

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Optimalizace metody inkorporace molekul značené DNA do savčích buněk za účelem přípravy vzorků pro "in cell" spektroskopická měření na jednotlivých molekulách

Bakalářská práce

Markéta Wachtlová

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Tomáš Fessler

České Budějovice 2011

Wachtlova M, (2011): Optimalizace metody inkorporace molekul značené DNA do savčích buněk za účelem přípravy vzorků pro "in cell" spektroskopická měření na jednotlivých molekulách [Optimization of a method of incorporation of labelled DNA molecules into mammalian cells to prepare samples for in cell spectroscopic measurements on individual molecules. Bc. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This work was focused on an optimization of incorporation procedure of individual oligonucleotides labelled with fluorescent probes ATTO 680 and ATTO 740 into mammalian cells. Two methods of incorporation were optimized, namely cationic lipofection and electroporation. A review of different methods of DNA transfection is also presented.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním svého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 23.12. 2010

.....

Markéta Wachtlová

Poděkování

Můj největší dík patří Mgr. Tomáši Fesslovi. Děkuji mu za odborné vedení, cenné rady, připomínky, trpělivost, za vytvoření příjemného pracovního prostředí a hlavně za to, že jsem věděla, že se na něj můžu kdykoli obrátit s důvěrou a vědomím, že mi pomůže. Doc. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D. děkuji za zadání diplomové práce a možnost vytvořit vlastní vědeckou práci. Dále bych ráda poděkovala laborantkám Evě Řezníčkové a Evě Výletové za zaškolení a pomoc při pěstování buněk a všem, kteří mi v průběhu práce jakkoli pomohli.

Za obrovskou podporu děkuji svému příteli, dále všem kamarádům a na posledním místě, ač rozhodně ne významem, děkuji své mamince za pozitivní motivaci a podporu nejen finanční.

OBSAH

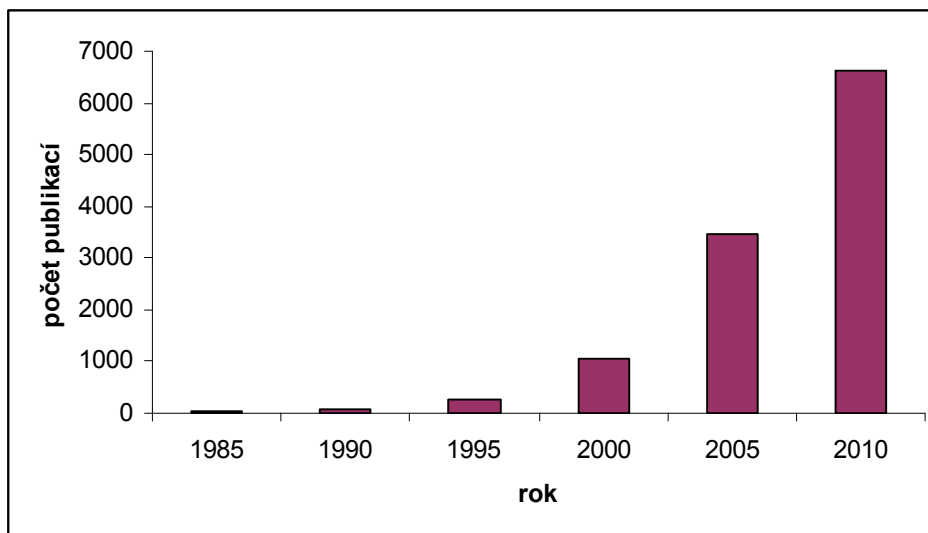
1 Úvod	1
2 Spektroskopie jednotlivých molekul a její aplikace	3
2.1 Foersterův rezonanční přenos energie na úrovni jednotlivých molekul (smFRET)	3
2.2 Fluorescenční polarizační anizotropie jednotlivých molekul	5
2.3 Fluorescenční korelační spektroskopie	5
3 Metody inkorporace nukleových kyselin.....	6
3.1 Virové metody.....	7
3.1.1 Adenovirové vektory	7
3.1.2 Retrovirové vektory.....	7
3.1.3 Adeno-asociované virové vektory	8
3.2 Nevirové metody.....	8
3.2.1 Fyzikální přístup.....	9
3.2.2 Chemický přístup	10
4 Cíle práce	13
5 Materiál a metodika práce.....	14
5.1 Materiál a přístroje	14
5.2 Metodika práce.....	16
5.2.1 Práce s buněčnými kulturami HeLa a CHO	16
5.2.2 Transfekce buněk	17
5.2.3 Vitalitní testy a lokalizace jednotlivých molekul	19
6 Výsledky	20
6.1 Optimalizace pěstování buněk	20
6.2 Vyhodnocení úspěšnosti inkorporace značených oligonukleotidů	21
6.3 Vyhodnocení viability buněk po transfekci	29

7 Diskuze	31
8 Závěr	34
9 Literatura.....	35

1 Úvod

Slavný fyzik, laureát Nobelovy ceny, Richard Phillips Feynman řekl: „Je velmi jednoduché zodpovědět mnoho základních biologických otázek; pouze se podíváte na věc!“ (Feynman, 1959) Techniky jednotlivých molekul právě toto umožňují.

Zadání hesla „single molecu*“ do vyhledávače Web Of Knowledge dokazuje intenzivní výzkum v oblasti jednotlivých molekul. Následující graf (Obr.1) znázorňuje počet publikací obsahujících ve svém názvu spojení „single molecu*“ v závislosti na čase.



Obr. 1: Počet publikací obsahujících ve svém názvu spojení „single molecu*“ v závislosti na čase. Graf dokazuje exponenciální nárůst studií, zabývajících se tematikou jednotlivých molekul. Zdroj: www.isiknowledge.com dne 14.12.2010.

Zatímco metody pracující s velkými soubory molekul poskytují informace pouze o průměrných vlastnostech, single-molekulární metody (SM metody) podávají informace o distribucích a časových trajektoriích jednotlivých molekul. Tyto vlastnosti jinak zůstávají skryty v průměru. SM metody umožňují zkoumat jednotlivé členy heterogenní populace a identifikovat, třídít a kvantitativně porovnávat jejich subpopulace (Weiss, 1999). Proto jsou tyto techniky vhodné pro studium heterogenních systémů a k detekci ojedinělých jevů

(Cornish a Ha, 2007). Další předností těchto technik je možnost lokalizace molekul s přesností až na desítky nanometrů (Walter a spol., 2008).

SM metody mají využití i v biomedicině a farmacii. Pomáhají například porozumět molekulárním procesům zásadním pro působení léků. Pro jejich studium jsou SM metody vhodnější než experimenty na úrovni souboru molekul, jelikož ve výsledku na každou buňku působí jen několik stovek molekul léku. Dále mohou být zkoumány individuální změny v proteinech, např. enzymech. Změny struktury a funkce enzymů mohou způsobovat některé nemoci, proto by včasná detekce těchto změn na úrovni jednotlivých molekul mohla umožnit včasnou diagnózu a pomoci zabránit propuknutí nemoci. Příkladem aplikací spektroskopických metod na úrovni jednotlivých molekul jsou studia interakcí protilátek s jejich antigeny či biofyzikálních vlastností RNA, DNA a chromatinu. Těmito metodami mohou být mapovány a sekvenovány jednotlivé molekuly DNA. Dalším příkladem je studium molekulárních motorů (kinesin, myosin, dynein). Může být též pozorována infekce buněk jednotlivými virovými částicemi (Greulic, 2004).

Jelikož studium biomolekul vyžaduje experimenty za fyziologických podmínek, konečným cílem by mělo být zkoumání biologických procesů v živých buňkách. Častý výskyt mnoha druhů endogenních fluorescenčních molekul uvnitř buněk však takové studie ztěžuje. Doposud byla úspěšná detekce jednotlivých molekul *in vivo* získána díky promyšlenému výběru typu buněk, metabolického stavu a excitační vlnové délce (Mörtelmaier a spol., 2002). Jak již bylo zmíněno, hlavním problémem aplikace SM metod *in vivo* je autofluorescence buněk, která zasahuje do detekce fluorescenční emise značených molekul. Navíc metody značení fluoroforů v živých buňkách jsou složité a nepříliš specifické (Hinterdorfer a Van Oijen, 2009). Problém autofluorescence je možno řešit volbou fluoroforů ve „far-red“ a „near-infrared“ oblasti. (Ehrenschwender a spol., 2010). Nevýhodou těchto fluoroforů je nižší kvantový výtěžek a molární absorptivita, dále jejich nižší fotostabilita a větší velikost (www.invitrogen.com).

SM metody můžeme rozdělit do dvou kategorií. První z nich jsou metody umožňující manipulaci jednotlivých molekul. Řadíme sem především mikroskopii atomárních sil (AFM - atomic force microscopy), laserové optické pinzety či magnetické pinzety. Techniky umožňující detekovat a sledovat jednotlivé molekuly v reálném čase tvoří druhou kategorii.

Spadají sem například: single-molekulární fluorescence, Ramanova spektroskopie či dvoufotonová spektroskopie a mikroskopie. Zkoumat nové jevy s vyšší přesností umožňuje kombinace manipulačních a fluorescenčních technik, např. laserové pinzety s fluorescencí (Ritort, 2006).

2 Spektroskopie jednotlivých molekul a její aplikace

Fluorescencí nazýváme záření emitované při návratu elektronu z excitovaných singletových stavů do různých vibračních hladin elektronického základního stavu (Hof a spol., 2005). Single-molekulární fluorescence je založena na detekci světla emitovaného jednotlivými fluorofory, které jsou připojeny na zkoumané molekule. Fluorofory jsou excitovány ze svého základního stavu absorpcí světla z externího světelného zdroje. Detekovány jsou velmi malé objemy (femtolitry) zředěných roztoků (nanomolární koncentrace). Single-molekulární fluorescence je neinvazivní technika a jako taková může být využita ke studiu biologických dějů a systémů *in vivo* (Ritort, 2006).

2.1 Foersterův rezonanční přenos energie na úrovni jednotlivých molekul (smFRET)

Jedním z nejvýznamnějších pokroků v oblasti studia jednotlivých molekul je měření Foersterova rezonančního přenosu energie mezi jednotlivými donory a akceptory energie (smFRET). Poprvé tuto techniku použil Ha a spol. (1996).

Výhodou smFRET je schopnost odkrývat statickou a dynamickou heterogenitu v biologických systémech, která jinak zůstává skryta v průměru. Navíc mohou být odhaleny krátce existující meziprodukty, nedetekovatelné v souborných experimentech. Praktický význam smFRET spočívá v získání informací o kinetice a konformaci studované molekuly (Blanco a Walter, 2010).

Metody smFRET může být využito ke zjišťování intramolekulárních vzdáleností na molekule DNA a tedy konformace, případně změn konformace molekul DNA (Deniz a spol., 1999). K příkladům použití patří např. studium konformačních přechodů Hollidayova spojení (McKinney a spol., 2002), dále studium skládání ribozymu (Zhuang a spol., 2000; Tan a spol., 2003). Byla též studována dynamika rozbalování a skládání nukleosomu (Luger a Hansen, 2005).

