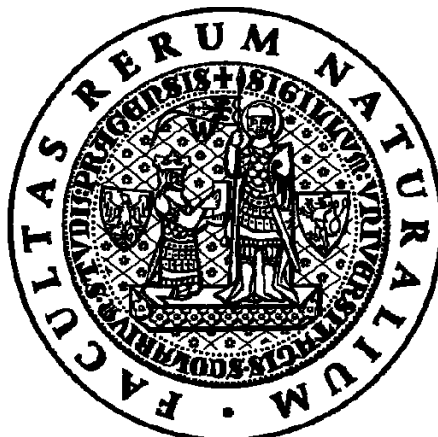


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



**Optimalizace rekombinantní exprese proteinů  
v HEK293 buněčné linii**

*Optimization of recombinant protein expression in HEK293 cell line*

**Bakalářská práce**

*Autor: Jan Bláha*

*Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk*

*Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.*

**Praha 2010**

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Ondřeji Vaňkovi za odborné vedení práce, trpělivost a snahu mě naučit novým dovednostem a Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování bakalářské práce a odborné vedení. Dále děkuji RNDr. Janu Svobodovi za vyhodnocení dat z průtokové cytometrie a Mgr. Petře Celadové za pomoc při práci. Všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR bych rád poděkoval za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu kdykoliv poradit a pomoci. V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům za jejich nesmírnou trpělivost a neustálou podporu v době mého studia.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Mgr. Ondřeje Vaňka a Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

**Abstrakt:**

Savčí buňky jsou dominantním systémem pro rekombinantní expresi farmaceutických proteinů. S rozvojem metodiky transientní transfekce savčích buněk se tento systém stává vhodným také pro strukturní biologii. Tato práce se zabývala optimalizací rekombinantní exprese v buněčných liniích HEK293T a HEK293-6E v různých médiích za použití snadno stanovitelných reportérových proteinů - sekretované alkalické fosfatasy (SEAP) a zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Důraz byl kladen na optimalizaci klíčových faktorů tvorby transfekčního komplexu – poměru DNA a polyethyleniminu a množství vložené DNA. Sledován byl i pozitivní vliv inhibitoru histonových deacetylase kyseliny valproové a dále kaseinového hydrolyzátu Tryptone N1.

**Abstract:**

Mammalian cells have become the dominant system for recombinant expression of pharmaceutical proteins. This system is becoming suitable also for structural biology, with the advances in methodology of transient transfection of mammalian cells. This work dealt with optimization of recombinant expression in HEK293T and HEK293-6E cell lines in various media using easily quantifiable markers - secreted alkaline phosphatase (SEAP) and green fluorescent protein (GFP). Emphasis was placed on optimizing key factors behind the creation of transfection complex - the ratio of DNA to polyethyleneimine and the amount of DNA used. The positive influence of histone deacetylase inhibitor valproic acid and also of casein hydrolysate Tryptone N1 was also studied. (The thesis is written in Czech.)

**Klíčová slova:**

rekombinantní exprese, transientní transfekce, polyethylenimin, HEK293T, HEK293-6E, sekretovaná alkalická fosfatasa, zelený fluorescenční protein

**Key Words:**

recombinant expression, transient transfection, polyethyleneimine, HEK293T, HEK293-6E, secreted alkaline phosphatase, green fluorescent protein

## Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatasa (z angl. alkaline phosphatase)
bPEI	rozvětvený polyethylenimin (z angl. branched PEI)
But	sodná sůl kyseliny máselné (z angl. sodium butyrate)
CC	buněčná hustota (z angl. cell count)
DEAE-D	diethylaminoethyl dextran
EBNA1	jaderný antigen 1 viru Epstein-Barrové (z angl. Epstein-Barr nuclear antigen 1)
EBNA1t	zkrácená forma jaderného antigenu 1 viru Epstein-Barrové (z angl. EBNA1 truncated)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
HEK	lidské embryonální ledvinné buňky (z angl. human embryonic kidney)
CHO	buněčná linie odvozená z vaječníku křečička čínského (z angl. Chinese hamster ovary)
IPEI	lineární polyethylenimin
MCS	mnohočetné klonovací místo (z angl. multiple cloning site)
MFI	průměrná fluorescenční intenzita (z angl. median fluorescence intensity)
oriP	replikační počátek DNA viru Epstein-Barrové
PEI	polyethylenimin
pNPP	4-nitrofenyl fosfát
r-proteiny	rekombinantní proteiny
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatasa (z angl. secreted alkaline phosphatase)
SV40 ori	replikační počátek DNA viru SV40
SV40 TAg	velký T-antigen viru SV40
TN1	kaseinový hydrolyzát Tryptone N1
VPA	kyselina valproová (z angl. valproic acid)
WPRE	DNA regulační sekvence (z angl. woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element)

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	3
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 REKOMBINANTNÍ PROTEINY .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 EXPRESNÍ SYSTÉMY .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 SAVČÍ EXPRESNÍ SYSTÉMY .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1 HEK293 .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 TRANSFEKCE .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1 Polyetylenimin .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.2 Transientní transfekce .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 OPTIMALIZACE TRANSFEKČNÍHO POSTUPU .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.1 Alkalická fosfatasa .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2 Sekretovaná alkalická fosfatasa .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.3 Zelený fluorescenční protein (GFP) .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 PLASMIDY .....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7.1 Esenciální produkční nutrienty .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7.2 Inhibitory histonových deacetylas .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7.3 Inhibitory glykosyltransferas .....</b>	<b>22</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIÁL .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 BUNĚČNÉ LINIE .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 VEKTORY .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5 ROZTOKY .....</b>	<b>26</b>
<b>4. METODY .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA VEKTORŮ PTT03C-SSH A PTT0-GFPQ .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 BUNĚČNÉ KULTURY .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1. Zmrazování buněčných linií HEK293T a HEK293-6E .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2. Rozmrazování buněčných linií HEK293T a HEK293-6E .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.3 Kultivace buněčných linií HEK293T a HEK293-6E .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.3 Počítání buněčné hustoty pomocí hemocytometru .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.1 Příprava transfekčního roztoku plasmidové DNA a PEI .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.2 Příprava buněčné suspenze pro transientní transfekci .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.2.1 Použitá transfekční a produkční média .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.2.2 Použitá transfekční a produkční nádoby a objemy .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.3 Použitá aditiva .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 STANOVENÍ REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4.1 Stanovení sekretované alkalické fosfatasy .....</b>	<b>31</b>

4.4.2 Stanovení zeleného fluorescenčního proteinu.....	31
4.6 ZPRACOVÁNÍ DAT .....	32
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>33</b>
5.1 VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA VEKTORŮ PTT03C-SSH A PTT0-GFPQ .....	33
5.2 ZAVEDENÍ METODY STANOVENÍ ALKALICKÉ FOSFATASY.....	34
5.3 OPTIMALIZACE POMĚRU DNA:PEI (w/w).....	35
5.4 OPTIMALIZACE NUTNÉHO MNOŽSTVÍ DNA ZA KONSTANTNÍHO POMĚRU DNA:PEI (w/w) .....	38
5.5 STUDIUM VLIVU VALPROOVÉ KYSELINY.....	40
5.6 ČASOVÉ ZÁVISLOSTI EXPRESE REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ .....	42
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>45</b>
<b>7. SHRnutí .....</b>	<b>48</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>49</b>
8.1 SEZNAM PŘEVZATÝCH OBRÁZKŮ.....	54

## 1. Teoretická část

Rozluštění lidského genomu koncem dvacátého století [1] dalo vědě do rukou sekvence všech lidských genů. Tyto sekvence jsou v živých organismech reprezentovány příslušnými proteiny, bez kterých by život, jak ho známe, nemohl existovat. Právě proteiny jsou nadějí pro novou generaci cílených léčiv, která můžeme navrhovat s úmyslem ovlivnit jistý molekulárně biologický aspekt organismu. U větší části proteomu ale zatím neznáme příslušné proteinové struktury, tudíž je racionální navrhování léčiv zatím velmi obtížné.

Rozvoj moderní genomiky, proteomiky a bioinformatiky umožnil studium většího množství proteinů – ať už z hlediska jejich nativní struktury, funkce v živých systémech nebo jejich případného využití ve farmaceutickém průmyslu. Prvním problémem, se kterým se logicky setkáváme, je hledání zdroje daného proteinu. A to nejlépe takového zdroje, aby získaná bílkovina byla v čistém a biologicky aktivním stavu. Dále musíme řešit i ekonomičnost a výtěžnost takového procesu získávání. Pro charakterizaci či farmaceutické testování je zapotřebí pouze malá výtěžnost – v řádech mg, ale pro terapeutické využití, např. u pacientů, jejichž život na daném preparátu závisí, je zapotřebí zajistit velkokapacitní zdroj. Obecně existují tři základní způsoby jak takové proteiny získat nebo připravit.

Příslušná proteinová terapeutika můžeme nahradit podobným proteinem extrahovaným z organismu člověku příbuzného – např. prasečí nebo koňský insulin [2]. Takový preparát je ale spíše jen modelem pro charakterizaci příslušného např. lidského proteinu. Navíc mezidruhová nekompatibilita daného terapeutika může vést k alergickým reakcím nebo nežádoucí biologické aktivitě.

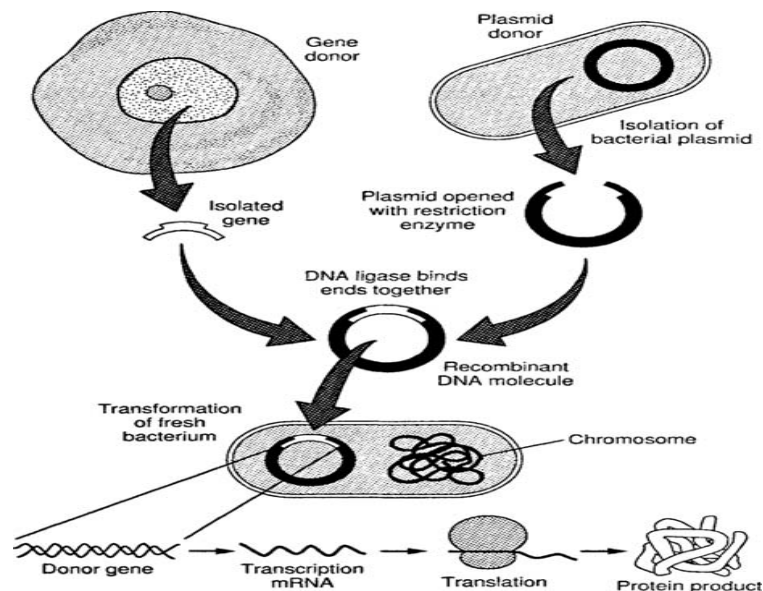
Protein můžeme připravit in vitro. Tato možnost je ale velmi omezena délkou aminokyselinového řetězce, složitostí nativní trojrozměrné struktury a posttranslačními modifikacemi (jako např. glykosylace). Přesto se během šedesátých let dvacátého století podařilo Meienhoferovi v Německu, Kungovi v Číně a Katsoyannisovi ve Spojených státech připravit biologicky aktivní lidský insulin in vitro [3][4][5].

S rozvojem metody rekombinantní genetické informace můžeme dnes využívat přírodních proteosyntetických aparátů uložených v buňkách. Tyto buněčné „nanostroje“ jsou uzpůsobeny ke čtení genetické informace a jejího překladu do bílkoviny. Když zvolíme vhodný hostitelský organismus – ať už prokaryotickou bakteriální kulturu, nebo eukaryotickou buněčnou linii, můžeme získat dostatečná množství studovaného

proteinu nebo bioterapeutika, a to navíc s přirozenou terciární strukturou a posttranslačními modifikacemi. Protože je taková rekombinantní exprese proveditelná i velkoobjemově, je její použití v průmyslu přímo vhodné. V roce 1978 se insulin stal prvním lidským proteinovým terapeutikem vyráběným rekombinantní cestou v bakterii *Escherichia coli* a i když se dnes používá pro rekombinantní expresi i mnoho jiných organismů, exprese v *E. coli* bývá, pokud je možná, stále nejekonomičtější možností [6].

## 1.1 Rekombinantní proteiny

Nenáročná příprava rekombinantní DNA [7] byla umožněna objevy restrikčních endonukleas [8][9][10], pokroky v rychlé přípravě definovaných nukleotidových sekvencí (metodou PCR) [11] a možností jejich zpětné kontroly sekvenčními technikami [12][13]. Připravené rekombinantní geny dnes umíme pomocí virových nebo bakteriálních (plasmidy) vektorů vpravit do hostitelského organismu, kde jsou přítomným proteosyntetickým aparátem exprimovány za vzniku rekombinantních proteinů (r-proteinů) (viz. Obr. 1). Námí připravené geneticky modifikované organismy se tak v ideálním případě stávají živými továrnami a zároveň zdroji našeho proteinu. R-proteiny jsou tedy takové proteiny, které jsou syntetizovány v organismech, pro které nejsou tyto proteiny přirozené.



**Obr. 1: Příklad přípravy r-proteinu v bakteriálním expresním systému**

Gen, který chceme exprimovat, je izolován např. z eukaryotního organismu a vložen do bakteriálního plasmidu. Takto připravenou rekombinantní DNA je transformovaná hostitelská bakteriální buňka, která vložený gen exprimuje za vzniku r-proteinu.

**Zdroj:** <http://eu.wiley.com>



## 1.2 Expresní systémy

Různorodý vývoj živých organismů na naší planetě vedl k odlišným vlastnostem, schopnostem a nárokům, které tyto organismy mají. Tyto charakteristiky, které je odlišují od ostatních, mohou být z hlediska využití živých organismů jako expresních systémů pokládány za pozitivní nebo negativní. V akademické i průmyslové produkci r-proteinů se tedy využívají různé hostitelské organismy právě podle požadovaných charakteristik, které musí zvolený expresní systém splňovat tak, aby byla produkce daného proteinu možná a zároveň ekonomická. Mezi hlavní charakteristiky expresního systému, které musíme zvažovat, patří rozsah a věrnost posttranslačních modifikací, kultivační náročnost zvoleného organismu a možná maximální výtěžnost produkce příslušného proteinu.

Prokaryotické organismy jsou historicky prvními užívanými hostiteli, jejichž transformací se cíleně začaly vyrábět r-proteiny. V roce 2007 bylo uváděno, že více jak 90% vyřešených proteinových struktur uložených v Brookhavenské proteinové databance (Brookhaven Protein Data Bank; <http://www.pdb.org>) pochází z r-proteinů exprimovaných právě v *Escherichia coli* [14]. Dalším často užívaným prokaryotickým organismem je *Lactococcus lactis* [15]. Hlavními výhodami prokaryotických expresních systémů je jejich odolnost vůči kontaminaci, rychlost růstu kultury, nutriční nenáročnost a s tím spojené nízké náklady. Na druhou stranu prokaryotické organismy nevykonávají některé procesy posttranslačních úprav proteinů. Proteiny mohou postrádat biologickou aktivitu a mohou být nevhodné k funkčním studiím. Tyto jednoduché organismy postrádají komplexní proteosyntetický aparát obvyklý u eukaryotních buněk, může tak navíc docházet ke špatnému sbalení daného proteinu a jeho vyloučení ve formě nerozpustných agregátů, tzv. inkluzních tělísek. V některých případech však lze proteiny z inkluzních tělísek *in vitro* renaturovat a získat je v jejich nativní konformaci, je-li výtěžek renaturace dostatečný pro dané účely, může být produkce r-proteinů ve formě inkluzních tělísek relativně výhodná kvůli jejich snadné izolaci v poměrně velké čistotě.

Mezi používanými eukaryotickými expresními systémy najdeme nižší eukaryoty – kvasinky, rostlinné buňky, hmyzí buňky i savčí buňky. Obecnou výhodou eukaryot oproti prokaryotům je jejich vyšší „kompatibilita“ s eukaryotickými geny z hlediska sbalení a posttranslačních úprav proteinů. Nevýhodou je pak cena nutného laboratorního vybavení, kultivačních médií a také vyšší náchylnost ke kontaminaci.

Nejpoužívanějšími kvasinkovými expresními systémy jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris* [16]. Výhodou je jejich rychlý růst, relativně nenáročné vybavení pro kultivaci a možnost poměrně vysokých výtěžků, na druhou stranu neprovádí všechny posttranslační modifikace a jejich glykosylace vysoce manosového typu je výrazně odlišná od komplexní glykosylace savčího typu.

Rostlinné buňky jsou méně využívány, přestože jsou snadno kultivovatelné a provádí savcím buňkám podobné posttranslační modifikace. K produkci r-proteinů je užíváno buněčných kultur tabáku, jejich průmyslovou nevýhodou je pomalý růst. GMO rostliny jsou spíše než jako expresní systémy pro výrobu terapeutik používány jako zemědělské transgenní rostliny – transfekcí Ti-plasmidem za pomoci *Agrobacterium tumefaciens* [17].

Pro rekombinantní expresi je využívána i skupina *Protozoa*, příkladem je parazitický prvok *Leishmania tarentolae* [18]. Výhodami tohoto organismu je rychlý růst, který je možný do vysokých hustot, uniformní glykosylace podobná glykosylaci savčích buněk nebo např. nenáročnost na kultivační médium a teplotu (26°C).

