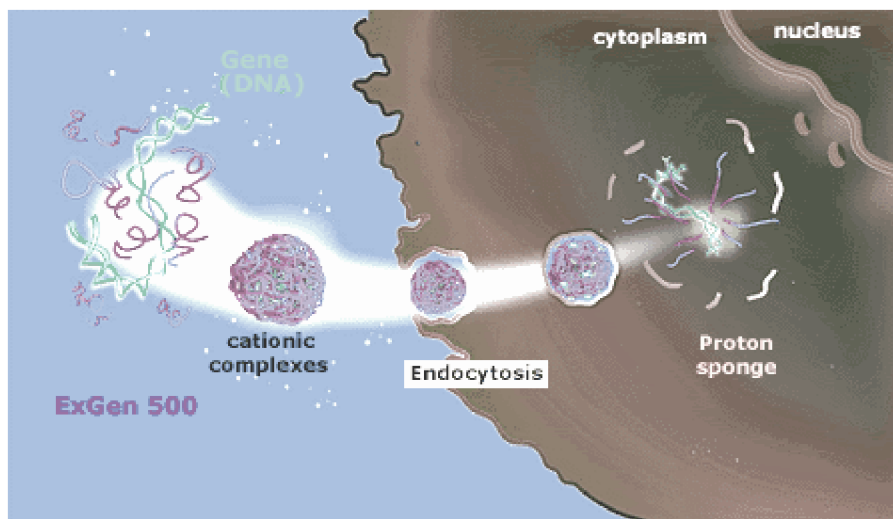
Před samotnou transfekcí se připraví roztoky DNA a PEI o přesné koncentraci a roztoky se smíchají. Poté dojde ke kondenzaci molekul a vzniku komplexu DNA/PEI na základě hydrofobních interakcí. [10] Komplexy DNA/PEI se shluknou k sobě a vzniknou kladně nabitě nanočástice. Nanočástice se poté naváží na buněčné záporně nabitě proteoglykany a glykoproteiny na povrchu buněčné membrány. [11] Dvnitř buněk pronikají pomocí endocytózy. PEI chrání endozóm před působením lysozomálních nukleáz. Uvnitř buňky se uvolní DNA z endozómu díky pufovací schopnosti PEI tím, že absorbuje protony při acidifikaci endozómu – tzv. houbový protonový efekt. [12] To vede k nahromadění kladného náboje, což způsobí influx chloridových aniontů a vody do endozómu. Endozóm nabobtná, uvnitř se zvyšuje osmotický tlak, což vede k prasknutí endozómu. [13]

Této domněnce však odporuje skutečnost, že v komplexu DNA/PEI je asi 85% molekul PEI volných [14], a také pKa PEI je přibližně 8,4 [15], takže po acidifikaci má PEI jen malou pufovací kapacitu. Z těchto důvodů je nepravděpodobné, že osmotické pnutí hraje významnou roli při prasknutí endozómu. [14]

Existuje teorie, že komplex DNA/PEI je transportován pomocí mikrotubulů k jádru, kde se část komplexu rozpadne díky přítomnosti RNA. RNA má vyšší afinitu k PEI než DNA. [10] DNA pak samostatně přechází přes jadernou membránu a poté se v jádře začlení do chromozomu. Mechanismus těchto pochodů není zatím zcela objasněn. [14] [16]

V průběhu transfekce a uvolnění DNA z komplexu záleží na předem zvoleném poměru DNA:PEI.

Pomocí AFM (atomic force microscopy – mikroskopie atomárních sil) byly studovány velikosti komplexu DNA/PEI. Velikost byla stanovena na 20 až 40 nm. Přesné poměrové zastoupení DNA v komplexech DNA/PEI zatím není známo. Transfekce pomocí PEI byly testovány v různých objem. [7] [17] [18]



Obr. 6: Schéma přenosu DNA do jádra buňky, zdroj Internet: <http://www.biomol.de/>

2.6 Hostitelské buňky a organismy

Při výběru hostitelského organismu je potřeba zvážit, zda chceme klonovat geny prokaryotní, nebo eukaryotní. Při expresi eukaryotních genů hostitelská buňka zajistí všechny posttranskripční a posttranslační úpravy. Vzniklý protein je často identický s přirozeně se vyskytujícím a je biologicky aktivní.

2.6.1 Prokaryotní buňky

Nejdetaillněji prostudovaný organismus, který se používá pro klonování genů je *Escherichia coli*. Výhodou je vysoká účinnost transformace a fakt, že existuje řada expresních vektorů s regulovatelnými promotory funkčních v *E. coli*. Nevýhodou je, že řada cizorodých proteinů se nevytváří ve funkční podobě.

Jako další hostitelské organismy z řady G - bakterií se využívá *Bacillus sp.* Tyto nepatogenní mikroorganismy produkují množství extracelulárních enzymů, které lze lehce izolovat z média. Snadno se kultivují a adaptují na řadu podmínek kultivace. Lze připravit řadu mutantů hyperprodukcující enzymy i jiné látky.

2.6.2 Kvasníky

Jedná se o jednobuněčné eukaryotní organismy. Řada kvasinkových genů je homologních s geny mnohobuněčných eukaryotních organismů, mají podobnou buněčnou biochemii a regulaci genů. U kvasinek lze stanovit dominanci a recesivitu alel. Mají krátkou generační dobu a vysoký počet jedinců, kultivují se na definovaných půdách a také ve velkokapacitních bioreaktorech. Jsou považovány za bezpečný (GRAS – generally recognised as safe) biotechnologický organismus, což umožňuje přípravu léčiv pro humánní medicínu. Tvoří eukaryotické proteiny v aktivní podobě, lze dosáhnout sekrece do prostředí. K nejčastěji

používaným druhům patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* a *Hansenula polymorpha*. [4] [5]

2.6.3 Rostliny

Výhodou rostlin při genetických manipulacích je totipotence, což znamená, že celou rostlinu můžeme vypěstovat z jakékoliv její části. Mezi další výhody se řadí schopnost regenerace, velký počet semen, krátká generační doba a asexuální křížení. Rostlinné biochemické dráhy poskytují průmyslové suroviny a léčiva. Modelovým organismem pro účely molekulární genetiky je *Arabidopsis thaliana*.

Jednou z možností přenosu cizorodé DNA je přenos pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie přirozeně infikuje rostliny a vnese do nich Ti-plazmidy (tumor indukující plazmidy) obsahující cílové sekvence. [5]

2.6.4 Živočišné buňky

Jsou izolovány z tkání živočichů a poté kultivovány in vitro. Při kultivaci je nutné zajistit podmínky, které se podobají přirozeným, proto se udržují při teplotě 37°C a v modifikované atmosféře (5% CO₂). Veškeré manipulace s buňkami musí být prováděny ve sterilním prostředí. Většina buněk roste přisedlá k pevnému povrchu, jako v původní tkáni. K růstu je nutné použít kultivační médium, které buňkám dodává potřebné živiny a další pro život důležité látky.

K nejčastěji používaným patří CHO (Chinese Hamster ovary) – buňky původně izolované z křeččích vajíček a 3T3 – buňky z myších vajíček.

HEK 293 (humam embryonal kidney) – epiteliální lidské ledvinové buňky a HeLa (Henrietta Lacks) – epiteliální buňky z rakovinných buněk. [2] [19]

2.6.4.1 Buňky 293HEK/EBNA1

Tyto buňky byly poprvé připraveny roku 1970 v laboratoři Alexe van der Eba v holandském Leidenu. Byl získány ze zdravých potrácených lidských plodů a poprvé kultivovány jako primární HEK buňky. Později byly upraveny pomocí pěti adenovirových genů. [20] Zkratka HEK označuje lidské embryonální ledvinové buňky a číslo 293 označuje 293. Grahamův pokus.

Tyto buňky se dobře kultivují a probíhá u nich relativně snadná transfekce, proto se využívají ke tvorbě rekombinantních proteinů. Protože se jedná o lidské buňky, jsou u exprese zajištěny správné posttranskripční a posttranslační modifikace. Jsou tedy vhodné pro klinický výzkum i pro tvorbu lidských terapeutik.

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů

do dceřinných buněk při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22] V dnešní době jsou buňky 293HEK/EBNA nejvíce používané buňky pro velkoobjemovou transienční expresi. [2]

2.7 Reportérové geny

Expresi těchto genů lze snadno detekovat a kvantitativně stanovit. Mohou tudíž sloužit jako měřítko exprese transgenů s různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypch a za různých podmínek.

2.7.1 Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu

Chloramfenikoltransferáza je bakteriální enzym, který nezpůsobuje rezistenci k chloramfenikolu, protože se používá u eukaryotních buněk, které jsou přirozeně rezistentní. Tento enzym acetyluje 14C-chloramfenikol. Po přidání extraktu z rostlin se značený chloramfenikol přeměňuje na značený acetylovaný chloramfenikol, který lze chromatograficky stanovit. Výsledek je možné hodnotit kvantitativně.

2.7.2 Transgen pro β -glukuronidázu

Jedná se o bakteriální enzym *E. coli*, který se označuje jako GUS. Zatím nejúspěšnější transgen používaný při tvorbě transgenních rostlin. Tento enzym mění vhodné substráty na modré produkty nebo fluoreskující látky. Existují dvě metody detekce aktivity.

Fluorescenční metoda, která se provádí v homogenátu se substrátem MUG (4-metyl umbelliferyl glukuronid). Po ozáření rozloženého MUG dlouhovlnným UV 365 nm dává modrou fluorescenci 570 nm.

Druhá metoda je histochemická. Používá se chromogenní substrát X-gluc (glukuronid), který po rozštěpení dává modrou barvu, která je nerozpustná a zůstává v buňkách.

2.7.3 Transgen pro luciferázu

Využívají se cDNA ze světlušky *Photinus pyralis* nebo kódující sekvence G - bakterie *Vibrio harvei*. Po dodání substrátu (luciferin, ATP) k buněčnému extraktu, nebo do kultivačního média dochází k emisi záření měřitelného luminometrem, scintilačním počítačem, nebo CCD kamerou. Nevýhodou je, že substrát je poměrně drahý.

2.7.4 Transgen pro zeleně fluoreskující protein (GFP)

Jedná se o gen z medúzy *Aequorea victoria*. Protein GFP přeměňuje modré světlo na zelené. Má schopnost emitovat zelené světlo po ozáření modrým světlem (440-480 nm). Je to jediný protein, který má schopnost fluoreskovat bez dodání substrátu nebo kofaktorů. Zachovává si schopnost fluoreskovat, i když je fúzován s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i N-konci. Mutacemi byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou vlnovou délku. [5]

2.7.5 Transgen pro alkalickou fosfatázu

Alkalická fosfatáza (ALP) je hydrolytický enzym optimálně působící při alkalickém pH, vyskytuje se v krvi v mnoha různých formách, které se vytváří v kostech a v játrech, ale i v jiných tkáních, jako např. v ledvinách, placentě, střevech, varlatech, brzlíku, plicích a tumorech. Fyziologické zvýšení ALP se vyskytují i u dětí při růstu kostí, v těhotenství, zatímco patologická zvýšení většinou souvisí s hepatobiliárním procesem a s kostním onemocněním. U hepatobiliárního onemocnění ukazuje na obstrukci žlučovodu, jako např. u cholesterázy vyvolané žlučovými kameny, nádory nebo zánětem. U kostních onemocnění je zvýšená činnost ALP vyvolána zvýšenou osteoblastickou činností, jako např. u Pagetovy nemoci, při měknutí kostí (rachitidě), kostních metastázích a hyperparatyreoidismu.

Za gen zájmu byl zařazen reportérový gen pro alkalickou fosfatázu, což je snadno detekovatelný protein. K buněčné suspenzi se přidává substrát, který je účinkem alkalické fosfatázy změněn na produkt. Tato reakce je provázena barevnou změnou a intenzita zbarvení je změřena fotometricky.

2.8 Transientní (přechodná) transfekce

Transientní transfekce se využívá k produkci rekombinantních proteinů. Výhodou přechodné transfekce je rychlost produkce r-proteinů.

Při přechodné transfekci nedochází po proniknutí cizorodé DNA do hostitelské buňky k začlenění do hostitelského genomu. Cizorodá DNA pronikne do jádra hostitelské buňky a následuje exprese a syntéza rekombinantního proteinu. Rekombinantní protein lze detekovat již pár hodin po transfekci. DNA se nepřenáší při mitóze na dceřinné buňky, tudíž je transientní transfekce časově omezená. Výtěžky této transfekce se řádově pohybují v miligramech až gramech.

Pro transientní transfekci do savčích buněk může být jako transfekční činidlo použit fosforečnan vápenatý, [23] nebo polyethylenimin. [24] Transfekce probíhá buď v malých objemech buněčné suspenze (ml), nebo v bioreaktorech, které dosahují objemů o velikosti až stovek litrů. Pátý až desátý den po provedení transfekce dochází k produkci několik miligramů až gramů r-proteinu. [17] [22] [18] [25] [26]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Chemikálie

Tab. 3: Použité chemikálie:

Plasmidové DNA: pCEP4, peBSV, pcDNA3,1, pcDNA 5, pCI, pEAK 8 , přečištěné
Polyethylenimin (PEI), lineární (1 mg/mL)
Fosfátový pufr (PBS)
DMEM/F-12 médium Biovendor
DMEM/F-12 médium Biowest
FCS (telecí sérum)
BV 293s médium
HYclone médium (CDM4 293)
Glukóza (25 %)
L-glutamin (2 mM)
HS (koňské sérum)
DMSO (dimethyl sulfoxid)
Trypsin (EDTA)
PBS pH 7,6 ± 0,2 (NaCl 7,75g; K ₂ HPO ₄ 1,50g; KH ₂ PO ₄ 0,20g v 1 l destilované vodě)
NaCl (150 mM)
Geneticin G418 (100 mg/ml)
Ampicilin (200 mg/ml)
Trypanová modř (0,4 % w/v)
PEI – polyethylenimin (1 mg/ml)
Pluronic (1% w/v)
Kit pro izolaci DNA
Kit pro stanovení alkalické fosfatázy

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Tab. 4: Použité přístroje a pomůcky

Laminární box pro sterilní práci
Centrifuga
Humidifikovaný CO ₂ inkubátor (5% CO ₂ , 37°C)
Orbitální třepačka
Spektrofotometr
Světelný mikroskop
Přístroj pro gelovou elektroforézu
Kultivační láhve T-75 cm ²
Sérologické pipety 1, 2, 5, 10, 25 ml
Mikropipety
Kryovialky na zamrazování
Jednorázové tuby 12–50 ml
Jednorázové zkumavky eppendorf
Sterilní rukavice
Sterilní filtry a dávkovače

3.1.3 Buňky a kultivační média

Pro tento experiment byly použity buňky 293HEK/EBNA1. Jak už bylo uvedeno v teoretické části, jedná se o lidské ledvinové buňky získané z potracených plodů. Do genomu těchto buněk byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukaryotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transienční transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA1 buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřinných buněk při buněčném dělení. [22]

Tyto buňky se snadno kultivují. Kultivace probíhá ve dvou fázích. Zpočátku se provádí kultivace v kultivačních lahvích T-75, kdy jsou buňky přisedlé na dně nádoby. Jako médium se používá DMEM/F-12 s 10% přidavkem telecího séra (FCS). Sérum udrží buňky přisedlé na dně nádoby. Jakmile buňky dosáhnou 80–90% konfluency pasážují se, rozsazují se do dalších lahví.

Druhou fází je suspenzní kultivace. Pro tuto kultivaci je používáno BV 293s médium s 1% přidavkem séra, nebo se kultivuje bezsérově. Buňky se uchovávají ve čtyřhranných skleněných lahvích. Důležité je zvolit správný objem, který činí asi 30% z objemu láhve, aby bylo zajištěno optimální množství kyslíku. Láhve se umísťují na orbitální třepačku, aby se buňky neshlukovaly, umístěnou v humidifikovaném inkubátoru. Rychlost rotace se pohybuje kolem 100 – 250 rpm při průměru otáčení 1,2; 2,5 a 5 cm. Po celou dobu kultivace se sleduje počet buněk a jejich nárůst. Odebírají se vzorky a pomocí trypanové modře a Bürknerovi komůrky se buňky spočítají. Jakmile buňky dosáhnou exponenciální fáze růstu, jsou připraveny pro transfekci. Pokud se počet buněk zdvojnásobí za 24 hod, jsou buňky v exponenciální fázi.



Obr. 7: Kultivační média (Lonza), zdroj internet: <http://www.eastport.cz/>

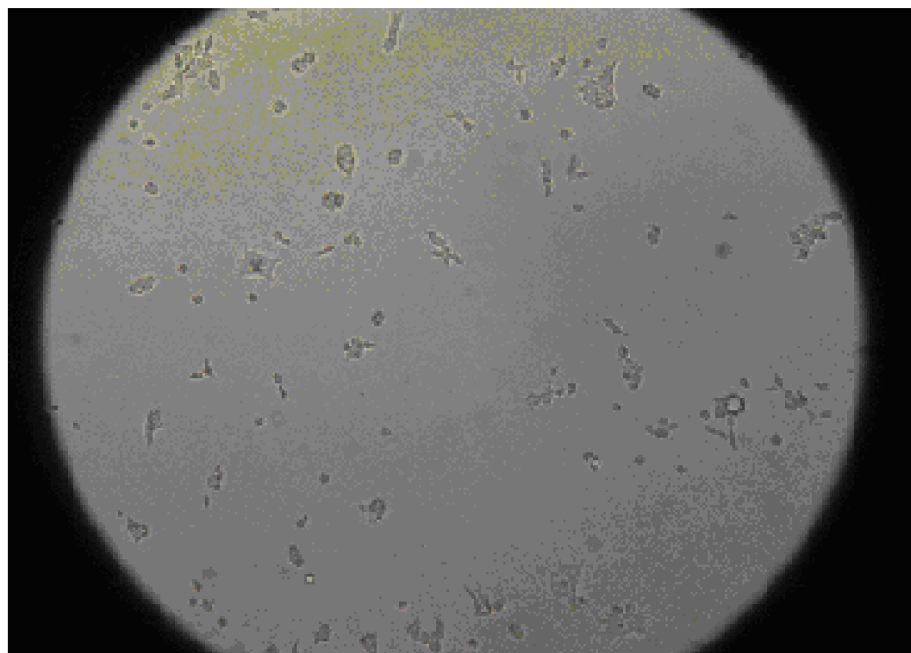
3.1.4 Metody

Rozmražení buněk a kultivace
Pasážování a zamražení buněk
Počítání buněk pomocí trypanové modři
Převedení na suspenzní linii
Izolace a purifikace plasmidové DNA
Metoda transfekce 1 - Muller (2005)
Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)
Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)
Stanovení exprese reportérového genu

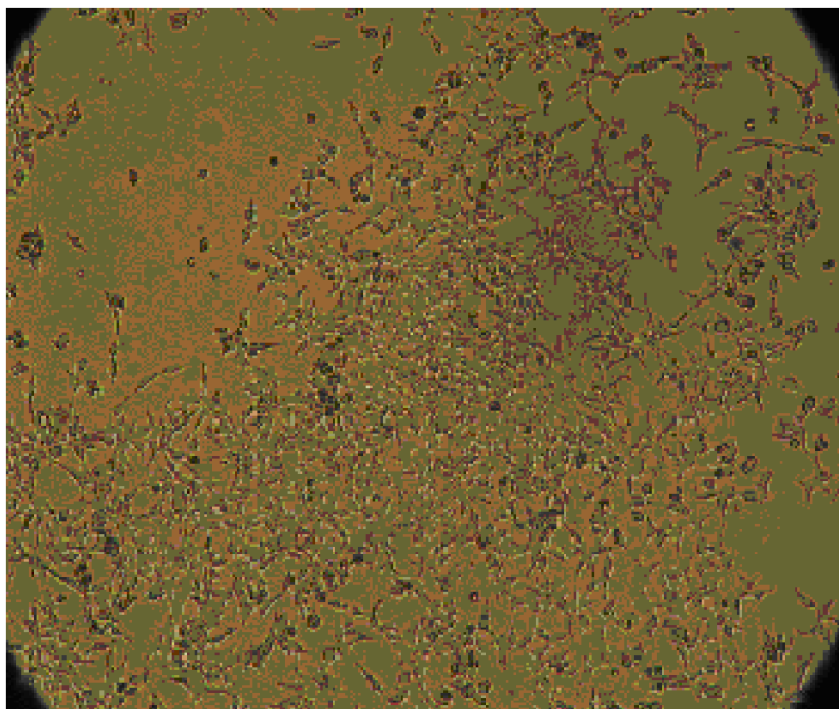
3.1.5 Rozmražení buněk a kultivace

Buňky 293HEK/EBNA1 jsou dlouhodobě skladovány při nízkých teplotách (-196°C) pod tekutým dusíkem v kryogenním boxu.

Předem bylo připraveno 12 ml kompletního vyhřátého média do T-75 (75 cm²) kultivačních lahví, DMEM/F-12 s přidavkem 10% FCS, aby buňky přisedly ke dnu. Po 2 – 4 hod bylo vyměněno médium za nové kompletní médium, aby se z původního média odstranily zbytky zamrazovacího média dimethyl sulfoxid (DMSO), které je pro buňky toxické. Po 24 hod bylo staré médium odsáto a nahrazeno novým kompletním médiem s přidavkem antibiotika G418 (geneticin). Přidává se 250 µg na 1 ml. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5% CO₂ v humidifikovaném inkubátoru dokud nedosáhly 80-90 % konfluence (normálně 4 – 7 dní).



Obr. 8: Buňky po rozmražení



Obr. 9: Buňky HEK293 EBNA1 3. den po rozmražení

3.1.6 Pasážování a zamražení buněk

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné membrány.

Pro další kultivaci v T-75 lahvích bylo odebráno 0,25 – 1 ml ztrypsinizovaných buněk a přidáno do nové lahve T-75 s 15 – 20 ml kompletního média s antibiotiky.

Zbylá ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a RT. Byl odsát supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v předem na ledu vychlazeném zamrazovacím médiu (9 ml DMEM/F-12 s 10% FCS + 1 ml DMSO). Buněčná suspenze byla rozpipetována do kryovialek, které byly ihned postaveny do ledu. Poté byly kryovialky zabaleny do vrstvy buničiny, obaleny alobalem a přemístěny do mrazáku s teplotou - 80 °C. Po 24 hod byl rozmražen kontrolní vzorek, zda byly buňky správně zamrazeny. Pokud bylo zamražení úspěšné, byly buňky přesunuty do kryogenního boxu.

