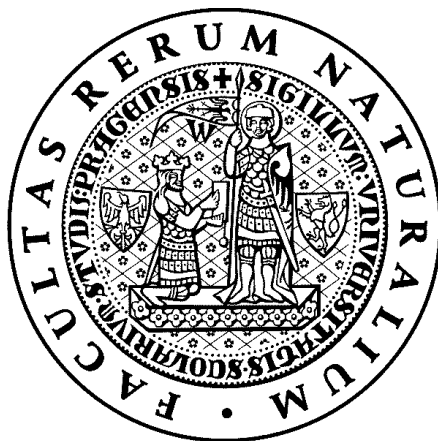


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Romana Čuperková

OPTIMALIZACE KULTIVAČNÍHO MÉDIA HEK293  
BUNĚČNÉ LINIE

Optimization of Culture Medium for HEK293 Cell Line

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. května 2012,

## Abstrakt:

HEK293 je lidská buněčná linie odvozená z embryonálních buněk ledvin a je často využívaným systémem pro výrobu rekombinantních proteinů. Tato práce se zabývala optimalizací složení bezsérového média pro HEK293S a HEK293T linie za účelem náhrady drahých komerčních médií. Indikátorem byl růst kultury a exprese reportérových proteinů SEAP a GFP. Podařilo se mi vytvořit nové médium, které mimo jiné obsahovalo insulin (1 mg/l), transferin (5 mg/l) a směs stopových prvků. Při kultivaci ve směsi komerčního média EX-CELL 293 s mým novým médiem se buňky linie 293S množily rychleji než v komerčních médiích (doba zdvojení  $20,47 \pm 2,68$  hodin ( $s_{rel} = 13,1 \%$ )). Zdá se, že je nové médium vhodné také pro transfekci HEK293 linií a poskytuje relativně vysokou expresi rekombinantních proteinů. Transfekční poměr DNA:PEI (w/w) pro toto médium je 1:2 až 1:3.

## Abstract:

HEK293 is a human cell line derived from embryonic kidney cells and is a frequently used system for the production of recombinant proteins. This work dealt with optimization of the composition of serum-free medium for HEK293S and HEK293T cell lines as a compensation for expensive commercial media. The growth of culture and expression of reporter proteins SEAP and GFP was monitored as the markers. I managed to create a new medium which contained, among other compounds, insulin (1 mg/l), transferrin (5 mg/l) and a mixture of trace elements. During the cultivation in a mixture of commercial medium EX-CELL 293 with my new medium 293S cells grew faster than during the cultivation in commercial media (doubling time  $20,47 \pm 2,68$  hours ( $s_{rel} = 13,1 \%$ )). It seems that the new medium is suitable for transfection of HEK293 cell lines with a relatively high expression of recombinant proteins. Transfection ratio of DNA:PEI (w/w) for this medium is 1:2 to 1:3.

## Klíčová slova:

HEK293S, HEK293T, kultivační médium, rekombinantní exprese, insulin, transferin, stopové prvky, transientní transfekce, polyethylenimin, sekretovaná alkalická fosfatáza, SEAP, zelený fluorescenční protein, GFP, doba zdvojení

## Key Words:

HEK293S, HEK293T, cultivation medium, recombinant expression, insulin, transferrin, trace elements, transient transfection, polyethylenimin, secreted alkaline phosphatase, SEAP, green fluorescent protein, GFP, doubling time

## Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení, snahu naučit mě novým dovednostem, trpělivost, možnost vypracování bakalářské práce a celkově výborný přístup ke studentům. Dále děkuji RNDr. Janu Svobodovi a Mgr. Žanetě Růžičkové za vyhodnocení dat z průtokové cytometrie a RNDr. Kamile Balušíkové za pomoc s koncentracemi iontů stopových prvků v médiu. Nesmím opomenout ani Bc. Jana Bláhu za pomoc se zpracováním dat exprese sekretované alkalické fosfatázy a pomoc při práci a samozřejmě další kolegy z laboratoře, kteří vytvářeli příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za obrovskou morální podporu a trpělivost v průběhu mého studia.

# Obsah

SEZNAM ZKRATEK .....	- 5 -
SEZNAM ZKRATEK POUŽITÝCH V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI .....	- 8 -
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>- 9 -</b>
1.1 BUNĚČNÉ KULTURY .....	- 9 -
1.2 EXPRESNÍ SYSTÉMY .....	- 10 -
1.2.1 <i>Expresní systémy využívající savčí buněčné linie</i> .....	- 11 -
1.2.2 <i>Příklady nejvyužívanějších savčích buněčných linií</i> .....	- 11 -
1.2.3 <i>HEK293 buněčná linie</i> .....	- 12 -
1.3 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY .....	- 14 -
1.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	- 15 -
1.4.1 <i>Médium EX-CELL® 293</i> .....	- 16 -
1.4.2 <i>Médium FreeStyle™ F17</i> .....	- 17 -
1.4.3 <i>Médium DMEM/F12</i> .....	- 17 -
1.4.4 <i>Další komponenty média</i> .....	- 19 -
1.4.4.1 <i>Insulin</i> .....	- 19 -
1.4.4.2 <i>Transferin</i> .....	- 20 -
1.4.4.3 <i>Hydrokortizon</i> .....	- 21 -
1.4.4.4 <i>Trypton</i> .....	- 21 -
1.4.4.5 <i>Selenit</i> .....	- 21 -
1.4.4.6 <i>Stopové prvky</i> .....	- 22 -
1.4.4.7 <i>Vitamíny</i> .....	- 22 -
1.5 VIABILITA A RŮST BUNĚK .....	- 22 -
1.6 TRANSFEKCE .....	- 23 -
1.6.1 <i>Polyethylenimin</i> .....	- 23 -
1.6.2 <i>Plazmid</i> .....	- 24 -
1.7 REPORTÉROVÉ PROTEINY .....	- 25 -
1.7.1 <i>Sekretovaná alkalická fosfatáza</i> .....	- 25 -
1.7.2 <i>Zelený fluorescenční protein</i> .....	- 26 -
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>- 28 -</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>- 29 -</b>
3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	- 29 -
3.2 CHEMIKÁLIE .....	- 30 -
3.3 BUNĚČNÉ LINIE .....	- 30 -
3.4 VEKTORY .....	- 30 -
3.5 ROZTOKY .....	- 31 -
3.6 POSTUP PŘÍPRAVY NOVÉHO MÉDIA (N) .....	- 31 -
3.7 KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ 293T A 293S .....	- 35 -

---

3.7.1	<i>Rozmrazování a zmrazování buněčných linií 293T a 293S</i> .....	- 35 -
3.7.2	<i>Počítání buněčné hustoty pomocí hemocytometru</i> .....	- 36 -
3.7.3	<i>Subkultivace</i> .....	- 36 -
3.8	<b>TRANSFEKCE BUNĚČNÝCH LINIÍ 293T A 293S</b> .....	- 36 -
3.8.1	<i>Příprava transfekčního roztoku PBS, plazmidové DNA a IPEI</i> .....	- 36 -
3.8.2	<i>Příprava buněčné suspenze pro tranzientní transfekci</i> .....	- 37 -
3.8.3	<i>Dodání média transfekovaným buňkám</i> .....	- 37 -
3.9	<b>STANOVENÍ REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ</b> .....	- 38 -
3.9.1	<i>Stanovení SEAP</i> .....	- 38 -
3.9.2	<i>Stanovení GFP</i> .....	- 38 -
3.10	<b>ZPRACOVÁNÍ DAT</b> .....	- 38 -
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>- 40 -</b>
4.1	<b>OPTIMALIZACE SLOŽENÍ MÉDIA</b> .....	- 40 -
4.1.1	<i>Optimalizace poměru média N a média Ex pro růst 293S a 293T</i> .....	- 40 -
4.1.2	<i>Optimalizace koncentrace insulinu</i> .....	- 40 -
4.1.3	<i>Optimalizace hydrokortizonu</i> .....	- 42 -
4.1.4	<i>Optimalizace dalších komponent média</i> .....	- 42 -
4.2	<b>OPTIMALIZACE POMĚRU DNA:PEI</b> .....	- 43 -
4.3	<b>293S: RŮST A VIABILITA</b> .....	- 44 -
4.4	<b>293S: STANOVENÍ SEAP A GFP</b> .....	- 46 -
4.5	<b>293T: RŮST A VIABILITA</b> .....	- 49 -
4.6	<b>293T: STANOVENÍ SEAP</b> .....	- 50 -
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>- 52 -</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>- 57 -</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>- 59 -</b>
7.1	<b>SEZNAM PŘEVZATÝCH OBRÁZKŮ A TABULEK</b> .....	- 63 -

## Seznam zkratek

293S	buněčná linie HEK293S
293T	buněčná linie HEK293T
AP	alkalická fosfatáza
3T3	buněčná linie odvozená z myších fibroblastů (z angl. „3-day transfer, inoculum $3 \cdot 10^5$ cells“)
BHK	buněčná linie odvozená z primárních buněk ledvin křečka (z angl. Baby Hamster Kidney)
bPEI	rozvětvený polyethylenimin (z angl. branched)
c	hmotnostní koncentrace [g/l]
CBP	kortizol vázající protein (z angl. Cortisol Binding Protein), transcortin
CHO	buněčná linie odvozená z primárních buněk vaječníků křečička čínské (z angl. Chinese Hamster Ovary)
DEAE-D	diethylaminoethyl dextran
DMSO	dimethylsulfoxid
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)
FACS	metoda průtokové cytometrie (z angl. Fluorescence - Activated Cell Sorting)
g	tíhové zrychlení [ $m \cdot s^{-2}$ ]
GFP	zelený fluorescentní protein (z angl. Green Fluorescent Protein)
GnTI	<i>N</i> -acetylglukosaminyltransferáza I
HEK293	buněčná linie 293 odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk (z angl. Human Embryonic Kidney 293)
HeLa	lidská buněčná linie odvozená z nádorových buněk děložního hrdla, název odvozen ze jména pacientky Henrietty Lacks
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IPEI	lineární polyethylenimin
NS0	linie odvozená z myších hybridomů
m	hmotnost [g]
M	molekulová hmotnost [Da]
Mr	relativní molekulová hmotnost (bez jednotek)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PBS	fyzilogický roztok s fosfátovým pufrem (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PEI	polyethylenimin
pNPP	<i>p</i> -nitrofenylfosfát
r-proteiny	rekombinantní proteiny
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
$s_{rel}$	relativní směrodatná odchylka [%]
$T_C$	teplota [°C]
V	objem [l]
w/w	hmotnostní poměr (z angl. weight for weight)

## Seznam zkratk použitých v experimentální části<sup>o</sup>

C	kyselina askorbová, vitamín C ( $c_N = 3,52 \cdot 10^{-3}$ g/l)
Ex	komerční kultivační médium EX-CELL 293
Ex/F17	směs komerčních kultivačních médií EX-CELL 293 a FreeStyle F17 v poměru 1:1
Ex/N	směs komerčního kultivačního média EX-CELL 293 a N v poměru 1:1 (pokud není napsáno jinak)
F17	komerční kultivační médium FreeStyle F17
H	hydrokortizon ( $c_N = 1,8 \cdot 10^{-6}$ g/l)
I	insulin ( $c_N = 5 \cdot 10^{-3}$ g/l)
I*	insulin s optimalizovanou koncentrací v médiu ( $c_N = 1 \cdot 10^{-3}$ g/l)
N	nové médium
NEA	směs neesenciálních aminokyselin (Tab. 7, str. 34)
P	směs iontů stopových prvků (Tab. 5, str. 33)
P*	konečná směs iontů stopových prvků s přídatkem $Cd^{II}$ , $V^V$ , $Co^{II}$ (Tab. 6, str. 33)
T	transferin ( $c_N = 5 \cdot 10^{-3}$ g/l)
Y	Trypton N1 ( $c_N = 5$ g/l)

---

<sup>o</sup> Zkratky použité v kapitole 3, 4, 5, a 6 této bakalářské práce zavedené pro lepší orientaci v textu, tabulkách a grafech.

$C_N$ ... koncentrace v 1 l média N [g/l]



## ***TEORETICKÁ ČÁST***

V současné době si dobře nedokážeme představit biomedicínský výzkum bez experimentů na živých organismech. Pokusy na laboratorních zvířatech jsou velmi časté, avšak v mnoha případech nevyhovující. Jsou finančně nákladné a časově náročné. Mezi další komplikace patří například vysoké nároky na vybavení laboratoře, interindividuální rozdíly mezi zvířaty a jejich biologické rytmy a zejména etické problémy [1]. V některých případech není ani výhodné provádět pokus na celém organismu, orgánu nebo tkáni, ale pouze na určitém typu buněk. Právě v těchto i dalších případech se nabízí využití buněčné kultury.

### ***1.1 Buněčné kultury***

Buněčnou kulturou rozumíme buňky prokaryotické či eukaryotické (rostlinné, živočišné) kultivované *in vitro*. Pojem buněčná kultura je v úzké souvislosti s výrazy tkáňová kultura nebo orgánová kultura, za které bývá často zaměňován. Myšlenka kultivovat buňky *in vitro* pochází již z roku 1885, kdy Willhelm Roux udržoval naživu embryonální kuřecí buňky v solném roztoku [2]. Rutinně se však tyto kultivace používají až od padesátých let 20. století [3].

Tkáňové (buněčné) kultury se v dnešní době využívají nejen v experimentální oblasti, ale jsou také neodmyslitelnou součástí výroby. Příkladem mohou být monoklonální protilátky, hormony a proteiny všeobecně.

Kultivované buňky mají ve srovnání s jinými typy biologických modelů zásadní výhody. Výsledky pokusu nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, buňky je možno během i po experimentu zničit, na rozdíl od etické otázky při pokusech na zvířatech, většina tkáňových kultur má charakter nenáročné kultivace, pokus probíhá na jednom buněčném typu a v relativně krátké době je možné získat velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu [1]. Naopak nevýhodou je složení umělého kultivačního média, které přesně neodráží složení vnitřního prostředí v organismu. *In vitro* kultivace tedy může, ale také nemusí přesně odrážet podmínky kultivace *in vivo*. Buňky mohou v tomto důsledku měnit svou morfolonii, expresi genů či citlivost na různé podněty [1]. Dalšími nevýhodami jsou poměrně nákladná kultivační zařízení a jednorázový sterilní spotřební materiál, který rovněž zvyšuje finanční nároky této metodiky. Práce s buněčnými kulturami vyžaduje čistotu a přesnost.

## 1.2 Expresní systémy

Jedním z hlavních využití tkáňových kultur je výroba rekombinantních proteinů (r-proteinů). Jsou to proteiny, které jsou syntetizovány v organismech, ve kterých se samy přirozeně nevyskytují.

Příprava rekombinantní DNA je díky restričním endonukleázám a techniky PCR dnes běžnou záležitostí. Pomocí virových vektorů nebo vektorů bakteriálního původu - plazmidů se gen vpraví do hostitelského organismu, kde je přítomným proteosyntetickým aparátem exprimován za vzniku rekombinantního proteinu.

Využití živých organismů jako expresních systémů se liší v jejich vlastnostech a nárocích na kultivaci [4]. Pro produkci r-proteinů se využívá různých hostitelských organismů v závislosti na co nejvyšším výtěžku produkce nebo alespoň schopnosti daného organismu r-protein vůbec exprimovat, rozsahu a věrnosti posttranslačních modifikací a náročnosti či ekonomičnosti kultivace [4].

Prokaryotické organismy jsou historicky prvními využívanými expresními systémy. Nejprozkoumanější z nich, jak geneticky, tak fyziologicky, je bakterie *Escherichia coli*. Výhodou transformace rekombinantních genů do této bakterie je krátká kultivační doba, nenáročnost kultivace (nízké náklady, vysoká odolnost vůči kontaminaci) a vysoký výtěžek proteinu [5]. Naopak nevýhodou je, že prokaryotické organismy nevykonávají většinu posttranslačních úprav proteinů obvyklých u vyšších organismů. Z tohoto hlediska jsou výhodnější pro produkci r-proteinů eukaryotické expresní systémy. Používají se různé organismy – od kvasinek až po savčí buňky.

Nejpoužívanějším kvasinkovým expresním systémem je *Saccharomyces cerevisiae*. Na rozdíl od savčích expresních systémů má rychlejší růst, poměrně vysoké výtěžky r-proteinů, menší kultivační nároky, nevýhodou jsou však nedokonalé posttranslační modifikace a značně odlišná glykosylace r-proteinů [6].

V praxi se lze, ovšem už méně často, setkat i s rostlinnými expresními systémy.

S ohledem na produkci proteinů a posttranslační zpracování jsou hmyzí buňky na druhém místě za savčími buněčnými liniemi. Kultivace není tak náročná, můžeme použít bezsérová média, buňky rostou poměrně rychle a do vysokých hustot. Pravděpodobně nejrozšířenější hmyzí buněčnou linií je *Spodoptera frugiperda* Sf9, dále se setkáváme například s liniemi Sf21, buněčnou linií *Trichoplusia ni* Hi5 či *Drosophila melanogaster* S2 [7].

### ***1.2.1 EXPRESNÍ SYSTÉMY VYUŽÍVAJÍCÍ SAVČÍ BUNĚČNÉ LINIE***

Savčí expresní systémy jsou nejvíce využívanými hostitelskými organismy pro produkci r-proteinů, a to jak ve farmaceutickém průmyslu, tak v proteomice. Důvodem je jejich vysoká příbuznost se studovanými lidskými proteiny a také čím dál více prostudované transfekční postupy. Nelze opomenout jejich schopnost skládat r-proteiny do jejich přirozené terciární či kvartérní struktury včetně nativních posttranslačních modifikací.

Savčí buněčné linie jsou velmi náročné, co se sterility prostředí a kvality médií týče. Buňky mají také podstatně delší generační dobu, v řádu desítek hodin až dní. Vyžadují stabilní teplotu 37°C a atmosféru obsahující typicky 5% CO<sub>2</sub>.

Primární buněčné linie se získávají přímo z orgánů nebo tkání savce. Dobře tedy reprezentují tkáň, ze které pocházejí. Nevýhodou je však skutečnost, že tyto buňky mají omezený počet dělení. V praxi se proto využívá imortalizovaných buněčných linií, které se vyznačují neomezeným počtem dělení, rychlejším růstem, možností kultivace při vysoké hustotě buněk a často i možností pěstování v bezsérovém médiu. Na druhou stranu však mohou ztratit specifické a charakteristické znaky původní tkáně a je zde možná chromosomální nestabilita. Buňky jsou imortalizovány splynutím s již nesmrtelnou nádorovou buňkou za vzniku tzv. hybridomů, náhodnou mutací či transformací virovou DNA.

### ***1.2.2 PŘÍKLADY NEJVYUŽÍVANĚJŠÍCH SAVČÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍ***

- **CHO (Chinese Hamster Ovary)**

Ve farmaceutickém průmyslu dnes zdaleka nejvyužívanější buněčnou linií pro produkci r-proteinů je buněčná linie CHO, odvozená roku 1958 z primárních buněk vaječníku křečička čínského [8]. Produkce je s vysokým výtěžkem zajišťována především pomocí stabilně transfekovaných buněčných klonů. Přípravu těchto stabilních linií lze usnadnit mj. použitím průtokové cytometrie (FACS) pro vytřídění nejlépe exprimujících buněk a namnožení tzv. mateřské buněčné linie (angl. „master cell line“), v níž může být reportérový gen posléze nahrazen cílovým genem pomocí homologní rekombinace [9].

- **NS0**

Linie odvozená z myších myelomů. Tyto hybridomy jsou často používány k biofarmaceutické výrobě monoklonálních protilátek. Médium, ve kterém je tato linie kultivována, musí obsahovat cholesterol, který není rozpustný ve vodě, což značně znesnadňuje jeho vývoj [10]. Komerční společnosti, jako například Sigma-Aldrich,

nabízejí média, do kterých se přidává sterilní přírodní cholesterol rozpuštěný v ethanolu [10].