Hmyzí buňky jsou na rozdíl od savčích buněk méně náročné na kultivační podmínky a mohou růst do vysokých hustot. Provádí glykosylaci vysoce manosového typu, která je odlišná od glykosylace savčích buněk, ale je snadno odštěpitelná. Proto je exprese v hmyzích buňkách v současnosti metodou první volby pro strukturní biologii. Pro jejich transfekci se používají virové vektory, což zvyšuje náročnost jejich přípravy. Používanými zástupci jsou např. *Spodoptera frugiperda* - buněčná linie Sf9 a Sf21, *Trichoplusia ni* – buněčná linie Hi5 či *Drosophila melanogaster* - buněčná linie S2 [19].

Pro strukturní a funkční analýzy i pro budoucí velkoobjemovou produkci lidských proteinů jako možných terapeutik je stále více upřednostňován savčí expresní systém. Jeho hlavní předností je komplexní proteosyntetický aparát zajišťující správné nativní uspořádání r-proteinu a to včetně všech potřebných posttranslačních úprav (glykosylace, fosforylace, modifikace aminokyselin, atd.). Odhaduje se, že zhruba 60 až 70% všech farmaceutických r-proteinů a všech 18 licencovaných terapeutických protilátek je produkováno v savčích buňkách [14]. Hlavní nevýhodou je náročnost na vybavení, vysoká cena kultivačních médií a velká náchylnost ke kontaminaci.

Nelze říci, který expresní systém je obecně nejlepší. Vždy záleží na daném proteinu, o jehož expresi se pokoušíme. Velké množství proteinů se dá levně a úspěšně produkovat v prokaryotickém systému, byť i s případným následným renaturačním krokem. Přesto pokud chceme daný protein používat v biologických a funkčních

testech, snažíme se naším vyprodukovaným modelem co nejvíce přiblížit reálnému proteinu *in vivo*. Pro lidské proteiny tuto podmínku skutečně nejlépe splňují savčí expresní systémy – a to nejlépe expresní systémy založené na lidských buněčných liniích.

### 1.3 Savčí expresní systémy

Savčí expresní systémy se v posledních dvaceti letech dostávají v oborech strukturní proteomiky a biofarmacie do popředí. Důvodem tohoto trendu je jednak usilovné studium lidských proteinů a tedy snaha co nejvěrněji se jim r-proteinem přiblížit - čímž máme na mysli především přirozené prostorové uspořádání a posttranslační modifikace, a jednak velký rozvoj, který metodologie eukaryotických expresních systémů doznala a to především v oblasti transfekčních postupů, které umožňují rychlou produkci malého množství proteinu.

Eukaryotické buněčné linie vznikají z odebraných primárních buněk daného živočicha. Protože se tyto buňky nemohou množit neomezeně dlouho, jsou immortalizovány náhodnou mutací, transformací virovou DNA nebo splynutím s již nesmrtelnou nádorovou buňkou za vzniku tzv. hybridomů. Např. hybridomy vzniklé splynutím lymfocytu imunizované myši s myelomovou buňkou jsou využívány pro výrobu monoklonálních protilátek.

Savčí buňky jsou obvykle kultivovány v prostředí termostatovaném na 37°C a pufrovaném atmosférou 5% CO<sub>2</sub>. Kultivační média jsou zdrojem potřebných živin, růstových faktorů, biogenních a stopových prvků. Mohou obsahovat i speciální aditiva – např. heparin k zamezení vzniku buněčných agregátů (vhodné pro míchané suspenzní kultury), acidobazické indikátory pro kontrolu pH anebo antibiotika pro vyšší kontaminační robustnost.

Stabilních savčích buněčných linií je dnes celá řada a mnoho z nich lze používat pro rekombinantní expresi, přesto jsou vědou i průmyslem preferovány především ty linie, jež mají vysokou transfekční úspěšnost a jsou zároveň řádně prostudovány:

- CHO (Chinese Hamster Ovary) – Linie odvozená v roce 1958 z primárních buněk vaječníku křečička čínského – častého laboratorního zvířete [20]. Tato linie je dnes průmyslem rekombinantní exprese nejvyužívanější – např. pro produkce

terapeuticky významného erythropoietinu [21]. Její výhodou je rychlý růst, přizpůsobivost a vysoká míra produkce stabilně transfekovaných linií [22].

- NS0 – Linie myších hybridomů, často používaných pro biofarmaceutickou výrobu monoklonálních protilátek. NS0 je cholesterolovým auxotrofem, což znesnadňuje vývoj kultivačních médií pro tuto linii [23].
- COS-7 – Původně odvozené z buněčné linie ledvinové tkáně kočkodana zeleného (CV-1) transformací genem pro velký T antigen viru SV40, který může zvyšovat expresi daného proteinu umožněnou episomální replikací plasmidové DNA.
- 3T3 – Linie myších fibroblastů odvozených z embryonálních buněk myši laboratorní [24].
- HeLa (Henrietta Lacks) – Lidská buněčná linie odvozená z buněk nádoru děložního hrdla, jméno nesou podle nevědomé dárkyně, která rakovině nakonec podlehla [25]. Tato linie je dobře prostudovaná a používá se jako model lidských buněk pro nejrozumnější pokusy, také jako expresní systém. Jejich kultivace není obtížná, dokonce mají tendenci kontaminovat svoje okolí [26].
- HEK293 (Human Embryonic Kidney) – Lidská buněčná linie odvozená z embryonální ledvinové tkáně. V posledních letech nabývá v průmyslu i výzkumu na významu jako rychlý zdroj r-proteinů vyráběných v lidských buňkách.

### 1.3.1 HEK293

Lidské embryonální ledvinné buňky číslo 293 je plný název pro dnes velmi atraktivní expresní systém - z hlediska průmyslové i akademické výroby r-proteinů, známý pod svou zkratkou HEK293. Tato buněčná linie byla v roce 1970 vytvořena Frankem Grahamem (v laboratoři Alexandra Van der Eba v Leidenu; Holandsko) odvozením z primárních lidských ledvinových buněk získaných z potracených embryí [27]. Primární kultura byla immortalizována transformací virovou DNA z adenoviru 5, transformace byla provedena precipitací DNA v prostředí fosforečnanu

vápenatého [28]. Číslo 293 je označením transformačního pokusu, ze kterého tato linie vzešla.

V průběhu let došlo ke zpětné charakterizaci této buněčné linie. Původně se HEK293 pokládaly za buňky odvozené od epiteliálních ledvinných buněk, pozdější výzkumy však naznačují, že adenovirem transformovaná linie je ve skutečnosti linií neurálních ledvinných buněk [29].

Buňky HEK293 lze snadno kultivovat adherentně a relativně snadno je lze převést do suspenze, a to i v bezsérovém prostředí. Suspenzní kultivace je vhodná pro produkci v třepaných lahvích nebo velkoobjemových bioreaktorech, kde bylo již dosaženo až 100 l produkce [30]. Lidský expresní systém by měl poskytovat savčí r-proteiny se správnými a přirozenými posttranslačními modifikacemi – ať už se jedná o správné vytvoření disulfidových můstků, proteolytické úpravy nebo glykosylaci. Cenou za nativitu proteinu jsou (v porovnání s prokaryotickými expresními systémy) drahá kultivační média, dlouhá generační doba a náchylnost k infekcím.

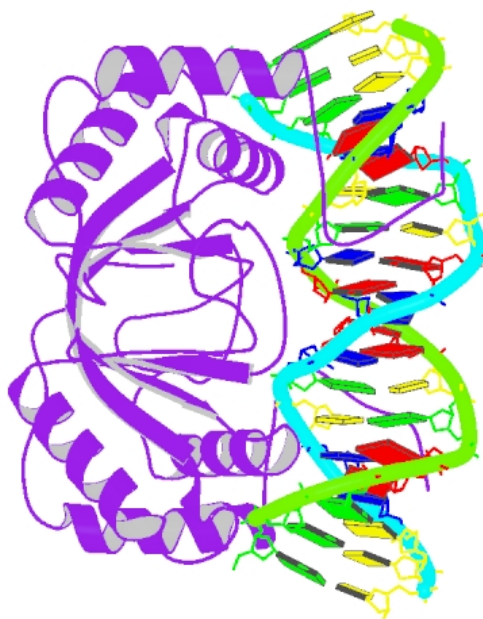
Dnes se můžeme setkat s mnoha variantami původní linie HEK293, které byly v průběhu času na akademické a komerční půdě vyvinuty pro snazší kultivaci a vyšší úroveň produkce. Běžně se lze setkat se čtyřmi variantami označenými S, F, T a E nebo s jejich kombinacemi např. 6E [31]:

- HEK293S – Buněčná kultura je uzpůsobena pro kultivaci v suspenzi, většinou v prostředí obsahujícím určitý podíl koňského nebo kravského séra.
- HEK293F – Kultura uzpůsobená pro kultivaci v bezsérovém prostředí, většinou pak v suspenzi.
- HEK293T – Kultura stabilně transformována genem pro velký T antigen polyomaviru SV40 (SV40 TAg), který umožňuje episomální replikaci vektorů obsahujících replikační počátek SV40.
- HEK293E – Kultura stabilně transformovaná genem pro nukleární antigen 1 viru Epstein-Barrové (EBNA1), který umožňuje episomální replikaci vektorů obsahujících replikační počátek oriP (viz Obr. 2, str. 13).

- HEK293-6E – Kultura transformovaná kratší verzí genu EBNA1, tzv. EBNA1t, který vykazuje nižší cytotoxicitu. Tato kultura je uzpůsobená pro bezsérovou kultivaci, její plný název je HEK293F-EBNA1t [32].

Episomální replikaci rozumíme proces, při kterém je plasmid replikován v transfekovaném hostitelském organismu. Jeho relativní množství v buňce nárůstem kultury neklesá, což by se navenek mělo projevit zvýšením celkové produkce r-proteinu oproti transfekovaným kulturám, které episomální replikaci neumožňují. Tento proces je v buňce umožněn expresí replikaci iniciujícím faktorem – jako je SV40 TAg, EBNA1 nebo EBNA1t, který specificky rozpoznává replikační počátek plasmidu (v jeho eukaryotické oblasti) – pro SV40 TAg je to SV40 ori, pro EBNA1 a EBNA1t pak oriP (viz Obr. 2).

Narozdíl od EBNA1 nemá v praxi episomální replikace pomocí SV40 TAg v HEK293 buněčné linii příliš velký účinek na zvýšení exprese rekombinantního genu, proto v porovnání buněčných linií HEK293T a HEK293E vykazuje druhá zmíněná vyšší míru produkce [33].



**Obr. 2: Interakce EBNA1 a oriP**

Iniciační faktor EBNA1 (fialově) se váže na replikační počátek plasmidu oriP (sacharidfosfátová kostra světle modře a světle zeleně; adenin – červeně, thymin – modře, guanin – zeleně, cytosin - žlutě) a spouští tak replikační kaskádu, která vyústí v rozmnožení tohoto plasmidu v buňce.

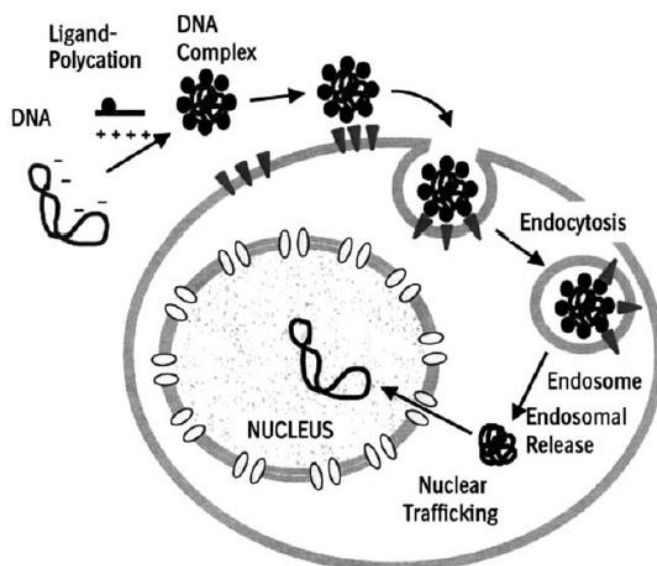
**Zdroj:** <http://www.pdb.org>

## 1.4 Transfekce

Způsobů jak vnést rekombinantní DNA do hostitelského organismu je mnoho, jejich použití se odvíjí od užitého hostitelského organismu, ekonomičnosti pro danou situaci a zamýšleného výsledku transfekce.

Většinou vycházíme z virových nebo plasmidových (bakteriálních) vektorů, do kterých rekombinantními metodami vložíme požadovaný(é) gen(y). Virové vektory vnášejí genetickou informaci do hostitele přirozenou infekcí. Plasmidové vektory lze vnést do cílového organismu pomocí bakteriální infekce (např. transgenní rostliny, viz 1.2, str. 9), fyzikálními metodami – mikroinjekce, elektroporace, biolistika, nebo metodami chemickými, které vhodným „zamaskováním“ umožní rekombinantní DNA vstup do cílové buňky [17].

Chemické transfekční metody nejsou tolik invazivní a náročné na vybavení jako metody fyzikální nebo biologicky nebezpečné jako virové vektory. Do těchto metod patří lipofekce, kdy je DNA uzavřena do liposomů, které pak splývají s cytoplasmatickou membránou hostitelské buňky. Dále pak precipitace DNA pomocí fosforečnanu vápenatého [28] nebo polykationtového ligandu (např. poly(L-lysin), PEI, DEAE-D) [34]. Vzniklé mikročástečky jsou pak adsorbovány na buněčný povrch a endocytovány (viz Obr. 3).



**Obr. 3: Příklad průběhu chemické transfekční metody**

DNA vstupuje do komplexu s polykationickým ligandem, kladně nabitě částice adsorbují na buněčný povrch a jsou endocytovány. Vzniklé endosomy uvolňují rekombinantní DNA a ta je dopravena do jádra.

**Zdroj:** KIRCHEIS, R., BLESSING, T., BRUNNER, S., et al: (2001).

### 1.4.1 Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) je v dnešní době upřednostňován pro velký transfekční potenciál, použitelnost v prostředí bez séra (narozdíl od fosforečnanu vápenatého) a zároveň nízkou komerční cenu [35]. PEI obsahuje primární, sekundární i terciární aminy, které udělají PEI pufrovací schopnost a mohou vázat do komplexu DNA. Právě přebytek kladného náboje, který je vnesen PEI do buňky může být příčinou prasknutí endosomu a uvolnění DNA. Rozeznáváme dva druhy PEI – rozvětvený a lineární. Rozvětvený PEI (bPEI) vzniká kyselou katalyzovanou polymerací aziridinu. Lineární PEI (lPEI) je syntetizován polymerací 2-ethyl-2-oxazolinu s methyl-p-toluensulfonátem a kyselým otevřením vzniklé cyklické makromolekuly [36]. Obě formy jsou vyráběny a používány v různých molekulových hmotnostech. V praxi je užívanější lPEI pro svoji vyšší transfekční účinnost. Ta může být způsobena obecně větší velikostí vzniklých komplexů (pro bPEI v řádech stovek nanometrů, pro lPEI v řádech mikrometrů), které rychleji sedimentují a tedy i interagují s buněčnou membránou. Transfekce lPEI se také zdá být nezávislá na buněčném cyklu a nepoškozuje tolik buňky jako bPEI [36].

### 1.4.2 Transientní transfekce

Z hlediska samotné transfekce rozeznáváme transfekci stabilní a transientní. Stabilní transfekce spočívá v inkorporaci rekombinantní DNA do genomu hostitele. Z takto transfekované kultury je následně vybrán jedinec s vhodnými vlastnostmi (v případě výroby r-proteinů se jedná především o vysokou produkci), který je pak klonován dále a užíván pro produkci ve velkých bioreaktorech. Tento postup je časově velice náročný (měsíce až roky) a je proto vhodný pro biofarmaceutický průmysl a velkoobjemové produkce již navržených terapeutických proteinů. Stabilní transfekce se hojně používá např. u CHO buněčné linie.

V případě transientní transfekce nám nejde o trvalou změnu hostitelského genomu pro dlouhodobou a co nejvyšší produkci, ale spíše o co nejrychlejší produkci takového množství r-proteinu, jež postačuje pro strukturní a funkční charakterizaci. Pak je totiž možné produkovat v relativně krátkém čase (dny až týdny) velké množství různých r-proteinů nebo mnoho variant jednoho proteinu, což je pro vědecké účely a účely hledání vhodného biofarmaka vhodnější. Hostitelský organismus pak existuje pouze jako dočasná továrna, která již není po své smrti obnovována, případně je pro její obnovu zapotřebí nové kultury a příslušné rekombinantní DNA. Postup transientní



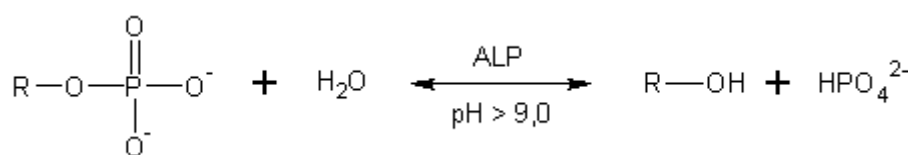
transfekce lze užívat jak s CHO, tak především s HEK293 buněčnými liniemi [37] a byl úspěšně použit i pro 100 l produkční objem [30].