3.1.7 Počítání buněk pomocí trypanové modři

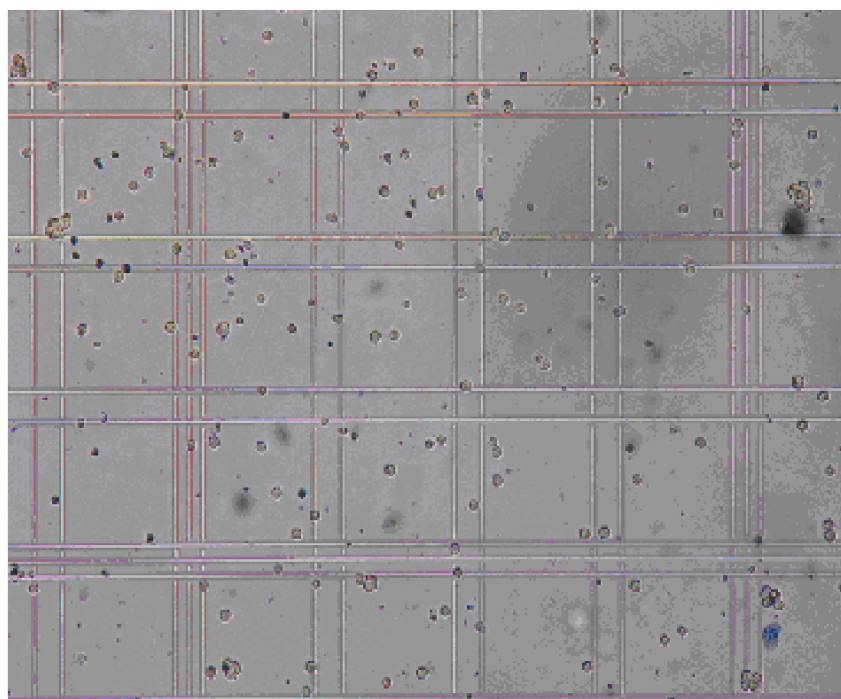
Bylo odebráno 100 μl z buněčné suspenze. Pomocí vortexu byly rozbity shluky buněk a bylo přidáno 100 μl 0,4% roztoku trypanové modře. Vše bylo řádně promícháno a suspenze byla inkubována po dobu asi 5 min. Do Bürkerovy komůrky s přikolopeným podložním sklíčkem byl napipetován vzorek a pod mikroskopem byly spočítány živé (žluté) a mrtvé (modré) buňky v 10 čtvercích a na levé a horní hranici čtverce. Počet buněk byl spočítán podle vzorce:

$$X = x \cdot 2 \cdot 2,5$$

X - denzita buněk v 1 ml

x – počet buněk v 10 čtvercích

(2 – vztaženo na ředění buněčné suspenze: trypanové modři = 1:1; 2,5 – vztaženo na rozměr jednoho čtverce)



Obr. 10: Počítání buněk v Bürkerově komůrce (hemocytometr) – žluté (živé) a modré (mrtvé) buňky

3.1.8 Převedení na suspenzní linii

Po dosažení 80-90% konfluency bylo odsáto médium z lahve. Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS, aby se odstranily zbytky starého média. Byly přidány 4 ml trypsinu na vrstvu přisedlých buněk, který byl předem vyhřát na pokojovou teplotu, aby se buňky odpoutaly ode dna. Trypsin působil 1 - 4 min. Celý proces byl sledován a kontrolován

pod mikroskopem. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 4 ml kompletního média, jinak by trypsin postupně úplně rozbil buněčné stěny.

Ztrypsinizovaná buněčná suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 min při 250 g a při pokojové teplotě (RT – room temperature).

Poté byl odsát supernatant a bylo přidáno 20 ml BV 293s s 1% přidáním HS a buňky byly resuspendovány. Zpočátku byly buňky kultivovány v T-75 kultivačních lahvích v 20 ml média a po dosažení 90% konfluency byly zbaveny média se sérem a resuspendovány v čerstvém médiu bez séra. Poté přesazeny do 250ml čtyřhranných skleněných lahví s 50 ml média. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku o rychlosti míchání cca 100 rpm při průměru rotace 2,5 cm. Byl sledován počet buněk a s růstem počtu buněk bylo postupně navyšováno množství kultivačního média. Konečný objem buněčné suspenze byl 400 ml, kdy buňky byly kultivovány v 11 čtyřhranných skleněných lahvích. Denzita buněk se udržovala do 4 miliónů/ml a obsah HS se postupně snižoval až na nulu. Do kultivačního média bylo přidáváno antibiotikum – geneticin, který zajišťoval selekci buněk. Přídavek geneticinu do kultivačního média byl 250 µg/ml.

3.1.9 Izolace a purifikace plasmidové DNA

Byly izolovány plasmidové DNA pro pozdější transfekce: pEAK 8, pCEP4, pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1, což je gen kódující epitop Epstein-Barr viru (EB viru), sekvence ori P odpovídající počtu replikací EB viru a reportérový gen pro alkalickou fosfatázu.

Na izolaci byl použit kit Genomed pro izolaci plasmidové DNA.

Na Petriho misku byla zaočkována kultura *Escherichia coli* pomocí křížového roztěru a ponechána v termostatu (37°C). Po narostení kultury byla pomocí předem vyžíhané kličky přenesena jedna kolonie do 10 ml LB média s přidáním ampicilinu. Suspenze byla inkubována po dobu 24 hod na třepačce (220 rpm, rotační průměr 1,2 cm) při teplotě 37 °C – startovací kultura.

Po 24 hod byla kultura přesazena do 400 ml LB média s přidáním ampicilinu v poměru 1:1000, tedy 400 µl.

Další den byla změřena optická denzita (OD₆₀₀) suspenze a vypočten objem (V) pro izolaci každého plasmidu.

$$V[ml] = \frac{1200}{OD_{600}}$$

Vypočtený objem suspenze byl centrifugován za podmínek: 4 °C, 8000g po dobu 10 min. Buněčný pelet byl resuspendován 12 ml E1 pufru (složení viz. Přílohy) s přidáním Rnázy. Poté bylo přidáno 12 ml lyzačního pufru E2 do tuby obsahující buněčnou suspenzi a vše bylo promícháno lehkým otáčením tuby. Po 4 min byla lýze buněk zastavena přidáním neutralizačního E3 pufru a obsah tuby byly opět promíchány lehkým přetáčením. Tímto byly buňky permeabilizovány a dezintegrovány.

Suspenze byla nanášena na kolonu, která byla předem ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru E4. Po prokápání roztoku kolonou byl na filtr opět nanášen ekvilibrační pufr E4. Přímou

na kolonu bylo nanášeno 25 ml wash pufru E5 pro promytí kolony. Po promytí bylo použito 15 ml elučního pufru E6 a eluát byl jímán do tuby.

Během procesu lze provést tři kontroly na přítomnost DNA v roztoku pod kolonou a to po přidavku neutralizačního pufru E3, nebo po přidavku wash pufru E5, kdy kontroly na přítomnost DNA vychází negativně, nebo po přidavku elučního pufru E6, kdy kontrola vyjde pozitivně.

Poté bylo k eluátu přidáno 10,5 ml isopropanolu. Směs byla pořádně protřepána a centrifugována po dobu 45 min při 4°C a 8000 g. Poté byl slit supernatant a pelet byl převeden do 5 ml 70% ethanolu na přečištění, a dále byl centrifugován po dobu 10 min při RT a 10 000 g. Po centrifugaci byl pomocí pipety odsát ethanol a pelet byl vysušen proudem vzduch do doby, kdy bílá barva peletu byla změněna na sklovitou. Poté byla usazenina rozpuštěna v 200 µl TE pufru.

Vzorek byl zfiltrován pomocí sterilního filtru o velikosti pórů 0,2 µm a naředěn sterilním TE puftrem na koncentraci 500 µg/ml. K filtraci byly použity i sterilní kolonky, kdy byl vzorek nanášen na povrch kolonky a kolonky byla umístěn do odstředivky. Podmínky centrifugace: 1 - 4 min, 12 000 g. Pokud veškerý roztok DNA neprošel přes kolonku, byla centrifugace opakována.

Dále byla u vzorku změřena koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru a vzorek byl nanášen na agarózový gel a byla provedena kontrola čistoty na gelu.

Čistota vzorku by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 – 1,9. Pokud je čistota nižší než 1,8, vzorek je kontaminován proteiny. Pokud je čistota větší než 2, vzorek je kontaminován RNA. V případě kontaminace musí být vzorek purifikován a to opakováním posledních kroků izolace po eluci.

Sterilní vzorek byl uskladněn v lednici, ale pokud se jednalo o dlouhodobé uskladnění (déle než 3 dny) byl umístěn do mrazáku (-80°C).

3.1.10 Plazmidy

Na následujících obrázcích (*Obr. 11-16*) jsou uvedené plazmidy, které byly použity v pokusu – volba plazmidu, metoda Muller (2005).

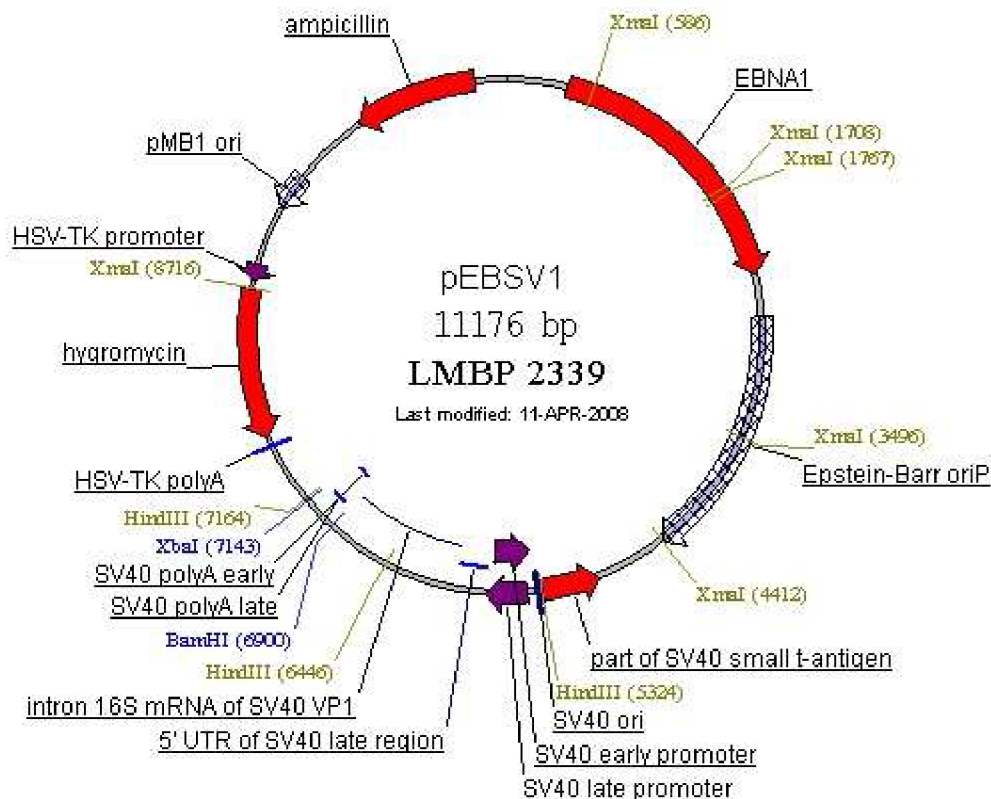
Tyto plazmidy jsou funkční jak v prokaryotních, tak i v eukaryotních buňkách. Jedná se tedy o kyvadlové vektory. Kyvadlový vektor obsahuje ori sekvenci a selekční marker funkční (rezistence na ampicilin) v *E. coli*. Dále obsahuje ori sekvenci, selekční marker pro eukaryotní hostitelskou buňku a klonovací místo MCS. Každý vektor obsahuje cílová místa pro restriční endonukleázy (např. Hind III, BamHI).

Jako hostitelské buňky byly zvoleny buňky 293HEK/EBNA1. Buňky 293HEK/EBNA1 jsou buňky, jejichž DNA byla pozměněna pomocí rekombinantních technik. Do jejich genomu byl včleněn gen z Epstein-Barr viru. [2] Tento gen je exprimován jako jaderný antigen, který umožňuje epizomální replikaci specifických plazmidů. [21] Specifický plazmid musí obsahovat v eukariotickém počátku replikace sekvence vázající se na EBNA1. Plazmidy neobsahující EBNA1 sekvence se při transientní transfekci nereplikují a jejich počet v buňkách klesá v důsledku buněčného dělení. Při transfekci specifických plazmidů do EBNA buněk dochází k replikaci specifických plazmidů a k přenosu plazmidů do dceřiných buněk

při buněčném dělení. To vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu. [22]

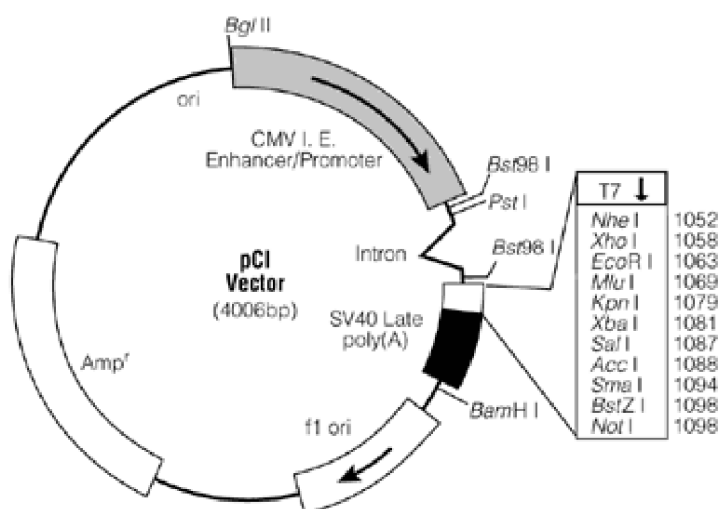
Níže jsou uvedené plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen zájmu EBNA1 a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

3.1.10.1 Plazmid peBSV1/SEAP



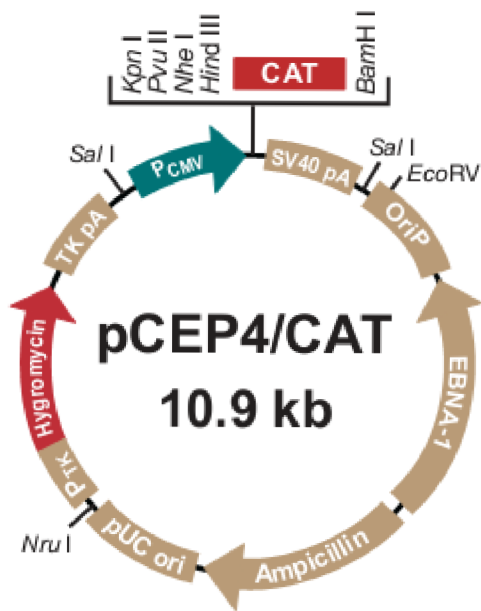
Obr. 11: Mapa plazmidu pEBSV1/SEAP, zdroj internet: <http://bccm.belspo.be/>

3.1.10.2 Plazmid pCI/SEAP



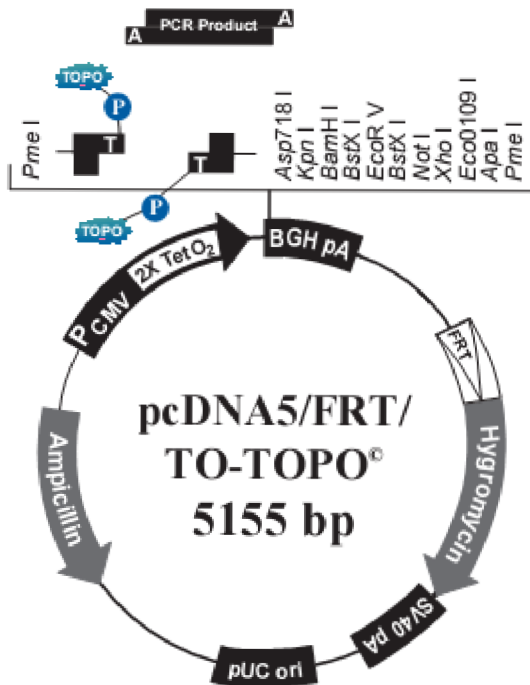
Obr. 12: Mapa plazmidu pCI/SEAP, zdroj internet: <http://www.promega.com/>

3.1.10.3 Plazmid pCEP4/SEAP



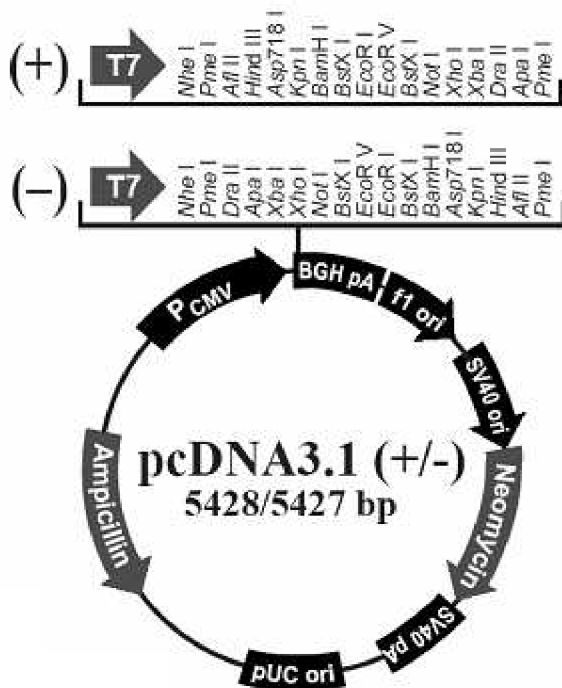
Obr. 13: Mapa plazmidu pCEP4/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.4 Plazmid pcDNA5/FTR/TO-TOPO/SEAP



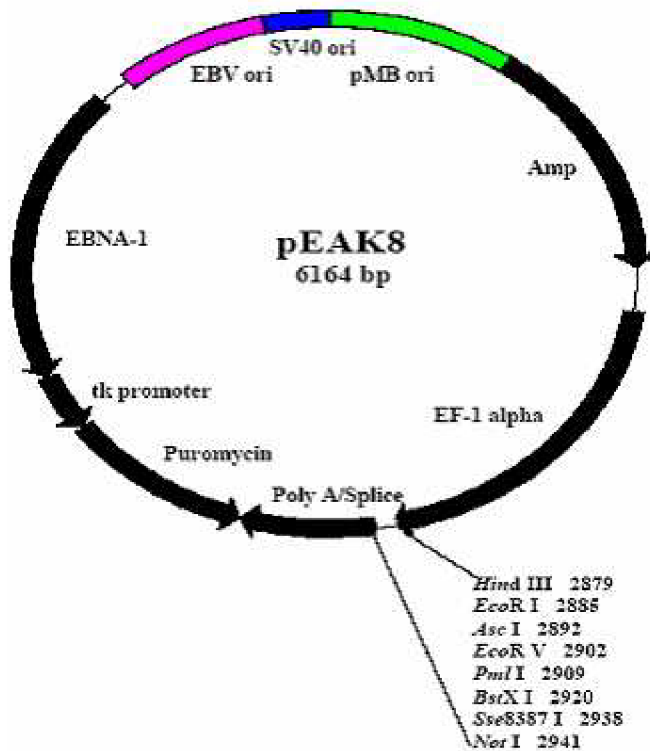
Obr. 14: Mapa plazmidu pcDNA5/FRT/TO-TOPO/SEAP, zdroj internet: <http://produkts.invitrogen.com/>

3.1.10.5 Plazmid pcDNA 3.1/SEAP



Obr. 15: Mapa plazmidu pcDNA 3.1/SEAP [2]

3.1.10.6 Plazmid pEAK8/SEAP



Obr. 16: Mapa plazmidu pEAK8/SEAP [2]

3.1.11 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Jedná se o transfekční metodu při nízké buněčné denzitě s výměnou média před transfekcí. Byla použita buněčná suspenze (400 ml) tvořena buňkami HEK 293/EBNA, které byly kultivovány v BV 293s médiu.

Podmínka: buňky double time (čas zdvojnásobení počtu buněk) = 24 hod

Transfekce byla prováděna ve 100ml čtyřhraných lahvích.

Nejprve byly spočítány buňky, které poté byly centrifugovány (5 min, 500 rpm, RT). Po centrifugaci byl slit supernatant a buňky byly resuspendovány ve 300 ml nového BV293s média. Suspenze byla rozpipetována do 100ml flašek po 20 ml.

V každé lahvi byly spočítány buňky.

Poté byla připravena transfekční směs v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, kdy finální koncentrace DNA v 20 ml média byla 2,5 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 2 ml : 20 ml

Původní koncentrace roztoku DNA byla 500 µg/ml a PEI 1mg/ml. Roztoky DNA a PEI byly zředěny na dané koncentrace pomocí 150mM roztoku NaCl.

Po smíchání PEI a DNA byla směs promíchána a doba inkubace byla 10 min. Poté bylo přidáno 2 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí. Láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 160 rpm, rotační průměr 2,5 cm) a buňky byly inkubovány za podmínek 37°C, 5 % CO₂. Po 4 hodinách bylo do každé láhve přidáno 20 ml předem vyhřátého média BV 293s.

Po transfekci byly každý den odebírány vzorky 100 µl a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.12 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Metoda Durocher je transfekční metoda s nízkou buněčnou denzitou bez výměny média před transfekcí.

Pokus byl proveden v 250ml čtyřhraných lahvích.

Podmínka: buňky double time = 24 hod

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk. Počet se pohyboval kolem 1 miliónů/ml. Z 0,5l zásobní láhve obsahující 200 ml buněčné suspenze bylo odebráno 100 ml a rozpipetováno do 250ml lahví po 22,5 ml a poté bylo do každé láhve přidáno 22,5 ml média (do transfekce v médiu s 1% koňského séra bylo přidáno odpovídné množství séra).

V každé láhvi byl spočítán počet buněk. Denzita buněčné suspenze byla přibližně 0,5 miliónů/ml. Láhve byly umístěny přes noc na třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

V den transfekce byl v každé láhvi spočítán počet buněk a byla připravena transfekční směs. Složení transfekční směsi bylo v poměru: transfekční směs DNA:PEI = 1:5, přičemž finální koncentrace DNA v 50 ml byla 1 µg/ml. Přídavek transfekční směsi do média byl v poměru: transfekční směs: médiu = 1: 10 = 5 ml : 50 ml.

Po smíchání PEI a DNA byla směs vortexována 5 s a poté byla inkubována 15 min při RT. Po inkubaci bylo přidáno 5 ml transfekční směsi do každé láhve s buněčnou suspenzí a láhve byly umístěny na orbitální třepačku (cca 100 rpm, rotační průměr 2,5 cm).

Vzorky byly odebírány 5. a 7. den, min. 100 μ l a zamraženy se při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.13 Metoda transfekce 3 - Backliwal (2008)

Jedná se o metodu transfekce s buněčnou suspenzí o vysoké denzitě s výměnou média před transfekcí.

Den před transfekcí byl v zásobní láhvi spočítán počet buněk a buněčná suspenze byla naředěna na polovinu.

V den transfekce byl opět spočítán počet buněk v zásobní láhvi a poté byla ze zásobní láhve odebrána buněčná suspenze a rozpipetována do 12 falkon po 10 ml. Poté byla buněčná suspenze centrifugována při 100g po dobu 5 min. Po centrifugaci byl odsát supernatant a do každé falkony byl přidán 1 ml čerstvého média: DMEM/F12 - Biowest (s přidaným L-Glutaminem a Glukózou) + 0,1% Pluronic. Před použitím bylo médium s přídavkem Pluronicu zfiltrováno. Z původního objemu 10 ml byl objem snížen na 1 ml, čímž vznikla buněčná suspenze o vysoké hustotě.

V tomto pokuse byly provedeny 3 variant o různých koncentracích DNA (15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) a k ním dvojnásobných množství PEI.

K jednomililitrovým buněčným suspenzím byly přidány příslušné množství DNA a poté PEI. Směs byla inkubována po dobu 4 hod při teplotě 37°C na orbitální třepačce (250 rpm, rotační průměr 1,2 cm). Po 4 hodinách bylo do každé falkony přidáno 9 ml média HYclone. U 4. varianty bylo do média HYclone přidáno příslušně množství valproové kyseliny a u 5. varianty butyrátu sodného. Do kontrolních falkon nebyla nepřidána transfekční směs.

