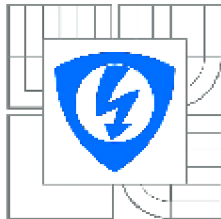


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ÚČINKY TRYPSINU NA MEMBRÁNY BUNĚK HEK293

EFFECTS OF TRYPSIN TO HEK293 CELL MEMBRANE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

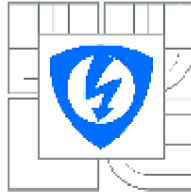
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

SOŇA LIPNICKÁ

VEDOUČÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Soňa Lipnická
Ročník: 3

ID: 147466
Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

Účinky trypsinu na membrány buněk HEK293

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se se vznikem a využitím trypsinu. Dále prostudujte jeho vliv na buněčné membrány. 2) Sestavte literární rešerši na dané téma. 3) Navrhněte metodiku pro studium vlivu trypsinu na membrány buněčných linií HEK293. Zaměřte se na objektivnost a reprodukovatelnost testů. 4) Navržený postup důkladně otestujte na transfekované i čisté linii HEK293. 5) Vytořte doporučení pro nejvhodnější koncentraci a dobu použití trypsinu při kultivacích buněčných linií. 6) Dosažené výsledky řádně zpracujte a okomentujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] BAUMANN, Heinz a Darrell DOYLE. Effect of trypsin on the cell surface proteins of hepatoma tissue culture cells. Characterization of a carbohydrate-rich glycopeptide released from a calcium binding membrane glycoprotein. *Journal of Biomedical Chemistry*. 1979, č. 54, s. 3935-3946.

[2] WALSH, K.A. [4] Trypsinogens and trypsins of various species. *Methods in Enzymology*. 1970, č. 19, s. 41-63. DOI: 10.1016/0076-6879(70)19006-9.

Termín zadání: 9.2.2015

Termín odevzdání: 29.5.2015

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel
Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je věnována vlivu trypsinu na membrány buněčných kultur. K optimalizaci byly vybrány buněčné linie HEK293 netransfekované a buněčné linie stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$, které byly postupně vystaveny účinku 0,25; 0,375 a 0,5 % trypsinu. Jeho koncentrace ovlivňuje nejen odlučování adherovaných buněk na podloží, ale také degradaci buněčných membrán, což ovlivňuje viabilitu buněčných kultur.

Součástí této práce je vytvoření metodiky pro studium vlivu trypsinu na membrány buněčných linií HEK293.

Klíčová slova

Trypsin, HEK293, membránový kanál $Ca_v3.1$, kultivace a pasážování.

ABSTRACT

This Bachelor's thesis examines the effect of trypsin on the membranes of cell cultures. HEK293 cell lines nontransfected and cell lines stably transfected through the $Ca_v3.1$ membrane channels were selected for the optimization. They were gradually exposed to 0.25, 0.375 and 0.5 % trypsin. The concentration of trypsin influences the separation of the adherent cells on structure, as well as the degradation of cell membranes, which influences the cell cultures viability.

Part of this thesis is an attempt to establish a methodology for the research of the effect of trypsin on membranes of HEK293 cell lines.

Keywords

Trypsin, HEK293, membrane channel $Ca_v3.1$, cultivation and passaging.

Bibliografická citace práce

LIPNICKÁ, S. *Účinky trypsinu na membrány buněk HEK293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Účinky trypsinu na membrány buněk HEK293 jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce panu Ing. Vratislavovi Čmielovi a panu Ing. Ondřejovi Svobodovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Obsah

1	Úvod.....	1
2.	Teoretická část	2
2.1	Proteolytické enzymy	2
2.1.1	Charakteristika trypsinu	3
2.1.2	Aktivace trypsinu	3
2.1.3	Inhibice trypsinu.....	5
2.1.4	Využití trypsinu.....	7
2.2	Buněčné kultury.....	9
2.2.1	Buněčné linie.....	9
2.2.2	Buněčný růst.....	11
2.2.3	Kultivace buněk.....	13
2.2.4	Pasážování buněk	15
2.2.5	Viabilita buněk	15
2.2.6	Určení množství buněk.....	16
3.	Výsledky a diskuze	18
3.1	Materiál.....	18
3.2	Kultivace.....	19
3.3	Pasážování	19
3.4	Stanovení viability	21
4.	Závěr	34
	Použitá literatura	35

Seznam zkratek

EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	Fetalbovineserum
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HEK293	Human Embryonic Kidney 293

Seznam tabulek

Tab.1: Klasifikace proteolytických enzymů v Enzyme Nomenclature [1], [2]	2
Tab. 2: Proteolytické enzymy běžně používané v proteomice [1].....	8
Tab. 3: Čas, za který se začnou netransfekované buňky HEK293 odlepovat od podloží (min).....	20
Tab. 4: Čas, za který se začnou stabilně transfekované buňky HEK293 odlepovat od podloží (min) ..	20
Tab. 5: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v 3.1$ za použití 0,25 % trypsinu	22
Tab. 6: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v 3.1$ za použití 0,375 % trypsinu	23
Tab. 7: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v 3.1$ za použití 0,5 % trypsinu	24
Tab. 8: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,25 % trypsinu.....	26
Tab. 9: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,375 % trypsinu.....	27
Tab. 10: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,5 % trypsinu.....	28
Tab. 11: Tabulka s hodnotami viabilních a všech transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,25 % trypsinu	30
Tab. 12: Tabulka s hodnotami viabilních a všech transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,375 % trypsinu	30
Tab. 13: Tabulka s hodnotami viabilních a všech transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,5 % trypsinu	30
Tab. 14: Tabulka s hodnotami viabilních a všech netransfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,25 % trypsinu	31
Tab. 15: Tabulka s hodnotami viabilních a všech netransfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,375 % trypsinu	31
Tab. 16: Tabulka s hodnotami viabilních a všech netransfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,5 % trypsinu	31

Seznam obrázků

Obrázek 1: Aktivace zymogenů proteolytickým štěpením.....	4
Obrázek 2: A) Schéma krystalografické struktury trypsinu [18].....	5
B) Schéma krystalografické struktury chymotrypsin [19]	
Obrázek 3: Interakce trypsinu se svým inhibitorem [32]	6
Obrázek 4: Schéma mechanismu hydrolýzy serinovou proteázou [12], [21].....	7
Obrázek 5: Křivka buněčného růstu [6]	12
Obrázek 6: netransfekované buňky HEK293 po 48hod. inkubaci při použité koncentraci 0,25 % trypsinu.....	15
Obrázek 7: Závislost koncentrace trypsinu na průměrném čase, kdy se adherované buňky odpoutají od podloží.....	21
Obrázek 8: Snímky buněk transfekovaných za použití 0,25 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)	22
Obrázek 9: Snímky buněk transfekovaných za použití 0,375 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)	23
Obrázek 10: Snímky buněk transfekovaných za použití 0,5 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)	24
Obrázek 11: Závislost koncentrace trypsinu na počtu viabilních transfekovaných buněk.....	25
Obrázek 12: Závislost koncentrace trypsinu na počtu neviabilních transfekovaných buněk	25
Obrázek 13: Snímky netransfekovaných buněk za použití 0,25 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)	26
Obrázek 14: Snímky netransfekovaných buněk za použití 0,375 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)	27
Obrázek 15: Snímky netransfekovaných buněk za použití 0,5 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)	28
Obrázek 16: Závislost koncentrace trypsinu na počtu viabilních netransfekovaných buněk	29
Obrázek 17: Závislost koncentrace trypsinu na počtu neviabilních netransfekovaných buněk	29
Obrázek 18 : Závislost viability buněk HEK293 transfekovaných a netransfekovaných na koncentraci trypsinu.....	32
Obrázek 19 : Závislost 0,25 % koncentrace trypsinu na počtu buněk (viabilních netransfekovaných, viabilních transfekovaných, neviabilních netransfekovaných a neviabilních transfekovaných).....	33

1 Úvod

Enzymy jsou biologicky aktivní látky, produkované žlázami trávicí soustavy. Mají významnou úlohu v chemickém procesu trávení potravy. Pracují jako biokatalyzátory (urychlovače), které rozkládají velké molekuly jídla (bílkoviny, lipidy, sacharidy) na dostatečně malé jednotky (aminokyseliny, mastné kyseliny, glukózu), které organismus dokáže vstřebat. Podle toho, jaké molekuly štěpí, je dělíme na proteolytické, lipolytické a sacharolytické.

Proteolytické enzymy rozkládají bílkoviny (proteiny) potravy na peptidy až jednotlivé aminokyseliny a zajišťují jejich vstřebání a využití v organismu. Trypsin je proteolytický enzym, který fyziologicky umožňuje štěpení a vstřebávání vzniklých fragmentů z tenkého střeva.

Buněčná membrána obsahuje velké množství proteinů, typicky kolem 50 % membránového objemu. Tyto proteiny jsou pro buňku důležité, protože jsou odpovědné za různé biologické aktivity. Buněčná membrána je vystavena vnějšímu prostředí a je důležitým místem pro mezibuněčnou komunikaci. Existuje velké množství proteinových receptorů a identifikačních proteinů, jako jsou antigeny, které jsou přítomné na povrchu membrány. Trypsin jakožto proteolytický enzym tak může tyto membránové proteiny degradovat a tím ovlivnit celkový stav buňky.

Cílem této práce je prostudovat vliv trypsinu na membrány buněčných linií HEK293 a vyhodnotit jeho nejvhodnější koncentraci a dobu použití při kultivacích.

2. Teoretická část

2.1 Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy uvádí katalog Enzyme Nomenclature [1], který aktualizuje a vydává názvoslovný výbor při IUBMB. Proteasy jsou klasifikovány jako součást třídy 3- hydrolasy (celkem je šest enzymových tříd). Peptidasy tvoří podtřídu 3, 4 – hydrolasy působící na peptidové vazby. V rámci této podtřídy pak rozlišujeme celou řadu podtříd (Tab. 1), kde nalezneme i náš studovaný trypsin.

Tab.1:Klasifikace proteolytických enzymů v Enzyme Nomenclature [1], [2]

Endopeptidasy s dosud neznámým mechanismem katalýzy tvoří podpodtřídu EC 3.4.99.

Podpodtřída	Souhrnný název	Typický příklad	Poznámka
EC 3.4.11	aminopeptidasy	leucylaminopeptidasa, EC 3.4.11.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.1
EC 3.4.13	dipeptidasy	Glu-Gludipeptidasa, EC 3.4.13.7	zahrnuje i bývalé EC 3.4.3
EC 3.4.14	dipeptidylpeptidasy, tripeptidylpeptidasy	dipeptidyldipeptidasa I, EC 3.4.14.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.15	peptidyldipeptidasy	peptidyldipeptidasa A, EC 3.4.15.1	
EC 3.4.16	serinové karboxypeptidasy	karboxypeptidasa C, EC 3.4.16.5	zahrnuje i bývalé EC 3.4.12
EC 3.4.17	metalokarboxypeptidasy	karboxypeptidasa A, EC 3.4.17.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.2, EC 3.4.12
EC 3.4.18	cysteinové karboxypeptidasy	kathepsin X, EC 3.4.18.1	
EC 3.4.19	ω -peptidasy	pyroglutamylpeptidasa I, EC 3.4.19.3	zahrnuje i bývalé EC 3.4.12
EC 3.4.21	serinové endopeptidasy	trypsin, EC 3.4.21.4	
EC 3.4.22	cysteinové endopeptidasy	papain, EC 3.4.22.2	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.23	aspartátové endopeptidasy	pepsin A, EC 3.4.23.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.24	metaloendopeptidasy	thermolysin, EC 3.4.24.27	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.25	threoninové endopeptidasy	komplex endoproteinasproteasomu, EC 3.4.25.1	

2.1.1 Charakteristika trypsinu

Tělo člověka potřebuje stálý přísun aminokyselin pro růst a opravy. Proteiny jsou velmi odolné, proto se na jejich trávení účastní enzymy. Trávení proteinů začíná v žaludku, kde kyselina chlorovodíková rozkládá proteiny a kde enzym pepsin započne hrubé trávení proteinů. Intenzivnější trávení začíná v intestinu. V acinárních buňkách žlázy tvoří pankreas sekret, bohatý na enzymy, z nichž nejvýznamnější trypsin štěpí proteinové řetězce na řetězce obsahující jen několik aminokyselin. Poté enzymy produkované enterocyty tyto krátké řetězce štěpí až na jednotlivé aminokyseliny, které jsou využity pro potřeby organismu [3].

Trypsin patří mezi hydrolázy, přesněji do podskupiny serinových proteáz (EC 3.4.21). Je součástí trávicího traktu obratlovců a společně s chymotrypsinem trávicím enzymem ho můžeme nalézt v dvanáctníku. Podobně jako pepsin štěpí peptidické vazby bílkovin obsažených v potravě [4]. Byl objeven v roce 1876 Wilhelmem Kühnem v pankreatické šťávě jako první proteolytický enzym vůbec [5]. Trypsin (EC 3.4.21.4) se vyznačuje mírně alkalickým pH a striktní specifitou místa štěpení pro aminokyselinové zbytky lysinu a argininu [6], [7].

Trypsin je složen z 223 aminokyselin (AMK), jeho molekulová hmotnost činí 23,3 kDa a isoelektrický bod (pI) je 10,5 [8]. Ke své aktivaci potřebuje jako kofaktor vápenaté ionty a jeho aktivita je optimálně zachována při hodnotě pH 7-8 [9].

2.1.2 Aktivace trypsinu

Trypsin je středně velký lobulární protein, který je produkován ve formě prekurzoru neaktivního (zymogenu) trypsinogenu. Pokud by byl enzym syntetizován v aktivní formě, tkáň, která ho syntetizuje, by jím byla natrávena (důsledkem může být akutní pankreatitida) [9]. Zymogeny jsou skladovány v granulách zvaných zymogenní granula, která mají stěny odolné proti enzymovému rozkladu. Zymogeny trypsinu, chymotrypsinu a elastázy nejsou enzymaticky aktivní, ačkoli obsahují všechny potřebné katalytické skupiny, protože specifická kapsa zymogenů je nevhodně formována [10].

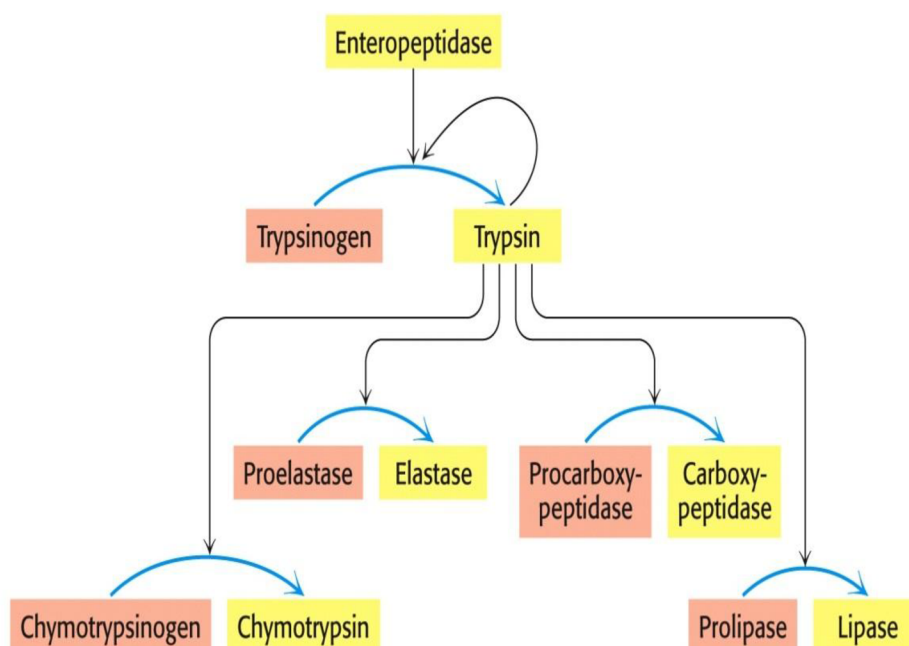
Jeho aktivace probíhá dvoustupňovým procesem. Jakmile trypsinogen vstoupí z pankreatu do dvanáctníku, dochází k štěpení pomocí enteropeptidázy (EC 3.4.21.9), která je specifickou serinovou proteázou lokalizovanou v membráně epitelu intestina, v buňkách enterocytů. Dojde k odštěpení 14 AMK z N-konce preproenzymu za vzniku proenzymu. Následuje odštěpení N-koncového hexapeptidu za vzniku β -trypsinu, který má jeden polypeptidový řetězec o 223 aminokyselinách. Tento řetězec může následně podléhat autolýze za vzniku víceřetězcových produktů (řetězce spojeny disulfidovými vazbami) - α - trypsinu a pseudotrypsinu [11].

Specifitou štěpení se pseudotrypsin blíží chymotrypsinu (trávicí peptidáze). Specifita pseudotrypsinu je velmi široká, což bývá příčinou, proč trypsin za určitých okolností vykazuje nízkou efektivitu [12].