## 1.5 Optimalizace transfekčního postupu

Stejně jako rekombinantní exprese proteinů v eukaryotickém systému je nutné každý proces předem zhodnotit z hlediska jeho možností, výtěžnosti a celkové ekonomičnosti. Optimalizace daného procesu mnohdy předchází jeho zavedení do akademického nebo průmyslového využití. Z hlediska rekombinantní exprese v eukaryotickém systému můžeme sledovat řadu faktorů, jež mají vliv na výslednou kvalitu a cenu produktu – např. způsoby kultivace buněčné linie, její stav při transfekci, množství transfekčního činidla a přidané DNA, či vliv různých aditiv během produkce. Abychom mohli sledovat vliv vybraných podmínek na naši produkující kulturu, užíváme k transfekci tzv. reportérových genů. Ty kódují upravené proteiny, které lze již v malém množství jednoduše kvalitativně i kvantitativně analyzovat. Protože podmínek, které chceme sledovat je obvykle velké množství, je možnost provádění optimalizačních testů v malých objemech, kde je absolutní výtěžek produkovaných proteinů malý, klíčová. Často užívanými reportérovými proteiny jsou mj. sekretovaná alkalická fosfatasa a zelený fluorescenční protein [38][39].

### 1.5.1 Alkalická fosfatasa

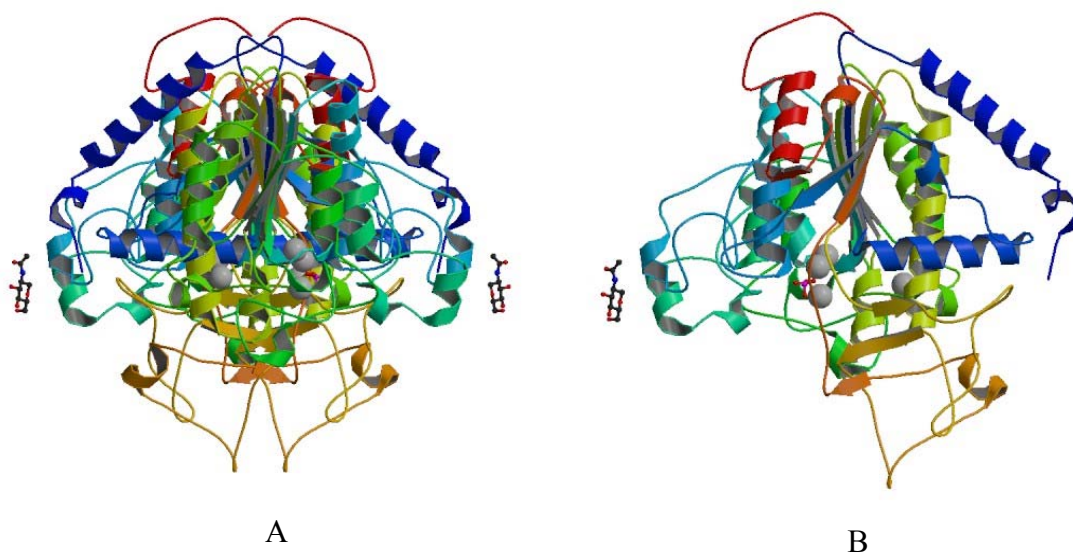
Alkalická fosfatasa (EC 3.1.3.1) (ALP) je skupina enzymů, která má pH optimum 9,0 – 10,5. Tyto enzymy uvolňují anorganický fosfát z organických fosfátových monoesterů za současného vzniku alkoholu, podle následující reakce,



ALP nacházíme u většiny organismů v několika isotypech (isoenzymech), naopak u některých vyšších rostlin ji nenacházíme vůbec. U člověka rozeznáváme čtyři isoenzymy ALP – placentární (viz Obr. 4, str. 17), embryonální, střevní a tkáňově nespecifickou ALP. Tyto se liší rozdílnou tepelnou stabilitou, hodnotou pI nebo citlivostí vůči různým inhibitorům a jsou snadno separovatelné elektromigračními

metodami. Placentární ALP je tepelně nejstabilnější (až 60°C), tato stabilita je ale výrazně ovlivněna počtem sialových kyselin v molekule isoenzymu.

Lidská ALP je membránový glykoprotein (s orientací vně buňky) patřící do rodiny homodimerních metaloenzymů, kde každá monomerní jednotka obsahuje ve svém katalytickém jádře čtyři vazná místa pro kovové ionty, které jsou nezbytné pro enzymatickou aktivitu ( $Zn^{2+}$ ) a také zvyšují stabilitu enzymu ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) [40].



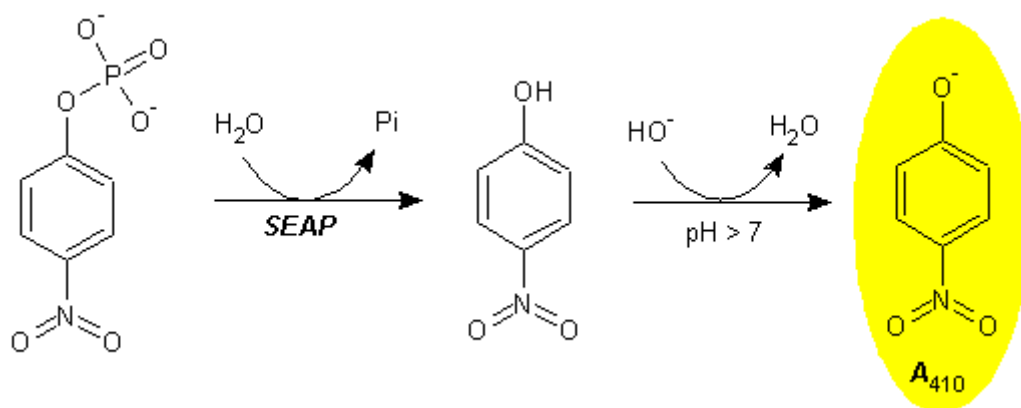
**Obr. 4: Lidská placentární alkalická fosfatasa**

Krystalická struktura molekuly lidské placentární alkalické fosfatasy (A) a její monomerní jednotky (B) (molekuly jsou barveny od N-konce k C-konci v řadě modrá, zelená, žlutá a červená).

**Zdroj:** <http://www.pdb.org>

### 1.5.2 Sekretovaná alkalická fosfatasa

V případě rekombinantní eukaryotické exprese se jako reportérový protein může užívat modifikované ALP – sekretované alkalické fosfatasy (SEAP), jejíž struktura je zbavena membránové kotvy a je tudíž buňkou sekretována volně do prostředí. Vzorek média je podroben reakci s činidlem obsahujícím para-nitrofenylfosfát (pNPP) za vzniku žlutého para-nitrofenolátu,



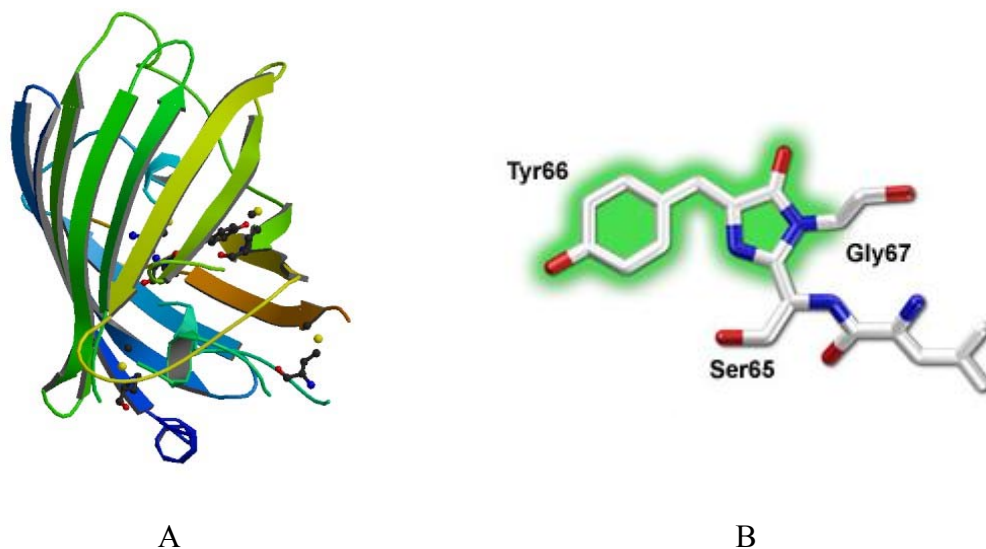
Vznik barevného produktu a tedy i kvantitativní zhodnocení obsahu SEAP ve vzorku je možno spektrofotometricky stanovit jako časovou změnu absorbance reakční směsi v absorpčním maximu para-nitrofenolátu (410 nm) [41].

### 1.5.3 Zelený fluorescenční protein (GFP)

Zelený fluorescenční protein byl objeven v polovině dvacátého století Osamou Shimomurem při studiu bioluminiscence mořských korýšů a medúzy *Aequorea victoria*. GFP vydává zelenou fluorescenci (emisní maximum 508 nm), když je vystaven modrému světlu (excitační maximum 475 nm). V buněčné a molekulární biologii je tento protein využíván jako snadno viditelný znak, pomocí kterého je možno sledovat například proliferaci nádorových buněk nebo úspěšnost transfekce buněk expresních.

GFP je relativně malý protein složený z 238 aminokyselin, jeho supersekundární strukturu tvoří soudek skládaných listů, v jehož středu je schovaná chromoforová skupina (viz Obr. 5, str. 19). Ta vzniká cyklizací a oxidací postranních zbytků aminokyselin Ser-65, Tyr-66 a Gly-67. Modifikací těchto aminokyselin bylo dosaženo změny barvy fluorescence GFP a byl tak připraven i žlutý, modrý a modrozelený fluorescenční protein.

Za objev a rozvoj využití zeleného fluorescenčního proteinu byla v roce 2008 udělena Osamu Shimomurovi, Martinu Chalfieovi a Rogeru Tsienovi Nobelova cena za chemii [42][43][44].



**Obr. 5: Zelený fluorescenční protein**

Krystalická struktura zeleného fluorescenčního proteinu (A) (molekula je barvena od N-konce k C-konci v řadě modrá, zelená, žlutá a oranžová). Chromoforová skupina, která je skryta uvnitř soudku skládaných listů, je zobrazena napravo (B) (atomy kyslíku červeně, dusíku modře, uhlíku stříbrně, vodíkové atomy nejsou zobrazeny, samotný chromofor je zeleně zvýrazněn).

**Zdroj:** A - <http://www.pdb.org> ; B - <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>

## 1.6 Plasmidy

Příroda využívá plasmidy k horizontálnímu přenosu genetické informace mezi prokaryotickými organismy. Jedná se o kruhovou DNA schopnou vlastní replikace, která obsahuje např. gen rezistence proti nějaké toxické látce, nejčastěji proti antibiotikům. Plasmidy jsou pak bakteriemi užívány k šíření této rezistence mezi sebou.

Člověk užívá plasmidovou DNA jako vektory, tedy nosiče, pro rekombinantní DNA, tedy navrženou genetickou informaci, kterou chceme transformovat nebo transfekovat cílový organismus. Takové plasmidy většinou vycházejí z jakési původní kostry, která se vyvinula v prokaryotických organismech. Avšak lidské poznání smyslu genetických informačních sekvencí vedlo k návrhu úprav přírodních plasmidů a to např. z důvodů zvýšení exprese, možnosti episomální replikace, jednoduché selekce pozitivních klonů a snadného vkládání rekombinantní DNA. Plasmidy pro eukaryotickou expresi obecně obsahují tři základní oblasti [45]:

- Oblast prokaryotickou – Obsahuje bakteriální počátek replikace, umožňující amplifikaci plasmidu v bakteriálních buňkách a gen pro rezistenci na antibiotikum jako selekční znak.
- Oblast eukaryotickou – Může obsahovat gen pro rezistenci na antibiotikum (na jiné než v oblasti prokaryotické), který je určený pro selekci úspěšně transfekovaných buněk. Dále může obsahovat replikační počátek, většinou odvozený z živočišných virů (SV40 ori, oriP), umožňující episomální replikaci.
- Oblast expresní (tzv. expresní kazeta) – Obsahuje sekvence zvyšující expresi vložené DNA – např. silný promotor (obvykle virového původu) a další regulační sekvence (introny), zvyšující transkripci do příslušné mRNA. Ty jsou následovány silnou Kozakovou sekvencí, zajišťující translaci na ribosomu [46] a dále klonovací místo (MCS), které obsahuje sekvence rozpoznávané restrikcími endonukleasami. Do tohoto místa je vkládána rekombinantní DNA, která může obsahovat jeden nebo více genů (vhodné v případě studia enzymových komplexů). Nakonec může tato oblast obsahovat sekvenci pro afinitní značení produkovaného proteinu – např. sekvenci histidinové kotvy pro snadnou purifikaci r-proteinu nebo c-myc epitop pro snadnou detekci protilátkami. Celá expresní kazeta je poté uzavřena polyadenylačním signálem

a případně dalšími regulačními sekvencemi (např. WPRE), zvyšujícími expresi transgenu.

## **1.7 Kultivační média**

Eukaryotické buňky jsou z hlediska složení kultivačních médií náročné, je to hlavní důvod, proč je práce s nimi drahá. Pro různé fáze práce s kulturou většinou potřebujeme různá chemická prostředí. Přestože jsou dnes komerčně dostupná média vhodná jak pro kultivaci, tak pro transfekci i produkci, je většinou ekonomičtější média v různých fázích měnit a to i za cenu zvýšeného rizika kontaminace. Základem každého média je zdroj energie (živiny), růstové faktory a látky regulující buněčný cyklus.

Jako další zdroj nutrientů, růstových faktorů, hormonů a jiných nedefinovaných komponent se často používá zvířecího séra – kravského (FBS) nebo koňského, získávaného z plodové vody zvířat. Od užívání séra se dnes upouští z důvodů etických, ekonomických, dále z důvodu nedefinovatelnosti séra, jež ztěžuje průmyslovou výrobu a srovnávání výsledků, a také z důvodu znesnadnění purifikace r-proteinu [47]. Přítomnost séra také ovlivňuje morfologii buněk a způsobuje jejich agregaci, což je pro suspenzní kultivace nevhodné. Pro snížení agregace je možno do média přidávat např. heparin. Pro zmenšení mechanického stresu při míchání suspenzní kultury lze přidávat různé surfaktanty – např. Pluronic F68 [48].

U transfekčního média není kladen důraz na vysoký obsah živin, protože samotný proces se odehrává v řádech hodin. Je třeba ale minimalizovat obsah látek, jež by mohly interferovat s plasmidovou DNA nebo samotným transfekčním procesem. U transfekčního procesu s využitím polykationtového ligandu PEI není vhodné, aby byly v médiu přítomny zbytné záporně nabitě molekuly, kompetující při utváření transfekčního komplexu s plasmidovou DNA – jako je tomu např. u komerčního média ExCELL293 obsahujícího pravděpodobně heparin. Vyšší koncentrace vápenatých iontů mohou být příčinou agregace buněk, čímž se sníží aktivní povrch biomasy, se kterou interagují transfekční komplexy [49].

Produkční médium pak mimo vyšší výživnost může obsahovat i speciální aditiva, která zvyšují nebo vhodně modifikují produkci r-proteinů.

### **1.7.1 Esenciální produkční nutrienty**

Při transienční transfekci většinou neudržíme produkční kulturu příliš dlouho a tudíž nedochází k výměně produkčního média a obnovení živin v něm přítomných.

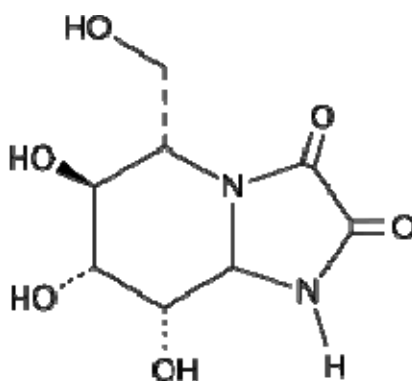
V průběhu produkce se tedy může stát, že dojde k vyčerpání některých pro produkci esenciálních nutrientů – hlavně aminokyselin. Proto se v řádech dní k produkční kultuře může přidávat proteinový hydrolyzát – např. Tryptone N1, vnějším efektem je pak nárůst výtěžku r-proteinu [50].

### 1.7.2 Inhibitory histonových deacetylas

Je známo velké množství chemických sloučenin, které mají pozitivní vliv na expresi r-proteinů mechanismem zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Mezi takové látky patří máselnan sodný (But) nebo kyselina valproová (VPA)[51]. Tyto látky chelatují zinečnaté kationty z aktivních míst histonových deacetylas a inhibují tak jejich aktivitu. Tím je ovlivněna transkripce řady genů a indukováno zastavení buněčného cyklu (zvýšením exprese inhibitorů cyklin dependentních kinas). Vnější efektem je dokumentovaný vzrůst exprese r-proteinů, úplný mechanismus nebyl zatím objasněn. Vyšší koncentrace But mohou však působit také apoptoticky [52].

### 1.7.3 Inhibitory glykosyltransferas

Z hlediska strukturních studií proteinů bývá dílčím cílem získání kvalitního krystalu dané bílkoviny. Proces krystalizace je ale u glykoproteinů znesnadněn složitými sacharidovými strukturami, které nebývají uniformní. Tento problém lze řešit inhibitory, které zablokují glykosylační procesy, které vedou ke složitým sacharidovým strukturám. Kifunensin (viz Obr. 6) je dobrým inhibitorem  $\alpha$ -mannosidas třídy I, a to jak endoplasmatického retikula, tak i Golgiho aparátu. Kifunensin tedy brání odštěpení uniformní manosové struktury, a tudíž nemůže proběhnout ani následná syntéza komplexních oligosacharidů [53][54].



Obr. 6: Chemická struktura kifunensinu.

