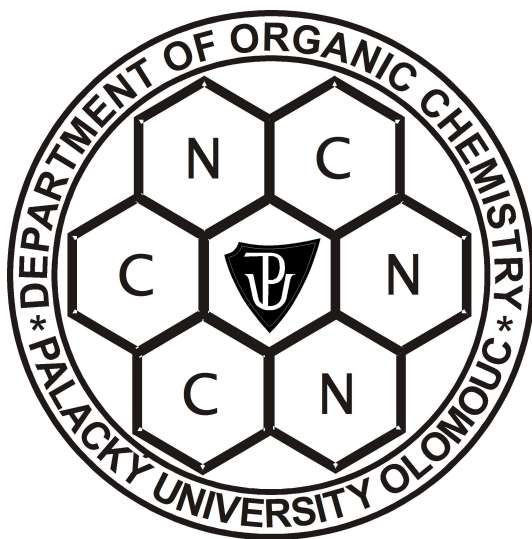


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Laboratoř experimentální medicíny
Ústav molekulární a translační medicíny



Martin MOZOLÍK

**Příprava a validace buněčných systémů pro
testování účinků protinádorových léčiv**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.

Olomouc 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci,

Podpis

Tímto vyslovuji upřímné poděkování všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP v Olomouci jako i všem pracovníkům Laboratoře experimentální medicíny, především Mgr. Ivovi Frydrychovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při práci a rozvoj mých schopností. Poděkovat bych chtěl rovněž Bc. Anně Janošťákové za skvělé základy práce v laboratoři tkáňových kultur a pomoc při práci.

Dále pak doc. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D. za motivaci a starostlivost o celý ročník bioorganiků, cenné rady a připomínky.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Martin Mozolík

Název práce: Příprava a validace buněčných systémů pro testování protinádorových léčiv.

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Laboratoř experimentální medicíny

Školitel: Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.

Školitel konzultant: doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt:

Genetická modifikace nádorových buněčných linií pomocí fúzních genů slouží jako účinný nástroj pro studium dějů *in vivo* téměř v reálném čase. Takto upravené buněčné linie se hojně využívají ve výzkumu při hledání mechanismu účinku současných i zcela nově objevených protinádorových léčiv jako jsou například cytostatika, alkylační látky, mitotické jedy nebo antimetabolity a to hlavně metodou High-content screening. Pokrok v oblasti automatizované zobrazovací mikroskopie umožňuje rychlé získání velkoplošných dat ze složitých biologických vzorků. Současné technologie High-content screeningu umožňují kvantifikaci mnohých důležitých údajů opisujících polohu, velikost, tvar, povrch a intenzitu fluorescence značených buněčných organel, jako i zobrazení celého životního cyklu buňky od rozdělení po apoptózu. V této práci se zabývám transfekcí modelových nádorových linií různého histologického původu (U2OS, HCT-116, A549) a optimalizací transfekčních metod s cílem připravit klony stabilních transfektantů. Pro genetickou modifikaci zvolených buněčných linií byly použity běžně komerčně dostupné plazmidy nesoucí geny pro strukturní proteiny (aktin, tubulin) a kaspasu-3 fúzované s reportérovými geny pro zelený (GFP) nebo červený (RFP) fluorescenční protein. Selektce buněk exprimujících plazmidy byla prováděna chemickou cestou s využitím antibiotika Geneticinu (G418) nebo pomocí sortovacího modulu průtokového cytometru.

Klíčová slova: transfekce, plazmid, nádorová buněčná linie, reportérové a fúzní geny, fluorescenční protein, High-content screening.

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Martin Mozolík

Title: Preparation and validation of modified cell systems for anticancer drug testing.

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of experimental medicine

Advisor: Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.

Advisor-consultant: doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract:

Genetic modification of cancer cell lines by using the fusion genes serves as a powerful tool for studying *in vivo* processes in almost real time. Such modified cell lines are widely used in research to find out the mechanism of action of current and newly discovered anti-cancer drugs such as antineoplastic agents, alkylating agents, antimetabolites and mitotic poisons, by high-content screening especially. The advances in automated imaging microscopy allows us quickly obtain large-scale data from complex biological samples. Current technologies of high-content screening allow to quantify many important data about location, size, shape, surface and intensity of fluorescence-labeled cell organelles, as well as the picture of the entire life cycle of cells from division to apoptosis. In this thesis I deal with transfection of model cancer cell lines of different histological origin lines (U2OS, HCT-116, A549) and optimization of transfection methods to prepare stable clones of transfectants. For genetic modification of selected cell lines were used commercially available plasmids carrying the genes for structural proteins (actin, tubulin) and caspase-3, fused with reporter genes for green (GFP) or red (RFP) fluorescent protein. Selection of cells expressing plasmids was carried out chemically, using the antibiotic Geneticin (G418) or through the sorting equipment of flow cytometer.

Keywords: transfection, plasmid, cancer cell line, reporter and fusion genes, fluorescent protein, High-content screening.

Number of pages: 58

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Seznam použitých zkratk

ATCC	„American Type Culture Collection“ - Americké soukromé neziskové výzkumné centrum
Bcr-Abl	onkogenní fúzní protein způsobující chronickou myeloidní leukemii
DEAE	diethylaminoethyl cellulose
DMSO	dimethylsulfoxid
DOPE	L-dioleoyl-fosfatidylethanolamin
DsRed	červený fluorescenční protein izolovaný z korálu <i>Discosoma</i>
DXMT	dexamethazon - silný syntetický glukokortikoid z třídy steroidů
<i>E. coli</i> DH5α	kmen <i>Escherichia coli</i> vhodný pro biosyntézu plazmidů
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	„Enzyme linked <i>in situ</i> analysis“ - biochemická metoda
FBS	„Foetal bovine serum“ - fetální telecí sérum
FCM	„Flow cytometry“ - průtoková cytometrie
FRET	„Förster resonance energy transfer“ - druh spojené fluorescence, kdy fluorescence jednoho chromoforu excituje druhý
FSC	„Forward scatter“ - měřený parametr metody průtokové cytometrie
G418	Geneticin - selekční antibiotikum
GFP	„Green fluorescent protein“ - zelený fluorescenční protein
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“ - virus lidské imunodeficiency
IC₅₀	„half maximal inhibitory concentration“ - koncentrace, která způsobuje pokles počtu metabolicky aktivních buněk na polovinu vzhledem ke kontrole
kbp	kilobáze
Lac-Z	Lac operon - operon potřebný pro transport a metabolismus laktózy u <i>E. coli</i> .
LB médium	„Lysogeny broth“ - médium bohaté na živiny určeno pro kultivaci bakterií
mRNA	mediatorová ribonukleová kyselina
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid, žlutý tetrazol - sloučenina využívána ke kolorimetrickému stanovení proliferace a viability buněk
NAG-1	„NSAID activating gene-1“ - gen, který bývá aktivován při stresu
<i>Neo</i> gen	gen kódující enzym, který poskytuje rezistenci vůči aminoglykosidovým antibiotikům
NFC	„Near Field Communication“ - nezářivý přenos energie, předchůdce Bluetooth
NSAID	„Non-steroidal anti-inflammatory drug“ - nesteroidní protizápalové léky, např. Ibuprofen
PBS	„Phosphate buffered saline“ - fosfátový isotonický roztok
PCR	„Polymerase chain reaction“ - polymerázová řetězová reakce
RFP	„Red fluorescent protein“ - červený fluorescenční protein
SDS	„Sodium dodecyl sulphate“ - dodecylsulfát sodný
siRNA	„silencing RNA“ - malá regulační molekula RNA

SOB	„Super Optimal Broth“ - médium bohaté na živiny určeno pro kultivaci bakterií
SOC	„Super Optimal broth with Catabolite repression“ - médium bohaté na živiny určeno pro kultivaci bakterií - SOB s glukosou
SSC	„Side scatter“ - měřený parametr metody průtokové cytometrie
TBE buffer	„Tris/Borate/EDTA“ pufr
TE buffer	„Tris/EDTA“ pufr
YFP	„Yellow fluorescent protein“ - žlutý fluorescenční protein - žlutá varianta GFP

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Cíle bakalářské práce.....	6
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
3.1 Reportérové a fúzní geny.....	7
3.1.1 Plazmid.....	8
3.1.1.1 Vektor pCasper3-GR.....	9
3.1.2 Fluorescenční proteiny.....	10
3.1.2.1 Green Fluorescent Protein (GFP)	10
3.1.2.2 Red Fluorescent Protein (RFP).....	12
3.2 Transfekce.....	13
3.2.1 Chemické metody.....	14
3.2.1.1 Chemická činidla.....	14
3.2.1.2 Kationtové lipidy.....	15
3.2.2 Fyzikální metody.....	17
3.2.2.1 Elektroporace.....	17
3.2.2.2 Genové dělo.....	17
3.2.2.3 Mikroinjekce.....	18
3.2.3 Virální metody.....	19
3.2.4 Přípravná fáze pro transfekci.....	19
3.2.5 Faktory ovlivňující účinnost transfekce.....	21
3.3 Metody selekce.....	23
3.3.1 Chemické metody.....	23
3.3.1.1 Selekční antibiotika.....	23
3.3.2 Fyzikální metody.....	25
3.3.2.1 Průtoková cytometrie.....	25
3.3.2.2 Princip metody.....	26
3.4 High-content screening.....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1 Materiál a metody.....	28
4.1.1 Buněčné linie.....	29
4.1.1.1 Média a suplementy.....	30
4.1.1.2 Pasážování buněčných linií.....	31
4.1.1.3 Stanovení počtu a viability buněk.....	32
4.1.1.4 Rozmrazování a zamrazování buněk.....	33
4.1.1.5 Stanovení buněčné proliferace a viability.....	34

4.1.2	Transfekce pomocí lipofekce.....	35
4.1.3	Selekce.....	36
4.1.3.1	Chemická selekce.....	36
4.1.3.2	Fyzikální selekce.....	36
4.1.4	Biosyntéza, čištění a ověření plazmidů.....	37
4.1.4.1	Transformace bakterií plazmidem.....	37
4.1.4.2	Množení a izolace plazmidu.....	38
4.1.4.3	Purifikace plazmidové DNA.....	39
4.1.4.4	Purifikace směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol.....	40
4.1.4.5	Odstranění endotoxinů.....	40
4.1.4.6	Restrikční štěpení.....	41
4.1.4.7	Příprava gelu a elektroforetická separace.....	42
4.1.5	Elektroporace.....	43
4.2	Výsledky.....	44
4.2.1	Optimalizace lipofekce.....	44
4.2.2	Selekce.....	45
4.2.2.1	Chemická selekce.....	45
4.2.2.2	Fyzikální selekce.....	47
4.2.3	Ověření plazmidu restrikčním štěpením	48
4.2.4	Stabilní klony A549 pCasper3-GR.....	49
5.	Diskuze.....	51
6.	Závěr.....	53
7.	Citace.....	53

1. Úvod

Incidence nádorových onemocnění má v současné době stoupající tendenci a proto je jim věnována velká pozornost jak v oblasti přímé léčby, tak v oblasti výzkumu.

Modifikované buněčné linie odvozené od různých typů nádorů jsou klíčové jak pro testování *in vitro*, tak i pro určení té nejúčinnější kombinace protinádorových léčiv pro jednotlivé pacienty (individualizace léčby). Využívají se i k vývoji nových léčiv a zkoumá se na nich účinnost, účinná koncentrace, mechanismus účinku a další farmakologické vlastnosti.

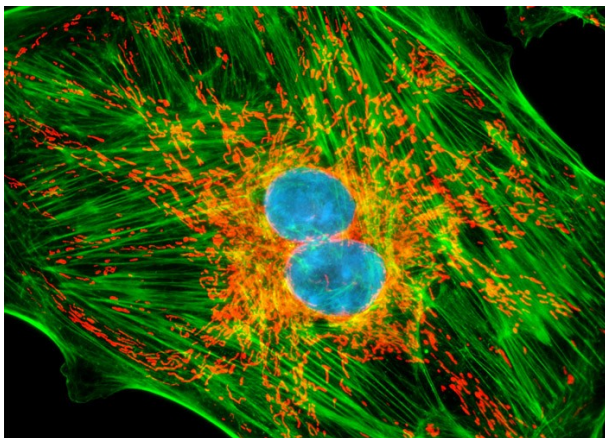
Modifikací je potřeba pro přístrojový i manuální screening, hlavně na zlepšení viditelnosti a detekce jak buněčných kompartmentů a buněčné anatomie, tak fyziologických i patologických dějů.

Existuje vícero druhů modifikací, např. značení monoklonálními protilátkami, radioaktivním izotopem či různými druhy reportérových a fúzních genů.

2. Cíle bakalářské práce

Cílem této práce bylo pokusit se připravit modifikované buněčné systémy odvozené od vybraných nádorových linií a získané klony následně validovat pomocí modelových protinádorových léčiv. Součástí tohoto cíle byla taky optimalizace parametrů jak samotné transfekce, tak metod selekce působením selekčních antibiotik nebo využitím metody průtokové cytometrie za účelem nalezení maximální efektivity a maximálního přežití buněk.

Fluorescenčně značené klony nádorových i nenádorových linií (Obr.1) se využívají kromě jiného i při metodě High-content screening, kde se simultánně sleduje celý soubor buněk, stav jejich kompartmentů a celý buněčný cyklus od rozdělení až po apoptózu.



Obr. 1 Hovězí buňky epitelu značené třemi různými fluorescenčními proteiny. Ilustrační obrázek.

(<http://www.microscopyu.com/galleries/fluorescence/images/bpae6.jpg>)

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Reportérové a fúzní geny

Reportérový gen (často nazýván jednoduše reportér) je gen, který se připojuje k regulační sekvenci jiného genu (genu zájmu) v buněčné kultuře, rostlinách či zvířatech. Jako reportéry se volí takové geny, které udělí organismu nějakou vlastnost, která je snadno identifikovatelná nebo měřitelná, pokud je daný gen exprimován. Reportérové geny jsou často používány jako indikace, že určitý gen byl exprimován v daném jedinci či populaci. Reportér může sloužit zároveň jako selekční marker. Pro zanesení reportéru do genomu je třeba vytvořit DNA konstrukt[☒], který bude vpraven do organismu. Pro bakterie a buněčné linie eukaryot v kultuře je obvykle ve formě kruhové molekuly DNA nazývané plazmid. Je důležité vybrat takový reportérový gen, který není přirozeně exprimován ve studovaném organismu, protože exprese reportéru se využívá jako marker pro expresi genu zájmu.

DNA konstrukt je vlastně druh fúzního genu, což je hybridní gen vzniklý ze dvou původně oddělených genů. Může se vyskytnout jako důsledek translokace, intersticiální delece[‡] nebo chromozomové inverze. Dobrým příkladem takového genu je BCR-ABL, jehož výskyt je typický pro diagnózu chronické myeloidní leukemii.