- **BHK (Baby Hamster Kidney)**

Buněčná linie odvozená z primárních buněk ledvin jeden den starých křeččích mláďat. Je rovněž využívána ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu r-proteinů.

- **3T3**

3T3 je buněčná linie odvozená ze základních buněk vazivové tkáně laboratorní myši, tzv. fibroblastů. Zkratka 3T3 je odvozená z anglického spojení „3-day transfer, inoculum  $3 \cdot 10^5$  cells“.

- **HeLa (Henrietta Lacks)**

Název buněčné linie je podle nevědomé dávkyně Henrietty Lacks, která podlehla nádoru děložního hrdla [11]. Je tedy odvozená z lidských nádorových buněk děložního hrdla a je také historicky první lidskou buněčnou linií (1951) [12]. Bylo zjištěno, že je pozoruhodně odolná a snadno proliferuje, dokonce má tendenci kontaminovat svoje okolí [13].

- **HEK293 (Human Embryonic Kidney)**

Lidská buněčná linie 293 odvozená z embryonální ledvinné tkáně.

### ***1.2.3 HEK293 BUNĚČNÁ LINIE***

V posledních letech je tato linie stále více využívána k výrobě r-proteinů. HEK293 (zkráceně pouze 293) buněčná linie byla poprvé vytvořena roku 1970 v Nizozemí Dr. Frankem Grahamem [14]. Je odvozena z primárních lidských ledvinných buněk potracených embryí [14]. Kultura byla imortalizována transformací virovou DNA z adenoviru 5 [15]. Označení linie číslem 293 je symbolické a poukazuje na 293. transformační pokus, ze kterého známá linie vzešla. Transformace byla provedena precipitací DNA v prostředí chloridu vápenatého [15].

Mnoho let byla tato linie považována za buňky odvozené od epiteliální ledvinné tkáně. Nicméně skutečnost, že buňky pocházejí z kultivovaných buněk ledvin, nevypovídá mnoho o přesném buněčném původu HEK293. Embryonální ledvinové kultury mohou obsahovat malé množství téměř všech typů buněk lidského těla. Graham a jeho spolupracovníci však předložili důkazy, že buňky HEK293 a několik dalších lidských buněčných linií, které jsou generované transformací adenovirem lidských embryonálních ledvinných buněk, mají mnoho vlastností nezralých neuronů [16]. Dnes se pokládají za buněčnou linii odvozenou z neurálních ledvinných buněk [16].

Výhodou HEK293 buněčné linie je to, že jakožto expresní systém pocházející z lidských buněk by měl poskytovat savčí r-proteiny se správnými a přirozenými posttranslačními modifikacemi. Na rozdíl od prokaryotických expresních systémů je však poměrně náchylný na infekci, má delší generační dobu, vyžaduje drahá kultivační média a kvalitní vybavení laboratoře. Jako experimentálně transformované buněčné linie nejsou HEK293 dobrým buněčným modelem, který je základním předmětem výzkumu. Nicméně jsou velmi snadno transfekovatelné, a tak mohou být použity v pokusech, ve kterých chování buňky samotné není předmětem zájmu. Příkladem využití HEK293 mohou být například studie účinků léků na sodíkové kanály [17], testování indukovatelného systému RNA interference [18], testování izoforem selektivní protein kinázy C [19] či výzkum interakce mezi dvěma proteiny, například glykogensyntázou kinázou 3beta a pro Alzheimerovu nemoc specifickým Ser396 mikrotubuly asociovaným proteinem [20].

Postupem času se na akademické i komerční půdě vyvíjely různé varianty původní linie HEK293, aby se dosáhlo vyšší úrovně transfekce, rychlejšího růstu a snazší kultivace. Nejznámějšími a nejvyužívanějšími variantami jsou:

- **HEK293S**

Linie adaptovaná na suspenzní kultivaci, která byla použita pro tvorbu stabilních linií exprimujících opsin po indukci tetracyklinem [21]. Později byla stejnou skupinou (zabývající se výzkumem struktury a funkce rhodopsinu) použita za pomoci mutagenese a selekce na růst v přítomnosti ricinu i pro přípravu linie s neaktivní *N*-acetylglukosaminyltransferázou I (GnTI) [22]. Buňky této HEK293S GnTI linie produkují proteiny, které mají jednoduchou a zcela homogenní *N*-glykosylaci. To je zvláště výhodné při strukturním výzkumu takových proteinů, např. pomocí proteinové krystalografie. Pro tyto účely je tato linie využívána i v naší laboratoři a zkrácené označení 293S používané v této práci se vždy týká právě této linie HEK293S GnTI.

- **HEK293T**

Linie stabilně transfekovaná genem pro velký T antigen polyomaviru SV40, který umožňuje episomální replikaci plazmidů obsahujících replikační počátek SV40. Zvýšením počtu kopií genu v jádře hostitelské buňky by mělo být dosaženo i vyšší exprese daného genu a tedy i např. vyššího výtěžku r-proteinů.

- **HEK293F**

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

- **HEK293E**

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

počátek oriP tohoto viru [23]. Stejně jako u linie HEK293T to může vést k vyššímu výtěžku při produkci r-proteinů.

- **HEK293-6E (úplný název HEK293F-EBNA1t)**

Linie stabilně transfekovaná genem EBNA1t, což je kratší verze genu EBNA1. Tato zkrácená verze rovněž umožňuje episomální replikaci oriP plazmidů a buňky přitom vykazují lepší růstové vlastnosti než u klasické HEK293E linie. Obě linie je možno pěstovat v suspenzi v bezsérovém médiu [23].

### 1.3 Kultivační podmínky

Aby se pěstované buňky udržely naživu či dokonce proliferovaly v systému *in vitro*, musíme jim zajistit vhodné kultivační podmínky. Mezi nejdůležitější z nich patří vlastnosti prostředí, jako je teplota a složení atmosféry, složení média a charakter kultivační nádoby.

Buňky se pěstují ve speciálních inkubátorech, které jim mohou zajistit odpovídající růstové parametry. Zároveň zde nesmí docházet ke kontaminaci kultur bakteriemi, plísněmi či jinými mikroorganismy (kvasinky, viry, mykoplazmy). Zařízení tudíž musí být sterilní a snadno čistitelné, popřípadě musí být vyrobeno z materiálů, které růst mikroorganismů nepodporují.

Kultivační teplota je blízká tělesné teplotě mateřského organismu, většinou tedy 37 °C.

Relativní vlhkost atmosféry v inkubátorech se udržuje okolo 90 %, aby nedocházelo k nežádoucímu odpařování vody z kultivačního média a tím nedocházelo ke změně koncentrace jeho složek. Atmosféra obsahuje zvýšený podíl CO<sub>2</sub>, obvykle 5 %. Tato koncentrace v médiu lépe odpovídá poměrům v extracelulární tekutině v organismu a také pomáhá udržovat pH médií s bikarbonátovým pufrem [1].

Buňky se ve většině případů pěstují adherentně, to znamená, že buňky rostou přisedle na vhodném kultivačním povrchu. Nejčastěji se používají polystyrenové nádoby s upraveným hydrofilním povrchem. Pro náročnější buněčné linie se povrch nádoby pro zlepšení adheze buněk potahuje například polypeptidy složených z aminokyselin s polárním postranním řetězcem, nejčastěji polylysinem [24]. Adhezi buněk též usnadní kolagen či jeho hydrolyzát – želatina, dále fibronectin či laminin [25]. Setkáváme se také s buněčnými kulturami rostoucími adherentně do trojrozměrného prostředí, například díky strukturám tvořených kolagenem, speciálními plasty či mikroskopickými pevnými částicemi, které umožní přisedlý růst buňkám i při suspenzním způsobu kultivace např. v bioreaktoru.

Některé buňky je naopak nutné pěstovat v suspenzi, jsou to většinou buňky krevního původu. Jejich adheze by mohla způsobit transformaci do jiného buněčného typu. Buňky

se udržují v suspenzi díky neustálému promíchávání kultury. Avšak přirozeně suspenzní buňky nepotřebují vždy míchání, pokud je objem kultury malý. Přirozeně adherentní buňky, jako jsou buňky HEK293, promíchávání potřebují nejen z důvodu udržení v suspenzi, ale při vyšších objemech kultury i kvůli dostatečnému přenosu plynů mezi kapalnou a plynnou fází. Promícháváním kultury také zamezíme sedimentaci buněk ke dnu vlivem gravitace. Promíchávání můžeme zajistit umístěním kultivačních nádob na kývaví míchačku, orbitální třepačku, pěstovat je ve speciálních kultivačních nádobách s míchadélkem (tzv. spinner) nebo je pěstovat ve válcovitých nádobách, které se otáčejí kolem vodorovné osy (tzv. roller). Jinou variantou je potažení kultivační nádoby agarosou, která zabrání adhezi buněk. Přítomnost séra je pro suspenzní kultury nevhodná, protože ovlivňuje morfologii buněk a způsobuje jejich agregaci. Pro snížení agregace je možno do média přidávat například heparin. Pro zmenšení mechanického stresu při míchání suspenzní kultury lze přidávat různé surfaktanty, např. Pluronic F68 [26].

Buňky HEK293 lze snadno kultivovat adherentně i v suspenzi, do které se dají relativně snadno převést s použitím vhodného média. Pro suspenzní růst je však nutné je pěstovat v bezsérovém prostředí. Suspenzní kultivace je vhodná pro produkci r-proteinů v třepaných lahvích až pro 100 l produkci nebo ve velkoobjemových bioreaktorech [27]. Pro suspenzní kultivaci nejsou vhodné vyšší koncentrace vápenatých iontů, které způsobují agregaci buněk a při transfekci snižují aktivní povrch biomasy, se kterou interagují transfekční komplexy [28].

## ***1.4 Kultivační média***

Při *in vitro* kultivaci pěstujeme buňky v médiích, která dostatečně napodobují extracelulární tekutinu *in vivo* systému. Musí obsahovat dostatečné množství živin, které jim umožní růst až po několik dní. Také musí umožňovat rychlou difúzi kyslíku a oxidu uhličitého – promícháváním u suspenzních kultur či vytvořením tenké vrstvy nad adherovanými buňkami u adherentních kultur. Médium se zpravidla mění dvakrát až třikrát týdně (subkultivace).

Kultivační médium musí obsahovat ve vhodných koncentracích látky potřebné pro život a proliferaci buněk. Nejvýznamnějšími látkami jsou bílkoviny, vitamíny, růstové faktory, anorganické soli, pufry, glukosa či jiný zdroj energie, peptidy, mastné kyseliny, lipidy a stopové prvky. Důležité jsou také fyzikálně-chemické vlastnosti média. Při bezsérové kultivaci bývá běžným doplňkem také insulin, který má mimo jiné i významnou mitogenní aktivitu, selen, transferin či hydrokortizon.

Některé látky, jako jsou růstové faktory, stopové prvky, vitamíny, inhibitory proteáz a podobně, se mohou do média dodat přídatkem séra. Existují média optimalizovaná na nízký

obsah séra (asi 2 % objemu) oproti klasickým médiím se sérem (asi 10 % objemu) [25]. Přídavkem séra do média dodáme buňkám stovky biologicky významných sloučenin, které na ně mají zásadní vliv, co se růstu a přežití vůbec týče. Nejčastěji se používají kravská séra či séra z telecích fétů [1]. Dostupná je celá řada živočišných sér, běžněji se používají i např. séra z koně či králíka. Běžná séra se sterilizují filtrací, jiná jsou tepelně inaktivovaná, což zabraňuje přenosu možné virové infekce [1]. Přidávání séra k médiu však přináší i své problémy, složení séra totiž není nikdy přesně definované. Může se tím měnit růst a vlastnosti kultur. Komerční společnosti tento problém řeší tak, že prodávají směsná séra, kde se odlišnosti různých jedinců zprůměrují. Nedefinovatelnost séra však stále ztěžuje průmyslovou výrobu, srovnávání výsledků a znesnadňuje purifikaci r-proteinů [29]. Od užívání séra se dnes upouští i z důvodů etických a v neposlední řadě i ekonomických, protože sérum už ze své podstaty není právě levné.

Naproti tomu se do bezsérových médií přidávají všechny potřebné mikronutrienty, růstové faktory a další látky o dobře definovaných směsích. Vznikají tak komplexnější média. Jejich vývoj vyžaduje dlouhé optimalizace, proto jsou výrazně dražší. Výrazně se sníží možnost infekce přenášené sérem, avšak na druhou stranu se v nich mohou buňky množit pomaleji. Nutným opatřením se leckdy stává i adaptace buněčných kultur na toto médium postupným snižováním koncentrací séra. V naprosté většině případů však komerční společnosti nedodávají kompletní seznam přesného složení prodáváného média.

Pro různé fáze práce s kulturou, ať se jedná o kultivaci, transfekci či produkci, potřebujeme různá chemická prostředí. Komerčně jsou dostupná média vhodná pro všechny fáze, avšak častou výměnou médií podstupujeme riziko snížené viability či rychlosti růstu kultury. Neekonomičtější cestou je mít k dispozici médium nebo používat směsi médií, ve kterých by buňky byly viabilní, rychle rostly, dobře se transfekovaly a produkovaly r-proteiny o co nejvyšším výtěžku.

U transfekčního média není nutný vysoký obsah živin, protože transfekce probíhá pouze v řádu hodin. Je ovšem potřeba minimalizovat interference látek s plazmidovou DNA či transfekčním procesem všeobecně.

#### **1.4.1 MÉDIUM EX-CELL® 293**

Médium EX-CELL 293 je komerční médium firmy Sigma-Aldrich. Neobsahuje sérum ani proteiny živočišného původu. Je speciálně vyvinuto pro dlouhodobý růst buněčné linie HEK293 a podobných linií [30]. Je určeno pro kultivaci v suspenzi. Přesné složení není dostupné veřejnosti, z dostupných materiálů víme pouze to, že toto médium obsahuje přibližně



1,1 mg/l proteinů menších než 10 kDa, 6 g/l glukózy a 0,1 % Pluronic F68 k minimalizaci poškození buněk vlivem míchání [30]. Do média se obvykle přidává L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mM.

#### ***1.4.2 MÉDIUM FREESTYLE™ F17***

Médium FreeStyle F17 je komerční médium vyráběné firmou Gibco Invitrogen. Je speciálně určeno pro 293F buňky, avšak je možné ho použít pro všechny 293 linie i linie CHO. Podporuje růst a transfekci a je určeno pro suspenzní kultury. Toto médium je chemicky definované, avšak přesné koncentrace a složení nejsou zveřejněny. Dle výrobce však médium F17 neobsahuje bílkoviny ani hydrolyzáty [31]. Do média se obvykle přidává L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM) a Pluronic F68 (výsledná koncentrace 0,1 %).

#### ***1.4.3 MÉDIUM DMEM/F12***

Plný název pro toto médium je Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12. Přestože jsou ideální koncentrace látek v médiu specifické pro každou buněčnou linii, zjistilo se, že pro řadu buněčných linií, včetně HEK293, je vyhovující právě směs dvou obvyklých základních kultivačních médií DMEM a Ham's F12 v objemovém poměru 1:1 [32]. V základní variantě je každé z těchto médií určeno pro adherentní kultivaci buněk v přítomnosti 10% fetálního hovězího séra, nicméně pokud je tato směs základních médií doplněna živinami, růstovými faktory a hormony, lze ji použít i jako bezsérové médium. Pokud je navíc médium připraveno ve variantě s nízkou koncentrací vápenatých iontů, lze ho použít i pro suspenzní kultivaci. Volitelně může také obsahovat pufr HEPES, který kompenzuje pufrací kapacitu chybějícího séra. Médium DMEM/F12 je obvykle dostupné v mnoha variantách, lišících se v přítomnosti a koncentraci jednotlivých přidaných složek (Tab. 1, str. 18; Tab. 2, str. 19) [32].



**Tab. 2: Tabulka složení různých variant DMEM/F12 média.** Koncentrace vitamínů a ostatních komponent v médiu, doporučení k přidání dalších látek a jejich koncentrace. Zdroj: www.sigmaaldrich.com

	D0547	D2906	D6421	D6434	D8900	D8062	D8437	D9785
	[powder]	[powder]	[1x]	[1x]	[powder]	[1x]	[1x]	[powder]
COMPONENT	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
<b>Vitamins</b>								
D-Biotin	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035	0.000035
Choline Chloride	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898	0.00898
Folic Acid	0.00266	0.00266	0.00265	0.00266	0.00266	0.00266	0.00266	0.00266
myo-Inositol	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126
Niacinamide	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202	0.00202
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224	0.00224
Pyridoxal • HCl	0.002	0.002	—	0.002	0.002	0.002	—	0.002
Pyridoxine • HCl	0.000031	0.000031	0.002031	0.002031	0.000031	0.002031	0.002031	0.000031
Riboflavin	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.000219	0.00219
Thiamine • HCl	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217	0.00217
Vitamin B <sub>12</sub>	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068	0.00068
<b>Other</b>								
D-Glucose	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
HEPES	—	3.5745	3.5745	3.5745	3.5745	—	3.5745	3.5745
Hypoxanthine	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021
Linoleic Acid	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042	0.000042
Phenol Red • Na	0.00863	—	0.00863	—	0.00863	0.00863	0.00863	—
Putrescine • HCl	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081	0.000081
Pyruvic Acid • Na	0.11	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055
DL-Thioctic Acid	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105	0.000105
Thymidine	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365	0.000365
<b>ADD</b>								
NaHCO <sub>3</sub>	1.2	1.2	—	—	1.2	—	—	1.2
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	—	—	0.1545
L-Glutamine	—	—	0.365	0.365	—	—	—	0.365
L-Leucine	—	—	—	—	—	—	—	0.05905
L-Lysine • HCl	—	—	—	—	—	—	—	0.09125
MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	—	—	0.0612
MgSO <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	—	—	0.04884
L-Methionine	—	—	—	—	—	—	—	0.0172

#### 1.4.4 DALŠÍ KOMPONENTY MÉDIA

Médium DMEM/F12, zvláště komerční varianta D9785, neobsahuje všechny důležité látky pro správný růst a účinnou transfekci HEK293 buněčné linie. Proto se k tomuto základnímu médiu často přidávají nejen látky uvedené v Tab. 2, ale také insulin či hydrokortizon, transferin, směsi neesenciálních aminokyselin, esenciální lipidy, Pluronic F68, hydrolyzát (např. Trypton či Primatone), vitamíny, selenit a některé ionty stopových prvků.

##### 1.4.4.1 INSULIN

Insulin je hormon produkovaný  $\beta$  buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Tento hormon snižuje hladinu cukru v krvi a působí proti glukagonu. Při pěstování tkáňových kultur v nepřítomnosti séra může být důležitou až nezbytnou součástí kultivačních médií [1]. Insulin se skládá ze dvou polypeptidických řetězců spojených disulfidickými můstky a je tvořen celkem 51 aminokyselinami (Obr. 1A, str. 20) [33]. Sekvence aminokyselin lidského insulinu se liší v pouhých třech od hovězího a v jedné od prasečího insulinu [34]. V těle je produkován a

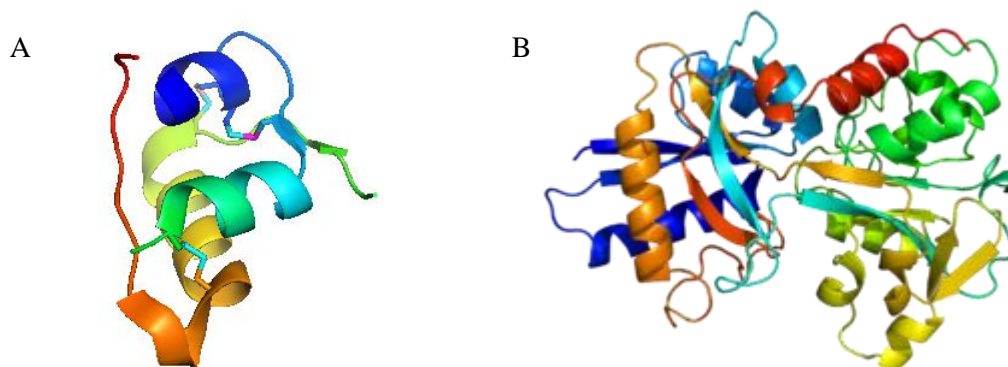
uložen jako neaktivní vysoce stabilní hexamer, zatímco aktivní je ve formě monomeru. Navázáním insulínu na insulinový receptor cílové buňky dojde k otevření glukózového transportéru GLUT4, kterým se glukóza dostane dovnitř buňky. Část přijaté glukózy se spotřebuje energetickým metabolismem a zbylá část se přemění na zásobní cukr glykogen.