Zdroj: [www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)

## 2. Cíle práce

- Zavedení optimalizačního postupu pomocí reportérových genů pro SEAP a GFP
- Optimalizace produkce r-proteinů v HEK293T a 6E z hlediska:
  - Poměru DNA:PEI (w/w)
  - Vlivu VPA
  - Vlivu Tryptone N1
- Porovnání obou linií



### 3. Materiál

#### 3.1 Přístroje a pomůcky

Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Spectrofuge 16M	<i>Edison, USA</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Hemocytometr	<i>Marienfeld, Německo</i>
Inkubátor pro tkáňové kultury IGO 150 Cell life	<i>Jouan, Francie</i>
Kahan Fireboy Eco	<i>Integra Biosciences, Švýcarsko</i>
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>P-LAB, ČR</i>
Laminární box MSC 12	<i>Jouan, Francie</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Lab.přístroje Praha, ČR</i>
Mikroskop inverzní IM3	<i>Intraco Micro, ČR</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Zanussi, Itálie</i>
Mrazicí box (-80 °C) Bio Freezer	<i>Forma scientific, USA</i>
Mrazicí kontejner Mr. Frosty	<i>Sigma, USA</i>
NoEndo JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit	<i>Genomed, Německo</i>
pH metr Φ 200	<i>Beckman, USA</i>
Pipetovací nástavec Pipetus AKKU	<i>Hirschmann Laborgeräte, Německo</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Průtokový cytometr BD LSR II	<i>BD biosciences, USA</i>
Předvážky HF-1200 G	<i>AND, USA</i>
Čtečka mikrotitračních destiček Safire <sup>2</sup>	<i>Tecan, Rakousko</i>
Spektrofotometr DU-70	<i>Beckman, USA</i>
Třepačka Orbit 1000	<i>Labnet, USA</i>
Vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>

### 3.2 Chemikálie

azid sodný	<i>Serva, USA</i>
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
diethanoleamine	<i>Sigma, USA</i>
DMEM médium	<i>Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., ČR</i>
DMEM médium bez vápníku	<i>Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., ČR</i>
DMSO	<i>Sigma, USA</i>
ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
F17 médium	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
FBS	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
Freestyle293 médium	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
G418	<i>Gibco, USA</i>
L-glutamin	<i>Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., ČR</i>
IPEI 25 kDa	<i>Polysciences, USA</i>
NEA	<i>Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., ČR</i>
Pluronic F-68	<i>Sigma, USA</i>
pNPP	<i>Sigma, USA</i>
Propidium jodid	<i>BD biosciences, USA</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Tryptone N1	<i>Organo Technie, Kanada</i>
VPA	<i>Sigma, USA</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

### 3.3 Buněčné linie

HEK293T	<i>A. Radu Aricescu, Oxford, Velká Británie</i>
HEK293-6E	<i>Y. Durocher, Montreal, Kanada</i>

### 3.4 Vektory

pTTo3c-SSH	<i>Y. Durocher, Montreal, Kanada</i>
pTTo-GFPq	<i>Y. Durocher, Montreal, Kanada</i>

### 3.5 Roztoky

- **Roztok E1, G1:** 50 mM Tris (pH = 8,0), 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  RNasa A (*Genomed*, Německo)
- **Roztok E2, G2:** 200 mM NaOH, 1 % SDS (*Genomed*, Německo)
- **Roztok E3:** 3,1 M octan sodný, pH = 5,5 (*Genomed*, Německo)
- **Roztok E4:** 100 mM octan sodný (pH = 5,0), 600 mM NaCl, 0,15% Triton X-100 (*Genomed*, Německo)
- **Roztoky ENDO-1 a ENDO-2:** chráněné složení (*Genomed*, Německo)
- **Roztok E5:** 100 mM octan sodný (pH = 5,0), 800 mM NaCl (*Genomed*, Německo)
- **Roztok E6:** 100 mM octan sodný (pH = 5,0), 1500 mM NaCl (*Genomed*, Německo)
- **TE pufr:** 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH = 8,0
- **DMEM médium:** připraveno ze zásobních roztoků (*Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., ČR*) ve standardním složení varianty obsahující 4,5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  glukosy, 3,7  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  a 4 mM L-glutamin a bylo dále doplněno NEA (výsl. konc. 1x) a případně FBS dle potřeby
- **DMEM médium bez vápníku:** připraveno ze zásobních roztoků (*Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., ČR*) s vynecháním  $\text{CaCl}_2$  v jinak standardním složení varianty obsahující 4,5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  glukosy, 3,7  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  a 4 mM L-glutamin a bylo dále doplněno NEA (výsl. konc. 1x) a Pluronic F-68 (výsl. konc. 0,1%)
- **ExCELL293 médium:** zakoupeno hotové médium (*Sigma*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4 mM)
- **PBS-TK pufr:** 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7,0
- **F17 médium:** zakoupeno hotové médium (*Gibco Invitrogen Corp.*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4 mM) a Pluronic F-68 (výsl. konc. 0,1%)

## 4. Metody

### 4.1 Velkoobjemová příprava vektorů pTTo3c-SSH a pTTo-GFPq

Pro purifikaci plasmidové DNA byla použita komerčně dostupná souprava - *NoEndo JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit* (Genomed, Německo). Bylo postupováno dle návodu výrobce. Každá peleta byla resuspendována v 10 ml roztoku E1 (obsahujícím RNasu o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Bylo přidáno 10 ml roztoku E2 a směs byla důkladně promíchána a ponechána inkubovat 5 min za laboratorní teploty. Následně bylo přidáno 10 ml roztoku E3, směs byla opět důkladně promíchána a poté centrifugována při  $20000 \times g$ , 10 min. Mezitím byla ekvilibrována kolona 30 ml roztoku E4. Supernatant získaný při centrifugaci byl smíchán s 1/10 objemu roztoku ENDO-1, směs byla důkladně promíchána a aplikována na ekvilibrovanou kolonu. Následovalo promytí nejdříve 30 ml roztoku ENDO-2, poté 30 ml roztoku E5 a nakonec eluce 15 ml roztoku E6. DNA byla z eluátu precipitována pomocí 0,7 násobku objemu isopropanolu, směs byla inkubována 30 min při  $-20^\circ\text{C}$  a odstředěna při  $20000 \times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ . Peleta byla opláchnuta 5 ml 70% ethanolu a znovu odstředěna při  $20000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn, peleta dosušena na rotační vakuové odparce a následně rozpuštěna v 1 ml TE pufru.

Nakonec byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota DNA. Roztok byl 300 x naředěn  $\text{dH}_2\text{O}$  a proti slepému vzorku (300 x zředěný TE pufr) byla změřena absorbance roztoků při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Koncentrace DNA byla vypočítána z empirického vztahu, podle kterého má roztok dvouvláknové DNA o koncentraci  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  absorbanci rovnou 1. Poměr  $A_{260}/A_{280}$  je u čisté DNA roven přibližně 1,8.

### 4.2 Buněčné kultury

#### 4.2.1. Zmrazování buněčných linií HEK293T a HEK293-6E

Pro zmrazení buněk byla nejprve spočítána hustota dané buněčné suspenze, centrifugována v 50 ml sterilních zkumavkách s víčkem při  $200 \times g$ , 3 min a resuspendována v takovém objemu mrazícího média, aby výsledná hustota byla  $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , v případě normálních alikvotů, nebo  $40 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , v případě alikvotů o vysoké

hustotě. Mrazicí médium sestávalo z 45% objemu z použitého kultivačního média, dále z 45% z čerstvého ExCELL293 média a 10% DMSO. Výsledná suspenze byla rozdělena po 1 ml do kryozkumavek a v mrazicím kontejneru Mr.Frosty (kontrolovaný pokles teploty rychlostí 1°C za minutu) umístěna do -80°C, kde byly zmrazené buňky i nadále skladovány; pro dlouhodobé skladování byly přeneseny do -150°C.

#### **4.2.2. Rozmrazování buněčných linií HEK293T a HEK293-6E**

Do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem bylo pipetováno 10 ml na 37°C předeřátého ExCELL293 média. Alikvotní množství buněk obsahující 1 ml suspenze o hustotě  $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$  bylo rychle rozmrazeno ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37°C a přeneseno do připraveného média. Výsledná suspenze byla jemně promíchána a centrifugována při 200 x g, 3 min. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 10 ml ExCELL293 média a přeneseny na 10 cm Petriho misku.

#### **4.2.3 Kultivace buněčných linií HEK293T a HEK293-6E**

Buněčné kultury byly kultivovány v inkubátoru při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> na Petriho miskách nebo v čtverhranných lahvích na třepačce v příslušném kultivačním médiu a „pasážovány“ ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala přibližně mezi  $0,2$  až  $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

Buněčná linie HEK293T byla kultivována v ExCELL293 médiu, nebo ve směsi ExCELL293 média a DMEM média bez vápníku v poměru 1:1. Buněčná linie HEK293-6E byla kultivována v F17 médiu, nebo ve směsi F17 média a ExCELL293 média v poměru 1:1. Po dosažení 24 h generační doby bylo ke kultivačnímu médiu přidáváno antibiotikum G418 ve výsledné koncentraci  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Běžný postup údržby zásobní kultury probíhal následovně. 2-3 dny po rozmrazení alikvotního množství dosáhly buňky na 10 cm Petriho misce hustoty  $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , byly rozmíchány 10 ml pipetou pomocí pipetovacího nástavce a trojnásobně zředěny na celkem tři 10 cm Petriho misky. Po dalších 2-3 dnech byly buňky stejným postupem převedeny do 75 ml příslušného kultivačního média ve 250 ml čtverhranné láhvi s víčkem s prodyšným filtrem a třepány na orbitální třepačce (Orbit 1000, Labnet, USA) vybavené adhezivní podložkou (Sticky Pad, New Brunswick Scientific, USA) rychlostí 135 ot./min (rotační průměr 19 mm) uvnitř inkubátoru. Optimální objem média je za těchto podmínek 30-40% objemu láhve. Tato kultura pak byla udržována

a užívána k optimalizačním testům (0,5 ml v 24 jamkových destičkách, 2 ml v 12 jamkových destičkách nebo 10 ml v 100 ml kulatých lahvičkách).

#### **4.2.3 Počítání buněčné hustoty pomocí hemocytometru**

Buňky byly počítány manuálně pomocí hemocytometru. Automatickou pipetou bylo odebráno 20  $\mu$ l rozmíchané buněčné suspenze a v mikrozkuhavce zředěno smícháním s 20 - 80  $\mu$ l 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK. Po 5 min inkubaci bylo 20  $\mu$ l směsi pipetováno do hemocytometru. Živé (průhledné) i mrtvé (modré) buňky byly spočítány zvlášť ve všech devíti čtvercích, průměrná hodnota pro jeden čtverec vynásobená faktorem ředění a faktorem  $1 \cdot 10^4$  pak odpovídá buněčné hustotě v jednotkách  $10^6 \text{ ml}^{-1}$ ; procento živých buněk (viabilita) odpovídá podílu počtu živých buněk a součtu všech buněk vynásobeného stem.

### **4.3 Transfekce buněčných linií HEK293T a HEK293-6E**

#### **4.3.1 Příprava transfekčního roztoku plasmidové DNA a PEI**

Pro přípravu transfekčního roztoku bylo potřebné množství příslušného plasmidu (podle zvoleného množství DNA na  $10^6$  buněk; např 1  $\mu$ g DNA na  $10^6$  buněk) zředěno ve sterilní plastové zkuhavce do PBS-TK, stejně tak bylo v jiné sterilní plastové zkuhavce zředěno příslušné množství IPEI (podle zvoleného hmotnostního poměru DNA : PEI; např 1:4) do stejného objemu PBS-TK. Objemy PBS-TK byly voleny tak, aby výsledný přírůstek transfekčního roztoku nebyl větší než 10% objemu produkční suspenze (např. v případě produkčního objemu 0,5 ml na 24 jamkové destičce transfekční roztok nepřesáhl 50  $\mu$ l). Roztok plasmidové DNA byl poté sterilizován filtrací přes 0,22  $\mu$ m filtr a přidán k roztoku IPEI. Výsledný roztok byl důkladně protřepán a inkubován 20-30 min a poté byl přidán k připravené buněčné suspenzi. Během inkubace se roztok mírně zakalil.

Při optimalizačních experimentech byl připravován jeden transfekční roztok, který byl v různých objemech pipetován k buněčné suspenzi tak, aby vznikla příslušná optimalizační řada při zachování maximálně 10% objemového přírůdku. V případě optimalizace poměru DNA:PEI – s proměnným množstvím IPEI a konstantním množstvím DNA byly nejprve připraveny zředěné roztoky DNA a IPEI, které pak byly

v příslušných objemech pipetovány do sady sterilních zkumavek za vzniku příslušné optimalizační řady.

Pro optimalizační experimenty zahrnující stanovení SEAP i GFP bylo k plasmidu pTTo3c-SSH přidáno i 5% (w/w) navíc plasmidu pTTo-GFPq.

#### **4.3.2 Příprava buněčné suspenze pro transientní transfekci**

Před přípravou transfekčního roztoku byla určena buněčná hustota předkultivované buněčné suspenze. Během inkubace transfekčního roztoku pak bylo potřebné množství převedeno do příslušné nádoby, objemu a hustoty – podle charakteru optimalizačního experimentu. Přenos probíhal odebráním požadovaného objemu suspenze 25 ml pipetou pomocí pipetovacího nástavce do 50 ml sterilních zkumavek s víčkem, centrifugací při 200 x g, 3 min a následným resuspendováním v příslušném objemu příslušného transfekčního média a přenosem do příslušné nádoby. Po konci inkubace transfekčního roztoku byl tento přidán k připravené buněčné suspenzi.

##### **4.3.2.1 Použitá transfekční a produkční média**

Pro transfekci a produkci byly buňky převáděny do těchto médií:

- DMEM médium bez vápníku, 2%FBS
- Freestyle293
- Polovina výsledného objemu DMEM médium bez vápníku + 4 h po transfekci pak doplněno ExCELL293 médiem (př. 0,25 ml buněčné suspenze v DMEM médiu bez vápníku je pipetováno na 24 jamkovou destičku, k suspenzi je přidán transfekční roztok, 4 h po transfekci je k suspenzi pipetováno 0,25 ml ExCELL293 média)
- F17

##### **4.3.2.2 Použité transfekční a produkční nádoby a objemy**

Pro optimalizaci byly používány tyto objemy v těchto nádobách:

- 0,5 ml v 24 jamkové destičce
- 2 ml v 12 jamkové destičce
- 10 ml v 100 ml láhvi s kulatým dnem

### 4.3.3 Použitá aditiva

- Zásobní roztoky Tryptone N1 (20% v F17 médiu) a VPA (0,5 M v dH<sub>2</sub>O) byly sterilizovány filtrací přes 0,22 µm filtr a uchovávány při 4°C, resp. -20°C.
- VPA byla přidávána k transfekovaným kulturám 4 h po transfekci ihned po přidání ExCELL293 média. Tryptone N1 byl přidáván k transfekovaným kulturám 48 h po transfekci.

## 4.4 Stanovení reportérových proteinů

### 4.4.1 Stanovení sekretované alkalické fosfatasy

Zásobní roztok činidla pro stanovení SEAP byl připraven dle návodu z publikace Y. Durochera [33] o výsledném složení – 20 mM pNPP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M diethanolamin v dH<sub>2</sub>O, pH = 9,8. Zásobní roztok byl sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr a uchováván při -20°C, před použitím byl rozmrazen a zahřát na pokojovou teplotu.

Z produkujících buněčných suspenzí transfekovaných pTTo3c-SSH byl do plastové zkumavky odebrán 50 µl vzorek, centrifugován 200 x g, 1 min. Supernatant byl poté postupně na 96 jamkové destičce s plochým dnem vhodně ředěn dH<sub>2</sub>O (typické ředění např. tisíckrát) do výsledného objemu 180 µl. Následně bylo k zředěnému vzorku pipetováno 20 µl činidla. U takto připravené série vzorků byla na spektrofotometrické automatické čtečce Safire<sup>2</sup> každých 30 s změřena A<sub>410</sub>. Měření bylo ukončeno po 10 až 20 min.

### 4.4.2 Stanovení zeleného fluorescenčního proteinu

Z produkujících buněčných suspenzí transfekovaných pTTo-GFPq byl na 96 jamkovou destičku s kulatým dnem odebrán 25-50 µl resuspendovaný vzorek a zředěn na 150 µl pomocí PBS-TK. K výsledné buněčné suspenzi bylo přidáno 10 µl roztoku propidium jodidu o koncentraci 10 µg.ml<sup>-1</sup> v PBS, jako viabilitu potvrzující agens. Propidium jodid je interkalátor DNA, který neprostupuje buněčnou membránou, pokud tato neztratila svou integritu, tedy pokud není buňka poškozená nebo mrtvá. Nutno dodat, že takto stanovená viabilita byla empiricky zhruba o 20% nižší než viabilita stanovená pomocí trypanové modře (viz. kapitola 4.2.3). U takto připravených vzorků byla RNDr. Janem Svobodou nebo Zdeňkem Cimburkem (*Centrum pro*



*cytometrii a mikroskopii*, MBÚ, AVČR v.v.i.) průtokovým cytometrem BD LSR II změřena viabilita, GFP pozitivita a úroveň fluorescence buněčné suspenze. Buňky byly postupně tříděny podle své velikosti (odpovídající jednotlivým buňkám, kalibrace na netransfekovanou kulturu jako kontrolu), míry fluorescence propidium jodidu (vysoká - mrtvé buňky, nízká - živé buňky; viabilita - procentuální zastoupení živých) a míry fluorescence GFP (nízká - buňky netransfekované, vysoká - buňky úspěšně transfekované). Výsledná populace buněk byla tedy vybrána jako propidium jodid negativní, GFP pozitivní (PI<sup>-</sup>, GFP<sup>+</sup>) a úspěšnost transfekce byla posuzována jako procento GFP<sup>+</sup> buněk ze všech živých (PI<sup>-</sup>) buněk.

