

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Optimalizace transfekcí eukaryontních buněčných linií

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Bc. Iva Šplíchalová

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za výborné vedení a cenné rady při vypracovávání mé diplomové práce, RNDr. Lucii Škarydové, Ph.D. za připomínky k mé diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat Věře Dvořáčkové za pomoc při kultivaci buněčných linií a Mgr. Veronice Markusové za rady při tvorbě protokolů. Dík patří i mé rodině za trpělivost a psychickou podporu.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použila, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 14.5. 2014

Podpis:

Bc. Iva Šplíchalová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Iva Šplíchalová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace transfekcí eukaryontních buněčných linií

Optimalizace transfekce je proces, při kterém hledáme nejlepší podmínky pro transfekci. Tento proces předchází každé rutinní výrobě rekombinantních proteinů v laboratoři. Nejprve se volí expresní systémy, které by nejlépe vyhovovaly konkrétním požadavkům. Při výběru se musí zohlednit rychlost, ekonomičnost a funkčnost vzniklého rekombinantního proteinu, která může být ovlivněna posttranslačními modifikacemi expresních systémů. Pro vnášení cílových genů do expresních systémů se využívá expresních vektorů.

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro transfekci eukaryontních buněčných linií CHO PF a HEK293 za pomoci tří komerčně dostupných kitů. Po optimalizaci následovalo srovnání transfekční účinnosti s doposud používanými transfekčními postupy ve firmě Generi biotech s.r.o. Pro optimalizace byl použit plazmid pMaxGFP. Účinnost transfekce byla hodnocena pomocí Neubauerovy komůrky a kvantifikací GFP v buněčném lyzátu. Pro optimalizace byly použity komerčně dostupné kity Electroporation Solution, TansIT-293 Reagent a TransIT_PRO. Transfekční účinnosti těchto kitů byly následně porovnány s již zavedenými metodami, a to elektroporací v Ex-Cell ACF CHO kultivačním médiu a transfekcí pomocí Effectene.

Nejllepší transfekční účinnosti dosahovala elektroporace v Electroporation Solution, kde, po 48 hodinách byla účinnost vyšší 4 × než je tomu v případě elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu a 12 × vyšší ve srovnání s Effectene. S užitím Trans-293 Reagent je účinnost vyšší 3 × ve srovnání s elektroporací v Ex-Cell ACF CHO médiu. V porovnání s Effectene 9 × vyšší. Tyto dvě nově optimalizované metody budou zavedeny do laboratoře. Transfekce s TransIT_PRO kitem byla 0,3 × nižší než při užití elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu. Ve srovnání s Effectene je pak účinnost vyšší pouze 0,8 ×.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Iva Šplíchalová

Supervisor: RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.

External supervisor: Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

Title of Master thesis: Optimization of Transfection of Eukaryotic Cells

An optimization of a transfection is a process of searching for the best conditions for the transfection. Expression systems corresponding to concrete requirements are chosen first of all. A speed, an economy and a functionality of prepared recombinant protein that can be influenced by posttranslational modifications must be considered. Expression vectors are used to insert genes of the interest into expression systems.

The goal of this diploma thesis was to optimize conditions for transfection of eukaryotic cell lines CHO PF a HEK293 using of three commercially available kits. It was followed by a comparison of these transfection efficiency with standard procedures that are used in the company Generi Botech s.r.o. A plasmid pMaxGFP was used for the optimization. A cell counting in Neubauer's chamber and a quantification of GFP in cell lysate were used to evaluate the efficiency of the transfection. Commercially available kits Electroporation Solution, TansIT-293 Reagent and TransIT_PRO were used for the optimization. Later the transfection efficiencies of these kits were compared with formerly established methods of electroporation in Ex-Cell ACF CHO and with the transfection by Effectene.

The best transfection efficiency was reached in Electroporation Solution that was 4 times higher 48 hours later then in the case of the electroporation in Ex-Cell ACF CHO and 12 times higher compare to Effectene. The efficiency was 3 times higher using of Trans-293 Reagent compare to the electroporation in Ex-Cell ACF CHO and 9 times higher compare to Effectene. The transfection by TransIT_PRO kit was 0.3 times lower than the electroporation in Ex-Cell ACF CHO and 0.8 higher compare to Effectene.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Biotechnologie	7
2.2. Rekombinantní proteiny	8
2.3. Optimalizace produkce proteinů	9
2.4. Expresní systémy	10
2.4.1. Bakteriální expresní systémy	11
2.4.2. Kvasinkové expresní systémy	12
2.4.3. Rostlinné expresní systémy	12
2.4.4. Hmyzí expresní systémy	12
2.4.5. Buněčné linie	13
2.5. Kultivační média.....	18
2.6. Expresní vektory	19
2.6.1. Plazmidy.....	19
2.6.2. Bakteriofág λ	23
2.6.3. Kosmidy	23
2.6.4. Virové vektory	23
2.6.5. Kvasinkové arteficiální chromozomy.....	24
2.7. Transfekce.....	25
2.7.1. Metody transfekce	25
3. CÍLE PRÁCE	30
4. METODIKA.....	31
4.1. Materiál.....	31
4.2. Pracovní postupy	33
4.2.1. Rozmrazování buněk	33
4.2.2. Zamrazování buněk	34

4.2.3.	Pasážování buněk	34
4.2.4.	Kultivace buněk	35
4.2.5.	Počítání buněk	36
4.2.6.	Izolace plazmidu	37
4.2.7.	Určování účinnosti transfekce	37
4.2.8.	Optimalizace transfekce buněčných linií CHO PF a HEK293	39
4.2.9.	Doposud používané postupy ve firmě Generi biotech s.r.o.....	45
4.2.10.	Zpracování dat	47
5.	VÝSLEDKY.....	48
5.1.	Optimalizace Ingenio® Electroporation Solution.....	48
5.1.1.	Parametry elektroporace	48
5.1.2.	Počet buněk.....	50
5.1.3.	Výměna média a vliv kondiciovaného média	51
5.1.4.	Množství DNA	52
5.1.5.	Ideální podmínky pro transfekci CHO PF.....	53
5.2.	Optimalizace TransIT® 293 Transfection Reagent	54
5.2.1.	Doba inkubace transfekční směsi	54
5.2.2.	Poměr DNA:transfekční reagent	55
5.2.3.	Výměna média.....	56
5.2.4.	Počet buněk.....	57
5.2.5.	Vliv kondiciovaného média	58
5.2.6.	Ideální podmínky pro transfekci HEK293	59
5.3.	Optimalizace TransIT PRO® Transfection Kit	60
5.3.1.	Počet buněk a doba inkubace transfekční směsi	60
5.3.2.	Poměr Trans-IT PRO Reagens:Pro BOOST Reagens.....	62
	<i>Tab. 20. Poměr Trans-IT PRO Reagens:Pro BOOST Reagens.....</i>	63
5.3.3.	Výměna média.....	64

5.3.4.	Poměr DNA:transfekční reagens	65
5.3.5.	Kondiciované médium	66
5.3.6.	Ideální podmínky pro transfekci CHO PF.....	67
5.4.	Kvantifikace GFP v buněčném lyzátu a porovnání s doposud používanými metodami transfekce.....	68
6.	DISKUSE	70
7.	ZÁVĚR	75
8.	SEZNAM ZKRATEK A CIZÍCH NÁZVŮ	76
9.	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	77

1. ÚVOD

Revoluční objev učinili James Watson a Francis Crick roku 1953, kdy popsali strukturu DNA a následně popsali přepis DNA na RNA a její následný překlad na proteiny (Watson and Crick, 1953a; Watson and Crick, 1953b). Tento proces, který dnes nazýváme centrální dogma molekulární biologie, umožnil rozvoj mnoha nových technik a vědních disciplín. Ne nadarmo je tedy 20. století nazývané jako Století molekulární biologie. Zmínky o vnášení genetické informace z jedince do jedince, pochází taktéž z tohoto století a jsou založeny na poznacích, které uplatňují centrální dogma molekulární biologie. Podařilo se vnést virovou DNA do bakterie *E. coli* pomocí infekce bakteriofágem. (Macgregor and Poon, 2003). Sled událostí záhy nabral rychlý spád. To bylo základem intenzivního rozvoje biotechnologií. Začíná se využívat expresních systémů a vektorů pro objasnění mnoha pochodů, které se uskutečňují na buněčné úrovni. Dochází k vývoji nových a lepších expresních systémů a nástrojů potřebných pro vnášení genů do těchto systémů díky genovému inženýrství. Vznikají tak účinné nástroje pro tvorbu rekombinantních proteinů. Rozvíjí se nové metody, kterými bychom genetickou informaci vnesli do buněk nebo dokonce i do celého organismu. Pro ověření nově vzniklých systémů a metod se snažíme najít optimální podmínky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Biotechnologie

Za autora tohoto pojmu je považován zemědělský inženýr Károly Ereky, který roku 1917 pojmem biotechnologie nazval technologii, při které se využívají živé organismy k produkci různých molekul. V té době se tento pojem týkal pouze molekul využitelných v zemědělství (Kiss et al., 2010).

Ke změně chápání pojmu biotechnologie došlo v 50. letech 20. století, kdy vychází přelomová práce Watsona a Cricka popisující strukturu DNA a v letech 70. pak popis restričních endonukleáz, nástroje nezbytného pro práci se sekvencemi DNA (Meselson and Yuan, 1968; Smith and Wilcox, 1992). Díky těmto zásadním objevům byla vytvořena první rekombinantní DNA, kdy se Paulovi Bergovi podařilo do molekuly DNA viru SV40 vložit sekvenci DNA z *E. coli*, která nesla geny fága λ a galaktózový operon pomocí endonukleázy *E. coli* RI (Jackson et al., 1972). Paul Berg pak za své studium rekombinantní DNA obdržel roku 1980 Nobelovu cenu za chemii. Roku 1973 se pak podařilo do bakterie vložit plazmid s genem kódujícím rezistenci na antibiotikum (Cohen et al., 1973). Již v roce 1977 vychází první publikace zabývající se expresí rekombinantního proteinu a to peptidového hormonu somatostatinu (Itakura et al., 1977).

Za tu dobu prošla definice mnoha změnami a k tomuto pojmu se přidala spousta nových metod a postupů využívaných v molekulární biologii. Proto je dnes velmi obtížné definovat pojem biotechnologie. V definici tohoto pojmu panovala nejednoznačnost jak mezi akademickými pracovníky, tak mezi státy (Dahms, 2004). Proto v roce 2002 OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj) vytvořila sjednocenou definici biotechnologie. OECD pak definuje biotechnologii takto:

„The application of science and technology to living organisms as well as parts, products, and models thereof to alter living or nonliving materials for the production of knowledge, goods, and services (Anonym 1, 2014).“

Aplikace vědy a techniky na živé organismy a jejich části, produkty a modely pro přeměnu živých i neživých materiálů pro produkci poznatků, zboží a služeb.

Pod touto definicí se pak skrývá mnoho dalších pojmů, se kterými se v biologii můžeme setkat. Počínaje přípravou virových vektorů, přes genovou terapii a kultivací buněčných linií konče.

2.2. Rekombinantní proteiny

Rekombinantní proteiny jsou proteiny kódované rekombinantní DNA. Rekombinantní DNA je v dnešní době možné vytvořit spojením genových úseků získaných z různých zdrojů. Takto vytvořená molekula je schopná replikovat se v hostitelském organismu, který se nazývá expresní systém nebo se integruje do jeho chromozomu. V expresním systému se pak pomocí proteosyntetického aparátu exprimuje protein kódovaný rekombinantní DNA. Vzniklý protein se následně izoluje a purifikuje. Rekombinantní proteiny dnes z velké části nahradily proteiny, které se dříve izolovaly z živočišných tkání. Jako příklad může sloužit inzulin. Inzulin se dříve izoloval ze slinivky břišní prasat (Rosenfeld, 2002). Takto izolovaný protein se však lišil strukturálně v jedné aminokyselině od inzulinu lidského. Izolace proteinů z živočišných tkání s sebou nesla i rizika zavlečení infekčního onemocnění do těla pacienta nebo vznik imunitní reakce, pokud se protein používal pro terapeutické účely. Izolace z živočišných tkání byla nevýhodná i v tom, že pro izolaci je potřeba velké množství vstupního materiálu, abychom získali potřebné množství daného proteinu (Zwickl et al., 1995).

Při tvorbě rekombinantních proteinů tyto problémy většinou nehrozí. Proto biotechnologické postupy přípravy rekombinantních proteinů převažují nad izolací proteinů z živočišných tkání. Rekombinantní proteiny se pak používají při diagnostice a terapii onemocnění nebo ve výzkumu jejich struktury a funkce (Rabert et al., 2013).

2.3. Optimalizace produkce proteinů

Před každým rutinním zavedením a velkoobjemovou výrobou rekombinantních proteinů je nutné najít nejlepší podmínky pro transfekci a následnou produkci s co nejvyšší výtěžností s ohledem na ekonomické hledisko. Proces, při kterém takové podmínky hledáme, se nazývá optimalizace.

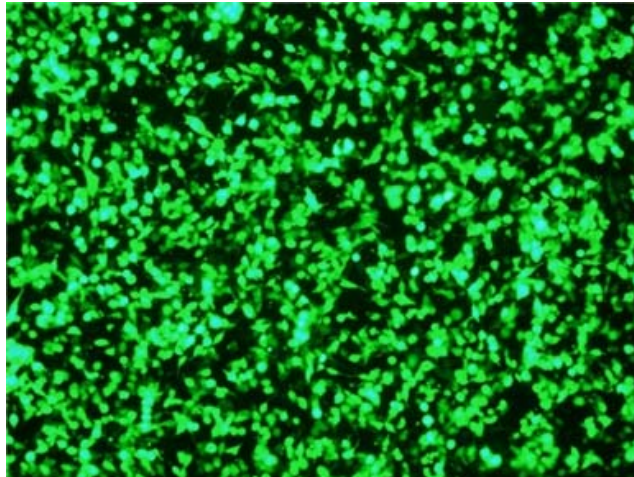
Optimalizace produkce v eukaryontních systémech zahrnuje mnoho kroků od výběru vhodné buněčné linie, vhodného transfekčního reagens a vektoru, najetí optimálních podmínek pro co nejúčinnější transfekci konče (Rose, 2003). Optimalizace se nejčastěji provádí na 96 jamkových destičkách. Je to proto, abychom mohli provést co nejvíce pokusů najednou, protože najít optimální podmínky může být velmi zdoluhavý proces.

Pokud používáme chemická transfekční reagens, měli bychom si uvědomit, že více reagens nutně neznamená vyšší produkci. Větší koncentrace chemických reagens často působí na buňky cytotoxicky (Synatschke et al., 2011). Pro chemické metody se optimalizuje počet buněk, množství DNA, poměr transfekčních reagens, čas, kdy reagens působí na buňky a další parametry (Sakurai et al., 2000). Pro každou buněčnou linii je nutné podmínky optimalizovat zvlášť, protože koncentrace chemických reagens, která byla pro jednu buněčnou linii cytotoxická, nemusí být toxická pro jinou linii (Salimzadeh et al., 2013).

Při optimalizaci se snažíme dodržet několik zásadních pravidel, díky kterým jsou data z jednotlivých měření mezi sebou porovnatelná. Buňky by se v době transfekce měly aktivně dělit a jejich životaschopnost (viabilita) by měla být co nejvyšší. Výrobci komerčních kitů doporučují pracovat s buňkami, které jsou pasážované 24 hodin před provedením transfekce a v den transfekce se viabilita buněk pohybuje okolo 90% (Daramola et al., 2014; Hunt et al., 2010).

Čistota plazmidové DNA se pro úspěšnou transfekci musí pohybovat v rozmezí 1,7–1,9 při poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm a měla by být endotoxinů prostá. DNA bez endotoxinů volíme proto, aby buňky nezačaly produkovat prozánětlivé cytokiny, které by mohly snížit účinnost transfekce (Budryk et al., 2001; Butash et al., 2000).

Pro monitorování účinnosti transfekce se používají reportérové geny kódující snadno kvantifikovatelné proteiny. Při optimalizacích se velmi často užívají sekretovaná alkalická fosfatáza, luciferáza nebo zelený fluorescenční protein (Igawa et al., 2014; Miller, 2014).



Obr. 1. Účinnost transfekce. CHO PF buněčná linie transfekovaná plazmidem pMaxGFP. Buňky, které zeleně fluoreskují se podařilo transfekovat tímto plazmidem.

2.4. Expresní systémy

Expresní systémy jsou prokaryontní, eukaryontní buňky nebo viry, ve kterých je možná exprese vloženého úseku nukleové kyseliny. Slouží k produkci rekombinantních proteinů. Při výběru expresního systému je dobré si rozmyslet, za jakým účelem do něj budeme geny vkládat. Musíme brát v úvahu rozdíly mezi expresí v prokaryontních a eukaryontních systémech, náročnost provedení a ekonomické hledisko.

2.4.1. Bakteriální expresní systémy

Doposud nejrozšířenější expresní systém je systém prokaryontní, kde se nejhojněji pracuje s gramnegativní bakterií *E. coli* nebo zástupci grampozitivních tyček rodu *Bacillus*. Bakterie rostou rychle ve velikých koncentracích a média potřebná pro jejich kultivaci jsou relativně levná. Díky expresi rekombinantních proteinů v bakteriích získáme poměrně vysoké množství produktu v relativně krátkém čase za nižší cenu, než je tomu u eukaryontních expresních systémů (Babaeipour et al., 2013; Porowinska et al., 2013).

Užití bakteriálních expresních systémů má však i svá negativa i přesto, že s jejich pomocí můžeme získat mnoho levného proteinu v krátkém časovém úseku. Produkovaný eukaryontní protein se liší svým prostorovým uspořádáním ve srovnání s přirozeným proteinem, což ve svém důsledku může znamenat pozměněnou až absentující biologickou aktivitu. To je způsobeno tím, že bakteriálním buňkám chybí posttranslační modifikace jak tomu je u eukaryontních buněčných systémů (Jeong et al., 2014). Druhá věc je, že velikost proteinu, který mohou prokaryontní buňky produkovat je omezená. Je možné získat protein do velikosti kolem 142 kDa (Berks et al., 2000). Další nevýhodou je to, že produkované rekombinantní proteiny mohou být toxické díky přítomnosti endotoxinu jako součásti bakteriální stěny gramnegativních bakterií použitých pro produkci rekombinantního proteinu. Proto je nutné jejich další zpracování, aby se odstranily endotoxiny bakterií, ve kterých byly proteiny produkovány. Endotoxiny by totiž mohly vyvolat zánětlivé reakce. Bakterie *E. coli* produkuje rekombinantní protein buď do cytosolu nebo do inkluzních tělísek (Mergulhao et al., 2005). Renaturace proteinu z těchto tělísek se nemusí vždy úplně podařit. Tento systém je vhodnější spíše pro jednodušší proteiny bez posttranslačních modifikací.

2.4.2. Kvasinkové expresní systémy

Nespornou výhodou kvasinkových expresních systémů oproti prokaryontním systémům je, že jsou schopné vzniklý produkt posttranslačně modifikovat. Lze v nich relativně bez problémů exprimovat proteiny, které jsou původně z eukaryot. Jejich kultivace není nijak náročná (Boer et al., 2007). Prvním nejvíce užívaným kvasinkovým expresním systémem byla kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Asi nejvýznamnějším rekombinantním proteinem získávaným za pomoci kvasinkového expresního systému je HBs antigen získávaný za účelem vakcinace proti hepatitidě B. Bohužel tato kvasinka má typ N-glykosylace, kdy ke vzniklému proteinu připojuje cukerné zbytky až 150 manóz vazbou α 1,3. Tato posttranslační modifikace nemusí vyhovovat vždy, protože v ojedinělých případech může být imunogenní. Dnes patří mezi nejvíce využívané kvasinkové expresní systémy kvasinka *Pichia pastoris* (Cregg et al., 2009). Tato kvasinka produkuje mnoho proteinu a je jí možné kultivovat ve vysokých koncentracích. Rekombinantní protein produkuje intracelulárně nebo do extracelulárního prostoru, pokud je ke genu pro rekombinantní protein připojen sekreční signál (Baumann et al., 2011).

2.4.3. Rostlinné expresní systémy

V poslední době se do popředí zájmu dostaly transgenní rostliny, které slouží k produkci rekombinantních proteinů (Santi et al., 2006). Rostlinné expresní systémy jsou eukaryontní buňky, dokáží tedy vzniklý protein posttranslačně modifikovat, což je nesporná výhoda oproti prokaryontním expresním systémům. Dále zde nehrozí riziko kontaminace patogeny, které se množí v živočišných buňkách (Daniell et al., 2001).

Hlavní omezení užití rostlinných expresních systémů je jejich velikost produkce, která dosahuje velmi malých výtěžků (Santi et al., 2006).

2.4.4. Hmyzí expresní systémy

Pro produkce v hmyzích systémech se nejčastěji užívá infekce pomocí rekombinantního bakulovirového expresního systému, který nese cílový gen. Jejich

kombinací dosahujeme vysokých výtěžků rozpustného glykosylovaného proteinu. Hlavní výhodou tohoto expresního systému je, že můžeme klonovat velké fragmenty cizorodé DNA.

2.4.5. Buněčné linie

Myšlenka na to, že by bylo možné kultivovat buňky *in vitro*, pochází již z 19 století. Společnost si však musela na potvrzení této myšlenky počkat ještě pár let až do roku 1912. V tomto roce se nositel Nobelovy ceny Alexis Carrel pokusil poprvé o to, co se mnoha lidem zdálo, jako nemožné. Do živného roztoku vložil buňky kuřecího srdce. Buňkám v živném roztoku se dařilo přežít velmi dlouho (Benveniste, 2013; Morris and Schirmer, 1990).