Mezi běžně využívané reportérové geny, které zvyšují vizuálně

☒ DNA konstrukt – je umělo vytvořený segment z DNA, který byl vytvořený pro vnesení do jiného organismu. Často obsahuje sekvenci pro reportér spolu s genem kódujícím protein zájmu. Rovněž bývá často upraven do podoby vektoru, který obsahuje ještě gen pro rezistenci k určitému selekčnímu antibiotiku.

‡ Intersticiální delece – delece, která nezahrnuje koncové části chromozomu.

identifikovatelný charakteristický znak patří GFP (Green fluorescent protein), DsRed RFP (Red fluorescent protein) a enzym luciferáza, která katalyzuje reakci s luciferinem produkující světlo. Další běžný reportérové gen u bakterií je Lac-Z, který kóduje enzym beta-galaktosidasu. Kolonie bakterií, která produkuje tento enzym se zbarví modře při růstu na médiu obsahujícím analog substrátu galaktosidasu X-gal. Příklad selekčního reportéru u bakterií je chloramfenikol-transferázový gen, který pokud je exprimován, zajišťuje rezistenci vůči chloramfenikolu. Reportérové geny mohou být použity i jako způsob měření aktivity určitého promotoru v buňce nebo organismu. V tomto případě tady není žádný samostatný gen zájmu - reportérový gen je jednoduše umístěn pod kontrolu cílového promotoru a jeho produkt je kvantitativně změřen.

3.1.1 Plazmid

Plazmid je kruhová molekula dvouvláknové DNA, která je oddělená od chromozomální DNA a může být replikována nezávisle na ní. Plazmidy se přirozeně vyskytují v bakteriích, ale taky v eukaryotických organizmech. Velikost plazmidů je od 1 do více než 1000 kilobází. (kbp)^(Sambrook and Russel, 2001) Počet identických plazmidů v jedné buňce může kolísat za určitých podmínek od jednoho po tisíce. Plazmidy můžeme považovat za část mobilomu[®]. Termín „plazmid“ byl poprvé použit americkým molekulárním biologem Joshuou Lederbergem v roce 1952.^(Lederberg, 1952) Plazmidy jsou považovány za přemístitelné genetické elementy, tzv. „replikony“, schopné autonomní replikace ve vhodném hostiteli. Můžeme je najít ve všech třech doménách - u archeonů, bakterií i eukaryotů. Stejně jako viry nelze ani plazmidy považovat za formu života, jak je v současnosti definována.^(Sinkovics, Harvath, Horak, 1998) Na rozdíl od virů představují plazmidy prostou molekulu DNA, která nekóduje geny potřebné na

[®]Mobilom je soubor všech mobilních genetických elementů v genomu. U eukaryot hlavní složku mobilomu tvoří „transposable elements“.

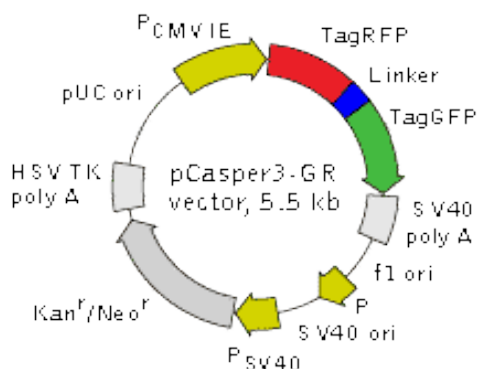
vnesení genetického materiálu do hostitele. Některé třídy plazmidů kódují sexuální pilus[⊕] potřebný pro jejich vlastní přenos. Plazmid se může rozšiřovat mezi hostiteli dvěma způsoby. Častější způsob je přímý, mechanický přenos pomocí konjugace. V druhém případě jsou to změny v genové expresi příjemce, které dovolují záměrný příjem genetického elementu transformací. Mikrobiální transformace pomocí plazmidové DNA není v přírodě parazitická ani symbiotická, protože každá zahrnuje přítomnost nezávislého druhu žijícího s pozorovaným druhem v symbiotickém či parazitickém stavu. Plazmidy spíše umožňují mechanismus horizontálního přenosu genů v populaci mikrobů a typicky poskytují selekční výhodu v daném stavu prostředí.

Plazmidy mohou nést geny rezistence k přirozeně se vyskytujícím antibiotikům v kompetitivní nise anebo geny kódující proteiny, které mohou působit jako toxiny pro ostatní organizmy. Schopnost vázat dusík, ať už vzdušný nebo získávaný saprofyticky, může být rovněž přenášena pomocí plazmidu.

3.1.1.1 Vektor pCasper3-GR

Příkladem eukaryontního plazmidu může být pCasper3-GR (Obr.2), který slouží k časně detekci aktivace kaspasy-3. Tato proteasa je považována za hlavní výkonnou kaspasu v procesu apoptózy a proto je tento vektor vhodným nástrojem pro její studium.

⊕ Pilus - je vláskovitý útvar na povrchu bakterií. Pomocí něj se bakterie připájí k další bakterií z vlastního nebo i jiného druhu a vytváří most mezi vnitřkem buněk. Pomocí pilusu dochází k transferům plazmidů mezi bakteriemi.



Obř. 2 Vektor pCasper3-GR. (<http://www.evrogen.com/img-vector/vector-pCasper3-GR.png>)

Vektor pCasper3-GR exprimuje dva fluorescenční proteiny - GFP a RFP, které jsou spojené linkerem obsahujícím sekvenci aminokyselin DEVD, specificky rozpoznávanou aktivovanou kaspasou-3. Vektor funguje na principu FRETu. Pokud dojde v buňce k aktivaci kaspasy-3, cílová sekvence DEVD je specificky rozštěpena, čímž dochází k poklesu červené a nárůstu zelené fluorescence.

3.1.2 Fluorescenční proteiny

Fluorescenční proteiny jsou proteiny, které obsahují fluorofor a proto vykazují fluorescenci. Fluorofor je funkční skupina, v molekule, která je schopna absorbovat energii o specifické vlnové délce a následně ji emitovat při jiné vlnové délce, avšak ve stejné energetické míře. Vlnová délka a kvantum emitované energie závisí jak na fluoroforu, tak i na jeho chemickém okolí.

3.1.2.1 Green Fluorescent Protein (GFP)

Zelený fluorescenční protein se skládá z 238 aminokyselin (26,9kDa). Při ozáření světlem modré barvy emituje zářivě zelenou fluorescenci. Také mnohé další mořské organizmy exprimují podobné fluorescenční proteiny, přičemž zkratka GFP tradičně představuje

protein původně izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*.^(Prendergast and Mann, 1978)

V této medúze jiný protein zvaný Aequorin emituje modré světlo po navázání vápníku. Tohle světlo je pak plně absorbováno GFP, který následně emituje zelenkavé světlo. GFP má hlavní excitační pík při vlnové délce 395 nm a druhý, méně významný, při 475nm. Emisního maxima dosahuje při 509 nm, kde se nachází oblast jemně zeleného viditelného spektra. Další hojně využívaný typ GFP byl původně izolován z mořského žahavce *Renilla reniformis* a má jediný excitační pík při 498nm^(Wampler, 1997).

V buněčné a molekulární biologii se GFP často a hojně využívá ke zkoumání exprese genů.^(Zimmer, 2008) V modifikovaných formách nachází využití jako biosenzor. Bylo vytvořeno mnoho transgenních organismů exprimujících GFP za účelem ověření aktivní exprese konkrétního genu v daném organismu.

Gen kódující GFP může být vnesen do genomu cílového organismu selektivním křížením, pomocí virového vektoru, fyzikálními metodami nebo buněčnou transformací. GFP má typickou strukturu β soudku (β barrel), který pozůstává z jednoho β skládaného listu a několika α helixů s chromoforem uprostřed.^(Yang, Moss, Phillips, 1996)

Dosud byl gen pro GFP úspěšně exprimován v mnoha druzích bakterií, kvasinek, hub, ryb (např. *Danio rerio* - *Dánio pruhované*), rostlin, much, savců (Obr. 3) a savčích buněčných linií, včetně lidských.



Obr. 3 Transgenní myš exprimující GFP
(http://www.nightsea.com/photos/mouse_GFP.jpg)

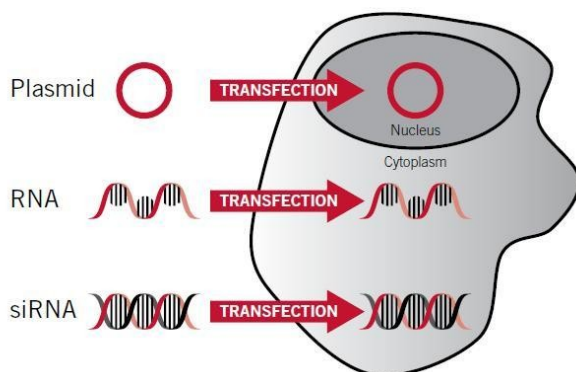
3.1.2.2 Red Fluorescent Protein (RFP)

Červený fluorescenční protein izolovaný poprvé z korálu *Discosoma* (DsRed)^(Matz et al., 1999) je velkým přínosem pro biotechnologii a buněčnou biologii. Po boku GFP z medúzy *Aequorea* se zařadil jako další alternativa studia genové exprese a lokalizace proteinů pomocí fluorescenčních sond. Ačkoliv se GFP a jeho modré, tyrkysové a žluté (YFP) varianty již hojně používají, rozšíření spektra dostupných barev o červené vlnové délky nám dává možnost využít vícebarevné analýzy například u fúzních proteinů. Současné využití RFP a GFP nebo jiné vhodné fluorescenční sondy vede ke vzniku FRET (Förster resonance energy transfer) donor/akceptorového páru. Zajímavé je, že energie ve skutečnosti není přenášena fluorescencí, proto je upřednostňován název tohoto mechanismu po německém vědci Theodorovi Försterovi oproti populárnímu „Fluorescence resonance energy transfer“. FRET je analogií k NFC (Near Field Communication - předchůdce Bluetooth), kde je poloměr interakce výrazně menší než vlnová délka emitovaného světla. V NFC oblasti excitovaný chromofor emituje virtuální foton, který je ihned pohlcen absorbujícím chromoforem. Virtuální fotony jsou nedetekovatelné, protože jejich existence porušuje zákon zachování energie a hybnosti. FRET je proto označen jako nezářivý mechanismus.

Vývoj DsRed směrem k všeobecně použitelnému a účinnému

indikačnímu nástroji byl zkomplikován několika kritickými problémy, jež zahrnují pomalé a nekompletní posttranslační modifikace a často se vyskytující tetramerizaci. (Baird, Zacharias, Tsien, 2000) Většina pokusů o řešení těchto problémů však přinesla jen mírné zlepšení. (Terskikh et al., 2002) Situaci změnil až upravený typ DsRed známý jako T1, který efektivně vyřešil problém s pomalou posttranslační modifikací. (Bevis, Glick, 2002) Dalším testováním a používáním různých forem DsRed se zjistilo, že RFP je poněkud více cytotoxický než GFP a to jak pro bakteriální, tak i pro nádorové buněčné linie a linie kmenových buněk. (Strack et al., 2009)

3.2 Transfekce



Obr. 4 Možnosti transfekce.

(http://www.mirusbio.com/assets/cms_files/technology/Technology-Transfection.pdf)

Transfekce je proces vědomého vložení nukleových kyselin do buněk. Termín „transfekce“ se používá pro nevirální metody, aby se tyto metody odlišily od virálních. Pro buňky bakteriální, neživočišné eukaryotické nebo rostlinné se raději volí termín „transformace“. Jiný význam tohoto slova je patologická transformace, kdy dochází ke změně DNA prostřednictvím vnějších činitelů (vysokoenergetické záření, karcinogeneze). Pro opis virálních technik zavádění nukleových kyselin do buněk se užívá termín „transdukce“. Všechny

tři pojmy vysvětlují stejný proces, avšak pokaždé s jiným mediátorem. Transfekce jako metoda přenosu genů je výkonný nástroj pro studování jejich funkce a exprese proteinů. Transfekci můžeme provést pomocí různých chemických, lipofekčních a fyzikálních metod. Pomocí transfekce můžeme studovat kromě již zmíněné exprese genů taky promotory, transkripční faktory, tvorbu mRNA, transkripci, translaci a interakce proteinů. (Groskreutz and Schenborn, 1999).

3.2.1 Chemické metody

Princip transfekce chemickými činidly spočívá v neutralizaci nebo odstranění repulze při zavádění negativně nabitých molekul (např. fosfátové zbytky nukleových kyselin) do buněk s negativně nabitou membránou. Chemikálie jako například fosforečnan vápenatý (CaHPO_4) nebo DEAE-dextran (diethylaminoethyl) dokážou obalit DNA a tím zeslabit její negativní náboj nebo dokonce jí udělit celkový pozitivní náboj, což výrazně usnadňuje transport transfekčního komplexu DNA přes membránu. Za zmínku stojí, že reagenty založené na bázi lipidů mohou taktéž obalit DNA za vzniku micel a asociovat s DNA prostřednictvím přitažlivých sil.

3.2.1.1 Chemická činidla

Jedním z prvních chemických činidel použitých na přenos nukleových kyselin do kultivovaných savčích buněk byl DEAE-dextran. (Vaheeri and Pagano, 1965) Je to kationický polymer, který těsně asociuje s negativně nabitými nukleovými kyselinami. Přebytek kladného náboje, který zajišťuje komplex DNA:polymer dovoluje silnější interakci s negativně nabitou buněčnou membránou. Příjem

komplexu do buňky je zajištěn patrně endocytózou.

