

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Viktória Murajdová

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

Optimization of recombinant protein expression in the human cell line HEK293

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Praha, 2024

Prohlášení:

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

V Praze dne 22. 8. 2024

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Na začátek bych chtěla poděkovat RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D., za jeho trpělivost, odborné vedení a možnost pracovat na této práci v Laboratoři strukturní biochemie imunitního rozpoznávání. Ráda bych také poděkovala RNDr. Adamovi Obrovi, Ph.D., za měření a vyhodnocení výsledků průtokové cytometrie na *Ústavu hematologie a krevní transfuze*. Děkuji také kolegům z Laboratoře strukturní biochemie imunitního rozpoznávání, konkrétně Mgr. Kristýně Pazderové, Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu a Bc. Jakubovi Jeníčkovi, na které jsem se mohla v případě nejasností kdykoliv obrátit. Také děkuji všem kolegům za zpříjemnění atmosféry při práci. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za neustálou podporu, pomoc a hlavně trpělivost v průběhu mého studia.

ABSTRAKT

Lidská buněčná linie HEK293 se v posledních letech stala klíčovým nástrojem pro rekombinantní expresi proteinů, a to zejména v kontextu genové terapie. Z tohoto hlediska je důležité poznat podmínky, které zajišťují efektivní a nenáročnou expresi těchto proteinů. Tato práce se zaměřila na optimalizaci tranzientní transfekce v buněčných liniích HEK293T a MEXi-293E s cílem zefektivnit tuto metodu a zároveň zabezpečit efektivní výtěžnost proteinů. K určení těchto podmínek byly použity snadno detekovatelné reportérové proteiny – zelený fluorescenční protein (GFP) a sekretovaná alkalická fosfatasa (SEAP). Proces optimalizace zahrnoval porovnání tří typů transfekčního činidla – lineárního polyethyleniminu, jeho poměry k DNA a podmínky, za kterých transfekce probíhala. Úspěšnost transfekce byla hodnocena sledováním fluorescence GFP metodou průtokové cytometrie, zatímco úspěšnost produkce byla měřena v závislosti na katalytické aktivitě SEAP spektrofotometricky.

KLÍČOVÁ SLOVA

HEK293, rekombinantní exprese, transfekce, tkáňová kultura, průtoková cytometrie

ABSTRACT

In recent years, the human cell line HEK293 has become a key tool for recombinant protein expression, particularly in the context of gene therapy. Understanding the conditions that ensure efficient and cost-effective expression of recombinant proteins is crucial. This study focused on optimizing transient transfection in human cell lines HEK293T and MEXi-293E, with the main goal of enhancing the efficiency of this method as well as ensuring effective protein yield. To determine these conditions, easily detectable reporter proteins – green fluorescent protein (GFP) and secreted alkaline phosphatase (SEAP) – were used. The optimization process involved comparing three types of transfection reagent linear polyethyleneimine, its ratios to DNA, and the conditions, under which the transfection occurred. Transfection efficiency was determined by the fluorescence signal of GFP using flow cytometry, while production efficiency was measured by spectrophotometry based on the catalytic activity of SEAP.

KEY WORDS

HEK293, recombinant expression, transfection, tissue culture, flow cytometry

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AP	alkalická fosfatasa (z angl. alkaline phosphatase)
BEVS	expresní vektorový systém bakuloviru (z angl. baculovirus expression vector system)
bPEI	větvený polyethylenimin (z angl. branched polyethyleneimine)
CHO	buněčná linie odvozená z vaječníku křečička čínského (z angl. Chinese hamster ovary)
EBNA-1	jaderný antigen 1 viru Epstein-Barrové (z angl. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1)
FACS	třídění buněk pomocí fluorescence (z angl. fluorescence-activated cell sorting)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. foetal bovine serum)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
GnTI	N-acetylglukosaminyltransferasa I
HEK	lidské embryonální ledvinné buňky (z angl. human embryonic kidney)
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
LEXSY	expresní systém <i>Leishmania tarentolae</i> (z angl. <i>Leishmania tarentolae</i> expression system)
IPEI	lineární polyethylenimin
NS0	buněčná linie odvozena z myších hybridomů
oriP	počátek pro replikaci genomu viru (z angl. origin of viral replication)
PEI	polyethylenimin
PI	propidium jodid (z angl. propidium iodide)
PLL	poly-L-lysin
pNPP	4-nitrofenyl fosfát (z angl. para-nitrophenyl phosphate)
RFPs	červeně fluoreskující proteiny (z angl. red fluorescent proteins)
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatasa (z angl. secreted alkaline phosphatase)
SV40 ori	replikační počátek DNA viru SV40
TMV	vir tabákové mozaiky (z angl. tobacco mosaic virus)

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	6
1. TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
1.1 EXPRESNÍ SYSTÉMY.....	10
1.1.1 Prokaryotické expresní systémy	11
1.1.2 Eukaryotické expresní systémy	14
1.2 BUNĚČNÁ LINIE HEK293.....	19
1.3 MOŽNOSTI VPRAVENÍ DNA DO HOSTITELSKÝCH BUNĚK	20
1.4 TRANSFEKCE HEK293.....	23
1.4.1 Optimalizace tranzientní transfekce	24
1.4.2 Polyethylenimin.....	25
1.5 REPORTÉROVÉ PROTEINY.....	27
1.5.1 Sekretovaná alkalická fosfatasa.....	27
1.5.2 Zelený fluorescenční protein.....	28
1.5.3 mScarlet	30
2. CÍLE PRÁCE	32
3. MATERIÁL.....	33
3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	33
3.2 CHEMIKÁLIE	34
3.3 BAKTERIÁLNÍ A BUNĚČNÉ LINIE.....	34
3.4 VEKTORY	34
3.5 ENZYMY	34
3.6 KULTIVAČNÍ MÉDIA	35
3.7 ROZTOKY A PUFRY	35
4. METODY.....	36
4.1 VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA pTW5_GFP a pTW5sec_SEAP.....	36
4.1.1 Extrakce DNA	36

4.1.2	Určení koncentrace a čistoty DNA.....	37
4.2	BUNĚČNÉ LINIE HEK293T A MEXi-293E.....	37
4.2.1	Rozmrazování buněčných linií HEK293T a MEXi-293E	37
4.2.2	Kultivace buněčných linií HEK293T a MEXi-293E.....	37
4.2.3	Určení buněčné hustoty a viability	38
4.3	TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE LINIÍ HEK293T A MEXi-293E	38
4.3.1	Příprava transfekčního roztoku plazmidové DNA a PEI	38
4.3.2	Příprava buněčné suspenze pro tranziентní transfekci.....	39
4.3.3	Příprava transfekčního činidla IPEI*	39
4.4	STANOVENÍ REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ	40
4.4.1	Stanovení úspěšnosti transfekce pomocí průtokového cytometru.....	40
4.4.2	Stanovení úspěšnosti transfekce automatickou počítačkou buněk.....	41
4.4.3	Stanovení úspěšnosti produkce měřením aktivity SEAP.....	41
5.	VÝSLEDKY	42
5.1	TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE LINIÍ HEK293T A MEXi-293E	43
5.1.1	Optimalizace buněčné hustoty a typu transfekce	43
5.1.2	Stanovení viability buněk a účinnosti transfekce	44
5.2	TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T.....	46
5.2.1	Optimalizace poměru DNA s různými typy IPEI.....	46
5.2.2	Stanovení viability a míry fluorescence GFP.....	48
5.2.3	Stanovení katalytické aktivity sekretované alkalické fosfatasy	50
5.3	TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T.....	53
5.3.1	Porovnání přímého přidání a inkubace DNA s IPEI.....	53
5.3.2	Vyhodnocení viability a úspěšnosti transfekce.....	54
5.4	TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE LINIÍ HEK293T A MEXi-293E	55
5.4.1	Optimalizace transfekčního postupu.....	55
5.4.2	Viabilita a buněčná hustota HEK293T a MEXi-293E v průběhu 2 dní....	56

5.4.3	Vyhodnocení transfekční účinnosti po 1. a 2. dni.....	59
6.	DISKUSE.....	61
7.	ZÁVĚR.....	65
8.	SEZNAM LITERATURY.....	66

1. TEORETICKÝ ÚVOD

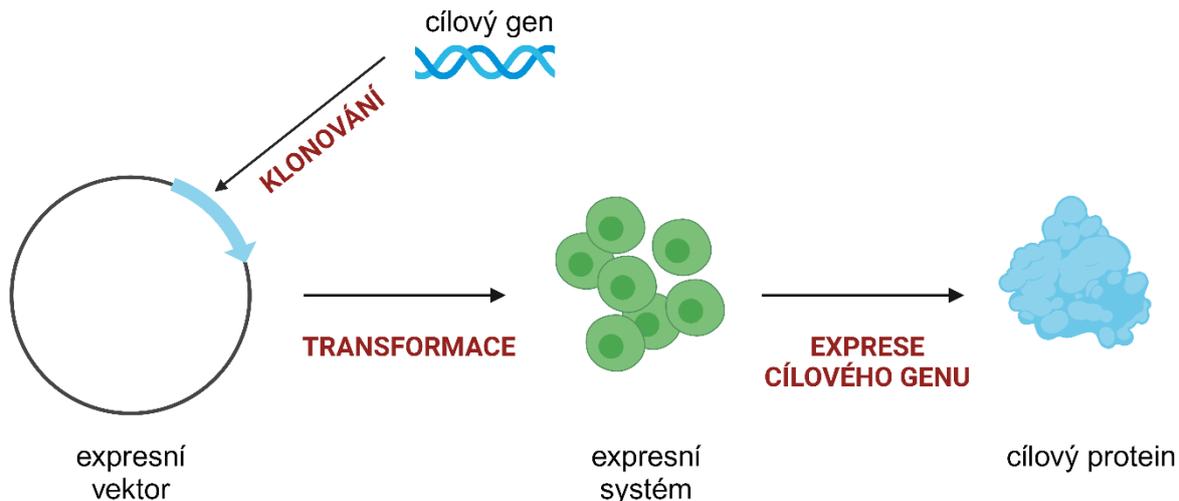
1.1 EXPRESNÍ SYSTÉMY

Rozvoj molekulární genetiky po roce 1970 přinesl různé metody, které přispěly k jejich zlepšení pro analýzu a manipulaci s DNA [1, 2]. Dnes jsou tyto tzv. genové technologie důležitým aspektem našeho života. Umožňují nám produkovat geneticky modifikované organismy, které jsou více odolné vůči nepříznivým podmínkám. Jsou klíčovou součástí rekombinantní exprese proteinů, jako jsou enzymy či terapeutická léčiva. Rovněž nám tyto metody slouží pro výzkumné účely.

Rekombinantní DNA (r-DNA) představuje jakoukoliv uměle vytvořenou molekulu DNA, obsahující určité sekvence, které by nebylo možné v dané formě volně v přírodě nalézt [3, 4]. Zavedením r-DNA do živých buněk tak dochází k její expresi, a tudíž k převedení na rekombinantní proteiny (r-proteiny). Jako zjednodušený přehled produkce r-proteinů slouží obrázek 1, str. 11.

To, že jsou proteiny rekombinantní, znamená, že jejich produkce probíhá v organismech, ve kterých se běžně nevyskytují [3, 4]. V průběhu let bylo studiem této metody vyvinuto několik druhů expresních systémů, tedy hostitelských organismů. Volbou jsou organismy od nízkých prokaryot až po eukaryotické savčí buněčné linie. Každý z těchto typů hostitelů má však svoje výhody i nevýhody, které jsou klíčové při průběhu exprese.

Jak již bylo zmíněno, jedním z využití rekombinantní exprese proteinů je výroba terapeutických léčiv. Asi 50 % přirozených lidských proteinů jsou glykoproteiny [5]. Sacharidové části dodávají proteinovým strukturám konkrétní fyzikální a chemické vlastnosti, čímž přispívají ke správné formě a funkci těchto proteinů. Tyto vlastnosti hrají důležitou roli v udržování stálosti vnitřního prostředí a v regulaci imunitního systému [6]. Z hlediska rekombinantní exprese proteinů jsou proto významné posttranslační modifikace, zejména glykosylace, které zabezpečují přidání sacharidového zbytku a tím určují, jakou funkci bude daný glykoprotein vykonávat.



Obrázek 1: Schématické znázornění rekombinantní exprese proteinů. Gen pro cílový protein je klonováním vložen do expresního vektoru (plazmidu), jenž je následně transformací vložen do daného expresního systému (hostitelské buňky). Expresí cílového genu v expresním systému dochází k produkci cílového proteinu. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

1.1.1 Prokaryotické expresní systémy

Pro rekombinantní expresi proteinů jsou dodnes často upřednostňovanými hostiteli prokaryotické organismy [7]. Jelikož se z hlediska evoluce jedná o méně vyvinuté organismy s jednoduššími biochemickými procesy, práce s nimi je méně obtížná a nevyžaduje tak vysoké nároky pro úspěšnou expresi. Na druhé straně bakteriální organismy postrádají mnohé posttranslační modifikace, čímž je jejich využití omezené pouze pro produkci jednodušších a menších proteinů.

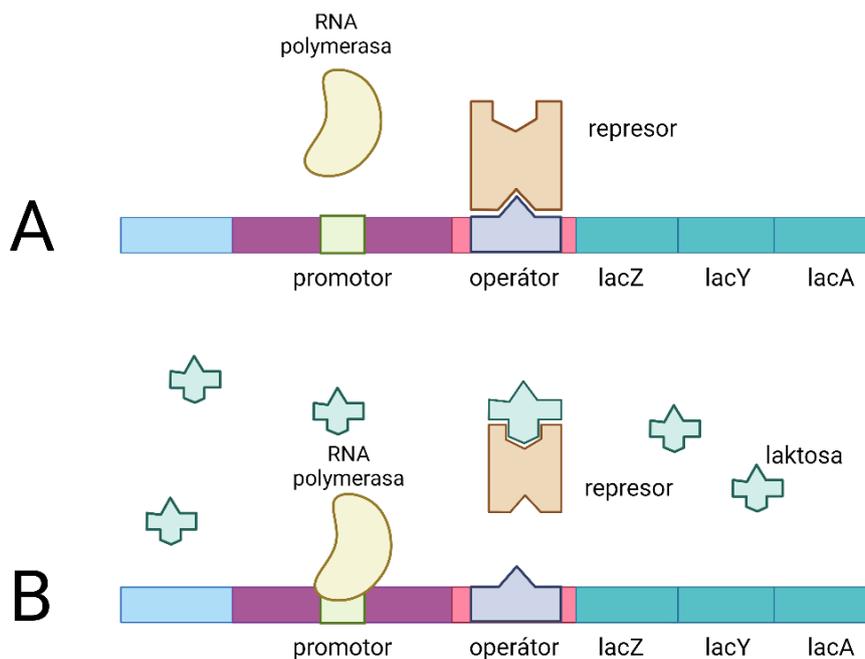
Příkladem bakteriálního modelového organismu, a zároveň jednoho z nejpoužívanějších a nejstarších systémů pro expresi r-proteinů, je *Escherichia coli* (*E. coli*) [8, 9]. Mezi výhody *E. coli* patří schopnost rychlého a intenzivního dělení, rychlá exprese r-DNA, možnost využití levných medií, vysoká efektivita a výtěžky. Dalším přínosem *E. coli* je růst ve vysokých hustotách. Díky růstu v malém objemu a za vysokých hustot bylo možné dosáhnout vysoké výtěžky r-proteinů v krátkém časovém úseku.

Kvůli absenci glykosylačních dějů, které by zabezpečily produkci nám blízkých glykoproteinů se správnou funkcí, byly postupně navrženy různé varianty kmenů těchto buněk [8]. Zdokonalováním genetického materiálu byla *E. coli* modifikována tak, aby byla schopna vytvořit i složitější eukaryotické proteiny.

Využití *E. coli* pro expresi má ovšem i jistá omezení. Ve vysoké hustotě dochází ke vzniku nadbytku acetátu, který se pro ně stává toxickým. Také bylo sledováno, že při expresi heterologních proteinů dochází u *E. coli* k agregaci proteinů a vzniku tzv. inkluzních tělísek [10]. Jedná se o větší shluky r-proteinů, které vznikají při jejich nadměrné produkci. Nahromaděním r-proteinů v cytosolu spolu proteiny interagují a nastává tak jejich shlukování. Po produkci a vzniku těchto struktur je však možné provést renaturaci. Tím dochází k opětovnému složení a získání původních funkčních r-proteinů [11–13].

Specifickým genetickým regulačním systémem u *E. coli* je laktosový operon (lac-operon). Díky sledování a pochopení jeho mechanismu byly vysvětleny jednotlivé kroky řídicí genovou expresi (viz Obrázek 2, str. 13). Lac-operon je úsek DNA, přepisovaný pro tvorbu proteinů přítomných při metabolických přeměnách laktosy. Dochází k jejímu odbourávání na galaktosu a glukosu, které pro buňky slouží jako zdroj energie. Druhým způsobem je přeměna laktosy na její izomer alolaktosu [1, 14].

Alolaktosa je, podobně jako laktosa, přirozeným induktorem lac-operonu. V případě, kdy laktosový represor (lac-represor) pozastavuje expresi lac-operonu, alolaktosa alostericky modifikuje daný represor. Výsledkem je změna afinity lac-represoru k DNA, což umožňuje iniciaci transkripce. Dochází k vytvoření vazby mezi RNA-polymerasou a promotorem lac-operonu. Na základě alolaktosy jako laktosového induktoru (lac-induktoru) byly později navrženy různé syntetické analogy. Jedním z nich byl isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG, z angl. isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) [15, 16]. Použitím IPTG je tedy zabezpečena indukce exprese r-genů pod kontrolou lac-operonu.



Obrázek 2: Přehled regulace lac-operonu. Na obrázku můžeme vidět hlavní komponenty sloužící k expresi skupiny genů tvořících lac-operon. Laktosový operon je tvořen sekvencí pro represor, promotorem a geny *lacZ*, *lacY* a *lacA*, které kódují enzymy spojené s metabolismem laktosy. Pokud se v okolí operonu nenachází laktosa (panel A), represor je navázán na operátor. Takto blokuje transkripci genů Z, Y a A. V případě přítomnosti laktosy (panel B) dochází k jejímu navázání na lac-represor, čímž dochází k jeho alosterické změně. Není tak schopen bránit transkripci genů. Na promotor nasedá RNA polymerasa a tak je zahájena exprese genů. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

Dalším expresním systémem k produkci r-proteinů u *E. coli* je systém T7 RNA polymerasy [17, 18]. Ten se skládá z promotoru T7, který reguluje expresi cílového proteinu, a RNA polymerasy z bakteriofága T7. T7 RNA-polymerasa je exprimována pomocí *lacUV5* promotoru. Tento promotor představuje mutovanou verzi lac-promotoru, který je citlivý na přítomnost IPTG. Vytvořená T7 RNA-polymerasa rozeznává T7 promotor, na který nasedá. Tak dochází k transkripci genu pro cílový protein. Využitím tohoto systému je zabezpečena zvýšená transkripce r-genu a následně produkce kýženého r-proteinu. Nevýhoda tohoto mechanismu spočívá v tom, že nadměrná tvorba nemusí být vždy efektivní. Rizikem je ku příkladu nadměrná produkce cílového proteinu, který může být pro hostitelské buňky toxickým.

Jinou alternativou, jak indukovat expresi rekombinantních proteinů, je využití autoindukčních médií, jejichž složení a funkci popsal v roce 2005 F. W. Studier [18]. Tato média slouží k syntéze cílového proteinu v systému T7 RNA polymerasy bez přítomnosti IPTG. Média jsou složena ze základních zdrojů uhlíku a živin, které podporují růst buněčné kultury a nedochází k narušení produkce proteinů. Glukosa podporuje růst buněčných kultur v počáteční fázi, a po vyčerpání glukosy je jejím zdrojem laktosa, která zároveň podporuje expresi r-proteinu. Na základě mnohých studií, kde se porovnávala funkčnost těchto dvou typů indukce, bylo zjištěno, že v případě využití IPTG nebyly výtěžky očekávaných proteinů tak vysoké, jako to bylo u autoindukčních médií, která podporují růst bakteriální kultury do významně vyšší buněčné hustoty [19].

1.1.2 Eukaryotické expresní systémy

Od prokaryotních systémů se věda posunula dál. Na základě podobných procesů a kroků exprese se do pozornosti dostaly i eukaryotní organismy. Jde o širokou škálu organismů od nižších forem, jakými jsou kvasinky, rostlinné, nebo hmyzí buňky, až po nejvyvinutější savčí buněčné linie.

Struktura a funkce proteinů závisí na specifických krocích použitých při jejich formování [20–22]. Prokaryotní organismy, díky své jednoduchosti, nevyžadují pro přežití složité proteiny. Naopak eukaryotní systémy zahrnují složité signální dráhy a mohou provádět komplexní posttranslační modifikace, jako jsou fosforylace, tvorba disulfidických můstků nebo glykosylace. Glykosylace, jako jedna z klíčových modifikací, je zvláště důležitá pro správné složení a funkci proteinů při jejich úkolu jako léčiv. Glykosylací u nižších eukaryot, jako jsou kvasinky, prvoci, hmyz a rostliny, vznikají jednodušší formy glykoproteinů. Každý z těchto organismů může tedy postrádat, nebo naopak zahrnuje při modifikacích odlišné kroky. Proto byly v průběhu studií u těchto organismů navrženy a provedeny modifikace jejich glykosylačních drah (viz dále).

Nejjednodušším expresním systémem eukaryot jsou kvasinky. Díky rychlému růstu a jejich kultivaci ve vysoké buněčné hustotě jsou ve spojení s posttranslačními modifikacemi vhodným systémem. Rostou rychle, lze je udržet ve vysoké buněčné hustotě, produkují značné množství proteinů, a zajišťují snadnou expresi r-proteinů bez přítomnosti patogenů. Podobně, jako *E. coli*, i tyto organismy zajišťují lehký a levný postup, a jsou schopny provádět posttranslační modifikace [23]. Jde o některé N- a O-glykosylace a formování disulfidických můstků, čímž vznikají komplikovanější struktury proteinů. V porovnání se složitějšími eukaryoty jsou však kvasinky jednoduššími buňkami. Při produkci léčiv tedy nejsou exprimované r-proteiny glykosylovány v souladu s potřebnými strukturami. V případě kvasinek převládá glykosylace manosového typu [23]. Výsledné glykoproteiny jsou tvořeny velkým množstvím manos. Naopak lidské N-glykany jsou komplexnější a složitější.

První kvasinkou, sloužící jako hostitelský systém pro produkci r-proteinů, byla v roce 1983 *Saccharomyces cerevisiae* [24]. H. Ito a kol. sledovali schopnost těchto buněk přijímat cizorodou DNA, a to účinkem alkalických iontů. *S. cerevisiae* byla známá už předtím, jelikož se používá ve vinařství, pivovarnictví a při pečení. Při jejím použití k expresi heterologních proteinů však byly zaznamenány problémy související s nízkými výtěžky a hyperglykosylací.

Problém spočívá v tom, že na rozdíl od lidských buněk postrádají tyto organismy v Golgiho aparátu mechanismus, který zajišťuje odštěpení manos. V případě posttranslačních změn u nich dochází k prodloužení oligosacharidového jádra [25]. Vznikají tak struktury s dlouhými řetězci α -1,6 manos. Struktury jsou pak modifikovány přidáním α -1,2- a α -1,3-manosových řetězců. Formovány jsou tak složitější proteiny s vysokou molekulovou hmotností. Nejedná se však o formy glykoproteinů, které by mohly být vhodným léčivem [26, 27]. Tím pádem není možné získávat konkrétní formy r-proteinů. Dokonce bylo zjištěno, že léčivo tohoto typu působí v lidském těle imunogenně, což bylo zjištěno u α -1,3 vázaných manos [25]. To znamená, že výsledným účinkem v lidském těle je vyvolání nežádoucí imunitní reakce.

Jiným zástupcem kvasinek je *Pichia pastoris*. Jedná se o methylotrofní kvasinku, pro kterou je typická regulace exprese enzymu alkoholoxidasy [28]. Výzkum, kterým byla dokázána její schopnost heterologní exprese, byl proveden v roce 1985 J. Creggem a kol. [29]. Transformace plazmidové DNA byla umožněna pomocí CaCl_2 a polyethylenglykolu, který způsobil zvýšení permeability buněčné stěny.

