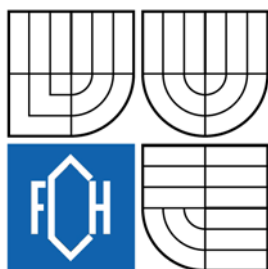


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF

VÝVOJ PROTOKOLU PRO TRANSIENTNÍ TRANSFEKCI BUNĚČNÉ LINIE HEK293 EBNA1

TITLE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

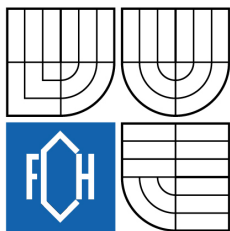
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

BC. JIŘÍ ŠMÍD

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

MGR. MOJMÍR ŠEVČÍK PH.D.

BRNO 2007



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0255/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jiří Šmíd	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Vývoj protokolu pro transienční transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jiří Šmíd
Student(ka)

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Rekombinantní proteiny patří mezi důležité biofarmaceutické produkty používané v biomedicinském výzkumu a při léčbě lidských nemocí. Rekombinantní proteiny lze produkovat ve velkém množství stabilní transfekcí nebo rychlejší cestou přechodné transfekce s menšími výtěžky. Pro zajištění správné biologické aktivity musí být protein náležitě poskládan a posttranslačně modifikován. Jelikož může být těchto modifikací dosaženo pouze expresí v savčích buňkách, staly se hlavním hostitelem expresí komplexních rekombinantních proteinů. V této diplomové práci je popsána přechodná transfekce buněk HEK 293 EBNA1 za použití lineárních polyethyleniminů (PEI). Tyto buňky byly předem adaptované na suspenzní kultivaci v médiu bez séra. Buňky byly transfekovány plasmidy pcDNA3.1, pCI, pEBSV1, pCEP4, pEAK8 a pcDNA5/FRT/TO, všechny nesly reporterový gen SEAP. K porovnání účinností jednotlivých transfekcí byly měřeny koncentrace exprimované alkalické fosfatázy (SEAP) v buněčném supernatantu. Dalším faktorem, který byl optimalizován, byl použitý poměr DNA:PEI; rovněž byly vzájemně srovnány účinnosti transfekcí při použití dvou různých polyethyleniminů. Nejvyšší dosažená exprese byla 50 mg/l SEAPu při transfekci ve 24 jamkových deskách za poměru DNA:PEI 1:5. Při porovnání všech šesti plasmidů měl nejvyšší expresi plasmid pCEP4/SEAP a to i při převedení transfekčního systému do většího objemu.

ABSTRACT

Recombinant proteins belong to considerable biofarmaceutics products used in biomedical research and in the treatment of human disease. Recombinant proteins can be produced by stable transfection in big amount or by faster transient transfection in smaller amount. To provide regular biological activity, it is necessary for the protein to be properly folded and post-translationally modified. As these modifications can be accurately performed only in mammalian cells, they have become the major host for complex r-protein expression. In this thesis is described transient transfection HEK 293 EBNA1 cells with linear polyethylenimines. These cells has been adapted to suspension cultivation in serum free medium. The cells were transfected with pcDNA3.1, pCI, pEBSV1, pCEP4, pEAK8 a pcDNA5/FRT/TO plasmids, everyone contained repoter gene SEAP. Concentration of SEAP in cell culture supernatants were determined in order to compare efficiencies of individual transfections. DNA:PEI ratio was another factor which was optimised and two different PEIs were compared. Highest achieved expresion was 50 mg per litre with transfection in 24 well plate when DNA:PEI ratio was 1:5. Comparison of six different plasmids give the biggest expresion pCEP4/SEAP, in well plate as well as in scaled up system.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buňky HEK 293 EBNA1, přechodná transfekce, polyethylenimin, sekretovaná alkalická fosfatáza, epizomální replikace

KEYWORDS

HEK 293 EBNA1 cells, transient transfection, polyethylenimine, secreted alkaline phosphatase, episomal replication

ŠMÍD, J. *Vývoj protokolu pro transientní transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009. 57 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat Mgr. Mojmíru Ševčíkovi Ph.D. za dobré vedení mé práce a pomoc při výběru vhodné literatury. Také chci poděkovat Mgr. Petru Orságovi za dohled a cenné rady v laboratoři. Poděkování také patří firmě BioVendor – Laboratorní medicína a.s. za technickou podporu.

OBSAH

1. Úvod	9
2. Cíl práce	10
3. Teoretická část.....	11
3.1 Rekombinantní proteiny	11
3.1.1 Monoklonální protilátky.....	12
3.2 Podmínky transfekce	13
3.2 Plasmidy	14
3.3 Produkce v hostitelských buňkách	15
3.3.1 Živočišné buňky	16
3.3.1.1 Buňky HEK 293	17
3.3.1.2 Buňky HEK 293 EBNA1	17
3.4 Přenos DNA do buněk.....	17
3.5 Transientní transfekce	19
3.6 Poly(ethylenimin).....	20
3.7 Kultivační média	22
3.8 SEAP – sekretovaná alkalická fosfatáza	22
4. Materiál a metody.....	24
4.1 Chemikálie	24
4.2 Přístroje a materiál	24
4.3 Buňky	25
4.3.1 Kultivace buněk.....	25
4.3.2 Adaptace buněk na bezsérovou kultivaci	25
4.3.2 Suspenzní kultivace.....	25
4.3.3 Zamrazování buněk	26
4.4 Plazmidová DNA	26
4.4.1 Příprava	26
4.4.1.1 Plasmid pcDNA5/FRT/TO/SEAP	26
4.4.1.2 Plasmid pCI/SEAP	27
4.4.1.3 Plasmid pcDNA3.1/SEAP	28
4.4.1.4 Plasmid pCEP4/SEAP	28
4.4.1.5 Plasmid pEBSV1/SEAP	29
4.4.1.6 Plasmid pEAK8/SEAP	30
4.4.1.7 Srovnání jednotlivých vektorů	30
4.4.2 Izolace a purifikace plasmidové DNA	31
4.5 Transfekce	32
4.5.1 Transfekční agens.....	32
4.5.2 Proces transfekce.....	32
4.5.2.1 Transfekce v 24ti jamkových destičkách	32
4.5.2.2 Transfekce v čtyřhranných lahvích	33
4.6 Stanovení exprese reporterového genu	34

4.7 Zpracování výsledků	34
5. Výsledky.....	34
5.1 Úvodní testování	35
5.1.1 Porovnání účinnosti dvou různých polyethyleniminů.....	35
5.1.2 Porovnání exprese v různé dny odběru vzorku	37
5.1.3 Vliv density buněk na produkci SEAPu.....	38
5.1.4 Porovnání různých poměrů DNA:PEI.....	39
5.2 Porovnání 6 plasmidů.....	40
5.3 Scale-up transfekčního systému	42
6. Diskuse	43
6.1 Vliv kultivačních podmínek před transfekcí na produkci SEAPu	43
6.2 Porovnání různých poměrů DNA:PEI.....	43
6.3 Porovnání dvou polyethyleniminů	43
6.4 Porovnání různých plasmidů.....	44
6.5 Převod do většího objemu	44
7. Závěr.....	45
8. Literatura	46
9. Zkratky	50
10. Přílohy	51
10.1 Složení média DMEM/F-12	51
10.2 Složení média BV293s	52
10.3 Složení LB média	52
10.4 Složení pufrů z purifikačního kitu Genomed	53
10.5 Statistiky.....	53
10.5.1 Statistický program R.....	53
10.5.2 Úvodní testování	54
10.5.3 Porovnání plasmidů.....	56

1. ÚVOD

Rozvoj biotechnologie a molekulární genetiky přinesl kromě dalších věcí i nové možnosti v léčbě lidských chorob. Genetické inženýrství a molekulární biologie nám umožnily pochopit samu podstatu nemocí. Jedním z mezníků tohoto vývoje je rok 1973, kdy byly poprvé popsány techniky rekombinantní DNA. Využitím těchto technik lze produkovat rekombinantní proteiny. Prvním úspěchem byla produkce lidského insulinu v buňkách *Escherichia coli*.

Rekombinantní proteiny (r-proteiny) jsou důležité biotechnologické produkty s širokou škálou využití, zejména v lékařství a klinickém výzkumu. Jejich spotřeba je stále větší, rychlá a efektivní produkce r-proteinů je i nadále velkou výzvou pro biofarmaceutické společnosti. Pro jejich správnou biologickou aktivitu je nutné splnění dvou podmínek – správné sbalení proteinu a posttranslační modifikace. Protože tyto změny nejlépe zajišťují savčí buňky, staly se nejvíce používaným produkčním systémem. Zejména v posledních deseti letech se podařilo dosáhnout významného pokroku v savcích expresních systémech, takže se staly atraktivnějšími i pro průmyslové využití.

Buněčné linie savčích buněk se staly dominantním systémem produkce rekombinantních proteinů pro klinické aplikace. Kvalita takových produktů je daleko větší než u jiných produkčních systémů, jako jsou bakterie, kvasinky nebo rostlinné buňky.

Pro základní výzkum a preklinické studie je výhodnější rychlé vyprodukování menšího množství r-proteinů, než zdoluhavé hledání buněčné linie s vysokou produkcí. Proto byly vyvinuty techniky rychlé exprese daného proteinu použitím transientní transfekce.

2. CÍL PRÁCE

Dřívější práce na obdobné téma ukázaly, že transientní transfekcí lze produkovat desítky miligramů rekombinantního proteinu v průběhu několika málo dní. Hlavním cílem této práce je optimalizace a porovnání dalších parametrů při transientní transfekci u suspenzní buněčné kultury. Především půjde o výběr vhodného plasmidu a potvrzení teorie epizomální replikace specifických plasmidů. Transientní transfekce bude studována v malém objemu jamky v transfekční desce (1 ml) i ve větším objemu třepané lahve (25 ml).

Dílčí cíle této práce jsou adaptace buněk HEK 293 a HEK 293 EBNA1 na bezsérovou kultivaci tak, aby byly připraveny na transientní transfekci.

Další cíle jsou příprava a amplifikace různých plasmidů pomocí PCR a jejich testování použitím gelové elektroforézy. Tyto plasmidy pak amplifikovat v bakteriálních buňkách, následně izolovat z bakterií a purifikovat plasmidovou DNA.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Pokroky v molekulární biologii a genetickém inženýrství vedly k hlubšímu pochopení biomolekulárních příčin lidských nemocí. Vystala tedy potřeba najít postupy a techniky jak tyto příčiny odstranit a léčit tak pravou podstatu nemocí.

V roce 1973 Boyer a Cohen poprvé popsali techniky rekombinantní DNA (Cohen a kol., 1973). Byli schopni připravit transgenní bakterie, izolovali a amplifikovali geny nebo jen části DNA a následně je transformovali do jiných buněk. Další velký krok kupředu znamenal objev restričních endonukleáz, za nějž obdrželi Werner Arber, Daniel Nathans a Hamilton Smith v roce 1978 Nobelovu cenu za lékařství.

Dalším milníkem byl rok 1982 a produkce lidského insulínu bakteriemi *Escherichia coli*. Do buněk *E. coli* byla transformována lidská DNA kódující tento hormon. Dříve byl pro léčbu používán zvířecí insulin izolovaný ze zvířecího pankreatu, takový insulin se ale samozřejmě mírně lišil od lidského. Tato odlišnost pak vyvolávala u některých pacientů alergickou reakci. Roku 1986 byl uveden na trh první rekombinantní protein vyprodukovaný v savcích buňkách, jednalo se o tkáňový plasminogenový aktivátor (Genentech).

Tento průlom vedl k masivnější produkci a využívání rekombinantních proteinů, zvláště v medicíně a klinickém výzkumu. Dnes lze jakýkoliv gen nebo úsek DNA (i rekombinantní) po izolaci a amplifikaci vložit do hostitelských buněk (bakterie, kvasinky, savčí buňky), které jej exprimují a vyprodukují tak žádaný rekombinantní protein.

3.1 Rekombinantní proteiny

Poprvé byl pojem „biotechnologie“, použit Karlem Erekyem v roce 1917. Biotechnologie byla definována jako jakákoli technologie, která využívá biologické systémy, živé organizmy nebo jejich části k určité výrobě nebo jejich přeměně či jinému specifickému použití. Od té doby prošla biotechnologie velkým vývojem provázeným řadou významných objevů, např. objev mRNA, objev plasmidů, restričních endonukleáz, přípravou geneticky modifikovaných organismů a další. Dnes zasahuje biotechnologie do mnoha vědních oborů a výrobních oblastí.

Když byly vynalezeny techniky rekombinantní DNA, předpokládalo se, že široké spektrum lidských terapeutik se bude takto syntetizovat a v dostatečném množství. Do dnešní doby bylo testováno více jak 1000 sekvencí DNA kódujících proteiny potenciálně využitelných při léčbě lidských nemocí (Glick a Pasternak, 2003). Většina těchto molekul DNA byla exprimována v hostitelských buňkách, přibližně 750 postoupilo do dalších klinických testů a na 80 látek už bylo schváleno jako léčiva v USA i EU (Glick a Pasternak, 2003). Prošly tedy mnohaletým širokým testováním jak na zvířatech, tak později i na lidech.

Hlavní výhodou používání rekombinantních proteinů jako terapeutik je jejich větší účinnost a méně vedlejších efektů narozdíl od farmaceutických produktů. Mohou být více zaměřeny na skutečnou příčinu nemoci a ne jen mírnit nebo odstraňovat její symptomy.

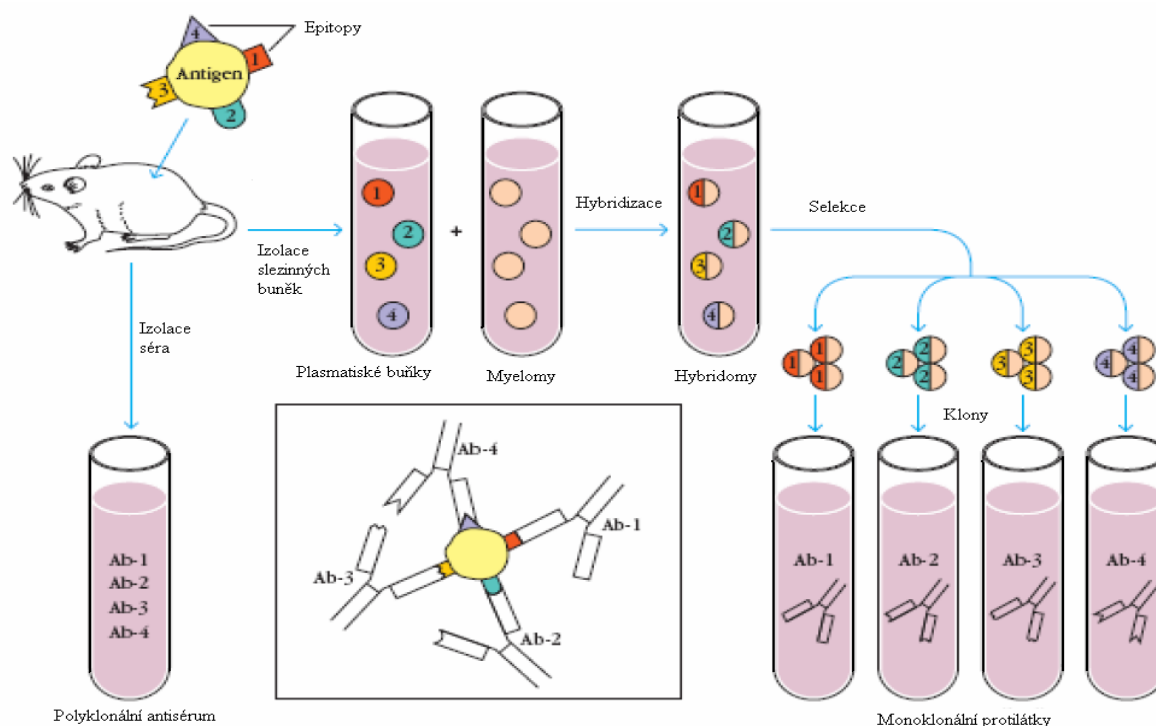
Obrat na trhu s terapeutickými proteiny činil v roce 2006 57 miliard dolarů a očekává se, že v roce 2010 už půjde o částku okolo 90 miliard dolarů. Největší část na trhu zaujímají monoklonální protilátky a očekává se jejich ještě větší posílení na trhu (Kyselá, 2008). Zbytek trhu zaujímají takové produkty jako vakcíny, antikoagulanty, erytropoetiny, interferony, insulin, růstové hormony a další terapeutické enzymy a proteiny. Všechny r-proteiny exprimované v savcích buňkách jsou produkovány v trvale transfekovaných buňkách, což je

standardní přístup pro komerční výrobu. V budoucnu možná dojde k většímu rozšíření produkce u transientně transfekovaných buněk.

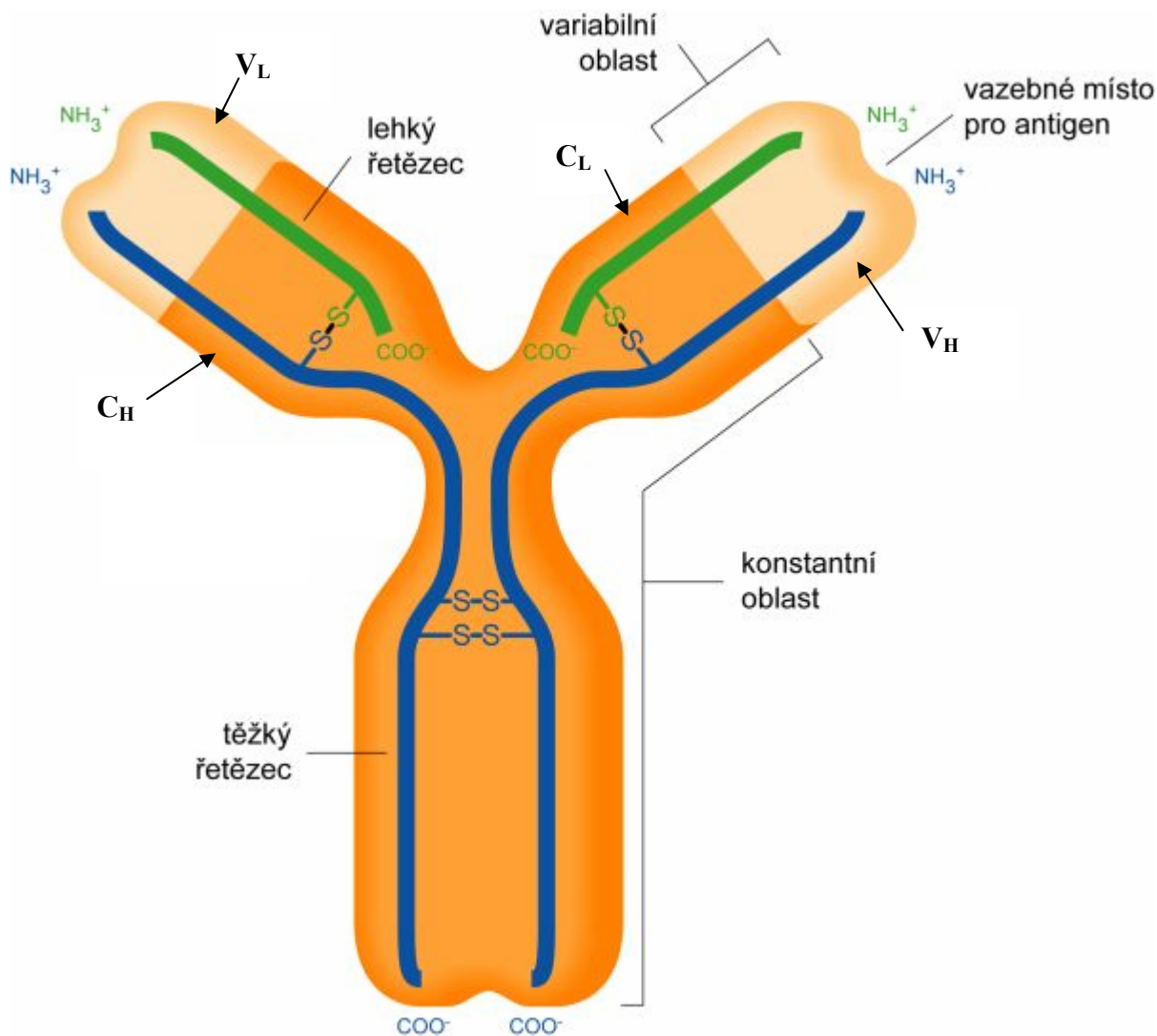
3.1.1 Monoklonální protilátky

Tato skupina r-proteinů je nejrychleji rostoucím segmentem na trhu s r-proteiny, je druhou největší třídou léčiv hned po vakcínách. Jedná se o nejdůležitější produkt savčích buněk na trhu. Mezi nejvýznamnější výrobce protilátek patří firmy jako Genentech, Amgen, MedImmune, Novartis a mnoho dalších.