Použití DNA polymerázy a smFRET umožňuje sekvenovat jednotlivé DNA molekuly. Braslavsky a spol. sledovali opakovanou inkorporaci fluorescenčně značených nukleotidů do jednotlivých vláken DNA s rozlišením jedné báze, což umožnilo zjištění sekvence (Braslavsky a spol., 2003). Díky smFRET byla v reálném čase sledována interakce mezi HIV reverzní transkriptázou a nukleovou kyselinou (Abbondanzieri a spol., 2008). Jedním z dalších využití je studium molekulárních motorů, např. ATP syntázy (Diez a spol., 2004; Zimmermann a spol., 2006) nebo kinesinu (Tomishige a spol., 2006; Mori a spol., 2007).

SmFRET slouží též ke studiu dynamiky a skládání proteinů. První studie aplikující smFRET na skládání proteinů provedli Hochstrasser a spol. a Weiss a spol. (Talaga a spol., 2000). Z mnoha prací zkoumajících skládání proteinů můžeme jmenovat studii zabývající se skládáním inhibitoru chymotrypsinu 2. (Deniz a spol., 2000). Dynamické studie reprezentuje např. Henzler-Wildman a spol., kteří zkoumali, jak enzym adenylát kináza dosahuje konformace, ve které jsou reaktivní skupiny v těsné pozici podporující katalýzu (Henzler-Wildman a spol., 2007).

Metoda byla též využita pro *in vivo* aplikace. Například byla zjištěna interakce EGF (epidermal growth factor) v EGFR (epidermal growth factor receptor) dimeru na molekulární úrovni (Sako a spol., 2000). SmFRET analýza byla využita i k výzkumu inter-EGF vzdáleností uvnitř párů EGF molekul, které mohou být nalezeny na povrchu A431 buněk. Na základě těchto vzdáleností byl odvozen model EGFR oligomerů (Webb a spol., 2008). Další aplikací je pozorování aktivace malého G proteinu Ras na úrovni jednotlivých molekul (Murakoshi a spol., 2004).

2.2 Fluorescenční polarizační anizotropie jednotlivých molekul

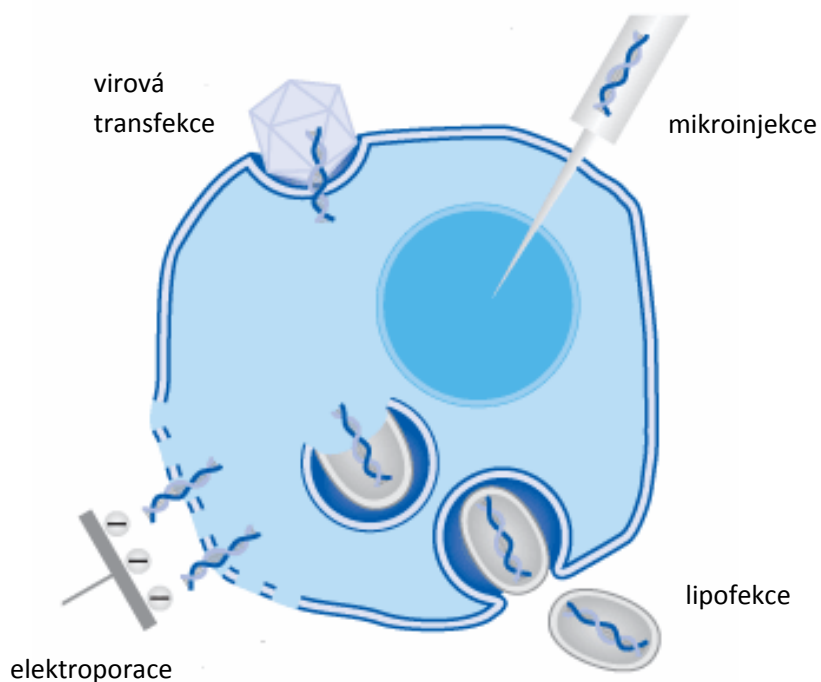
Fluorescenční polarizační anizotropie jednotlivých molekul (smFPA) poskytuje informace o velikosti, tvaru, flexibilitě a rotačních dynamikách makromolekul (Weiss, 1999). Pomocí smFPA byla například získána data o orientaci a mobilitě kinesinových molekul vázaných na mikrotubuly (Sosa a spol., 2001) nebo o konformačních stavech myosinu (Warshaw a spol., 1998).

2.3 Fluorescenční korelační spektroskopie

Aplikací fluorescenční korelační spektroskopie mohou být studovány interakce mezi proteiny (Stan a spol., 2000) nebo mezi nukleovými kyselinami či nukleovými kyselinami a proteiny (Sevenich a spol., 1998; Politz a spol., 1998). Dále může být zjišťována biochemická kinetika (Korn a spol., 2000), ale i dynamika proteinů *in vitro* (Schwille a spol., 2000; Hink a spol., 2000) a *in vivo* (Brock a spol., 1999; Schwille a spol., 1999; Köhler a spol., 2000).

3 Metody inkorporace nukleových kyselin

Transfekční technika byla vyvinuta Grahamem a Van der Ebem (Graham a Van der Eb, 1973). Zejména kvůli velikosti, negativnímu náboji molekuly DNA a negativnímu náboji membrány většiny buněk (kvůli přítomnosti kyseliny sialové) (Finkelstein a spol., 2007), dále kvůli množství enzymatických a membránových bariér vytvořených buňkou je samovolný vstup neporušené DNA do buňky a její následná exprese v jádře velmi neúčinný proces. Z tohoto důvodu byla vyvinuta široká řada metod, které usnadňují tento proces. Některé z těchto technik jsou znázorněny na Obr. 2. Základní rozdělení metod pro inkorporaci nukleových kyselin definuje dvě kategorie, jsou jimi metody virové a nevirové.



Obr. 2: Příklady technik inkorporace DNA. Převzato z www.biontexas.com a upraveno.

3.1 Virové metody

Viry se přirozeně vyvinuly pro úspěšný přenos cizích nukleových kyselin do hostitelských buněk, a tudíž virové vektory slouží jako účinné prostředky k přenosu genů. Mezi nejčastěji používané virové vektory patří retroviry, lentiviry, adenoviry, adenoasociované viry (Griffin a spol., 2002).

Ve srovnání s neviróvými metodami jsou tyto vektory výrazně efektivnější. Je tomu tak díky schopnosti virů zabalit geny do obalu, který rozpoznává specifická místa na povrchu cílových buněk a připojuje se k nim. Tím je umožněn průchod vektoru a jeho genetického „nákladu“ do buněk skrz dráhy, které chrání přicházející materiál před buněčnými degradačními procesy. Virové vektory jsou účinné, ale vážnými vadami jsou jejich časté cytotoxické, imunogenní a biohazardní vlastnosti (Friedmann a Rossi, 2007).

3.1.1 Adenovirové vektory

Adenoviry jsou neobalené dsDNA viry s velikostí genomu 26-45 kbp (Fauquet a spol., 2005). Mají několik vlastností, které z nich dělají vhodné vektory pro přenos genů. Mohou přenášet poměrně velké segmenty DNA, až 7,5 kb. Rychle infikují velkou řadu buněk a zajišťují vysokou úspěšnost přenosu genů ve srovnání s dalšími vektory. Další předností je snadná manipulace (Vorburger a Hunt, 2002).

3.1.2 Retrovirové vektory

Retroviry jsou obalené ssRNA viry s velikostí genomu 7-13 kb (Fauquet a spol., 2005). Tyto vektory jsou schopné transformovat svůj jednořetězcový RNA genom do dvouřetězcové DNA molekuly, která se stabilně integruje do cílového buněčného genomu. Díky tomu mohou retrovirové vektory trvale modifikovat hostitelský buněčný jaderný genom, a jsou tedy vhodné v případech, kdy je preferován trvalý přenos genů. Na druhou stranu schopnost retrovirů integrace do chromozomu hostitelské buňky zvyšuje možnost inzerční mutagenese a onkogenní aktivace. Pravděpodobnost těchto událostí může být

redukována poměrně jednoduchými modifikacemi vektorů, tyto přístupy se stále vyvíjejí a ověřují. Unikátní vlastnost má jedna ze tříd retrovirů - lentiviry: jsou schopné infikovat nedělicí se buňky (Anson, 2004).

3.1.3 Adeno-asociované virové vektory

Adeno-asociované viry řadíme do skupiny Parvoviridae, mají ssDNA genom o velikosti 4-6 kb (Fauquet a spol., 2005). Tyto vektory mají také schopnost integrace vektoru do hostitelského genomu, což umožňuje trvalou expresi integrovaného genu. Další výhodou je účinná transdukce velké řady hostitelských buněk. V neposlední řadě je u těchto vektorů oceňována nepatogenita, způsobují minimum buněčně-zprostředkovaných imunitních odpovědí. Ale malá kapacita a limitující velikost přenášených genů patří k nevýhodám těchto vektorů. Stejně jako riziko inzerční mutageneze (Monahan a Samulski, 2000).

3.2 Nevirové metody

Nevirové metody sloužící k přenosu genů rozdělujeme na fyzikální a chemické. Fyzikální přístup je založen na principu fyzikální síly, která proniká buněčnou membránou a zjednodušuje přenos genů do buňky. K fyzikálním postupům řadíme mikroinjekci, elektroporaci nebo genové pistole. Chemické metody využívají umělé nebo přirozeně se vyskytující sloučeniny jako nositele k přenosu genů do buněk. Těmito nositeli mohou být kationické lipidy, fosforečnan vápenatý či kationické polymery. Většina nevirových přístupů je však stále mnohem méně úspěšná než virové vektory, obzvláště pro přenos genů *in vivo* (Gao a spol., 2007).

3.2.1 Fyzikální přístup

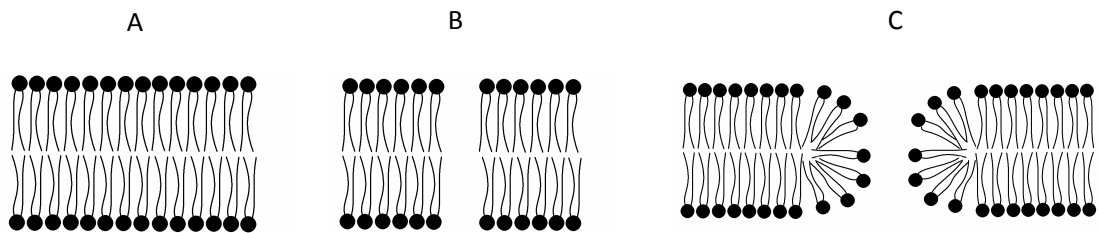
Mikroinjekce

Mikroinjekce je přímý vstřík roztoku do buňky pomocí skleněné kapiláry. Jedná se o účinnou metodu vnášení exogenního materiálu do buněk v kultuře (King, 2004). Techniku, která se stala podkladem pro dnešní mikroinjekční aplikace popsal jako první Barber (Barber, 1911). Předností mikroinjekce je přesná regulace doručované dávky (Zhang a Yu, 2008). Mikroinjekce je však hlavně využívána pro transfekci velkých živočišných buněk (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Též vzhledem k extrémně pracné technice a nízké úspěšnosti transfekce není metoda vhodná pro studia, která požadují velké množství transfekovaných buněk (Lu a spol., 2009). Nevýhodou techniky je také vysoká cena přístroje.

