

Istraživanje učinkovitosti transfekcije CHO DP-12 stanica u mediju obogaćenom proteinskim hidrolizatima lana

Kozarić, Vlatka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:003455>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Vlatka Kozarić

**ISTRAŽIVANJE UČINKOVITOSTI
TRANSFEKCIJE CHO DP-12
STANICA U MEDIJU
OBOGAĆENOM PROTEINSKIM
HIDROLIZATIMA LANA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Igora Slivca te uz pomoć Marijana Logarušića, mag. ing.

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogače lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ (šifra projekta: IP-2016-06-3848), kojeg vodi prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček, a financiran je od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).



Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu i Marijanu Logarušiću, mag. ing. na prenesenom znanju, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Hvala i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na savjetima, pristupačnosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom čitavog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

ISTRAŽIVANJE UČINKOVITOSTI TRANSFEKCIJE CHO DP-12 STANICA U MEDIJU OBOGAĆENOM PROTEINSKIM HIDROLIZATIMA LANA

Vlatka Kozarić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058208343

Sažetak: U posljednje vrijeme sve je veći interes za primjenom uljnih pogača sjemenki lana zbog njihovog visoko vrijednog sastava u kojem oko 20 % čine proteini. Kako je već ranije utvrđeno da proteinski hidrolizati lana potiču rast CHO DP-12 stanica, u ovom radu se otišlo korak dalje te je ispitan njihov utjecaj na uspješnost transfekcije CHO DP-12 stanica. Transfekcija se provodila i na adherentnim i na suspenzijskim stanicama. Korištena su dva transfekcijska sredstva, *FuGene 6* i *Turbofect* te nekoliko različitih hranjivih medija (PowerCHO, DMEM, ExCell, CD CHO, FidCHO). Transfekcija je zabilježena samo u DMEM mediju uz *FuGene 6* transfekcijsko sredstvo, bez dodatka hidrolizata lana. Ispitivanjem različitih omjera mase plazmida (μg) i transfekcijskog sredstva (mL), ustanovljeno je da najveću učinkovitost transfekcije daje omjer 1:6. Iako je utvrđeno da proteinski hidrolizati lana imaju negativan utjecaj na transfekciju CHO DP-12 stanica, dobiveni rezultati su dobra podloga za daljnja istraživanja u cilju pronalaska optimalnih uvjeta transfekcije.

Ključne riječi: *transfekcija, proteinski hidrolizati, CHO DP-12 stanična linija, lan, hranjivi medij*

Rad sadrži: 40 stranica, 8 slika, 10 tablica, 42 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (mentor)
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (članica)
4. doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjenska članica)

Datum obrane: 07. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

INVESTIGATION OF THE EFFICIENCY OF CHO DP-12 CELL TRANSFECTION IN MEDIA ENRICHED WITH FLAXSEED PROTEIN HYDROLYSATES

Vlatka Kozarić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058208343

Abstract: The application of flaxseed oil cake attracts great interest due to its highly valuable composition and protein content of about 20 %. As it has been already known that flax protein hydrolysates stimulate the growth of CHO DP-12 cells, this work went a step further and their impact on the efficiency of CHO DP-12 cells transfection has been examined. Transfection was performed on both adherent and suspension cells. Two transfection reagents were used, *FuGene 6* and *Turbofect*, and several different nutrient media (PowerCHO, DMEM, ExCell, CD CHO, FidCHO). Transfection was recorded only in DMEM medium with *FuGene 6* transfection reagent, without adding flax hydrolyzates. Examination of different ratios of plasmid mass (μg) and transfection reagent (mL), revealed that the ratio of 1:6 gives the highest transfection efficiency. Although it has been determined that flax protein hydrolysates have a negative effect on CHO DP-12 cell transfection, the obtained results are good foundation for further research to find optimal transfection conditions.

Keywords: *transfection, protein hydrolysates, CHO DP-12 cell line, flaxseed, cell culture medium*

Thesis contains: 40 pages, 8 figures, 10 tables, 42 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Igor Slivac, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: *Marijan Logarušić, mag. ing.*

Reviewers:

1. Višnja Gaurina Srček, PhD, Full professor (president)
2. Igor Slivac, PhD, Associate professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (member)
4. Teuta Murati, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 7th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	3
2.1.1. Uvjeti uzgoja	3
2.1.2. Stanična linija CHO	4
2.2. MEDIJI ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA	4
2.2.1. Serum kao komponenta hranjivog medija	6
2.2.2. Hidrolizati biljnih proteina.....	7
2.2.3. Hidrolizati proteina lana	7
2.3. TRANSFEKCIJA.....	9
2.3.1. Prolazna transfekcija	11
2.3.2. Stanična transfekcija u biotehnologiji	11
2.3.3. Transfekcijska smjesa	12
2.3.3.1. Transfekcijsko sredstvo	12
2.3.3.2. Plazmid pEGFP-C1.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Kemikalije	15
3.1.2. Uređaji i oprema.....	16
3.1.3. Stanična linija CHO DP-12.....	17
3.1.4. Plazmid pEGFP	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica.....	18
3.2.2. Priprema stanica za transfekciju	18
3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	19
3.2.4. Priprava transfekcijske smjese	20
3.2.4.1. Transfekcija – prvi pokus – usporedba dva transfekcijska sredstva.....	21
3.2.4.2. Transfekcija – drugi pokus – usporedba različitih medija	22
3.2.4.3. Transfekcija – treći pokus.....	22
3.2.4.4. Transfekcija – četvrti pokus – transfekcija uz dodatak proteinskih hidrolizata lana....	23
3.2.5. Određivanje uspješnosti transfekcije	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. ANALIZA USPJEŠNOSTI TRANSFEKCIJE.....	26
5. ZAKLJUČCI	35

6. LITERATURA	36
----------------------------	-----------

1. UVOD

U modernoj prehrambenoj industriji veliki naglasak stavlja se na što efikasnije iskorištavanje nusproizvoda iz procesa. Primjerice, uljna pogača lana kao ostatak nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki lana, može se koristiti kao sirovina u tehnologiji životinjskih stanica (Logarušić i sur., 2019).

Iako se pogača lana dugo vremena smatrala poljoprivrednim otpadom, u posljednje vrijeme raste interes za ovom sirovinom zbog visokog udjela proteina i drugih bioaktivnih komponenata te niza pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje. Proteini sjemenki lana izvor su bioaktivnih peptida koji se oslobađaju mikrobnom fermentacijom, enzimski kataliziranom hidrolizom *in vitro* ili razgradnjom u gastrointestinalnom traktu *in vivo*. Hidroliza proteina je najčešći postupak dobivanja proizvoda s biološkom aktivnošću, tj. bioaktivnih peptida. Biološka aktivnost peptida ovisi o vrsti enzima korištenih za hidrolizu odnosno o tome od kojih se aminokiselina peptidi sastoje i kolika je duljina pojedinih sekvenci. Peptidi dobiveni iz proteina sjemenki lana imaju veliku antioksidativnu aktivnost koja je važna u zaštiti stanica od oksidativnog stresa (Logarušić i sur., 2020).

Mikrookoliš je važan za rast stanica, a definiran je nutritivnim sastavom medija za kulturu stanica. U medij se kao izvor proteina i peptida standardno dodaje serum (5-20 % v/v) koji je kompleksna smjesa makromolekula dobiven iz fetalne krvi teladi. Zbog cijelog niza negativnih strana seruma, pojavila se alternativa u obliku biljnih proteinskih hidroliza. Utvrđeno je da dodatak proteinskih hidrolizata lana u DMEM medij, uz smanjenu koncentraciju seruma, potiče rast CHO DP-12 stanica te u konačnici povećava koncentraciju IgG-a (Logarušić i sur., 2021).

Fiziološke, biološke i farmakološke aktivnosti na razini stanice i tkiva proučavaju se *in vitro* metodama koje također postaju sve važnije u proizvodnji bioloških komponenata poput hormona i cjepiva. Životinjske stanice se općenito uzgajaju u inkubatorima u kontroliranim uvjetima gdje se temperatura održava na 37 °C uz smjesu vlažnog zraka s 5 % CO₂ i 95 % O₂ (Van der Valk i sur., 2010).

Sve veća potrošnja terapijskih monoklonskih antitijela zahtijeva unaprjeđenje proizvodnih procesa, što između ostalog podrazumijeva i optimizaciju medija (Bayat i sur., 2018; Ho i sur., 2013).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj proteinskih hidrolizata uljne pogače sjemenki lana na uspješnost transfekcije CHO DP-12 stanica koje proizvode rekombinantno humano

antitijelo, imunoglobulin (IgG) anti IL-8. Ispitani su različiti uvjeti transfekcije odnosno dva različita transfekcijska sredstva, nekoliko različitih hranjivih medija za uzgoj te različiti omjeri koncentracija pDNA i transfekcijskih sredstava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica glavna je grana moderne biotehnologije, a podrazumijeva uzgoj stanica izoliranih iz različitih tkiva životinja u hranjivom mediju. Njen napredak postignut je povezivanjem istraživanja iz područja medicine, biologije, proteinske kemije i inženjerstva. Primjena kulture životinjskih stanica temelji se na tome da se pojedinačne stanice izdvajaju iz tkiva ili organa te održavaju u umjetnom okolišu i smatraju se zasebnim organizmom u *in vitro* uvjetima. Prednost kulture stanica u odnosu na primjenu tkiva životinja jest činjenica da se rastom u kontroliranim uvjetima kroz više generacija, može dobiti homogena populacija stanica. Genetičko inženjerstvo odnosno primjena tehnologije rekombinantne DNA pruža brojne mogućnosti u smislu proizvodnje različitih proizvoda pomoću kulture životinjskih stanica, poput monoklonskih protutijela i glikoziliranih proteina (Slivac i sur., 2016).

2.1.1. Uvjeti uzgoja

Životinjske stanice se najčešće uzgajaju u kontroliranim uvjetima u inkubatorima pri temperaturi oko 37 °C uz strujanje vlažnoga zraka koji se sastoji od 5 % CO₂ i 95 % O₂. Za postizanje dobre reproducibilnosti eksperimenta, važan je sastav medija za kulturu stanica. Da bi se stanice uspješno održavale što duže vremena, medij mora sadržavati komponente poput nutrijenata i tvari za održavanje pH. Primjer takvog medija je *Eagle's minimal essential medium* (Eagle's MEM ili MEM) koji također sadrži aminokiseline, glukozu i vitamine. Modifikacijom MEM-a dobiven je *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) koji se još uvijek koristi za održavanje primarne stanične kulture i staničnih linija. U osnovne medije se dodaju određene tvari i faktori, a sve s ciljem da se stanice što duže održe živima i da se poveća njihova produktivnost. Najčešće dodavana smjesa za održavanje i proliferaciju stanica je fetalni goveđi serum (FBS, eng. *Fetal Bovine Serum*) koji najbolje služi svrsi te predstavlja standard u današnje vrijeme. FBS je kompleksna smjesa različitih faktora i sadrži velik broj komponenata, poput faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima, hormona itd. koji su esencijalni za rast i održavanje kulture stanica. Ipak, njegova primjena je kontroverzna zbog niza razloga (Van der Valk i sur., 2010).

2.1.2. Stanična linija CHO

Staničnu liniju CHO (*Chinese hamster ovary*) čine epitelne stanice ovarija kineskog hrčka. Linija je uspostavljena imortalizacijom stanica pedesetih godina prošlog stoljeća. Danas je ona jedna od najčešće primjenjivanih staničnih linija za proizvodnju rekombinantnih proteina za terapiju i dijagnostiku (Sharker i Rahman, 2021). CHO stanice imaju brojne kvalitete poput tolerancije na genetičke manipulacije, lakoće prilagodbe na proizvodne procese, velike brzine rasta te sposobnosti provođenja posttranslacijskih modifikacija koje su kompatibilne s humanim. Svaki industrijski proizvodni proces mora slijediti stroge kriterije kako bi se osigurala ponovljivost, usklađenost i kvaliteta. Proces proizvodnje bioterapeutika su jedinstveni pošto se koriste žive stanice u kulturi. CHO stanice su dostigle visoku razinu produktivnosti, a usko grlo kod razvoja procesa uglavnom su *downstream* postupci (Dahodwala i Lee, 2019; Beckmann i sur., 2012).