Podobně jako u *S. cerevisiae*, i u *P. pastoris* dochází k formování dlouhých manosových řetězců. Pro odstranění tohoto děje byly navrženy různé genetické úpravy kvasinek. V případě *P. pastoris* dochází k prodlužování manosového řetězce katalýzou za pomoci enzymu α -1,6-manosyltransferasy. Proto byla snaha o odstranění genu, který kóduje α -1,6-manosyltransferasu. Navržen byl i nový gen, který měl být exprimován tak, aby produkoval proteiny s kratšími glykany [30]. Porovnáním s původní formou kvasinky byla sledována redukce počtu manos z 10 na 8. Na druhé straně vykazovala tato forma *P. pastoris* pomalý růst, teplotní citlivost a špatnou tvorbu dceřiných buněk během pučení.

Typickým zástupcem prvoků využívaných k produkci r-proteinů je *Leishmania tarentolae*. Pochází ze skupiny *Trypanosomatidae*, a je parazitem gekona, ze kterého byla v roce 2002 izolována [31]. I přesto, že je parazitem, pro savčí organismy nepředstavuje hrozbu [32, 33]. S novými výzkumy a kultivacemi tohoto organismu byl firmou Jena Bioscience (Německo) vytvořen expresní systém LEXSY (z angl. *Leishmania tarentolae* expression system) [34]. Tento systém zjednodušil metodu pro produkci proteinů. LEXSY umožňuje růst buněk do vysokých koncentrací s cenově výhodným médiem. Využitím LEXSY bylo později možné získávat proteiny, které byly glykosylovány komplexními N-glykany s galaktosou i fukosou, čímž vykazovaly již relativně blízké typy glykosylace, jako u savčí buněčné linie odvozené z buněk vaječníku křečička čínského (CHO, z angl. Chinese hamster ovary) [31].

Vhodnou alternativou organismů pro expresi proteinů jsou i rostliny. Podobně jako u kvasinek a prvoků, ani zacházení s rostlinami a jejich pěstování není nákladnou záležitostí. Kromě využití rostlinných buněčných linií je možná exprese r-proteinů i jejich organelami. Jelikož jsou průmyslově bohatě využívány, problém nepředstavuje ani jejich sklizeň, skladování, nebo zpracování [35]. Kromě toho jejich hojné množení souvisí i s genetickými úpravami, které jsou z hlediska zemědělství běžné. Geneticky modifikované (GM) rostliny jsou pak odolnější vůči jejich přirozeným parazitům, nemocem, a taky vůči vnějším podmínkám. Ve spojení s vývojem a úpravami chloroplastových transformací a objevením silných, indukovatelných promotorů, byly výsledkem vyšší výtěžky r-proteinů. Oproti bakteriím je viditelný posun v otázce glykosylačních dějů, avšak rostlinné glykany jsou od savčích (lidských) značně odlišné. Taky jsou lehko transfekovatelné za použití různých vektorů, a nedochází u nich k produkci endotoxinů [36].

Jednou z metod produkce r-proteinů v rostlinných buňkách je stabilní transformace. Tento proces umožňuje trvalou produkci těchto proteinů zavedením jejich expresních vektorů do rostlinných buněk [36, 37]. V rostlinách je možné tyto vektory zavést nejen do jaderného genomu, ale i do chloroplastového genomu. Chloroplasty jsou v rostlinných buňkách hojně zastoupeny, což z nich činí vhodný nástroj pro výrobu r-proteinů. Na rozdíl od jaderného genomu nedochází u chloroplastů k potlačení genů, což zajišťuje stabilní expresi r-DNA ve větším měřítku. Použitím promotorů specifických pro pletiva různých organel je dokonce možné produkci lokalizovat na konkrétním místě. Výhodou této metody je stabilní produkce několika typů r-proteinů. Na druhé straně může v případě jaderného genomu docházet k nestabilní expresi, nebo dokonce k „umlčení“ genů [38]. Záměnou tohoto genomu za genom chloroplastů má taky své nevýhody. Při formování r-proteinů postrádají potřebnou glykosylaci. Další nevýhoda stabilní exprese je i její časová náročnost.

Pro zrychlení této metody je vhodnou volbou tranzientní exprese genů. V porovnání se stabilní expresí spočívá její výhoda v rychlejší produkci r-proteinů [39, 40]. Tato metoda je prováděna infiltrací rostlin jejich patogenem *Agrobacterium tumefaciens* [41]. Její strategii jako patogenu je přenos svých částí DNA do rostlinných buněk. Napadá je pomocí tumor-indukčního plazmidu (Ti), který obsahuje oblast přenosové DNA (T-DNA), gen virulence, a počátek replikace. Po započítí infekce se do jádra rostlinné buňky přenesou T-DNA oblast Ti-plazmidu, kde dojde k fúzi s genomem rostliny. Tak je uskutečněna exprese virulentních genů.

Vědci také zjistili, že pro nádorové působení *A. tumefaciens* jsou potřebné dva plazmidy, které spolu interagují [40, 42]. Jeden z těchto plazmidů obsahuje T-DNA a druhý virovou oblast. Pro rostlinný expresní systém je tak možné použít plazmidy *A. tumefaciens*, a to jejich genetickou modifikací s T-DNA. Druhý plazmid, který obsahuje virovou oblast, funguje jako pomocník, pro přenos genomu *A. tumefaciens* do rostlinných buněk. Tyto binární vektory jsou zbaveny nežádoucích virulentních genů. Zavedením r-DNA do rostlinných buněk a následným infikováním rostlin touto bakterií dochází k růstu výhonků a kořenů. Tím se rostlina stává hostitelem k produkci r-proteinů. Tranzientní transfekce genomem *A. tumefaciens* je nejčastěji uskutečňována v expresním systému tabáku *Nicotiana benthamiana*. Tato rostlina je schopná rychle růst a práce s ní je nenáročná. Jako vektor je možné použít kromě *A. tumefaciens* i vir tabákové mozaiky (TMV, z angl. tobacco mosaic virus) [36]. S vývojem a dalšími pracemi se z ní stal jeden z nejpoužívanějších rostlinných expresních systémů.

Jako expresní systém mohou fungovat i hmyzí buňky. K přenosu genů do hmyzích buněk jsou používány zejména bakulovirové vektory [5, 43]. Bakuloviry fungují na základě jejich úlohy jako přirozené viry hmyzu. Proto se využívá jejich infekční schopnost k přenosu r-DNA do hmyzích expresních systémů. Jedním ze zástupců bakulovirů je expresní vektorový systém bakuloviru (BEVS, z angl. baculovirus expression vector system). BEVS byl objeven kolem roku 1980, kdy byl použit k expresi r-proteinů v hmyzí buněčné linii *Spodoptera frugiperda* [44]. Jeho využití je spojeno se schopností pojmout delší sekvence DNA, lehká práce s nimi a vysoké výtěžky r-proteinů. Transfekcí hmyzích buněk tímto systémem jsou umožněny rozmanité O- a N-glykosylace, čímž hmyzí buňky zabezpečují produkci r-proteinů se správnou strukturou, a tedy i funkcí. Jedním z nejpoužívanějších hmyzích expresních systémů pro BEVS jsou buněčné linie odvozené od můry *Spodoptera frugiperda* (Sf). První buněčná linie Sf byla izolována z ovariální tkáně tohoto hmyzu a označena jako forma Sf21 [45]. Od této varianty byla dále odvozena i další buněčná linie, označena jako Sf9 [46].

Dalším dnes komerčně dostupným systémem je i expresní systém drozofily (DES, z angl. *Drosophila* expression system), který byl objeven v roce 1989 [47]. Oproti savčím buňkám, které formují komplexnější N-glykany, u drozofily nedochází k prodlužování cukerných řetězců. Naopak aktivitou membránově vázaného enzymu β -N-acetylglukosaminidasy se N-glykany převádí na paucimanosovou formu [48]. Jelikož u drozofily dochází při formování glykoproteinů k tvorbě N-glykanů odlišných od člověka, bylo nutné provést určité genetické úpravy. Pro „humanizaci“ hmyzí glykosylace byly expresní systémy modifikovány tak, aby byla aktivita β -N-acetylglukosaminidasy potlačena [48].

Jakožto nám nejbližší eukaryota, savčí organismy jsou schopny glykosylací modifikovat proteiny za vzniku rozvětvených řetězců, obsahujících různé cukerné zbytky [49]. V porovnání s ostatními expresními systémy jsou však savčí buněčné linie náročné z hlediska jejich kultivace. K produkci léčiv je známá buněčná linie odvozena z vaječníku křečička čínského (CHO). Je ní produkována většina monoklonálních protilátek. Výhodou tohoto systému je růst v relativně vysokých hustotách a možnost použití bezsérového média. Dalším známým systémem je buněčná linie odvozená z myších hybridomů (NS0). Jelikož jsou odvozeny od myší, tyto buňky produkují protilátky s epitopy, tedy specifickými oblastmi na povrchu molekul, které mohou u člověka působit imunogenně [50]. Tím dochází v lidském těle k vyvolání nežádoucích imunitních reakcí.

Naproti savcím systémům odlišných živočišných druhů se používají i lidské buněčné linie [49]. Jedná se např. o buněčnou linii odvozenou od lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (HEK, z angl. human embryonic kidney). Pro expresi r-proteinů je prováděna jak stabilní, tak tranzientní transfekce (viz kap. 1.4, str. 23), nejčastěji pomocí CaCl_2 nebo s použitím polyethyleniminu (IPEI, z angl. linear polyethyleneimine). Výhodou této linie je produkce r-proteinů se správnou funkcí, které nepůsobí na imunitní systém nepříznivě.

1.2 BUNĚČNÁ LINIE HEK293

Jedná se o lidskou buněčnou linii odvozenou z embryonální ledvinové tkáně, známé od roku 1970 [51]. Tato linie byla vytvořena F. Grahamem izolováním buněk z ledvin potracených embryí [51]. Linie HEK293 vznikla z původních izolovaných buněk transformací fragmenty DNA adenoviru typu 5 [52]. Díky přítomnosti adenovirální DNA se staly embryonální ledvinné buňky immortalizovanými. To tedy zabezpečuje buňkám HEK293 schopnost dělit se neomezeně dlouho. Zlepšení růstu a intenzivnější dělení oproti původním buňkám také představovalo možnost zavedení HEK293 buněk do různých experimentů. Původně byla tato buněčná linie definovaná jako buňky epiteliálního původu, ale na základě mnohých pozorování se přišlo na to, že adenovirová DNA transformuje převážně neurální buněčné linie [53]. Proto jsou dnes HEK293 buňky brány za linii odvozenou z neurálních ledvinných buněk [53].

Uskutečněním dalších transfekcí byly připraveny rozličné varianty HEK293 buněčné linie. V případě varianty HEK293T se jedná o linii transfekovanou genem, díky kterému dochází k expresi velkého T antigenu polyomaviru SV40 [54]. Tím je epizomálně replikován plazmid, který obsahuje replikační počátek SV40 [54]. Amplifikační vektoru s replikačním počátkem SV40 byla při tranzientní expresi sledována vyšší míra exprese proteinů [55]. Dalším derivátem je HEK293E. Tato buněčná linie byla připravena stabilní transfekcí jaderným antigenem I viru Epstein-Barrové (EBNA-1, z angl. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1) [56]. Exprese tohoto genu podporuje epizomální replikaci plazmidů, které obsahují počátek replikace specifický pro tento vir (oriP, z angl. origin of viral replication) [56]. Jinou variantou jsou i HEK293S buňky. Jejich výhoda spočívá v možnosti růst volně v suspenzi. Z této linie pak byla vytvořena další varianta, u které byla inhibována aktivita N-acetylglukosaminyltransferasy I (GnTI) [57]. Linie HEK293S GnTI⁻ pak provádí oproti původním HEK293S buňkám omezenější a homogenní N-glykosylaci [57].

Značnou výhodou těchto hostitelských buněk je fakt, že jako buňky lidského původu jsou schopny provádět posttranslační modifikace (především glykosylaci), kterými získáváme lidskou formu r-proteinů [58, 59]. Dalšími vlastnostmi buněk HEK293 je jejich rychlý růst a vysoká míra transfekovatelnosti [60, 61]. To jsou výhodné vlastnosti pro možnost relativně rychlé exprese r-proteinů. Pro zachování jejich fyziologických podmínek jsou inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂. Přítomnost 5 % CO₂ je důležitá pro udržování stálého pH kultivačního média.

Nevýhodou je jejich náročnost pro kultivaci. Pro kultivaci tkání se běžně používá sérum pocházející ze zvířat. Nejběžnějším sérem je fetální hovězí sérum (FBS, z angl. foetal bovine serum). Je zdrojem růstových faktorů a látek, které podporují proliferaci a uchycení buněk *in vitro* [62]. Později však bylo sledováno, že použití FBS může způsobit kontaminaci hovězími viry, nebo také může FBS nepříznivě reagovat s jinými látkami [62, 63]. Výhodou médií bez séra je, že buňky nerostou adherentně, ale v suspenzi, což je dobré pro kultivaci ve vyšších hustotách.

1.3 MOŽNOSTI VPRAVENÍ DNA DO HOSTITELSKÝCH BUNĚK

Jak již vyplývá z předešlých kapitol, každý organismus má své charakteristické vlastnosti, které zjednodušují, nebo naopak ztěžují manipulaci s ním. Výjimkou není ani děj spojený s vpravováním DNA do hostitelských buněk. K vložení se používají tzv. vektory. Pojem vektor představuje v rámci molekulární biologie jakýkoliv nosič (např. plazmid, vir či bakterii) obsahující molekulu r-DNA, která je cíleně přenášena do hostitelských buněk [64]. V nich je tato r-DNA transkribována, a pak překládána na konkrétní proteinovou strukturu. Pro vpravení vektoru do expresních systémů jsou používány především tři základní metody: fyzikální, virové a chemické (viz dále).

Jednou z fyzikálních metod je elektroporace [65, 66]. Její princip spočívá v dočasném zvýšení permeability buněčné membrány pomocí krátkých elektrických pulzů, které na membránách vytvářejí dočasné „póry“. Póry pak umožňují molekulám r-DNA procházet buněčnou membránou. Ta je přenesena na cílovou tkáň nebo buňky, kde dochází k jejímu využití. Díky bezpečnosti a nízkým nákladům se elektroporace stala potenciální metodou v případech, kdy selhávají jiné způsoby transfekce. Různými pokusy byla tato metoda úspěšně využita pro přenos plazmidové DNA do T-lymfocytů. Modifikace T-lymfocytů tímto způsobem je pak možností, jak vyvíjet nové vakcíny a zlepšovat imunitní odpovědi proti patogenům [67].

Známé jsou také metody využívající vysoký tlak, jako např. tzv. „gene gun“ technika, jenž je výhodným mechanismem, jelikož při ní nehrozí riziko toxicity. Principem je nanesení molekuly DNA na wolframové nebo zlaté mikročástice, a do hostitelských buněk je DNA přenesena tlakovým paprskem z „genové pistole“ [68]. Také se používá mikroinjekce [69]. Je to jedna z nejstarších technik k vpravení DNA nebo jiných molekul do buněk [70]. Podobně, jako elektroporace, i mikroinjekce je efektivní v případě, kde nejsou jiné metody vpravení DNA do organismu vhodné. Výhodou tohoto přenosu molekuly DNA je přesné dávkování materiálu, a také, v porovnání s chemickou a virovou transfekcí, i nižší cytotoxicita.

Z hlediska biologických metod se jedná o viry, které fungují jako vektory [71, 72]. Využití virů má oproti „nevirovým“ metodám své výhody. Přenos DNA do buněk a tkání je úspěšnější, avšak na druhé straně virové vektory působí patogenně. Rozlišujeme tři typy vektorů: retrovirální, adenovirální a adenoasociované virální. Výhodou retrovirů je, že se dokážou infikovat do hostitelské buňky, a tam exprimovat proteiny, které nepůsobí imunogenně. Také jsou schopny integrovat se do buněk stabilně, čímž je cílový gen exprimován ve všech dceřiných buňkách. Jinou možností jsou adenoviry. Jedná se o viry s dvouvláknovou DNA. Tyto vektory jsou schopny infikovat různé typy buněk, včetně nedělivých buněk, a mohou být pěstovány ve vysokých hustotách [73]. Stále více využívané jsou i adenoasociované viry (AAV). Často se uplatňují při přenosu genů v rámci genové terapie, např. při jaterních onemocněních [74]. Ty se integrují do genomu hostitelských organismů zřídka, a také mají minimální genotoxický účinek, což jsou při transfekci důležité vlastnosti [74].

U chemických metod rozlišujeme lipofekci, srážení fosforečnanu vápenatého a využití kationických polymerů.

Lipofekce, nebo také transfekce na bázi lipidů, je metoda, při které dochází vlivem elektrostatických sil k navázání DNA na kladně nabitě (kationické) lipidy. Vznikají tak tzv. lipoplexy, obsahující kladně nabitě lipidové dvojvrstvy, které se střídají s úseky DNA [75]. Průnik lipoplexů do buňky je poté umožněn buď fúzí lipoplexu s buněčnou membránou, nebo endocytózou lipoplexu buňkou či tkání. Výhodou této metody je, že obvykle nedochází k nežádoucím imunogenním reakcím [76]. Prvním kationickým lipidem, který byl představen v roce 1993 Felgnerem a kol., byl N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamonium chlorid (DOTMA) [77]. V průběhů dalších studií byly navrženy a i další lipidy. Ty mají odlišné strukturní vlastností, jako jsou velikost hydrofilních hlaviček a délka hydrofobních uhlovodíkových ocasů. Na základě toho byl studován jejich správný poměr vůči DNA [78]. Ten nezávisí jen na složení lipidů, ale také na poměru náboje mezi lipidem a DNA [78].

Srážení fosforečnanu vápenatého je také způsob, kterým je možné provést transfekci. Tímto způsobem byla připravena lidská buněčná linie HEK293 (viz kap. 1.2, str. 19). K srážení dochází rozpuštěním DNA do fosfátového pufru a smícháním této směsi s roztokem CaCl_2 [79]. Po inkubaci při pokojové teplotě se nerozpustná sraženina vzniklého fosforečnanu vápenatého s DNA přidává do suspenze spolu s buněčnou kulturou [79]. Komplex vápenatého kationtu s DNA se pak váže na buněčnou membránu buněk a je přenesen do buněk endocytózou [80]. Ve srovnání s ostatními chemickými metodami je využití srážení cenově výhodné, ale zároveň nefunguje efektivně v případě vysoce diferencovaných buněk [81, 82].

Kationické polymery jsou běžným a účinným chemickým transfekčním činidlem [83, 84]. Vlivem elektrostatických sil působících mezi jejich kladným nábojem a záporným nábojem DNA dochází k formování vazeb. Vzniká tak nanočástice daného polymeru s DNA. Podobně jako tomu bylo u předešlých chemických metod, i v tomto případě je vzniklá částice přijatá buňkami endocytózou. Vyvinuty byly rozličné konvenční polymery, jako jsou poly-aminové kyseliny, polyamidoamin (PAMAM), poly-L-lysin (PLL), nebo polyethylenimin (PEI). Na základě odlišného složení se tyto polymery vyznačují odlišnými účinnostmi transfekce a cytotoxickým působením. Jsou citlivé vůči vnějším podmínkám, jakou je vysoká iontová síla. Proto je pro každou metodu rozhodujícím krokem výběr správného transfekčního činidla. V případě PEI bylo na základě jeho charakteristických vlastností provedeno velké množství úspěšných transfekcí (viz kap. 1.4.2, str. 25).

1.4 TRANSFEKCE HEK293

Transfekce je metoda používána k vnesení cizí DNA do eukaryotických hostitelských buněk [85, 86]. Tento proces zahrnuje trvalou nebo dočasnou expresi cílového genu. Na základě toho dělíme transfekci na stabilní a tranzientní.

Stabilní transfekce je uskutečněna vložením rekombinantního genu (r-genu) do genomu hostitelské buňky. Při replikaci buněk tak dochází k trvalé expresi cizího genu. Uplatňuje se při dlouhodobých studiích rekombinantní exprese a umožňuje produkci r-proteinů ve velkém měřítku. Tento typ transfekce je sice časově náročný a nákladný, ale jelikož je v biofarmaceutickém průmyslu potřeba produkovat co nejvíc protilátek a léčiv, je z tohoto hlediska běžně používanou metodou. Avšak pro výzkumné účely je výhodnější alternativou transfekce, která by zabezpečovala rychlejší expresi r-proteinů. Proto se častěji provádí tranzientní transfekce [85, 86].

Tranzientní transfekce nevyžaduje přímé vložení r-genu do genomu buňky. Cizí DNA je do buněk přenesena pomocí chemických, biologických, nebo fyzikálních metod (viz kap. 1.3, str. 20). U buněčné linie HEK293 jde hlavně o lipofekci nebo použití polyplexů, a to zejména PEI (viz kap. 1.4.2, str. 25). Tyto struktury s DNA tvoří komplexy, a pak se do eukaryotních buněk dostávají endocytózou. Uskutečnění této metody však závisí od podmínek, za kterých má probíhat (viz kap. 1.4.1, str. 24). Exprese r-proteinu se každou replikací hostitelských buněk redukuje, až úplně vymizí.

Za účelem přenosu r-DNA se používají plazmidové nebo virové vektory [87]. Použití virových vektorů má řadu výhod. Díky dlouhodobé práci a manipulaci s nimi byly vyvinuty různé typy těchto vektorů, které byly na základě různých procesů optimalizovány. Klíčovou vlastností virů je jejich přirozená schopnost využít genom hostitelských buněk, což umožňuje dlouhodobou expresi r-DNA i po buněčném dělení. Geny vložené do virových vektorů jsou tak exprimovány delší dobu, než v případě plazmidů. Na druhé straně je navrhování těchto vektorů složité a časově náročné. Vzhledem k tomu, že většina transfekcí buněčné linie HEK293 probíhá chemickým způsobem, a to hlavně použitím PEI (viz kap. 1.3, str. 20), výhodnější je jako vektor použít plazmid. Ve spojení s vektory virového původu je buněčná linie HEK293T využita spíše jejich výrobě, než aby pro ně představovala expresi r-proteinů. Jedná se například o produkci rekombinantních adeno-asociovaných virů, které jsou často využívány v klinických studiích [88].

Plazmid představuje kruhovou molekulu DNA, která se přirozeně nachází v prokaryotických buňkách [89]. Kóduje informace a mechanismy spojené s jejich přenosem během replikace. Schopnost plazmidů přenášet se při konjugaci z nich činí nástroj, který je možné použít k vpravení r-DNA do hostitelských organismů. Výhodou je, že na základě charakteristik hostitelských organismů byly navrženy plazmidy, schopné exprimovat geny jak v bakteriích, tak v eukaryotických buňkách [90]. Tím je možné tímto plazmidem uskutečnit expresi r-proteinů v buněčné linii HEK293 a zároveň ho produkovat v bakteriích a poté ho z nich purifikovat k dalšímu použití.

K rozeznávání plazmidů expresními systémy je důležitý počátek replikace (ori, z angl. origin of replication). Ten je pro každý organismus specifický. Pro buněčnou linii HEK293T je to replikační počátek DNA viru SV40 (SV40 ori) a u MEXi-293E oriP, tedy replikační počátek DNA viru Epstein-Barrové (viz kap. 1.2 str. 19). Plazmid také obsahuje bakteriální replikační počátek (replikon) a gen pro rezistenci vůči antibiotikům [91]. Expresí tohoto genu je zabezpečen růst plazmidových vektorů v bakteriích.

Důležitými jsou taky vhodné eukaryotické promotory, které umožňují expresi cizího genu v těchto hostitelských organismech. Příkladem je promotor cytomegaloviru (CMV). V případě CMV, který je u tranzientních transfekcí HEK293 běžným užívaným promotorem, byly snahy o jeho optimalizaci [92]. Proto je jeho využití spojeno s vysokou transfekční účinností. I když je tento promotor velice účinným, sledovány u něj byly potíže spojeny s nedostatečnou regulací exprese.

1.4.1 Optimalizace tranzientní transfekce

Pro rekombinantní expresi proteinů, ať už v kontextu studia jejich struktury, nebo při výrobě terapeutik, je klíčovým parametrem úspěšnost exprese [81]. Úspěšnost transfekce závisí od toho, jak je transfekce provedena a vyžaduje tedy konkrétní vybavení a podmínky. Proto je potřebné vymyslet postup, který zohledňuje úspěšnost transfekce, a zároveň je časově a nákladově šetrný.