Elektroporace

Mechanismus elektroporace je založen na rozrušení membrány buněk elektrickým pulsem. Póry, které se přechodně vytváří, pak umožňují průchod nukleových kyselin do buňky (Shigekawa a Dower, 1988). Na Obr. 3 jsou znázorněny dva typy pórů, které pravděpodobně vznikají při elektroporaci. Předpokládá se, že dochází k tvorbě hydrofilních pórů, vznikajících přechodem z pórů hydrofobních (Weaver, 2002).

Elektroporace se využívá hlavně k přenosu DNA, ale i dalších makromolekul. Výhodou metody je technická jednoduchost, schopnost ošetřit celou populaci buněk, široká aplikace pro přenos makromolekul, větší úspěšnost transfekce pro některé buněčné linie a schopnost přechodně či stabilně transfekovat adherentní nebo suspenzní linie. K nevýhodám řadíme potřebu empiricky určit podmínky pro úspěšnou transfekci. Také je třeba velkého množství DNA a viabilita ošetřených buněk je nízká (Andreason, 1993).



Obr. 3: Tvorba pórů při elektroporaci. A - lipidická dvojvrstva, B – hydrofobní pór, C – hydrofilní pór. © Markéta Wachtlová

Genové pistole

Technika byla původně vyvinuta pro přenos genů do rostlin (Klein a spol., 1987), dnes je využívána mnohem širším způsobem. Tato metoda využívá částice subcelulárních velikostí, které jsou pokryty DNA. Částicím je dodána vysoká rychlost a poté jsou vrhány do buněk. Mohou být transfekovány tkáně, buňky a organely, jak *in vitro* tak *in vivo*. Metoda je rychlá, jednoduchá a vysoce úspěšná. Nevýhodou je drahé pořízení genové pistole (O'Brien a Lummis, 2006).

3.2.2 Chemický přístup

Kationické polymery (DEAE-dextran)

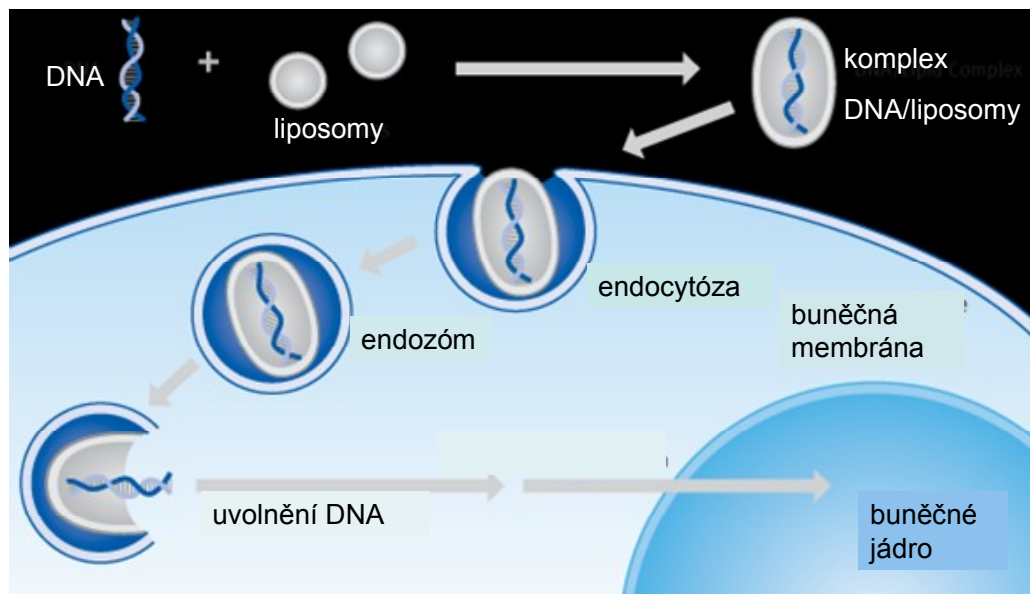
Transfekci pomocí DEAE-dextranu (diethyl aminoethyl-dextran) popsali jako první Pagano a Vaheri (1965). Jedna z nejstarších chemických metod, vyvinutá k přenosu RNA nebo DNA do kultivovaných savčích buněk, je založena na vystavení buněk roztoku DEAE-dextranu a DNA. Pozitivně nabitý DEAE-dextran polymer se váže s negativně nabitými nukleovými kyselinami. Tento komplex pak adsorbuje na negativně nabitou buněčnou membránu a je přijat do buňky patrně prostřednictvím endocytozy. Metoda nemůže být využita pro stabilní transfekci (Schenborn a Goiffon, 2000).

Fosforečnan vápenatý

Pro *in vitro* transfekci je tato technika jednou z nejpoužívanějších. Podstatou metody je smísení DNA s chloridem vápenatým a fosfátovým pufrem, které vytvoří sraženinu, jež je nanesena na kultivované buňky. Mechanismem transfekce DNA s fosfátem vápenatým je pravděpodobně fagocytóza sraženiny buňkami. DNA je asociací s fosfátem vápenatým částečně chráněna proti extracelulárním a intracelulárním nukleázám. K přednostem metody patří aplikovatelnost na mnoho buněčných typů a požadavek minimální optimalizace protokolu pro různé typy buněk. Speciální vybavení není požadováno a metoda je vhodná pro krátkodobou i trvalou transfekci, pro adherentní buňky i pro buňky rostoucí v suspenzní kultuře. Nevýhodou je omezení na použití *in vitro* a metoda též není univerzálně úspěšná se všemi typy buněk (Schenborn a Goiffon, 2000).

Lipofekce (kationické lipidy)

Metodu představil Felgner a spol. Syntetizovali kationický lipid, který tvoří liposomy, a ukázali, že tyto liposomy spontánně interagují s DNA, fúzí s kultivovanými tkáňovými buňkami a usnadňují doručení DNA do buňky. Technika je jednoduchá, vysoce reprodukovatelná a účinnější než některé jiné, běžně používané procedury. DNA je obklopena kationickým lipidem, který neutralizuje její negativní náboj a poskytuje komplex s celkovým pozitivním nábojem, který může asociovat s negativně nabitým povrchem buňky. Lipofekce je vhodná pro trvalou i dočasnou expresi vnesené DNA. (Felgner a spol., 1987). Mechanismus tvorby komplexů, vazby a vstupu do buněk je stále studován (Ilarduya a spol., 2010). Výhodou této metody je možnost cílení liposomů do určitých orgánů a buněk (Sihorkar a Vyas, 2001; Harokopakis a spol., 1998). Princip lipofekce je znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4: Princip lipofekce. Převzato z www.biontexas.com a upraveno.

4 Cíle práce

Cílem této práce bylo vytvořit a optimalizovat metodu přípravy vzorků pro spektroskopická měření jednotlivých oligonukleotidů v živočišných buňkách HeLa a CHO. Toto zahrnovalo optimalizaci inkorporace jednotlivých molekul metodami elektroporace a lipofekce a posléze kontrolovanou adhezi monocelulární vrstvy těchto buněk na krycím skle.

5 Materiál a metodika práce

5.1 Materiál a přístroje

Buňky

HeLa – linie lidských nádorových buněk z karcinomu děložního čípku (Parazitologický ústav AVČR, Laboratoř interakcí vektor-hostitel)

CHO – buněčná linie odvozená z vaječníku čínského křečka (Parazitologický ústav AVČR, Laboratoř interakcí vektor-hostitel)

Kultivační média:

RPMI 1640 (Biotech) + 5% BOFES - bovinní fetální sérum (Biotech) + 1% ATB -
- antibiotikum (Biotech) + 1% L-glutamin (Biotech)

D-MEM (Biotech) + 5% BOFES (Biotech) + 1% ATB (Biotech) + 1% L-glutamin (Biotech)
+ 0,1% 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

Chemikálie:

DNA - oligonukleotid značený pro FRET aplikace (donor energie ATTO 680, akceptor ATTO 740) (Sigma-Aldrich)

Escort™ Transfection Reagent (Sigma-Aldrich)

Trypsin EDTA (EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid) (Biotech)

PBS (Phosphate buffered saline) (8g NaCl, 0,2g KCl, 2,89g Na₂HPO₄.12 H₂O, 0,2g KH₂PO₄, doplněno destilovanou H₂O na 1l; pH=7,3)

0,5% vodný roztok trypanové modři

Roztok pro ředění DNA (0,01% Tween 20, 200 μ M sodium-L-ascorbate, 0,3 mM EDTA, 10 mM Tris; pH=7,5)

Polyvinyl alkohol

Ethanol (Merck)

Methanol (Lach-Ner)

Přístroje

Elektroporátor – ECM 630 (Biotech)

Experimentální aparatura pro TIRF (total internal reflection fluorescence) fluorescenční mikroskopii:

- inverzní mikroskop Olympus IX70
- Triax 320 zobrazovací spektrograf s tekutým dusíkem chlazenou CCD (Charge-Coupled Device) kamerou (Spectrum One, Jobin Yvon, 2048 * 512 pixelů, velikost pixelu 13.5 * 13.5 μ m)
- lineárně polarizovaný pulzní diodový laser o vlnové délce 641 nm (PicoQuant, Germany)
- objektivy: Olympus 100x, NA (numerická apertura) 0.95, UMPLANFL $\infty/0$

Zeiss 100x oil, NA 1.4, Plan – APOCHROMAT, $\infty/0,17$

Zeiss 40x oil, NA 1.3, Plan – NEOFLUAR, $\infty/0,17$

Zeiss 20x, NA 0.5, Plan – NEOFLUAR, $\infty/0,17$

- mikroskop je vybaven soustavou optických filtrů Semrock (Semrock, Germany)

Termostat TCH 100 (Laboratorní přístroje, Praha)

Centrifuga – MPW-52 (MPW Med. Instruments, Poland)

Spin coater – vyrobil F. Matoušek z Oddělení fotosyntézy Ústavu molekulární biologie rostlin

5.2 Metodika práce

5.2.1 Práce s buněčnými kulturami HeLa a CHO

Kultivace buněk

Rozmražené HeLa a CHO buňky byly získány z Laboratoře interakcí vektor-hostitel na Oddělení imunologie parazitóz, Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR.

Ke kultivaci byla použita média RPMI 1640 (pro HeLa buňky) a D-MEM (pro CHO buňky). Buňky byly kultivovány v kultivačních láhvích při 37 °C v termostatu. Pasážování bylo prováděno po vytvoření souvislé vrstvy buněk na dně kultivační láhve. Kultivační láhev byla nejprve dvakrát propláchnuta roztokem PBS, poté dvakrát roztokem Trypsin EDTA, načež byla vložena do termostatu do té doby, než se buňky začaly uvolňovat ze dna láhve - - zjištěno pod mikroskopem. Po uvolnění buněk bylo přidáno médium, aby se zabránilo působení enzymů, část buněčné suspenze byla odsáta a zbytek v láhvi byl doplněn médiem asi do ¼ kultivační láhve. Tímto způsobem (při pasážování) byly buňky odebírány pro další testy.

Optimalizace pěstování buněk na krycích sklech

Bylo třeba optimalizovat pěstování buněk na krycích sklech tak, aby buňky tvořily jednu vrstvu a nepřekrývaly se. Zároveň bylo třeba dosáhnout dostatečného počtu buněk na skle. Bylo také zjišťováno, jak dlouhá doba je potřeba pro uchycení buněk na sklech. Optimalizace probíhala na CHO buňkách.