2.2. MEDIJI ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA

Razvoj medija za kulturu stanica vezan je za početke razvoja kulture stanica. To je vodena otopina različitih spojeva koja osigurava nutritivne (metabolizam) i mikrookolišne (pH, osmolarnost itd.) potrebe stanica. Danas još uvijek pretežu formulacije medija koji sadrže tekuću krvnu komponentu, tzv. serum, životinjskog fetusa, međutim sve je veća potražnja za medijima jasnijeg sastava s dodanim proteinskim izolatima i proteinskim hidrolizatima ili potpuno kemijski definiranim medijima s rekombinantnim proteinima (Ritacco i sur., 2018).

Mediji se razlikuju u svojim formulacijama s obzirom na to za što će se točno koristiti, ali svi imaju isti cilj, a to je opskrba hranjivim tvarima potrebnim za zdravu staničnu diobu i razmnožavanje. U prošlosti su se, zbog jednostavnosti primjene i dostupnosti, koristili kompleksni mediji za biotehnošku proizvodnju rekombinantnih proteina. Tako je primjerice fetalni goveđi serum, kao komponenta medija, štitio stanice od smicanja, promjene pH te od stresa uzrokovanog promjenama razine hranjivih tvari tijekom uzgoja u bioreaktoru. Sirovi materijali, poput seruma, potencijalno mogu sadržavati nepoželjne tvari, a uz to pojavljuju se etički problemi zbog korištenja fetusa koji je donor seruma. Industrija je stoga zamijenila serum s definiranim sirovim materijalima (Hunter i sur., 2018).

Mediji za kulturu animalnih stanica napredovali su do formulacija koje su bez seruma ili kemijski definirane, a u prosjeku sadrže 50 do 100 komponenata grupiranih u supstrate za proizvodnju energije, kelatore, aminokiseline, surfaktante, pH stabilizatore, vitamine, derivate

nukleinskih kiselina, elemente u tragovima, soli, masne kiseline i lipide. Prednost medija bez seruma je između ostalog jednostavniji *down-stream* proces pročišćavanja. Sastav medija može utjecati na posttranslacijske modifikacije proteina čime ima direktan utjecaj na biološku aktivnost proteina (Hunter i sur., 2018).

Harry Eagle razvio je prvi medij s osnovnom formulacijom koja je odgovarala dvjema staničnim linijama, mišjim-L stanicama fibroblasta i HeLa stanicama. Taj je medij sadržavao proizvoljne koncentracije aminokiselina, vitamina, kofaktora, ugljikohidrata i soli te dijalizirani serum. Kasnije je Eagle unaprijedio taj medij i razvio Eagle's MEM medij (EMEM) sastavljen od 28 esencijalnih metabolita koji uz dodatak seruma osiguravaju propagaciju različitih vrsta staničnih linija s vremenom udvostručenja od 18 do 24 sata. Iako ovaj medij sadrži serum, i dalje se koristi kao osnovni medij za kulturu stanica. Modifikacijom EMEM medija dobiven je DMEM medij (Dulbecco and Freeman's DMEM) koji ima četiri puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina u odnosu na EMEM. DMEM (slika 1) je povoljniji medij od EMEM-a jer podržava povećani rast i veću gustoću stanica, a kasnije je korišten kao osnova za brojne *serum-free* medije (Ritacco i sur., 2018).



Slika 1. DMEM medij (Anonymous 1, 2022)

2.2.1. Serum kao komponenta hranjivog medija

Serum je kompleksna smjesa koja sadrži veliki broj komponenata poput faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima, hormona itd. koji su važni za rast i održavanje stanica. Čak 20-50 % komercijalnog FBS-a sadrži viruse. Osnovni medij za uzgoj stanica mora sadržavati takozvanu ITS komponentu što je zapravo smjesa inzulina, transferina i selen. Protein transferin ima glavnu ulogu u prijenosu željeza u stanice, selen se ugrađuje u proteine koji štite stanice od oksidativnog stresa, a inzulin je sastavni dio kulture stanica još od 1924. godine te je i danas najčešći hormon koji se dodaje u medije za uzgoj (Van der Valk i sur., 2010).

Velik broj staničnih linija se još uvijek uzgaja u medijima uz dodatak seruma, ali razvoj znanosti doveo je do toga da se stanice danas mogu uzgajati i u mediju bez seruma. Smanjenu koncentraciju ili potpuni izostanak seruma moguće je nadomjestiti odgovarajućim modifikacijama nutritivnog i hormonalnog statusa medija. Serum kao dodatak mediju ima cijeli niz nedostataka zbog čega ga se sustavno pokušava zamijeniti boljim rješenjima. Problem seruma je njegova fiziološka varijabilnost. Glavne sastavnice seruma su poznate, to su proteini albumin i transferin, ali tu je i veliki broj različitih komponenata kojima ni koncentracija ni aktivnost nisu u potpunosti određene. To su aminokiseline, proteini, hormoni, minerali, lipidi, faktori rasta i slično koji u znatnoj mjeri utječu na rast stanica (Freshney, 2010).

Također često je upitna dostupnost seruma bilo da se radi o ekonomskim ili političkim razlozima ili je u pitanju širenje bolesti među stokom. Što se tiče *downstream* procesa, prisutnost seruma otežava pročišćavanje proizvoda, a uz to ograničava farmaceutsko prihvaćanje proizvoda. Serum je često kontaminiran virusima koji uglavnom nisu štetni za staničnu kulturu, ali su dodatni nepoželjni faktor u cijelom procesu. Kontinuirana uporaba antibiotika tijekom uzgoja stoke predstavlja rizik od kontaminacije primjerice tetraciklinom koji može biti toksičan ili utjecati na transkripciju gena. Uz to što potiče rast, serum ima i inhibitornu aktivnost. Iako stimulacija rasta najčešće prevlada nad inhibicijom, sveukupni učinak kombinacije ove dvije aktivnosti ne može se predvidjeti. Glavne prednosti medija bez seruma su standardizacija sastava medija te jednostavnija validacija industrijskih procesa. Medij bez seruma ima i tu prednost što može biti selektivan za točno određeni tip stanica. Mediji bez seruma naravno imaju i svoje nedostatke (Freshney, 2010).

Korištenje kemijski definiranih medija omogućava dosljednost, a uz to su troškovi proizvodnje manji. Olakšano je provođenje *downstream* procesa kao i dobivanje regulatornih dozvola, a uz to je poboljšana i sigurnost proizvoda. Adaptacija stanica na uvjete bez seruma

postupnim smanjivanjem koncentracije seruma u mediju dugotrajan je i zahtjevan posao (Ozturk i sur., 2004).

2.2.2. Hidrolizati biljnih proteina

U posljednjih 15-ak godina upotreba kemijski definiranih medija je porasla, ali takvi mediji su i dalje relativno skupi. Također adaptacija stanica na uvjete bez seruma je dugotrajna i stresna za stanice, a uz to ne daje uvijek željene rezultate. Prilagodba se ipak može izvesti i na drugačiji način, a to je primjenom biljnih proteinskih hidrolizata. Kroz povijest su se takvi hidrolizati koristili za smanjenje ili zamjenu seruma u osnovnim medijima poput DMEM medija ili za obogaćivanje CDM (*Chemically Defined Medium*) medija. Hidrolizati biljnih proteina se proizvode enzimskom ili kiselinskom razgradnjom biljnog materijala koji potječe od sirovina bogatih proteinima poput sjemenki soje, suncokreta, lana, pamuka, sezama, uljane repice, palme i slično. Produkti razgradnje su peptidi, slobodne aminokiseline, minerali, ostaci ulja te neke komponente kojima je biološka aktivnost nepoznata. Ovisno o tome kakav efekt se želi postići, određuje se potrebna doza hidrolizata za željeni medij (Logarušić i sur., 2021).

Serum je kompleksna smjesa hranjivih tvari i faktora rasta te je najskuplja komponenta medija za kulturu stanica. Pronalaženje alternative serumu vrlo je važno za proizvodnju biofarmaceutika koji se proizvode u velikom mjerilu i važno je smanjiti troškove koliko god je to moguće. Osim utjecaja na rast, proteinski hidrolizati mogu imati i druge željene i neželjene učinke na staničnu kulturu. Primjerice, proteinski hidrolizati slanutka dobiveni primjenom proteaza *Alcalase* i *Flavourzyme* još su jedna potencijalna alternativa serumu, a imaju i dodatne prednosti poput toga da su sigurni, imaju antioksidativnu aktivnost te nisu skupi. Kao i sve druge alternative serumu, utjecaji hidrolizata ovise o tome u koju kulturu stanica se dodaju (Girón-Calle, 2008).

2.2.3. Hidrolizati proteina lana

Lan (*Linum usitatissimum*) je jednogodišnja biljna vrsta iz porodice *Linaceae* koja raste do visine od 0,3-1 m te se uzgaja za proizvodnju tekstilnog vlakna, sjemenki i lanenog ulja. U proizvodnji lanenog ulja, zaostaje velika količina pogače sjemenki lana (slika 2) kao nusprodukt ekstrakcije ulja iz sjemenki. Pogača sjemenki lana smatrala se otpadom koji nema neku

preveliku vrijednost te se u najvećoj mjeri koristila kao hrana za stoku ili kao aditiv u pekarskim proizvodima (Gutiérrez i sur., 2010).

U novije vrijeme su se promijenili pogledi na pogaču sjemenki lana te je uočen njen veliki potencijal u vidu funkcionalne hrane i sastojaka. Iako se najviše koristi kao hrana za stoku, pogača sjemenki lana bi mogla imati značajnu primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, zbog visokog udjela proteina, manjeg udjela zaostalog ulja te zbog drugih komponenata poput fenolne kiseline i flavonoida (Sanmartin i sur., 2020).

Antioksidativni peptidi zapisani su u aminokiselinskom slijedu proteina u obliku inaktivnih fragmenata. Njihova antioksidativna aktivnost može se primjerice pojaviti tijekom enzimske hidrolize *in vitro*. Učinkovitost hidrolizata kao antioksidativnih tvari ovisi o karakteristikama oslobođenih peptida, njihovoj molekulskoj masi, aminokiselinskom sastavu te o slijedu aminokiselina. Odmašćene sjemenke lana bogate su proteinima u udjelu od 31-50 % (w/w) s relativno visokim sadržajem asparaginske kiseline, glutaminske kiseline, leucina i arginina (Karamać i sur., 2016).