#### **4.6 Zpracování dat**

Získané soubory dat byly přeneseny do tabulkového kalkulátoru MS Office Excel 2003, ve kterém byla vypočítána směrnice jejich lineární aproximace. Záporné hodnoty nebo extrémně odlehlé hodnoty v rámci triplikátu byly vyřazeny. Výsledná hodnota reprezentující úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy byla vypočítána jako průměr hodnot reprezentujících úroveň exprese v jednotlivých experimentech triplikátu a byla opatřena směrodatnou odchylkou tohoto průměru.

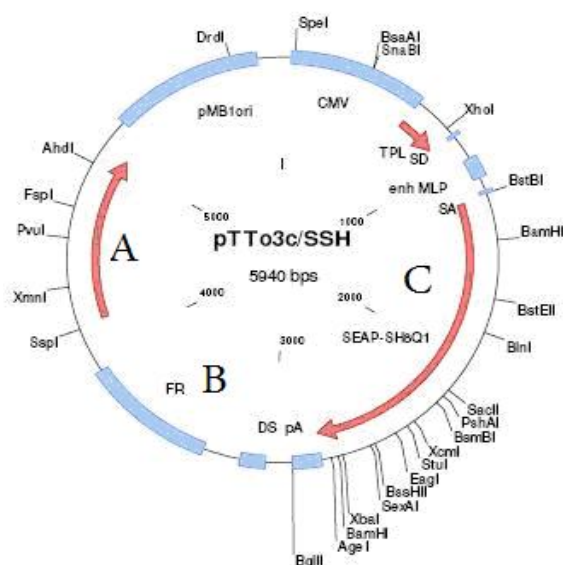
Získaná data z průtokové cytometrie byla vyhodnocována RNDr. Janem Svobodou v programu FlowJo 7.2.5 (Tree Star Inc) a exportována do tabulkového kalkulátoru MS Office Excell 2003, kde byl v rámci triplikátů spočítán průměr příslušných hodnot opatřený směrodatnou odchylkou tohoto průměru.

Takto zpracovaná data byla převedena do tabulkového kalkulátoru OriginPro 8, kde byla zpracována do podoby shrnujících grafů.

## 5. Výsledky

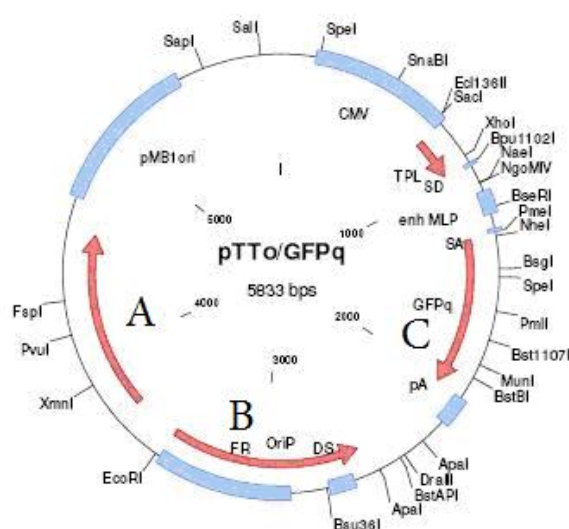
### 5.1 Velkoobjemová příprava vektorů pTTo3c-SSH a pTTo-GFPq

Pro optimalizaci rekombinantní exprese proteinů v buněčných liniích HEK293T a HEK293-6E bylo potřeba najít vhodné reportérové proteiny, které by byly stanovitelné již v malých absolutních expresních výtěžcích. Takovými proteiny se ukázaly být sekretovaná alkalická fosfatasa a zelený fluorescenční protein. Jejich vektory – pTTo3c-SSH (viz. Obr. 7) a pTTo-GFPq (viz. Obr. 8), byly získány z laboratoře Y. Durochera (Montreal, Kanada).



Obr. 7: pTTo3c-SSH

A – ampicilinová rezistence, B – oriP,  
C – gen pro sekretovanou alkalickou fosfatasu



Obr. 8: pTTo-GFPq

A – ampicilinová rezistence, B – oriP,  
C – gen pro zelený fluorescenční protein

Nejprve bylo nutné provést velkoobjemovou přípravu vektorů. Transformaci do kompetentních buněk *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) a velkoobjemový nárůst pozitivních klonů provedla Petra Celadová, výchozím materiálem byly zmrazené pelety z 0,5 l kultivace; dále bylo postupováno dle kapitoly 4.1. Pro stanovení čistoty a množství plasmidové DNA byla měřena absorbance při vlnové délce 260 nm a 280 nm (viz Tab. 1).

Tab. 1: Velkoobjemová příprava plasmidů pTTo3c-SSH a pTTo-GFPq

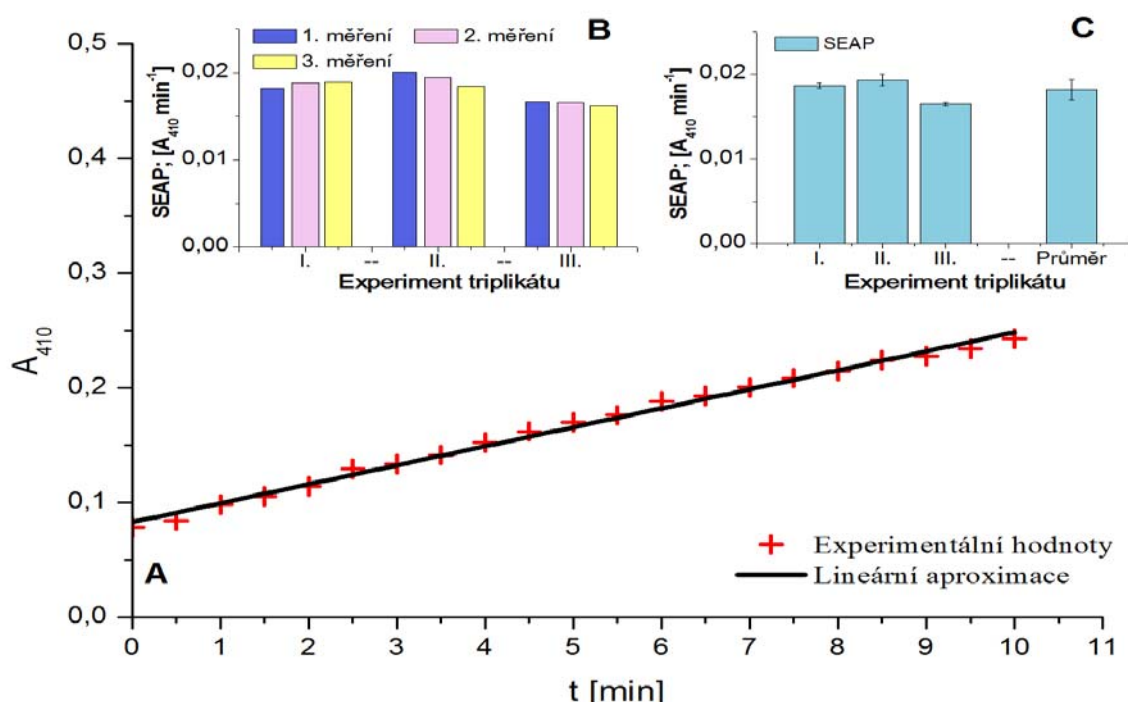
Naměřené hodnoty  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ , koncentrace roztoku plasmidu a jeho čistota vyjádřená poměrem  $A_{260}/A_{280}$ .

Plasmid	$A_{260}$	$A_{280}$	$c$ [ $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ]	$A_{260}/A_{280}$
pTTo3c-SSH	0,186	0,098	2,8	1,9
pTTo-GFPq	0,273	0,152	4,1	1,8

## 5.2 Zavedení metody stanovení alkalické fosfatasy

Optimalizační experimenty by nebylo možné provádět bez vhodné metody pro stanovení alkalické fosfatasy, efektivního statistického zpracování velkého objemu dat a postupu zmenšujícím systematickou chybu. Pokud není uvedeno jinak, byly experimenty prováděny v triplikátech a vyhodnocovány 72 h po transfekci.

U odebraného vzorku byla podle kapitoly 4.4.1 změřena časová závislost  $A_{410}$  (viz Obr. 9, panel A). Dále byla vypočítána směrnice lineární aproximace této závislosti, odpovídající časové změně  $A_{410}$ , vypovídající o množství exprimované alkalické fosfatasy. Pro zmenšení systematické chyby byl s každým vzorkem opakován stejný postup třikrát (viz Obr. 9, panel B). Výsledky trojnásobných měření experimentů triplikátu pak byly zprůměrovány a opatřeny směrodatnými odchylkami těchto průměrů (viz Obr. 9, panel C). Výsledná hodnota užitá pro reprezentaci množství exprimované alkalické fosfatasy za zvolených podmínek se vypočítala jako průměr z průměrů jednotlivých měření experimentů triplikátu a je opatřena směrodatnou odchylkou tohoto konečného průměru (viz Obr. 9, panel C).

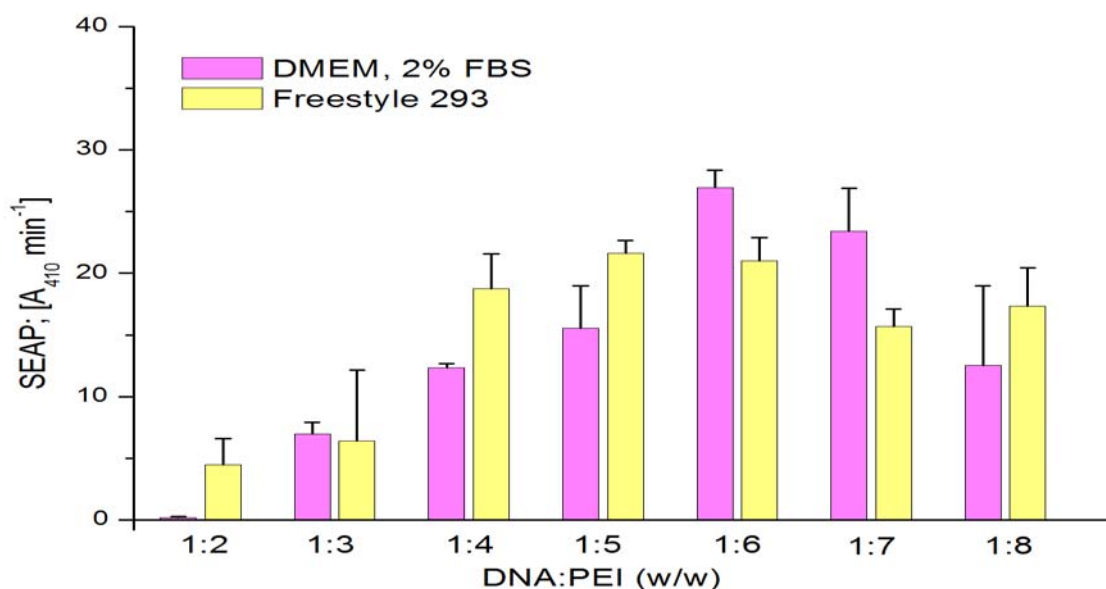


Obr. 9: Statistické zpracování získaných dat pro stanovení alkalické fosfatasy

**Panel A** reprezentuje graf závislosti naměřené  $A_{410}$  na čase (+), pro tuto závislost je pomocí tabulkového kalkulátoru MS Excell 2003 zkonstruována lineární aproximace (plnou čarou). **Panel B** ukazuje sloupcovým grafem porovnání směrnic takových lineárních aproximací u triplikátu dat, přičemž každý experiment byl změřen třikrát. **Panel C** sloupcovým grafem porovnává průměrné naměřené hodnoty v triplikátu (I., II., III.) a ukazuje průměrnou hodnotu triplikátu (Průměr).

### 5.3 Optimalizace poměru DNA:PEI (w/w)

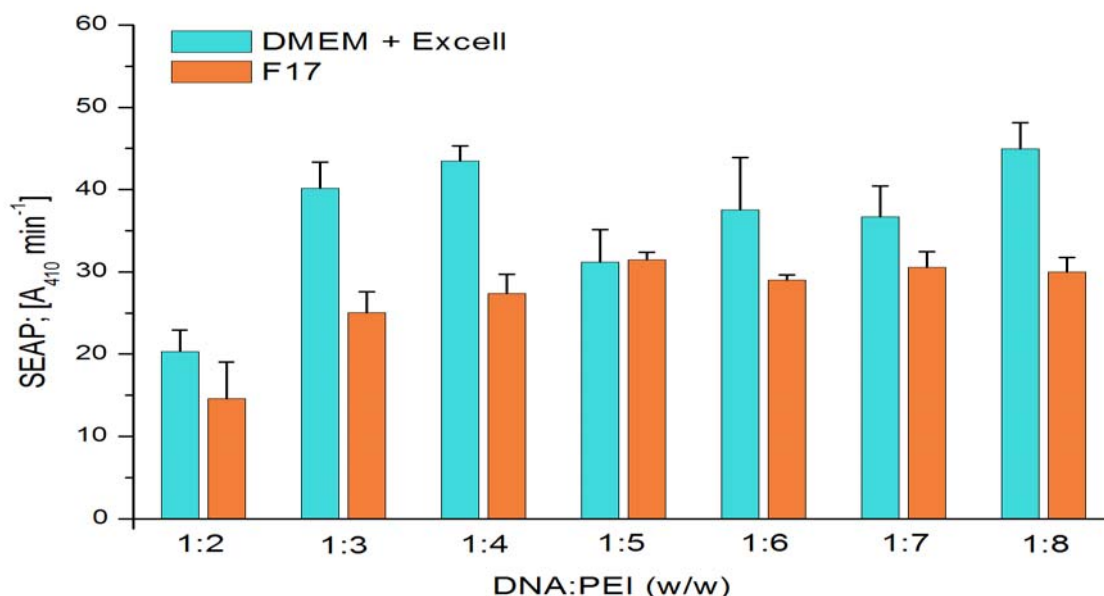
Kritickým parametrem pro expresi rekombinantních proteinů v HEK293 buněčných liniích je zvolený poměr DNA ku transfekčnímu agens, v našem případě IPEI. Tento poměr se odvíjí od charakteru šarže zakoupeného IPEI a chemického složení použitého média. Je proto nutné a vhodné tento poměr optimalizovat. V rámci zavedení metody stanovení alkalické fosfatasy byla tato optimalizace provedena s linií HEK293T v DMEM médiu s 2% přídavkem FBS a v komerčním médiu Freestyle 293 (viz Obr. 10).



**Obr. 10: Optimalizace poměru DNA:PEI (w/w) - HEK293T; DMEM (2%FBS), Freestyle293**

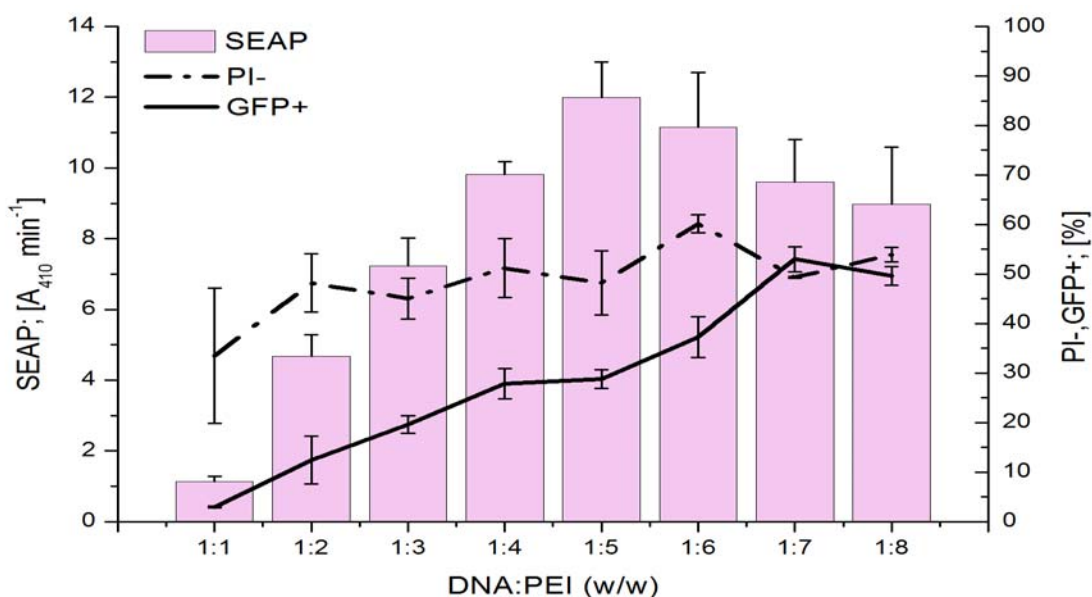
Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk s proměnným množstvím IPEI. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem (růžovou v DMEM médiu, 2% FBS; žlutou v médiu Freestyle293), každý sloupec reprezentuje průměr triplikátu.