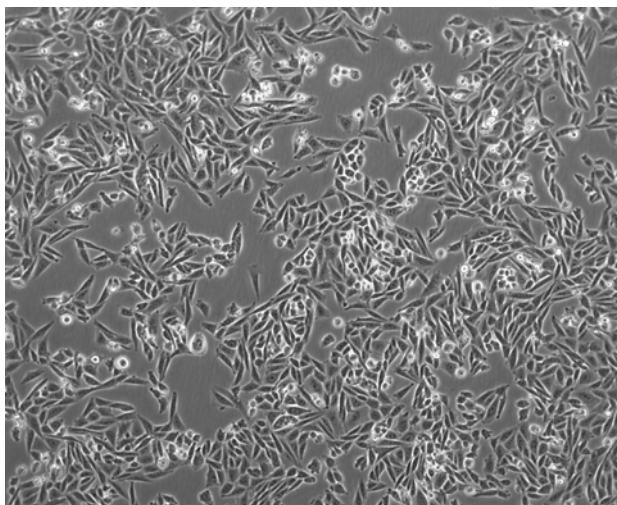
Buňky, které jsou schopné nepřetržitě růst a dělit se v *in vitro* podmínkách se nazývají buněčné linie. Založení nové buněčné linie je zdlouhavý proces, a proto dnes mnoho biotechnologických firem nabízí k zakoupení již připravené buněčné linie.

Zdroj buněk pro vytvoření buněčné linie může být laboratorní zvíře, člověk, hmyz nebo dokonce i rostliny (Ha et al., 2013; Thiel, 2014; Wagner et al., 2014; Zaniboni et al., 2014). Pro získání buněčné kultury nám někdy stačí pouze kousek tkáně umístěné ve vhodném kultivačním médiu, ze které buňky vyrůstají. Takovým postupem se nejčastěji získávají fibroblasty. Nevýhodou takového způsobu získávání buněčných linií je, že získáme směs buněk různých typů. Proto následně musíme buňky izolovat. Pro izolaci lze použít mnoho metod. Například přidáním selekčních médií podporujících růst požadovaných buněk a růst ostatních buněk zcela zastaví, buňky oddělíme pomocí centrifugace v hustotním gradientu nebo případně buňky limitně naředíme tak, aby jednotlivé buňky daly základ novým buněčným klonům tak, jak je to např. známé z hybridomové biotechnologie (Beghin et al., 2009; Rusu et al., 2005). První kulturu, kterou izolujeme z tkání, pak nazýváme primární kulturou nebo též primokulturou. Izolované buňky se nechají nějaký čas růst, aby se namnožily. Poté jsou buňky opakovaně pasážovány, tj. ředěny a přenášeny do nového média v nových kultivačních nádobách. Po první pasáži se již buněčná kultura nazývá sekundární kultura nebo také subkultura.

Buňky samozřejmě nejsou nesmrtelné. Zdravé buňky se mohou dělit v průměru 50-60 krát. Počet dělení pak závisí na typu buňky. Proto se využívá různých mechanismů, které naruší kontrolní mechanismy buněčného cyklu, jako tomu je u nádorových buněk nebo se buňky transformují viry. Díky tomu jsou pak buňky schopné dělit se neomezeně. Takové buňky se pak nazývají permanentní buněčné linie.

Většina buněčných linií roste přisedlá na kultivačním povrchu. Takové buňky se nazývají adherentní. K pěstování adherentních buněk se používají polystyrénové kultivační nádoby s upraveným povrchem, který je hydrofilní. Některým liniím stačí pouze taková drobná chemická úprava povrchu dna (či celé kultivační nádoby). Jiné, náročnější buňky na pěstování potřebují dno potažené látkami, jako jsou peptidy nebo adhezivní faktory, které usnadní a zlepší jejich adhezi.

Pro průmyslové účely je vhodnější práce se suspenzními buněčnými liniemi, které nerostou přisedlé na kultivační dno. Je možné u nich dosáhnout větší hustoty buněk.



Obr. 2. CHO buněčná linie. Adherentní buněčnou linii izolovanou z vaječnickú křečka čínského 15 hodin po pasáži (Anonym 2, 2014).

Savčí expresní systémy

Rekombinantní proteiny, které jsou produkovány v savčích expresních systémech, zcela změnil tvář moderní medicíny. Dnes je možné je využívat pro léčbu či oddálení onemocnění, která byla dříve velmi obtížně léčitelná, jako je například rakovina nebo neplodnost. Aby byly rekombinantní proteiny používané pro léčbu účinné, musí být biologicky aktivní a náležitě složené. K tomu poslouží posttranslační modifikace, které prokaryontní systémy nedokážou zajistit. Savčí buňky dokáží vzniklý protein glykosylovat, fosforylovat nebo třeba methylovat. Díky savčím expresním systémům můžeme získat funkční protein v gramech již za měsíc (Almo and Love, 2014). V biomedicíně se nejvíce užívají buněčné linie odvozené z lidských buněk nebo buněk hlodavců. Až 70% světové produkce rekombinantních proteinů je dnes produkováno v CHO buněčné linii (Reichert et al., 2004).

CHO PF

CHO PF (chinese hamster ovary-protein free) je buněčná linie odvozená z buněk ovarií křečka čínského, který byl poprvé použit jako laboratorní *in vivo* model v roce 1919 pro studium a typizaci *Streptococcus pneumoniae* (Kildegaard et al., 2013). Na počátku 20. let 19. století sloužil křeček čínský jako model pro epidemiologické studie leishmaniózy, protože tento hlodavec je vyhledávaným hostitelem prvoků z rodu *Leishmania*. S časem zájem o tohoto hlodavce vzrůstal, díky jeho malému počtu chromozomů, což ho učinilo velmi užitečným modelem pro studium vlivu radiace na savčí buňky a studium buněčných kultur. V roce 1957 doktor Theodore Puck poprvé izoloval a ustanovil buněčnou linii z vaječnicků samičky křečka čínského. Podařilo se mu získat linii, která byla velmi rezistentní, s krátkým biologickým poločasem a vhodná pro kultivaci *in vitro*. Linie se začala používat pro studium metabolických drah nebo pro toxikologické studie (Kildegaard et al., 2013).

Vědci si po čase všimli, že náhodně zmutované buňky mají lepší životaschopnost a lze je pasážovat vícekrát, než zdravé buňky. Proto tyto mutované jedince izolovali a vytvořili tak pilíř pro CHO buněčné linie vhodné pro produkci rekombinantních proteinů (Puck and Kao, 1967). Tyto buňky měly deficity v syntéze enzymů jako je

dihydrofolátreduktáza nebo adenylfosforibosyltransferáza (Taylor et al., 1977; Urlaub and Chasin, 1980).

Díky své přizpůsobivosti a snadné kultivaci získávala CHO buněčná linie více a více na své oblibě. Využívaly se a do dnes využívají pro studium receptorů, signalizačních drah spřažených s G-proteiny, adhezi, cytoskeletární struktury a pro studium buněčného cyklu (Figler et al., 2003; Fiore et al., 2002; Hari et al., 2003; Yu et al., 2003).

Při výběru vhodné buněčné linie pro produkci proteinů, určených pro léčebné účely pacientů je velmi důležité, aby se v těchto liniích nemohly množit patogeny, které jsou přenosné na člověka. Již v roce 1989 bylo prokázáno, že v CHO buňkách se nedokáží replikovat viry HIV, pásového oparu chřipky, spalničky a dalších patogenů přenosných na člověka. To z CHO buněčné linie činí nejhojněji užívanou linii pro produkci rekombinantních proteinů určených pro terapii. Dalším faktorem díky, kterému jsou CHO buňky vhodné pro produkce terapeutických proteinů je snadná genová manipulace a jejich schopnost růst ve vysokých koncentracích v suspenzi, což je skvělé pro velkoobjemovou kultivaci v bioreaktorech. Nespornou výhodou klonů deficientních v enzymu dihydrofolátreduktázy je, dramatické zvýšení produkce rekombinantních proteinů. Dihydrofolátreduktáza je enzym, který katalyzuje přeměnu kyseliny listové na tetrahydrofolát. Tetrahydrofolát je kofaktor důležitý při syntéze mnoha biosyntetických drah jako je například syntéza tymidinu, purinu a glycinu. Do takto deficientních buněk je možné vnést gen pro rekombinantní protein spolu s funkční kopíí genu pro dihydrofolátreduktázu. Pokud se do buněk podaří transfekovat tyto geny, dochází k překlada genu na enzym. Buňka pak nepotřebuje získávat tymidin, puriny ani glycin z kultivačního média, ale dokáže si je syntetizovat sama. Buňky, které se podařilo transfekovat je možné selektovat pomocí média bez glycinu, hypoxantinu a thymidinu. Buňky bez dihydrofolátreduktázy v takovém médiu umírají a buňky, do kterých se podařilo transfekovat geny pro rekombinantní protein spolu s genem pro dihydrofolátreduktázu v takovém médiu přežívají (Wurm, 2004).

První rekombinantní protein vyprodukovaný savčí buněčnou linií CHO byl aktivátor plazminogenu v roce 1987. Dnes je tato savčí linie nejvíce využívaná pro produkci rekombinantních proteinů určených pro terapii. Nejčastěji se jedná o produkce

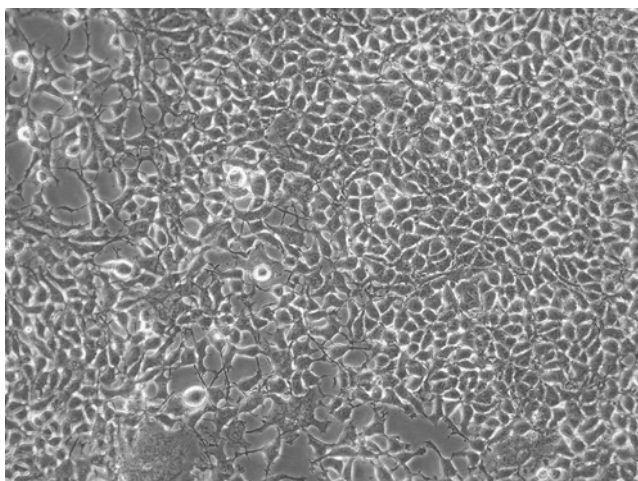
erythropoetinu a tkáňového aktivátoru plazminogenu (Gaffney and Curtis, 1985; Goh et al., 2014; Rahimpour et al., 2013).

HEK293

HEK293 (*Human embryonal kidney*) je suspenzní buněčná linie, která je odvozená z lidských embryonálních buněk ledvin, upravená pomocí 5 adenovirových genů. Buněčná linie byla poprvé připravena v laboratořích Alexe Van der Eba v Leidenu v Holandsku roku 1970. Název HEK, vychází z jejich původu, číslo 293 značí 293. experiment s touto buněčnou linií (Graham et al., 1977).

Tyto buňky jsou charakteristické tím, že mají vlastnosti skoro všech buněk v lidském těle. V této buněčné linii se například vyskytuje více jak 60 genů typických pro nervové buňky, díky kterým, jsou v HEK293 buněčné linii přítomny některá neurofilamenta a neuroreceptory (Shaw et al., 2002; Thomas and Smart, 2005). V současné době se proto diskutuje o tom, že jejich původ vychází z neuronálních buněk (Shaw et al., 2002).

Využití této buněčné linie je rozsáhlé díky jejím signalizačním drahám, endogenním receptorům, snadné kultivaci a v neposlední řadě i relativně nízké ceně. Díky těmto vlastnostem se linie hojně využívá již od počátku jejího vzniku, jako expresní systém pro produkci rekombinantních protilátek a proteinů (Jager et al., 2013; Thomas and Smart, 2005). Další možnost jejího využití je ve farmaceutickém průmyslu, kde se studuje účinek léčiv na sodné kanály a na jejich metabolismus (Apaolaza et al., 2014; Fredj et al., 2006; Olajide et al., 2014; Thomas and Smart, 2005; Zoidis et al., 2014).



Obr. 3. HEK293. Buněčná linie HEK293 odvozená z lidských embryonálních buněk ledvin. Je pro ni typický růst ve shlucích (Anonym 3, 2014).

2.5. Kultivační média

Kultivační média jsou roztoky, ve kterých se buněčné kultury pěstují *in vitro*. Svým složením se snaží co nejvíce přiblížit podmínkám, které vyhovovaly buňkám *in vivo*.

Většinu buněčných kultur se nejlépe daří při pH okolo 7.4 (Bradley et al., 2014; Kallel et al., 2002; Qu et al., 2014).

Buňky jsou velmi citlivé na výkyvy pH, proto se do medií přidává barevný indikátor, abychom mohli sledovat stav buněk. Mezi nejpoužívanější bezesporu patří fenolová červeň (Berthois et al., 1986). Při pH 7.4 má potom médium červenou barvu. Při kultivaci se pH může stávat kyselějším, kdy začíná žloutnout, nebo alkaličtějším, pak mění svojí barvu do růžova. K okyselování média dochází po několika dnech, kdy buňky vylučují do média kyselé produkty metabolismu jako je například laktát. Proto musíme médium vyměňovat až třikrát týdně, aby buňky měly dostatek potřebných živin pro svůj růst (Wurm, 2004). Média obsahují zdroj energie jako je například glukóza, dále pak anorganické látky, pufrы, vitamíny růstové faktory, mastné kyseliny a stopové prvky. Mnoho těchto látek se do média dostává díky přidavku séra. Nejčastěji se používá 10% fetální bovinní sérum nebo dokonce již i sérum lidské (Aghayan et al.,

2012; Wu et al., 2013). Do kultivačních médií se velmi často přidávají antibiotika, která zabrání nežádoucí kontaminaci.

Dnes se většina velkoobjemových produkcí rekombinantních proteinů provádí v médiích bez přídavku séra, protože zde stále hrozí kontaminace priony nebo viry z přidaného séra (Wurm, 2004).

2.6. Expresní vektory

Vektory slouží k přenosu a udržení cizí DNA v hostitelské buňce. Poté usnadní selekci nebo detekci buněk, do kterých se rekombinantní DNA transformovala. Vektory jsou klonovací nebo expresní. Expresní vektor slouží k přenosu genu a jeho následné expresi v hostitelské buňce (Lu et al., 2014). Expresní vektory se vyznačují tím, že mají silný promotor. Promotor je sekvence, která usnadní vazbu RNA-polymerázy. Takový promotor, se nachází u klonovacího místa a je situován proti směru transkripce. Pokud přenášíme genetickou informaci pomocí virového vektoru, jedná se o transdukcii (Guo et al., 2013). Proces, při kterém vkládáme nukleovou kyselinu do prokaryontních buněk bez použití virových vektorů, se nazývá transformace (Clewell et al., 2014). Transfekce jsou pak metody, kterými vkládáme nukleové kyseliny nebo proteiny do eukaryontních buněk s použitím jiného než virového vektoru (Alvin and Ye, 2014).

2.6.1. Plazmidy

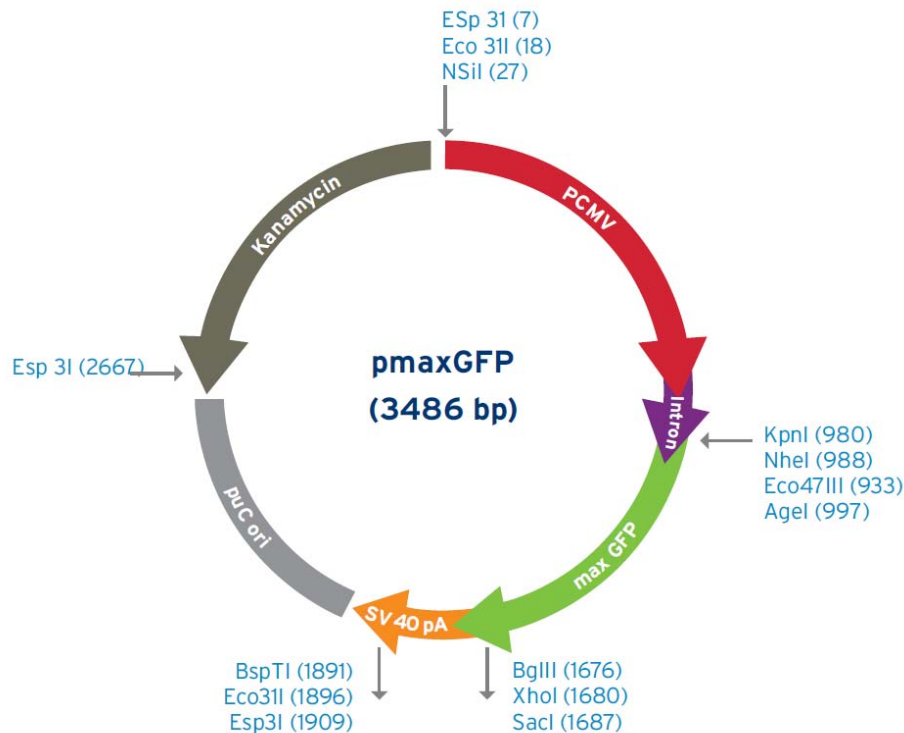
Plazmidy se vyskytují u prokaryontních organismů. Jsou to malé cirkulární molekuly DNA, které v prokaryontní buňce zastávají řadu funkcí. Jejich velikost se pohybuje od 1 do 300 kbp. Tyto molekuly mohou ve struktuře například nést geny kódující přenos rezistence na antibiotika nebo umožňující fixaci vzdušného dusíku důležitého pro metabolické pochody některých buněk. Nejbohatší plazmidovou výbavu, kterou lze užít, jako expresní vektor nalezneme v bakterii *Escherichia coli*, kde jej lze s úspěchem i namnožit (Lu et al., 2014).

Izolovaná DNA z donora, v našem případě z bakterie *Escherichia coli* se nejprve fragmentuje. Konce těchto fragmentů se vhodně upraví pro rekombinaci s vhodným vektorem. Spojením izolované cizorodé DNA s vektorem pak vzniká rekombinantní DNA, kterou je už možné vložit do dané buňky.

Aby bylo možné plazmid použít jako transfekční vektor, který zajistí expresi vloženého genu, je nutné, aby ve své struktuře obsahoval určité důležité sekvence. Polylinker nebo též multiple cloning site (MCS) je krátké místo v sekvenci plazmidu. V tomto místě je možné štěpit plazmid pomocí restričních endonukleáz a vložit sem gen, který chceme v dané buňce exprimovat. Po štěpení plazmidu dochází k jeho linearizaci.

Do linearizovaného plazmidu je možné vložit inzerť pomocí enzymu T4 DNA ligázy, která katalyzuje vznik fosfodiesterových vazeb mezi inzertem a plazmidem (Lohman et al., 2011). Následně dochází k opětovné cirkulaci plazmidu. V blízkosti polylinkeru je silný promotor a introny, které zvyšují expresi vloženého genu. Nejčastěji se jedná o promotor virového původu například CMV (Cytomegalovirus) (Kirsch et al., 2003). Na promotor pak nasedají transkripční faktory. Ve vektoru plazmidového typu nesmí chybět Kozakova sekvence, která zajistí translaci vloženého genu na ribosomu a počátek replikace ori (origin of replication). Nedílnou součástí plazmidu je také sekvence zvaná terminátor spolu s polyadenylačním signálem, která ukončí translaci. Plazmidy navržené za účelem tvorby rekombinantních proteinů navíc obsahují sekvenci, která kóduje rezistenci na antibiotikum pro případnou selekci transfekovaných klonů. Jedná se například o geny kódující rezistenci na ampicilin nebo geneticin (Chen et al., 2012; Kirsch et al., 2003; Yari et al., 2013).

Pokud je nutné optimalizovat celý proces transfekce, tak se používají plazmidy s geny pro reportérové systémy, díky kterým lze vizuálně a nedestruktivně hodnotit účinnost transfekce. Nejčastěji se jedná o geny kódující luciferázu nebo GFP (Benns et al., 2001; Huang et al., 2013; Routledge, 2012; Siedl et al., 2012).



Obr. 4. Struktura plazmidu pMaxGFP. Na mapě plazmidu od shora vidíme místo, které kóduje rezistenci na antibiotikum (Kanamycin), počátek replikace (puC ori), promotor (SV 40pA), sekvenci kódující GFP (max GFP), intron a promotor z cytomegaloviru (PCMV) (Anonym 4, 2014).

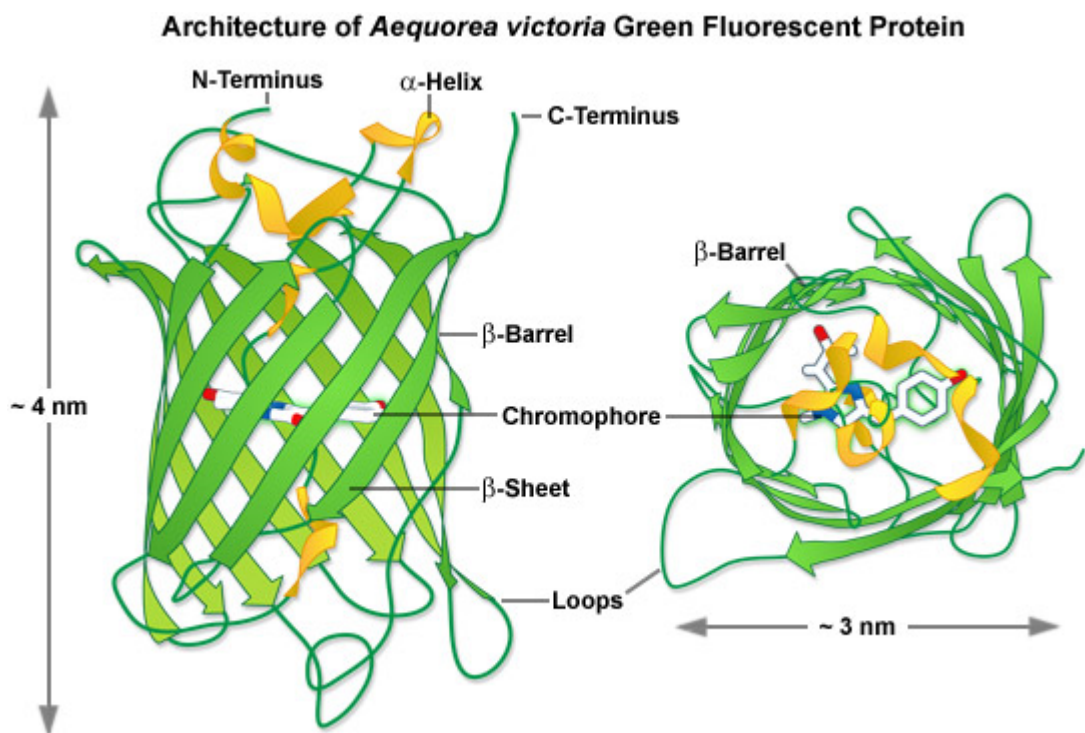
2.6.1.1. GFP

GFP (*Green fluorescent protein*) je zelený fluorescenční protein z medúzy *Aequorea victoria*. Tento fluoreskující protein objevil a poprvé izoloval profesor Osamu Shimomura v roce 1961 (Shimomura, 2009). Pokud je tento protein vystaven modrému excitačnímu světlu s excitačním maximem 475 nm, tak zeleně fluoreskuje, protože má emisní maximum při 508 nm (Wang et al., 2002).