Tato metoda umožňuje přenos nukleové kyseliny do buněk pro přechodnou expresi - je vhodná pro krátkodobé studie obvykle trvající několik dní. Avšak tato technika je všeobecně nepoužitelná pro přípravu stabilních transfektantů, u kterých je nutná inkorporace transfekované DNA do genomu cílových buněk. (Gluzman, 1981)

K přenosu DNA do buněk byly použity i jiné syntetické kationové polymery, například *polybren*^(Kawai and Nishizawa, 1984), *polyethylenimin*^(Boussif et al. 1995), a dendrimery.^(Haensler and Szoka, 1993)

Na počátku 70. let se stala populární transfekční technikou koprecipitace s fosforečnanem vápenatým. (Graham and van der Eb, 1973)

Koprecipitace fosforečnanem vápenatým je i dnes široce používána, protože použité komponenty jsou snadno dostupné a levné, protokol je jednoduchý a tato metoda je efektivní pro řadu rozličných buněčných kultur. Protokol zahrnuje smíchání DNA s chloridem vápenatým, následuje přidání této směsi kontrolovaným způsobem k roztoku PBS (phosphate buffered saline) a výsledná směs se inkubuje při laboratorní teplotě. Kontrolované přidání vytváří precipitát, který se rozptýlí na kultivované buňky a je jimi následně přijat endocytózou nebo fagocytózou. Transfekce pomocí fosforečnanu vápenatého se rutinně používá pro přechodné i stabilní transfekce u různých buněčných linií. Ukazuje se, že fosforečnan vápenatý navíc poskytuje ochranu proti nitrobuněčným a sérovým nukleasám.^(Loyter et al. 1982) Nevýhodou koprecipitace fosforečnanem vápenatým je náchylnost k variabilitě, a proto je tato metoda nepoužitelná pro přenos genů *in vivo* do zvířat. Kromě toho malá změna pH ($\pm 0,1$) výrazně ovlivňuje efektivitu transfekce. (Wolff et al., 1990)

3.2.1.2 Kationové lipidy

Termín „liposom“ pojednává o lipidové dvojvrstvě, která vytváří koloidní částice ve vodním roztoku. (Sessa and Weissmann, 1968) Umělé liposomy se od počátku 80. let používají k doručení DNA do buněk. (Fraleigh et al., 1980)

Dalším pokrokem v oblasti liposomálních částic bylo vytvoření syntetického kationtového lipidu. ^(Felgner, P. L. et al., 1987)

Kationtová čelní skupina lipidu asociuje s negativně nabitými fosfátovými zbytky v nukleové kyselině. Liposomální přenos poskytuje mnohé výhody: 1) Relativně vysokou efektivitu přenosu genů. 2) Schopnost transfekovat vybrané buněčné linie, které jsou rezistentní vůči fosforečnanu vápenatému nebo DEAE-dextranu. 3) Možná aplikace *in vitro* i *in vivo*. 4) Úspěšné doručení DNA různých velikostí od oligonukleotidů až po celé kvasinkové chromozomy. ^(Felgner, J. H. et al., 1994) 5) Přenos RNA ^(Dwarki et al., 1993) a přenos proteinů. ^(Debs et al., 1990)

Buňky transfekované liposomálními technikami mohou být použity pro přechodnou studii i pro dlouhodobé experimenty, které závisí na integraci DNA do chromozomu nebo na episomálním[⊠] zachování.

Na rozdíl od chemických metod transfekce DEAE-dextranem nebo fosforečnanem vápenatým, může být přenos nukleových kyselin pomocí liposomů použit pro *in vivo* transfer DNA i RNA do zvířat a lidí. ^(Felgner, P. L. et al., 1995)

Lipid s celkovým pozitivním nábojem při fyziologickém pH je nejběžnější syntetickou lipidovou formou liposomu vyvinutou pro přenos genů. Často jsou kationtové lipidy smíchány s neutrálními lipidy jako je například L-dioleoyl-fosfatidylethanolamin (DOPE), které mohou zvýšit schopnost transferu genů u určitých forem kationtových lipidů ^(Felgner, J. H. et al., 1994) Kationtová část molekuly lipidu asociuje s negativně nabitými nukleovými kyselinami pravděpodobně díky elektrostatickým interakcím, jejichž výsledkem je uzavření nukleové kyseliny do komplexu liposom:nukleová kyselina. ^(Kabanov and Kabanov, 1995)

Celková velikost pozitivního náboje tohoto komplexu všeobecně zvyšuje efektivitu transfekce, protože pozitivní náboj dovoluje těsnou

⊠ Episom - element vyskytující se v buňce buď jako nezávisle se replikující molekula v cytoplazmě, nebo jako součást hostitelského chromozómu buňky.

asociaci komplexu a záporně nabitě cytoplasmatické membrány. Vstup liposomálního komplexu do buňky může proběhnout endocytózou nebo prostou fúzí s membránou.^(Gao and Huang, 1995) Dosud nebylo zcela objasněno, jakým způsobem dochází k průniku nukleové kyseliny přes jadernou membránu. DOPE je považován za tzv. „fusogenní“ lipid, jehož úlohou může být uvolnění komplexů nukleových kyselin z endosomu a zároveň usnadnění jejich fúze s buněčnou membránou.^(Farhood, Serbina, Huang, 1995)

3.2.2 Fyzikální metody

3.2.2.1 Elektroporace

Elektroporace byla poprvé popsána jako metoda při studii přenosu genů do myších buněk.^(Wong and Neumann, 1982) Tato technika je často používána pro buněčné typy (např. rostlinné protoplasty), které jsou obtížně transfekovatelné jinými metodami. Mechanismus je založen na použití elektrického pulzu na rozrušení buněčné membrány a vytvoření dočasných pórů, přes které projdou molekuly nukleových kyselin do buňky.^(Shigekawa and Dower, 1988) Tato technika vyžaduje optimalizaci délky pulzu pro každý použitý typ buněk i nukleových kyselin. Vzhledem k vysoké úmrtnosti buněk vyžaduje elektroporace použití větší masy buněk a také mnohem vyšší koncentraci nukleových kyselin než je běžné u chemických metod. Modernější instrumentace umožňuje úspěšný přenos nukleových kyselin do primárních i kmenových buněk a to i do jejich jader.

3.2.2.2 Genové dělo

Další fyzikální metoda přenosu genů je genové dělo (biolistic particle delivery). Tato metoda, známá též jako „částicové

bombardování“ spočívá ve vysokorychlostním přenosu nukleových kyselin do cílových buněk na mikroprojektilech, které prorazí membránu. ^(Ye, Daniell, Sanford, 1990) Tato metoda se úspěšně používá při přenosu nukleových kyselin do buněk *in vitro* a rovněž *in vivo*. ^(Burkholder, Decker, Yang, 1993) Genové dělo je relativně drahá záležitost pro mnohé výzkumné projekty. Tato technologie může být použita i pro genetické očkování a uplatnění nachází i v polnohospodářství.

3.2.2.3 Mikroinjekce

Tato metoda byla poprvé využita pro přenos DNA do embryonálních kmenových buněk, které se používají při produkci transgenních organizmů. ^(Bockamp et al., 2002) Přímá mikroinjekce nukleových kyselin do kultivovaných buněk nebo do jádra je efektivní, ačkoliv laboratorní provedení vyžaduje velice tenkou jehlu. Jedná se o jednoduchý mechanický proces, při kterém skleněná jehla o průměru 0,5 - 5µm propíchně buněčnou membránu s možností dostat se až do jádra. Další možné aplikace mikroinjekce jsou v technikách klonování a při studiu virů. ^(Davis, et al., 2000) Cílové látky jsou vstříknuty do vybrané buněčné organely nebo do cytoplazmy a jehla se jednoduše vytáhne. Mikroinjekce je obvykle prováděna pod specializovaným optickým mikroskopickým systémem nazvaným „Micromanipulator“. Tato metoda se často používá jako vektor v genetickém inženýrství a transfekcích pro vložení genetického materiálu do jednotlivé buňky. Avšak zařízení je drahé a technika je náročná, proto je tahle metoda nevhodná pro studie, které vyžadují velké počty transfekovaných buněk.

3.2.3 Virální metody

Zatímco se pro transfer genů úspěšně používala transfekce, bylo zjištěno, že použití virů jako vektorů je možnou alternativní metodou přenosu genů do buněk v kultuře i *in vivo*. Přednosti adenovirových vektorů vyplývají za následujících vlastností:

A) Rychle infikují široké spektrum lidských buněk a můžou dosáhnout vysoké úrovně přenosu genů v porovnání s jinými typy vektorů.

B) Adenovirové vektory mohou nést relativně velké segmenty DNA (až do 7,5 kb) a dovolují tyto transgeny vnést i do neproliferujících buněk.

C) Adenovirové vektory jsou relativně lehce manipulovatelné využitím technik rekombinantní DNA.^(Vorburger and Hunt, 2002) Ostatní vektory zájmu zahrnují Adeno-asociované viry, viry Herpes simplex, Retroviry a Lentiviry. Právě Lentiviry (např. HIV-1), podmnožina rodiny Retrovirů, jsou předmětem zájmu, protože jsou dobře prostudovány, mohou infikovat buňku v klidové fázi a dokáží se včlenit do genomu hostitelského organismu, což vede k stabilní expresi transgenů.^(Anson, 2004) Všechny metody přenosu genů mají své nevýhody. Pro Adenovirové vektory to je náročná laboratorní produkce a nízká kapacita obalu.^(Vorburger and Hunt, 2002) V případě retrovirových vektorů zde existuje reálné riziko aktivace latentní nemoci a pokud jsou přítomny viry schopné replikace, aktivují se endogenní retroviry a exprese transgenů se sníží na minimum.^(Anson, 2004)

3.2.4 Přípravná fáze pro transfekci

Před každou transfekcí musíme brát na zřetel množství faktorů, od kterých závisí její úspěšnost.

A) Výběr reagensie. Při jakékoliv změně parametrů zahrnujících typ

buněčné linie, plazmid nebo prostou změnu účelu samotného přenosu genů, musí následovat stanovení optimálních podmínek celé transfekce, které mohou zahrnovat i výběr jiné transfekční reagenty.

B) Přejídná versus stabilní transfekce. Další parametr na posouzení je časový rámec experimentu, po který si ho přejeme provádět. Pro přípravu stabilních transfektantů není vhodná každá technika a pro několikadenní měření zase není potřeba obvykle finančně náročnější techniky stabilní transfekce. Taky je dobré zvážit, co se vlastně bude měřit. Například, na určení, který z fragmentů promotoru si zachoval původní funkci postačí dočasná transfekce, zatímco sledování exprese exogenního genu bude vyžadovat stabilní transfektanty.

Přejídná transfekce - Buňky jsou obvykle sklizeny do 72 hodin po transfekci. Přejídná transfekce je určena pro analýzy krátkodobé exprese genů zájmu. Optimální časový interval závisí od typu buněčné linie, cílů výzkumu, specifické exprese a charakteristik studovaných genů.

Stabilní transfekce - cílem stabilní transfekce je izolovat a rozmnožit jednotlivé klony obsahující vnesenou DNA, která se zabudovala do jejich buněčného genomu. Rozlišení netransfekovaných buněk a buněk pozitivních na danou exogenní DNA vyžaduje selekci, která bývá obvykle zajištěna rezistencí vůči selekčnímu antibiotiku a obsahuje ji již exogenní DNA. Častější výměna kultivačního média je vhodná vzhledem k prudkému nárůstu úmrtnosti a buněčného odpadu vlivem selekce. Alternativní strategií je použít vektor nesoucí esenciální gen, který je defektní v původní linii.

C) Typ transfekované molekuly. Nejčastěji se pomocí transfekčních metod přenáší plazmidová DNA, avšak přeneseny mohou být i jiné molekuly či makromolekuly, např. siRNA^(Hong et al., 2004), oligonukleotidy^(Lin, Li, Wu, 2004), RNA^(Shimoike et al., 1999) a dokonce i proteiny.^(Debs et al., 1990) Podmínky pro transfekci plazmidem musí být modifikovány při použití jiné makromolekuly. V každém případě,

přenášený biopolymer musí být vysoce kvalitní a čistý. Nukleové kyseliny by měli obsahovat co nejméně proteinů, pokud možno žádné znečišťující fragmenty jiných nukleových kyselin a žádné jiné látky jako například ionty solí. Protein by měl být čistý a v přijatelném rozpouštědle, které neškodí buňce.

D) Ověření úspěšnosti transfekce. Plazmidy kódující reportérové proteiny jsou snadno měřitelné podle hladiny exprese daného proteinu v buňkách. Obvykle se úspěšnost měří 1-3 dny po transfekci, optimální čas lze určit empiricky. Další metoda měření úspěšnosti může být přímý test proteinu zájmu, například pomocí Western blotu či hodnocení ELISA. V případě siRNA může být úspěšnost proměřena jak přímým testem proteinu zájmu, tak pomocí mRNA technikou RT-PCR.

3.2.5 Faktory ovlivňující účinnost transfekce

Každá z transfekčních metod závisí na 5 důležitých parametrech, které mohou významně ovlivnit účinnost transfekce: životaschopnost buněk, konfluence (adherentní linie), počet pasáží, kontaminace, kvalita a množství DNA.

A) Buněčná viabilita. Buňky by měli být kultivovány ve vhodném, pro danou linii určeném médiu, které by mělo být doplněno všemi potřebnými suplementy (např. telecí fetální sérum, růstové faktory, aminokyseliny, antioxidanty, antibiotika, atd.). Je vhodné používat čerstvé médium a to hlavně v případě, je-li některá z komponent nestálá. Kontaminovaná buněčná linie se v žádném případě nesmí použít pro transfekci, ale musí být urychleně a sterilně zlikvidována z důvodu možného šíření kontaminace. Drtivá většina buněčných linií by měla být inkubována v inkubátoru při 37°C s požadovanou koncentrací CO₂ (obvykle 5-10 %) při 100% vlhkosti vzduchu. Podrobnější a doplňující informace o většině buněčných linií jsou dostupné na domovské stránce organizace ATCC (American Type

Culture Collection; <http://www.atcc.org/>).

B) Konfluence. Pro většinu typů transfekcí se obvykle doporučuje 40-80% konfluence. Příliš nízká hustota buněk způsobuje pomalý růst kolonie vlivem omezeného buněčného kontaktu. Příliš vysoká hustota zase vede ke kontaktní inhibici (omezení hlavně pro nenádorové linie), jejímž důsledkem je snížený příjem přenášené DNA. Aktivně se dělící buňky přijímají vnášenou DNA ochotněji než buňky v klidové fázi.

C) Počet pasáží. Všeobecně se doporučuje k transfekci používat buňky s co nejnižším počtem pasáží (obvykle mezi 10. až 20. pasáží, ne víc jak 50.), důležitost tohoto parametru záleží na konkrétní linii. Tento faktor může mít vliv na výsledek transfekce i samotných testů, protože chování buněk se s časem může měnit a to z důvodu kumulace chromozomálních aberací, které sice imortalizovaným buňkám příliš nevadí, avšak ovlivňují jejich vlastnosti a citlivost.

D) Kvalita a množství DNA. Plazmidová DNA určená pro transfekce by měla být prostá proteinů, RNA a chemické či mikrobiální kontaminace. Zvýšení čistoty lze dosáhnout etanolovou precipitací, po které se plazmidová DNA rozpustí ve sterilním TE pufru (Tris/EDTA) (pH=8,0) na požadovanou koncentraci (0,2 - 1mg/ml). Optimální množství DNA pro transfekci je různé a závisí od zvolené metody, buněčné linie, počtu buněk a charakteru samotné plazmidové DNA.

E) Poměry transfekčních reagensů; použitá metoda.