Protilátky jsou vysoce specifické molekuly rozpoznávající a ničící antigeny – polysacharidy (toxiny) a proteiny na povrchu různých patogenních organismů. Z chemického hlediska se jedná o glykoproteiny, molekula má tvar písmene Y (viz obrázek 2) a skládá se ze dvou identických lehkých (light) řetězců a dvou těžkých (heavy) řetězců, které jsou navzájem spojeny pomocí disulfidových můstků. V organismu jsou produkovány buňkami lymfocytů, které je uvolňují do krve a dalších tělních tekutin, a zajišťují tzv. humorální imunitu organismu. Protilátky jsou široce používány v diagnostické, zobrazovací, terapeutické a analytické praxi. Dříve se používaly hlavně jako diagnostika in vitro pro stanovení těhotenství, pro měření počtu patogenních organismů, měření hladiny různých léčiv v krvi, zjišťování tkáňové snášenlivosti nebo detekci antigenů produkovaných tumorovými buňkami. Byly produkovány klasickou cestou izolace polyklonálních protilátek pomocí laboratorních zvířat (viz obrázek 1), tento proces však byl časově i finančně náročný, také více pracný. Dnešní produkce monoklonálních protilátek spočívá v prostém vnesení cílového genu do produkčního organismu a následné izolaci produktu.



Obrázek 1: Produkce monoklonálních protilátek. Každá protilátka vytvořená z plazmatických buněk je specifická vůči jedinému epitopu, narozdíl od polyklonálního antiséra (Kyselá 2008).



Obrázek 2: Schématický náčrt imunoglobulinu (protilátky). Rozeznáváme 4 domény (oblasti) na molekule protilátky – variabilní lehký řetězec (V_L), variabilní těžký řetězec (V_H), konstantní lehký řetězec (C_L) a konstantní těžký řetězec (C_H). Lehký řetězec je dvou typů: κ nebo λ . Těžký řetězec má typů více: α , δ , ϵ , γ a μ . Zúžená oblast uprostřed je bohatá na prolin. Zdroj: internet – www.gvm.vvm.cz

3.2 Podmínky transfekce

Pro transfekci jsou potřeba čtyři základní věci – produkční organismus, kultivační médium pro tento organismus, vektor pro přenos a expresi cílové DNA v produkčním organismu a transfekční činidlo zajišťující inkorporaci vektoru do produkčního organismu.

Jako produkční organismus lze použít celou řadu organismů – bakterie (*E.coli*), kvasinky, rostlinné buňky nebo živočišné buňky. Pro produkci r-proteinů používaných v biofarmacii a klinickém výzkumu se používají savčí buněčné linie. Ty zajišťují správné sbalení proteinu i všechny posttranslační modifikace.

Kultivační médium musí zajišťovat správnou výživu kultivovaných buněk (zdroj uhlíku, dusíku, energie), dále růstové faktory (např. esenciální aminokyseliny) a látky regulující buněčný cyklus.

Pro přenos DNA do buněk se používají různé typy vektorů, v závislosti na velikosti cílové DNA a dalších faktorech. Pro přenos jednotlivých genů běžné velikosti jsou dobrým vektorem plasmidy. Z přírodních plasmidů byly pomocí technik rekombinantní DNA zkonstruovány vektory použitelné v různých konkrétních aplikacích.

Transfekční činidla zajišťují přenos DNA do buněk. Mezi základní požadavky na tyto činidla patří jejich nízká cena a efektivita přenosu DNA do buněk.

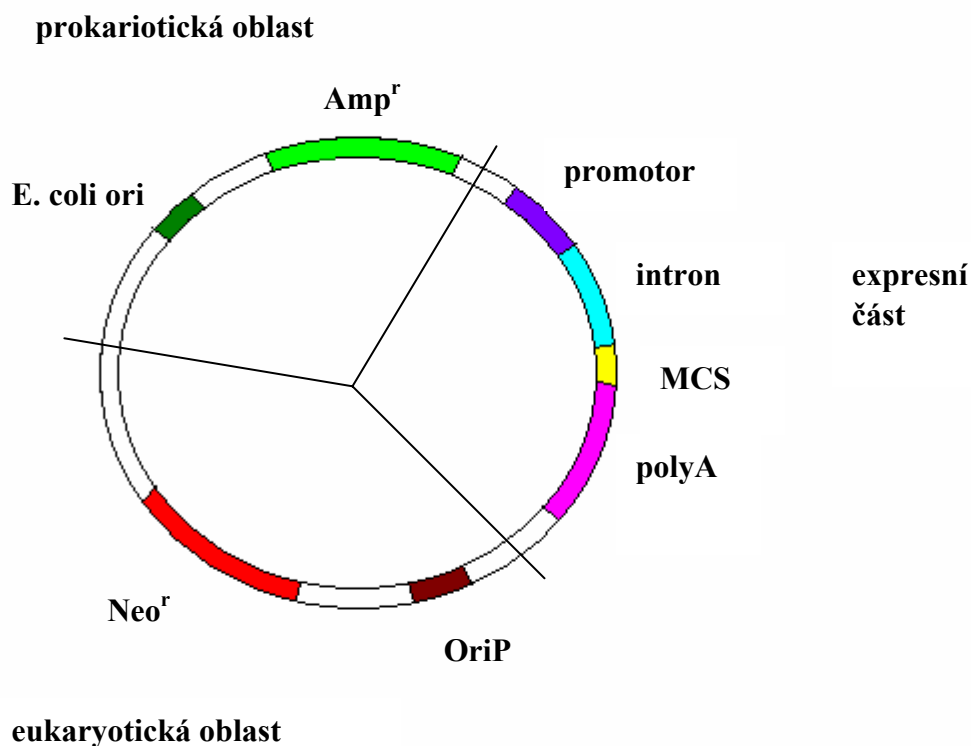
3.2 Plasmidy

Plasmid je extra-chromozomální kruhová DNA schopná vlastní replikace, plasmidy se nachází u většiny bakterií. Plasmidy obsahují geny ovlivňující metabolickou aktivitu a umožňující buňkám přežití v nepříznivém prostředí, většinou se jedná o rezistenci buněk vůči antibiotikům, bakteriofágům a některým těžkým kovům.

Plasmidové vektory byly odvozeny z přírodních plasmidů použitím technik rekombinantní DNA, přitom byly odstraněny nepotřebné sekvence a zachovány jen ty nezbytně nutné (esenciální). Dále byly plasmidy upravovány pro nejrůznější aplikace a využití, nyní představují výborné klonovací a expresní vektory.

Každý savčí expresní vektor obsahuje tři důležité části:

- Prokaryotická oblast – slouží k amplifikaci plasmidu v bakteriálních buňkách a k selekci transfekovaných buněk. Tato oblast tak obsahuje počátek replikace (zde nasedá DNA polymeráza a začíná replikace) a selekční marker (resistence na antibiotikum).
- Expresní oblast – obsahuje sekvence potřebné pro expresi cílové DNA. Sekvence regulující transkripci cílového genu pochází z živočišných virů nebo ze savčích genů (Glick a Pasternak, 2003). Také obsahuje klonovací místo, do kterého se včleňuje cílová DNA. Klonovací místo (MCS – multiple cloning site) je sekvence nukleotidů rozpoznávaná restriktivními endonukleázami, které v daném místě specificky štěpí vlákno DNA. Někdy se do expresní oblasti vkládají i intronové sekvence, které zvyšují expresi cílové DNA.
- Eukaryotická oblast – obsahuje geny pro resistenci na antibiotikum (vždy jiné než v prokaryotické oblasti) pro selekci transfekovaných buněk. Může také obsahovat eukaryotický počátek replikace pro epizomální replikaci plasmidu v eukaryotických buňkách (často upravený z živočišných virů).



Obrázek 3: Schéma plasmidu. Prokaryotická oblast je důležitá pro selekci v buňkách *E. coli*, obsahuje počátek replikace *E. coli* ori a selekční marker pro tyto buňky – gen pro resistenci na ampicilin (*Amp^r*). MCS (multiple cloning site) je klonovací místo, obsahuje sekvence rozpoznávané restrikčními endonukleázami, předchází mu promotorová sekvence (místo rozpoznávané DNA polymerázou) a intronové oblasti. Plasmid dále obsahuje počátek replikace (*OriP*) a selekční marker v savčích buňkách – gen pro resistenci na neomycin (*Neo^r*).

3.3 Produkce v hostitelských buňkách

Produkovat rekombinantní proteiny lze mnoha způsoby. Hostitelské buňky lze rozdělit dle typu buňky na prokaryotické a eukaryotické. Přenos DNA u prokaryotických buněk se nazývá transformace, u eukaryotických se jedná o transfekci.

Z prokaryotických organismů se daleko nejvíce používá bakterie *Escherichia coli*, kde je produkce rekombinantních proteinů dobře prostudována geneticky i fyziologicky (Baneyx, 1999; Glick a Pasternak, 2003). Tento systém má mnoho výhod – levná kultivace, snadné genetické manipulace, krátká generační doba a velká expresní kapacita. Má ale také své nevýhody – exprimovaný protein není správně sbalen, není posttranslačně modifikován (např. glykosylace) nebo má malou rozpustnost (Clark, 2001).

Eukaryotické organismy používané pro produkci r-proteinů jsou různé, např. kvasinky, hmyzí, rostlinné a savčí buňky.

Typickým představitelem kvasinek, důležitým z hlediska výzkumu a vývoje, je *Saccharomyces cerevisiae*. Výhoda jejich použití spočívá v rychlém růstu a také jsou dobře geneticky manipulovatelné. Nevýhodou je, že provádí jen některé posttranslační modifikace proteinů, takže nejsou použitelné pro farmaceutické účely.

Hmyzí buňky jsou většinou transfekovány pomocí rekombinantních bakulovirů. Výhodou je možnost jejich kultivace ve vysoké densitě. Nevýhodou je skutečnost, že r-protein je často nerozpustný, někdy tvoří agregáty uvnitř buněk (Kost a Condereay, 1999), což ztěžuje izolaci a purifikaci produktu. Hmyzí buňky také neobsahují konvertázy, proto je r-protein často inaktivní.

Výhoda použití buněk rostlin je jejich snadná kultivace, nevýhoda že rostou pomalu. Posttranslační modifikace proteinů jsou obdobné jako u savčích buněk až na glykosylaci. Přesto jde o optimální systém pro modelování různých podmínek prostředí a jejich důsledků. Pro vylepšení vlastností byly připraveny transgenní rostliny, které se používají v zemědělství a také pro produkci r-proteinů.

Savčí buňky mají dvě velké nevýhody – rostou pomalu a jejich kultivace je finančně náročná. Zato ale produkují proteiny správně posttranslačně modifikované i správně sbalené, rekombinantní proteiny produkované v savčích buňkách se používají ve farmacii a pro další preklinické studie.

3.3.1 Živočišné buňky

Kultury živočišných buněk jsou izolovány z určité tkáně živočicha a dále kultivovány v laboratoři (in vitro). Podmínky kultivace se snaží napodobit přirozené prostředí (in vivo), proto jsou buňky inkubovány při teplotě 37 °C a v modifikované atmosféře (5% CO₂). Důležitá je podmínka sterility a kontrolované prostředí.

Některé buňky nerostou přisedle, například krevní buňky. Většina však potřebuje pevný povrch pro kultivaci (buňky z tkání).

Při pokračující kultivaci buňky rostou a dělí se, časem tak rychle zaplní povrch nebo daný objem. Z toho vyplývá velká spotřeba nutrientů živného média, hromadění mrtvých buněk a zastavení dalšího buněčného dělení. Pro omezení těchto negativních jevů se živné médium vyměňuje a buňky se přesazují.

Primární buňky jsou buňky kultivované odděleně od původce. Tyto buňky mají krátkou střední délku života, po určitém počtu zdvojení začnou buňky stárnout a přestanou se dělit. Proto se používají stálé buněčné linie. Ty lze získat náhodnými mutacemi nebo genetickými manipulacemi (např. upravení genu pro telomerázu). Takto už byla vytvořeno celá řada nesmrtelných buněčných linií používaných ve výzkumných laboratořích i biofarmaceutickém průmyslu.

Upravené zvířecí buněčné linie:

- CHO (Chinese Hamster ovary) – vajíčka křečka čínského. Poprvé představeny v 60. létech 20. století, dnes nejčastěji používané savčí buňky pro produkci r-proteinů v průmyslovém měřítku.
- 3T3 – fibroblasty z myši švýcarské

Upravené lidské buněčné linie:

- HEK 293 (human embryonal kidney) – epiteliální buňky z lidských ledvin. Široce používané v preklinickém výzkumu, zvyšující se význam pro produkci lidských r-proteinů.
- HeLa (Henrietta Lacks) – epiteliální buňky z rakovinných buněk

3.3.1.1 Buňky HEK 293

Tyto buňky byly poprvé připraveny roku 1970 v laboratoři Alexe Van der Eba v Leidenu v Holandsku. Byly získány ze zdravých potracených lidských plodů, poprvé kultivovány jako primární HEK buňky. Později byly upraveny transformací pomocí pěti adenovirových genů (Graham a kol., 1977). Jedná se tedy o epiteliální buňky z lidských ledvin (human embryonal kidney – HEK), číslo 293 značí, že se jednalo o 293. pokus pana Grahama.

Buňky HEK 293 se používají pro produkci rekombinantních proteinů, relativně jednoduše se kultivují i transfekují. Protože se jedná o lidské buněčné linie, zajišťují tyto buňky naprosto všechny posttranslační modifikace, které jsou pro daný r-protein potřeba, používají se tedy pro produkci lidských terapeutik a pro klinický výzkum. Lze je také poměrně snadno převést do většího produkčního objemu, takže jsou zajímavé i pro průmyslovou produkci r-proteinů.

3.3.1.2 Buňky HEK 293 EBNA1

Techniky rekombinantní DNA umožňují mj. i upravování hostitelských buněk, vylepšení jejich vlastností nebo přidání úplně nových. Buňky HEK 293 EBNA1 jsou vylepšené buňky, do jejich genomu byl začleněn gen z Epstein-Barr viru. Tento gen je exprimován jako jaderný antigen EBNA1 (Epstein-Barr virus nuclear antigene), který umožňuje epizomální replikaci specifických plasmidů (Aiyar a kol., 2009). Takový plasmid musí v eukaryotickém počátku replikace obsahovat sekvence vázající se na EBNA1. Při transientní transfekci s plasmidy neobsahující EBNA1 sekvence se tyto v buňce nereplikují, jejich počet v buňkách tak jen klesá v důsledku buněčného dělení. Plasmidy bez EBNA1 sekvencí se nepřenáší na dceřinné buňky. Ale u buněk obsahujících EBNA1 a při použití specifických plasmidů by docházelo k replikaci těchto plasmidů, takže jejich počet by se zvyšoval. EBNA1 antigen také umožňuje přenos plasmidů do dceřinných buněk při buněčném dělení. To vše vede k větší expresi cílového genu a větší produkci rekombinantního proteinu (Pham a kol., 2003). Lze tak dosáhnout produkce 10 až 20 mg/l v objemu více jak 100 l (Girard a kol., 2002). Buňky HEK 293 EBNA1 jsou v dnešní době nejvíce používané buněčné linie pro velkoobjemovou transientní expresi (Pham, 2006).

3.4 Přenos DNA do buněk

Přenos prosté DNA do buněk je proces velmi neefektivní. Jde o proces, který probíhá i v přírodě, např. přenos během bakteriální konjugace nebo při virové infekci. Modifikované virové částice se používají i v laboratorní a technologické praxi (virové vektory), ale jejich použití vyžaduje specifický přístup a náročné vybavení.

Proto se používají daleko více nonvirální metody transfekce, které se dělí na fyzikální (mechanické) a chemické (nemechanické) metody.