Aktivace je také zrychlována autokatalycky vzniklým trypsinem a vápenatými ionty. Molekula trypsinu obsahuje 6 disulfidových vazeb [13], [14].

V aktivním místě trypsinu má důležitou roli zbytek histidinový (His57), serinový (Ser195) a zbytek kyseliny asparagové (Asp102). Podíl má také zbytek kyseliny asparagové (Asp189), který je důležitý k uchycení dlouhých kladně nabitých aminokyselinových zbytků lysinu a argininu [15].

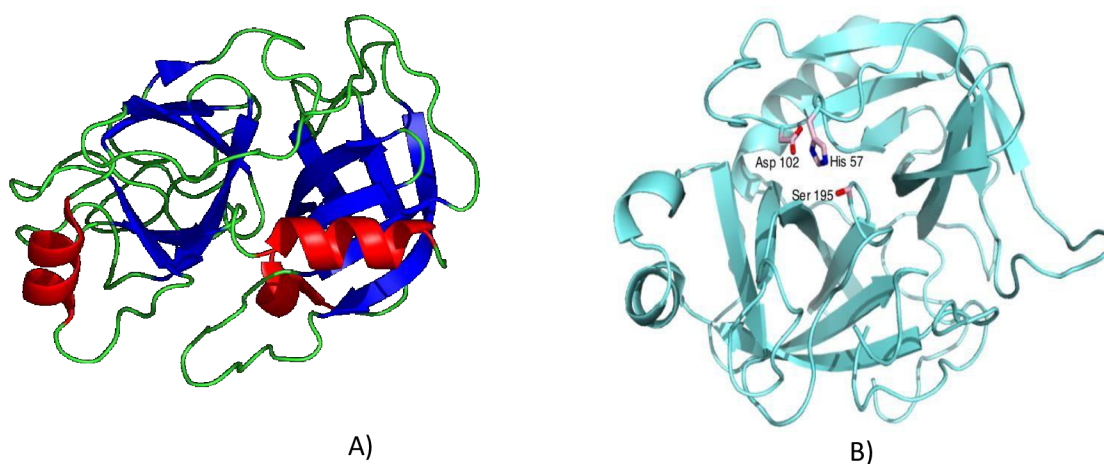
Obrázek 1 popisuje kaskádu aktivace zymogenů, kdy enteropeptidáza iniciuje aktivaci. Prekurzory chymotrypsinu, elastázy, karboxypeptidázy A a dalších jsou aktivovány trypsinem taktéž [9], [10], [16].



Obrázek 1: Aktivace zymogenů proteolytickým štěpením

(Trypsinogen je aktivován enteropeptidázou a vzniká trypsin, který autokatalycky zvyšuje svoji tvorbu. Působením trypsinu na chymotrypsinogen vzniká chymotrypsin, působením na proelastázu vzniká elastáza, působením na prokarboxypeptidázu vzniká karboxypeptidáza, působením na prolipázu vzniká lipáza) [17]

Trypsin a chymotrypsin (Obr. 2) obsahují rozsáhlé shodné sekvence a téměř identické hlavní řetězce. Trypsin však štěpí polypeptidy pouze za kladně nabitým zbytkem, zatímco chymotrypsin tak činí za velkým hydrofobním zbytkem. Tato odlišná specifita pro substrát je zřejmě dána odlišnostmi v jejich specifických vazebných místech pro substrát. Povrchové smyčky spojující stěny specifického místa a skládají se z aminokyselin 185 - 188 a 221 - 225, které se u chymotrypsinu i trypsinu liší, i když jsou tyto smyčky v obou typech proteinů přesně zachovány [17].

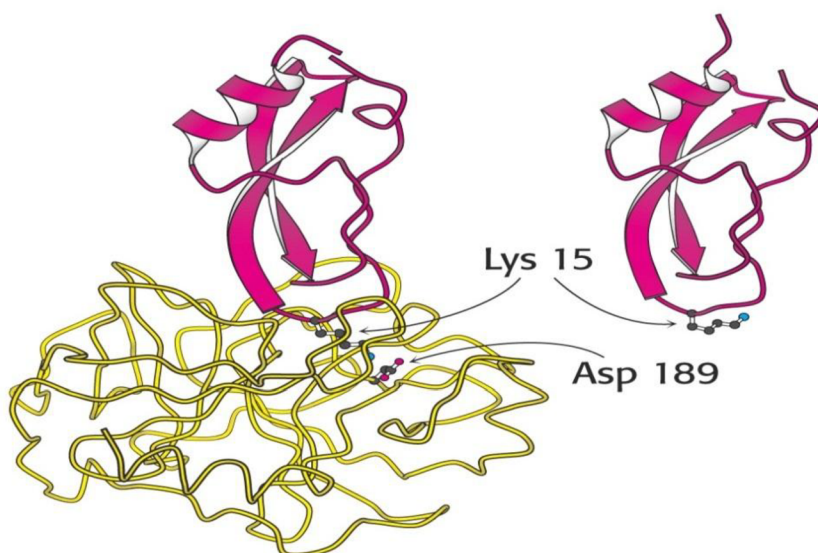


Obrázek 2: A) Schéma krystalografické struktury trypsinu [18]
 B) Schéma krystalografické struktury chymotrypsin [19]

2.1.3 Inhibice trypsinu

Některé látky ovlivňují rychlost enzymových reakcí. Když dojde ke snížení rychlosti, mluvíme o inhibici, při zvýšení rychlosti o aktivaci. V zásadě může být inhibice reversibilní či ireversibilní. Ireversibilní inhibice v podstatě znamená kovalentní modifikaci funkčních skupin enzymu nebo jeho destrukci.

Aktivace zymogenů je ireversibilní. K omezení nebo inaktivaci aktivních enzymů se využívají specifické inhibitory proteáz. Např. pankreatický trypsinový inhibitor (antitrypsin) je 6 kD protein inhibující trypsin tak, že se váže velmi pevně do jeho aktivního místa. Inhibiční konstanta je 1 pM. Komplex nelze oddělit ani denaturací 8 M močovinou nebo 6 M guanidin HCl. Nejznámějším trypsinovým inhibitorem je tzv. Kunitzův inhibitor z hovězího pankreatu (6,5 kD) [20]. Inhibuje i chymotrypsin, ale slaběji. Interakce trypsinu se svým inhibitorem. Lys 15 inhibitoru vstupuje do aktivního místa trypsinu a vytváří iontovou vazbu s Asp 189 (Obr. 3).

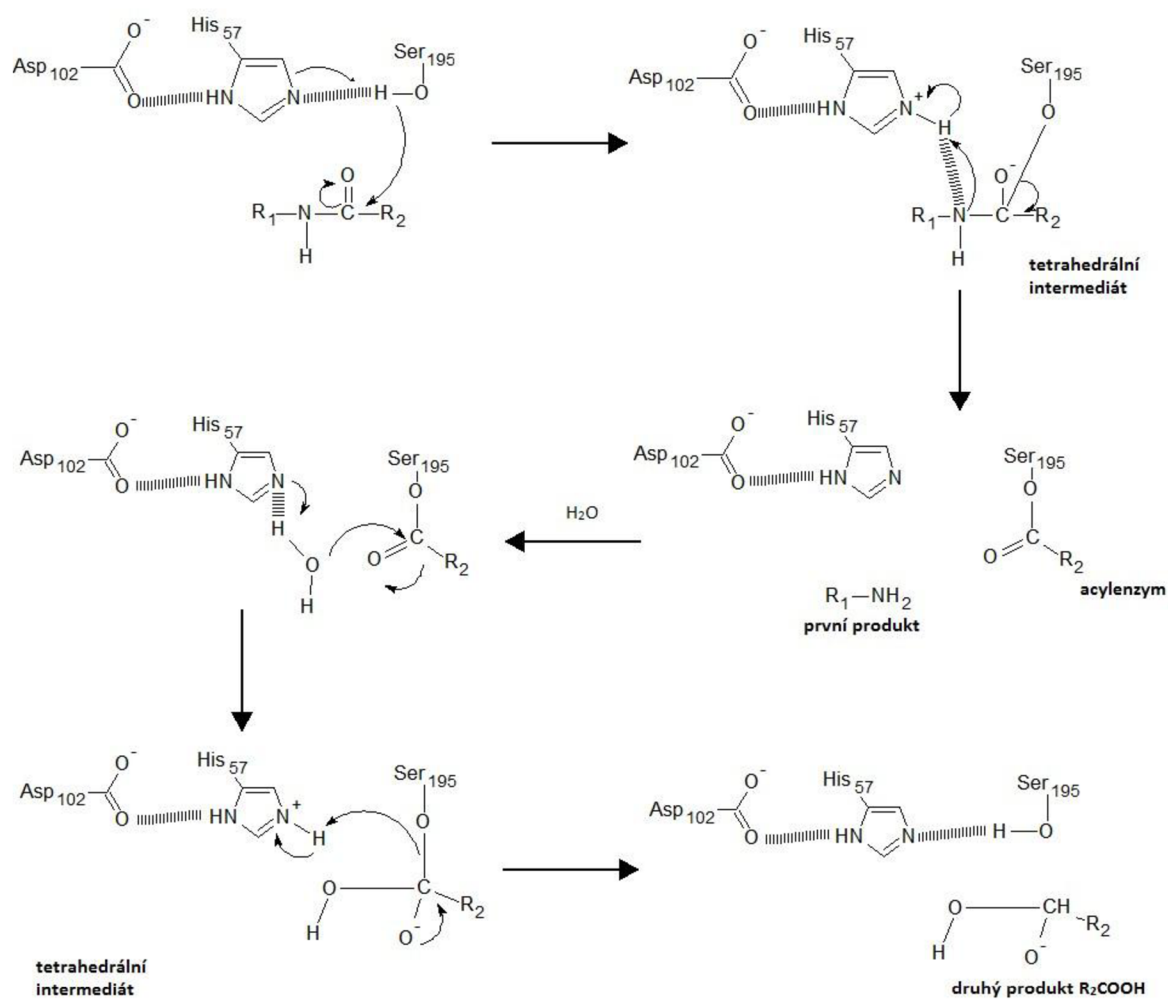


Obrázek 3: Interakce trypsinu se svým inhibitorem [32]

(Obrázek zobrazuje komplex enzymu trypsinu se svým inhibitorem a volný inhibitor trypsinu)

Aktivní centrum serinových proteáz má tvar povrchové prohlubně, v němž je klíčovou katalytickou skupinou hydroxylová skupina serinu společně s bočními řetězci histidinu a aspartátu. Přesto, že jsou tyto tři zbytky aminokyselin umístěny na vzdálených místech polypeptidového řetězce trypsinu, vzájemně spolu místně kooperují. Vodíkovým můstkem je spojen karboxyl zbytku Asp 102 s jedním z dusíkových atomů imidazolového kruhu His57. Jeho atom dusíku tvoří vodíkovou vazbu s hydroxylem reaktivního serinu na povrchu molekuly. Podél těchto vodíkových vazeb se posouvá náboj zevnitř molekuly od Asp102k Ser195 a naopak [19]. Obrázek 4 zobrazuje mechanismus hydrolytického štěpení serinových proteáz.

Polypeptidový substrát je vázán na povrch serinové proteázy vložení štěpitelné vazby do aktivního místa enzymu, karbonylový uhlík této vazby je umístěn v blízkosti nukleofilního Ser195. Hydroxyl Ser195 napadá karbonylový uhlík štěpeného peptidu a dusík His57 přijímá proton z hydroxyly. Vzniká tetrahedrální intermediát. Přenosem protonu z bližšího dusíkového atomu imidazolového kruhu, který je součástí nábojové štafety, na atom dusíku substrátu se přeruší peptidová vazba N–C a vytvoří se první reakční produkt R1–NH₂. Zbývající část substrátu se pak kovalentně váže acylovou skupinou na Ser195. Vzniklý meziprodukt se nazývá acylenzy. Do reakce vstupuje voda. Nukleofilním atakem nahradí N-konce z rozštěpeného peptidu a napadá karbonyl uhlíku. Její proton vytvoří vodíkovou vazbu mezi dusíkovým atomem imidazolového kruhu a hydroxylovou skupinou zbytku serinu a zbylý ion OH⁻ se váže na acyl štěpeného substrátu. Tvoří se opět tetrahedrální intermediát. Uvolněním druhého produktu R2–COOH se aktivní místo enzymu uvede do původního stavu [19], [21].



Obrázek 4: Schéma mechanismu hydrolyzy serinovou proteázou [12], [21]

2.1.4 Využití trypsinu

Cytoplazmatická membrána je tenký semipermeabilní (polopropustný) obal ohraničující vnitřek buňky od vnějšího prostředí a kontrolující pohyb látek do buňky a ven z buňky. Buněčná membrána je selektivně permeabilní pro ionty a organické molekuly, a v zásadě chrání buňku před vnějšími vlivy. Skládá se z lipidové dvouvrstvy se zakotvenými proteiny. Buněčná membrána obsahuje velké množství proteinů, typicky kolem 50 % membránového objemu. Tyto proteiny jsou pro buňku důležité, protože jsou odpovědné za různé biologické aktivity. Existuje velké množství proteinových receptorů a identifikačních proteinů, jako jsou antigeny, které jsou přítomné na povrchu membrány. K funkcím membránových proteinů také patří buněčný kontakt, povrchové rozpoznání, kontakt cytoskeletu, signalizace, enzymatické aktivity nebo transport látek přes membránu [22].

Plazmatické membránové proteiny jsou zodpovědné za širokou řadu funkcí nezbytných pro udržení normální fyziologické aktivity. Například EGF receptory je skupina proteinů nacházejících se v plazmatické membráně, které působí jako růstové receptory. Přenášejí vnější signály do nitra buňky a mohou měnit fyziologické aktivity buňky v odezvě na externí signály [23]. Tzv. kadheriny tvoří skupinu transmembránových proteinů podílejících se na

stavbě mezibuněčných spojů. Jejich schopnost adheze (přilnutí) je podmíněna přítomností vápenatých kationtů v okolním prostředí. V typickém případě se skládají z pěti podobných extracelulárních domén a jedné vnitrobuněčné domény, která se často váže na cytoskelet. Klasické kadheriny jsou často součástí tzv. adhezních spojů a přes katenin se vážou na aktinová filamenta. Patří k nim E-kadherin (na epiteliích i jinde), R-kadherin (na sítnici a jinde), N-kadherin (v nervech, svalech, epitelech) a P-kadherin. V buněčné membráně tedy působí jako kotvy k propojení cytoskeletu s extracelulární matrix a tím regulují migraci buněk a buněčnou adhezi [24], [25].

Deregulace membránových proteinů může způsobit četná onemocnění, jako je vznik nádorů. Kromě toho mutace ErbB-2 receptorů vedou k výskytu karcinomu žaludku a hepatocelulární rakoviny [26].

Trypsin jakožto proteolytický enzym tak může tyto membránové proteiny degradovat a tím ovlivnit celkový stav buňky. Nejčastěji se používá k oddělení buněk od substrátu, jakmile buňky dosáhnou vysoké konfluence a dále se pasážují. Jedná se tedy o rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem pomocí proteázy trypsinu, proto se často hovoří o tzv. trypsinizaci buněk [27], [28].

Izolovaný trypsin se dále využívá např. v cytogenetice, kde se nechává působit na chromozomy. Jelikož trypsin poskytuje dobře definované kladně nabitě peptidové štěpy o vhodné velikosti 10-12 AMK, je v proteomice (Tab. 2) využíván ke štěpení proteinů na směs štěpných peptidů pro analýzu hmotnostní spektrometrií [27], [29].