Koncentrace insulínu v kultivačním médiu byla popsána v řadě odborných publikací [35, 36, 37], avšak přesná koncentrace insulínu konkrétně pro linii HEK293 pěstovanou v kultivačním médiu DMEM/F12 není známa. Z praktického (růst, viabilita a transfekovatelnost kultury) i ekonomického hlediska je vhodná optimalizace koncentrace insulínu v médiu s přihlédnutím k rozmezí publikovaných koncentrací.

#### 1.4.4.2 TRANSFERIN

Transferiny jsou glykoproteiny krevní plazmy, které reverzibilně váží železo a kontrolují hladinu volného železa v biologických tekutinách [38]. Molekulová hmotnost transferinu je okolo 80 kDa a obsahuje 2 vazebná místa pro železité ionty s vysoce specifickou afinitou [39]. U člověka se skládá z polypeptidového řetězce obsahujícího 679 aminokyselin [40]. Sekundární struktura tvoří dvě domény alfa šroubovic a beta listů (Obr. 1B). N- a C-terminální konce tvoří kulovité laloky, mezi kterými je vazebné místo pro železo.

Hlavním zdrojem transferinu v těle jsou játra, ale produkuje ho také mozek. Jeho úkolem je transport železitých iontů do celého těla. Klíčovou roli hraje v erythropoéze a aktivním buněčném dělení [41]. Transferin se naváže na transferinový receptor a následně je vstřebán endocytózou. Následně je za kyselého pH v lysozomu disociován na železo a protein.

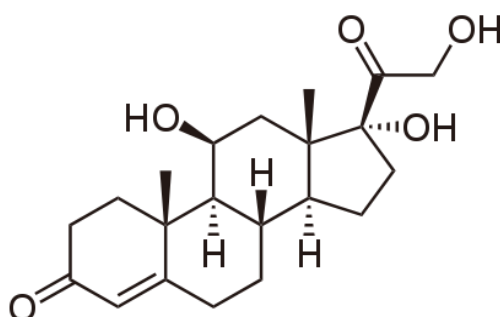


**Obr. 1: Krystalové struktury insulínu a transferinu.** A) struktura monomeru lidského insulínu ve vodě; polypeptidické řetězce jsou barveny od N-konce modře po C-konec prvního řetězce světle zeleně a od N-konce druhého řetězce tmavě zeleně po C-konec červeně; řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky; B) struktura lidského transferinu; barveno od N-konce po C-konec od modré po červenou. Zdroj: [www.pdb.org](http://www.pdb.org); kód A) 2JV1, B) 1A8E

#### 1.4.4.3 HYDROKORTIZON

Hydrokortizon, též kortisol, je hormon ze skupiny glukokortikoidů produkovaných kůrou nadledvin (Obr. 2) [42]. Je málo rozpustný ve vodě, proto vyžaduje vhodný přenašeč pro transport v krvi. Většina hydrokortizonu je navázána na kortizol vázající protein (CBP, z angl. cortisol binding protein, transcortin), asi 15% na albumin a zbytek (asi 10%) je ve volném stavu, který má jako jediný biologický účinek [43].

Hydrokortizon zvyšuje celkovou pohotovost organismu na zátěžové situace. Jednou z jeho mnoha funkcí je například stimulace glukoneogeneze a lipolýzy a má proteokatabolický efekt na metabolismus bílkovin.



**Obr. 2: Chemická struktura hydrokortizonu.**

#### 1.4.4.4 TRYPTON

Ke kultivačnímu médiu se přidávají proteinové hydrolyzáty, které jsou především zdroji dusíku. Příkladem často používaných hydrolyzátů je Primatone [37, 44] či Trypton [45]. Hydrolyzátů je v komerční sféře celá řada, používají se hydrolyzáty získané kupříkladu z kaseinu, tedy z mléka (Trypton), masa (Primatone), sóji či pšenice.

Trypton je produkt enzymatického štěpení kaseinu proteázou trypsinem. V mikrobiologii se často využívá při přípravě kultivačních médií především jako zdroj dusíku, respektive aminokyselin.

Kaseinový hydrolyzát je dostupný v mnoha verzích lišících se čistotou a způsoby přípravy a tím i různým podílem aminokyselin. Jedním z nich je Trypton N1, který může být dodán buňkám 24 hodin po transfekci k zvýšení produkce rekombinantních proteinů [45].

#### 1.4.4.5 SELENIT

Selen je esenciální prvek, který je nezbytný pro správnou funkci některých enzymů. K přípravě médií se používá jako seleničitan sodný,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

#### 1.4.4.6 STOPOVÉ PRVKY

Pro správný růst buněk v bezsérovém médiu je nezbytné přidat do něj i ionty stopových prvků. Mezi nejdůležitější patří ionty molybdenu, boru, niklu, křemíku, cínu, lithia, vanadu, jódu, chrómu, fluoru, kobaltu a kadmia.

#### 1.4.4.7 VITAMÍNY

Vitamíny mají funkci katalyzátorů biochemických reakcí a podílejí se na metabolismu proteinů, sacharidů a tuků. Kromě vitamínů přidaných do základního DMEM/H12 média se také často přidává kyselina L-askorbová, neboli vitamín C.

## 1.5 Viabilita a růst buněk

Buňky se množí exponenciálně (tzv. log-fáze), tedy až do té doby, než se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat (stacionární fáze) [46]. Nejčastěji se tedy při práci s buněčnými kulturami snažíme udržovat buňky pouze ve fázi exponenciální a těsně před dosažením stacionární fáze se buňky při tzv. subkultivaci vhodně naředí čerstvým médiem tak, aby se mohly opět množit.

Buňky se v kultuře vzájemně ovlivňují a produkují růstové faktory. Různé buněčné linie snesou během kultivace *in vitro* odlišné hustoty populací. V případě, že je buněk v kultuře velmi málo, množí se pomaleji kvůli nízké koncentraci růstových faktorů (tzv. lag-fáze růstu), nebo dokonce může dojít k jejich apoptóze [1]. Naopak při vyšších hustotách mohou adherentní kultury dosáhnout tzv. konfluency, kdy se buňky navzájem dotýkají a tvoří souvislou vrstvu [24]. Dělení buněk se v této fázi zastaví. Některé kultury však konfluency nedosáhnou a přestanou se dělit již ve fázi, kdy se začnou dotýkat výběžky buněk. Naproti tomu některé nádorové buňky rostou i po vytvoření konfluentní vrstvy [24]. Při vysokých hustotách nejsou většinou buňky dostatečně dobře zásobovány živinami a začínají odumírat.

Některé kultury nemůžeme kultivovat neomezeně, buňky se časem přestávají dělit a odumírají. To platí zejména pro buňky odebrané z dospělého jedince. Tomuto jevu se dá zabránit spontánní transformací, chemickou imortalizací či virovou transformací [1]. Kultury nádorových buněk nestárnou.

Viabilitou se rozumí životaschopnost kultury. U buněčných kultur vyjadřujeme viabilitou procento živých buněk z počtu všech buněk. Další důležitou vlastností kultury je buněčná hustota, která vyjadřuje počet buněk vztažený na jednotku objemu (nejčastěji v milionech buněk na mililitr). Buněčnou hustotu měnící se v čase lze přepočítat na dobu zdvojení kultury, tzn. průměrnou generační dobu. Ta se u savčích buněčných linií obvykle pohybuje kolem 20 - 30 hodin, průměrně činí přibližně jeden den [1].

## **1.6 Transfekce**

Transfekcí rozumíme vložení cizorodé rekombinantní DNA do hostitelské buňky, nejčastěji pomocí vektorů bakteriálního původu, plazmidů. Plazmidy lze vnést do hostitelské buňky buď přímo pomocí bakteriální infekce, anebo častěji různými chemickými či fyzikálními metodami. Příkladem fyzikálních metod může být mikroinjekce, biolistika, elektroporace, příkladem chemických metod transfekce je “maskování“ rekombinantní DNA vhodnou chemikálií, která umožní vstup genetické informace do buňky. Způsobů jak vnést rekombinantní DNA do hostitelského organismu je celá řada, záleží na druhu tohoto organismu, ekonomickém hledisku a zamýšleného výsledku transfekce [4].

Používání virových vektorů vyžaduje vyšší úroveň zabezpečení pracoviště, metody fyzikální jsou zase náročné na vybavení laboratoře. Nejméně invazivní jsou chemické transfekční metody. Při tomto způsobu transfekce vznikají mikročástičky komplexu daného transfekčního činidla s DNA, které jsou hostitelskou buňkou endocytovány či fúzí s její buněčnou membránou. Příkladem je lipofekce kationickými lipidy či precipitace DNA pomocí chloridu vápenatého [15]. Dnes často užívanou metodou je precipitace pomocí polykationických polymerů, například pomocí polyethyleniminu (PEI), diethylaminoethyl dextranu (DEAE-D) nebo poly(L-lysinu) [47].

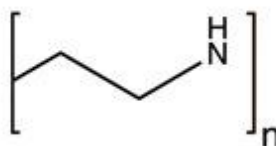
Z hlediska modifikace pomocí rekombinantní DNA rozlišujeme tranzientní a stabilní transfekci hostitelských buněk. Stabilní transfekci rozumíme inkorporaci rekombinantní DNA do genomu hostitele, následné vybrání buněk s vhodnými vlastnostmi (např. vysoká produkce r-proteinů), jejich klonování a vytvoření nové buněčné kultury s trvale pozměněnými vlastnostmi. Tranzientní transfekce je krátkodobá, nejde o trvalou změnu genomu, slouží k produkci spíše pro strukturní a funkční charakterizaci r-proteinů. Hostitelské buňky se pěstují jen omezenou dobu (1-2 generace). Nevýhodou tranzientní transfekce jsou v porovnání se stabilními liniemi obvykle o něco nižší výtěžky produkce r-proteinů, na druhou stranu její velkou výhodou je rychlost a jednoduchost provedení.

### **1.6.1 POLYETHYLENIMIN**

Polyethylenimin (PEI) je kladně nabitý polymer (Obr. 3, str. 24), který se jako polykationt poměrně často používá k precipitaci DNA. Je vhodný k použití i v médiu se sérem [47]. Rozlišujeme dva druhy PEI, rozvětvený bPEI (z angl. branched) a lineární lPEI, navíc lze oba připravit v širokém rozpětí molekulových hmotností. Vznikají odlišnými reakcemi, lPEI je

syntetizován polymerací 2-ethyl-2-oxazolinu s methyl-*p*-toluensulfonátem a kyselým otevřením vzniklé cyklické makromolekuly, bPEI vzniká kysele katalyzovanou polymerací aziridinu [48].

Pro transfekci HEK293 buněk kultivovaných v suspenzi se používá výhradně IPEI, poněvadž bPEI silně podporuje agregaci buněk během transfekce. Naproti tomu pro adherentní kultury se lépe osvědčil bPEI. Velikost vzniklých komplexů (v závislosti na poměru DNA:PEI a délce inkubace) pak přímo souvisí s účinností transfekce [47]. PEI se vyrábí v širokém rozmezí molekulových hmotností, od pár tisíc až po stovky tisíc Da, bylo však ukázáno, že nejvhodnější molekulová hmotnost bPEI i IPEI pro transfekci HEK293 linie je 25 kDa [48].



**Obr. 3: Chemická struktura lineárního polyethyleniminu.**

### **1.6.2 PLAZMID**

Plazmid je malá kruhová molekula DNA schopná vlastní replikace. Přirozeně se vyskytuje v cytoplazmě bakterií a archebakterií. Plazmidy jsou v přírodě horizontálními přenositeli genetické informace. Ve vědě se plazmidy využívají jako vektory genetické informace. Nejčastěji jsou to vektory uměle navržené genetické informace, tedy rekombinantní DNA. Cílový organismus se plazmidem transformuje či transfekuje, čímž se daná sekvence rekombinantní DNA přenesou do jádra hostitelské buňky, kde může dojít k expresi genů plazmidu či jejich začlenění do genomu hostitele. Přirozeně se vyskytující plazmidy pocházející z prokaryotických organismů jsou upravovány tak, aby kromě vlastního vloženého genu obsahovaly i další regulační elementy rekombinantní DNA, které mohou například spouštět či zvyšovat expresi daného genu.

Plazmidy určené pro transfekci do savčích buněčných linií obecně obsahují prokaryotickou, eukaryotickou a expresní oblast [49]. Prokaryotická oblast obsahuje bakteriální počátek replikace a gen pro rezistenci na antibiotika (sloužící k namnožení plazmidu v bakteriích), který může eukaryotická oblast obsahovat také (je určen pro selekci úspěšných stabilních transfektantů). Eukaryotická oblast může dále obsahovat většinou z živočišných virů odvozený replikační počátek umožňující episomální replikaci plazmidu v jádře hostitelské buňky [49]. Expresní oblast neboli expresní kazeta obsahuje sekvence regulující a zvyšující expresi vloženého genu, především silný (zpravidla virový) promotor. Dále může obsahovat



např. sekvenci pro různé afinitní značky či kotvy usnadňující následnou detekci či purifikaci exprimovaného r-proteinu.

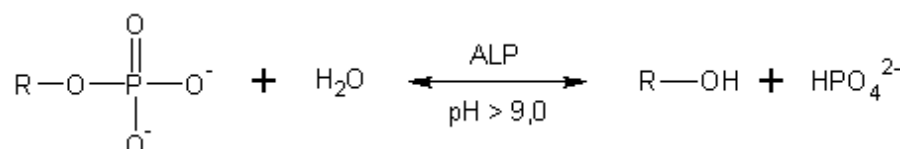
## 1.7 Reportérové proteiny

K transfekci a zejména k její optimalizaci se často využívají tzv. reportérové proteiny, které jsou snadno a kvantitativně stanovitelné již v malých množstvích. Příkladem je sekretovaná alkalická fosfatáza a zelený fluorescenční protein.

### 1.7.1 SEKRETOVANÁ ALKALICKÁ FOSFATÁZA

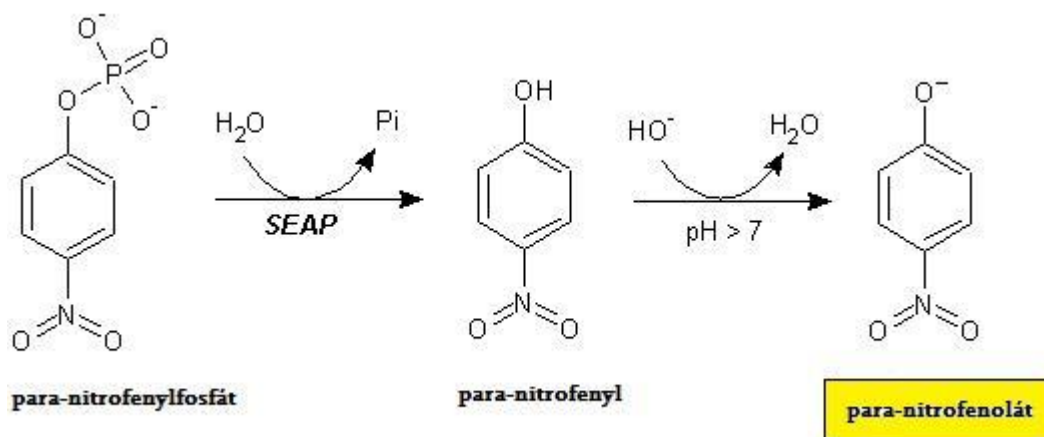
Alkalická fosfatáza (ALP) je skupina enzymů, které se nacházejí u většiny organismů, kromě některých vyšších rostlin. Nachází se v několika izoenzýmech. U člověka rozeznáváme placentární, embryonální, střevní a tkáňově nespecifickou ALP, které se od sebe liší hodnotou pI, tepelnou stabilitou a citlivostí vůči různým inhibitorům.

ALP je zodpovědná za odstranění fosfátové skupiny z mnoha typů molekul včetně nukleotidů a proteinů. Jak název napovídá, alkalická fosfatáza je nejúčinnější v zásaditém prostředí a uvolňuje za vzniku alkoholu anorganický fosfát (Obr. 4).



**Obr. 4: Reakce popisující odstranění fosfátové skupiny účinkem ALP.**

Sekretovaná alkalická fosfatáza (SEAP) je modifikovaná forma placentární alkalické fosfatázy. Tento reportérový protein je vylučován z buňky a může být detekován v médiu, kde jsou buňky pěstovány. Využitím reakce SEAP s *p*-nitrofenylfosfátem (pNPP), kdy vzniká žlutý *p*-nitrofenolát je možno stanovit množství SEAP nepřímo spektrofotometricky jako časovou změnu absorbance reakční směsi při vlnové délce 410 nm (absorpční maximum *p*-nitrofenolátu) (Obr. 5, str. 26).

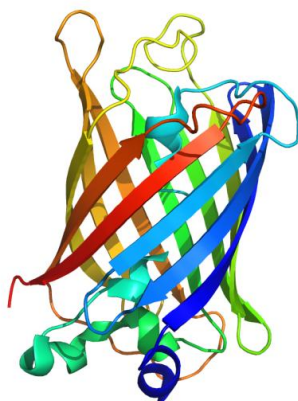


Obr. 5: Chemická reakce SEAP s pNPP za vzniku barevného *p*-nitrofenolátu.

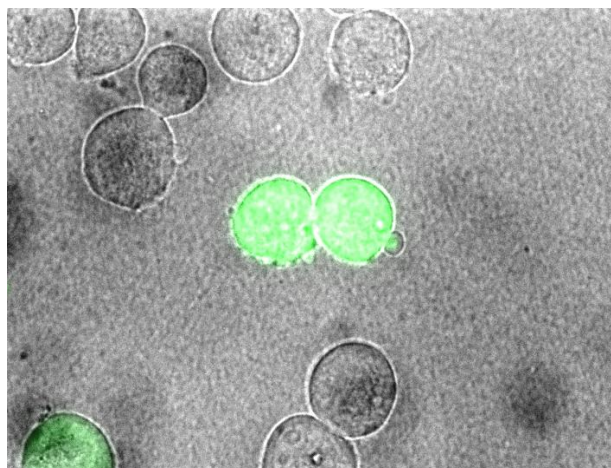
### 1.7.2 ZELENÝ FLUORESCENČNÍ PROTEIN

Zelený fluorescenční protein (GFP, z angl. green fluorescent protein) je složený z 238 aminokyselin o molární hmotnosti 29,6 kDa [50]. Často se v biochemii a molekulární biologii využívá jako reportérový protein (Obr. 7, str. 27), například k vizualizaci exprese genů, testování lokalizace různých proteinů či sledování proliferace nádorových buněk. Když je GFP vystaven modrému světlu o excitačním maximu 475 nm, vydává zelenou fluorescenci o emisním maximu 508 nm.

Struktura GFP je poměrně jednoduchá, je tvořena 11  $\beta$ -skládanými listy, které se skládají do kompaktního  $\beta$ -barelu, uvnitř kterého se nachází chromoforová skupina chráněná před vnějším prostředím (Obr. 6). Modifikací GFP byla připravena celá škála barevných forem [51].