1. Fyzikální metody:

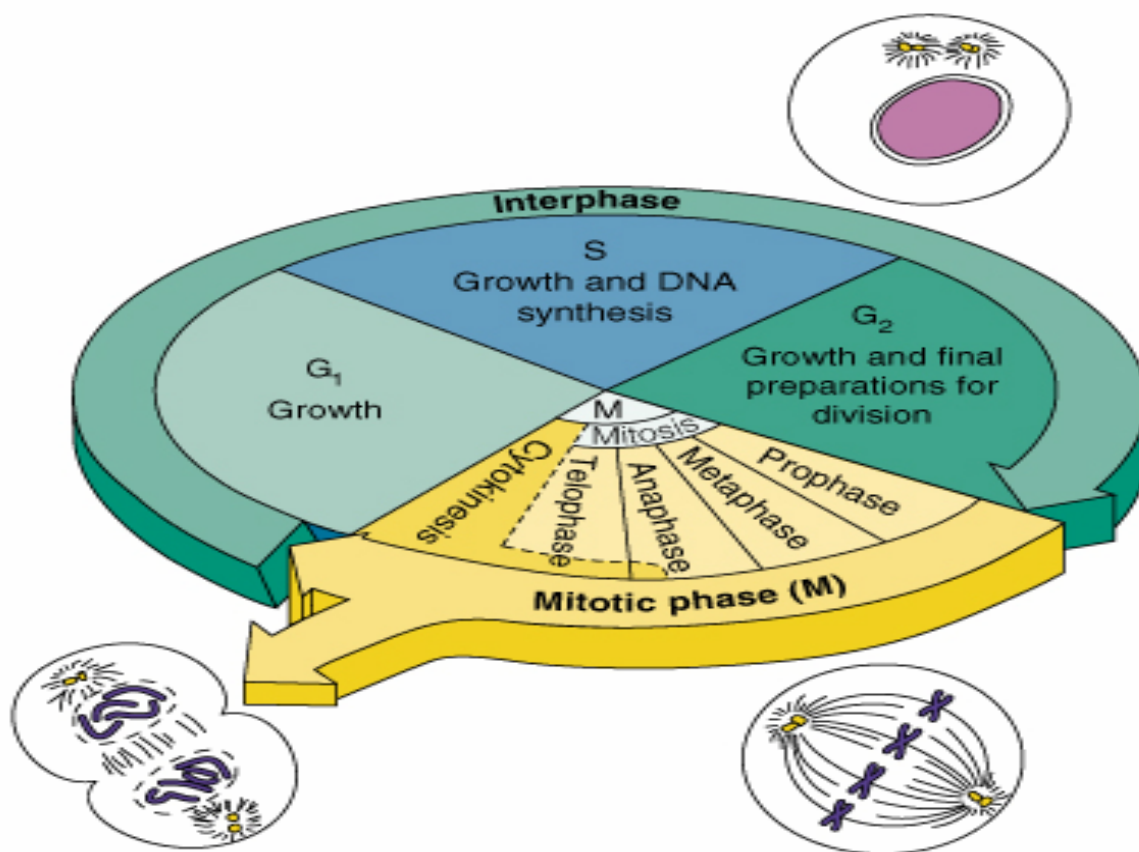
- Elektroporace – působením vysokého napětí (krátkého pulsu) dochází k reverzibilní permeabilizaci buněk, v cytoplazmatické membráně se tvoří hydrofilní kanálky, což značně urychluje přenos DNA do buněk (aplikace vnějšího elektrického pole tedy není podmínkou přenosu DNA). Molekuly jsou transportovány přes póry difúzí, elektrickým driftem a elektroosmózou. Používá se pro neadherující buněčné linie a menší produkční systémy.
- Mikroinjekce – vpravení DNA do jednotlivých buněk pomocí miniaturní injekce, touto transfekční technikou lze vytvořit i transgenní zvířata – původní jádro buňky se odsaje a nahradí se jádrem s rekombinantně upraveným genomem. Jedná se o nejlepší metodu přenosu genů, ale jen pro transfekci malého počtu buněk, pro větší počet buněk nevhodná (příliš pracné, zdlouhavé).

2. Chemické metody:

- CaPi precipitace – založeno na koprecipitaci DNA s fosforečnanem vápenatým, vytvořený komplex pak adhezuje na povrchu buněk, 5 % CaPi/DNA precipitát se dostává do buněk fagocytózou (Batard a kol., 2001). Technika přenosu DNA pomocí CaPi byla vyvinuta Grahamem a Van der Ebem v roce 1973. Pro zvýšení absorpce DNA do buněk se využívá glycerolový či dimethylsulfoxidový šok. Pro svou jednoduchost a malou finanční náročnost je CaPi široce používané pro transfekci, zvláště ve velkých objemech.
- Lipofekce – pozitivně nabitě lipidy tvoří elektrostatické interakce s negativní páteří DNA, vznikají kondenzované agregáty, kde kladný náboj a lipofilie pozitivně nabitých lipidů umožňuje interakci se zápornou a hydrofobní buněčnou membránou a následný vstup do cílové buňky. Lipidy ve vodě tvoří lipozómy - nekovalentní duté sférické struktury s průměrem 100 – 400 nm. K dispozici jsou komerčně dostupné lipidy (LipofectAMINE, FuGENE, 293fectin a další), používají se však častěji pro menší transfekční systémy. Pro velké objemy nejsou příliš vhodné kvůli jejich vyšší ceně.
- Syntetické komplexy DNA-ligand – kondenzace DNA s polykationtem (např. PEI nebo DEAE-dextran), vhodná metoda pro transientní transfekce díky jednoduchosti a relativně nízké ceně.

Nonvirální transfekční techniky mají výhodu proti virovým vektorům ve větší flexibilitě co se týče velikosti i počtu genů, které lze vpravit do buňky. Nemechanické metody jsou založeny na stejném principu – utváření kladně nabitých nanočástic, které se pak vážou na záporně nabitý povrch buněk a dostávají se dovnitř pomocí endozómů (viz obrázek 5). Uvnitř buňky se DNA uvolňuje z endozómů do cytoplazmy a vstupuje do jádra. Mechanismy těchto procesů se u jednotlivých typů transfekcí liší. Značná část molekul DNA je ale degradována dříve než dosáhne jádra (Godbey a kol., 2000).

Efektivita přenosu DNA do buněk souvisí s buněčným cyklem (viz obrázek 4; Lechardeur a kol., 1999; Brunner a kol., 2002; Mannisto a kol., 2005). Transfekce s použitím lipozómů nebo rozvětveného PEI je více efektivní u buněk v pozdní S fázi (Grosjean a kol., 2002). Pravděpodobně dochází k lepšímu přechodu plasmidové DNA přes jadernou membránu při mitotickém dělení buněk, kdy je jaderná membrána narušená. Přesný mechanismus těchto pochodů není znám.



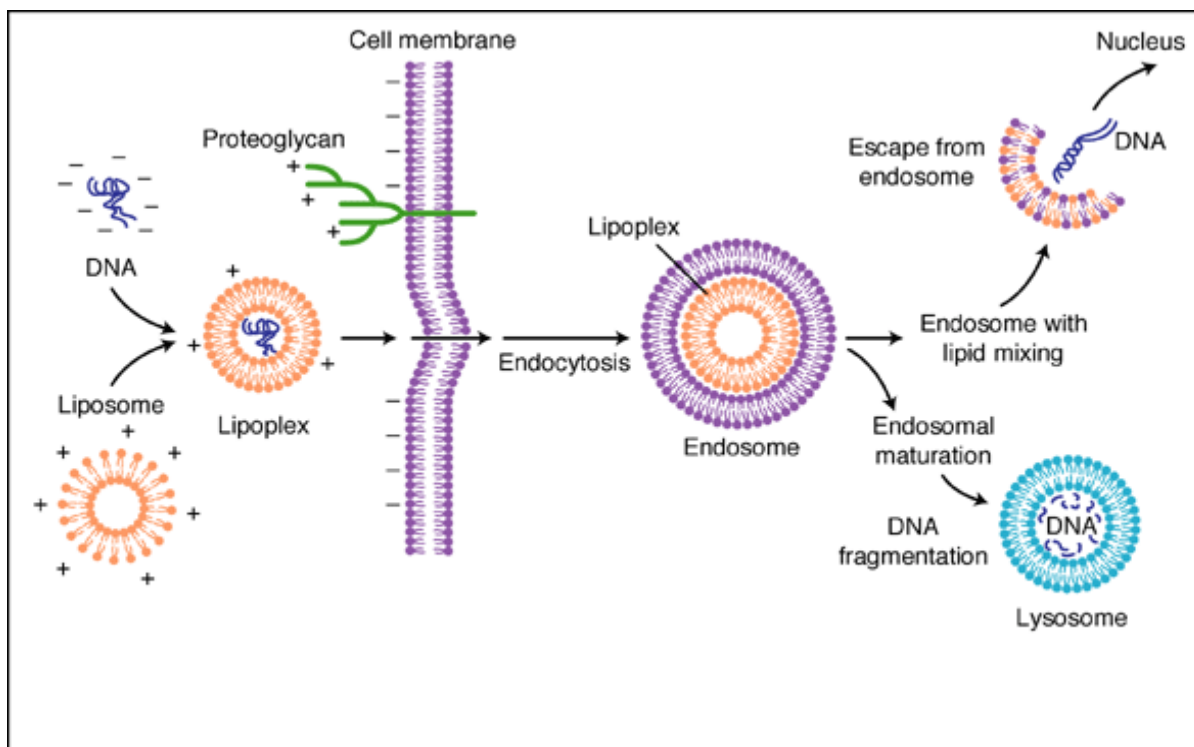
Obrázek 4: Buněčný cyklus a jeho jednotlivé fáze, zdroj internet - <http://www.apsu.edu>

3.5 Transientní transfekce

Při trvalé transfekci je třeba izolovat, charakterizovat a expandovat vysoce produkční buněčné linie. Jsou produkovány řádově kilogramy rekombinantního proteinu, ale hledání buněčné linie s vysokou expresí je velmi zdlouhavé (řádově roky) a náročné. Pro některé aplikace je třeba rychlé vyprodukování r-proteinů, například při hledání vhodné varianty konkrétního proteinu nebo posuzování efektivity různých proteinů. U takových aplikací stačí i menší množství, hlavní je zde rychlost produkce. Slibnou metodou se tak stává transientní transfekce.

Rozdíl mezi přechodnou (transientní) a trvalou transfekcí spočívá v tom, že při přechodné se cílová DNA nezačleňuje do genomu hostitelských buněk. K expresi cílové DNA dochází hned po jejím proniknutí do jádra, rychle následuje i syntéza rekombinantního proteinu. Již pár hodin po transfekci je r-protein detekovatelný. DNA se nemůže přenášet při mitóze na dceřinné buňky. To znamená, že exprese cílového genu je časově dosti omezená. Vyprodukované množství rekombinantního proteinu je proto malé, řádově miligramy až gramy. Toto nemusí být nevýhodou, protože pro účely dalších výzkumů např. ve farmacii, diagnostice nebo individuální léčbě (Pereira a kol., 2004; Muller-Zellenberg a Muller, 2005) nejsou třeba velká množství rekombinantního proteinu, ale rychlá produkce. Pro tyto aplikace byly vyvinuty rychlé transientní techniky transfekce v savčích buňkách (Wurm a Bernard 1999). Použitím levných transfekčních agens, jako je fosforečnan vápenatý (Jordan a kol.,

1996) nebo PEI (Ehrhardt a kol., 2005), při přechodné transfekci savčích buněk byly kultivovány v objemech od několika mililitrů až po stovky litrů. Byly tak produkovány rekombinantní proteiny v množství několika miligramů až gramů po dobu 5 až 10 dní po transfekci (Durocher a kol. 2002; Girard a kol., 2002; Pham a kol., 2003; Derouazi a kol., 2004; Baldi a kol., 2005).



Obrázek 5: Schéma přenosu DNA pomocí lipozómu, uvnitř buňky se část celkové DNA dostává až do jádra buňky, část je degradována nukleázami v lysosomu. Zdroj internet – www.expertreviews.org

3.6 Poly(ethylenimin)

Poly(ethylenimin) – PEI – je polymer vyskytující se ve dvou formách, lineární a rozvětvený (viz obrázky 6 a 7). Zatímco lineární forma je při pokojové teplotě v pevném stavu, rozvětvená je tekutá. Používají se molekuly s různým stupněm polymerace a různou molekulovou hmotností. Obě formy (lineární i rozvětvená) se používají jako transfekční agens. Poprvé použil PEI jako transfekční činidlo v roce 1995 Boussif a kol.

Atomy dusíku, které tvoří v rozvětvené formě primární, sekundární a terciární aminy, mohou být protonovány, což udělí molekule PEI pufrovací schopnosti. Tato schopnost stoupá s velikostí polymerní molekuly (více atomů dusíku). Informace o celkové pufrovací kapacitě je pak důležitější než určení disociační konstanty pK_a molekuly PEI (Godbey a kol., 1999). PEI je pro buňky mírně toxický, hlavně jeho volné částice (nezformované do komplexu s DNA).

Před transfekcí pomocí PEI se nejprve smíchají roztoky DNA a PEI, dojde tak ke kondenzaci molekul DNA, vytváření komplexů DNA/PEI na základě hydrofobních interakcí (Bertschinger a kol. 2006) a agregaci komplexů do kladně nabitých nanočástic. Ty se, po přidání směsi k buňkám, naváží na záporně nabitě glykoproteiny a proteoglykany na povrchu

buněk (Lungwitz a kol., 2005) a endocytózou se dostávají dovnitř. Uvnitř buněk napomáhá PEI uvolnění DNA z endozómu tím, že absorbuje protony (pufrovací schopnosti aminů – viz výše) při acidifikaci endozómu – tzv. houbový protonový efekt (Behr, 1994). Toto nahromadění kladného náboje způsobí influx chloridových iontů a vody do endozómu, což vede k nabobtnání, osmotickému napětí na membráně endozómu a následně k prasknutí endozómu (Lindel a kol., 2004). PEI částečně brání spojení endozómu uvnitř buňky s lysozómem, chrání tak DNA před degradací lysozomálními nukleázami.

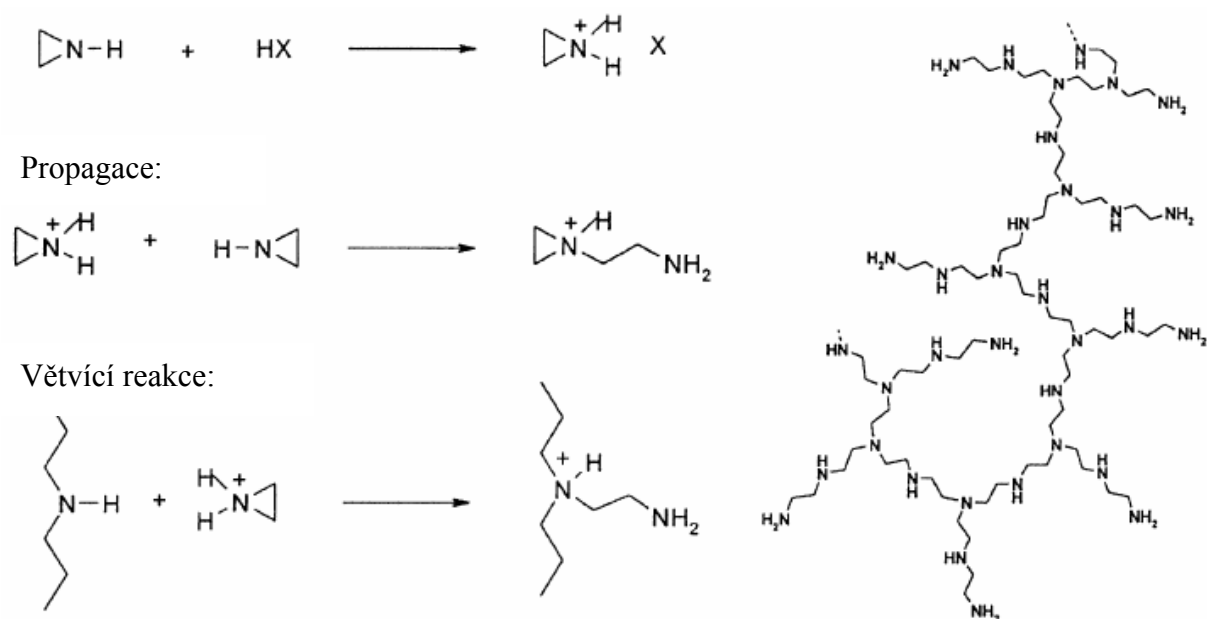
Této hypotéze ale odporuje fakt, že ve směsi DNA/PEI je asi 85 % molekul PEI volných (Clamme a kol., 2003), a také pKa PEI je přibližně 8,4 (von Harpe, 2000), takže při nízkém pH v endozómu (po acidifikaci – pozdní endozóm) má PEI jen malou pufrovací kapacitu. Z těchto důvodů je pak nepravděpodobné, aby osmotické pnutí hrálo významnou roli při prasknutí endozómu (Clamme a kol., 2003).

Komplex DNA/PEI v cytoplasmě je transportován pomocí aktinových vláken a mikrotubulů do oblasti blízko jádra, kde se část těchto komplexů rozpadá. Na rozpad komplexu DNA/PEI má velký vliv přítomnost RNA, protože RNA má větší afinitu k PEI než DNA (Bertschinger a kol. 2006). Samostatně pak přechází přes jadernou membránu (část přechází v komplexu a rozpadá se až v jádře působením rRNA). V jádře se importovaná DNA začleňuje do chromozomální DNA. Mechanismus těchto pochodů není zcela objasněn (Iida a kol., 2007; Clamme a kol., 2003).

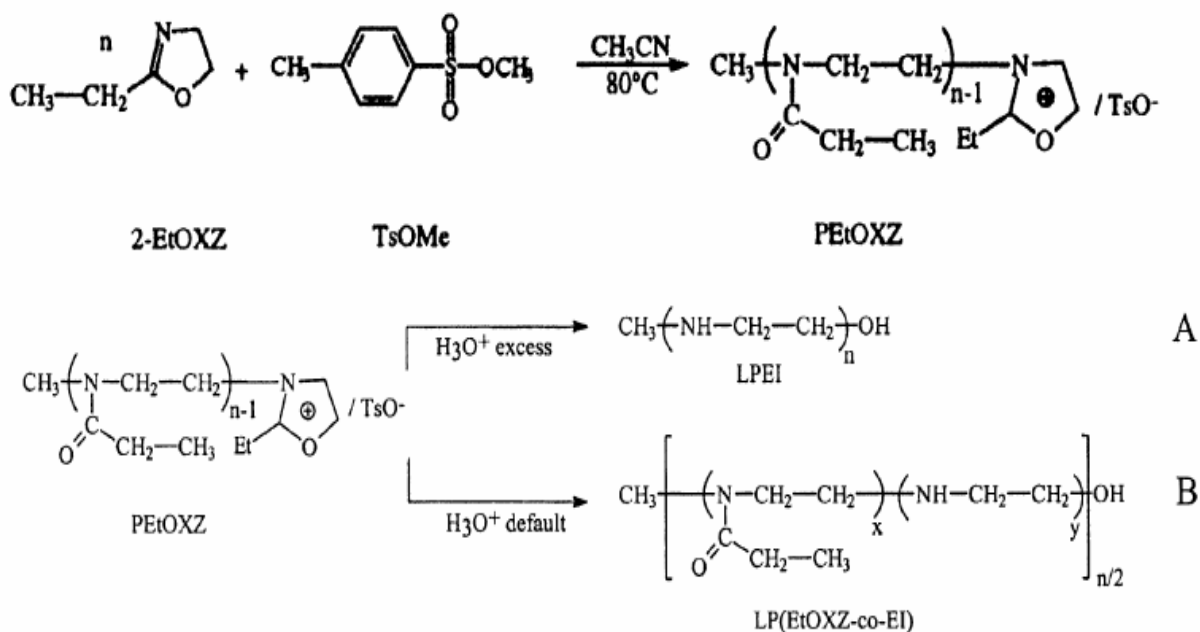
Proces prasknutí endozómu a uvolnění DNA je silně závislý na poměru DNA ku PEI. Také celková efektivita transfekce je závislá na tomto poměru (Kyselá; 2008), také je závislá na použitém kultivačním médiu.