Optimalizace představuje výběr nejlepších parametrů [93, 94]. Důležitými parametry u HEK293 jsou jejich varianta, růstové podmínky, hustota buněk v suspenzi a viabilita (životaschopnost). Dále se jedná i o podmínky kultivace, včetně kultivačních a transfekčních médií. Velkou roli hrají taky vlastnosti vektoru a metoda, kterou je vektor zaveden do expresních buněk. Každá technika převodu r-DNA do hostitelských buněk vyžaduje konkrétní buněčnou hustotu a koncentraci transfekčního činidla. K výběru vhodných poměrů a koncentrací činidel a i podmínek, při kterých tranzientní transfekce dosahuje nejlepší výtěžky, jsou monitorovány konkrétní vlastnosti reportérových proteinů, které představují vyhodnocení úspěšnosti jak samotné transfekce, tak i produkce buněk (viz kap. 1.5, str. 27). K stanovení úspěšnosti je výhodné použít reportérový gen pro zelený fluorescenční protein (viz kap. 1.5.2, str. 28), a k vyhodnocení úspěšnosti produkce např. sekretovanou alkalickou fosfatase (viz kap. 1.5.1, str. 27). Navzdory množství optimalizačních postupů a protokolů, které vedly k pozitivním výsledkům v účinnosti tranzientní transfekce, zůstává její realizace v laboratořích i nadále finančně a časově nákladná.

1.4.2 Polyethylenimin

Jak již bylo zmíněno (viz kap. 1.3, str. 20), jedním z transfekčních činidel, u kterého bylo sledováno množství úspěšných transfekcí buněčné linie HEK293, je polyethylenimin [95, 96]. Jedná se o nevirální vektor kationtové povahy, který je k dispozici ve dvou formách – jako lineární PEI (IPEI) nebo větvený PEI (bPEI, z angl. branched polyethyleneimine). Ty se liší jak v jejich přípravě, tak i v složení (viz **Obrázek 3**, str. 27). V případě IPEI je její struktura tvořena pouze sekundárními aminy, u bPEI se jedná o primární, sekundární, i terciární aminy. Pro transfekce se používají PEI o různých molekulových hmotnostech, většinou se však jedná o 25 či 40 kDa [95]. Dalším rozdílem je jejich syntéza. Lineární PEI se syntetizuje polymerizací 2-ethyl-2-oxazolinu. Syntéza začíná methyl-p-toluensulfonátem, který iniciuje polymeraci [97]. Následně se 2-ethyl-2-oxazolin hydrolyzuje za přítomnosti HCl, čímž vzniká IPEI [97]. U větveného PEI probíhá příprava polymerací aziridinu za kyselých podmínek ve vodném roztoku [97].

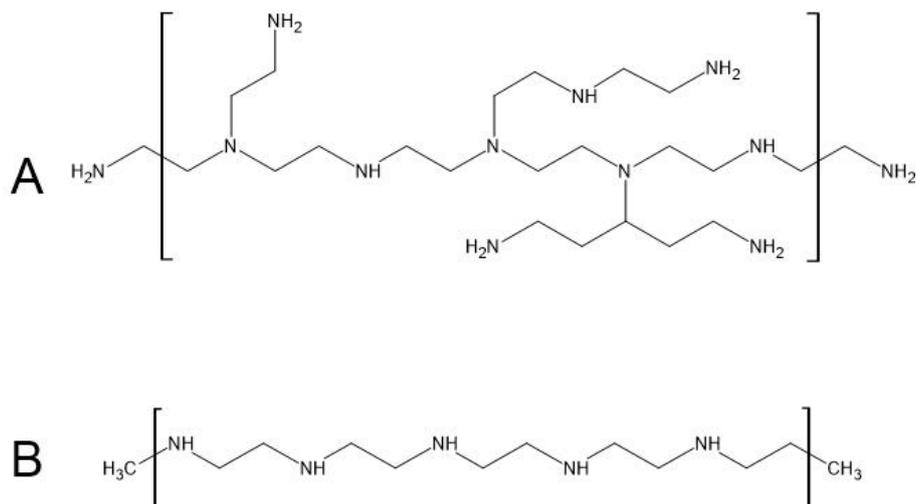
Princip přenosu r-DNA zahrnuje vznik elektrostatických interakcí mezi záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA a kladně nabitými molekulami PEI. Tento proces vede k vytvoření stabilních nanočástic, které jsou schopny přecházet buněčnou membránou. K vyčtyávání těchto komplexů dochází vytvořením vazby na negativně nabitě buněčné membrány. Tím je zprostředkována endocytóza tohoto komplexu dovnitř buňky. K tvorbě komplexu stačí roztoky PEI a nukleové kyseliny smíchat. Výhodou je i to, že PEI je při pokojové teplotě stabilní, a také je možné vzniklý komplex skladovat zmrazením, přičemž je zachována jeho aktivita [95, 96].

Studiem IPEI bylo prokázáno, že až 90 % aminů je při fyziologickém pH protonizováno [97]. Tato vysoká míra protonizace vytváří výrazný pozitivní náboj, který přispívá k formování stabilnějších polyplexů [97]. Další výhodou je pufruční schopnost sekundárních aminů, která umožňuje udržovat stálou hodnotu pH, čímž se minimalizuje riziko degradace DNA. Dokonce v porovnání s jinými kationtovými polymery, jakým je třeba PLL, je PEI cenově dostupnější a při dodávání r-DNA vykazuje vyšší účinnosti [98].

U PEI byly v rámci různých pokusů sledovány i jeho dvě formy – IPEI a bPEI. Při pokusech byly použity v různých hmotnostních poměrech vůči DNA a za odlišných molekulových hmotností [99]. V potaz byla kromě stanovení správného poměru PEI:DNA brána i schopnost uvolnění DNA uvnitř buňky. Jak k buněčnému příjmu, tak k účinnější transfekci došlo v případě bPEI [99].

Důležitým parametrem při použití tohoto transfekčního činidla je jeho hmotnostní poměr s DNA. Jelikož jsou IPEI vyráběny o různých molekulových hmotnostech, je potřeba k správnému stanovení tohoto poměru vycházet z podmínek, při kterých je transfekce prováděna. Při porovnávání IPEI a bPEI byly účinnější transfekce v obou případech pozorovány při nízkých poměrech PEI:DNA. U vyšších poměrů jsou transfekce i nadále úspěšné. Rozdíl spočívá v tom, že je při nich byl IPEI buňkami vyčtyáván méně [99].

Kromě toho byla vyhodnocena srovnatelná účinnost transfekce při použití jednoho krátkého a druhého dlouhého řetězce PEI (2,5 a 25 kDa) [99]. V případě bPEI jsou využívány větší molekulové hmotnosti [100]. Při použití větších molekulových hmotností (až 800 kDa) došlo ke vzniku kompaktnějších nanočástic, a tak k zvýšené úspěšnosti transfekce. Problém ovšem spočíval ve viabilitě buněk, která po transfekci rapidně klesla. To je způsobeno cytotoxickým účinkem bPEI [100].



Obrázek 3: Struktura polyethyleniminu. Na panelu **A** je zobrazen polymerní větvený polyethylenimin pozůstávající z primárních, sekundárních, a terciárních aminů. Panel **B** znázorňuje strukturu lineárního polymerního polyethyleniminu, který je naopak tvořen pouze sekundárními aminy. Vytvořeno pomocí programu ChemSketch [101].

1.5 REPORTÉROVÉ PROTEINY

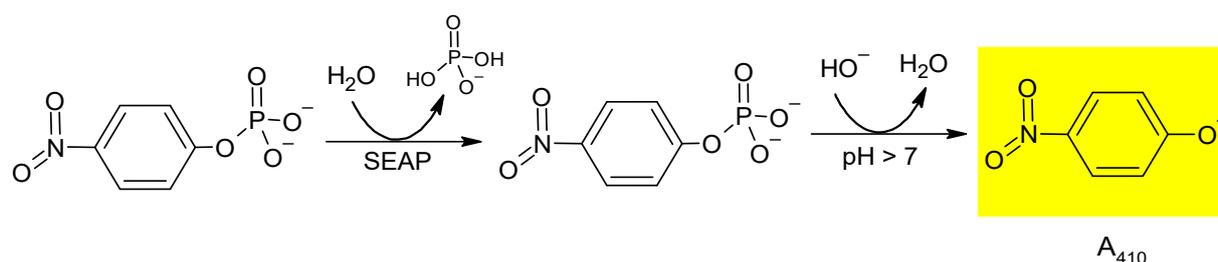
Některé reakce jsou z hlediska biochemie katalyzovány za vzniku lehce detekovatelných produktů, které se dají snadno testovat. Touto vlastností se vyznačují tzv. reportérové proteiny. Působí jako markery u mikroskopických studií, a také při genové expresi [102].

1.5.1 Sekretovaná alkalická fosfatasa

Alkalická fosfatasa (ALP, z angl. alkaline phosphatase) je membránově vázaný glykoprotein, který je z hlediska jeho přítomnosti v tkáních ve čtyřech formách – placentární, střevní, ALP ze zárodečných buněk, a tkáňově nespecifická ALP [103]. I přes odlišné vlastnosti mají ALP jako izoenzymy stejnou funkci. Jak napovídá jejich přívlastek, ALP katalyzuje hydrolýzu fosfátové skupiny při bazickém pH. Skupina těchto dimerních enzymů se běžně nachází v prokaryotních, a taky u vyšších eukaryotních organismů.

Od ALP byla odvozena lidská placentární forma ALP, označována jako sekretovaná alkalická fosfatasa (SEAP, z angl. secreted alkaline phosphatase) [104]. Jako nový ukazatel kvantitativních vlastností byla pro stanovení její aktivity v diagnostice považována za jeden z nejméně náročných enzymů. Jedná se o specifický reportérový protein, který je po transfekci jeho genem uvolňován do kultivačního média. Výhodou této metody je odběr malého množství média, čímž nedochází k narušení růstu a ovlivnění transfekovaných buněk. Tak je možné provést měření odběrem média i vícekrát [105].

Jednou z metod, jak je u SEAP možné detekovat její aktivitu, je pomocí kolorimetrie. Je to levná, rychlá, a cenově dostupná metoda. Používají se k ní různé substráty s fosfátovou skupinou, jako například para-nitrofenylfosfát (pNPP, z angl. para-nitrophenyl phosphate) [106]. Na základě enzymové aktivity proměňuje SEAP p-NPP na barevný produkt, kterým je žlutý para-nitrofenolát [107]. Využitím této reakce (viz Obrázek 4, str. 28) je pak možné měřit při vlnové délce 410 nm časovou změnou absorbance. Změna odpovídá množství vzniklého barevného produktu, který je přímo úměrný množství produkovaného reportérového proteinu SEAP.



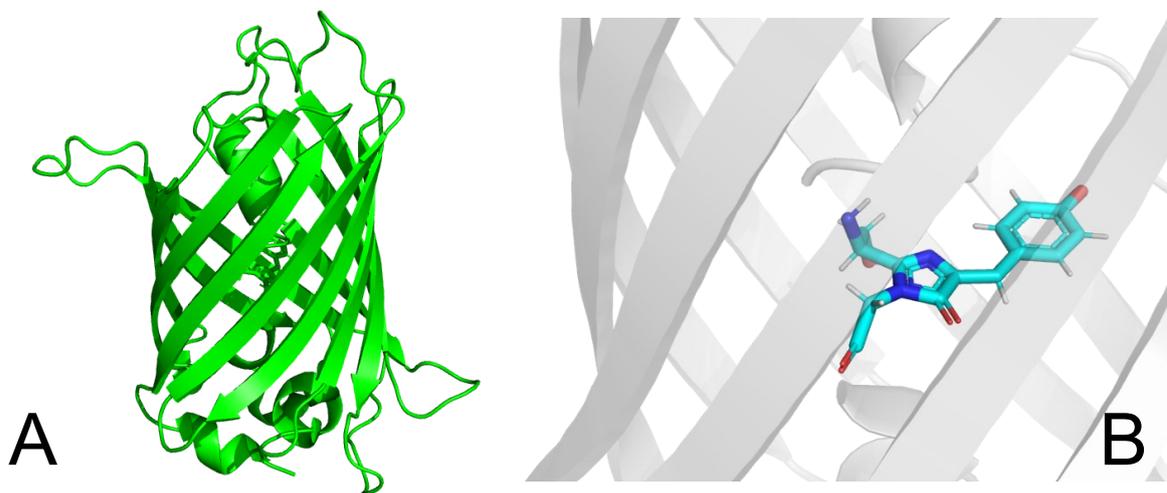
Obrázek 4: Hydrolýza para-nitrofenylfosfátu katalyzovaná enzymem SEAP. U této reakce dochází k odštěpení fosfátu z para-nitrofenylfosfátu při bazickém pH. Vzniká barevný produkt, kterým je para-nitrofenolát, který má žluté zbarvení. Vytvořeno pomocí programu ChemSketch [101].

1.5.2 Zelený fluorescenční protein

Kolem roku 1960 se Osamovi Shimomurovi a kolegům, kteří studovali bioluminiscenci u medúzy *Aequorea victoria*, podařilo izolovat a purifikovat zelený fluorescenční protein (GFP, z angl. green fluorescent protein) [108]. Ten byl součástí aequorinu, který byl purifikován jako první fotoprotein. Bohužel byl v té době výtěžek GFP v porovnání s aequorinem nízký. K převratnému objevu, jako je fluoroforová oblast tohoto proteinu (viz **Obrázek 5**, str. 29) došlo až po 30 letech studií a snahy zjistit strukturu GFP [109]. Tento protein se skládá z 238 aminokyselin a má charakteristický způsob excitace, ke které dochází prostřednictvím aktivity aequorinu. Aequorin emituje modrozelené světlo s vlnovou délkou 470 nm. To je absorbováno fluoroforem GFP, který vyzařuje viditelné zelené světlo s vlnovou délkou 508 nm. Silná fluorescence je umožněna díky specifickému systému, kde je fluorofor tvořen a kovalentně připojen k sekvenci tří aminokyselin: Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ [98]. Ta je obklopena 11 vlákní β-skládaného listu, které formují GFP do tvaru sudu (viz **Obrázek 5**, str. 29). Tím je chráněna struktura obsahující chromofor [109, 110].

Původní GFP měl jako nový typ reportérového proteinu, v porovnání s jinými proteiny, nižší intenzitu fluorescence [111, 112]. Zpočátku nebyl pro sledování účinnosti tranzientní transfekce efektivním znakem. Z toho důvodu byly připraveny různé nové formy GFP, založené na mutacích v oblasti fluoroforu, které vedly k vyšší míře fluorescence. Tak byla například vytvořena varianta známá jako zesílený zelený fluorescenční protein (EGFP, z angl. enhanced green fluorescent protein). EGFP byl připraven mutacemi fluoroforu a nahrazením původních kodónů medúzy kodóny, které jsou lépe exprimovány v lidských buňkách [113]. Na základě tohoto pokusu byla připravena forma proteinu, která byla fotostabilnější, a i navzdory posunu hodnoty excitační energie si zachovala emisní energii kolem vlnové délky 510 nm. Kromě toho umožnila záměna kodónů efektivnější translaci mRNA tohoto proteinu, čímž došlo k jeho zvýšené expresi [113].

Na základě znalosti mechanismu a vlastností GFP je dnes tento protein, díky možnosti snadné detekce, jedním z nejužívanějších reportérových proteinů [111]. Konkrétně u tranzientní transfekce slouží jako ukazatel její účinnosti. Jelikož nevyžaduje přítomnost kofaktorů nebo substrátů, jeho excitace je možná osvětlením buněk modrým nebo ultrafialovým (UV) světlem. K pozorování účinnosti transfekce se používají různé metody, jako fluorescenční mikroskopie nebo průtoková cytometrie (FACS, z angl. fluorescence-activated cell sorting).

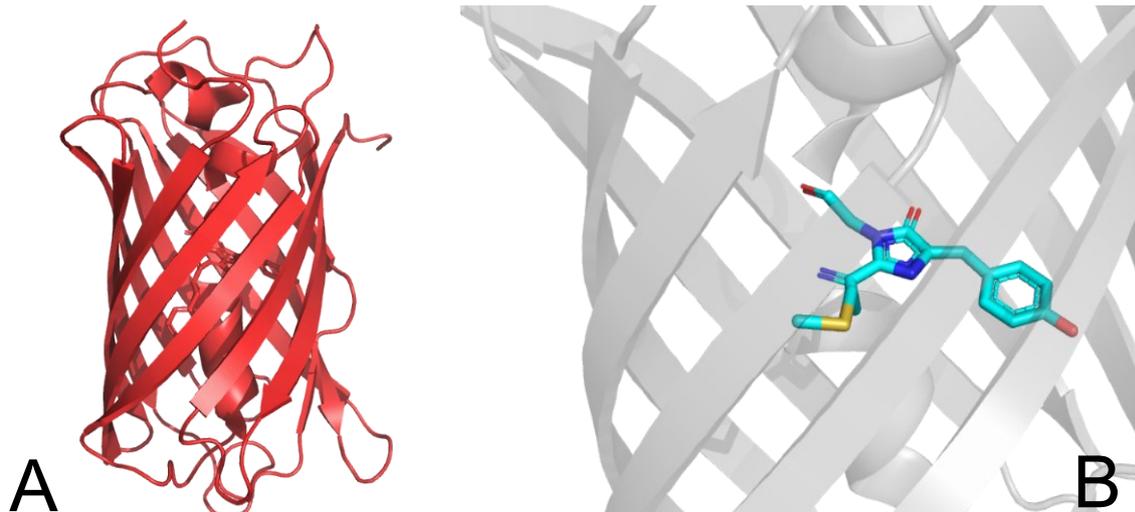


Obrázek 5: Struktura zeleného fluorescenčního proteinu s fluoroforem. Na panelu A je zobrazena terciární struktura GFP, tvořená 11 antiparalelními β -skládanými listy, vevnitř se nachází α -helix s oblastí tvořící fluorofor. Panel B znázorňuje okolí fluoroforu, který pozůstává ze tří aminokyselin: Ser65-Tyr66-Gly67. Atomy uhlíku jsou vyznačeny azurovou barvou, atomy dusíku tmavomodře, atomy kyslíku červeně a atomy vodíku šedě. Struktura proteinu byla zobrazena pomocí programu PyMol [114] (PDB kód: 6L27 [115]).

1.5.3 mScarlet

Po objevení GFP byly navrženy další nové varianty tohoto proteinu fluoreskující modrou, azurovou, nebo žlutou barvou. Vytvořeny byly i červeně fluoreskující proteiny (RFPs, z angl. red fluorescence proteins) [116, 117]. Jak vyplývá z názvu, RFPs emitují světlo s vlnovou délkou odpovídající červené barvě. V porovnání s GFP dochází u těchto proteinů k menší autofluorescenci. Ta je způsobená přirozenou emitací světla biologickými strukturami a metabolity uvnitř buněk. Jelikož tyto autofluorescenční molekuly svítí modře a zeleně, dochází k překryvu jejich emise se sledovaným signálem GFP. Použití RFPs proto zajišťuje lepší detekci a dochází tak ke zvýšení kontrastu mezi jejich červeným signálem a autofluorescencí buněk. Naopak nevýhodou těchto proteinů je formování tetramerních struktur. Při sledování jiných proteinů tak mohou RFPs svou velikostí ovlivňovat jejich funkci.

Od RFPs byl v roce 2016 odvozen protein mScarlet [117]. Jedná se o monomerní strukturu (viz **Obrázek 6**, str. 31) odvozenou od syntetického konstruktů. K její excitaci dochází použitím vlnové délky 569 nm, což odpovídá žlutozelené barvě. Protein pak emituje světlo o vlnové délce 594 nm. Ze skupiny RFPs má nejvyšší kvantový výtěžek, což znamená, že energie pro jeho excitaci je efektivně přeměněna na emisi červeného světla. Také je fotostabilní, takže vlivem světla nedochází k jeho degradaci. Tyto vlastnosti, ve spojení s nízkou hodnotou pKa jsou příznivé při využití mScarlet na značení různých buněčných organel a při konstruování fúzních proteinů. Díky emitování jasné červené barvy je mScarlet možné použít ve spojení s jinými barvami, a to hlavně s modrou a zelenou barvou [118]. Spojením mScarlet s GFP se tak dá sledovat víc procesů, nebo struktur v jednom vzorku.



Obrázek 6: Struktura proteinu mScarlet s fluoroforem. Panel **A** představuje terciární strukturu mScarlet, která je podobně, jako u GFP, tvořena 11 β -skládanými listy, které formují mScarlet do tvaru sudu. Ve středu se nachází α -helix, jehož součástí je skupina fluoroforu. Na panelu **B** je zvýrazněna struktura fluoroforu. Atomy uhlíku jsou vyznačeny azurovou barvou, atomy dusíku tmavomodře, atomy kyslíku červeně a atomy síry žlutě. Struktura proteinu byla zobrazena pomocí programu PyMol [114] (PDB kód: 5LK4 [119]).

2. CÍLE PRÁCE

- Optimalizace podmínek transfekce použitím plazmidů kódujících reportérové proteiny GFP a SEAP

- Optimalizace transfekce v buněčných liniích HEK293T a MEXi-293E porovnáním:
 - poměru DNA:IPEI (w/w),
 - různých transfekčních médií,
 - transfekce na destičce vs. v lahvičce,
 - kultivace buněk ve skleněné vs. plastové lahvičce

- Porovnání transfekčních podmínek pro buněčné linie HEK293T a MEXi-293E

3. MATERIÁL

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

6-jamkové destičky	Corning, UK
96-jamkové destičky s plochým dnem	Corning, UK
Automatická počítačka buněk Corning Cell Counter	Corning, UK
Automatická počítačka buněk Automated cell counter Fluo	VWR, Radnor, PA, USA
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettich, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Láhve skleněné čtyřhranné s prodyšným víčkem	P-LAB, ČR
Láhve kultivační s neupraveným povrchem (25 cm ²)	VWR, Radnor, PA, USA
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	VWR, Radnor, PA, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikrostríkačka typu Hamilton	P-LAB, ČR
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo
Průtokový cytometr LSRFortessa	BD Biosciences, USA
Spektrofotometr DS-11	DeNovix, USA
Spektrofotometr Multiskan Go	Thermo Fisher, Finsko

3.2 CHEMIKÁLIE

Ampicilin	Biotika, SK
DMEM médium	Sigma, USA
Ethanol, 96%	Lach-Ner, ČR
EX-CELL 293 médium	Sigma, USA
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
IPEI – lineární polyethylenimin (25 kDa), 10 mg/ml	Polysciences, USA
IPEI* – syntetický polyethylenimin (40 kDa), 10 mg/ml	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.; katedra biochemie PřF UK
IPEI Max – lineární polyethylenimin hydrochlorid (40 kDa)	Polysciences, USA
MEXi-CM kultivační médium	IBA Lifesciences, Germany
MEXi-TM transfekční médium	IBA Lifesciences, Germany
poly(2-ethyl-2-oxazolin) (50 kDa)	Sigma-Aldrich, USA
Trypanová modř	Sigma-Aldrich, USA

3.3 BAKTERIÁLNÍ A BUNĚČNÉ LINIE

<i>E. coli</i> DH5a	Invitrogen, USA
HEK293T	A. Radu Aricescu, Univerzita v Oxfordu, UK
MEXi-293E	IBA Lifesciences, Göttingen, Germany

3.4 VEKTORY

pTW5_GFP	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK [120]
pTW5sec_SEAP	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK [120]
pXST_I2_3C_His	RNDr. Jan Bláha, Ph.D.; EMBL Hamburg, Německo

3.5 ENZYMY

RNAsa A	Sigma, USA
---------	------------

3.6 KULTIVAČNÍ MÉDIA

DMEM médium: komerční médium (Sigma, USA), doplněno o L-glutamin (do 4mM koncentrace)

EX-CELL 293 médium: komerční médium (Sigma, USA), doplněno o L-glutamin (do 4mM koncentrace)

LB Amp agar: 1,5% (w/v) agar v LB médiu, 100 µg/ml ampicilin

LB médium: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH 7,4; sterilizováno v autoklávu

MEXi-CM médium: komerční kultivační médium (IBA Lifesciences, Německo), doplněno o L-glutamin (do 4mM koncentrace)

MEXi-TM médium: komerční transfekční médium (IBA Lifesciences, Německo), doplněno o L-glutamin (do 4mM koncentrace)

3.7 ROZTOKY A PUFRY

IPEI roztok (10× koncentrovaný): 10 mg/ml IPEI v 150mM NaCl; pH 7,0; sterilizováno filtrací přes 0,22µm filtr, uchováno při teplotě -20 °C a před použitím zředěn PBS-TK na pracovní koncentraci 1 mg/ml

PBS-TK (pro tkáňové kultury): 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄; pH 7,0; sterilizováno filtrací přes 0,22µm filtr

PI roztok: 0,5 mg/ml PI, 1 mg/ml NaN₃ v PBS-TK

pNPP: 20 mM pNPP, 1 mM MgCl₂, 1 mM diethanolamin; pH 9,8; sterilizováno filtrací přes 0,22µm filtr a uchováno při teplotě -20 °C

TES pufr: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM NaN₃; pH 8,0

4. METODY

4.1 VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA pTW5_GFP a pTW5sec_SEAP

Pro přípravu plazmidů byly jako expresní systém použity buňky *E. coli* DH5a. Buněčná suspenze (100 μ l) těchto buněk byla vybrána z mrazáku (-85 °C) a rozmrazena za sterilních podmínek při 0 °C po dobu přibližně 5 minut. Následně bylo přidáno množství plazmidu pTW5_GFP nebo pTW5sec_SEAP tak, aby plazmidová DNA odpovídala hmotnosti 1 μ g. Buněčná suspenze spolu s plazmidovou DNA byla inkubována 15 minut v ledové lázni. Po inkubaci byla suspenze nanášena na Petriho misku s LB Amp agarem a inkubována přes noc při 37 °C.