Protože DMEM médium s přidaným FBS nebylo vhodné pro suspenzní kultivaci a médium Freestyle293 bylo nahrazeno levnějším médiem F17, bylo od dalších optimalizací v těchto médiích upuštěno. Další práce se soustředila na optimalizaci exprese v médiu F17 a v DMEM médiu bez vápníku, ke kterému byl 4 h po transfekci přidáván stejný díl média ExCELL293 (viz Obr. 11, str. 36). Během další fáze práce byla dohodnuta spolupráce s centrem pro cytometrii a mikroskopii (MBÚ, AVČR v.v.i.), která umožnila stanovení viability kultury a procento úspěšně transfekovaných buněk, podle kapitoly 4.4.2., a byly provedeny optimalizace poměru DNA:PEI v linii HEK 293-6E (viz Obr. 12, str. 36 a Obr. 13, str. 37).



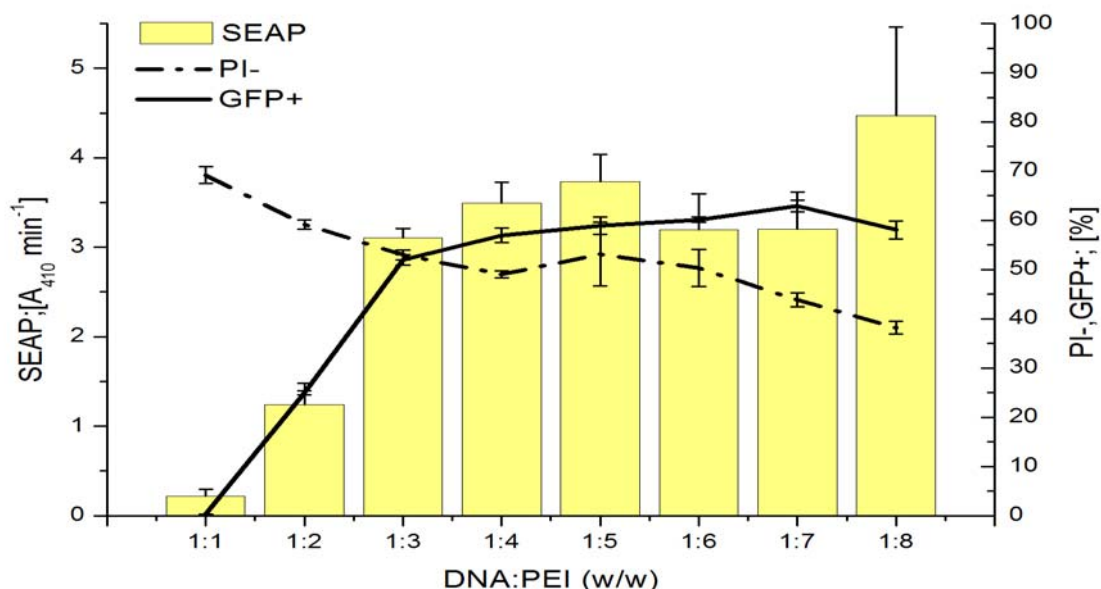
**Obr. 11: Optimalizace poměru DNA:PEI (w/w) - HEK293T; DMEM + ExCELL293, F17**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $1.10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk s proměnným množstvím IPEI. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem (**modře** v DMEM médiu bez vápníku s přidavkem ExCELL293 4 h po transfekci, **oranžově** v F17 médiu), každý sloupec reprezentuje průměr triplikátu.



**Obr. 12: Optimalizace poměru DNA:PEI (w/w) - HEK293-6E; F17**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk s proměnným množstvím IPEI. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.



**Obr. 13: Optimalizace poměru DNA:PEI (w/w) - HEK293-6E; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk s proměnným množstvím IPEI. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.

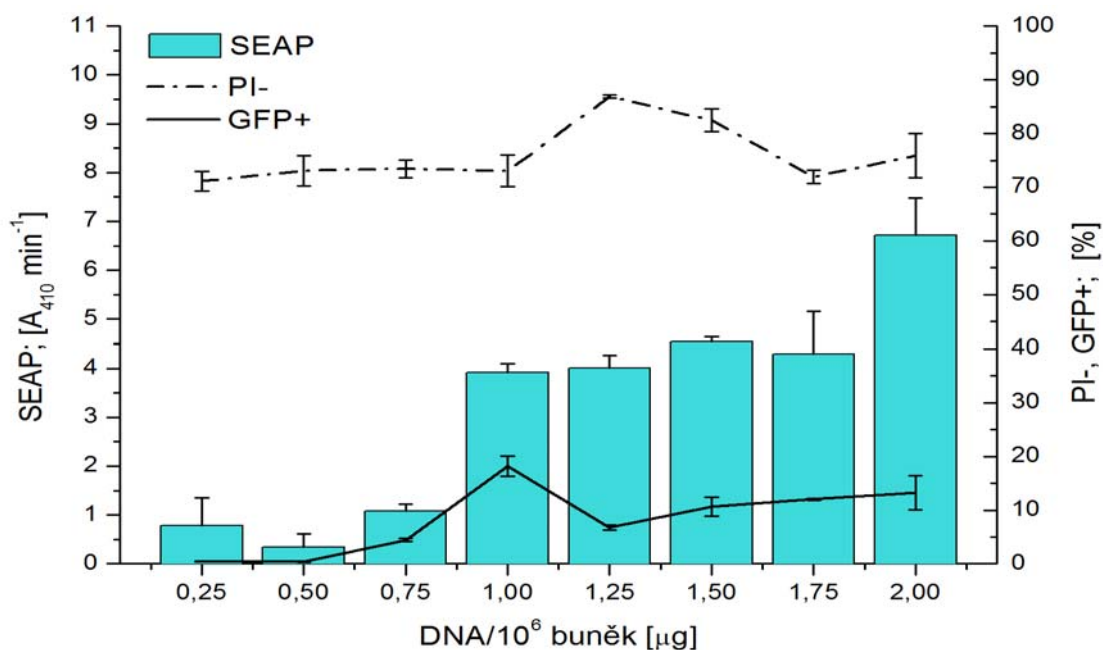
Optimalizační výsledky ukázaly, že se vhodné poměry DNA:PEI (w/w) pro obě buněčné linie v různých médiích pohybují mezi 1:4 a 1:5. Ukázalo se, že i když se zvyšujícím množstvím transfekčního agens roste úspěšnost transfekce, je pro expresi sekretovaných proteinů vhodné a možné zvolit nižší poměry. U linie HEK293-6E byly pozorovány přijatelné úrovně exprese u poměrů 1:3 až 1:6, u linie HEK293T pak 1:3 až 1:5. Pro další práci byly z hlediska úspory materiálu zvoleny poměry shrnuté v Tab. 2.

**Tab. 2: Shrnutí výsledků optimalizace poměru DNA:PEI (w/w)**

Linie	Médium	Výsledný poměr
HEK293T	DMEM, 2% FBS	1:6
HEK293T	Freestyle 293	1:5
HEK293T	DMEM + ExCELL293	1:4
HEK293T	F17	1:5
HEK293-6E	DMEM + ExCELL293	1:4
HEK293-6E	F17	1:5

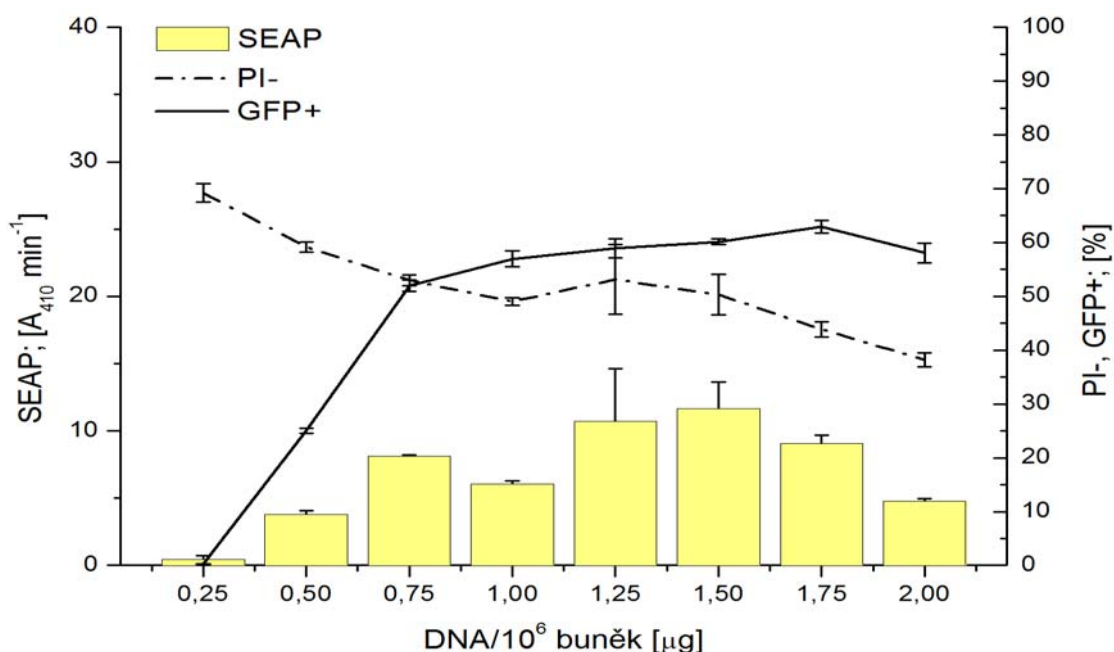
## 5.4 Optimalizace nutného množství DNA za konstantního poměru DNA:PEI (w/w)

Paralelně probíhající velkoobjemové produkce vyvolaly snahu ke zmenšení spotřeby plasmidové DNA užívané pro transfekci – standardně byl užíván 1  $\mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk v transfekované suspenzi. Proto bylo optimalizováno množství DNA na buňky při vybraném poměru DNA:PEI (w/w). Tento experiment byl proveden pro obě buněčné linie pouze v DMEM médiu bez vápníku, ke kterému byl 4 h po transfekci přidáván stejný díl média ExCELL293 (viz Obr. 14 a Obr. 15, str. 39). Médium F17 tímto způsobem nebylo optimalizováno, neboť při velkoobjemových produkcích vykazovalo nižší produkční výtěžky (data neuvedena).



**Obr. 14: Optimalizace množství DNA pro úspěšnou expresi - HEK293T; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven v poměru DNA:PEI (w/w) 1:4, s proměnným množstvím DNA. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.



**Obr. 15: Optimalizace množství DNA pro úspěšnou expresi - HEK293-6E; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven v poměru DNA:PEI (w/w) 1:4, s proměnným množstvím DNA. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.

Výsledky experimentů této fáze optimalizace ukázaly, že u linie HEK293T není vhodné snižovat množství DNA na  $10^6$  buněk v transfekčním roztoku pod 1 µg. U linie HEK293-6E se naopak projevila úspěšná exprese sekretované alkalické fosfatasy i při nižším množství DNA na  $10^6$  buněk než 1 µg. Použité hodnoty jsou shrnuty v Tab. 3.

**Tab. 3: Shrnutí výsledků optimalizace množství DNA potřebné pro úspěšnou expresi**

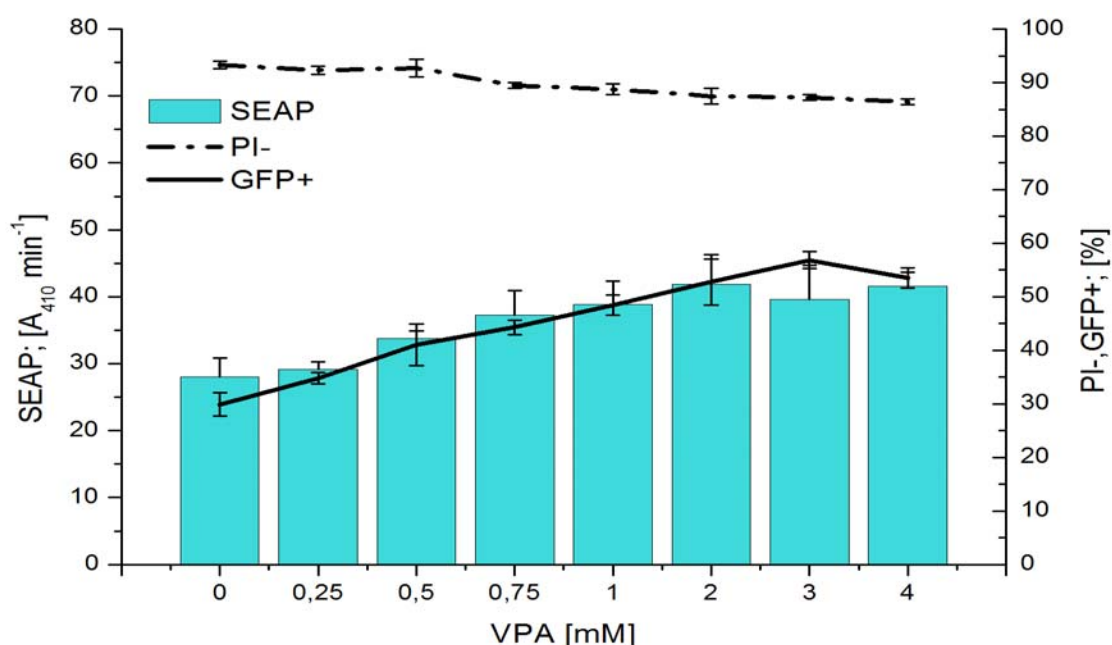
Linie	Médium	Výsledné množství DNA / $10^6$ buněk [µg]
HEK293T	DMEM + ExCELL293	1,0
HEK293-6E	DMEM + ExCELL293	0,75 – 1,0



## 5.5 Studium vlivu valproové kyseliny

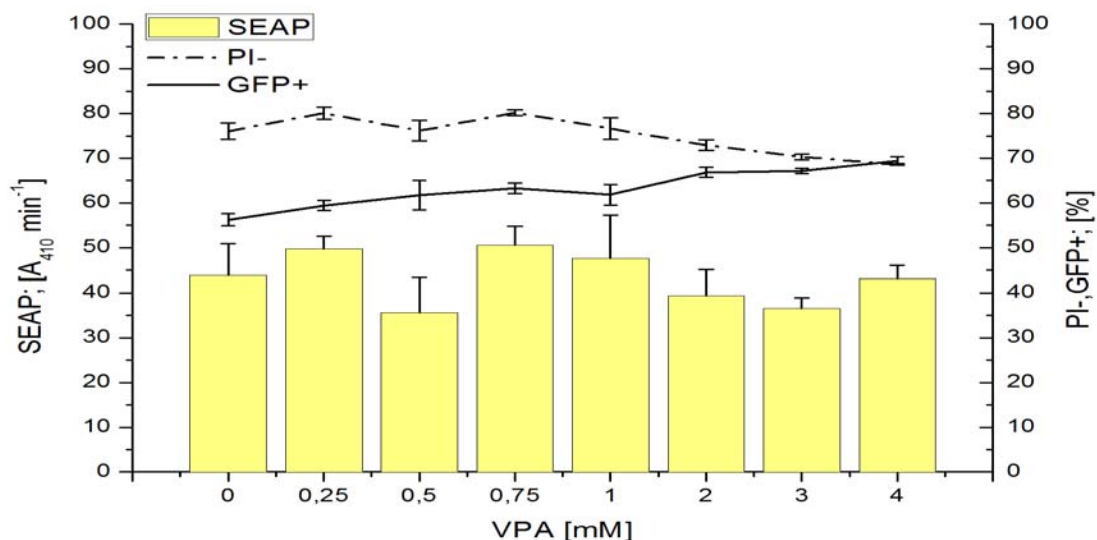
V další fázi optimalizačních experimentů byl studován vliv zvyšující se koncentrace valproové kyseliny z hlediska jejího účinku na stav kultury a úroveň exprese alkalické fosfatasy. Studovány byly linie HEK293T (viz Obr. 16) a HEK293-6E (viz Obr. 17, str. 41) v DMEM médiu bez vápníku, ke kterému byl 4 h po transfekci přidáván stejný díl média ExCELL293 a linie HEK293-6E v médiu F17 (viz Obr. 18, str. 41).

Tyto experimenty byly prováděny s konstantním užitým množstvím DNA na počet buněk a jedním vybraným poměrem DNA:PEI (w/w), valproová kyselina byla přidávána 4 h po transfekci.