GFP je nevelký protein složený z 238 aminokyselin o molekulové hmotnosti 26.9 kDa (Izadi et al., 2009). GFP má strukturu β -soudku složeného z 11 β -listů. Uvnitř soudku je α -šroubovice, která nese vlastní fluorofor (Li et al., 1997). Protein má řadu využití. Pomocí fluorescenčního mikroskopu lze posoudit, zda jsou rekombinantní buňky

exprimující GFP živé, průběh apoptických dějů nebo lze s jeho pomocí studovat receptory spřažené s G proteiny a v neposlední řadě slouží k hodnocení účinnosti transfekce eukaryontních buněčných linií (Avalos, I et al., 2013; Izadi et al., 2009; Lant and Derry, 2014; Salimzadeh et al., 2013; Ye et al., 2014).

Cílenými genetickými úpravami GFP vznikly nové reportérové proteiny s posunutým excitačním a emisním spekterem do jiných vlnových délek. Dnes je možné využívat žlutý fluorescenční protein YFP (yellow fluorescent protein), modrý fluorescenční protein CFP (cyan fluorescent protein) a jiné (Dyachok et al., 2014; Liu et al., 2011). Stejně jako GFP lze i ostatní fluorescenční proteiny detekovat pomocí fluorescenčního mikroskopu, fluorimetrie nebo fluorescenční průtokové cytometrie (Salimzadeh et al., 2013).



Obr. 5. Struktura GFP. Na levé straně je pohled z boku. Napravo je pohled shora.

N-konec (N-Terminus), α -helikální struktura (α -Helix), C-konec (C-Terminus), β -souděk (β -Barrel) složený z β -listů (β -Sheet), smyčky (Loops). Uvnitř β -soudku je chromofor (chromophore) zodpovědný za fluorescenci (Anonym 5, 2014).

2.6.2. Bakteriofág λ

Bakteriofág λ je virus, který infikuje bakterie. Jeho genom je dvouřetězcová DNA, která ve své molekule obsahuje místa, která nejsou nezbytná pro lytickou fázi fága. Do těchto míst je možné vložit cizorodou DNA. Přenáší se ve virových částicích jako lineární molekula s přesahujícími kohezními konci. Po vniknutí do hostitelské buňky molekula cirkuluje a vlastní přepis pak nastává z cirkulární molekuly. Do buněk ho lze vnést infekcí a využít tak jeho replikačního cyklu nebo pomocí transdukce. Transdukce však dosahuje nižší účinnosti než infekce. (Broussard and Hatfull, 2013; Marinus and Poteete, 2013).

2.6.3. Kosmidy

Kosmidy jsou plazmidy, ve kterých je *cos* sekvence z bakteriofága λ . Její kohezivní konce *cos* sekvencí jsou spojené a tak je celá molekula cirkulární.

Po transfekci do buněk se replikuje pouze jako plazmid. Neobsahuje celý genom bakteriofága λ a proto neprochází lytickým cyklem, jako fág. Pomocí kosmidů je do buněk možné vpravit větší fragmenty nukleových kyselin do velikosti 40 kbp (Cheng et al., 2014).

2.6.4. Virové vektory

Viry jsou parazitické nebuněčné organismy bez vlastního proteosyntetického aparátu. Ke své replikaci potřebují hostitelskou buňku. Viry používané v genovém inženýrství jsou zbaveny své infekčnosti, mají však zachovanou schopnost proniknout do buňky a pomnožit se v ní. Nejužívanější vektory jsou obalné RNA viry (retroviry) určené k transfekci eukaryontních buněk. Za pomoci enzymu reverzní transkriptázy přepíší svou RNA do DNA, kterou posléze včlení do genomu hostitelské buňky. Tyto vektory nesou pouze sekvence nezbytně nutné pro včlenění RNA transkriptu do virionu, integraci do buněčného genomu a expresi vloženého genu. Díky sekvenci, která kóduje velmi silný promotor LTR (long terminal repeats), je možné dosahovat

velmi vysoké transfekční účinnosti (Doh et al., 2014). Do retroviru je možné včlenit cizorodou sekvenci o velikosti 8-10 kbp. Většinou je závislý na pomocných virech, které nesou ostatní sekvence nezbytné pro účinnou replikaci. Retrovirové vektory se mimo jiné užívají k vyvíjení antivirotik a pro genovou terapii (Bogoslovskaja et al., 2012; Misra, 2013).

Velké DNA viry rodu Baculovirus se používají pro infekci hmyzích buněk. Nejčasteji se jedná o buňky z larvy motýlů a můr rodu *Lepidoptera* (Clem and Passarelli, 2013; Grady et al., 2014).

Užitím virových vektorů lze dosahovat nejvyšší účinnosti. Virové vektory mají svá omezení a tím jsou velikost cizorodé DNA, kterou dokáží pojmout a nemusí být vždy biologicky bezpečné (Kay et al., 2001).

2.6.5. Kvasinkové arteficiální chromozomy

Tyto chromozomy jsou vytvořené uměle pomocí genového inženýrství. Slouží ke klonování rekombinantních DNA molekul v kvasinkových expresních systémech. Některé geny není možné vkládat do plazmidů nebo jiných expresních vektorů, protože mají rozlehlé regulační oblasti a výše zmíněné expresní vektory dokáží pojmout pouze menší úseky DNA. Oproti tomu kvasinkové arteficiální chromozomy dokáží pojmout molekuly DNA až do velikosti 600 kbp, což je jejich obrovská výhoda (Noskov et al., 2011). Tyto poměrně nové vektory se z velké části používají pro mapování a sekvenování genomu (Casper et al., 2012).

Úsek DNA, který chceme klonovat, se nejprve musí linearizovat a následně se vloží do kvasinkového chromozomu, kde je ohraničený telomerázami z obou stran. Vzniklý chromozom pak obsahuje centromeru, telomery a kvasinkové markery autonomně replikující se sekvenci z kvasinek. Po vložení do kvasinkového systému jsou tyto chromozomy stabilní stejně, jako chromozomy, které se v nich normálně vyskytují (Noskov et al., 2011).

2.7. Transfekce

Transfekcí se označují metody přenosu DNA do eukaryontních buněk. Touto metodou vzniká z eukaryontní buňky geneticky modifikovaný organismus. Transfekci můžeme provádět *in vivo*, tedy s použitím živého organismu. Toho se využívá zejména pro genovou terapii. Pokud se transfekce provádí *in vitro*, znamená to, že se provádí za laboratorních podmínek. Transfekce lze provádět jako stabilní nebo přechodné (tranzientní), výběr pak záleží na účelu, za jakým chceme přenos DNA do buňky uskutečnit. Provádíme-li stabilní transfekci začleňuje se přenášený gen do chromozomální DNA hostitelské buňky. Následně dochází k tvorbě stabilní buněčné linie, která má ve svém genomu začleněný vložený gen, který se replikuje spolu s buněčným genomem. Tvorba takové stabilně transfekované buněčné linie je velmi náročná jak po finanční stránce, tak po stránce časové (Baldi et al., 2007; Liu et al., 2008). Stabilně transfekované buněčné linie využívají zejména farmaceutické společnosti, které kontinuálně vyrábí rekombinantní proteiny určené pro terapeutické účely (Baldi et al., 2007).

Protikladem k stabilní transfekci je přechodná (transientní) transfekce. Při transientní transfekci se cizorodá molekula DNA dostane do hostitelské buňky, ale nezačlení se do jejího jaderného genomu. Při mitóze buňky se vnesená DNA nepředává z mateřské buňky do dceřiné, proto je produkce rekombinantních proteinů časově omezená. Výhody této metody spočívají v tom, že je možné produkovat rekombinantní proteiny mnohem rychleji, než při stabilní transfekci nevýhoda je ta, že protein je možné produkovat pouze nějaký čas a nelze tedy vytvořit buněčnou linii, která by neustále produkovala požadovaný protein (Wright et al., 2003).

2.7.1. Metody transfekce

Metod a reagensů pro transfekci je nepřehledné množství. Rozdělit je do jednotlivých skupin je velmi složité, což je vidět i ve studijní literatuře, kdy například užití viru pro vnesení do genů do buněk zařazujeme jak mezi vektory, tak mezi biologické metody transfekce. Metody transfekce by se v zásadě daly rozdělit do tří

skupin. Na fyzikální, dále pak metody chemické a na konec metody biochemické. Výběr metody závisí na tom, za jakým účelem chceme buňky transfekovat a také na typu transfekovaných buněk.

Elektroporace

Elektroporace patří mezi fyzikální metody přenosu molekul do buněk, která dosahuje nejvyšší efektivity (Gehl, 2003; Venslauskas et al., 2010; Xie and Tsong, 1993). Nesporná výhoda této metody spočívá v tom, že je možné ji provádět bez užití chemických činidel, která by mohla způsobit změny v expresi vložených genů (Fedorov et al., 2005; Garcia-Sanchez et al., 2014). Je možné ji aplikovat skoro na všechny buněčné typy, do kterých lze tímto způsobem doručit jak mikro tak makromolekuly. Je to jedna z mála metod, kterou lze účinně transfekovat i primokultury (Andre and Mir, 2004; Cegovnik and Novakovic, 2004; Jordan et al., 2008; Li et al., 2013). Používá se jak pro stabilní tak pro transientní transfekci (Barker et al., 2009; Yao et al., 2010).

Elektroporace se provádí v květách k tomu určených, kde na buňky působí krátké elektrické pulsy v μs - ms o vysokém napětí řádově v kV/cm (Kotnik et al., 2010). Působením elektrického pole na plazmatickou membránu dochází k zvýšení její permeability a reverzibilnímu otevření iontových kanálů. Otevřenými kanály mohou do buňky snáze vstupovat molekuly RNA, DNA nebo dokonce proteiny (Escoffre et al., 2009; Huang et al., 2011; Sustarsic et al., 2014). Jakmile elektrické pole přestane působit na plazmatickou membránu, dochází samovolně k uzavírání iontových kanálů a permeabilita membrány se vrací do původního stavu.

Účinnost transfekce lze velmi ovlivnit změnou teploty, při které celý proces provádíme. Při vyšších teplotách má buněčná membrána fluidnější charakter, než při nižších teplotách. Při teplotě blízké $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se membrána buněk stane více uspořádanou. Proto je vhodnější při elektroporaci pokud ochladíme jak elektroporační plato, tak elektroporační pufr. Při nižších teplotách se iontové kanály uzavírají pomaleji (Kanduser et al., 2008). Díky tomu získá molekula DNA více času na vstup do buňky, než by tomu bylo při vyšších teplotách. Při nižších teplotách je však nutné užít vyššího

napětí pro dostatečné otevření iontových kanálů, což může být nevýhodné při zotavování buněk po elektroporaci (Gallo et al., 2002).

Většina dnešních zařízení pro elektroporaci je navržena pro transfekci suspenzních buněk, které slouží pro produkci rekombinantních proteinů. V poslední době s rozvojem terapie různých onemocnění pomocí elektroporace se začíná pracovat na vývoji elektroporačních zařízení vhodných pro transfekci adherentních buněk, které svým tvarem a vlastnostmi více připomínají organizaci buněk v lidských tkáních. Ty pak mohou posloužit lépe jako model pro studium účinku léčby onemocnění s užitím elektroporace lépe, než buňky suspenzní (Garcia-Sanchez et al., 2014). Elektroporace by pak mohla být využívána pro léčbu nádorových onemocnění v podobě elektrochemoterapie (Campana et al., 2014a; Campana et al., 2014b; Seccia et al., 2014).

Lipofekce

Lipofekce patří mezi biochemické metody. Pro přenos DNA i RNA do buněk se využívá kladně nabitých syntetických lipidů (Kedika and Patri, 2014; McLenachan et al., 2013). Metodu poprvé popsal Felger roku 1987. Felger použil syntetický lipid s kladným nábojem N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorid (DOTMA). Celá metoda je nenáročná na provedení. Je vhodná pro trvalou i dočasnou transfekci DNA do buněčného jádra. Záporně nabitá molekula DNA se sbalí do umělých lipidových micel spontánně díky přítomnosti kladného náboje na syntetickém lipidovém monomeru. Vzniklý kladně nabitý lipidový komplex je přitahovaný buněčnou membránou a endocytózou se dostane do buňky (Felgner et al., 1987). O mechanismu, jakým se cizorodá DNA včlení do jaderného genomu, toho zatím moc nevíme. Lipofekce v mnoha případech dosahuje nižší účinnosti než elektroporace nebo transdukce (Jordan et al., 2008; Li et al., 2013). Navíc syntetické lipidy v mnoha případech působí na buňky cytotoxicky (Kedika and Patri, 2014; Nguyen et al., 2007).

Dnes jsou na trhu komerční kity určené pro transfekci pomocí záporně nabitých lipidů. Například Effectene (Qiagen) nebo Lipofectamine® (Life Technologies).

Pro provádění transfekce *in vivo* není vhodná metoda, kdy používáme kladně nabitě syntetické lipidy. Je to z velké části způsobeno tím, že doposud nevíme, jakým způsobem se DNA dostane do jádra a syntetické lipidy působí v mnoha případech na buňky cytotoxicky (Parvizi et al., 2014).

Chemické metody

Chemické metody transfekce můžeme rozdělit podle toho, do jaké skupiny chemických látek reakční činidlo patří a to na anorganické látky a kladně nabitě polymery. Jako zástupce anorganických látek můžeme jmenovat fosforečnan vápenatý.

Precipitace DNA pomocí fosforečnanu vápenatého je poměrně levná metoda, kterou můžeme použít pro obtížně transfekovatelné buňky, jako jsou například primokultury neuronálních buněk (Sun et al., 2013). K provedení se používá fosfátový pufr obsahující 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonovou kyselinu (HEPES) v jehož přítomnosti se DNA srazí s fosforečnanem vápenatým. Vzniklý komplex pak přilne na buněčnou membránu. Vstup komplexu do buňky můžeme usnadnit aplikací ultrazvuku o nízké intenzitě vlnění (Hassan et al., 2012). Metoda klade veliké nároky na čistotu DNA a na přesnost.

Zástupců kladně nabitých polymerů pro přenos DNA do buňky je hned několik. Patří mezi ně například diethylaminoethyl-dextran (DEAE) nebo polyethylenimin (PEI).

Metoda, kdy používáme DEAE-dextran je vhodná pouze pro transienční transfekci (Onishi et al., 2007). Jedná se o sloučeninu, která je z uvedených transfekčních postupů a reagensů nejstarší. Kladně nabitý DEAE-dextran se váže se záporně nabitou molekulou DNA. Tato vazba může být umocněna změnou pH nebo iontové síly prostředí, ve kterém transfekci provádíme (Eshita et al., 2009). Vzniklý kladně nabitý komplex se váže na záporně nabitou plazmatickou membránu buněk. Celé provedení je snadné a rychlé (Gulick, 2003).

PEI je vysokomolekulární kladně nabitý polymer vhodný pro transfekce *in vivo* a *in vitro*. Pro účely transfekce se užívá jak lineární tak jeho rozvětvená forma. Jejich velikost se pohybuje mezi 5-25 kDa. (Jere et al., 2009; Neu et al., 2005). Větší polymery se nepoužívají, protože se srážejí na plazmatické membráně a způsobí tak nekrózu

buněk (Fischer et al., 1999). DNA se sbalí do molekul PEI hlavně díky elektrostatickým interakcím a přejde přes plazmatickou membránu. Obal z polymeru chrání DNA před rozštěpením nukleázami (Duguid and Bloomfield, 1996; Fischer et al., 2003). Formování molekul DNA/PEI zlepšíme, pokud zvýšíme iontovou sílu prostředí, ve které transfekci provádíme. Proto se do reakční směsi často přidávají sloučeniny jako chlorid sodný nebo fosfátový pufr (Hartikka et al., 2000).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem práce byla optimalizovat transfekci vybraných eukaryotních linií. Pro tyto účely byly vybrány dvě buněčné linie CHO PF a HEK293. Cíl lze rozčlenit na několik dílčích částí:

- Optimalizovat účinnost transfekce 3 komerčně dodávaných transfekčních kitů na transfekci buněčných linií CHO PF a HEK 293. Pro tento účel byly vybrány kity Ingenio® Electroporation Solution, TransIT® 293 Transfection Reagent a TransIT-PRO® Transfection Kit.
- Porovnat účinnost transfekce testovaných kitů postupy dosud běžně používanými ve firmě Generi biotech s.r.o. pro CHO PF buněčnou linii a sice Effectene Transfection Reagent a elektroporací v EX-CELL ACF CHO médiu.
- Vyhodnotit, která metoda je nejefektivnější a navrhnout postup, který by vedl k co nejefektivnější transfekci rekombinantní DNA do vybraných buněčných linií a tedy ke zvýšení výtěžku rekombinantních proteinů.

4. METODIKA

4.1. Materiál

Buněčné linie

- CHO-PF (autentizovaná buněčná linie získaná z evropské buněčné banky ECACC)
- HEK293 (autentizovaná buněčná linie získaná z evropské buněčné banky ECACC)

Kultivační média

- EX-CELL ACF CHO médium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hektor kultivační médium (Cell Culture Technologies LLC, Švýcarsko)

Reagencie a chemikálie

- Albuminová frakce V (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Dimetylsulfoxid (DMSO) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemsko)
- Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, USA)
- Ingenio® Electroporation Solution (MIRUS, Madison, USA)
- Inzulin (Gibco)
- LB médium (Luria-Bertany médium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Opti-MEM médium (Gibco)
- Fosfátový pufr (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- RC DC kit (Bio-Rad, California, USA)
- Sterilní deionizovaná voda
- TransIT® 293 Transfection Reagent (MIRUS, Madison, USA)
- TransIT-PRO® Transfection Kit (MIRUS, Madison, USA)
- Trypanová modř 0.2% (Roche, San Francisco, USA)

- 1% lyzační pufr (CCLR) (Promega)
- 10% Pluronic F-68 (Gibco)
- 200mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Laboratorní a přístrojové vybavení

Vybavení potřebné pro sterilní práci s buněčnými liniemi

- Box s laminárním prouděním (Bioair Instruments)
- Buněčný inkubátor s termostatem a regulátorem koncentrace CO₂ (Binder, Sanyo)
- Centrifuga 5810 (Eppendorf)
- Pipety různého rozsahu (Eppendorf)
- Laboratorní třepačky (BioSan, Litva)
- Serologické sterilní pipety 5ml, 10 ml, 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- Sterilní kultivační nádoby T25 a T75 (TPP, Švýcarsko)
- Sterilní kultivační Erlenmayerovy baňky 125 a 250 (Thermo Scientific)
- Sterilní špičky 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf)
- 96-jamkové mikrotitrační kultivační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)

Ostatní vybavení

- Dewarova nádoba (Cryometal)
- Gene Pulser MXcell™ Electroporation System (přístroj na elektroporaci) (Bio-Rad, California, USA)
- Mikrozkmavky 0,5 ml a 1 ml (PPT, Švýcarsko)
- MiniPrep kit (Macherey-Nagel, USA)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Neubauerova komůrka (Thomas Scientific, Swedesboro, USA)
- Počítací sklíčko Cedex Smart Slides (Roche, San Francisco, USA)
- Počítadlo buněk Cedex XS (Roche, San Francisco, USA)

- Světelný mikroskop TE-DH 100W (Nikon)
- Tecan INFINE 200 PRO (Tecan, Zürich, Švýcarsko)
- Vortex (BioSan, Litva)
- 96-jamkové elektroporační kyvety (Bio-Rad, California, USA)
- Zamrazovací kontejner Mr. Frosty (Thermo Scientific)

4.2. Pracovní postupy

4.2.1. Rozmrazování buněk

CHO-PF

Buněčná suspenze o objemu 1 ml byla rychle rozmrazena při 37 °C v inkubátoru a následně přenesena do 15 ml sterilní zkumavky s 9 ml bezsérového média EX-CELL ACF CHO předehřátého na 37 °C. Následně byly buňky jemně resuspendovány 10 ml sérologickou pipetou a centrifugovány při 500g po dobu 5 minut. Supernatant byl odsán a buňky resuspendovány v 50 ml zkumavce v 30 ml bezsérového média EX-CELL ACF CHO vytemperovaného na 37 °C a jemně resuspendovány. Buňky byly přeneseny na T75 sterilní kultivační nádobu a kultivovány při 37 °C, 5% CO₂ v inkubátou bez třepání 3 dny. První výměna média proběhla po 3 dnech.