Obr. 6: Krystalová struktura zeleného fluorescenčního proteinu. Molekula je barvena od N-konce k C-konci od modré po červenou. Zdroj: [www.pdb.org](http://www.pdb.org), kód 1RM9.



**Obr. 7: Buňky HEK293-6E transfekované plazmidem pEF-FS-EGFP-dneo.** Snímek pořízený pomocí fluorescenčního mikroskopu (RNDr. Jan Svoboda, Mikrobiologický ústav AV ČR) zaznamenávající transfekované (zelené) GFP<sup>+</sup> buňky v populaci GFP<sup>-</sup> buněk (zelená barva byla do obrázku dodána až během zpracování snímku v počítači, odpovídá však intenzitě nasnímané fluorescence).

## ***2 CÍLE PRÁCE***

- Optimalizace složení kultivačního média DMEM/F12 pro suspenzní bezsérovou kultivaci linií HEK293S a HEK293T
- Optimalizace podmínek transfekce těchto linií v nově vytvořeném médiu
- Ověření transfekovatelnosti a produkční schopnosti buněk pěstovaných v novém médiu
- Porovnání s buňkami pěstovanými v komerčních médiích

### 3 *MATERIÁL A METODY*

#### 3.1 *Přístroje a pomůcky*

12ti jamkové destičky, sterilní	<i>TPP, Švýcarsko</i>
8-kanálová pipeta Transferpette	<i>Biohit, USA</i>
96ti jamkové destičky	<i>KOH-I-NOOR HARDTMUTH, Česká republika</i>
Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
Analytické váhy	<i>A&amp;D Company, Japonsko</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H +P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety	<i>Biohit, USA</i>
Centrifuga EBA 12 R	<i>Hettich Zentrifugen, Německo</i>
Centrifuga Universal 320 R	<i>Hettich Zentrifugen, Německo</i>
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise	<i>Tecan, Rakousko</i>
Filtry pro sterilizaci	<i>Corning, Německo</i>
Laminární box Clean Air Techniek B. V.	<i>PMV a Telstar company, Belgie</i>
Hemocytometr	<i>INCYTO, Korea</i>
CO <sub>2</sub> inkubátor 18AIC	<i>Sanyo, Japonsko</i>
CO <sub>2</sub> třepačka Multitron Cell	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON, Česká republika</i>
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>Duran Group, Německo</i>
Lednice	<i>Fagor, Španělsko</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Lab.přístroje Praha, ČR</i>
Mikroskop inverzní AE31	<i>Motic, Německo</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Calex, Česká republika</i>
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Mrazicí kontejner Cryo 1 °C	<i>Nalgene, USA</i>
pH metr Ino Lab	<i>Schoeller, Německo</i>
Pipetovací nástavec Midiplus	<i>Biohit, USA</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>Corning, Německo</i>
Průtokový cytometr BD LSR II	<i>BD biosciences, USA</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
Sterilní pipety Stripette Costar	<i>Corning, Německo</i>
Sterilní zkumavky s víčkem	<i>Corning, Německo</i>
Třepačka Orbit 1000	<i>Labnet, USA</i>
Vakuový systém VACUSAVE	<i>Integra, Švýcarsko</i>
Vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>
Vortex	<i>IKA, Německo</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>

### 3.2 Chemikálie

Aminokyseliny L-Met, L-Lys · H <sub>2</sub> O, L-Leu	<i>Degussa, Česká republika</i>
CD Lipid Concentrate	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
Diethanolamin	<i>Sigma, USA</i>
Práškové DMEM/H12 médium D9785	<i>Sigma, USA</i>
DMSO	<i>Sigma, USA</i>
Ethanolamin	<i>Sigma, USA</i>
ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
D-Glukóza monohydrát	<i>PENTA, Česká republika</i>
Hydrokortizon	<i>Sigma, USA</i>
Freestyle F17 médium	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
Hoechst 33258-A	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
Insulin	<i>Sigma, USA</i>
Kyselina askorbová	<i>Sigma, USA</i>
L-Glutamin	<i>Sigma, USA</i>
IPEI 25 kDa	<i>Polysciences, USA</i>
NEA, koncentrát neesenciálních aminokyselin	<i>Přípravna médií ÚMG AV ČR, v.v.i., Česká republika</i>
Seleničitan sodný	<i>Sigma, USA</i>
Pyrohroznán sodný	<i>Sigma, USA</i>
Pluronic F68	<i>Sigma, USA</i>
Transferin	<i>Sigma, USA</i>
pNPP	<i>Sigma, USA</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Tryptone N1	<i>Organo Technie, Kanada</i>
Ostatní běžné chemikálie (pufry, soli)	<i>Lach-Ner, ČR</i>

### 3.3 Buněčné linie

HEK293T	<i>A. Radu Aricescu, Oxford, Velká Británie</i>
HEK293S	<i>americká sbírka buněčných linií (ATCC)</i>

### 3.4 Vektory

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

### 3.5 *Roztoky*

- **DMEM/H12 1:1 médium**

Zakoupeno základní DMEM/H12 médium v prášku (D9785, *Sigma*, USA). Nejprve byly připraveny 2x koncentrované zásobní roztoky média DMEM/H12 s přísávkem látek uvedených v Tab. 3, str. 32, poté bylo médium zředěno a připraveno k optimalizaci s přísávkem dalších látek uvedených v Tab. 9, str. 34 (viz. 4.1 Postup přípravy nového média).

- **ExCELL293 médium**

Zakoupeno hotové médium (*Sigma*, USA) a před použitím přidán L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mM.

- **Freestyle F17 médium**

Zakoupeno hotové médium (*Gibco Invitrogen*, USA) a před použitím přidán L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mM a Pluronic F68 o výsledné koncentraci 0,1 %.

- **PBS-TK pufr**

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0. Sterilizován filtrací.

- **Roztok pNPP**

Pro stanovení SEAP bylo namícháno činidlo o složení 20 mM pNPP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1M diethanolamin, pH 9,8 [48].

- **Trypton (Y)**

Trypton byl rozpuštěn v médiu F17 tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 20% a sterilizován filtrací přes 0,22 µm membránu.

- **Trypanová modř**

Trypanová modř byla rozpuštěna v PBS-TK tak, aby její výsledná koncentrace byla 0,4%.

### 3.6 *Postup přípravy nového média (N)*

Zakoupené práškové médium DMEM/F12 (Tab. 1, str. 18; Tab. 2, str. 19) bylo rozpuštěno za stálého míchání ve 4,5 l destilované vody za účelem přípravy 2x koncentrovaného zásobního roztoku média o celkovém objemu 5 l. Láhev zakoupeného práškového média vystačí na přípravu 10 l média o koncentraci 14,8 g/l [32]. K rozpuštěnému médiu byly přidány látky uvedené v Tab. 3, str. 32. Důležité bylo také upravit pH média na hodnotu 7. Poté bylo toto médium doplněno na objem 5 l a sterilně zfiltrováno po 0,5 l do litrových čtverhranných lahví.

**Tab. 3: Tabulka přidaných látek na 5 l 2x koncentrovaného média.** D-Glukóza byla přidána k základní variantě D9785 média DMEM/F12 (Tab. 2, str. 19), celková koncentrace je vztažena na výslednou koncentraci D-Glukózy v novém médiu N.

Látka	Navážka na 5 l 2x koncentrovaného roztoku média [g]	Celková koncentrace v médiu [g/l]
L-Leucin [32]	0,5905	0,05905
L-Lysin · H <sub>2</sub> O [32]	0,8200	0,08200
L-Methionin [32]	0,1724	0,01724
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O [32]	1,0086	0,10086
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O [32]	0,6120	0,06120
D-Glukóza [37]	34,2	6,0

Před použitím připraveného 2x koncentrovaného média se toto muselo zředit a přidat k němu další látky. Pokud nebyly látky v kapalném skupenství, byly připraveny a sterilně zfiltróvány zásobní roztoky některých látek uvedených v Tab. 4, str. 32 a Tab. 5 resp. Tab. 6, str. 33.

**Tab. 4: Připravené sterilní zásobní roztoky.**

Látka	Rozpouštědlo	Koncentrace zásobního roztoku [g/l]	Koncentrace v médiu [g/l]	Přídavek do 1 l média [ml]
NaHCO <sub>3</sub> [32]	voda	75,00	1,20	16
L-Glutamin [32]	voda	30,00	0,60	20
Pluronic F68 [30]	voda	1,00	0,01	10
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> [52]	voda	0,05	$5 \cdot 10^{-6}$	0,1
Ethanolamin [53]	voda	2,00	$2 \cdot 10^{-3}$	1
Trypton N1 (Y) [45]	F17	200,00	5,00	25
Kyselina askorbová (C) [54]	voda	3,52	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1
Hydrokortizon (H) [54]	ethanol	0,0018	$1,8 \cdot 10^{-6}$	1
Směs stopových prvků (P resp. P*)	voda	-	(Tab. 5 resp. 6, str. 30)	1
Transferin (T) [36, 54, 55]	voda	5,00	optimalizace	optimalizace

Směs stopových prvků (P) byla připravena tak, že bylo naváženo na analytických váhách 10 mg každé sloučeniny. Navážky byly rozpuštěny vždy v 1 ml vody. Postupným ředěním (10 x nebo 100 x) některých sloučenin bylo dosaženo koncentrací vhodných pro odebrání řádově mikrolitrů daného roztoku (Tab. 5, str. 33). Přesné objemy všech roztoků byly přeneseny do 10 ml destilované vody. Roztok byl sterilně zfiltróván. Do 1 l média se přidává 1 ml této směsi stopových prvků (Tab. 4). Později byly k této směsi stopových prvků stejným způsobem přidány kademnaté ionty a zvýšeny koncentrace kobaltnatých a vanadičných iontů. Tato konečná směs je označena symbolem P\* a charakterizuje ji Tab. 6.



Tab. 5: Příprava a koncentrace směsi stopových prvků (P) v médiu.

Ionty stopového prvku	Sloučenina	Násobky ředění po rozpuštění 10mg sloučeniny v 1 ml H <sub>2</sub> O	Odebraný objem (v µl) zředěných roztoků doplněný 10 ml H <sub>2</sub> O	Koncentrace v médiu [µg/l]
Mo <sup>IV</sup> [32]	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0	6,68	6,68
B <sup>III</sup> [32]	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	8,2	0,82
Mn <sup>II</sup> [32]	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100	26,7	0,267
Ni <sup>II</sup> [32]	NiSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10	4,7	0,47
Si <sup>VI</sup> [32]	H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0	4,25	4,25
Sn <sup>II</sup> [32]	SnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	100	7,9	0,079
*V <sup>V</sup>	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	100	10	0,1
*Co <sup>II</sup>	CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100	10	0,1
*I <sup>I</sup>	NaI	0	10	10
*Cr <sup>III</sup>	CrCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	100	10	0,1
*F <sup>I</sup>	NaF	0	10	10
*Li <sup>I</sup>	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	3	3

Tab. 6: Příprava a koncentrace konečné směsi stopových prvků (P\*) v médiu. Toto složení iontů stopových prvků P\* se liší od P (Tab. 5) přidáním Cd<sup>II</sup> a zvýšenou koncentrací V<sup>V</sup> a Co<sup>II</sup>.

Ionty stopového prvku	Sloučenina	Násobky ředění po rozpuštění 10 mg sloučeniny v 1 ml H <sub>2</sub> O	Odebraný objem (v µl) zředěných roztoků doplněný 10 ml H <sub>2</sub> O	Koncentrace v médiu [µg/l]
Mo <sup>IV</sup> [32]	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0	6,68	6,68
B <sup>III</sup> [32]	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	8,2	0,82
Mn <sup>II</sup> [32]	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100	26,7	0,267
Ni <sup>II</sup> [32]	NiSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10	4,7	0,47
Si <sup>III</sup> [32]	H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0	4,25	4,25
Sn <sup>II</sup> [32]	SnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	100	7,9	0,079
V <sup>V</sup> [54]	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	100	29	0,29
Co <sup>II</sup> [54]	CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100	28	2,8
Cd <sup>II</sup> [54]	CdCl <sub>2</sub> · 2,5 H <sub>2</sub> O	0	11,4	11,4
*I <sup>I</sup>	NaI	0	10	10
*Cr <sup>III</sup>	CrCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	100	10	0,1
*F <sup>I</sup>	NaF	0	10	10
*Li <sup>I</sup>	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	3	3

\* Koncentrace uvedených iontů stopových prvků řádově odhadnuty dle [56].

**Tab. 7: Koncentrace aminokyselin ve směsi neesenciálních aminokyselin (NEA).** Směs NEA byla připravena v Přípravně médií ÚMG AV ČR, v.v.i.

Aminokyselina	Koncentrace [mg/l]
L-Alanin	8,9
L-Asparagin · H <sub>2</sub> O	15
L-Askorbová kyselina	13,3
L-Glutamová kyselina	14,7
Glycin	7,5
L-Prolin	11,5
L-Serin	10,5

**Tab. 8: Předem připravené zásobní roztoky přidávané do média.**

Látka	Rozpouštědlo	Koncentrace zásobního roztoku	Koncentrace v médiu	Přídavek do 1 l média v ml
Pyrohroznán sodný [57]	voda	11 g/l	0,11 g/l	10
Lipidový koncentrát [58]	ethanol	100 ml/l	0,1 ml/l	1
NEA	voda	-	Tab. 7	10
Insulin (I)	voda	1 mg/ml	optimalizace	optimalizace

Protože hlavním cílem této práce byla optimalizace složení média, nepřipravovalo se médium obsahující všechny potřebné látky najednou. Bylo nutné sledovat růst a expresi reportérových proteinů v závislosti na koncentraci a přítomnosti různých látek. Látky jako insulin (I), transferin (T), směs iontů stopových prvků (P resp. P\*), trypton (Y) a hydrokortizon (H) se přidávaly přímo k buněčné suspenzi přepočítané na množství dodaného média N. Po optimalizaci těchto látek už bylo možné připravit kompletní médium N obsahující všechny důležité látky o nejúčinnějších koncentracích.

Litr média bez přidaného I, T, Y, H a P či P\* se připravil tak, že se 0,5 l předem připraveného 2x koncentrovaného zásobního média doplnilo na asi 900 ml sterilní deionizovanou vodou. Dále se přidaly všechny látky uvedené v Tab. 9. Nakonec se přidalo 16 ml NaHCO<sub>3</sub> a doplnilo sterilní deionizovanou vodou na 1 l.

**Tab. 9: Přidávané objemy látek pro přípravu 1 l média N z 2x koncentrovaného zásobního média.**

Médium nezahrnuje I (I\*), T, Y, H, P (P\*), C.

Látka	Přidávaný objem [ml] do 1 l média N
L-Glutamin	20
Pluronic F68	10
Pyrohroznán sodný	10
NEA	10
Selenit	0,1
Ethanolamin	1
Lipidový koncentrát	1

### **3.7 Kultivace buněčných linií 293T a 293S**

Buněčné linie 293T a 293S byly kultivovány v suspenzi v čtverhranných lahvích o objemu 250 ml či 100 ml v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Pravidelně po 3–4 dnech byly počítány jejich buněčné hustoty a následně byly naředěny na buněčnou hustotu  $0,2 \cdot 10^6$  buněk na mililitr z důvodu možnosti porovnávání rychlosti růstu buněčných kultur mezi sebou.

Obě buněčné linie byly pěstovány ve směsi médií Ex/F17, Ex/N (obvykle v poměru 1:1) nebo v případě 293S i v samotném médiu N. K médiu N se při optimalizaci přidávaly látky jako je insulin, jehož koncentrace v médiu N byla taktéž předmětem optimalizace, nebo hydrokortizon, transferin, trypton, směs iontů stopových prvků (složení viz Tab. 5 resp. 6, str. 33) a kyselina askorbová (koncentrace dle Tab. 4, str. 32). Byl sledován růst těchto kultur v čase. Obvykle trvalo několik dní až týdnů, než se buňky adaptovaly na nové složení média, či kompletní změnu média, proto byl průběh jejich růstu sledován po několik týdnů až měsíců.

#### **3.7.1 ROZMRAZOVÁNÍ A ZMRAZOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ 293T A 293S**

Pro rozmrazení buněk bylo vždy nutné buňky nejdříve zbavit DMSO, který byl k buněčné suspenzi přidán před zmrazením jako kryoprotektant. Byly použity kryozkumavky, které obsahovaly 1 ml suspenze o hustotě cca 5 milionů buněk. Buňky byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37 °C a byly přeneseny do 10 ml směsi médií ExCELL293 (Ex)/F17 1:1 v 15ml sterilní zkumavce s víčkem. Tato suspenze byla jemně promíchána a centrifugována při 160 x g po dobu 5 minut. Pelet buněk byl opatrně zbaven supernatantu a resuspendován v několika mililitrech média, ve kterém bylo zamýšleno buňky pěstovat. Tato suspenze byla převedena do 250ml sterilní láhve a doplněna médiem na výsledný objem 20 ml. Výsledná hustota buněk po rozmrazení byla tedy asi 0,25 milionů buněk na mililitr. Po několika dnech, kdy se buňky začaly dělit obvyklou rychlostí, byla kultura zředěna médiem na výsledný objem 50 ml, ve kterém se v 250ml láhvi buňky standardně pěstovaly.

Naopak pro zmrazení buněk byla nejdříve spočítána buněčná hustota buněk v médiu a rozhodlo se, kolik alikvotů o jaké buněčné hustotě bude zapotřebí zmrazit. Poté byl vypočítán objem této suspenze centrifugován v 50 ml sterilních zkumavkách s víčkem při 160 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet, který obsahoval buňky určené ke zmrazení, byl resuspendován v takovém objemu média, aby se dosáhlo požadované buněčné hustoty (nejčastěji 5, 10 nebo 20 milionů buněk na ml). Toto mrazící médium (Ex, směs Ex/N, směs F17/Ex) obsahovalo 10 % DMSO. Výsledná suspenze byla rozdělena po 1 ml

do kryozkumavek, dána do mrazícího kontejneru, v němž je kontrolovaný pokles teploty o 1 °C za minutu a umístěna do mrazícího boxu o teplotě -80 °C.

### **3.7.2 POČÍTÁNÍ BUNĚČNÉ HUSTOTY POMOCÍ HEMOCYTOTMETRU**

Buňky byly počítány manuálně, a to pomocí hemocytometru. Do mikrozkuhavky bylo pomocí automatické pipety odebráno 20 µl rozmíchané buněčné suspenze a zředěno 20 µl roztoku trypanové modři. Po krátké inkubaci bylo 20 µl této směsi pipetováno do komůrky hemocytometru. Byly počítány průhledné živé buňky ve všech devíti čtvercích hemocytometru. Následně byly spočítány i všechny modře obarvené mrtvé buňky. Průměrná hodnota jednoho čtverce živých buněk byla vynásobena faktorem hemocytometru  $1 \cdot 10^4$  a faktorem ředění, v tomto případě 2. Výsledná hodnota odpovídá buněčné hustotě vyjádřené v milionech buněk na mililitr. Viabilita v procentech se vypočítala podílem počtu všech živých buněk k počtu všech buněk a vynásobením stem.

### **3.7.3 SUBKULTIVACE**

Subkultivací se rozumí výměna či naředění média, ve kterém jsou buňky kultivovány. Aby se kultura nedostala až do stacionární fáze, kdy dochází k buněčné apoptóze a zastavení růstu buněk, musí se buňkám včas dodat čerstvé médium.