Pro každou transfekci je nutná optimalizace vzájemných poměrů materiálu pro transfekci, obvykle transfekční reagensie a pufru. Dále je třeba zvážit typ reagensie, typ materiálu pro transfekci (DNA, RNA, protein) a jeho množství, doba působení transfekční reagensie na buňky a přítomnost či nepřítomnost séra v kultivačním médiu. Celková účinnost transfekce závisí na typu metody (chemická činidla, lipofekce, fyzikální metoda, atd.), použité buněčné linii, materiálu pro transfekci a vzájemné kombinaci těchto faktorů.

U řady buněčných linií byla již testována účinnost téměř všech dostupných transfekčních technik. V literatuře však dosud chybí systematická studie srovnávající účinnost chemických a fyzikálních metod. Prozatímní výsledky testování účinnosti a toxicity na třech typech systémů savčích buněk (člověk, králík, prase) naznačují, že fyzikální metody (nukleofekce) jsou efektivnější než chemické transfekční reagentie různých kationtových typů (dendrimer, polyethylenimin, lipid) při doručování DNA do různých testovaných buněčných linií. Tyto studie taky poskytly užitečný náhled na optimalizaci transfekčních podmínek a relativní životnost buněk.

3.3 Metody selekce

Úspěšnost žádné transfekční metody není 100 % a proto je potřeba nějakým způsobem oddělit pozitivní buňky od negativních. Selektovat můžeme fyzikálními nebo chemickými metodami, přičemž nejznámějšími zástupci jsou selekční antibiotika a průtoková cytometrie.

3.3.1 Chemické metody

3.3.1.1 Selekční antibiotika

Každý plazmid obsahuje části, které kódují enzymy poskytující různým nositelům ochranu vůči působení jistého selekčního antibiotika. Jejich přehled s krátkým popisem je shrnut v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1 Přehled nejpoužívanějších selekčních antibiotik.

	Antibiotikum	charakteristika	původ	účinná koncentrace – bakterie	účinná koncentrace – savčí buňky	popis mechanismu účinku
1.	Blasticidin S	peptidový nucleosid	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	25-100 µg/ml	1-10 µg/ml	Specifická blokáce proteosyntézy prostřednictvím blokáce tvorby peptidové vazby v ribozomu
2.	G418	aminoglykosid	<i>Micromonospora rhodorangea</i>	5 µg/ml	400-1100 µg/ml	Blokace syntézy polypeptidů prostřednictvím inhibice prodlužovacího kroku
3.	Hygromycin B	aminoglykosid	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	100 µg/ml	50-200 µg/ml	Inhibice proteosyntézy ovlivněním translace velké ribozomální podjednotky 70s způsobující její nefunkčnost
4.	Pheomycin	glykopeptid	<i>Streptomyces verticillus</i>	10 µg/ml (kvasinky)	25-150 µg/ml (houby)	Vazba a interkalace do DNA
5.	Puromycin	aminonukleosid	<i>Streptomyces alboniger</i>	125 µg/ml (nevhodný)	1-10 µg/ml	Inhibice translace přes inhibici enzymů dipeptidyl-peptidasy II a alanyl aminopeptidasy, což způsobuje uvolnění proteinu před dokončením
6.	Zeocin™	glykopeptid s chelátovanou mědí	<i>Streptomyces CL990</i>	25 µg/ml	50-300 µg/ml	Interkalace do DNA způsobující její rozštěpení

Hojně používané je taky aminoglykosidové antibiotikum Neomycin. Odolnost vůči němu poskytuje *neo* gen, který kóduje jednu ze dvou aminoglykosidfosfotransferas. *Neo* gen je kromě jiných běžně zabudován do DNA plazmidů používaných pro stabilní transfekci savčích buněčných linií.^(Li et al.,2010) Mnoho komerčně dostupných plazmidů obsahuje právě *neo* gen jako selekční marker. *Neo* gen poskytuje odolnost vůči vícerym aminoglykosidovým antibiotikům, například vůči Neomycinu, Kanamycinu a Geneticinu. Neomycin a Kanamycin se používají spíše pro selekci u prokaryot, kdežto selekce eukaryot obvykle vyžaduje Geneticin (G418).^(InvivoGen, 2010)

3.3.2 Fyzikální metody

3.3.2.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (zkráceně FCM – *ang.* Flow cytometry) je technika pro počítání a měření řady parametrů mikroskopických částic, jako jsou například buňky nebo chromozomy. Tato metoda spočívá v nasátí částic do proudu nosné kapaliny a jejich následném proměření na elektronickém aparátu, což dovoluje multiparametrovou analýzu jejich fyzikálních a chemických vlastností rychlostí několik tisíc částic za sekundu. Základní měřitelné parametry jsou tzv. „Forward scatter“, který odpovídá velikosti částic a tzv. „Side scatter“ jež odráží granularitu buněk. Průtoková cytometrie se běžně používá při diagnostice mnohých chorob, hlavně nádorových onemocnění (např. leukémie) a má i mnoho dalších aplikací ve výzkumné i klinické praxi.^(Barlogie et al., 1983) Některé modernější průtokové cytometry (Obr. 5) jsou vybaveny sortovacím modulem, který umožňuje fyzicky roztrždit částice podle zvolených parametrů. Jednou z mnoha využitelných aplikací sortování je možnost vytržení populace pozitivních buněk po transfekci na základě jejich fluorescence zajištěné expresí reportérových proteinů z heterogenní směsi buněk.



Obr. 5 Průtokový cytometr FACS ARIA II SORP.

(http://www.productwiki.com/upload/images/becton_dickinson_facsaria_i_ii_and_iii.jpg)

3.3.2.2 Princip metody

Laserový paprsek o konstantní vlnové délce je směřován na hydrodynamicky zaostřený proud kapaliny. Několik specifických detektorů je namířeno na bod, kde paprsek světla prochází skrz proud s částicemi: Jeden rovnoběžný s paprskem (Forward Scatter or FSC), několik kolmo na něj (Side Scatter or SSC) a jeden nebo více fluorescenčních detektorů. Každá částice od 0,2 do 150 mikrometrů procházející skrz paprsek ho specificky rozptýlí a jestli jsou v částici nebo na jejím povrchu fluorescenční látky, můžou být excitovány a následně emitují světlo o vyšší vlnové délce, než má zdroj, který je excitoval. Tato kombinace rozptýleného a fluorescenčního světla je snímána detektory, kde analýzou fluktuací jasnosti u každého detektoru (jeden pro každou vlnovou délku fluorescenční emise) je možné odvodit různé typy informací o fyzikální a chemické struktuře každé jednotlivé částice. FSC měří objem a velikost buňky, SSC stanovuje hodnoty vnitřní komplexity částice (např. tvar jádra, počet a typ cytoplasmatických granulí nebo drsnost membrány). Některé průtokové cytometry na trhu vůbec neměří fluorescenci a využívají pouze rozptyl světla na měření. Většinou se ale měří velikost částice (např. odlišení jednotlivých živých buněk od mrtvých a klastrů), granularita (často vypovídá o zdravotním stavu buňky) a intenzita fluorescence (např. určení míry exprese vneseného reportérového genu v konkrétní buňce).

3.4 High-content screening

High-content screening, známá taky jako Cell-based screening, Phenotypic screening anebo Visual screening, je automatizovaná metoda buněčné biologie vycházející z optiky, chemie, biologie a obrazové analýzy. Umožňuje rychlý, vysoce paralelní biologický

výzkum a testování léčiv na vysoké úrovni, jako i vyhodnocení mnohých biochemických a morfologických parametrů v buněčných systémech.

Využívá obrázky žijících buněk jako základní jednotku pro detekci molekul. Proteiny zájmu přítomné v buňkách jsou detekovány pomocí fluorescenčních značek (např. Green fluorescent protein)^(GFP site, 2011) nebo pomocí fluorescenčních monoklonálních protilátek.

High-content screening je metoda využívající současně vícere metody k získání mnohočetných informací najednou, co zvyšuje kvalitu analýzy. Následná analýza obrazů je využita k měření a vyhodnocování změn vlastností buněk způsobených vnějším vlivem, např. cytostatiky.

Metoda High-content screening je kombinací moderní buněčné biologie se všemi molekulárními nástroji, kterými v současnosti disponuje s automatizovanou mikroskopií s vysokým rozlišením a robotickou manipulací. Odlišuje se od většiny současné vědecké práce, protože vyhodnocení experimentů je z velké části taky automatizováno.^(Dorval et al., 2010)

Tato technologie se hlavně používá na určení účinnosti potenciálních léčiv na buněčné funkce, které jsou ovlivněny určitou chorobou.

Technologie High-content screeningu má velký vliv na základní biomedicínský výzkum. Integrované nástroje téhle metody dovolují obrovské zvýšení počtu biologických měření v současném měřítku. Jejich hodnota je demonstrována vysokým výkonem zpracování kinetických, víceparametrových testů cytotoxicity pomocí naměření kolem 10^8 individuálních fyziologických buněčných parametrů za méně než den.^(Abraham, Taylor, Haskins, 2004)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

Základem mé výzkumné činnosti je práce v sterilních podmínkách ve flowboxu s laminárním prouděním vzduchu (Obr. 6). Po zvládnutí všech základních technik jsem byl proškolen v pokročilejších, které zahrnují přípravu médií a roztoků, MTT test životnosti buněk, v manipulaci s fluorescenčním mikroskopem, kde jsem pozoroval transfekované buňky MAT-Ly-Lu pEYFP Tnk II (kryší karcinom prostaty) pomocí GFP – tubulinu.



Obr. 6 Flow-box s laminárním prouděním vzduchu.

4.1.1 Buněčné linie

Buněčná linie je soubor buněk, které byli izolovány a z kultivovány z nějakého druhu tkaniva, fyziologického či patologického. Oblast mého výzkumu se zabývá nádorovými liniemi. V podstatě se jedná o modelově stejný typ buněk, jako má daný nádor, takže je vysoká pravděpodobnost, že buňky nádoru budou vykazovat velmi podobné vlastnosti jako mají buňky kultivované v linii. Jedná se o model nádoru, na kterém se dají celkem spolehlivě dělat např. výzkumy cytotoxicity pro posouzení efektivity léčiva, resp. jejich kombinaci. Při své práci jsem se setkal s mnoha nádorovými buněčnými liniemi, no jen s pár jsem pracoval dlouhodoběji. Jejich přehled je uveden v tabulce. (Tab. 2)

Tab. 2 Přehled buněčných linií, s kterými jsem dlouhodobě pracoval.

Reference: <http://www.atcc.org>

Buněčná linie	Typ onemocnění	Tkáňový původ	Orgán
CCRF-CEM	akutní lymfoblastická leukemie	lymfoblast	kostní dřev
MAT-Ly-Lu-B-2	krysí karcinom	epitel	prostata
HCT 116	karcinom	epitel	konečník
U-2 OS	sarkom	epitel	kost
A549	karcinom	epitel	plice

Základy práce s tkáňovými kulturami jsem se naučil na linii CCRF-CEM, základy práce s transfekovanou linií na MAT-Ly-Lu pEYFP Tnk II. Pak jsem pracoval s buněčnou linií HCT-116, kterou vystřídali experimenty s U-2 OS a nakonec jsem pracoval s linií A549.

Všechny linie kromě MAT-Ly-Lu a CCRF-CEM jsou adherentní - sedí na dně kultivační nádoby a odpojují se jen při mitóze anebo buněčné smrti. Linie MAT-Ly-Lu je semiadherentní - její adherence je slabší, oddělí se snáze ode dna. CCRF-CEM je suspenzní linie - nevyžaduje kontakt s podložím, zato ale nemůže být limitně naředěna - vyžaduje kontakt s jinými buňkami svého druhu. Každá linie má svoje

specifika, ideální kultivační podmínky a vyžaduje jiné zacházení.

4.1.1.1 Média a suplementy

Jak již bylo zmíněno, každá buněčná linie potřebuje médium na kultivaci a růst. Médium musí co nejvěrněji a co nejlépe napodobovat přirozené prostředí, kde se daná linie vyskytuje. Prakticky žádné kultivační médium se neobejde bez iontů solí udržujících příznivý osmotický tlak a pH, aminokyselin nutných pro proteosyntézu a jednoduchých cukrů (nejčastěji glukóza) jako zdroje energie. Média bývají často doplněna vitamíny a jiné doplňující látky. Různé nádorové linie mají ale různé požadavky, no požadavky těch běžně se vyskytujících se v podstatě se dají shrnout do možností 3 médií, které jsou následně doplněny suplementy:

A) Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)

B) McCoy's 5A Modified Medium

C) Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)

Až na pár výjimek se média doplňují suplementy. K těm nejběžnějším a nejčastěji používaným pro eukaryotické buňky patří *fetální bovinní sérum* (FBS). Je to plasma, která zůstává po sražení krve extrahované z plodu skotu. FBS má velmi nízký obsah protilátek a obsahuje mnoho růstových faktorů.

Média se často doplňují barvivem *fenolová červeň* (Phenol red). Jedná se o acidobazický chromator, který celkem spolehlivě odráží stav živin v médiu. Když je médium čerstvé, má sytě červenou barvu, kterou kyselé metabolity buněk postupně mění na oranžovou až žlutou. Jedinou nevýhodou tohoto indikátoru je ovlivnění barvy při absorpci vzdušného CO₂, kdy se médium zdá nutričně bohatší, než ve skutečnosti je.

Dalšími suplementy mohou být různé další vitamíny, specifické růstové faktory nebo aminokyseliny (zejména glutamin - i když ho už médium obsahuje, daná linie vyžaduje vyšší koncentraci.)

Požadavky některých buněčných linií jsou skutečně exotické, například již zmíněná linie MAT-Ly-Lu-B-2 se má nejlépe v médiu RPMI 1640 obohaceném o glutamin na koncentraci 2mM a o Dexamethazon (DXMT) na koncentraci 250nM. Dexamethazon je silný syntetický glukokortikoid z třídy steroidů. Působí protizánětlivě a má imunosupresivní účinky.

Zajímavým paradoxem je, že existují vyselektované buněčné linie, které je možno kultivovat jenom v přítomnosti jisté koncentrace určitého cytostatika.

4.1.1.2 Pasážování buněčných linií

Množením adherentních buněk postupně dochází k pokrytí celé plochy dna kultivační láhve a pokud nedojde ke včasné pasáži, přerůstají buňky do vrstev. Přerůstání adherentních či suspenzních buněčných linií vede k poklesu viability v důsledky spotřebování živin v médiu. Pasážování znamená prosté vyředění buněčné kultury vhodným faktorem. Obvyklá frekvence pasážování je 2-3x týdně.

Suspenzní linie: Jestli v dané kultivační nádobě není mnoho mrtvých buněk, část obsahu nádoby se jednoduše slije a novým médiem se doplní na původní objem. Jestli je potřeba odstranit mrtvé buňky, musí se obsah kultivační nádoby stočit v centrifuze. Využívá se menší rychlosti sedimentace mrtvých buněk, které zůstanou v starém médiu, které se dekantuje. Peleta se pak sklepe a tím rozsuspenduje a následně se novým médiem kultivační nádoba doplní na původní objem.