HEK293

Alikvota o 1 ml buněčné suspenze byla rychle rozmrazena při 37 °C v inkubátoru a následně přenesena do 15 ml sterilní zkumavky s 5 ml bezsérového média Hektor předehřátého na 37 °C. Následně byly buňky jemně resuspendovány 10 ml sérologickou pipetou a centrifugovány při 100g po dobu 1 minuty. Supernatant byl odsán a buňky resuspendovány v 10 ml bezsérového média Hektor vytemperovaného na 37 °C a jemně resuspendovány. Buňky byly přeneseny na T25 sterilní kultivační nádobu a kultivovány při 37 °C, 5% CO₂ v inkubátou bez třepání. První výměna média proběhla po 4-5 dnech.

4.2.2. Zamrazování buněk

CHO-PF A HEK293

Buňky byly zamrazovány, pokud měly viabilitu více jak 95%. Objem zamrazovaných buněk byl 1 ml a jejich koncentrace 6×10^6 buněk/ml. K zamrazení byl použit zamrazovací roztok zmetabolizovaného media a čerstvého média (poměr 1:1) s přídavkem DMSO, aby jeho konečná koncentrace byla 7,5%.

Potřebné množství buněčné suspenze bylo přeneseno 10 ml sterilní sérologickou pipetou do sterilní zkumavky o objemu 10 ml a stočeno při $500 \times g$ po dobu 5 minut. Zmetabolizované médium bylo odebráno na test přítomnosti mykoplazmat a buňky resuspendovány v 1 ml zamrazovacího roztoku. Vzniklá buněčná suspenze byla přenesena do zamrazovacího kontejneru do mrazáku ($-70 \text{ }^\circ\text{C}$). Po negativním výsledku na test mykoplazmat byly buňky přesunuty z $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ do Dewarovy nádoby do kapalného dusíku do $-196 \text{ }^\circ\text{C}$, kde jsou dlouhodobě uchovávány.

4.2.3. Pasážování buněk

CHO-PF

Buňky byly pasážovány tak, aby byly udržovány v rozmezí koncentrací $2 \times 10^5 - 10 \times 10^5$ buněk na ml.

Celá buněčná suspenze byla přenesena 10 ml sterilní sérologickou pipetou do sterilní zkumavky o objemu 50 ml. Buňky byly stáčeny při $500 \times g$ po dobu 5 minut. Následně bylo odebráno zmetabolizované médium. Buňky byly resuspendovány v 10 ml předehřátého média pomocí 10 ml sérologické pipety. Část buněčné suspenze byla přenesena na kultivační nádobu do nového předehřátého média, tak aby jejich koncentrace byla v požadovaném rozmezí (viz výše).

HEK293

Buňky na T25 sterilní kultivační nádobě jsou poprvé pasážovány po 14 dnech od dne rozmrazení v poměru 1:2. Při pasáži nejsou buňky centrifugovány. Pouze se odebere potřebné množství média s buněčnou suspenzí a je přeneseno do nové kultivační nádoby. Buněčná suspenze je doplněna čerstvým předeštěným médiem.

Buňky na T75 sterilní kultivační nádobě na třepačce byly pasážovány pravidelně po 4-5 dnech podle potřeby. Buněčná suspenze byla přenesena do 50 ml sterilní zkumavky, uzavřena víčkem a centrifugována při $100 \times g$ 1 minutu. Následně bylo odebráno zmetabolizované médium a buňky byly resuspendovány v 10 ml čerstvého předeštěného média pomocí 10 ml sterilní serologické pipety. Potřebné množství buněčné suspenze bylo přeneseno do nové kultivační nádoby a doplněno do 20 ml čerstvým předeštěným médiem, tak aby jejich koncentrace byla v požadovaném rozmezí (viz výše).

4.2.4. Kultivace buněk

CHO-PF

Buňky byly kultivovány 3 dny na T75 ve 30 ml bezsérového média EX-CELL ACF s přídavkem 4mM L-glutaminu. Po 3 dnech byly přesunuty na orbitální třepačku s výkyvem 10 mm a třepány při 120 rpm. Při nárůstu koncentrace na 2×10^5 buněk na ml byly přesunuty do sterilní Erlenmeyerovy baňky o objemu 125 ml a následně do baňky s objemem 250 ml do bezsérového média EX-CELL ACF CHO s přídavkem 4mM L-glutaminu v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ bez přídavku antibiotik.

Buňky byly kultivovány v rozmezí koncentrací 2×10^5 – 10×10^5 buněk na ml. Při výměně média byly buňky přeneseny do 50 ml sterilní zkumavky stáčený při $500 \times g$ po dobu 5 minut. Následně bylo odebráno zmetabolizované médium. Buňky byly jemně resuspendovány 10 ml sterilní sérologickou pipetou v potřebném množství předeštěného média.

HEK 293

Buňky byly kultivovány na T25 a následně na T75 sterilních kultivačních nádobách v bezsérovém médiu Hektor s přidavkem 4mM L-glutaminu a 5µg/ml inzulinu v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ bez přidavku antibiotik.

Buňky byly nejprve kultivovány v rozmezí koncentrací 2×10^5 – 10×10^5 buněk na ml v 10 ml média na T25 sterilní kultivační nádobě bez třepání. Buňky byly pravidelně pasážovány po 4-5 dnech. Při částečné výměně média se buňky nechaly usadit na dno nádoby. Poté byla odebrána část zmetabolizovaného média a nahrazena čerstvým předeštěným médiem.

Pokud buňky dobře narůstaly, byly přesunuty do 20 ml čerstvého média na T75 na třepačku. Při kultivaci na třepačce s orbitem 10 mm jsou třepány při 100 rpm. Buňky jsou na třepačce udržovány při koncentracích 2×10^5 – 2×10^6 buněk/ml a jsou kultivovány s přidavkem Pluronic F-68. Buňky se při vyšších koncentracích stávají odolnějšími, proto jsou při výměně média stáčeny při 100 × g po dobu 1 minuty.

4.2.5. Počítání buněk

Buňky byly počítány na počítadle buněk Cedex XS (Roche). Cedex XS analyzátor je počítadlo buněk, které využívá Trypanové modři k určení koncentrace buněk a jejich viability (životaschopnosti buněk). Před počítáním buněk byla buněčná suspenze jemně promíchána pipetou 10 ml sterilní sérologickou pipetou, aby byly odstraněny případné shluky buněk, které by snižovaly počet buněk. Bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze. Buněčná suspenze byla přidána k 10 µl Trypanové modři (Roche). Směs byla před nanesením na počítací sklíčko Cedex Smart Slice (Roche) 2 x resuspendována pomocí pipety se 100 µl špičkou. Na počítací sklíčko bylo následně naneseno 10 µl obarvené buněčné suspenze.

4.2.6. Izolace plazmidu

Den před izolací byla kolonie *E. coli* obsahující plazmid přenesena sterilním párátkem z agarové půdy do 5 ml LB média. Bakteriální kultura byla kultivována 16 hodin v inkubátoru při 37 °C na třepačce při 220 rpm.

Druhý den byla namnožená kultura stočena při 11 000 × g 30 sekund. Supernatant byl odstraněn a z bakteriální pelety byl izolován plazmid pomocí MiniPrep kitu.

Buněčná peleta byla resuspendována v 250 µl pufru A1. Následně bylo přidáno 250 µl pufru A2. Zkumavka byla jemně promíchána převrácením. Směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě, poté bylo přidáno 300 µl pufru A3 a jemně promícháno převrácením zkumavky. Následovala centrifugace 10 minut při 11 000 × g při pokojové teplotě.

Supernatant byl přenesen na kolonku, která byla umístěna v 2 ml sběrné zkumavce. Kolonku ve zkumavce byla centrifugována při 11 000 × g 1 minutu. Frakce ve sběrné zkumavce po centrifugaci byla odstraněna a na kolonku bylo aplikováno 600 µl pufru A4 (s ethanolem). Vše bylo centrifugováno 11 000 × g 1 minutu. Byla odstraněna proteklá frakce a kolonka byla znovu centrifugována 11 000 × g 2 minuty. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a plazmidová DNA byla z kolonky eluována 50 µl deionizované vody.

Pro určování čistoty a koncentrace byl použit Nanodrop.

4.2.7. Určování účinnosti transfekce

Neubauerova komůrka

Transfekované buňky byly 10 × promíchány pipetou se špičkou o objemu 100 µl. Do 10 µl 4,0% Trypanové modři bylo přidáno 10 µl promíchané buněčné suspenze. Vzniklá suspenze byla 2 krát promíchána pipetou se špičkou o objemu 100 µl. Následně bylo z obarvené buněčné suspenze odebráno 10 µl a přeneseno na Neubauerovu komůrku. Živé buňky byly počítány v 50 čtvercích pod světelným mikroskopem. Následně byly počítány transfekované buňky v 50 čtvercích pod fluorescenčním

mikroskopem. Počet transfekovaných buněk byl vydělen počtem živých buněk a vynásoben 100. Účinnost transfekce byla hodnocena v procentech transfekovaných buněk. Pokud bylo napočítáno méně než 100 svítících buněk na 50 čtverců, byla účinnost transfekce udávána v počtu transfekovaných buněk a ne v procentech.

Kvantifikace GFP v buněčném lyzátu

Tato metoda se používá k relativnímu stanovení GFP v buněčném lyzátu. Slouží k vyhodnocení účinnosti transfekce. Stanovení se provádí na destičkové čtečce Tecan fluorimetricky. Naměřené hodnoty fluorescence se následně normalizují na celkový obsah proteinů, aby se vyloučila možnost ovlivnění výsledků nerovnoměrným růstem, nestejnosměrným nasazením, nebo cytotoxicitou.

Stanovení GFP

Buňky byly opláchnuty 100 μ l 1 \times PBS předeřhátého na 37 °C, stočeny při 500 \times g 5 minut. 1 \times PBS byl připraven naředěním 10 \times PBS deionizovanou vodou. PBS bylo dokonale odsáto, aby nedošlo k naředění buněčného lyzátu. K buňkám bylo přidáno 150 μ l 1 \times CCLR (1 \times Cell Culture Lysis Reagent), připraveného naředěním z 5x koncentrovaného zásobního roztoku, pomocí opakovací pipety. Zkumavky s buňkami a lyzátem byly umístěny na třepačku a třepány 30 minut při 120 rpm. Zkumavky se následně centrifugovaly při 500 \times g 5 minut. Poté bylo odebráno 100 μ l buněčného lyzátu. Lyzát byl opatrně přenesen na 96-jamkovou mikrotitrační destičku s plochým dnem. Pokud se v lyzátu v jamce vytvořily bubliny, byly opatrně odstraněny pomocí injekční jehly. Destička se analyzovala na destičkové čtečce Tecan, kde se snímala intenzita fluorescence. Excitační vlnová délka 490 nm, emisní vlnová délka 525 nm.

Stanovení koncentrace proteinů

Postup stanovení koncentrace proteinů vychází z doporučení výrobce RC DC kitu. Pro sestavení kalibrační křivky a určení koncentrace proteinů byla použita frakce

albuminu V a reagentie pro stanovení koncentrace proteinů z RC DC kitu. Frakce albuminu byla ředěna pomocí 1 × CCLR na koncentrace 250, 500, 750, 1000 a 1500 µg/ml pro sestavení kalibrační křivky. Do jamek na 96 jamkové destičce bylo nanášeno 5 µl vzorku vždy v duplikátech, k němuž bylo přidáno 25 µl roztoku A' a poté 200 µl roztoku B. Roztok A' byl připraven těsně před nanášením smísením 1 ml roztoku A s 20 µl roztoku S. Jamky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla stanovena absorbance při 750 nm na destičkové čtečce Tecan.

Postup pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích byl stejný, jako při sestavení kalibrační křivky. Vzorky pro stanovení koncentrace proteinů byly také měřeny v duplikátech.

Normalizace hodnot fluorescence

Nejprve byla vypočítána hodnota RFU/l, kdy RFU bylo vynásobeno 10 000. RFU/l bylo vyděleno příslušnou koncentrací proteinů v jednotkách mg/l. Po normalizaci jsme získali hodnoty RFU (Relative Fluorescence Units), relativní fluorescence přepočtené na 1 mg proteinu.

4.2.8. Optimalizace transfekce buněčných linií CHO PF a HEK293

Pro všechny optimalizační kroky byl použit plazmid pMaxGFP o zásobní koncentraci 1,29 µg/µl o čistotě 1,9 (260/280 nm), pocházející z jedné izolace, tak aby byl minimalizován vliv různých izolací plazmidu. Všechny optimalizace byly prováděny na 96-jamkové destičce s plochým dnem.

Příprava buněk na transfekci

Buňky byly pasážovány 24 hodin před transfekcí. V den transfekce byla změřena jejich koncentrace a viabilita. Viabilita buněk byla v den transfekce nejméně 90%. V den transfekce byly buňky přeneseny na 96-jamkovou destičku s plochým dnem. Buňky byly kultivovány bez přídavku antibiotik.

Optimalizace Ingenio® Electroporation Solution

Na optimalizaci byla použita buněčná linie CHO PF. Potřebné množství buněk bylo stočeno při 500 × g 5 minut, opláchnuto v 1 x PBS, resuspendováno v malém objemu a spočítáno. Buňky byly přemístěny do nové zkumavky a stočeny při 500 × g 5 minut. Byl odstraněn supernatant. Buňky byly resuspendovány ve 100 µl elektroporačního pufru. K buňkám bylo přidáno potřebné množství plazmidu. Plazmid byl jemně promíchán pipetou. Vzniklá suspenze byla přenesena do vychlazené 96-jamkové elektroporační kyvety po 100 µl, zbylé jamky byly vyplněny 100 µl vychlazeného Opti-MEM média. Kyveta byla umístěna do elektroporačního přístroje. Následně byla provedena elektroporace. Po ukončení elektroporace byla buněčná suspenze přesunuta na 96-jamkovou destičku se 100 µl kultivačního média ExCELL CHO vytemperovaného na pokojovou teplotu, která byla následně umístěna do inkubátoru do 37 °C, 5% CO₂. Jako kontrola byla použita buněčná suspenze bez přídavku plazmidu, se kterou bylo zacházeno stejně jako s buňkami s plazmidem.

Pro transfekci CHO PF buněčné linie v elektroporačním pufru byly optimalizovány tyto podmínky: typ pulsu a jednotlivé podmínky, počet buněk, čas výměny média, vliv kondicionovaného média a množství DNA.

- **Typ pulsu a jednotlivé podmínky:** uvedeny v následujících tabulkách.

Tab. 1. Square wave.

Napětí (V)	Délka pulsu (ms)	Počet Pulsů	Kapacita (μF)
80	15	1	800
			900
			1000
120	15	1	800
			900
			1000
160	15	1	800
			900
			1000
200	15	1	800
			1000
			1200
250	15	1	800
			1000
			1200
			1500
			2000
280	15	1	1500
			2000
300	15	1	800
			1000
			1200

Tab. 2. Exponential decay

Napětí (V)	Rezistence (Ω)	Kapacita (μF)
150	1000	800
		1000
		1200
200	1000	800
		1000
		1200
250	1000	800
		900
		950
		1000
		1200

- **Počet buněk na jamku:** 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10×10^5 .
- **Čas výměny média a vliv kondiciovaného média po:** 16, 24, 48 hodinách a bez výměny média.
- **Množství DNA na jamku:** 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 μg .

Experimenty byly prováděny v duplikátech (kvůli finanční náročnosti testovaných látek) a účinnost transfekce byla sledována po dobu 3 dnů.

Optimalizace TransIT® 293 Transfection Reagent

Na optimalizaci byla použita buněčná linie HEK293. Bylo odebráno potřebné množství buněk, ty byly stočeny při $100 \times g$ 1 minutu. Supernatant byl odsán. Buňky byly resuspendovány v kultivačním médiu Hektor vytemperovaného na 37°C . Potřebné množství buněčné suspenze o objemu $92 \mu\text{l}$ bylo nasazeno na 96-jamkovou destičku 24 hodin před transfekcí a kultivováno v inkubátoru při 37°C , 5% CO_2 .

Druhý den byla připravena transfekční směs. TransIT® 293 bylo zahřáto na pokojovou teplotu a promícháno na vortexu. Do sterilní zkumavky bylo přeneseno $9 \mu\text{l}$ kultivačního média Hektor. K médiu bylo přidáno potřebné množství plazmidu. Vše bylo promícháno pipetou. K roztoku bylo přidáno potřebné množství TransIT® 293. Směs byla inkubována 15 nebo 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla směs přidána k buňkám po kapkách po celé ploše jamky. 96-jamková destička s buněčnou suspenzí a transfekčním reagens byla umístěna do inkubátoru do 37°C , 5% CO_2 . Jako kontrola byla použita buněčná suspenze bez přídavku plazmidu, se kterou bylo zacházeno stejně jako s buňkami s plazmidem.

Pro transfekci HEK293 buněčné linie pomocí TransIT® 293 Transfection Reagent byly optimalizovány tyto podmínky: Počet buněk, doba inkubace transfekční směsi, poměr DNA:TransIT® 293 Transfection Reagent, čas výměny média a vliv kondiciovaného média.

- **Počet buněk na jamku:** 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 7×10^5 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 ,
- **Doba inkubace transfekční směsi:** 15 a 30 minut.

- **Poměr DNA:TransIT® 293 Transfection Reagent:**

Tab. 3. Poměr DNA:TransIT® 293 Transfection Reagent.

DNA (µg)	TransIT_293 reagent (µl)
0,04	0,08
	0,24
	0,32
0,08	0,16
	0,48
	0,64
0,12	0,24
	0,72
	0,96

- **Čas výměny média a vliv kondiciovaného média po: 4, 16, 24 a 48 hodinách.**

Experimenty byly prováděny v duplikátech a účinnost transfekce byla sledována po dobu 3 dnů.

Optimalizace TransIT-PRO® Transfection Kit

Na optimalizaci byla použita buněčná linie CHO PF. Potřebné množství buněk bylo stočeno při 500 × g 5 minut. Supernatant byl odsán. Buňky byly resuspendovány v čerstvém kultivačním médiu Ex-CELL ACF CHO vytemperovaném na 37 °C. 92 µl buněčné suspenze bylo v den transfekce nasazeno na 96-jamkovou destičku.

Před transfekcí byla připravena směs TransIT-PRO Reagens a Pro Boost Reagens. Obě reagenty byly vytemperovány na pokojovou teplotu a promíchány na vortexu. K 8 µl kultivačního média bylo přidáno potřebné množství plazmidu, Trans IT-PRO Reagens a Pro Boost Reagens. Směs byla inkubována 15 a 30 minut a následně byla přidána k buněčné suspenzi. 96-jamková destička s buněčnou suspenzí byla následně umístěna do inkubátoru do 37 °C, 5% CO₂.

Jako kontrola byla použita buněčná suspenze bez přídavku plazmidu, se kterou bylo zacházeno stejně jako s buňkami s plazmidem.

Experimenty byly prováděny v duplikátech a účinnost transfekce byla sledována po dobu 3 dnů.

Pro transfekci CHO PF buněčné linie pomocí TransIT-PRO® Transfection Kit byly optimalizovány tyto podmínky: Počet buněk, doba inkubace transfekční směsi, poměr Trans-IT PRO Reagens: Pro BOOST Reagens, čas výměny média a vliv kondiciovaného média, poměr DNA: Trans-IT PRO Reagens: Pro BOOST Reagens.

- **Počet buněk na jamku:** 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10×10^5 .
- **Doba inkubace transfekční směsi:** 15 a 30 minut.
- **Čas výměny média a vliv kondiciovaného média po:** 16, 24, 48 hodinách a bez výměny média.
- **Poměr Trans-IT PRO Reagens: Pro BOOST Reagens:**

Tab. 4. Poměr Trans-IT PRO Reagens: Pro BOOST Reagens.

DNA (μ g)/ jamka	TransIT_PRO (μ l)/ jamka	Pro_BOOST (μ l)/ jamka
	0,05	-
		0,05
		0,1
		0,15
0,1	0,1	-
		0,05
		0,1
		0,15
	0,15	-
		0,05
		0,1
		0,15
	0,2	-
		0,05
		0,1
		0,15

- **Poměr DNA:Trans-IT PRO Reagens:Pro BOOST Reagens:**

Tab. 5. Poměr DNA:Trans-IT PRO Reagens:Pro BOOST Reagens.

DNA μg/jamka	Trans_IT_PRO μl/jamka	PRO_BOOST μl/jamka
0,05	0,2	0,1
0,1		
0,15		
0,2		
0,25		

Experimenty byly prováděny v duplikátech a účinnost transfekce byla sledována po dobu 3 dnů.

4.2.9. Doposud používané postupy ve firmě Generi biotech s.r.o.

Pro transfekce byl použit plazmid pMaxGFP o zásobní koncentraci 1,29 μg/μl o čistotě 1,9. Experimenty byly prováděny v duplikátech na 96-jamkové destičce. Jako kontrola byla použita buněčná suspenze bez přídavku plazmidu, se kterou bylo zacházeno stejně jako s buňkami s plazmidem. Pro transfekci byl použit kit Effectene a pro elektroporaci Ex-Cell ACF CHO médium.

Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, USA)

Pro transfekci byla použita buněčná linie CHO PF. Potřebné množství buněk bylo stočeno při 500 × g 5 minut. Buňky byly resuspendovány ve 100 μl Ex-Cell ACF CHO médiu. DNA (0,4 μg) byla přidána k 30 μl Buffer EC. Směs byla promíchána. K směsi byl přidán 3,2 μl Enhancer. Směs byla promíchána a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 10 μl Effecteme. Směs byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě a následně byla přidána k buněčné suspenzi. 96-jamková destička s buněčnou suspenzí byla následně umístěna do inkubátoru do 37 °C, 5% CO₂.