Slika 2. Uljna pogača sjemenki lana (Anonymous 2, 2022)

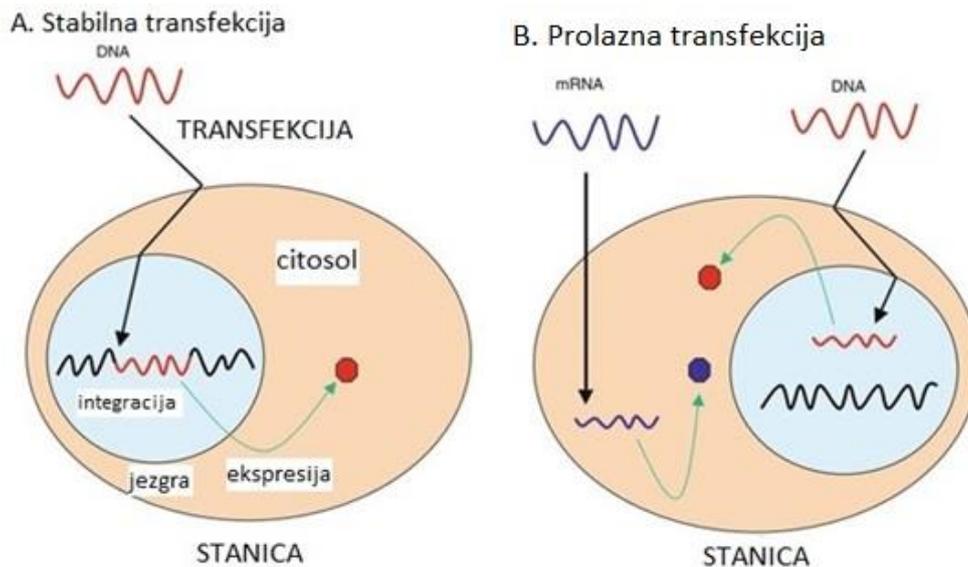
2.3. TRANSFEKCIJA

Transfekcija je oblik prijenosa gena odnosno proces uvođenja strane nukleinske kiseline (DNA ili RNA) u stanicu. Metode transfekcije mogu se podijeliti na kemijske, fizikalne i biološke te na metode kojima nastaje prolazna ili stabilna transfekcija (tablica 1) (Sheikh i sur., 2017).

Tablica 1. Usporedba prolazne i stabilne transfekcije (Sheikh i sur., 2017)

PROLAZNA TRANSFEKCIJA	STABILNA TRANSFEKCIJA
Kemijske ili fizikalne metode	Biološke ili fizikalne metode
Kratkotrajna ekspresija	Dugotrajna ekspresija uz trajno dobivanje funkcije ili gubitak funkcije
Nema integracije u genom	Rizik od nespecifične integracije

Na slici 3 shematski je prikazana stabilna i prolazna transfekcija. Svrha transfekcije je proučavanje funkcije gena ili genskih produkata pojačavanjem ili inhibiranjem ekspresije specifičnog gena u stanicama te proizvodnja rekombinantnih proteina u životinjskim stanicama. Primjeri su: genska terapija kojom se gen od interesa dostavlja u stanice u svrhu liječenja ili poboljšanja simptoma bolesti; inducirane pluripotentne matične stanice transfecirane s tri ili četiri transkripcijska faktora; *knock-down* postupci s malom interferirajućom RNA te proizvodnja aktivatora humanog tkivnog plazminogena u besmrtnim stanicama ovarija kineskog hrčka u terapeutske svrhe. U kliničkim istraživanjima najčešće se koristi transfekcija posredovana virusom poznata kao transdukcija, dok su u suvremenim istraživanjima najčešće korištene kemijske metode transfekcije (Kim i Eberwine, 2010).



Slika 3. Shematski prikaz A. Stabilne i B. Prolazne transfekcije (Kim i Eberwine, 2010)

Proces transfekcije može se podijeliti u nekoliko koraka počevši od formiranja kompleksa pozitivno nabijenog polimera i negativno nabijene pDNA koji se zove polipleks. Stvaranje kompleksa pokreće se porastom entropije zbog oslobađanja malih iona suprotnih naboja iz pDNA i polimera. Nakon formiranja polipleksa slijedi interakcija sa stanicom pri čemu dolazi do endocitoze. Nakon uspješne endocitoze polipleks se mora osloboditi iz endosoma kako bi se izbjegla razgradnja pDNA u lizosomu ili egzocitozom. Oslobođena pDNA mora se transportirati iz citoplazme u jezgri stanice. Točan mehanizam nije poznat, ali pretpostavlja se da se razgradnja polipleksa i oslobađanje iz endosoma odvijaju u isto vrijeme iako su polipleksi također detektirani i u jezgri. Osim toga, pokazalo se da pDNA može ući u jezgri i kroz jezgrine pore (Rinkenauer i sur., 2015).

Uvjeti u kojima se provode transkripcija i translacija u proizvodnim animalnim stanicama odgovaraju uvjetima u divljem tipu stanica tj. u humanim stanicama. U animalnim stanicama proteini se nakon translacije modificiraju čime postaju funkcionalni i aktivni. Iako je moguće proizvesti humane proteine u prokariotskim stanicama, može se dogoditi da se sintetiziraju proteini s nepoželjnim karakteristikama zbog izostanka posttranslacijskih modifikacija (Hunter i sur., 2018).

2.3.1. Prolazna transfekcija

U slučaju prolazne transfekcije, genetički materijal se ne integrira u genom domaćina (ostaje u epizomalnom obliku) stoga je ekspresija ciljanog gena vremenski ograničena i gubi se tijekom diobe stanica. DNA ulazi u stanicu i locira se u jezgri te je za 24 sata moguće izmjeriti aktivnost transkripcijskih gena. S druge strane, tijekom stabilne transfekcije, DNA se integrira u kromosomalnu DNA stanice domaćina. Uspješnost transfekcije može se ispitati pomoću selektivnih podloga koje primjerice sadrže antibiotik pa će stanice koje su primile plazmid koji sadrži gen za rezistenciju na taj antibiotik moći rasti. Također stanice koje su primile plazmid mogu se razlikovati od onih koje nisu, pomoću fluorescentnog mikroskopa u slučaju kada plazmid sadrži gen za sintezu određenog fluorescentnog proteina. Transfekcija se temelji na prijenosu negativno nabijenog genetičkog materijala kroz negativno nabijenu membranu stanice (Sheikh i sur., 2017).

2.3.2. Stanična transfekcija u biotehnologiji

Najčešće korištene animalne stanice kako u istraživanjima tako i u industriji su CHO (*Chinese hamster ovary cells*) i HEK-293 (*Human embryonic kidney 293 cells*) stanice. Obje vrste se održavaju ili kao adherentna ili kao suspenzijska kultura, ali suspenzijska stanična kultura ima prednost zbog jednostavnijeg rukovanja i *scale up*-a. Uobičajeno vrijeme udvostručenja stanica u suspenziji manje je od 24 sata (Hunter i sur., 2018).

U modernoj proizvodnji bio-terapeutskih proteina najčešće korištene stanice su CHO stanice. Nekoliko je CHO staničnih linija koje se koriste u proizvodnji te imaju različite karakteristike, ali isti genotip i fenotip. Prvu CHO staničnu liniju uspostavio je Puck 1957. godine, a do danas je uspostavljen cijeli niz različitih linija poput CHO-S, CHO-K1, CHOK1SV, DG44 itd. Općenito, CHO stanice mogu rasti do visokog stupnja gustoće u suspenzijskoj kulturi te održavati visoku vijabilnost u velikom mjerilu. Kad je stanična linija uspostavljena, produktivnost i željena ekspresija postižu se optimizacijom procesa. Cilj je postići maksimalni prinos uz održavanje odgovarajuće kvalitete proizvoda što se postiže optimizacijom medija i procesa proizvodnje (Stolfa i sur., 2017).

Rekombinantni proteini imaju sve veću važnost u medicini s obzirom da je sve veći broj njih koji su dobili odobrenje za korištenje u prevenciji i liječenju bolesti. Oni se prvenstveno proizvode u kulturama stanica sisavaca jer se u njima proteini pravilno sklapaju i prolaze kroz posttranslacijske modifikacije. U biotehnološkoj industriji se CHO stanice u velikoj mjeri

koriste u proizvodnji stabilne stanične linije za ekspresiju rekombinantnih proteina. Najbrža i najjeftinija metoda dobivanja rekombinantnih proteina je upravo prolazna ekspresija gena tj. prolazna transfekcija (Derouazi i sur., 2004).

Za svaki postupak transfekcije potrebno je imati stanice zdrave morfologije i u aktivnoj fazi diobe. Plazmid s heterolognim genom mora ući u jezgri stanice kako bi se uspješno provela transkripcija gena. Kod svake metode transfekcije bitno je provesti određenu vrstu optimizacije samog postupka. Ako se koristi kemijsko sredstvo kao agens transfekcije (T.S.), temeljna optimizacija obuhvaća doziranje kemijskog sredstva prema predviđenoj količini plazmida (pDNA) te dodavanje nastalog kompleksa (pDNA:T.S.) stanicama. Pri tome je jedan od ključnih uvjeta da količina dodanog kompleksa nije toksična za stanice. Idealni parametri su oni pri kojem se koristi najmanje transfekcijskog sredstva s najvećim brojem transfektanata, tj. stanicama koje eksprimiraju heterologni gen od interesa.

2.3.3. Transfekcijska smjesa

2.3.3.1. Transfekcijsko sredstvo

Najveći izazov kod primjene transfekcijskih sredstava je prijenos do stanice te u jezgri stanice. Prijenos DNA putem virusa daje vrlo dobre rezultate, ali postoji rizik od stvaranja imunskog odgovora kod ponovljene primjene, a uz to problem je i ograničeni kapacitet pakiranja DNA. Ne-virusne metode prijenosa DNA koje podrazumijevaju primjenu kationskih lipida ili (ne)razgranatih polimera kao transfekcijskih sredstava su odlična alternativa virusima te se mogu koristiti *in vitro* i *in vivo* (Rinkenauer i sur., 2015). Alternativa primjeni kationskih transfekcijskih sredstava koji stvaraju transfekcijske komplekse s DNA, su postupci transfekcije poput elektroporacije ili sonoporacije koji koriste fizičku silu za unos „gole“ DNA u stanice (Slivac i sur., 2017). Rezultat dopremanja DNA je proizvodnja proteina koja započinje transkripcijom pDNA u jezgri stanice. Zbog veličine čiste DNA kao i zbog kratkog vremena poluživota u prisutnosti proteina iz seruma, neophodno je da se pDNA upakira u vezikule ili čestice i time zaštiti (Rinkenauer i sur., 2015).

Najznačajniji sintetski polimerni sustavi su PEI (polietilenimin), PLL (poli-(L-lizin)) i PDMAEMA (poli (2-(dimetilamino) etil metakrilat). PEI je zlatni standard među polimernim transfekcijskim sredstvima kod primjene *in vitro* zahvaljujući velikoj učinkovitosti te komercijalnoj dostupnosti. Najveće prepreke koje treba prevladati kod primjene transfekcijskih polimera su učinkovitost i citotoksičnost, a nažalost visoka učinkovitost sa sobom nosi i visoku

citotoksičnost. Kationski polimer može izazvati destabilizaciju membrane i razoriti ju te zbog toga imati veliku citotoksičnost (Rinkenauer i sur., 2015; Ehrhardt i sur., 2006).

U ovom radu korištena su dva transfekcijska sredstva, kationski lipid (*FuGene 6*) i kationski polimer (*Turbofect*). Osim toga, u primjeni su i neki drugi oblici transfekcijskih sredstava poput kalcijevog fosfata, DEAE-dekstrana, aktivirani dendrimeri te magnetske kuglice.

Kationski lipidi su amfifilne molekule koje imaju pozitivno nabijenu polarnu glavu vezanu za nepolarnu hidrofobnu grupu koja se najčešće sastoji od dva alkilna lanca. Elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih grupa na lipidnoj glavi i negativno nabijenih fosfatnih grupa na pDNA, osnova su za spontano vezanje pDNA i kationskih lipida. Formirani kompleks prolazi kroz staničnu membranu pomoću liposoma koji isto kao i stanična membrana imaju fosfolipidni sloj te zbog jednake građe mogu proći kroz nju.

Kationski polimeri se razlikuju od kationskih lipida po tome što ne sadrže hidrofobni dio i potpuno su topljivi u vodi. S obzirom na njihovu polimernu prirodu, kationski polimeri se mogu sintetizirati u različitim dužinama i oblicima (linearni ili razgranati) (Bio-Rad Laboratories, 2022).