Po spočítání buněčné hustoty pomocí hemocytometru se vypočítal objem buněčné suspenze, která se má zředit čerstvým médiem tak, aby bylo dosaženo požadované buněčné hustoty a objemu (nejčastěji 50 ml, buněčná hustota 0,2 milionů buněk na ml). Pomocí sterilní jednorázové pipety se po jemném promíchání buněčné suspenze v kultivační láhvi odebral nepotřebný objem buněk. Tyto buňky byly buď použity na vytvoření další kultury, k transfekci apod. nebo zlikvidovány. Buňky, které zůstaly v láhvi, byly zředěny na požadovaný objem daným médiem. K suspenzi byly pak ještě v některých případech přidány pomocí automatických pipet se sterilními špičkami optimalizované látky.

## **3.8 Transfekce buněčných linií 293T a 293S**

### **3.8.1 PŘÍPRAVA TRANSFEKČNÍHO ROZTOKU PBS, PLAZMIDOVÉ DNA A LPEI**

Plazmidová DNA pro expresi GFP a SEAP byla namíchána v molárním poměru 1:19 GFP:SEAP a byl připraven roztok této směsi plazmidů rozpuštěný ve sterilní vodě o koncentraci

DNA 1 g/l. Množství plazmidové DNA použité pro transfekci se odvíjelo od množství buněk určených k transfekci, konkrétně 1 µg plazmidu na milion buněk.

Objem přidávaného IPEI byl závislý na transfekčním poměru. Například pro poměr DNA:IPEI 1:3, kdy se přidávalo 10 µl DNA k 10 milionům buněk, bylo přidáno 30 µl 1x koncentrovaného IPEI pro 293T nebo 3,8 µl 8x koncentrovaného IPEI pro 293S.

Sterilní plazmidová DNA byla zředěna v PBS-TK tak, aby koncový objem transfekční směsi nepřesáhl 10 % objemu produkční suspenze. Například pro transfekci 1 milionu buněk 293T v 0,5 ml suspenzi na 12ti jamkové destičce při poměru DNA:IPEI 1:3 byl použit 1 µl DNA, 3 µl IPEI a 46 µl PBS-TK.

Transfekční směs se připravila přidáním sterilní plazmidové DNA k PBS-TK v mikrozkušavce a následným přidáním IPEI. Směs byla důkladně promíchána a inkubována 10 min a poté přidána k buněčné suspenzi.

### **3.8.2 PŘÍPRAVA BUNĚČNÉ SUSPENZE PRO TRANZIENTNÍ TRANSFEKCI**

Nejdříve byla pomocí hemocytometru spočítána hustota buněčné suspenze určené pro transfekci. Dle zjištěné hustoty buněk byl vypočítán objem buněčné suspenze, který je třeba odebrat a centrifugovat při 160 x g po dobu 5 minut ve sterilní zkumavce s víčkem. Pelet buněk byl resuspendován v požadovaném objemu transfekčního média a převeden do vhodné sterilní nádoby. Zpravidla to byl 1 milion 293T a 10 milionů 293S buněk zředěných na objem 0,5 ml příslušného média v jedné jamce 12ti jamkové destičky. Následně byl k buňkám přidán připravený transfekční roztok.

### **3.8.3 DODÁNÍ MÉDIA TRANSFEKOVANÝM BUŇKÁM**

Produkční buněčná suspenze a transfekční roztok byly inkubovány po dobu 4 hodin. Poté byla v případě linie 293T suspenze zředěna čerstvým produkčním médiem na svůj dvojnásobný objem, čímž se dosáhlo obvyklé produkční hustoty 1 milionu transfekovaných buněk v 1 ml média. U linie 293S se prováděla takzvaná vysokohustotní transfekce, kdy se buňky transfekují v co nejmenším objemu média a poté se 20x zředí čerstvým médiem. Protože je nemožné celou takovouto transfekci provést v jamce 12ti jamkové destičky, byla transfekce 10 milionů buněk provedena výše popsaným způsobem a následně byla po 4 hodinách odebrána větší část transfekované suspenze (0,45 ml) a pouze zbylá suspenze byla doplněna na objem 1 ml, prakticky tedy byl k dispozici 1 milion původně transfekovaných buněk a hustota výsledné suspenze byla stejná jako u linie 293T.

## **3.9 Stanovení reportérových proteinů**

### **3.9.1 STANOVENÍ SEAP**

Z produkujících buněčných suspenzí bylo odebráno 200  $\mu$ l vzorku do plastové mikrozkušavky a centrifugováno 2 minuty při 200 x g. Poté bylo 20  $\mu$ l supernatantu ředěno v tripletech 10x, 100x a 1000x ředící řadou na 96ti jamkové destičce. K takto zředěným vzorkům bylo přidáno 20  $\mu$ l roztoku pNPP a bezprostředně poté byla měřena absorbance při 410 nm každých 30 s (celkem 21 x) na automatické čtečce mikrotitračních destiček.

### **3.9.2 STANOVENÍ GFP**

Z produkující buněčné suspenze bylo odebráno 200  $\mu$ l do plastové mikrozkušavky a centrifugováno po dobu 5 minut při 200 x g. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS a znovu centrifugovány. Následně byly opět resuspendovány v 200  $\mu$ l PBS. K buňkám bylo přidáno fluorescentní barvivo Hoechst 33258-A jako indikátor populace mrtvých buněk. U takto připravených vzorků byla RNDr. Janem Svobodou nebo Mgr. Žanetou Růžičkovou (Centrum pro cytometrii a mikroskopii, MBÚ, AVČR v. v. i.) průtokovým cytometrem BD LSR II změřena viabilita dle množství absorbovaného barviva Hoechst (vysoké množství = mrtvé buňky) a úroveň GFP fluorescence buněčné suspenze ukazující úspěšnost transfekce (vysoká úroveň fluorescence = buňky úspěšně transfekované). Výsledná populace buněk byla tedy vybrána jako Hoechst negativní, GFP pozitivní a úspěšnost transfekce byla posuzována jako procento GFP<sup>+</sup> buněk ze všech živých (Hoechst negativních) buněk.

## **3.10 Zpracování dat**

Získaná data z kultivací buněčných linií pěstovaných v médiu o daném složení, tj. jejich buněčná hustota a viabilita, byla pomocí tabulkového kalkulátoru MS Office Excel 2007 přepočítána na průměrnou dobu zdvojení kultury v hodinách, která byla opatřena směrodatnou odchylkou tohoto průměru.

Získané soubory dat z měření exprese SEAP byly vyhodnoceny s pomocí Bc. Jana Bláhy. Data naměřená na automatické čtečce mikrotitračních destiček byla automaticky přenesena do tabulkového kalkulátoru MS Office Excel 2007 a byla vypočítána směrnice jejich lineární

aproximace. V rámci triplikátu měření byly záporné nebo extrémně odlehle hodnoty vyřazeny. Výsledná hodnota reprezentující úroveň exprese SEAP byla vypočítána jako průměr hodnot reprezentujících úroveň exprese v jednotlivých experimentech triplikátu a byla opatřena směrodatnou odchylkou tohoto průměru.

Data získaná na FACS byla vyhodnocena RNDr. Janem Svobodou a Mgr. Žanetou Růžičkovou (Centrum pro cytometrii a mikroskopii, MBÚ, AV ČR v. v. i.) v programu FlowJo 7.2.5 (Tree Star Inc.) a přenesena do tabulkového kalkulátoru MS Office Excel 2007.

Takto zpracovaná data se v tabulkovém kalkulátoru MS Office Excel 2007 převedla do podoby shrnujících grafů a tabulek.

## **4 VÝSLEDKY**

Zkratky použité v této části vycházejí ze Seznamu zkratk použitých v experimentální části, str. 8.

### **4.1 Optimalizace složení média**

#### **4.1.1 OPTIMALIZACE POMĚRU MÉDIA N A MÉDIA EX PRO RŮST 293S A 293T**

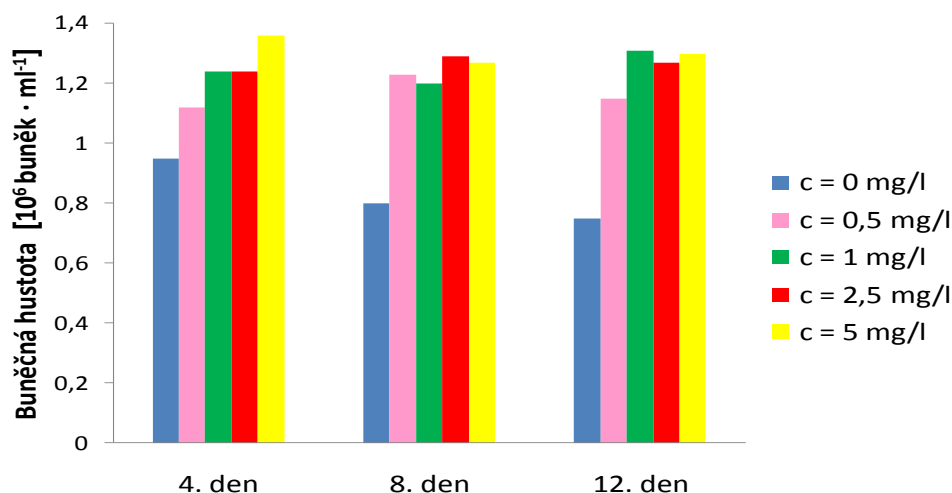
Byl porovnáván růst buněčných kultur 293S v médiu N (složení a příprava viz kapitola 3.6 Postup přípravy nového média (N)) a médiích o různých poměrech Ex/N, konkrétně 1:1, 1:3 a 1:9 po dobu 3 týdnů. Protože se postupem času ukázalo díky zpomalení růstu a klesající viabilitě, že buňkám z média N a ze směsi médií Ex/N 1:3 a 1:9 chybí neznámé nutrienty, byla tato optimalizace změněna pouze na sledování růstu a transfekci buněk 293S pěstovaných ve směsi Ex/N 1:1 (dále jen Ex/N) a v samotném médiu N. K médiu N byly postupně přidávány další látky (I (I\*) nebo H, dále T, P (P\*), Y) a byl sledován dlouhodobý růst linií 293S a 293T.

#### **4.1.2 OPTIMALIZACE KONCENTRACE INSULINU**

Koncentrace insulínu v médiu N byla optimalizována tak, že bylo vytvořeno 5 buněčných kultur 293S pěstovaných v médiu N o různých koncentracích I (koncentrace 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2,5 mg/l a 5 mg/l). Kultury byly sledovány po dobu 12 dnů od subkultivace ze zásobní kultury 293S (Ex/F17) (Obr. 8, str. 41).

Dále byl sledován růst a exprese GFP a SEAP těchto 293S kultur pěstovaných v médiu N nebo ve směsi média Ex/N obsahujícího optimalizované složení insulínu (I\*) (viz 4.1.3 Optimalizace hydrokortizonu, 4.4 293S: Stanovení SEAP a GFP).





**Obr. 8: Sledování růstu buněk 293S v médiu N s přidaným T a Y o různých koncentracích I po dobu 12 dní od převedení buněk ze zásobní lahve 293S (Ex/F17).** Buňky byly pěstovány ve 100ml čtverhranných lahvích a po každém spočítání buněčné hustoty pomocí hemocytometru byly zředěny na stejnou hustotu, tj.  $0,25 \cdot 10^6$  buněk na ml. Viabilita buněk byla srovnatelná a vždy vyšší než 97 %.

Hodnoty buněčných hustot (Obr. 8) vykazují závislost růstu kultury 293S na koncentraci I v médiu N. Buňky, které byly pěstovány v suspenzi bez I ( $c = 0$  mg/l) vykazovaly nejpomalejší růst. Od koncentrace 1 mg/l a vyšších rostly buňky přibližně stejnou rychlostí. Z ekonomického hlediska byla zvolena koncentrace insulinu v médiu N dodávaného buňkám nejnižší možná, a to 1 mg/l. Pro tyto kultury nebyla počítána doba zdvojení, protože nezáleželo na konkrétní, ale na relativní rychlosti růstu pro porovnání kultur mezi sebou.

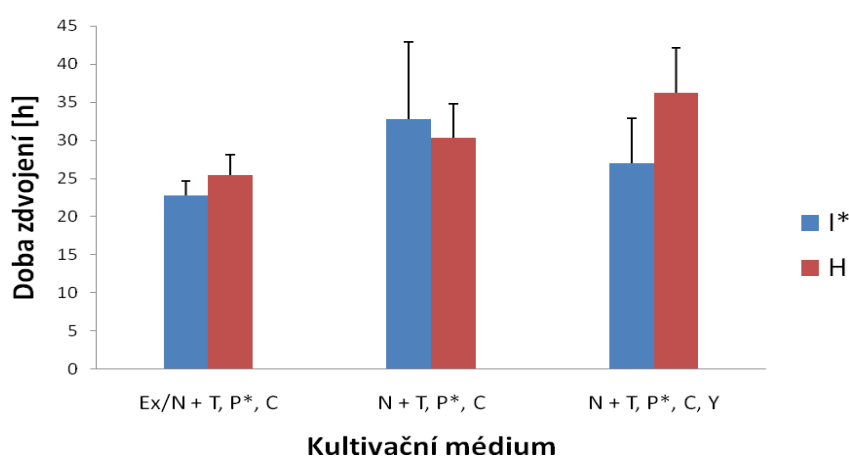
Po zavedení optimalizované koncentrace insulinu v médiu N se porovnávala doba zdvojení 293S pěstovaných ve směsi Ex/N + I, T s Ex/N + I\*, T (Tab. 10).

**Tab. 10: Porovnání a statistické zpracování průměrné doby zdvojení buněk 293S pěstovaných ve směsi média Ex/N + T obsahujícího 5 mg/l (I) nebo 1 mg/l (I\*) insulinu.** Buňky byly pěstovány standardně ve 250ml čtverhranných lahvích. Viabilita buněk byla srovnatelná a byla vždy vyšší než 97 %. Počtem subkultivací se rozumí počet získaných dat z počítání buněk pomocí hemocytometru a jejich následné zředění.

Kultivační médium	Průměr doby zdvojení [h]	Směrodatná odchylka doby zdvojení [h]	Relativní směrodatná odchylka doby zdvojení [%]	Interval spolehlivosti [h]	Počet subkultivací
Ex/N + I, T	23,03	2,32	10,1	± 1,22	14
Ex/N + I*, T	22,74	1,90	8,4	± 1,41	7

### 4.1.3 OPTIMALIZACE HYDROKORTIZONU

Koncentrace H v médiu N nebyla měněna, byla tedy  $1,8 \cdot 10^{-6}$  g/l [54]. Bylo však důležité zjistit, zda k novému médiu přidávat spíše I nebo H podle toho, jak buněčná kultura rychle roste, je viabilní a transfekovatelná. Porovnávaly se tedy kultury 293S pěstované v čistém médiu N nebo ve směsi Ex/N 1:1 s přidavkem optimalizovaného insulinu (I\*) s kulturami 293S pěstovaných v čistém médiu N nebo ve směsi Ex/N 1:1 s přidavkem hydrokortizonu. Byl sledován jak jejich růst a viabilita (Obr. 9), tak exprese GFP a SEAP (viz kapitola 4.4 293S: Stanovení SEAP a GFP).



**Obr. 9: Porovnání průměrné doby zdvojení buněk 293S pěstovaných v médiích s přidavkem I\* (modré sloupce) nebo H (červené sloupce).** Hodnoty průměrných dob zdvojení jsou opatřeny směrodatnou odchylkou. Buňky byly pěstovány standardně ve 250ml čtverhranných lahvích. Viabilita buněk byla srovnatelná a vždy vyšší než 98 %.

Ze sledování růstu těchto kultur vyplývá, že přidavkem I\* místo H do média je růst mírně rychlejší, s výjimkou kultivace v nemíšeném médiu N bez přidavku Y. Výsledky ukazují, že v porovnání růstu i exprese těchto kultur, je výhodnější do média přidávat I\*.

### 4.1.4 OPTIMALIZACE DALŠÍCH KOMPONENT MÉDIA

Důležitými látkami v médiu jsou ionty stopových prvků. Kvůli nedostatku informací o jejich koncentraci v kultivačních médiích bylo nutno vyzkoušet, zda přidaná směs iontů stopových prvků P bude mít na buňky pozitivní či negativní vliv (Tab. 5, str. 33). Byly sledovány kultury 293S a posléze i 293T v médiu N nebo Ex/N. S pomocí RNDr. Kamily

Balušíkové (3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy), která doporučila koncentrace některých iontů stopových prvků, byla tato směs později upravena (P\*; Tab. 6, str. 33). Zároveň s touto novou směsí iontů stopových prvků P\* se do média N začal přidávat i vitamín C (C).

**Tab. 11. Porovnání a statistické zpracování průměrné doby zdvojení buněk 293S pěstovaných ve směsi Ex/N + I\*, T obsahujícího P nebo P\* + C.** Buňky byly pěstovány standardně ve 250ml čtverhranných lahvích. Průměrná viabilita 293S v médiu obsahujícím P byla 98 % a v médiu obsahujícím P\* + C 100 %. Počtem subkulturací se rozumí počet získaných dat z počítání buněk pomocí hemocytometru a jejich následné zředění.

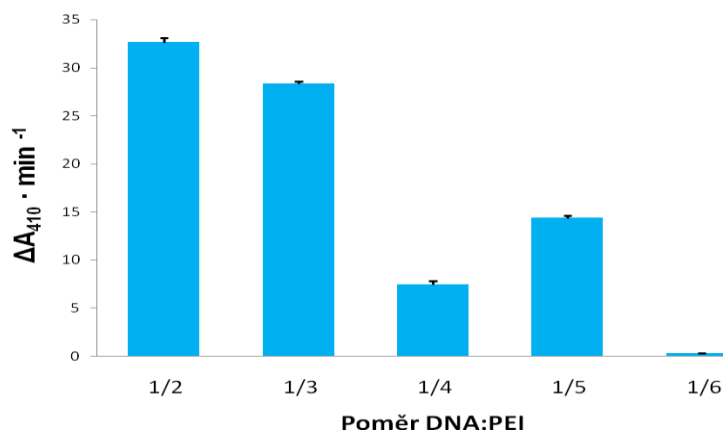
Kultivační médium	Průměr doby zdvojení [h]	Směrodatná odchylka doby zdvojení [h]	Relativní směrodatná odchylka doby zdvojení [%]	Interval spolehlivosti [h]	Počet sub-kulturací
Ex/N + I*, T, P	26,73	4,88	18,3	± 3,38	8
Ex/N + I*, T, P*, C	20,47	2,68	13,1	± 2,63	4

Trypton N1 jako další z komponent média N byl přidáván k buňkám do koncentrace 0,5% v médiu N, které nebylo ve směsi s Ex. Byl porovnáván růst a viabilita (Obr. 9, str. 42) buněk 293S v médiu obsahujícího Y s buňkami 293S bez přidávaného Y. Další proměnnou byl v tomto případě I nebo H. Z Obr. 9, str. 42 lze vyčíst, že se doba zdvojení snížila po přidání Y k médiu obsahujícímu I\* a naopak zvýšila po přidání k médiu obsahujícímu H. Později byly transfekovány buňky 293S v médiu N + I\*, T, P\*, Y a byla sledována exprese proteinů GFP a SEAP (viz kapitola 4.4 293S: Stanovení SEAP a GFP).

Bylo optimalizováno složení kultivačního média. Výsledky ukazují, že médium N je pro kultivaci nejlepší ve směsi s Ex 1:1 s přidáním I\*, T, P\*, C a Y.

## 4.2 Optimalizace poměru DNA:PEI

Transfekční poměr DNA:PEI (w/w) byl optimalizován na buňkách 293S (Obr. 10). Jednalo se o zásobní roztok IPEI zředěný v PBS. Standardní koncentrace pro 293S je 1 mg/ml, ale pro transfekci v menších objemech je lepší použít koncentrovanější IPEI, koncentraci 8 mg/ml. Buňky 293T byly transfekovány 1x koncentrovaným (1 mg/ml) IPEI zředěný v PBS obdobně se stejným výsledkem. U obou kultur se tedy liší pouze zásobní koncentrace IPEI, nikoli poměr DNA:PEI (viz kapitola 3.8.1 Příprava transfekčního roztoku PBS, plazmidové DNA a IPEI).