Následující den byla vzniklá buněčná kultura přenesena do 1 l Erlenmeyerovy baňky obsahující 500 ml LB média s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 μ g/ml. Inkubace suspenze proběhla přes noc při teplotě 37 °C za míchání při 200 otáčkách/min. Po inkubaci byla suspenze centrifugována 30 minut při teplotě 4 °C a 4255 \times g. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována ve 20 ml TES pufru a centrifugován 10 minut při 4 °C a 4255 \times g. Pak byla přes noc uchovávána při teplotě -20 °C.

4.1.1 Extrakce DNA

DNA byla izolována pomocí komerční soupravy NucleoBond Xtra Maxi. Nejprve byla peleta důkladně resuspendována ve 12 ml resuspendačního pufru obsahujícího RNAsu A. Poté byla provedena lýze suspenze přidáním 12 ml lyzačního pufru, a směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Při delší době inkubace by mohlo dojít k degradaci plazmidové DNA. Následně byla suspenze neutralizována přidáním 12 ml neutralizačního pufru a lyzát byl okamžitě promíchán, dokud se modře zbarvená suspenze nezměnila na bezbarvou. Pro odstranění precipitátu byla směs centrifugována 30 minut při 4 °C a 4255 \times g. Kolona NucleoBond Xtra Maxi s vloženým filtrem byla ekvilibrována postupným přidávkem 25 ml ekvilibračního pufru. Po centrifugaci byla suspenze nanášena na kolonu přes komerční filtr. Kolona a filtr byly následně promyty 15 ml ekvilibračního pufru, kolona byla zbavena filtru a bylo provedeno druhé promytí kolony pomocí 25 ml promývacího pufru. DNA byla eluována z kolony do zkumavky za použití 15 ml elučního pufru. Pro precipitaci plazmidové DNA bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu, který byl předchlazen na -20 °C. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a dále centrifugována 30 minut při 4 °C a 16000 \times g.

Po opatrném odstranění supernatantu byly k peletě přidány 4 ml 70 % ethanolu předchlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále následovala centrifugace 5 minut za pokojové teploty a $16000 \times g$. Ethanol byl odstraněn opatrným slitím a zbývající kapky byly odsáty pipetou. Peleta byla ponechána k sušení přes noc při pokojové teplotě. Pak byla peleta DNA rozpuštěna v 1 ml sterilní deionizované vody (dH_2O). Roztok DNA v mikrozkušavce byl uchováván při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kolona byla nakonec promyta 10 ml 1M HCl a 1 l dH_2O , zabalena do parafilmu a skladována ve 20 % ethanolu.

4.1.2 Určení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace DNA byla určena pomocí spektrofotometru DS-11 na základě měření absorpčního maxima při vlnové délce 260 nm. U měření se vycházelo z empirického vztahu, kde platí, že $A_{260} = 1$ odpovídá koncentraci DNA $50\text{ }\mu\text{g/ml}$. Kromě toho byly stanoveny poměry absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm a 260/230 nm. V případě A_{260}/A_{280} se DNA považuje za čistou, pokud hodnota poměru není nižší než 1,8. U poměru A_{260}/A_{230} se v případě čisté DNA pohybují hodnoty poměru v intervalu 2,0-2,2. Při měření byla jako slepý vzorek použita sterilní dH_2O .

4.2 BUNĚČNÉ LINIE HEK293T A MEXi-293E

4.2.1 Rozmrazování buněčných linií HEK293T a MEXi-293E

Buněčné kultury byly skladovány v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro potřebu kultivace buněčných linií HEK293T a MEXi-293E byl jejich alikvot obsahující 1 ml suspenze o hustotě $5 \cdot 10^6\text{ ml}^{-1}$ rychle rozmražen ve vodní lázni o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přenesen do 9 ml EX-CELL 293 média, které bylo předehřáto na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato suspenze byla opatrně promíchána a centrifugována 5 minut při $200 \times g$. Buněčná suspenze byla následně přenesena do 10cm sterilní Petriho misky a inkubována v inkubátoru pro tkáňové kultury při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 5 % CO_2 atmosféře.

4.2.2 Kultivace buněčných linií HEK293T a MEXi-293E

Kultivace HEK293T a MEXi-293E probíhala v médiu EX-CELL 293 nebo MEXi-CM na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, v atmosféře s obsahem 5 % CO_2 a při 135 otáčkách/min. Po rozmražení probíhala kultivace buněk na 10ml Petriho misce (pododdíl 4.2.1). Po uplynutí 3-4 dnů byla změřena buněčná hustota, na základě které byl odebrán potřebný objem suspenze, a ten přenesen do čtyřhranné skleněné lahve s prodyšným víčkem. Suspenze byla doplněna kultivačním médiem EX-CELL 293 nebo MEXi-CM na výsledný objem 30 ml tak, aby byla výsledná buněčná hustota $0,5 \cdot 10^6$ buněk/ml.

Každé 3-4 dny byly buněčné suspenze subkultivovány čerstvým médiem, které bylo předem vyhřáté na teplotu 37 °C. Subkultivace byla provedena tak, aby se výsledná buněčná hustota pohybovala v rozmezí $0,5-2 \cdot 10^6$ buněk/ml. Buňky byly kultivovány ve skleněné lahvi s prodyšným víčkem tak, aby výsledný objem suspenze činil 30-40 % objemu lahve.

4.2.3 Určení buněčné hustoty a viability

Buněčná hustota a viabilita byly určeny pomocí automatické počítačky buněk Corning Cell Counter (Corning). Před odebráním vzorku byla buněčná suspenze důkladně promíchána. Pro měření bylo z každé buněčné suspenze do mikrozkušavky odebráno 20 μ l a pro rozlišení mrtvých a živých buněk byl použit roztok 0,4% trypanové modři v PBS-TK pufru, kterou byla suspenze zředěna 2 \times . Vzorek byl poté přenesen do komůrky Bürkerova hemocytometru. Pro měření HEK293 buněčných linií byl nastaven interval velikosti buněk 8-26 μ m, což odpovídá jejich běžným parametrům.

V některých případech byla k určení buněčné hustoty a viability použita i automatická počítačka buněk Automated cell counter Fluo (VWR). Tehdy bylo do mikrozkušavky odebráno 10 μ l buněčné suspenze, která byla promíchána s 10 μ l 0,4% trypanové modři. Příslušenstvím počítačky byly i jednorázové počítací komůrky, do nichž bylo přeneseno vždy 10 μ l vzorku. Ještě před provedením měření byla po zavedení vzorku komůrka ponechána stát 30 sekund. Mezitím byly nastaveny pro buňky přesné parametry, jako jejich velikost, tvar a také jas. Výsledky byly uloženy do paměťového zařízení USB a přeneseny do programu MS Office Excel 2023.

4.3 TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE LINIÍ HEK293T A MEXi-293E

4.3.1 Příprava transfekčního roztoku plazmidové DNA a PEI

Při přípravě transfekčního roztoku bylo odebráno a ve sterilní plastové zkumavce zředěno příslušné množství plazmidu v PBS-TK tak, aby na $1 \cdot 10^6$ buněk byl přidán 1 μ g DNA. V jiné sterilní plastové zkumavce bylo zředěno potřebné množství IPEI (podle zvolené optimalizační podmínky hmotnostního poměru DNA: IPEI, např. 1:4). Množství PBS-TK bylo zvoleno tak, aby jeho výsledný objem netvořil více než 10 % celkového objemu buněčné suspenze v transfekčním médiu. Roztok plazmidu DNA v PBS-TK byl sterilizován filtrací pomocí 0,22 μ m filtru.

U tranzientní transfekce v 6-jamkových destičkách byly prováděny transfekce ve vysoké hustotě. To představovalo celkový objem buněčné suspenze s transfekčním roztokem 1,5 ml. Po 2h inkubaci byla tato směs přenesena do čtyřhranné skleněné lahve a doplněna EX-CELL 293 médiem do konečné buněčné hustoty $1 \cdot 10^6$ buněk/ml o objemu 30 ml.

V případě „inkubace“ transfekční směsi byl k roztoku plazmidové DNA přidán roztok IPEI. Výsledný roztok byl důkladně promíchán a inkubován 20-30 minut. Poté byl přidán k buněčné suspenzi [121].

U postupu „přímého přidání“, který vychází z protokolu pro vysokohustotní transfekci linie HEK293S GnTI⁻, byly DNA a IPEI přidávány k buněčné suspenzi bez promíchání a předchozí vzájemné inkubace [122].

Při použití transfekčního média MEXi-TM byl proveden dle doporučení výrobce postup pro nízkohustotní tranzientní transfekci buněčné linie MEXi-293E [123]. Buňky byly zředěny transfekčním médiem MEXi-TM na hustotu $2 \cdot 10^6$ buněk/ml. Nejdříve byl přidán roztok DNA přímo do suspenze, která byla po dobu 10 minut inkubována na třepačce při 37 °C, 5 % CO₂ a 135 ot./min. Po inkubaci bylo přidáno potřebné množství IPEI po kapkách. Buněčná suspenze pak byla inkubována při 37 °C, 5 % CO₂ a 135 ot./min po dobu 2 hodin. Poté byla pomocí média EX-CELL 293 naředěna na výslednou hustotu $1 \cdot 10^6$ buněk/ml.

4.3.2 Příprava buněčné suspenze pro tranzientní transfekci

Předtím, než byly připraveny transfekční roztoky, bylo potřebné určit buněčnou hustotu předem kultivované buněčné suspenze. Při inkubaci a přípravě transfekčních roztoků bylo potřebné množství buněčné suspenze převedeno do konkrétní nádoby, objemu a hustoty (podle stanovení optimalizační podmínky). Buněčná suspenze byla odebrána 25 ml automatickou pipetou do 25ml nebo 50ml sterilních zkumavek s víčkem a poté byla centrifugována 3 minuty při $200 \times g$. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a peleta byla resuspendována příslušným objemem transfekčního média (podle potřebné buněčné hustoty).

4.3.3 Příprava transfekčního činidla IPEI*

Syntetický polyethylenimin (IPEI*), připravený jako analog komerčně dostupného IPEI Max, byl odvozen z patentu WO 2009/016507 A2. Výroba byla provedena Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D., ve spolupráci s RNDr. Luděkem Lepšou, Ph.D. Výsledný IPEI* měl molekulovou hmotnost přibližně 40 kDa a byl získán kyselou hydrolyzou polymerního prekurzoru poly(2-ethyl-2-oxazolinu) [124].

Ve 200ml baňce s kulatým dnem byl rozpuštěn 1 g poly(2-ethyl-2-oxazolinu) v 11 ml 34% HCl. Směs byla za současného zahřívání v olejové lázni při 110 °C doplněna 8 ml dH₂O. Zahřívání pokračovalo po dobu 3 hodin pod vodním chladičem. Poté byla směs odpařena pomocí vakuové pumpy. Precipitát byl rozpuštěn ve dH₂O a přidavkem 40% roztoku NaOH neutralizován na pH 7,4. Vzniklý IPEI byl pak dialyzován v 15ml dialyzačních kazetách (10 kDa cut-off) 3× proti 5 l dH₂O. Polyethylenimin byl poté přenesen do lyofilizačních baněk a zmrazen v ethanolové lázni se suchým ledem. Lyofilizace byla provedena za asistence paní laborantky Anny Ammerové. Po lyofilizaci byl IPEI navážen, rozpuštěn v dH₂O na výslednou koncentraci 10 mg/ml a sterilizován filtrací přes 0,22 μm filtr.

4.4 STANOVENÍ REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ

4.4.1 Stanovení úspěšnosti transfekce pomocí průtokového cytometru

Tranzientně transfekovaná buněčná suspenze HEK293T nebo MEXi-293E buněk byla před odběrem důkladně promíchána pomocí 25ml serologické pipety. K měření byl jako vzorek odebrán 1 ml buněčné suspenze. Pro zbarvení mrtvých buněk a stanovení viability byl použit propidium jodid (PI). Propidium jodid je činidlo, které se interkaluje do DNA v případě poškozené buněčné membrány. Viabilita a úspěšnost transfekce byly změřeny a vyhodnoceny RNDr. Adamem Obrem, Ph.D. (ÚHKT, Praha) průtokovým cytometrem LSRFortessa (BD Biosciences, USA). Jako kontrola byla použita netransfekovaná buněčná suspenze HEK293T nebo MEXi-293E.

Pomocí programu BD FACS DIVA byly buňky rozděleny na živé a mrtvé sledováním fluorescence propidium jodidu. V případě buňky obarvené propidium jodidem se jednalo o mrtvou buňku. Pro stanovení úspěšnosti transfekce byla pomocí modrého kanálu o vlnové délce 488 nm změřena míra fluorescence GFP, které odpovídala emisní vlnové délce 509 nm. Vysoká intenzita fluorescence odpovídající vyššímu množství GFP v buňce by značila úspěšnou transfekci buněk, sledovaným parametrem je však především procento buněk vykazujících fluorescenci GFP, tzv. transfekční účinnost.

4.4.2 Stanovení úspěšnosti transfekce automatickou počítačkou buněk

V některých případech byla ke stanovení úspěšnosti transfekce použita i automatická počítačka buněk Automated cell counter Fluo (VWR). K měření intenzity fluorescence GFP bylo na počítací komůrku nanášeno 10 μl buněčné suspenze, která byla nejdříve důkladně promíchána a bylo k ní přidáno 10 μl 0,4% trypanové modři. Do přístroje byla vložena zelená fluorescenční kostka a u daného vzorku byla měřena míra fluorescence v zeleném kanále, jenž odpovídá fluorescenci proteinu GFP. Výsledky byly uloženy na USB nosič a přeneseny do MS Office Excel 2023.

4.4.3 Stanovení úspěšnosti produkce měřením aktivity SEAP

Sekretovaná alkalická fosfatasa byla stanovena použitím roztoku činidla, který obsahoval 20 mM pNPP, 1 mM MgCl_2 a 1 M diethanolamin, pH 9,8. Po přípravě byl roztok činidla filtrován přes 0,22 μm filtr a uchováván při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Pro měření enzymové aktivity SEAP byl do mikrozkušavky z tranzientně transfekovaných suspenzí HEK293T nebo MEXi-293E buněk odebrán objem 50-100 μl a centrifugován 5 minut při $200 \times g$. Byl odebrán supernatant, který byl postupně v triplikátu ředěn 25-, 50-, 100-, 200-, 400-, 800- a 1600-krát destilovanou vodou (dH_2O) na výsledný objem 180 μl . Jednotlivé vzorky byly v daném ředění měřeny v triplikátech na 96-jamkové destičce s plochým dnem. Těsně před měřením bylo do každé jamky pomocí osmikanálové manuální pipety přeneseno 20 μl činidla. Pomocí spektrofotometru Multiskan Go byla každých 30 sekund změřena změna absorbance při vlnové délce 410 nm. Měření bylo ukončeno po 15 minutách. Hodnoty byly porovnány se slepým vzorkem, který byl složen ze 180 μl dH_2O a 20 μl pNPP.

Získané závislosti změny absorbance při 410 nm na čase byly přeneseny do tabulkové podoby v MS Office Excel 2003. Z daných hodnot byly vypočítány směrnice lineární regrese. Ty vycházely z průměrných hodnot triplikátů. Pro každé ředění byl vyhotoven pomocí programu GraphPad Prism (verze 8.0.2.263) graf, který kromě průměrné hodnoty úrovně exprese SEAP zahrnoval i směrodatnou odchylku.

5. VÝSLEDKY

Tato bakalářská práce byla zaměřena na optimalizaci tranzientní transfekce lidské buněčné linie HEK293. Optimalizace zahrnovala výběr parametrů, které zajišťují co nejvyšší efektivitu transfekce a produkce rekombinantních proteinů. Současně byla cílem této práce snaha o zjednodušení postupu výběrem méně nákladných činidel a zkrácením doby trvání procesu transfekce. Stanovení optimálních parametrů by mohlo vést k zavedení postupu, který umožní plynulejší, méně nákladnou a vysoce efektivní expresi rekombinantních proteinů.

K optimalizaci těchto podmínek byly prováděny tranzientní transfekce, přičemž byla porovnávána specifická kritéria transfekce u buněčných linií HEK293T a MEXi-293E. Pro sledování výsledku transfekce byly použity reportérové proteiny. Jako ukazatel účinnosti transfekce byl použit plazmid pTW5_GFP s genem pro GFP (viz kap. 1.5.2, str. 28) a možnost detekce jeho fluorescence. Účinnost transfekce pak byla vyhodnocena pomocí průtokové cytometrie (FACS), případně s pomocí automatické fluorescenční počítačky buněk. Kromě genu pro GFP byly buňky transfekovány i plazmidem s genem pro protein syntetického původu (pXST_I2_3C_His), a to mScarlet (viz kap. 1.5.3, str. 30), jehož signál byl také měřen pomocí metody FACS. Míra produkce r-proteinů byla stanovována jako parametr přímo úměrný katalytické aktivitě enzymu SEAP (viz kap. 1.5.1, str. 27), a to pomocí plazmidu pTW5sec_SEAP. Ta byla sledována pomocí spektrofotometru jako časová změna absorbance při 410 nm. Pro transfekce byly použity již dříve optimalizovaná množství DNA vůči počtu buněk a poměry transfekčního činidla vůči množství DNA. Počtu $1 \cdot 10^6$ buněk v suspenzi odpovídal přírůstek 1 μg DNA. Při transfekci bylo přidáno množství DNA s transfekčním činidlem zvoleno tak, aby tento „transfekční mix“ představoval 10 % z celkového objemu buněčné suspenze. Výchozí obvykle používaný hmotnostní poměr DNA:IPEI byl 1:4, ale u dalších transfekcí byly studovány i jiné poměry. Transfekce byla prováděna vždy pomocí kationického polymeru IPEI. Z tohoto hlediska byly porovnávány tři typy tohoto činidla – standardní komerční 25kDa IPEI (IPEI st.), vylepšený komerční 40kDa IPEI Max (IPEI Max) a 40kDa IPEI* syntetizovaný Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D. a RNDr. Luděkem Lepšou, Ph.D. (viz kap. 4.3.3, str. 39).

5.1 TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE LINIÍ HEK293T A MEXi-293E

5.1.1 Optimalizace buněčné hustoty a typu transfekce

V případě první tranzientní transfekce byly porovnávány dvě varianty buněčné linie HEK293, a to HEK293T a MEXi-293E. K provedení transfekce byla použita dvě různá média – komerční médium EX-CELL 293 a MEXi-TM. Buňky byly transfekovány dvěma postupy transfekce, a to buď ve vysoké, nebo nízké buněčné hustotě.

Vysokohustotní transfekce buněčných linií probíhala na jamkách 6jamkové destičky v transfekčním médiu o objemu 1,5 ml tak, aby jejich výsledná hustota byla $20 \cdot 10^6$ buněk/ml. K transfekci ve vysoké hustotě bylo použito médium EX-CELL 293. Roztoky plazmidu a standardního IPEI (IPEI st.) byly přidány do suspenze přímo, bez jejich smíchání a pre-inkubace (viz kap. 4.3.1, str. 38). U nízkohustotní transfekce se postupovalo podle protokolu pro MEXi-TM médium doporučeného výrobcem (viz kap. 4.3, str. 38). Buněčná suspenze byla resuspendována v MEXi-TM médiu, a převedena byla do čtyřhranné skleněné lahve s prodyšným víčkem v objemu 15 ml a o buněčné hustotě $2 \cdot 10^6$ buněk/ml. K ní byl nejdříve přidán roztok DNA, a směs byla inkubována po dobu 10 minut. S ohledem na hmotnostní poměr DNA:IPEI (1:4) byl po kapkách do buněčné suspenze přidán roztok IPEI st.

Veškeré parametry a podmínky shrnuje Tabulka 1, str. 44, kde vzorky **2** a **5** byly transfekovány ve vysoké hustotě ($20 \cdot 10^6$ buněk/ml) plazmidem pro GFP na jamce 6jamkové destičky, a to v transfekčním médiu EX-CELL 293. U vzorků **3** a **4** byla naopak provedena nízkohustotní transfekce ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml) ve čtyřhranné skleněné láhvi s prodyšným víčkem pomocí média MEXi-TM, kde byla nejdříve k buňkám přidána DNA pro GFP, a po 10min inkubaci po kapkách IPEI st. Vzorky **6** a **7** byly připraveny stejným postupem, jako vzorky **2** a **5**, ale s tím rozdílem, že k transfekci byl použit plazmid pro protein mScarlet. Vzorek 1 sloužil v tomto pokusu jako pozitivní kontrola, u kterého proběhla vysokohustotní transfekce přímo ve čtyřhranné skleněné láhvi. Buňky byly resuspendovány v médiu EX-CELL 293 do výsledného objemu 10 ml a hustoty $20 \cdot 10^6$ buněk/ml. Po 2h inkubaci byly vzorky doplněny médiem EX-CELL 293 na výslednou buněčnou hustotu $1 \cdot 10^6$ buněk/ml.

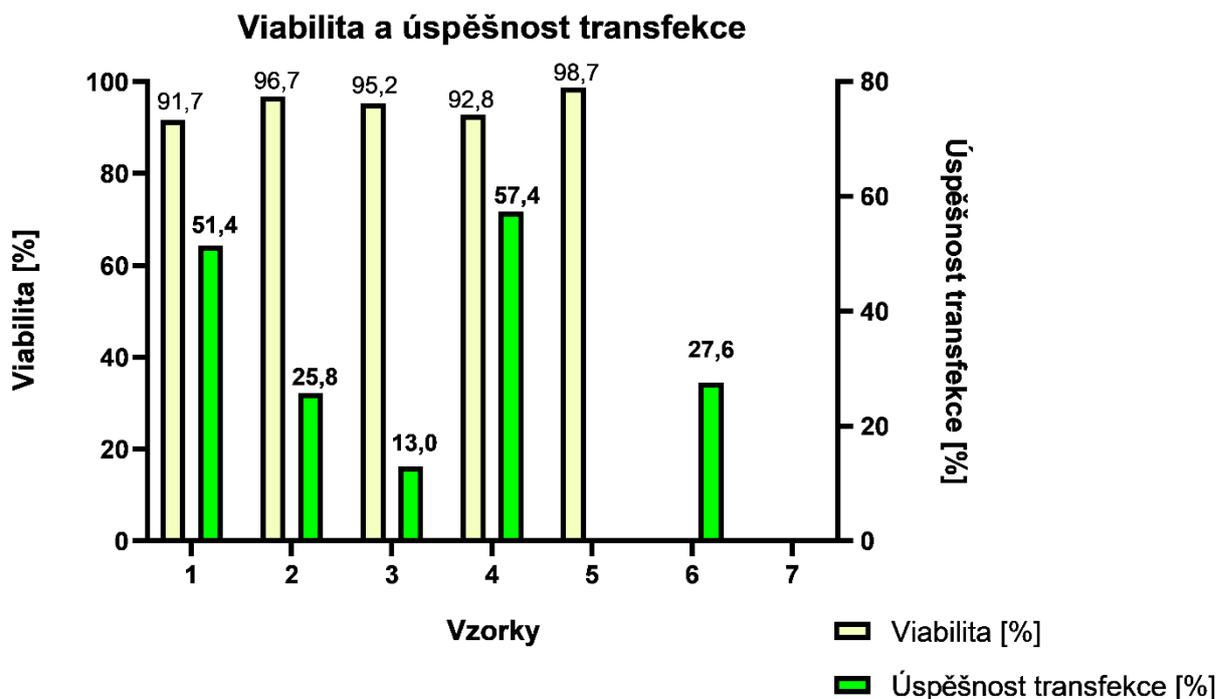
Tabulka 1: Přehled podmínek a parametrů použitých při tranzientní transfekci buněčných linií HEK293T a MEXi-293E. Konstantními podmínkami jsou poměr DNA k transfekčnímu činidlu IPEI (w/w), a také skleněná láhev (skl.), ve které byly buňky po transfekci kultivovány. V případě vzorku **1** byly buňky transfekovány v čtyřhranné skleněné láhvi s prodyšným víčkem, u vzorků **2, 5, 6 a 7** na jamkách 6jamkové destičky. K těmto vzorkům byla DNA a IPEI přidávány přímo do suspenze bez jejich inkubace. Vzorky **3 a 4** byly transfekovány v nízké hustotě v MEXi-TM médiu (transfekce „MEXi“), kde byla k buněčné suspenzi přidána DNA, směs byla po dobu 10 minut inkubována, a k ní byl po kapkách přidán roztok standardního IPEI (IPEI st.).