FuGene 6 je ne-liposomalno transfekcijsko sredstvo koje je dokazano efikasno u postupcima transfekcije s više od 700 vrsta stanica. Može se koristiti u medijima bez i sa serumom, a njegova niska citotoksičnost ima i ekonomsku korist jer nije nužno mijenjati medij nakon transfekcije ovim sredstvom. Također, ima minimalan učinak na fiziologiju stanice stoga njegova primjena daje vrijedne rezultate uz minimalne popratne pojave (Nagy i Watzele, 2006).

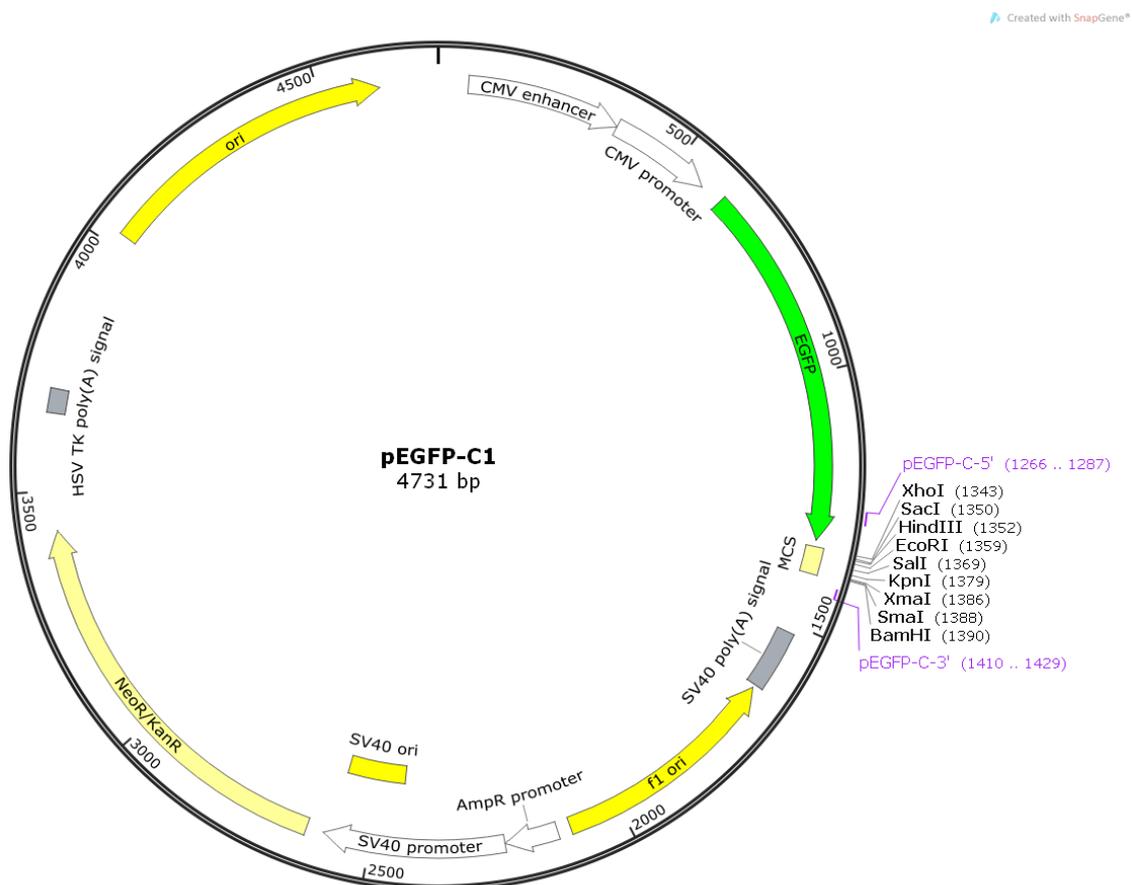
2.3.3.2. Plazmid pEGFP-C1

Stanice se nakon transfekcije plazmidom pGFP-C1 analiziraju fluorescentnom mikroskopijom. Zeleni fluorescentni protein općenito se koristi za određivanje učinkovitosti transfekcije, a uz to služi za određivanje smještaja proteina u stanici. Određeni oblici mogu služiti i za mjerenje učinkovitosti promotora, obilježavanje staničnih organela ili se koristiti u protočnoj citometriji (Herak Bosnar, 2004). Primjena GFP-a je u porastu te se uspješno koristi u sve većem broju vrsta, uključujući bakterije, gljive, biljke, insekte i nematode (Reid i Flynn, 1997).

Plazmid pEGFP-C1 (slika 4) dobiven je optimizacijom GFP plazmida divljeg tipa na način da svjetlije fluorescira i da se u većoj mjeri eksplicira u stanicama sisavaca. Sadrži gen

koji kodira za varijantu proteina GFPmut1 koja sadrži dvostruku aminokiselinsku supstituciju pri čemu je Phe-64 zamijenjen s Leu, a Ser-65 s Thr. Sekvence koje okružuju gen *egfp* pretvorene su u Kozak konsenzusno mjesto inicijacije translacije kako bi se dodatno povećala učinkovitost translacije u eukariotskim stanicama. MCS (*multiple cloning site*) se u pEGFP-C1 nalazi između *egfp* kodirajućih sekvenci i *sv40* poli A. SV40 poliadenilacijski signali nizvodno od *egfp* gena usmjeravaju pravilnu obradu 3' kraja *egfp* mRNA.

Ciljni gen treba biti kloniran u pEGFP-C1 tako da bude u okviru sa sekvencama koje kodiraju za EGFP, bez intervenirajućih stop kodona unutar okvira čitanja. Rekombinantni EGFP vektor može se transfecirati u stanice sisavaca korištenjem bilo koje standardne metode transfekcije. Plazmid pEGFP-C1 također se može koristiti za ekspresiju EGFP-a u staničnoj liniji od interesa (npr. kao marker transfekcije) (Nova lifetech Inc, 2022).



Slika 4. Mapa plazmida pEGFP-C1 s ozančenim dijelovima ključnim za njegovo umnožavanje i ekspresiju EGFP gena (Anonymous 3, 2022)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Proteinski hidrolizati lana korišteni u ovom radu, pripremljeni su tijekom izrade diplomskog rada kolegice Marije Cavrić (2021) u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te su čuvani na temperaturi od -80 °C. Za pripremu proteinskih hidrolizata lana korišteno je brašno uljne pogače lana proizvođača Nutrimedica d.o.o., Zagreb, Hrvatska. Postupak pripreme hidrolizata iz proteinskog izolata uljne pogače lana opisan je u znanstvenom radu Logarušić i sur. (2021).

3.1.1. Kemikalije

Ala-Gln (GlutaMAX), Sigma-Aldrich Handels GmbH, Beč, Austrija

Antibiotik antimikotik, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Anti-Clumping Agent, Gibco, SAD

CD CHO Medium, Chemically Defined Medium, Gibco

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco

Ex - Cell[®] CD CHO Serum – Free Medium for CHO Cells, Chemically Defined, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, SAD

Fetalni teleći serum (FBS), Gibco BRL, SAD

FidCHO Medium, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka

FuGene 6 Transfection Reagent, Promega, Madison, SAD

Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD

Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma-Aldrich, Velika Britanija

Plazmid pEGFP-C1, donacija Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, IRB, Hrvatska

PowerCHO[®]-2 CD, Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Verviers, Belgija

Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD

Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka

Turbofect Transfection Reagent, Thermo Scientific, SAD

3.1.2. Uređaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka

Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija

Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Ploče s jažicama (*eng. 24-well plate*), Corning, SAD

T25-boce, Nunc, SAD

Erlenmeyerove tikvice za uzgoj staničnih kultura, 125 mL, Corning, New York, SAD

Laboratorijski pribor:

- pipete 1000 uL, 100 uL, 10 uL, Rainin, SAD
- nastavci za pipete 1000 uL, 100 uL i 10 uL, Rainin, SAD
- epruvete 1,5 mL, Eppendorf, Njemačka
- Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka

Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

Hladnjak (-80 °C), DF 290, NUVE, Turska

Tresilica, Biosan shaker PSU-10i, Biosan, Latvija

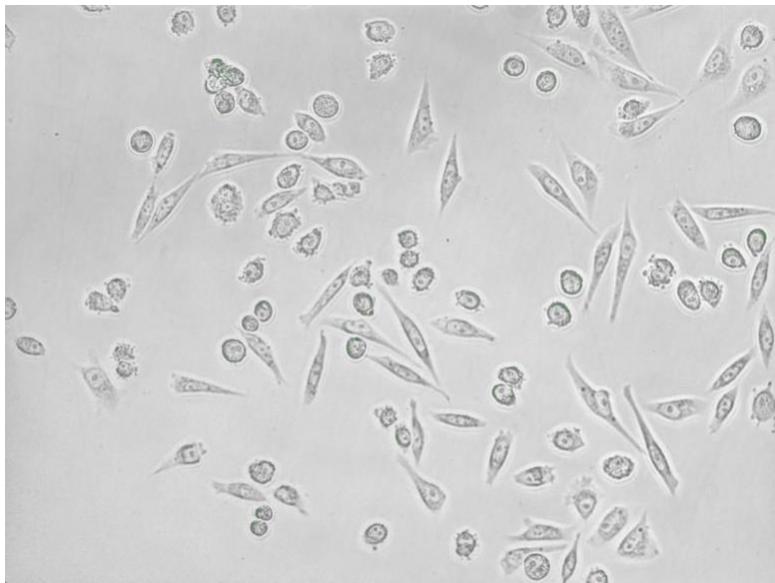
Centrifuga, MCR, Izrael

Cell Drop DeNovix Inc., Wilmington, SAD

Inverzni fluorescentni mikroskop, Fluid Cell Imaging Station, Life Sciences, SAD

3.1.3. Stanična linija CHO DP-12

U ovome radu korištena je životinjska stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka, CHO DP-12 (eng. *Chinese Hamster Ovary Cell*) pohranjena u *American Type Cell Collection* banci (Manassas, Virginia, SAD), pod oznakom ATCC®CRL 12444™. Stanična linija ima sposobnost proizvodnje humanog rekombinantnog monoklonskog protutijela, anti-IL8. Izvorno je to adherentna stanična linija koja je adaptirana na suspenzijski rast u mediju bez seruma u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije (slika 5).



Slika 5. Adherentne CHO DP-12 stanice, svjetlosna mikroskopija (400x) (vlastita fotografija)

3.1.4. Plazmid pEGFP

U radu je korišten plazmid iz bakterije *Escherichia coli* izoliran u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama. Koncentracija izoliranog plazmida pEGFP iznosi $0,65 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ što je procijenjeno na temelju intenziteta benda na gelu nakon provedene gel elektroforeze. Plazmid pEGFP sadrži sekvencu koja kodira za sintezu zelenog fluorescentnog proteina, GFP (eng. *Green Fluorescent Protein*). Stanice koje su primile plazmid i sintetizirale GFP protein, tj. one stanice u kojima je došlo do transfekcije, svijetle zeleno pri izlaganju svjetlu određene valne duljine na fluorescentnom mikroskopu.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica

Stanice se čuvaju na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa je potrebno odmrznuti ampule iz radne banke kako bi započeo uzgoj stanica. Odmrzavanje se postiže uranjanjem ampula u vodenu kupelj zagrijanu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sadržaj ampule se nakon odmrzavanja inokulira u hranjivi medij za uzgoj u Erlenmeyerovoj tikvici za uzgoj suspenzijskih stanica. Stanice su uzgajane u kemijski definiranom hranjivom mediju PowerCHO[®]-2 CD uz dodatak određenih komponenti: rekombinantni humani inzulin (0,02 % v/v) koji služi za stimulaciju rasta i proliferaciju stanica, metotreksat (0,01 % v/v) za amplifikaciju stanica, anti-clumping reagens (0,25 % v/v) koji onemogućava nastanak staničnih agregata, smjesa glutamina i alanina (4 % v/v) kao dodatni izvor energije stanicama te antibiotik (1 % v/v).