Vzorky byly odebírány 5., 7., 11. a 14. den, a zamraženy při teplotě -20°C do zpracování.

3.1.14 Stanovení exprese reportérového genu

Metoda:

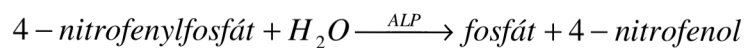
Kinetické fotometrické stanovení v souladu s International federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).

Aktivita SEAP byla zjišťována pomocí kitu pro stanovení alkalické fosfatázy. Reakční směs, substrát pro alkalickou fosfatázu, vznikla smícháním roztoků R1 a R2.

Z odebraného vzorku bylo pipetováno 4 μ l do 96ti jamkové desky, a poté bylo přidáno 200 μ l reakční směsi. Po minutové inkubaci byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 405 nm v časech 0, 1, 2 a 3 minuty. Data byla shromažďována pomocí programu Gen5 (Biotek).

Koncentrace exprimovaného proteinu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky sestavené na základě měření absorbance roztoků standardů (STD). Byly použity naředěné standardy o koncentraci SEAP: 1,92 mg/l (6000x), 1,44 mg/l (8000x), 1,15 mg/l (10 000x) a 0,96 mg/l (12 000x). [2]

Princip:



Složení a koncentrace roztoků

R1:

2-amino-2-methyl-1-propanol, octan hořečnatý, síran zinečnatý, EDTA

R2:

4-nitrofenylfosfát

Činidla smíchat v poměru 4 : 1 = R1 : R2, směsné činidlo je stabilní 4 týdny při 2 – 8°C nebo 5 dní při 15 – 25°C. Monoreagent chránit před světlem.

Výpočet

$$c_{ALP} = c_{St} \cdot (\Delta A_s / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) / (\Delta A_{st} / \text{min} - \Delta A_{bl} / \text{min}) \quad [\mu\text{kat} / l]$$

c_{st}katalytická koncentrace standardu uvedená v atestu [$\mu\text{kat}/l$]

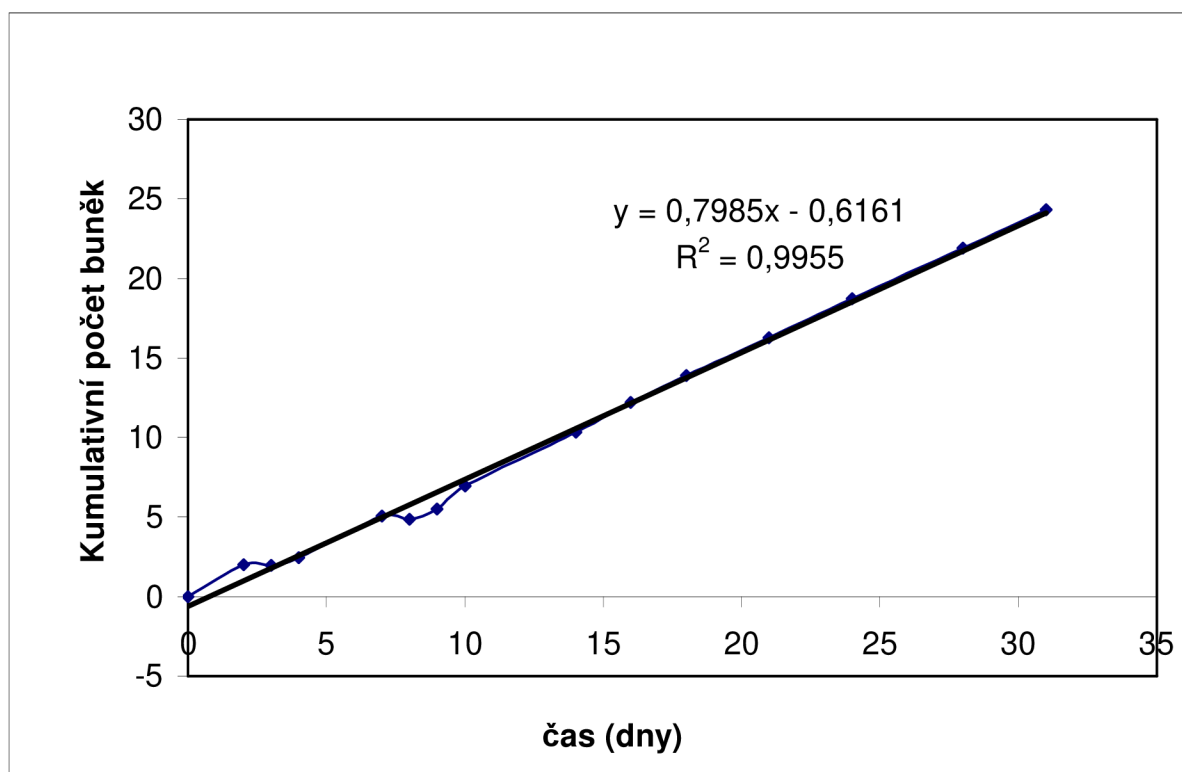
A_sabsorbance vzorku

A_{st}absorbance standardu

A_{bl}absorbance blanku

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

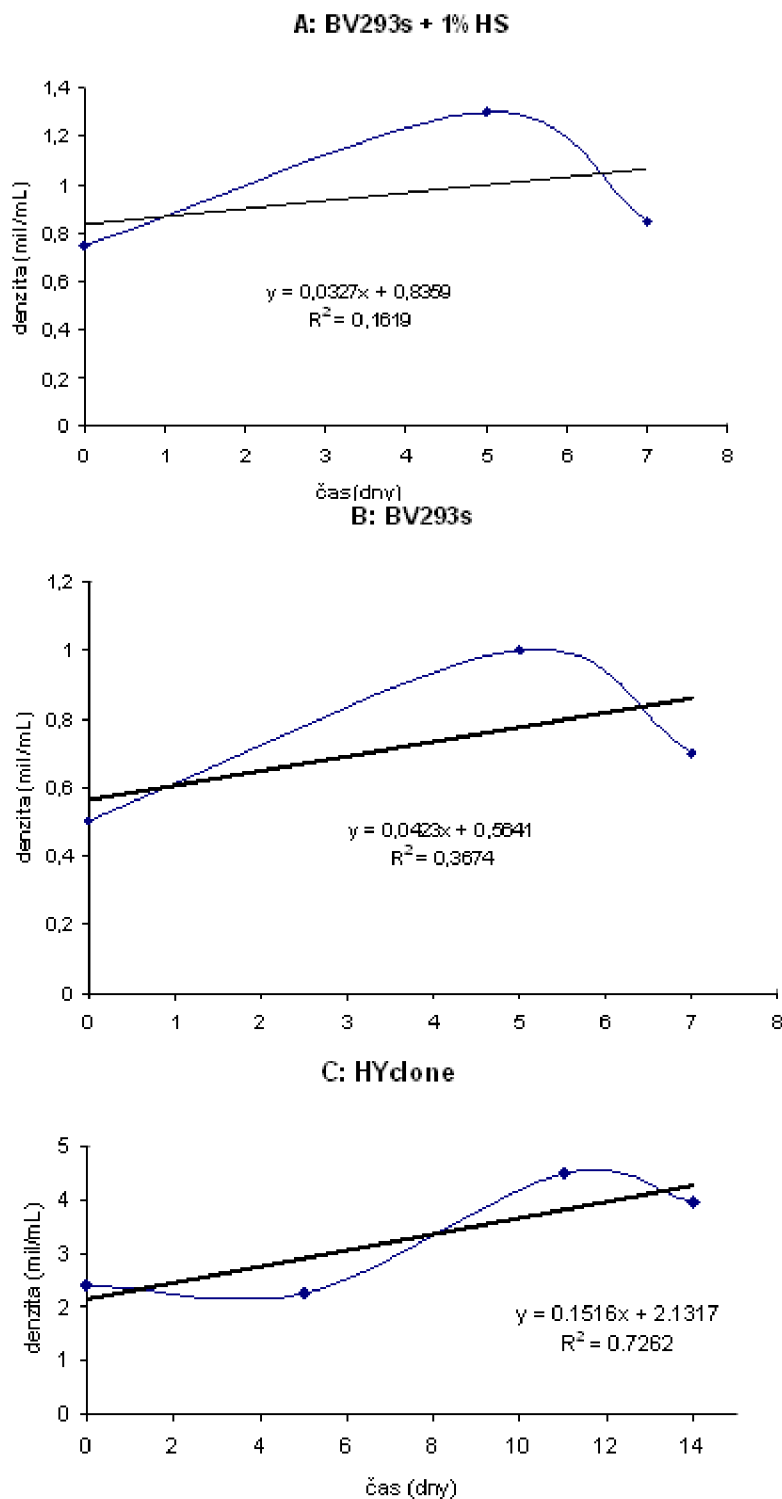
4.1 Růst zásobní buněčné kultury



Obr. 17: Kumulativní počet buněk HEK293/EBNA na 1 ml v závislosti na čase – Graf ukazuje kumulativní počet buněk ve sledovaném období. Byla sledována denzita buněčné suspenze v daných časových intervalech. Buňky byly počítány pomocí hemocytometru a byl sledován nárůst počtu buněk.

Po dobu experimentu byla udržována buněčná kultura, která sloužila jako zdroj buněk pro experimenty. Tato kultura byla kultivována za stejných podmínek jako posttransfekční kultury (médiu BV 293s, inkubována třepačka, 37°C). Růst buněk byl sledován, aby se zjistilo, zda buňky dosáhly exponenciální růstové fáze. Pokud se počet buněk za den zdvojnásobí dosáhly buňky exponenciální fáze a jsou připraveny na transfekci.

4.2 Růst buněk po transfekci



Obr. 18: Růstové křivky buněk HEK293/EBNA - Na obrázku jsou znázorněny růstové křivky buněk HEK 293/EBNA po transfekci pomocí PEI v různých médiích: A: BV 293s, B: BV 293s s 1% přídatkem koňského séra a C: Hyclone médium. Grafy A a B jsou velmi podobné, což svědčí o tom, že přítomnost HS neovlivňuje růst buněk po transfekci. Pátý den po transfekci u buněk kultivovaných v BV 293s médiu (popř. s 1% přídatkem HS) buňky dosáhly maximální

denzity, a poté se buněčná denzita začala snižovat z důvodů úmrtí buněk. V Hyclone médiu bylo maximálního počtu buněk dosaženo jedenáctý den po transfekci. V médiu Hyclone buňky rostly delší dobu a do vyšších hustot buněčných suspenzí.

4.3 Volba plazmidu pro transienční expresi

Nejdříve bylo potřeba ověřit volbu vektoru vhodného pro stanovení intenzity exprese a účinnosti transfekce. Pro transfekci byly použity vektory uvedené v tabulce č. 3. Měření bylo prováděno po dnech. U každého dne je uvedena kalibrační křivka SEAP standardů a tabulka s naměřenými koncentracemi (viz. Přílohy). Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy.

Pro transfekci byly použity plazmidy pEAK 8, pCEP4, peBSV, které obsahují gen EBNA1, usnadňující expresi genu zájmu, a pcDNA 3.1, pcDNA 5, pCI, které gen EBNA1 nenesou.

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů ve dvou sadách) + 2 kontrolní láhve.

Tab. 5: Použité plazmidy

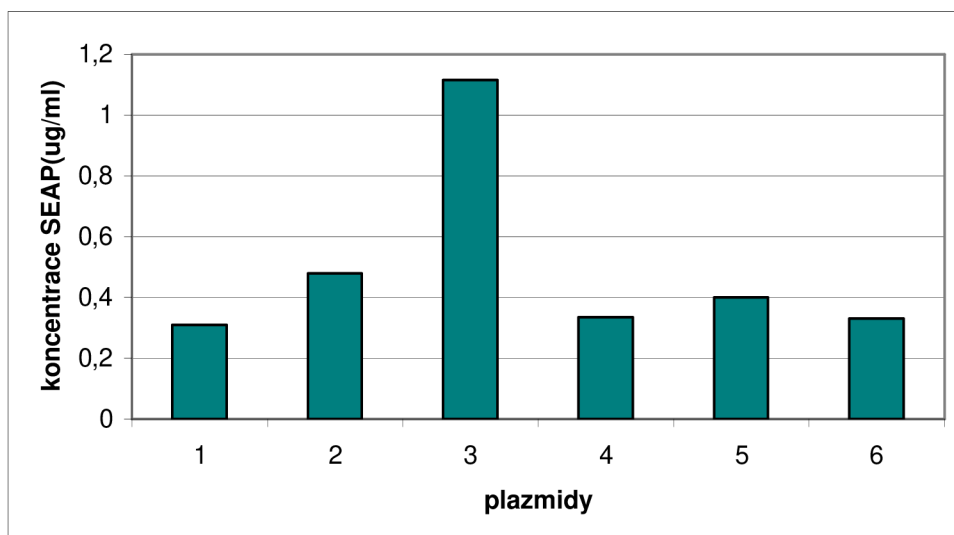
číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	pEAK8	4	pCI
2	pcDNA 5	5	pcDNA 3.1
3	pCEP4	6	peBSV

První den po transfekci nebyla detekována exprese SEAP. Hodnoty exprese SEAP byly na úrovni pozadí měření. Třetí den po transfekci se naměřené hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků, kde byl použit plazmid pCEP4 zdvojnásobily proti pozadí. Dále se hodnoty exprese zvýšily u vzorků s použitými plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Hodnoty exprese SEAP vzorků s použitými plazmidy pEAK 8, pCI a peBSV i nadále zůstaly na úrovni pozadí.

Nejvyšší hodnoty koncentrací alkalické fosfatázy u vzorků byly naměřeny pátý den po transfekci, kdy hodnoty u vzorku obsahující pCEP4 byly až trojnásobné proti hodnotám koncentrace SEAP v jiných vzorcích. Šestý a sedmý den po transfekci se hodnoty koncentrace začaly snižovat, což bylo způsobeno nejspíše úmrtím buněk a rozpadem SEAP.

Jako nejúčinnější se ukázal plazmid pCEP4. Další vhodné plazmidy pro transienční transfekci byly zvoleny plazmidy pcDNA 5 a pcDNA 3.1. Plazmidy peBSV, pEAK 8 a pCI se v daném pokusu nejevily jako vhodné plazmidy pro transfekci v buňkách HEK293/EBNA.

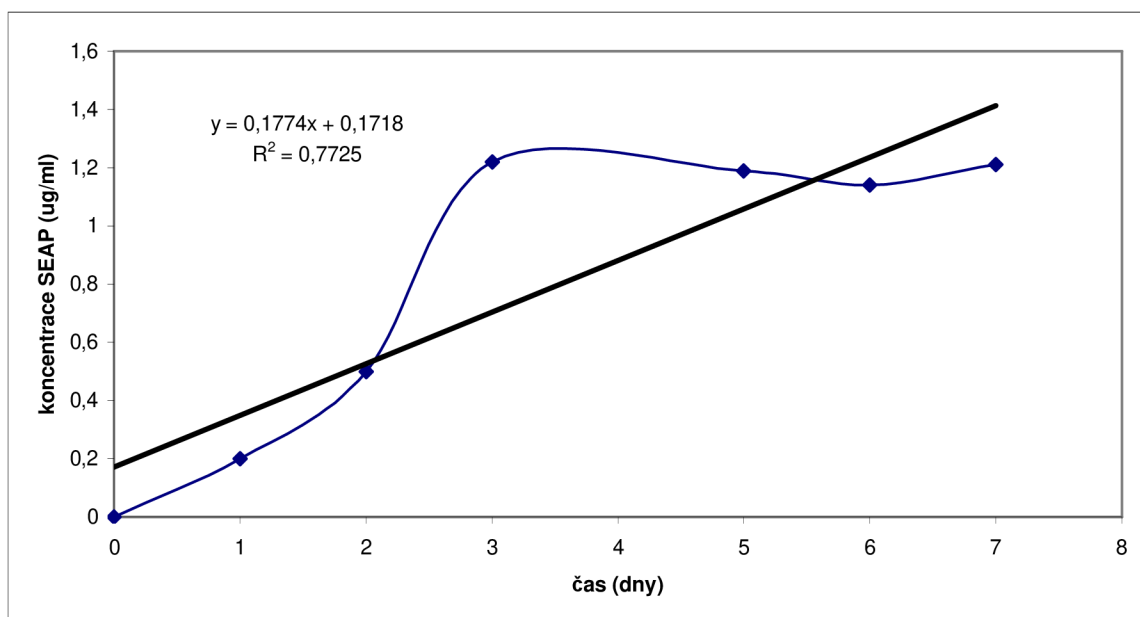
Plazmid pCEP4/SEAP byl vyhodnocen jako nejúčinnější plazmid pro transienční transfekci do buněk HEK293/EBNA i dříve. [2]



Obr. 19: Koncentrace SEAP 3. den po transfekci - obrázek znázorňuje koncentraci SEAP v jednotlivých vzorcích odebraných 3. den po provedení transfekce. Vzorek 1 (pEAK 8), vzorek 2 (pcDNA 5), vzorek 3 (pCEP4), vzorek 4 (pCI), vzorek 5 (pcDNA 3.1) a vzorek 6 (peBSV). Z obrázku je patrné, že nejvyšší koncentrace SEAP byla přítomna ve vzorku 3 (pCEP4). Proti pozadí byla zvýšená exprese i ve vzorcích 2 (pcDNA5) a 5 (pcDNA3.1). Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.3.1 Závislost exprese SEAP na čase uplynulém od transfekce

Vedlejším produktem pokusu, při kterém byl určován nejúčinnější vektor pro transfekci je křivka průběhu exprese SEAP v závislosti na čase uplynulém od transfekce. Nejvyšší exprese bylo dosaženo sedmý den po transfekci.



Obr. 20: Závislost koncentrace SEAP na čase – graf znázorňuje nárůst exprese SEAP po transfekci u plazmidu pCEP4. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP bylo dosaženo 3 den

po transfekci. Koncentrace SEAP poté zůstala stejná až do posledního měřeného dne (7. den).

4.4 Srovnání metod transienční transfekce

Byla provedena série pokusů s cílem najít nejvhodnější metodu pro transienční transfekci pomocí PEI. Srovnávány byly metody podle Muller (2005), Durochera (2007) a Backliwala (2008). Metody jsou podrobněji popsány výše. Pro všechny pokusy ($n = 4$) byl jako reportérový plazmid použit pCEP4/SEAP.

4.4.1 Metoda transfekce 1 - Muller (2005)

Transfekce byla prováděna v duplikátech, ve čtrnácti 100ml čtyřhraných lahvích: 12 lahví na transfekci (6 plazmidů po dvou sadách) + 2 kontrolní lahve. Nejvyšší naměřená koncentrace SEAPu vzorků byla naměřena 7. den po transfekci. Hodnoty jsou nižší než hodnoty naměřené dříve [2], což může být způsobeno úmrtím buněk.

4.4.2 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Pokus byl proveden v osmi 250ml čtyřhraných lahvích: 2 láhve na transfekci bezsérovou a 2 láhve na transfekci v médiu (293BVs) s 1% koňského séra + 4 kontrolní lahve. Pokus byl prováděn se suspenzí o nízké buněčné denzitě (0,5 milónů/ml), což mohlo být příčinou neúspěchu. Naměřené hodnoty absorbance se téměř shodovaly s hodnotami absorbance blanku (slepého vzorku). Metoda Durocher byla vyhodnocena jako neúčinná.

4.4.3 Metoda Backliwal (2008)

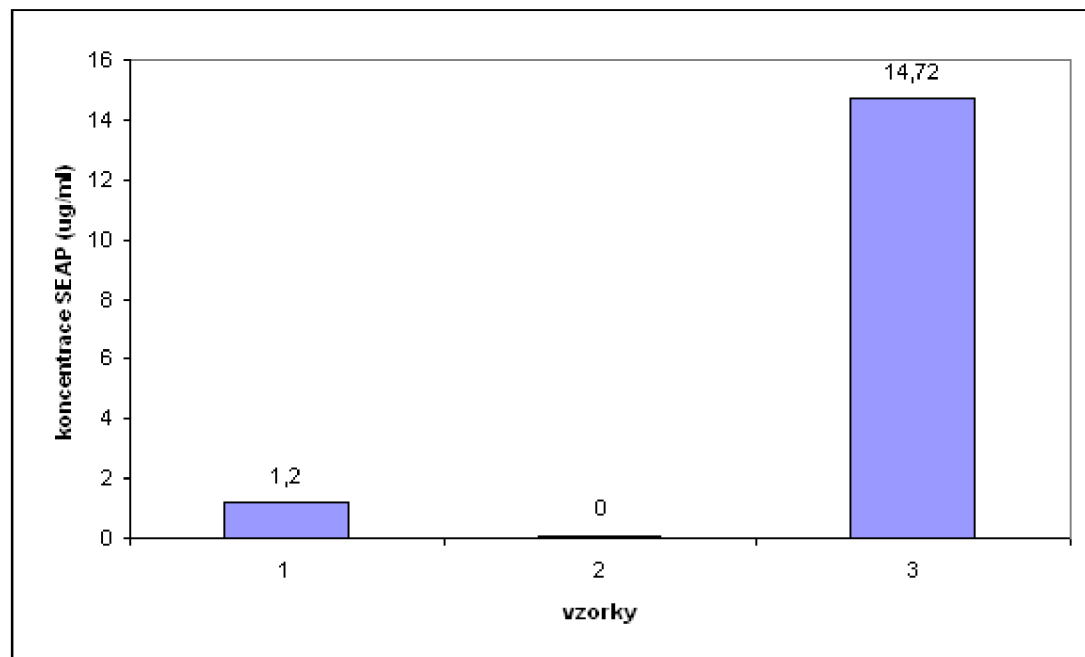
Byly použity buňky 293HEK/EBNA kultivované v médiu HYclone o denzitě 2,4 milónů/ml. Buněčná suspenze byla rozpipetována do falkon po 10 ml, odstředěna a poté bylo odsáto médium a nahrazeno 1 ml DMEM/F12 (Biowest) médiem doplněným o 0,1% Pluronic (Invitrogen). Denzita buněčné suspenze při transfekci byla 24×10^6 /ml. Transfekce byla úspěšná. Nejvyšší detekovaná exprese SEAP byla 14,7 $\mu\text{g/ml}$ při transfekci 20 $\mu\text{g/ml}$ DNA odebraném čtrnáctý den po transfekci. Hladina exprese může dosáhnout až 22 mg/ml pro rekombinantní protilátky u vzorku s koncentrací DNA při transfekci 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA. [27]

Tab. 6: Transfekční podmínky u jednotlivých metod

metoda	koncentrace DNA (µg/ml)	poměr DNA:PEI	transfekční médium	kultivační médium	poměr transfekční směs:médiu
Muller	2,5	1:5	BV 293s	BV 293s	1:10
Durocher	1	1:5	BV 293s (příp. + 1% HS)	BV 293s (příp. + 1% HS)	1:10
Backliwal	15	1:2	DMEM/F12 (Biowest) + 0,1% Pluronic	Hyclone + 3mM butyrát sodný + 4 mM kyselina valproová	-
	20				
	50				
	50				
	50				

Tab. 7: Míchání transfekčních směsí na jednu láhev

metoda	původní koncentrace DNA (µg/ml)	DNA (µl)	1 mg/ml PEI (µl)	ředění pomocí
Muller	500	100	500	150 mM NaCl
Durocher	5	25	1000	PBS
Backliwal	289,4	103,6	60	-
	830	120,4	200	
	289,4	138,2	80	



Obr. 21: Vliv metody transfekce na hladinu exprese SEAP (za použití plazmidu pCEP4) - vzorek 1: metoda Muller, vzorek 2: metoda Durocher, vzorek 3: metoda Backliwal. Nejvyšší hodnoty exprese SEAP bylo dosaženo za použití metody Backliwal. Asi desetinu výtěžku exprimovaného proteinu tvoří výtěžek získaný pomocí metody Muller. Na nulové hodnotě jsou hodnoty exprese SEAP u metody Durocher.