**Obr. 10: Porovnání exprese SEAP 4 dny po transfekci buněk 293S v závislosti na poměru DNA:PEI (w/w).** Kultivační médium bylo směsí Ex/N + I\*, T, P, transfekční médium Ex a produkční médium Ex. Hodnoty průměrných změn absorbancí při vlnové délce 410 nm jsou opatřeny směrodatnou odchylkou triplikátu měření. Buňky byly transfekovány vysokohustotní transfekcí (viz kapitola 4.3.2 a 4.3.3) v 12ti jamkové destičce a konečný produkční objem byl 1 ml. K transfekci byl použit zásobní roztok 8 mg/ml IPEI v PBS.

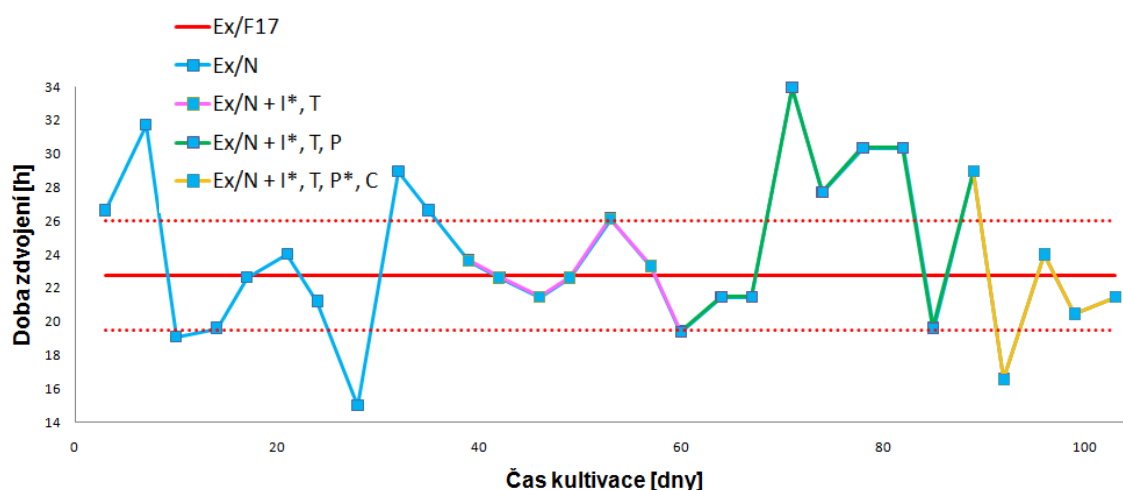
Optimalizace ukázala, že vhodný poměr DNA:PEI (w/w) pro buněčnou linii 293S se pohybuje mezi 1:2 a 1:3. Pro buněčnou linii 293T byly získané výsledky obdobné. Pro další práci byl zvolen poměr DNA:PEI 1:3, přestože při této optimalizaci byl výtěžek exprese SEAP vyšší u poměru DNA:PEI 1:2. Důvodem byly další série optimalizačních pokusů transfekce 293S za použití stejných médií provedené Bc. Janem Bláhou, které nejsou součástí této práce a ve kterých byla průměrná exprese SEAP vyšší při transfekčním poměru DNA:PEI 1:3.

### 4.3 293S: Růst a viabilita

Buňky 293S byly dlouhodobě kultivovány v různých směsných médiích (Tab. 11 a Obr. 11, str. 45). Všechny optimalizace byly prováděny s linií 293S a jsou popsány v dřívějších kapitolách. Buňky 293S byly také pěstovány bez přídavku Ex pouze v médiu N s přídavkem I (později I\*) či H, T, P a Y (Obr. 9, str. 42). Jejich průměrné doby zdvojení však byly vždy mnohem vyšší než u buněk pěstovaných ve směsích Ex/N (průměrně přibližně 1,5 krát).

**Tab. 11. Porovnání a statistické zpracování průměrné doby zdvojení buněk 293S pěstovaných v různých směsných médiích.** Buňky byly pěstovány standardně ve 250ml čtverhranných lahvích, kdy se k médiu Ex/N přidávaly postupně další látky. Průměrná viabilita 293S v médiu obsahujícím P byla 98 % a v ostatních médiích se blížila 100 %. Počtem subkultivací se rozumí počet získaných dat z počítání buněk pomocí hemocytometru a jejich následné zředění.

Kultivační médium	Průměr doby zdvojení [h]	Směrodatná odchylka doby zdvojení [h]	Relativní směrodatná odchylka doby zdvojení [%]	Interval spolehlivosti [h]	Počet subkultivací
Ex/F17	22,75	3,27	14,4	± 1,71	14
Ex/N	23,55	4,8	20,4	± 2,98	10
Ex/N + I*, T	22,74	1,9	8,4	± 1,41	7
Ex/N + I*, T, P	26,73	4,88	18,3	± 3,38	8
Ex/N + I*, T, P*, C	20,47	2,68	13,1	± 2,63	4



**Obr. 11: Časový vývoj doby zdvojení buněk 293S závislosti na složení kultivačního média.** Červená plná čára znázorňuje průměrnou dobu zdvojení 293S pěstovaných v Ex/F17, červená tečkovaná čára znázorňuje směrodatné odchylky této doby zdvojení. Tento obrázek je grafickým znázorněním podkladů pro výpočet průměrných hodnot uvedených v Tab. 11.

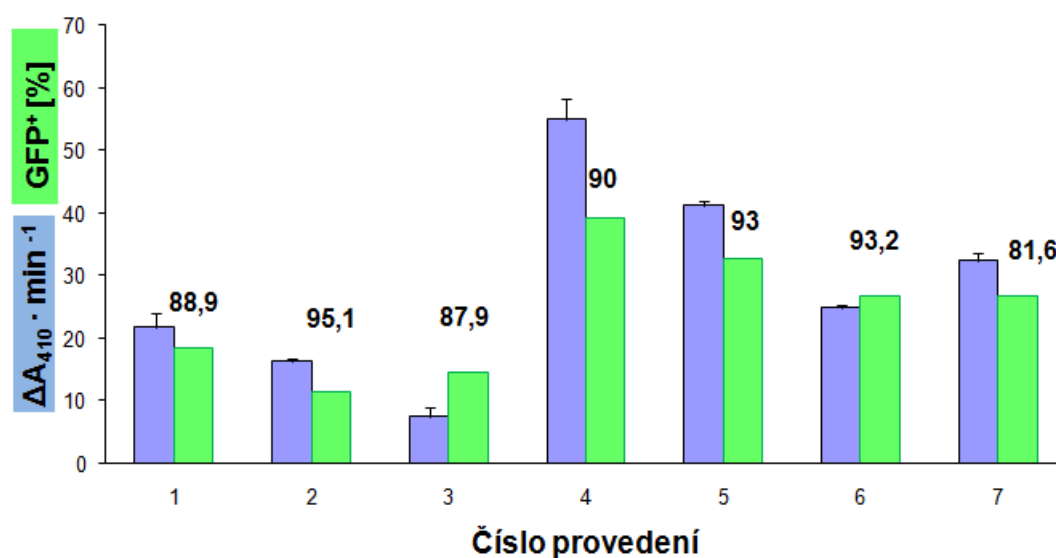
Z hodnot průměrné doby zdvojení (Tab. 11) i její časové závislosti (Obr. 11) lze vypočítat, že po přidavku prvotní směsi stopových prvků do média došlo k znatelnému zpomalení růstu buněk (na Obr. 11 zelená oblast), který se však opět vrátil do kontrolního rozmezí při použití optimalizované směsi stopových prvků a vitamínu C (na Obr. 11 žlutá oblast).

#### 4.4 293S: Stanovení SEAP a GFP

Expres SEAP a GFP (snímek z FACS viz Obr. 13, str. 47) byla sledována u 293S s různými kultivačními, transfekčními i produkčními médii. Nejdříve byla porovnávána exprese SEAP a GFP u buněk transfekovaných v médiu Ex a převedených do produkčního média Ex, N + I, T nebo směsi Ex/N (Tab. 12, Obr. 12). V průběhu této prvotní optimalizace ještě nebyla zavedena upravená koncentrace I\* a k médiím nebyly přidávány P a C. Transfekce byla provedena poměrem DNA:PEI (w/w) 1:5 za použití optimalizovaného 1x koncentrovaného roztoku IPEI rozpuštěného ve sterilní destilované vodě, což byl doposud používaný standardní postup pro 293S (Ex/F17) kontrolní kulturu.

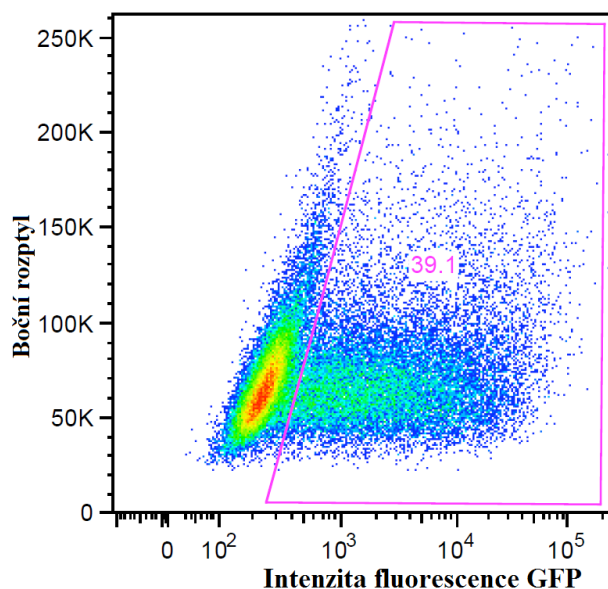
Tab. 12: Legenda k Obr. 12

Číslo provedení	Kultivační médium	Produkční médium
1	Ex/N	Ex
2	Ex/N	Ex/N
3	Ex/N	N + I, T
4	Ex/F17	Ex
5	Ex/N + I, T	Ex
6	Ex/N + I, T	Ex/N
7	Ex/N + I, T	N + I, T



Obr. 12: Stanovení exprese SEAP 4 dny po transfekci a stanovení počtu GFP<sup>+</sup> 293S buněk 5 dní po transfekci. Kultivační, transfekční a produkční médium viz Tab. 12. Hodnoty průměrných změn absorbancí při vlnové délce 410 nm jsou znázorněny modrými sloupci a jsou opatřeny směrodatnou odchylkou triplikátu měření. Zeleně jsou znázorněny GFP<sup>+</sup> buňky v populaci všech živých buněk v %. Čísla nad sloupci vyjadřují viabilitu transfekované kultury v % určenou při FACS analýze. Buňky byly

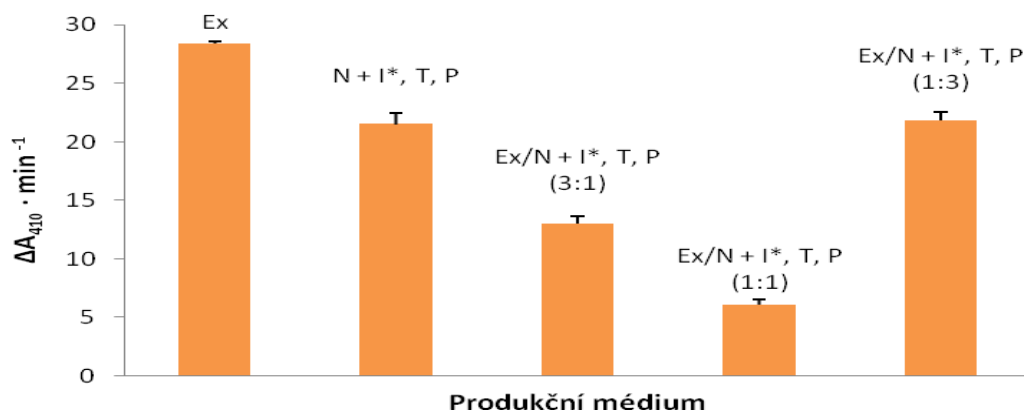
transfekovány vysokohustotní transfekcí (viz kapitola 4.3.2 a 4.3.3) ve 100ml čtverhranných lahvích na konečný produkční objem 20 ml. Poměr DNA:PEI byl 1:5 s použitím 1x koncentrovaného IPEI rozpuštěného v destilované vodě.



**Obr. 13: Snímek z FACS, výběr GFP<sup>+</sup> 293S buněk.** FACS umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buněk během jejich průchodu laserovým paprskem. Úhel bočního rozptylu je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury respektive granularity. GFP<sup>+</sup> buňky absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla avšak již o odlišné vlnové délce. Populace GFP<sup>+</sup> buněk je na obrázku ohraničena růžovým rámem. Výsledkem je 39,1 % GFP<sup>+</sup> buněk ze všech živých (Hoechst negativních) buněk. Tento snímek odpovídá transfekovaným buňkám 293S č. provedení 4 z Obr. 12, str. 46.

Expres SEAP a GFP u linie 293S byla nejvyšší u kontrolních buněk pěstovaných v kultivačním médiu Ex/F17 za použití transfekčního a produkčního média Ex, avšak pouze asi o čtvrtinu nižší míru exprese vykazovaly buňky pěstované v médiu Ex/N + I, T a transfekované stejným způsobem (Obr. 12, str. 46). Buňky pěstované v médiu Ex/N + I, T, transfekované v Ex s použitím produkčního média Ex/N nebo N + I, T vykazovaly v porovnání s kontrolními buňkami také nižší míru exprese, ale tento postup by mohl být dále použitelný.

Dále byla porovnávána exprese SEAP buněk 293S kultivovaných v Ex/N + I\*, T, P v závislosti na složení produkčního média (Obr. 14, str. 48).



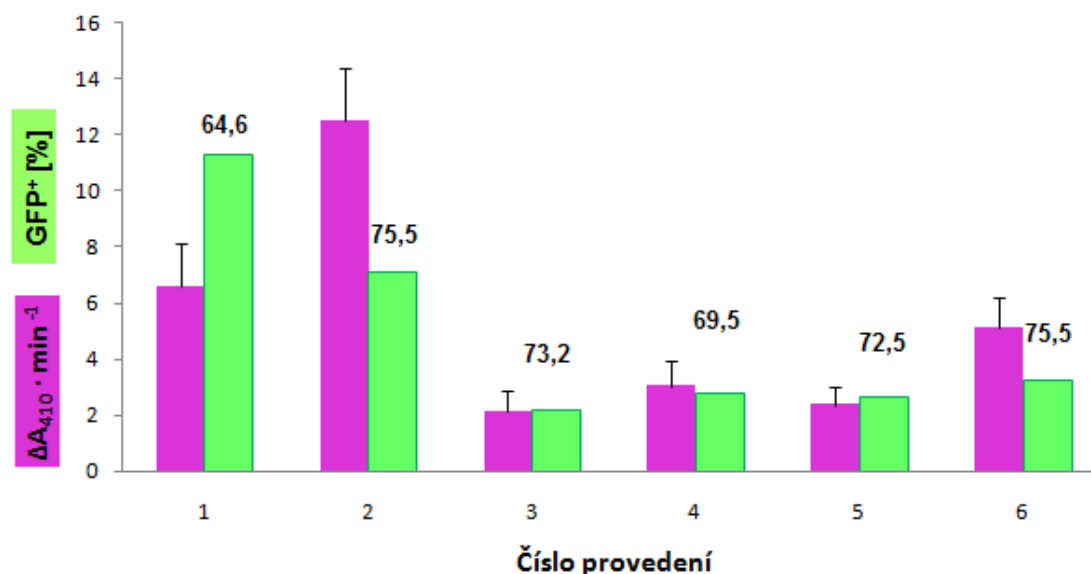
**Obr. 14: Porovnání exprese SEAP 4 dny po transfekci buněk 293S v závislosti na složení produkčního média.** Kultivační médium bylo směsí Ex/N + I\*, T, P, transfekční médium Ex. Produkční médium je vyznačeno nad sloupci vyjadřujícími expresi SEAP. Hodnoty průměrných změn absorbancí při vlnové délce 410 nm jsou opatřeny směrodatnou odchylkou triplikátu měření. Buňky byly transfekovány vysokohustotní transfekcí (viz kapitola 3.8.2 a 3.8.3) v 12ti jamkové destičce a konečný produkční objem byl 1 ml. Byl použit optimalizovaný poměr DNA:PEI 1:3 s 8x koncentrovaným IPEI rozpuštěným v PBS.

Nakonec byla provedena transfekce 293S kultivovaných ve směsi Ex/N nebo v médiu N obsahujícím I\* nebo H a další látky a transfekovaných v analogickém nemíseném médiu N (Tab. 13, str. 49). Produkční médium sestávalo z média Ex nebo stejného média N, které se použilo také jako transfekční. Míru exprese SEAP a GFP znázorňuje Obr. 15, str. 49.



Tab. 13: Legenda k Obr. 15.

Číslo provedení	Kultivační médium	Transfekční médium	Produkční médium
1	Ex/N + I*, T, P*, C	N + I*, T, P*, C	N + I*, T, P*, C
2	Ex/N + I*, T, P*, C	N + I*, T, P*, C	Ex
3	N + I*, T, P*, C, Y	N + I*, T, P*, C, Y	N + I*, T, P*, C, Y
4	N + I*, T, P*, C, Y	N + I*, T, P*, C, Y	Ex
5	Ex/N + H, T, P*, C	N + H, T, P*, C	N + H, T, P*, C
6	Ex/N + H, T, P*, C	N + H, T, P*, C	Ex



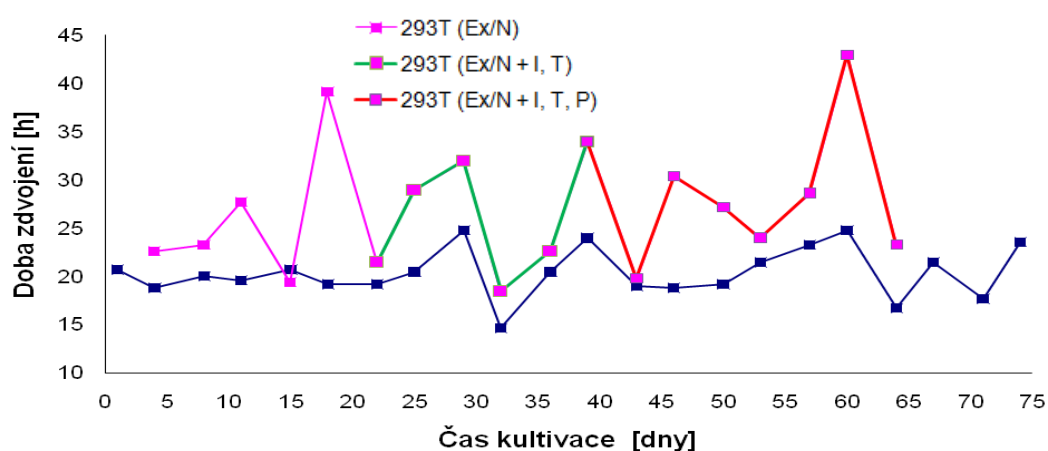
**Obr. 15: Stanovení exprese SEAP 4 dny po transfekci a stanovení počtu GFP<sup>+</sup> 293S buněk 3 dny po transfekci.** Kultivační, transfekční a produkční médium viz Tab. 13. Hodnoty průměrných změn absorbance při vlnové délce 410 nm jsou znázorněny fialovými sloupci a jsou opatřeny směrodatnou odchylkou triplikátu měření. Zeleně jsou znázorněny GFP<sup>+</sup> buňky v populaci všech živých buněk v %. Čísla nad sloupci vyjadřují viabilitu v % určenou při FACS analýze. Buňky byly transfekovány vysokohustotní transfekcí (viz kapitola 3.8.2 a 3.8.3) v 12ti jamkové destičce a konečný produkční objem byl 1 ml. Byl použit optimalizovaný poměr DNA:PEI 1:3 s 8x koncentrovaným IPEI rozpuštěným v PBS.