Vzorek	Buňky	Láhev	Médium	Počet buněk [10 ⁶]	Hustota buněk [10 ⁶ /ml]	Transfekce	DNA:IPEI st. (w/w)	Vektor
1	HEK293T	skl.	EXCELL 293	200	20	přímá	1:4	pTW5_GFP
2	HEK293T	skl.	EXCELL 293	30	20	přímá	1:4	pTW5_GFP
3	MEXi-293E	skl.	MEXi-TM	30	2	MEXi	1:4	pTW5_GFP
4	HEK293T	skl.	MEXi-TM	30	2	MEXi	1:4	pTW5_GFP
5	MEXi-293E	skl.	EXCELL 293	30	20	přímá	1:4	pTW5_GFP
6	HEK293T	skl.	EXCELL 293	30	20	přímá	1:4	pXST_I2_3C_His
7	MEXi-293E	skl.	EXCELL 293	30	20	přímá	1:4	pXST_I2_3C_His

5.1.2 Stanovení viability buněk a účinnosti transfekce

Měření viability a úspěšnosti transfekce u jednotlivých vzorků bylo provedeno pomocí průtokového cytometru LSRFortessa. Získaná data byla zpracována pomocí programu BD FACS Diva. K rozlišení živých a mrtvých buněk byl použit propidium jodid (viz kap. 4.4, str. 40). Z celkového množství buněk byla viabilita vyjádřena jako procentuální poměr nezbarvených buněk k celkovému počtu buněk. Účinnost transfekce pak charakterizoval poměr buněk fluorescencí GFP ku celkovému množství živých buněk. U vzorků 6 a 7 transfekovaných genem pro červený fluorescenční protein mScarlet byl však postup odlišný: v červeném kanálu by nešlo rozlišit mrtvé buňky značené propidium jodidem a buňky exprimující mScarlet, proto jsme propidium jodid nepřidávali a pro tyto vzorky byla transfekční účinnost vztažena na celkový počet buněk. Získané naměřené hodnoty byly poté přeneseny do MS Office Excel 2023 a z nich byl zpracován sloupcový graf v programu GraphPad Prism, verze 8.0.2.263.

Nejvyšší transfekční účinnost bylo možné sledovat u vzorku č. 4, a to 57,4 % (viz **Obrázek 7**, str. 45). K vysoké účinnosti transfekce došlo i u pozitivní kontroly, tedy u vzorku 1. Výsledné hodnoty vzorků transfekovaných v jamkách 6-jamkových destiček (vzorky 2, 5, 6 a 7) nebyly až tak příznivé a tento postup byl z časového hlediska zdlouhavější.



Obrázek 7: Vyhodnocení viability a úspěšnosti tranzientní transfekce vzorků 1-7. Tento graf znázorňuje vyhodnocení vzorků 1-7, u kterých byly porovnávány různé postupy transfekce (viz **Tabulka 1**, str. 44). Naměřena byla jejich viabilita a transfekční účinnost, jenž odpovídá procentu buněk exprimujících GFP ze všech živých buněk. U vzorků 6 a 7, transfekovaných genem pro červený fluorescenční protein mScarlet, nebyla stanovena viabilita a transfekční účinnost odpovídá procentu buněk detekovaných v červeném kanálu ze všech buněk. Hodnocení bylo provedeno pomocí průtokového cytometru LSRFortessa.

5.2 TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T

5.2.1 Optimalizace poměru DNA s různými typy IPEI

U této transfekce HEK293T bylo cílem optimalizovat několik parametrů. Porovnáván byl postup „přímé“ transfekce a postup „MEXi“, které byly použity už při předešlé transfekci (viz kap. 5.1, str. 43). Zaveden byl i postup tzv. „inkubace“, kde došlo k pre-inkubaci roztoku DNA s IPEI (viz **Tabulka 2**, str. 47). Tyto transfekce proběhly ve čtyřhranných skleněných láhvích s prodyšným víčkem. Optimalizováno bylo také použití tří typů transfekčních činidel IPEI – standardní IPEI (**IPEI st.**), komerční **IPEI Max** a syntetický konstrukt **IPEI***. Ty byly vůči DNA přidávány v různém poměru (w/w). U těchto podmínek byla transfekce provedena ve 25cm² plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem (tzv. „non-treated“ kultivační láhve pro tkáňové kultury).

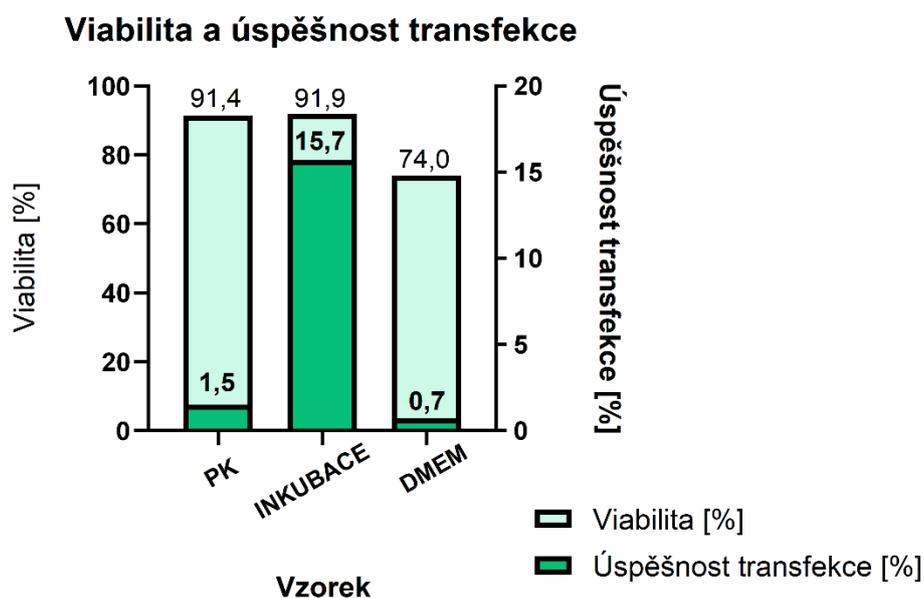
U vzorků **PK, 1 a 2** byla transfekce provedena v nízké buněčné hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml), a to plazmidem pro GFP a standardním PEI (IPEI st.) v poměru 1:4 (w/w). V případě vzorku **PK** byl použit postup transfekce „MEXi“, u vzorku **1** „inkubace“ a u vzorku **2** došlo k pre-inkubaci DNA s IPEI st. U vzorku 2 bylo další proměnnou použití jiného transfekčního média, a to DMEM. Vzorky **3-16** byly transfekovány plazmidem pro GFP a SEAP v hmotnostním poměru 1:1. Transfekce, podobně jako u předchozích tří vzorků, probíhala v nízké hustotě. U vzorků **3-6** byl předmětem optimalizace poměr DNA a **IPEI st.** (w/w). Různé poměry DNA s komerčním **IPEI Max** byly porovnávány u vzorků **7-10**, a sledováno bylo taky přidávané různé množství syntetického **IPEI***, a to u vzorků **11-16** (viz **Tabulka 2**, str. 47).

Tabulka 2: Parametry a podmínky použité při tranzientní transfekci buněk HEK293T. V případě vzorků **PK, 1 a 2** byly buněčné suspenze transfekovány ve čtyřhranných skleněných láhvích s prodyšným víčkem (skl.) v nízké hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml), za použití média MEXi-TM, do něž byl přidán roztok plazmidu pro GFP. Vzorek **PK** představoval transfekci „MEXi“, tedy předešlý postup s neúspěšnější transfekcí (viz **Tabulka 1**, str. 44, a **Obrázek 7**, str. 45). U vzorku **1** se jednalo o „inkubaci“, kde byl před transfekcí roztok DNA smíchán a inkubován s roztokem IPEI st. (20-30 minut). V případě vzorků **3-16** byly buňky transfekovány při nízké hustotě plazmidy pro GFP a SEAP v poměru 1:1 (w/w) v 25cm² plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem (pl.). Vzorky **3-6** byly optimalizovány různými poměry DNA s IPEI st., vzorky **7-10** poměry DNA s komerčním **IPEI Max**, a u vzorků **11-16** poměry DNA se syntetickým konstruktem – **IPEI*** (w/w).

HEK293T							
Vzorek	Láhev	Médium	Počet buněk [10 ⁶]	Hustota buněk [10 ⁶ /ml]	Transfekce	DNA:IPEI (w/w)	Vektor/y (w/w)
PK	skl.	MEXi-TM	10	2	MEXi	IPEI st. 1:4	pTW5_GFP
1	skl.	MEXi-TM	10	2	inkubace	IPEI st. 1:4	pTW5_GFP
2	skl.	DMEM	10	2	přímá	IPEI st.1:4	pTW5_GFP
3	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI st. 1:1	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
4	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI st. 1:2	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
5	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI st. 1:3	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
6	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI st. 1:4	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
7	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI Max 1:1	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
8	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI Max 1:2	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
9	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI Max 1:3	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
10	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI Max 1:4	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
11	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI* 1:1	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
12	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI* 1:2	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
13	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI* 1:3	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
14	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI* 1:4	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
15	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI* 1:5	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1
16	pl.	MEXi-TM	10	2	přímá	IPEI* 1:6	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 1:1

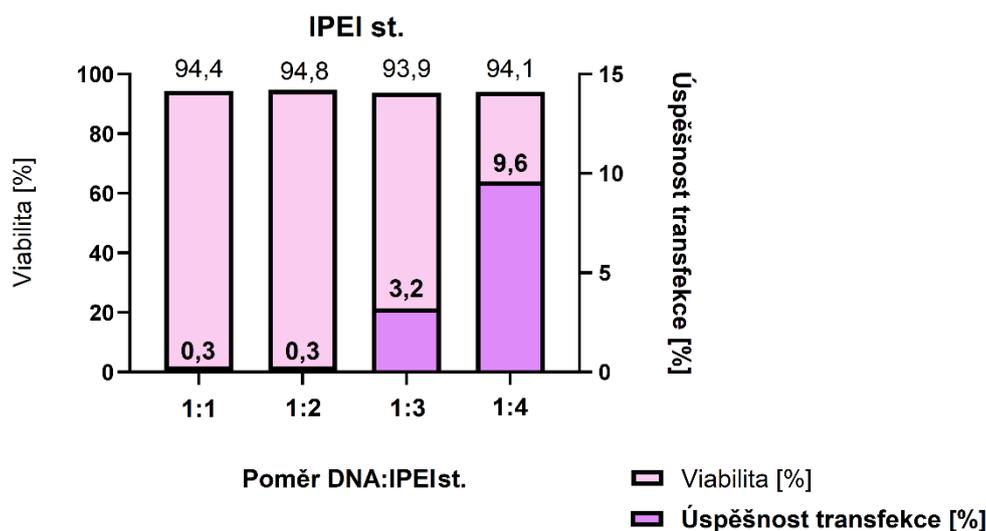
5.2.2 Stanovení viability a míry fluorescence GFP

U prvních tří vzorků byla vyhodnocena pouze viabilita a úspěšnost transfekce (viz **Obrázek 8**, str. 48). **PK**, u které byla při předešlém pokusu naměřena nejvyšší úspěšnost transfekce, ji měla v tomto případě velice nízkou, a to 1,5 %. V případě třetího vzorku (**DMEM**), tedy u použití média DMEM a přímého přidání DNA a IPEI byla transfekce efektivní pouze z 0,7 %. Výraznější účinnost transfekce lze vidět u druhého vzorku (**INKUBACE**), a to 15,7 %.



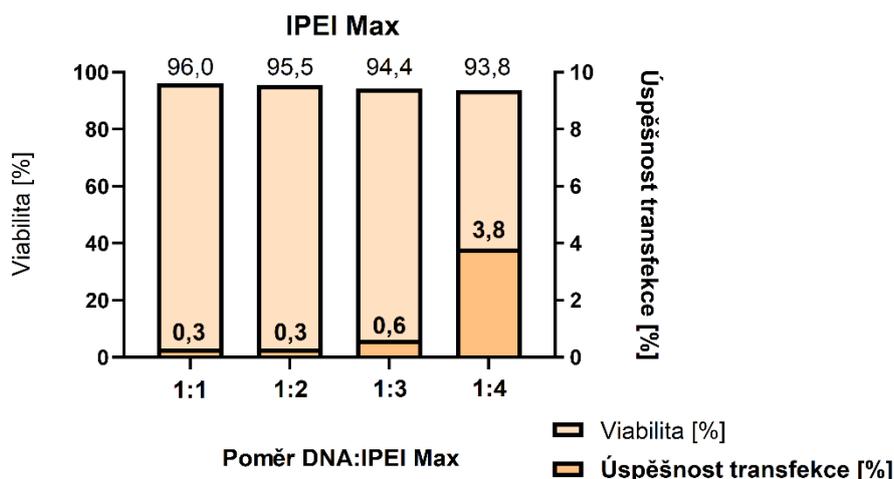
Obrázek 8: Výsledná viabilita a transfekční účinnost vzorků PK, 1 a 2. Tento graf zobrazuje u prvních tří vzorků jejich viabilitu a úspěšnost transfekce vyjádřenou pomocí exprese GFP, které v procentech udává podíl transfekovaných buněk z populace všech živých buněk. Všechny tři vzorky byly transfekovány DNA a IPEI st. v poměru 1:4 za nízké buněčné hustoty, a to v čtyřhranných skleněných láhvích s prodyšným víčkem.

V případě vzorků **3-6** byly sledovány různé poměry DNA:IPEI st. Co se týče viability, ta nabývala podobné hodnoty u všech vzorků. Viditelný rozdíl lze však pozorovat v transfekční účinnosti. U hmotnostních poměrů DNA:IPEI st. **1:1** a **1:2** (vzorky **3** a **4**) byly její hodnoty shodné. K nárůstu úspěšnosti transfekce došlo u poměru **1:3**. Největší procento úspěšnosti je však zaznamenáno u vzorku, kde byl použit poměr DNA:IPEI st. **1:4** (viz **Obrázek 9**, str. 49).



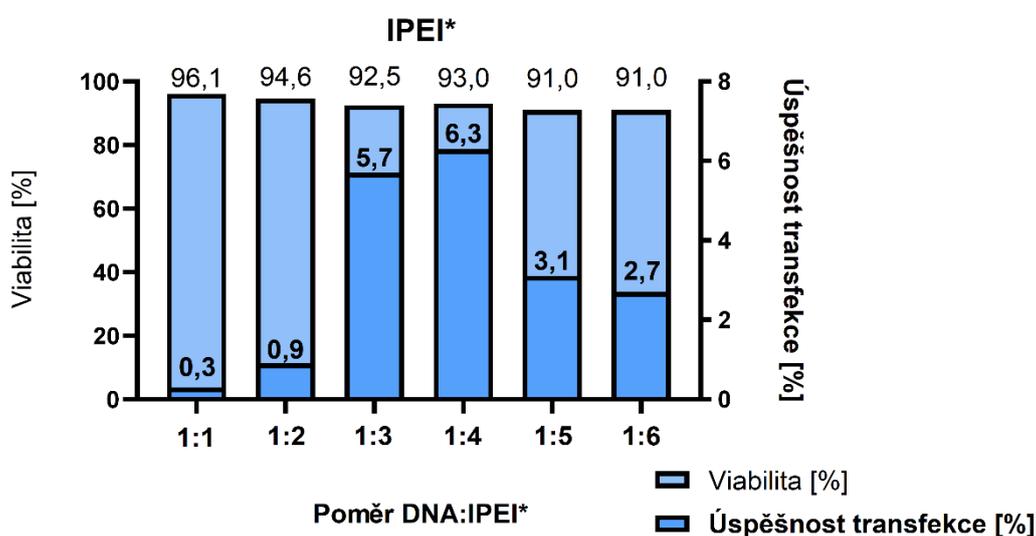
Obrázek 9: Optimalizace poměrů DNA se standardním IPEI (IPEI st.) u vzorků 3-6. Tento graf představuje hodnoty viability a úspěšnosti transfekce vzorků (exprese GFP), u kterých byly použity různé hmotnostní poměry DNA k standardnímu IPEI (IPEI st.). Tyto vzorky byly transfekovány v nízké hustotě přímým přidáním DNA i IPEI st., aniž by došlo k jejich promíchání a inkubaci. Transfekce byly provedeny v 25cm² kultivačních plastových láhvích s neupraveným povrchem.

Vzorky 7-10 byly transfekovány odlišnými poměry DNA s komerčním IPEI Max. Stejně jako u vzorků s IPEI st., i v tomto případě byly hodnoty viability 1 den po transfekci vysoké. Míra exprese GFP nabyla u vzorků 1 a 2 (tedy poměrů 1:1 a 1:2) pouze 0,3 %. V případě poměru 1:3 (vzorku 9) není zaznamenán její výraznější nárůst v porovnání s transfekční účinností u vzorků 3-6 (viz **Obrázek 9**, str. 49). K tomu dochází až v případě poměru 1:4 (tedy u vzorku 10), a to na 3,8 % (viz **Obrázek 10**, str. 49).



Obrázek 10: Optimalizace poměru DNA s komerčním IPEI Max u vzorků 7-10. Tento graf představuje hodnoty viability a transfekční účinnosti u vzorků 7-10, kde byly DNA a IPEI Max přidávány v různých poměrech do buněčné suspenze přímo, bez jejich inkubace. Transfekovány byly nízkohustotně v 25cm² kultivačních plastových láhvích s neupraveným povrchem.

Třetím typem transfekčního činidla, použitým pro optimalizaci jeho poměru s DNA (vzorky 11-16), byl syntetický konstrukt (IPEI*). Ten byl připraven Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D. a RNDr. Luděkem Lepšou, Ph.D. (viz kap. 4.3.3, str. 39). V tomto případě byly testovány jak nižší, tak i vyšší poměry DNA:IPEI*, a to od 1:1 až po 1:6 (w/w). Podobně jako v předchozích případech, ani u těchto vzorků nebyl problém v otázce nízkých hodnot viability. Ze sledování fluorescence GFP lze vidět, že její nejvyšší stupeň byl naměřen u vzorků 13 a 14, tedy u poměrů 1:3 a 1:4. Nejnižší hodnoty jsou u vzorků s poměry 1:1 a 1:2 (vzorky 11 a 12) a k poklesu míry fluorescence dochází i u vzorků 15 a 16, tedy u poměrů 1:5 a 1:6 (viz **Obrázek 11**, str. 50), kde lze zároveň pozorovat i mírný pokles viability, patrně v důsledku toxicity nadbytku PEI.



Obrázek 11: Optimalizace poměrů DNA se syntetickým IPEI (IPEI*) u vzorků 11-16. Tento graf představuje vyhodnocení viability a úspěšnosti transfekce u vzorků 11-16. Tyto vzorky byly transfekovány v nízké hustotě přidáním DNA a IPEI* v různých poměrech. Buněčné suspenze byly u jednotlivých vzorků přeneseny do 25cm² plastových kultivačních láhví s neupraveným povrchem, ke kterým byly DNA a IPEI* přidány přímo po sobě, bez jejich inkubace nebo promíchání.

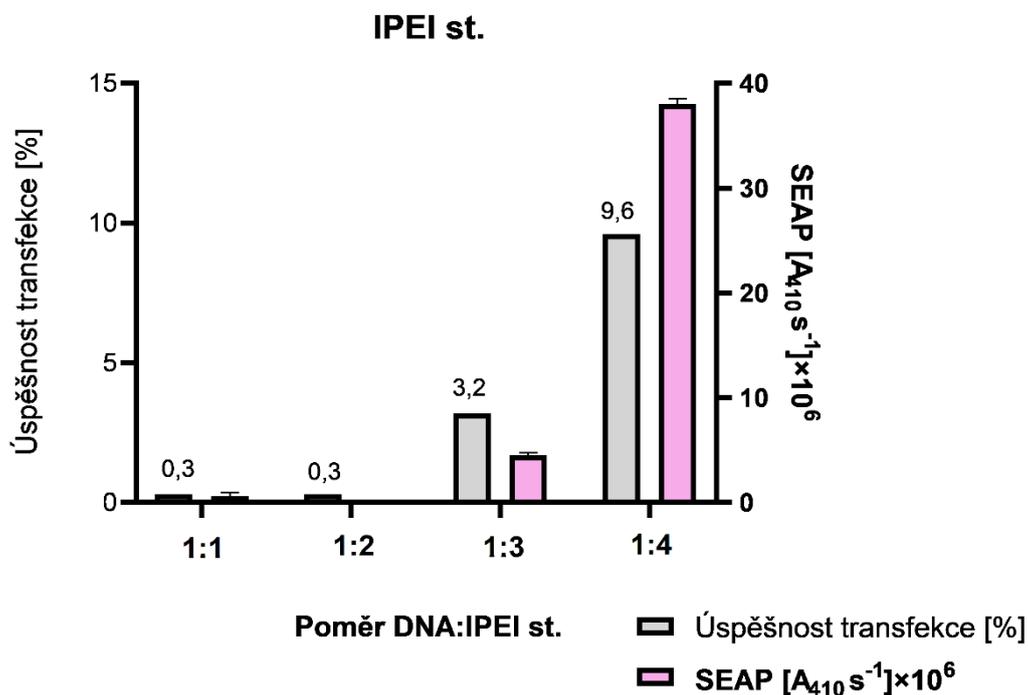
5.2.3 Stanovení katalytické aktivity sekretované alkalické fosfatasy

V rámci optimalizování poměrů DNA:IPEI byla kromě transfekční účinnosti sledována i úspěšnost produkce, kterou je možné stanovit použitím reportérového proteinu SEAP. Měření aktivity tohoto proteinu bylo provedeno v triplicátech tři dny po tranzientní transfekci.

Podle kap. 4.4.3 na str. 41 byla v časových intervalech sledována změna absorbance při 410 nm (ΔA_{410}). Pro každý vzorek byla ΔA_{410} měřena v triplikátech. Od těchto hodnot byla odpočítána ΔA_{410} slepého vzorku. Z lineární aproximace závislosti ΔA_{410} na čase byly pak pro každou část triplikátu vypočítány směrnice. Z nich byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatné odchylky, které byly vyneseny do grafu. Pro prezentaci výsledků bylo vybráno u každého vzorku ředění 800×.

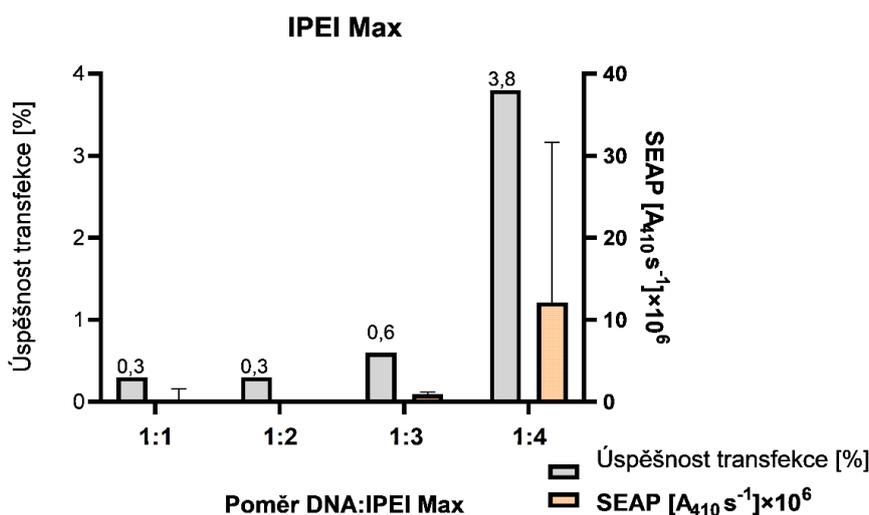
Vzorky 3-16 (viz **Tabulka 2**, str. 47) byly kromě genu pro GFP transfekovány také plazmidem pro expresi proteinu SEAP, a to v poměru 1:1. Množství DNA na $1 \cdot 10^6$ buněk bylo v tomto případě tedy 0,5 μg .