Částice DNA – PEI byly studovány pomocí AFM (atomic force microscopy), byla tak určena jejich velikost: 20 až 40 nm. Počet plasmidů v těchto částicích ale stále není znám.

Mnoho typů buněk bylo s úspěchem transfekováno pomocí PEI, ať už v přítomnosti séra nebo bez něj. Byly popsány transfekce v různých uspořádáních a různých pracovních objemech (Boussif a kol., 1995; Durocher a kol., 2002; Derouazi a kol., 2004).



Obrázek 6: Syntéza rozvětveného polyethyleniminu – kyselé katalyzovaná polymerace arizidinu ve vodném roztoku, vpravo schéma rozvětveného PEI. Zdroj Lungwitz a kol.; 2005



Obrázek 7: Syntéza lineárního PEI, vychází se z polymerační reakce 2-ethyl-2-oxazolinu s methyl-p-toluensulfonátem, v silně kyselém prostředí pak vzniká lineární molekula PEI (A) Zdroj Lungwitz a kol.; 2005

3.7 Kultivační média

Každé kultivační médium musí obsahovat vhodný a snadno utilizovatelný zdroj energie, dále růstové faktory a látky regulující buněčný cyklus. Médium může, ale nemusí obsahovat sérum, v minulosti bylo sérum esenciální součástí médií. V dnešní době je snaha minimalizovat používání séra, proto jsou kultivační média upravována tak, aby i bez séra zajišťovala dobrý růst buněk.

Při postupné adaptaci buněk na bezsérovou kultivaci byla použita séra FCS – fetal calf serum a později HS – horse serum. Sérum obsahuje různé nutrienty, hormony, růstové faktory a další nedefinované komponenty, podporující růst buněk. Nevýhody spojené s používáním sér jsou chemická nespecifičnost, vysoká cena a složité separační postupy při purifikaci rekombinantního proteinu. V poslední době se klade větší důraz na etiku při získávání sér, což vede k omezování používání všude tam, kde je to možné (Kyselá, 2008).

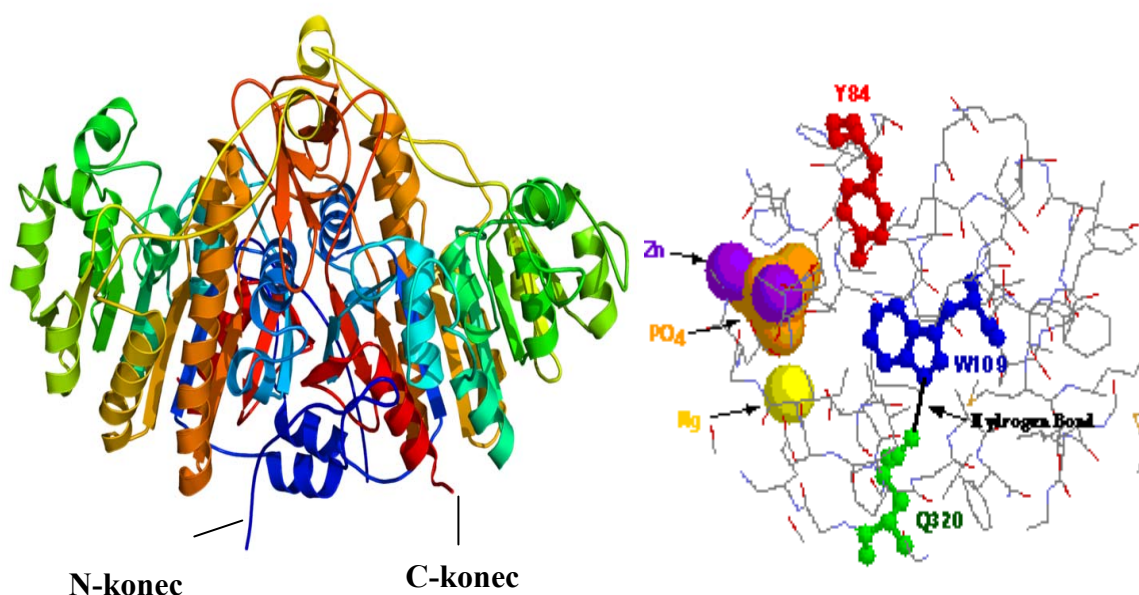
3.8 SEAP – sekretovaná alkalická fosfatáza

Alkalická fosfatáza (AP) patří do skupiny hydroláz (EC 3.1.3.1), katalyzuje hydrolytické štěpení esterů kyseliny fosforečné při alkalickém pH (in vitro pH 10), tento proces se nazývá defosforylace. Mezi tři hlavní izoenzymy patří placentární, střevní a tkáňově nespecifická AP, zahrnující izoformy jaterní, kostní a ledvinnou. Jsou popsány i další, tzv. onkogenní izoenzymy produkované nádorovými buňkami. Isoformy jsou kódovány stejným genem, liší

se pouze různým obsahem sacharidů. Liší se tak svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, což umožňuje jejich laboratorní odlišení a separaci.

Strukturně se jedná o glykoprotein, ve své molekule totiž obsahuje i sacharidické složky, včetně kyseliny sialové. Pro svou aktivitu vyžaduje přítomnost zinečnatých iontů v aktivním centru, je tedy metaloproteinem, zinek slouží jako kofaktor. V séru však působí přídavek zinečnatých solí vždy inhibičně. Mezi nespecifické inhibitory AP, které váží zinek do silnějšího komplexu než je vazba s enzymem, patří např. EDTA, KCN, cystein, *o*-fenantrolin a kyselina 8-hydroxychinolin-5-sulfonová. AP je aktivována hořečnatými, kobaltnatými a manganatými ionty.

Placentární AP je nejstabilnějším izoenzymem, biologický poločas rozpadu je 7 dní. Vyskytuje se pouze u vyšších primátů. Přírodní forma je vázaná na membránu, rekombinantní je upravena tak, že je sekretována do extracelulárního prostoru. Rekombinantní AP (resp. gen pro AP) se pro tyto jedinečné vlastnosti používá jako reporterový gen pro kinetickou analýzu genové exprese a promotorové aktivity u buněčných linií.



Obrázek 8: Model molekuly alkalické fosfatázy. N-konec je naznačen modře, C-konec červeně. Vpravo aktivní centrum s atomy zinku (fialově zbarveny) vázanými na fosfátovou skupinu (oranžová), žlutě je naznačen atom hořčíku, který aktivuje AP, zdroj internet – www.umich.edu a www.wikimedia.org

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce
DMEM/F-12 médium	Cambrex (Lonza)
BV293s médium	
Pro293S médium	Cambrex (Lonza)
FCS	Cambrex (Lonza)
HS	Cambrex (Lonza)
Glukóza	Sigma-Aldrich
L-glutamin	Applichem
DMSO	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin PEI, PEI-MAX	Polysciences
Trypsin	Cambrex (Lonza)
Kit na stanovení alkalické fosfatázy	BioVendor – Laboratorní medicína
Kit na purifikaci plasmidové DNA	Genomed
Fyziologický roztok	
Restrikční endonukleázy XhoI, NheI, NotI	New England Biolabs
Polymeráza Phusion Hotstart	Finnzymes

sterilní destilovaná voda, isopropanol, ethanol, NaCl, agaróza, tryptofanová modř, ethidium bromid

4.2 Přístroje a materiál

- sterilní box třídy II biohazardu (Esco Labculture)
- spektrofotometr EL 808 (Biotek) a Thermo Fisher ND-1000 (Scientific Nanodrop)
- centrifuga 6K15 (Sigma) a Spectrofuge 16M (Labnet)
- termostatované orbitální třepačky Lab-Therm (Kühner Switzerland) a Infors HT (Labotron)
- termostat Kendra Heracell 240 (Heraeus)
- thermocycler PTC-150HB MJ (Research)
- kryosystém Cryostorage Rack System (Taylor-Wharton)
- kahan Ultra Fire (Orange Scientific)
- vortex Bio Vortex V1 (Biosan)
- zařízení pro gelovou elektroforézu (Owl Scientific)
- kity pro purifikaci plasmidové DNA (Genomed)
- světelný mikroskop

mikropipety, špičky na mikropipety, zkumavky Eppendorf, Petriho misky, Bürkerova komůrka, čtverhranné skleněné lahve 100 ml a 250 ml (Schott Duran), 24ti jamkové destičky (Orange Scientific), kryovialky, centrifugační zkumavky 10 ml a 50 ml, plastové lahve pro tkáňovou kultivaci OrFlasks T-75 cm² (Orange Scientific)

4.3 Buňky

4.3.1 Kultivace buněk

V kryogenním boxu (teplota -195 °C) uchovávané buňky HEK 293 a HEK 293 EBNA1 byly rozmrazeny a dány do kultivačního média DMEM/F-12 v lahvích T-75. Médium bylo obohaceno 10 % fetálního bovinního séra FCS (fetal calf serum). Druhý den bylo odsáto staré médium obsahující zbytky dimethylsulfoxidu (DMSO), který se používá při zamrazování buněk jako kryoprotektivní agens, a přidáno 20 ml čerstvého média DMEM/F-12 s 10 % FCS (tj. 18 ml média a 2 ml séra). U buněk HEK 293 EBNA1 bylo do média přidáno 50 µl antibiotika hygromycin, takže výsledná koncentrace činila 0,5 µg/ml.

Po dosažení zhruba 90 % konfluence byly buňky odděleny od povrchu lahví pomocí 0,25% roztoku trypsinu a byly dány do čerstvého média BV293s s 2 % koňského séra (třetina původního objemu).

4.3.2 Adaptace buněk na bezsérovou kultivaci

Narostlé buňky kultivované adherentně v BV293s médiu s 2 % HS byly setřepány (bez použití trypsinu), z 20 ml původního objemu bylo 17 ml suspenze převedeno do čtyřhranných skleněných lahví (objem 250 ml) a doplněno čerstvým BV293s médiem na objem 50 ml. Podíl séra se tak snížil z 2 % na hodnotu 0,7 %. Lahve byly umístěny na orbitální třepačku v termostatu s CO₂ atmosférou (37 °C, rel. vlhkost 95 %). Po nárůstu buněk na hodnotu přibližně 2.10⁶ ml⁻¹ (tj. po 3 až 5 dnech od převodu buněk do lahví) byly buňky zcentrifugovány a dány do čerstvého BV293s média bez séra. Přešlo se tak na bezsérovou kultivaci.

4.3.2 Suspenzní kultivace

Buněčná suspenze adaptovaná na bezsérovou kultivaci byla přepasážována každých 3 až 5 dní kvůli výměně média. Někdy byla suspenze ředěna tak, že byl odebrán a odstraněn určitý objem suspenze a zbytek doplněn čerstvým BV293s médiem (bez séra). Takto bylo postupováno při velkém růstu buněk. Objem média s buňkami byl udržován na hodnotě 50 ml. Lahve byly umístěny na orbitální třepačku (200 rpm), kultivace probíhala v modifikované atmosféře (5 % CO₂) při teplotě 37 °C a relativní vlhkosti 95 %. Šroubovací uzávěry na lahvích byly otevřeny o čtvrtinu jedné otáčky.

Počet buněk byl zjišťován pomocí Bürkerovy komůrky, viabilita buněk byla stanovena pomocí barvení tryptofanovou modří, kdy mrtvé buňky se obarví na modro, zatímco živé zůstávají bezbarvé.

4.3.3 Zamrazování buněk

Zamrazují se buňky narostlé v médiu DMEM/F-12 s 10 % FCS o konfluenci asi 90 %. Buňky byly odděleny od povrchu kultivační lahve pomocí trypsinu. Trypsinizace byla poté ukončena přidavkem plného média (tj. média se sérem) a buňky zcentrifugovány. Buněčný pelet byl resuspendován v zamrazovacím médiu (4ml DMEM/F-12; 0,5 ml FCS; 0,5 ml DMSO). Do kryovialek pak byly pipetovány alikvoty, kryovialky byly zamotány do gázy a alobalu a umístěny do mrazáku s teplotou -80 °C na několik dní. Poté byly skladovány v kryogenním systému s náplní tekutého dusíku.

4.4 Plasmidová DNA

4.4.1 Příprava

Plasmidy pcDNA /SEAP byly připraveny amplifikací PCR produktu SEAP pomocí Phusion HotStart polymerázy z klonu cDNA (MGC: 104591, IMAGE: 30330997) s příslušnými primery.

Vzniklý PCR produkt byl naštěpen restrikčními enzymy a včleněn pomocí T4 ligázy do vektoru plasmidu, který byl také naštěpen stejnými restrikčními enzymy.

Kmen *E. coli* TOP 10F byl transformován vzniklou ligační směsí a byl vyset na LB agaru s ampicilinem, jeho koncentrace činila 100 µg/ml. Narostlé resistantní kolonie byly testovány elektroforézou pomocí vektor-insert specifických primerů na přítomnost plasmidu ve svých buňkách.

Správnost klonování byla na závěr ověřena sekvenováním DNA (MWG Biotech, Německo).

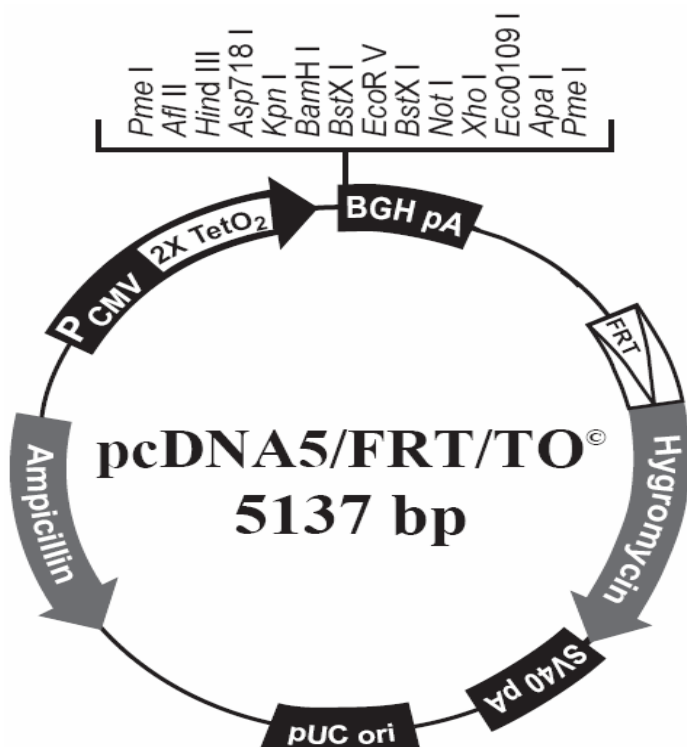
4.4.1.1 Plasmid pcDNA5/FRT/TO/SEAP

U plasmidu pcDNA5/FRT/TO byly použity tyto primery:

5' - CGTAAAGCTT**GCC**ACCATGGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG -3' (zvýrazněná část je sekvence rozpoznávaná restrikční endonukleázou HindIII)

5'-GCAT**CTCGAG**TCAACCCGGGTGCGCGGCGTCG -3' (zvýrazněná část je sekvence rozpoznávaná restrikční endonukleázou XhoI)

Plasmidový vektor i SEAP byly štěpeny restrikčními endonukleázami HindIII a XhoI.



Obrázek 9: Mapa plasmidu *pcDNA5/FRT/TO*, zdroj Invitrogen

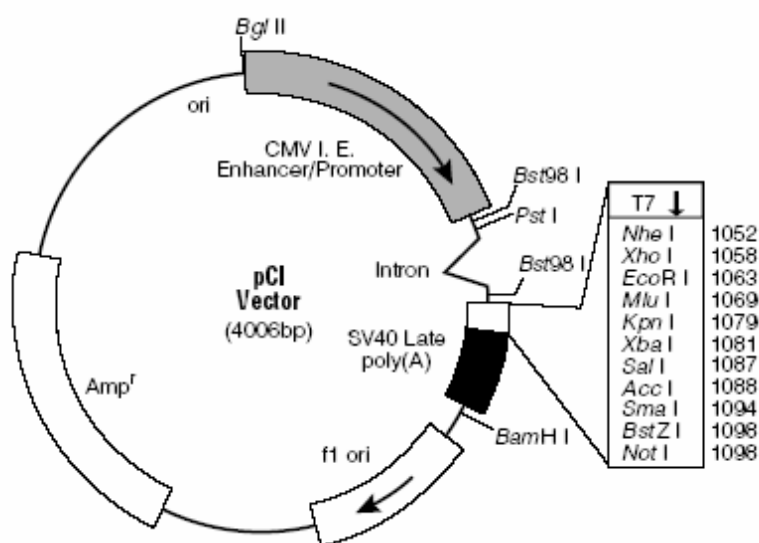
4.4.1.2 Plasmid *pCI/SEAP*

U plasmidu *pCI* byly použity tyto primery:

5'- ATATG**GATC**CTCTGCTAGCGCCACCATGGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG -3' –
zvýrazněná část je sekvence rozpoznávaná restriční enzymem *NheI*

5'- GCAT**CTCGAG**TCAACCCGGGTGCGCGGCGTCG -3' – zvýrazněno místo
rozpoznávané restriční enzymem *XhoI*.

Plasmidový vektor i *SEAP* byly štěpeny restričními endonukleázami *NheI* a *XhoI*.



Obrázek 10: Mapa plasmidu *pCI*, zdroj Invitrogen

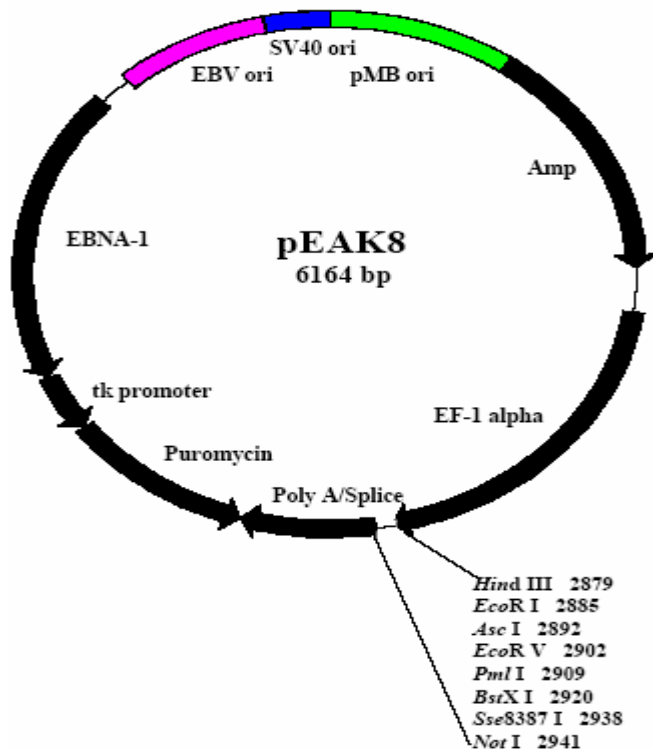
4.4.1.6 Plasmid pEAK8/SEAP

U plasmidu pEAK8 byly použity tyto primery:

5'- GATCAAGCTTGCTAGCCACCATGGTGCTGCTGCTGCTGCT -3' – zvýrazněné místo je rozpoznáváno restričním enzymem HindIII

5'- CTGTCTCGAGGCGGCCGCTACGTACGTTATCAGTCGGTGGTGCCGGCGGGG -3' – zvýrazněno místo, které rozpoznává enzym NotI

Plasmidový vektor i SEAP byly štěpeny restričními endonukleázami HindIII a NotI.