#### 4.5 293T: Růst a viabilita

Růst buněk 293T nebyl sledován v čistém médiu N (případně s přidanými látkami), ale pouze ve směsi s Ex 1:1, ke kterému byly postupně přidávány I, T a nakonec také P (Tab. 14, str. 50; Obr. 16, str. 50). Rychlost růstu této kultury (doba zdvojení) byla porovnávána s rychlostí růstu kultury 293T pěstované ve směsi komerčních médií Ex/F17.

**Tab. 14: Průměrné doby zdvojení a jejich statistické zpracování buněk 293T pěstovaných v různých médiích.** Buňky byly pěstovány standardně ve 250ml čtverhranných lahvích. Viabilita buněk byla srovnatelná a byla vždy vyšší než 98 %. Počtem subkulturací se rozumí počet získaných dat z počítání buněk pomocí hemocytometru a jejich následné zředění.

Kultivační médium	Průměr doby zdvojení [h]	Směrodatná odchylka doby zdvojení [h]	Relativní směrodatná odchylka doby zdvojení [%]	Interval spolehlivosti [h]	Počet subkulturací
Ex/F17	20,39	2,51	12,3	± 0,98	25
Ex/N	26,44	6,9	26,1	± 6,05	5
Ex/N + I, T	26,24	5,71	21,8	± 5,00	5
Ex/N + I, T, P	28,02	6,91	24,7	± 5,12	7



**Obr. 16: Časový vývoj doby zdvojení buněk 293T v závislosti na složení kultivačního média.** Buňky 293T byly pěstovány ve standardní směsi komerčních médií Ex/F17 (modrá čára) nebo ve připravené směsi Ex/N (růžová čára), ke které se postupně přidával I a T (zelená čára), následně i P (červená čára). Tento obrázek je grafickým znázorněním podkladů pro výpočet průměrných hodnot uvedených v Tab. 14.

Z výsledků je patrné (Tab. 14), že doba zdvojení 293T pěstovaných ve směsi Ex/F17 je výrazně nižší než doba zdvojení 293T pěstovaných ve směsi Ex/N, ať už s přidavkem nebo bez přidavku I, T a P. Po přidání směsi stopových prvků P byl zaznamenán dokonce ještě pomalejší růst této kultury. V době provedení experimentu se k médiu N ještě nepřidávala upravená směs P\*. Po porovnání transfekovatelnosti obou kultur 293T (viz níže kapitola 4.6) se buňky přestaly ve směsi s médiem N pěstovat.

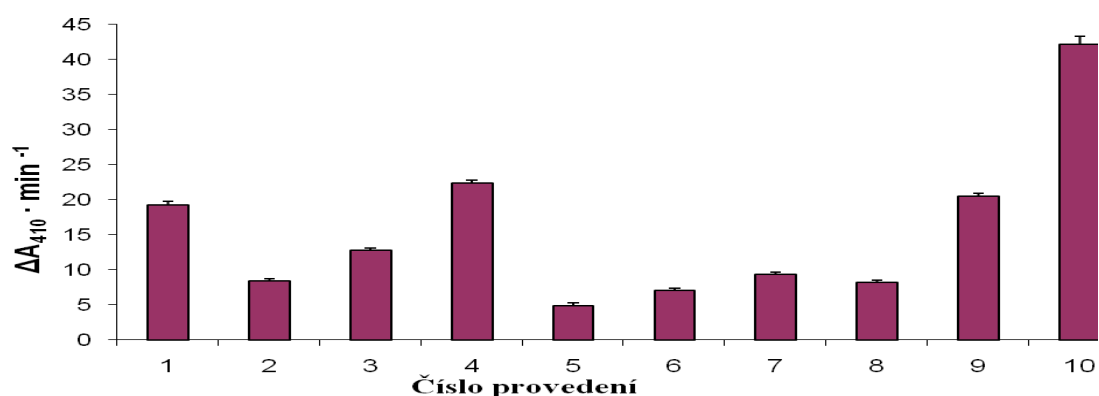
## 4.6 293T: Stanovení SEAP

Po transfekci 293T bylo nutno stanovit reportérové proteiny SEAP a GFP a porovnat tak schopnost buněk vyrábět r-proteiny závislou na různé kombinaci kultivačních, transfekčních i

produkčních médií. Při těchto optimalizacích se však opakovaně nezdařilo kvůli velmi nízké viabilitě buněk 5 dní po transfekci (prakticky všechny buňky byly Hoechst pozitivní) stanovit na FACS procento GFP<sup>+</sup> buněk. Proto tyto výsledky vychází pouze ze stanovení exprese SEAP (Tab. 15, Obr. 17).

**Tab. 15: Legenda k Obr. 17.**

Číslo provedení	Kultivační médium	Transfekční médium	Poměr DNA:PEI	Produkční médium
1	Ex/F17	F17	1/3	Ex
2	Ex/F17	F17	1/2	Ex
3	Ex/N + I, T, P	N + I, T, P	1/3	Ex
4	Ex/N + I, T, P	N + I, T, P	1/2	Ex
5	Ex/N + I, T, P	N + I, T, P	1/3	N + I, T, P
6	Ex/N + I, T, P	N + I, T, P	1/2	N + I, T, P
7	Ex/N + I, T, P	F17	1/3	N + I, T, P
8	Ex/N + I, T, P	F17	1/2	N + I, T, P
9	Ex/F17	N + I, T, P	1/3	Ex
10	Ex/F17	N + I, T, P	1/2	Ex



**Obr. 17: Stanovení exprese SEAP 4 dny po transfekci 293T buněk.** Kultivační, transfekční a produkční médium viz Tab. 15. Hodnoty průměrných změn absorbancí při vlnové délce 410 nm jsou znázorněny fialovými sloupci a jsou opatřeny směrodatnou odchylkou triplikátu měření. Buňky byly transfekovány v 12ti jamkové destičce a konečný produkční objem byl 1 ml. Byl použit poměr DNA:PEI 1:3 a 1:2 pro ověření správnosti dřívější optimalizace s 1x koncentrovaným IPEI rozpuštěným v PBS.

## 5 DISKUZE

Hlavním cílem této práce byla optimalizace složení kultivačního média DMEM/F12 pro suspenzní bezsérovou kultivaci linií HEK293S a HEK293T. Účelem bylo především snížit ekonomické nároky kultivace a exprese r-proteinů v těchto buněčných liniích. Médium DMEM/F12 bylo doplněno o řadu nutrientů a bylo pracovně označeno jako „Nové médium“ (N). Cílem bylo nejen vytvořit vhodné kultivační, ale také tranfekční a produkční médium, které by se buňkám dodávalo samotné anebo alespoň ve směsi s dalším komerčním médiem. Jelikož reportérové proteiny SEAP a GFP jsou stanovitelné již v malých absolutních výtěžcích, nabízely se jako ideální proteiny k optimalizaci rekombinantní exprese a tím i k optimalizaci složení média. Dalším ukazatelem kvality média byla viabilita a rychlost růstu buněk při jejich kultivaci v daném médiu. K optimalizaci byly vybrány buněčné linie 293S a 293T. Pozitivní výsledky použití média N by mohly být budoucím podnětem ke kultivaci a transfekci dalších typů HEK293 buněčných linií (například 293-6E nebo 293F) v tomto médiu N.

Vhodným měřítkem pro porovnání rychlosti růstu buněčných kultur byla zvolena doba zdvojení, která vycházela z dat získaných dlouhodobou kultivací. Doba zdvojení byla počítána pomocí vlastního vzorce vytvořeného pomocí tabulkového kalkulátoru MS Excel 2007. Doba zdvojení kultur je tím přesnější, čím déle byla kultura sledována a subkultivována. Z časových důvodů však v některých případech stačilo sledovat kulturu po dobu alespoň 10 dní, kdy byly již výsledky pro porovnání růstu jasné (například při optimalizaci koncentrace insulinu) či byla rychlost růstu výrazně pomalejší než v ostatních případech a byla zde možnost doplnění média o další nutrienty (například postupné obohacování kultivačního média Ex/N o další látky).

Přesnost počítání buněk na hemocytometru však mohla být zatížena lidským faktorem, jak při odebrání vzorku kultury, při ředění trypanovou modří, tak při samotném počítání. Následné ředění (subkultivace) buněk tak mohlo být zatíženo chybou počítání a tím i špatně vypočteným objemem kultury, který je nutno ředit pro dosažení požadované buněčné hustoty. Chyba při subkultivaci se mohla prohloubit ulpíváním buněk na stěnách lahve či špatným promícháním kultury před odebráním příslušného objemu. Uvedené hodnoty doby zdvojení v této práci byly proto statisticky zpracovány.

Dalším ukazatelem vlastností média byla viabilita kultury. Celkově byla viabilita buněk při kultivaci velice dobrá, průměrně byla vyšší než 97 %. Výjimkou byly buňky 293S v N + I\*, T, P, které nejsou uvedeny ve výsledcích této práce. Jejich viabilita se neustále snižovala, zlepšení nastalo až po odebrání P a přidání P\* a C k médiu, ale i tak činila maximálně pouhých 86 % oproti ostatním kulturám. Viabilita transfekovaných kultur byla měřena pomocí FACS a je uvedena na Obr. 12, str. 46 a Obr. 15, str. 51, kapitola 4.4.

Hodnoty exprese SEAP byly zprůměrovány a opatřeny směrodatnou odchylkou triplikátu měření. Výsledky by byly přesnější, pokud by i samotná optimalizace probíhala v triplikátech vzorků, toho však z praktického hlediska nebylo možné dosáhnout. Bylo by tedy vhodné v budoucnu některé klíčové výsledky potvrdit nezávisle opakovanými experimenty. To se týká i stanovení míry exprese GFP, která vždy vycházela pouze z jedenkrát měřeného jediného vzorku. Výsledky tedy mohou být odlehle od skutečné hodnoty a měly by se v budoucnu ověřit kontrolní transfekcí vybraných kultur.

Médium N bylo složeno z varianty D9785 směsi média DMEM/F12 s přidavkem látek doporučených výrobcem (Tab. 2, str. 19) a látek uvedených v odborné literatuře. Aby bylo možno měnit a optimalizovat složení média, bylo primárně připraveno 2x koncentrované sterilní základní D9785 médium, do nějž byly dle potřeby přidávány testované látky v různé koncentraci, a následně byl jeho objem příslušně doplněn sterilní vodou.

Koncentrace insulínu (I) v médiu N byla optimalizována s pomocí linie 293S, kdy byl porovnáván růst kultur pěstovaných v samotném médiu N + T, Y (tedy bez přidavku média Ex, které samo I pravděpodobně obsahuje) s různou koncentrací I. Pro tyto kultury nebyla počítána doba zdvojení z důvodu omezeného množství dat. V tomto případě však stačilo porovnat buněčné hustoty kultur vždy několik dní po subkultivaci buněk na stejnou buněčnou hustotu, porovnávala se tedy relativní rychlost růstu (Obr. 8, str. 41, kapitola 4.1). Rychlost růstu buněk v médiu N + T, Y obsahující insulín o koncentraci od 1 mg/l po 5 mg/l byla srovnatelná, z ekonomických důvodů však byla zvolena koncentrace nejnižší, tedy 1 mg/l. Po porovnání průměrů doby zdvojení 293S pěstovaných ve směsi Ex/N + T s koncentrací I 5 mg/l a 1 mg/l se tyto prakticky neliší. Buňky 293S, které byly kultivovány v médiu obsahujícím nejvyšší koncentraci I, byly pěstovány dvakrát déle a jejich průměrná doba zdvojení je tím přesnější. Je zde tedy možnost, že kdyby byly buňky 293S pěstované v médiu Ex/N + I\*, T kultivovány po stejně dlouhou dobu, mohla by být jejich průměrná doba odlišná. Výsledky však naznačují, že by se patrně jednalo pouze o mírnou korekci, řádově pouze o desítky minut, což je z hlediska kultivace zanedbatelné. Exprese SEAP a GFP u těchto kultur nebyla z časových důvodů porovnávána v jedné sérii optimalizačních pokusů, ale z celkových výsledků vyplývá, že by se jednalo o jen nepatrné až zanedbatelné rozdíly v expresi.

Použití hydrokortizonu (H) jako dalšího komponentu média bylo optimalizováno pomocí buněk 293S. Růst i exprese kultur pěstovaných v médiu s přidavkem I\* je signifikantně lepší než kultur pěstovaných s přidavkem H (Obr. 9, str. 42, kapitola 4.1; Obr. 15, str. 49, kapitola 4.4). Kombinace obou látek v médiu nebyla dosud nikdy publikována. Tyto dva hormony působí v organismu prakticky proti sobě, je tedy otázkou, jak by jejich kombinace ovlivnila růst a expresi proteinů v buněčné kultuře. Plánem do budoucna je kombinaci I\* a H v médiu vyzkoušet.

Původní směs stopových prvků (P) byla po zaznamenání výrazně pomalejšího růstu 293S optimalizována (P\*). K původní směsi byly přidány Cd<sup>II</sup> ionty a zvýšeny koncentrace V<sup>V</sup> a Co<sup>II</sup> iontů. Zároveň s touto směsí P\* byl k médiu přidán i vitamín C (C). Výsledkem byla výrazně kratší doba zdvojení kultury. Expres SEAP a GFP těchto kultur pěstovaných v médiu s P a médiu s P\* a C nebyla z časových důvodů porovnávána v jedné sérii optimalizačních pokusů. Je zde tedy možnost, že by exprese SEAP a GFP mohla ovlivnit celý optimalizační postup.

Co se týče přidavku tryptonu N1 (Y) k médiu N, plánem do budoucna je přidávat Y i ke směsi médií Ex/N + I\*, T, P\*, C a porovnat tak růst a expresi proteinů této kultury a kultury bez Y. Tento komponent by poté mohl být trvalou součástí média N.

Součástí této práce byla také optimalizace poměru DNA:PEI (w/w) nově vytvořeného 8x a 1x koncentrovaného zásobního roztoku IPEI rozpuštěného v PBS. Rozpuštění IPEI v PBS může ovlivnit průběh transfekce menším poškozením buněk vlivem osmotického šoku, na rozdíl od rozpouštění IPEI ve vodě, což je jinak obvyklý a v literatuře popsán způsob [48]. Z Obr. 10, str. 44, kapitola 4.2 zahrnujícího optimalizaci 8x koncentrovaného IPEI a jeho poměru k DNA při transfekci 293S je patrné, že nejlepší poměr DNA:PEI (w/w) je 1:2 až 1:3. I když exprese SEAP při poměru DNA:PEI 1:2 byla v tomto experimentu vyšší, byl pro další práci zvolen poměr DNA:PEI 1:3, a to na základě porovnání s dalšími optimalizačními pokusy prováděnými ve stejné době Bc. Janem Bláhou nezveřejněnými v této práci. Optimalizace 1x koncentrovaného zásobního roztoku IPEI pro transfekci 293T vycházela nejlépe také v rozmezí poměru DNA:PEI 1:2 – 1:3. U této linie však byl poměr porovnán také při dalších optimalizačních pokusech (Obr. 17, str. 51, kapitola 4.6). Zdá se, že je tento poměr závislý na použití transfekčního média. Při použití transfekčního média F17 je lepší poměr DNA:PEI 1:3, při použití média N + I, T, P poměr DNA:PEI 1:2.

Co se týče složení kultivačního média pro linii 293S, jednoznačně nejrychlejší růst byl zaznamenán v médiu Ex/N + I\*, T, P\*, C. Takto pěstované buňky mají dokonce kratší dobu zdvojení než buňky pěstované v komerčních médiích Ex/F17. Je možné, že přidáním Y do připravené směsi médií by se růst ještě urychlil. Buňky byly pěstovány v Ex/N + I\*, T, P\*, C médiu pouze 2 týdny, proto by se jejich průměrná doba zdvojení mohla při dlouhodobější kultivaci ještě změnit, avšak jednalo by se pravděpodobně o pouhé desítky minut. Tyto buňky byly na médium adaptované, do média se pouze přidal C a některé ionty stopových prvků (P\*), které byly pro růst nejspíše klíčové.

Expres SEAP a GFP u linie 293S byla nejvyšší u kontrolních buněk pěstovaných v kultivačním médiu Ex/F17 za použití transfekčního a produkčního média Ex (Obr. 12, str. 46, kapitola 4.4), tedy za standardních podmínek, které byly pro tuto linii v pracovní skupině školitele již dříve optimalizovány. Avšak pouze asi o čtvrtinu nižší míru exprese vykazovaly

buňky pěstované v médiu Ex/N + I, T a transfekované stejným způsobem (Obr. 12, str. 46, kapitola 4.4). Z ekonomického hlediska je tento výsledek velice pozitivní, jelikož by bylo možné buňky pěstovat při nižších nákladech ve větších objemech (cena kompletního média N je asi pětina ceny média F17 po akademické slevě, resp. asi desetina katalogové ceny média F17). Z porovnání míry exprese buněk 293S pěstovaných v médiu N s přidavkem P a I\* v rozdílných produkčních médiích (Obr. 14, str. 48, kapitola 4.4) vychází oproti Ex poměrně dobře také médium N + I\*, T, P a směsné médium Ex/N + I\*, T, P v objemovém poměru 1:3. To naznačuje, že po další optimalizaci by bylo médium N pravděpodobně možno použít jako levné produkční médium. Expresse by mohla být ještě vyšší za použití P\*, Y a C, avšak z časových důvodů již nebyl tento experiment v rámci této bakalářské práce proveden, jistě by však bylo vhodné tímto naznačeným směrem pokračovat v budoucnosti. Takovýto způsob kultivace a transfekce (i za cenu mírně nižšího výtěžku r-proteinů vztaženou na jednotku objemu použitých médií, neboť komerčním médiím se lze přeci jen těžko vyrovnat) by pak mohl vést k produkci ve výrazně větším objemu média než doposud, a tedy výrazně zvýšit výtěžek r-proteinů za srovnatelné finanční náklady.

Konečná verze média N + I\*, T, P\*, C byla nakonec použita i jako transfekční médium (Obr. 15, str. 49, kapitola 4.4). Celková exprese reportérových proteinů však byla nízká oproti dřívějším pokusům. Tyto výsledky ani nelze porovnat s dřívějšími pokusy, jelikož kontrolní transfekce (293S pěstované v Ex/F17, transfekce a produkce v Ex) v tomto pokusu nedosáhla ani minimální hodnotu exprese, proto nebyla ani do srovnání na Obr. 15 zahrnuta. Výsledky tak mohou být naprosto irelevantní. Na tomto Obr. 15 však lze sledovat alespoň závislost použitého kultivačního a produkčního média. Nejvyšší exprese GFP byla stanovena u buněk 293S z kultivačního média Ex/N + I\*, T, P\*, C (tedy buněk s nejrychlejším růstem), transfekovaných a produkujících v médiu N + I\*, T, P\*, C. Naopak nejvyšší exprese SEAP byla sledována u takovýchto buněk produkujících v médiu Ex. Tyto rozdíly mohou souviset s rozdílnou viabilitou buněk: zatímco v médiu Ex se během produkce dařilo buňkám lépe (vyšší produkce SEAP, vyšší viabilita), buňky se zároveň více dělily a tím došlo ke snížení velikosti populace GFP<sup>+</sup> buněk. Oproti tomu v médiu N + I\*, T, P\*, C zůstala díky omezenému buněčnému dělení zachována transfekovaná GFP<sup>+</sup> populace, ale díky chybějícím živinám v médiu byl celkový výtěžek produkce SEAP nižší. Celkově však byla úroveň exprese GFP i SEAP v tomto experimentu výrazně nižší než obvykle, což mohlo být způsobeno chybou měření a malým počtem dat (zejména u GFP, kdy se jednalo pouze o jeden pokus), ale mnohem pravděpodobněji se jednalo o chybu při samotné transfekci buněk. Tuto optimalizaci je nutno zopakovat a porovnat s ostatními dosavadními výsledky. I tak však výsledky kultivace a transfekce 293S prozatím naznačují, že médium N + I\*, T, P\*, Y, C v kombinaci s Ex by se v blízké budoucnosti

mohlo stát dobrým řešením pro vyšší výtěžek r-proteinů a snížení finančních nákladů spojených s používáním tohoto expresního systému.