Při optimalizaci poměrů DNA s IPEI st. (vzorky 3-6) je z naměřených hodnot vidět, že v případě poměrů 1:1 a 1:2 (vzorky 3 a 4) nebyla úspěšná jak transfekce, tak ani produkce (viz **Obrázek 12**, str. 51). U poměru 1:3 (vzorek 5) je viditelný vzrůst množství SEAP, největší hodnotu lze však sledovat až u poměru 1:4 (vzorek 6). Dle očekávání spolu tedy transfekční účinnost a produktivita buněk pozitivně koreluje.



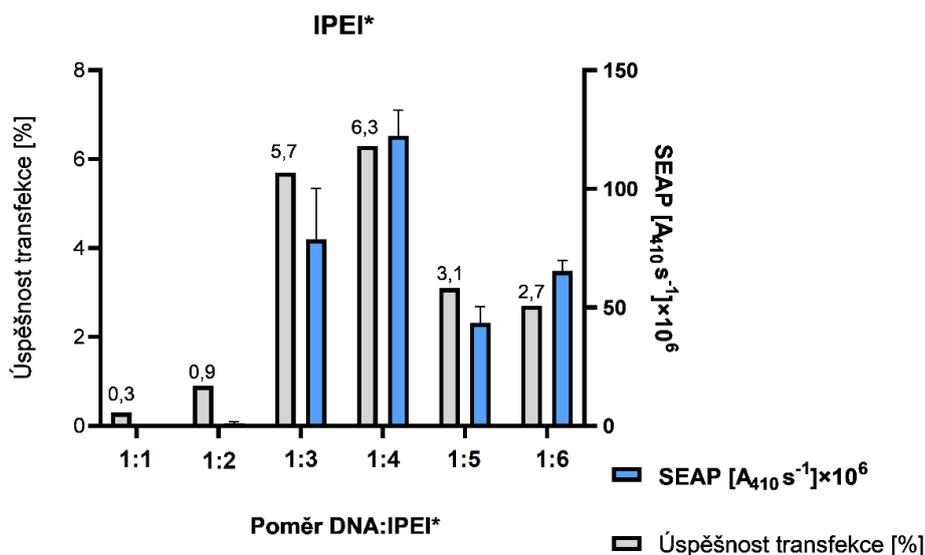
Obrázek 12: Úspěšnost transfekce a produktivita buněk v závislosti na hmotnostním poměru DNA se standardním PEI (IPEI st.). Tento graf znázorňuje hodnoty transfekční účinnosti a produktivity u vzorků 3-6 (viz Tabulka 2, str. 47) při optimalizaci poměru DNA:IPEI st. Plazmidy pro GFP a SEAP byly použity v poměru 1:1 (w/w). Byla provedena „přímá“ transfekce v nízké buněčné hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml) ve 25cm² plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem. Průměrné hodnoty směrnic závislosti změny A_{410} v čase pocházejí ze vzorků ředěných 800×.

U vzorků 7-10, kde byla měřena úspěšnost produkce při použití různých poměrů DNA s komerčním IPEI Max, jsou úspěšnosti transfekce a produkce, v porovnání s hodnotami u IPEI st. (viz **Obrázek 12**, str. 51), podstatně nižší. Zároveň je u tohoto pokusu, se zvyšováním poměrů DNA:IPEI, sledován podobný růst těchto hodnot. V porovnání s IPEI st. se tedy za daných námi použitých transfekčních podmínek jeví komerční IPEI Max jako výrazně méně účinné transfekční činidlo.



Obrázek 13: Úspěšnost transfekce a produktivita buněk při optimalizaci poměru DNA s komerčním IPEI Max. Tento graf znázorňuje hodnoty transfekční účinnosti a produktivity u vzorků 7-10 (viz **Tabulka 2**, str. 47), které byly transfekovány v nízké hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml) za použití různých poměrů DNA:IPEI Max (w/w). Transfekce byla uskutečněna plazmidy pro GFP a SEAP v hmotnostním poměru 1:1 ve 25cm² plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem.

Vyhodnocena byla také optimalizace poměru DNA se syntetickým IPEI (IPEI*), který byl připraven podle kap. 4.3.3, str. 39. Ten byl proti DNA přidáván v různých hmotnostních poměrech do vzorků 11-16. Voleny byly v tomto případě i vyšší hmotnostní poměry (viz **Obrázek 14**, str. 53). U vzorků 11 a 12, kde byly použity poměry 1:1 a 1:2, nedošlo téměř k žádné produkci proteinu SEAP. Nárůst produkce lze vidět až v případě vyšších poměrů. Výraznou změnu produkční účinnosti bylo vidět u poměru 1:3 (vzorek 13), v případě poměru 1:4 (vzorek 14) je tato hodnota nejvyšší. Poměry 1:5 a 1:6 (vzorky 15 a 16) mají také určitou úspěšnost produkce, avšak v porovnání s poměrem 1:4 jsou tyto hodnoty nižší. Při porovnání s IPEI st. o stejném poměru (1:4) lze říci, že i přes nižší pozorovanou transfekční účinnost (6,3 % pro IPEI* vs. 9,6 % pro IPEI st.) vykazuje vzorek 14 (IPEI*) přibližně trojnásobnou aktivitu SEAP oproti vzorku 6 (IPEI st.). To naznačuje, že by námi syntetizovaný IPEI* mohl představovat levnou a přitom účinnou náhradu komerčních PEI.



Obrázek 14: Úspěšnost transfekce a produktivita buněk při optimalizaci poměru DNA se syntetickým IPEI*. Tento graf znázorňuje hodnoty transfekční účinnosti a produktivity u vzorků 11-16 (viz **Tabulka 2**, str. 47), pro které byla provedena optimalizace poměru DNA:IPEI* (w/w). Plasmidy pro reportérové proteiny GFP a SEAP byly přidány v hmotnostním poměru 1:1. Tato nízkohustotní „přímá“ transfekce probíhala ve 25cm² plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem.

5.3 TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T

5.3.1 Porovnání přímého přidání a inkubace DNA s IPEI

U této transfekce buněčné linie HEK293T byl optimalizován způsob, jakým byly k buněčné suspenzi přidávány roztoky DNA a standardního IPEI (viz **Tabulka 3**, str. 54). Porovnáván byl postup „MEXi“ (viz **Tabulka 1**, str. 44), který měl v předešlém případě naměřenou poměrně vysokou transfekční účinnost (viz **Obrázek 7**, str. 45), s pre-inkubací roztoků DNA a IPEI st. Z hlediska inkubace byl roztok DNA a IPEI st. inkubován buď v PBS-TK pufru, nebo v 1 ml MEXi-TM transfekčního média. Transfekce proběhly v čtyřhranných skleněných láhvích s prodyšným víčkem v nízké hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml). Použitým transfekčním médiem bylo v tomto případě u všech vzorků MEXi-TM, a DNA s IPEI st. byly k buněčné suspenzi přidány v poměru 1:4 (w/w).

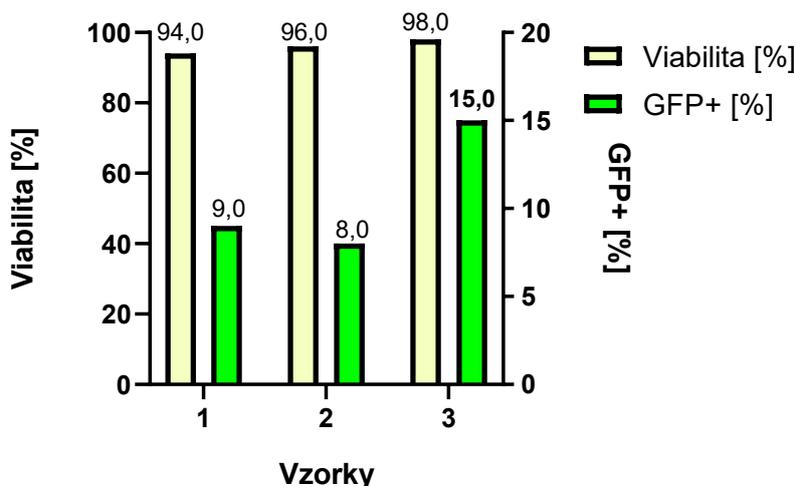
Tabulka 3: Postup a parametry použité při tranzientní transfekci buněk HEK293T. Všechny tři vzorky byly připraveny transfekcí ve čtyřhranných skleněných láhvích s prodyšným víčkem. Bylo použito MEXi-TM médium a buňky byly transfekovány plazmidem pro GFP v nízké buněčné hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml). Roztoky DNA se standardním IPEI (IPEI st.) byly k buněčné suspenzi přidávány v poměru 1:4 (w/w). U vzorku **1** byl použit postup „MEXi“ (viz **Tabulka 1**, str. 44), kde nedošlo k pre-inkubaci DNA s IPEI st. K vzorku **2** byla DNA a IPEI st. přidány ve formě transfekční směsi, která byla připravena jejich inkubací v PBS-TK pufru. Vzorek **3** byl také transfekován pre-inkubovanou směsí DNA s IPEI st., ale na rozdíl od vzorku **2** došlo k pre-inkubaci v 1 ml transfekčního média MEXi-TM.

HEK293T							
Vzorek	Láhev	Médium	Počet buněk [10 ⁶]	Hustota buněk [10 ⁶ /ml]	Transfekce	DNA:IPEI st. (w/w)	Vektor/y (w/w)
1	skl.	MEXi-TM	30	2	MEXi	1:4	pTW5_GFP
2	skl.	MEXi-TM	30	2	inkubace DNA + IPEI v PBS	1:4	pTW5_GFP
3	skl.	MEXi-TM	30	2	inkubace DNA + IPEI v 1 ml média	1:4	pTW5_GFP

5.3.2 Vyhodnocení viability a úspěšnosti transfekce

Po této transfekci byly viabilita a transfekční účinnost (na rozdíl od předešlých měření) vyhodnoceny pomocí automatické počítačky buněk (viz kap. 4.4.2, str. 41). Z grafu lze vidět, že v případě vyhodnocení viability byla její hodnota u každého vzorku vysoká (viz **Obrázek 15**, str. 55). Z hlediska míry exprese GFP byla její nejvyšší hodnota naměřena u vzorku **3** (15 %). Hodnoty transfekční účinnosti u vzorků **1** a **2** se lišily pouze o jedno procento.

Viabilita a úspěšnost transfekce



Obrázek 15: Viabilita a transfekční účinnost pozorovaná při porovnání způsobu přidávání DNA a IPEI st. Tento graf zobrazuje hodnoty viability a transfekční účinnosti vzorků 1-3 (viz **Tabulka 3**, str. 54). Hodnoty viability a transfekční účinnosti byly v tomto případě naměřeny pomocí automatické počítačky buněk.

5.4 TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE LINIÍ HEK293T A MEXi-293E

5.4.1 Optimalizace transfekčního postupu

V případě této transfekce byly podobně jako v případě předešlé transfekce (viz kap. 5.3, str. 53) porovnávány různé způsoby vpravení DNA a IPEI st. do buněčných linií. U této transfekce byly postupy porovnávány mezi buněčnými liniemi HEK293T a MEXi-293E. Jako v případě minulé transfekce (viz **Tabulka 3**, str. 54) byl porovnáván postup „MEXi“, inkubace transfekční směsi v PBS-TK pufru nebo v 1 ml transfekčního média MEXi-TM (viz **Tabulka 4**, str. 56). U pre-inkubace DNA a IPEI st. v 1 ml média bylo sledováno různé množství plazmidu pro GFP – přidávána byla buď pouze DNA pro GFP, nebo DNA pro GFP a SEAP v poměru 1:9 (w/w).

Vzorky **T-Ex 1** a **E-Mex 1** byly transfekovány postupem „MEXi“ (viz **Tabulka 1**, str. 44). U vzorků **T-Ex 2** a **E-Mex 2** došlo k pre-inkubaci roztoku DNA a IPEI st. v PBS-TK. K inkubaci roztoku DNA s IPEI st. došlo i v případě vzorků **T-Ex 3**, **T-Ex 4**, **E-Mex 3** a **E-Mex 4**. K vzorkům **T-Ex 4** a **E-Mex 4** byl kromě plazmidu pro GFP přidáván taky plazmid pro SEAP tak, aby byly plazmidy v hmotnostním poměru 9:1 (SEAP:GFP).

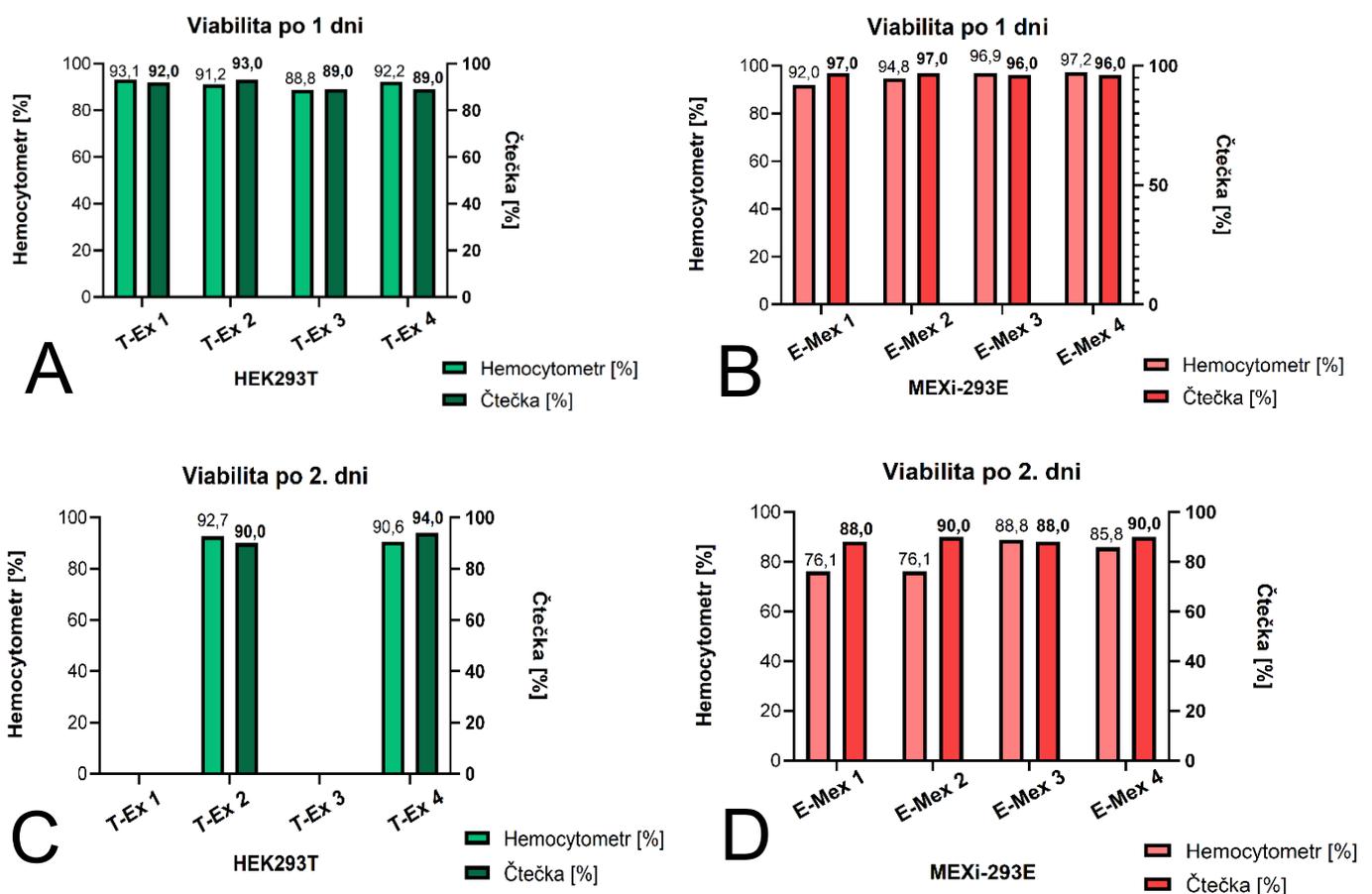
Tabulka 4: Tranzientní transfekce buněčných linií HEK293T a MEXi-293E. Tato tabulka slouží jako souhrn všech použitých množství a parametrů. Vzorky byly transfekovány ve 25cm² plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem v nízké hustotě (2·10⁶ buněk/ml) v médiu MEXi-TM. Roztoky DNA se standardním IPEI (IPEI st.) byly ke vzorkům přidávány v poměru 1:4 (w/w). Porovnáván byl postup „MEXi“ (viz **Tabulka 1**, str. 44), inkubace DNA a IPEI st. v pufru PBS-TK, nebo v 1 ml transfekčního média MEXi-TM.

Vzorek	Buňky	Kultivační médium	Láhev	Médium	Počet buněk [10 ⁶]	Hustota buněk [10 ⁶ /ml]	Transfekce	DNA:IPEI st. (w/w)	Vektor/y (w/w)
T-Ex 1	HEK293T	EXCELL293	pl.	MEXi-TM	10	2	MEXi	1:4	pTW5_GFP
T-Ex 2	HEK293T	EXCELL293	pl.	MEXi-TM	10	2	inkubace DNA + IPEI v PBS	1:4	pTW5_GFP
T-Ex 3	HEK293T	EXCELL293	pl.	MEXi-TM	10	2	inkubace DNA + IPEI v 1 ml media	1:4	pTW5_GFP
T-Ex 4	HEK293T	EXCELL293	pl.	MEXi-TM	10	2	inkubace DNA + IPEI v 1 ml media	1:4	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 9:1
E-Mex 1	MEXi-293E	MEXi-CM	pl.	MEXi-TM	10	2	MEXi	1:4	pTW5_GFP
E-Mex 2	MEXi-293E	MEXi-CM	pl.	MEXi-TM	10	2	inkubace DNA + IPEI v PBS	1:4	pTW5_GFP
E-Mex 3	MEXi-293E	MEXi-CM	pl.	MEXi-TM	10	2	inkubace DNA + IPEI v 1 ml media	1:4	pTW5_GFP
E-Mex 4	MEXi-293E	MEXi-CM	pl.	MEXi-TM	10	2	inkubace DNA + IPEI v 1 ml media	1:4	pTW5sec_SEAP:pTW5_GFP 9:1

5.4.2 Viabilita a buněčná hustota HEK293T a MEXi-293E v průběhu 2 dní

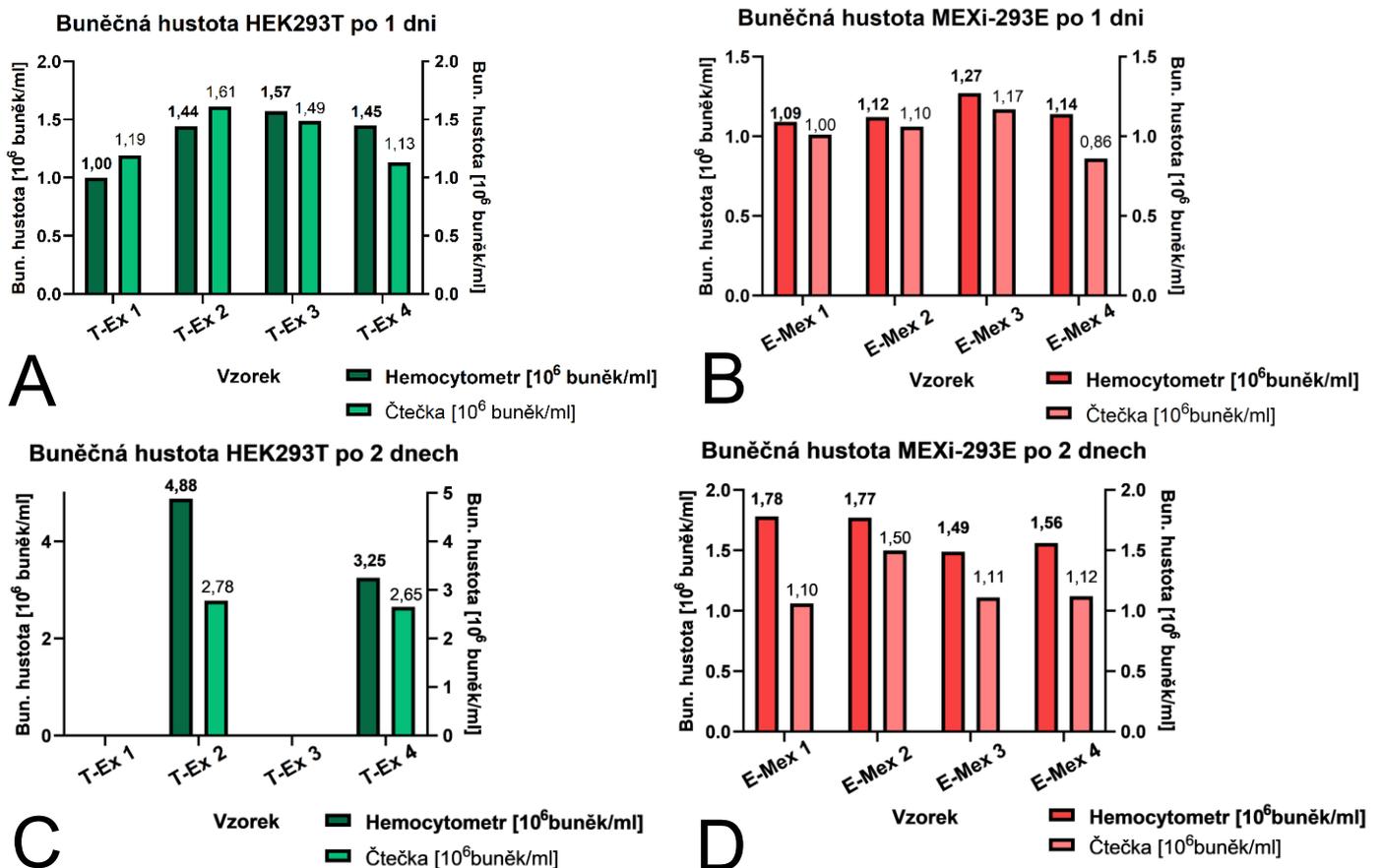
Po tranzientní transfekci buněčných linií HEK29T a MEXi-293E byla v průběhu dvou dní sledována jejich viabilita a buněčná hustota. Hodnoty byly měřeny hemocytometrem a automatickou počítáčkou buněk Corning Cell Counter a zároveň i pomocí automatické počítáčky buněk Automated cell counter Fluo (VWR) s jednorázovými počítacími komůrkami (viz kap. 4.2.3, str. 38). Výsledky byly shrnuty pomocí sloupcového grafu v programu GraphPad Prism.

Viabilita po jednom dni byla u vzorků HEK293T i MEXi-293E poměrně vysoká (viz Obrázek 16, str. 57). V případě vzorků HEK293T byly tyto hodnoty nižší, než u vzorků MEXi-293E. Měření viability vzorků pokračovalo i druhý den po jejich transfekci (viz **Obrázek 16**, str. 57). U transfekované buněčné linie HEK293T byl sledován pokles viability. V případě vzorků **T-Ex 1** a **T-Ex 3** nebylo možné naměřit viabilitu. U vzorku **T-Ex 2** nebyla hodnota viability moc odlišná, v případě **T-Ex 4** došlo k jejímu mírnému nárůstu. Naopak u transfekovaných buněk MEXi-293E byl sledován mírný pokles viability u každého vzorku, a to při použití obou měřících přístrojů (viz **Obrázek 18**, str. 59).



Obrázek 16: Viabilita transfekovaných buněčných linií HEK293T a MEXi-293E stanovená po 1. a 2. dnu od transfekce. Na tomto obrázku jsou graficky znázorněny hodnoty viability u transfekovaných vzorků HEK293T a MEXi-293E buněk. Na panelech **A** a **C** byla vyhodnocena viabilita vzorků s HEK293T buňkami, kde slabě zelené sloupce byly hodnoty viability naměřené hemocytometrem a počítačkou Corning, silně zeleně lze vidět hodnoty zjištěné automatickou počítačkou buněk VWR. Stejně byly naměřeny i vzorky transfekované buněčné linie MEXi-293E (panely **B** a **D**), kde slabě červeně je znázorněna viabilita naměřená pomocí hemocytometru a počítačky Corning, silně červeně pomocí automatické počítačky buněk VWR.