Nejprve byl testován standardní postup používaný v Laboratoři interakcí vektor-hostitel na Oddělení imunologie parazitóz, Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR. 10 ml suspenze buněk o koncentraci $2 \cdot 10^5$ buněk/ml média byla opatrně

naneseno na suchá, ethanolem odmaštěná krycí skla v Petriho misce. Připravené vzorky byly na 24 hodin vloženy do termostatu (37 °C). Po inkubaci byly buňky dvakrát opláchnuty puřrem PBS. Doporučená doba růstu buněk byla 2-3 dny, ale pro účely naší laboratoře bylo nutné optimalizovat metody tak, aby se co nejvíce zkrátila doba kultivace.

Krycí skla byla opět odmaštěna ethanolem a ponechána oschnout. Byla připravena suspenze buněk o koncentraci $5 \cdot 10^5$ buněk/ml média. Na každé sklo v Petriho misce bylo napipetováno 500 μ l suspenze buněk tak, aby celý objem této suspenze zůstal pouze na krycím skle. Vzorky byly vloženy do termostatu (37 °C) na dobu 1, 2 a 3 hodin. Po inkubaci byly dvakrát opláchnuty puřrem PBS.

Fixace buněk na krycím skle – příprava trvalých preparátů

Trvalé preparáty byly připraveny z transfekovaných i netransfekovaných HeLa a CHO buněk.

Krycí skla byla nejprve odmaštěna ethanolem a umístěna do Petriho misek. Na každé sklo bylo napipetováno 0,5 ml suspenze buněk s médiem, koncentrace suspenze byla $5 \cdot 10^5$ buněk/ml suspenze. Vzorky byly inkubovány 8 hodin při 37 °C. Po inkubaci byla skla dvakrát opláchnuta roztokem PBS. Po oschnutí byla fixována chlazeným methanolem (-20 °C) po dobu 10 minut. Na připravené preparáty bylo napipetováno 100 μ l polyvinyl alkoholu a pomocí spin coateru byla vytvořena tenká vrstva.

Následující kroky týkající se práce se značenými oligonukleotidy byly prováděné za minimálního osvětlení, aby nedocházelo k fotodestrukci fluorescenčních sond.

5.2.2 Transfekce buněk

Ředěním byly připraveny roztoky značených oligonukleotidů. Koncentrace výsledných roztoků byly 10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l, 10^{-6} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-8} mol/l a 10^{-9} mol/l.

Lipofekce - transfekce činidlem Escort™ Transfection Reagent (Sigma-Aldrich)

100 μ l suspenze buněk odebrané při pasážování bylo obarveno 100 μ l 0,5% vodného roztoku trypanové modři. Pod mikroskopem v Bürkerově komůrce byl určen počet buněk v suspenzi. Bylo odebráno takové množství suspenze buněk, aby obsahovala 10^6 buněk. Poté byly buňky centrifugovány 10 min (1000 ot./min) Mezitím bylo smícháno 15 μ l Escort™ Transfection Reagent s 5 μ l DNA o dané koncentraci a 230 μ l DMEM (CHO buňky)/ RPMI (HeLa buňky) média bez suplementů. Tato směs byla promíchána pipetováním a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 1,75 ml kompletního média DMEM (CHO)/ RPMI (HeLa) k této směsi, opět promícháno pipetováním. Z připravených buněk bylo nejprve odsáto médium, následně byla přidána připravená směs a roztok byl promíchán pipetou. Buňky byly inkubovány 6 hodin při 37 °C. Poté následovala fixace buněk na krycím skle výše popsaným způsobem. Stejný postup byl proveden pro každou koncentraci DNA.

Elektroporace

Stejným postupem, který byl použit při lipofekci, bylo odebráno 10^6 buněk. Buňky byly opět centrifugovány 10 min při 1000 ot./min. Supernatant byl odsán a buňky byly následně rozsuspendovány v 0,4 ml DMEM (CHO buňky)/ RPMI (HeLa buňky). Médium s buňkami bylo napipetováno do 4mm elektroporačních kyvet (BTX) a 10 minut uloženo na ledu. Poté bylo do kyvet napipetováno 5 μ l DNA o dané koncentraci a směs byla ihned promíchána a následně elektroporována za těchto podmínek: $U=260$ V, $C=850$ μ F, $R=725$ Ω .

Po elektroporaci bylo k buňkám přidáno 1,6 ml média (DMEM - CHO /RPMI - HeLa) a promícháno. Buňky byly fixovány na krycím skle výše popsaným postupem. Stejný postup byl proveden pro každou koncentraci DNA.

5.2.3 Vitalitní testy a lokalizace jednotlivých molekul

Test na viabilitu buněk

Po elektroporaci/lipofekci dle výše popsaných protokolů byly buňky obarveny trypanovou modří (100 μ l suspenze buněk : 100 μ l vodného roztoku trypanové modří) a spočítány pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Ze získaných dat bylo vypočítáno procentuální zastoupení živých buněk po použití obou metod transfekce.

Lokalizace molekul

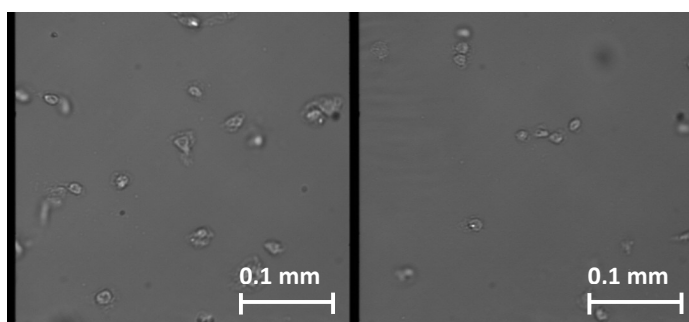
Připravené trvalé preparáty byly vyhodnocovány pomocí TIRF fluorescenční mikroskopie na experimentální aparatuře v laboratoři spektroskopie jednotlivých molekul.

Samotná lokalizace spočívala v překrytí transmisního a fluorescenčního snímku. Pro odlišení signálu sondy od pozadí, tvořeného autofluorescencí a rozptylem laseru, bylo na vybraných molekulách změřeno emisní spektrum jednotlivých molekul, případně shluku a vzápětí porovnáno s referencí.

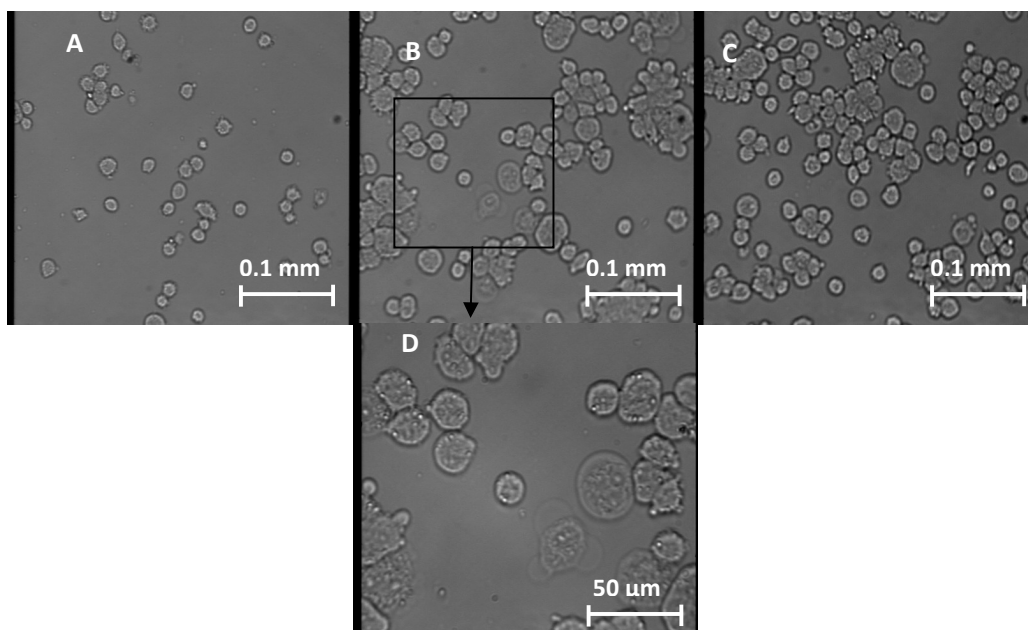
6 Výsledky

6.1 Optimalizace pěstování buněk

Byly testovány dva postupy pěstování buněk na krycích sklech, postup používaný v Laboratoři interakcí vektor-hostitel na Oddělení imunologie parazitóz, Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR nebyl optimální z důvodu dlouhé doby inkubace buněk. Navíc výsledný počet buněk na plochu skla byl malý (Obr. 5). Druhý, mnou vyvinutý postup - aplikace 0,5 ml suspenze buněk (o koncentraci $5 \cdot 10^5$ buněk/ml suspenze) na sklo již splňoval zadané požadavky (Obr. 6).



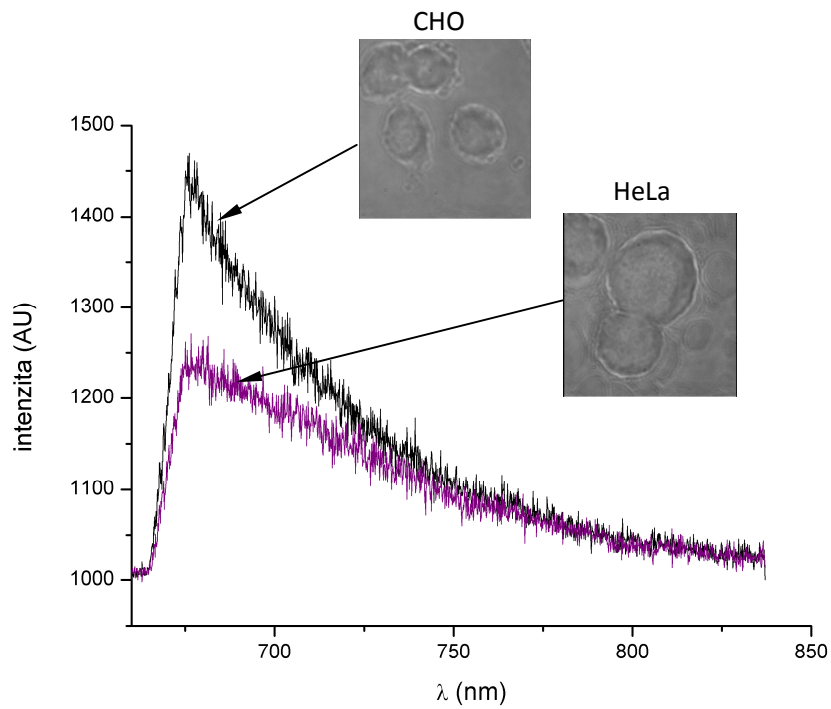
Obr. 5: CHO buňky pěstované na skle, koncentrace $2 \cdot 10^5$ buněk/ml suspenze; 10 ml na Petriho miskou, inkubace 24 hodin. Zvětšení: 20x.