Optimální podmínky jsou v následující tabulce:

Tab. 6. Effectene Transfection Reagent.

Počet Buněk	DNA (μg)	Enhancer (μl)	Effectene (μl)	Buffer EC (μl)
5×10^4	0,4	3,2	10	30

Elektroporace v EX-CELL ACF CHO médium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Pro transfekci byla použita buněčná linie CHO PF. Potřebné množství buněk bylo stočeno při 500 × g 5 minut, opláchnuto v 1 x PBS, resuspendováno v malém objemu a spočítáno. Buňky byly přemístěny do nové zkumavky a stočeny při 500 × g 5 minut. Byl odstraněn supernatant. Buňky byly resuspendovány ve 100 μl Ex-Cell ACF CHO médiu. K buňkám bylo přidáno potřebné množství plazmidu. Plazmid byl jemně promíchán pipetou. Vzniklá suspenze byla přenesena do vychlazené 96-jamkové elektroporační kyvety po 100 μl, zbylé jamky byly vyplněny 100 μl vychlazeného Opti-MEM média. Kyveta byla umístěna do elektroporačního přístroje, do kterého byl vpuštěn puls. Po ukončení elektroporace byla buněčná suspenze přesunuta na 96-jamkovou destičku se 100 μl kultivačního média ExCELL CHO vytemperovaného na pokojovou teplotu, která byla následně umístěna do inkubátoru do 37 °C, 5% CO₂.

Optimální podmínky jsou v následujících tabulkách:

Tab. 7. Ex-Cell ACF CHO médium.

Počet buněk	DNA (μg)	Ex-CELL ACF CHO (μl)
2×10^4	0,5	100

Tab. 8. Parametry elektroporace pro Ex-Cell ACF CHO médium.

Napětí (V)	Délka pulsu (ms)	Počet pulsů	Zpoždění	Kapacita (μF)
280	15	2	1	2000

4.2.10. Zpracování dat

Získaná data byla přenesena do tabulkového editoru MS Office 2003. Výsledná hodnota exprese reporterového proteinu GFP byla jako průměr hodnot exprese tohoto proteinu z duplikátů.

5. VÝSLEDKY

5.1. Optimalizace Ingenio® Electroporation Solution

5.1.1. Parametry elektroporace

Pro optimalizaci parametrů elektroporace jsme požili buněčnou linii CHO PF. Experiment byl prováděn s 6×10^5 buňkami na jamku a množstvím DNA 0,2 μg na jamku. Vybírali jsme mezi exponenciálním (Exponential) a čtvercovým (Square) typem pulsu a měnili jsme parametry, které s jednotlivými pulsy souvisí.

Tab. 9. Parametry elektroporace- Square wave.

Napětí (V)	Délka pulsu (ms)	Počet Pulsů	Kapacita (μF)	Účinnost elektroporace		
				po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
80	15	1	800	0,00%	0,00%	0,00%
			900	0,00%	0,00%	0,00%
			1000	0,00%	0,00%	0,00%
120	15	1	800	0,00%	0,00%	0,00%
			900	0,00%	0,00%	0,00%
			1000	0,00%	0,00%	0,00%
160	15	1	800	0,00%	0,00%	0,00%
			900	0,00%	0,00%	1,00%
			1000	0,00%	0,00%	0,00%
200	15	1	800	0,00%	3,00%	3,00%
			1000	0,00%	2,00%	3,00%
			1200	0,00%	1,00%	3,00%
250	15	1	800	3,00%	5,00%	5,00%
			1000	5,00%	5,00%	1,00%
			1200	4,00%	5,00%	5,00%
			1500	1,00%	0,00%	0,00%
			2000	1,00%	0,00%	0,00%
280	15	1	1500	1,00%	0,00%	0,00%
			2000	2,00%	0,00%	0,00%
300	15	1	800	8,00%	8,00%	2,00%
			1000	1,00%	10,00%	3,00%
			1200	2,00%	2,00%	2,00%

Tab. 10. Parametry elektroporace- Exponential decay.

Napětí (V)	Rezistence (Ω)	Kapacita (μF)	Účinnost elektroporace		
			po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
150		800	0,00%	0,00%	0,00%
		1000	0,00%	0,00%	0,00%
		1200	0,00%	0,00%	0,00%
200	1000	800	0,00%	3,00%	3,00%
		1000	1,00%	2,00%	3,00%
		1200	0,00%	1,00%	3,00%
250		800	3,00%	5,00%	5,00%
		1000	20,00%	20,00%	10,00%
		1200	5,00%	5,00%	5,00%
300		1000	8,00%	8,00%	15,00%
		1200	8,00%	8,00%	20,00%

Čtvercový typ pulsu se pro náš experiment příliš neosvědčil. Vyšší účinnost transfekce byla až při hodnotách okolo 300 V, kde se první dva dny dosahovala 8%. Buňky však při tak vysokém napětí neměly dobrou viabilitu. Nejvhodnější se ukázalo použití exponenciálního typu pulsu s napětím 250 V, rezistencí 1000 Ω a kapacitou 1000 μF , kdy účinnost transfekce po 24 a 48 hodinách byla 20%, jak je vidět v tabulce 10. Při užití napětí 300 V byla účinnost také vysoká, ale viabilita buněk se snížila na 80% již po 24 hodinách oproti viabilitě 96% při užití pulsu o napětí 250 V.

5.1.2. Počet buněk

Volili jsme počet buněk v rozmezí $5-10 \times 10^5$. Množství DNA bylo stejné, jako u předchozího experimentu, tedy $0,2 \mu\text{g}$ na jamku. Na základě předešlého experimentu jsme pro elektroporaci zvolili exponenciální typ pulsu s hodnotami napětí 250 V rezistencí 1000Ω a kapacitou $1000 \mu\text{F}$.

Tab. 11. Počet buněk.

Počet buněk/ jamka	Účinnost elektroporace		
	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
6×10^5	3,50%	5,50%	8,50%
7×10^5	2,50%	6,00%	8,50%
8×10^5	1,50%	5,00%	11,00%
9×10^5	5,00%	5,50%	10,50%
10×10^5	4,00%	4,00%	9,50%

Jako nejvhodnější počet buněk jsme vybrali 7×10^5 buněk na jamku, i když účinnost transfekce byla při vyšších konfluencích buněk o něco vyšší (tabulka 11). Je to hlavně proto, že buňkám nebylo vyměňováno médium. Po výměně média začínají buňky velmi rychle růst. Kdybychom použili vyšší konfluenci (hustota), je možné, že by buňky médium velmi rychle zmetabolizovaly a začaly by umírat.

5.1.3. Výměna média a vliv kondiciovaného média

Výměnu média jsme uskutečnili mezi 16 a 48 hodinami po elektroporaci. Při experimentu jsme použili jak čerstvé, tak kondiciované médium. Pro experiment bylo použito 6×10^5 buněk a 0,2 μg DNA na jamku. Pro elektroporaci byl použit exponenciální typ pulsu s hodnotami napětí 250 V rezistencí 1000 Ω a kapacitou 1000 μF .

Tab. 12. Výměna média a kondiciované médium.

výměna média po (hodiny)	Účinnost elektroporace		
	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
16	2,50%	3,50%	5,50%
16 <i>kondiciované</i>	2,00%	2,50%	1,50%
24	2,00%	4,50%	7,00%
24 <i>kondiciované</i>	2,50%	4,50%	4,00%
48	0,00%	1,00%	5,50%
48 <i>kondiciované</i>	2,00%	1,00%	1,50%

Kondiciované médium bohužel nepomohlo zvýšit účinnost transfekce ani v jednom z případů. Proto jsme se rozhodli, že budeme měnit pouze čerstvé médium a to po 24 hodinách, kdy byla účinnost transfekce nejvyšší a to 7,00% třetí den (tabulka 12).

5.1.4. Množství DNA

Pro experiment jsme použili 7×10^5 buněk na jamku, exponenciální puls s hodnotami napětí 250 V, rezistencí 1000 Ω a kapacitou 1000 μF . Měnili jsme pouze množství DNA a to v rozmezí 0,5 až 4 μg na jamku. Výměna čerstvého média proběhla po 24 hodinách.

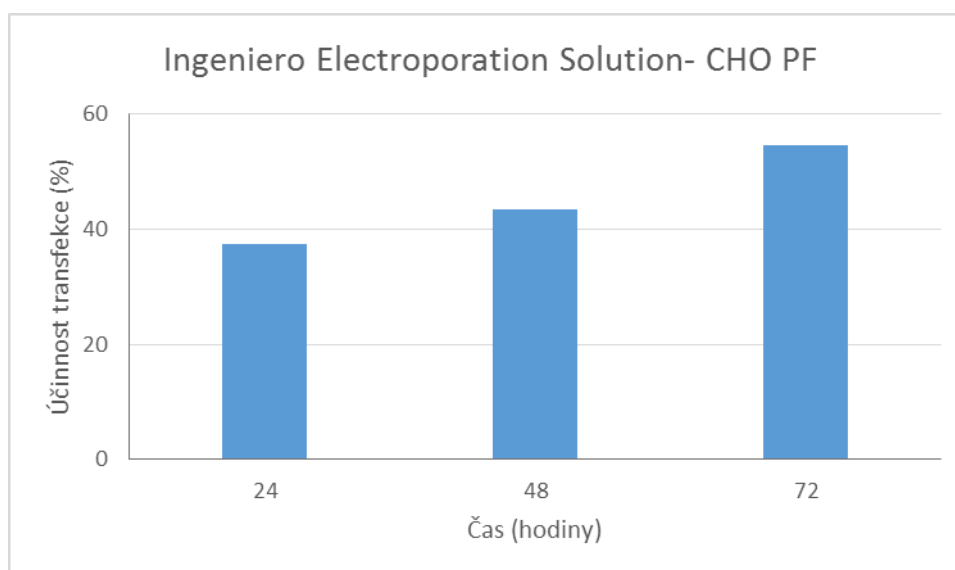
Tab. 13. Množství DNA.

množství DNA $\mu\text{g}/\text{jamka}$	Účinnost elektroporace		
	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
0,5	3,00%	22,00%	16,00%
1	6,50%	17,00%	38,00%
2	37,50%	43,50%	54,50%
3	36,00%	40,00%	50,50%
4	37,50%	47,50%	57,00%

Jako nejlepší se jeví užití 4 μg DNA na jamku s účinností transfekce 57%. Porovnáme-li to však s 2 μg DNA na jamku, kdy byla účinnost transfekce třetí den 54,5% není rozdíl v účinnosti transfekce nijak výrazný. Proto jsme jako ideální množství DNA zvolili 2 μg DNA na jamku, které kompromisem mezi účinností transfekce a finanční stránkou experimentu.

5.1.5. Ideální podmínky pro transfekci CHO PF

Jako ideální podmínky pro transfekci CHO PF buněčné linie jsme zvolili: počet buněk 7×10^5 buněk a 2 μg DNA na jamku, exponenciální typ pulsu s hodnotami napětí 250 V, rezistencí 1000 Ω a kapacitou 1000 μF a výměnou čerstvého média po 24 hodinách. Pro elektroporaci byl použit Electroporation Solution 200 μl .



Obr. 6. Ideální podmínky pro elektroporaci CHO PF buněčné linie s užitím Ingeniero Electroporation Solution. Účinnost transfekce byla měřena po dobu 72 hodin. S časem rostl i počet transfekovaných buněk a po 72 hodinách dosahovala účinnost transfekce nejvyšších hodnot.

Transfekční účinnost dosahuje relativně vysokých hodnot již první den po transfekci. Blíží se 40 %. Výměna média, která proběhla po 24 hodinách, nemá výrazný vliv na zvýšení transfekční účinnosti, byla provedena ke zvýšení viability buněk. Protože při elektroporaci se nepoužívá chemických reagens, které by byly pro buňky toxické. Po 48 hodinách účinnost transfekce přesahovala 40%. Po 72 hodinách se účinnost transfekce blížila 55% (obrázek 6).

5.2. Optimalizace TransIT® 293 Transfection Reagent

5.2.1. Doba inkubace transfekční směsi

Volili jsme dobu inkubace transfekční směsi (transfekční ragencie a DNA) 15 a 30 minut před jejím přidáním k buňkám při pokojové teplotě. Pro experimenty jsme zvolili různé koncentrace buněk v rozmezí $4-6 \times 10^4$. Množství TransIT-293 Reagent bylo 0,3 μ l a množství DNA bylo 0,1 μ l na jamku. Transfekční směs jsme v jamkách ponechali po celý průběh experimentu.

Tab. 14. Doba inkubace transfekční směsi.

Počet buněk/ jamka	Inkubace směsi (minuty)	Účinnost transfekce		
		po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
4×10^4	15	pár buněk	desítky buněk	$\leq 1,00\%$
	30	pár buněk	desítky buněk	$\leq 1,00\%$
5×10^4	15	pár buněk	desítky buněk	$\geq 1,00\%$
	30	pár buněk	desítky buněk	$\geq 1,00\%$
6×10^4	15	pár buněk	desítky buněk	$\leq 1,00\%$
	30	pár buněk	desítky buněk	$\leq 1,00\%$

Ideální byla doba inkubace transfekční směsi 15 minut při pokojové teplotě před jejím přidáním k buněčné kultuře. Transfekční účinnost nebyla příliš vysoká. Mohlo to být způsobeno poměrem DNA:transfekční reagens, který ještě nebyl optimalizován. Nízká účinnost transfekce mohla být také způsobena ponecháním transfekční směsi po dobu 72 hodin bez výměny média (tabulka 14).

5.2.2. Poměr DNA:transfekční reagent

Volba správného poměru DNA ku transfekčnímu reagens je u chemických transfekčních metod jedním z nejkritičtějších parametrů. Poměry DNA: transfekční reagent byly zkoušeny na konstantním množství buněk a to 5×10^4 buněk na jamku. Doba inkubace transfekční směsi byla před přidáním k buňkám 15 minut při pokojové teplotě.

Tab. 15. Poměr DNA:transfekční reagent

DNA μg/ jamka	TransIT_293 reagent μl/ jamka	Účinnost transfekce		
		po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
0,04	0,08	0,00%	0,00%	0,00%
	0,24	0,50%	3,00%	9,50%
	0,32	0,00%	3,00%	7,50%
0,08	0,16	0,00%	1,50%	3,00%
	0,48	1,00%	30,00%	40,00%
	0,64	0,50%	35,00%	30,00%
0,12	0,24	0,00%	1,00%	0,50%
	0,72	2,25%	30,00%	40,00%
	0,96	0,50%	20,00%	42,50%

Poměr DNA:transfekční reagens 1:3 nebyl vhodný ani v jednom z případů i když bylo navyšováno množství jak DNA, tak množství transfekčního reagens. Se zvyšujícím se poměrem DNA:transfekční reagens se zvyšovala i účinnost transfekce. Ideální poměr DNA: transfekční reagens byl 1:9 tedy 0,12 μl DNA a 0,96 μl transfekčního reagens na jamku (tabulka 15). Z tabulky můžeme vidět, že účinnost transfekce je po 24 hodinách pouze 0,50%, po 48 hodinách pak rapidně stoupla na 20,00% a po 72 hodinách je již rovna 42,50%

5.2.3. Výměna média

Výměna média a tím i odmytí chemického transfekčního reagens často velmi pomáhá zvýšit transfekční účinnost. Při výměně média dochází mimo jiné k odstranění zplodin metabolismu buněk. Zlepšuje jak transfekční účinnost, tak viabilita buněk. Médium jsme vyměňovali v rozmezí časů 4 až 48 hodin při konstantním počtu buněk 5×10^4 na jamku. Pro experiment bylo použito 0,12 μg DNA a 0,96 μl TransIT-293 Reagent na jamku. Transfekční směs se inkubovala 15 minut při pokojové teplotě.

Tab. 16. Výměna média.

Výměna média po (hodiny)	Účinnost transfekce		
	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
4	0,00%	1,00%	0,50%
16	1,17%	9,30%	18,00%
24	3,00%	10,70%	20,00%
48	8,30%	8,40%	13,30%

Při výměně média po 4 hodinách byla viabilita buněk vysoká, ne však účinnost transfekce. Za tu dobu nestihlo transfekční reagens proniknout do buněk. Při výměně média po 48 hodinách byla účinnost transfekce vyšší, ale viabilita buněk se snížila o 10% již po 24 hodinách. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při výměně média mezi 16 až 24 hodinami (tabulka 16).

5.2.4. Počet buněk

Volili jsme koncentrace buněk od $3-9 \times 10^4$. Bylo použito 0,12 μg DNA a 0,96 μl TransIT-293 Reagent na jamku. Inkubace transfekční směsi byla 15 minut před jejím přidáním k buňkám. Výměna média proběhla po 24 hodinách.

Tab. 17. Počet buněk.

Počet buněk/ jamka	Účinnost transfekce		
	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
3×10^4	3,00%	8,50%	38,00%
4×10^4	4,67%	36,60%	50,00%
5×10^4	12,30%	39,50%	50,00%
6×10^4	11,50%	33,30%	30,00%
7×10^4	4,70%	26,00%	30,00%
8×10^4	15,00%	41,70%	38,20%
9×10^4	5,00%	20,00%	16,70%

Kontrolní buňky narůstaly až do koncentrace 9×10^4 buněk na jamku. Při této koncentraci i přes výměnu média po 24 hodinách se jejich viabilita rapidně snižovala. Nejlepší viabilitu a nárůst vykazovaly buňky v rozmezí koncentrací 4×10^4 až 7×10^4 . Nejlepší účinnost a viabilita byla u buněk při výchozí koncentraci 5×10^4 buněk na jamku (tabulka 17).

5.2.5. Vliv kondiciovaného média

Kondiciované médium často podporuje růst buněk s nízkou viabilitou. Pro experiment byly použity dvě koncentrace buněk a to 3×10^4 a 5×10^4 . Nižší koncentrace byly testovány, protože dosažení konfluencie buněčné linie HEK293, která by byla vhodná pro provádění transfekcí často trvá velmi dlouho. Menší spotřeba buněk by tedy mohla celý proces urychlit. Vliv kondiciovaného média byl porovnáván s čerstvým médiem. Výměna média proběhla po 24 hodinách od zahájení transfekce.

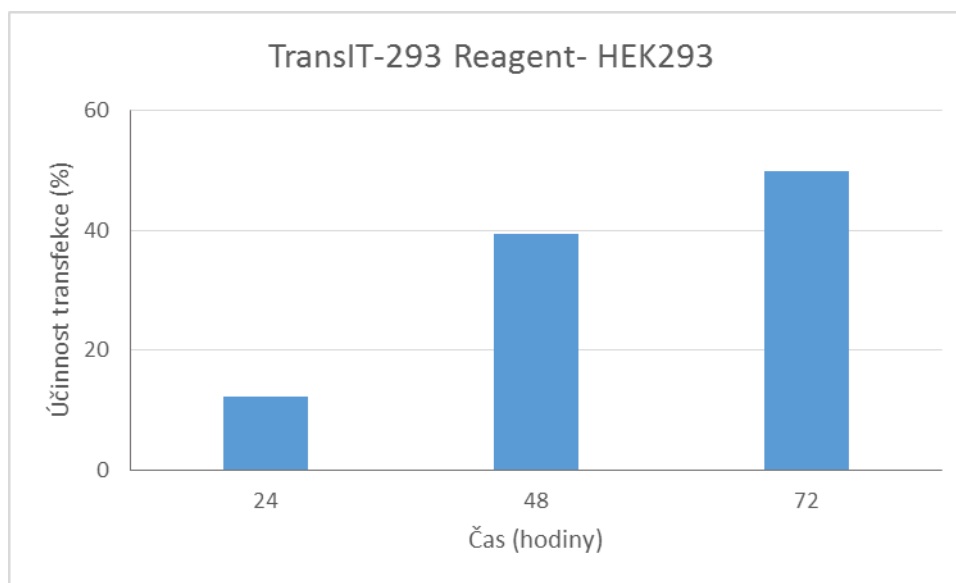
Tab. 18. Kondiciované médium.

Počet buněk/ jamka	Médium	Účinnost transfekce		
		po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
3×10^4	čerstvé	4,40%	9,00%	38,30%
	kondiciované	6,00%	15,00%	20,00%
5×10^4	čerstvé	13,30%	41,67%	50,00%
	kondiciované	7,21%	20,00%	18,50%

Kondiciované médium bohužel nezvyšovalo účinnost transfekce ani nezlepšilo viabilitu buněk. Pokud porovnáme účinnost transfekce v prvních dnech není rozdíl markantní. Větší výkyvy vidíme druhý a třetí den. Nejlepší transfekční účinnosti je dosahováno při použití buněk o koncentraci 5×10^4 , kdy třetí den dosahuje účinnost transfekce 50% (tabulka 18). Při této koncentraci se po 72 hodinách účinnost transfekce liší o 31,5%, pokud porovnáme čerstvé a kondiciované médium, což je výrazný rozdíl.

5.2.6. Ideální podmínky pro transfekci HEK293

Jako ideální podmínky pro transfekci HEK293 buněčné linie jsme zvolili: počet buněk 5×10^4 na jamku, 0,12 μg DNA a 0,96 μl TransIT-293 Reagent na jamku, inkubace transfekční směsi 15 minut a výměna čerstvého média po 24 hodinách. Pro transfekci bylo použito TransIT-293 Reagent.



Obr. 7. Účinnost transfekce pro TransIT-293 Reagent prováděné na HEK293 buněčné linii. Účinnost transfekce se po 48 hodinách téměř ztrojnásobila oproti účinnosti po 24 hodinách. Nejvyšších hodnot pak dosahovala po 72 hodinách.