Adherentní a semiadherentní linie: Vzhledem k tomu, že se adherentní buňky poměrně pevně drží dna kultivační nádoby, staré médium můžeme přímo slít do odpadu. K uvolnění buněk lze použít chemickou metodu tzv. trypsinizace nebo fyzikální metodu (buněčná škrabka) v případě že je daná linie citlivá na působení trypsinu. Vlastní trypsinizaci provádíme přidávkem malého objemu trypsinu k buňkám několikrát opláchnutým s PBS. Po uvolnění buněk

zastavíme reakci přidavkem nadbytku media, čímž dojde k inaktivaci trypsinu jeho vyvázáním na sérum obsažené v médiu. Poté buňky centrifugujeme (1300 rpm, 5 minut), médium s trypsinem slijeme a peletu rozsuspendujeme ve vhodném objemu média. Škrabku obvykle používáme při pasážování semiadherentních buněčných linií. Po seškrabání buněk ze dna kultivační lahve se uvolněné buňky chovají prakticky jako suspenzní linie, takže je pouze naředíme na požadovanou hustotu. Obvykle platí, že mechanické seškrabání vede k vyšší buněčné úmrtnosti než trypsinizace.

4.1.1.3 Stanovení počtu a viability buněk

Ke stanovení přesné koncentrace a viability buněk můžeme použít kromě řady komerčně dostupných moderních automatických čítačů (např. Countess™, ViCell) i Bürkerovu komůrku, kterou upravil Neubauer (Obr. 8) Jedná se o jistým způsobem rýhované hrubé podložní sklíčko překryté krycím sklíčkem. Před vlastním počítáním napipetujeme mezi skla cca 10 μ l směsi buněčné suspenze a barviva Trypanové modři v poměru 1:1. Existují vícere možnosti způsobu počítání buněk, které závisí především od typu rýhování. Já jsem používal metodu sčítání všech buněk v jakýchkoli dvou řádcích, které spolu nesousedí plus jeden čtverec kdekoliv mimo dané 2 řádky, přičemž buňky, které se nějakým způsobem dotýkají stěny se počítají jen z dolní a pravé strany konkrétního čtverce. Daný počet buněk vynásobíme faktorem 0,02 a výsledek udává počet buněk v milionech namililitr. Viabilitu určíme na základě intaktnosti plazmatické membrány, která pokud je porušena (mrtvé buňky) dovoluje průchod trypanové modři do cytosolu. Podle počtu modrých buněk lze tedy snadno zjistit procento živých, resp. mrtvých buněk.



Obr. 7 Bürkerova komůrka na počítání buněk upravená Neubauerem. (<http://dk.cryosinternational.com/media/4267/neubauer.jpg>)

4.1.1.4 Rozmrazování a zamrazování buněk

S buněčnými liniemi se nepracuje nepřetržitě, proto je lepší přebytečné nebo důležité buňky zamrazit jako pojistku pro případ, že pokus nevyjde nebo bude potřebné ho zopakovat. Buněčná suspenze přežije zmrazení na rozdíl od tkaniva, protože jejich membrána se má kam roztáhnout a nedochází tedy k perforaci rostoucími krystaly ledu.

Zamrazování: Živé buňky je třeba zmrazit tak, aby nedošlo k jejich poškození krystaly vody. Do zamrazovacího média se proto přidává vhodné kryoprotektivum, nejčastěji dimethylsulfoxid. Mnohem méně často se jako kryoprotektivum používá glycerol^(Vejražka, 2007). Suspenze dané buněčné linie se centrifuguje (1300 rpm, 5min.), supernatant se slijí a peleta rozsuspenduje rozklepáním. Následně se přidá 1ml zamrazovacího média, které se skládá z čistého fetálního telecího séra a dimethylsulfoxidu (DMSO) v poměru 9:1. Suspenze se několikrát propipetuje, aby se minimalizoval počet klastrů, přenesení do zamrazovacích zkumavek a umístí do mrazáku na -80°C. Při dlouhodobějším skladování je doporučeno buňky uchovávat v tekutém dusíku s přibližnou teplotou -195°C.

Rozmrazování: Zatímco zamrazování buněk by mělo probíhat

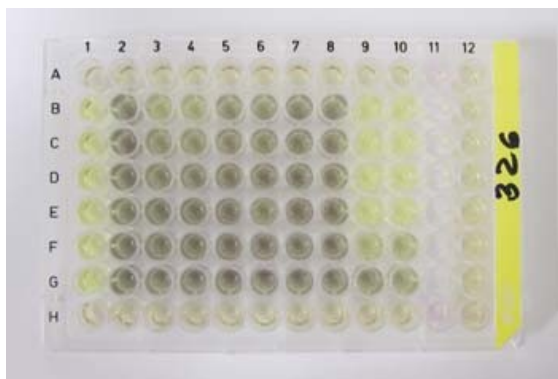
pozvolna, pro rozmrazování se doporučuje rychlé (cca 3 minuty) zahřátí vložením zamrazovací zkumavky do vodní lázně vyhřáté na 37°C za občasného protřepání, dokud nedojde k rozpuštění směsi. Pak se suspenze propipetuje a přemístí do falkony, kde se zředí předeřátým kultivačním médiem a zcentrifuguje (1300rpm, 5min.). Supernatant se slije, peleta rozsuspenduje, přidá se odpovídající objem kultivačního media, suspenze se přenesse do kultivační lahve a umístí do inkubátoru.

4.1.1.5 Stanovení buněčné proliferace a viability

Pro stanovení buněčné proliferace a viability buněk se standartně používá MTT tetrazoliový test.^(Mosmann, 1983) (Obr. 8) Touto metodou se testuje citlivost buněčných linií pro různé chemické látky nebo jejich kombinace. Očekávaným výstupem je obvykle hodnota IC₅₀, která odpovídá koncentraci látky způsobující pokles počtu metabolicky aktivních buněk na polovinu vzhledem ke kontrolní neovlivněné populaci.

Princip metody spočívá v redukci žluté tetrazoliové soli (3-(4,5-Di(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid; MTT) dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk na fialový nerozpustný formazan, který je následně solubilizován roztokem SDS a absorbance roztoku je změřena při 540nm. Buňky kultivované obvykle v 96-ti jamkovém panelu, v objemu 100μl média jsou vystaveny působení testované látky po dobu 1 až 3 dny podle charakteru experimentu. V panelu jsou vždy přítomny 2 kontrolní sloupce, první s čistým médiem (tzv. blank) a druhý s buňkami v mediu bez přítomnosti testované látky (kontrola). Kontrolu i blank je potřeba obohatit o objem rozpouštědla totožný s objemem přidávaných látek. Zbylá část panelu je vyplněna buněčnou suspenzí obsahující kontinuálně klesající koncentraci testovaných látek. Po

uplynutí testované doby se do všech jamek přidá 10 μ l tetrazoliové soli a po patrném vysrážení krystalů formazánu (obvykle 1-4h) je reakce ukončena přidávkem 100 μ l dodecylsulfátu sodného (SDS). Panel se ponechá v inkubátoru do dalšího dne, aby došlo k úplné lyzi všech buněk. Následně je změřena absorbance při 540nm a stanovená hodnota IC₅₀, která odráží účinnost testované látky.



Obr. 8 MTT test. (http://lem.ocol.cz/_data/1156230932_37.jpg)

4.1.2 Transfekce pomocí lipofekce

Pro lipofekční techniku transfekce byla použita reagencie JetPRIME™ (Polyplus, Francie). Podmínky transfekce byly optimalizovány podle následujícího schématu (Obr. 9) nejprve na linii HCT-116 a následně také U2OS a A549. Expresní vektory kodující aktin (pmKate2-actin), histon (pmKate2-H2B) a kaspasu-3 (Casper3-GR) byly zakoupeny u firmy Evrogen (Russia).

	1	2	3	4
A	10 0,1 0,1	25 0,25 0,25	50 0,5 0,5	100 1 1
B	10 0,1 0,2	25 0,25 0,5	50 0,5 1	100 1 2
C	10 0,1 0,4	25 0,25 1	50 0,5 2	100 1 4

Obr. 9 Optimalizace transfekce pomocí JetPRIME™. Transfekční pufr, plazmid a transfekční reagencie byly namíchaný v uvedených poměrech. Koncentrace plazmidu je uvedena v μ g/ μ l, objem pufru a reagencie v μ l.

Optimalizace byla provedena s plazmidem pmKate2-H2B a nejlepší výsledek byl aplikován na další expresní vektory.

4.1.3 Selekcce

4.1.3.1 Chemická selekcce

K chemické selekci bylo použito antibiotikum Geneticin (G418), pro který nesou plazmidy gen odolnosti *neo*. Negativní buňky byly tedy mnohem víc ovlivňovány blokací proteosyntézy, kterou G418 jako aminoglykosidové antibiotikum způsobuje.^(Le Goffic et al., 1979) Nutností bylo zjistit citlivost daných linií k tomuto antibiotiku, aby se účinně potlačily negativní buňky a nezvyšovala se zbytečně chemorezistence. Provedl jsem vícere zkušky citlivosti s různými parametry na liniích HCT 116 a A549.

4.1.3.2 Fyzikální selekcce

Selekcce pomocí sortovacího zařízení průtokového cytometru je velmi elegantní metoda, kterou lze nahradit časově zdlouhavou fyzikální selekci, navíc bez potenciálního rizika indukce chemorezistence. Buňky určené k sortování trypsinujeme, reakci zastavíme přidáním nadbytku média, centrifugujeme (1300 rpm, 5min.) a buněčnou peletu nesuspendovanou v malém objemu média nebo PBS přeneseme do cytometrické zkumavky a podrobíme sortování průtokovým cytometrem FACSAria™ II (BD, USA). Populace RFP - nebo GFP - pozitivních buněk byla sortována do 6-ti jamkového panelu jako tzv. bulk nebo po jedné buňce do 96-ti jamkového panelu.

4.1.4 Biosyntéza, čištění a ověření plazmidů

Vzhledem k vysoké spotřebě plazmidů při četných transfekčních experimentech bylo nutné plazmidy namnožit prostřednictvím transformace bakterií. K tomuto účelu byl využit bakteriální kmen *E.Coli* DH5 α . Tato technika dovoluje získat plazmidy v množství jednotek miligramů.

4.1.4.1 Transformace bakterií plazmidem

Transformace je přenos genetické informace (plazmidové DNA) do geneticky upravených tzv. kompetentních buněk. Pro přenos jsme použili techniku tepelného šoku s následným ochlazením. Komerčně upravené plazmidy obsahují geny pro rezistenci k jistému selekčnímu antibiotiku. Bakterie obsahující tento gen jsou schopny růstu na agarové půdě, která obsahuje určitou koncentraci selekčního antibiotika. Bakterie, do kterých plazmid nevnikl jsou k selekčnímu antibiotiku citlivé a zahynou. Rostoucí kolonie pak budou tvořeny pouze bakteriemi obsahujícími plazmid. Transformaci jsem provedl dle následujícího postupu:

Na ledové tříšti se rozmrazí ampule s kompetentními buňkami *E. coli* DH5 α . K alikvotu 50 μ l rozmrazených buněk přidáme 5 μ l roztoku plazmidové DNA v TE pufru (Tris - EDTA) o výsledné koncentraci 1ng/ μ l. Daná směs se inkubuje na ledové tříšti po dobu 45 minut. Pak následuje tepelný šok - danou směs kompetentních buněk a plazmidu umístíme do vodní lázně vyhřáté na 42°C po dobu 90 sekund. Po uplynutí této doby zkumavku okamžitě zchladíme na ledu. Do zkumavky přidáme SOC médium určené pro kultivaci bakterií a za mírného třepání inkubujeme při 37°C po dobu 45 minut. Následně se bakterie vysejí ve dvou koncentracích (5 μ l a 50 μ l bakterií v SOC médiu + 500 μ l LB média) na tuhé, půdy obsahující selekční

antibiotikum. Je dobré vyšetřit i dvě kontrolní koncentrace na jiném než selekčním antibiotiku. Půdy se pak nechají 24h kultivovat v termostatu při 37°C. Po ukončení kultivace se buď vyočkuje kolonie k biosyntéze plazmidu, nebo se miska s koloniemi obalí parafilmem a uloží do lednice dnem vzhůru. Selekční půdy s jiným než selekčním antibiotikem by měly zůstat čisté.

SOC médium (Super Optimal broth with Catabolite repression) se skládá z 99 dílů média SOB 99 (Super Optimal broth) a 1 dílu 2M roztoku glukózy. Roztok SOB 99 se získá smícháním 98 dílů roztoku SOB 98 a 1 dílu roztoku SOB 1. Roztok SOB 98 obsahuje 2% Proteose pepton (Sigma P0431), 0,5% Bacto yeast extract (Sigma Y1625), 10mM roztok NaCl a 2,5mM roztok KCl (Lachema). SOB 1 se získá smícháním dvou 10mM roztoků $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Lachema) a následnou sterilizací přefiltrováním.

1 litr LB média (Lysogeny broth) obsahuje 10g Proteose pepton (Sigma P0431), 5g Bacto yeast extract (Sigma Y1625) a 9,17g NaCl (Fluka 71376). Následně se autoklávuje, inkubuje 24h při 37°C a reautoklávuje.

Tris/EDTA pufr 10x koncentrovaný obsahuje 106g Tris zásady (Sigma T1503), 55g kyseliny borité (Sigma B6768) a 40ml 0,5M EDTA (pH 8,0) (Sigma E26282).