Měřeny byly zároveň i buněčné hustoty jednotlivých vzorků, znovu jak pomocí hemocytometru a automatické počítacíky buněk Corning, tak i pomocí automatické počítacíky buněk od VWR (viz **Obrázek 17**, str. 58). U buněčné linie HEK293T lze u vzorků **T-Ex 2** a **T-Ex 4** v průběhu dvou dní vidět nárůst hustoty. V případě vzorků **T-Ex 1** a **T-Ex 3** byly buňky druhý den po transfekci mrtvé. U MEXi-293E v průběhu dvou dní nebyl sledován výrazný růst.



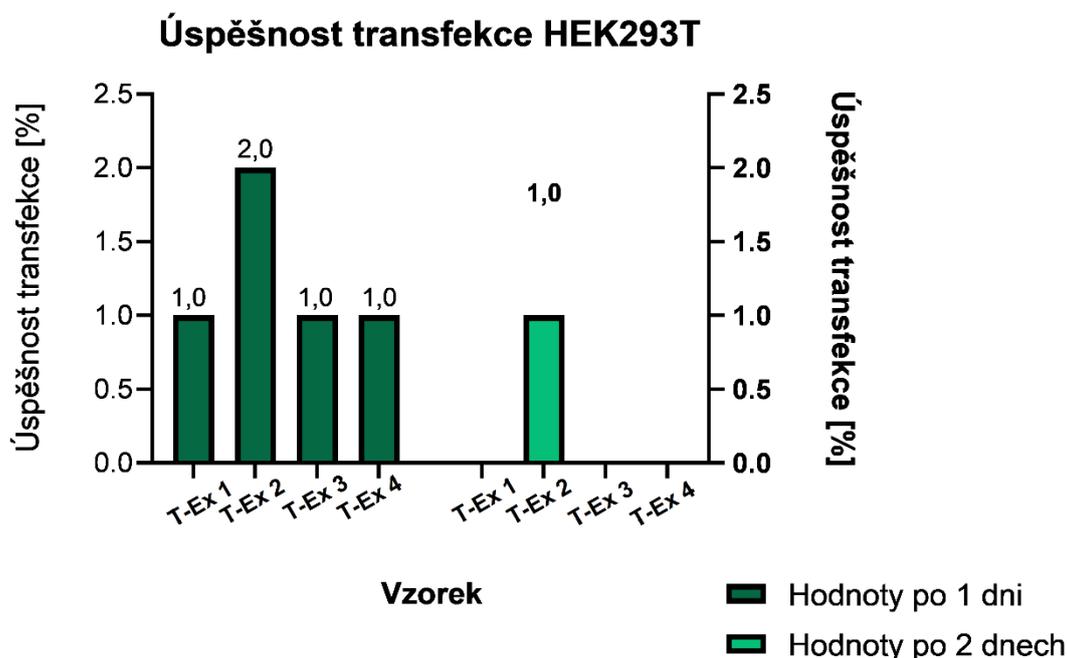
Obrázek 17: Buněčná hustota linií HEK293T a MEXi-293E stanovená po 1. a 2. dnu od transfekce. Na panelech **A** a **C** se jedná o buněčnou linii HEK293T, kde silně zelenou jsou hodnoty naměřené hemocytometrem a počítacíkou Corning a slabě zeleně pomocí automatické počítacíky buněk VWR. U panelů **B** a **D** se jedná o buněčnou linii MEXi-293E, kde silně červeně jsou hodnoty naměřené pomocí hemocytometru a počítacíky Corning a slabě červeně automatickou počítacíkou buněk VWR.

5.4.3 Vyhodnocení transfekční účinnosti po 1. a 2. dni

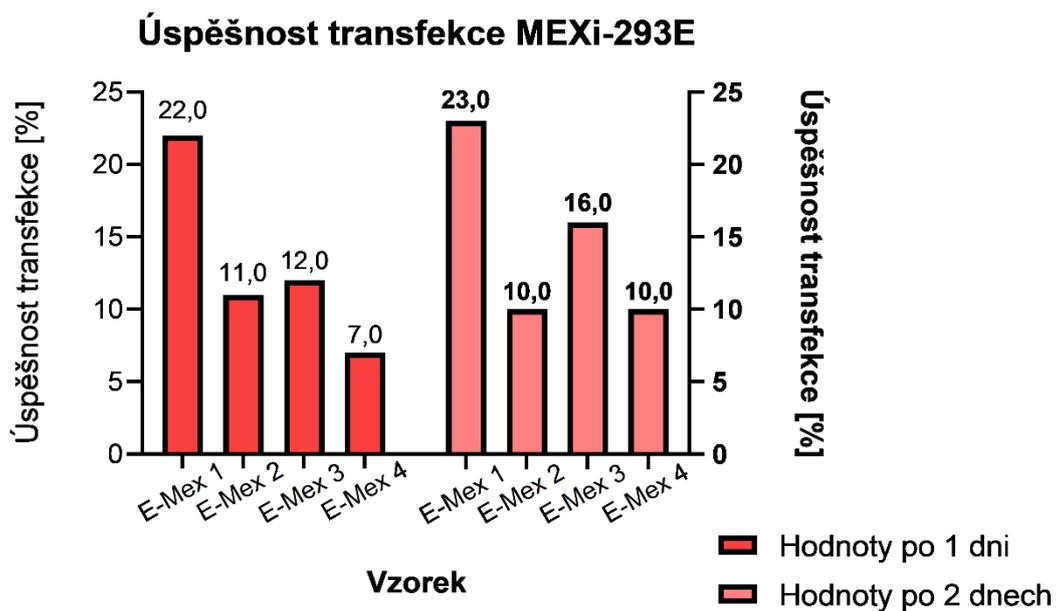
Podobně jako viabilita (viz kap. 5.4.2, str. 56) byla u vzorků **T-Ex (1-4)** a **E-Mex (1-4)** (viz kap. 5.4.1, str. 55) po prvním a druhém dni vyhodnocena i transfekční účinnost. Míra fluorescence GFP byla měřena pomocí automatické počítačky buněk VWR (viz 4.4.2, str. 41).

V případě buněčné linie HEK293T byla v průběhu dvou dní sledována nejvyšší úspěšnost transfekce u vzorku **T-Ex 2**, a to pouze 2 %. V porovnání s prvním dnem (viz **Obrázek 18**, str. 59) nebyla u vzorků **T-Ex 1**, **T-Ex 3** a **T-Ex 4** naměřena žádná míra fluorescence GFP a u vzorku **T-Ex 2** měla transfekční účinnost poloviční hodnotu.

U vzorků představujících transfekované buněčné linie MEXi-293E byly míry fluorescence GFP o něco příznivější (viz **Obrázek 19**, str. 60). První den byly tyto hodnoty u většiny vzorků o něco nižší, než druhý den po transfekci. Největší transfekční účinnost byla naměřena u vzorku **E-Mex 1**, kde byly DNA a IPEI st. přidány podle postupu „MEXi“ (viz **Tabulka 4**, str. 56). Na druhý den byl sledován nárůst účinnosti transfekce u vzorku **E-Mex 3**, kde byl nejdříve roztok plazmidu pro GFP inkubován s IPEI st. v 1 ml transfekčního média. Další vzrůst fluorescenčního signálu GFP nastal i u vzorku **E-Mex 4**. Postup přípravy transfekčního roztoku, tedy smíchání DNA s IPEI v 1 ml média byl proveden taktéž, rozdíl spočíval v tom, že byl použit plazmid pro SEAP a GFP v poměru 9:1 (w/w).



Obrázek 18: Vyhodnocení úspěšnosti transfekce u vzorků buněčné linie HEK293T po 1. a 2. dnu od transfekce. Na obrázku je barevně rozlišena naměřená transfekční účinnost HEK293T první (silně zelená) a druhý (slabě zelená) den po tranzientní transfekci v nízké hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml) v médiu MEXi-TM (viz **Tabulka 4**, str. 56). Měření bylo provedeno pomocí automatické počítačky buněk VWR.



Obrázek 19: Vyhodnocení úspěšnosti transfekce u vzorků buněčné linie MEXi-293E po 1. a 2. dnu od transfekce. Na obrázku je barevně rozlišena naměřená transfekční účinnost MEXi-293E první (silně červená) a druhý (slabě červená) den po tranzientní transfekci v nízké hustotě ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml) v médiu MEXi-TM (viz **Tabulka 4**, str. 56). Měření bylo provedeno pomocí automatické počítačky buněk VWR.

6. DISKUSE

Hlavním cílem této bakalářské práce byla optimalizace rekombinantní exprese proteinů v lidské buněčné linii HEK293T a MEXi-293E. Cílem bylo stanovit optimální podmínky pro dosažení vyšší úspěšnosti exprese a sekrece proteinů. K tomu byla využita metoda tranzientní transfekce, při níž byl přenos r-DNA uskutečněn chemicky, pomocí IPEI. V rámci experimentů byly testovány různé podmínky a postupy za účelem sledování transfekční a produkční účinnosti. Pro optimalizaci podmínek byly použity reportérové proteiny GFP a SEAP, které umožnily snadné sledování exprese a sekrece. Plazmidy obsahující tyto reportérové proteiny byly již dříve připraveny Mgr. Editou Poláchovou [120].

V první řadě byla u linií HEK293T a MEXi-293E optimalizována buněčná hustota během transfekce, stejně jako metoda, kterou byly DNA a IPEI st. přidány k buněčné suspenzi. Při vysokohustotní transfekci v jamce 6jamkové destičky nebyly hodnoty úspěšnosti transfekce výrazné, přestože každý vzorek měl viabilitu nad 90 % (viz **Obrázek 7**, str. 45). Vzhledem k této nevýhodě a taky časové náročnosti bylo od tohoto postupu upuštěno. Zajímavé bylo, že nejvyšší účinnost transfekce byla zaznamenána u buněčné linie HEK293T při použití bez-sérového transfekčního média MEXi-TM určeného pro linii MEXi-293E. Tento postup, který na rozdíl od média ExCELL 293 nevyžaduje vysokou buněčnou hustotu a také časovou prodlevu spojenou s inkubací buněk s DNA a PEI ve vysoké hustotě před jejich následným vyředěním do finální buněčné hustoty, se ukázal pro optimalizaci tranzientní transfekce v malém objemu média mnohem výhodnější, a proto byl použit i v dalších experimentech.

V rámci další transfekce byly optimalizovány podmínky pouze pro buněčnou linii HEK293T, která je v laboratoři již dlouhodobě rutinně používána, zatímco linie MEXi-293E představuje novinku – i proto jsme pro ni chtěli podmínky transfekce optimalizovat a pokud možno porovnat obě linie nejen co do jejich transfekovatelnosti, ale i produktivity. Výsledky úspěšnosti transfekce však i v tomto případě vykazovaly nekonzistentnost (viz kap. 5.2.2, str. 48). Přestože byla viabilita buněk poměrně vysoká, vzorek transfekovaný postupem pro MEXi-TM neměl příznivou úspěšnost transfekce. Ukázalo se, že úspěšnější byl postup zahrnující pre-inkubaci DNA s IPEI st.

Aby bylo možné sledovat co nejvíce parametrů a současně šetřit buňkami, byl navržen postup nízkohustotní transfekce v plastových kultivačních láhvích s neupraveným povrchem (25 cm²). Před samotnou transfekcí byla testována schopnost přežití buněk v plastových láhvích s různými objemy buněčné suspenze (vždy o hustotě $2 \cdot 10^6$ buněk/ml). U objemu 10 ml nebyla zaznamenána výrazná změna viability buněk, a tento objem byl tedy zvolen jako výchozí pro následující transfekce. Další výhodou plastových láhví byla jejich menší velikost, což umožnilo kultivaci většího množství kultur zároveň, a tedy provedení většího množství pokusů najednou, přičemž odpadla nutnost pracného mytí a sterilizace skleněných láhví. Tento postup byl použit při optimalizaci poměru DNA a tří typů IPEI.

Z hlediska optimalizace transfekce je poměr DNA:IPEI klíčovým faktorem. Volba správného poměru zajišťuje optimální průběh transfekce, od formování nanočástic až po uvolnění DNA uvnitř buněk. V mnoha publikacích jsou uváděny různé poměry, které závisí na použitém transfekčním médiu a typu zakoupeného IPEI.

V podmínkách tranzientní transfekce prováděné v Laboratoři strukturní biochemie imunitního rozpoznávání byly sledovány podobné trendy u všech tří typů IPEI – standardního IPEI st. (25 kDa), komerčního IPEI Max (40 kDa) a synteticky připraveného IPEI* (40 kDa). V případě IPEI st. a IPEI Max byly pozorovány poměry v rozmezí 1:1 až 1:4, přičemž nejvyšší úspěšnost transfekce a produkce byla vždy dosažena při poměru 1:4. Porovnáním naměřených hodnot u vzorků transfekovaných IPEI st. a IPEI Max se ukázalo, že hodnoty byly nižší u komerčního IPEI Max. U IPEI* byla tranzientní transfekce provedena i při vyšších poměrech DNA:IPEI*, konkrétně 1:5 a 1:6. U těchto poměrů však došlo k poklesu transfekční účinnosti a produkce r-proteinů (**Obrázek 14**, str. 53).

Podobné výsledky vycházejí z mnohých studií, které ukazují, že optimální molekulová hmotnost k zajištění efektivní transfekce se pohybuje v intervalu 20–30 kDa. Nejvyšší transfekční účinnosti byly zaznamenány u IPEI s molekulovou hmotností 25 kDa [125]. Použití IPEI s vyšší molekulovou hmotností také prokázalo určitou efektivitu, avšak pouze do určitých koncentrací s ohledem na inkubační dobu [126]. Tyto efekty byly pozorovány jak u IPEI st. s molekulovou hmotností 25 kDa, tak u IPEI Max s molekulovou hmotností 40 kDa. U IPEI*, kde byly sledovány i vyšší poměry, byl sledován zajímavý trend také při vyšších poměrech. Nejvyšší úspěšnost transfekce a zároveň i produkce byla u poměru 1:4, u poměrů 1:5 a 1:6 je sledován jejich pokles. To by tedy mohlo znamenat, že u těchto poměrů nebyla vytvořena správná rovnováha nábojů komplexu DNA s IPEI, čímž nedošlo k efektivnímu vychytávání lipoplexů záporně nabitou membránou buněk HEK293T.

Dalším možným vysvětlením je, že nadbytek PEI v buňce brání přenosu DNA do jádra, pro nějž musí dojít k disociaci plazmidu od PEI, popř. že nadbytek PEI brání transkripci z DNA do mRNA. Přílišný nadbytek PEI má také typicky negativní vliv na viabilitu transfekovaných buněk. Na druhou stranu, pokud se podíváme na hodnoty produktivity buněk sledované skrze stanovení aktivity SEAP, lze říci, že médium odebrané z kultury transfekované IPEI* za identických podmínek jako pomocí IPEI st. vykazuje přibližně trojnásobnou míru aktivity SEAP (viz Obrázek 12 a 14, str. 51 a 53). To jednak prokazuje, že IPEI* syntetizovaný v naší laboratoři je možné použít jako transfekční činidlo, ale navíc i naznačuje, že po další optimalizaci by IPEI* mohl být vhodnou, účinnou a levnou náhradou komerčních PEI.

Pro stanovení viability, buněčné hustoty i úspěšnosti transfekce byly používány a porovnávány dvě různé automatické počítačky buněk, jedna využívající standardní hemocytometr (počítačka Corning), druhá jednorázové počítací komůrky (fluorescenční počítačka od VWR; viz kap. 4.2.3, str. 38, a kap. 4.4.2, str. 41). V porovnání s měřením pomocí FACS bylo použití automatického počítadla buněk jednodušší. K měření bylo odebráno pouze 20 μ l buněčné suspenze, což mohlo ovlivnit přesnost výsledků, a to z několika důvodů. Mohlo dojít ke nedostatečnému promíchání buněčné suspenze nebo k odebrání části, kde nebylo dostatek buněk. V tomto měření (viz **Obrázek 15**, str. 55) byla nejlepší transfekční účinnost naměřena při inkubaci DNA a IPEI st. v 1 ml transfekčního média.

Dalším zajímavým pozorováním bylo měření hodnot viability a jejich porovnání mezi hemocytometrem ve spojení s počítačkou Corning a automatickou počítačkou buněk od VWR. Tyto hodnoty byly měřeny u obou buněčných linií HEK293T a MEXI-293E během dvou dní. Jak plyne z výsledků (viz **Obrázek 16**, str. 57), i přes příznivé hodnoty viability u HEK293T před transfekcí měly dva ze čtyř vzorků druhý den po transfekci nulovou viabilitu.

Podobně jako u měření viability pomocí automatické počítačky buněk, chyby mohly nastat také v případě měření hemocytometrem. Chyba mohla nastat jak při odběru vzorku, tak i při jeho barvení trypanovou modří. To mohlo vést k nesprávnému výpočtu objemu buněčné suspenze pro tranzientní transfekci, což má vliv na kultivaci a výslednou viabilitu. K podobným problémům mohlo dojít také při subkultivaci buněk. Tím by byl vypočten nesprávný objem buněčné suspenze potřebné k subkultivaci, což mohlo opět ovlivnit výslednou viabilitu buněk.

U posledního měření byla v průběhu dvou dní kromě viability měřena také úspěšnost transfekce (viz kap. 5.4.3, str. 59). K tomu byla použita automatická počítanka buněk od VWR. Buněčná linie HEK293T celkově nevykazovala známky úspěšné transfekce, což mohlo být způsobeno nesprávným měřením její viability, či neznámou kontaminací vedoucí k rychlému úmrtí všech buněk. Co se týče buněčné linie MEXi-293E, nejúspěšnější transfekce byla provedena postupem pro transfekční médium MEXi-TM (viz Obrázek 19, str. 60). Je důležité zmínit, že pro čtvrtý vzorek, kde byla DNA s IPEI (1:4) pre-inkubována v 1 ml transfekčního činidla, byl plazmid pro GFP přidán pouze z 10 % celkového množství DNA (viz **Tabulka 4**, str. 56). Zbýlých 90 % tvořil plazmid pro SEAP. Je tedy pravděpodobné, že v případě přidání pouze plazmidu pro GFP by mohla být výsledná pozorovaná úspěšnost transfekce vyšší.

Další zvláštností u těchto výsledků je o něco vyšší transfekční účinnost až druhý den po transfekci (viz **Obrázek 19**, str. 60). To naznačuje, že chyba mohla nastat v růstu buněčné linie MEXi-293E. Jelikož se jednalo o nedávno rozmražený alikvot, je možné, že tyto buňky nebyly ještě schopné růst plně exponenciálně. Při měření buněčné hustoty (viz **Obrázek 17**, str. 58) byla tato skutečnost potvrzena. Pomalý růst buněk mohl tím pádem zpomalit i proces exprese GFP.

7. ZÁVĚR

- Byla optimalizována transfekce v buněčných liniích HEK293T a MEXi-293E použitím plazmidů kódujících reportérové proteiny GFP a SEAP:
- poměr DNA:IPEI (w/w)

Tabulka 5: Souhrn výsledných optimalizací DNA s třemi typy IPEI (w/w).

Buněčná linie	Transfekční médium	Typ IPEI	DNA:IPEI (w/w)
HEK293T	MEXi-TM	IPEI st.	1:4
HEK293T	MEXi-TM	IPEI Max	1:4
HEK293T	MEXi-TM	IPEI*	1:4

- průběh transfekce

Tabulka 6: Souhrn optimalizovaných podmínek k tranzientní transfekci.

Buněčná hustota	Transfekce	Láhev
nízká ($2 \cdot 10^6$ buněk/ml)	v láhvi	plastová kultivační s neupraveným povrchem

8. SEZNAM LITERATURY

- [1] Klaus–Heinrich R., Koolman J. *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. Grada Publishing a.s., **2012**. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [2] Rogers K.: *Genetic Engineering* [online]. 1. vyd. New York, NY, UNITED STATES: Rosen Publishing Group, **2018** [vid. 2024-07-07]. ISBN 978-1-5383-8185-4. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?docID=5540096>
- [3] Primrose S. B., Twyman R. M. *Principles of gene manipulation and genomics*. 7. ed., 4. print. Malden, MA: Blackwell, **2007**. ISBN 978-1-4051-3544-3.
- [4] Kelman Z., O'Dell W. B.: *Recombinant Protein Expression: Eukaryotic Hosts*. San Diego, UNITED STATES: Elsevier Science & Technology, **2021**. ISBN 978-0-323-90738-5.
- [5] Khan A. H., Bayat H., Rajabibazl M., Sabri S., Rahimpour A.: Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **2016**, **33**(1), 4. ISSN 1573-0972. Dostupné z: [doi:10.1007/s11274-016-2172-7](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2172-7)
- [6] Anthony R. M., Nimmerjahn F., Ashline D. J., Reinhold V. N., Paulson J. C., Ravetch J. V.: Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **2008**, **320**(5874), 373–376. ISSN 1095-9203. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1154315](https://doi.org/10.1126/science.1154315)
- [7] Eastwood T. A., Baker K., Streather B. R., Allen N., Wang L., Botchway S. W., Brown I. R., Hiscock J. R., Lennon Ch., Mulvihill D. P.: High-yield vesicle-packaged recombinant protein production from *E. coli*. *Cell Reports Methods* [online]. **2023**, **3**(2), 100396. ISSN 2667-2375. Dostupné z: [doi:10.1016/j.crmeth.2023.100396](https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100396)
- [8] Zerbs, S., Giuliani S., Collart F.: Small-Scale Expression of Proteins in *E. coli*. In: Jon LORSCH, ed. *Methods in Enzymology* [online]. Academic Press, **2014** [vid. 2024-07-09], Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part A, s. 117–131. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-420070-8.00011-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00011-8)
- [9] Lee, S. Y.: High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* [online]. **1996**, **14**(3), 98–105. ISSN 0167-7799. Dostupné z: [doi:10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)
- [10] Yang, X., Hu W., Li F., Xia H., Zhang Z.: Gene cloning, bacterial expression, in vitro refolding, and characterization of a single-chain Fv antibody against PreS1(21–47) fragment of HBsAg. *Protein Expression and Purification* [online]. **2005**, **41**(2), 341–348. ISSN 1046-5928. Dostupné z: [doi:10.1016/j.pep.2005.02.005](https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.02.005)
- [11] Carrió, M., Villaverde A.: Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Bacteriology* [online]. **2005**, 3599–3601. ISSN 0021-9193. Dostupné z: [doi:10.1128/JB.187.10.3599-3601.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3599-3601.2005)

- [12] Fursova K. K., Laman A. G., Melnik B. S., Semisotnov G. V., Kopylov P. Kh., Kiseleva N. V., Nesmeyanov V. A. a Brovko F. A.: Refolding of scFv mini-antibodies using size-exclusion chromatography *via* arginine solution layer. *Journal of Chromatography B* [online]. **2009**, 877(22), 2045–2051. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.05.038
- [13] Peternel Š., Komel R.: Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microbial Cell Factories* [online]. **2010**, 9(1), 66. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-9-66
- [14] Simas R. G., Pessoa JR. A., Long P. F.: Mechanistic aspects of IPTG (isopropylthio- β -galactoside) transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*-a rate limiting step in the induction of recombinant protein expression. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. **2023**, 50(1). ISSN 1476-5535. Dostupné z: doi:10.1093/jimb/kuad034
- [15] Kepes A.: Études cinétiques sur la galactoside-perméase d'*Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. **1960**, 40, 70–84. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0006-3002(60)91316-0
- [16] Müller-Hill B.: *The lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm* [online]. De Gruyter, **2011** [vid. 2024-07-10]. ISBN 978-3-11-087947-6. Dostupné z: doi:10.1515/9783110879476
- [17] Adhya S.: The lac and gal Operons Today. In: E. C. C. Lin a A. Simon Lynch, ed. *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli* [online]. Boston, MA: Springer US, **1996** [vid. 2024-07-10], s. 181–200. ISBN 978-1-4684-8601-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-8601-8_9
- [18] Studier F. W.: Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* [online]. **2005**, 41(1), 207–234. ISSN 1046-5928. Dostupné z: doi:10.1016/j.pep.2005.01.016
- [19] El-Baky, N. A., Linjawi M. H., Redwan E. M.: Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli*. *BMC biotechnology* [online]. **2015**, 15, 14. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/s12896-015-0128-x
- [20] Geisse S., Gram H., Kleuser B., Kocher H. P.: Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expression and Purification* [online]. **1996**, 8(3), 271–282. ISSN 1046-5928. Dostupné z: doi:10.1006/pep.1996.0101
- [21] Aricescu A. R., Lu W., Jones E. Y.: A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* [online]. **2006**, 62(10), 1243–1250. ISSN 0907-4449. Dostupné z: doi:10.1107/S0907444906029799
- [22] Durocher Y., Butler M.: Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **2009**, 20(6), Chemical biotechnology. Pharmaceutical biotechnology, 700–707. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2009.10.008