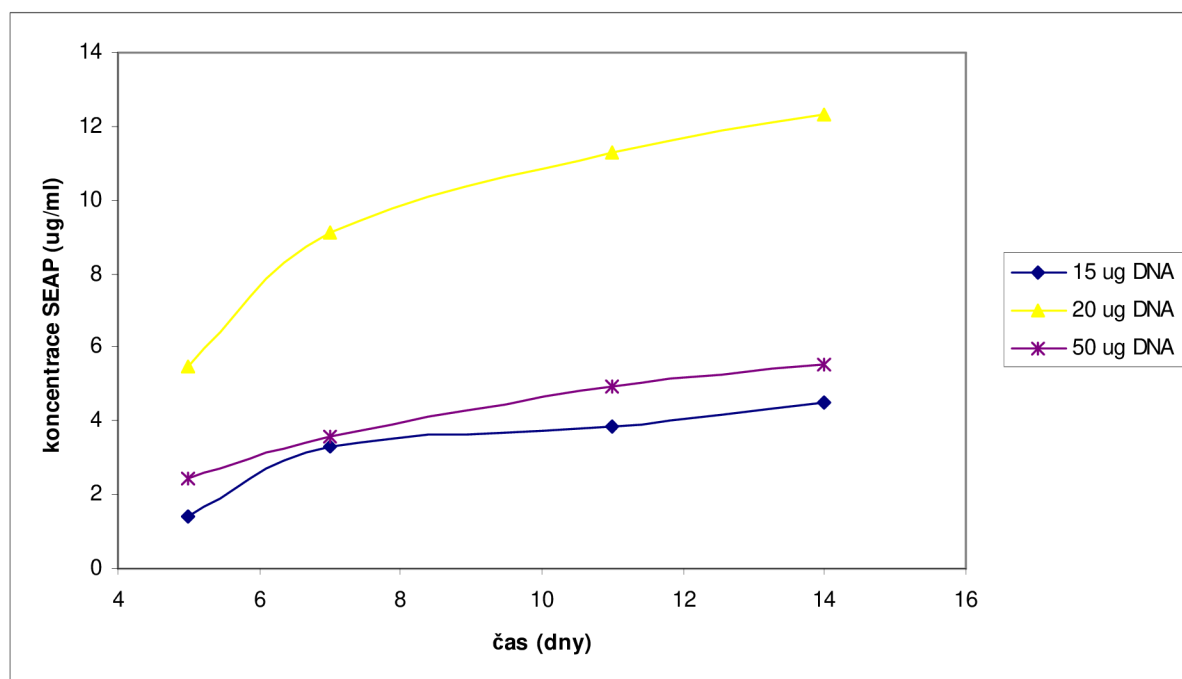
Na základě výsledků měření byl jako nejlepší metoda vyhodnocena metoda Backliwal (2008), kdy koncentrace SEAP dosahovaly několikanásobně vyšších hodnot než byly hodnoty koncentrace SEAP u vzorků metody Muller (2005). Úspěšnost transfekce u metody Backliwal byla zajištěna nejspíše vysokohustotní buněčnou suspenzí a také vyššími přídávky DNA a PEI.

Metoda Durocher byla vyhodnocena jako nejméně účinná. Důvodem může být používání buněčných suspenzí o nižší hustotě buněk a nízkými koncentracemi DNA přidávanými k buňkám. Také postup provedení transfekce se zcela odlišuje od předešlých dvou metod. Metoda Duroscher přidává transfekční směs do finálního objemu buněčné suspenze s médiem narozdíl od metod Muller a Backliwal, kdy je transfekce prováděna v menším objemu a následně je zastavena přídávkem média. U metody Muller byly detekovány hodnoty exprese SEAP, ale o velmi nízkých koncentracích.

Velký vliv má také kultivační médium, ve kterém jsou pěstovány buňky. V médiu Hyclone buňky dosahovaly vyšší denzity a životnost buněk byla delší než v médiu BV 293s.

4.4.3.1 Vliv koncentrace DNA na účinnost transfekce

Pomocí metody Backliwal (2008) bylo ověřováno množství DNA vhodné pro transienční transfekci. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 μg DNA/ml transfekční směsi. To je méně než uvádí Backliwal et al. (2008), který zjistil nejvyšší účinnost při 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. [27]



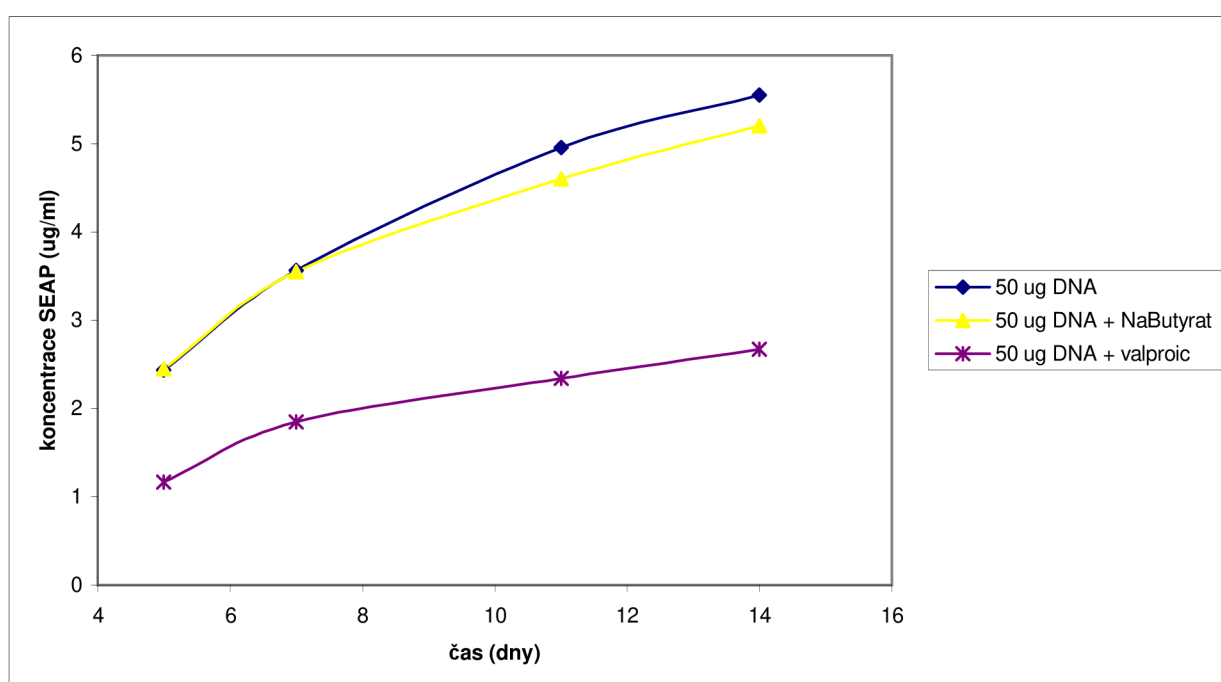
Obr. 22: Závislost koncentrace SEAP na koncentraci DNA při transfekci - graf ukazuje koncentrace SEAP u jednotlivých vzorků. Nejvyšší hodnoty koncentrace SEAP byly naměřeny po transfekci 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

4.4.3.2 Vliv inhibitorů histon deacetyláz na hladinu exprese po transfekci

Pomocí metody Backliwal (2008) byl zjišťován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. [28]

Koncentrace SEAP u vzorku s přidavkem butyrátu sodného (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci) se výrazně nelišily od hodnot koncentrací vzorku kontrolního. Hodnoty koncentrace SEAP s přidavkem valproové kyseliny v médiu byly poloviční než hodnoty vzorku bez přidavku (při 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA pro transfekci).

I když počet buněk ve vzorcích obsahujících přidavek butyrátu sodného byl nízký, přesto hodnoty exprese SEAP byly srovnatelné s hodnotami SEAP u vzorků bez přidavku, kde byl počet buněk vyšší. To znamená, že přidavek butyrátu sodného zvýšil hladinu exprese, ale snížil viabilitu buněk.



Obr. 23: Závislost koncentrace SEAP na přítomnosti inhibitorů histon deacetyláz - graf ukazuje koncentrace SEAP u vzorků obsahujících 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA: bez přidavku, s přidavkem butyrátu sodného do média a s přidavkem kyseliny valproové do média. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot měření získaných vždy ze dvou kultivačních lahví.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci zabývající se problematikou transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminu byla hledána optimální metoda transientní transfekce.

V první části bylo testováno šest plazmidů a cílem bylo nalézt plazmid, za jehož použití se dosáhne nejvyšších hodnot exprese SEAP. Nejúčinnějším plazmidem byl zvolen pCEP4/SEAP, který byl poté použit v následujících experimentech.

Byly testovány tři metody: Muller (2005), Durocher (2007) a Backliwal (2008). Jako nejúčinnější metoda byla zvolena metoda Backliwal (2008), která dává použitelné výsledky pro zavedení této metody do praxe.

Byl sledován vliv koncentrace DNA (15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) použité pro transfekci s vysokohustotní buněčnou suspenzí. Bylo zjištěno, že nejúčinnější je koncentrace 20 $\mu\text{g DNA/ml}$ transfekční směsi.

Dále byl sledován vliv inhibitorů histon deacetyláz (butyrát sodný, kyselina valproová) na hladinu exprese. Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitorů v kultivačním médiu zvyšuje hladinu exprese, ale snižuje viabilitu buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. *Molecular Biotechnology: principles on application of recombinant DNA*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. ISBN 1-55581-269-4. 760 p.
- [2] ŠMÍD, J. Vývoj protokolu pro transienční transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009 57s.
- [3] COHNE, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*. 1973, 70: 3240-3244
- [4] ŠPANOVÁ, A. *Přednášky z molekulární biotechnologie 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [5] DOŠKAŘ, J. *Přednášky z molekulární genetiky II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [6] RITTICH, B. *Přednášky z bioinženýrství II 2009*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009
- [7] BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1995, 92(16):7297-301.
- [8] GODBEY, W. T., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res*. 2000, 51(3):321-8.
- [9] GODBEY, W. T., BARRY, M. A., SAGGAU, P., WU, K. K., MIKOS, A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 1999a, 60(2-3): 149-60.
- [10] BERTSCHINGER, M., BACKLIWAL, G., SCHERTENLEIB, A., JORDAN, M., HACKE, D. L. R., WURM, F. M. Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: Implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery. *Journal of Controlled Release* 2006, 116 (2006): 96-104
- [11] LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 60 (2005): 247-266.
- [12] BEHR, J. P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospect for gene therapy. *Bioconjugate Chem*. 1994, 5 (1994) 382-389.

- [13] LINDELL, J., GIRARD, P., MULLER, N., JORDAN, M., WURM, F. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1676(2): 155-61.
- [14] CLAMME, J.-P., KRISHNAMOORTHY, G., ME'LY, Y. Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1617 (2003): 52-61.
- [15] VON HARPE, A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*. 2000, 69 (2): 309-22.
- [16] IIDA, T., MORI, T., KATAYAMA, Y, NIIDOME, T. Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex. *Journal of Controlled Release*. 2007, 118 (2007): 364-369.
- [17] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(2):e9
- [18] DEROUAZI, M., GIRARD, P., VAN TILBORGH, F., IGLESIAS, K., MULLER, N., BERTSCHINGER, M., WURM, F. M. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004, 87(4):537-45
- [19] MULLER, N. Transient gene expression for rapid protein production: Studies and optimization under serum-free conditions. PH.D. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005. 120 p.
- [20] GRAHAM, F. L., SMILLEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRU, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 1977, 36, 59-72.
- [21] AIYAR, A., ARAS, S., WASHINGTON, A., SINGH, G. AND LUFTIG, R. B. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of *oriP*-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology Journal*. 2009, 6:29
- [22] GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M. 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002, 38 (1-2): 15-21.

- [23] JORDAN, M., SCHALLHORN, A., WURM, F. M., Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24 (4): 596-601.
- [24] ERHARDT, C., SCHMOLKE, M., MATZKE, A., KNOBLAUCH, A., WILL, C., WIXLER, V., LUDWIG, S., Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction.* 2006, 6, 179-184
- [25] PHAM, P. L., PERRET, S., DOAN, H. C., CASS, B., ST-LAURENT, G., KAMEN, A., DUROCHER, Y. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol Bioeng.* 2003, 84(3): 332-42.
- [26] BLDI, L., MULLER, N., PICASSO, S., JACQUET, R., GIRARD, P., THANH, H. P., DEROW, E., WURM, F. M. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress.* 2005, 21(1): 148-153.
- [27] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., HASIJA, F., WURM, F. M., High-density transfection with HEK-293 cell allows doubling of transient titers and removes need for a prior DNA complex formation with PEI *Biotech. and Bioeng.* 2008, 99: 721-727.
- [28] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., KUETTEL, I., DELEGRANGE, F., HACKER, D. L., WURM, F. M., Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures *Biotech. and Bioeng.* 2008, 101: 182-189.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

r-protein	rekombinantní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	cyklická deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEK buňky	lidské embryonální ledvinové buňky
EBNA	jaderný antigen Epstein-Barr viru
EB-vir	Epstein-Barr vir
MCS	mnohočetné klonovací místo
ATP	adenosintrifosfát
DEAE	diethylaminoethyl
PEI	polyethylenimin
MCS	mnohočetné klonovací místo (multiple cloning sit)
AFM	mikroskopie atomárních sil (atomis force microscopy)
G -	Gram-negativní
G +	Gram-pozitivní
CHO	vajíčka křečka čínského
3T3	vajíčka myši švýcarské
HHV-4	herpesvirus 4
Gus	β -glukuronidáza
MUG	4-metyl umbelliferyl glukuronid
GFP	zeleně fluoreskující protein
ALP	alkalická fosfatáza
HS	koňské sérum
FCS	telecí sérum
DMSO	dimethyl sulfoxid
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
STD	standard
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (Internationa federation of clinical chemistry and laboratory medicine)

8 SEZNAM PŘÍLOH

Složení médií a pufrů

Metoda transfekce 1 - Muller (2005): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP, grafy srovnání koncentrací SEAP, růstové křivky

Metoda transfekce 2 - Durocher (2007): růstové křivky

Metoda transfekce 3 – Backliwal (2008): kalibrační křivky SEAP, tabulky koncentrací SEAP
růstové křivky

9 PŘÍLOHY

9.1 Složení médií a pufrů

9.1.1 LB médium

LB médium bylo použito pro kultivaci buněk kmene *Escherichia coli*. Z těchto buněk byla následně izolována plazmidová DNA.

Tab. 8: Složení LB média [2]

Složka	koncentrace (g/l)
trypton	10
kvasničný extrakt	5
NaCl	10

9.1.2 Kit Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA

Tab. 9: Složení kitu Genomed pro izolaci a purifikaci plasmidové DNA [2]

<u>Roztok E1</u> – resuspendační, uchováván při pokojové teplotě 50 mM Tris 10 mM EDTA přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 8 K roztoku je nutné přidat 100 µg/ml RNázy A, která je uchovávána při teplotě 4 °C
<u>Roztok E2</u> – lyzační, uchováván při pokojové teplotě 200 mM NaOH 1,0 % SDS (w/v)
<u>Roztok E3</u> – neutralizační, uchováván při pokojové teplotě 3,1 M octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,5
<u>Roztok E4</u> – ekvilibrační, uchováván při pokojové teplotě 600 mM NaCl 100 mM octan sodný 0,15 % TritonX- 100 přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E5</u> – promývací, uchováván při pokojové teplotě 800 mM NaCl 100 mM octan sodný přídavek kyseliny octové pro úpravu pH na hodnotu 5,0
<u>Roztok E6</u> – eluční, uchováván při pokojové teplotě 1250 mM NaCl 100 mM Tris přídavek HCl pro úpravu pH na hodnotu 5,5

9.1.3 DMEM/F-12 médium

Toto médium bylo použito pro kultivaci přisedlých 293HEK/EBNA buněk.

Tab. 10: Složení DMEM/F-12 média [2]

Složka	koncentrace (mg/ml)
CaCl ₂ (anhydrid)	116,00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,42
KCl	311,83
MgCl ₂ · 6H ₂ O	61,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100,00
NaCl	6,9995
NaHCO ₃	1,20
Na ₂ H ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	134,00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	62,50
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,43
Glucose	3,1510
HEPES	3,5745
Hypoxanthine	2,04
Linoleic Acid	0,04
Lipoic Acid	0,10
Phenol Red · Na	8,00
Putrescine · 2HCl	0,08
Sodium Pyruvate	110,00
Thymidine	0,36
L-Alanine	4,46
L-Arginine · HCl	147,35
L-Asparagine · H ₂ O	7,50
L-Aspartic Acid	6,66
L-Cysteine · HCl · H ₂ O	17,56
L-Cystine	24,00
L-Glutamic Acid	7,36
L-Glutamine	365,1
L-Alanyl-L-Glutamine (UltraGlutamine 1)	868,00
Glycine	18,76
L-Histidine · HCl · H ₂ O	31,48
L-Isoleucine	54,37
L-Leucine	58,96
L-Lysine · HCl	91,37
L-Methionine	17,24
L-Phenylalanine	35,48
L-Proline	17,27
L-Serine	26,26
L-Threonine	53,56

9.1.4 BV 293s médium

Médium pro kultivaci suspenzní linie buněk 293HEK/EBNA

Tab. 11: Složení BV 293s média [2]

Složka	koncentrace
DMEM/F-12	1 litr
pantotenát vápenatý	4 mg/l
Pluronic F-68	1 g/l
diethanolamin	3 µg/l
fyton Difco select	2 g/l
pepton z laktalbuminu	2 g/l
lipidový koncentrát	1 mg/l
lidský insulin	5 g/l
lidský transferrin ATF	5 g/l

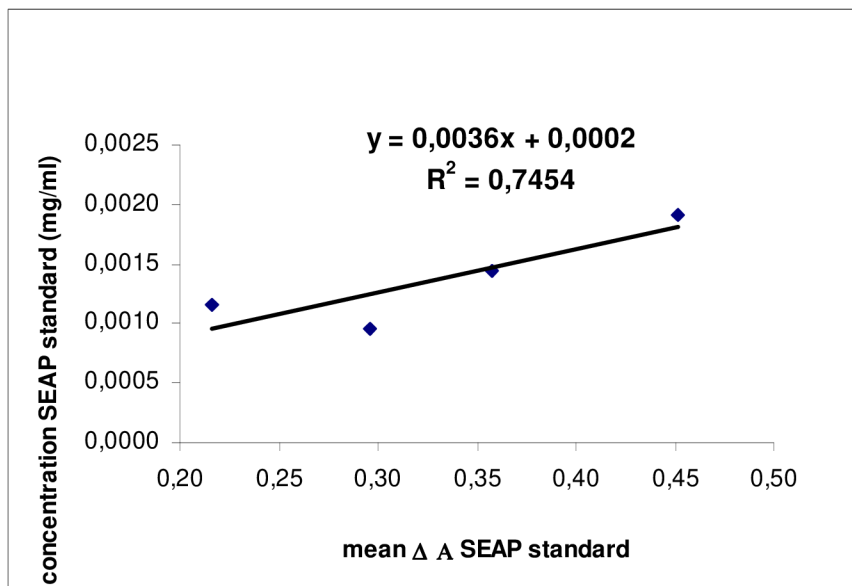
9.2 Metoda transfekce 1 – Muller (2005)

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích a srovnání koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

Tab.12: Použité plazmidy

číslo	plazmid	číslo	plazmid
1	peak8	7	pCI
2	peak8	8	pCI
3	pcDNA 5	9	pcDNA 3.1
4	pcDNA 5	10	pcDNA 3.1
5	pCEP4	11	peBSV
6	pCEP4	12	peBSV

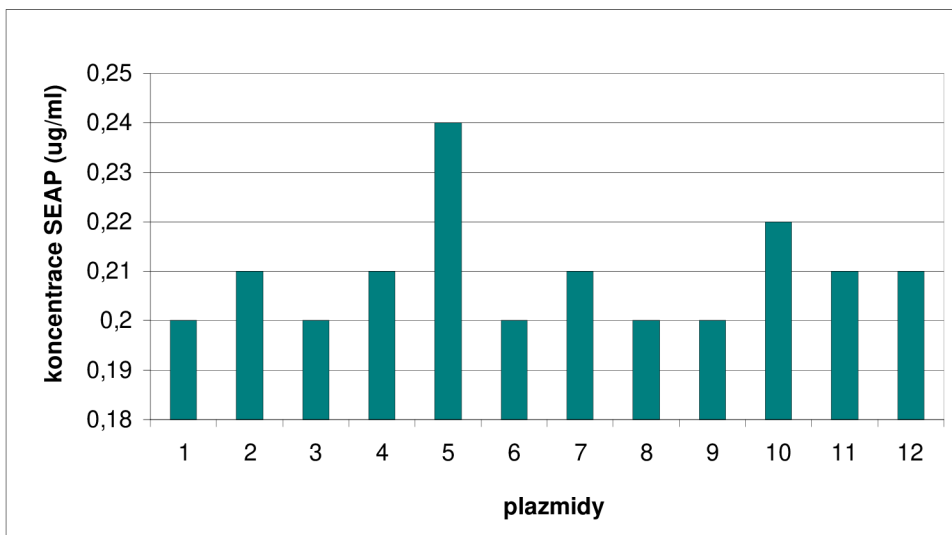
Transfekce – 1. den po transfekci



Obr. 24: Kalibrační křivka SEAP – 1. den po transfekci

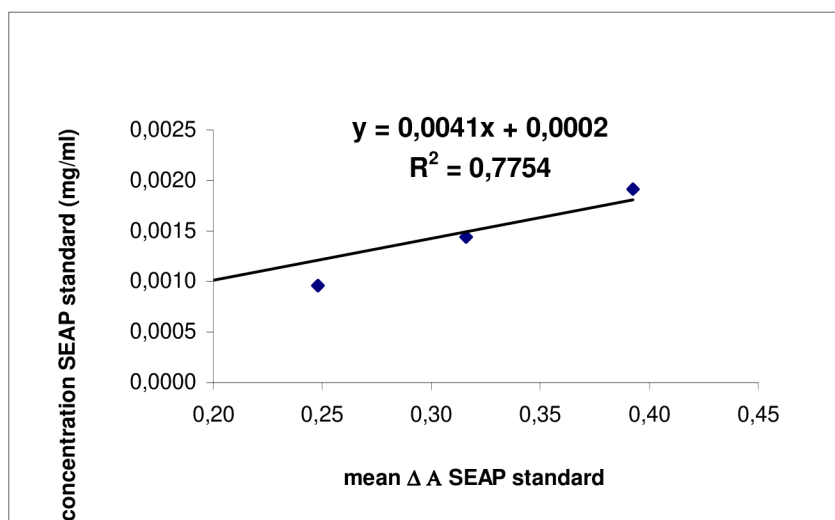
Tab.13: Koncentrace vzorků – 1. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,20	(ug/ml)
2	0,21	(ug/ml)
3	0,20	(ug/ml)
4	0,21	(ug/ml)
5	0,24	(ug/ml)
6	0,20	(ug/ml)
7	0,21	(ug/ml)
8	0,20	(ug/ml)
9	0,20	(ug/ml)
10	0,22	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,83	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,98	(ug/ml)
STD 12000x	1,27	(ug/ml)