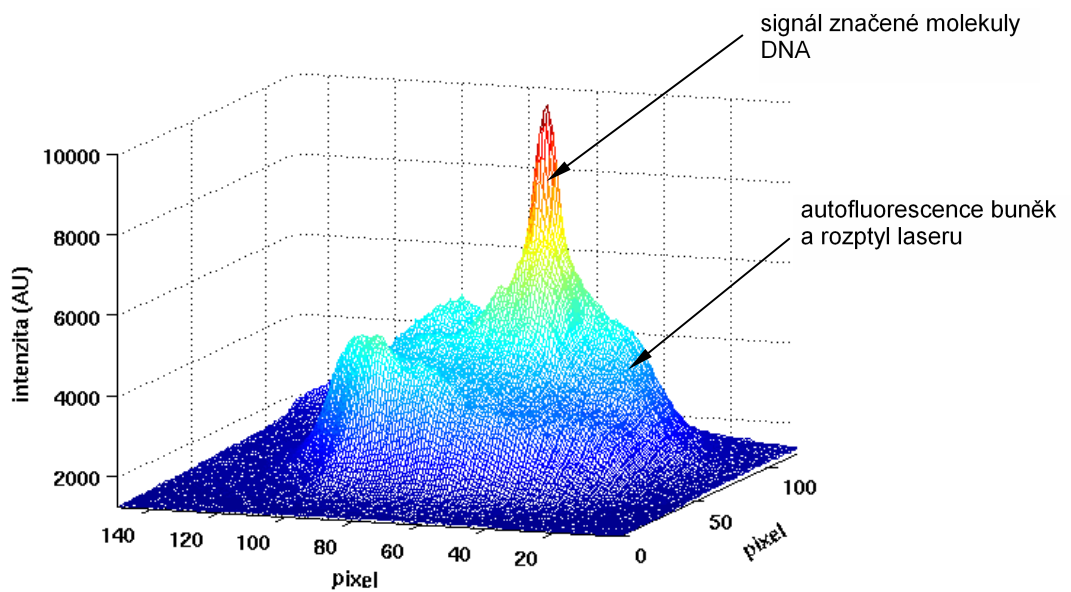
Obr. 6: CHO buňky pěstované na skle, koncentrace $5 \cdot 10^5$ buněk/ml suspenze; 0,5 ml suspenze na skle. A – inkubace 1 hodinu, B – inkubace 2 hodiny, C – inkubace 3 hodiny. Zvětšení: 20x. Po dvouhodinové inkubaci byly buňky dostatečně separované a ve vhodném počtu buněk na plochu skla. D – inkubace 2 hodiny; zvětšení: 40x.

6.2 Vyhodnocení úspěšnosti inkorporace značených oligonukleotidů

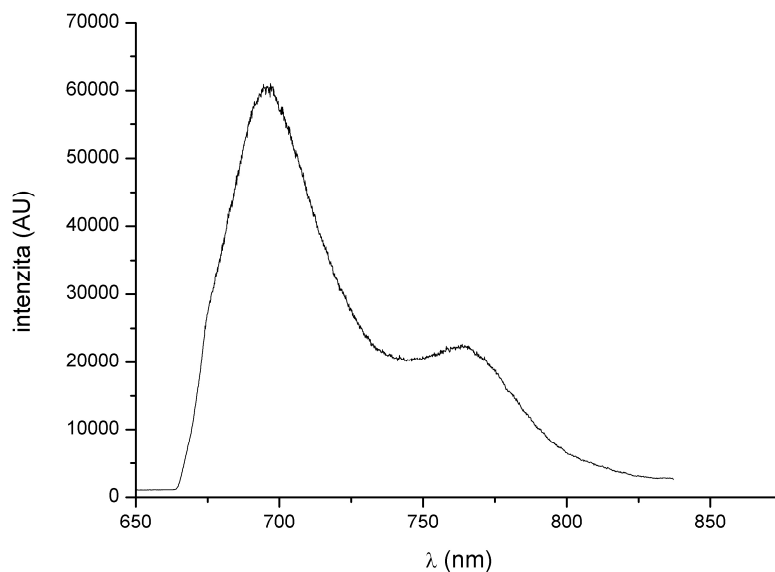
Rozlišení autofluorescence buněk a fluorescence značících sond je možné na základě jejich emisních spekter. Na následujících grafech vidíme dlouhovlnnou část emisního spektra autofluorescence HeLa a CHO buněk (Obr. 7). Obr. 9 znázorňuje emisní spektrum použitého FRET-DNA konstruktu, přenos energie je patrný na nárůstu intenzity v oblasti emisního maxima akceptoru energie ATTOa 740. Obr. 8 dokazuje velký rozdíl v intenzitě autofluorescence buněk a značených oligonukleotidů.



Obr. 7: Autofluorescence a rozptyl laseru v HeLa a CHO buňkách. Hrana ve spektru při vlnové délce 650 nm je způsobena přítomností optického filtru.

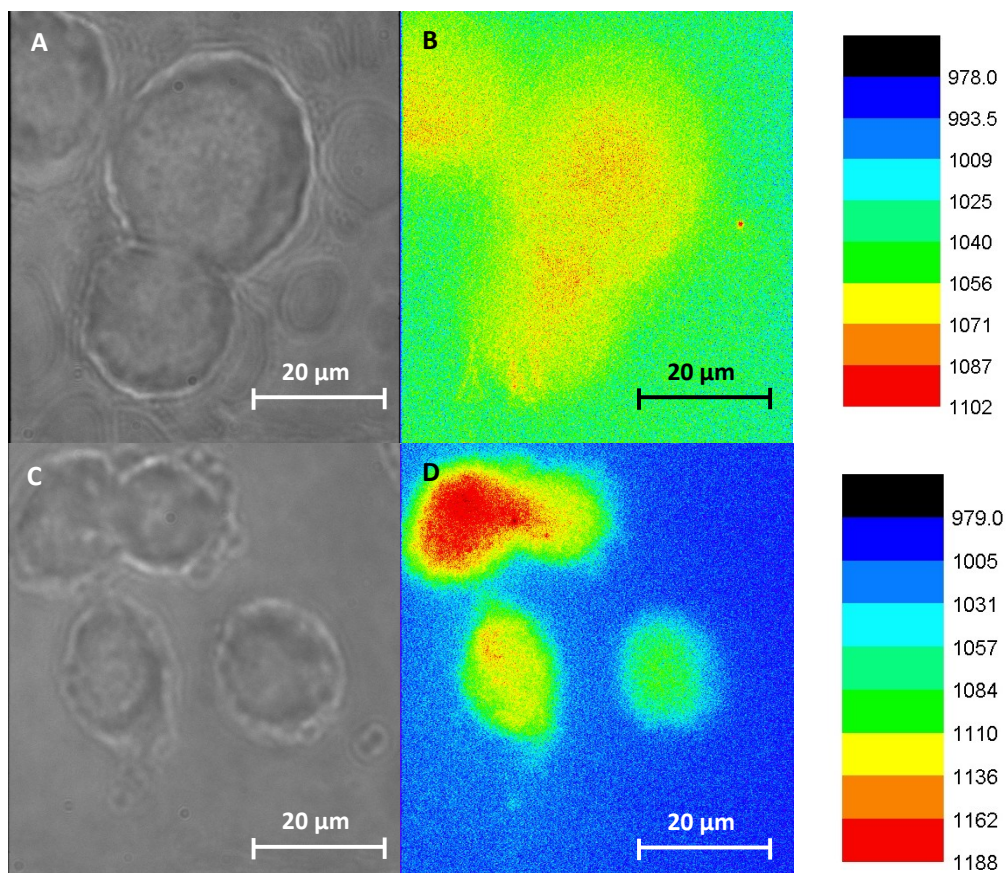


Obr. 8: Rozdíl v intenzitě autofluorescence buněk a značených oligonukleotidů.

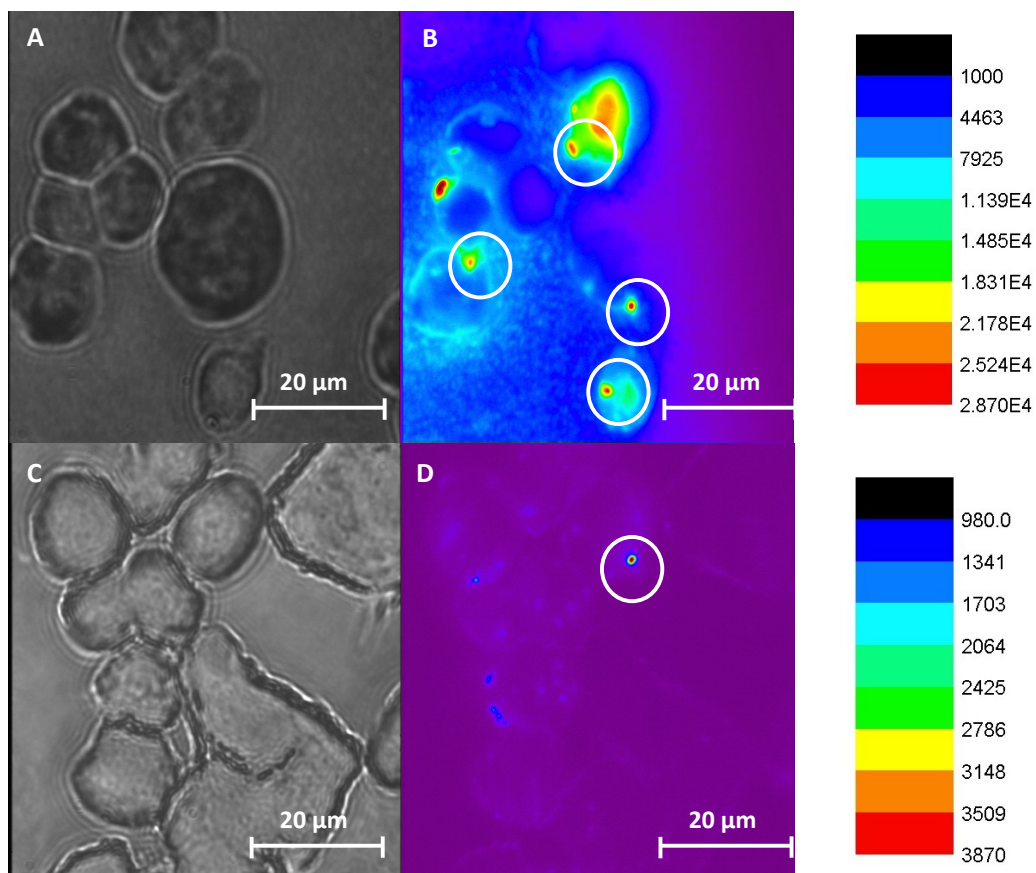


Obr. 9: Emisní spektrum FRET páru ATTO 680 a ATTO 740. Toto spektrum bylo naměřeno uvnitř HeLa buňky po lipofekci při koncentraci oligonukleotidů $c = 10^{-4}$ mol/l.