- [23] De Pourcq K., De Schutter K., Callewaert N.: Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **2010**, 87(5), 1617–1631. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-010-2721-1
- [24] Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*. **1983**, **153**(1), 163–168. ISSN 0021-9193.
- [25] Yip C. L., Welch S. K., Klebl F., Gilbert T., Seidel P., Grant F. J., O'Hara P. J., Mackay V. L.: Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **1994**, **91**(7), 2723–2727. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.7.2723
- [26] Onishi H. R., Tkacz J. S., Lampen J. O.: Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. Formation of active enzyme in the presence of tunicamycin. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **1979**, **254**(23), 11943–11952. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)86408-6
- [27] Gascón S., Lampen J. O.: Purification of the Internal Invertase of Yeast. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **1968**, **243**(7), 1567–1572. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)93579-9
- [28] Roggenkamp R., Janowicz Z., Stanikowski B., Hollenberg C. P.: Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Molecular and General Genetics MGG* [online]. **1984**, **194**(3), 489–493. ISSN 1432-1874. Dostupné z: doi:10.1007/BF00425563
- [29] Cregg J. M., Barringer K. J., Hessler A. Y., Madden K. R.: *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **1985**, **5**(12), 3376–3385. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.5.12.3376-3385.1985
- [30] Krainer F. W., Gmeiner Ch., Neutsch L., Windwarder M., Pletzenauer R., Herwig Ch., Altmann F., Glieder A., Spadiut O.: Knockout of an endogenous mannosyltransferase increases the homogeneity of glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports* [online]. **2013**, **3**(1), 3279. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep03279
- [31] Breitling R., Klingner S., Callewaert N., Pietrucha R., Geyer A., Ehrlich G., Hartung R., Müller A., Contreras R., Beverley S. M., Alexandrov K.: Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expression and Purification* [online]. **2002**, **25**(2), 209–218. ISSN 1046-5928. Dostupné z: doi:10.1016/S1046-5928(02)00001-3
- [32] Raymond F., Boisvert S., Roy G., Ritt J.-F., Légaré D., Isnard A., Stanke M., Olivier M., Tremblay M. J., Papadopoulou B., Ouellette M., Corbeil J.: Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research* [online]. **2012**, **40**(3), 1131–1147. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkr834

- [33] Wallbanks K. R., Maazoun R., Canning E. U., Rioux J. A.: The identity of *Leishmania tarentolae* Wenyon **1921**. *Parasitology* [online]. 1985, 90 (1), 67–78. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/s0031182000049027
- [34] JENA BIOSCIENCE. *LEXSY: Leishmania Expression System*. 2002
- [35] Whitelam G. C., Cockburn B., Gandecha A. R., Owen M. R. L.: Heterologous Protein Production in Transgenic Plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. **1993**, **11**(1), 1–32. ISSN 0264-8725. Dostupné z: doi:10.1080/02648725.1993.10647896
- [36] Feng Z., Li X., Fan B., Zhu Ch., Chen Z.: Maximizing the Production of Recombinant Proteins in Plants: From Transcription to Protein Stability. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **2022**, **23**(21), 13516. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232113516
- [37] Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T.: A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* [online]. **1985**, **227**(4691), 1229–1231. Dostupné z: doi:10.1126/science.227.4691.1229
- [38] Hellwig S., Drossard J., M. Twyman R. M., Fischer R.: Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology* [online]. **2004**, **22**(11), 1415–1422. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1027
- [39] Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G.: An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* [online]. **1997**, **122**(1), 101–108. ISSN 0168-9452. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-9452(96)04541-4
- [40] Lee J., Lee S.-K., Park J.-S., Lee K.-R.: Plant-made pharmaceuticals: exploring studies for the production of recombinant protein in plants and assessing challenges ahead. *Plant Biotechnology Reports* [online]. **2023**, **17**(1), 53–65. ISSN 1863-5466. Dostupné z: doi:10.1007/s11816-023-00821-0
- [41] Simmons Ch. W., Vandergheynst J. S., Upadhyaya S. K.: A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. **2009**, **102**(3), 965–970. ISSN 1097-0290. Dostupné z: doi:10.1002/bit.22118
- [42] Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A.: A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* [online]. **1983**, **303**(5913), 179–180. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/303179a0
- [43] Thakur R., Shankar J.: Strategies for Gene Expression in Prokaryotic and Eukaryotic System. In: Vipin Chandra KALIA a Adesh Kumar SAINI, ed. *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes* [online]. Singapore: Springer, **2017** [vid. 2024-07-10], s. 223–247. ISBN 978-981-10-5511-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-5511-9_11

- [44] Beljelarskaya S. N.: Baculovirus expression systems for production of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Molecular Biology* [online]. **2011**, **45**(1), 123–138. ISSN 0026-8933. Dostupné z: doi:10.1134/S002689331101002X
- [45] Vaughn J. L., Goodwin R. H., Tompkins G. J., McCawley P.: The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* [online]. **1977**, **13**(4), 213–217. ISSN 0073-5655. Dostupné z: doi:10.1007/BF02615077
- [46] Summers M., Smith G.: A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. In: [online]. **1987** [vid. 2024-07-18]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Manual-of-Methods-for-Baculovirus-Vectors-and-Summers-Smith/e3d062c628e3918054855d651c490e307e643d0c>
- [47] Johansen H., Van Der Straten A., Sweet R., Otto E., Maroni G., Rosenberg M.: Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in *Drosophila Schneider* cells. *Genes & Development* [online]. **1989**, **3**(6), 882–889. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.3.6.882
- [48] Geisler Ch., Aumiller J. J., Jarvis D. L.: A fused lobes Gene Encodes the Processing β -N-Acetylglucosaminidase in Sf9 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **2008**, **283**(17), 11330–11339. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M710279200
- [49] O’Flaherty R., Bergin A., Flampouri E., Mota L. M., Obaidi I., Quigley A., Xie Y., Butler M.: Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances* [online]. **2020**, **43**, 107552. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107552
- [50] Villacrés C., Tayi V. S., Butler M.: Strategic feeding of NS0 and CHO cell cultures to control glycan profiles and immunogenic epitopes of monoclonal antibodies. *Journal of Biotechnology* [online]. **2021**, **333**, 49–62. ISSN 0168-1656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2021.04.005
- [51] Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R.: Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology* [online]. **1977**, **36**(1), 59–72. ISSN 1465-2099. Dostupné z: doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
- [52] Graham F. L., Van Der Eb A. J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* [online]. **1973**, **52**(2), 456–467. ISSN 0042-6822. Dostupné z: doi:10.1016/0042-6822(73)90341-3
- [53] Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F. L.: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal* [online]. **2002**, **16**(8), 869–871. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0995fje
- [54] Dubridge R. B., Tang P., Hsia H. C., Leong P. M., Miller J. H., Calos M. P.: Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology*. **1987**, **7**(1), 379–387. ISSN 0270-7306.

- [55] Lin Y.-Ch., Boone M., Meuris L., Lemmens I., Van Roy N., Soete A., Reumers J., Moisse M., Plaisance S., Drmanac R., Chen J., Speleman F., Lambrechts D., Van De Peer Y., Tavernier J., Callewaert N.: Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications* [online]. **2014**, 5, 4767. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms5767
- [56] Jäger V., Büsow K., Wagner A., Weber S., Hust M., Frenzel A., Schirrmann T.: High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC biotechnology* [online]. **2013**, 52. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6750-13-52
- [57] Reeves P. J., Callewaert N., Contreras R., Khorana H. G.: Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **2002**, **99**(21), 13419–13424. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.212519299
- [58] Aricescu A. R., Lu W., Jones E. Y.: A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* [online]. **2006**, **62**(Pt 10), 1243–1250. ISSN 0907-4449. Dostupné z: doi:10.1107/S0907444906029799
- [59] Geisse S., Henke M.: Large-scale Transient Transfection of Mammalian Cells: A Newly Emerging Attractive Option for Recombinant Protein Production. *Journal of Structural and Functional Genomics* [online]. **2005**, **6**(2), 165–170. ISSN 1570-0267. Dostupné z: doi:10.1007/s10969-005-2826-4
- [60] Petiot E., Cuperlovic-Culf M., Shen Ch. F., Kamen A.: Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine. *Vaccine* [online]. **2015**, 33(44), Vaccine Engineering, 5974–5981. ISSN 0264-410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.097
- [61] Tan E., CHin C. S. H., Lim Z. F. S., Ng S. K.: HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **2021**, 9, 796991. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2021.796991
- [62] Van Der Valk, J., Bieback K., Buta Ch., Cochrane B., Dirks W. G., Fu J., Hickman J. J., Hohensee Ch., Kolar R., Liebsch M., Pistollato F., Schulz M., Thieme D., Weber T., Wiest J., Winkler S., Gstraunthaler G.: Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* [online]. **2018**, **35**(1), 99–118. ISSN 1868-8551. Dostupné z: doi:10.14573/altex.1705101
- [63] Groothuis F. A., Heringa M. B., Nicol B., Hermens J. L. M., Blaauboer B. J., Kramer N. I.: Dose metric considerations in *in vitro* assays to improve quantitative *in vitro*–*in vivo* dose extrapolations. *Toxicology* [online]. **2015**, 332, Quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation (QIVIVE): An essential element for *in vitro*-based risk assessment, 30–40. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2013.08.012

- [64] Smith. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology Rev. ed* [online]. Oxford [England]: Oxford University Press, **2000** [vid. 2024-07-17]. ISBN 978-0-19-850673-7. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=98508&site=ehost-live>
- [65] Amante D. H., Smith T. R. F., Mendoza J. M., Schultheis K., McCoy J. R., Khan A. S., Sardesai N. Y., Broderick K. E.: Skin Transfection Patterns and Expression Kinetics of Electroporation-Enhanced Plasmid Delivery Using the CELLECTRA-3P, a Portable Next-Generation Dermal Electroporation Device. *Human Gene Therapy Methods* [online]. **2015**, **26**(4), 134–146. ISSN 1946-6536. Dostupné z: [doi:10.1089/hgtb.2015.020](https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.020)
- [66] Kisakov D. N., Belyakov I. M., Kisakova L., Yakovlev V. A., Tigeeva E. V., Karpenko L. I.: The use of electroporation to deliver DNA-based vaccines. *Expert Review of Vaccines* [online]. **2024**, **23**(1), 102–123. ISSN 1476-0584. Dostupné z: [doi:10.1080/14760584.2023.2292772](https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2292772)
- [67] Berger C., Berger M., Feng J., Riddell S. R.: Genetic modification of T cells for immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. **2007**, **7**(8), 1167–1182. ISSN 1471-2598. Dostupné z: [doi:10.1517/14712598.7.8.1167](https://doi.org/10.1517/14712598.7.8.1167)
- [68] Yang N. S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D.: In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1990**, **87**(24), 9568–9572. ISSN 0027-8424.
- [69] Fus-Kujawa A., Prus P., Bajdak-Rusinek K., Teper P., Gawron K., Kowalczyk A., L. Sieron A.: An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **2021**, [vid. 2024-07-18]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: [doi:10.3389/fbioe.2021.701031](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701031)
- [70] Barber M. A.: A Technic for the Inoculation of Bacteria and Other Substances Into Living Cells. *Journal of Infectious Diseases* [online]. **1911**, **8**(3), 348–360. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Dostupné z: [doi:10.1093/infdis/8.3.348](https://doi.org/10.1093/infdis/8.3.348)
- [71] Robbins P. D., Tahara H., Ghivizzani S. C.: Viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology* [online]. **1998**, **16**(1), 35–40. ISSN 0167-7799, 1879-3096. Dostupné z: [doi:10.1016/S0167-7799\(97\)01137-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01137-2)
- [72] Zhao Z., Anselmo A., Mitragotri S.: Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine* [online]. **2022**, **7**(1), 10258. ISSN 2380-6761. Dostupné z: [doi:10.1002/btm2.10258](https://doi.org/10.1002/btm2.10258)
- [73] Wilson J. M.: Adenoviruses as Gene-Delivery Vehicles. *New England Journal of Medicine* [online]. **1996**, **334**(18), 1185–1187. ISSN 0028-4793. Dostupné z: [doi:10.1056/NEJM199605023341809](https://doi.org/10.1056/NEJM199605023341809)
- [74] Hadi M., Qutaiba B. Allela O., Jabari M., Jasoor A. M., Naderloo O., Yasamineh S., Gholizadeh O., Kalantari L.: Recent advances in various adeno-associated viruses (AAVs) as gene therapy agents in hepatocellular carcinoma. *Virology Journal* [online]. **2024**, **21**. ISSN 1743-422X. Dostupné z: [doi:10.1186/s12985-024-02286-1](https://doi.org/10.1186/s12985-024-02286-1)

- [75] Xu Y., Hui S. W., Frederik P., Szoka F. C.: Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. *Biophysical Journal*. **1999**, *77*(1), 341–353. ISSN 0006-3495.
- [76] Balazs D. A., Godbey W.: Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery* [online]. **2011**, 326–497. ISSN 2090-3022. Dostupné z: doi:10.1155/2011/326497
- [77] Felgner J. H., Kumar R., Sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P. L.: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *The Journal of Biological Chemistry*. **1994**, *269*(4), 2550–2561. ISSN 0021-9258.
- [78] Maurer N., Mori A., Palmer L., Monck M. A., Mok K. W., Mui B., Akhong Q. F., Cullis P. R.: Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs. *Molecular Membrane Biology* [online]. **1999**, *16*(1), 129–140. ISSN 0968-7688. Dostupné z: doi:10.1080/096876899294869
- [79] Hasan M., Ragnarsson L., Cardoso F. C., Lewis R. J.: Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain. *PLoS ONE* [online]. **2021**, *16*(3), e0243645. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0243645
- [80] Guo L., Wang L., Yang R., Feng R., Li Z., Zhou X., Dong Z., Ghartey-Kwansah G., Xu M., Nishi M., Zhang Q., Isaacs W., Ma J., Xu X.: Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. **2017**, *24*(3), 622–629. ISSN 1319-562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2017.01.034
- [81] Mohammad H.S., Kurokohchi K., Yoneyama H., Tokuda M., Morishita A., Jian G., Shi L., Murota M., Tani J., Kato K., Miyoshi H., Deguchi A., Himoto T., Usuki H., Wakabayashi H., Izuishi K., Suzuki Y., Iwama H., Deguchi K., Uchida N., Sabet E.A., Arafa U.A., Hassan A.T.A., El-Sayed A.A., Masaki T.: Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology* [online]. **2008**, *33*(6), 1157–1163. Dostupné z: doi:10.3892/ijo_00000105
- [82] Inokuchi J., Narula N., Yee D. S., Skarecky D. W., Lau A., Ornstein D. K., Tyson D. R.: Annexin A2 positively contributes to the malignant phenotype and secretion of IL-6 in DU145 prostate cancer cells. *International Journal of Cancer* [online]. **2009**, *124*(1), 68–74. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.23928
- [83] Conwell Ch. C., Huang L.: Recent Advances in Non-viral Gene Delivery. In: *Advances in Genetics* [online]. B.m.: Academic Press, **2005** [vid. 2024-07-17], Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 1, s. 1–18. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2660(05)53001-3
- [84] Cai X., Dou R., Guo Ch., Tang J., Li X., Chen J., Zhang J.: Cationic Polymers as Transfection Reagents for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics* [online]. **2023**, *15*(5), 1502. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics15051502

- [85] Porosk L., Nebogatova J., Härk H. H., Vunk B., Arukuusk P., Toots U., Ustav M., Langel Ü., Kurrikoff K.: Predicting Transiently Expressed Protein Yields: Comparison of Transfection Methods in CHO and HEK293. *Pharmaceutics* [online]. **2022**, **14**(9), 1949. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14091949
- [86] Chong Z. X., Yeap S. K., Ho W. Y.: Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* [online]. **2021**, **9**. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.11165
- [87] Scherman D.: Advanced Textbook On Gene Transfer, Gene Therapy And Genetic Pharmacology: Principles, Delivery And Pharmacological And Biomedical Applications Of Nucleotide-based Therapies. In: [online]. London, UK: Imperial College Press, **2014**. ISBN 978-1-84816-828-2. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=704492&site=ehost-live>
- [88] Joiner J., Huang Z., McHugh K., Stebbins M., Aron K., Borys M., Khetan A.: Process modeling of recombinant adeno-associated virus production in HEK293 cells. *Current Opinion in Chemical Engineering* [online]. **2022**, **36**, 100823. ISSN 2211-3398. Dostupné z: doi:10.1016/j.coche.2022.100823
- [89] Wein T., Dagan T.: Plasmid evolution. *Current Biology* [online]. **2020**, **30**(19), R1158–R1163. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2020.07.003
- [90] Durland R. H., Toukdarian A., Fang F., Helinski D. R.: Mutations in the trfA replication gene of the broad-host-range plasmid RK2 result in elevated plasmid copy numbers. *Journal of Bacteriology* [online]. **1990**, **172**(7), 3859–3867. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.172.7.3859-3867.1990
- [91] Gupta S., Yel L.: Molecular Biology and Genetic Engineering. In: *Middleton's Allergy* [online]. B.m.: Elsevier, **2014** [vid. 2024-08-10], s. 162–183. ISBN 978-0-323-08593-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-08593-9.00011-5
- [92] Johari Y. B., Scarrott Y. M., Pohle T. H., Liu P., Mayer A., J. Brown A. J., C. James D. C.: Engineering of the CMV promoter for controlled expression of recombinant genes in HEK293 cells. *Biotechnology Journal* [online]. **2022**, **17**(8), 2200062. ISSN 1860-7314. Dostupné z: doi:10.1002/biot.202200062
- [93] Abaandou L., Quan D., Shiloach J.: Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells* [online]. **2021**, **10**(7), 1667. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10071667
- [94] Heng Z., Yeo J. Y., Koh D. W.-S., Gan S., Ling W.-L.: Augmenting recombinant antibody production in HEK293E cells: optimizing transfection and culture parameters. *Antibody Therapeutics* [online]. **2022**, **5**(1), 30–41. ISSN 2516-4236. Dostupné z: doi:10.1093/abt/tbac003
- [95] Casper J., H. Schenk S. H., Parhizkar E., Detampel P., Dehshahri A., Huwyler J.: Polyethylenimine (PEI) in Gene Therapy: Current Status and Clinical Applications. *Journal of Controlled Release* [online]. **2023**, **362**, 667–691. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2023.09.001

- [96] Mahajan S., Tang T.: Polyethylenimine–DNA Nanoparticles under Endosomal Acidification and Implication to Gene Delivery. *Langmuir* [online]. **2022**, **38**(27), 8382–8397. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.2c00952
- [97] Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Göpferich A.: Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. **2005**, **60**(2), Selected papers of the 5th International Conference and Workshop on Cell Culture, 247–266. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2004.11.011
- [98] Hajifathaliha F., Mahboubi A., Nematollahi L., Mohit E., Bolourchian N.: Comparison of different cationic polymers efficacy in fabrication of alginate multilayer microcapsules. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **2020**, **15**(1), 95–103. ISSN 1818-0876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2018.11.007
- [99] Dai Z., Gjetting T., Matthebjerg M. A., Wu Ch., L. Andresen T. L.: Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI. *Biomaterials* [online]. **2011**, **32**(33), 8626–8634. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.044
- [100] Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G.: Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. **1999**, **45**(3), 268–275. ISSN 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990605)45:3<268::AID-JBM15>3.0.CO;2-Q
- [101] *ChemSketch* [online]. Toronto, ON, Kanada: Advanced Chemistry Development. Inc. (ACD/Labs). Dostupné z: www.acdlabs.com
- [102] Stücheli P., Sieber S., Fuchs D. W., Scheller L., Strittmatter T., Saxena P., Gademann K. a Fussenegger M.: Genetically encoded betaxanthin-based small-molecular fluorescent reporter for mammalian cells. *Nucleic Acids Research* [online]. **2020**, **48**(12), e67. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa342
- [103] Sharma U., Pal D., Prasad R.: Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [online]. **2014**, **29**(3), 269–278. ISSN 0974-0422. Dostupné z: doi:10.1007/s12291-013-0408-y
- [104] Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., Cullen B. R.: Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* [online]. **1988**, **66**(1), 1–10. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(88)90219-3
- [105] Yang T.-T., Sinai P., Kitts P. A., Kain S. R.: Quantification of Gene Expression with a Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System. *BioTechniques* [online]. **1997**, **23**(6), 1110–1114. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/97236pf01
- [106] Tabatabaai M. A., a Bremner J. M.: Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. **1969**, **1**(4), 301–307. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/0038-0717(69)90012-1

- [107] Hu Q., Zhou B., Dang P., Li L., Kong J., Zhang X.: Facile colorimetric assay of alkaline phosphatase activity using Fe(II)-phenanthroline reporter. *Analytica Chimica Acta* [online]. **2017**, **950**, 170–177. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.11.012
- [108] Shimomura O., Johnson F. H. a Saiga Y.: Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* [online]. **1962**, **59**(3), 223–239. ISSN 1553-0809. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.1030590302
- [109] Cody C. W., Prasher D. C., Westler W. M., Prendergast F. G., Ward W. W.: Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* [online]. **1993**, **32**(5), 1212–1218. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00056a003
- [110] Heim R., Prasher D. C., Tsien R. Y.: Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **1994**, **91**(26), 12501–12504. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.26.12501
- [111] Zhang G., Gurtu V., Kain S. R.: An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **1996**, **227**(3), 707–711. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1996.1573
- [112] Shibasaki Ch., Shimizu R., Kagotani Y., Ostermann A., Schrader T. E., Adachi M.: Direct Observation of the Protonation States in the Mutant Green Fluorescent Protein. *The Journal of Physical Chemistry Letters* [online]. **2020**, **11**(2), 492–496. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcllett.9b03252
- [113] Yang T.-J., Cheng L., R. Kain S. R.: Optimized Codon Usage and Chromophore Mutations Provide Enhanced Sensitivity with the Green Fluorescent Protein. *Nucleic Acids Research* [online]. **1996**, **24**(22), 4592–4593. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/24.22.4592
- [114] Schrödinger L., Delano W.: *The PyMOL Molecular Graphics System*. verze 3.0. Schrödinger, LLC,
- [115] Shibasaki Ch., Shimizu R., Kagotani Y., Ostermann A., Schrader T. E., Adachi M.: Direct Observation of the Protonation States in the Mutant Green Fluorescent Protein. *The Journal of Physical Chemistry Letters* [online]. **2020**, **11**(2), 492–496. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcllett.9b03252
- [116] Drobizhev M., Molina R. S., Callis P. R., Scott J. N., Lambert G., Salih A., Shaner N. C., Hughes T. E.: Local Electric Field Controls Fluorescence Quantum Yield of Red and Far-Red Fluorescent Proteins. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. **2021**, ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2021.633217
- [117] Bindels D. S., Haarbosch L., Van Weeren L., Postma M., Wiese K. E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M. A., Gadella T. W. J.: mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nature Methods* [online]. **2017**, **14**(1), 53–56. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.4074

- [118] McCulloch, Tyler W., David M. Maclean a Paul J. Kammermeier.: Comparing the performance of mScarlet-I, mRuby3, and mCherry as FRET acceptors for mNeonGreen. *PLoS ONE* [online]. **2020**, **15**(2), e0219886. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0219886
- [119] Bindels D. S., Haarbosch L., Van Weeren L., Postma M., Wiese K., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., A. Hink M. A. Gadella T.: mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nature Methods* [online]. **2017**, **14**(1), 53–56. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.4074
- [120] Poláchová E., Mgr.: *Optimalizace expresního systému HEK293 buněčné linie pomocí regulace buněčného cyklu a apoptózy*. Praha, **2014**. diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.
- [121] RNDr. Bláha J., Ph.D.: *Optimalizace rekombinantní exprese proteinů v HEK293 buněčné linii*. Praha, **2010**. bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.
- [122] Backliwal G., Hildinger M., Hasija V. a Wurm F.: High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. **2008**, **99**(3), 721–727. ISSN 1097-0290. Dostupné z: doi:10.1002/bit.21596
- [123] IBA LIFESCIENCES. *Protein production in MEXi-293E cells* [online]. **2023**. Dostupné z: https://www.iba-lifesciences.com/media/4c/7d/27/1689767346/Manual_MEXi-mammalian-expression.pdf
- [124] Brissault B., Antoine Kichler A., Guis Ch., Leborgne Ch., Danos, Cheradame H.: Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection. *Bioconjugate Chemistry* [online]. **2003**, **14**(3), 581–587. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc0200529
- [125] 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 Research* [online]. **2002**, **30**(2), E9. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/30.2.e9
- [126] Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsässer H. P., Kissel T.: A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research* [online]. **1999**, **16**(8), 1273–1279. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/a:1014861900478