Stanice se inkubiraju na temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na tresilici (160 rpm) uz odgovarajuću atmosferu (95 % zraka + 5 % CO₂). Važno je pratiti zamućenje medija zato što ono ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi stanica. Uzgoj se vodi do koncentracije stanica od oko 4×10^6 stanica mL⁻¹. Stanice se zatim precijepu u svježiji medij u koncentraciji od oko 250 000 stanica mL⁻¹.

U slučaju adherentnih stanica, sadržaj ampule se prebacuje u sterilnu kivetu u koju se doda 5-10 mL medija za uzgoj (DMEM). Stanice se potom centrifugiraju 5 minuta na 1000 okretaja min⁻¹ kako bi se uklonili ostaci medija za smrzavanje stanica koji sadrži „štetnu“ komponentu dimetil sulfoksid (DMSO). Supernatant se uklanja, a talog stanica resuspendira u mediju za uzgoj uz dodatak 5 % (v/v) FBS-a i 1 % (v/v) antibiotika. Stanice se prebacuju u T-bocu i uzgajaju u istim uvjetima kao i suspenzijske stanice. Pomoću inverznog mikroskopa provjerava se uspješnost prihvaćanja stanica za podlogu, proučava se brojnost, morfologija i opće stanje stanica. Važno je pratiti i promjenu boje DMEM medija koji sadrži fenolno crvenilo kao indikator jer je promjena boje medija znak pojave kontaminacije u kulturi.

3.2.2. Priprema stanica za transfekciju

U slučaju suspenzijskih stanica koje su uzgajane u PowerCHO mediju, prije samog postupka transfekcije, provedeno je centrifugiranje i ispiranje stanica PBS puferom kako bi se

uklonio stari medij u kojemu su stanice uzgajane. Cilj tog postupka je smanjenje mogućnosti negativnog utjecaja dodatka mediju na uspješnost transfekcije, tj. uklanjanje komponenata dodanih u medij za uzgoj, prije svega *anticlumpinga*, ali i antibiotika koji mogu negativno utjecati na uspješnost transfekcije. Izuzima se 1 mL suspenzije stanica, suspenzija se centrifugira 5 minuta, nakon čega se uklanja supernatant i dodaje 1 mL PBS-a. Postupak se ponavlja još jednom. Tako pripremljene stanice naciepljene su u DMEM, ExCell, CD CHO i FidCHO medije.

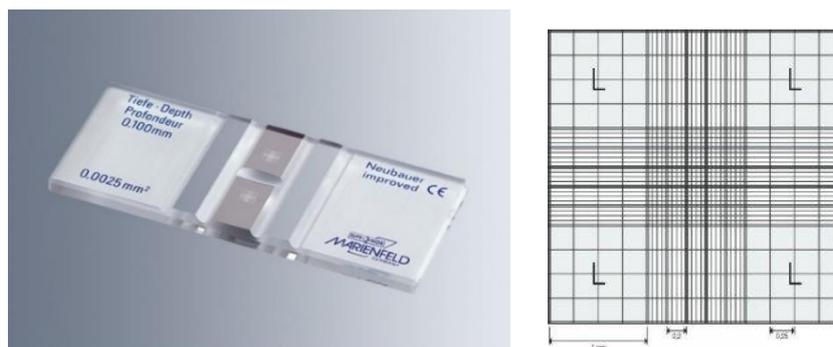
U slučaju adherentnih stanica koje su uzgajane u DMEM mediju uz dodatak 5 % (v/v) FBS-a i 1 % (v/v) antibiotika, prije transfekcije se uklanja stari medij pri čemu stanice ostaju pričvršćene za podlogu te se dodaje svježi DMEM medij. Transfekcija se provodi u čistom DMEM mediju, a 2 h nakon transfekcije se u jažice dodaje 5 % (v/v) FBS-a.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Rast stanica u suspenziji praćen je metodom tripan-plavo pri čemu su stanice brojane u Neubauerovoj komorici (slika 6) i promatrane pomoću svjetlosnog mikroskopa te im je određivana koncentracija u suspenziji. Boja tripan plavo veže se za oštećene dijelove membrane stanica pa se zbog toga mogu razlikovati žive od mrtvih stanica. Mrtve stanice su obojane plavo, a žive stanice ostaju neobojane. Suspenzija stanica se lagano promiješa kako bi se dobila jednaka koncentracija stanica u cijelom volumenu suspenzije. Uzorak suspenzije stanica izuzima se iz Erlenmeyerove tikvice u Eppendorf epruvetu. Uzorak se resuspendira te se 10 μL suspenzije pomiješa s 10 μL tripan plavo bojila. Iz pripremljenog uzorka uzima se alikvot od 10 μL i nanosi na Neubauerovu komoricu. Stanice se broje u 4 velika kvadrata, a koncentracija se računa prema formuli [1]:

broj stanica mL^{-1} suspenzije = broj stanica izbrojenih u sva 4 kvadrata \times 5000 \times faktor razrjeđenja [1]

Na temelju koncentracije stanica izračunati su volumeni suspenzije s kojima su inokulirani mediji kako bi u svakoj jažici bila željena koncentracija stanica.



Slika 6. Neubauerova komorica za brojanje stanica (lijevo) (Anonymous 4, 2022) i mreža kvadrata u Neubauerovoj komorici (desno) (Anonymous 5, 2022)

3.2.4. Priprava transfekcijske smjese

Transfekcija je vođena na pločama s 24 jažice (*24-well plate*) (slika 7) pri čemu je radni volumen po jažici iznosio 500 μL , a volumen transfekcijske smjese 50 μL po jažici. Transfekcijska smjesa sastoji se od transfekcijskog sredstva, PBS pufera i plazmida. U svaku jažicu dodano je 0,5 μg plazmida što je 0,1 % ukupnog volumena jažice. Ispitana su dva transfekcijska sredstva, *FuGene 6* i *Turbofect* u različitim volumenima (μL) u odnosu na masu plazmida (μg). U eksperimentima taj omjer transfekcijskog sredstva i mase plazmida varira ovisno o uspješnosti transfekcije odnosno cilj je definirati pri kojem omjeru je učinkovitost najveća uz najmanji utrošak transfekcijskog sredstva.

Transfekcijska smjesa s *Turbofectom* priprema se dodavanjem PBS-a, plazmida pa transfekcijskog sredstva. Smjesa se resuspendira te inkubira 15 minuta:

PBS + plazmid + *Turbofect* \rightarrow resuspendirati smjesu (inkubacija 15 min na sobnoj temperaturi)

Transfekcijska smjesa s *FuGene 6* priprema se tako da se doda PBS pa transfekcijsko sredstvo. Takva smjesa se resuspendira i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se dodaje plazmid, smjesa se resuspendira i inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi:

PBS + *FuGene 6* \rightarrow resuspendirati smjesu (inkubacija 5 min na sobnoj temperaturi) + plazmid \rightarrow resuspendirati smjesu (inkubacija 15 min na sobnoj temperaturi)

Na ploču s 24 jažice naciepljene su ranije pripremljene stanice u odgovarajućem mediju te je dodana pripremljena transfekcijska smjesa. Stanice su inkubirane na 37 °C oko 24 sata.



Slika 7. Prikaz ploče s 24 jažice (*24-well plate*) (Anonymous 6, 2022)

3.2.4.1. *Transfekcija – prvi pokus – usporedba dva transfekcijska sredstva*

Korištene su suspenzijske CHO DP-12 stanice koje su prije naciepljivanja centrifugirane i isprane PBS puferom kako bi se uklonile određene komponente medija koje bi mogle imati negativan utjecaj na transfekciju. U ovom eksperimentu je ispitana uspješnost transfekcije u dva medija, PowerCHO i DMEM. U PowerCHO medij je dodan GlutaMAX (4 % (v/v)), a u DMEM medij je 2 sata nakon transfekcije dodan FBS (5 % (v/v)). Stanice su naciepljene u PowerCHO i DMEM medij u *24-well plate* u koncentraciji od $2 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} i inkubirane oko 2 sata na temperaturi od 37 °C. Dodatak seruma je doveo do vezanja stanica na površinu jažica. Korištena su transfekcijska sredstva *FuGene 6* i *Turbofect*, a omjeri DNA i transfekcijskog sredstva (T.S.) koji su ispitani u ovom eksperimentu (tablica 2) su:

1. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 2
2. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 4
3. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 8

Tablica 2. Transfekcija – prvi pokus

MEDIJ	STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μg) : T.S. (μL)
PowerCHO	CHO DP-12 suspencijske	<i>Turbofect</i>	1:2, 1:4, 1:8
		<i>FuGene 6</i>	1:2, 1:8
DMEM	CHO DP-12 suspencijske*	<i>Turbofect</i>	1:2, 1:4, 1:8
		<i>FuGene 6</i>	1:2, 1:8

*CHO DP-12 suspencijske – uzgajane kao adherentna kultura

3.2.4.2. Transfekcija – drugi pokus – usporedba različitih medija

Kao i u prvom slučaju, korištene su suspencijske CHO DP-12 stanice, a uz PowerCHO i DMEM medij, ispitani su još i ExCell, CD CHO i FidCHO mediji (tablica 3). Stanice su prije naciepljivanja na *24-well plate* centrifugirane i isprane PBS puferom. U svaku jažicu je naciepljeno $1 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} te je provedena inkubacija od oko 2 sata na temperaturi od 37 °C. Transfekcija je vođena s *FuGene 6* transfekcijskim sredstvom te je ispitan omjer DNA i transfekcijskog sredstva (T.S.):

$$\text{DNA } (\mu\text{g}) : \text{T.S. } (\mu\text{L}) = 1 : 6$$

Tablica 3. Transfekcija – drugi pokus

MEDIJ	STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μg) : T.S. (μL)
PowerCHO	CHO DP-12 suspencijske	<i>FuGene 6</i>	1:6
DMEM			
ExCell			
CD CHO			
FidCHO			

3.2.4.3. Transfekcija – treći pokus

U trećem eksperimentu (tablica 4) suspencijske CHO DP-12 stanice naciepljene su u *24-well plate* u koncentraciji od $0,6 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} u DMEM medij s 5 % FBS-a koji je dva

dana kasnije uklonjen te su stanice isprane PBS puferom i dodan je svježi DMEM medij. U PowerCHO medij je dodan GlutaMAX (4 % (v/v)) te su u tako pripremljen medij nacijepnjene stanice u koncentraciji od $2 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} . Korišteno je *FuGene 6* transfekcijsko sredstvo te je ispitan omjer plazmidne DNA i transfekcijskog sredstva (T.S.) kao i ranije:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}) : \text{T.S. } (\mu\text{L}) = 1 : 6$$

Dva sata nakon dodatka transfekcijske smjese, dodano je 5 % FBS-a u jažice s DMEM medijem.

Tablica 4. Transfekcija – treći pokus

MEDIJ	STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μg) : T.S. (μL)
PowerCHO	CHO DP-12	<i>FuGene 6</i>	1:6
DMEM	suspenzijske		

3.2.4.4. Transfekcija – četvrti pokus – transfekcija uz dodatak proteinskih hidrolizata lana

U posljednjem eksperimentu korištene su adherentne CHO DP-12 stanice koje su uzgajane u DMEM mediju u T-bocama na $37\text{ }^\circ\text{C}$. U DMEM medij dodani su proteinski hidrolizati lana dobiveni pomoću enzima *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex* u koncentraciji od 1 g L^{-1} . Stanice su uzgajane u DMEM mediju s dodatkom hidrolizata te u DMEM mediju bez hidrolizata (tablica 5).