Obr. 25: Koncentrace SEAP – 1. den po transfekci

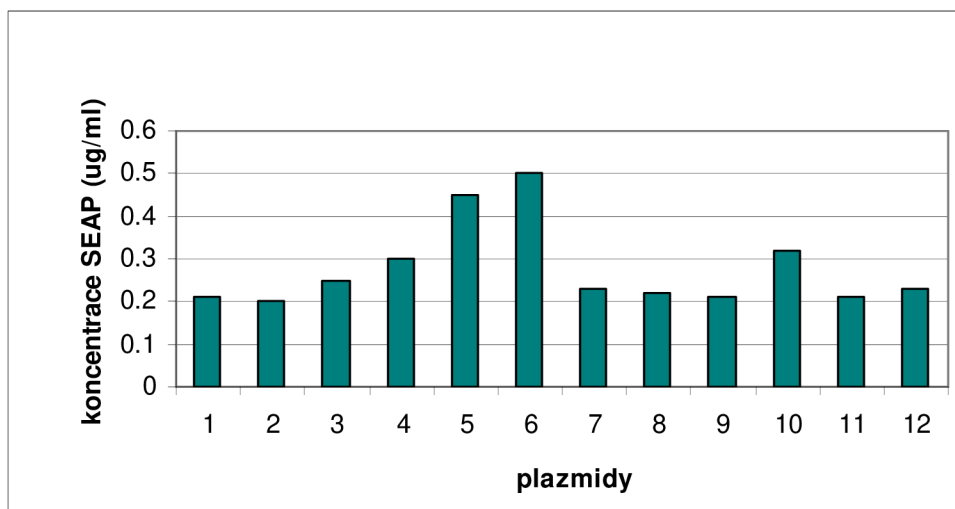
Transfekce – 2. den po transfekci



Obr. 26: Kalibrační křivka SEAP – 2. den po transfekci

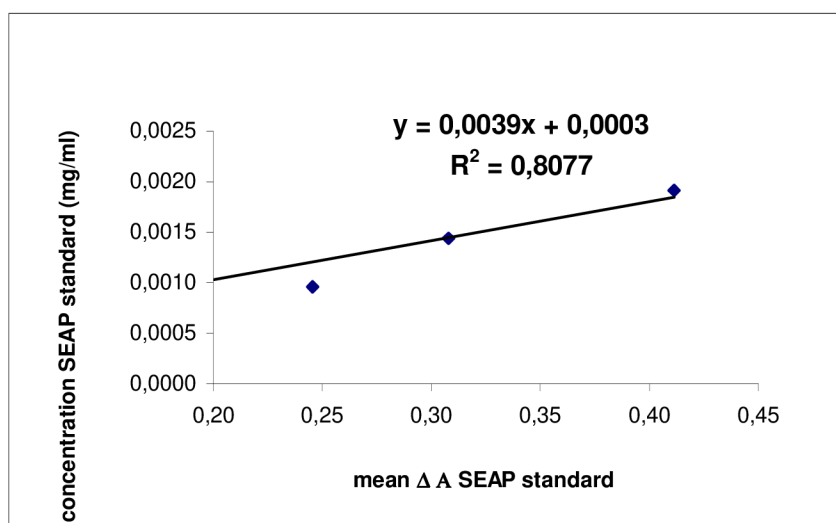
Tab. 14: Koncentrace vzorků – 2. den po transfekci

Koncentrace vzorku		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,20	(ug/ml)
3	0,25	(ug/ml)
4	0,30	(ug/ml)
5	0,45	(ug/ml)
6	0,50	(ug/ml)
7	0,23	(ug/ml)
8	0,22	(ug/ml)
9	0,21	(ug/ml)
10	0,32	(ug/ml)
11	0,21	(ug/ml)
12	0,23	(ug/ml)
STD 6000x	1,81	(ug/ml)
STD 8000x	1,49	(ug/ml)
STD 10000x	0,96	(ug/ml)
STD 12000x	1,22	(ug/ml)



Obr. 27: Koncentrace SEAP – 2. den po transfekci

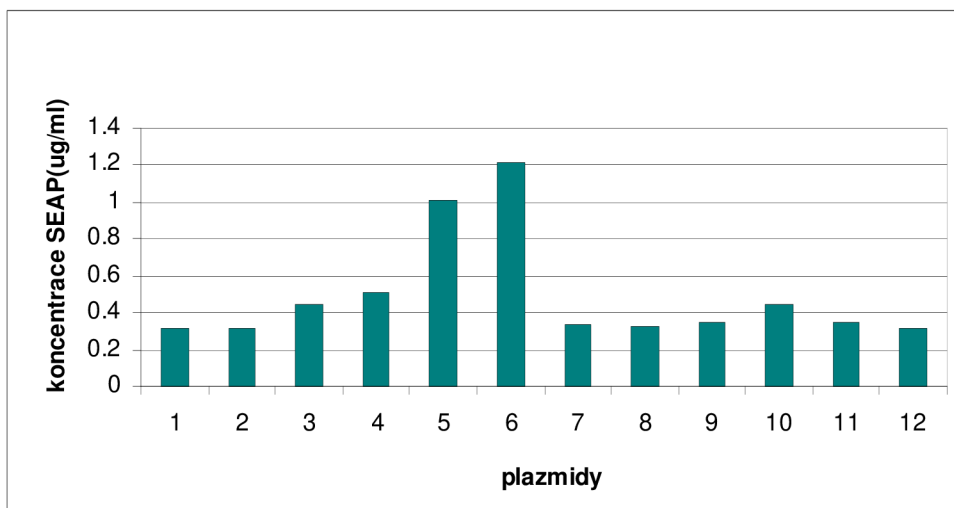
Transfekce – 3. den po transfekci



Obr. 28: Kalibrační křivka SEAP – 3. den po transfekci

Tab. 15: Koncentrace vzorků – 3. den po transfekci

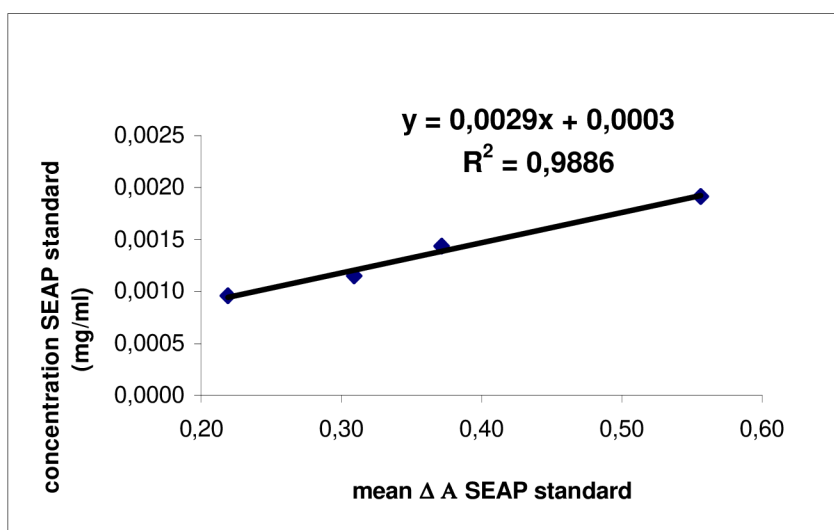
Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,31	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
4	0,51	(ug/ml)
5	1,01	(ug/ml)
6	1,22	(ug/ml)
7	0,34	(ug/ml)
8	0,33	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
10	0,45	(ug/ml)
11	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,50	(ug/ml)
STD 10000x	1,02	(ug/ml)
STD 12000x	1,26	(ug/ml)



Obr. 29: Koncentrace SEAP – 3. den po transfekci

Transfekce – 5. den po transfekci

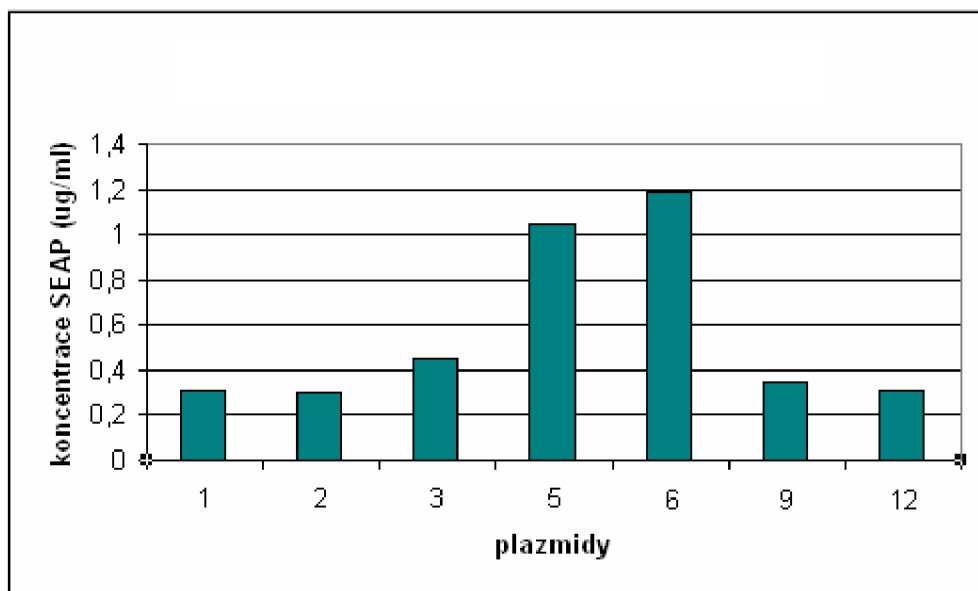
Na následujících grafech a v tabulkách jsou uvedeny jen některé hodnoty vzorků. U ostatních vzorků došlo ke kontaminaci a byly zlikvidovány.



Obr. 30: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

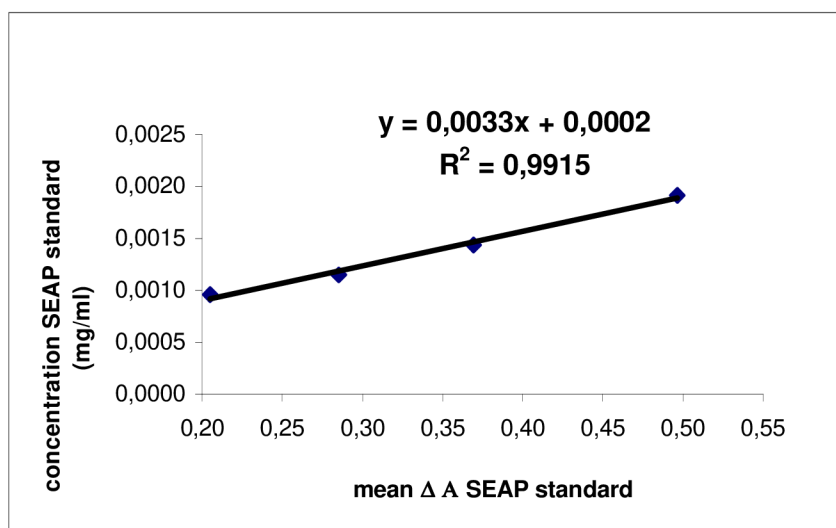
Tab. 16: Koncentrace vzorků – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,31	(ug/ml)
2	0,30	(ug/ml)
3	0,45	(ug/ml)
5	1,05	(ug/ml)
6	1,19	(ug/ml)
9	0,35	(ug/ml)
12	0,31	(ug/ml)
STD 6000x	1,91	(ug/ml)
STD 8000x	1,38	(ug/ml)
STD 10000x	1,20	(ug/ml)
STD 12000x	0,94	(ug/ml)



Obr. 31: Koncentrace SEAP – 5. den po transfekci

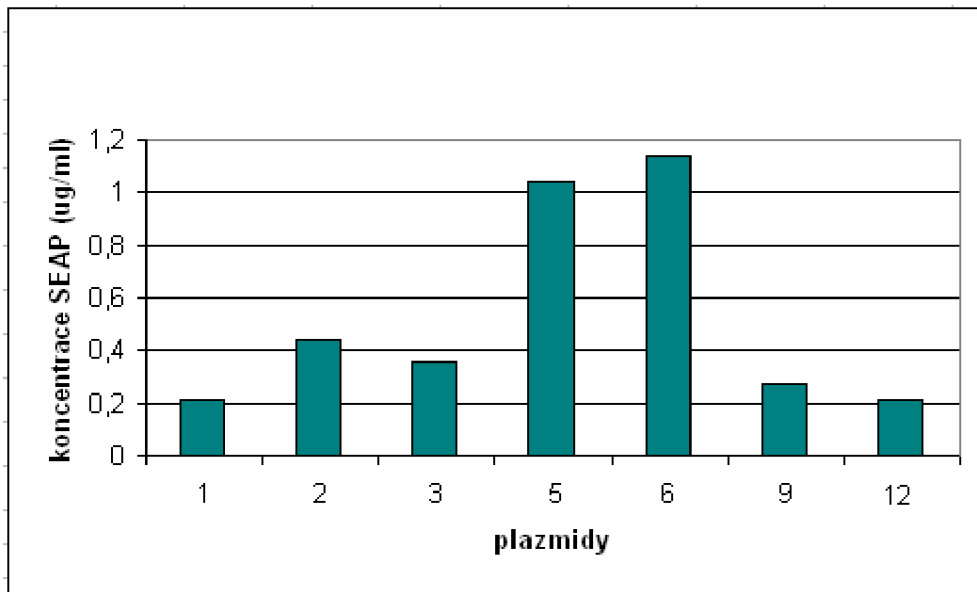
Transfekce – 6. den po transfekci



Obr. 32: Kalibrační křivka SEAP – 6. den po transfekci

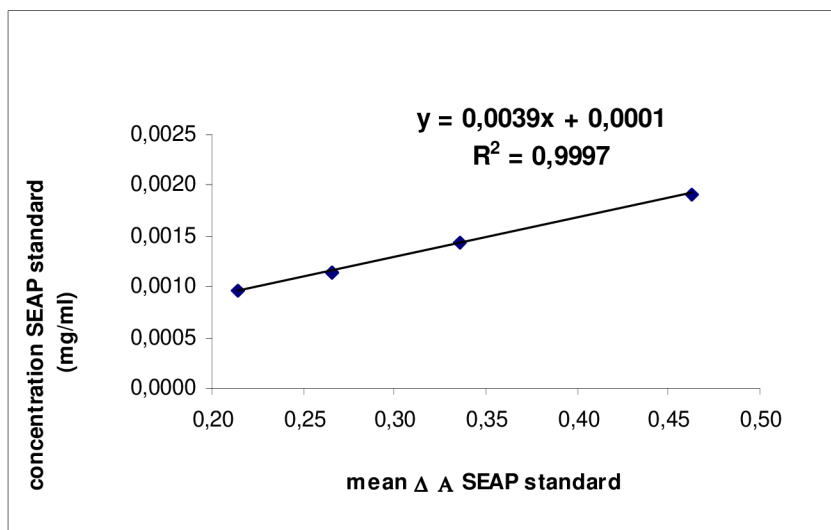
Tab.17: Koncentrace vzorků – 6. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,21	(ug/ml)
2	0,44	(ug/ml)
3	0,36	(ug/ml)
5	1,04	(ug/ml)
6	1,14	(ug/ml)
9	0,27	(ug/ml)
12	0,21	(ug/ml)
STD 6000x	1,84	(ug/ml)
STD 8000x	1,42	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,88	(ug/ml)



Obr. 33: Koncentrace SEAP – 6. den po transfekci

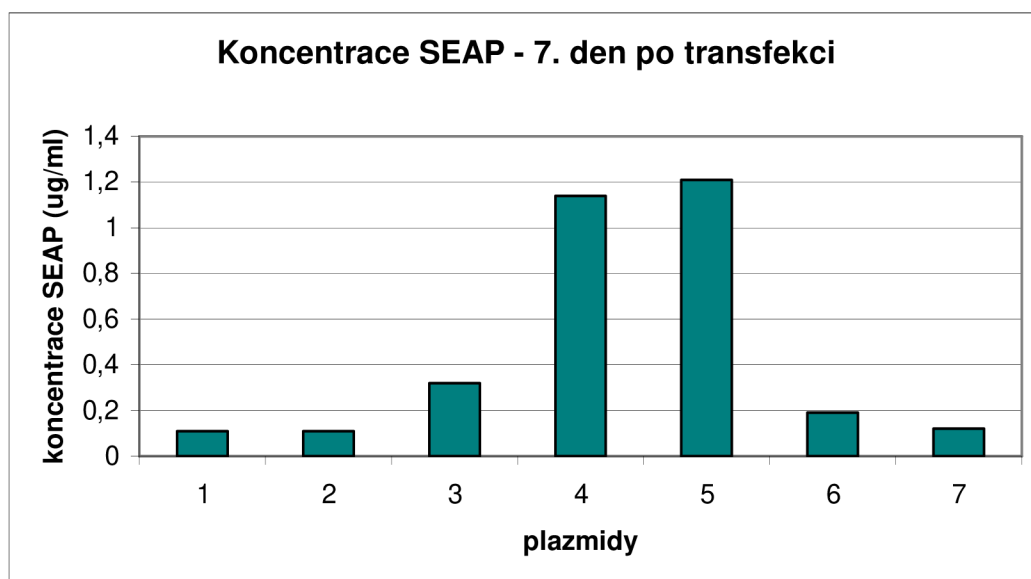
Transfekce – 7. den po transfekci



Obr. 34: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

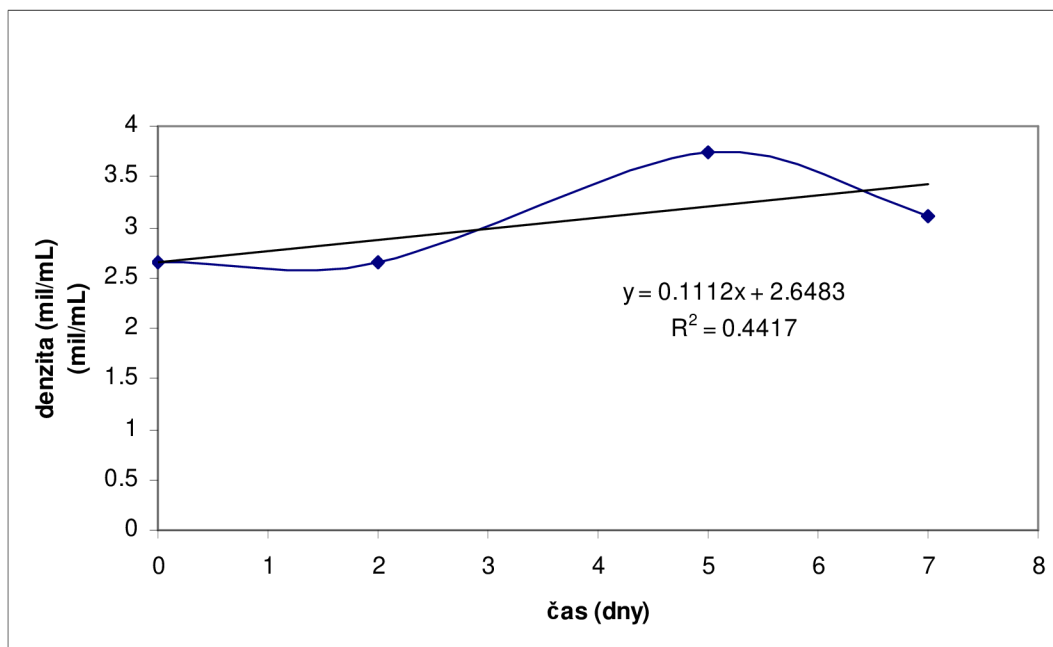
Tab.18: Koncentrace vzorků – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
1	0,11	(ug/ml)
2	0,11	(ug/ml)
3	0,32	(ug/ml)
5	1,14	(ug/ml)
6	1,21	(ug/ml)
9	0,19	(ug/ml)
12	0,12	(ug/ml)
STD 6000x	1,90	(ug/ml)
STD 8000x	1,41	(ug/ml)
STD 10000x	1,14	(ug/ml)
STD 12000x	0,93	(ug/ml)

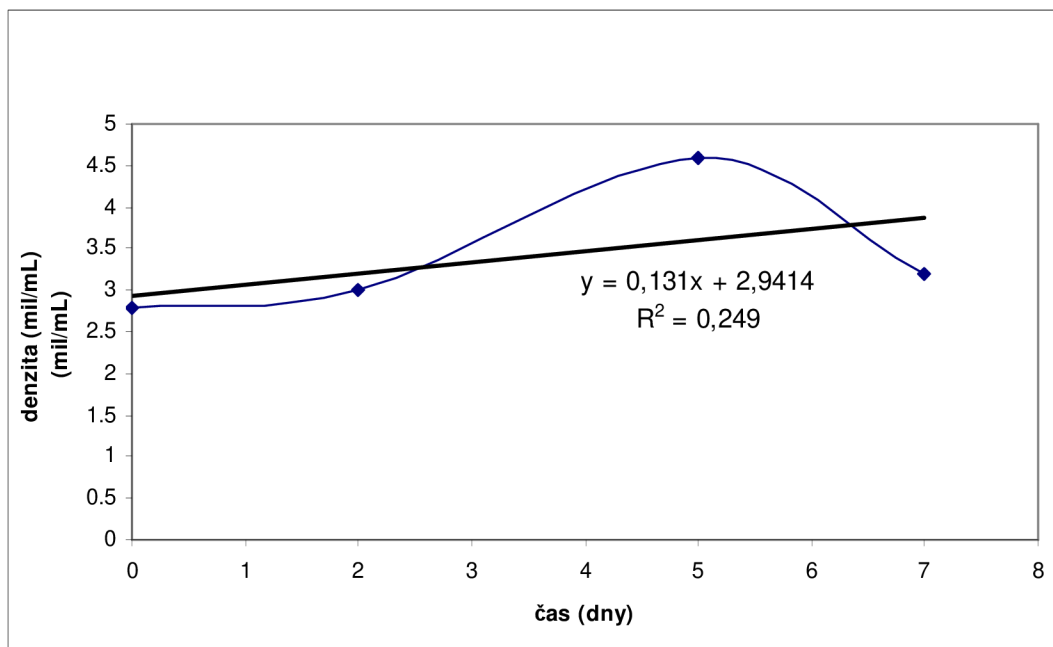


Obr. 35: Koncentrace SEAP – 7. den po transfekci

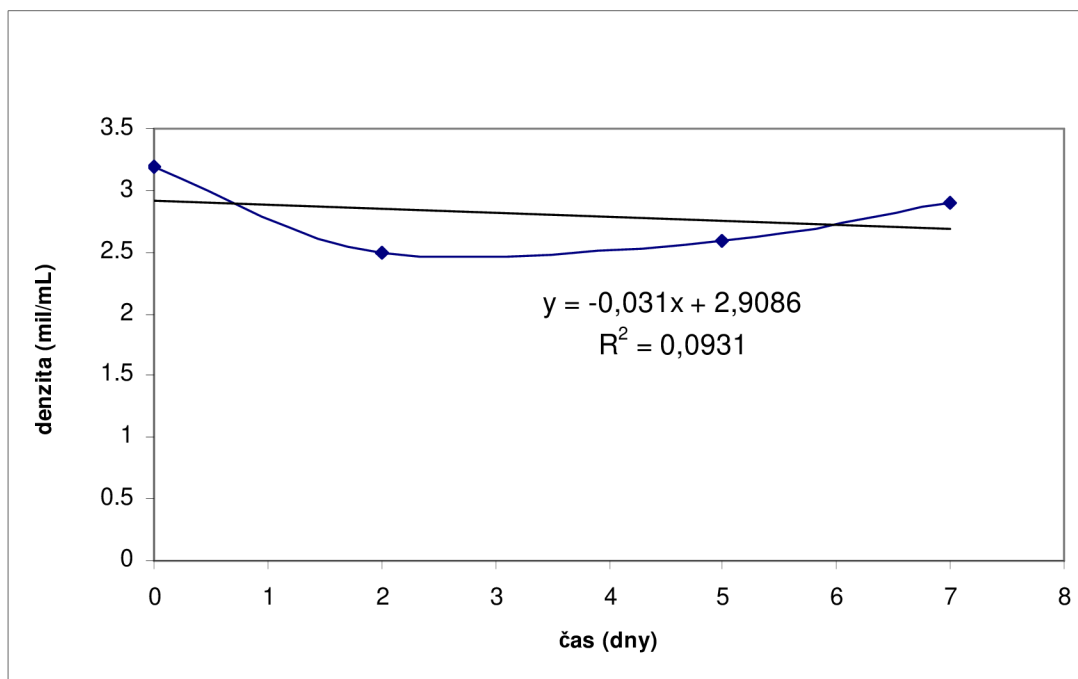
Níže jsou uvedené růstové křivky vzorků a kontroly, u kterých byly odebrány vzorky po celých sedm dní po transfekci.