Tab.2: Proteolytické enzymy běžně používané v proteomice [1]

Enzym	Místo štěpení	Výjimka	Rozsah pH
Trypsin	C-konec R-X, K-X	X = P	7,0–9,0
Chymotrypsin	C-konec F-, Y-, W-, L-, I-, V- a M-X	X = P	7,5–8,5
EndoproteinasaGlu-C (V8-DE)	C-konec E-X, D-X	X = P	4,0–8,0
EndoproteinasaLys-C	C-konec K-X	(X = P)	8,5–8,8
Endoproteinasa Arg-C	C-konec R-X	(X = P)	7,5–8,5
EndoproteinasaAsp-N	N-konec X-D, X-E		6,0–8,5
Elastasa	C-konec A, V, L, I, G, S		8,5
Pepsin	F, M, L, W (zvl. F-L, F-F, F-Y)		2–4
Pronase	směs endo- a exoproteinás, štěpí téměř všechny peptidové vazby		7,0–8,0 *
Subtilisin	široká specifita, pref. C-konec nenabitě aminokyseliny		7,0–11,0
Thermolysin	široká specifita (W, Y, F, I, L, V, A, M), převážně N-konec X-F, X-L		6,0–10,0

* v závislosti na povaze směsi

2.2 Buněčné kultury

Definovat buněčné kultury lze jako procesy in vitro za účelem udržení životaschopnosti, rozšíření a využití buněk živých organismů. Mohou to být kultury prokaryotické (bakterie, mykoplazmy) a také eukaryotické (kvasinky, prvoci, rostlinné a živočišné buňky). Pojem buněčná kultura je v úzké souvislosti s výrazy tkáňová kultura nebo orgánová kultura. Přestože myšlenka kultivovat buňky in vitro pochází již z 19. století, rutinně se kultivace používají od 50. let 20. století. Buněčné kultury mají rozsáhlý význam a využití např. ve virologii - diagnostika virových onemocnění, kultivace a izolace viru, výroba virových vektorů pro genovou terapii či výroba vakcín proti virům, dále výroba enzymů, hormonů, monoklonálních protilátek, interleukinů a dalších proteinů pro léčebné, diagnostické či vědecké účely; testování látek, léčiv a jejich toxicity či teratogenity, výzkum rakoviny a vývoj protinádorových léčiv; studium regulace buněčného cyklu a diferenciaci buněk; prenatální vyšetření, postnatální vyšetření, chromozomové vyšetření nádorových buněk; produkce transgenních plodin [6]. Buněčná kultura se zakládá izolací určitého typu buněk ze zvířete, člověka či rostliny. K izolaci se používají nejrůznější techniky založené na mechanické disociaci tkáně a trávení pomocí proteolytických enzymů (trypsin, kolagenáza) v přítomnosti EDTA (váže Ca^{2+}). Separace buněk ze suspenze probíhá na základě rozdílných fyzických vlastností (různé velikosti a hustota - centrifugace) nebo tendenci určitých typů buněk silně se lepit na sklo či plast (oddělení od buněk, které se lepí méně). Většina buněk může žít, množit se a exprimovat diferenciační charakteristiky in vitro v kultivačních nádobách. Pro růst buněk je důležitá optimální teplota (37 °C), přístup kyslíku (filtry) a CO_2 (udržení pH medií; zvýšený parciální tlak, 5-7.5 %), a také vysoká relativní vlhkost. Buňky mohou být kontinuálně pozorovány pod mikroskopem anebo biochemicky analyzovány. Tak je možné studovat vliv, buď přidání, nebo odebrání specifické molekuly (hormony, růstové faktory) a také interakce mezi různými buněčnými typy. Většina buněk získaných z tkání vyžaduje pro svůj růst pevný povrch, na kterém se uchyť. Dno plastové misky modifikované chemicky nebo gama zářením takový povrch poskytuje. Často musí být miska pokrytá nějakou z komponent extracelulární matrix (kolagen, laminin, fibronectin), aby buňky přežily a dělily se. Některé buňky jsou schopné proliferovat v suspenzi bez nutnosti adheze [7].

2.2.1 Buněčné linie

V současné době jako dva hlavní zdroje linií jsou organizace ECACC (European Collection of Cell Cultures) a ATCC (American Tissue and Cultures Collection). Linie mají definovaný fenotyp a doporučené kultivační podmínky. Jejich využití v buněčné biologii je dáno žádaným sledovaným parametrem.

Buněčné linie se získávají cílenou selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních nebo chemických mutagenů nebo přímo z nádorových buněk. Jsou plně adaptovány na podmínky

in vitro a mohou být pasážovány avšak pouze určitou dobu. Jejich charakter se však mění během pasážování a buňky v kultuře se často liší velmi výrazně od buněk tkání, ze kterých byly získány. Jejich charakteristickým znakem je heteroploidní počet chromozomů.

Transfekce savčích buněk je proces, při kterém je do eukaryotické buňky vložen plazmidový konstrukt, který obsahuje kódující sekvenci pro rekombinantní protein. Je známo mnoho transfekčních technik. Transfekční techniky lze obecně rozdělit na fyzikální (např. elektroporace - používá krátké silné elektrické pulsy, které na buněčné membráně dočasně otevřou póry, kterými vstupuje vektor do cytoplazmy) a chemické (např. precipitace fosforečnanem vápenatým nebo s užitím liposomů). Principem chemických metod je vazba různých molekul na DNA, které usnadňují transdukcii. Řadíme sem například lipofekci, kdy jsou přenašečem částice lipidů (liposomy), které splývají s buněčnou membránou, vnikají do buňky a po degradaci v lysosomech se DNA uvolňuje, přesunuje do jádra, kde se může integrovat s buněčným genomem. Užívají se ale i další látky s navázanou DNA, umožňující vazbou na specifické receptory vstup přenášené DNA. Transfekce může být dočasná (transientní), nebo stabilní. Při transientní transfekci DNA vstupuje do jádra hostitelské buňky, kde dochází k transkripci, ale nedojde k stabilní integraci do genomu. To má za následek poměrně rychlou expresi požadovaného proteinu, která ovšem po několika dnech až týdnech mizí. Při stabilní transfekci je cizorodá DNA náhodně začleněna do genomu hostitelské buňky a replikuje se zároveň s ní. K začlenění cizorodé DNA dojde pouze v malém počtu buněk, proto je nutné tyto buňky namnožit a podrobit selekci. Stabilní transfekce je na rozdíl od transientní zdlouhavější, ale vede k získání stálého produkčního klonu buněk [30].

Buněčná linie HEK293 byla odvozena z ledviny zdravého lidského embrya (human embryonal kidney – HEK). Linie byla poprvé vytvořena roku 1970 v Nizozemí Dr. Frankem Grahamem. Jedná se o lidské epiteliální buňky, které jsou transformované pomocí lidského DNA viru - adenoviru typu 5 [27]. Transformace byla provedena inzercí přibližně 4,5 kb genomu viru do 19. lidského chromosomu. Označení linie číslem 293 je symbolické a poukazuje na 293. transformační pokus, ze kterého známá linie vzešla. Transformace byla provedena precipitací DNA v prostředí chloridu vápenatého. Mnoho let byla tato linie považována za buňky odvozené od epiteliální ledvinné tkáně. Nicméně skutečnost, že buňky pocházejí z kultivovaných buněk ledvin, nevyovídá mnoho o přesném buněčném původu HEK293. Embryonální ledvinové kultury mohou obsahovat malé množství téměř všech typů buněk lidského těla. Graham a jeho spolupracovníci však předložili důkazy, že buňky HEK293 a několik dalších lidských buněčných linií, které jsou generované transformací adenovirem lidských embryonálních ledvinných buněk, mají mnoho vlastností nezralých neuronů. Dnes se pokládají za buněčnou linii odvozenou z neurálních ledvinných buněk [31]. Tato buněčná linie je vhodná především pro sledování vlastností, které nejsou závislé na konkrétním typu buněk, HEK293 se v mnohém podobají neuronům. Výhodou HEK293

buněčné linie je to, že jakožto expresní systém pocházející z lidských buněk by měl poskytovat savčí r-proteiny se správnými a přirozenými posttranslačními modifikacemi. Na rozdíl od prokaryotických expresních systémů je však poměrně náchylný na infekci, má delší generační dobu, vyžaduje drahá kultivační média a kvalitní vybavení laboratoře. Jako experimentálně transformované buněčné linie nejsou HEK293 dobrým buněčným modelem, který je základním předmětem výzkumu. Nicméně jsou velmi snadno transfekovatelné, a tak mohou být použity v pokusech, ve kterých chování buňky samotné není předmětem zájmu. Příkladem využití HEK293 mohou být například studie účinků léků na sodíkové kanály, testování indukovatelného systému RNA interference testování izoforem selektivní protein kinázy C, či jsou vhodné ke sledování změn exprese konkrétních proteinů v závislosti na změnách podmínek [28], [32], [33]. HEK293 buňky se také používají proto, že neexprimují velké množství napětově řízených kanálů. Existuje tedy předpoklad, že proudová odezva z těchto buněk je celá z kanálu, který je do buněk vpraven transfekcí. Další výhodou této linie je rychlá proliferace a jednoduchá kultivace.

Postupem času byly odvozeny různé varianty původní linie HEK293, aby se dosáhlo vyšší úrovně transfekce, rychlejšího růstu a snazší kultivace. Nejznámějšími a nejvyužívanějšími variantami jsou:

HEK293S - Linie adaptovaná na suspenzní kultivaci, která byla použita pro tvorbu stabilních linií exprimujících opsin po indukci tetracyklinem [40].

HEK293T - Linie stabilně transfekovaná genem pro velký T antigen polyomaviru SV40, který umožňuje episomální replikaci plazmidů obsahujících replikační počátek SV40.

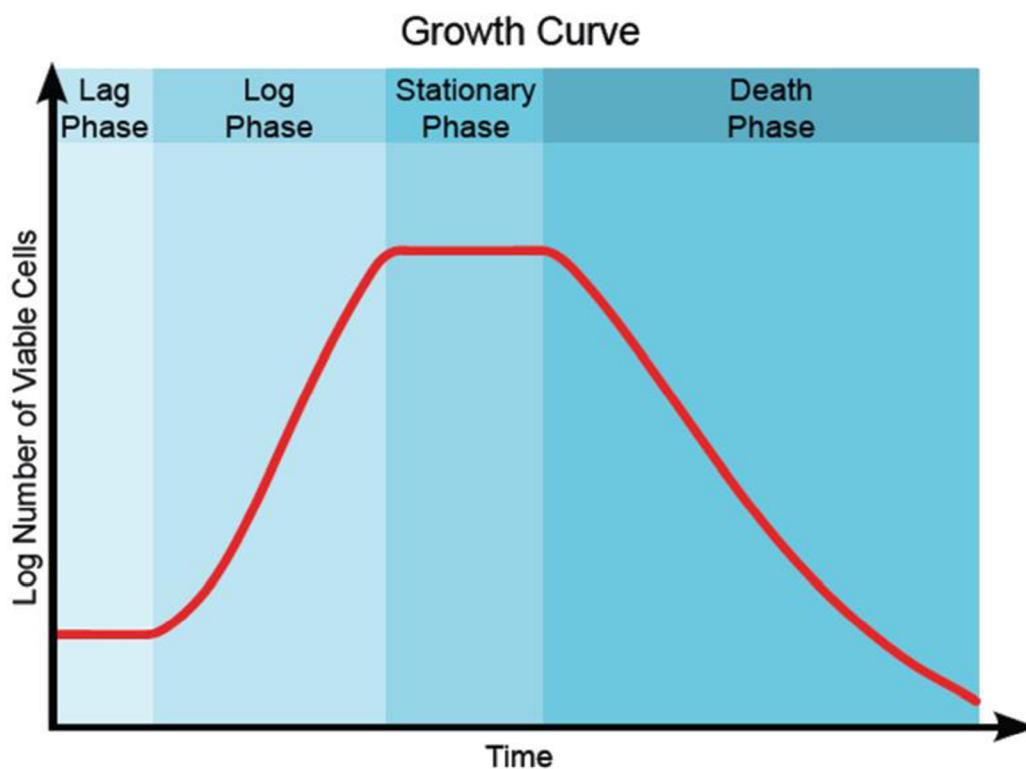
HEK293F - Linie uzpůsobená pro kultivaci v suspenzním a bezsérovém prostředí (komerčně někdy označovaná angl. přídomek „freestyle“, též odvozeného ze „serum-free“ kultivace).

HEK293E - Linie stabilně transfekovaná genem pro nukleární antigen 1 viru Epstein-Barrové (EBNA1), který umožňuje episomální replikaci plazmidů obsahujících replikační počátek oriP tohoto viru.

HEK293 - 6E (úplný název HEK293F-EBNA1t) - Linie stabilně transfekovaná genem EBNA1t, což je kratší verze genu EBNA1. Tato zkrácená verze rovněž umožňuje episomální replikaci oriP plazmidů a buňky přitom vykazují lepší růstové vlastnosti než u klasické HEK293E linie. Obě linie je možné pěstovat v suspenzi v bezsérovém médiu [35].

2.2.2 Buněčný růst

Rychlost růstu buněk v kultuře odráží míru adaptace na podmínky prostředí, dostupnost živin, a u adherentních buněk volná plocha pro přisednutí. Buněčný růst se skládá z několika fází: jsou to lag fáze, fáze exponenciálního růstu neboli logaritická, dále následuje fáze stacionární (plateau) a fáze odumírání (obr. 5).



Obrázek 5: Křivka buněčného růstu [6]

(*lag phase* – období disperze a uchycování, *log phase (exponentialphase)* – fáze exponenciálního růstu, *stationary phase* - klesá růstová rychlost, buňky se přestávají množit, eventuálně jich ubývá, *death phase* - fáze odumírání, kdy již mrtvé buňky nejsou nahrazovány živými)

Lag fáze nastává po přesazení buněk a vyznačuje se pomalým, nebo téměř žádným buněčným dělením. V této adaptační fázi adherentní buňky resyntetizují části glykolalaxy, které ztratily během trypsinizace. Délka lag fáze závisí na dvou faktorech. Prvním je fáze, ve které byly buňky před přesazením. U buněk přesazených v aktivní růstové fázi je lag fáze kratší. Druhým faktorem je hustota přesazených buněk. Buňky přesazené v nízké hustotě se hůř adaptují na nové podmínky, což prodlužuje lag fázi. Fáze logaritická je fáze aktivního růstu a dělení buněk. Označuje se též jako exponenciální nebo log fáze. V této fázi jsou buňky v nejlepší kondici a fáze je ideální pro studium buněčných pochodů. Faktory ovlivňující trvání této fáze jsou: počáteční koncentrace buněk při přesazení, rychlost buněčného dělení, dostupnost živin a hromadění metabolických produktů. U adherovaných buněk ještě hraje roli dostupnost volné plochy, neboť kontakty inhibují růst. Během fáze stacionární dochází k redukci růstu z důvodů nedostatku živin a hromadění metabolických produktů. Přestože už nedochází ke zvyšování hustoty, mrtvé buňky jsou ještě nahrazovány živými. Specializované proteiny jsou syntetizovány místo strukturních a mohou nastat změny na povrchu buněk. Tato fáze může být prodloužena nahrazením média čerstvým, nicméně některé buněčné linie ji špatně snášejí a snadno přechází do fáze odumírání. Po stacionární fázi následuje fáze odumírání, kdy již mrtvé buňky nejsou nahrazovány živými. Jedná se o konečnou a nevratnou fázi, kdy buňky pro nedostatek živin a kyslíku podléhají autodestrukci.

Obecně, buňky se nedoporučují nechat dorůst do 100% konfluence, protože následně, díky kontaktní inhibici, dochází k umírání buněk. Konfluence se hodnotí mikroskopicky. Při cca 70-90 % konfluenci buněk se kultura tzv. pasážeje. Jedná se o rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem pomocí proteázy trypsinu. Pracovní postup pasážování je popsán dále.

2.2.3 Kultivace buněk

Jednou z nejdůležitějších strategií pro poznávání buněčného cyklu je pěstování buněk mnohobuněčného organismu *in vitro*. Možné je pěstování v explantátech z vyňaté části tkáně (orgánová kultura), nebo je možné získat populaci izolovaných buněk (buněčná kultura). Nejjednodušším případem je získání populace, která pochází z jediné buňky (buněčné linie či buněčné klony).

Živočišné buňky je nutné pěstovat na pevné podložce, protože jejich dělení vyžaduje adhezi k podložce. Při kultivaci *in vitro* pěstujeme buňky v médiích, která dostatečně napodobují extracelulární tekutinu *in vivo* systému. Musí obsahovat dostatečné množství živin, které jim umožní růst až po několik dní. Také musí umožňovat rychlou difúzi kyslíku a oxidu uhličitého – promícháváním u suspenzních kultur či vytvořením tenké vrstvy nad adherovanými buňkami u adherentních kultur. Médium se zpravidla mění dvakrát až třikrát týdně (subkultivace). Kultivační médium musí obsahovat ve vhodných koncentracích látky potřebné pro život a proliferaci buněk. Mezi nejvýznamnější látky patří bílkoviny, vitamíny, růstové faktory, anorganické soli, pufrý, glukosa či jiný zdroj energie, peptidy, mastné kyseliny, lipidy a stopové prvky. Někdy je médium potřeba doplnit o 5 - 10 % krevního séra, které obsahuje růstové faktory. Přídavkem séra dodáváme buňkám stovky biologicky významných sloučenin. Tyto sloučeniny mají zásadní vliv na život a růst buněk. Nejčastěji se používají kravská séra či séra z telecích fétů. Dostupná je celá řada živočišných sér, běžněji se používají i např. séra z koně či králíka. Séra se sterilizují filtrací, jiná jsou tepelně inaktivovaná, což zabraňuje přenosu možné virové infekce [36]. Přidávání séra k médiu však přináší i své problémy, složení séra totiž není nikdy přesně definované. Může se tím měnit růst a vlastnosti kultur. Komerční společnosti tento problém řeší tak, že prodávají směsná séra, kde se odlišnosti různých jedinců zprůměrují. Nedefinovatelnost séra však stále ztěžuje průmyslovou výrobu, srovnávání výsledků a znesnadňuje purifikaci r-proteinů [37]. Od užívání séra se dnes upouští i z důvodů etických a v neposlední řadě i ekonomických, protože sérum už ze své podstaty není právě levné. Média bezsérová se používají pro studium růstových faktorů. Pro různé fáze práce s kulturou, ať se jedná o kultivaci, transfekci či produkci, potřebujeme různá chemická prostředí. Komerčně jsou dostupná média vhodná pro všechny fáze, avšak častou výměnou médií podstupujeme riziko snížené viability či rychlosti růstu kultury. Nejekonomičtější cestou je mít k dispozici médium nebo používat směsi médií, ve kterých by buňky byly viabilní, rychle rostly, dobře se transfekovaly. Při přípravě kultivačního média je nutné dodržet optimální pH (7,4), osmolaritu (290 mosm/kg) a

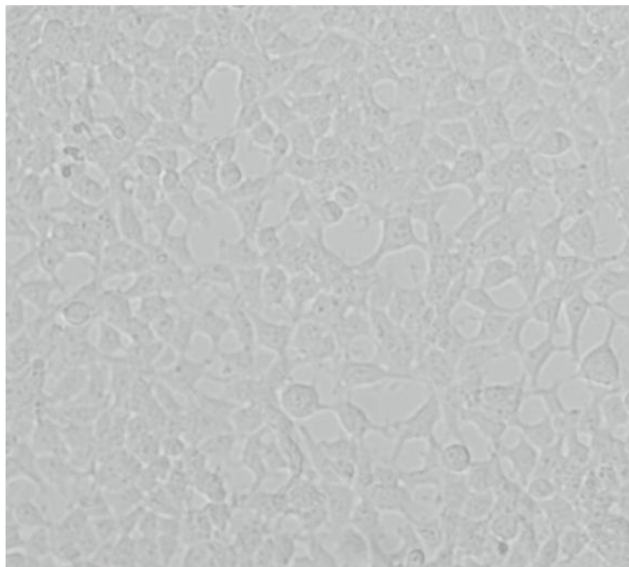
atmosféra musí kromě kyslíku obsahovat i určité procento oxidu uhličitého. Takto pěstované buňky se množí, vyčerpávají živiny a tedy je nutné po určité době buňky přesadit (pasážovat) do čerstvého média. Buňky se od substrátu uvolní, mechanicky nebo enzymaticky pomocí trypsinu, a jejich část se opět nasadí do kultivační nádoby. Buňky je takto možné zmrazit a neomezeně skladovat.