Nakon uzgoja uklonjen je DMEM medij, stanice su isprane PBS-om te su tripsinizirane s $0,5\text{ mL}$ tripsina. Nakon 10 minuta dodan je 1 mL DMEM-a s FBS-om čime je inaktiviran tripsin. Stanice su uklonjene iz T-boca i dodane u *24-well plate* u koncentraciji od $1 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} . Nakon otprilike 24 sata provedena je transfekcija. Korišteno je transfekcijsko sredstvo *FuGene 6*, a ispitani su omjeri DNA i transfekcijskog sredstva (T.S.):

1. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 2
2. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 4
3. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 6

Neposredno prije transfekcije mediji su zamijenjeni svježim medijima sa i bez hidrolizata, pripremljena je transfekcijska smjesa i dodana u jažice. Četiri jažice su kontrolne, od toga su u dvije jažice DMEM medij, stanice i transfekcijska smjesa, a u preostale dvije DMEM medij, stanice i PBS pufer.

Tablica 5. Transfekcija – četvrti pokus

MEDIJ		STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μg) : T.S. (μL)
DMEM		CHO DP-12 adherentne	<i>FuGene 6</i>	1:2
DMEM + hidrolizati	HLA			1:4
	HLN			1:6
	HLP			

HLA - hidrolizat lana dobiven pomoću enzima *Alcalase*; HLN - hidrolizat lana dobiven pomoću enzima *Neutralse*; HLP - hidrolizat lana dobiven pomoću enzima *Protamex*

3.2.5. Određivanje uspješnosti transfekcije

Nakon provedene transfekcije, uspješnost je provjerena pomoću fluorescentnog mikroskopa, a pomoću uređaja *Cell Drop* određena je učinkovitost transfekcije, tj. kvantifikacija stanica koje su proizvele marker protein EGFP. Ispod objektiva fluorescentnog mikroskopa stavlja se ploča s 24 jažice te se svaka jažica obasja UV svjetlošću. Slika se prenosi na ekran računala pa se prema tom prikazu podešava slika odnosno oština pomoću makro- i mikrovijka. Stanice u kojima je došlo do transfekcije dakle one u kojima je došlo do sinteze GFP-a, emitiraju zelenu svjetlost.

Uređajem *Cell Drop* utvrđena je uspješnost transfekcije. Nakon izbora programa i postavke parametara, suspenzija stanica (10 μL) nanosi se na komoricu te se s ekrana iščitava ukupan broj stanica i udio (%) zeleno fluorescirajućih stanica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U zadnjih nekoliko desetljeća mnogi ekspresijski sustavi sisavaca razvijeni su za proizvodnju terapijskih proteina. CHO stanice se koriste za proizvodnju oko 35 % svih biofarmaceutskih proizvoda odobrenih od 1982. godine. Stoga, transformacije u životinjskim ekspresijskim staničnim sustavima imaju veliki značaj za industriju, a sve s ciljem postizanja veće produktivnosti, bržeg rasta i bolje kvalitete proizvoda. Mnoge inženjerske tehnologije poput optimizacije medija ili genetičkog inženjerstva su već utemeljene te se njima mogu postići poboljšanja u krajnjim prinosima procesa. Usprkos tome, nove tehnologije se još uvijek moraju usavršavati te je potrebno kontrolirati svojstva staničnih linija sisavaca (Eisenhut i sur., 2018).

Za postizanje dobrih rezultata istraživanja pomoću kulture životinjskih stanica, važno je osigurati odgovarajući sastav hranjivog medija za uzgoj stanica. *In vitro* metode su među omiljenim metodama koje bi trebale zamijeniti eksperimente na životinjama, stoga se javlja potreba za pouzdanim i znanstveno utemeljenim metodama kulture stanica i tkiva koje podrazumijevaju osiguranje kvalitete. Postoje jasne smjernice za dobru praksu u kulturi stanica (GCCP, eng. *good cell culture practice*), koje sadrže preporuke vezane za korištenje medija bez seruma (Van der Valk i sur., 2010).

Zbog nedostataka seruma koji su navedeni u poglavlju 2.2.1., želi se naći odgovarajuća alternativa serumu koja bi imala jednak ili bolji utjecaj na rast i produktivnost kultura životinjskih stanica. Projekt Hrvatske zaklade za znanost „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ bavi se utjecajem biljnih hidrolizata lana i konoplje kao zamjene serumu i dodatka hranjivom mediju, a u sklopu tog projekta izrađen je i ovaj diplomski rad. U diplomskom radu Marije Cavrić (2021) opisan je postupak dobivanja hidrolizata ukupnih proteina iz pogače lana i njihovih frakcija, djelovanjem tri proteolitička enzima, *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*. U ovome radu ispitan je utjecaj proteinskih hidrolizata lana na transfekciju CHO DP-12 stanične linije. Rast i vijabilnost stanica praćeni su metodom tripan-plavo, a učinkovitost transfekcije praćena je fluorescentnim mikroskopom i uređajem *Cell Drop*. Ispitivanju utjecaja proteinskih hidrolizata lana, prethodilo je ispitivanje različitih uvjeta transfekcije CHO DP-12 stanica, ali bez dodatka hidrolizata. U idućem poglavlju analizirani su rezultati provedenih istraživanja.

4.1. ANALIZA USPJEŠNOSTI TRANSFEKCIJE

Provedena su četiri eksperimenta u kojima su ispitani različiti uvjeti transfekcije CHO DP-12 stanica. Svi eksperimenti vođeni su na pločama s 24 jažice (*24-well plate*) kako bi se potrošnja kemikalija svela na minimum. Cilj rada bio je utvrditi je li transfekcija navedenih stanica moguća u uvjetima bez dodatka FBS-a odnosno uz dodatak proteinskih hidrolizata lana.

U prvom eksperimentu ispitana je uspješnost transfekcije suspenzijskih stanica u dva različita medija, PowerCHO i DMEM. Kako bi se izbjegla svaka moguća interferencija dodataka mediju sa sastojcima transfekcijske smjese te samim time i štetan utjecaj tih tvari na transfekciju, njihov dodatak se sveo na minimum. U PowerCHO medij je stoga dodan samo GlutaMAX (4 % (v/v)) dok je u DMEM medij dodan FBS (5 % (v/v)). L-glutamin je esencijalna aminokiselina koja se dodaje u kulturu stanica kao dodatni izvor energije pogotovo kada se stanice ubrzano dijele, a također ga stanice mogu koristiti kao izvor dušika u sintezi proteina, nukleinskih kiselina i slično. S obzirom da je L-glutamin nestabilan u vodenim otopinama poput hranjivog medija te se raspada na amonijak koji je toksičan za stanice, bolje rješenje je GlutaMAX. To je zapravo dipeptid L-alanin-L-glutamin koji je stabilniji oblik te se ne degradira u vodenim otopinama. Dodatak FBS-a u DMEM medij doveo je do vezanja stanica za površinu jažica. Na taj način ispitani su dinamični uvjeti uzgoja u PowerCHO mediju te statični uvjeti uzgoja u DMEM mediju. U svaki od medija dodana su transfekcijska sredstva, *FuGene 6* i *Turbofect* u nekoliko različitih omjera u odnosu na plazmidnu DNA:

1. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 2
2. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 4
3. DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 8

Transfekcija je zabilježena samo u DMEM mediju, s *FuGene 6* transfekcijskim sredstvom pri omjeru DNA (μg) : T.S. (μL) = 1 : 8 (tablica 6). Takav ishod može se pripisati statičnim uvjetima uzgoja u DMEM mediju uz dodatak FBS-a, pri čemu je i serum pozitivno utjecao na stanice. Također treba napomenuti da su omjeri 1 : 2 i 1 : 4 u svakom slučaju bili nedostadni da bi se stanice transfecirale. Pored racionalizacije uporabe T.S., ispitivanje doze, tj. omjera u kojem se T.S. koristi bitno je za izbjegavanje toksičnog učinka kojeg ta sredstva ponekad mogu imati dodana u većim količinama. U ovom slučaju, navedeni omjeri ipak su premali da bi se postigao opazivi ishod transfekcije. Na temelju prvog eksperimenta uočeno je

da transfekcijsko sredstvo *Turbofect* nije dalo pozitivne rezultate niti u jednom slučaju pa se zbog toga u daljnjim eksperimentima koristilo samo *FuGene 6* transfekcijsko sredstvo.

Tablica 6. Uvjeti i ishod prvog eksperimenta transfekcije. Oznake plus (+) i minus (-) označavaju prisutnost odnosno odsustvo zeleno-fluorescirajućih stanica u transfeciranoj staničnoj kulturi

MEDIJ	STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μ g) : T.S. (μ L)	USPJEŠNOST TRANSFEKCIJE (fluorescentni mikroskop)
PowerCHO	CHO DP-12 suspenzijske	<i>Turbofect</i>	1:2	-
			1:4	-
			1:8	-
		<i>FuGene 6</i>	1:2	-
			1:8	-
DMEM	CHO DP-12 suspenzijske*	<i>Turbofect</i>	1:2	-
			1:4	-
			1:8	-
		<i>FuGene 6</i>	1:2	-
			1:8	+

*CHO DP-12 suspenzijske – uzgajane kao adherentna kultura

U drugom eksperimentu se transfekcija također provodila na suspenzijskim stanicama, ispitivano je samo *FuGene 6* transfekcijsko sredstvo, ali su uz PowerCHO i DMEM medij, ispitani još i ExCell, CD CHO i FidCHO mediji. S obzirom na to da se pri omjeru plazmidne DNA i transfekcijskog sredstva 1 : 8, transfekcija dogodila, ali pri 1 : 4 nije, u ovom eksperimentu ispitani su samo jedan omjer i to 1 : 6. Cilj je bio odrediti koji je najmanji omjer pri kojemu će se transfekcija odvijati. Pri toj manjoj koncentraciji transfekcijskog sredstva, zabilježena je pojava transfekcije, ali samo u DMEM mediju (tablica 7). U ExCell mediju je nakon dodatka transfekcijske smjese došlo do stvaranja nakupina u mediju što je moglo ukazivati na kontaminaciju, ali s obzirom na to da u drugim jažicama nije došlo do toga, može

se pretpostaviti da su komponente ExCell medija reagirale s transfekcijskom smjesom što je dovelo do te pojave. Također, to potvrđuje i negativna kontrola u kojoj su u ExCell medij dodane samo stanice, bez transfekcijske smjese te nije došlo do pojave nakupina. U preostalim medijima nije zabilježena transfekcija, a niti neka druga pojava poput ove u ExCell mediju. Stoga se u idućem eksperimentu istraživanje nastavilo provoditi u DMEM mediju.

Tablica 7. Uvjeti i ishod drugog eksperimenta transfekcije. Oznake plus (+) i minus (-) označavaju prisutnost odnosno odsustvo zeleno-fluorescirajućih stanica u transfeciranoj staničnoj kulturi

STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μg) : T.S. (μL)	MEDIJ	USPJEŠNOST TRANSFEKCIJE (fluorescentni mikroskop)
CHO DP-12 suspenzijske	<i>FuGene 6</i>	1:6	PowerCHO	-
			DMEM	+
			ExCell	-
			CD CHO	-
			FidCHO	-

U trećem eksperimentu također su korištene suspenzijske CHO DP-12 stanice te ista koncentracija *FuGene 6* transfekcijskog sredstva kao i u drugom eksperimentu. Korišteni su DMEM i PowerCHO mediji pri čemu je u DMEM medij dodan FBS 2 sata nakon dodatka transfekcijske smjese, a u PowerCHO medij je dodan GlutaMAX-a. Transfekcija je zabilježena samo u DMEM mediju, kao i u prva dva eksperimenta (tablica 8).