Buňky 293T byly pěstovány standardně ve směsi médií Ex/F17 nebo Ex/N s postupným přidáváním I, T a následně P (Obr. 16, str. 50, kapitola 4.5). Protože linie 293S kultivovaná v samotném médiu N (byť i s přidavkem všech dalších látek) vykazovala značně pomalý růst, předpokládali jsme, že ani u buněk 293T by výsledek v samotném médiu N nebyl lepší, a proto jsme tuto variantu ani nezkoušeli. Avšak buňky 293T vykazovaly výrazně pomalejší růst i při kultivaci ve směsi médií Ex/N. Graf na Obr. 16, str. 50, kapitola 4.5 je znázorněním časové závislosti doby zdvojení na délce kultivace a je dobrým ukazatelem, že v průběhu ředění buněk nedocházelo k systematickým chybám. Pomalejší růst 293T v médiu Ex/N bez i po přidavku dalších látek byl důvodem upuštění od optimalizace kultivace 293T ve směsi s médiem Ex. Je však otázkou, zda by se růst nezrychlil při použití výsledné pro 2983S linii optimalizované směsi Ex/N + I\*, T, P\*, Y, C. Toto bude předmětem dalších experimentů.

Expresse GFP po 5 dnech od transfekce nebyla opakovaně stanovena z důvodu prakticky nulové viability 293T při FACS analýze. Důvodem mohla být příliš dlouhá doba po transfekci, kontaminace buněk či technické problémy při FACS analýze. Z časových důvodů však nebylo možné změřit expresi GFP v kratším intervalu po transfekci. Expresse SEAP transfekovaných 293T (Obr. 17, str. 51, kapitola 4.6) byla nejvyšší u standardně kultivovaných 293T v Ex/F17 s použitím N + I, T, P jako transfekčního média a Ex jako produkčního média. Expresse byla dokonce vyšší než u stejných buněk s použitím standardního transfekčního média F17 a produkčního média Ex. To naznačuje, že o co je samotné médium N horší pro dlouhodobou kultivaci buněk, o to je ve srovnání s komerčními komplexními médii lepší pro vlastní transfekci buněk. Je to patrné tím, že komerční média typu Ex, ale v menší míře i F17, obsahují látky, které interferují s DNA:PEI komplexy a snižují účinnost transfekce - pro její zachování je tak potřeba používat větší množství transfekčního činidla. Je to patrné i z výsledků na Obr. 17, str. 51, kapitola 4.6, kde při transfekci v médiu F17 vždy vychází lépe poměr DNA:PEI 1:3, zatímco pro transfekce v médiu N vychází lépe poměr s nižším přidavkem PEI, tedy 1:2. Uspokojivé a zároveň i vyšší výsledky průměrné exprese než u standardní transfekce přinesly i buňky kultivované v médiu Ex/N + I, T, P (a to i přes jejich pomalejší růst, viz výše), transfekované v N + I, T, P a produkující v Ex. Opět je otázkou, zda by nebyla transfekce ještě účinnější, kdyby médium N obsahovalo I\*, T, P\*, Y, C.



## 6 ZÁVĚR

- Bylo vytvořeno médium o základu DMEM/F12 (složení viz Tab. 1, str. 18, Tab. 2, str. 19), které obsahovalo látky uvedené v Tab. 16 rozpuštěné ve sterilní deionizované vodě.

**Tab. 16: Shrnutí komponent přidávaných do média.**

Látka	Celková koncentrace v médiu
L-Leucin	59 mg/l
L-Lysin · H <sub>2</sub> O	82 mg/l
L-Methionin	17 mg/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	61 mg/l
D-Glukóza	6 g/l
L-Glutamin	600 mg/l
Pluronic F68	10 mg/l
Pyrohroznán sodný	110 mg/l
NEA	viz. Tab 7, str. 33
Selenit	5 µg/l
Ethanolamin	2 mg/l
Lipidový koncentrát	0,10 ml/l
NaHCO <sub>3</sub>	1,2 g/l
<b>Optimalizované látky</b>	
Směs stopových prvků (P*)	viz. Tab 6, str. 32
Insulin (I*)	1 mg/l
Transferin (T)	5 mg/l
Trypton N1 (Y)	5 g/l
Kyselina askorbová (C)	3,5 mg/l

- Bylo vybráno vhodné kultivační médium pro linie 293S a 293T.

**Tab. 17: Shrnutí vhodných kultivačních médií pro 293S a 293T a doba zdvojení těchto buněk.**

Buněčná linie	Kultivační médium	Doba zdvojení
293S	Ex/F17	22,75 ± 1,71 hodin (s <sub>rel</sub> = 14,4 %)
293S	Ex/N + I*, T, P*, C	20,47 ± 2,68 hodin (s <sub>rel</sub> = 13,1 %)
293T	Ex/F17	20,39 ± 5,12 hodin (s <sub>rel</sub> = 24,7 %)

- Byl optimalizován poměr DNA:PEI (w/w):
  - 293S – 8x koncentrovaný IPEI rozpuštěný v PBS, poměr DNA:PEI 1:3
  - 293T – 1x koncentrovaný IPEI rozpuštěný v PBS, poměr DNA: PEI 1:2 při použití transfekčního média N + I, T, P, 1:3 při použití transfekčního média F17

- Byla optimalizována transfekční a produkční média pro linie 293S a 293T v závislosti na expresi SEAP a GFP.

**Tab. 18: Shrnutí nejvyšší exprese GFP a SEAP pro linie 293S a 293T.** Míra exprese je seřazena sestupně.

Buněčná linie	Kultivační médium	Transfekční médium	Produkční médium	Poznámka
293S	Ex/F17	Ex	Ex	Standardní transfekce
293S	Ex/N + I*, T, P	Ex	N + I*, T, P	Hodnoty exprese by mohly být vyšší s využitím kompletního média N
293S	Ex/N + I*, T, P*, C	N + I*, T, P*, C	N + I*, T, P*, C	Nutno potvrdit opakováním experimentu
293S	Ex/N + I*, T, P*, C	N + I*, T, P*, C	Ex	Nutno potvrdit opakováním experimentu
293T	Ex/F17	N + I, T, P	Ex	Hodnoty exprese by mohly být vyšší s využitím kompletního média N
293T	Ex/N + I, T, P	N + I, T, P	Ex	Hodnoty exprese by mohly být vyšší s využitím kompletního média N
293T	Ex/F17	F17	Ex	Standardní transfekce

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VEJRAŽKA, M.: *Buněčné kultury* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2007 [cit. 2012-02-26]. Dostupné z WWW: <<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verzeprednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>>
- [2] ZURLO, J., RUDACILLE, D., GOLDBERG, A. M.: *Animals and Alternatives in Testing: History, Science, and Ethics: Timeline of Tissue Culture* [online]. John Hopkins university [rev. 2002-06-21], [cit. 2012-02-26]. Dostupné z WWW: <[http://web.archive.org/web/20060225204205/http://caat.jhsph.edu/pubs/animal\\_alts/appendix\\_c.htm](http://web.archive.org/web/20060225204205/http://caat.jhsph.edu/pubs/animal_alts/appendix_c.htm)>
- [3] KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D.: *Klinická cytogenetika I: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum, 1. vydání, 2006
- [4] BLÁHA, J.: *Optimalizace rekombinantní exprese proteinů v HEK293 buněčné linii, bakalářská práce*. Praha: Katedra biochemie, 2010
- [5] ROSYPAL, S.: *Úvod do molekulární biologie, Díl první*. Brno: Grafex, 1996
- [6] UETZ, P., GIOT, L., CAGNEY, G., MANSFIELD, T. A., JUDSON, R. S., KNIGHT, J. R., LOCKSHON, D., NARAYAN, V., SRINIVASAN, M., POCHART, P., QURESHI-EMILI, A., LI, Y., GODWIN, B., CONOVER, D., KALBFLEISCH, T., VIJAYADAMODAR, G., YANG, M., JOHNSTON, M., FIELDS, S., ROTHBERG, J. M.: *A comprehensive analysis of protein – protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature 405, 623 - 627 s., 2000
- [7] ALTMANN, F., STAUDACHER E., WILSON, B. H., MÄRZ, L.: *Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins*. Glykoconjugate journal 16 (2), 102 - 123 s., 1999
- [8] PUCK, T. T., CIECIURA, S. J., ROBINSON, A.: *Genetics of somatic mammalian cells*. Journal of Experimental Medicine 108, 945 - 959 s., 1958
- [9] WILKE, S., KRAUSZE, J., BUSSOW, K.: *Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting*. Protein Science 19(6), 1264 – 1271 s., 2010
- [10] TALLEY, D., CUTAK, B., RATHBONE, E., AL-KOLLA, T., ALLISON, D., BLASBERG, J., KAO, K., CAPLE, M.: *Synthechol™ synthetic cholesterol for cholesterol dependent cell culture - development of non-animal derived chemically defined NS0 medium* [online]. Sigma-Aldrich Corporation, 2001 [cit. 2012-04-03]. 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)>
- [11] SCHERER, W. F., SYVERTON, J. T., GEY, G. O.: *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant*

- epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix.* Journal of Experimental Medicine 97 (5), 695 – 710 s., 1953
- [12] RAHBARI, R., SHEAHAN, T., MODES, V., COLLIER, P., MACFARLANE, C., BADGE, R. M.: *A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification.* BioTechniques 46 (4), 277 – 284 s., 2009
- [13] CAPES-DAVIS, A., THEODOSOPOULOS, G., ATKIN, I., DREXLER, H. G., KOHARA, A., MACLEOD, R. A. F., MASTERS, J. R., NAMAKURA, Y., REID, Y. A., REDDEL, R. R., FRESHNEY, R. I.: *Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines.* International Journal of Cancer 127, 1 – 8 s., 2010
- [14] GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSEL, W. C., NAIRN, R.: *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.* Journal of General Virology 36, 59 – 74 s., 1977
- [15] GRAHAM, F. L., VAN DER EB, A. J.: *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.* Virology 52, 456 – 467 s., 1973
- [16] SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M., GRAHAM, F. L.: *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells.* FASEB Journal 16, 869 – 885 s., 2002
- [17] FREDJ, S., SAMPSON, K. J., LIU, H., KASS, R. S.: *Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action.* British Journal of Pharmacology 148 (1), 16 – 24 s., 2006
- [18] AMAR, L., DESCLAUX, M., FAUCON-BIGUET, N., MALLET, J., VOGEL, R.: *Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter.* Nucleic Acids Research 34 (5), 2006
- [19] KANNO, T., YAMAMOTO, H., YAGUCHI, T., HI, R., MUKASA, T., FUJIKAWA, H., NAGATA, T., YAMAMOTO S., TANAKA, A., NISHIZAKI, T.: *The linoleic acid derivative DCP-LA selectively activates PKC-epsilon, possibly binding to the phosphatidylserine binding site.* Journal of Lipid Research 47 (6), 1146 – 1156 s., 2006
- [20] LI, T., PAUDEL, H. K.: *Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism.* Biochemistry 45 (10), 3125 – 3133 s., 2006
- [21] REEVES., P. J., THURMOND, R. L., KHORANA, H. G.: *Structure and function in rhodopsin: High level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines.* Biochemistry 93, 11487 – 11492 s., 1996
- [22] REEVES., P. J., CALLEWAERT, N., CONTRERAS, R., KHORANA, H. G.: *Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line.* Biochemistry 99 (21), 13419 - 13424 s., 2002

- [23] TOM, R., BISSON, L., DUROCHER, Y.: *Transient expression in HEK293-EBNA1 cells, Expression systems* (DYSON, M. R., DUROCHER, Y. ed.). Bloxham: Scion Publishing Ltd., 203 – 23 s., 2007
- [24] DAVIS, J. M.: *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford University Press, 2. vydání, 2002
- [25] *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 2nd Edition* [online]. Sigma-Aldrich Corporation, 2001 [cit. 2012-04-05]. Dostupné z WWW: <[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Instructions/1/ecacc\\_handbook.Par.0001.File.tmp/ecacc\\_handbook.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Instructions/1/ecacc_handbook.Par.0001.File.tmp/ecacc_handbook.pdf)>
- [26] CHISTI, Y.: *Animal-cell damage in sparged bioreactors*. TIBTECH 18, 420 – 432 s., 2000
- [27] GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M.: *100-liter transient transfection*. Cytotechnology 38, 15 - 21 s., 2002
- [28] 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*. Biotechnology and Bioengineering 41, 179 – 187 s., 1993
- [29] WURM, F.: *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. Nature Biotechnology 22, 1393 – 1398 s., 2002
- [30] *EX-CELL<sup>®</sup> 293 Serum-Free Medium for HEK 293 Cells* [online]. Sigma-Aldrich Corporation, [cit. 2012-04-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/14571c?lang=en&region=CZ>>
- [31] *FreeStyle<sup>™</sup> F17* [online]. Gibco Invitrogen<sup>™</sup>, [cit. 2012-04-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.invitrogen.com/1/1/11376-freestyle-f17.html>>
- [32] *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* [online]. Sigma-Aldrich Corporation, [cit. 2012-04-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9785?lang=en&region=CZ>>
- [33] BOCIAN, W., SITKOWSKI, J., BEDNAREK, E., TARNOWSKA, A., KAWECKI, R., KOZERSKI, L.: *Structure of human insulin monomer in water/acetonitrile solution*. Journal of Biomolecular NMR 40 (1), 55 – 64 s., 2008
- [34] SHIFEI, P., YONGGANG, L.: *Molecular Characterization, Polymorphism and Association of Porcine IBP4 Gene*. Folia Biologica 58 (1), 30 – 36 s., 2012
- [35] SCHLAEGER, E.-J., CHRISTENSEN, K.: *Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture*. Cytotechnology 30, 71 – 83 s., 1999
- [36] KELLEY, D. S., BECKER, J. E., POTTER, V. R.: *Effect of Insulin, Dexamethasone, and Glucagon on the Amino Acid Transport Ability of Four Rat Hepatoma Cell Lines and Rat Hepatocytes in Culture*. Cancer Research 38, 1978

- [37] SCHUMPP, B., SCHLAEGER, E. J.: *Optimization of culture conditions for high cell density proliferation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells*. Journal of Cell Science 97, 639 – 647 s., 1990
- [38] CRICHTON, R. R., CHARLOTEAUX-WAUTERS, M.: *Iron transport and storage*. European Journal of Biochemistry 164 (3), 485 – 506 s., 1987
- [39] AISEN, P., LEIBMAN, A., ZWEIER, J.: *Stoichiometric and Site Characteristics for Binding of Iron to Human Transferrin*. Journal of Biological Chemistry 253 (6), 1930 – 1937 s., 1978
- [40] *Transferrin Structure* [online]. St. Edward's University, 2005 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Projects04/Transferrin/structure.htm>>
- [41] MACEDO, M. F., DE SOUSA, M.: *Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns*. Inflammation & Allergy Drug Targets 7 (1), 41 – 52 s., 2008
- [42] EBRECHT, M., HEXTALL, J., KIRTLEY, L. G., TAYLOR, A., DYSON, M., WEINMAN, J.: *Perceived Stress and Cortisol Levels Predict Speed of Wound Healing in Healthy Male Adults*. Psychoneuroendocrinology 29(6), 798 - 809 s., 2004
- [43] HYNIE, S.: *Farmakologie, 2. díl*. Praha: Karolinum, 1996
- [44] PHAM, P. L., PERRET, S., DOAN, H. C., CASS, B., ST-LAURENT, G., KAMEN, A., DUROCHER Y.: *Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency*. Biotechnology and Bioengineering 84 (3), 332 – 342 s., 2003
- [45] PHAM, P. L., PERRET, S., CASS, B., CARPENTIER, E., ST-LAURENT, G., BISSON, L., KAMEN, A., DUROCHER, Y.: *Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis*. Biotechnology and Bioengineering 90 (3), 332 – 344 s., 2005
- [46] ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., VAN 'T RIET K.: *Modeling of the Bacterial Growth Curve*. Applied and Environmental Microbiology 56 (6), 1875 – 1881 s., 1990
- [47] BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P.: *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92 (16), 7297 – 7301 s., 1995
- [48] LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A.: *Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 60, 247 – 266 s., 2005
- [49] KONVALINKA, J.: *Biochemie II*. Praha: Katedra biochemie, přednáška na PšF UK, 2010
- [50] BUDISA, N., PAL, P. P., ALEFELDER, S., BIRLE, P., KRYWCUN, T., RUBINI, M., WENGER, W., BAE, J. H., STEINER, T.: *Probing the role of tryptophans in Aequorea*

- victoria green fluorescent proteins with an expanded genetic code*. Journal of Biological Chemistry 385 (2), 191 – 202 s., 2004
- [51] SHIMOMURA, O., CHALFIE, M., TSIEN, R. Y.: *Discovery of green fluorescent protein, GFP: The Nobel Prize in Chemistry 2008* [online]. Stockholm University: World Scientific Publishing Corporation, 2008 [cit. 2012-05-02]. Dostupné z WWW: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/)>
- [52] *Sodium selenite* [online]. Sigma-Aldrich Corporation, [cit. 2012-04-21]. Dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s5261?lang=en&region=CZ>>
- [53] KANO-SUEOKA, T., ERRICK, J. E.: *Effects of phosphoethanolamine and ethanolamine on growth of mammalian carcinoma cells in culture*. Experimental Cell Research 97, 120 - 126 s., 1981
- [54] KOVÁŘ, J.: *Growth-stimulating effect of ferric citrate on hybridoma cells: Characterization and relation to transferrin function*. Hybridoma 7, 255 – 263 s., 1988
- [55] KOVÁŘ, J., FRANĚK, F.: *Growth-stimulating effect of transferrin on a hybridoma cell line: relation to transferrin iron-transporting function*. Experimental Cell Research 182, 358 – 369 s., 1989
- [56] *List of Human Blood Components* [online]. Wikipedia [rev. 2012-03-16], [cit. 2012-04-21]. Dostupné z WWW: <[http://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_human\\_blood\\_components](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_human_blood_components)>
- [57] MCKEEHAN, W. L., MCKEEHAN, K.A.: *Oxocarboxylic acids, pyridine nucleotide-linked oxidoreductases and serum factors in regulation of cell proliferation*. Journal of Cellular Physiology 101 (1), 9 – 16 s., 1979
- [58] *Chemically Defined Lipid Concentrate* [online]. Gibco Invitrogen™, [cit. 2012-04-21]. Dostupné z WWW: <[http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media\\_formulation.249.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.249.html)>

## 7.1 Seznam převzatých obrázků a tabulek

- [TAB. 1, 2] *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* [online]. Sigma-Aldrich Corporation, [cit. 2012-04-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9785?lang=en&region=CZ>>
- [OBR.1A] *NMR structure of human insulin monomer in 35% CD3CN zinc free, 50 structures* [online]. Brookhaven Protein Data Bank [cit. 2012-04-19]. Dostupné z WWW: <<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2JV1>>
- [OBR.1B] *Human serum transferrin, recombinant N-terminal lobe* [online]. Brookhaven Protein Data Bank [cit. 2012-04-19]. Dostupné z WWW: <<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1a8e>>

- [OBR. 6] *Probing the Role of Tryptophans in Aequorea Victoria Green Fluorescent Proteins with an Expanded Genetic Code* [online]. Brookhaven Protein Data Bank [cit. 2012-04-19]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1RM9>>