Účinnost transfekce se po 24 hodinách pohybovala kolem 12%. Po 48 hodinách došlo k jejímu prudkému zvýšení až na hodnoty okolo 40%. Bylo to způsobeno výměnou média po 24 hodinách. Chemické transfekční reagens bylo pro buňky nejspíš toxické. Po 72 hodinách již byla účinnost transfekce 50%, jak můžeme vidět na obrázku 7.

5.3. Optimalizace TransIT PRO® Transfection Kit

5.3.1. Počet buněk a doba inkubace transfekční směsi

Volili jsme dobu inkubace transfekční směsi (transfekční reagentie a DNA) před přidáním k buňkám 15 a 30 minut při pokojové teplotě. Pro experimenty jsme zvolili různé koncentrace buněk od $5-10 \times 10^5$ buněk na jamku. Bylo použito 0,1 μ l TransIT_PRO Reagens, 0,05 μ l Pro Boost Reagens a 0,1 μ g DNA na jamku. Transfekční směs jsme v jamkách ponechali po celý průběh experimentu. Účinnost transfekce je uváděna jako počet buněk.

Tab. 19. Počet buněk a doba inkubace transfekční směsi.

Počet buněk/ jamka	Inkubace transfekční směsi (minuty)	Účinnost transfekce		
		po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
5×10^5	15	6,00	2,50	1,00
	30	5,50	2,50	2,50
6×10^5	15	16,00	2,00	0,50
	30	15,00	3,50	2,50
7×10^5	15	9,50	4,00	3,00
	30	7,00	4,00	1,50
8×10^5	15	7,00	3,00	0,50
	30	8,00	0,50	0,00
9×10^5	15	5,00	0,50	1,00
	30	6,00	4,00	3,50
10×10^5	15	4,50	3,50	2,50
	30	1,00	1,50	0,50

Z tabulky 19 je patrné, že nejvyšší transfekční účinnosti jsme dosáhli po 24 hodinách. Jako ideální výchozí podmínky jsme zvolili počet buněk 6×10^5 na jamku a dobu inkubace transfekční směsi 30 minut. Je to proto, že v tomto případě byla transfekční účinnost vyšší než v ostatních případech a buňky vykazovaly velmi vysokou intenzitu fluorescence i po 72 hodinách oproti ostatním případům.

5.3.2. Poměr Trans-IT PRO Reagens:Pro BOOST Reagens

Pro experiment jsme použili konstantní počet buněk a to 6×10^5 na jamku a konstantní množství DNA 0,1 μg na jamku. Bylo použito rozmezí koncentrací Trans-IT PRO Reagens 0,05-0,20 μl a Pro BOOST Reagens 0-0,15 μl na jamku. Doba inkubace transfekční směsi před jejím přidáním k buňkám byla 30 minut při pokojové teplotě. Transfekční směs se neodmývá. Účinnost transfekce je uváděna jako počet buněk.

Tab. 20. Poměr Trans-IT PRO Reagens:Pro BOOST Reagens.

TransIT_PRO (μl)/ jamka	Pro_BOOST (μl)/ jamka	Účinnost transfekce		
		po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
0,05	-	6,00	3,50	2,50
	0,05	2,00	1,50	2,00
	0,10	1,50	1,00	2,00
	0,15	2,00	0,50	1,50
0,10	-	5,50	2,50	1,50
	0,05	2,00	0,00	0,00
	0,10	1,00	1,50	1,50
	0,15	2,50	2,00	1,00
0,15	-	1,50	1,00	0,50
	0,05	1,00	1,00	0,50
	0,10	0,00	1,00	2,00
	0,15	3,00	1,00	0,50
0,20	-	1,00	0,50	1,00
	0,05	2,50	0,50	0,50
	0,10	7,00	4,50	1,00
	0,15	1,50	1,00	0,00

Jako ideální poměr jsme vybrali 0,20 μl Trans-IT PRO Reagens a 0,10 μl Pro BOOST Reagens na jamku (tabulka 20). Hodnotili jsme hlavně první a druhý den od transfekce. Poslední den již buňky měly relativně nízkou viabilitu. Je tedy možné, že nízká účinnost transfekce byla způsobena tímto faktorem.

5.3.3. Výměna média

Výměna média proběhla mezi 16 až 48 hodinami. Bylo použito konstantní množství buněk a to 6×10^5 na jamku a konstantní množství DNA a to 0,1 μg na jamku. Výměnu média jsme zkoušeli při dvou různých poměrech chemických transfekčních reagensů. Doba inkubace transfekční směsi před přidáním k buňkám byla 30 minut. Účinnost transfekce je uváděna jako počet buněk.

Tab. 21. Výměna média.

Čas výměny média (hodiny)	TransIT_PRO $\mu\text{l}/\text{jamka}$	Pro_BOOST $\mu\text{l}/\text{jamka}$	Účinnost transfekce		
			po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
16	0,05	0,00	2,50	0,00	0,00
	0,20	0,10	0,50	16,50	25,00
24	0,05	0,00	2,50	0,00	0,00
	0,20	0,10	3,50	40,50	56,00
48	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,20	0,10	0,00	0,00	0,00
bez výměny	0,05	0,00	2,00	0,00	0,00
	0,20	0,10	2,50	0,00	0,00

Ideální je výměna média po 24 hodinách. Při nižších objemech transfekčních reagensů je účinnost transfekce nižší i přes výměnu média. Proto jsme jako ideální hodnoty vybrali poměr 0,20 μl Trans-IT PRO Reagens a 0,10 μl Pro BOOST Reagens na jamku s výměnou média po 24 hodinách (tabulka 21).

5.3.4. Poměr DNA:transfekční reagens

Množství DNA jsme měnili v rozmezí 0,05 až 0,25 μg na jamku při stejném objemu transfekčních reagens a to 0,20 μl Trans-IT PRO Reagens a 0,10 μl Pro BOOST Reagens na jamku. Inkubace transfekční směsi před přidáním k buňkám byla 30 minut při pokojové teplotě. Experiment jsme prováděli na buňkách o koncentraci 6×10^5 na jamku. Výměna média proběhla po 24 hodinách.

Tab. 22. Poměr DNA:transfekční reagens.

DNA $\mu\text{g}/\text{jamka}$	Účinnost transfekce		
	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
0,05	0,00%	1,71%	1,81%
0,1	0,52%	3,31%	0,91%
0,15	0,22%	2,83%	4,22%
0,2	0,14%	2,26%	1,91%
0,25	0,09%	1,38%	2,71%

Z tabulky je zřejmé, že nejlepší je užití množství 0,15 μg DNA na jamku, pokud pro experiment použijeme 0,20 μl Trans-IT PRO Reagens a 0,10 μl Pro BOOST Reagens na jamku (tabulka 22).

5.3.5. Kondiciované médium

Účinnost transfekce je s použitím kitu TransIT-PRO velmi nízká. Proto jsme se domnívali, že užití kondiciovaného média by ji mohlo zvýšit. Médium jsme měnili po 24 hodinách. Zkoušeli jsme i různá množství DNA v rozmezí 0,05 až 0,25 μg na jamku. Objem transfekčních reagens byl 0,20 μl Trans-IT PRO Reagens a 0,10 μl Pro BOOST Reagens na jamku. Doba inkubace transfekční směsi byla 30 minut při pokojové teplotě.

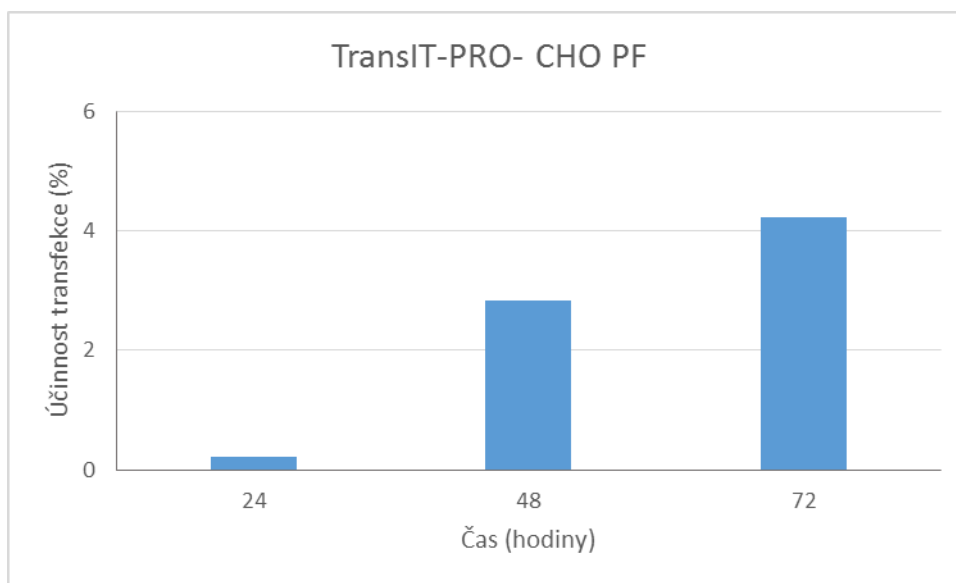
Tab. 23. Kondiciované médium.

Médium	DNA $\mu\text{g}/\text{jamka}$	Účinnost transfekce		
		po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
kondiciované	0,05	46,00	45,00	26,50
čerstvé		35,00	45,00	25,00
kondiciované	0,10	46,50	65,50	40,50
čerstvé		36,00	83,00	65,00
kondiciované	0,15	46,00	71,50	46,50
čerstvé		43,00	90,00	81,00
kondiciované	0,20	32,50	51,50	49,50
čerstvé		40,00	60,00	51,00
kondiciované	0,25	45,00	54,00	52,00
čerstvé		39,00	71,00	40,00

Užití kondiciovaného média bohužel nezvýšilo traksfekční účinnost ani viabilitu buněk (tabulka 23). Proto jsme zůstali u čerstvého média a množství DNA 0,15 μg na jamku.

5.3.6. Ideální podmínky pro transfekci CHO PF

Jako ideální podmínky pro transfekci CHO PF buněčné linie jsme zvolili: počet buněk 6×10^5 na jamku, 0,15 μg DNA, 0,20 μl Trans-IT PRO Reagens a 0,10 μl Pro BOOST Reagens na jamku, inkubace transfekční směsi 30 minut a výměna čerstvého média po 24 hodinách. Pro transfekci byl použit kit Trans IT-PRO.

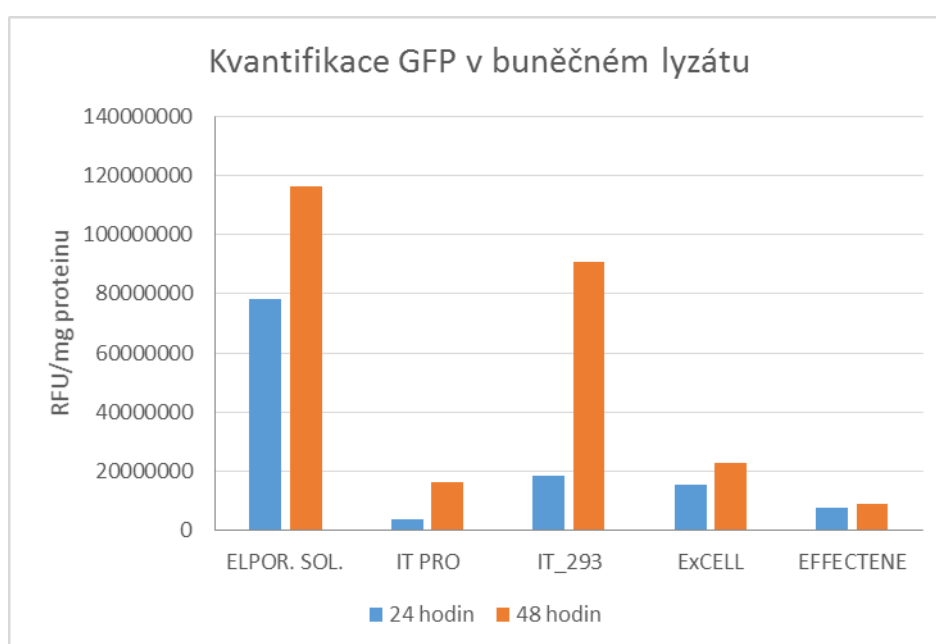


Obr. 8. Transfekční účinnost pro CHO PF buněčnou linii pomocí TransIT-PRO kitu. Transfekční účinnost po 24 hodinách je velmi nízká. Po 48 hodinách dochází k jejímu rapidnímu nárůstu a po 72 hodinách dosahuje nejvyšších hodnot.

Po 24 hodinách byla transfekční účinnost velmi nízká, nedosahovala ani 0,3%. Po výměně média po 24 hodinách můžeme pozorovat vysoký nárůst transfekční účinnosti, který se pohybuje okolo 3%. Výměna média tedy velmi pomohla zvýšit transfekční účinnost, jako tomu bylo i v případě transfekce buněčné linie HEK293 pomocí TransIT-293 Reagent. Po 72 hodinách účinnost transfekce přesahovala 4%.

5.4. Kvantifikace GFP v buněčném lyzátu a porovnání s doposud používanými metodami transfekce

Pro porovnání jsme použili již optimalizované metody pro CHO PF buněčnou linii a to elektroporaci v ExCell ACF CHO médiu a transfekci pomocí Effectene. Tyto doposud používané metody byly srovnány s optimalizovanými metodami a to s elektroporací v Electroporation Solution a transfekcí za pomoci TransIT_PRO kitu pro CHO PF buněčnou linii a transfekcí HEK293 buněčné linie s užitím TransIT-293 Reagent.



Obr. 9. Porovnání transfekční účinnosti nově optimalizovaných metod s doposud používanými metodami. Nejvyšší transfekční účinnosti dosahuje elektroporace v Electroporation Solution jak po 24 hodinách, tak po 48 hodinách. Transfekce CHO PF buněčné linie za pomoci TransIT-PRO kitu dosahuje velmi nízkých hodnot oproti nově optimalizovaným postupům. U transfekce HEK293 buněčné linie můžeme pozorovat vysoký nárůst účinnosti po 48 hodinách oproti 24 hodinám. Elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu a Effectene dosahuje nízkých hodnot ve srovnání s elektroporací v Electroporation Solution a transfekcí TransIT-293.

ELPOR.SOL- 100 μ l Electroporation Solution, CHO PF, 7×10^5 /jamka, DNA 2 μ g/jamka, exponenciální typ pulsu, 250 V, 1000 Ω , 1000 μ F, výměna média po 24 hodinách.

IT PRO- *TransIT_PRO kit, CHO PF, 6×10^5 /jamka, DNA 0,15 μ g/jamka, 0,20 μ l TransIT-PRO Reagens a 0,10 μ l Pro BOOST Reagens/jamka, inkubace 30 minut, výměna média po 24 hodinách.*

IT_293- *TransIT-293 Reagent, HEK293, 5×10^4 /jamka, DNA 0,12 μ g/jamka, 0,96 μ l TransIT-293 Reagent, inkubace 15 minut, výměna média po 24 hodinách.*

ExCELL- *100 μ l Ex-Cell ACF CHO médium, CHO PF, 2×10^4 /jamka, DNA 0,5 μ g/jamka, elektroporace, čtvercový typ pulsu, 280 V, délka 15 ms, počet pulsů 2, zpoždění 1, 2000 μ F.*

EFFECTENE- *Effectene kit, CHO PF, 5×10^4 /jamka, DNA 0,4 μ g/jamka, Enhancer 3,2 μ l/ jamka, Effectene 10 μ l/ jamka, Buffer EC 30 μ l/ jamka.*

Experimenty byly prováděny na 96- jamkové destičce.

Z grafu je patrné, že nejlepší transfekční účinnosti dosahuje elektroporace v Electroporation Solution. Již první a druhý den je účinnost vyšší 4 \times než je tomu v případě elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu. Účinnost je první den 9 \times vyšší, než je tomu v případě užití Effectene a dokonce 12 \times vyšší druhý den.

V případě užití Trans-293 Reagent je účinnost první den vyšší pouze 0,2 \times a druhý den 3,0 \times ve srovnání s elektroporací v Ex-Cell ACF CHO médiu. V porovnání s Effectene je pak účinnost první den 1,5 \times a druhý den 9 \times vyšší.

Transfekce s TransIT_PRO kitem měla první den účinnost 0,8 \times nižší a druhý den nižší 0,3 \times než při užití elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu. Ve srovnání s Effectene je pak účinnost nižší 0,5 \times . Druhý den je již vyšší 0,8 \times ve srovnání s Effectene.

6. DISKUSE

Hlavním cílem této diplomové práce byla optimalizace transfekce eukaryontních buněčných linií a to CHO PF a HEK293. Pro optimalizaci byl použit plazmid kódující GFP, který se za tímto účelem běžně používá (Haleem-Smith et al., 2005). Účinnost transfekce během optimalizace byla hodnocena počítáním za pomoci Neubauerovy komůrky, protože experimentů bylo prováděno mnoho. Pro účely optimalizace je tato metoda levná a dostačující. Závěrečný experiment, kdy jsme porovnávali účinnost transfekce s doposud užívanými metodami s nově optimalizovanými byl proveden metodou kvantifikací GFP v buněčném lyzátu.

V laboratoři byly doposud používány komerční transfekční reagens Effectene a elektroporace v Ex-Cell ACF CHO médiu. Použitím většiny nových optimalizovaných metod lze hned zpočátku získat velké množství úspěšně transfekovaných buněk, což je důležité pro následné procesy, ať již se jedná o transientní produkci nebo selekci produkčních klonů. Další nespornou výhodou je i finanční otázka. Při takto optimalizovaných procesech klesá spotřeba materiálu (buněk, plazmidu, reagens).

Optimalizace transfekce je poměrně zdlouhavý proces, pokud chceme svědomitě vyzkoušet všechny parametry. Největší komplikací bývá často získat buňky v dostatečném množství a kondici, což platí především pro linii HEK293, která v průběhu experimentů často dosahovala nižších než potřebných hodnot viability. Proto bylo nutné kultivace buněk opakovat.

Z výsledků je patrné, že nejúčinnější metoda, kdy by bylo teoreticky možné získat nejvíce proteinů je elektroporace CHO PF buněčné linie v Electroporation Solution. Elektroporace je elegantní a rychlá metoda, při níž běžně nedochází k změnám ve fenotypovém projevu a v expresi genů, jako tomu může být při užití metod, kdy dochází k torbě liposomů a při užití virových vektorů (Fedorov et al., 2005). Lze ji aplikovat pro vnesení genů nebo dokonce i proteinů do primokultur (Li et al., 2013). Jako vše i tato metoda má svá negativa. Je nutné používat vyšší koncentrace buněk. Při nízkých koncentracích po aplikaci pulsu jich přežije jen velmi málo. To může být velmi nevýhodné, pokud pracujeme s těžko kultivovatelnými buněčnými kulturami. Nelze však užit ani příliš vysoké koncentrace buněk. Při vysokých koncentracích dochází při aplikaci pulsu k tvorbě shluků, kterými velmi těžko proniká plazmid do buněk. Další

negativum se týká množství spotřebované DNA. V porovnání s jinými metodami, se jí na elektroporaci spotřebuje nejvíce (Jordan et al., 2008; Li et al., 2013; Martinez and Hollenbeck, 2003).

Při optimalizaci elektroporace na CHO PF buněčné linii, bylo nutné nejprve vybrat ideální typ pulsu se všemi parametry s nimi souvisejícími. Bylo nutné podmínky optimalizovat tak, aby byla účinnost transfekce co nejvyšší, ne však na úkor snížení viability buněk. Bylo zajímavé pozorovat, že pokud jsme zvýšili napětí nad 250 V, docházelo sice k zvýšení transfekční účinnosti avšak také k rapidnímu snížení viability buněk. Účinnost elektroporace se běžně pohybuje mezi 8 až 80% již první den. Záleží pak na typu buněk a na dalších podmínkách elektroporace (Parham et al., 1998). Proto bych námi optimalizované podmínky, kdy jsme první den dosáhli účinnosti okolo 40% a třetí den již přesahovala 55%, považovala za úspěšné (obrázek 6). Zajímavé bylo zjištění, že při dvojnásobném množství DNA, tedy 4 μg na jamku se účinnost transfekce zvýšila pouze o 2,5%, tedy na 57% z původních 54,5%, kdy jsme použili 2 μg DNA na jamku po 72 hodinách (tabulka 13). Navyšování množství použité DNA je v tomto případě neefektivní a neekonomické.

Nespornou výhodou elektroporace za užití Electroporation Solution s řádně optimalizovanými parametry spatřuji v tom, že účinnost transfekce bylo možné sledovat již po 4 hodinách po jejím ukončení. To nebylo možné, pokud jsme pro elektroporaci užili Ex-Cell ACF CHO kultivační médium, kdy po 4 hodinách ještě nebylo možné pozorovat fluorescenci. Z publikací vyplývá, že HEK293 buněčná linie je také vhodná pro metodu elektroporace, kde třetí den účinnost transfekce dosahuje 70% až 80% (Cervera et al., 2013; Parham et al., 1998). Obecně platí, že produkce rekombinantních proteinů v HEK293 buněčné linii, dosahujeme vyšších výtěžků rekombinantních proteinů ve srovnání s produkcí v CHO linii. Proto by bylo vhodné optimalizovat podmínky elektroporace i pro HEK293 buněčnou linii (Bertschinger et al., 2008; Derouazi et al., 2004; Galbraith et al., 2006).