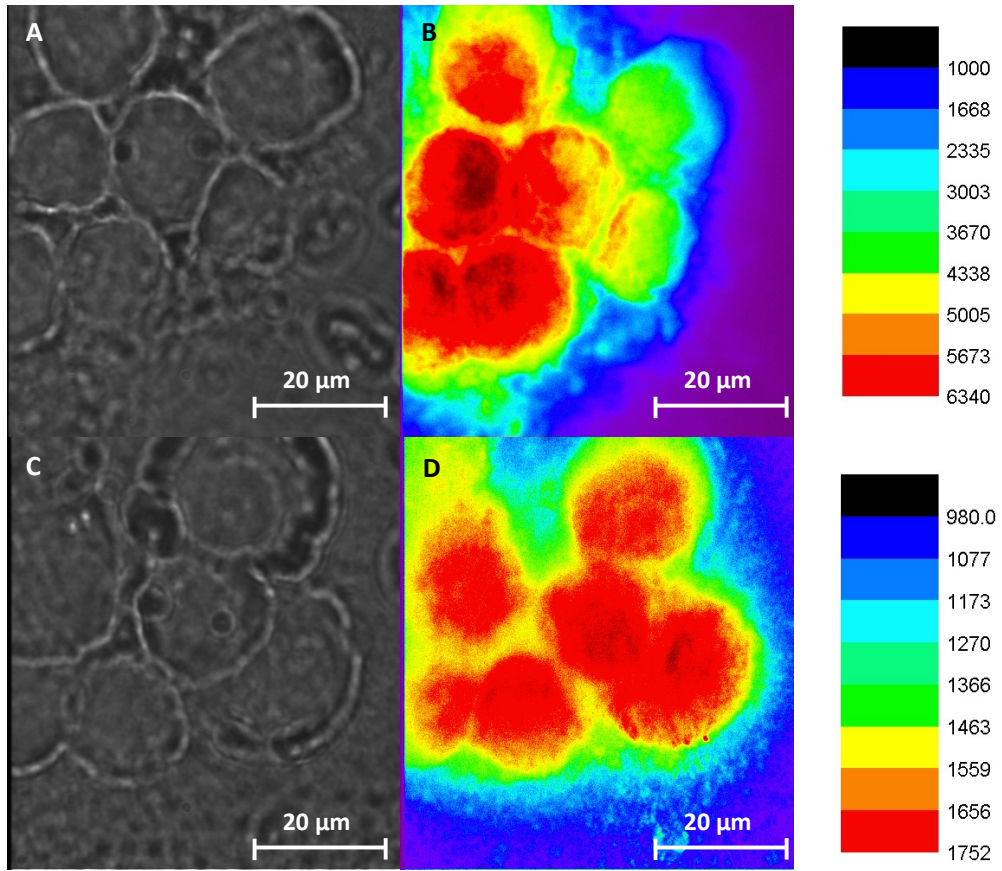
Pomocí TIRF fluorescenční mikroskopie byla nejprve vyhodnocena autofluorescence buněk a rozptyl laseru. Transmisní a fluorescenční snímky HeLa a CHO buněk jsou znázorněny na Obr. 10. Poté byla zjišťována úspěšnost inkorporace značených oligonukleotidů do HeLa buněk po lipofekci (Obr. 11) a po elektroporaci (Obr. 12). Stejně byla zjištěna úspěšnost inkorporace značených oligonukleotidů do CHO buněk po lipofekci (Obr. 13) a po elektroporaci (Obr. 14). U každého fluorescenčního snímku je zobrazena barevná škála odpovídající intenzitě fluorescence.

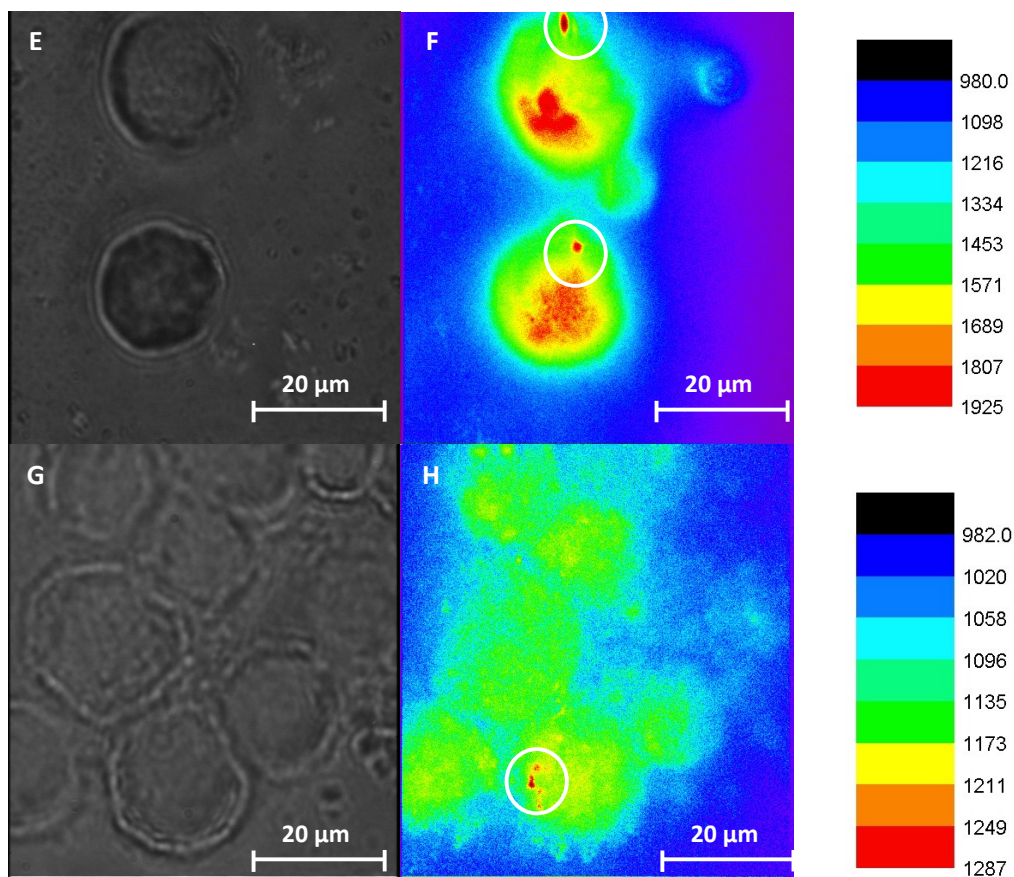


Obr. 10: Autofluorescence HeLa buněk (A-transmise, B-fluorescence) a CHO buněk (C-transmise, D-fluorescence); zvětšení: 100x. Barevná škála odpovídá intenzitě fluorescence, u obrázků 9-13 platí totéž.

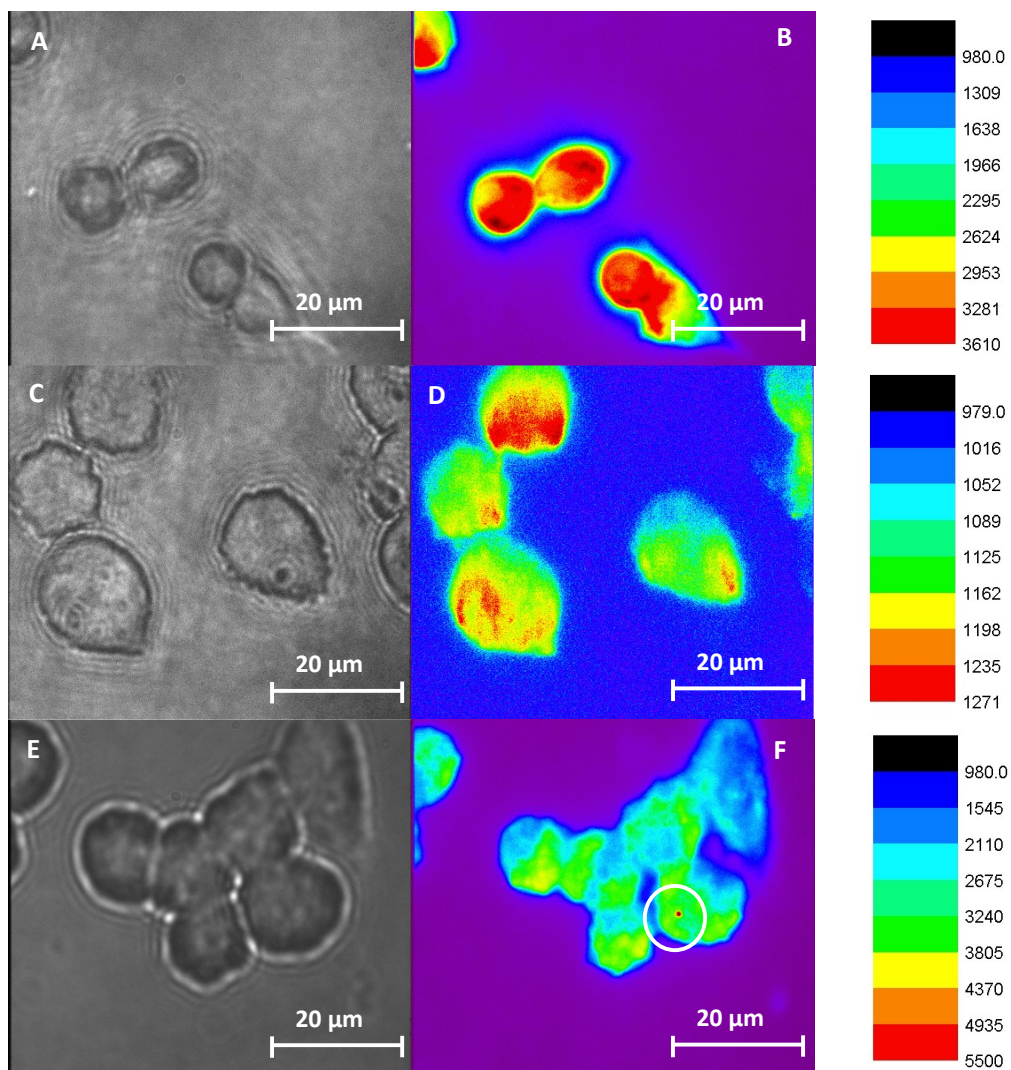


Obr. 11: Úspěšnost inkorporace značených oligonukleotidů do HeLa buněk po lipofekci. Koncentrace oligonukleotidů: A, B - 10^{-4} mol/l; C, D - 10^{-5} mol/l; zvětšení: 100x. Jednotlivé molekuly jsou zvýrazněny kroužkem. Vzhledem k nižší účinnosti lipofekce jsou jednotlivé molekuly pozorovatelné již při koncentraci 10^{-4} mol/l.