Tablica 8. Uvjeti i ishod trećeg eksperimenta transfekcije. Oznake plus (+) i minus (-) označavaju prisutnost odnosno odsustvo zeleno-fluorescirajućih stanica u transfeciranoj staničnoj kulturi

STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μ g) : T.S. (μ L)	MEDIJ	USPJEŠNOST TRANSFEKCIJE (fluorescentni mikroskop)
CHO DP-12 suspenzijske	<i>FuGene 6</i>	1:6	PowerCHO	-
			DMEM	+

U četvrtom eksperimentu ispitivani su različiti uvjeti transfekcije adherentnih CHO DP-12 stanica, na temelju ishoda prethodna tri eksperimenta. Konačno, ispitan je i utjecaj proteinskih hidrolizata lana na uspješnost transfekcije. Korišteno je samo *FuGene 6* transfekcijsko sredstvo, ali u tri različita omjera:

1. DNA (μ g) : T.S. (μ L) = 1 : 2
2. DNA (μ g) : T.S. (μ L) = 1 : 4
3. DNA (μ g) : T.S. (μ L) = 1 : 6

Transfekcija se provodila samo u DMEM mediju s obzirom na to da se u prethodnim slučajevima pokazalo da je najveća uspješnost transfekcije upravo u tom mediju. U pojedine jažice dodani su proteinski hidrolizati lana dobiveni pomoću enzima *Alcalase* (HLA), *Neutrase* (HLN) i *Protamex* (HLP) čime se ispitaio njihov utjecaj na transfekciju. Četiri jažice predstavljale su kontrolu pa se u te jažice nisu dodavali hidrolizati. Od toga se u dvije jažice uz DMEM medij i stanice dodala i transfekcijska smjesa dok se u preostale dvije umjesto transfekcijske smjese dodao PBS pufer. Transfecirane stanice su zabilježene samo u kontrolnim jažicama, u koje je dodana transfekcijska smjesa s *FuGene 6* transfekcijskim sredstvom u omjeru DNA (μ g) : T.S. (μ L) = 1 : 6 (tablica 9). U jažicama u koje su dodani hidrolizati nije došlo do transfekcije, stoga se može zaključiti da proteinski hidrolizati lana negativno utječu na transfekciju CHO DP-12 stanica.

Tablica 9. Uvjeti i ishod četvrtog eksperimenta transfekcije. Oznake plus (+) i minus (-) označavaju prisutnost odnosno odsustvo zeleno-fluorescirajućih stanica u transfeciranoj staničnoj kulturi

STANIČNA LINIJA	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	DNA(μ g) : T.S. (μ L)	MEDIJ		USPJEŠNOST TRANSFEKCIJE (fluorescentni mikroskop)
CHO DP-12 adherentne	<i>FuGene 6</i>	1:2	DMEM		-
		1:4			-
		1:6			+
		1:2, 1:4, 1:6	DMEM + hidrolizati	HLA	-
		HLN		-	
		HLP		-	

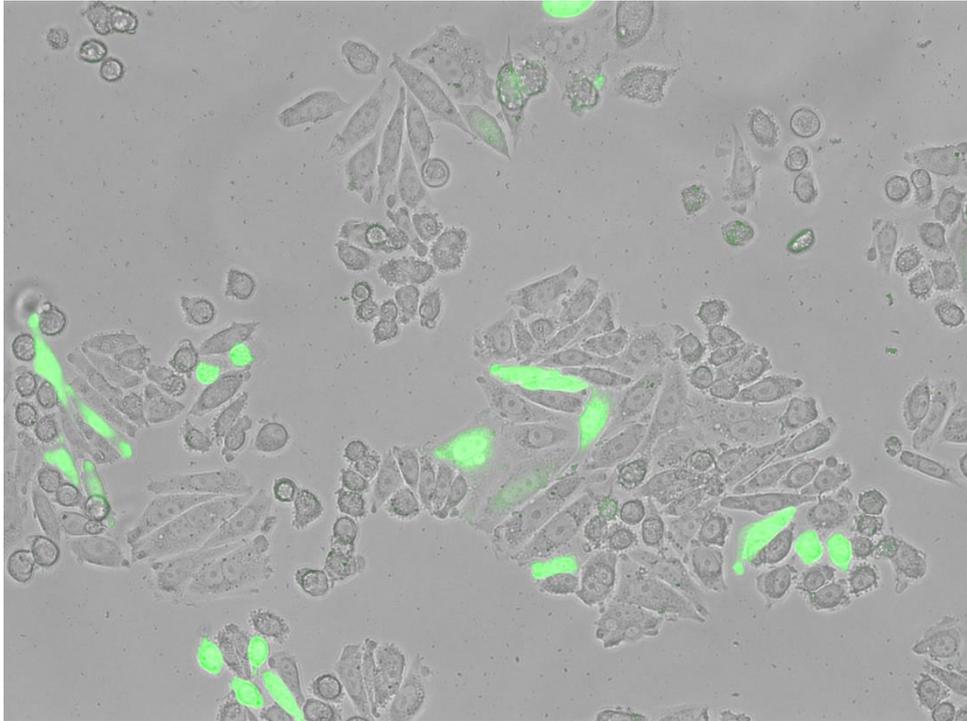
Logarušić i sur. (2021) opisali su rast adherentnih CHO DP-12 stanica te proizvodnju monoklonskog antitijela (mAb) u DMEM mediju pri čemu je serum djelomično zamijenjen proteinskim hidrolizatima sjemenki lana. Razgradnja proteina provedena je s komercijalnim endopeptidazama: *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex*. Pojedini enzimi razgrađuju proteine na različite načine odnosno dobivaju se hidrolizati s različitim stupnjevima hidrolize i različitim frakcijama peptida. Najveći stupanj hidrolize postignut je s enzimom *Alcalase*, zatim s *Protamex*-om te najmanji s *Neutrased*-om. Dodatak hidrolizata pospješio je rast stanica, a posljedično i koncentraciju IgG-a, ali najbolji utjecaj su imali hidrolizati dobiveni *Alcalase*-om dok hidrolizati dobiveni s preostala dva enzima nisu dali toliko dobre rezultate. Iako je u ranijim istraživanjima utvrđeno da proteinski hidrolizati lana povoljno utječu na rast i produktivnost stanica, njihova prisutnost tijekom transfekcije stanica je nepoželjna.

Kad su utvrđeni uvjeti transfekcije koji daju EGFP pozitivne stanice (zeleno-fluorescirajuće stanice), učinkovitost transfekcije je kvantificirana (%). Pomoću uređaja *Cell Drop* dobivene su učinkovitosti transfekcije za svaki eksperiment odnosno za svaki slučaj transfekcije, što je prikazano u tablici 10.

Tablica 10. Prikaz uvjeta pri kojima je došlo do transfekcije i učinkovitost transfekcije

MEDIJ	TRANSFEKCIJSKO SREDSTVO	STANIČNA LINIJA	DNA(μ g) : T.S. (μ L)	UČINKOVITOST TRANSFEKCIJE (%)
DMEM	<i>FuGene 6</i>	CHO DP-12 suspenzijske	1 : 8	6,1
			1 : 6	12,0
			1 : 6	8,0
		CHO DP-12 adherentne	1 : 6	10,0

Na slici 8 prikazana je slika dobivena pomoću fluorescentnog mikroskopa. Na njoj su stanice podvrgnute transfekciji plazmidom pEGFP-C1. Stanice koje uspješno ekspimiraju gen GFP te proizvode fluorescentni protein vide se kao zeleno-fluorescirajuće stanice. Stanice koje nisu uspješno transfecirane ili je ekspresija GFP gena neuspješna ostale su bezbojne.



Slika 8. CHO DP-12 stanice 48 sati nakon transfekcije plazmidom pEGFP-C1. Zeleno-fluorescirajuće stanice su transfektanti koji proizvode marker protein EGFP. Slika je dobivena pomoću fluorescentnog mikroskopa (povećanje 400x)

U ovom radu je utvrđeno da je za uspješnu transfekciju CHO DP-12 stanica, tj. proizvodnju molekula GFP potreban najmanji potreban omjer DNA i transfekcijskog sredstva *FuGene 6* 1:6. Pritom je jedan od uvjeta za to i provedba transfekcije stanica u DMEM mediju s 5 % FBS-a. Kemijski definirani mediji (PowerCHO, ExCell, FidCHO i CD CHO) koji su također testirani nisu se pokazali prikladnim za transfekciju. U njihovom sastavu (poznatom samo proizvođaču) vjerojatno se nalaze komponente koje nepovoljno reagiraju s transfekcijskim kompleksom ili utječu na polarnost vanjskog dijela stanične membrane. Derouazi i sur. (2004) opisali su optimizaciju postupka prolazne transfekcije CHO DG44 stanica adaptiranih na suspenzijske uvjete bez seruma korištenjem PEI (polietilenimin) kationskog polimera kao transfekcijskog sredstva. Stanice su uzgajane u ProCHO5 CDM mediju bez seruma te je korišten plazmid pEGFP-N1. PEI se pokazao citotoksičnim za endotelne stanice te L929 stanice fibroblasta. Moguće da je razlog tome bilo oštećenje plazmine membrane zbog izlaganja PEI-u. Sukladno tome, veći prinosi rekombinantnih proteina

zabilježeni su kod omjera DNA:PEI = 1:2 nego kod 1:3 i više, što se može objasniti porastom smrtnosti stanica prilikom transfekcije s višim koncentracijama PEI-a. Utvrđeno je da je moguće napraviti *scale-up* ove metode do 20 L u bioreaktoru. Transfekcija s linearnim PEI-om od 25 kDa je financijski povoljna i može se provoditi u uvjetima bez seruma.

Neuspješnost transfekcije životinjskih stanica u medijima suplementiranim biljnim proteinskim hidrolizatima česta je pojava koja se objašnjava interferencijom uglavnom kationskih transfekcijskih sredstava s dodanim hidrolizatima. Zbog toga se primjerice kod proizvodnje rekombinantnih proteina prolaznom transfekcijom preporuča hidrolizate dodati u medij tek u kasnijoj fazi postupaka, nakon što je obavljena transfekcija. Svojim istraživanjima na HEK-293 stanicama to su jasno pokazali radovi Jäger i sur. (2015) i Pham i sur. (2005). S obzirom da su oba transfekcijska sredstva korištena u našem istraživanju kationske prirode, *FuGene 6* (kationski lipid) i *TurboFect* (kationski polimer), vrlo je izgledno da je njihovo transfekcijsko djelovanje također narušeno prisutnošću hidrolizata proteina lana.

Rajendra i sur. (2017) opisali su prolaznu transfekciju CHO-DG44 stanica u velikom mjerilu u volumenu od 1 litre. Koristili su PEI (polietilenimin) transfekcijsko sredstvo te plazmid pXLGCHO-A3 koji kodira za anti-Rhesus D IgG1. Proveli su adaptaciju stanica na rast u suspenziji bez seruma u *ProCHO5* mediju koji je sadržavao proteinske hidrolizate biljnog podrijetla. Zbog prisutnosti hidrolizata sastav medija varira, a samim time je učinkovitost transfekcije različita u različitim šaržama. Važno je da se dan prije transfekcije stanice prebace u svježiji medij kako bi se uspostavio eksponencijalni rast stanica. Poznato je da neki komercijalno dostupni mediji zbog prisutnosti dekstran sulfata, heparin sulfata, željezovog amonijevog citrata te određenih hidrolizata ili drugih nepoznatih tvari inhibiraju transfekciju posredovanu PEI transfekcijskim sredstvom. S obzirom na to da je PEI kationski polimer, a *FuGene 6* i *Turbofect* su također kationske prirode, slaba učinkovitost transfekcije može se pripisati prisutnosti navedenih komponenata medija.

Bayat i sur. (2018) ispitivali su uspješnost (prolazne) transfekcije na adherentnim CHO-K1 stanicama u DMEM mediju. Medij se sastojao od smjese DMEM/F-12 uz dodatak FBS-a (10 %), penicilina, streptomicina i L-glutamina. Koristili su transfekcijsko sredstvo *Turbofect* te plazmide pLC-Puro i pHG-hygro. Pomoću ELISA-e su utvrdili uspješnost transfekcije tj. ekspresiju antitijela pri čemu je za označavanje korišten humani IgG1. Navedeno istraživanje primjer je pozitivnog rezultata transfekcije uz *Turbofect* transfekcijsko sredstvo koje u našem slučaju ipak nije dalo zadovoljavajuće rezultate.