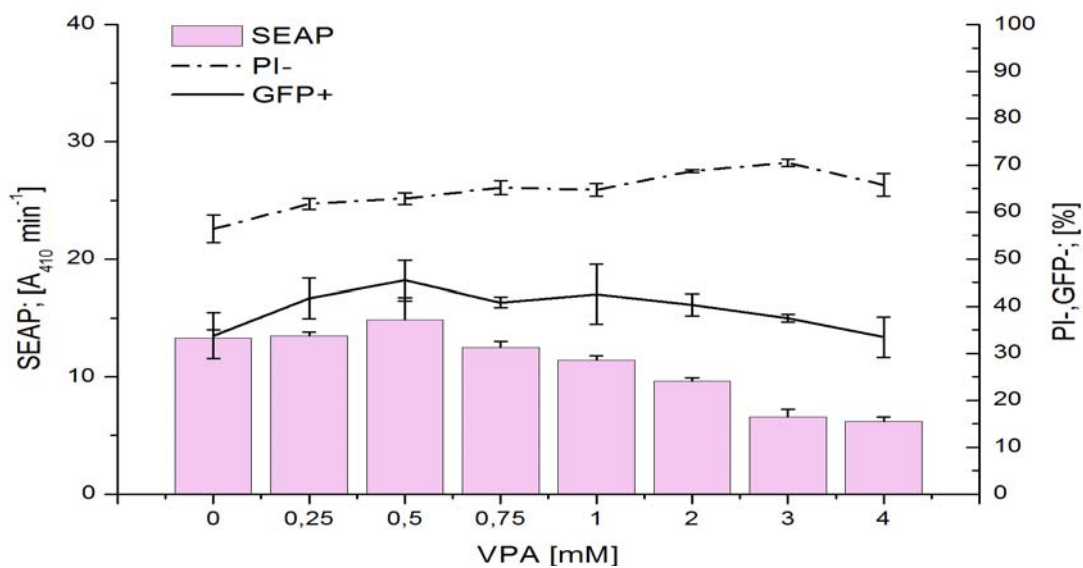
**Obr. 16: Vliv VPA na rekombinantní expresi - HEK293T; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk v poměru DNA:PEI (w/w) 1:5. Příslušný objem zásobního roztoku VPA byl přidáván 4 h po transfekci. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.



**Obr. 17: Vliv VPA na rekombinantní expresi - HEK293-6E; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk v poměru DNA:PEI (w/w) 1:5. Příslušný objem zásobního roztoku VPA byl přidáván 4 h po transfekci. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.



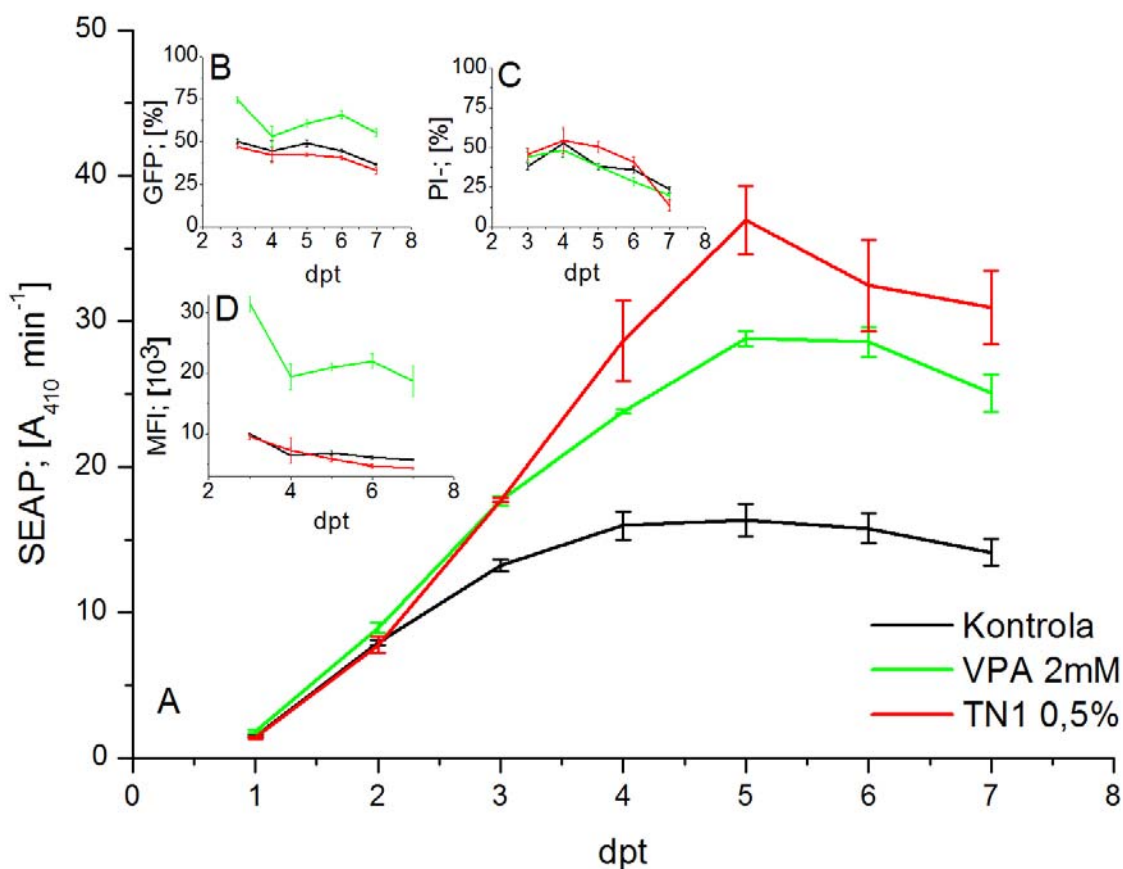
**Obr. 18: Vliv VPA na rekombinantní expresi - HEK293-6E; F17**

Transfekce byla prováděna v 24 jamkové destičce v objemu 0,5 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk v poměru DNA:PEI (w/w) 1:5. Příslušný objem zásobního roztoku VPA byl přidáván 4 h po transfekci. Úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy je vyjádřena sloupcovým grafem, čárovým grafem je vyjádřeno procento pozitivně transfekovaných buněk (**plnou čarou**) a viabilita kultury (**čerchovanou čarou**). Všechna data jsou průměrem triplikátu.

Výsledky vlivu valproové kyseliny naznačily u linie HEK293T pozitivní účinek na expresi sekretované alkalické fosfatasy, zatímco u linie HEK293-6E nebyl takový trend pozorován, naopak v případě použití média F17 se účinek VPA jevil dokonce spíše negativní. Ani u jedné linie se v testovaném koncentračním rozpětí neprojevila snížená viabilita, která by ukazovala např. na apoptotické účinky. Vliv valproové kyseliny byl dále studován pro zvolenou koncentraci 2 mM ve výsledném objemu, protože v médiu DMEM bez vápníku, ke kterému byl 4 h po transfekci přidán stejný díl média ExCELL293, se u linie HEK293T jevila jako koncentrace nejvíce pozitivně ovlivňující úroveň exprese sekretovaného proteinu. A naopak u linie HEK293-6E neměla v tomto médiu při této koncentraci žádný pozorovaný vliv.

## **5.6 Časové závislosti exprese reportérových proteinů**

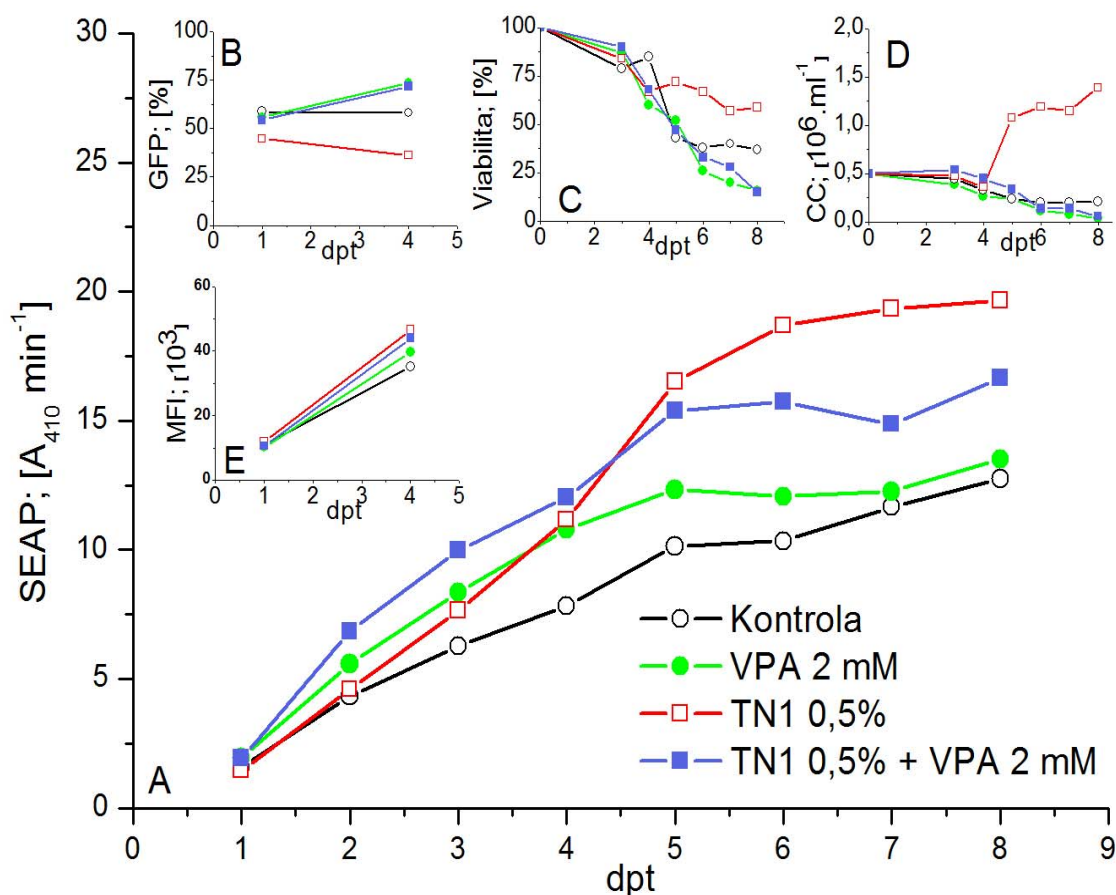
Závěrem této práce byl studován vliv valproové kyseliny a kaseinového hydrolyzátu Tryptone N1 na časový vývoj exprese reportérových proteinů v průběhu jednoho týdne při odebírání vzorků po 24 h. Experiment byl prováděn pro obě linie opět jen v DMEM médiu bez vápníku, ke kterému byl 4 h po transfekci přidáván stejný díl média ExCELL293. Protože bylo u linií HEK293T (viz Obr. 19, str. 43) a HEK293-6E (viz Obr. 20, str. 44) použito jiného postupu z hlediska objemu média a typu nádoby, nejsou tyto výsledky přímo porovnatelné. Vystupují spíše jako samostatné výsledky, ukazující na vliv valproové kyseliny a hydrolyzátu Tryptone N1 z hlediska exprese reportérových proteinů u dané linie. U linie HEK293T byl opět pozorován pozitivní efekt valproové kyseliny, který se u linie HEK293-6E neprojevil. U linie HEK293T lze v případě valproové kyseliny také pozorovat zvýšenou intenzitu fluorescence GFP, která je úměrná úrovni exprese zeleného fluorescenčního proteinu. U obou buněčných linií je pak dobře patrný silný pozitivní vliv hydrolyzátu TN1.



**Obr. 19: Časová závislost exprese reportérových proteinů - HEK293T; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna v 12 jamkové destičce v objemu 2 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk v poměru DNA:PEI (w/w) 1:4. Získaná data jsou zobrazena čárovými grafy v závislosti na dnech po transfekci (dpt). Černě je zobrazena kontrolní produkční kultura bez aditiv. Zelenou je zobrazena produkční kultura, ke které byla přidána kyselina valproová 4 h po transfekci tak, že její koncentrace byla ve výsledném objemu 2 mM. Červenou je zobrazena produkční kultura, ke které byl přidán hydrolyzát Tryptone N1 48 h po transfekci do 0,5% obsahu ve výsledném objemu. Vzorky byly odebrány a měřeny po 24 h.

**Panel A** zobrazuje úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy. **Panel B** zobrazuje procento pozitivně transfekovaných buněk. **Panel C** zobrazuje viabilitu kultury. **Panel D** zobrazuje průměrnou intenzitu fluorescence GFP. Data jsou průměrem triplikátu.



**Obr. 20: Časová závislost exprese reportérových proteinů - HEK293-6E; DMEM + ExCELL293**

Transfekce byla prováděna ve 100 ml kulatých láhvích v objemu 10 ml buněčné suspenze o hustotě  $0,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Experiment nebyl prováděn v triplicátu. Transfekční roztok byl připraven z  $1 \mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk v poměru DNA:PEI (w/w) 1:4.

Získaná data jsou zobrazena čárovými grafy v závislosti na dnech po transfekci (dpt). Černě je zobrazena kontrolní produkční kultura bez aditiv. Zelenou je zobrazena produkční kultura, ke které byla přidána kyselina valproová 4 h po transfekci tak, že její koncentrace byla ve výsledném objemu 2 mM. Červenou je zobrazena produkční kultura, ke které byl přidán hydrolyzát Tryptone N1 48 h po transfekci do 0,5% obsahu ve výsledném objemu. Produkční kultura, ke které byla přidána jak VPA tak Tryptone N1 (ve stejný čas a stejných výsledných koncentracích jak je výše uvedeno) je zobrazena modře. Vzorky byly odebírány a měřeny po 24 h.

**Panel A** zobrazuje úroveň exprese sekretované alkalické fosfatasy. **Panel B** zobrazuje procento pozitivně transfekovaných buněk (měřeno pouze 1. a 4. dpt). **Panel C** zobrazuje viabilitu kultury počítanou hemocytometrem. **Panel D** zobrazuje buněčnou hustotu počítanou hemocytometrem. **Panel E** zobrazuje průměrnou intenzitu fluorescence GFP (měřeno pouze 1. a 4. dpt).

## 6. Diskuse

Hlavním cílem této práce byla optimalizace rekombinantní exprese proteinů v HEK293T a 6E buněčných liniích za účelem zvýšení exprese sekretovaných proteinů pro strukturně biologické studie prováděné v Laboratoři architektury proteinů (MBÚ, AVČR v.v.i.). Protože bylo neekonomické dělat velké série optimalizačních experimentů, zahrnujících interval různých parametrů jedné relevantní podmínky, ve velkých objemech. A zároveň nebylo možné vyhodnotit takové experimenty s produkovanými proteiny v malých objemech. Bylo nutné zavést optimalizační postup pomocí reportérových proteinů SEAP a GFP. Tyto proteiny jsou vyhodnotitelné již v malých absolutních výtěžcích a běžně se k optimalizaci rekombinantní exprese používají. Vektory s těmito proteiny byly spolu s buněčnou linií HEK293-6E laskavě poskytnuty z laboratoře Y. Durochera (Montreal, Kanada).

První optimalizační experimenty a snaha o zmenšení systematické chyby při stanovení SEAP záhy přinesly velké soubory dat, které nebylo snadné dostatečně rychle vyhodnocovat, což v počáteční fázi zpomalovalo práci. Toto úskalí bylo překonáno počítačovou automatizací pomocí vytvoření vlastních algoritmů (tzv. makra) v tabulkovém kalkulátoru MS Office Excel 2003. Spolu s navázáním spolupráce s Centrem pro cytometrii a mikroskopii (MBÚ, AVČR v.v.i.), umožňující vyhodnocení GFP, byla zavedena metoda pro optimalizaci rekombinantní exprese.

Buněčná linie HEK293T byla v laboratoři úspěšně pěstována již více než rok a její adaptace na suspenzní kultivaci v médiu ExCELL293 proběhla poměrně snadno. Linie HEK293-6E získaná z Kanady byla již adaptovaná na suspenzní kultivaci v médiu F17 a její převod do média ExCELL293 činil ze začátku problémy, které se později podařilo překonat. Tento postup sice nebyl hlavní náplní této bakalářské práce, přesto na něm byla do značné míry závislá a pomoc s kultivací obou linií byla samozřejmostí.

Prvním optimalizovaným parametrem byl poměr DNA:PEI (w/w), tento poměr je kritický při utváření transfekčního komplexu a samotném procesu transfekce. V předchozích pracích prováděných v laboratoři byl testován poměr 1:2 a po několika méně úspěšných produkcích pak poměr 1:5. V dostupné literatuře lze nalézt velký interval užívaných poměrů (přibližně 1:2 až 1:11) v závislosti na šarži zakoupeného IPEI nebo složení použitého média, proto byl tento poměr testován pro obě linie v již zavedených transfekčních postupech – tzn. v médiu F17 a v DMEM médiu bez vápníku s přidavkem ExCELL293 média po transfekci. Získaná data potvrdila, že pro dosažení

úspěšné transfekce a produkce r-proteinů je v našich podmínkách nutné používat spíše vyšší poměry v rozmezí 1:4 až 1:6, v závislosti na daném typu transfekčního média. Ukázala také nevhodnost absolutního porovnávání experimentů prováděných v různých časech, neboť tyto se mohly lišit stářím a stavem kultury před transfekcí, nebo celkovým zatížením třepačky, jež někdy činilo problémy s udržením stálé teploty. Pro další práci v kombinovaném médiu DMEM bez vápníku s přídavkem ExCELL293 byl proto pro obě linie zvolen poměr 1:4.

Velkoobjemové produkce probíhající paralelně s touto prací podnítily snahu o zmenšení spotřeby DNA pro transientní transfekci. Výsledky této optimalizace ukázaly, že u linie HEK293T není vhodné množství 1  $\mu\text{g}$  DNA na  $10^6$  buněk dále zmenšovat, kdežto u linie HEK293-6E postačuje i o něco menší množství DNA. Tento jev by mohl být způsoben episomální replikací použitých plasmidů v linii HEK293-6E, která v linii HEK293T není možná.

V další fázi práce byl proveden optimalizační experiment sledující vliv vzrůstající koncentrace VPA přidané po transfekci na rekombinantní expresi u obou buněčných linií. Pro linii HEK293T v kombinovaném médiu DMEM bez vápníku s ExCELL293 byl pozorován pozitivní trend korelující s rostoucí koncentrací VPA. Viabilita kultury byla přitom vyrovnaná, což naznačuje že VPA neměla za použitých koncentrací apoptotický účinek. Vliv VPA na linii HEK293-6E ve stejném médiu byl rozporuplný a žádný jasný trend nebyl pozorován. V médiu F17 byl pak pozorován spíše negativní trend při zachování relativně stejné viability kultury.