4.1.4.2 Množení a izolace plazmidu

Ze selekčních půd vyočkujeme pomocí vyžíhané platinové kličky pozitivní kolonii exprimující požadovaný plazmid do malého objemu (10-15 ml) tekutého LB média s příslušným selekčním antibiotikem a umístíme na temperovanou třepačku. Po několika hodinách je patrné zakalení inokulátu. Objem bakteriální kultury slijeme do Erlenmeyerovy baňky obsahující 1 litr LB média s příslušným selekčním antibiotikem a necháme kultivovat na

temperované třepačce po dobu 15 - 24h. Poté následuje vlastní izolace plazmidu, k níž lze využít celé řady komerčně dostupných kitů, které celý proces značně zjednodušují. Kity ve většině případů využívají kolonkový systém, kde v první fázi dochází k záchytu plazmidu, následují promývací kroky a v konečné fázi se plazmid eluje do vychlazeného isopropanolu, čímž dojde ke srážení plazmidové DNA. Této proceduře předchází alkalická lyze sedimentované bakteriální pelety pufrům obsahujícím SDS, který se následně neutralizuje, vzniklá směs se přefiltruje a filtrát se aplikuje na equilibrovanou kolonu, kde dochází k záchytu plazmidu. Vysrážená plazmidová DNA se centrifuguje (10 000rpm, 20 min., 4°C), opakovaně promyje 70% ethanolem a po vysušení se peleta rozpustí ve vhodném objemu TE-pufru. 10x koncentrovaný TE-pufr obsahuje 10mM Tris zásady (Sigma T1503) s upraveným pH na 8,0 pomocí HCl a 1mM EDTA (Sigma E26282). Ve výsledném roztoku změříme koncentraci a čistotu na spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.1.4.3 Purifikace plazmidové DNA

Kvalita a čistota plazmidové DNA a nukleových kyselin obecně se zjišťuje spektrofotometricky. Pro dvouvláknovou molekulu DNA platí, že hodnota absorpance při 260nm rovna 1 odpovídá přibližně koncentraci 50µg/ml. Dále se sleduje hlavně poměr absorbancí 260/280nm, který vyjadřuje míru znečištění proteiny, neboť aromatické aminokyseliny tyrozin, tryptofan a fenylalanin mají vysokou absorpaci při 280nm. Hodnota poměru 260/280 pro čistý vzorek by měla být 1,8 a vyšší. Platí, že i při hodnotě poměru 1,8 vzorek obsahuje kolem 50 % proteinů. Tato poměrně značná kontaminace se však toleruje vzhledem k faktu, že proteiny obvykle nejsou problémem pro transfekce ani jiná měření, na rozdíl od např. endotoxinů. Nezanedbatelnou roli má také poměr absorbancí

260nm/230nm, kde v oblasti kolem vlnové délky 230nm mají svá absorpční maxima látky jako fenolátový ion, thiokyanáty a různé organické látky. Pokud je hodnota poměru 1,8 a vyšší, lze vzorek považovat za čistý.

4.1.4.4 Purifikace směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol

Tento protokol je určen především k purifikaci roztoků nukleových kyselin s vysokým obsahem proteinů. Protokol je poměrně jednoduchý. Roztok plazmidové DNA smísíme se stejným objemem směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1), důkladně zvortexujeme a zcentrifugujeme při 14000rpm po dobu 5 minut, čímž dojde k oddělení dvou vrstev. Horní vodnou fázi obsahující plazmidovou DNA opatrně přeneseme do čisté zkumavky a přidáme 1/10 objemu 3M octanu sodného (CH₃COONa). Srážení plazmidové DNA dosáhneme přikapáváním ledově vychlazeného ethanolu (99%). Celou směs řádně promícháme na vortexu a zcentrifugujeme (14000rpm, 5 min.). Sraženinu plazmidové DNA následně promyjeme dvěma podíly 70% ethanolu. Nakonec zkumavku s peletou necháme stát několik hodin ve flowboxu a po dokonalém vysušení peletu rozpustíme ve vhodném objemu TE pufru.

4.1.4.5 Odstranění endotoxinů

Plazmidová DNA izolovaná z bakterií je často znehodnocena vysokým obsahem endotoxinů (lipopolysacharidů) pocházejících z buněčných stěn Gram-negativních bakterií. Bylo popsáno, že endotoxiny významně ovlivňují účinnost transfekce.^(Weber et al., 1995)

K odstranění endotoxinů byl použit produkt firmy Sigma-Aldrich - Endotoxin Removal solution (E4274), jehož hlavní složkou je Triton X-

114. Vlastnosti tohoto detergentu ve vodných roztocích jsou výrazně závislé na teplotě. Při nízkých teplotách detergent vytváří průzračný micelární roztok, no nad teplotou bodu zakalení micely formují větší a hustší agregáty a s amfifilními molekulami lipopolysacharidů následně vytvoří oddělenou fázi, zatímco hydrofilní molekuly zůstanou ve vodní vrstvě. Jeho účinek spočívá v měnících se vlastnostech detergentu s měnící se teplotou. Protokol je velmi podobný purifikaci směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol. Do zkumavky napipetujeme definovaný objem roztoku plazmidové DNA, přidáme desetinu objemu 3M octanu sodného a směs inkubujeme 5 minut na ledu. Pak přidáme pětinu původního objemu Endotoxin Removal solution, intenzivně zvortexujeme a inkubujeme 10 minut na ledu. Po inkubaci na ledu následuje půlhodinová inkubace při 37°C, po níž je patrné oddělení dvou fází. Pro dokonalé oddělení se zkumavka se směsí ještě zcentrifuguje po dobu 5 minut při 3000g. Horní vrstvu obsahující plazmidovou DNA opatrně odpipetuje do čisté zkumavky, znovu přidáme Endotoxin Removal solution a dále postupujeme dle předchozího protokolu. Plazmidovou DNA vysrážíme z 2x přečištěné horní vrstvy směsí přísádkem 2,5-násobného množství ledově vychlazeného 99% ethanolu. Směs důkladně zvortexujeme, necháme stát 15min. v mrazáku a centrifugujeme (14000rpm, 30 min., 4°C). Peletu promyjeme 70% ethanolem a po vysušení na vzduchu rozpustíme v TE pufru.

4.1.4.6 Restrikční štěpení

Celistvost plazmidu po izolaci nebo purifikačních procedurách standardně ověřujeme restrikčním štěpením. Tato technika spočívá v inkubaci plazmidu s vhodnou restrikční endonukleasou, která ho rozštěpí ve specifických místech. Výsledkem restrikce je směs fragmentů definované velikosti, což lze snadno ověřit pomocí elektroforézy. Pro restrikční analýzu plazmidu pCasper3-GR byla

zvolena endonukleáza *PvuII*, která rozpoznává a specificky štěpí sekvenci 5'...CAG^{*}CTG...3', kde vytváří nelepivé konce - molekuly DNA jsou ukončeny párem bází, ne vláknem nespárovaných nukleotidů, jak je tomu u lepivých konců. Plazmid pCasper3-GR obsahuje celkem 3 místa pro *PvuII*, což signalizuje vznik 3 fragmentů po restrikční analýze. Vlastní analýza spočívá v inkubaci definovaného množství plazmidové DNA s odpovídajícím počtem jednotek restrikční endonukleasy na vodní lázni vyhřáté na 37°C po dobu 1 hod. Poté se restrikční směs podrobí elektroforetické separaci.

4.1.4.7 Příprava gelu a elektroforetická separace

K ověření úspěšnosti restrikční analýzy se standardně využívá elektroforéza na agarosovém gelu. 1% agarosový gel připravíme povařením 1g práškové agarosy (Serva, Germany) ve 100ml TBE (Tris/Borate/EDTA; Duchefa, Netherland) pufru. Směs poté zchladíme pod proudem studené vody na teplotu cca 50°C a přidáme vizualizační barvičku ethidium bromid o výsledné koncentraci 5µg/ml. Po zamíchání do gelu se ještě za tepla daná směs nalívá do připravené elektroforetické vany s hřebínkem pro vytvoření jamek a nechá se utuhnout. Ztuhlý gel následně převrstvíme TBE puftrem, nanese vzorky do jamek a elektroforézu necháme běžet 2-3 hod. při 100V. Pro přesné určení molekulové hmotnosti fragmentů po restrikci se do jedné jamky přidává tzv. marker (žebřík), což je v podstatě roztok oligonukleotidů o různé, přesně definované molekulové hmotnosti. Dále se do všech vzorků přidává tzv. loading buffer, který obsahuje kromě jiných složek i trypanovou modř, aby bylo jasně vidět elektroforetické čelo i ve viditelném světle. Po ukončení elektroforézy prohlédneme gel pod transluminátorem a pořídíme fotografii pomocí kamery Kodak Gel Logic 1500 (Carestream Health, USA)

4.1.5 Elektroporace

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům lipofekce (klesající exprese fluorescenčního proteinu a vysoká mortalita pozitivních klonů) jsme zkoušeli k transfekci využít metodu elektroporace. Z časových důvodů byla elektroporace testována pouze na linii A549 a plazmidu pCasper3-GR. Nevýhodou této metody je vysoká úmrtnost (kolem 50%), vysoké požadavky na množství buněk i plazmidu jako i potřeba jeho linearizace. Na rozdíl od lipofekčních technik je v případě elektroporace vhodnější použít linearizovaný plazmid, který snáz proniká póry v plazmatické membráně a také pravděpodobnost jeho inkorporace do genomu je vyšší. Linearizace plazmidu lze docílit působením vhodné restriční endonukleázy, která je pro daný plazmid jedinečná, tzn. že plazmid nese pro tuto endonukleasu jen jedno restriční místo. V tomto případě byla použita endonukleasa *AseI*, která má jen jedno restriční místo a to na 7. pozici od počátku. Protokol spočívá ve smíchání roztoku plazmidové DNA, dané restriční endonukleázy v pufru a následné inkubaci při 37°C po dobu 1 hodiny. Poté je vhodné *Ase I* tepelně inaktivovat zahřátím na 65°C po dobu 20 minut.

Vlastní proces elektroporace provádíme smícháním restriční směsi obsahující linearizovaný plazmid s buněčnou suspenzí v poměru 1:1 v elektroporační kyvetě, kterou po krátkodobé (15 min.) inkubací na ledu podrobíme výboji elektrického proudu (250V, 960 μ F). Poté přeneseme směs z kyvety do 1 ml předeřátého kultivačního media a umístíme do inkubátoru. Po 10 minutách přeneseme obsah zkumavky do kultivační lahve obsahující nadbytek media. Vzhledem k hrubému narušení homeostázy se dá předpokládat vysoká úmrtnost buněk, proto se k elektroporaci používají řádově miliony buněk. Aby bylo dosaženo maximální účinnosti elektroporace, je nutné použít větší množství plazmidu, obvykle 50-100 μ g.

4.2 Výsledky

4.2.1 Optimalizace lipofekce

Optimalizace lipofekce byla provedena podle schématu uvedeného v kapitole 4.2 (Obr. 9)

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 3 Výsledky optimalizace transfekce pomocí reagentie JetPRIME™. Výsledky jsou vztaheny ke schématu na Obr. 9. První číslo udává procentuální zastoupení buněk vykazujících fluorescenci,

	1	2	3	4
A	0,28/40	0,26/60	0,28/90	0,51/40
B	0,38/40	1,53/30	1,02/30	5,10/30
C	1,46/70	1,70/30	3,40/60	10,20/40

druhé číslo udává konfluenci.

Z tabulky jasně vyplývá, že nejideálnější poměr plazmid/reagentie je 1:4. Zvýšení poměru již nevedlo k vyšší efektivitě transfekce. Poměr objemu transfekčního pufru k množství DNA je doporučen výrobcem na 100:1. Všechny další lipofekční transfekce i s použitím dalšího typu plazmidu pmKate2-Actin, kde byly výsledky téměř stejné, byly na základě zjištěných údajů prováděny v tomto poměru.

Po nalezení optimálního složení lipofekční směsi byl zkoumán vliv dalších parametrů na účinnost transfekce a to doba působení transfekční suspenze na buňky, vliv média na efektivitu a vliv teploty.

První pokus byla aplikace transfekční suspenze přímo do média, kde maximální efektivita byla 50%. Zkusil jsem tedy odsát médium před aplikací a dát tam po jisté době čerstvé. Výsledkem bylo mírné zvýšení efektivitě na cca 60% a to i u menších objemů plazmidu, no poměr plazmid/reagentie musel být zachován na 1:4.

Jako další experiment jsem zkusil vrátit jim původní médium, které již obsahovalo jejich růstové faktory. Efektivita se dle očekávání

zvedla na cca 70%.

Optimální čas expozice buněk transfekční suspenzí jsem vícerymi experimenty stanovil na 5 minut. Při vyšším expozičním čase se exponenciálně zvyšovala úmrtnost, pravděpodobně kvůli hypotermii a nutriční deprivaci. Při nižším expozičním čase klesala efektivita transfekce.

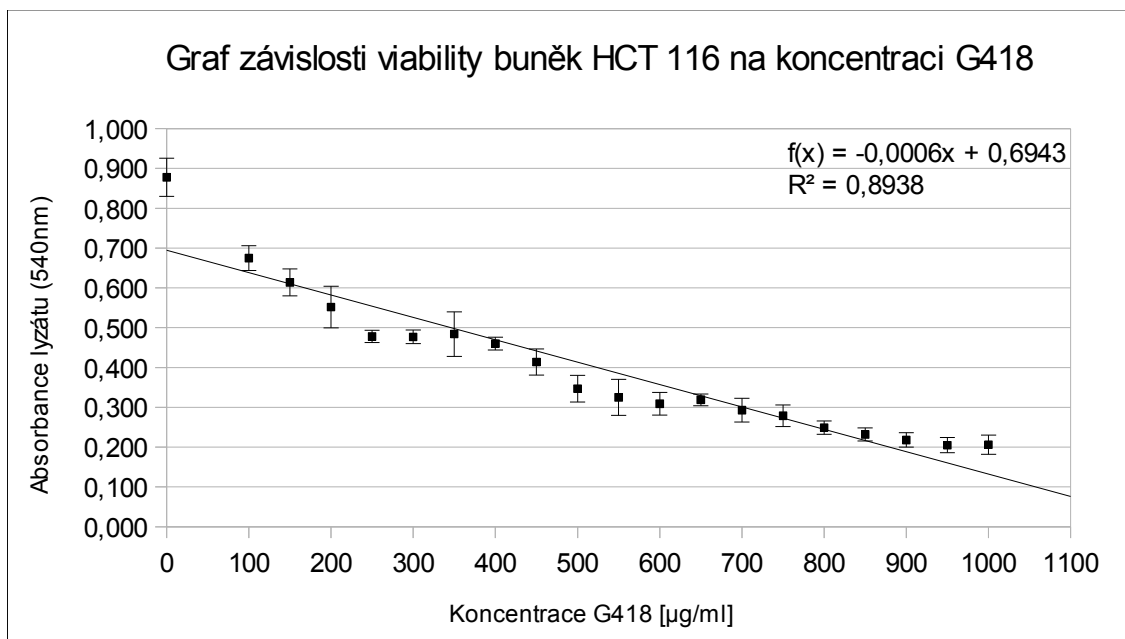
Vliv snížení teploty byl znatelný, buněčný stres po vhodné dobu se mohl projevit i snížením negativního náboje membrány a to mohlo zvýšit transfekční účinnost.