Buněčné kultury mají velmi mnohostranné využití. Kontinuálním sledováním je možné pozorovat řadu buněčných procesů. Také je možné přímo sledovat působení vnějších faktorů fyzikálních a chemických látek. Buněčné kultury dnes slouží hlavně jako preferenční model pro studium toxického působení látek, což nahrazuje pokusy s laboratorními zvířaty.

V samotném experimentu se používaly buněčné linie HEK293 dvou typů. Jedna buněčná linie byla tvořena netransfekovanými buňkami, druhá byla stabilně transfekovaná membránovým kanálem $Ca_v3.1$.

Napětím řízené brány vápenatých kanálů zprostředkovávají vstup Ca^{2+} do buněk v závislosti na depolarizaci membrány. Elektrofyziologické studie odkrývají různé Ca^{2+} proudy určené dle daného L-, N-, P-, Q-, R-, a T-typu. $Ca_v3.1$ patří mezi kalciové kanály typu T, také označován jako $\alpha 1G$. Tento typ kalciového kanálu můžeme naléznout u neuronových a srdečních buněk. Pro jeho aktivaci stačí nízký membránový potenciál (low voltage activated - LVA). Kalciové kanály jsou tvořeny proteiny, které se skládají z více proteinových podjednotek. Mezi tyto podjednotky patří alfa-1 podjednotka (o velikosti 190-250 kDa) tvořící pór a dále kombinace podjednotek beta, alfa-2, delta a gamma. Podjednotka beta se nachází uvnitř buňky, disulfidem vázaným komplex subjednotek alfa-2 delta tvoří prostor procházející skrz membránu. Je známo deset typů podjednotek alfa-1, čtyři komplexy alfa-2 delta, čtyři subjednotky beta a dvě subjednotky gama. Mnohačetné geny a spojené genetické varianty kódují členy každé rodiny podjednotek. Rozsáhlá biofyzikální a farmakologická různorodost přirozených kalciových proudů je přisuzována různým kombinacím jejich molekulárních identit.

Rodina $Ca_v3.1$ alfa-1 subjednotek vede L-typ Ca^{2+} proudů, které iniciují kontrakci svalů, endokrinní sekreci a transkripci genu, a jsou primárně řízeny druhým přenosem fosforylační cesty proteinu. Rodina $Ca_v 2$ alfa-1 podjednotek vede N-typ, P/Q-typ a R-typ Ca^{2+} proudů, které iniciují rychlý synaptický přenos a jsou primárně řízeny přímou interakcí s G proteiny a SNARE proteiny a druhotně fosforylací proteinu. Rodina $Ca_v3.1$ alfa-1 subjednotek vede T-typ Ca^{2+} proudů, které jsou aktivovány a deaktivovány nejrychleji z Ca^{2+} typů proudů a při nejnegativnějším membránovém potenciálu. Jasná struktura a systém regulace těchto tří rodin Ca^{2+} kanálů poskytuje přizpůsobivou škálu cest vstupu Ca^{2+} v závislosti na měnícím se membránovém potenciálu a škálu možností jak regulovat vstup Ca^{2+} cestou druhého přenosu a interagujícími proteiny [40].



Obrázek 6: netrasfekované buňky HEK293 po 48hod. inkubaci při použité koncentraci 0,25 % trypsinu

2.2.4 Pasážování buněk

Pasáž je pracovní postup, při kterém dochází k odstranění adherentních buněk z růstové plochy (kultivační láhev, petriho misky, atd.) a jejich umístění na nové růstové plochy v nižší koncentraci. Tento postup je důležitý u buněk, které se dělí (rostou), jelikož kultivační plocha má omezenou velikost a většina buněčných linií roste v monovrstvě. Po dosažení maximální plochy se buňky samovolně pustí do kultivačního média a jsou již dále nepoužitelné. Tomuto jevu je tedy nutno zabránit.

Počet buněk v nové kultivační láhvi po pasáži by měl být přibližně 20 % původního počtu. Toto je optimální množství pro správný růst a proliferaci. Pokud je buněk méně, rostou pomaleji a mohou se samovolně pouštět do kultivačního média. Pokud je jich naopak více, zvyšuje se rychlost růstu a pasáž je nutno opakovat dříve.

Buňky jsou po transfekci rezistentnější a rostou více odděleně, což je pro demonstrační účely vhodné. Buňky jsou kultivovány v růstovém médiu, jehož hlavní složkou je EMEM, které je dále doplněno o další růstové a zásobní látky (obsahuje 10 % FBS, 1 % penicilin/streptomycin, 1 % L-glutamine a u stabilně transfekované linie ještě genomicin jako antibiotický selektor).

Pro natrávení peptidové vazby, kterou jsou buňky přichyceny k růstové ploše, se používá trypsin-EDTA (Sial), který se uchovává při teplotě -20 °C.

2.2.5 Viabilita buněk

Buňky se dělí exponenciálně tedy až do té doby, než se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat. V této chvíli začíná stacionární fáze. Nejčastěji se proto při práci s buněčnými kulturami snažíme udržovat buňky pouze ve fázi exponenciální a těsně před dosažením stacionární fáze se buňky při tzv. subkultivaci vhodně naředí čerstvým médiem. Tím se buňkám poskytne vhodné prostředí pro jejich opětovné dělení. Buňky se v

kultuře vzájemně ovlivňují a produkují růstové faktory. Různé buněčné linie snesou během kultivace *in vitro* odlišné hustoty populací. V případě, že je buněk v kultuře velmi málo, množí se pomaleji kvůli nízké koncentraci růstových faktorů, nebo dokonce může dojít k jejich apoptóze [36], [38].

Při vyšších hustotách mohou adherentní kultury dosáhnout tzv. konfluency, kdy se buňky navzájem dotýkají a tvoří souvislou vrstvu. Dělení buněk se v této fázi zastaví. Některé kultury však konfluency nedosáhnou a přestanou se dělit již ve fázi, kdy se začnou dotýkat výběžky buněk. Naproti tomu některé nádorové buňky rostou i po vytvoření konfluentní vrstvy. Při vysokých hustotách nejsou většinou buňky dostatečně dobře zásobovány živinami a začínají odumírat [39].

Některé kultury nemůžeme kultivovat neomezeně, buňky se časem přestávají dělit a odumírají. To platí zejména pro buňky odebrané z dospělého jedince. Tomuto jevu se dá zabránit spontánní transformací, chemickou immortalizací či virovou transformací.

Viabilitou se rozumí životaschopnost kultury. U buněčných kultur vyjadřujeme viabilitou procento živých buněk z počtu všech buněk. Další důležitou vlastností kultury je buněčná hustota, která vyjadřuje počet buněk vztažený na jednotku objemu (nejčastěji v milionech buněk na mililitr). Buněčnou hustotu měnící se v čase lze přepočítat na dobu zdvojení kultury, tzn. průměrnou generační dobu. Ta se u savčích buněčných linií obvykle pohybuje kolem 20 - 30 hodin, průměrně činí přibližně jeden den [36].

2.2.6 Určení množství buněk

Určení počtu buněk patří mezi základní postupy jak při jejich samotném pěstování (například pro stanovení hustoty buněk nasazovaných po pasáži), tak v pokusech s kultivovanými buňkami. Používá se řada postupů. V řadě případů stačí počet buněk stanovit odhadem nebo semikvantitativně – odhaduje se například počet buněk v zorném poli mikroskopu při daném zvětšení, u adherentních buněk procento kultivačního povrchu pokryté buňkami apod..

Pro přesné stanovení počtu buněk se stále standardně používá počítání v cytometrické komůrce (např. v Bürkerově nebo v Türkově). Přesnost této metody je ovšem vyvážena její pracností a časovou náročností. Nejčastěji se využívá tzv. Trypan Blue Exclusion test, založený na skutečnosti, že zdravá (živá) buňka, pokud je vystavena okolnímu prostředí se specifickým barvivem (např. trypanová modř), nepustí barvivo do intracelulárního prostoru díky integritě buněčné membrány a funkčnosti transportních systémů. Naopak buňky mrtvé či poškozené se nabarví trypanovou modří. Buněčnou suspenzi v roztoku trypanové modři pak hodnotíme mikroskopicky, kdy určíme jak počet buněk v daném objemu buněčné suspenze, tak i podíl živých (nenabarvených) buněk v celkové buněčné populaci.

Rychlejší metodou je průtoková cytometrie. Nevýhodou, kromě potřeby poměrně drahého přístroje, je ovšem nutnost kalibrovat přístroj na každý buněčný typ. Stanovuje-li se počet buněk opakovaně za přesně definovaných podmínek, lze s výhodou využít rozptylu světla na

buněčné suspenzi a měřit hustotu suspenze turbidimetricky. Další možností je stanovení koncentrace některých buněčných součástí – nejčastěji se měří množství celkové bílkoviny ve vzorku (je ovšem nutné zabránit zkreslení bílkovinami séra, které se přidává do kultivačního média) nebo koncentrace DNA. Někdy se také využívá stanovení aktivity vhodných enzymů. V úvahu připadá také stanovení celkové metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu – využívá se redukce derivátu tetrazoliové modři (MTT) enzymy dýchacího řetězce.

3. Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo optimalizovat koncentraci trypsinu, při které by jeho účinek byl dostatečný, a zároveň se minimalizovala úmrtnost používaných buněk. K optimalizaci byly vybrány buněčné linie HEK293 netransfekované a buněčné linie stabilně transfekované membránovými kanály Cav3.1, které byly postupně vystaveny účinku 0,25; 0,375 a 0,5 % trypsinu.

Moji bakalářskou práci jsem začala návštěvou a následným pozorováním buněčných linií netransfekovaných a stabilně transfekovaných membránovými kanály Cav3.1. Celý proces, včetně laboratorních prací, jsem konzultovala s panem Ing. Svobodou, který má velké zkušenosti v této problematice. Jelikož jsem během studia neměla možnost pracovat v laboratoři, bylo pro mě toto téma velmi inspirativní a přínosné. Pan Ing. Svoboda mě naučil základní metodiku, postupy a chování při práci v laboratoři, včetně bezpečnostních pokynů. Celý semestr jsem strávila v laboratoři, kde bylo hlavním úkolem zjistit za jaké koncentrace trypsinu, ze tří možných, se začnou buňky odlepovat od podloží. Celkem proběhlo více než 60 pozorování a měření. V navazujícím letním semestru, jsem se věnovala podrobnému zkoumání těchto buněk pomocí mikroskopu. Tato práce spočívala hlavně v obarvení buněk trypanovou modří a jejím následným vyhodnocováním. K tomuto procesu byla pořizována fotodokumentace, která je nedílnou součástí této práce.

3.1 Materiál

Přístroje a pomůcky

- inkubátor CO2 Cell od BMT
- mikroskop Olympus IX71
- elektrická pipeta
- serologické pipety 15 ml
- centrifuga na 15ml pipety
- Bürkerova komůrka
- lednice
- nitrilové rukavice

Chemikálie

- EMEM (Sigma)
- 10% FBS (Sigma)
- PBS
- 1 % penicilin/streptomycin (Sigma)
- 1 % L-glutamin (Sigma)
- 1 % Genomycin (Sigma)
- 10 % DMSO (Sigma)

- Trypsin – EDTA 10x (Sigma)
- trypanová modř (Sigma)
- 70 % ethanol

Buněčné linie

- HEK293
- HEK293 transfekovaná membránovým kanálem Ca_v3.1

3.2 Kultivace

Jak bylo uvedeno, v samotné experimentální části se používaly buněčné linie HEK293 dvou typů. Jedna buněčná linie byla tvořena netransfekovanými buňkami, druhá byla stabilně transfekovaná membránovým kanálem Ca_v3.1.

Kultivace buněk buněčné linie HEK293 byla kultivována v inkubátoru CO2 Cell od BMT při teplotě 37 °C a v atmosféře obohacené 5 % oxidu uhličitého. Kultura byla pěstována v médiu EMEM obohaceném 10 % fetálního bovinního séra (FBS). Buněčná kultura byla posléze přesazena dle potřeb pokusu na médium EMEM připravené stejným způsobem.

3.3 Pasážování

Důležitým úkolem při pasážování a následném sledování vývoje buněk je zvolení správné koncentrace trypsinu. Toto bylo sledováno při koncentracích 0,25 %, 0,375 % a 0,5 % trypsinu. Celý pracovní postup se provádí za sterilních podmínek. Vhodná je práce v nitrilových rukavicích (bez pudru). Aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků, či ztrátě buněk, je nutné ošetřit pracovní plochy před i po práci, stejně tak vše vložené do laminárního boxu, 70 % ethanolem.

V následujících krocích je stručně popsán postup pasážování:

1. Vyjmout buňky z inkubátoru
2. Kontrola buněk pod mikroskopem
3. Odstranit médium - 5ml pipetou
4. Promýt 2x5ml PBS....
5. Přidat 1ml trypsinu, promíchat
6. Nechat odstát a sledovat čas, za který se buňky začnou pouštět
7. Poté co se začnou buňky pouštět, klepnout o ruku
8. Přidat 1ml média 5ml pipetou a ponechat ji v lahvi
9. Opláchnout povrch - 5-7x
10. Přemístit buňky do centrifugačních zkumavek
11. Centrifugovat 5 minut na 1000 otáček
12. Po centrifugaci kontrola sedimentu
13. 1ml pipetou odstranit supernatant

14. Přidat 1ml média do jedné zkumavky a resuspendovat
15. Přemístit buňky do druhé a opět resuspendovat
16. Umístit buňky do kultivační láhve
17. Umístit očištěné láhve ethanolem do inkubátoru

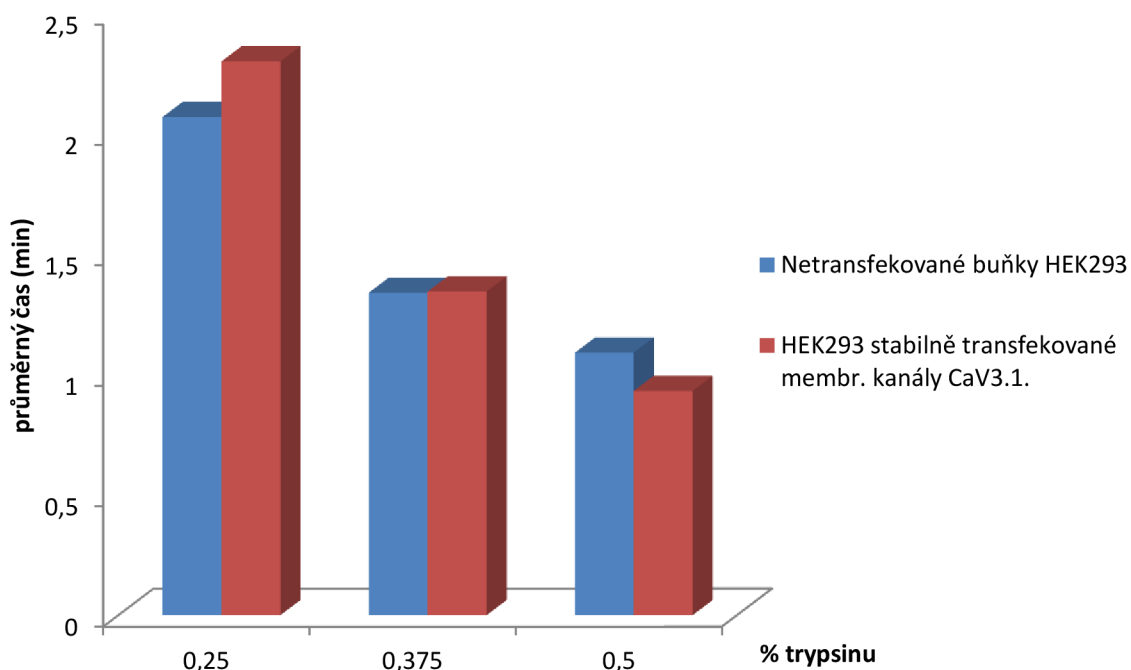
Při pasážování byl k buňkám přidán trypsin, který má za úkol natrávit peptidovou vazbu, pomocí které jsou buňky přichyceny k podloží. Byl tak sledován čas za jak dlouho se začnou adheované buňky odlepovat. Veškeré údaje jsou uvedeny v Tab. 3 a 4, jak pro netransfekované buňky HEK293 tak pro HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$. Graficky jsou zohledněny průměrné naměřené hodnoty v Obr.7.