Obrázek 14: Mapa plasmidu pEAK8, zdroj Invitrogen

4.4.1.7 Srovnání jednotlivých vektorů

Jednotlivé vektory použité na přípravu expresních plasmidů se liší v mnoha ohledech – velikostí vektoru, různými expresními promotory, přítomností intronů atd. Z hlediska epizomální replikace v buňkách HEK293 EBNA1 je lze rozdělit do dvou skupin – vektory obsahující sekvence EBNA a EBNA ori, které využívají potenciálu epizomální replikace, a vektory, které neobsahují tyto sekvence a nejsou proto schopny se v buňkách replikovat.

Tabulka 2: Srovnání některých vlastností použitých expresních vektorů

Vektor	expresní promotor	intron	EBNA ori	EBNA
pEAK8	EF-1	ne	ano	ano
pESV1	SV40 late, SV40 early	SV40 VP1	ano	ano
pCEP4	CMV	ne	ano	ano
pcDNA 3.1	CMV	ne	ne	ne
pCI	CMV	chimerický	ne	ne
pcDNA5/FRT/TO	CMV	ne	ne	ne

4.4.2 Izolace a purifikace plasmidové DNA

Izolace byla provedena pomocí kitu pro izolaci plasmidové DNA (Genomed).

Z Petriho misky byla pomocí vyžíhané kličky odebrána jedna kolonie a resuspendována v 1,5 ml LB média s ampicilinem. Tato suspenze byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C na třepačce (220 rpm) – startovací kultura.

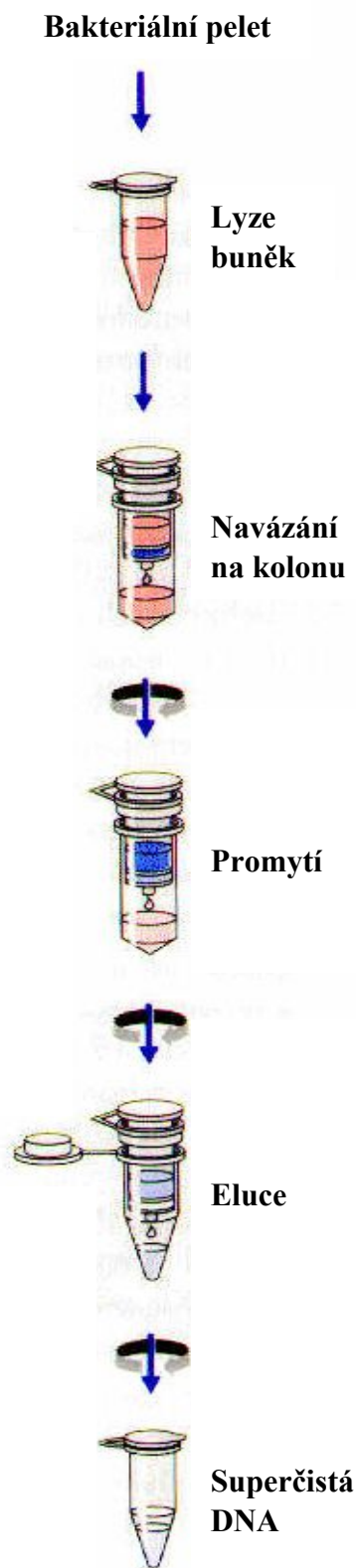
Další den bylo zaočkováno 100 ml LB média pomocí 200 µl startovací kultury a kultivováno přes noc na třepačce při 37 °C.

Buňky pak byly zcentrifugovány při 6 000 g a 4 °C po dobu 15 minut. Takto připravený buněčný pelet byl buď ihned dále použit pro izolaci plasmidové DNA nebo byl zamražen při -20 °C a uchován pro pozdější zpracování.

Bakteriální pelet byl resuspendován v 10 ml E1 pufru (přesné složení jednotlivých pufrů viz přílohy) obsahující RNázu A, poté přidán pufr E2 a celá směs jemně promíchána obracením tuby v ruce. Po 5 minutách byl přidán E3 pufr a směs byla ihned jemně promíchána stejným způsobem. Tím došlo k permeabilizaci a dezintegraci buněk. K separaci tohoto lyzátu byla směs centrifugována při 10 000 g a 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl poté zfiltrován.

Kolona byla ekvilibrována 10 ml E4 pufru a nechána volně vykapat. Poté byl na kolonu dávkován přečištěný supernatant, na sorbentu v pryskyřičném loži kolony se tak zachytila DNA. Po úplném vykapání byla kolona promyta 30 ml E5 pufru a poté byla zachycená DNA eluována pomocí 15 ml E6 pufru. K precipitaci DNA bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu. Po promíchání byla směs centrifugována při 5 000 g a 4 °C po dobu 60 minut. Supernatant byl opatrně dekantován.

DNA pelet byl promyt 5 ml 70% ethanolu a centrifugován při 15 000 g a 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant byl opět opatrně dekantován a pelet DNA byl vysušen v proudu vzduchu. DNA byla pak resuspendována ve 200 µl TE pufru.



Obrázek 15: Purifikace plasmidové DNA (zdroj Qiagen)

Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla měřena pomocí spektrofotometru. Pro další použití byly brány pouze vzorky u nichž čistota plasmidové DNA byla větší než 1,8. Roztok DNA pak byl naředěn na koncentraci 1 µg/µl a filtrován přes sterilní filtr. Roztok DNA byl alikvotován a skladován v mrazáku při teplotě -20 °C.

4.5 Transfekce

4.5.1 Transfekční agens

Byly použity dva typy transfekčních agens – PEI (lineární polyethylenimin s molekulovou hmotností 25 kDa) a PEI-MAX (lineární vysokokapacitní polyethylenimin s molekulovou hmotností 40 kDa). Oba byly připraveny ve vodném roztoku v konečné koncentraci 1 mg/ml, pH bylo upraveno na hodnotu 8,0. Roztoky byly sterilizovány filtrací přes sterilní filtr (0,22 µm) a rozplněny po 1 ml alikvotech. Připravený PEI (PEI-MAX) byl uchováván při teplotě -20 °C.

4.5.2 Proces transfekce

Den před vlastní transfekcí byly buňky zcentrifugovány (5 minut při 1 000 g), supernatant byl odsát a buňky byly resuspendovány v 50 ml čerstvého BV293s média, byla tak zachována původní densita buněk. Buněčná suspenze byla poté kultivována přes noc v termostatu (37 °C) na orbitální třepače.

4.5.2.1 Transfekce v 24ti jamkových destičkách

Byly použity buňky kultivované v densitě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (A) a v densitě $6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (B). Nejprve byly spočítány buňky, poté byl odebrán příslušný objem suspenze tak, aby byl získán dostatečný počet buněk pro transfekci. Tyto odebrané buňky byly zcentrifugovány a resuspendovány v 12 ml BV293s média, vznikla tak buněčná suspenze v densitě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Poté bylo do každé jamky dáno 0,5 ml této nové suspenze.

Byly připraveny sterilní roztoky DNA (plasmid pcDNA5/SEAP) s 150 mM NaCl a PEI (resp. PEI-MAX) také s 150 mM NaCl. Poměr DNA a PEI (PEI-MAX) byl 1:5 a 1:6 dle tabulky 3, finální koncentrace DNA byla 2,5 µg/ml média.

Tabulka 3: Příprava transfekčních směsí, objem pro 3 jamky

poměr DNA:PEI	1:5		1:6	
PEI	18,8	µl	24,8	µl
150 mM NaCl	63,8	µl	57,8	µl
DNA	4,13			µl
150 mM NaCl	82,5			µl

Poté byly přidány jednotlivé roztoky PEI (PEI-MAX)/NaCl do zkumavek s DNA/NaCl, mírně protřepány na vortexu, nechány inkubovat 10 minut a pak bylo 50 μ l transfekční směsi napipetováno do příslušné jamky 24 jamkové desky (pracovalo se s triplikáty).

24ti jamková deska byla umístěna na orbitální třepačku (200rpm) v termostatu a kultivována při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

Po čtyřech hodinách bylo přidáno do každé jamky 0,5 ml BV293s média. Odběr vzorků probíhal vždy třetí, šestý a desátý den po transfekci, bylo odebráno 50 μ l média z každé jamky. U vzorků byla hned měřena aktivita SEAP pomocí spektrofotometru nebo byly zamrazeny při teplotě -20 °C.

V dalším průběhu byl na základě výsledků vybrán jako transfekční agens PEI a jediný poměr DNA:PEI – 1:5. Také byly dále používány pouze buňky kultivované ve vysoké hustotě – cca $6 \cdot 10^6$ ml⁻¹. Příprava transfekčních směsí se pak řídila dle tabulky 4.

Tabulka 4: Příprava transfekčních směsí, objem pro 4 jamky

poměr DNA:PEI	1:5				
PEI	27,5	μ l	DNA	5,5	μ l
150 mM NaCl	82,5	μ l	150 mM NaCl	104,5	μ l

Byly použity plasmidy pcDNA5, pcDNA3.1, pCI, pEBSV1, pCEP4 a PEAK8, všechny s reporterovým genem SEAP. Postup přípravy byl stejný (viz výše).

4.5.2.2 Transfekce v čtyřhranných lahvích

Buňky byly spočítány, poté odebrán příslušný objem média s buňkami (25 milionů buněk na jednu láhev), zcentrifugován a buněčný pelet byl resuspendován v čerstvém BV293s médiu. Vzniklá suspenze byla rozplněna po 12,5 ml do 6 lahví s hustotou buněk $2 \cdot 10^6$ ml⁻¹.

Jako transfekční agens byl použit PEI, poměr DNA:PEI byl 1:5. Byly připraveny do Eppendorfek roztoky DNA/NaCl a PEI/NaCl dle tabulky 5.

Tabulka 5: Příprava transfekčních směsí, objem na jednu láhev

poměr DNA:PEI	1:5				
PEI	172	μ l	DNA	34,4	μ l
150 mM NaCl	516	μ l	150 mM NaCl	653	μ l

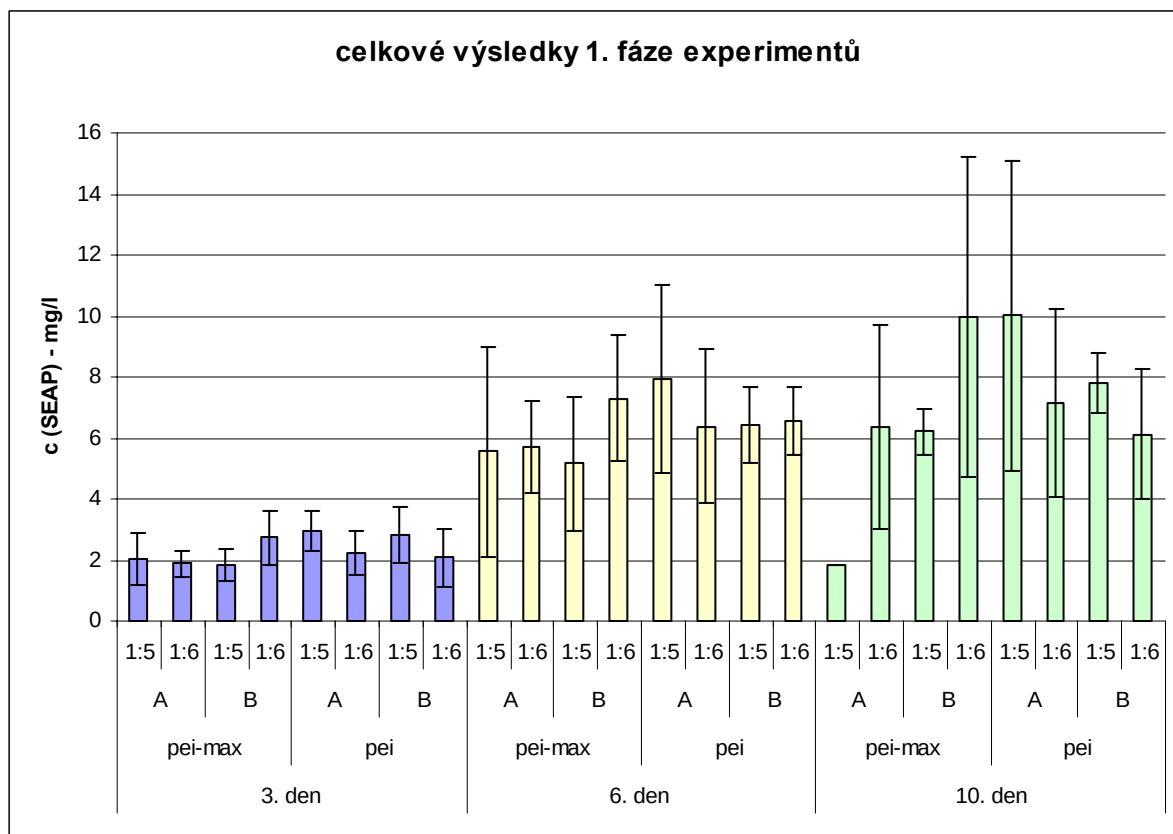
Po smíchání PEI a DNA byla směs vortexována a nechána inkubovat 10 minut. Poté bylo pipetováno 1250 μ l směsi do skleněné lahve s buněčnou suspenzí. Lahve byly umístěny na orbitální třepačku a buňky byly inkubovány při standardních podmínkách (37 °C, 5 % CO₂). Po 4 hodinách bylo přidáno do každé lahve 12,5 ml čerstvého BV293s média, celkový objem tak činil 25 ml.

Třetí, šestý a desátý den po transfekci byly odebírány 100 μ l vzorky pro měření aktivity AP. Vzorky byly ihned měřeny nebo byly zamrazeny při teplotě -20 °C.

v použitých HEK 293 EBNA1 buňkách. Transfekce probíhaly ve 24ti jamkových deskách v objemu 1 ml na jamku. Proces s testováním plasmidů byl později převeden do většího objemu (25 ml) v třepaných lahvích. Transfekční desky i třepané lahve byly umístěny na třepače a inkubovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.

5.1 Úvodní testování

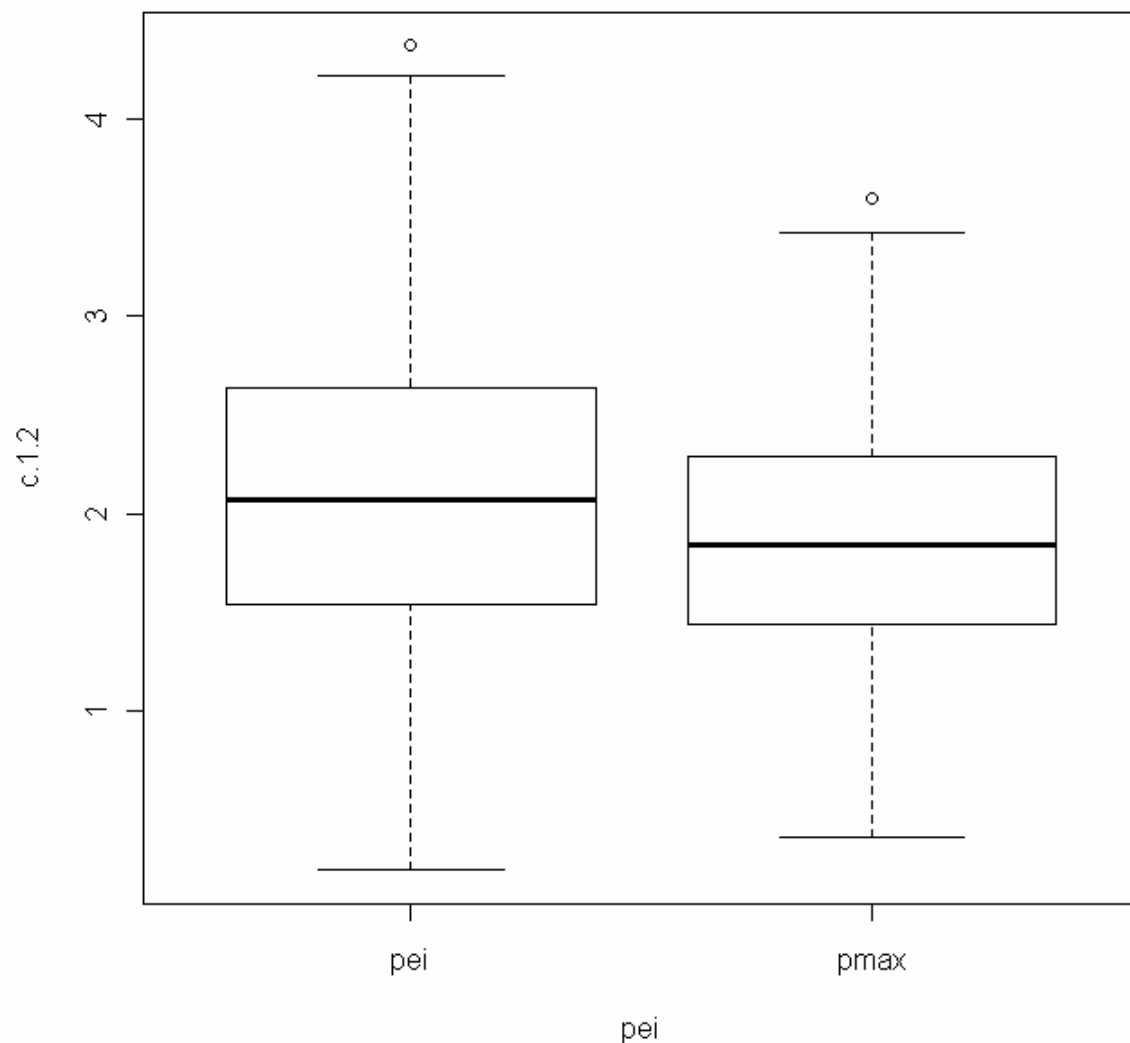
V této fázi práce byly testovány dva polyethyleniminy (PEI a PEI-MAX), dva poměry DNA:PEI (1:5 a 1:6) a vliv kultivačních podmínek na buňky před transfekcí. Byl použit plasmid pcDNA5/SEAP. Následující grafy jsou výsledkem jednoho experimentu. Při zpracování dat byly vyřazeny extrémně odlehlé hodnoty (celkově tímto způsobem byla vyřazena jedna hodnota) a také záporné hodnoty (vyřazeny dvě hodnoty). Data byla testována vícerozměrnou ANOVA.