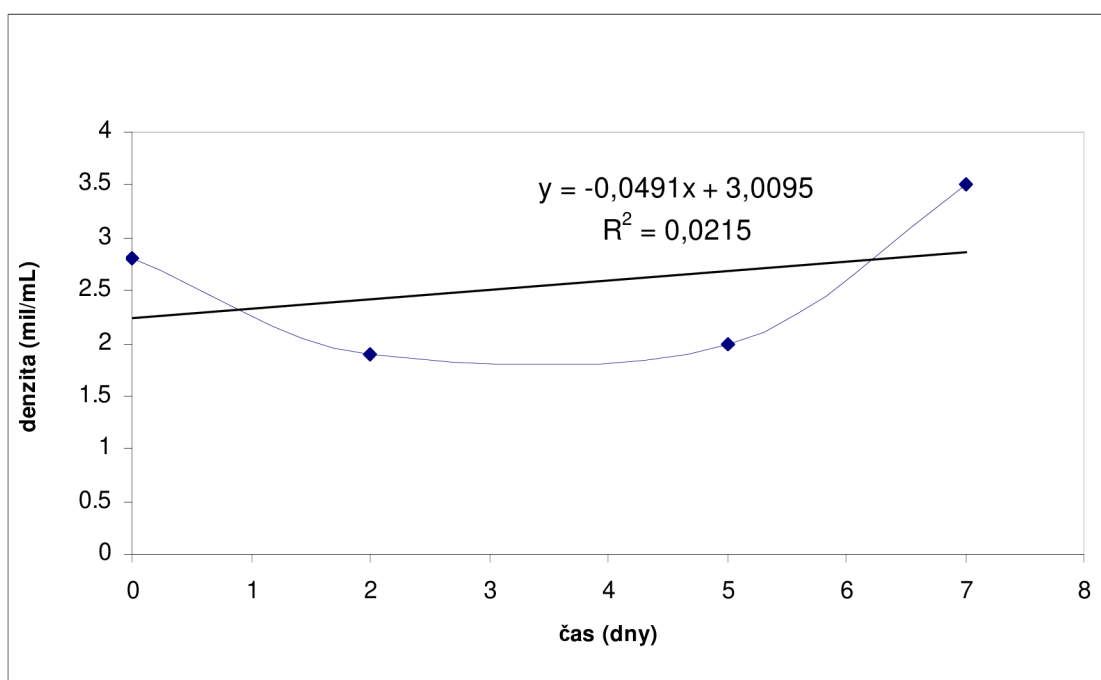
Obr 36: Růstová křivka – peak8, vzorek 1



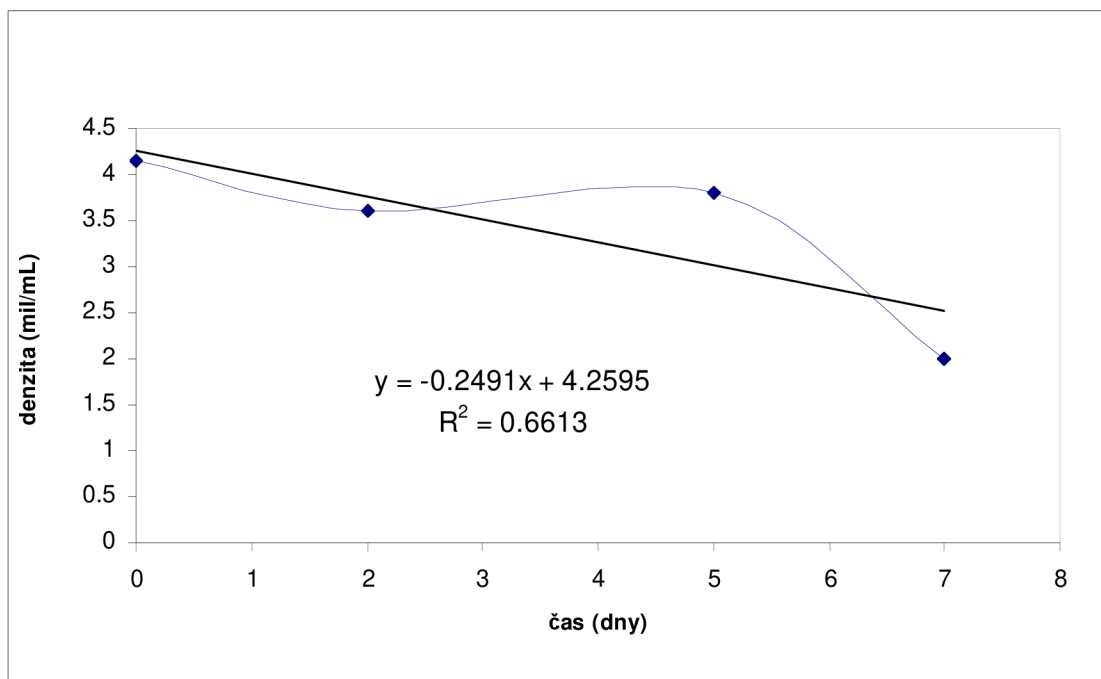
Obr. 37: Růstová křivka – peak8, vzorek 2



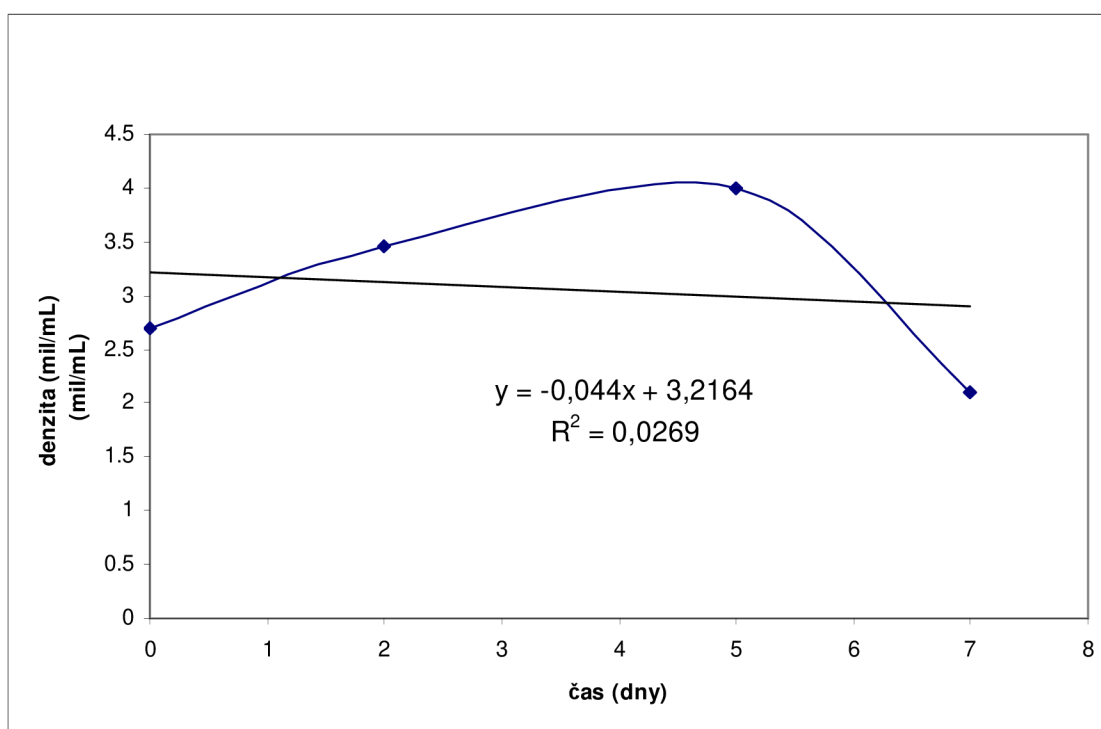
Obr. 38: Růstová křivka – pcDNA 5, vzorek 3



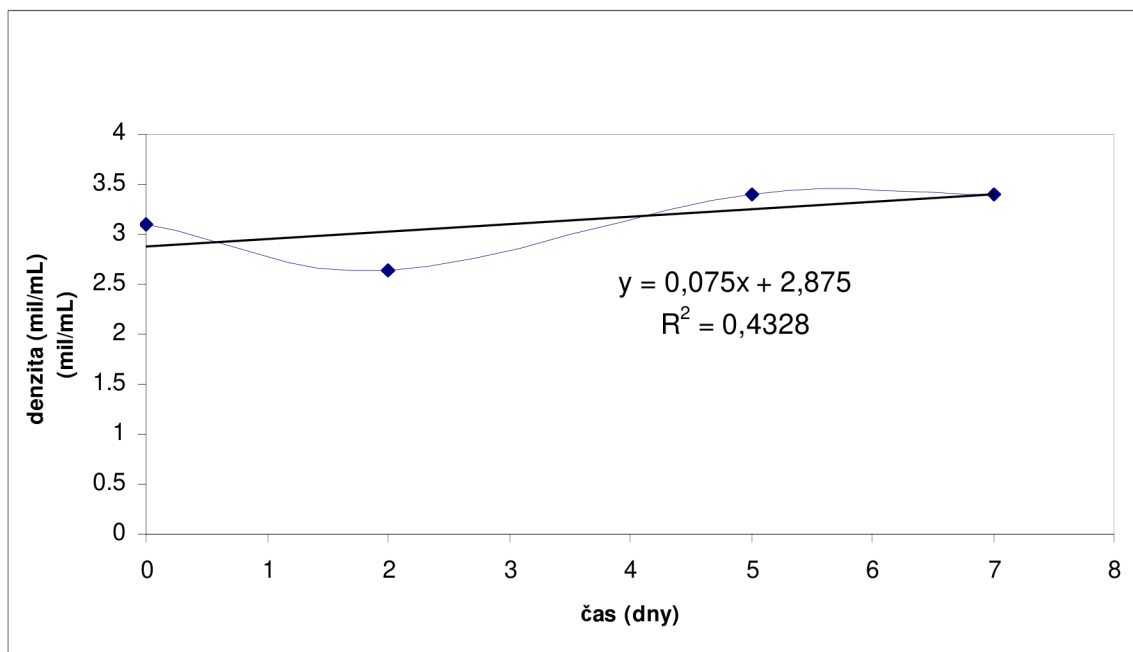
Obr. 39: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 5



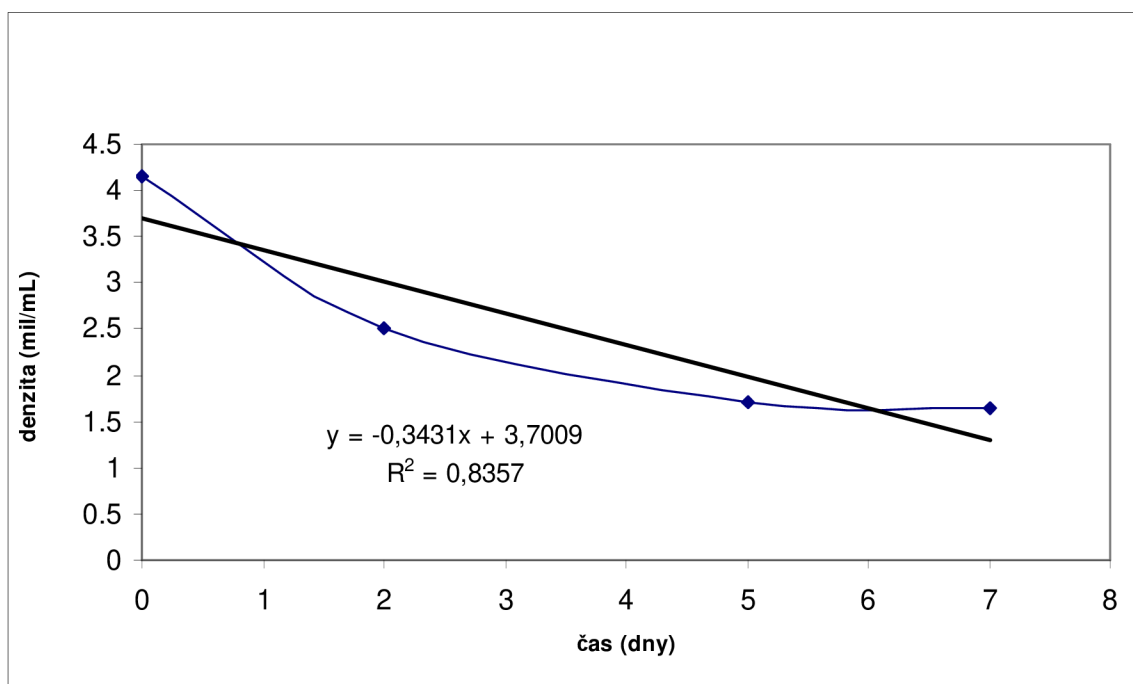
Obr. 40: Růstová křivka – pCEP4, vzorek 6



Obr. 41: Růstová křivka – pcDNA 3.1, vzorek 9



Obr. 42: Růstová křivka – peBSV, vzorek 12

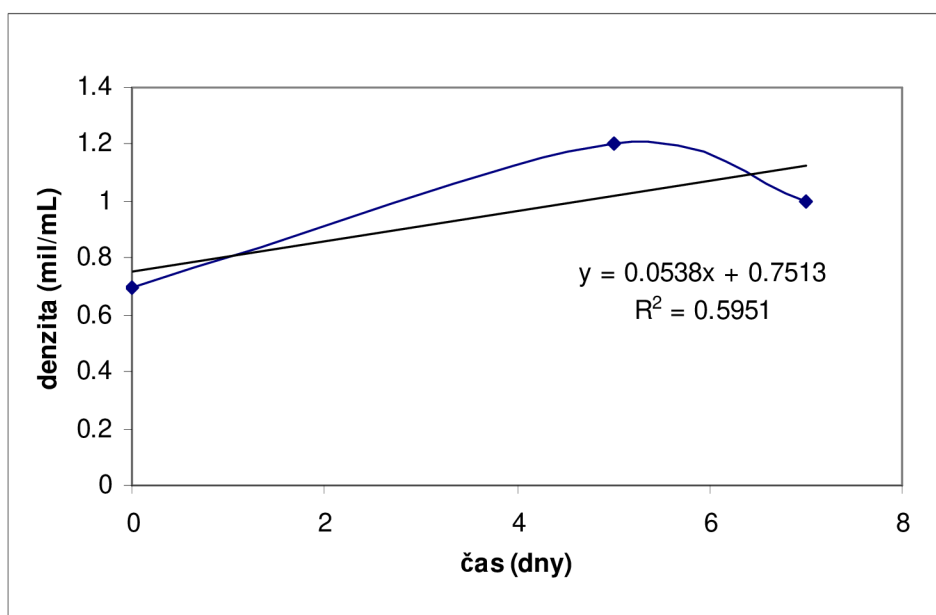


Obr. 43: Růstová křivka – kontrola

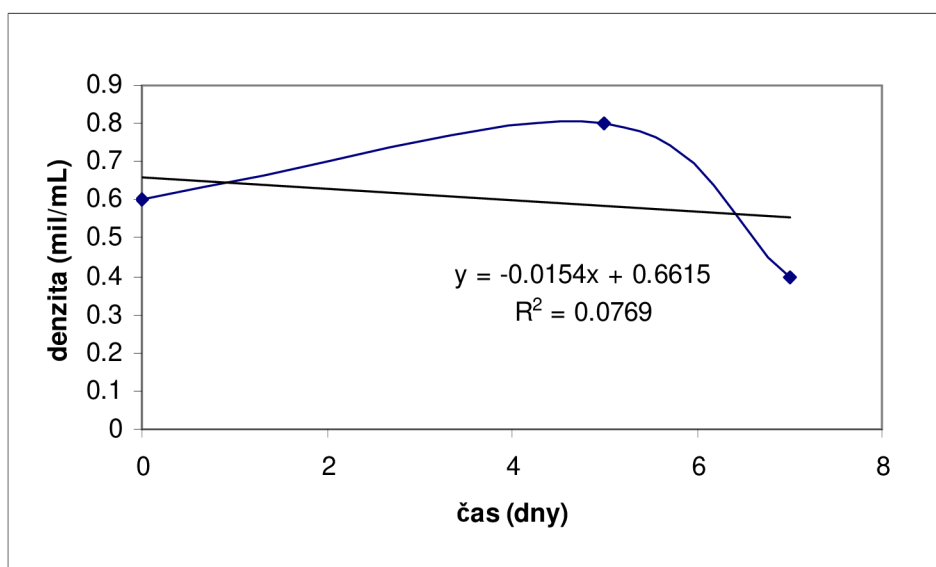
9.3 Metoda transfekce 2 - Durocher (2007)

Níže jsou uvedené grafy růstových křivek kontrolních vzorků u nichž nebyla provedena transfekce, dále růstové křivky měřené po transfekci bezsérových kultur a buněčných suspenzí udržovaných v 293BVs médiu s 1% přídavkem koňského séra.

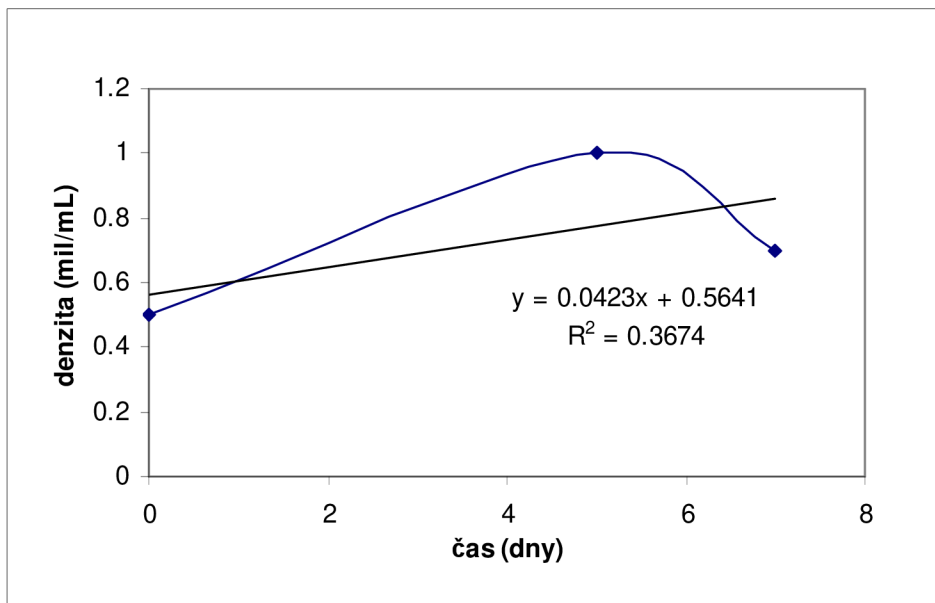
9.3.1 Bezsérová kultivace



Obr. 44: Růstová křivka – kontrolní vzorek (bezsérová kultura)

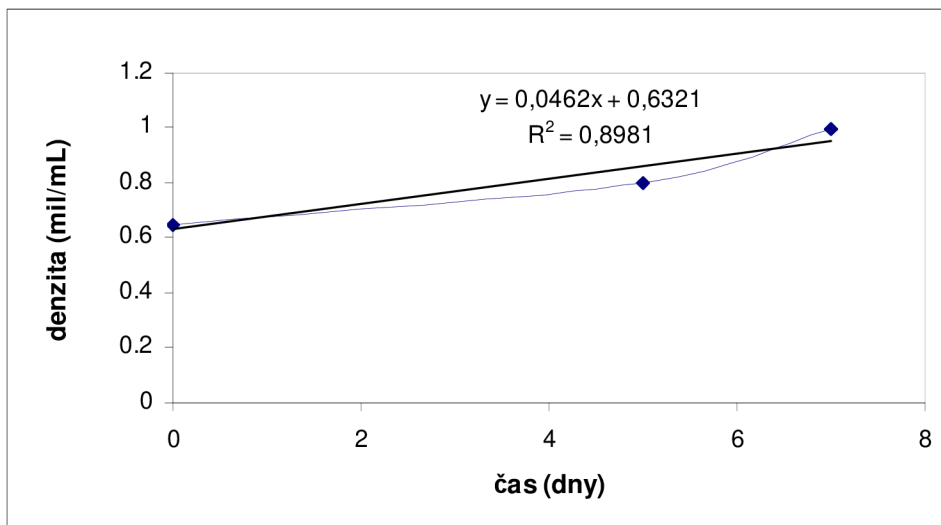


Obr. 45: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 1

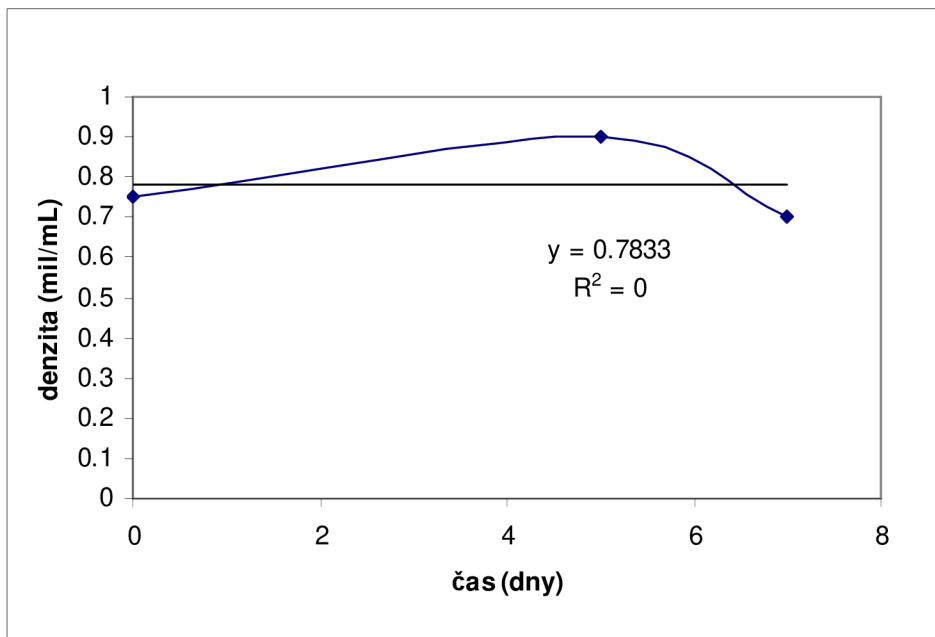


Obr. 46: Růstová křivka – Bezsérových kultur po transfekci 2

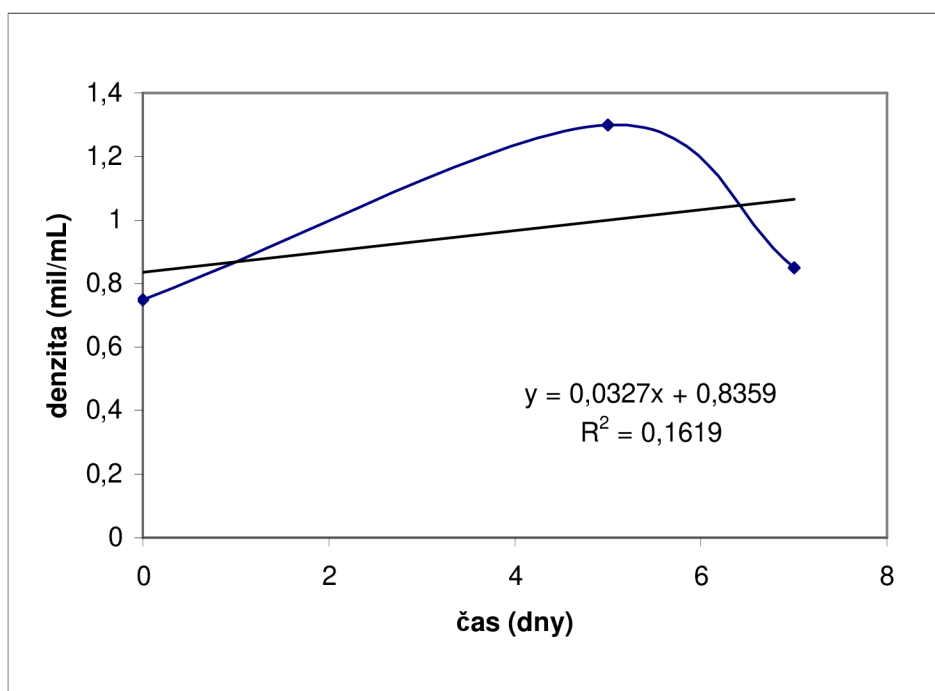
9.3.2 Kultivace s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 47: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra



Obr. 48: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 1

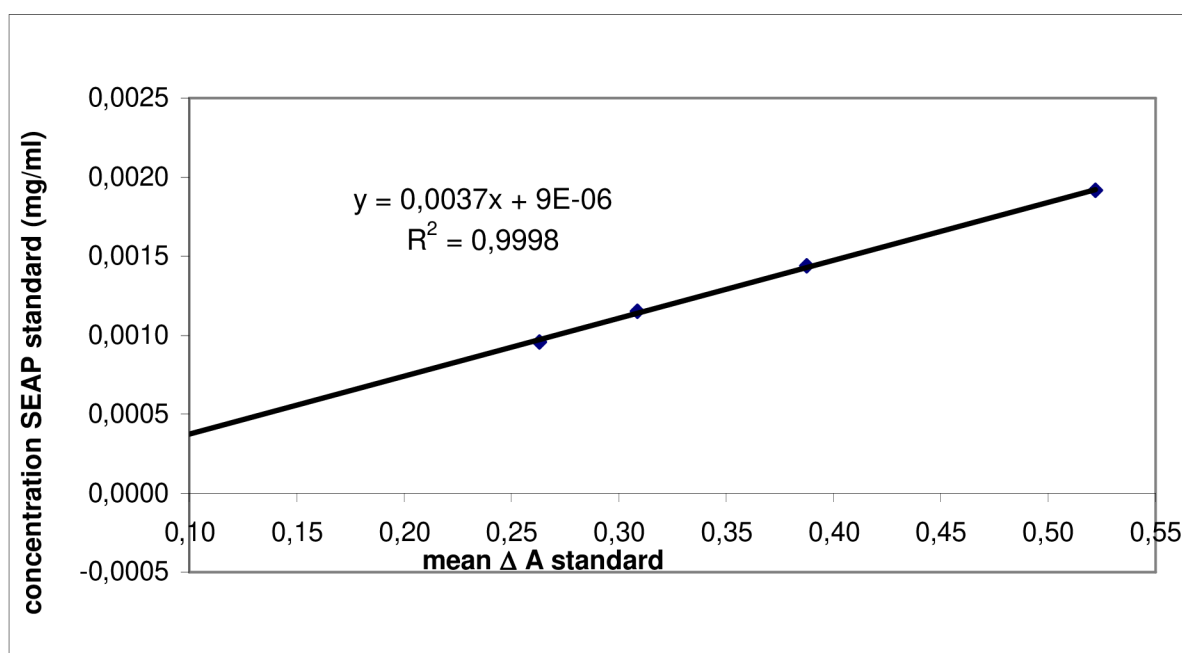


Obr. 49: Růstová křivka – Buněčných kultur s 1% přidavkem koňského séra po transfekci 2

9.4 Metoda transfekce 3 – Backliwal

Níže jsou uvedené grafy – kalibrační křivky SEAP, které byly vytvořeny pomocí kinetického fotometrického měření standardů. Měření bylo prováděno v časech 0, 1, 2, 3 min při 405 nm. Kalibrační křivka SEAP znázorňuje závislost koncentrace alkalické fosfatázy v mg/ml na průměrné hodnotě absorbance v různých časech. Jako blank byl použit roztok pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy. Dále jsou zde uvedeny tabulky s výsledky koncentrací SEAP v jednotlivých vzorcích.

5. den po transfekci

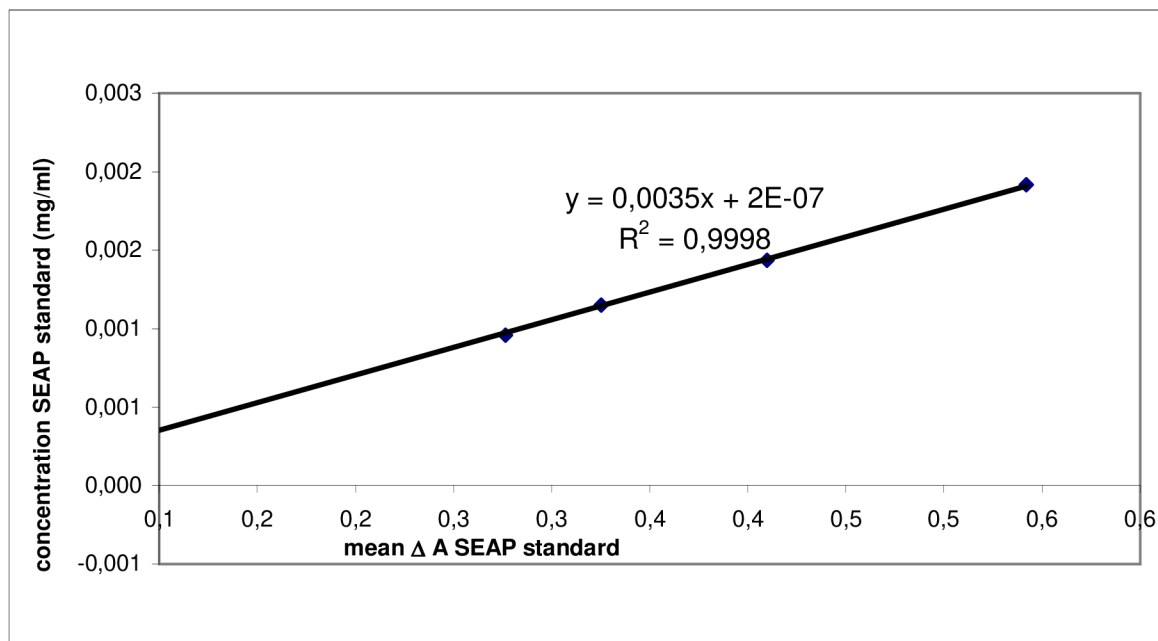


Obr. 50: Kalibrační křivka SEAP – 5. den po transfekci

Tab.19: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 5. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	2,016	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	0,85	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,03	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	5,9624	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	1,9235	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	2,9484	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4119	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	2,4933	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	1,41	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	0,92	(ug/ml)

7.den po transfekci

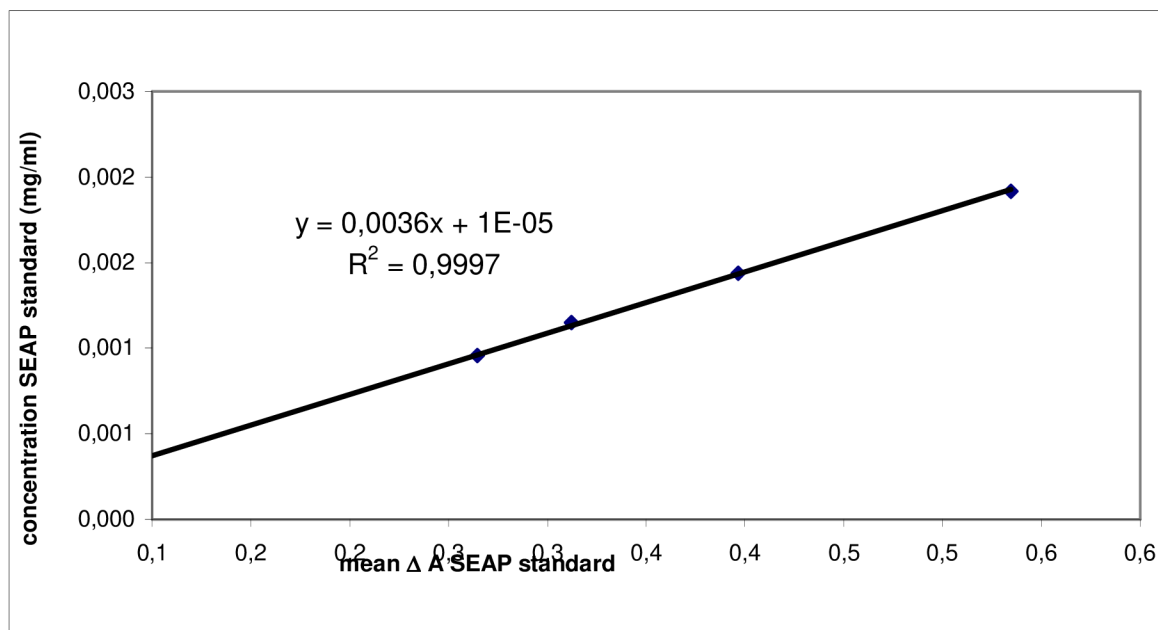


Obr. 51: Kalibrační křivka SEAP – 7. den po transfekci

Tab.20: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 7. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	5,5456	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,1204	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	7,3656	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,8516	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	3,1088	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,0258	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,8648	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	3,2348	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,4014	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,2919	(ug/ml)

11. den po transfekci

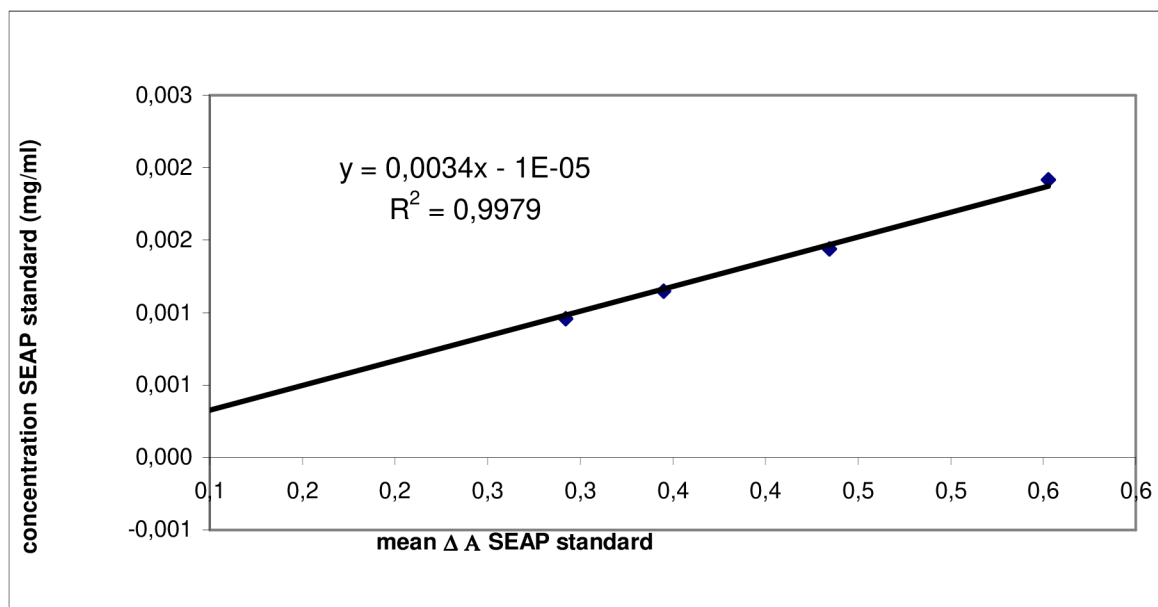


Obr. 52: Kalibrační křivka SEAP – 11. den po transfekci

Tab.21: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 11. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug/ml	6,488	(ug/ml)
DNA 15ug/ml	1,25	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	10,18	(ug/ml)
DNA 20ug/ml	12,34	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	4,6392	(ug/ml)
DNA 50ug/ml	5,2764	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,5204	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+Na butyrate	4,68	(ug/ml)
DNA 50ug+valproic acid	2,7246	(ug/ml)
DNA 50ug/ml+valproic acid	1,9632	(ug/ml)

14. den po transfekci

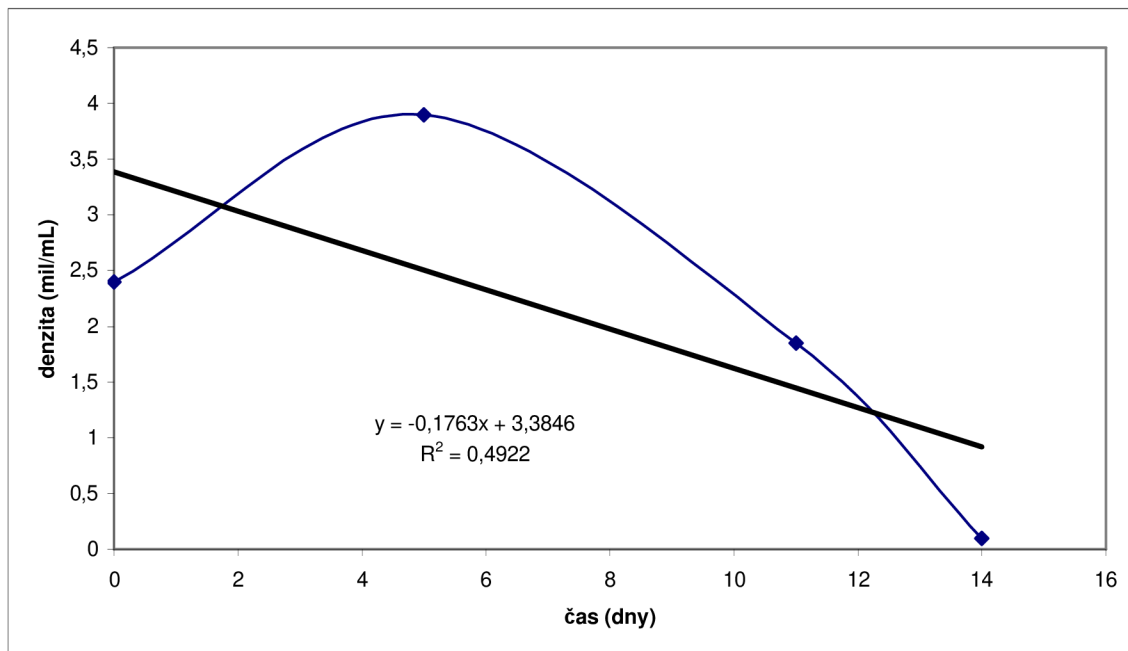


Obr. 53: Kalibrační křivka SEAP – 14. den po transfekci

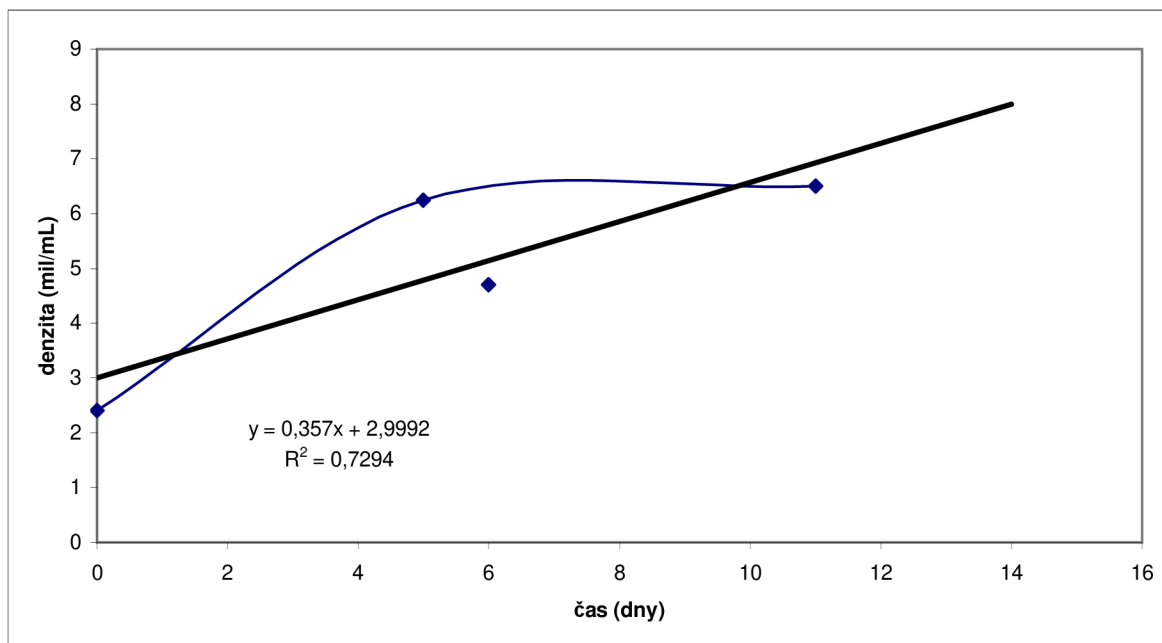
Tab.22: Koncentrace SEAP v jednotlivých vzorcích – 14. den po transfekci

Koncentrace vzorků		
DNA 15ug	7,8048	(ug/ml)
DNA 15ug	1,22	(ug/ml)
DNA 20ug	9,96	(ug/ml)
DNA 20ug	14,72	(ug/ml)
DNA 50ug	4,588	(ug/ml)
DNA 50ug	6,509	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,2344	(ug/ml)
DNA 50ug+Na butyrate	5,1664	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	3,2226	(ug/ml)
DNA 50ug+valporic acid	2,1261	(ug/ml)

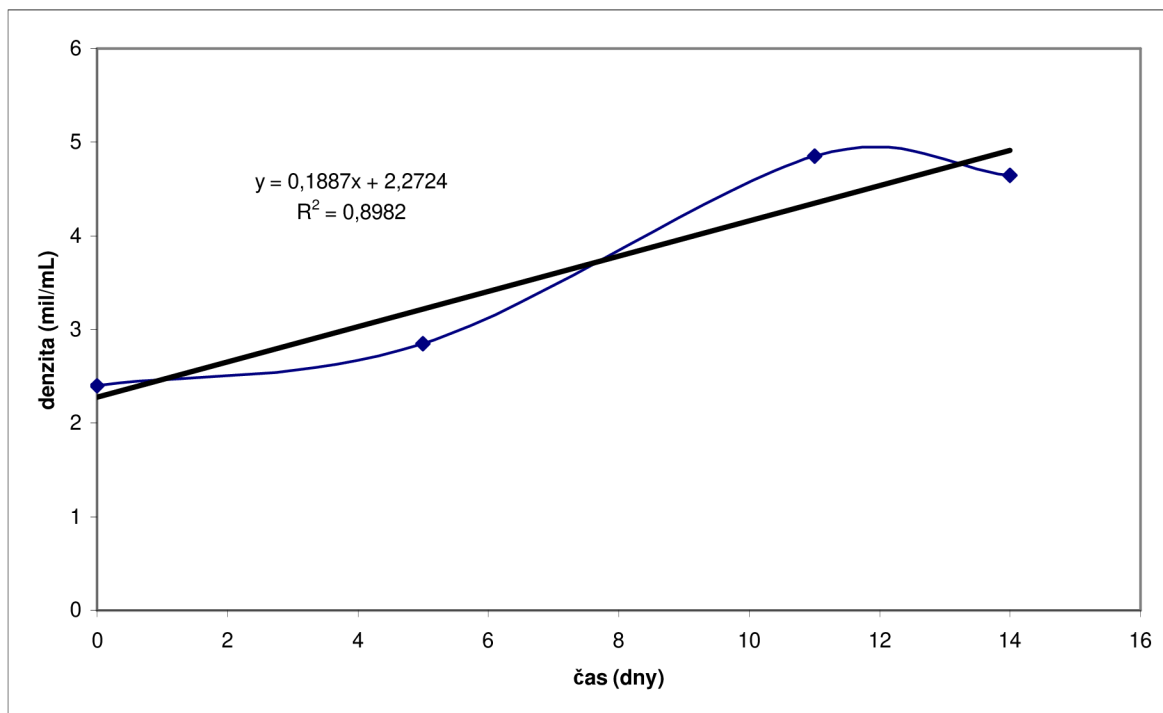
Níže jsou uvedené růstové křivky u vzorků a kontrol.