Tab. 3: Čas, za který se začnou netransfekované buňky HEK293 odlepovat od podloží (min)

Netransfekované buňky HEK293	0,25 % trypsin	0,375 % trypsin	0,5 % trypsin
	2,15	1,46	1,46
	2,36	1,20	1,16
	1,57	1,24	1,05
	2,06	1,31	1,17
	2,08	1,54	1,00
	2,10	1,39	1,04
	2,21	1,29	1,11
	2,13	1,27	1,23
	2,03	1,41	1,09
	2,00	1,29	0,59
Průměr	2,10	1,34	1,09
Směrodatná odchylka	0,19	0,10	0,21

Tab. 4: Čas, za který se začnou stabilně transfekované buňky HEK293 odlepovat od podloží (min)

HEK293 stabilně transfekované membr. kanály $Ca_v3.1$.	0,25 % trypsin	0,375 % trypsin	0,5 % trypsin
	2,48	1,34	1,03
	2,03	1,30	0,57
	2,23	1,25	1,06
	2,23	1,30	1,14
	2,20	1,36	0,59
	2,22	1,52	1,11
	2,33	1,40	1,07
	2,34	1,27	1,04
	2,38	1,40	1,06
	2,56	1,31	1,10
Průměr	2,30	1,35	0,93
Směrodatná odchylka	0,14	0,15	0,23



Obrázek 7: Závislost koncentrace trypsinu na průměrném čase, kdy se adherované buňky odpoutají od podloží

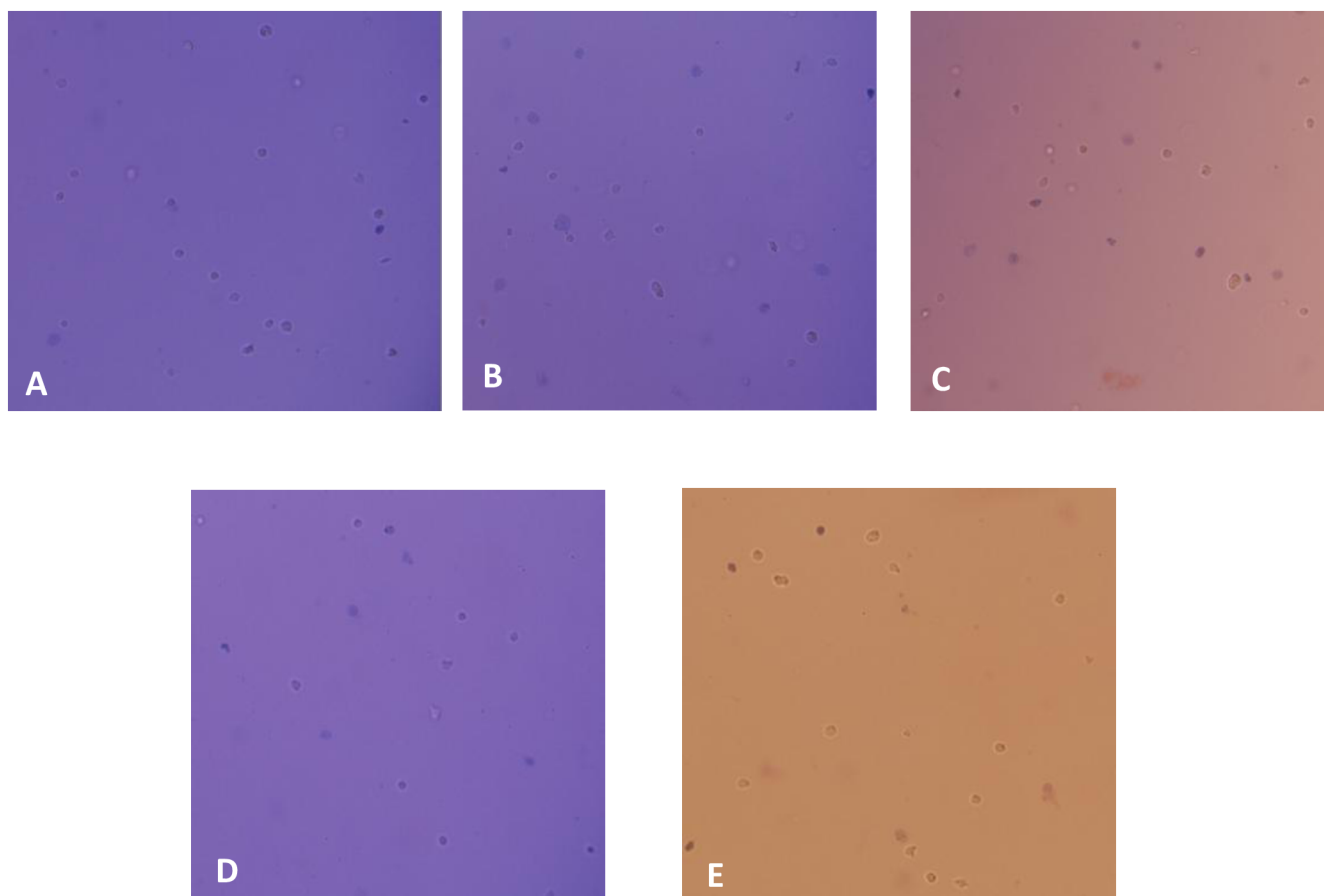
Jak je z výsledků patrné u netransfekovaných buněk HEK293, se nejrychleji od podloží odlepují buňky vystavené 0,5 % koncentraci trypsinu. Naopak nejpomaleji se odlepují buňky vystavené nejmenší – tedy 0,25 % koncentraci trypsinu. U buněk HEK293 stabilně transfekovaných membránovými kanály Ca_v3.1 je výsledek stejný. Při porovnání času obou buněčných linií se nejrychleji odpoutávají buňky transfekované při koncentraci 0,5 % trypsinu a nejpomaleji opět buňky HEK293 transfekované vystavené 0,25 % koncentraci trypsinu.

3.4 Stanovení viability

Na základě předchozího pasážování, se následně pracuje se samotnými buňkami. Počítají se viabilní a neviabilní buňky. Jak již bylo zmíněno, po pasážování se buňky obarvují trypanovou modří. Živé (viabilní) buňky přidané barvivo nepřijímají a zůstanou tedy neobarvené. Mrtvé (neviabilní) buňky jsou zcela tmavé díky obsaženému barvivo. Na základě této znalosti je lze v zorném poli od sebe rozlišit.

Při pokusech se buňky rozřídí do 3 kategorií podle použití trypsinu, tedy na 0,25 % trypsin, 0,375 % trypsin a 0,5 % trypsin a následně se počítá množství živých a mrtvých buněk. Pokud bychom chtěli znát pouze odhad, tak u adherentních buněk můžeme stanovit procento kultivačního povrchu pokryté buňkami. V našem případě je nutné přesné stanovení počtu buněk a pro tento případ se používá cytometrické komůrky (Bürkerova komůrka). Přesnost této metody je ovšem vyvážena její pracností a časovou náročností. Obrázky 8-10 a 13-15 zobrazují buňky obou buněčných linií vždy za použití 0,25 %, 0,375 %, a 0,5 % trypsinu (tedy

netransfekované buňky HEK293 a HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály Ca_v 3.1.) pod mikroskopem.



Obrázek 8: Snímky buněk transfekovaných za použití 0,25% trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)

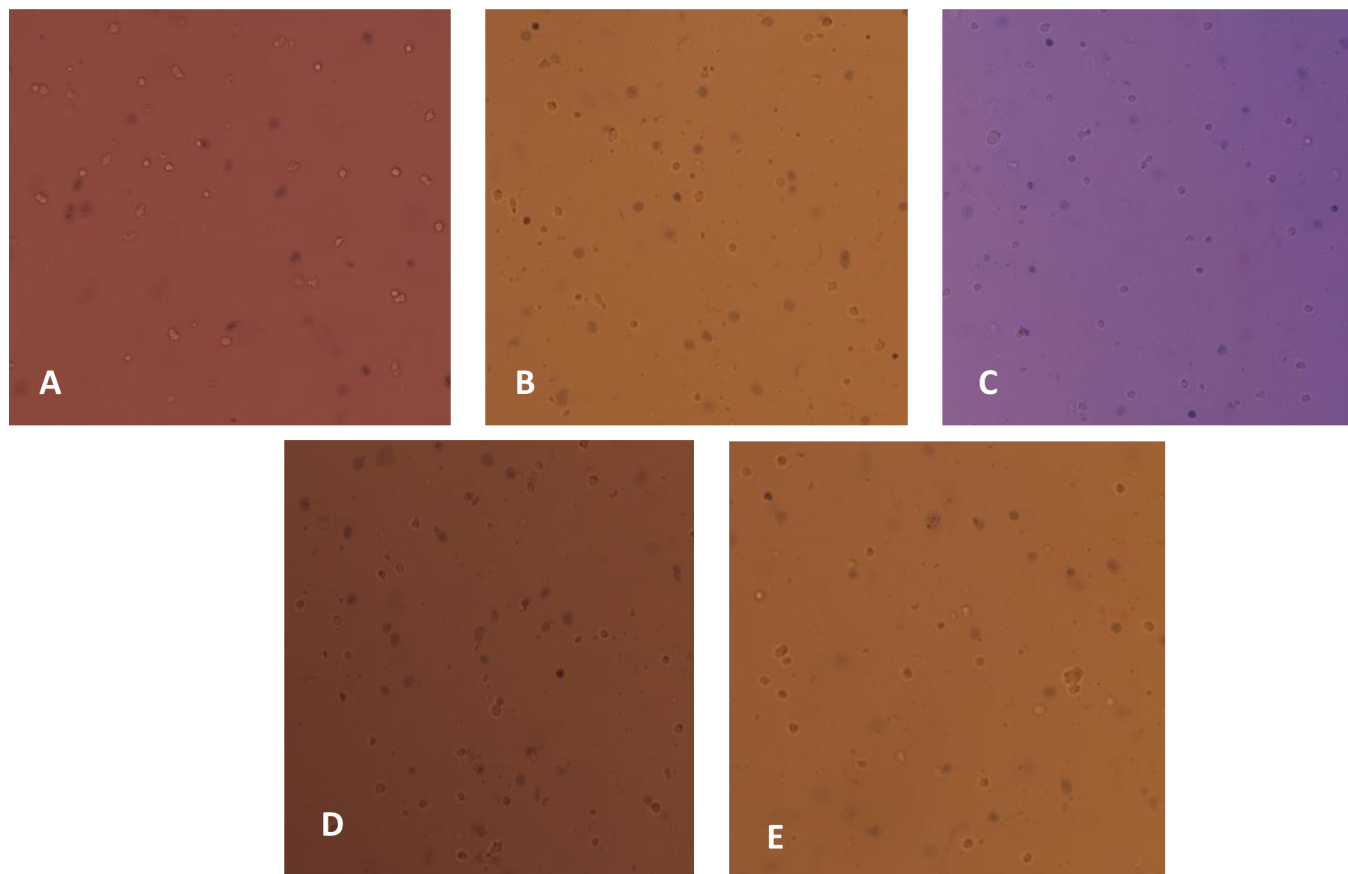
Jako měřítko pro porovnání účinku trypsinu, bylo sledování růstu jednotlivých buněčných kultur a následné hodnocení viabilních a neviabilních buněk. U jednotlivých buněčných linií byl sledován účinek 0,25%; 0,375% a 0,5 % trypsinu. Přesnost počítání buněk mohla být zatížena lidským faktorem zejména při odebrání vzorku kultury, při ředění trypanovou modří a také při samotném počítání buněk. Uvedené hodnoty jsou proto uvedené průměrem, aby se případná nepřesnost minimalizovala. Jednotlivé výsledky jsou uvedené v Tab. 5-10 a následně graficky zobrazeny v Obr. 11, 12, 16 a 17.

Tab. 5: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály Ca_v 3.1 za použití 0,25% trypsinu

Viabilní	Neviabilní
13	6
10	7
7	5
12	5
15	6

Pomocí fluorescenčního mikroskopu jsou pořízené snímky, které zobrazují viabilní a neviabilní buňky HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$ za použití 0,25 % trypsinu.

Hodnoty uvedené v tabulce 6 znázorňují počty živých a mrtvých buněk.

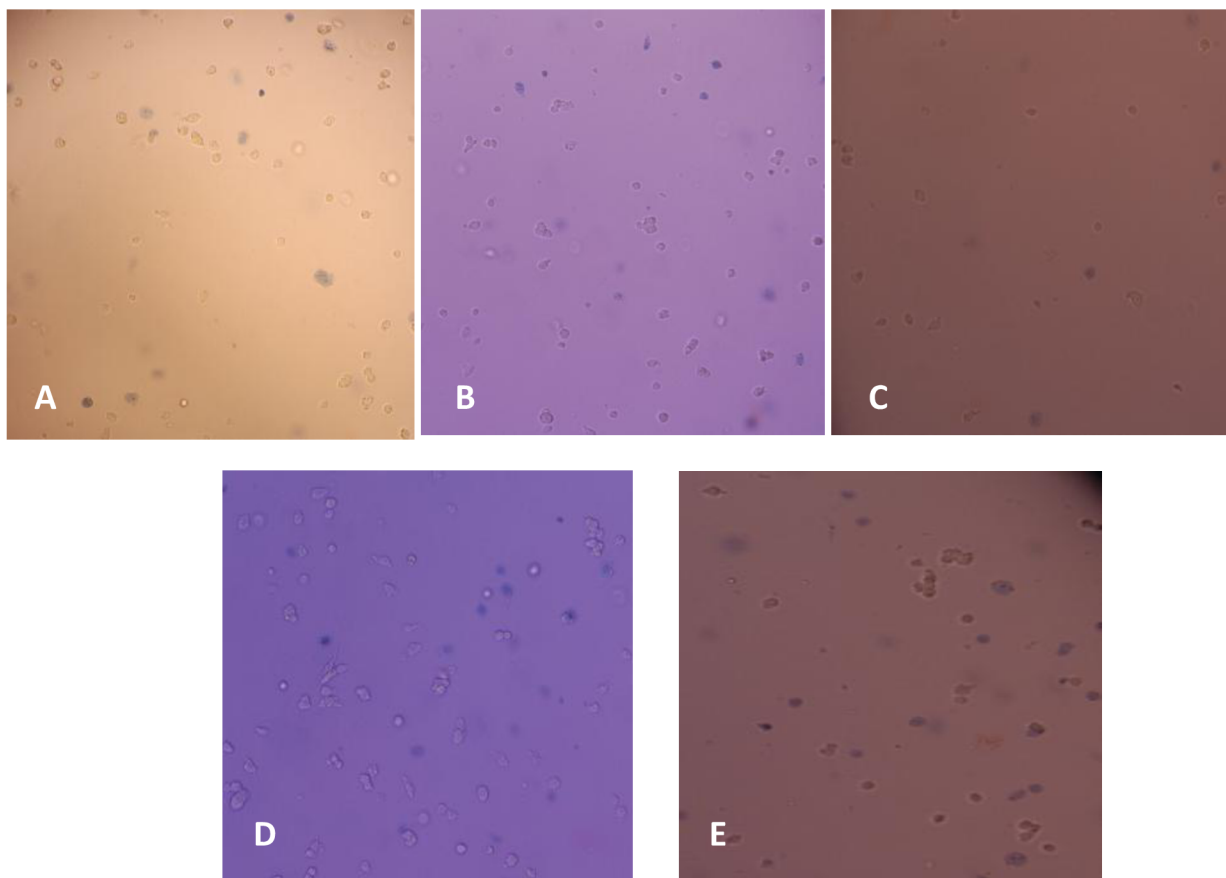


Obrázek 9: Snímky buněk transfekovaných za použití 0,375% trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)

Tab. 6: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$ za použití 0,375% trypsinu

Viabilní	Neviabilní
11	10
9	8
7	5
8	9
5	10

U druhého měření jsme snímky opět pořídily na fluorescenčním mikroskopu. Jedná se o snímky viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekovaných membránovými kanály $Ca_v3.1$ za použití 0,375 % trypsinu. Tabulka 6 pod snímky opět vyjadřuje kolik je živých a mrtvých buněk při použití 0,375 % trypsinu.