4.2.2 Selekcce

4.2.2.1 Chemická selekcce

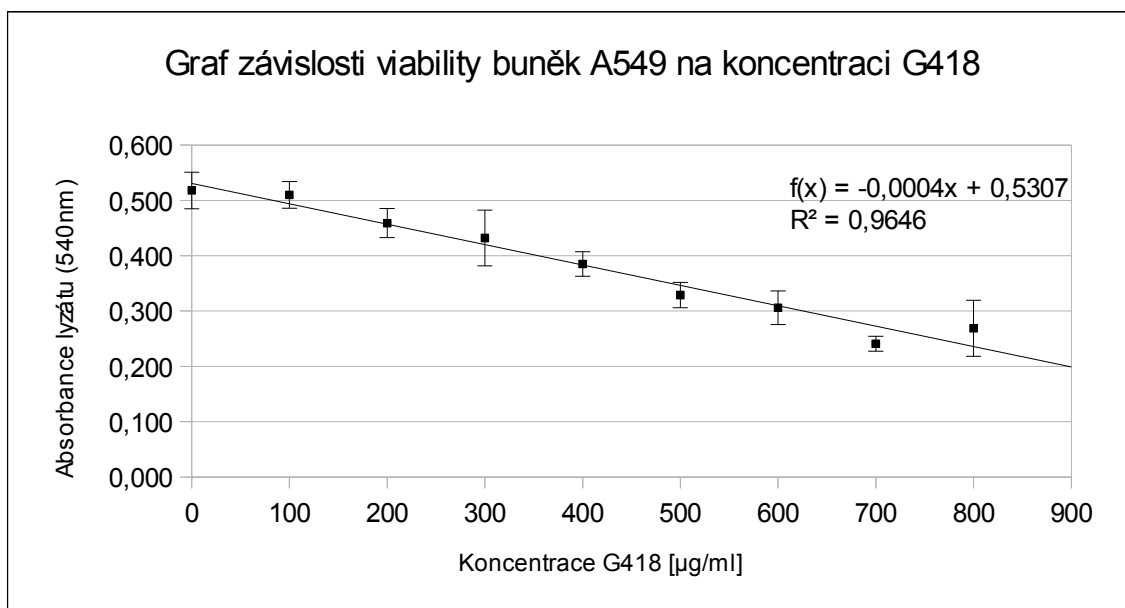
Citlivost testovaných buněčných linií ke G418 byla zjištěna pomocí MTT testů, kterých výsledky jsou uvedeny v následujících grafech. (Graf 1 a 2) Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z regresní rovnice přímky dosazením poloviční hodnoty absorbance kontroly.

Graf 1 Vliv G418 na proliferaci a viabilitu buněčné linie HCT 116. Citlivost buněčné linie HCT 116 vůči G418 byla stanovena pomocí MTT testu, jak je popsáno v kapitole 4.1.6. Každá koncentrace byla změřena v 5ti opakováních. Naměřené hodnoty absorbancí byly fitovány pomocí lineární regrese. Rovnice regresní přímky a regresní koeficient jsou zobrazeny.



$IC_{50} = 425,5\mu\text{g/ml}$.

Graf 2 Vliv G418 na proliferaci a viabilitu buněčné linie A549. Citlivost buněčné linie A549 vůči G418 byla stanovena pomocí MTT testu, jak je popsáno v kapitole 4.1.6. Každá koncentrace byla změřena v opakováních. Naměřené hodnoty absorbancí byly fitovány pomocí lineární regrese. Rovnice regresní přímky a regresní koeficient jsou zobrazeny.

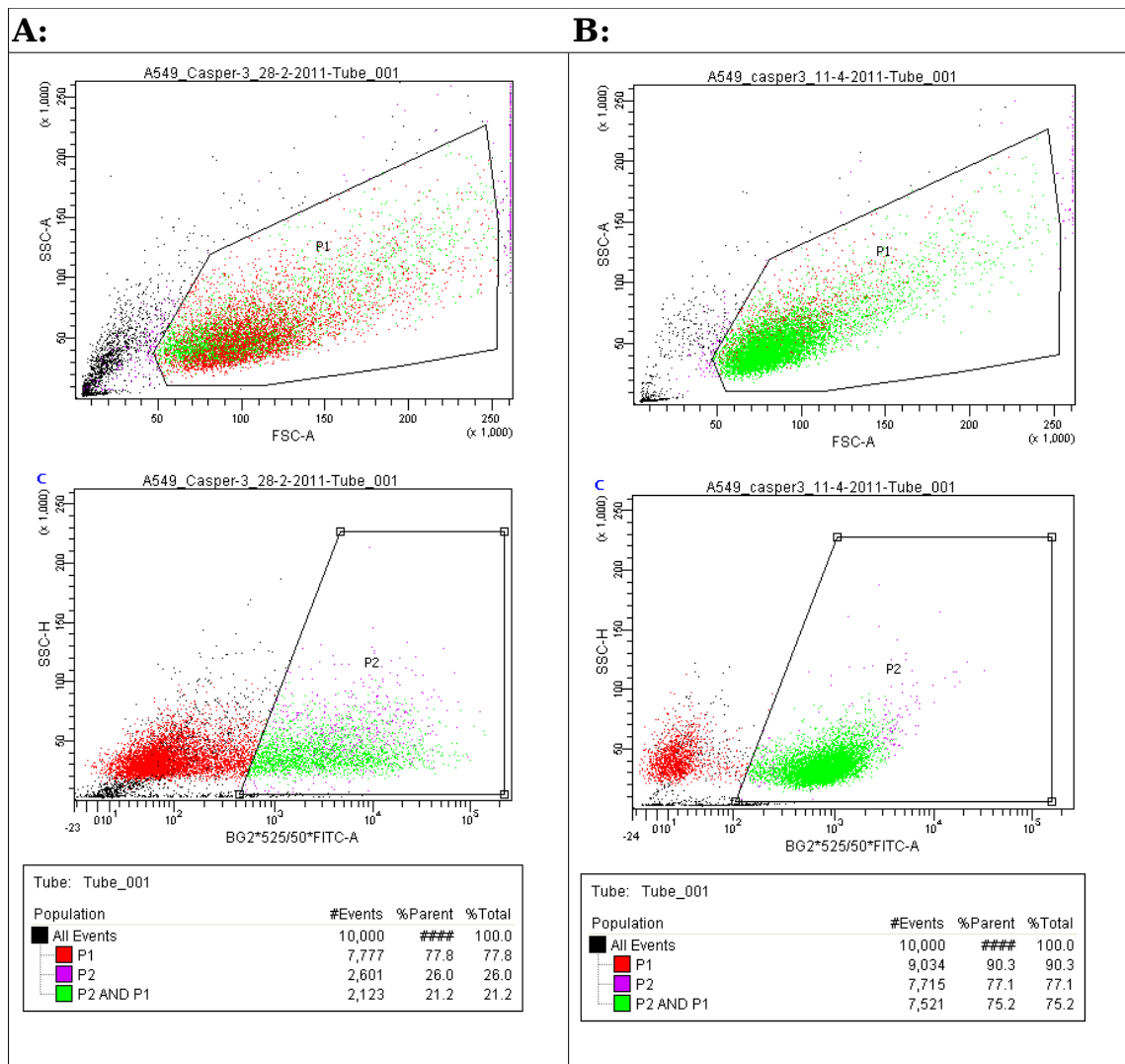


$IC_{50} = 1211\mu\text{g/ml}$.

Z výsledků vyplývá, že citlivost použitých buněčných linií vůči G418 je různá. Zajímavý je i rozdíl v trendu křivek koncentrační závislosti. Zatímco v případě linie A549 je závislost prakticky lineární, u linie HCT 116 je na křivce patrné plató v oblasti koncentrací 250, resp. 600 μ g/ml.

4.2.2.2 Fyzikální selekce

Chemická selekce antibiotiky není dostatečně účinná a po delší době dochází k indukci chemorezistenci, proto byla vhodně kombinována s fyzikální selekcí využitím sortovacího zařízení průtokového cytometru. Postupné vyselektování populace buněk A549 stabilně exprimujících pCasper3-GR znázorňuje obrázek 10.



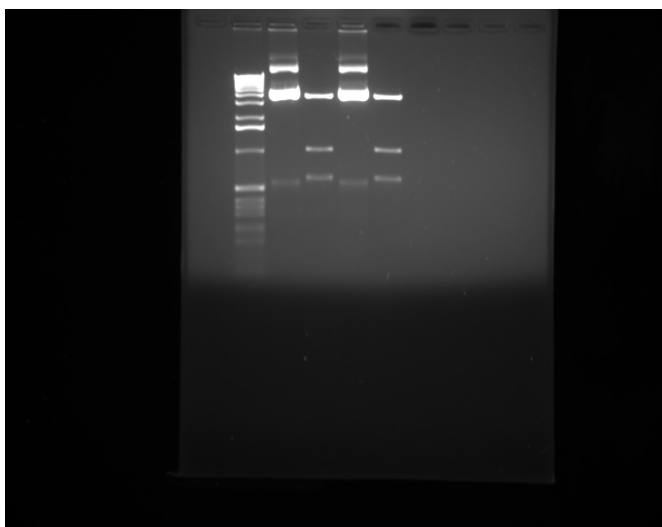
Obř. 10 Selekcce buněk A549 exprimujících pCasper3-GR. **A:** Profil populace A549 buněk 3 dny po selekcii G418. Buňky spadající do oblasti P1 a zároveň P2 byly sortovány do 6-ti jamkového panelu a dále kultivovány pod selekčním tlakem G418. **B:** Profil populace A549 buněk 10 dní po sortingu. Buňky spadající do průniku oblastí P1 a P2 byly sortovány do 96-ti jamkového panelu v režimu 1 buňka na jamku. Z panelu A je patrná značná heterogenita buněčné populace, která se ztrácí po sortování a další selekcii G418, kdy je možné jednoznačně odlišit populaci pozitivních a negativních buněk.

4.2.3 Ověření plazmidu restriční štěpením

Po inkubaci se specifickou restriční endonukleasou a následném rozdělení fragmentů elektroforézou, lze na gelu pozorovat směs fragmentů o různé molekulové hmotnosti, u kterých lze snadno pomocí markeru (žebříku) stanovit velikost. Mnou

provedené restriční štěpení plazmidu pCasper3-GR je zobrazeno na fotce gelu (Obr. 10). Nadávkováno bylo 5 vzorků (zleva doprava):

1. marker
2. pCasper3-GR vzorek 1 neštěpený
3. pCasper3-GR vzorek 1 štěpený
4. pCasper3-GR vzorek 2 neštěpený
5. pCasper3-GR vzorek 2 štěpený

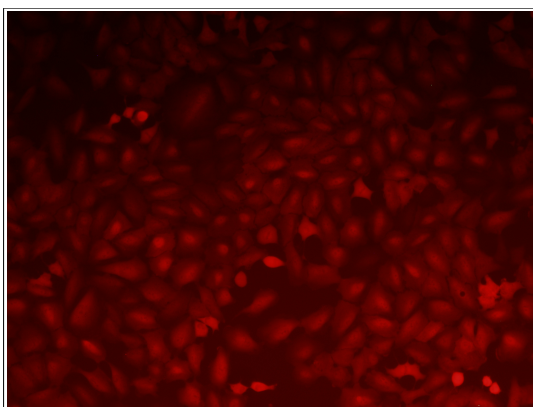


Obr. 11 Fotka gelu pod UV světlem po restričním štěpení plazmidu pCasper3-GR.

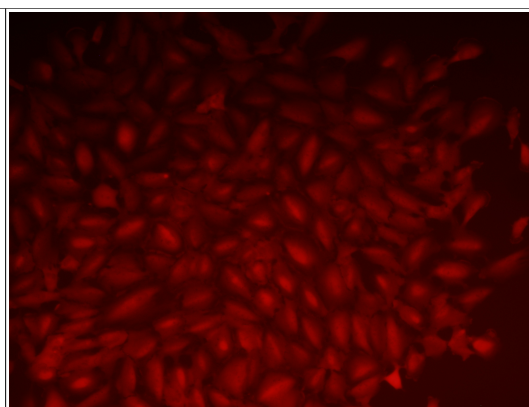
Z fotografie vyplývá, že na gelu jsou separovány jen 3 očekávané fragmenty o předpokládané molekulové hmotnosti z čehož lze usuzovat, že připravené a přečištěné plazmidy vykazují dostatečnou čistotu a integritu. V zóně komprese se nachází proužek odpovídající zbytku bakteriální genomické DNA.

4.2.4 Stabilní klony A549 pCasper3-GR

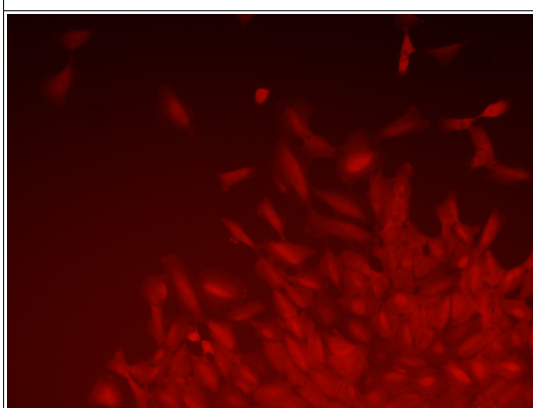
Postupnou chemickou i fyzikální selekcí bylo připraveno 7 klonů stabilních transfektantů linie A549 exprimujících pCasper3-GR (Obr. 12 - 19) vyobrazených na následující stránce. Označení definuje číslo panelu/jamku kde byl daný klon lokalizován.



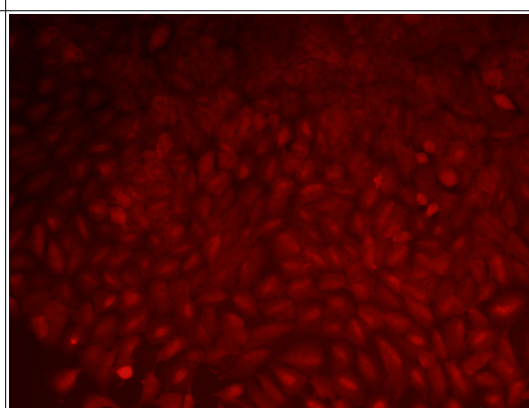
Obr. 12 Klon 1/D4 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace.



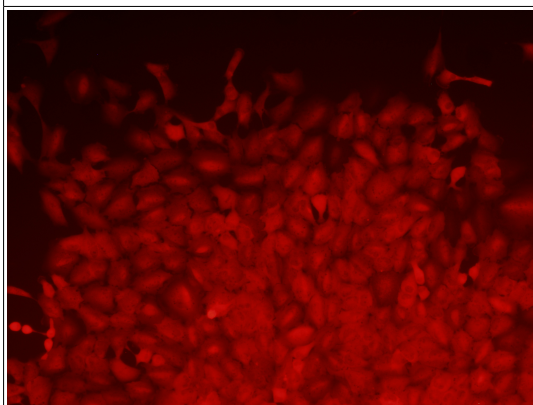
Obr. 13 Klon 1/G7 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace.