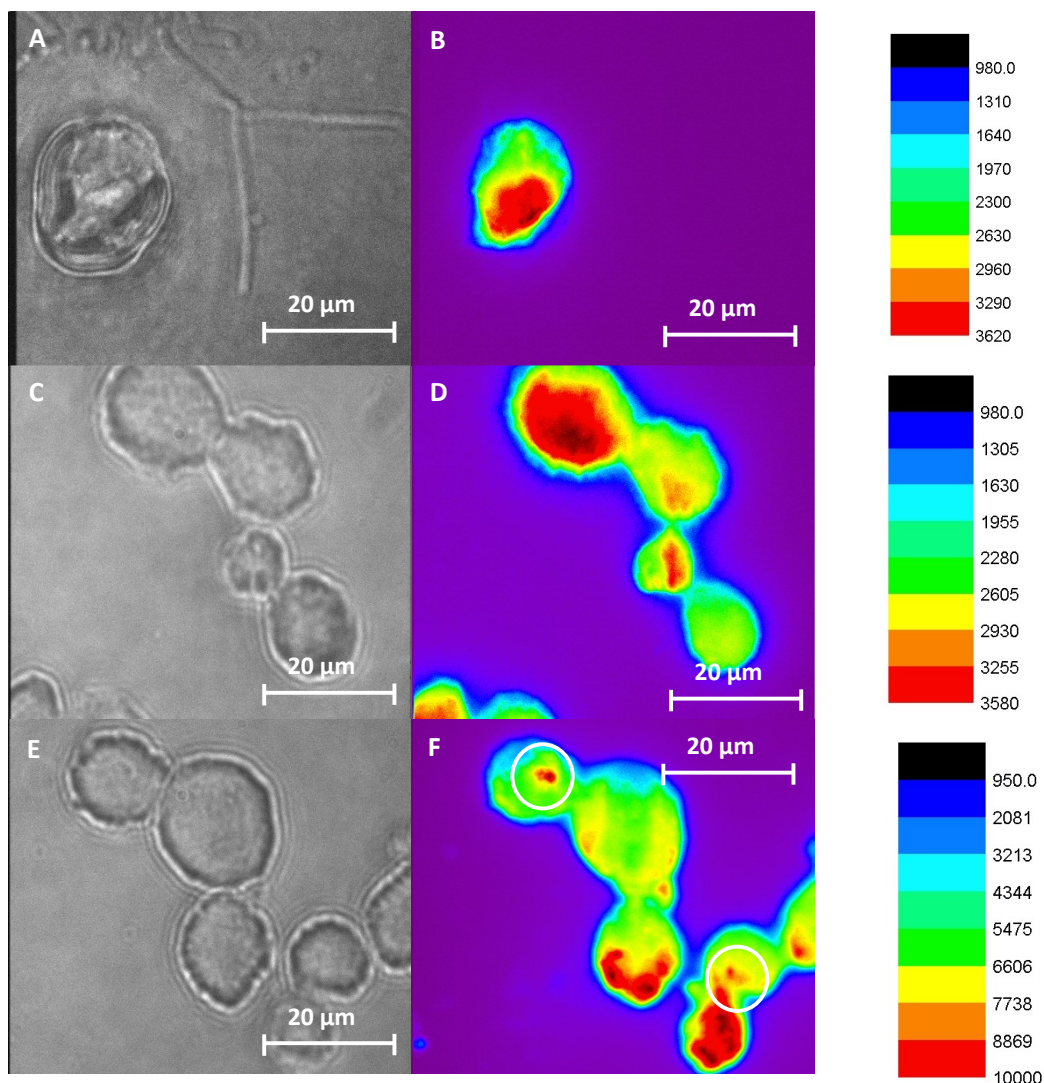




Obr. 12: Úspěšnost inkorporace značených oligonukleotidů do HeLa buněk po elektroporaci. Koncentrace oligonukleotidů: A,B - 10^{-4} mol/l; C,D - 10^{-5} mol/l; E,F - 10^{-6} mol/l; G,H - 10^{-7} mol/l; zvětšení: 100x. Elektroporace je účinnější metodou v porovnání s lipofekcí. Pro detekci jednotlivých molekul DNA musí být koncentrace oligonukleotidů velmi malá (10^{-6} mol/l, 10^{-7} mol/l). Jednotlivé molekuly jsou zvýrazněny kroužkem.



Obr. 13: Úspěšnost inkorporace značených oligonukleotidů do CHO buněk po lipofekci (A, B - koncentrace 10^{-4} mol/l; C, D - koncentrace 10^{-5} mol/l; E, F - koncentrace 10^{-6} mol/l); zvětšení: 100x. Jednotlivé molekuly jsou zvýrazněny kroužkem.

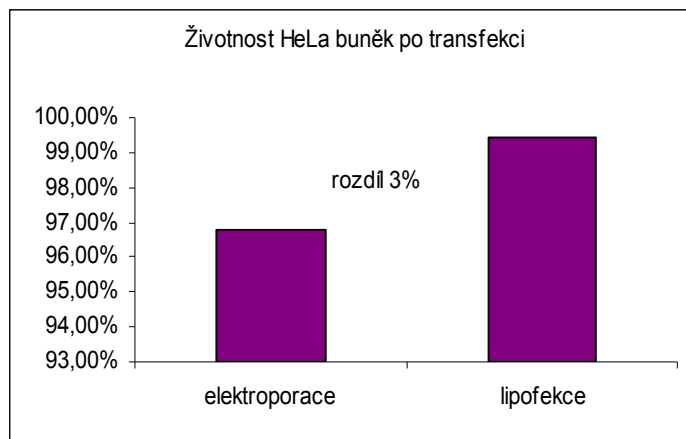


Obr. 14: Úspěšnost inkorporace značených oligonukleotidů do CHO buněk po elektroporaci (A, B - koncentrace 10^{-4} mol/l; C, D - koncentrace 10^{-5} mol/l; E, F - koncentrace 10^{-6} mol/l); zvětšení: 100x. Jednotlivé molekuly jsou zvýrazněny kroužkem.

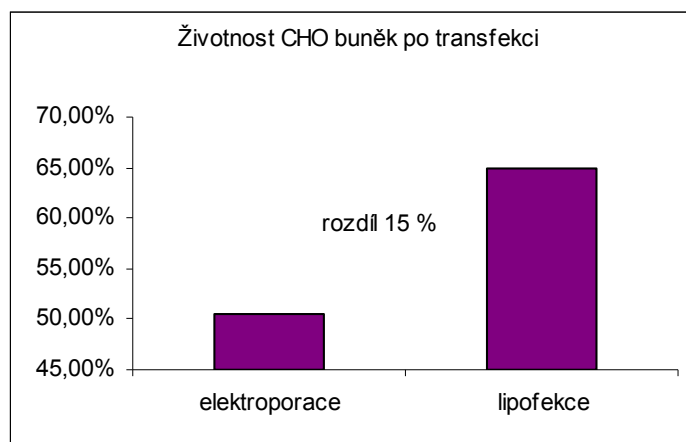
6.3 Vyhodnocení viability buněk po transfekci

Životaschopnost buněk byla vyhodnocena pod mikroskopem po obarvení trypanovou modří (poměr 1:1). Přiložené grafy znázorňují procentuální zastoupení živých buněk ve vzorku po provedení transfekce. Životnost HeLa buněk po inkorporaci DNA oběma metodami byla vysoká. Rozdíl v životaschopnosti buněk v závislosti na zvolené

metodě transfekce činí pouhá 3% (Obr. 15). Naproti tomu CHO buňky přežily po elektroporaci z pouhých 50% a po lipofekci z 65% (Obr. 16).



Obr. 15: Životnost HeLa buněk po elektroporaci a lipofekci. Transfekce viabilitu buněk příliš neovlivnila ($\approx 97-99\%$ živých buněk). Rozdíl ve viabilitě při porovnání obou metod byl pouhá 3%.



Obr. 16: Životnost CHO buněk po elektroporaci a lipofekci. Elektroporace se jeví jako velmi invazivní metoda pro CHO buňky, lipofekce je šetrnější. Přesto viabilita CHO buněk po transfekci byla výrazně nižší než u HeLa buněk (pouze 50-65 % přeživších buněk).

7 Diskuze

Nejprve bylo optimalizováno pěstování CHO a HeLa buněk na krycích sklech. Ukázalo se, že postup používaný v Laboratoři interakcí vektor-hostitel na Oddělení imunologie parazitóz, Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR je třeba adaptovat pro potřeby naší laboratoře. Inkubace vzorků byla příliš dlouhá a také spotřeba buněk byla vyšší. Proto byl navržen jiný postup, jehož výsledky splňovaly zadané požadavky, tedy na krycích sklech byl dostatečný počet buněk, buňky na skle tvořily jednu vrstvu a překrývaly se jen minimálně. Také doba potřebná k přisednutí dostatečného počtu buněk byla 2 hodiny. Buňky zůstaly na skle i po dvojnásobném opláchnutí pufrům PBS.

Při fixaci buněk byla skla s buňkami inkubována 8 hodin, jelikož byly vzorky ještě fixovány 10 minut v methanolu. V experimentech, kdy buňky nebudou fixovány, je ale žádoucí co nejkratší doba inkubace, z důvodu vyššího rizika biodegradace vzorků.

Na základě pokusů byly porovnávány a optimalizovány dvě metody inkorporace značených oligonukleotidů, elektroporace a lipofekce činidlem Escort™ Transfection Reagent. Byla zjišťována životaschopnost buněk po transfekci a úspěšnost inkorporace oligonukleotidů, přičemž cílem bylo najít takové podmínky, při kterých mohou být pozorovány jednotlivé oligonukleotidy.

Elektroporace

Jako optimální pro elektroporaci CHO buněk byla zvolena koncentrace oligonukleotidů $c = 10^{-6}$ mol/l, optimální koncentrací pro elektroporaci HeLa buněk byla určena $c = 10^{-6}$ mol/l.

Předností metody v porovnání s lipofekcí je jednodušší a rychlejší příprava vzorků. Nižší cena je další nespornou výhodou. Vzhledem k vyšší efektivitě inkorporace oligonukleotidů je použita nižší koncentrace DNA, což je dalším kladem této techniky. Nevýhodou metody je však vyšší mortalita buněk.

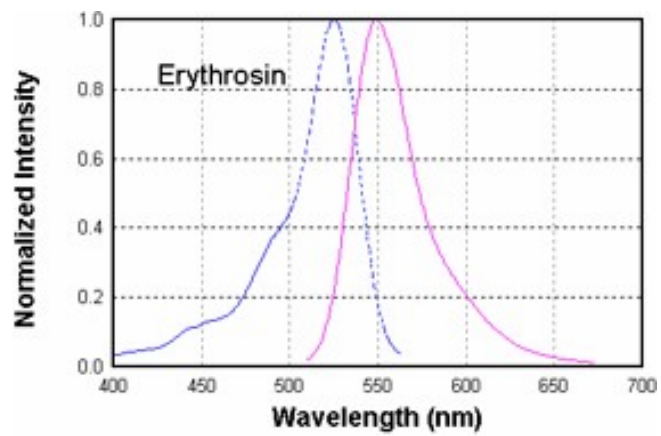
Lipofekce činidlem Escort™ Transfection Reagent

Zvolené optimální koncentrace oligonukleotidů jsou pro lipofekci CHO buněk $c = 10^{-5}$ mol/l a pro lipofekci HeLa buněk $c = 10^{-5}$ mol/l.

Lipofekce je v porovnání s elektroporací metoda méně invazivní, viabilita buněk po lipofekci byla vyšší. Další výhodou metody je možnost specifického cílení lipidických váčků do určitých tkání a buněk (Deng a spol., 2011). Tato metoda je ovšem delší a náročnější na přípravu (inkubace 6 hodin), navíc se jedná o drahou techniku a efektivita inkorporace je nižší.

Cílem této práce bylo porovnat efektivitu inkorporace značených oligonukleotidů do vybraných savčích buněk. Dalším vhodným krokem by byla optimalizace protokolu tak, aby molekuly DNA byly cíleny do jader buněk. Možným postupem by bylo použití jaderných lokalizačních signálních peptidů připojených na molekule DNA (Zanta, 1999).

Viabilita buněk byla zjišťována pouze kvantitativně. Pro další pokusy bude potřeba vybrat metodu umožňující určit viabilitu konkrétních buněk v čase měření. Pro testy viability, fungující na základě barvení buněk, je důležité vybrat barvičku, jejíž emisní spektrum by se nepřekrývalo s emisním spektrem použitých fluorescenčních sond. Takové barvičce se blíží například erythrosin, jehož spektrum je znázorněno na Obr. 17. Stále ale dochází k emisnímu překryvu erythrosinu a ATTO 680. Proto by musel být erythrosin aplikován v nízkých koncentracích, je však otázkou, jaká by potom byla jeho vypovídací hodnota o viabilitě buněk. Další alternativou při zjišťování viability je obrazová analýza buněčné entropie. Ta je zatím časově velmi náročná (Levitner a spol., 2010).