Mnohem více než elektroporace se užívají chemické metody transfekce. Nejčastěji se setkáváme s polyethyleniminem a jeho modifikacemi jako účinným doručovatelem DNA do buněk. Při užití této metody je možné v některých případech zaznamenat po 48 hodinách na HEK293 buněčné linii až 90% transfekční účinnost ovšem za cenu vysoké spotřeby polyethyleniminu a plazmidu o koncentraci 1 mg/ml (Carpentier et

al., 2007). Optimalizace chemické transfekce trvá obecně déle, než optimalizace elektroporace a navíc chemické reagenty mají velmi často cytotoxický účinek na buňky, pokud jsou používány ve vysokých koncentracích (Synatschke et al., 2011). Proto je velmi těžké vybrat správný poměr chemické reagens a DNA, aby byla transfekční účinnost co nejvyšší s co nejnižší toxicitou pro buňky. Při chemické transfekci velmi často pomáhá odmyt transfekční reagens kolem 24 hodin. Pak lze toxický vliv na buňky minimalizovat se zachováním maximální efektivity. Pro transfekci za pomoci chemických metod požíváme méně buněk, než je tomu tak při elektroporaci, což může být obrovská výhoda, pokud chceme transfekovat těžko kultivovatelné buněčné linie.

Zástupce chemických reagentů TransIT-293 Reagent, který byl použit v této diplomové práci, je určen pro transfekci HEK293 buněčné linie. Používá se převážně pro studie iontových kanálů a receptorů na buněčném povrchu, proto nemohu vést žádná data pro srovnání (Talavera et al., 2004; Vriens et al., 2004). Ovšem může také velmi dobře posloužit za účelem optimalizace transfekce, která by mohla vést k produkci rekombinantních proteinů, jak jsme se mohli přesvědčit při dosažení transfekční účinnosti po 24 hodinách pohybovala 12%, 40% po 48 hodinách a po 72 hodinách dosahovala 50% po 72 (obrázek 7).

Dalším zástupcem chemických reagentů je TransIT_PRO kit, který slouží k transfekci jak CHO PF, tak HEK293 buněčné linie. Jedná se o směs lipidových polymerů, která vytvoří s DNA micelu nezbytnou pro její transport do buňky. Lipofekce s užitím jiných komerčních kitů může dosáhnout až 40% účinnosti druhý den, pokud je aplikována na primokultury například buněk izolovaných z endotelu pupečnickové žíly (Hunt et al., 2010). Z výsledků optimalizace, kdy se nám podařilo dosáhnout účinnosti transfekce o něco vyšší než 4% by se dalo říci, že TransIT_PRO kit není vhodný pro transfekci CHO PF buněčné linie. Navíc účinnost transfekce se během jednotlivých experimentů výrazně lišila. Pouze při jednom experimentu bylo možné transfekci hodnotit v procentech (tabulka 22) a v ostatních pouze jako počet buněk (tabulky 19, 20, 21, 23). Takový výrazný rozdíl nás může navést k tomu, abychom transfekční kit vyzkoušeli na buněčné linii HEK293. Pokud bychom chtěli zůstat u práce s CHO PF buněčnou linií, bylo by vhodné vyzkoušet jiné komerčně dostupné kity na bázi lipidů. Ovšem užití většiny kitů a reagentů, které jsou založené na bázi lipidů určených pro

transfekci CHO buněčných linií dosahuje maximálně 16% účinnosti a to až třetí den po provedení transfekce (Reisinger et al., 2007).

V případě již zavedené metody Effectene, která využívá záporně nabitých lipidů je pro CHO PF buněčnou linií účinnost opravdu nízká. Je tomu tak s podivem, protože se tato metoda běžně používá pro transfekce primokultury buněk izolovaných z endotelu pupečnickové žíly s účinností okolo 15% druhý den po transfekci (Hunt et al., 2010).

Obě buněčné linie je možné kultivovat při vysokých koncentracích, proto je možné jejich převedení do velkých objemů. Jedním z řešení, které by splnilo tyto podmínky je jejich kultivace v bioreaktorech (Gaillet et al., 2010). Jeho užití by mohlo přispět ke zvýšenému výtěžku rekombinantních proteinů, ovšem na úkor vysoké spotřeby transfekčních reagens a plazmidu. Bylo by však možné buňky transfekovat v menších objemech a až dosáhnou potřebné koncentrace, tak je převést do bioreaktoru. Takový proces by byl však velmi zdlouhavý a nejspíše i finančně náročnější než doposud používaná produkce v menších objemech.

Pokud bychom změnili strategii a chemické reagensie nebo elektroporaci nahradili jinými metodami, bylo by možné dosahovat vyšší účinnosti transfekce. Jako to například případ užití lentivirů, jako vektorů, které doručí DNA do buňky. Lentiviry mají schopnost napadat jak dělicí se buňky, tak ty, které se nedělí (Lever et al., 2004). Jejich užitím lze získat buňky, jejichž účinnost transfekce je až 95% a v některých případech dokonce tuto hodnotu přesahuje. Bohužel dodnes panují obavy, zda jsou virové vektory opravdu biologicky bezpečné (Gaillet et al., 2010).

Obě buněčné linie byly kultivovány bez přídavku séra a bez antibiotik. Buňky byly kultivovány bez přídavku antibiotik, hlavně proto, aby nedošlo ke skryté kontaminaci bakteriemi z okolí. Taková kontaminace by mohla změnit metabolismus buněk a tím pádem i změny v účinnosti transfekce. Séra nebylo do kultivačních médií přidáváno záměrně, protože jejich jednotlivé šarže se mezi sebou mohou lišit ve složení, což by mohlo výrazně měnit růst kultur mezi jednotlivými experimenty, proto by nebylo možné s jejich užitím podmínky řádně optimalizovat. Je však možné, že při kultivaci buněčných kultur s přídavkem sér stejné šarže, by se mohla zlepšit účinnost transfekce a buňky by se po transfekci lépe zotavovaly. Výrobci transfekčních kitů doporučují pracovat s buňkami, které mají viabilitu vyšší než 90% s co nejnižší pasáží. Někdy je velmi obtížné těchto podmínek dosáhnout. Buňkám s nižší viabilitou pomáhá pasáž

s částečnou nebo úplnou výměnou média. Než dostaneme buňky do správné kondice, mohou mezitím projít několika pasážemi. Dostaneme pak buňky s lepší viabilitou avšak na úkor nárůstu čísla pasáže. Přídavek séra má na buňky velmi dobrý vliv, proto je možné že jeho přídavek by odstranil problém špatné viability a zbytečného zvyšování čísla pasáže.

7. ZÁVĚR

V průběhu diplomové práce se podařilo dosáhnout vytčených cílů. Podařilo se nám optimalizovat podmínky pro CHO PF a HEK293 buněčné linie za pomoci 3 komerčně dostupných kitů. Následně se nám podařilo porovnat nově optimalizované transfekční postupy s těmi, které byly doposud používány ve firmě Generi biotech s.r.o. S užitím nově optimalizovaných transfekčních postupů se nám ve většině případů podařilo dosáhnout vyšší účinnosti transfekce v srovnání s doposud používanými postupy.

Při užití optimálních podmínek pro elektropráci CHO PF buněčné linie za pomoci Electroporation Solution jsme dosahovali nejvyšší účinnosti transfekce 55% po 72 hodinách (obrázek 6) a ve srovnání s doposud používanými metodami byla účinnost transfekce 4 × vyšší než při elektroporaci v Ex-Cell ACF CHO médiu a 12 × vyšší než transfekce s Effectene po 48 hodinách (obrázek 9). Pro transfekci HEK293 buněčné linie byla účinnost transfekce po 72 hodinách rovna 50% (obrázek 7). V porovnání s doposud používanými metodami pak byla účinnost transfekce po 48 hodinách 3 × vyšší než elektroporace v Ex-Cell ACF CHO a 9 × vyšší než transfekce s Effectene (obrázek 9). Tyto dvě optimalizace považujeme po srovnání s doposud používanými metodami, za úspěšné a proto nahradí doposud používané postupy.

Optimalizace transfekce CHO PF za pomoci TransIT_PRO kit dosahovala pouze 4% po 72 hodinách a účinnost transfekce byla 0,5 × nižší než elektroporaci v Ex-Cell ACF CHO médiu a pouze 0,8 × vyšší ve srovnání s Effectene (obrázek 9). Proto tato metoda nebude zavedena do laboratoře.

Nově optimalizované postupy a to elektroporace CHO PF buněčné linie v Electroporation Solution a transfekce HEK293 za pomoci TransIT-293 Reagent nahradí doposud používané metody. Optimalizace by následně měly vést k efektivnější a vyšší výtěžnosti při produkci rekombinantních proteinů.

8. SEZNAM ZKRATEK A CIZÍCH NÁZVŮ

μ F- Faraday

CCLR-lyzační pufr

CFP-modrý fluorescenční protein

CMV-cytomegalovirus

CO₂-oxid uhličitý

DEAE-dextran diethylaminoethyl-dextran

DMSO-dimetylsulfoxid

DNA-deoxyribonukleová kyselina

DOTMA-N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorid

GFP-zelený fluorescenční protein

HEK293-buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293

HEPES-fosfátový pufr obsahující 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonovou kyselinu

CHO-PF-buněčná linie křeččích vaječníků

kbp-kilobáze

kD-kilodalton

OECD- Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj

PBS-fosfátový pufr

PEI-polyethylenimin

Pluoronic P-68

RFU-relativní fluorescence

Rpm-otáčky za minutu

V- Volt

Viabilita- životaschopnost buněk

Virus SV40- opičí virus

YFP-žlutý fluorescenční protein

Ω - Ohm

9. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Aghayan, H. R., B. Arjmand, A. Norouzi-Javidan, H. Saberi, M. Soleimani, S. A. Tavakoli, A. Khodadadi, N. Tirgar, and F. Mohammadi-Jahani, 2012, Clinical grade cultivation of human Schwann cell, by the using of human autologous serum instead of fetal bovine serum and without growth factors: *Cell Tissue Bank.*, v. 13, no. 2, p. 281-285.
2. Almo, S. C., and J. D. Love, 2014, Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production: *Curr.Opin.Struct.Biol.*, v. 26C, p. 39-43.
3. Alvin, K., and J. Ye, 2014, Generation of cell lines for monoclonal antibody production: *Methods Mol.Biol.*, v. 1131, p. 263-271.
4. Andre, F., and L. M. Mir, 2004, DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications: *Gene Ther.*, v. 11 Suppl 1, p. S33-S42.
5. Anonym 1, 2014, OECD: Biotechnology policies - Statistical Definition of Biotechnology: <http://www.oecd.org/health/biotech/statisticaldefinitionofbiotechnology.htm>, dostupné 4.5.2014.
6. Anonym 2, 2014, Public Health of England- Culture Collections: http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85051005&collection=ecacc_gc, p. dostupné 9.5.2014.
7. Anonym 3, 2014, Cell search system: http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=RCB1637, dostupné 9.5.2014.
8. Anonym 4, 2014, Catalog 2005, Lonza: http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/amaxa_Catalog_2005.pdf, dostupné 9.5.2014.
9. Anonym 5, 2014, Green Fluorescent Protein: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>, dostupné 4.5.2014.
10. Apaolaza, P. S., D. Delgado, A. D. Pozo-Rodriguez, A. R. Gascon, and M. A. Solinis, 2014, A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases: *Int.J.Pharm.*.
11. Avalos, V., I. P. Emge, P. Miermeister, M. Chabria, R. Konradi, V. Vogel, and J. Moller, 2013, Fluorescence-based in situ assay to probe the viability and growth kinetics of surface-adhering and suspended recombinant bacteria: *Biointerphases.*, v. 8, no. 1, p. 21.
12. Babaeipour, V., S. A. Shojaosadati, and N. Maghsoudi, 2013, Maximizing Production of Human Interferon-gamma in HCDC of Recombinant E. coli: *Iran J.Pharm.Res.*, v. 12, no. 3, p. 563-572.
13. Baldi, L., D. L. Hacker, M. Adam, and F. M. Wurm, 2007, Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives: *Biotechnol.Lett.*, v. 29, no. 5, p. 677-684.

14. Barker, M., B. Billups, and M. Hamann, 2009, Focal macromolecule delivery in neuronal tissue using simultaneous pressure ejection and local electroporation: *J.Neurosci.Methods*, v. 177, no. 2, p. 273-284.
15. Baumann, K., N. Adelantado, C. Lang, D. Mattanovich, and P. Ferrer, 2011, Protein trafficking, ergosterol biosynthesis and membrane physics impact recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*: *Microb.Cell Fact.*, v. 10, p. 93.
16. Beghin, D., J. L. Delongueas, N. Claude, F. Forestier, R. Farinotti, and S. Gil, 2009, Development and characterisation of a new model of rat trophoblasts: *Toxicol.In Vitro*, v. 23, no. 1, p. 141-147.
17. Bennis, J. M., A. Maheshwari, D. Y. Furgeson, R. I. Mahato, and S. W. Kim, 2001, Folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine-based gene delivery: *J Drug Target*, v. 9, no. 2, p. 123-139.
18. Benveniste, G. L., 2013, Alexis Carrel: the good, the bad, the ugly: *ANZ.J.Surg.*, v. 83, no. 9, p. 609-611.
19. Berks, B. C., F. Sargent, and T. Palmer, 2000, The Tat protein export pathway: *Mol.Microbiol.*, v. 35, no. 2, p. 260-274.
20. Berthois, Y., J. A. Katzenellenbogen, and B. S. Katzenellenbogen, 1986, Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 83, no. 8, p. 2496-2500.
21. Bertschinger, M., A. Schertenleib, J. Cevey, D. L. Hacker, and F. M. Wurm, 2008, The kinetics of polyethylenimine-mediated transfection in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells: *Mol.Biotechnol.*, v. 40, no. 2, p. 136-143.
22. Boer, E., G. Steinborn, G. Kunze, and G. Gellissen, 2007, Yeast expression platforms: *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, v. 77, no. 3, p. 513-523.
23. Bogoslovskaja, E. V., D. V. Glazkova, G. A. Shipulin, and V. V. Pokrovskii, 2012, [Safety of retroviral vectors in gene therapy]: *Vestn.Ross.Akad.Med.Nauk*, no. 10, p. 55-61.
24. Bradley, E., S. Fedigan, T. Webb, M. A. Hollywood, K. D. Thornbury, N. G. McHale, and G. P. Sergeant, 2014, Pharmacological characterization of TMEM16A currents: *Channels (Austin.)*, v. 8, no. 3.
25. Broussard, G. W., and G. F. Hatfull, 2013, Evolution of genetic switch complexity: *Bacteriophage.*, v. 3, no. 1, p. e24186.
26. Budryk, M., T. Cichon, and S. Szala, 2001, Direct in vivo transfer of plasmid DNA into murine tumors: effects of endotoxin presence and transgene localization: *Acta Biochim.Pol.*, v. 48, no. 3, p. 795-800.
27. Butash, K. A., P. Natarajan, A. Young, and D. K. Fox, 2000, Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency: *Biotechniques*, v. 29, no. 3, p. 610-619.

28. Campana, L. G., G. Bertino, C. R. Rossi, A. Occhini, M. Rossi, S. Valpione, and M. Benazzo, 2014a, The value of electrochemotherapy in the treatment of peristomal tumors: *Eur.J.Surg.Oncol.*, v. 40, no. 3, p. 260-262.
29. Campana, L. G., A. Testori, N. Mozzillo, and C. R. Rossi, 2014b, Treatment of metastatic melanoma with electrochemotherapy: *J.Surg.Oncol.*, v. 109, no. 4, p. 301-307.
30. Carpentier, E., S. Paris, A. A. Kamen, and Y. Durocher, 2007, Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells: *J.Biotechnol.*, v. 128, no. 2, p. 268-280.
31. Casper, A. M., D. M. Rosen, and K. D. Rajula, 2012, Sites of genetic instability in mitosis and cancer: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 1267, p. 24-30.
32. Cegovnik, U., and S. Novakovic, 2004, Setting optimal parameters for in vitro electrotransfection of B16F1, SA1, LPB, SCK, L929 and CHO cells using predefined exponentially decaying electric pulses: *Bioelectrochemistry.*, v. 62, no. 1, p. 73-82.
33. Cervera, L., S. Gutierrez-Granados, M. Martinez, J. Blanco, F. Godia, and M. M. Segura, 2013, Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium: *J.Biotechnol.*, v. 166, no. 4, p. 152-165.
34. Chen, J., M. Jin, Z. G. Qiu, C. Guo, Z. L. Chen, Z. Q. Shen, X. W. Wang, and J. W. Li, 2012, A survey of drug resistance bla genes originating from synthetic plasmid vectors in six Chinese rivers: *Environ.Sci.Technol.*, v. 46, no. 24, p. 13448-13454.
35. Cheng, J., L. Pinnell, K. Engel, J. D. Neufeld, and T. C. Charles, 2014, Versatile broad-host-range cosmids for construction of high quality metagenomic libraries: *J.Microbiol.Methods*, v. 99, p. 27-34.
36. Clem, R. J., and A. L. Passarelli, 2013, Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects: *PLoS.Pathog.*, v. 9, no. 11, p. e1003729.
37. Clewell, D. B., K. E. Weaver, G. M. Dunny, T. M. Coque, M. V. Francia, and F. Hayes, 2014, Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology.
38. Cohen, S. N., A. C. Chang, H. W. Boyer, and R. B. Helling, 1973, Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 70, no. 11, p. 3240-3244.
39. Cregg, J. M., I. Tolstorukov, A. Kusari, J. Sunga, K. Madden, and T. Chappell, 2009, Expression in the yeast *Pichia pastoris*: *Methods Enzymol.*, v. 463, p. 169-189.
40. Dahms, A. S., 2004, Biotechnology: What it is, what it is not, and the challenges in reaching a national or global consensus: *Biochem.Mol.Biol.Educ.*, v. 32, no. 4, p. 271-278.
41. Daniell, H., S. J. Streatfield, and K. Wycoff, 2001, Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants: *Trends Plant Sci.*, v. 6, no. 5, p. 219-226.

42. Daramola, O., J. Stevenson, G. Dean, D. Hatton, G. Pettman, W. Holmes, and R. Field, 2014, A high-yielding CHO transient system: coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression: *Biotechnol.Prog.*, v. 30, no. 1, p. 132-141.
43. Derouazi, M., P. Girard, T. F. Van, K. Iglesias, N. Muller, M. Bertschinger, and F. M. Wurm, 2004, Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells: *Biotechnol.Bioeng.*, v. 87, no. 4, p. 537-545.
44. Doh, J. H., S. Lutz, and M. J. Curcio, 2014, Co-translational Localization of an LTR-Retrotransposon RNA to the Endoplasmic Reticulum Nucleates Virus-Like Particle Assembly Sites: *PLoS.Genet.*, v. 10, no. 3, p. e1004219.
45. Duguid, J. G., and V. A. Bloomfield, 1996, Electrostatic effects on the stability of condensed DNA in the presence of divalent cations: *Biophys.J.*, v. 70, no. 6, p. 2838-2846.
46. Dyachok, J., J. A. Sparks, F. Liao, Y. S. Wang, and E. B. Blancaflor, 2014, Fluorescent protein-based reporters of the actin cytoskeleton in living plant cells: fluorophore variant, actin binding domain and promoter considerations: *Cytoskeleton (Hoboken.)*.
47. Escoffre, J. M., T. Portet, L. Wasungu, J. Teissie, D. Dean, and M. P. Rols, 2009, What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues: *Mol.Biotechnol.*, v. 41, no. 3, p. 286-295.
48. Eshita, Y., J. Higashihara, M. Onishi, M. Mizuno, J. Yoshida, T. Takasaki, N. Kubota, and Y. Onishi, 2009, Mechanism of introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-dextran-MMA graft copolymer as non-viral gene carrier: *Molecules.*, v. 14, no. 7, p. 2669-2683.
49. Fedorov, Y., A. King, E. Anderson, J. Karpilow, D. Ilsley, W. Marshall, and A. Khvorova, 2005, Different delivery methods-different expression profiles: *Nat.Methods*, v. 2, no. 4, p. 241.
50. Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen, 1987, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 84, no. 21, p. 7413-7417.
51. Figler, H., R. A. Olsson, and J. Linden, 2003, Allosteric enhancers of A1 adenosine receptors increase receptor-G protein coupling and counteract Guanine nucleotide effects on agonist binding: *Mol.Pharmacol.*, v. 64, no. 6, p. 1557-1564.
52. Fiore, M., R. Zanier, and F. Degrassi, 2002, Reversible G(1) arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese hamster cells: *Mutagenesis*, v. 17, no. 5, p. 419-424.
53. Fischer, D., T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsasser, and T. Kissel, 1999, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity: *Pharm.Res.*, v. 16, no. 8, p. 1273-1279.
54. Fischer, D., Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Kriegelstein, and T. Kissel, 2003, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis: *Biomaterials*, v. 24, no. 7, p. 1121-1131.
55. Fredj, S., K. J. Sampson, H. Liu, and R. S. Kass, 2006, Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action: *Br.J.Pharmacol.*, v. 148, no. 1, p. 16-24.