Kao što je već spomenuto, DMEM se pokazao kao jedini povoljni medij za transfekciju CHO DP-12 stanica, kako adherentnih tako i suspenzijskih, uz *FuGene 6* kao transfekcijsko

sredstvo. To su potvrdili i radovi drugih stručnjaka, a uz DMEM medij dobri rezultati transfekcije su postignuti i s Opti-MEM i M199 medijima (Young i sur., 2004).

Iako su Young i sur. (2004) postigli učinkovitost transfekcije od oko 20 % na humanim endotelnim stanicama, poveznica s njihovim istraživanjem je što su ga također proveli u DMEM mediju, ali s manjim udjelom glukoze te su uklanjali transfekcijsku smjesu 3 sata nakon transfekcije kako bi se smanjio toksični utjecaj T.S. na stanice. Na sličan način bi se moglo provesti ispitivanje učinkovitost transfekcije adherentnih CHO DP-12 stanica i suspenzijskih stanica koje se uzgajaju u statičnim uvjetima.

Rosser i sur. (2005) proveli su istraživanje s četiri različita transfekcijska sredstva: DMRIE, *FuGene*, *Geneporter* i *Lipofectamine 2000*. Transfekciju su provodili na CHO stanicama te se transfekcijsko sredstvo *Lipofectamine 2000* pokazalo najučinkovitijim i to pri omjeru DNA:T.S. = 1:3, a *FuGene* je dao najlošije rezultate.

Osim svega navedenog, na učinkovitost transfekcije utječe i kvaliteta same plazmidne DNA. Plazmid mora biti pročišćen od proteina, RNA i endotoksina što je dio postupka pripreme plazmida za transfekciju (Bio-Rad Laboratories, 2022).

5. ZAKLJUČCI

1. Kemijski definirani mediji za uzgoj suspenzijske kulture CHO stanica (*PowerCHO*, *ExCell*, *FidCHO* i *CD CHO*) nisu prikladni za transfekciju stanica transfekcijskim sredstvom *FuGene 6*.
2. Za transfekciju CHO DP-12 stanica, adherentnih i suspenzijskih, pomoću *FuGene 6* kao jedini povoljni medij pokazao se DMEM.
3. Hidrolizati proteina lana u mediju DMEM nepovoljno utječu na uspješnost transfekcije CHO DP-12 stanica koristeći sredstvo *FuGene 6*.
4. Omjer mase plazmida (μg) i transfekcijskog sredstva (μL) *FuGene 6* koji daje najveći udio transfektanata je 1:6 u mediju DMEM bez dodanih proteinskih hidrolizata lana.

6. LITERATURA

- Anonymous 1 (2022) DMEM medij <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11965084> Pristupljeno 20. ožujka 2022.
- Anonymous 2 (2022) Uljna pogača lana <https://www.indiamart.com/proddetail/flaxseed-oil-cake-23164142897.html> Pristupljeno 06. svibnja 2022.
- Anonymous 3 (2022) Mapa plazmida pEGFP-C1 <https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/pegfp-c1-plasmid-p-63562.html> Pristupljeno 06. svibnja 2022.
- Anonymous 4 (2022) Neubauerova komorica <https://www.marienfeld-superior.com/counting-chambers-2817.html> Pristupljeno 07. veljače 2022.
- Anonymous 5 (2022) Mreža u Neubauerovoj komorici <https://shop.brand.de/en/p949> Pristupljeno 07. veljače 2022.
- Anonymous 6 (2022) Ploča s 24 jažice (eng. 24-well plate) <https://www.amazon.com/United-Scientific-F1004-Polystyrene-Non-Sterile/dp/B00ES3RR5Q> Pristupljeno 18.04.2022.
- Bayat H, Hoseinzadeh S, Pourmaleki E, Ahani R, Rahimpour A (2018) Evaluation of different vector design strategies for the expression of recombinant monoclonal antibody in CHO cells. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **48** (2), 160-164. DOI: [10.1080/10826068.2017.1421966](https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1421966).
- Beckmann TF, Krämer O, Klausning S, Heinrich C, Thüte T, Büntemeyer H, Hoffrogge R, Noll T (2012) Effects of high passage cultivation on CHO cells: a global analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 659–671. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3806-1>.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2022) https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.pdf Pristupljeno 30. svibnja 2022.
- Cavrić M (2021) Učinak hidrolizata proteina uljne pogače sjemenki lana na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Dahodwala H, Lee KH (2019) The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. *Curr Opin Biotechnol* **60**, 128-137. DOI: [10.1016/j.copbio.2019.01.011](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.011).

- Derouazi M, Girard P, Van Tilborgh F, Iglesias K, Muller N, Bertschinger M, Wurm FM (2004) Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol and Bioeng* **87** (4), 537-545. DOI: [10.1002/bit.20161](https://doi.org/10.1002/bit.20161).
- Ehrhardt C, Schmolke M, Matzke A, Knoblauch A, Will C, Wixler V, Ludwig S (2006) Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *J Signal Transduct* **6** (3), 179-184. DOI: <https://doi.org/10.1002/sita.200500073>.
- Eisenhut P, Klanert G, Weinguny M, Baier L, Jadhav V, Ivansson D, Borth N (2018) A CRISPR/Cas9 based engineering strategy for overexpression of multiple genes in Chinese hamster ovary cells. *Metab Eng* **48**, 72-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.017>.
- Freshney RI (2010) Serum-Free Media. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, str. 115-132.
- Girón-Calle J, Vioque J, Pedroche J, Alaiz M, Yust MM, Megías C, Millán F (2008) Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology* **57**, 263–272. DOI: [10.1007/s10616-008-9170-z](https://doi.org/10.1007/s10616-008-9170-z).
- Gutiérrez C, Rubilar M, Jara C, Verdugo M, Sineiro J, Shene C (2010) Flaxseed and Flaxseed cake as a source of compounds for Food Industry. *J Soil Sci Plant Nutr* **10** (4), 454-463. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000200006>.
- Herak Bosnar M (2004) Transfekcija stanica u kulturi i upotreba zelenog fluorescentnog proteina (Metodološki tečajevi u biologiji i medicini, Fluorescentna i konfolkalna mikroskopija) / Ambriović Ristov A. (ur.). Zagreb: Institut Ruđer Bošković.
- Ho SCL, Tong YW, Yang Y (2013) Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharm Bioprocess* **1** (1), 71-87.
- Hunter M, Yuan P, Vavilala D, Fox M (2018) Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Curr Protoc Protein Sci* **95** (1) DOI: [10.1002/cpps.77](https://doi.org/10.1002/cpps.77).
- Jäger V, Groenewold J, Krüger D, Schwarz D, Vollmer V (2015) High-titer expression of recombinant antibodies by transiently transfected HEK 293-6E cell cultures. *BMC Proc* **9**. DOI: <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S9-P40>.
- Karamać M, Kosińska-Cagnazzo A, Kulczyk A (2016) Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *Int J Mol Sci* **17** (7), 1027. DOI: [10.3390/ijms17071027](https://doi.org/10.3390/ijms17071027).

Logarušić M, Gaurina Srček V, Berljavac S, Leboš Pavunc A, Radošević K, Slivac I (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources* **10** (6), 59-71. DOI: <https://doi.org/10.3390/resources10060059>.

Logarušić M, Radošević K, Bis A, Paić M, Slivac I, Gaurina Srček V (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods Hum Nutr* **75**, 518-524. DOI: [10.1007/s11130-020-00841-z](https://doi.org/10.1007/s11130-020-00841-z).

Logarušić M, Slivac I, Radošević K, Gaurina Srček V (2019) Učinak proteina iz uljne pogače lana na rast i produktivnost CHO-E i HEK-293T stanica. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **14**, 98-104. DOI: <https://doi.org/10.31895/hcptbn.14.3-4.3>.

Nagy V, Watzele M (2006) FuGENE® 6 Transfection Reagent: minimizing reagent-dependent side effects as analyzed by gene-expression profiling and cytotoxicity assays. *Nat Methods* **3**. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth879>.

Nova Lifetech Inc (2022) <https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/pegfp-c1-plasmid-p-63562.html> Pristupljeno 04. svibnja 2022.

Ozturk S, Kaseko G, Mahaworasilpa T, Coster HGL (2004) Adaptation of Cell Lines to Serum-Free Culture Medium. *Hybrid Hybridomics* **22** (4). DOI: [10.1089/153685903322329009](https://doi.org/10.1089/153685903322329009).

Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L, Kamen A, Durocher Y (2005) Transient gene expression in HEK293 cells: Peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol Bioeng* **90** (3), 332–344. DOI: [10.1002/bit.20428](https://doi.org/10.1002/bit.20428).

Rajendra Y, Balasubramanian S, Hacker DL (2017) Large-Scale Transient Transfection of Chinese Hamster Ovary Cells in Suspension. *Methods Mol Biol* **1603**, 45-55. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6972-2_3.

Reid BG i Flynn GC (1997) Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochem* **36** (22), 6786-6791. DOI: [10.1021/bi970281w](https://doi.org/10.1021/bi970281w).

Rinkenauer AC, Schubert S, Traeger A, Schubert US (2015) The influence of polymer architecture on *in vitro* pDNA transfection. *J Mater Chem B* **3**, 7477-7493. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5TB00782H>.

- Ritacco FV, Wu Y, Khetan A (2018) Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Prog* **34** (6), 1407-1426. DOI: [10.1002/btpr.2706](https://doi.org/10.1002/btpr.2706).
- Rosser MP, Xia W, Hartsell S, McCaman M, Zhu Y, Wang S, Harvey S, Bringmann P, Cobb RR (2005) Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Protein Expr Purif* **40** (2): 237-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.07.015>.
- Sanmartin C, Taglieri I, Venturi F, Macaluso M, Zinnai A, Tavarini S, Botto A, Serra A, Conte G, Flamini G, Angelini LG (2020) Flaxseed Cake as a Tool for the Improvement of Nutraceutical and Sensorial Features of Sourdough Bread. *Foods* **9** (2), 204. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9020204>.
- Sharker SM, Rahman A (2021) A Review on the Current Methods of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells Cultivation for the Production of Therapeutic Protein. *Curr Drug Discov Technol* **18** (3), 354-364. DOI: [10.2174/1570163817666200312102137](https://doi.org/10.2174/1570163817666200312102137).
- Sheikh S, Coutts AS, La Thangue NB (2017) Chapter 11 – Transfection, Basic Science Methods for Clinical Researchers, str. 191-209.
- Slivac I, Gaurina Srček V, Radošević K (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu.
- Slivac I, Guay D, Mangion M, Champeil J, Gaillet B (2017) Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opin Biol Ther* **17** (1), 105-118. DOI: [10.1080/14712598.2017.1248941](https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1248941).
- Stolfa G, Smonskey MT, Boniface R, Hachmann AB, Gulde P, Joshi AD, Pierce AP, Jacobia SJ, Campbell A (2017) CHO-Omics Review: The Impact of Current and Emerging Technologies on Chinese Hamster Ovary Based Bioproduction. *Biotechnol J* **13** (3). DOI: [10.1002/biot.201700227](https://doi.org/10.1002/biot.201700227).
- Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen AF, Honneger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro* **24** (4), 1053-1063. DOI: [10.1016/j.tiv.2010.03.016](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016).

Young ATL, Moore RB, Murray AG, Mullen JC, Lakey JRT (2004) Assessment of Different Transfection Parameters in Efficiency Optimization. *Cell Transplant* **13**: 179-185. DOI: <https://doi.org/10.3727/000000004773301861>.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (VLATKA KOZARIĆ) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Kozarić

Vlastoručni potpis