

Abstrakt

Tranzientní transfekce savčích buněčných linií je známa jako užitečná technika pro přípravu rekombinantních proteinů, kterou lze získat miligramy až gramy proteinů za pouhé dva týdny od klonování odpovídající cDNA. Takto připravené nativní glykosylované proteiny mohou být využity pro různé účely v molekulární biologii, imunologii či farmaceutickém průmyslu, např. pro počáteční fáze preklinického výzkumu terapeutických proteinů. Jednou z nejvíce používaných hostitelských savčích buněčných linií je v tomto ohledu linie lidských embryonálních ledvinných buněk, kterou lze dobře kultivovat a snadno se chemicky transfekuje. Produkce proteinů v tranzientně transfekovaných lidských embryonálních ledvinných buňkách může být zvýšena celou řadou faktorů, např. koexpresí kyselého růstového faktoru fibroblastu či jeho přidávkou do kultivačního média, anebo koexpresí proteinů regulujících buněčný cyklus či apoptózu.

Byl připraven expresní plazmid pTW5, do kterého byl následně vložen gen pro aFGF, regulátor buněčného cyklu p18, p21 či p27 (inhibitory cyklin-dependentních kináz) nebo inhibitor apoptózy bcl-2 či bcl-x. Tyto plazmidy byly využity k optimalizaci expresního systému buněčné linie HEK293T. Za pomoci modelových proteinů – zeleného fluorescenčního proteinu a sekretované alkalické fosfatázy – byl sledován vliv těchto regulátorů exprese jak jednotlivě, tak v kombinaci, včetně dosud nepopsaného současného působení regulátorů buněčného cyklu a apoptózy. Dále byly optimalizovány celkové podmínky kultivace buněčné linie během produkce.

(Práce je psaná v českém jazyce.)