Obrázek 17: Graf celkových výsledků získaných v první fázi práce. Každý sloupec je průměrem hodnot exprese ze tří opakování.

5.1.1 Porovnání účinnosti dvou různých polyethyleniminů

Cílem bylo určit a vybrat pro pozdější experimenty jeden typ polyethyleniminu. K dispozici byly dva polyethyleniminy – PEI (25 kDa) a PEI-MAX (40 kDa).

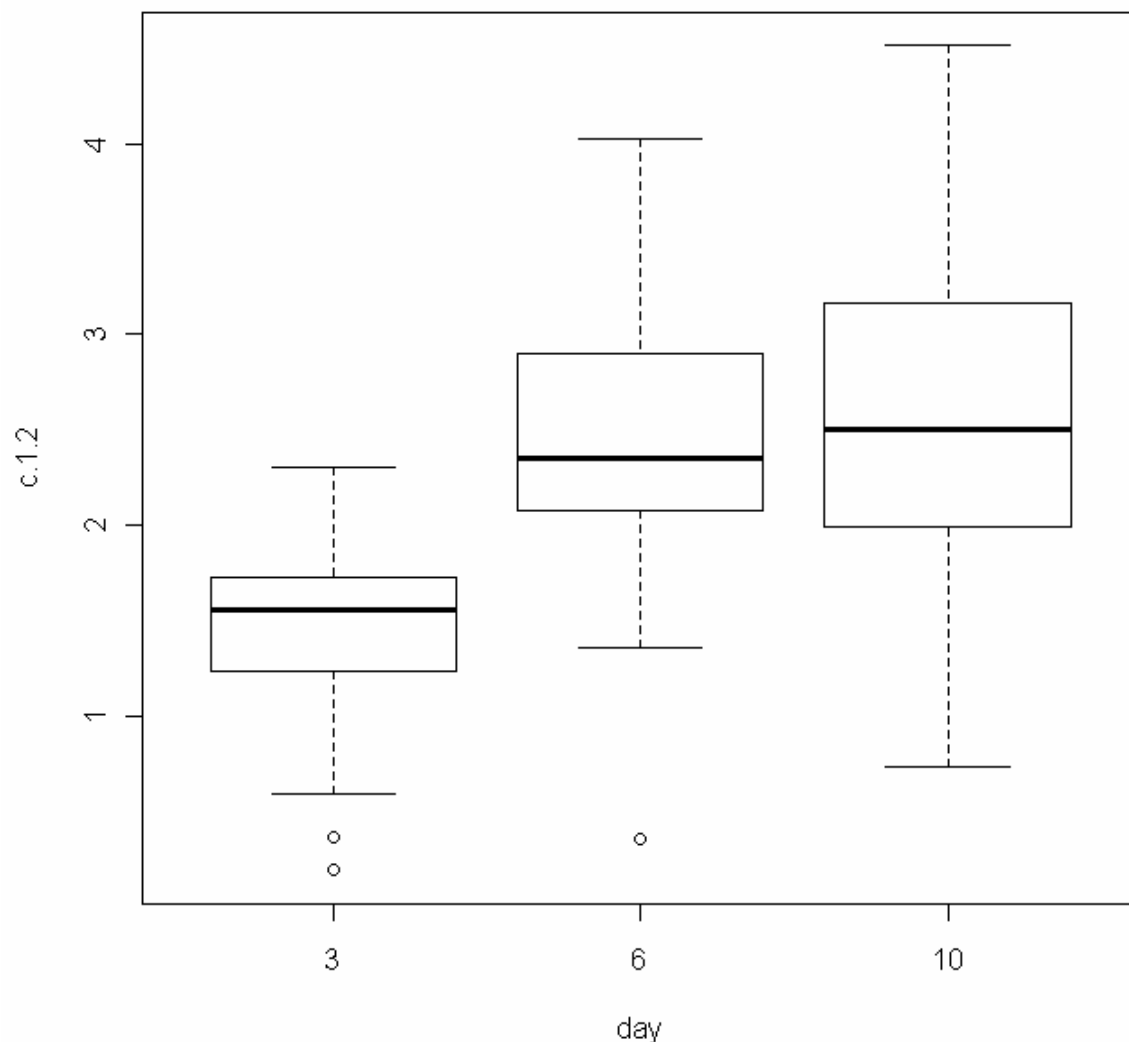


Obrázek 18: Boxplot - Porovnání účinnosti transfekce při použití PEI (25 kDa) a PEI-MAX (40 kDa). Osa y (c.l.2) udává odmocninu z hodnoty koncentrace SEAPu (mg/l). Rozdíl v koncentraci SEAP byl statisticky významný ($p=0,0048$). Graf shrnuje data dvou opakování experimentu a celkem 36 nezávislých měření.

Statistická analýza prokázala rozdíl mezi těmito dvěma PEI, vyšší exprese byla dosažena pomocí polyethyleniminu s molekulovou hmotností 25 kDa (PEI) – 4 mg/l, exprese u PEI-MAX byla 3,6 mg/l. Proto byl také v další fázi experimentů vybrán PEI.

5.1.2 Porovnání exprese v různé dny odběru vzorku

Vzorky byly odebírány vždy 3., 6. a 10. den po transfekci.

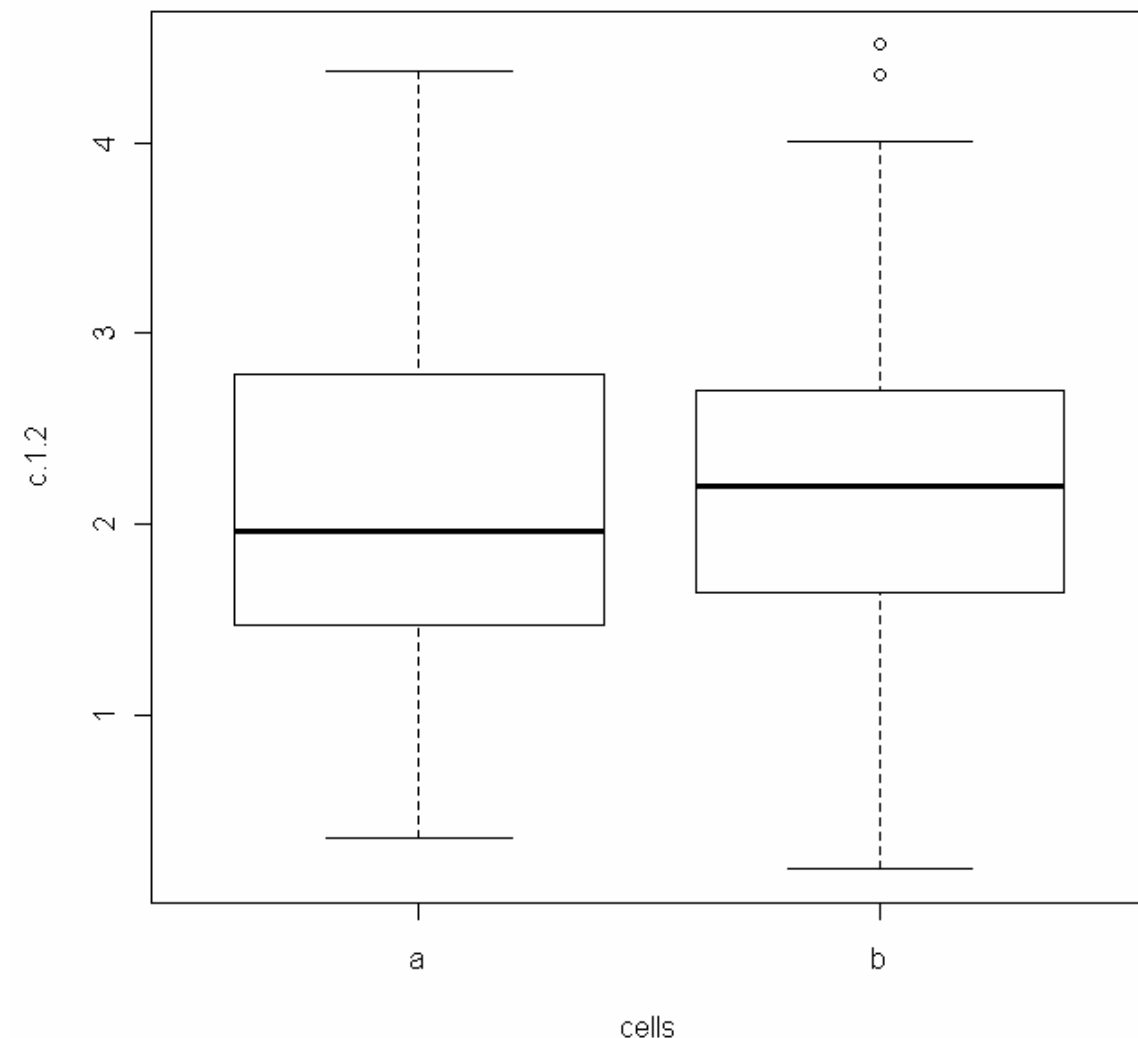


Obrázek 19: Boxplot - vliv dne odběru na velikost exprese SEAPu. Osa x: dny odběru vzorků – 3., 6. a 10. den po transfekci. Osa y (c.1.2) udává odmocninu z hodnoty koncentrace SEAPu (mg/l). Rozdíl v koncentraci SEAP byl statisticky významný ($p=2 \cdot 10^{-16}$). Graf shrnuje data tří opakování experimentu a celkem 72 nezávislých měření.

Graf i statistická analýza naměřených dat prokázaly rozdíly mezi expresí v jednotlivých dnech odběru vzorků. 3. den byla exprese nejnižší – 2,25 mg/l. Nejvyšší exprese byla 10. den po transfekci – 6,2 mg/l.

5.1.3 Vliv density buněk na produkci SEAPu

Byl zkoumán vliv kultivačních podmínek na buňky před vlastní transfekcí. Byly kultivovány buňky A) v densitě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ a buňky B) v densitě $6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Koncentrace buněk při transfekci byla $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

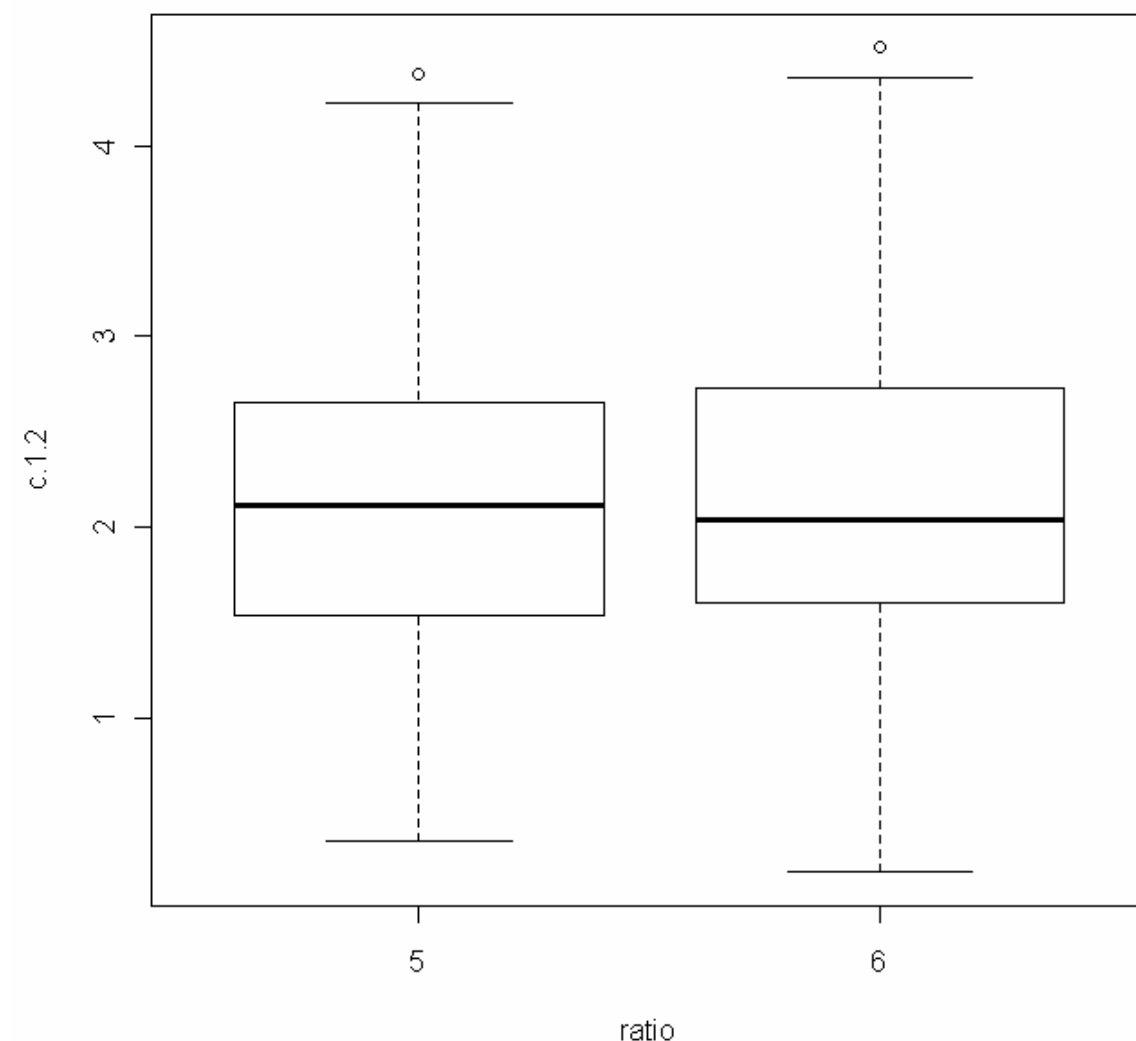


Obrázek 20: Boxplot - Vliv kultivačních podmínek před transfekcí na produkci SEAPu. Osa x: a) buňky byly kultivovány v densitě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$, b) v densitě $6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Osa y (c.1.2) udává odmocninu z koncentrace SEAPu (mg/l). Rozdíl v koncentraci SEAP nebyl statisticky významný ($p > 0,05$). Graf shrnuje data tří opakování experimentu a celkem 36 nezávislých měření.

Statistická analýza ukázala, že není rozdíl mezi buňkami kultivovanými v nižší a vyšší densitě.

5.1.4 Porovnání různých poměrů DNA:PEI

Na základě předchozí práce a dat v ní prezentovaných byly ještě dále testovány dva poměry DNA:PEI – 1:5 a 1:6 – protože při vyšších poměrech se už dále nezvyšovala produkce SEAPu.

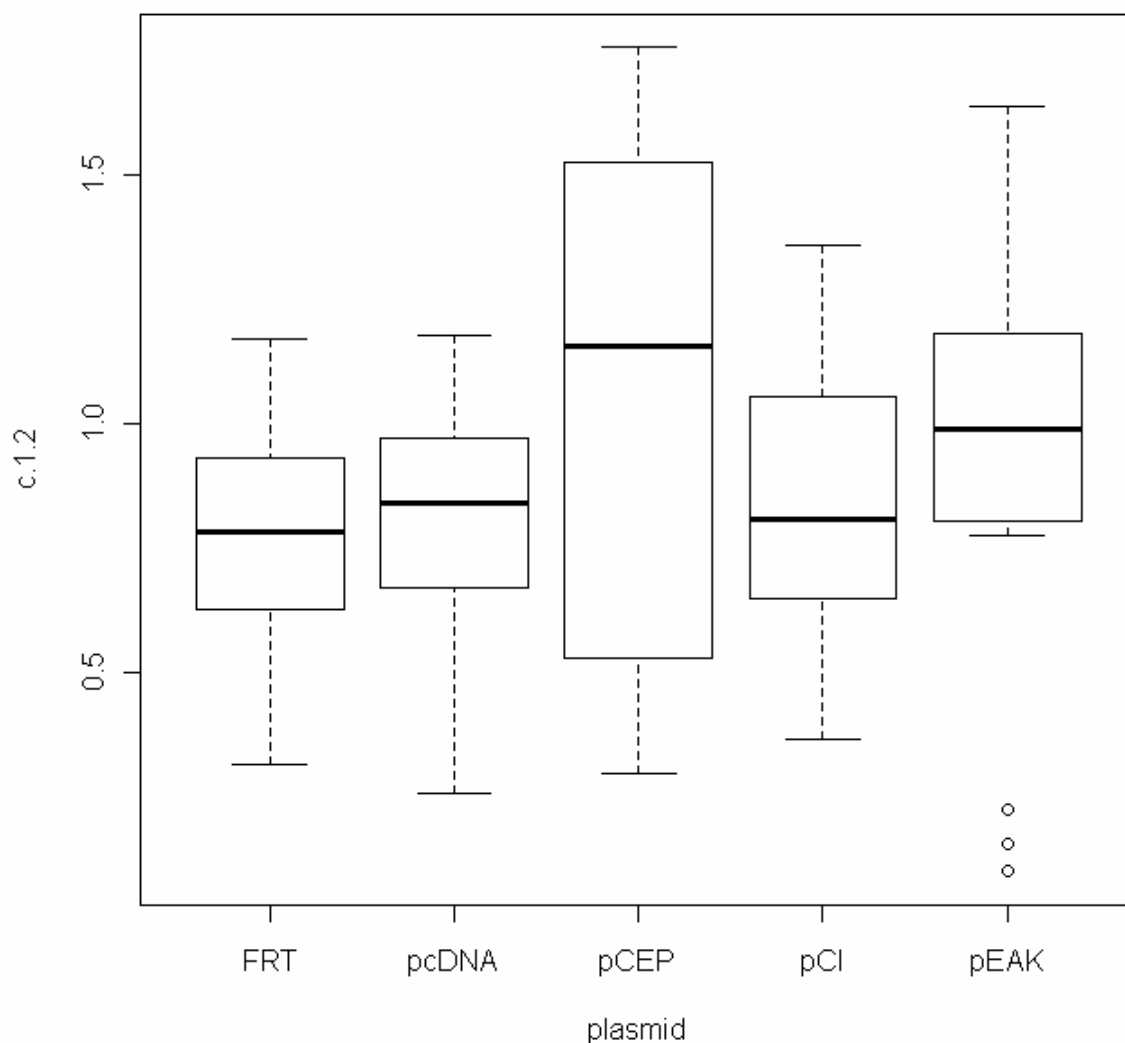


Obrázek 21: Boxplot – vliv poměru DNA:PEI na produkci SEAPu. Osa x: 5 značí poměr DNA:PEI 1:5 a 6 značí poměr 1:6. Osa y (c.1.2) udává odmocninu z koncentrace SEAPu (mg/l). Rozdíl v koncentraci SEAP nebyl statisticky významný ($p > 0,05$). Graf shrnuje data tří opakování experimentu a celkem 36 nezávislých měření.

Statistická analýza naměřených dat neprokázala rozdíl mezi poměrem DNA:PEI 1:5 a 1:6.