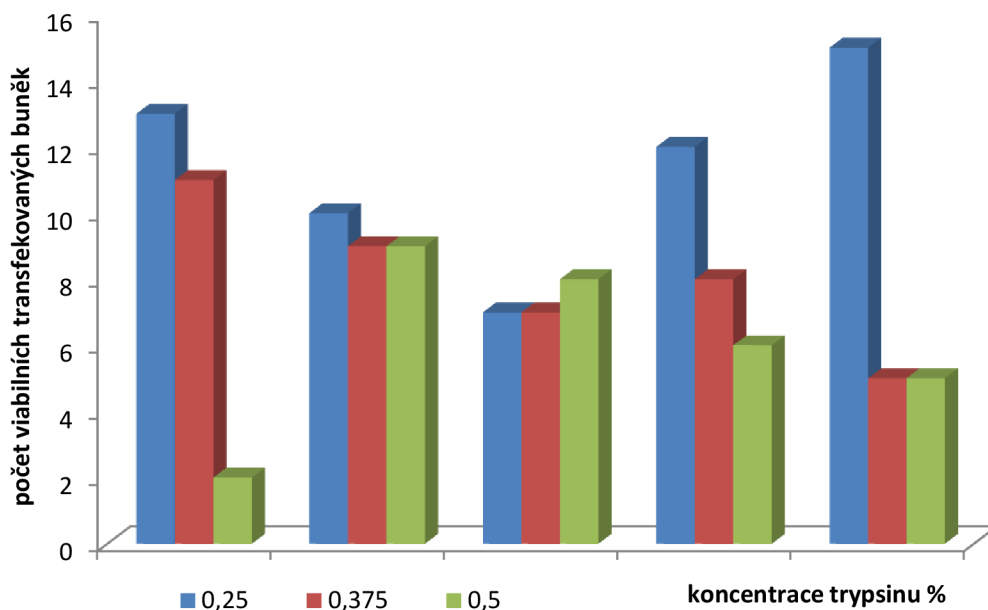


Obrázek 10: Snímky buněk transfekovaných za použití 0,5% trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)

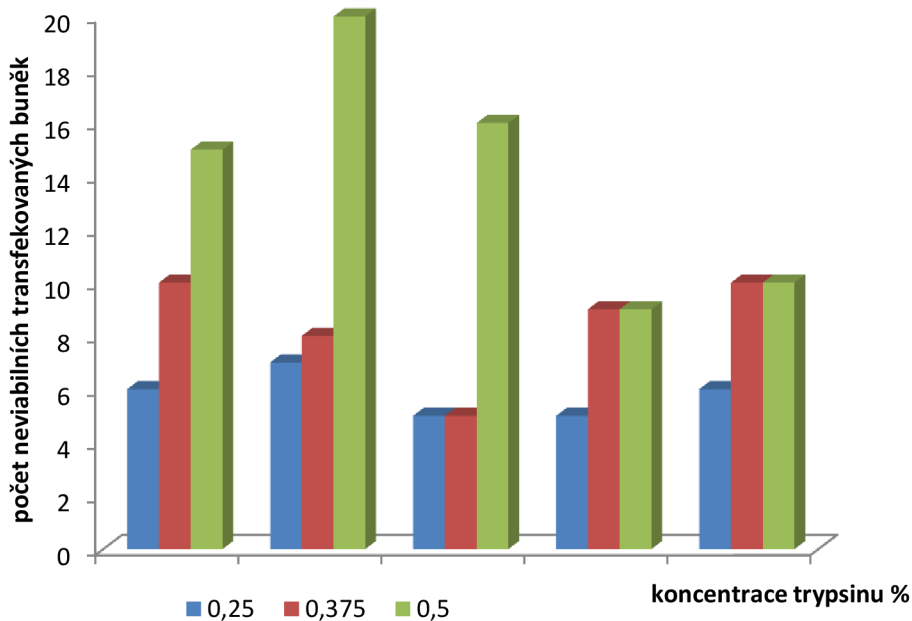
Tab. 7: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních buněk HEK293 stabilně transfekované membránovými kanály Ca_v 3.1 za použití 0,5% trypsinu

Viabilní	Neviabilní
2	15
9	20
8	16
6	9
5	10

Při třetím měření viability buněk HEK293 stabilně transfekovaných membránovými kanály Ca_v 3.1 byla použita 0,5 % koncentrace trypsinu. Toto měření bylo nejrychlejší a pořízené snímky poukázaly na skutečnost, že četnost neviabilních buněk při použití 0,5 % trypsinu je mnohem větší než u viabilních. Tento výsledek je zaznamenán i v tabulce 7.



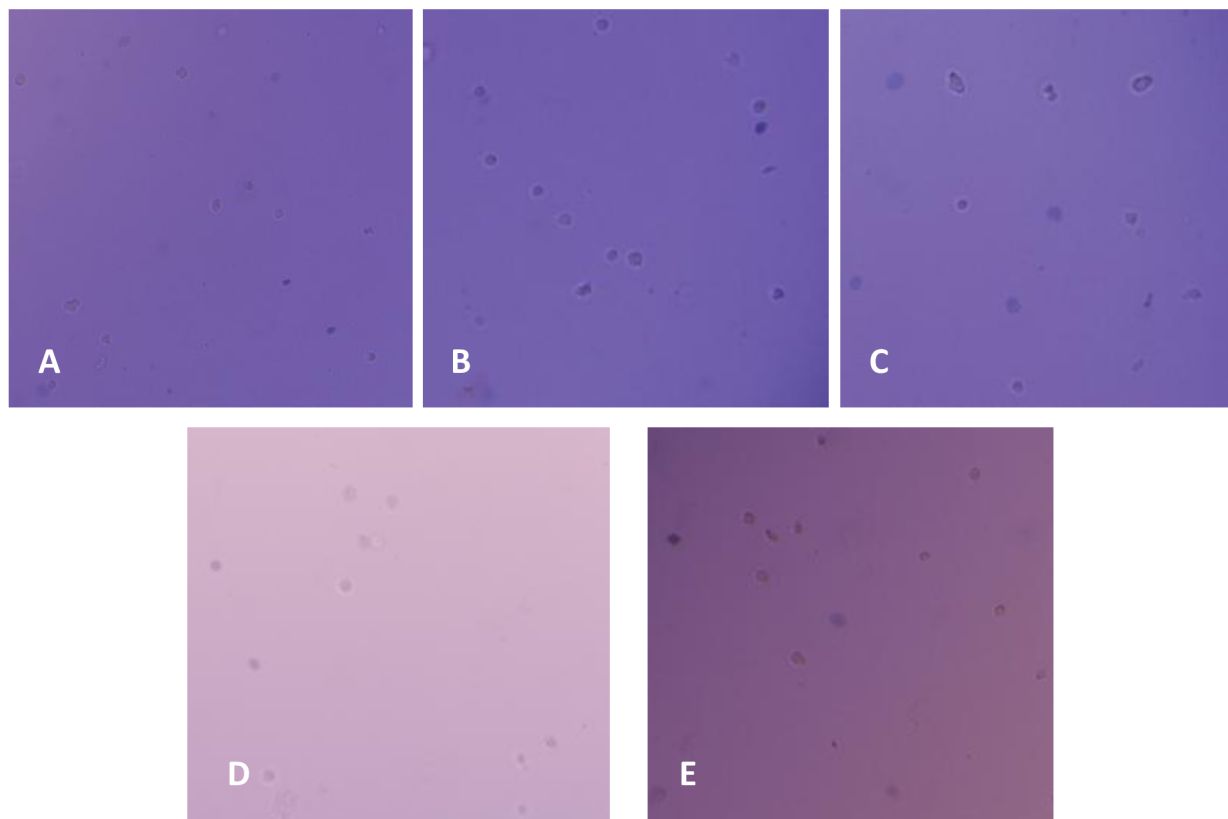
Obrázek 11: Závislost koncentrace trypsinu na počtu viabilních transfekovaných buněk



Obrázek 12: Závislost koncentrace trypsinu na počtu neviabilních transfekovaných buněk

Obrázek 11 znázorňuje závislost koncentrace trypsinu na počtu viabilních transfekovaných buněk. Jak je z grafu patrné, hodnoty naměřené u stabilně transfekovaných buněk HEK293 vykazují tedy nejvyšší viabilitu při 0,25 % koncentraci trypsinu. Naopak

nejvíce neviabilních buněk bylo spočítáno při nejvyšší koncentraci trypsinu – tedy 0,5 % koncentrace. Obrázek 12 popisuje závislost koncentrace trypsinu na počtu neviabilních stabilně transfekovaných buněk. Tady je situace přesně opačná než u obrázku 12. Největší úmrtnost vykazují buňky při použití 0,5 % trypsinu a nejmenší při koncentraci 0,25 % trypsinu.

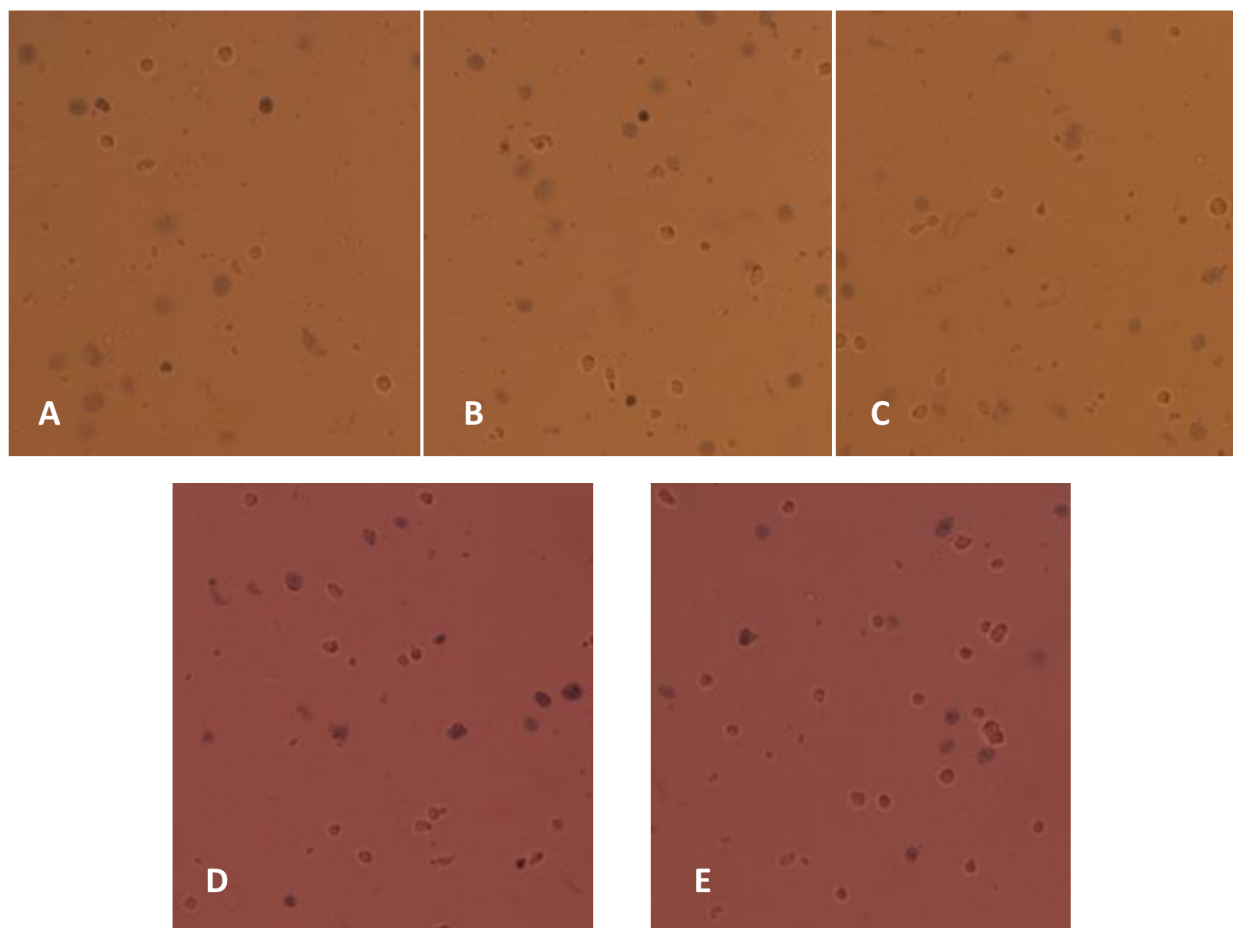


Obrázek 13: Snímky netransfekovaných buněk za použití 0,25% trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)

V tomto pozorování bylo pracováno s netransfekovanými buňkami HEK293 za použití 0,25 % trypsinu. Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem (Obr. 13) byly použity pro výpočet živých a mrtvých buněk. Hodnoty byly zaznamenány do tabulky 8, ze které je patrné, kolik buněk je viabilních a kolik neviabilních za použití 0,25 % trypsinu. Je zřejmé, že převládá množství viabilních buněk nad neviabilními.

Tab. 8: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,25 % trypsinu

Viabilní	Neviabilní
12	6
8	8
6	5
10	5
13	3

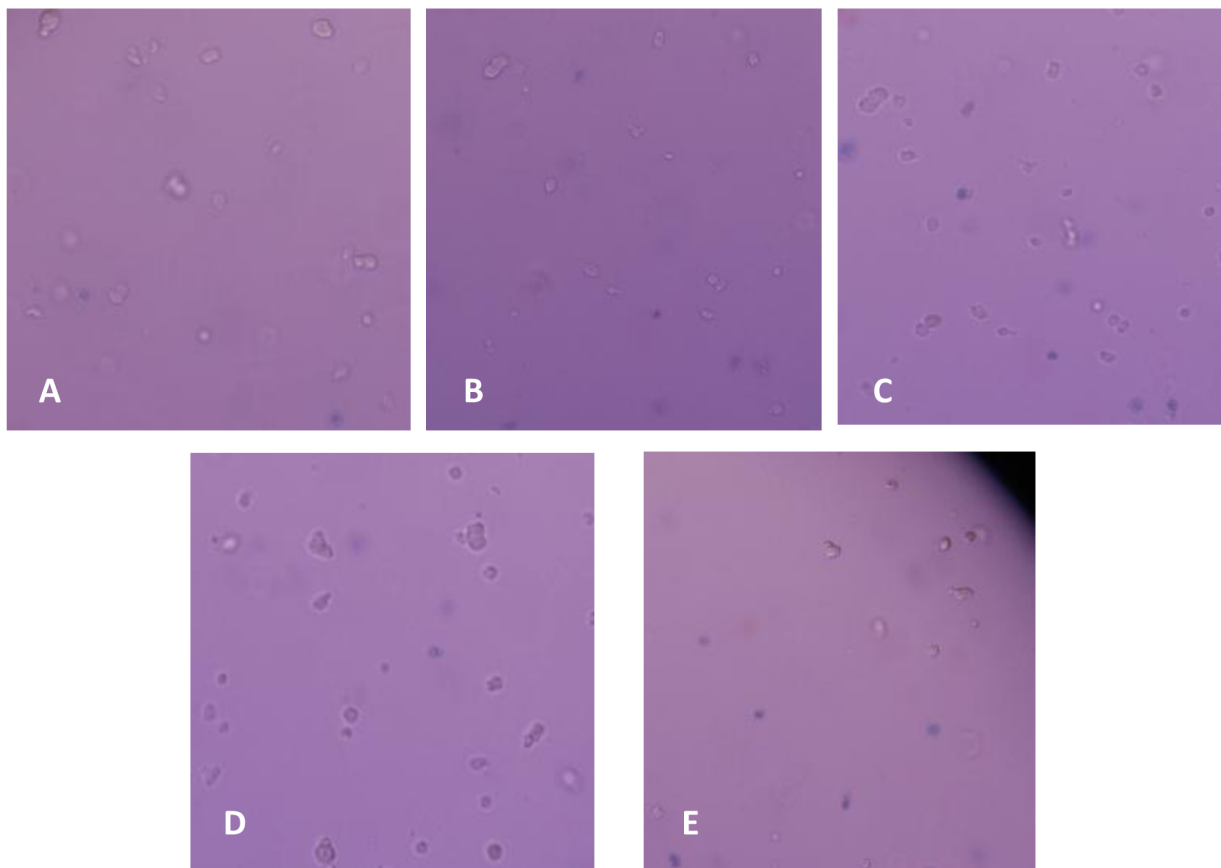


Obrázek 14: Snímky netransfekovaných buněk za použití 0,375% trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)

Obrázek 14 zachycuje snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem. Jedná se o snímky netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,375 % trypsinu. Tabulka 9 pod snímky opět vyjadřuje kolik je živých a mrtvých buněk při použití 0,375 % trypsinu. Můžeme konstatovat, že jejich množství, tedy viabilních a neviabilních, je přibližně stejné.