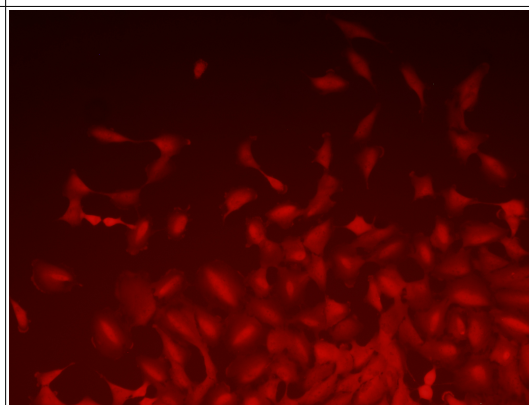
Obr. 14 Klon 2/E11 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace.



Obr. 15 Klon 3/B2 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace.

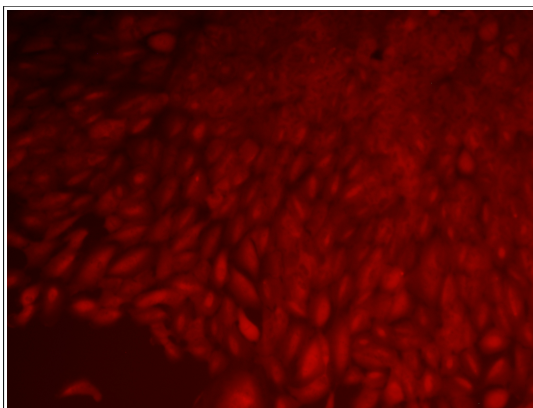


Obr. 16 Klon 4/H9 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace.

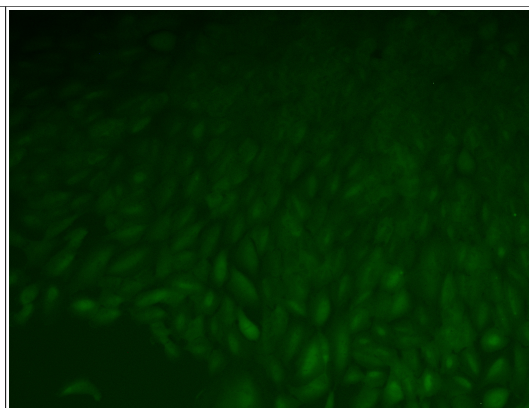


Obr. 17 Klon 6/C8 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace.

Vektor pCasper3-GR kóduje 2 fluorescenční značky - GFP i RFP.



Obr. 18 Klon 5/D8 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace - červený filtr.



Obr. 19 Klon 5/D8 linie A549 transfekované vektorem pCasper3-GR pomocí elektroporace - zelený filtr.

5. Diskuze

V předložené práci je řešena problematika přípravy geneticky modifikovaných buněčných linií odvozených od lidských modelových karcinomů využitím transfekce a dále optimalizací různých metod transfekce. Zásadní problémy, s nimiž jsem se potýkal, spočívaly v nízké persistenci lipofekce a vysoké mortalitě transfekovaných buněk. Procento pozitivních buněk se snižovalo až na polovinu průměrně každé 3 dny a to buď v důsledku apoptózy buněk, nebo vypnutí exprese reportérového fluorescenčního proteinu. Daný problém se vyskytoval u všech transfekovaných buněčných linií v případě, že byl použit plazmid nesoucí gen pro fluorescenční značku pm-Kate2. V literatuře lze nalézt možné vysvětlení tohoto problému. Bylo popsáno, že červený fluorescenční protein vykazuje jistou cytotoxicitu a fototoxicitu.^(Strack et. al., 2009) Fototoxický stres byl indukován jednak prostým pozorováním buněk na fluorescenčním mikroskopu, ale především sortováním buněk na průtokovém cytometru při selekci. Již na druhý den po sortování byla v panelech pozorovatelná masivní apoptóza, a to hlavně v případě linie HCT 116,

u níž dochází k indukci apoptózy patrně v důsledku zvýšené exprese genu NAG-1(NSAID activated gene-1; NSAID = Non-steroidal anti-inflammatory drug).^(Kim et al., 2002) Příklad přidavek antioxidantu N-acetylcysteinu (výsledná koncentrace 1mM) do média 24h před sortováním nevedl k vyššímu přežití buněčné populace.

Vzhledem k pozorovanému chování linie HCT 116 po transfekci vektory nesoucími pm-Kate2 a nemožnosti další selekce byly veškeré experimenty s touto linií záhy ukončeny. Podobné vlastnosti ovšem vykazovala také linie U-2 OS, takže byla převážná část transfekcí omezena na linii A549. Jedním z klíčových parametrů selekce je zvolení vhodné koncentrace selekčního antibiotika (G418). Zatímco příliš vysoké koncentrace jsou toxické i pro pozitivní buňky, příliš nízké zase dovolují přerůstání negativních buněčných klonů. Pomocí MTT testu byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro jednotlivé buněčné linie. Ve většině případů byla pro selekce zvolena koncentrace 400 μ g/ml, jež je v dobré shodě s doporučením výrobce, který zároveň uvádí, že maximální účinnosti G418 je dosaženo při konfluenci do 25 %.^(IvivoGen, 2010) Kultivace buněk v přítomnosti selekčního antibiotika byla omezena na relativně krátkou dobu vzhledem k možné indukci chemorezistence a dále byla využívána již výhradně selekce pomocí průtokové cytometrie.

Paralelně s pm-Kate2 vektory byly prováděny také transfekce vektorem pCasper3-GR, který nese cílovou sekvenci pro kaspasu-3 fúzovanou na jednom konci s červeným a na druhém se zeleným fluorescenčním proteinem. Lipofekční techniky poskytovaly nadějně výsledky, avšak vzhledem k vysoké heterogenitě získané populace a vypínání exprese reportérů byla následná selekce příliš zdlouhavá. K úspěšnému cíli vedlo až využití elektroporace, kde bylo dosaženo dlouhodobé persistence exprese fluorescenčních proteinů a kombinací fyzikální a chemické selekce se podařilo v relativně krátké době připravit celkem 7 klonů stabilních transfektantů.

Z časových důvodů již nebyla provedena validace těchto klonů.

6. Závěr

Cílem této práce bylo pokusit se připravit modifikované buněčné systémy odvozené od vybraných nádorových linií a získané klony následně validovat pomocí modelových protinádorových léčiv. U linie A549 se podařilo vyselektovat celkem 7 klonů stabilně exprimujících pCasper3-GR, avšak vzhledem k časové náročnosti celé procedury již nedošlo k jejich validaci. Dalším cílem této práce byla optimalizace transfekčních metod, kde jsem vyvinul vícero postupů, které vedou k zefektivnění lipofekce a rovněž jsem zjistil neschůdnost některých postupů, které měli vést k přípravě stabilních modifikovaných buněčných systémů.

7. Citace

1. ABRAHAM V. C.; TAYLOR D. L.; HASKINS J. R. High-content screening applied to large-scale cell biology, *TRENDS in Biotechnology*, 2004 Jan; vol. 22, no. 1 s. 15-22.
2. ANSON, D. S. 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*. 2004, vol. 2, no. 1, s. 9.
3. BAIRD, G. S.; ZACHARIAS, D. A.; TSIEN, R. Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral . *PNAS*. 2000, vol. 97, no. 22, s. 11984-11989 . Dostupný také z WWW: <<http://www.pnas.org/content/97/22/11984.full.pdf+htm>>.
4. BARLOGIE, B., et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer research*. 1983, vol. 43, no. 9, s. 3982-3997.
5. BEVIS, B. J.; GLICK, B. S. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology*. 2002, vol. 20, no. 1, s. 83-87. ISSN 1087-0156.

6. BOUSSIF, O., et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, vol. 92, no. 16, s. 7297-7301.
7. BURKHOLDER, J. K.; DECKER, J.; YANG, N. S. Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *Journal of immunological methods*. 1993, vol. 165, no. 2, s. 149-156.
8. DAVIS, B. R., et al. Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells. *Blood*. 2000, vol. 95, no. 2, s. 437-444. Dostupný také z WWW: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/95/2/437.full.pdf+html>>
9. DEBS, R. J., et al. Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. *The Journal of biological chemistry*. 1990, vol. 265, no. 18, s. 10189-10192.
10. DORVAL, T., et al. Contextual automated 3D analysis of subcellular organelles adapted to high-content screening. *Journal of Biomolecular Screening*. 2010, vol. 15, no. 7, s. 847-857.
11. DWARKI, V. J., et al. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Methods in enzymology*. 1993, vol. 217, no. 1, s. 644-654.
12. FARHOOD, H.; SERBINA, N.; HUANG, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995, vol. 1235, no. 2, s. 289-295.
13. FELGNER, J. H., et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *The Journal of biological chemistry*. 1994, vol. 269, no. 4, s. 2550-2561.
14. FELGNER, P. L., et al. Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *The New York Academy of Sciences*. 1995, vol. 772, no. 1, s. 126-139.
15. FELGNER, P. L., et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. 25. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987, vol. 84, no. 21, s. 7413-7417.
16. FRALEY, R., et al. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *The Journal of biological chemistry*. 1980, vol. 255, no. 21, s. 10431-10435.

17. GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene therapy*. 1995, vol. 2, no. 10, s. 710-722.
18. *GFP site*[online]. 2011 [cit. 2011-02-18]. Green Fluorescent Protein. Dostupné z WWW: <<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>>.
19. GLUZMAN, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *The Cell*. 1981, vol. 23, no. 1, s. 175-182.
20. GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*. 1973, vol. 54, no. 2, s. 536-539.
21. GROSKREUTZ, D.; SCHENBORN, E. T. Reporter gene vectors and assays. *Molecular Biotechnology*. 1999, vol. 13, no. 1, s. 29-44.
22. HAENSLER, J., ; SZOKA, F.C., Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate chemistry*. 1993, vol. 4, no. 5, s. 372-379.
23. HONG, L., et al. Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by down-regulation of ZNRD1 with ZNRD1 siRNA. *British journal of biomedical science*. 2004, vol. 61, no. 4, s. 206-210.
24. InvivoGen. *Www.invivogen.com* [online]. 06A11-SV. San Diego: InvivoGen, 2010 [cit. 2011-04-15]. G418 Sulfate. Dostupné z WWW: <http://www.invivogen.com/PDF/G418_TDS.pdf>.
25. KABANOV, A. V.; KABANOV, V. A. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjugate chemistry*. 1995, vol. 6, no. 1, s. 7-20.
26. KAWAI, S.; NISHIZAWA, M. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Molecular and cellular biology*. 1984, vol. 4, no. 6, s. 1172-1174.
27. KIM, K. S., et al. Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue. *Gastroenterology*. 2002, vol. 122, no. 5, s. 1388-1398. Dostupný také z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WFX-45XTG3S-X-1&_cdi=6806&_user=990403&_pii=S001650850233419X&_origin=gateway&_coverDate=05%2F31%2F2002&_sk=998779994&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWb&md5=c192a3ba81a3f868b4f79e7feb3273d5&ie=/sdarticle.pdf>.

28. LE GOFFIC, F., et al. Mechanism of action of aminoglycoside antibiotics. Binding studies of tobramycin and its 6. *European journal of biochemistry : FEBS*. 1979, vol. 102, no. 1, s. 73-81. Dostupný také z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1979.tb06264.x/pdf>>.
29. LEDERBERG, J. Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological Reviews*. 1952, vol. 32, no. 4, s. 403-430.
30. LI, J., et al. Construction and functional analysis of a common gene targeting vector with double-selection markers. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao (Chinese journal of biotechnology)*. 2010, vol. 26, no. 12, s. 1696-1703.
31. LIN, Y. C.; LI, M.; WU, C. C. Simulation and experimental demonstration of the electric field assisted electroporation microchip for in vitro gene delivery enhancement. *Lab on a chip*. 2004, vol. 4, no. 2, s. 104-108.
32. LOYTER, A., et al. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells : Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Experimental cell research*. 1982, vol. 139, no. 1, s. 223-234.
33. MATZ, M.V., et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*. 1999, vol. 17, no. 10, s. 969-973. ISSN 1087-0156.
34. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983, vol. 65, no. 1-2, s. 55-63.
35. PRENDERGAST, F. G.; MANN, K. G. Chemical and Physical Properties of Aequorin and the Green Fluorescent Protein Isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry*. 1978, vol. 17, no. 17, s. 3448-3453. Dostupný také z WWW: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00610a004>>.
36. SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*. 3rd Edition. [s.l.] : Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 999 s. ISBN 0879695773.
37. SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of lipid research*. 1968, vol. 9, no. 3, s. 310-318.
38. SHIGEKAWA, K.; DOWER, W. J. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques*. 1988, vol. 6, no. 8, s. 742-751.

39. SHIMOIKE, T., et al. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of virology*. 1999, vol. 73, no. 12, s. 9718-9725.
40. SINKOVICS, J.; HARVATH, J.; HORAK, A. The Origin and evolution of viruses (a review). *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 1998, vol. 45, no. 3-4, s. 349-390. ISSN 1217-8950.
41. STRACK, R. L., et al. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *BMC Biotechnology*. 2009, vol. 9, no. 32, s. -. Dostupný také z WWW: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6750-9-32.pdf>>. ISSN 1472-6750.
42. TERSKIKH, A. V., et al. Analysis of DsRed Mutants : Space around the fluorophore accelerates fluorescence development. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, vol. 277, no. 10, s. 7633-7636. Dostupný také z WWW: <<http://www.jbc.org/content/277/10/7633.full.pdf+html>>.
43. VAHERI, A.; PAGANO, J. S. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*. 1965, vol. 27, no. 3, s. 434-436 .
44. VEJRAŽKA, M. Bunečné kultury. In *Přednášky* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2007 [cit. 2011-04-12]. Dostupné z WWW: <<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>>.
45. VORBURGER, S. A.; HUNT, K. K. Adenoviral gene therapy. *The Oncologist*. 2002, vol. 7, no. 1, s. 46-59.
46. WAMPLER, J. E. *Bmb.uga.edu* [online]. University of Georgia (Athens): Department of Biochemistry and Molecular Biology, c1997 [cit. 2011-02-23]. Renilla Green Fluorescent Protein: Discovered and Identified by Function. Dostupné z WWW: <<http://www.bmb.uga.edu/wampler/biolum/gfp/>>.
47. WOLFF, J. A., et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990, vol. 247, no. 4949 (Pt. 1), s. 1465-1468.
48. WONG, T. K.; NEUMANN, E. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1982, vol. 107, no. 2, s. 584-587.
49. YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS, JR. G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 1996, no. 14, s. 1246 - 1251.

50. YE, G. N.; DANIELL, H.; SANFORD, J. C. Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant molecular biology*. 1990, vol. 15, no. 6, s. 809-819.
51. ZIMMER, M. *Conncoll.edu* [online]. 2008, 1-Feb-2011 [cit. 2011-02-23]. Green Fluorescent Protein (GFP). Dostupné z WWW: <<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>>.