56. Gaffney, P. J., and A. D. Curtis, 1985, A collaborative study of a proposed international standard for tissue plasminogen activator (t-PA): *Thromb.Haemost.*, v. 53, no. 1, p. 134-136.
57. Gaillet, B., R. Gilbert, S. Broussau, A. Pilotte, F. Malenfant, A. Mullick, A. Garnier, and B. Massie, 2010, High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch: *Biotechnol.Bioeng.*, v. 106, no. 2, p. 203-215.
58. Galbraith, D. J., A. S. Tait, A. J. Racher, J. R. Birch, and D. C. James, 2006, Control of culture environment for improved polyethylenimine-mediated transient production of recombinant monoclonal antibodies by CHO cells: *Biotechnol.Prog.*, v. 22, no. 3, p. 753-762.
59. Gallo, S. A., A. Sen, M. L. Hensen, and S. W. Hui, 2002, Temperature-dependent electrical and ultrastructural characterizations of porcine skin upon electroporation: *Biophys.J.*, v. 82, no. 1 Pt 1, p. 109-119.
60. Garcia-Sanchez, T., M. Guitart, J. Rosell-Ferrer, A. M. Gomez-Foix, and R. Bragos, 2014, A new spiral microelectrode assembly for electroporation and impedance measurements of adherent cell monolayers: *Biomed.Microdevices.*
61. Gehl, J., 2003, Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research: *Acta Physiol Scand.*, v. 177, no. 4, p. 437-447.
62. Goh, J. S. et al., 2014, Highly sialylated recombinant human erythropoietin production in large-scale perfusion bioreactor utilizing CHO-gmt4 (JW152) with restored GnT I function: *Biotechnol.J.*, v. 9, no. 1, p. 100-109.
63. Grady, L. M., P. Bai, and S. K. Weller, 2014, HSV-1 Protein Expression Using Recombinant Baculoviruses: *Methods Mol.Biol.*, v. 1144, p. 293-304.
64. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn, 1977, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5: *J.Gen.Virol.*, v. 36, no. 1, p. 59-74.
65. Gulick, T., 2003, Transfection using DEAE-dextran: *Curr.Protoc.Cell Biol.*, v. Chapter 20, p. Unit.
66. Guo, P. et al., 2013, Specific transduction and labeling of pancreatic ducts by targeted recombinant viral infusion into mouse pancreatic ducts: *Lab Invest*, v. 93, no. 11, p. 1241-1253.
67. Ha, T. K., M. K. Jeon, d. Y. Yu, and G. M. Lee, 2013, Effect of Bcl-x(L) overexpression on lactate metabolism in chinese hamster ovary cells producing antibody: *Biotechnol.Prog.*, v. 29, no. 6, p. 1594-1598.
68. Haleem-Smith, H., A. Derfoul, C. Okafor, R. Tuli, D. Olsen, D. J. Hall, and R. S. Tuan, 2005, Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro: *Mol.Biotechnol.*, v. 30, no. 1, p. 9-20.
69. Hari, M., Y. Wang, S. Veeraraghavan, and F. Cabral, 2003, Mutations in alpha- and beta-tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine: *Mol.Cancer Ther.*, v. 2, no. 7, p. 597-605.
70. Hartikka, J. et al., 2000, Sodium phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo: *Gene Ther.*, v. 7, no. 14, p. 1171-1182.

71. Hassan, M. A., I. S. Ahmed, P. Campbell, and T. Kondo, 2012, Enhanced gene transfection using calcium phosphate co-precipitates and low-intensity pulsed ultrasound: *Eur.J.Pharm.Sci.*, v. 47, no. 4, p. 768-773.
72. Huang, H. et al., 2011, An efficient and high-throughput electroporation microchip applicable for siRNA delivery: *Lab Chip.*, v. 11, no. 1, p. 163-172.
73. Huang, X., A. V. Hartley, Y. Yin, J. H. Herskowitz, J. J. Lah, and K. J. Ressler, 2013, AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications: *J.Virol.Methods*, v. 193, no. 2, p. 270-277.
74. Hunt, M. A., M. J. Currie, B. A. Robinson, and G. U. Dachs, 2010, Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents: *J.Biomol.Tech.*, v. 21, no. 2, p. 66-72.
75. Igawa, K., N. Ohara, A. Kawakubo, K. Sugimoto, K. Yanagiguchi, T. Ikeda, S. Yamada, and Y. Hayashi, 2014, D-Glucosamine Promotes Transfection Efficiency during Electroporation: *Biomed.Res.Int.*, v. 2014, p. 485867.
76. Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, and H. W. Boyer, 1977, Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin: *Science*, v. 198, no. 4321, p. 1056-1063.
77. Izadi, M., M. Abiri, and M. Keramatipour, 2009, Producing a Mammalian GFP Expression Vector Containing Neomycin Resistance Gene: *Avicenna.J.Med.Biotechnol.*, v. 1, no. 1, p. 33-36.
78. Jackson, D. A., R. H. Symons, and P. Berg, 1972, Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 69, no. 10, p. 2904-2909.
79. Jager, V., K. Bussow, A. Wagner, S. Weber, M. Hust, A. Frenzel, and T. Schirrmann, 2013, High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells: *BMC.Biotechnol.*, v. 13, no. 1, p. 52.
80. Jeong, T. H. et al., 2014, Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*: *Protein Expr.Purif.*, v. 95, p. 211-218.
81. Jere, D., H. L. Jiang, R. Arote, Y. K. Kim, Y. J. Choi, M. H. Cho, T. Akaike, and C. S. Cho, 2009, Degradable polyethylenimines as DNA and small interfering RNA carriers: *Expert.Opin.Drug Deliv.*, v. 6, no. 8, p. 827-834.
82. Jordan, E. T., M. Collins, J. Terefe, L. Ugozzoli, and T. Rubio, 2008, Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells: *J.Biomol.Tech.*, v. 19, no. 5, p. 328-334.
83. Kallel, H., A. Jouini, S. Majoul, and S. Rourou, 2002, Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells: *J.Biotechnol.*, v. 95, no. 3, p. 195-204.

84. Kanduser, M., M. Sentjurc, and D. Miklavcic, 2008, The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization: *Bioelectrochemistry.*, v. 74, no. 1, p. 52-57.
85. Kay, M. A., J. C. Glorioso, and L. Naldini, 2001, Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics: *Nat.Med.*, v. 7, no. 1, p. 33-40.
86. Kedika, B., and S. V. Patri, 2014, Benzothiazole head group based cationic lipids: Synthesis and application for gene delivery: *Eur.J.Med.Chem.*, v. 74, p. 703-716.
87. Kildegaard, H. F., D. Baycin-Hizal, N. E. Lewis, and M. J. Betenbaugh, 2013, The emerging CHO systems biology era: harnessing the 'omics revolution for biotechnology: *Curr.Opin.Biotechnol.*, v. 24, no. 6, p. 1102-1107.
88. Kirsch, P., M. Hafner, H. Zentgraf, and L. Schilling, 2003, Time course of fluorescence intensity and protein expression in HeLa cells stably transfected with hrGFP: *Mol.Cells*, v. 15, no. 3, p. 341-348.
89. Kiss, E., Z. Kuluncsics, Z. Kiss, and G. Poor, 2010, [Biotechnological advances in monoclonal antibody therapy: the RANK ligand inhibitor antibody]: *Orv.Hetil.*, v. 151, no. 52, p. 2137-2144.
90. Kotnik, T., G. Pucihar, and D. Miklavcic, 2010, Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport: *J.Membr.Biol.*, v. 236, no. 1, p. 3-13.
91. Lant, B., and W. B. Derry, 2014, Fluorescent Visualization of Germline Apoptosis in Living *Caenorhabditis elegans*: *Cold Spring Harb.Protoc.*, v. 2014, no. 4.
92. Lever, A. M., P. M. Strappe, and J. Zhao, 2004, Lentiviral vectors: *J.Biomed.Sci.*, v. 11, no. 4, p. 439-449.
93. Li, F., K. Yamaguchi, K. Okada, K. Matsushita, N. Enatsu, K. Chiba, H. Yue, and M. Fujisawa, 2013, Efficient transfection of DNA into primarily cultured rat sertoli cells by electroporation: *Biol.Reprod.*, v. 88, no. 3, p. 61.
94. Li, X., G. Zhang, N. Ngo, X. Zhao, S. R. Kain, and C. C. Huang, 1997, Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 45, p. 28545-28549.
95. Liu, C., B. Dalby, W. Chen, J. M. Kilzer, and H. C. Chiou, 2008, Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells: *Mol.Biotechnol.*, v. 39, no. 2, p. 141-153.
96. Liu, R., D. Ren, Y. Liu, Y. Deng, B. Sun, Q. Zhang, and X. Guo, 2011, Biosensors of DsRed as FRET partner with CFP or GFP for quantitatively imaging induced activation of Rac, Cdc42 in living cells: *Mol.Imaging Biol.*, v. 13, no. 3, p. 424-431.
97. Lohman, G. J., L. Chen, and T. C. Evans, Jr., 2011, Kinetic characterization of single strand break ligation in duplex DNA by T4 DNA ligase: *J.Biol.Chem.*, v. 286, no. 51, p. 44187-44196.

98. Lu, X., X. Jin, Y. Huang, J. Wang, J. Shen, F. Chu, H. Mei, Y. Ma, and J. Zhu, 2014, Construction of a novel liver-targeting fusion interferon by incorporation of a Plasmodium region I-plus Peptide: *Biomed.Res.Int.*, v. 2014, p. 261631.
99. Macgregor, R. B., and G. M. Poon, 2003, The DNA double helix fifty years on: *Comput.Biol.Chem.*, v. 27, no. 4-5, p. 461-467.
100. Marinus, M. G., and A. R. Poteete, 2013, High efficiency generalized transduction in *Escherichia coli* O157:H7: *F1000Res.*, v. 2, p. 7.
101. Martinez, C. Y., and P. J. Hollenbeck, 2003, Transfection of primary central and peripheral nervous system neurons by electroporation: *Methods Cell Biol.*, v. 71, p. 339-351.
102. McLenachan, S., D. Zhang, A. B. Palomo, M. J. Edel, and F. K. Chen, 2013, mRNA transfection of mouse and human neural stem cell cultures: *PLoS.One.*, v. 8, no. 12, p. e83596.
103. Mergulhao, F. J., D. K. Summers, and G. A. Monteiro, 2005, Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*: *Biotechnol.Adv.*, v. 23, no. 3, p. 177-202.
104. Meselson, M., and R. Yuan, 1968, DNA restriction enzyme from *E. coli*: *Nature*, v. 217, no. 5134, p. 1110-1114.
105. Miller, A. D., 2014, Retroviral vector production: *Curr.Protoc.Hum.Genet.*, v. 80, p. Unit.
106. Misra, S., 2013, Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution: *J.Assoc.Physicians India*, v. 61, no. 2, p. 127-133.
107. Morris, J. B., and W. J. Schirmer, 1990, The "right stuff": five Nobel Prize-winning surgeons: *Surgery*, v. 108, no. 1, p. 71-80.
108. Neu, M., D. Fischer, and T. Kissel, 2005, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives: *J.Gene Med.*, v. 7, no. 8, p. 992-1009.
109. Nguyen, L. T., K. Atobe, J. M. Barichello, T. Ishida, and H. Kiwada, 2007, Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes: *Biol.Pharm.Bull.*, v. 30, no. 4, p. 751-757.
110. Noskov, V. N., R. Y. Chuang, D. G. Gibson, S. H. Leem, V. Larionov, and N. Kouprina, 2011, Isolation of circular yeast artificial chromosomes for synthetic biology and functional genomics studies: *Nat.Protoc.*, v. 6, no. 1, p. 89-96.
111. Olajide, O. A., R. Velagapudi, U. P. Okorji, S. D. Sarker, and B. L. Fiebich, 2014, *Picralima nitida* seeds suppress PGE2 production by interfering with multiple signalling pathways in IL-1beta-stimulated SK-N-SH neuronal cells: *J.Ethnopharmacol.*, v. 152, no. 2, p. 377-383.
112. Onishi, Y., Y. Eshita, A. Murashita, M. Mizuno, and J. Yoshida, 2007, Characteristics of DEAE-dextran-MMA graft copolymer as a nonviral gene carrier: *Nanomedicine.*, v. 3, no. 3, p. 184-191.
113. Parham, J. H., M. A. Iannone, L. K. Overton, and J. T. Hutchins, 1998, Optimization of transient gene expression in mammalian cells and potential for scale-up using flow electroporation: *Cytotechnology*, v. 28, no. 1-3, p. 147-155.

114. Parvizi, P. et al., 2014, Aspects of nonviral gene therapy: correlation of molecular parameters with lipoplex structure and transfection efficacy in pyridinium-based cationic lipids: *Int.J.Pharm.*, v. 461, no. 1-2, p. 145-156.
115. Porowinska, D., M. Wujak, K. Roszek, and M. Komoszynski, 2013, [Prokaryotic expression systems]: *Postepy Hig.Med.Dosw.(Online.)*, v. 67, p. 119-129.
116. Puck, T. T., and F. T. Kao, 1967, Genetics of somatic mammalian cells. V. Treatment with 5-bromodeoxyuridine and visible light for isolation of nutritionally deficient mutants: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 58, no. 3, p. 1227-1234.
117. Qu, B., Y. Gu, J. Shen, J. Qin, J. Bao, Y. Hu, W. Zeng, and W. Dong, 2014, Trehalose maintains vitality of mouse epididymal epithelial cells and mediates gene transfer: *PLoS.One.*, v. 9, no. 3, p. e92483.
118. Rabert, C., D. Weinacker, A. Pessoa, Jr., and J. G. Farias, 2013, Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system: *Braz.J.Microbiol.*, v. 44, no. 2, p. 351-356.
119. Rahimpour, A., B. Vaziri, R. Moazzami, L. Nematollahi, F. Barkhordari, L. Kokabee, A. Adeli, and F. Mahboudi, 2013, Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: effects of CERT and XBP1s genes: *J.Microbiol.Biotechnol.*, v. 23, no. 8, p. 1116-1122.
120. Reichert, V. C., V. Seltzer, L. S. Efferen, and N. Kohn, 2004, Women and tobacco dependence: *Med.Clin.North Am.*, v. 88, no. 6, p. 1467-81, x.
121. Reisinger, H., E. Sevcsik, K. Vorauer-Uhl, K. Lohner, H. Katinger, and R. Kunert, 2007, Serum-free transfection of CHO-cells with tailor-made unilamellar vesicles: *Cytotechnology*, v. 54, no. 3, p. 157-168.
122. Rose, J. K., 2003, Optimization of transfection: *Curr.Protoc.Cell Biol.*, v. Chapter 20, p. Unit.
123. Rosenfeld, L., 2002, Insulin: discovery and controversy: *Clin.Chem.*, v. 48, no. 12, p. 2270-2288.
124. Routledge, S. J., 2012, Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity: *Comput.Struct.Biotechnol.J.*, v. 3, p. e201210014.
125. Rusu, D., S. Loret, O. Peulen, J. Mainil, and G. Dandrifosse, 2005, Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures: *BMC.Cell Biol.*, v. 6, p. 42.
126. Sakurai, F., R. Inoue, Y. Nishino, A. Okuda, O. Matsumoto, T. Taga, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. Hashida, 2000, Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression: *J.Control Release*, v. 66, no. 2-3, p. 255-269.
127. Salimzadeh, L., M. Jaberipour, A. Hosseini, and A. Ghaderi, 2013, Non-viral transfection methods optimized for gene delivery to a lung cancer cell line: *Avicenna.J.Med.Biotechnol.*, v. 5, no. 2, p. 68-77.

128. Santi, L., A. Giritch, C. J. Roy, S. Marillonnet, V. Klimyuk, Y. Gleba, R. Webb, C. J. Arntzen, and H. S. Mason, 2006, Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 103, no. 4, p. 861-866.
129. Seccia, V., L. Muscatello, I. Dallan, A. Bajraktari, T. Briganti, S. Ursino, L. Galli, A. Falcone, and S. Sellari-Franceschini, 2014, Electrochemotherapy and its controversial results in patients with head and neck cancer: *Anticancer Res.*, v. 34, no. 2, p. 967-972.
130. Shaw, G., S. Morse, M. Ararat, and F. L. Graham, 2002, Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells: *FASEB J.*, v. 16, no. 8, p. 869-871.
131. Shimomura, O., 2009, Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture): *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, v. 48, no. 31, p. 5590-5602.
132. Siedl, N., S. O. Baumann, M. J. Elser, and O. Diwald, 2012, Particle Networks from Powder Mixtures: Generation of TiO₂-SnO₂ Heterojunctions via Surface Charge-Induced Heteroaggregation: *J.Phys.Chem.C.Nanomater.Interfaces.*, v. 116, no. 43, p. 22967-22973.
133. Smith, H. O., and K. W. Wilcox, 1992, A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. 1970: *Biotechnology*, v. 24, p. 38-50.
134. Sun, M., L. P. Bernard, V. L. Dibona, Q. Wu, and H. Zhang, 2013, Calcium phosphate transfection of primary hippocampal neurons: *J.Vis.Exp.*, no. 81, p. e50808.
135. Sustarsic, M., A. Plochowitz, L. Aigrain, Y. Yuzenkova, N. Zenkin, and A. Kapanidis, 2014, Optimized delivery of fluorescently labeled proteins in live bacteria using electroporation: *Histochem.Cell Biol.*
136. Synatschke, C. V., A. Schallon, V. Jerome, R. Freitag, and A. H. Muller, 2011, Influence of polymer architecture and molecular weight of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) polycations on transfection efficiency and cell viability in gene delivery: *Biomacromolecules.*, v. 12, no. 12, p. 4247-4255.
137. Talavera, K., M. Staes, A. Janssens, G. Droogmans, and B. Nilius, 2004, Mechanism of arachidonic acid modulation of the T-type Ca²⁺ channel α 1G: *J.Gen.Physiol.*, v. 124, no. 3, p. 225-238.
138. Taylor, M. W., J. H. Pipkorn, M. K. Tokito, and R. O. Pozzatti, Jr., 1977, Purine mutants of mammalian cell lines: III. Control of purine biosynthesis in adenine phosphoribosyl transferase mutants of CHO cells: *Somatic.Cell Genet.*, v. 3, no. 2, p. 195-206.
139. Thiel, J., 2014, Development of endosperm transfer cells in barley: *Front Plant Sci.*, v. 5, p. 108.
140. Thomas, P., and T. G. Smart, 2005, HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins: *J.Pharmacol.Toxicol.Methods*, v. 51, no. 3, p. 187-200.
141. Urlaub, G., and L. A. Chasin, 1980, Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 77, no. 7, p. 4216-4220.

142. Venslauskas, M. S., S. Satkauskas, and R. Rodaite-Riseviciene, 2010, Efficiency of the delivery of small charged molecules into cells in vitro: *Bioelectrochemistry.*, v. 79, no. 1, p. 130-135.
143. Vriens, J., H. Watanabe, A. Janssens, G. Droogmans, T. Voets, and B. Nilius, 2004, Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, no. 1, p. 396-401.
144. Wagner, J. M., J. D. Pajeroski, C. L. Daniels, P. M. McHugh, J. A. Flynn, J. W. Balliet, D. R. Casimiro, and S. Subramanian, 2014, Enhanced Production of Chikungunya Virus-Like Particles Using a High-pH Adapted *Spodoptera frugiperda* Insect Cell Line: *PLoS.One.*, v. 9, no. 4, p. e94401.
145. Wang, Y., Y. A. Yu, S. Shabahang, G. Wang, and A. A. Szalay, 2002, Renilla luciferase- Aequorea GFP (Ruc-GFP) fusion protein, a novel dual reporter for real-time imaging of gene expression in cell cultures and in live animals: *Mol.Genet.Genomics*, v. 268, no. 2, p. 160-168.
146. Watson, J. D., and F. H. Crick, 1953a, Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid: *Nature*, v. 171, no. 4361, p. 964-967.
147. Watson, J. D., and F. H. Crick, 1953b, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid: *Nature*, v. 171, no. 4356, p. 737-738.
148. Wright, J. L., M. Jordan, and F. M. Wurm, 2003, Transfection of partially purified plasmid DNA for high level transient protein expression in HEK293-EBNA cells: *J.Biotechnol.*, v. 102, no. 3, p. 211-221.
149. Wu, P., E. DeLassus, D. Patra, W. Liao, and L. J. Sandell, 2013, Effects of serum and compressive loading on the cartilage matrix synthesis and spatiotemporal deposition around chondrocytes in 3D culture: *Tissue Eng Part A*, v. 19, no. 9-10, p. 1199-1208.
150. Wurm, F. M., 2004, Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells: *Nat.Biotechnol.*, v. 22, no. 11, p. 1393-1398.
151. Xie, T. D., and T. Y. Tsong, 1993, Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. V. Effects of DNA topology on surface binding, cell uptake, expression, and integration into host chromosomes of DNA in the mammalian cell: *Biophys.J.*, v. 65, no. 4, p. 1684-1689.
152. Yao, S., D. L. Gutierrez, S. Ring, D. Liu, and G. E. Wise, 2010, Electroporation to deliver plasmid DNA into rat dental tissues: *J.Gene Med.*, v. 12, no. 12, p. 981-989.
153. Yari, K., S. Afzali, H. Mozafari, K. Mansouri, and A. Mostafaie, 2013, Molecular cloning, expression and purification of recombinant soluble mouse endostatin as an anti-angiogenic protein in *Escherichia coli*: *Mol.Biol.Rep.*, v. 40, no. 2, p. 1027-1033.
154. Ye, C., Z. Zhang, Z. Wang, Q. Hua, R. Zhang, and X. Xie, 2014, Identification of a novel small molecule agonist for human GPR3: *J.Pharmacol.Exp.Ther.*.
155. Yu, Y., H. Zeng, S. Lyons, A. Carlson, D. Merlin, A. S. Neish, and A. T. Gewirtz, 2003, TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism: *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, v. 285, no. 2, p. G282-G290.

156. Zaniboni, A. et al., 2014, Cells derived from porcine aorta tunica media show mesenchymal stromal-like cell properties in in vitro culture: *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 306, no. 4, p. C322-C333.
157. Zoidis, G., A. Sandoval, J. B. Pineda-Farias, V. Granados-Soto, and R. Felix, 2014, Anti-allodynic effect of 2-(aminomethyl)adamantane-1-carboxylic acid in a rat model of neuropathic pain: A mechanism dependent on CaV2.2 channel inhibition: *Bioorg.Med.Chem.*, v. 22, no. 6, p. 1797-1803.
158. Zwickl, C. M., H. W. Smith, J. L. Zimmermann, and D. Wierda, 1995, Immunogenicity of biosynthetic human LysPro insulin compared to native-sequence human and purified porcine insulins in rhesus monkeys immunized over a 6-week period: *Arzneimittelforschung.*, v. 45, no. 4, p. 524-528.