Tab. 9: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,375 % trypsinu

Viabilní	Neviabilní
9	9
8	8
9	4
10	10
7	13

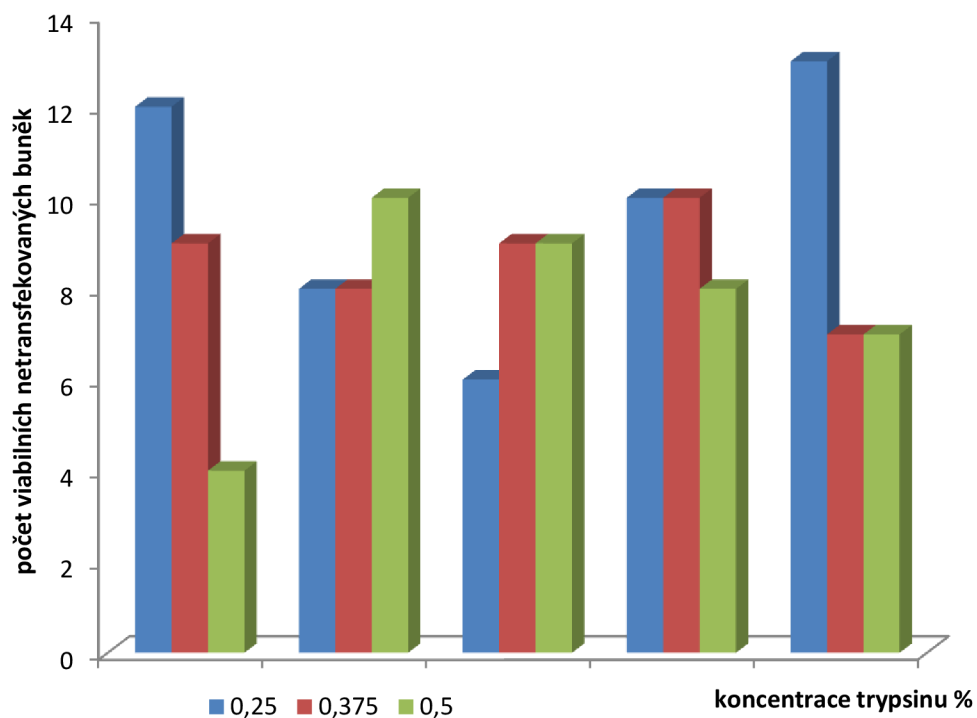


Obrázek 15: Snímky netransfekovaných buněk za použití 0,5 % trypsinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv se zvětšením 10x)

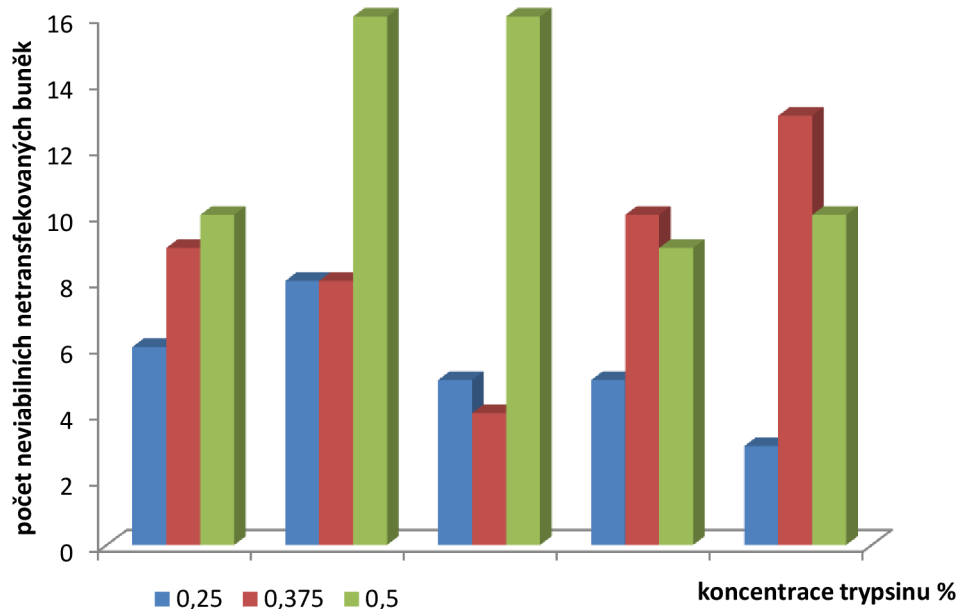
Obrázek 15 zachycuje snímky znázorňující netransfekované buňky HEK293 za použití 0,5 % trypsinu. Znázorněná tabulka 10 zachycuje množství viabilních a neviabilních buněk při této koncentraci. Měření tedy potvrdilo skutečnost, že při použití 0,5 % trypsinu je větší množství buněk neviabilních.

Tab. 10: Tabulka s hodnotami viabilních a neviabilních netransfekovaných buněk HEK293 za použití 0,5% trypsinu

Viabilní	Neviabilní
4	10
10	16
9	16
8	9
7	10



Obrázek 16: Závislost koncentrace trypsinu na počtu viabilních netransfekovaných buněk



Obrázek 17: Závislost koncentrace trypsinu na počtu neviabilních netransfekovaných buněk

Obrázek 16 popisuje graficky viabilitu netransfekovaných buněk HEK293. Z výsledků vyplývá, že netransfekované buňky HEK293 vykazují nejvyšší viabilitu při 0,25 % koncentraci trypsinu. Obrázek 17 popisuje závislost koncentrace trypsinu na množství neviabilních buněk. Z grafu vyplývá, že nejvíce neviabilních buněk bylo spočítáno při 0,5 %

koncentraci trypsinu. Při porovnání obou buněčných kultur lze konstatovat, že při koncentraci 0,25 % trypsinu je nejvíce viabilních buněk HEK293 stabilně transfekovaných. Nejvíce neviabilních buněk je naopak při koncentraci 0,5 % trypsinu u kultury netransfekované.

Pro přehlednější a jasnější výsledky byl vypočítán průměr hodnot viabilních buněk a všech buněk v zorném poli jak u stabilně transfekovaných tak netransfekovaných HEK293 buněk. Výsledné hodnoty byly zaznamenány v Tab. 11-16.

Tab. 11: Tabulka s hodnotami viabilních a všech transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,25 % trypsinu

	Viabilní buňky	Všechny buňky
	13,00	19,00
	10,00	17,00
	7,00	12,00
	12,00	17,00
	15,00	21,00
průměr	11,40	17,20
směrodatná odchylka	2,73	2,99

procenta: 66 % viabilních ze všech

Tab. 12: Tabulka s hodnotami viabilních a všech transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,375 % trypsinu

	Viabilní buňky	Všechny buňky
	11,00	21,00
	9,00	17,00
	7,00	12,00
	8,00	17,00
	5,00	15,00
průměr	8,00	16,40
směrodatná odchylka	2,00	2,94

procenta: 48 % viabilních ze všech

Tab. 13: Tabulka s hodnotami viabilních a všech transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,5 % trypsinu

	Viabilní buňky	Všechny buňky
	2,00	17,00
	9,00	29,00
	8,00	24,00
	6,00	15,00
	5,00	15,00
průměr	6,00	20,00
směrodatná odchylka	2,45	5,59

procenta: 30 % viabilních ze všech

Tab. 14: Tabulka s hodnotami viabilních a všech netransfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,25 % trypsinu

	Viabilní buňky	Všechny buňky
	12,00	18,00
	8,00	16,00
	6,00	11,00
	10,00	15,00
	13,00	16,00
průměr	9,80	15,20
směrodatná odchylka	2,56	2,32

procenta: 65 % viabilních ze všech

Tab. 15: Tabulka s hodnotami viabilních a všech netransfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,375 % trypsinu

	Viabilní buňky	Všechny buňky
	9,00	18,00
	8,00	16,00
	9,00	13,00
	10,00	20,00
	7,00	20,00
průměr	8,60	17,40
směrodatná odchylka	1,02	2,65

procenta: 49 % viabilních ze všech

Tab. 16: Tabulka s hodnotami viabilních a všech netransfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,5 % trypsinu

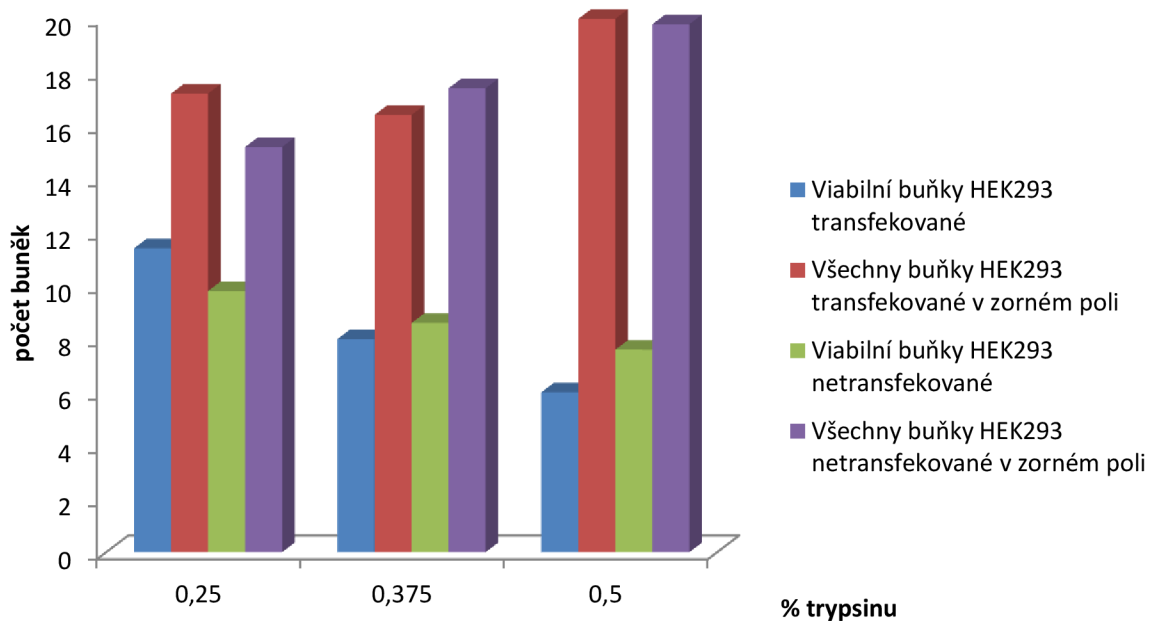
	Viabilní buňky	Všechny buňky
	4,00	14,00
	10,00	26,00
	9,00	25,00
	8,00	17,00
	7,00	17,00
průměr	7,60	19,80
směrodatná odchylka	2,06	4,79

procenta: 38 % viabilních ze všech

Z průměrných hodnot viabilních a všech buněk v zorném poli (stabilně transfekovaných i netransfekovaných) byl spočítán jejich procentuální poměr u všech použitých koncentrací trypsinu. Tyto výsledky jsou uvedené v Tab. 17.

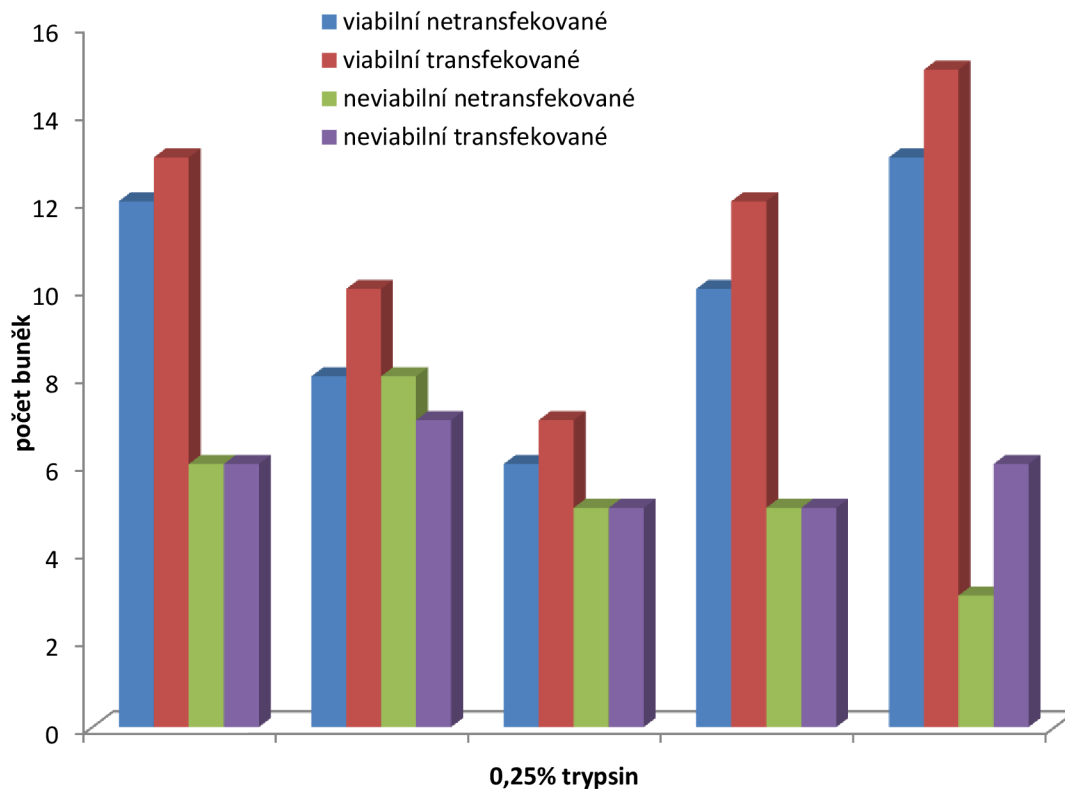
Tab. 17: Tabulka s procentuálním poměrem viabilních a všech netransfekovaných a transfekovaných buněk HEK293 v zorném poli za použití 0,25 %; 0,375 % a 0,5 % trypsinu

	0,25 % trypsin	0,375 % trypsin	0,5 % trypsin
HEK293 stabilně transfekované membr. kanály Cav3.1.	66 %	48 %	30 %
HEK293 netransfekované	65 %	49 %	38 %



Obrázek 18: Závislost viability buněk HEK293 transfekovaných a netransfekovaných na koncentraci trypsinu

Z výsledných hodnot tabulky 17 a grafickým znázorněním obrázkem 18 se jako nejvhodnější koncentrací zdá být 0,25 % trypsin, i když časová prodleva jeho účinku je vyšší než při ostatních použitých koncentracích. Jeho koncentrace má tedy nejmenší vliv na degradaci buněčné membrány a tak i na životnost (viabilitu) jednotlivých buněk. Při sledování účinnosti trypsinu na jednotlivých typech buněčných kultur se potvrdil předpoklad, že 0,25 % trypsin je efektivnější u buněčné linie stabilně transfekované membránovými kanály Cav3.1. To lze potvrdit i graficky obrázkem č. 19.



Obrázek 19: Závislost 0,25 % koncentrace trypsinu na počtu buněk (viabilních netransfekovaných, viabilních transfekovaných, neviabilních netransfekovaných a neviabilních transfekovaných)

Tento obrázek přesně zachycuje počet viabilních a neviabilních buněk obou použitých kultur při koncentraci 0,25 % trypsinu. Vyšší viability stabilně transfekovaných buněk HEK293 je dosaženo nejpravděpodobněji díky přítomným membránovým kanálům. Lze předpokládat, že jejich přítomnost zvyšuje stabilitu a tedy následně i jejich vyšší viabilitu než u buněk netransfekovaných.

Dalším cílem této práce bylo vytvoření návrhu pro metodiku studia vlivu trypsinu na membrány buněčných linií HEK293, který je uveden v příloze. Tato metodika umožňuje snadné a rychlé otestování uvedené problematiky. Jednotlivé kroky metodiky popisují celý pracovní postup a seznámí s problematikou kultivace, pasážování, barvení či počítání jednotlivých viabilních a neviabilních buněk.

4. Závěr

Buněčná membrána obsahuje velké množství proteinů, které jsou pro buňku velmi důležité, protože jsou odpovědné za různé biologické aktivity. Buněčná membrána je vystavena vnějšímu prostředí a je důležitým místem pro mezibuněčnou komunikaci. Existuje velké množství proteinových receptorů a identifikačních proteinů, jako jsou antigeny, které jsou přítomné na povrchu membrány. Trypsin, jakožto proteolytický enzym, tak může tyto membránové proteiny degradovat a tím ovlivnit celkový stav buňky.