Obr. 17: Absorpční (modré) a emisní (červené) spektrum erythrosinu. Zdroj: www.iss.com.

8 Závěr

Pro laboratoř single-molekulární spektroskopie jsem optimalizovala metodu přípravy vzorků s adherovanou monocelulární vrstvou buněk HeLa a CHO. Poté jsem optimalizovala postup inkorporace jednotlivých značených molekul DNA do těchto buněk metodami elektroporace a lipofekce.

Elektroporace je metoda jednodušší a rychlejší, na druhou stranu také invazivnější. Lipofekce je vhodnou volbou při nutnosti specifického cílení lipidických váčků do určitých tkání a buněk.

9 Literatura

Abbondanzieri EA, Bokinsky G, Rausch JW, Zhang JX, Le Grice SFJ, Zhuang X (2008), "Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase", *Nature* 453 (7192):184-189.

Andreason GL (1993), "Electroporation as a technique for the transfer of macromolecules into mammalian cell lines", *Methods in Cell Science* 15 (2):56-62.

Anson DS (2004), "The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery", *Genetic Vaccines and Therapy* 2 (9):1-13.

Barber MA (1911), "A Technic for the inoculation of bacteria and other substances into living cells", *The Journal of Infectious Diseases* 8 (3):348-360.

Blanco M, Walter NG (2010) "Analysis of Complex Single-Molecule FRET Time Trajectories", *Methods in Enzymology* 472:153-178.

Braslavsky I, Hebert B, Kartalov E, Quake SR (2003), "Sequence information can be obtained from single DNA molecules", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7):3960.

Brock R, Vamosi G, Vereb G, Jovin TM (1999), "Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (18):10123.

Cornish PV, Ha T (2007), "A survey of single-molecule techniques in chemical biology", *ACS chemical biology* 2 (1):53-61.

Deng H, Q Jiang Q, Yang Y, Zhang S, Ma Y, Xie G, Chen X, Qian Z, Li J, Yang J (2011), "Intravenous liposomal delivery of the short hairpin RNAs against Plk1 controls the growth of established human hepatocellular carcinoma", *Cancer Biology & Therapy* 11 (4).

Deniz AA, Dahan M, Grunwell JR, Ha T, Faulhaber AE, Chemla DS, Weiss S, Schultz PG (1999), "Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7):3670.

Deniz AA, Laurence TA, Beligere GS, M Dahan, Martin AB, Chemla DS, Dawson PE, Schultz PG, Weiss S (2000), "Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2",

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 (10):5179.

Diez M, Zimmermann B, Börsch M, König M, Schweinberger E, Steigmiller S, Reuter R, Felekyan S, Kudryavtsev V, Seidel CAM (2004), "Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F0F1-ATP synthase", *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (2):135-141.

Ehrenschwender T, Varga BR, Kele P, Wagenknecht HA (2010), "New Far red and Near infrared Fluorescent Probes with Large Stokes Shifts for Dual Covalent Labeling of DNA", *Chemistry-An Asian Journal* 5 (8):1761-1764.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Academic Press, London.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987), "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (21):7413.

Feynman RP (1959), "There's plenty of room at the bottom, lecture at the American Physical Society, Caltech", *The Pleasure of Finding Things Out and the Meaning of It All*.

Finkelstein EI, Chao PG, Hung CT, Bulinski JC (2007), "Electric field induced polarization of charged cell surface proteins does not determine the direction of galvanotaxis", *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64 (11):833-846.

Friedmann T, Rossi JJ (2007), *Gene transfer: delivery and expression of DNA and RNA: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Gao X, Kim KS, Liu D (2007), "Nonviral gene delivery: what we know and what is next", *The AAPS journal* 9 (1):92-104.

Graham FL, Van der Eb AJ (1973), "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology* 52 (2):456-467.

Greulic KO (2004), "Single molecule techniques for biomedicine and pharmacology", *Current pharmaceutical biotechnology* 5 (3):243-257.

Griffin JP, O'Grady J, Wells FO (2002), *The textbook of pharmaceutical medicine*, Blackwell Publishing, Oxford.

Ha T, Enderle T, Ogletree DF, Chemla DS, Selvin PR, Weiss S (1996), "Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a

single donor and a single acceptor", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (13):6264.

Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM (1998), "Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system", *Infection and immunity* 66 (9):4299.

Henzler-Wildman KA, Thai V, Lei M, Ott M, Wolf-Watz M, Fenn T (2007), "Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory", *Nature* 450 (7171):838-844.

Hink MA, Griep RA, Borst JW, van Hoek A, Eppink MHM, Schots A, Visser AJWG (2000), "Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein", *Journal of Biological Chemistry* 275 (23):17556.

Hinterdorfer P, Van Oijen A (2009), *Handbook of single-molecule biophysics*, Springer, New York.

Hof M, Hutterer R, Fidler V (2005), *Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells*, Springer, New York.

Ilarduya CT, Sun Y, Düzgüneş N (2010) "Gene Delivery by Lipoplexes AND Polyplexes", *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 40(3):159-70.

King R (2004), "Gene delivery to mammalian cells by microinjection", *Methods in Molecular Biology* 245:167-174.

Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987), "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature* 327:70-73.

Kohler RH, Schwille P, Webb WW, Hanson MR (2000), "Active protein transport through plastid tubules: velocity quantified by fluorescence correlation spectroscopy", *Journal of Cell Science* 113 (22):3921-3930.

Korn, K, Wennmalm S, Foerster HH, Hahn U, Rigler R (2000), "Analysis of the RNase T1 mediated cleavage of an immobilized gapped heteroduplex via fluorescence correlation spectroscopy", *Biological chemistry* 381 (3):259-264.

Levitner T, Timr S, Stys D (2010), "Expertomica Cells: analysis of cell monolayer development", *Bioinformatics* 26:278-279.

Lu VB, Williams DJ, Won YJ, Ikeda SR (2009), "Intranuclear Microinjection of DNA into Dissociated Adult Mammalian Neurons", *Journal of Visualized Experiments* 34: 1614

Luger K, Hansen JC (2005), "Nucleosome and chromatin fiber dynamics", *Current Opinion in Structural Biology* 15 (2):188-196.

McKinney SA, Déclais AC, Lilley DMJ, Ha T (2002), "Structural dynamics of individual Holliday junctions", *Nature Structural & Molecular Biology* 10 (2):93-97.

Monahan PE, Samulski RJ (2000), "Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons?", *Molecular Medicine Today* 6 (11):433-440.

Mori T, Vale RD, and Tomishige M (2007), "How kinesin waits between steps", *Nature* 450 (7170):750-754.

Mörtelmaier M, Kögler EJ, Hesse J, Sonnleitner M, Huber LA, Schütz GJ (2002), "Single molecule microscopy in living cells: Subtraction of autofluorescence based on two color recording", *Single Molecules* 3 (4):225-231.

Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, Kusumi A (2004), "Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (19):7317.

O'Brien JA, Lummis SCR (2006), "Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun", *Nature protocols* 1 (2):977-981.

Pagano JS, Vaheiri A (1965), "Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D)", *Archives of Virology* 17 (3):456-464.

Politz JC, Browne ES, Wolf DE, Pederson T (1998), "Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11):6043.

Rakoczy-Trojanowska M (2002), "Alternative methods of plant transformation-a short review", *Cellular and molecular biology letters* 7 (3):849-858.

Ritort F (2006), "Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications", *Journal of Physics: Condensed Matter* 18:R531.

Řezníčková E (2010), ústní sdělení, Laboratoř interakcí vektor-hostitel, Oddělení imunologie parazitóz, Parazitologický ústav Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích.

Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T (2000), "Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells", *Nature cell biology* 2 (3):168-172.

Sevenich FW, Langowski J, Rippe K, Weiss V (1998), "DNA binding and oligomerization of NtrC studied by fluorescence anisotropy and fluorescence correlation spectroscopy", *Nucleic acids research* 26 (6):1373.

Shigekawa K, Dower WJ (1988), "Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells", *BioTechniques* 6, 742–51.

Schenborn ET, Goiffon V (2000), "Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells", *Methods in molecular biology-clifton then totowa* 130:135-146.

Schenborn ET, and V Goiffon (2000), "DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells", *Methods in molecular biology-clifton then totowa* 130:147-154.

Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb WW (1999), "Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one-and two-photon excitation", *Biophysical journal* 77 (4):2251-2265.

Schwille P, Kummer S, Heikal AA, Moerner WE, Webb WW (2000), "Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1):151.

Sihorkar V, Vyas SP (2001), "Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization", *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 4 (2):138-158.

Sosa H, Peterman EJG, Moerner WE, Goldstein LSB (2001), "ADP-induced rocking of the kinesin motor domain revealed by single-molecule fluorescence polarization microscopy", *Nature Structural & Molecular Biology* 8 (6):540-544.

Stan T, Ahting U, Dembowski M, Künkele KP, Nussberger S, Neupert W, Rapaport D (2000), "Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria", *The EMBO Journal* 19 (18):4895-4902.

Talaga DS, Lau WL, Roder H, Tang J, Jia Y, DeGrado WF, Hochstrasser RM (2000), "Dynamics and folding of single two-stranded coiled-coil peptides studied by fluorescent energy transfer confocal microscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (24):13021.

Tan E, Wilson TJ, Nahas MK, Clegg RM, Lilley DMJ, Ha T (2003), "A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16):9308.

Tomishige M, Stuurman N, Vale RD (2006), "Single-molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein", *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (10):887-894.

Vorburger SA, Hunt KK (2002), "Adenoviral gene therapy", *The oncologist* 7 (1):46.

Walter NG, Huang CY, Manzo AJ, Sobhy MA (2008), "Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit", *Nature methods* 5 (6):475-489.

Warsaw DM, Hayes E, Gaffney D, Lauzon AM, Wu J, Kennedy G, Trybus K, Lowey S, Berger C (1998), "Myosin conformational states determined by single fluorophore polarization", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14):8034.

Weaver JC (2002), "Electroporation of cells and tissues", *Plasma Science, IEEE Transactions on* 28 (1):24-33.

Webb SED, Roberts SK, Needham SR, Tynan CJ, Rolfe DJ, Winn MD, Clarke DT, Barraclough R, Martin-Fernandez ML (2008), "Single-molecule imaging and fluorescence lifetime imaging microscopy show different structures for high-and low-affinity epidermal growth factor receptors in A431 cells", *Biophysical journal* 94 (3):803-819.

Weiss S (1999), "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules", *Science* 283 (5408):1676.

Weiss S (1999), "Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy", *Biophysical journal* 76:409-413.

Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP (1999), "Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1):91.

Zhang Y, Yu LC (2008), "Single-cell microinjection technology in cell biology", *Bioessays* 30 (6):606-610.

Zhuang X, Bartley LE, Babcock HP, Russell R, Ha T, Herschlag D, Chu S (2000), "A single-molecule study of RNA catalysis and folding", *Science* 288 (5473):2048.

Zimmermann B, Diez M, Börsch M, Gräber P (2006), "Subunit movements in membrane-integrated EF0F1 during ATP synthesis detected by single-molecule spectroscopy", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1757 (5-6):311-319.

Internetové zdroje:

www.isiknowledge.com

www.biontex-usa.com

www.iss.com

www.invitrogen.com