5.2 Porovnání 6 plasmidů

Cílem bylo srovnání exprese jednotlivých plasmidů za stejných podmínek. V této fázi experimentů byl použit jediný polyethylenimin (PEI), poměr DNA:PEI (1:5) a buňky kultivované ve vysoké hustotě ($6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Bylo porovnáváno 6 plasmidů – pcDNA3.1/SEAP, pcDNA5/SEAP, pCI/SEAP, pEBSV1/SEAP, pCEP4/SEAP a pEAK8/SEAP. Při zpracování dat byly vyřazeny záporné hodnoty (vyřazeno 13 hodnot).

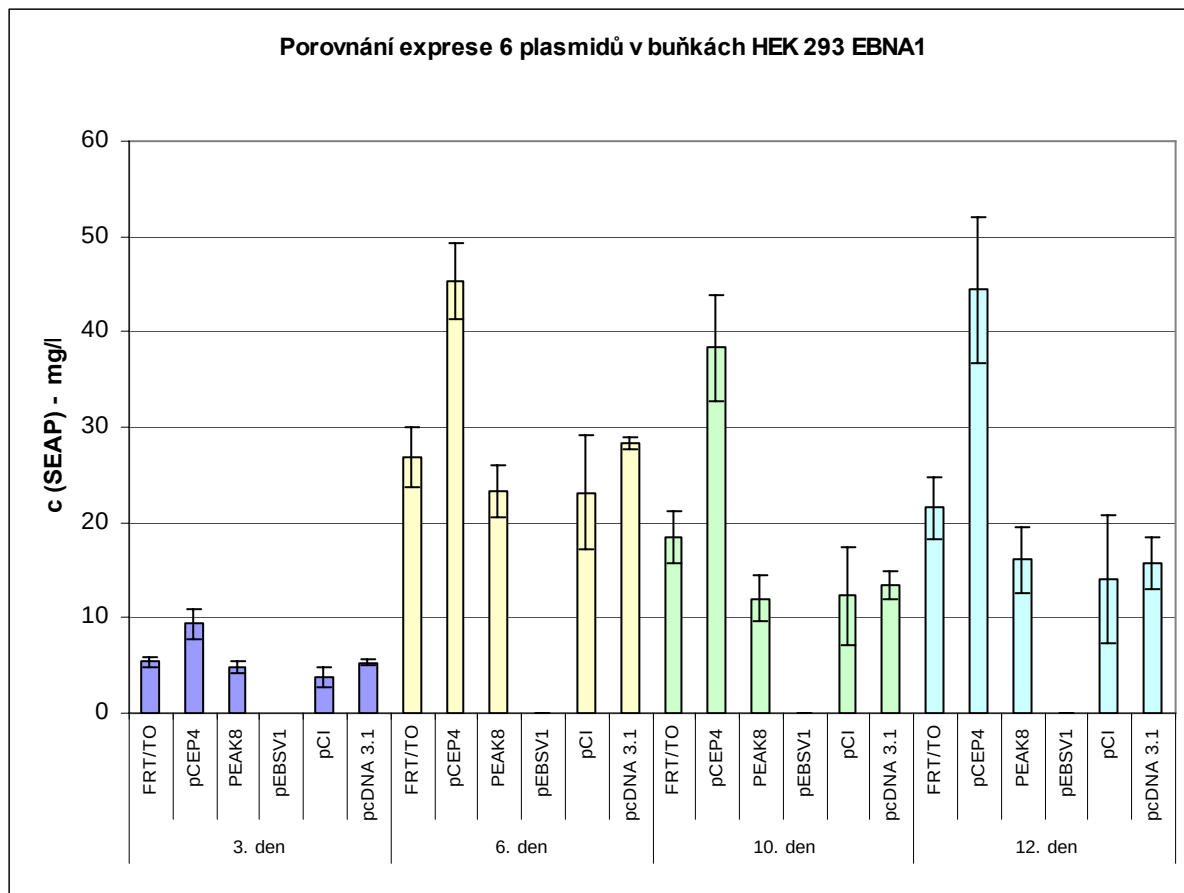


Obrázek 22: Boxplot – velikost exprese různých plasmidů. Na ose x: FRT (pcDNA5/SEAP), pcDNA (pcDNA3.1/SEAP), pCEP (pCEP4/SEAP), pCI (pCI/SEAP) a pEAK (pEAK8/SEAP). Osa y (c.1.2) udává odmocninu z koncentrace SEAPu (mg/l). Rozdíl v koncentraci SEAP byl statisticky významný ($p=2 \cdot 10^{-16}$). Graf shrnuje data tří opakování experimentu a celkem 12 nezávislých měření.

Vzorky byly odebírány 6. den po transfekci. V experimentech byly použity plasmidy uchovávané 3 měsíce v mrazáku při teplotě -20°C . Nejvyšší exprese byla u plasmidu pCEP4/SEAP – 1,5 mg/l. Exprese u plasmidu pEBSV1/SEAP byla nulová, proto nebyl zahrnut do statistického vyhodnocení experimentálních dat. TukeyHSD test prokázal

signifikantní rozdíly mezi expresí plasmidu pCEP4/SEAP a všemi ostatními plasmidů ($p < 0,05$).

Experiment porovnání plasmidů byl proveden i s čerstvě připravenými plasmidů.

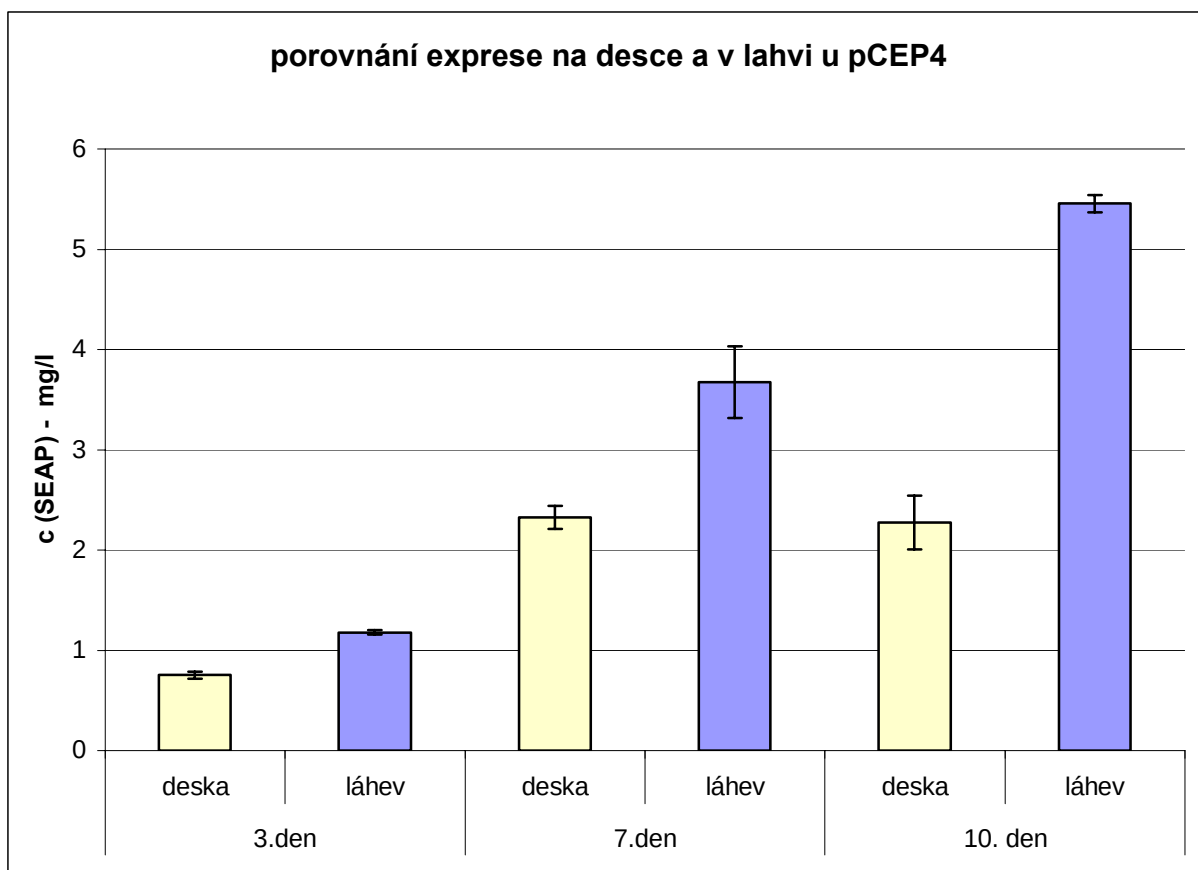


Obrázek 23: Porovnání různých plasmidů a průběh jejich exprese v různé dny odběru vzorků. Tento experiment nebyl opakován, každý sloupec reprezentuje průměr tetraplikátu na jedné transfekční desce. Byl použit PEI a poměr DNA:PEI 1:5. Byly použity čerstvě připravené plasmidy.

Nejvyšší exprese byla u plasmidu pCEP4/SEAP – 50 mg/l, exprese u plasmidu pEBSV1/SEAP byla nulová. Exprese u pCEP4/SEAP zůstala konstantní i 12. den po transfekci, zatímco u ostatních plasmidů exprese klesla po 6. dnu.

5.3 Scale-up transfekčního systému

Cílem experimentu bylo porovnat expresi plasmidů v transfekční desce a ve větším objemu třepaných lahví. Transfekční systém byl převeden z malého objemu jamek transfekční desky (1 ml) do většího objemu třepaných lahví (25 ml). Byl zachován poměr DNA:PEI – 1:5 – a byly použity buňky kultivované ve vysoké hustotě. Množství chemikálií se zvětšilo stejně jako se zvětšil objem, tj. 25krát.



Obrázek 24: Srovnání exprese plasmidu pCEP4 v transfekční desce a třepaných lahvích. V případě desky představuje každý sloupec průměr tetraplikátu, u lahví představuje průměr duplikátu.

Tímto způsobem byly srovnávány kromě plasmidu pCEP4/SEAP ještě plasmidy pCI/SEAP a pcDNA5/SEAP. Expresi v systému třepaných lahví byla u každého plasmidu vždy vyšší než v transfekční desce, exprese plasmidu pCEP4/SEAP byla v obou případech nejvyšší.

6. DISKUSE

V první části experimentů byly testovány tři parametry: vliv kultivace buněk před vlastní transfekcí, druh polyethyleniminu a poměr DNA:PEI. Experimenty probíhaly za stejných podmínek jako v práci Kyselá z roku 2008 (především stejné kultivační médium;), proto bylo možno vycházet ze závěrů v této dřívější práci uvedených. Poměr DNA:PEI byl podrobněji studován již dříve (Kyselá, 2008), proto byly testovány jen dva poměry DNA:PEI.

V další části experimentů bylo cílem porovnat exprese u různých plasmidů, které lze rozdělit na dvě skupiny – obsahující EBNA1 antigen a plasmidy neobsahující tento antigen.

6.1 Vliv kultivačních podmínek před transfekcí na produkci SEAPu

Byl studován vliv kultivačních podmínek na buňky před vlastní transfekcí, především jejich hustota. Buňky byly kultivovány v hustotě $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ resp. $6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$, transfekce probíhala při stejné hustotě buněk – $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Základním předpokladem bylo, že buňky kultivované ve vyšší hustotě budou produkovat větší množství r-proteinu. Přestože předchozí práce (Kyselá, 2008) naznačila, že buňky kultivované ve vyšší hustotě produkují signifikantně větší množství SEAPu, v této práci se to neprokázalo. Rozdíl v expresi byl při zpracování tří opakování statisticky nevýznamný ($p < 0,01$). Přesto byly v dalších experimentech používány buňky kultivované ve vysoké hustotě.

6.2 Porovnání různých poměrů DNA:PEI

Podrobnější a rozsáhlejší testování tohoto parametru za stejných podmínek bylo provedeno dříve (Kyselá, 2008). V této dřívější práci byl nejlepší poměr DNA:PEI 1:7. Při použití kultivačního média Ex-Cell 293 CDM byl optimální poměr 1:11 (Muller, 2005). Na základě těchto předchozích prací byly ještě dále testovány dva poměry DNA:PEI – 1:5 a 1:6 – protože při vyšších poměrech se už dále nezvyšovala produkce SEAPu. Pokud by se produkce v těchto poměrech statisticky nelišila, bylo by z hlediska ekonomičnosti i toxicity PEI používání nižšího množství PEI (tj. poměr DNA:PEI 1:5) výhodnější.

Výsledky ukázaly statisticky nevýznamný ($p < 0,01$) rozdíl mezi poměry DNA:PEI 1:5 a 1:6, proto byl v dalších experimentech používán poměr 1:5. Nejvyšší exprese byla v obou případech 15 mg/l.

6.3 Porovnání dvou polyethyleniminů

Tento vliv na efektivitu transfekce již byl také studován (Kyselá, 2008). K dispozici byly dva polyethyleniminy – PEI (25 kDa) a PEI-MAX (40 kDa), oba zakoupeny ve stejné firmě (Polyscience). V předchozí práci nebyl prokázán rozdíl mezi těmito polyethyleniminy, resp. rozdíl byl statisticky nevýznamný. V této práci byl rozdíl statisticky významný ($p > 0,01$), lepším transfekčním činidlem byl PEI. V dalších experimentech byl proto používán tento polyethylenimin.

6.4 Porovnání různých plasmidů

V této fázi experimentů byl vybrán jeden transfekční agens (PEI), jeden poměr DNA:PEI (1:5) a používány buňky kultivované ve vysoké densitě ($6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Cílem bylo porovnat exprese SEAPu u plasmidů obsahujících specifické sekvence umožňující epizomální replikaci v buňkách HEK 293 EBNA1 s plasmidy, které tyto sekvence neobsahují. Byly připraveny tři plasmidy obsahující EBNA1 antigen – pCEP4/SEAP, pEBSV1/SEAP a pEAK8/SEAP – a tři plasmidy bez EBNA1 sekvencí – pCI/SEAP, pcDNA 3.1/SEAP a pcDNA5/SEAP. Předpokladem byla větší exprese u plasmidů s EBNA1 sekvencemi.

Výsledky částečně potvrdily předpokládanou nejvyšší expresi SEAPu u plasmidu pCEP4/SEAP, při použití čerstvě připraveného plasmidu dosahovala exprese 50 mg/l. Exprese plasmidu pEBSV1/SEAP byla ve všech experimentech nulová, pravděpodobně došlo k chybě při izolaci a purifikaci tohoto plasmidu. Předpoklad se nenaplnil u plasmidu pEAK8/SEAP. Jeho exprese byla srovnatelná s plasmidy neobsahujícími EBNA1 sekvence, hodnoty expresí těchto plasmidů odpovídaly nejvyšší dosažené expresi plasmidu pcDNA5/SEAP použitého v předchozí práci (Kyselá, 2008). Experiment byl třikrát opakován s 3 měsíce starými plasmidy (uchovávány při -20°C), exprese pak byla řádově nižší (5 mg/l). Je možné, že tyto výsledky byly ovlivněny způsobem skladování při -20°C . Přesto byla exprese plasmidu pCEP4/SEAP stále nejvyšší.

6.5 Převod do většího objemu

Experiment s porovnáváním plasmidů byl nakonec převeden do většího objemu (25 ml) třepaných lahví. Zde byly srovnávány exprese u plasmidů pCEP4/SEAP, pcDNA5/SEAP a pCI/SEAP. Paralelně byl prováděn experiment v 24ti jamkové desce. Předpokladem byla vyšší exprese SEAPu ve větším pracovním objemu, protože kultivace v třepané lahvi zajišťuje buňkám lepší podmínky než malý objem v jamce transfekční desky.

Experiment nebyl opakován, takže výsledky nejsou příliš relevantní, lze je ale srovnávat s výsledky z jiných prací (Kyselá, 2008; Muller, 2005; Pham a kol., 2005). Byl potvrzen předpoklad vyšší exprese při transfekci v třepaných lahvích. Exprese v třepaných lahvích byla téměř dvojnásobná oproti expresi v transfekční desce. Zároveň se potvrdila nejvyšší exprese plasmidu pCEP4/SEAP. Potvrdil se tedy fakt, že transfekční systém lze s úspěchem převést do vyššího objemu (Muller, 2005), čehož se dá v budoucnu využít i v průmyslovém měřítku.

7. ZÁVĚR

Produkce rekombinantních proteinů v savčích buňkách je výborným způsobem přípravy biofarmaceutických látek a lidských terapeutik. Protože transientní techniky exprese zatím neposkytují velká množství r-proteinů, jsou pro svou rychlost využívány v preklinických studiích a základním výzkumu. Je velkou výzvou do budoucna, aby byly transientní techniky využívány průmyslově pro produkování velkých množství r-proteinů. Tomuto cíli měla napomoci tato práce.

V této práci byly optimalizovány některé parametry transientní transfekce buněk HEK 293 EBNA1. V první fázi šlo o kultivační podmínky před transfekcí, byly srovnávány hodnoty exprese u buněk kultivovaných v nižší a vyšší densitě. Dále byly porovnávány účinnosti transfekce u dvou různých polyethyleniminů – PEI (25 kDa) a PEI-MAX (40 kDa). Dále byl porovnáván různý poměr DNA:PEI.

V další fázi byly porovnávány exprese u šesti různých plasmidů, přičemž tři obsahovaly specifické EBNA sekvence a tři neobsahovaly. Všechny plasmidy byly předem připraveny pomocí PCR produktu SEAPu a konkrétních plasmidových vektorů. Čerstvě připravené plasmidy byly použity jen jednou, tento experiment poskytl největší exprese všech plasmidů, u plasmidu pCEP4/SEAP byla exprese až 50 mg/l.

Nakonec byl transfekční systém převeden do většího objemu třepaných lahví (25 ml) a byla srovnávána exprese s malým objemem v transfekční desce.

Na závěr je třeba zmínit i neúspěchy. Nepodařilo se nakultivovat buňky HEK 293, které měly být srovnávány s vylepšenými buňkami HEK 293 EBNA1, jejich adaptace na bezsérovou kultivaci stále provázely potíže. Tyto se nepodařilo do konce práce odstranit, takže se pracovalo jen s buňkami HEK 293 EBNA1.

8. LITERATURA

AIYAR, A., ARAS, S., WASHINGTON, A., SINGH, G. AND LUFTIG, R. B. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of *oriP*-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology Journal*. 2009, 6:29

BALDI, L., MULLER, N., PICASSO, S., JACQUET, R., GIRARD, P., THANH, H. P., DEROW, E., WURM, F. M. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress*. 2005, 21(1):148-153.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1999, 10(5):411-21.

BATARD, P., JORDAN, M., AND WURM, F. Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene*. 2001, 270: 61–68.

BEHR, J.P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjugate Chem*. 1994, 5 (1994) 382–389.

BERTSCHINGER, M., BACKLIWAL, G., SCHERTENLEIB, A., JORDAN, M., HACKE, D. L. R., WURM, F. M. Disassembly of polyethylenimine-DNA particles in vitro: Implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery. *Journal of Controlled Release*. 2006, 116 (2006): 96–104.

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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92(16):7297-301.