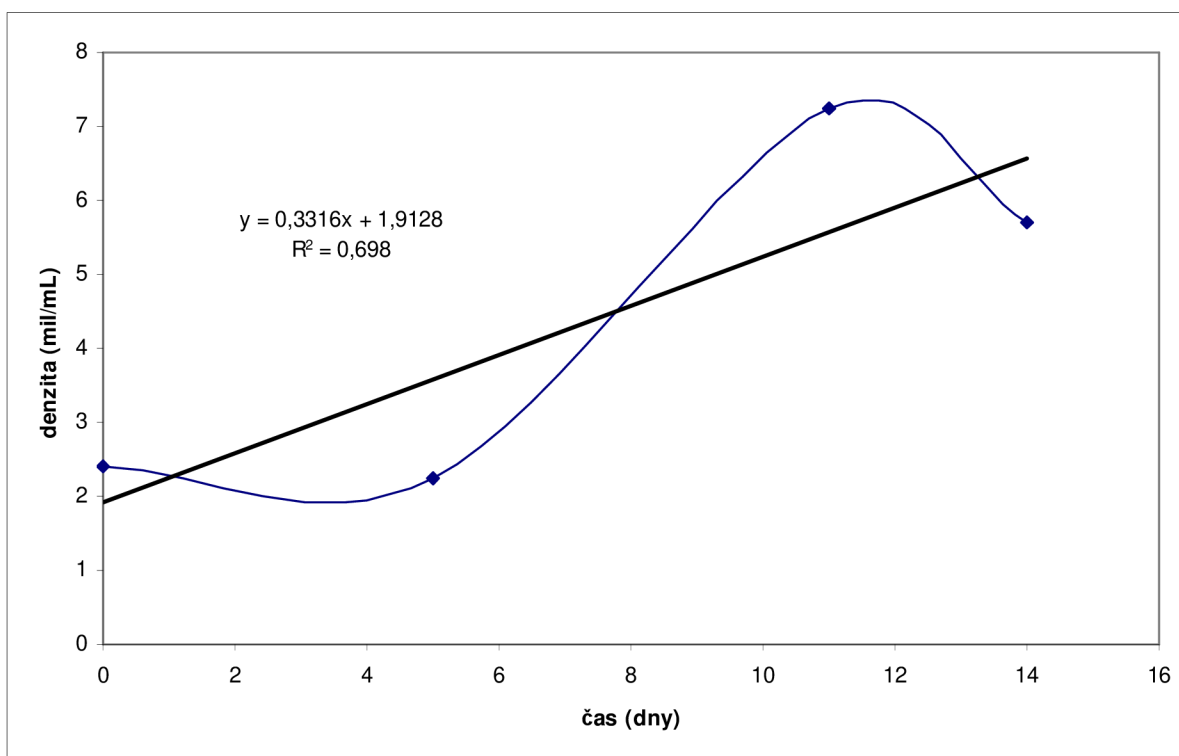
Obr. 54: Růstová křivka- kontrola 1



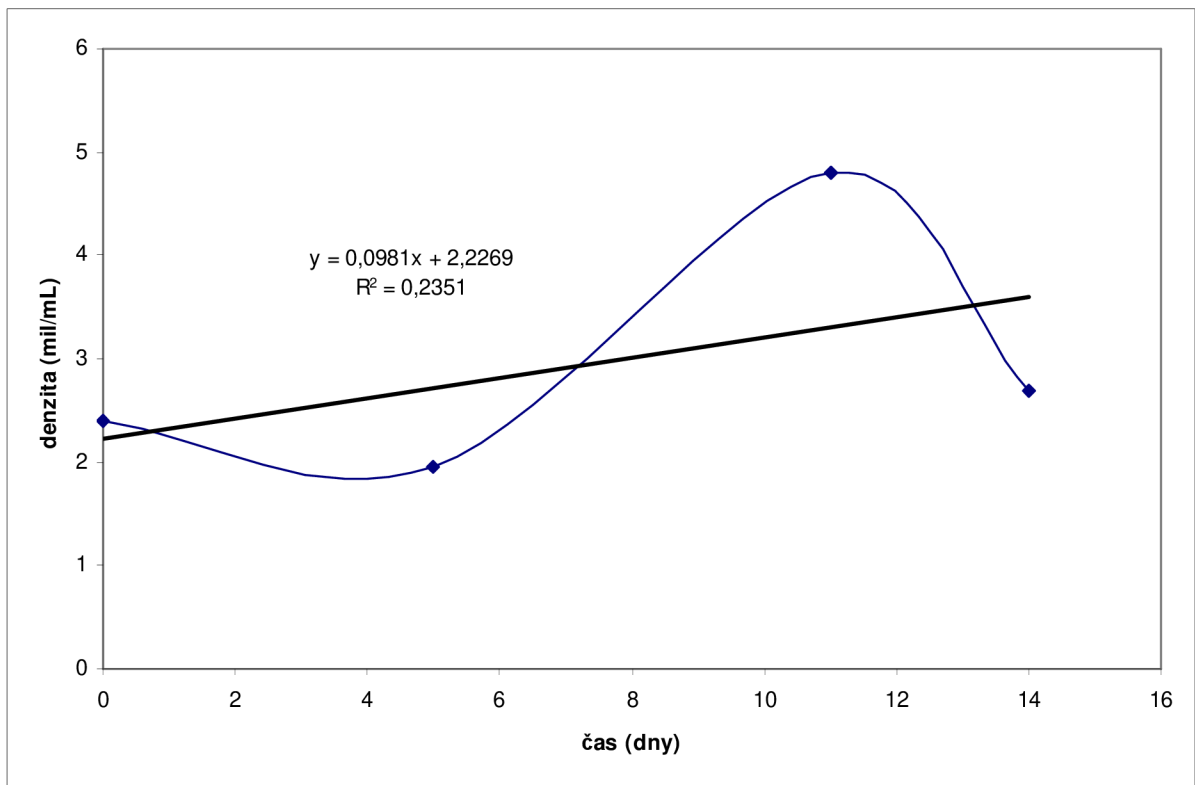
Obr. 55: Růstová křivka - kontrola 2



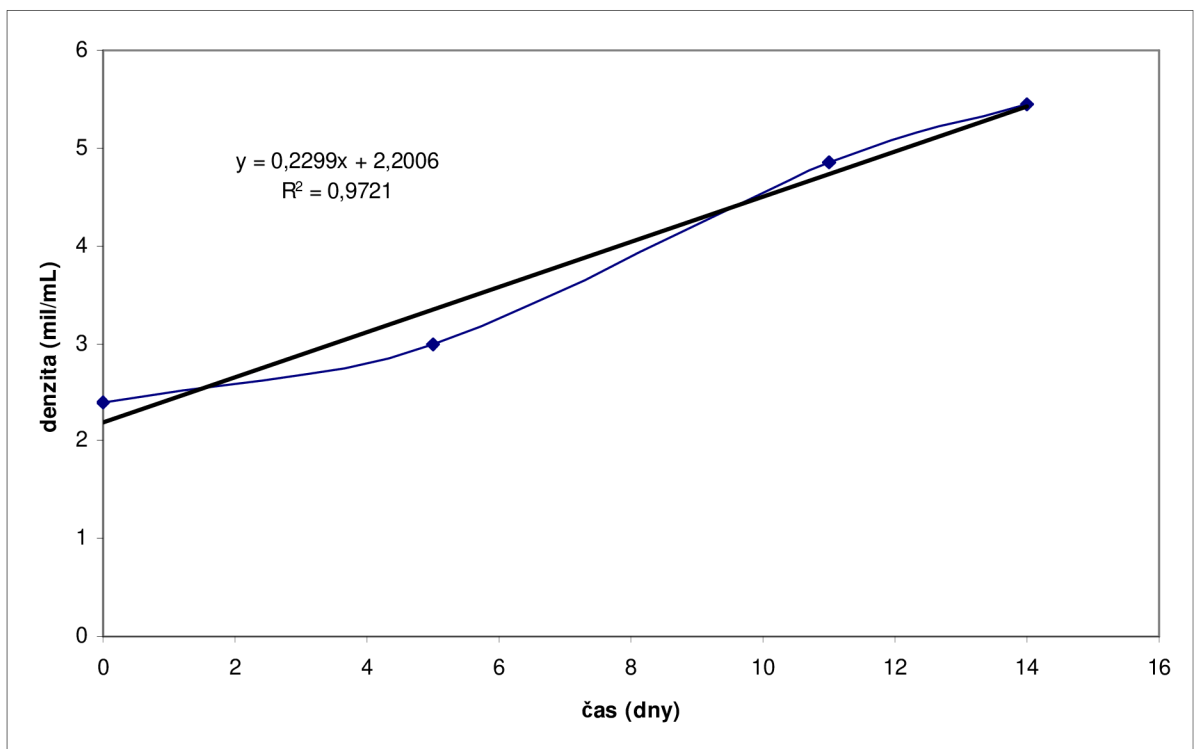
Obr. 56: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA A



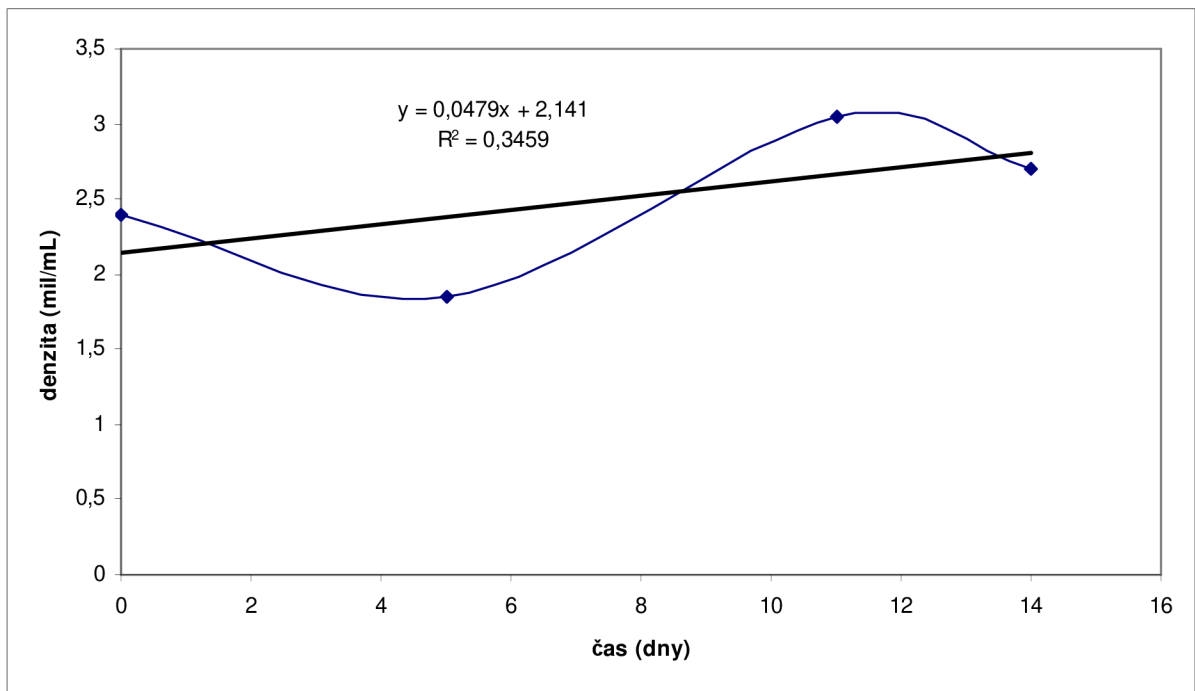
Obr. 57: Růstová křivka - 15 µg/ml DNA B



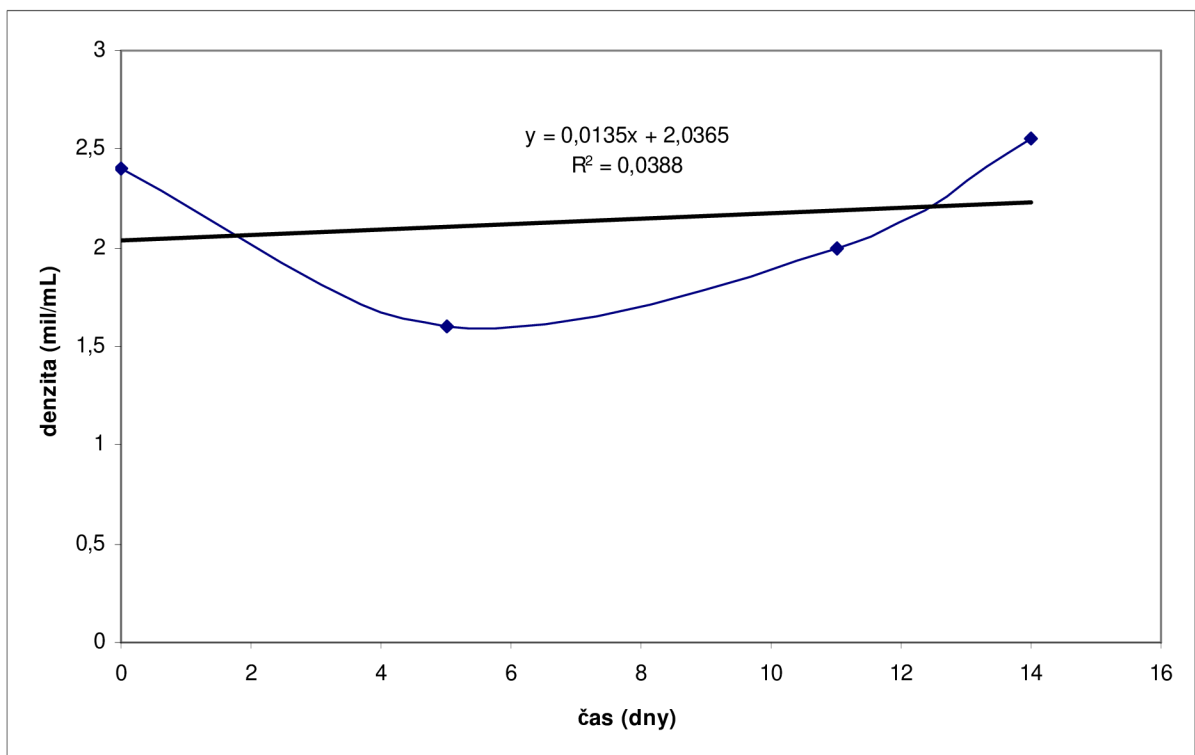
Obr. 58: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA A



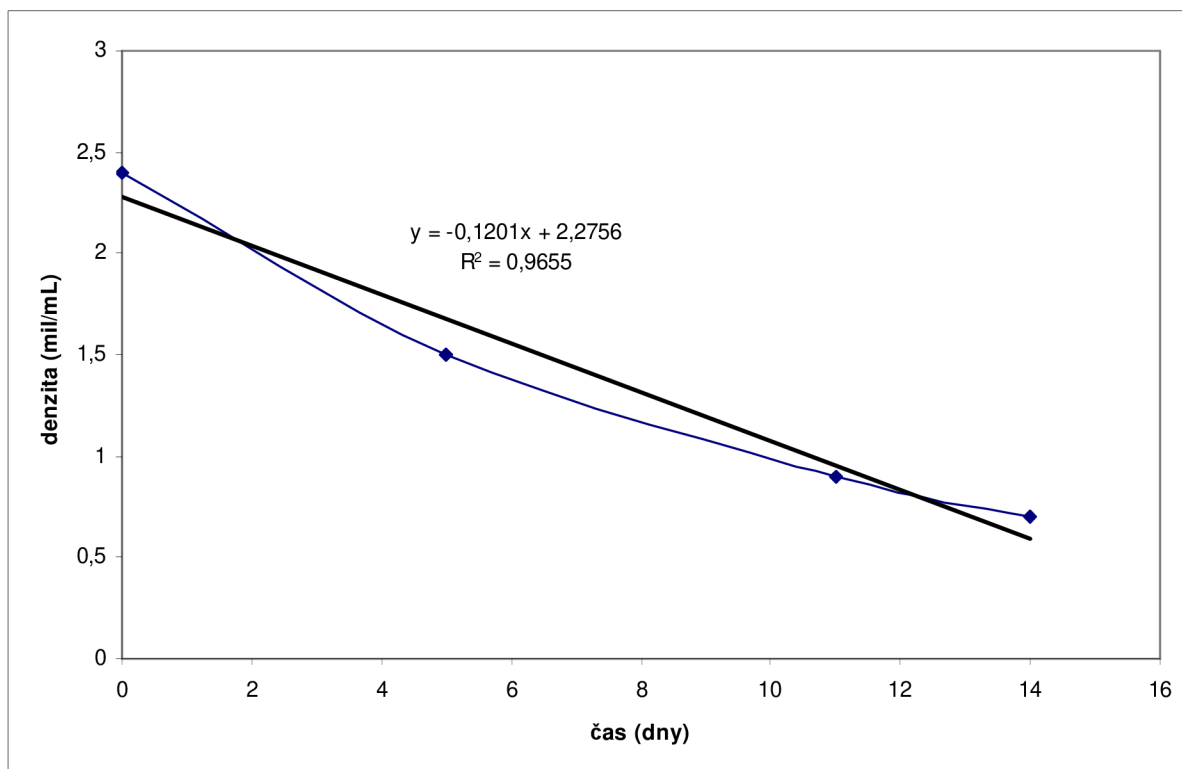
Obr. 59: Růstová křivka - 20 µg/ml DNA B



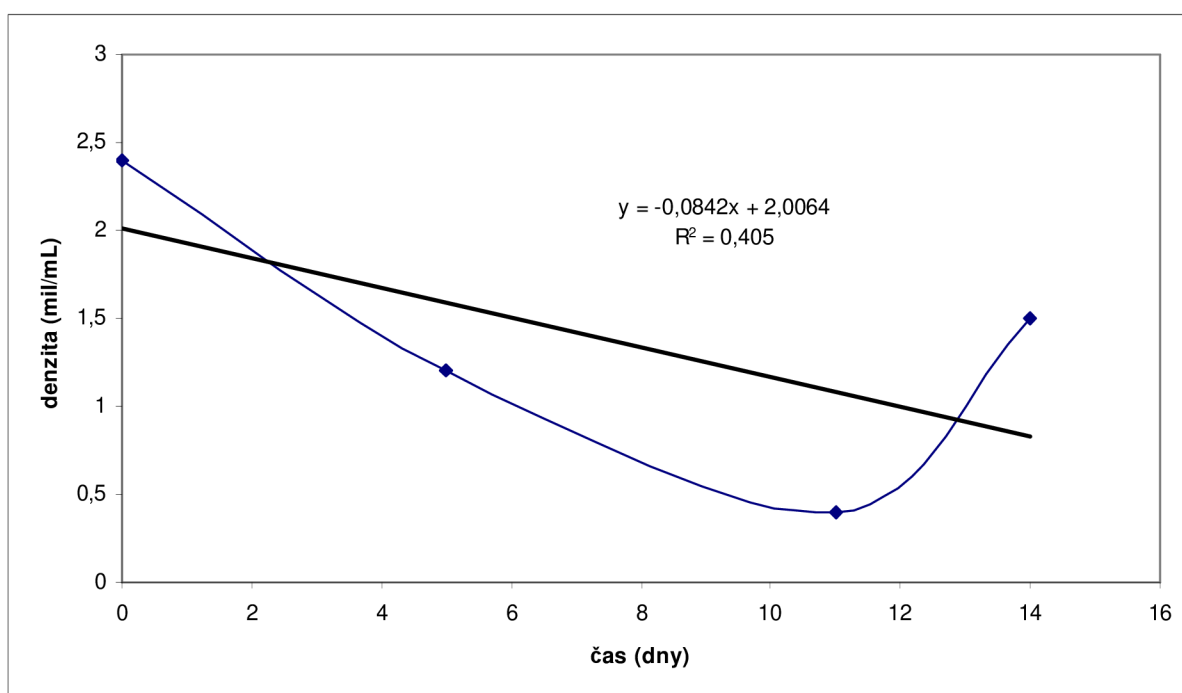
Obr. 60: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA A



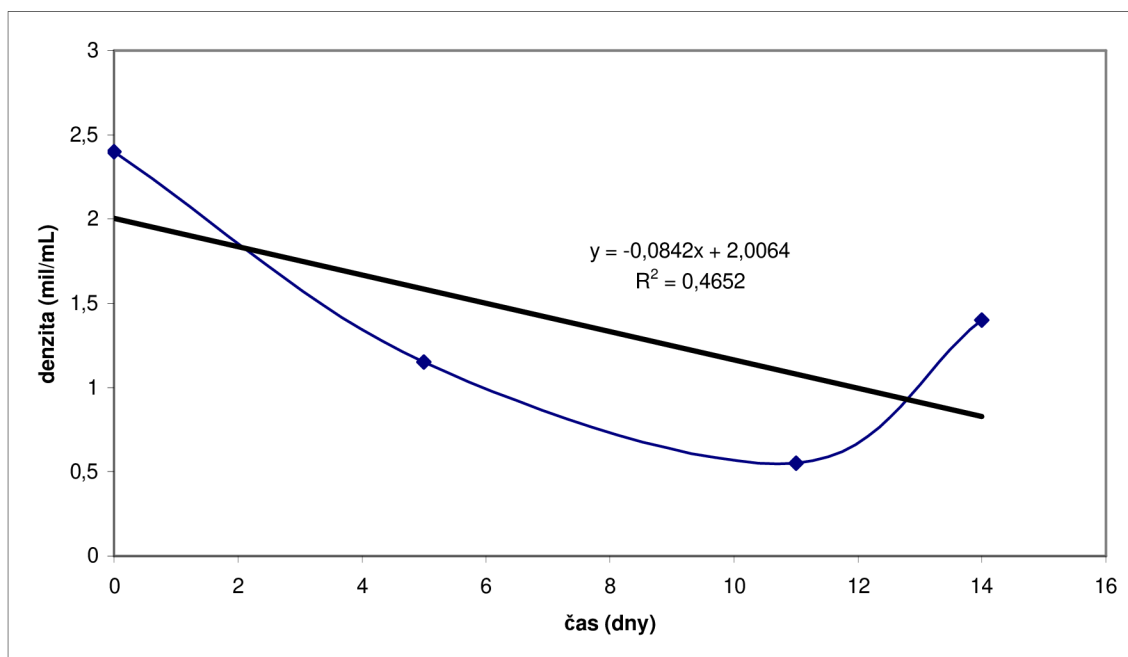
Obr. 61: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA B



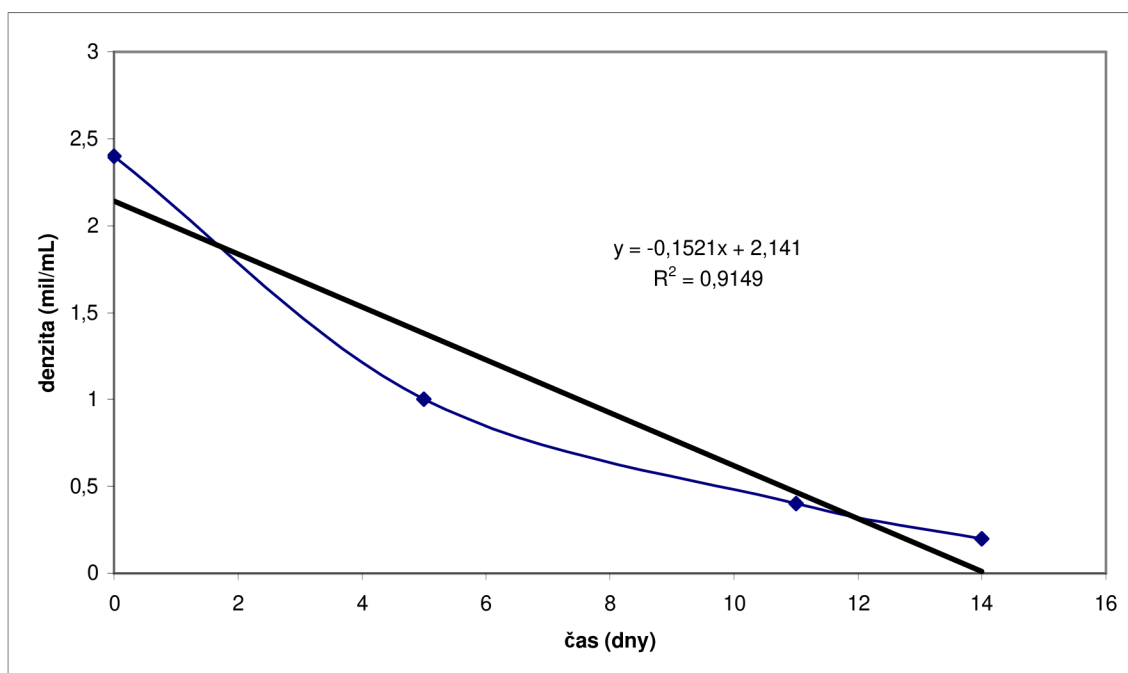
Obr. 62: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný A



Obr. 63: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + butyrát sodný B



Obr. 64: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina A



Obr. 65: Růstová křivka - 50 µg/ml DNA + valproová kyselina B