Základním cílem této práce byla optimalizace koncentrace trypsinu na membrány buněčných linií HEK293. V první fázi byly srovnány časové hodnoty při stanovených koncentracích trypsinu (0,25; 0,375 a 0,5 %) u dvou typů linií - buněčné linie HEK293 netransfekované a buněčné linie stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$. V další části byly porovnány počty viabilních a neviabilních buněk opět u buněčné linie HEK293 netransfekované a buněčné linie stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$. Z uvedených výsledků lze konstatovat, že nejvíce viabilních buněk a zároveň nejméně neviabilních buněk obou linií bylo napočítáno při použité koncentraci 0,25 % trypsinu. Naopak nejvíce neviabilních a nejméně viabilních buněk bylo sledováno při koncentraci 0,5 % trypsinu.

Jako nevhodnější koncentrace tedy byla zvolena 0,25 % trypsin, i když časová prodleva jeho účinku je vyšší než při ostatních použitých koncentracích. Trypsin při koncentraci 0,25 % má nejmenší vliv na degradaci buněčné membrány a tak i na životnost jednotlivých buněk. Při porovnání efektivnosti u zvolených linií se také potvrdil předpoklad, že množství viabilních buněk je větší u buněčné linie stabilně transfekované membránovými kanály $Ca_v3.1$.

Těchto výsledků je dosaženo nejpravděpodobněji díky přítomným membránovým kanálům. Lze předpokládat, že jejich přítomnost zvyšuje stabilitu a tedy následně i jejich vyšší viabilitu než u buněk netransfekovaných.

Nakonec byl vytvořen návrh pro metodiku studia vlivu trypsinu na membrány buněčných linií HEK293, který je uveden v příloze. Tato metodika umožňuje snadné a rychlé otestování uvedené problematiky.

Použitá literatura

- [1] WEBB, Edwin C. *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. San Diego: Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, c1992, xiii, 862 p. ISBN 0122271653.
- [2] Eur. J. Biochem. 223, 1 (1993); Eur. J. Biochem.232, 1 (1995); Eur. J. Biochem.237, 1 (1996); Eur. J. Biochem.250, 1 (1997); Eur. J. Biochem. 264, 610 (1999).
- [3] [online]. [cit. 2015-02-03]. Dostupné z:
<http://www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=46>
- [4] [online]. [cit. 2015-01-25]. Dostupné z:
www.worthington-biochem.com/TRY/default.html
- [5] KÜHNE, W. *Ueber die Verdauung der Eiweisstoffe durch den Pankreassaft*. ISBN 10.1007/bf01878988.
- [6] OLSEN, J. V. *Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues*. ISBN 10.1074/mcp.t400003-mcp200.
- [7] CHAMRÁD, Ivo, Ondřej STROUHAL, Pavel ŘEHULKA, René LENOBEL, Marek ŠEBELA, S. STOEVA, G. GRÜBLER, S. HÖRGER, A. KEEN, W. VOELTER a Wendy SANDOVAL. *Microscale affinity purification of trypsin reduces background peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of protein digests*. ISBN 10.1002/0471140864.ps1602s77.
- [8] Schonburg, D., Salzman, M. (2005) *Enzyme Handbook* 5, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung.
- [9] VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, xiv, 1325, xxiii s. ISBN 80-85605-44-9.
- [10] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed., rev. and enl. Ilustrace Jürgen Wirth. Stuttgart: Thieme, 2005, x, 467 s. Thieme flexibook. ISBN 1588902471.
- [11] Keil-Dlouhá V., Zylber N., Imhoff J., Tong N., Keil B.: *FEBS Lett.* 16, 291 (1971).
- [12] ŠTOSOVÁ T., HAVLIŠ J., LENOBEL R., et al. Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku. *Chem. Listy*. 2005, roč. 99, s. 896–905.
- [13] SCOTT, Thomas a Mary EAGLESON. *Concise encyclopedia biochemistry*.
- [14] Walsh K. A., Neurath H. (1964) Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 884 – 889.
- [15] Perona J. J, Craik Ch. S. (1997) Evolutionary Divergence of Substrate Specificity within the Chymotrypsin-like Serine Protease Fold. *J. Biol. Chem.* 272, 29987 – 29990.
- [16] Iván, Gábor.; Szabadka, Zoltán; Ordög, Rafael; Grolmusz, Vince; Náray-Szabó, Gábor (2009). "Four Spatial Points That Define Enzyme Families". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **383** (4): 417–420. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.022. PMID 19364497
- [17] Jeremy M Berg, John L Tymoczko, Lubert Stryer, W H Freeman New York 0-7167-3051-02002 Copyright © 2002, W. H. Freeman and Company 2002.

- [18] Trypsin. LEMPINEN, M, et al. Sequential changes in pancreatic markers in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 2003, vol. 38, no. 6, s. 666-75, ISSN 0036-5521
- [19] Chymotrypsin. VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie.* Praha : Academia, 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [20] Trypsin inhibitor. SILBERNAGL, Stefan; DESPOPOULOS, Agamemnon. *Atlas fyziologie člověka.* 6.. vyd. Praha : Grada Publishing, 2004. 448 s. ISBN 80-247-0630-X.
- [21] Dhillon, Soraya and Gill, Kiren. "Basic Pharmacokinetics." 28 Oct. 2012. Dostupné z: http://www.pharmpress.com/files/docs/clinical_pharmacokinetics_samplechapter.pdf
- [22] Cytoplazmatická membrána. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science. ISBN 0-8153-3218-1.
- [23] RÉDEI, George P.. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics.* 3rd Edition. vyd. [s.l.] : Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6753-2.
- [24] *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology; revised edition.* Příprava vydání R. Cammack et al. New York : Oxford university press, 2006. ISBN 0-19-852917-1.
- [25] POLLARD, Thomas D; EARNSHAW, William C. *Cell Biology.* 2. vyd. [s.l.] : Saunders, 2007. ISBN 1416022554. S. 928.
- [26] Huang, H. L.; Hsing, H. W.; Lai, T. C.; Chen, Y. W.; Lee, T. R.; Chan, H. T.; Lyu, P. C.; Wu, C. L.; Lu, Y. C.; Lin, S. T.; Lin, C. W.; Lai, C. H.; Chang, H. T.; Chou, H. C.; Chan, H. L. (2010). "Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells". *Journal of Biomedical Science* 17 (1): 36. doi:10.1186/1423-0127-17-36. PMC 2873939. PMID 2045977
- [27] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36:59-74.
- [28] Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005;51:187-200.
- [29] Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* 6, 2959 – 2963.
- [30] Vonka, V. (2002) Genová terapie. *Postgrad. Med.* 2 563-569.
- [31] SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M., GRAHAM, F. L.: *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells.* *FASEB Journal* 16, 869 – 885 s., 2002.
- [32] AMAR, L., DESCLAUX, M., FAUCON-BIGUET, N., MALLET, J., VOGEL, R.: *Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter.* *Nucleic Acids Research* 34 (5), 2006
- [33] KANNO, T., YAMAMOTO, H., YAGUCHI, T., HI, R., MUKASA, T., FUJIKAWA, H., NAGATA, T., YAMAMOTO S., TANAKA, A., NISHIZAKI, T.: *The linoleic acid derivative DCP-LA selectively activates PKC-epsilon, possibly binding to the phosphatidyl serine binding site.* *Journal of Lipid Research* 47 (6), 1146 – 1156 s., 2006

- [34] REEVES., P. J., THURMOND, R. L., KHORANA, H. G.: Structure and function in rhodopsin: High level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines. *Biochemistry* 93, 11487 – 11492 s., 1996.
- [35] TOM, R., BISSON, L., DUROCHER, Y.: Transient expression in HEK293-EBNA1 cells, *Expression systems* (DYSON, M. R., DUROCHER, Y. ed.). Bloxham: Scion Publishing Ltd., 203 – 23 s., 2007.
- [36] [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [37] WURM, F.: *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. *Nature Biotechnology* 22, 1393 – 1398 s., 2002.
- [38] ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., VAN 'T RIET K.: *Modeling of the Bacterial Growth Curve*. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6), 1875 – 1881 s., 199.
- [39] DAVIS, J. M.: *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford University Press, 2. vydání, 2002
- [40] STRIESSNIG, Jörg, William A. CATTERALL, H. REUTER, Roger A. BANNISTER, Ulises MEZA, Brett A. ADAMS, William A. CATTERALL, Melanie E. M. KELLY a Steven BARNES. Targeting voltage-gated Ca² channels: Generalization. *The Lancet*. 2001, vol. 357, issue 9264, s. 334-345. DOI: 10.1007/0-387-27526-6_22.

Příloha 1 – navržená metodika pro studium vlivu trypsinu na membrány buněčných linií HEK293

Teoretická část

Buněčné linie se získávají cílenou selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních nebo chemických mutagenů nebo přímo z nádorových buněk. Jsou plně adaptovány na podmínky in vitro a mohou být pasážovány neomezeně dlouhou dobu. Jejich charakter se však mění během pasážování a buňky v kultuře se často liší velmi výrazně od buněk tkání, ze kterých byly získány. Jejich charakteristickým znakem je heteroploidní počet chromozomů.

Buněčná linie HEK293 byla odvozena z ledviny zdravého lidského embrya (human embryonal kidney – HEK). Jedná se o lidské epiteliální buňky, které jsou transformované pomocí lidského DNA viru - adenoviru typu 5 [27]. Na rozdíl od prokaryotických expresních systémů je však poměrně náchylný na infekci, má delší generační dobu, vyžaduje drahá kultivační média a kvalitní vybavení laboratoře. Nicméně jsou velmi snadno transfekovatelné, a tak mohou být použity v pokusech, ve kterých chování buňky samotné není předmětem zájmu. HEK293 buňky se také používají proto, že neexprimují velké množství napětově řízených kanálů. Existuje tedy předpoklad, že proudová odezva z těchto buněk je celá z kanálu, který je do buněk vpraven transfekcí. Další výhodou této linie je rychlá proliferace a jednoduchá kultivace.

Navrženou metodiku se používaly buněčné linie HEK293 dvou typů. Jedna buněčná linie byla tvořena netransfekovanými buňkami, druhá byla stabilně transfekovaná membránovým kanálem $Ca_v3.1$.

Transfekce savčích buněk je proces, při kterém je do eukaryotické buňky vložen plazmidový konstrukt, který obsahuje kódující sekvenci pro rekombinantní protein. Transfekce může být dočasná (transientní), nebo stabilní. Při transientní transfekci DNA vstupuje do jádra hostitelské buňky, kde dochází k transkripci, ale nedojde k stabilní integraci do genomu. To má za následek poměrně rychlou expresi požadovaného proteinu, která ovšem po několika dnech až týdnech mizí. Při stabilní transfekci je cizorodá DNA náhodně začleněna do genomu hostitelské buňky a replikuje se zároveň s ní. K začlenění cizorodé DNA dojde pouze v malém počtu buněk, proto je nutné tyto buňky namnožit a podrobit selekci. Stabilní transfekce je na rozdíl od transientní zdlouhavější, ale vede k získání stálého produkčního klonu buněk.

Buněčná membrána obsahuje velké množství proteinů, typicky kolem 50 % membránového objemu. Tyto proteiny jsou pro buňku důležité, protože jsou odpovědné za různé biologické aktivity. Buněčná membrána je vystavena vnějšímu prostředí a je důležitým místem pro mezibuněčnou komunikaci. Existuje velké množství proteinových receptorů a identifikačních proteinů, jako jsou antigeny, které jsou přítomné na povrchu membrány. Trypsin jakožto proteolytický enzym tak může tyto membránové proteiny degradovat a tím ovlivnit celkový stav buňky. Nejčastěji se používá k oddělení buněk od substrátu, jakmile

buňky dosáhnou vysoké konfluence a dále se pasážují. Jedná se tedy o rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem pomocí proteasy trypsinu, proto se často hovoří o tzv. trypsinizaci buněk. Jak bude na závěr metodiky patrné, jeho koncentrace značně ovlivňuje rychlost odpoutání adherovaných buněk od podloží.

Kultivace, pasážování, barvení a počítání buněk

Kultivace buněk in vitro (ve zkumavce) je snaha o napodobení podmínek v organismu. Během kultivace se používají jednorázový spotřební materiál a speciální chemikálie pro kultivaci buněčných kultur. Při kultivaci dochází k množení buněk, které je nutné následně naředit a přenést do nových kultivačních nádob. Tomuto postupu říkáme pasážování, při kterém vzniká sekundární kultura neboli subkultura. K uvolnění adherentních buněk od kultivačního povrchu i od sebe navzájem se provádí působením proteáz, v našem případě trypsinem. Pro přesné stanovení počtu buněk se stále standardně používá počítání v cytometrické komůrce (v Bürkerově komůrce). Přesnost této metody je ovšem vyvážena její pracností a časovou náročností. Nejčastěji se využívá tzv. Trypan Blue Exclusion test, založený na skutečnosti, že zdravá (živá) buňka, pokud je vystavena okolnímu prostředí se specifickým barvivem (např. trypanová modř), nepustí barvivo do intracelulárního prostoru díky integritě buněčné membrány a funkčnosti transportních systémů. Naopak buňky mrtvé či poškozené se nabarví trypanovou modří. Buněčnou suspenzi v roztoku trypanové modři pak hodnotíme mikroskopicky, kdy určíme jak počet buněk v daném objemu buněčné suspenze, tak i podíl živých (nenabarvených) buněk v celkové buněčné populaci.

Praktická část

Použitý materiál a přístroje

- inkubátor CO2 Cell od BMT
- mikroskop Olympus IX71
- elektrická pipeta
- serologické pipety 15 ml
- centrifuga na 15ml pipety
- Bürkerova komůrka
- lednice
- nitrilové rukavice

Chemikálie

- EMEM (Sigma)
- 10 % FBS (Sigma)
- PBS
- 1 % penicilin/streptomycin (Sigma)

- 1 % L-glutamin (Sigma)
- 1 % Genomycin (Sigma)
- 10 % DMSO (Sigma)
- Trypsin – EDTA 10x (Sigma)
- Trypanová modř (Sigma)
- 70 % ethanol

Buněčné linie

- HEK293
- HEK293 transfekovaná membránovým kanálem $Ca_v3.1$

Pracovní postup zahrnuje následující kroky:

1. Kultivace
2. Pasážování
3. Obarvení a testování viability

1. Kultivace

Kultivace buněk buněčných linií HEK293 se kultivují v kultivačních nádobách v inkubátoru při teplotě 37 °C a v atmosféře obohacené 5 % oxidu uhličitého. Kultura se pěstuje v médiu EMEM obohaceném 10 % fetálního bovinního séra (FBS). K této směsi se přidává 1 % antibiotikum (ATB) směs penicilin/streptomycin, 1% L-glutamine a v případě buněčné linie transfekované $Ca_v3.1$ se do média přidá také Genomycin, který vyselektuje pouze buňky transfekované kanálem $Ca_v3.1$. Buněčná kultura se po inkubaci přesazuje dle potřeb pokusu na médium EMEM připravené stejným způsobem (10 % FBS, 1 % ATB, 1% L-glutamine, Genomycin).

2. Pasážování

Celý pracovní postup se provádí za sterilních podmínek. Nutná je práce v nitrilových rukavicích (bez pudru). Aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků, či ztrátě buněk, je nutné ošetřit pracovní plochy před i po práci, stejně tak vše vložené do boxu, 70 % ethanol. Následujícími kroky jednoduše popisují proces pasážování a trypsinizaci.

1. Vyjmout buňky z inkubátoru
2. Kontrola buněk pod mikroskopem
3. Odstranit médium - 5ml pipetou
4. Promýt 2x5ml PBS
5. Přidat 1ml trypsinu, promíchat
6. Nechat odstát a sledovat čas, za který se buňky začnou pouštět
7. Poté co se začnou buňky pouštět, klepnout o ruku

8. Přidat 1ml média 5ml pipetou a ponechat ji v lahvi
9. Opláchnout povrch - 5-7x
10. Přemístit buňky do centrifugačních zkumavek
11. Centrifugovat 5minut na 1000 otáček
12. Po centrifugaci kontrola sedimentu
13. 1ml pipetou odstranit supernatant
14. Přidat 1ml média do jedné zkumavky a resuspendovat
15. Přemístit buňky do druhé a opět resuspendovat
16. Umístit buňky do kultivační láhve
17. Umístit očištěné láhve ethanolem do inkubátoru

3. Obarvení a testování viability

Na základě předchozího pasážování, se následně pracuje se samotnými buňkami za normálních podmínek (teplota cca 22 °C, atmosférický tlak). Počítají se viabilní a neviabilní buňky. Jak již bylo zmíněno, po pasážování se buňky obarvují trypanovou modří. Živé (viabilní) buňky zůstanou neobarvené, mrtvé (neviabilní) buňky jsou zcela tmavé díky obsaženému barvivu. Na základě této znalosti je lze v zorném poli od sebe rozlišit. Při pokusech se buňky roztrídí do 3 kategorií podle použití trypsinu, tedy na 0,25 % trypsin, 0,375 % trypsin a 0,5 % trypsin a následně se počítá množství živých a celkový počet buněk. Z těchto výsledků se nakonec udělá poměr. Jelikož je nutné přesné stanovení počtu živých a mrtvých buněk, využívá se pro tento případ cytometrické komůrky (Bürkerova komůrka).