BRUNNER, S., FURTBAUER, E., SAUER, T., KURSA, M., WAGNER, E. Overcoming the nuclear barrier: Cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Molecular Therapy*. 2002, 5(1):80-86.

CLAMME, J.-P., KRISHNAMOORTHY, G., ME'LY, Y. Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1617 (2003): 52–61.

CLARK, E. D. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, 12(2):202-207.

COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1973, 70: 3240-3244

DEROUAZI, M., GIRARD, P., VAN TILBORGH, F., IGLESIAS, K., MULLER, N., BERTSCHINGER, M., WURM, F. M. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004, 87(4):537-45.

DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293- EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(2): e9

ERHARDT, C., SCHMOLKE, M., MATZKE, A., KNOBLAUCH, A., WILL, C., WIXLER, V., LUDWIG, S. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction*. 2006, 6, 179 – 184

GIRARD, P., DEROUAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M. 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002, 38 (1-2): 15-21.

GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. *Molecular Biotechnology: principles on application of recombinant DNA*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. ISBN 1-55581-269-4. 760 p.

GODBEY, W. T., BARRY, M. A., SAGGAU, P., WU, K. K., MIKOS, A. G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res*. 2000, 51(3):321-8.

GODBEY, W. T., WU, K. K., MIKOS, A. G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 1999a, 60(2-3):149-60.

GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., NAIRU, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 1977, 36, 59-72.

GROSJEAN, F., BATARD, P., JORDAN, M., WURM, F. M. S-phase synchronized CHO cells show elevated transfection efficiency and expression using CaPi. *Cytotechnology*. 2002, 38(1-2): 57-62.

IIDA, T., MORI, T., KATAYAMA, Y., NIIDOME, T. Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex. *Journal of Controlled Release*. 2007, 118 (2007): 364–369.

JORDAN, M., SCHALLHORN, A., WURM, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res*. 1996, 24(4): 596-601.

KOST, T. A., CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol*. 1999, 10(5): 428-33.

KYSELÁ, H. Optimization of recombinant protein production in animal cell culture. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2008. 56 p. Head of diploma thesis Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

LECHARDEUR, D., SOHN, K. J., HAARDT, M., JOSHI, P. B., MONCK, M., GRAHAM, R. W., BEATTY, B., SQUIRE, J., O'BRODOVICH, H., LUKACS, G. L. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Therapy*. 1999, 6(4): 482-497

LINDELL, J., GIRARD, P., MULLER, N., JORDAN, M., WURM, F. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1676(2): 155-61.

LUNGWITZ, U., BREUNIG, M., BLUNK, T., GÖPFERICH, A.. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 60 (2005): 247–266.

MANNISTO, M., RONKKO, S., MATTO, M., HONKAKOSKI, P., HYTTINEN, M., PELKONEN, J., URTTI, A. The role of cell cycle on polyplex-mediated gene transfer into a retinal pigment epithelial cell line. *J Gene Med*. 2005, 7(4): 466-76.

MULLER, N. Transient gene expression for rapid protein production: Studies and optimizations under serum-free conditions. Ph.D. Thesis. École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005. 120 p.

MULLER-ZELLENBERG, U., MULLER, M. Drug therapy and pharmacogenomics—hopes and facts. *Wien Med Wochenschr*. 2005, 155(3-4): 45-9.

PEREIRA, C., BOTELHO, F., TAVARES, B., LOURENCO, C., BAETA, C., PALMA-CARLOS, A. G., LIMA, J., CHIEIRA, C. Kinetics and dynamic evaluation of specific immunotherapy. *Allerg Immunol*. 2004, (Paris) 36(10): 375-86.

PHAM P. L., KAMEN A., AND DUROCHER Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular biotechnology*. 2006, 34 (2006): 225-237

PHAM, P. L., PERRET, S., CASS, B., CARPENTIER, E., C., ST-LAURENT, G., BISSON, L., KAMEN, A., DUROCHER, Y. Transient gene expression in HEK293 cells: Peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*. 2005, 90(3): 332–344

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. *Biotechnol Bioeng*. 2003, 84(3): 332-42.

VON HARPE, A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*. 2000, 69 (2): 309-22.

WURM, F., BERNARD, A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*. 1999, 10(2): 156-9.

Další zdroje:

GENOMED Plasmid purification mini/midi/maxi protocol 2003. Dostupné z
<<http://www.genomed-dna.com/pdf/Star-PDFs/JETSTAR-Protocol.pdf>> [cit. 3. 5. 2009]

Alkalická fosfatáza, BioVendor – Laboratorní medicína a.s., dostupné z
<http://lm.biovendor.cz/download.php?file=S:\BIOVENDOR%20BVLM%20DATAB%C1ZE\DiaSys\N%E1vody\Rutinn%ED%20reagencie\%C8esk%E9%20verze\L%20Alkalick%E1%20fosf%E1t%E1za%2010061.pdf&_full_path=1> [cit. 1. 5 2009]

Lonza: DMEM/ F-12 medium složení, dostupné z
<<http://www.lonzabioscience.com/Content/Documents/Bioscience/DMEMF12.pdf>>
[cit. 2. 5. 2009]

9. ZKRATKY

AFM	mikroskopie atomárních sil
AP	alkalická fosfatáza
BV293s	médium pro buňky HEK 293 (BioVendor)
CaPi	precipitace fosforečnanem vápenatým
CHO	vajíčka křečka čínského
DEAE	diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	dimethylsulfoxid
EBNA	jaderný antigen z Epstein-Barr viru
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FCS	fetální bovinní sérum
HEK	lidské embryonální ledviny
HS	koňské sérum
LB	Luria Bertani médium
MCS	mnohočetné klonovací místo
PEI	poly(ethylenimin)
PCR	polymerázová řetězová reakce
r-protein	rekombinantní protein
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
293 CDM	chemicky definované médium pro buňky HEK293

10. PŘÍLOHY

10.1 Složení média DMEM/F-12

Tabulka 6: Složení DMEM/F-12 média

Komponenta	koncentrace
CaCl ₂ (anhyd.)	116,00 mg/l
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,05 mg/l
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,42 mg/l
KCl	311,83 mg/l
MgCl ₂ •6H ₂ O	61,00 mg/l
MgSO ₄ •7H ₂ O	100,00 mg/l
NaCl	6,99950 mg/l
NaHCO ₃	1,20000 g/l
Na ₂ H ₂ P0 ₄ •7H ₂ O	134,00 mg/l
NaH ₂ P0 ₄ •H ₂ O	62,50 mg/l
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,43 mg/l
Glucose	3,15100 g/l
HEPES	3,57450 g/l
Hypoxanthine	2,04 mg/l
Linoleic Acid	0,04 mg/l
Lipoic Acid	0,10 mg/l
Phenol Red•Na	8,00 mg/l
Putrescine•2HCl	0,08 mg/l
Sodium Pyruvate	110,00 mg/l
Thymidine	0,36 mg/l
L-Alanine	4,46 mg/l
L-Arginine•HCl	147,35 mg/l
L-Asparagine•H ₂ O	7,50 mg/l
L-Aspartic Acid	6,66 mg/l
L-Cysteine•HCl•H ₂ O	17,56 mg/l
L-Cystine	24,00 mg/l
L-Glutamic Acid	7,36 mg/l
L-Glutamine	365,10 mg/l
L-Alanyl-L-Glutamine (UltraGlutamine 1)	868,00 mg/l
Glycine	18,76 mg/l
L-Histidine•HCl•H ₂ O	31,48 mg/l
L-Isoleucine	54,37 mg/l
L-Leucine	58,96 mg/l
L-Lysine•HCl	91,37 mg/l
L-Methionine	17,24 mg/l
L-Phenylalanine	35,48 mg/l
L-Proline	17,27 mg/l
L-Serine	26,26 mg/l
L-Threonine	53,56 mg/l

10.2 Složení média BV293s

Tabulka 7: *Médium BV293s – složení*

složka	koncentrace
DMEM/F-12	1 litr
pantotenát vápenatý	4 mg/l
Pluronic F-68	1 g/l
diethanolamin	3 µg/l
fyton Difco select	2 g/l
pepton z laktalbuminu	2 g/l
lipidový koncentrát	1 mg/l
insulin lidský	5 g/l
transferrin ATF lidský	5 g/l

10.3 Složení LB média

Tabulka 8: *Složení LB média*

složka	koncentrace
trypton	10 g/l
kvasničný extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

10.4 Složení pufrů z purifikačního kitu Genomed

Tabulka 9: Složení pufrů pro purifikaci plasmidové DNA (Genomed). K E1 pufru je ještě třeba přidat 100 µg/ml RNázy A.

<u>Solution E1</u> (Cell Resuspending)		Store at RT
50 mM	Tris	
10 mM	EDTA	
	HCl ad pH 8.0	
The RNase-containing solution E1 must be stored at 4 °C.		
<u>Solution E2</u> (Cell Lysis)		Store at RT
200 mM	NaOH	
1.0 %	SDS (w/v)	
<u>Solution E3</u> (Neutralization)		Store at RT
3.1 M	potassium acetate	
	acetic acid ad pH 5.5	
<u>Solution E4</u> (Column Equilibration)		Store at RT
600 mM	NaCl	
100 mM	sodium acetate	
0.15 %	TritonX-100	
	acetic acid ad pH 5.0	
<u>Solution E5</u> (Column Washing)		Store at RT
800 mM	NaCl	
100 mM	sodium acetate	
	acetic acid ad pH 5.0	
<u>Solution E6</u> (DNA Elution)		Store at RT
1250 mM	NaCl	
100 mM	Tris	
	HCl ad pH 8.5	
		RT = room temperature

10.5 Statistika

10.5.1 Statistický program R

R program verze 2.9.0 (2009-04-17) © The R Foundation for Statistical Computing, veřejně dostupný software s otevřeným kódem (open source). Byl vylepšen o balíček Rcmdr (grafické rozhraní), založen na balíčku tcltk.

10.5.2 Úvodní testování

Shapiro-Wilk normality test:

data: exp123b c.1.2

W = 0.9872, p-value = 0.06354

Multiway ANOVA:

```
multiway AnovaModel. <- (lm(c.1.2 ~ cells*day*exp*ratio, data=exp123b)
```

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cells	0.1931	0.6651		0.41592
day	50.440	2	86.7027	< 2.2e-16 ***
exp	10.4382	17	9417	8.668e-08 ***
ratio	0.0611	0.2093		0.64790
cells:day	0.0772	0.1318		0.87656
cells:exp	6.7262	11	5622	1.974e-05 ***
day:exp	9.0704	7	7953	8.707e-06 ***
cells:ratio	0.6991	2	4024	0.12303
day:ratio	0.2102	0	3614	0.69721
exp:ratio	7.1622	12	3101	1.026e-05 ***
cells:day:exp	0.0934	0	0802	0.98833
cells:day:ratio	0.0692	0	1181	0.88865
cells:exp:ratio	2.6212	4	5053	0.01242 *
day:exp:ratio	0.5914	0	5082	0.72977
cells:day:exp:ratio	0.1134	0	0972	0.98323
Residuals	48.868	168		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiway ANOVA:

```
multiway AnovaModel. <- (lm(c.1.2 ~ cells*day*exp*pei*ratio, data=exp12b))
```

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
cells	0.56071	2.0701		0.153570
day	27.92342	51.5498		8.596e-16 ***
exp	2.64891	9.7805		0.002355 **
pei	2.25641	8.3311		0.004845 **
ratio	2.96061	10.9313		0.001345 **
cells:day	0.05682	0.1049		0.900526
cells:exp	6.47101	23.8926		4.240e-06 ***
day:exp	5.61492	10.3657		8.630e-05 ***
cells:pei	1.00601	3.7144		0.056998 .
day:pei	0.97312	1.7965		0.171593
exp:pei	0.42571	1.5718		0.213086
cells:ratio	0.10481	0.3869		0.535442
day:ratio	0.35452	0.6545		0.522059
exp:ratio	1.50361	5.5515		0.020564 *
pei:ratio	1.99831	7.3782		0.007872 **
cells:day:exp	0.06482	0.1196		0.887402
cells:day:pei	0.19962	0.3684		0.692843
cells:exp:pei	1.10501	4.0799		0.046274 *
day:exp:pei	1.66212	3.0684		0.051229 .
cells:day:ratio	0.25312	0.4673		0.628183
cells:exp:ratio	0.28561	1.0547		0.307101
day:exp:ratio	0.00232	0.0042		0.995762
cells:pei:ratio	0.42501	1.5691		0.213480
day:pei:ratio	0.32562	0.6012		0.550289
exp:pei:ratio	0.08921	0.3295		0.567327
cells:day:exp:pei	0.35342	0.6533		0.522682
cells:day:exp:ratio	0.06322	0.1166		0.890060
cells:day:pei:ratio	0.59952	1.1068		0.334920
cells:exp:pei:ratio	0.15301	0.5648		0.454228
day:exp:pei:ratio	1.13672	2.0984		0.128419
cells:day:exp:pei:ratio	0.3872	0.7144		0.492150
Residuals	25.1880	93		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

10.5.3 Porovnání plasmidů

Shapiro-Wilk normality test:

data: exp678 c.1.2

W = 0.989, p-value = 0.2185

Multiway ANOVA:

```
multiway AnovaModel. <- (lm(c.1.2 ~ day*exp*plasmid, data=exp678))
```

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
day	7.62182	236.7752		< 2.2e-16 ***
exp	3.90642	121.3539		< 2.2e-16 ***
plasmid	2.45654	38.1569		< 2.2e-16 ***
day:exp	0.55074	8.5533		4.058e-06 ***
day:plasmid	1.36678	10.6145		3.121e-11 ***
exp:plasmid	0.83988	6.5220		4.643e-07 ***
day:exp:plasmid	2.098216	8.1478		5.892e-13 ***
Residuals	1.9636	122		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> TukeyHSD(fm1, "plasmid", ordered = TRUE)
```

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

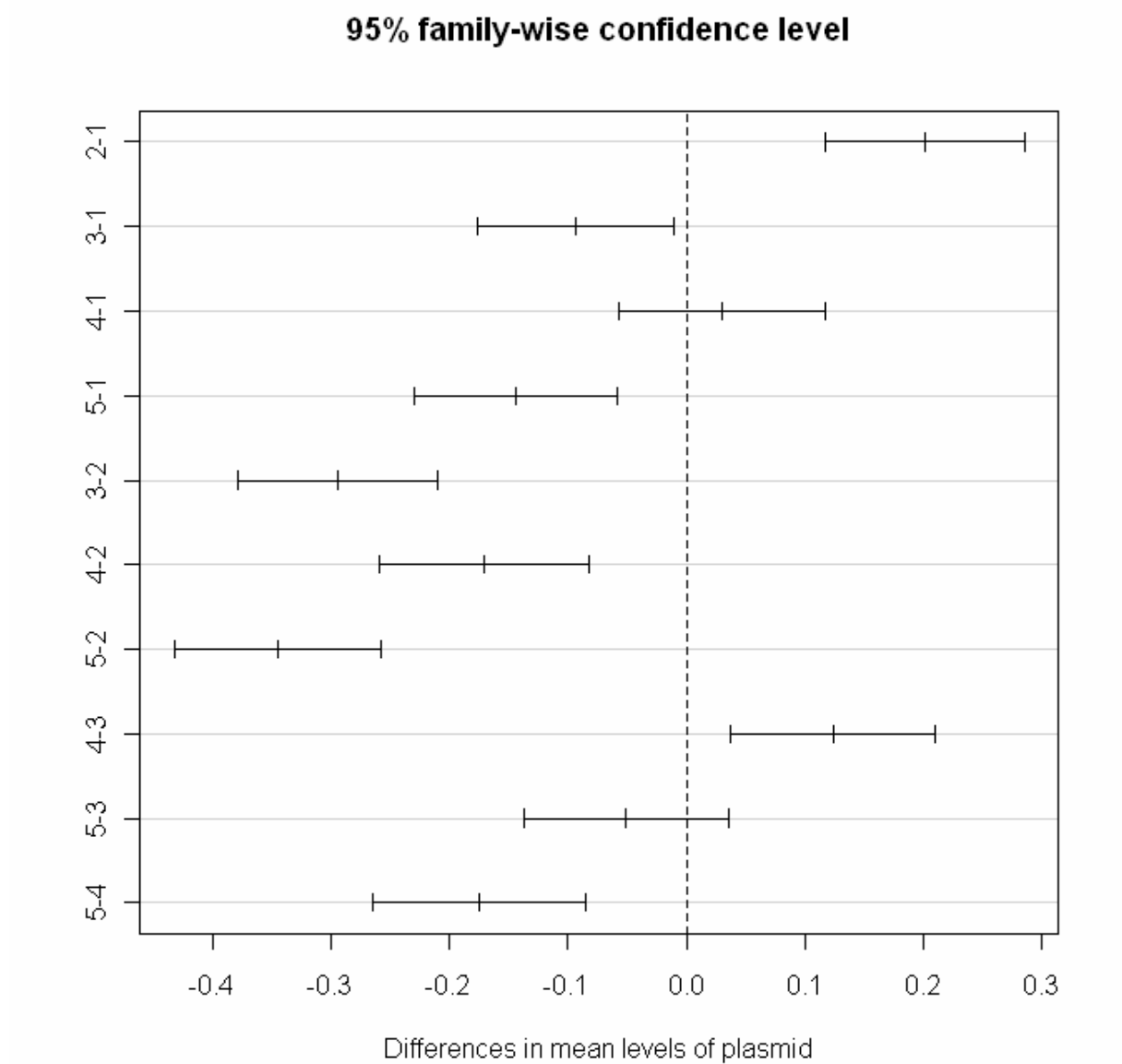
factor levels have been ordered

```
Fit: aov(formula = c.1.2 ~ day * exp * plasmid, data = exp678d)
```

\$plasmid

	diff	lwr	upr	p adj
3-5	0.05103250	-0.03504158	0.1371066	0.4739349
1-5	0.14412128	0.05804720	0.2301954	0.0000868
4-5	0.17454269	0.08457418	0.2645112	0.0000037
2-5	0.34546763	0.25823008	0.4327052	0.0000000
1-3	0.09308878	0.01028869	0.1758889	0.0192145
4-3	0.12351019	0.03666872	0.2103517	0.0012744
2-3	0.29443513	0.21042621	0.3784440	0.0000000
4-1	0.03042141	-0.05642006	0.1172629	0.8681337
2-1	0.20134635	0.11733743	0.2853553	0.0000000
2-4	0.17092494	0.08293015	0.2589197	0.0000036

1 = pCI/SEAP, 2 = pCEP4/SEAP, 3 = pcDNA3.1/SEAP, 4 = pEAK8/SEAP,
5 = pcDNA5/SEAP



Obrázek 25: Grafické vyjádření Tukeyho srovnávacího testu. Na ose y: 1 = *pCI/SEAP*, 2 = *pCEP4/SEAP*, 3 = *pcDNA3.1/SEAP*, 4 = *pEAK8/SEAP*, 5 = *pcDNA5/SEAP*