Optimalizace pokračovaly časově závislými experimenty, které sledovaly vliv VPA a kaseinového hydrolyzátu Tryptone N1 na rekombinantní expresi ve srovnání s kontrolní kulturou těmito látkami neovlivněnou. U linie HEK293T se potvrdil pozitivní vliv VPA. Na zvýšenou expresi rekombinantní DNA ukazuje i zvýšená intenzita fluorescence této kultury, která je úměrná množství buňkami produkovaného GFP. To může souviset s vyšší četností transkripce v přítomnosti VPA. Vliv hydrolyzátu Tryptone N1 přidávaného 48 h po transfekci se ukázal být dokonce ještě silnější. Napomáhal udržet viabilitu kultury na vyšších úrovních o několik dní déle a tak pravděpodobně i zvýšit úroveň produkce dané kultruty.

Podobný experiment byl proveden i s buněčnou linií HEK293-6E, který jsme se však pro větší nápodobu podmínek panujících při skutečné velkoobjemové produkci r-proteinů rozhodli provést nikoli na 12 jamkové destičce, ale přímo v malém objemu suspenzní kultury třepané v láhvích. Z toho důvodu ovšem nebylo možné jej provést

paralelně v multiplikátu, data proto nejsou zatím příliš objektivní, k tomu bude třeba ještě experiment alespoň jednou zopakovat. V tomto experimentu se v prvních dnech projevoval lehce pozitivní vliv VPA, který se však ke konci experimentu spíše zmenšoval, a tak se ani zde významný pozitivní vliv VPA na tuto linii nepotvrdil, což je v souladu s předchozími výsledky z 24 jamkových destiček. Hydrolyzát Tryptone N1 naopak ovlivnil viabilitu i růst kultury, což bylo pravděpodobně příčinou zvýšené rekombinantní exprese SEAP. Kombinovaný experiment VPA s TN1 probíhal ze začátku podobně jako kultura s přidanou VPA. Po přidání TN1 se ale neprojevil jeho pozitivní vliv na viabilitu nebo růst kultury, což je v souladu s očekávaným vlivem VPA na zastavení buněčného růstu; jeho pozitivní vliv na expresi SEAP tak v tomto případě může být čistě jen odrazem dodávky vyčerpávajících se nutrientů.

Očekávaná vyšší úroveň produkce linie HEK293-6E oproti linii HEK293T, umožněná episomální replikací plasmidů s reportérovými geny, se během této práce příliš nepotvrdila. Mohlo to být způsobeno různým stavem používaných kultur při stejných optimalizačních experimentech nebo nedostatečnou adaptací kultury HEK293-6E na námi používaná média. Během této práce také vyvstala otázka optimální hustoty, stáří a stavu kultury bezprostředně před transfekcí, které včetně kombinovaného vlivu VPA a hydrolyzátu Tryptone N1 na produkci linie HEK293T zůstávají námětem pro další experimenty.



## 7. Shrnutí

- Byl zaveden postup optimalizace rekombinantní exprese proteinů v HEK293 buněčných liniích pomocí reportérových genů pro SEAP a GFP
- Byla provedena optimalizace produkce r-proteinů v HEK293T a 6E buněčných liniích v různých médiích z hlediska:
  - Poměru DNA:PEI (w/w) – Tab. 4:

**Tab. 4: Shrnutí výsledků optimalizace poměru DNA:PEI (w/w)**

<b>Linie</b>	<b>Médium</b>	<b>Výsledný poměr</b>
HEK293T	DMEM, 2% FBS	1:6
HEK293T	Freestyle 293	1:5
HEK293T	DMEM + ExCELL293	1:4
HEK293T	F17	1:5
HEK293-6E	DMEM + ExCELL293	1:4
HEK293-6E	F17	1:5

- Nutného množství DNA na  $10^6$  buněk – Tab. 5:

**Tab. 5: Shrnutí výsledků optimalizace množství DNA potřebné pro úspěšnou expresi**

<b>Linie</b>	<b>Médium</b>	<b>Výsledné množství DNA / 10<sup>6</sup> buněk [μg]</b>
HEK293T	DMEM + ExCELL293	1,0
HEK293-6E	DMEM + ExCELL293	0,75 – 1,0

- Byl pozorován vliv VPA a hydrolyzátu Tryptone N1 na expresi r-proteinů v HEK293T a 6E buněčných liniích

## 8. Seznam použité Literatury

- [1] DAVIES, K.: *Rozluštěný genom*. Praha a Litomyšl : Fénix, 301 s. (2002)
- [2] ZUNDORF, I., DINGERMANN, T.: *Vom rinder-, schweine-, pferde- insulin zum humaninsulin: die biotechnische und gentechnische insulin-herstellung*, Pharmazie Unserer Zeit 30, s. 27-32. (2001)
- [3] MEIENHOFER, J., SCHNABEL, E., BREMER, H., BRINKHOFF, O., ZABEL, R., SROKA, W., KLOSTERMAYER, H., BRANDENBURG, D., OKUDA, T., ZAHN, H.: *Synthese der insulinketten und ihre kombination zu insulactiven präparaten*, Z. Naturforsch. 18, s. 1120. (1963) cit. dle TEUSCHER, A.: *Insulin - a voice for choice*, The history of insulin Basel : Karger, s. 10-13. (2007)
- [4] KUNG, Y. T., DU, Y. C., HUANG, W. T., CHEN, C. C., KE, L. T.: *Total synthesis of crystalline insulin*, Sci. Sin. 15, s. 544. (1996) cit. dle TEUSCHER, A.: *Insulin - a voice for choice*, The history of insulin Basel : Karger, s. 10-13. (2007)
- [5] KATSOYANNIS, P. G., TOMESKO A., ZALUT C.: *Insulin peptides XII. human insulin generation by combination of synthetic A and B chains*, J. Am. Chem. Soc. 88, s. 186. (1966) cit. dle TEUSCHER, A.: *Insulin - a voice for choice*, The history of insulin Basel : Karger, s. 10-13. (2007)
- [6] SCHMIDT, F. R.: *Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, s. 363-372. (2004)
- [7] BERG, P.: *Dissections and reconstructions of genes and chromosomes* : nobel lecture, december 8, 1980, Nobel lectures: chemistry 1971-1980 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1993) [cit. 2010-04-12]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/berg-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/berg-lecture.pdf)
- [8] ARBER, W.: *Promotion and limitation of genetic exchange* : nobel lecture, december 8, 1978, Nobel lectures : physiology or medicine 1971-1980 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1992) [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1978/arber-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/arber-lecture.pdf)
- [9] NATHANS, D.: *Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics* : nobel lecture, december 8, 1978, Nobel lectures : physiology or medicine 1971-1980 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1992) [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1978/nathans-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/nathans-lecture.pdf)

- [10] SMITH, H. O.: *Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases* : nobel lecture, december 8, 1978, Nobel lectures : physiology or medicine 1971-1980 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1992) [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1978/smith-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/smith-lecture.pdf)
- [11] MULLIS, K. B.: *The polymerase chain reaction* : nobel lecture, december 8, 1993, Nobel lectures : chemistry 1991-1995 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1997) [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html)
- [12] SANGER, F.: *Determination of nucleotide sequences in DNA* : nobel lecture, december 8, 1980, Nobel lectures : chemistry 1971-1980 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1993) [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/sanger-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/sanger-lecture.pdf)
- [13] GILBERT, W.: *DNA sequencing and gene structure* : nobel lecture, december 8, 1980, Nobel lectures : chemistry 1971-1980 Singapore : World Scientific Publishing Co., (1993) [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.pdf)
- [14] DYSON, M. R.: *Expression strategy*, Expression systems (DYSON, M. R., DUROCHER, Y. ed.) Bloxham : Scion Publishing Ltd., s. 1-11. (2007)
- [15] DE RUYTER, P., KUIPERS, O., DE VOS, W.: *Controlled gene expression systems for lactococcus lactis with the food-grade inducer nisin*, Appl. Environ. Microbiol. 62, s. 3662–3667. (1996)
- [16] CREGG, J. M., BARRINGER, K. J., HESSLER, A. Y., MADDEN, K. R.: *Pichia pastoris as a host system for transformations*, Mol. Cell. Biol. 5, s. 3376-3385. (1985)
- [17] HODEK, P.: *Aplikovaná biochemie*, přednáška na PŘF UK, katedra biochemie, Praha, (2010)
- [18] BREITLING R.: *LEXSY - A novel eukaryotic protein expression system based on Leishmania tarentolae, the whole story from scratch*, Discussion workshop on eukaryotic expression, Praha, Česká Republika, (2009)
- [19] LOOMIS, K. H, ROCKWELL, C. R., STERNARD, H. D., YAEGER, K. W., NOVY, R. E. jr.: *Transient transfection of insect cells for rapid expression screening and protein production*, Expression systems (DYSON, M. R., DUROCHER, Y. ed.) Bloxham : Scion Publishing Ltd., s. 169-182. (2007)

- [20] PUCK, T. T., CIECIURA, S. J., ROBINSON, A.: *Genetics of somatic mammalian cells*, J. Exp. Med. 108, s. 945-959. (1958)
- [21] LIN, F., SUGGS, S., LIN, C., BROWNE, J. K., SMALLING, R., EGRIE, J. C., et al.: *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, s. 7580-7584. (1985)
- [22] LU, Z., LAKEN, H., ZHANG, J., ZHONG, X., ZOLLNER, R.: *Generation of stable CHO cell lines for protein expression*, Expression systems (DYSON, M. R., DUROCHER, Y. ed.) Bloxham : Scion Publishing Ltd., s. 183-201. (2007)
- [23] TALLEY, D., CUTAK, B., RATHBONE, E., AL-KOLLA, T., ALLISON, D., BLASBERG, J., et al.: *Synthechol™ synthetic cholesterol for cholesterol dependent cell culture - development of non-animal derived chemically defined NS0 medium* (2001) [cit. 2010-04-18].  
Dostupné z WWW:  
[https://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General\\_Information/2/cell\\_culture\\_poster\\_c1231.Par.0001.File.tmp/cell\\_culture\\_poster\\_c1231.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/2/cell_culture_poster_c1231.Par.0001.File.tmp/cell_culture_poster_c1231.pdf)
- [24] TODARO, G., GREEN, H.: *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*, J. Cell. Biol. 17, s. 299-313. (1963)
- [25] MACVILLE, M., SCHRÖCK, E., PADILLA-NASH, H., KECK, C., GHADIMI, M. B., ZIMONJIC, D., et al.: *Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping*, Cancer. Res. 54, s. 141-150. (1999)
- [26] CAPES-DAVIS, A., THEODOSOPOULOS, G., ATKIN, I., DREXLER, H. G., KOHARA, A., MACLEOD, R. A. F., et al.: *Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines*, Int. J. Cancer. 127, s. 1-8. (2010)
- [27] GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSEL, W. C., NAIRN, R.: *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*, J. Gen. Virol. 36, s. 59-74. (1977)
- [28] GRAHAM, F. L., VAN DER EB, A. J.: *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*, Virology 52, s. 456-467. (1973)
- [29] 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 J. 16, s. 869-885. (2002)
- [30] GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., et al.: *100-liter transient transfection*, Cytotechnology 38, s. 15-21. (2002)

- [31] TOM, R., BISSON, L., DUROCHER, Y.: *Transient expression in HEK293-EBNA1 cells*, Expression systems (DYSON, M. R., DUROCHER, Y. ed.) Bloxham : Scion Publishing Ltd., s. 203-223. (2007)
- [32] DUROCHER, Y.: *Expression vectors containing a truncated epstein barr nuclear antigen 1 lacking the Gly-Gly-Ala domain for enhanced transient gene expression*, World Intellectual Property Organisation (21.09.2006) [cit. 2010-04-10]. Dostupné z WWW: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?KEY=06/096989&IA=CA2006000403&DISPLAY=DESC>
- [33] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A.: *High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells*, Nucleic Acids Res. 30, s. e9. (2002)
- [34] BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., et al.: *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, s. 7297-7301. (1995)
- [35] DUROCHER, Y.: *Mammalian cell expression: theory and practice of large-scale transfection*, Discussion workshop on eukaryotic expression, Praha, Česká Republika, (2009)
- [36] LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A.: *Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, s. 247-266. (2005)
- [37] SCHLAEGER, E. J., CHRISTENSEN, K.: *Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture*, Cytotechnology 30, s. 71-83. (1999)
- [38] HAN, X., SUN, L., FANG, Q., LI, D., GONG, X., WU, Y., et al.: *Transient expression of osteopontin in HEK 293 cells in serum-free culture*, Enzyme And Microbial Technology 41, s. 133-140. (2007)
- [39] FARRELL, P., IATROU, K.: *Transfected insect cells in suspension culture rapidly yield moderate quantities of recombinant proteins in protein-free culture medium*, Protein Expr. Purif. 36, s. 177-185. (2004)
- [40] ŠTEFKOVÁ, K.: *Alkalická fosfatáza v buněčné biologii*. PřF MU Brno, Ústav experimentální biologie, oddělení fyziologie a imunologie živočichů, 42 s., Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Jiří Placherník, Ph.D. (2007)
- [41] ŠMÍD, J.: *Vývoj protokolu pro transientní transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1*. FCH VUT Brno, 57 s., Vedoucí diplomové práce: Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D. (2009)

- [42] SHIMOMURE, O.: *Discovery of green fluorescent protein, GFP*. nobel lecture, december 8, 2008, Les prix nobel : the nobel prizes 2008 Stockholm : Nobel Foundation, (2009) [cit. 2010-04-20]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/shimomura\\_lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/shimomura_lecture.pdf)
- [43] CHALFIE, M.: *GFP: lighting up life*. nobel lecture, december 8, 2008, Les prix nobel : the nobel prizes 2008 Stockholm : Nobel Foundation, (2009) [cit. 2010-04-20]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/chalfie\\_lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/chalfie_lecture.pdf)
- [44] TSIEN, R. Y.: *Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox*. nobel lecture, december 8, 2008, Les prix nobel : the nobel prizes 2008 Stockholm : Nobel Foundation, (2009) [cit. 2010-04-20]. Dostupné z WWW: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/tsien\\_lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/tsien_lecture.pdf)
- [45] KONVALINKA, J.: *Biochemie II.*, přednáška na PŘF UK, katedra biochemie, Praha, (2010)
- [46] KOZAK, M.: *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*, Nucleic Acids Res. 15, s. 8125-8148. (1987)
- [47] WURM, F.: *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*, Nat. Biotechnol. 22, s. 1393-1398. (2002)
- [48] CHISTI, Y.: *Animal-cell damage in sparged bioreactors*, TIBTECH 18, s. 420-432. (2000)
- [49] PESHWA, M. V., Kyung, Y. S., McClure, D. B., Hu, W. S.: *Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: effect of calcium concentration of spatial distribution of viability*, Biotechnol. Bioeng. 41, s. 179-187. (1993) cit. dle: GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., et al.: *100-liter transient transfection*, Cytotechnology 38, s. 15-21. (2002)
- [50] PHAM, P. L., PERRET, S., CASS, B., CARPENTIER, E., ST-LAURENT, G., BISSON, L., et al.: *Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis*, Biotechnol. Bioeng. 90, s. 332-344. (2005)
- [51] BACKLIWAL, G., HILDINGER, M., KUETTEL, I., DELEGRANNGE, F., et al.: *Valproic acid: a viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures*, Biotechnol. Bioeng. 101, s. 182-189. (2008)
- [52] SUNLEY, K., BUTLER, M.: *Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest*, Biotechnol. Adv. 28, s. 385-394. (2010)

- [53] ELBEIN, A. D., TROPEA, J. E., MITCHELL, M., KAUSHAL, G. P.: *Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I*, J. Biol. Chem. 265, s. 15599-15605. (1990)
- [54] CHANG, V.: *Glycoprotein structural genomics – expressing and crystallizing glycoproteins*, Discussion workshop on eukaryotic expression, Praha, Česká Republika, (2009)

## 8.1 Seznam převzatých obrázků

- [OBR. 1] Articles.DirectoryM.net [cit. 2010-04-15]. Dostupné z WWW:  
[http://articles.directorym.net/Recombinant\\_DNA\\_San\\_Francisco\\_CA-r1051910-San\\_Francisco\\_CA.html](http://articles.directorym.net/Recombinant_DNA_San_Francisco_CA-r1051910-San_Francisco_CA.html)
- [OBR.2] Brookhaven Protein Data Bank [cit. 2010-04-17]. Dostupné z WWW:  
<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1B3T>
- [OBR.3] KIRCHEIS, R., BLESSING, T., BRUNNER, S., WIGHTMAN, L., WAGNER, E.: *Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes*, J. Controll. Rel. 72, s. 165-170. (2001) cit. dle: LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A.: *Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, s. 247-266. (2005)
- [OBR.4] Brookhaven Protein Data Bank [cit. 2010-04-18]. Dostupné z WWW:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1EW2>
- [OBR.5A] Brookhaven Protein Data Bank [cit. 2010-04-18]. Dostupné z WWW:  
<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EMA>
- [OBR.5B] ZEISS Online Campus [cit. 2010-04-18]. Dostupné z WWW:  
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>
- [OBR.6] Cayman Chemical [cit 2010-04-21]. Dostupné z WWW:  
<http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10009437/promo/searchresult.10009437/a/z>

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka