

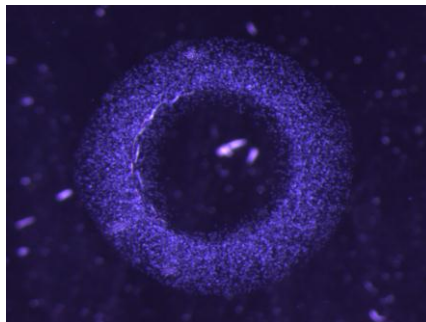
Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Katedra Fyziologie živočichů

Magisterská práce



**Studium vlivu Sericinových proteinů a jejich derivátů
na hmyzí a savčí buňky**



Eva SUCHANOVÁ

**Vedoucí práce: Mgr. Robert Fedič, PhD. Garant: Doc. RNDr. Jan
Kopecký CSc.**

Magisterská diplomová práce

Eva Suchanová (2011): Vliv sericinových proteinů a jejich derivátů na hmyzí a savčí buňky. Magisterská práce (Effect of sericin proteins and their derivatives on the insect and mammalian cells. Mgr. Thesis in Czech - 57 p, University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Effect of commercial sericin extract on cell proliferation was examined in the following cell cultures: HeLa, L929, Vero, HaCaT, WS1, human dermal fibroblasts and primary keratinocytes. Sericin was present in the culture media in concentrations 0.001; 0.005; 0.01; 0.05 and 0.1 per cent, respectively. The rate of cell proliferation was assessed by means of a „cratch test“. Sericin was also added to the medium used to freeze the cells for storage.

Tato práce byla financována z grantu školitele (grant MŠMT 620/3117)

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 30. 4. 2011

.....
Eva Suchanová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat zejména panu doktoru Kopeckému a celému jeho kolektivu za poskytnutí pracovního zázemí v prostorách jeho laboratoří na Parazitologickém ústavu a panu doktoru Kváčovi za poskytnutí mikroskopu pro focení mých preparátů. Dále bych chtěla velmi poděkovat doktoru Sehnalovi za jeho ochotu v opravování mé práce a studentům Tomášovi Krůčkovi, Kláře Mičulkové a Tereze Staškové za cenné rady z oboru molekulární biologie. Velký dík patří mé rodině, která mě podporuje.

Obsah

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED	1
1.1. Hedvábí – jeho původ, složení a použití	1
1.1.1. Bourec morušový (<i>Bombyx mori</i>)	2
1.1.2. Hedvábnictví	3
1.1.2.1. Složení hedvábí	4
1.1.2.2. Komponenty hedvábí	5
1.1.3. Snovací žlázy.....	6
1.1.4. Použití hedvábí.....	7
1.1.5. Sericiny.....	9
1.1.5.1. Použití sericinu	10
1.2. Tkářové kultury	13
2. CÍLE PRÁCE	15
3. MATERIÁL A METODIKA	16
3.1. Zkoumaný preparát sericinu.....	16
3.2. Použité buněčné linie	16
4. VÝSLEDKY.....	32
4.1. Scratch test	32
4.2. Efekt sericinu na zamražené buňky.....	38
5. DISKUSE	41
5.1. Účinek sericinu na zamražené buňky.....	43
6. ZÁVĚR.....	44
7. POUŽITÁ LITERATURA	45

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. Hedvábí – jeho původ, složení a použití

Hedvábí je svázáno s lidskými dějinami od nepaměti. Je to přírodní materiál pozoruhodných vlastností. Jeho využití kopíruje vývoj lidské společnosti, od původního použití jako prostředku směny, přes textilní průmysl až po dnešní aplikace v průmyslu, farmacii a biotechnologiích. Provází nás a neustále inspiruje.

Hedvábnictví má své kořeny v Číně, nejspíše v provincii Šan-tung na pobřeží Žlutého moře. Zpracování hedvábí bylo pod dohledem císařské dynastie, a proto vyražení způsobu chovu bource a tkaní hedvábí bylo trestáno smrtí. Do západního světa se hedvábí dostávalo karavanní cestou (tzv. hedvábnou cestou). Tato cesta vedla z Číny přes Bagdád a východní Persii do syrských přístavů. Tato vzdálenost byla přibližně 11 tisíc kilometrů, což mělo za následek vysokou hodnotu hedvábí.

Přes velký zákaz se hedvábnictví dostalo ve 2. století našeho letopočtu do Japonska a Koreje. Evropané již znali tajemství chovu bourců a proto podle legendy v 6. století císař Justinián poslal několik mnichů na nebezpečnou cestu. Mniši měli přenést vajíčka bourců z Číny. Úspěšně je přenesli do Evropy v dutých poutnických holích a od té doby se v Evropě začal chovat bourec (Hyde 1984). Od 8. století se hedvábnictví rozmáhá ve Španělsku, ve 13. století ve Francii a Itálii. V Čechách se nejprve ve 14. století vytvořil obchod s hedvábím, a chov bource začal až v 1. polovině 17. století.

Vědci začali zkoumat hedvábí na začátku 20. století. První zájmy o studie byli čistě komerční. Když ve Francii vypukl v polovině 19. století bourčí mor a hrozila likvidace hedvábnictví, které bylo v té době významným hospodářským odvětvím, byl požádán o pomoc Luis Pasteur. Prokázal, že příčinou jsou dva patogeny přenášené transovariálně a vypracoval pravidla pro udržení zdravých chovů. Pozdější výzkumy byly zaměřeny hlavně na strukturu hedvábí. Mezi významné objevy patří identifikace aminokyseliny serinu a objasnění sekundární struktury proteinů, ve kterých aminokyseliny vytvářejí prostřednictvím



Obr.1

http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/resources/Grzimek_insects/Lepidoptera/Bombyx_mori.jpg/view.html

vodíkových můstků tzv. β -skládaný list, jako je tomu v případě hedvábného proteinu fibroinu (Pauling, Corey 1953).

1.1.1. Bourec morušový (*Bombyx mori*)

Systémové zařazení bource je následující:

Říše: Animalia (živočichové)

Kmen: Arthropoda (členovci)

Podkmen: Hexapoda (šestinozí)

Třída: Insecta (hmyz)

Řád: Lepidoptera (motýli)

Čeleď: Bombycidae (bourcovití)

Bourec morušový patří do poměrně rozsáhlé čeledi bourcovití (*Bombycidae*). První jedinci bource morušového byli chováni už 3000 let p. n. l. Dnes je bourec zcela domestikovaný a produkcí hedvábí a některými dalšími vlastnostmi se značně liší od příbuzných divokých druhů. Housenky i dospělci jsou málo pohybliví a vyžadují péči člověka. Housenky přijímají jako potravu listy moruše bílé (*Morus alba*).

B. mori byl domestikován z *B. mandarina*, který žije ve volné přírodě. *B. mandarina* se vyskytuje v oblasti od severní Indie po severní Čínu, Koreu a Japonsko a ve velmi vzdálené oblasti východního Ruska. Domestikovaný bourec pochází spíše z Číny než z Japonska a Koreje (Arunkumar et al. 2006; Maekawa et al. 1988).

Domestikovaný bourec má na rozdíl od divokého větší velikost kokonu, roste rychleji a postačí mu malý prostor. Dospělci nemohou létat, nemají strach z predátorů a nemohou přijímat potravu. Tyto změny způsobily, že *B. mori* potřebuje pro své přežití lidskou pomoc (Goldsmith et al. 2005).

Vajíčka drobných rozměrů (délka 1,5 mm, váha 0,7 mg), mají oválný tvar, ze stran zploštělý. Po vykladení je barva běložlutá, posléze se mění na zlehka hnědou, pak ztmavnou a během 2 až 3 dnů mění barvu na modrošedou jako zralý mák (Michajlov 1952, Krejčík 1936). Vývoj od vylíhnutí z vajíčka do zapředení trvá u monovoltinních ras při letní teplotě 28 až 32 dnů, u menších bivoltinních 24 až 25 dnů, a u drobných polyvoltinních s 6 až 8 generacemi do roka je vývoj ještě kratší. Motýli se z kokonů líhnou 10. až 12. den a během 24 hodin se spáří. Samičky kladou 300 až 450 vajíček během dalších 48 hodin.

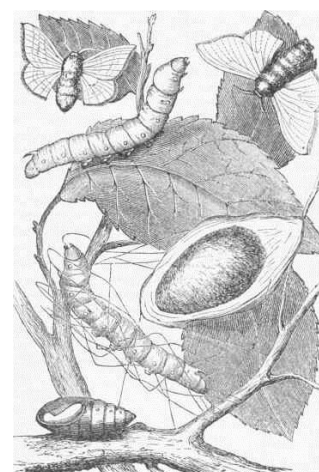
1.1.2. Hedvábnictví

Komerční hedvábí se získává z domestikového *B. mori* a malé množství asi z deseti jiných druhů motýlů (Peigler 1993). Proteinová vlákna, kterým říkáme hedvábí, jsou produkována několika stovkami tisíců druhů z následujících podkmenů suchozemských členovců: Chelicerata (ve třech podtřídách třídy Arachnida – pavoukovci, štírci, pavouci), Myriapoda (třídy Symphyla, Pauropoda a primitivní mnohonožky, chybí u stonožek) a Hexapoda (Sehnal, Akai 1990; Craig 1997).

Hedvábí je sekretováno z rozdílných typů ektodermálních žláz. U larev některých zástupců hmyzu s dokonalou proměnou (Holometabola) je hedvábí produkováno z páru labiálních žláz, jejichž původní funkce byla produkce slin. Produkce hedvábí je velmi intenzivní v sesterských řádech Trichoptera a Lepidoptera. Jejich labiální žlázy jsou specializované na sekreci hedvábí, a proto se nazývají žlázy snovací. Jsou složeny z několika stovek obrovských a vysoce polyploidních buněk a morfologicky a funkčně lze ve žláze rozlišit zadní (PSG), střední (MSG) a přední (ASG) část (Sehnal 2008). Tvorba hedvábí ve slinných žlázách larev se pravděpodobně vyvinula už v předcích Lepidopter a Trichopter, před více než 250 miliony let. Housenky některých druhů spřádají nepřetržitě hedvábnou tubičku (obydlí), ve kterém také žijí. Jiné druhy produkují malý polštářek, nebo návlek, který jim poskytuje oporu během svlékání. Mnoho druhů spřádá trvalé kokony, ve kterých se larvy kuklí. Složení hedvábí bylo v některých detailech analyzováno v nadčeledích Yponomeutoidea, Pyraloidea a Bombycidae. Závěry jsou pravděpodobně závazné pro celou třídu Dytrisia, která obsahuje 96% z okolo 160 tisíc popsaných druhů motýlů (Kristensen et al. 2007).

Hedvábí produkované bourcem je po chemické stránce tvořené vláknitou bílkovinou fibroinem, která je složená přibližně z 15 různých aminokyselin. Jednotlivá vlákna jsou spojená hedvábným tmelem, sericinem. Jeden kokon obsahuje až 2000 metrů hedvábného vlákna.

Před zpracováním se musí kukly nejprve usmrtit vložением kokonů do horkého vzduchu, tím líhnoucí se dospělec nepoškodí celistvost vlákna. Surové hedvábí má bílou barvu (některé druhy mají kokony v odstínech žluté) a není lesklé. K získání 1 kg surového hedvábí je



Obr.2

<http://chestofbooks.com/reference/American-Cyclopaedia-11/Silkworm.html>

potřeba 50 tisíc kokonů. Vyvařením v mýdlové vodě dojde k odstranění sericinů, vlákno je pak vláčné, měkké a lesklé.

1.1.2.1. Složení hedvábí

Hedvábné vlákno housenek je vysoce organizovaná struktura tvořená z několika proteinů, které jsou produkovány ze zadní a střední části (PSG a MSG) snovací žlázy. Vlákno je tvořeno ze dvou filamentů (1 z každé žlázy), které jsou polymerizovány z velkého proteinu zvaného těžký fibroin (H-fibroin, 350 – 500 kDa v různých druzích). Vlákno je tvořeno v PSG spolu se dvěma dalšími proteiny, lehkým fibroinem (L-fibroin, cca 25 kDa) a P25 glykoproteinem (také zvaný fibrohexamerin), který je ve dvou formách lišících se úrovní glykosylace (27 – 31 kDa). Tyto tři proteiny vytvářejí v endoplasmatickém retikulu micely (Inoue et al. 2004). Mikrovlákna jsou formována v Golgiho aparátu a uvolňována jako sekreční granula do lumenu žlázy (Akai et al. 1993), kde se hromadí jako vysoce koncentrovaný gel. Gel formuje sloupek, který je tlačěn dovnitř MSG, kde je nepřetržitě obalován sekretovanými sericiny. Bylo ukázáno, že MSG u *B. mori* je tvořena třemi funkčními oblastmi, které produkují rozdílné typy sericinů. Sericiny přilehají k fibroinovému sloupku přicházejícímu z distální oblasti. Hlavním sericinem z distální oblasti MSG je protein o velikosti 150 kDa, centrální oblast sekretuje protein 400 kDa, a proximální oblast protein 250 kDa (Takasu et al. 2002). První dva uvedené proteiny jsou získány z genu zvaného Ser1 a poslední protein je z genu Ser2. Gen Ser1 byl plně sekvenován (Garel et al. 1997). Jeho produktem jsou čtyři mRNA vznikající rozlišovacím sestřihem (differential splicing) primárního transkriptu (Michaile et al. 1986; Tripoulas, Samols 1986; Hamada et al. 1987). Gen Ser2 byl důkladně mapován použitím restričních enzymů (Michaille et al. 1990a) a byl identifikován jako zdroj dvou mRNA (Michaille et al. 1990b). Jeho sekvence byla plně rozluštěna teprve nedávno (Kludkiewicz et al. 2009).

Fibroinový sloupek a sericinové vrstvy okolo něj jsou ve žlázách skladovány dny, nebo týdny jako oddělené, vysoce koncentrované gely, které jsou přestavěny na pevné materiály během spřádání vlákna, když jsou taženy skrz úzkou přední část žlázy (ASG) a snovací bradavku (spineret). Vnitřek sloupku polymerizuje rychle do vlákna obsahujícího H-fibroin, L-fibroin a chaperon P25 v poměru 6:6:1 (Inoue et al. 2000, 2004).

Polymerizace závisí na uspořádání a složení aminokyselinových opakování, která tvoří okolo 95% délky H-fibroinu. I v rámci řádu Lepidoptera jsou repetice aminokyselin velmi rozdílné (Sezutsu, Yukuhiro 2000; Zhou et al. 2001; Žurovec, Sehnal 2002; Yonemura, Sehnal 2006), lze je však odlišit od repetice ve fibroinu chrostíků (Yonemura et al. 2006).

Většina repetitivně pravděpodobně tvoří β -list a krystaly, které se jeví jako typické fibroinové konformace (Warwicker 1960). Tyto konformace jsou závislé na interakcích mezi aminokyselinami v přilehlých peptidických řetězcích (Sehnal, Žurovec 2004). Měření rentgenové difrakce ukázalo, které interakce se obvykle objevují mezi Gly a Gly, nebo mezi Gly a Ala (Lucas, Rudall 1968). H-fibroin z *B. mori* je tvořen z těchto částí spojení GlyAlaGlyAlaGlySer (Mita et al. 1994).

1.1.2.2. Komponenty hedvábí

Sekrece a tvorba hedvábí jsou značně studovány u bource morušového. Je známo, že zadní část žlázy (PSG) sekretuje velké množství vysokomolekulárního (200-500kDa) těžkého řetězce fibroinu (H-fibroin), nízkomolekulárního (25 kDa) lehkého řetězce fibroinu (L-fibroin) a chaperonin P25, který se objevuje ve dvou formách (27 a 31 kDa), které se liší obsahem cukrů (Tanaka et al. 1999). Lehký fibroin je napojen na těžký fibroin disulfidickou vazbou, která je rozhodující pro sekreci obou komponent (Takei et al. 1987). Chaperon P25 nekovalentně interaguje s aminokoncem těžkého fibroinu a tím usnadňuje uskladnění vysoce nerozpustného H-fibroin/L-fibroin heterodimeru ve formě rosolovitého nátěru v lumenu žlázy (Sehnal 2008). Jeho sekrece a přeměna z rosolu v pevné vlákno závisí na nekovalentních interakcích s proteinem P25.

Osa hedvábného vlákna je tedy komplexem proteinů sekretovaných v PSG, jak bylo prokázáno u *B. mori*, *B. mandarina*, *D. spectabilis*, *G. mellonella* a *P. xunthus*. L-fibroin a chaperon P25 však nebyly nalezeny u motýlů z čeledi Saturniidae *Samia Cynthia ricini*, *A. pernyi* a *A. yamamai* (Tamura, Kubota 1989; Tanaka, Mizuno 2001).

Disulfidické můstky spojují šest molekul těžkého řetězce a šest molekul lehkého řetězce z fibroinu. Jedna molekula chaperonu P25 je spojena disulfidickým můstkem s těžkým a lehkým řetězcem nekovalentní interakcí u *B. mori* (Inoue et al. 2000).

Těžký řetězec fibroinu je hlavním proteinem hedvábí a jeho struktura určuje vlastnosti hedvábného vlákna. Molekula fibroinu obsahuje krystalické a amorfní oblasti. Amorfní oblasti jsou charakteristické přítomností aminokyselin s objemnějšími postranními řetězcí, krystalické oblasti mají vysoké množství alaninu, glycinu a serinu (12, 30 a 40%), které obsahují krátké postranní řetězce se schopností uzavřít struktury listů (Voegeli et al. 1993). U *B. mori* má H-fibroin velikost ~391 kDa. Celá sekvence byla získána kombinací dvou metod – shotgun sekvenační metodou a sekvenováním fyzikálního základu genetických map (Zhou et al. 2000). Gen H-fibroinu je samostatná kopie genu nacházejícího se na 25. chromosomu (Kimura et al. 1985) a je tvořený dvěma exony a jedním intronem.

L-fibroin je spojen disulfidickým můstkem s H-fibroinem (Yamaguchi et al. 1989; Tanaka et al. 1999b) a jejich disulfidická vazba je základní pro dobře fungující sekreci, jak bylo ukázáno v analýze fibroin-sekrečního deficitu při mutaci způsobující nahé kukly (Takei et al. 1987; Mori et al. 1995).

U *B. mori* je gen L-fibroinu lokalizován na 14. chromosomu (Kimura et al. 1985) a jeho celková délka je 13472 bp. Kódovací oblast je tvořena sedmi exony.

Chaperon P25, jinak nazývaný fibrohexamerin, který se objevuje ve dvou formách během různých úrovní glykosilace (27 – 31 kDa) (Inoue et al. 2004). Chaperon P25 obsahuje dva až tři oligosacharidy navázané na asparagin. Tvoří kompaktní strukturu v důsledku intramolekulárních disulfidických vazeb. S dimerem H- a L-fibroinu je spojen nekovalentními interakcemi (Tanaka et al. 1999a).

U *B. mori* byl gen pro P25 popsán Chevillardem et al. (1986). Samotná kopie genu je přibližně 3500 nt dlouhá a zahrnuje 5 exonů s 1173 nt (Couple et al. 1985; Chevillard et al. 1986).

1.1.3. Snovací žlázy

Hedvábné vlákno je produkováno párovými žlázami (silk glands, SG). Vývojově jsou všechny snovací žlázy ektodermálního původu. U klepítkačů (Chelicerata) vznikají primárně epidermálním vchlípením, kdežto u hmyzu většinou sekundárně z různých typů žláz.

Snovací žlázy motýlů jsou odvozené z labiální (retní) žlázy. Žlázy jsou formovány z jednovrstevného tubicovitého epitelu, který se podélně dělí na funkčně oddělené části – přední (ASG), střední (MSG) a zadní (PSG). Proteiny tvořící osu hedvábného filamentu jsou sekretovány v PSG. MSG slouží pro sekreci lepkavých sericinových proteinů pokrývajících hedvábné vlákno. PSG a zejména MSG také sekretují proteiny, které nepřispívají ke struktuře hedvábí, ale mají v něm specifické funkce (Žurovec et al. 1998; Nirmala et al. 2001a,b). Funkce ASG nebyla beze zbytku objasněna.

Snovací žlázy housenek vznikají invaginací epidermis v časném embryonálním vývoji. Epidermální buňky se přestávají dělit, když jejich počet dosáhne 250 v ASG, 300 v MSG a 500 v PSG. Za 132 hodin po invaginaci se buňky stávají polyploidními (Akai 1984) a objevují se první známky sekrece hedvábí. Během postembryonálního vývoje se žlázy rychle prodlužují (Ono 1951). Značný růst je zejména během posledního larválního instaru. Snovací žláza bource tvoří od 4% do 40% jeho tělesné hmotnosti (Sehnal, Akai 1990).

Funkce snovací žlázy je specificky stimulována mozkovými neurohormony. Tyto hormony ovlivňují také sekreci hedvábí. Významné role mají také juvenilní hormony a ekdysteroidy (Sehnal, Akai 1990).

1.1.4. Použití hedvábí

Archeologické nálezy ukazují, že kokony motýlů byly sbírány už během doby kamenné. Pro naše předky byli kukly pravděpodobně více zajímavé z výživného hlediska než z potřeby získat hedvábí. Technologie využití kokonů na výrobu textilií byla objevena až v roce 2700 p. n. l. v Číně. Kokon spadl do šálku s horkým čajem princezně Hsi Ling Shi, která pak z něho vytahovala hedvábné vlákno. Produkce textilií je dominantním využitím hedvábných vláken. Vlákna jsou z velké části tvořena H-fibroinem, L-fibroinem a chaperonem P25, ale obsahují také vnitřní sericinovou vrstvu a malé množství vnitřních dalších proteinů. Tyto složky jsou obvykle uváděny jako fibroin a používají se v různých biologických testech (Park et al. 2002).

Hedvábná vlákna mají vynikající mechanické vlastnosti, které se plně uplatňovaly při výrobě padáků. Až do vynálezu nylonu bylo hedvábí pro toto použití nenahraditelné. Pokroky genového inženýrství otevřeli dveře k produkci základní součásti hedvábného vlákna, fibroinů. Dokonce více pozornosti bylo věnováno vláknům z pavoučího hedvábí (Spohner 2007).

Použití přírodní hedvábné nitě jako šicího materiálu v chirurgii bylo úspěšné, což znamená, že imunitní systém dokonale toleruje přítomnost hedvábného vlákna v lidském těle. Fibroin byl také použit jako skeletový materiál pro růst buněk a tkáňové inženýrství (Wang et al. 2006).

Hedvábí různých druhů hmyzu a pavouků je velmi rozmanité (Kaplan et al. 1994; Kaplan et al. 1998; Vollrath, Knight 2001) v závislosti na jeho funkci (Vollrath 1999; Altman et al. 2003). Např. pavouci využívají hedvábí pro tvorbu sítí na chytání kořistí (pavoučiny), záchranná lanka (vlečná lanka) a funkce při reprodukci (tvorbu kokonů jako úkrytu vajíček) (Altman et al 2003; Winkler, Kaplan 2000; Wong, Kaplan 2002).

Hedvábí poskytuje výborné kombinace lehké váhy ($1,3 \text{ g/cm}^3$), vysoké pevnosti (nad 4,8 GPa jako nejsilnější vlákno známé v přírodě) a významné pružnosti (nad 35%) (Rising et al. 2005). Hedvábí snese srovnání se syntetickým vysoce pevným vláknem jakým je Kevlar 49. Elasticita hedvábí je 4-7 krát vyšší než Kevlaru 49 a energie požadovaná na přetržení vlečného vlákna z hedvábí je 3-4 krát vyšší než pro přetržení vlákna z Kevlaru 49. Mezi další významné vlastnosti hedvábí patří ještě termostabilita $\sim 250^\circ\text{C}$, povolující zpracovávání přes široké hodnoty teplot (Wong, Kaplan 2002).

Fibroiny a sericiny jsou hlavní, ale ne jediné složky hedvábí motýlů a jejich sesterského řádu chrostíků. Několik proteinů menších než 20 kDa bylo identifikováno v hedvábí housenek (Kodrík 1992). Některé z nich jsou pravděpodobně zodpovědné za rezistenci hedvábí vůči predátorům, molům a mikrobům (Akai 1997). To může být role seroinů, které jsou produktem jednoho genu v *G. mellonella* a dvou u *B. mori* (Žurovec et al. 1998b; Nirmala et al. 2001b; Žurovec, Sehnal 2002).

V hedvábí bource morušového tvoří sericiny 25-30% celkových proteinů. Sericiny obalují fibroinové filamenty lepkavou vrstvou a při průchodu spinneretem je slepují v jedno vlákno. Povrchové sericiny se uplatňují při tvorbě kokonu, protože slepují předené vlákno do mnoha vrstev. Většina sericinu musí být při výrobě surového hedvábí odstraněna koupelí kokonů v horké a slabě alkalické vodě. Uvolněné hedvábné vlákno se spojuje residuálními sericiny z několika dalšími v hedvábnou nit, která se navíjí na vřetena. Sericin zůstává v odpadní vodě. Celosvětová produkce kokonů je okolo 1 milionu tun (čerstvé váhy), po sušení se získá 400 tisíc tun suchých kokonů. Během jejich zpracování se odstraní 50 tisíc tun sericinu (Zhang 2002).

Stejně jako fibroin je sericin směsí několika proteinů, jejichž molekulová hmotnost je ve velkém rozmezí od 10 do více než 300 kDa. Sericiny obsahují převážně aminokyseliny s polárními funkčními skupinami – hydroxylová, karboxylová a aminová. Aminokyseliny serin a kyselina aspartátová tvoří přibližně 33,4 a 16,7% všech sericinů (Zhang 2002).

Sericin je protein rozpustný ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech. Velikost získaných frakcí závisí na řadě faktorů (teplota, pH, čas zpracování). Sericiny jsou zčásti hydrolyzovány v kyselém nebo alkalickém prostředí a degradovány protézami přítomnými v samotném hedvábí. Sericinové peptidy, nebo hydrolyzáty o nízké molekulové hmotnosti (méně než 20 kDa) jsou používány v kosmetice jako přísady v produktech péče o pleť a vlasy, zdravotnické produkty a medikamenty. Sericinové peptidy o vysoké molekulární váze (více než 20 kDa) jsou většinou používány jako medicínský biomateriál, degradatelný biomateriál, sloučeniny polymerů, funkční biomembrány, hydrogely a funkční vlákna a tkaniny (Zhang 2002).

Malé sericinové peptidy jsou rozpustné ve studené vodě a mohou být obnoveny na prvotní úroveň surových hedvábných produktů. Velké sericinové peptidy jsou rozpustné v horké vodě. Díky svým vlastnostem je sericin používán pro zlepšení umělých polymerů jako jsou polyestery, polyamid, polyolefin a polyakrylonitril. Sericin je také hojně používán

jako nátěrový, nebo směsný materiál pro přírodní a umělá vlákna, tkaniny a polymerové články (Zhang 2002).

Tři sericinové geny, kódující rodinu nejméně šesti glykoproteinů, byly izolovány z *B. mori*. Primární transkripty tvoří alternativním sestřihem několik mRNA, které kódují proteiny dosahující 65-400 kDa (Sinohara 1979; Gamo 1982; Couble et al. 1987). Sericinové proteiny obsahují velké množství serinových aminokyselinových zbytků (16-42%) a velké množství hydrofilních aminokyselinových zbytků (Komatsu 1975; Gamo 1977), které zapříčiňují jejich rozpustnost v horké alkalické vodě.

Transkript genu *Ser1* je vyjádřen a odlišně sestřižen v distální a centrální oblasti MSG. Transkript genu *Ser2* je především v proximální části MSG (Couble et al. 1987). Toto je shodné s rozdělením sericinů o velikostech 150, 400 a 250 kDa, ale množství sestřižených produktů ukazuje, že je produkováno více sericinových proteinů. Gamo et al. (1977) určili nejméně šest a Sprague (1975) až 15 typů sericinových proteinů v hedvábných extraktech. Proteiny vypadající jako sericiny reprezentují 20-30% z proteinů kokonu (Suzuki 1977).

1.1.5. Sericiny

Gen *Ser1* z *B. mori* byl částečně klonovaný a sekvenovaný Okamoto et al. (1982), Michaillem et al. (1986) a jeho kompletní strukturu dokončil Garel et al. (1997). Gen je dlouhý 23 kb, má devět exonů (Garel et al. 1997) a je exprimován v distální a centrální části MSG (Hamada 1987). Velká část centrálního exonu kóduje 60 kopií bloku 38 aminokyselin (Garel et al. 1997). Rekombinantní proteiny založené na této repetici SRTSG GTSTY GYSSS HRGGS VSSTG SSSNT DSSTK NAG samovolně zaujaly konformaci β -listu a krystalů (Huang et al. 2003). V 5' oblasti genu jsou kolem CAAT boxu úseky podobné jako u genu H-fibroinu (Okamoto et al. 1982). Primární transkript (10,5 kb) je střižán tkáňově a vývojově specificky (Couble et al. 1987) do čtyř mRNA dlouhých 2,8/2,9 kb, 4,0 kb, 9,0 kb a 10,5 kb (Michaille et al. 1986; Fedič 1996). Během pátého instaru je gen *Ser1* přepisován ve 150 zadních buňkách MSG, z nichž 42 produkuje mRNA o velikosti 2,8 kb a 108 buněk mRNA o velikostech 4,0, 10,5 a 9,0 kb (Michaille et al. 1990a). Všechny čtyři mRNA obsahují exony 1, 2, 7, 8 a 9, a proto mají stejné 5' a 3' konce (Michaille et al. 1986). Liší se zastoupením exonů 3, 4, 5 a 6 (Garel et al. 1997). Exon 6 je největší (~6,5 kb) a je tvořen přibližně 60 opakováními s charakteristickým 114 bp motivem, který kóduje výše zmíněnou repetici 38 aminokyselin (Okamoto et al. 1982).

Gen *Ser2* přísluší *ser2* genetickému lokusu na chromosomu 11 (Gamo 1982), je vysoce polymorfní (Michaille et al. 1990a) a jeho produktem jsou dvě mRNA. Jedna z nich má vždy

velikost 3,1 kb, velikost druhé závisí na alele a je 5,0; 5,4 nebo 6,4 kb (Michaille et al. 1990). Gen Ser2 obsahuje 11 exonů, z nichž dva kódují mnohonásobné kopie repetic ALTEKAKPNDRSPSHKDT (Kludkiewicz et al. 2009). Způsob polymerizace a finální konformace proteinu nejsou známy. Není vyloučeno, že proteiny genu Ser2 drží vlákna kokonu pohromadě elektrostatickými silami, které jsou přerušeny vařením v alkalické vodě (Sehnal, Sutherland 2008).

Protein odvozený od genu Ser3 je tvořen 1271 aminokyselinami, z nichž 18 připadá na signální peptid. Odvozené složení aminokyselin z proteinu bez signálního peptidu bylo srovnáno se sericinovými proteiny a bylo zjištěno podobné složení jako u produktů genu Ser1. Poměrné zastoupení aminokyselin je v sericinových proteinech podobné (Gamo et al. 1977; Garel et al. 1997; Takasu et al. 2002). Protein Ser3 obsahuje dva typy repetic bohaté na serin (Okamoto et al. 1982, Takasu et al. 2007).

1.1.5.1. Použití sericinu

Sericin je dobře rozpustným substrátem různých proteáz a je proto biodegradabilní. Díky jeho dalším vlastnostem jako je schopnost tvorby gelu, zadržování vlhkosti, biokompatibilita a kožní přilnavost má široké použití v kosmetice a potenciálně i v medicíně a farmacii (Padamwar, Pawar 2004).



Obr.3 <http://www.fibre2fashion.com/industry-article/16/1510/a-value-added-finish-from-silk-degumming-waste-liquor1.asp>

Biologicky odbouratelné materiály

Polymery prakticky neškodné pro životní prostředí mohou být vytvořeny smícháním sericinu s pryskyřicemi (Annamaria et al. 1998) a jinými syntetickými polymery. Polyuretanové pěny, které mají ve své struktuře včleněný sericin, dobře absorbují a uvolňují vlhkost (Nomura et al. 1995). Polymerové filmy, pěny, lisované pryskyřice a vlákna obsahující sericin (0,01-50% w/w) mohou být tvořeny několika složkami zahrnujícím polyol (polyether polyol získaný normální polymerizací glycerolu, propylen oxidu a ethylen oxidu), tolylen diisotyanate, dibutyltin dilaurate (katalyzátor) a trichloromonofluoromethan (nadouvadlo) v přítomnosti sericinu. Schopnost absorpce/vypařování vlhkosti je dvakrát až pětkrát lepší v pěně obsahující sericin než v kontrolní pěně (Zhang 2002).

Některé produkty obsahující sericin mají výborné mechanické a tepelné vlastnosti (Hatakeyama 1996). Sericinový prášek je rozpustný v organických rozpouštědlech jako je tetrahydrofuran nebo dioxan, který může obsahovat polyether, nebo polyesterové sloučeniny. Polyurethan obsahující biologicky rozložitelné části sericinu se stává celý biologicky rozložitelný. Tento polyurethan je levný, jelikož je tvořen z velkého množství zbytkového sericinu (Zhang 2002). Může být použit na výrobu filmů, vláken a lisovaných objektů.

Membránové materiály

Hedvábné sericinové membrány a filmy mají značnou pružnost a tažnou sílu. Jejich biokompatibilita a odolnost k mikroorganismům z nich činí dobrý obvazový materiál pro zastavení krvácení. Navíc flexibilita a schopnost absorpce vody umožňují použití pro léčení kožních poškození a nezpůsobují odloupávání kůže, když je obvaz odstraňován z již zahojené rány (Tsubouchi 1998).

Není snadné použít samotný čistý sericin na tvorbu biologických membrán, ale sericin v membráně ochotně tvoří síť, směs, nebo kopolymer s jinými látkami v membráně. Sericin obsahuje velké množství aminokyselin s neutrálními polárními funkčními skupinami, membrány obsahující sericin jsou tedy hydrofilní a selektivní pro směsi vodních organických roztoků.

Akrylonitril používaný na tvorbu některých syntetických polymerů může být kopolymerizován se sericinem. Touto přípravou vznikne polymerový film obsahující proteiny, který může být použit na oddělení vody z orgánů (Yamada, Fuwa 1993a, 1994).

Yamada a Fuwa (1993b) připravili ze sericinu filtr, který měl trojrozměrnou síťovanou strukturu získanou vzájemným propojením sericinu, ve vodě rozpustné epoxidové sloučeniny a polymerizujícím činidlem.

Funkční biomateriály

Kurioka (1998) vyzkoušel sericin jako biomateriál pro lékařská použití, např. pro výrobu kontaktních čoček. Transplantační polymery jsou připravovány s metyl metacrylatem, nebo styrenem a jsou biokompatibilní (Nakamura et al. 1986; Wei et al. 1989).

Sericinový film na povrchu zařízení má antimrznoucí účinek (Tanaka 2001). Použití vrstveného sericinového filmu je efektivní antimrznoucí metoda, která může být široce použita v chladničce, hlubokém mrazení, a v chladících vozech a lodích. Dále může být tento film použit na cesty a střechy jako prevence proti poničení mrazem a snadné odklizení sněhu (Zhang 2002).

Medicínské biomateriály

Tsubouchi (1999a) vyvinul hedvábný fibroinový obvaz, který by mohl po umístění na zraněné místo zvyšovat hojení a mohl by jít sloupnout ze zahojeného místa bez poranění nově utvořené kůže. Tento nekystalický fibroinový obvaz obsahuje 3-16% vody a jeho tloušťka je 10-100 μm . Obvaz byl vytvořen ze směsi fibroinu a sericinu (Tsubouchi 1999b).

Membrána tvořená sericinem a fibroinem je efektivní substrát pro dělení adherujících zvířecích buněk a může být použita jako náhrada kolagenu (Zhang 2002).

Film tvořený sericinem a fibroinem má výbornou propustnost pro kyslík a svými vlastnostmi je podobný lidské rohovce. Díky těmto vlastnostem by mohl být sericin-fibroinový film použit na tvorbu náhrady rohovky (Murase 1994).

Proteiny hedvábí po sulfonačním ošetření sericinu a fibroinu mohou být použity jako biomateriály s antikoagulačními vlastnostmi (Tamada 1997). Takový antikoagulant je potenciální náhradou heparinu. Antikoagulant může být použit na úpravu povrchů medicínských nástrojů. Sulfonovaný hedvábný proteinový antikoagulant potvrdil zásah do vazby HIV s imunocyty. Přesněji řečeno, antikoagulant by mohl být použit do zubních past a holících krémů jako prevence proti rozšíření HIV (The Chemical Daily (Japanese) 2001).

Sericin byl nalezen na potlačení lipidové peroxidace a inhibici tyrosinásové (polyfelen oxidasa) aktivity in vitro (Kato et al. 1998).

Funkční vlákna, tkaniny a články

Funkční vlastnosti některých syntetických vláken mohou být zlepšeny potahováním přírodními makromolekulami - chitinem, chitosanem, fibroinem a sericinem. Syntetická polyesterová vlákna mají mikropory o průměru 0,001-10 μm . Sericinové molekuly by mohly být zavedeny do těchto mikropórů a zesíťovány (Zhang 2002).

Wakabayashi a Sugioka (1994) připravili polyesterová vlákna modifikovaná sericinem. Tato vlákna mohou být více než pětikrát více hygroskopická než neupravená polyesterová vlákna a více než 85% z prvotní hygroskopicity zůstává po 50 vymytích. Jiná syntetická vlákna jako například polyamidové (6-nylon) nebo polyolefinové byla rovněž chemicky modifikována se sericinem (Mori et al. 1997; Nomura et al. 1996).

Kaučuk je biokompatibilnější po smíchání se sericinem. Směs hydrolyzovaného sericinu (5-50 kDa molekulární hmotnosti) tvoří s kaučukem produkty s nižší dráždivostí na pokožku než přírodní kaučuk. Takto modifikovaný kaučuk by mohl být použit na výrobu vnitřku kaučukových rukavic, úchopy řídítek na kole a na různém sportovním náčiní. Pudrový sericin s částicemi menšími než 20 μm v průměru by mohl být smíchán se sloučeninou kaučuku a termoplastů, a tato směs by mohla být použita na vnitřní části produktů z kůže (Ueda, Makita 2000).

1.2. Tkáňové kultury

Buněčné kultury se uplatňují hlavně ve dvou oblastech lékařského výzkumu: produkce antivirových vakcín a výzkum neoplazií (novotvorba, tvorba nádorů). Standardizované podmínky a buněčné linie pro produkci a analýzu virů poskytují impuls pro vývoj technologie moderní tkáňové kultury, zejména produkce velkého množství buněk vhodných pro biochemickou analýzu. Tato a jiné techniky využívají komerčně dodávaná sterilní media a kultivační nádoby. Standardizované tkáňové kultury jsou pro moderní lékařský výzkum nezbytné.

Tkáňové kultury byly poprvé použity na začátku 20. století (Harrison 1907; Carrel 1912) jako metoda pro studium chování volných živočišných buněk se systémovými změnami, které mohou nastat *in vivo* během normálních životních podmínek a při působení stresových faktorů. Jak už název naznačuje, technika byla poprvé vyzkoušena s fragmenty tkání, jejichž růst *in vitro* byl omezen na migraci buněk z tkáňového fragmentu s náhodnou mitózou ve výsledku. (Fischer 1925; Parker 1961). Název tkáňová kultura se používá jako

všeobecný název. V druhé polovině dvacátého století nastal velký rozkvět v této oblasti a vedl k vytvoření klasifikace tkáňových kultur (R. I. Freshney 2005).

Migrace buněk z explantátů a pokračování jejich proliferace po přenesení do čistého média bylo poprvé ukázáno Rousem (Rous, Jones 1916). Tento proces se nazývá pasážování, které je dnes běžnou technikou při udržování buněčných kultur (Fischer et al. 1958) Některé buněčné linie jsou tímto způsobem udržovány mnoho desetiletí.

V roce 1950 začal být pro uvolnění buněk z explantované tkáně používán trypsin. Dulbecco jako první popsal, jak lze z explantátu pasážováním získat jednotlivé typy buněk pro virovou plakovou zkoušku (Dulbecco 1952). Gey založil první nepřetržitou lidskou buněčnou linii HeLa (Gey et al. 1952).

Tkáňové kultury začali být široce používány v polovině 20. století po zavedení antibiotik, která ulehčila udržování buněčných linií. Dnes víme, že antibiotika je nutno používat velmi opatrně, protože mohou vést k resistenci vůči antibiotikům a ke skryté kontaminaci kultury (Parker 1961).

V roce 1950 bylo vyzkoušeno první medium, do kterého nebyla přidána žádná složka hovězího séra (Morgan et al. 1950; Parker et al. 1954; Eagle 1955, 1959; Waymouth 1959). Dnes se bez-serového media běžně používají, v mnoha případech je však přídavek séra z telecího plodu nezbytné (Ham 1963, 1965).

Buněčné kultury z poikilotermů

Buněčné kultury z poikilotermů mají obdobně široké použití jako kultury z teplotokrevných živočichů (ptáci, savci).

Rybí buňky

Kultury z rybích buněk začali být více populární díky komerčnímu zájmu. Akvarijní ryбка *Danio rerio* (zebřička) má mnoho vlastností, které z ní dělají populární nesavčí model pro studium vývoje a toxikologie savců (Driever et al. 1994). Zebřička získá sexuální zralost asi ve 3 měsících, a samice pak každý týden produkuje 100 – 200 vajíček. Embryogeneze probíhá ve vnějším prostředí 3–4 dny. Velká průhledná vajíčka jsou přístupná experimentální manipulaci zahrnující buněčné značení nebo omývací (ablační) techniky (Westerfield 1993).

Hmyzí buňky

Kultury z hmyzích buněk jsou důležité pro studium vývojových procesů, uplatňují se však i při hledání nových prostředků proti hmyzím škůdcům. Používání hmyzích buněčných kultur se podstatně zvýšilo po vyvinutí metody exprese rekombinantních proteinů

v bakulovirech, které hmyzí buňky vyžadují (Midgley et al. 1998). Bakulovirus nejčastěji roste v Sf9 buňkách, což je nepřetržitá buněčná linie získaná z mýry *Spodoptera frugiperda* (R. I. Freshney 2005).

Typy tkáňových kultur

Tkáňová kultura – obecný termín zahrnující orgánové a buněčné kultury. Tkáňové kultury jsou těchto typů:

- Buněčná kultura – kultura odvozená z tkáně, nebo výrůstku z primárního explantátu, která je rozčleněná (mechanicky, enzymaticky) do buněčné suspenze. Kultura může být kultivována jako jedna adhezující vrstva na pevném substrátu, nebo jako suspenze v kultivačním mediu
- Histotypická (histologická) kultura – znovu nahromaděná nebo růstem obnovená trojrozměrná struktura s hustotou buněk srovnatelnou jako je u tkání
- Organotypická kultura – kultura obsahující více interagujících typů buněk (např. epidermální keratinocyty v kombinované kultuře s dermálními fibroblasty) což je podobné jako v orgánu. Tato kultura dává nové naděje pro studium buněčných interakcí mezi jednotlivými, definovanými populacemi z homogenních a potenciálně geneticky a fenotypicky definovaných buněk (R. I. Freshney 2005)

2. CÍLE PRÁCE

1. Zvládnutí techniky tkáňových kultur.
2. Studium vlivu komerčního sericinového hydrolyzátu na hmyzí a savčí buňky.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Zkoumaný preparát sericinu

Při mých pokusech jsem pracovala s komerčně dodávaným proteinem sericinem PureSericin od firmy Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan.

3.2. Použité buněčné linie

HeLa

Jedná se o nesmrtelnou buněčnou linii, která je používána ve výzkumu. Patří mezi nejstarší a nejčastěji používané lidské buňky (Rahbari et al. 2009). Buňky byly získány z karcinomu děložního čípku od pacientky Henrietty Lacks (odtud také název linie), která zemřela na její karcinom 4. října, 1951. Tato linie je mimořádně stabilní a rozšířená jako směs s jinými buněčnými liniemi používanými ve výzkumu (Capes-Davis et al. 2010; Watts, Watson 2010). Buňky byly propagovány Georgem Otto Geyem již krátce před smrtí Lackové v roce 1951. Je to první buněčná linie testovaná úspěšně *in vitro*, která byla vědeckým úspěchem s hlubokým budoucím darem pro lékařský výzkum. Gey otevřeně daroval buňky, nástroje a zpracování jeho laboratorního vývoje jinému vědci, který je požadoval. Učinil toto jako dar pro vědu. Ani Lacks ani její rodina nedali Geyovi souhlas pro výtěžek z buněk, ale v tuto dobu nebyl souhlas vyhledáván. Buňky byly později komercializované, což znamená, že nikdy nebyly patentovány v jejich originální formě (Skloot 2010).

HeLa buňky jsou označovány jako nesmrtelné, jelikož se dokáží dělit do nekonečného množství. Toto množství je pouze omezeno na dobu, po kterou mají buňky podmínky jim vyhovující. Existuje mnoho způsobů jak udržet HeLa buňky, aby pokračovali ve svém růstu v buněčné kultuře, ale všechny HeLa buňky pocházejí z jednoho nádoru z pacientky Henrietty Lacks. Je odhadováno, že celkové množství HeLa buněk, které byly použity v buněčných kulturách velmi překračuje množství všech buněk v těle Henrietty Lacks (Sharrer 2006).

HeLa buňky byly použity Jonasem Salkem, který jako první testoval vakcínu proti dětské obrně v roce 1950. Od té doby mají HeLa použití pro výzkum rakoviny, AIDS, efektu radioaktivních a toxických látek, genetického mapování a mnoho jiných vědeckých výzkumů (Smith 2002).

Helacyton gartleri – díky neomezené replikaci a nelidskému množství chromosomů byla tato linie popsána Leigh Van Valenem jako příklad vytvoření moderního druhu. Druh byl pojmenován po Stanley M. Gartlerovi, jehož Van Valen uznal objevitelem úspěchu tohoto druhu (Van Valen, Maiorana 1991).

Vero linie

Tato linie byla izolována z ledvinných epiteliálních buněk získaných z africké zelené opice *Cercopithecus aethiops*. Linie byla získána 27. března 1962 Yasumurou a Kawakitou v Čibě na Čibské univerzitě v Japonsku (Yasumura, Kawakita 1963).

Tato linie je pokračující a aneuploidní (buňky mají abnormální počet chromosomů). Pokračující buněčná linie může být replikována během několika cyklů dělení a nemůže stárnout ("Main Types of Cell Culture". *Fundamental Techniques in Cell Culture: a Laboratory Handbook*. Retrieved 2006-09-28).

Buňky Vero jsou interferon-postrádající, takže nejsou jako normální savčí buňky. Nesekretují typ interferonu 1, když jsou napadeny virem (Desmyter et al. 1968).

NIH-3T3 linie

Buněčná linie založená v roce 1962 vědci Georgem Todarem a Howardem Greenem na oddělení patologie na lékařské škole na univerzitě v New Yorku. Todaro a Green získali tuto buněčnou linii z embryonální tkáně ze švýcarské myši. NIH-3T3 patří mezi standardní buněčné linie fibroblastů.

Označení 3T3 vychází z protokolu na kultivaci těchto buněk. Primární myší embryonální fibroblasty byly pasážovány (transferred) odtud písmeno T každý třetí den, odtud první číslo 3, a vysety na buněčnou hustotu 3×10^5 buněk na Petriho misku 20 cm^2 kontinuálně, odtud druhé číslo 3. Samovolně nesmrtelné buňky se stabilní růstovou rychlostí byly založeny po 20-30 generacích v kultuře, a potom nazvány 3T3 (Todaro, Green 1963).

L929 linie

Tato linie byla založena W. R. Earlem v roce 1940. Linie pochází z myši, která byla podrobena působení metyholantrénu na podkožní pojivovou tkáň.

HaCaT linie

Tato linie jsou dospělé kožní keratinocyty. Keratinocyty jsou hlavní buňky v epidermis (pokožce) nejzevnější vrstvě lidské kůže, tvoří zhruba 95% všech buněk, které jsou zde nalezeny (McGrath et al. 2004). Keratinocyty nalezeny v této bazální vrstvě (*stratum germinativum*) v pokožce jsou někdy nazývány jako "bazální buňky", nebo "bazální keratinocyty" (James et al. 2005).

Tyto buňky jsou mnohdy považovány za nesmrtelné, jelikož jsou schopny podstoupit až 140 pasáží. Buňky tvoří heterotypickou kmenovou linii se specifickým stabilním markerem chromosomů, která ovšem není rakovinotvorná. Dokonce po několika pasážích buňky zůstávají schopné množení jako po normálním množení, díky čemuž poskytují vhodný a stabilní model pro studium keratinocytů. Výběr klonů dal vyšší rozlišování benigních epidermálních cyst a/nebo karcinomu šupinaté buňky u holých myší (Fusenig et al. 1990).

WS1 linie

Linie kožních fibroblastů získaná z embrya černošské rasy. Buňky jsou získány z kůže dvanácti týdenního embrya ženského pohlaví černošské rasy ze střední části kůže lopatky. Linie je schopná podstoupit 17 pasáží (<http://bioinformatics.istge.it/cldb/cl4732.html>).

Fibroblasty

Fibroblasty jsou typem buněk, které tvoří extracelulární matrix a kolagen (<http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=fibroblast>), strukturální kostru (stroma) pro živočišné tkáně, a hraje klíčovou roli v uzdravování zranění. Fibroblasty jsou nejběžnější buňky v pojivové tkáni u živočichů.

Keratinocyty

Keratinocyty jsou hlavní buňky v epidermis (pokožce) nejzevnější vrstvě lidské kůže, tvoří zhruba 95% všech buněk, které jsou zde nalezeny (McGrath et al. 2004). Keratinocyty nalezeny v této bazální vrstvě (*stratum germinativum*) v pokožce jsou někdy nazývány jako “bazální buňky“, nebo “bazální keratinocyty“ (James et al. 2005).

Izolace keratinocytů z lidské kůže

Pomůcky

- Chirurgická pinzeta
- Anatomická pinzeta (Dumont 7)
- Skalpel vel. 10 (Feather)
- Nůžky (Mayo-Stille, ostré) č. 14013-15 (FST)
- Nůžky (Mayo-Stille, zahnuté) č. 14013-15 (FST)
- Petriho miska 100mm/150mm (velikost závisí na množství materiálu)
- Skleněná Petriho miska pro krájení a stříhání materiálu
- Skleněný trychtýř
- Gáza na cezení materiálu
- PBS + penicilin/streptomycin (dále jen pen/strep), amfotericin, gentamycin (promytí/rozdělení částit)
- FCS (zastavení reakce trypsinu)
- Dispása II 240 U/100 ml (=2,4 U/ml) 10 – 15 ml/10 na Petriho misku
- Trypsin/EDTA (10x) č. L11-033 (PAA), trypsin 5mg/ml EDTA 2,2 mg/ml
- Milipor – filr na buňky 100 μ m/70 μ m

Postup

Izolační den 1

Zahnutými nůžkami oddělíme tuk a spojení tkáně s kůží. Kůži nastříháme na kousky o velikosti cca 0,5 cm² a promyjeme je opakovaně PBS + amfotericin, pen/strep, gentamycin. Promytí opakujeme třikrát, promývací roztok necháme vždy působit 20 minut a poté ho opatrně odsajeme, abychom neodsáli také kousky kůže. Kousky kůže rozdělíme do Petriho misek (10er/15er), tak aby byly škárou (dermis) nahoru. Uchování v 10 – 15 ml dispasy II/10er misku. Inkubace přes noc (nebo po 2 noci) při 4°C.

Izolační den 2

Trypsin/EDTA (10x) ve vodní lázni rozeřjeme a zahřejeme na 37°C. Do 50 ml zkumavky pipetujeme 50ml PBS + 0,5ml amfotericin, pen/strep, gentamycin. Kousky kůže dáme do nové Petriho misky s touto směsí. Kousek kůže uchopíme pomocí chirurgické pinzety, oddělíme vrstvu epidermis, kterou rozdělíme na malé kousky (důvodem je usnadnění pipetování později) a kousky dáme do předem připravené 50ml zkumavky. Svlečeme/odloupneme keratinocyty zahnutou anatomickou pinzetou z dermis. Kousky dermis omyjeme pečlivě v Petriho misce s PBS s antibiotiky, supernatant pipetujeme do zkumavky.

Kousky dermis dáme do nové Petriho misky (150 mm) s PBS + antibiotiky pro přípravu fibroblastů a endoteliálních buněk. Roztok trypsin/EDTA pipetujeme do zkumavky se směsí fibroblastů a endoteliálních buněk. Zkumavku inkubujeme v pohybující se vodní lázni při 37°C kvůli natrávení buněk, vortexujeme každých 5 minut. Trávení zastavíme přidáním 10ml FCS. Pasteurovou pipetou přidáme ke směsi několik kapek DNAsy I a rozpustíme (buňky se uvolní rychleji, pokud budeme pipetou pumpovat nahoru a dolů). Gázu (2 vrstvy) rozprostřeme na filtr a směs filtrujeme do sterilní 100 ml velké nádoby. Přes gázu přelijeme i trochu media s FCS. Přefiltrovanou suspenzi buněk filtrujeme ještě přes milipor (100µm velké otvory). Přefiltrovanou suspenzi buněk centrifugujeme 5 minut, 1200 rpm (= 350 xg), při pokojové teplotě. Pelet resuspendujeme v ohřátém (37°C) keratinocytovém růstovém mediu. Buňky spočítáme, pomocí Trypanové modři zjistíme množství živých a mrtvých, primární kulturu vyséváme do 75ml inkubační lahve o hustotě inokula 3×10^6 buněk.

Pasážování

Jelikož buňky velmi rychle rostou, musíme je zhruba každé tři dny pasážovat. Procesem pasážování jsou tedy odstraněny mrtvé buňky, živé a vitální buňky jsou zredukovány v jejich množství a přeneseny do nového media v nové inkubační lahvi.

Pomůcky

- Skleněné/plastové jednorázové pipety (Sterilin)
- Inkubační lahve (plastová lahev na tkáňovou kulturu), dále jen ink. láhev (TPP, Orange)
- Pipetboy – akumulátorový pipetovač (SWIFT PET)
- PBS
- Trypsin
- Růstové medium pro daný typ buněk
- Pasteurovy pipety na odsávání odpadu, pokud v laboratoři není přístroj na odsávání odpadu, pak použijeme nádobku s persterilem (dezinfekce na zahubení případných mikroorganismů)

Postup

Staré medium z ink. láhve buď odsajeme, nebo vylijeme do nádobky s persterilem. Buňky omyjeme 2x PBS a poté aplikujeme trypsin, který v ink. lahvi ponecháme. Ink. láhev uzavřeme a vložíme do inkubátoru. Pod binolupou kontrolujeme, zda jsou všechny buňky uvolněny od dna ink. láhve. Lehkým poklepem a následným pohledem do binolupy zjistíme,

zda jsou všechny buňky uvolněny (v ink. láhvi je slabá vrstva trypsinu, ve které buňky plavou). Reakci působení trypsinu zastavíme aplikací cca 5 ml nového růstového media. Pomocí pipety nasazené na pipetovač resuspendujeme (“rozfoukáme“) buňky v ink. láhvi v novém mediu. Musíme důkladně, aby na stěnách ink. láhve buňky nezůstaly. Poté odebereme cca 1 ml buněčné suspenze a přeneseme ho do nové ink. láhve. Suspenzi naředíme přidáním nového media, aby měli buňky dostatek živin pro růst. Řádně označenou ink. láhev umístíme do inkubátoru. Případně můžeme se suspenzí dále pracovat.

PBS (Phosphate Buffered Saline) neboli fosfátový pufr

Patří mezi nejvíce používané pufrы v biologickém výzkumu. Vodný roztok solí obsahující NaCl, NaHPO₄*2H₂O, a v některých modifikacích také KCl a KH₂PO₄. Hlavní funkcí je že pomáhá udržovat konstantní pH. Osmolarita a koncentrace iontů obvykle odpovídají koncentraci těchto iontů u člověka, což znamená, že roztok je izotonický. Díky těmto vlastnostem je pufr používán takové u tkáňových kultur, jelikož je pro buňky netoxický. PBS může být rozdělován do menších nádob a autoklávován (20 min, 121°C, program roztok) (http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline).

Při mých pokusech v Českých Budějovicích jsem pracovala s PBS, ve kterém se nachází následující chemikálie: pro přípravu 1 litru o pH=7 je potřeba NaCl 8,0 g; Na₂HPO₄*12H₂O 2,9g; KH₂PO₄ 0,2g; KCl 0,2g, chemikálie rozpustíme v přefiltrované a autoklávované destilované vodě.

Trypsin

Trypsin je serinová proteáza nalezená v zažívacím traktu mnoha obratlovců, kde hydrolyzuje proteiny (Rawlings, Barrett 1994:). Trypsin je produkován ve slinivce jako inaktivovaný proenzym trypsinogen. Enzym štěpí peptidové řetězce hlavně na karboxylové straně z aminokyselin lysinu, nebo argininu, hlavně když je jedna z nich následována prolinem. Má četné použití v biotechnologických procesech. Např. trypsinová proteolýza nebo trypsinizace.

V laboratoři tkáňových kultur je trypsin používán pro uvolnění adheřujících buněk během pasážování. Některé typy buněk mají schopnost přilnavosti ke dnu ink. láhve během kultivace *in vitro*. Trypsin je používán na rozštípnutí proteinů držících buňky na dně ink. láhve. Při pasážování může trypsin na buňky působit krátkou dobu (>60 sekund), při působení delší dobu by mohlo dojít k poškození buněk (<http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin>).

V laboratoři v Českých Budějovicích jsem pracovala s tímto trypsinem: 1,5% trypsin smíchaný s chelatonem 3 (0,02% ethylenediaminetetra acetic acid disodium salt hydrate G. R. Chelaton III p.a. Lachner), látka je rozpuštěna v PBS.

Růstové médium

Na počátku byly buňky pěstovány v přírodních médiích, která byla tvořena tkáňovými extrakty a tělní tekutinou, jako například extrakt kuřecího embrya, sérum, lymfa a další. S rozšířením výzkumu buněčných linií došlo ke vzniku vyšších požadavků na růstová media. Vyšší nároky na kvalitu vedli k uvedení chemicky definovaných medií založených na analýze tělních tekutin a výživných látek z biochemického hlediska. Eaglovo základní medium (Eagle 1955) a následně Eaglovo minimální esenciální medium (MEM) (Eagle 1959) začali široce používat různé přídavky do médií. Například telecí, lidské nebo koňské sérum, hydrolysáty proteinů a embryonální extrakt. Některé nepřetržité linie (L929, HeLa) začali být používány, což byl hlavní výsledek toho, že vytvořená média měla dostačující vlastnosti pro hlavní požadavky těchto buněk. Následně začala být vyvíjena média s náhražkami séra, začala být vyvíjena média pro rozdílné typy buněk (např. RPMI 1640 pro lymfoblastové buněčné linie), nebo specifikovaná média pro různé životní podmínky buněk (např. Leibovitz L15 pro vyloučení potřeby přidávání CO_2 a NaHCO_3) (Leibovitz 1963).

V mém pokusu jsem pracovala s těmito médii: MEM – minimal essential medium eagle 10x (Sigma), které je pro HeLa a L929 buněčné linie, a L15 (L15 medium Leibowitz, Sigma), které je pro Vero buněčnou linii.

Kompletní médium

Termín kompletní médium označuje médium, které má všechny součásti a přídavky přidané a je vhodné pro určité použití. Obvykle je tvořeno z definovaných složek média. Některé z jeho součástí, jako například glutamin, sérum, růstové faktory a hormony mohou být přidávány před použitím.

Kompletní média obsahují velké množství rozdílných aminokyselin, včetně neesenciálních aminokyselin a přidaných vitamínů. Často jsou obohacena metabolity (nukleotidy, lipidy) a minerály (R. I. Freshney 2005).

Sérum

Sérum obsahuje růstové faktory, které podporují buněčné dělení. Dále obsahuje adhesní faktory a antitrypsinové působení, které podporuje přilnavost buněk k podkladu. Sérum je také zdrojem minerálů, lipidů a hormonů, mnoho z nich může být vázáno v proteinu.

V tkáňových kulturách se používají tato séra: hovězí z telete a z plodu, z dospělého koně a lidské sérum. Široké využití má hovězí sérum a to jak z telete, tak z plodu, jsou nejvíce používána pro náročné buněčné linie a pro klonování buněk.

Lidské sérum je někdy používáno ve spojení s některou lidskou buněčnou linií, ale před použitím jsou nutná vyšetření, která objeví přítomný virus, HIV nebo hepatitidu B.

Koňské sérum je některými pracovníky upřednostňováno před telecím. Obvykle je získáváno z uzavřeného stáda a je více shodné v jednotlivých dávkách. Koňské sérum může být také s menší pravděpodobností metabolizováno polyaminy, následkem nižší úrovně polyamin oxidázy. Polyaminy jsou totiž mitogenní pro některé buněčné linie (Hyvonen et al. 1988; Kaminska et al. 1990).

Při mé práci jsem pracovala s následujícími médii – viz. Tab1., Tab2.

Buněčná linie	HaCaT	WS1	Lidské kožní fibroblasty	Primární epidermální keratinocyty
Typ média	DMEM/F12	DMEM	DMEM/F12	Keratinocytové růstové médium
Obsažené látky				
Aminokyseliny	L-alanin, L-arginin, L-asparagine, L-aspartátová kyselina, L-cystein, L-cystin, L-glutamová kyselina, L-glutamin, glycin, L-histidin, L-iso-leucin, L-leucin, L-lysin HCl, L-metionin, L-fenylalanin, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin	L-arginin, L-cystin, L-glutamin, glycin, L-histidin, L-iso-leucin, L-leucin, L-lysin HCl, L-metionin, L-fenylalanin, L-serin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin	L-alanin, L-arginin, L-asparagine, L-aspartátová kyselina, L-cystein, L-cystin, L-glutamová kyselina, L-glutamin, glycin, L-histidin, L-iso-leucin, L-leucin, L-lysin HCl, L-metionin, L-fenylalanin, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin	
Vitamíny	biotin, cholin chlorid, kyselina foliková, myo-inositol,	cholin chlorid, kyselina foliková, myo-inositol,	biotin, cholin chlorid, kyselina foliková, myo-inositol,	

	nicotinamid, D-Ca pantotenát, pyridoxal HCl, pyridoxin HCl, riboflavin, thiamin, vitamin B12,	nicotinamid, D-Ca pantotenát, pyridoxal HCl, riboflavin, thiamin	nicotinamid, D-Ca pantotenát, pyridoxal HCl, pyridoxin HCl, riboflavin, thiamin, vitamin B12	
Anorganické soli	CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄	CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄	CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄	
Stopové prvky	CuSO ₄ *5H ₂ O, Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O, FeSO ₄ *7H ₂ O, ZnSO ₄ *7H ₂ O	Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O	CuSO ₄ *5H ₂ O, Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O, FeSO ₄ *7H ₂ O, ZnSO ₄ *7H ₂ O	
Báze, nukleosidy, ...	hypoxantin, thymidin		hypoxantin, thymidin	
Energetické metabolity	D-glukósa, pyruvát sodný	D-glukósa, pyruvát sodný	D-glukósa, pyruvát sodný	
Lipidy a prekursory	kyselina linoleická, kyselina lipoická	kyselina linoleická	kyselina linoleická, kyselina lipoická	
Jiné složky	fenolová červeň, putrescin	fenolová červeň	fenolová červeň, putrescin	
Plynná fáze/ množství	CO ₂ /7%	CO ₂ /10%	CO ₂ /7%	

Tab1. V této tabulce jsou uvedeny buněčné linie a k nim příslušná media, se kterými jsem pracovala v průběhu mé pracovní stáže v Medizinische Hochschule Hannover (R. I. Freshney 2005).

Buněčná linie	HeLa	Vero	L929
Typ média	MEM	L15	MEM
Obsažené látky			
Aminokyseliny	L-arginin, L-cystin, L-glutamin, L-histidin, L-iso-leucin, L-leucin, L-lysin HCl, L-metionin, L-fenylalanin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin	L-alanin, L-arginin, L-asparagine, L-cystein, L-glutamin, glycin, L-histidin, L-iso-leucin, L-leucin, L-lysin HCl, L-metionin, L-fenylalanin, L-serin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin	L-arginin, L-cystin, L-glutamin, L-histidin, L-iso-leucin, L-leucin, L-lysin HCl, L-metionin, L-fenylalanin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin
Vitamíny	cholin chlorid, kyselina foliková, myo-inositol, nicotinamid, D-Ca pantotenát, pyridoxal HCl, riboflavin, thiamin	cholin chlorid, kyselina foliková, myo-inositol, nicotinamid, D-Ca pantotenát, riboflavin, thiamin	cholin chlorid, kyselina foliková, myo-inositol, nicotinamid, D-Ca pantotenát, pyridoxal HCl, riboflavin, thiamin
Anorganické soli	CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄	CaCl ₂ , KCl, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄	CaCl ₂ , KCl, MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Stopové prvky			
Báze, nukleosidy, ...			
Energetické metabolity	D-glukósa	D-galaktósa, pyruvát sodný	D-glukósa
Lipidy a prekursor			
Jiné složky	fenolová červeň	fenolová červeň	fenolová červeň
Plynná fáze/množství	CO ₂ /5%	vzduch	CO ₂ /5%

Tab2. V této tabulce jsou uvedeny buněčné linie a k nim příslušná média, se kterým jsem pracovala v laboratoři parazitologického ústavu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (R. I. Freshney 2005).

Scratch test – rýhový test

Pomůcky

- Viz pomůcky Pasážování
- Bürkerova komůrka (Meopta)
- Trypanová modř (barvivo) (0,5% vodný roztok, Sigma)
- Centrifugační zkuševka, 1 zkuševka o objemu 50 ml (PTT, Orange)
- 3 kusy 6 jamkových panelů (PTT)

Postup

Nejprve pracujeme podle postupu Pasážování. Uvolněné buňky resuspendujeme ve 2 ml nového media. Buněčnou suspenzi přeneseme pipetou do centrifugační zkuševky. Centrifugujeme 5 min při 1000 rpm. Medium opatrně odsajeme Pasteurovou pipetou, abychom neodebrali pelet tvořený buňkami.

Pelet resuspendujeme v 1 ml nového media. Pomocí Bürkerovi komůrky a mikroskopu spočítáme množství buněk v suspenzi.

Z 1 ml buněčné suspenze odebereme mikropipetou požadované množství a doplníme ho do čerstvého media, které máme připravené ve zkuševce o větším objemu.

Vzniklou buněčnou suspenzi řádně pomocí pipety a pipetovače před dalším použitím promícháme.

V dalším kroku pipetujeme suspenzi do jamkových panelů. Do každé jamky 2 ml suspenze. Po napipetování musíme každým panelem zahýbat zleva doprava, a nahoru a dolů, aby se buňky řádně rozmístili po dně, a došlo tak k rovnoměrnému porostu dna jamky. Takto připravené jamkové panely s buňkami dáme opatrně do inkubátoru a buňky necháme růst zhruba 3-4 dny.

Po této době, nebo až je dno jamky buňkami porostlé provádíme další krok. Na mikropipetu nasadíme žlutou špičku (Ependorf, 200 μ l) a vytvoříme pomocí ní rýhu v buněčném porostu. Rýha vede od shora dolů, tedy v úrovni znázornění průměru jamky.

Pipetou odsajeme medium spolu s uvolněnými buňkami, které byly v místě, kde se nachází rýha. Buňky na dně jamky 2x omyjeme PBS, v případě linií Vero a L929 promýváme základem média (po promytí PBS změní buňky do druhého dne tvar na kulatý a nemohou se použít pro experiment). Nakonec aplikujeme nové růstové medium s přidaným sericinem (viz. Tab3.). V celém postupu musíme pracovat rychle, aby buňky nebyly delší dobou v suchém prostředí. Pokud by tomu tak bylo, došlo by ke smrti buněk v obvodové části jamky. Nakonec uděláme na spodní straně jamky cca 0,5 cm od začátku rýhy fixou značku pro dobrou

orientaci při focení (díky značce začínáme vždy od stejného místa). Focení provádíme vždy v tyto časy: 0. hod (hodina kdy byla rýha udělána), 12. hod, 18. hod, 24. hod, 36. hod, 42. hod. Časy focení mohou pokračovat, pokud není rýha zarostlá.

	Kontrola + FCS	Kontrola - FCS	Sericin 0,01%	Sericin 0,05%	Sericin 0,1%
Množství media s FCS	4 ml	0	0	0	0
Množství media bez FCS	0	2 ml	5,940 ml	5,700 ml	5,400 ml
Množství sericinu	0	0	60 µl	300 µl	600 µl

Tab3. Udává kolik media a zásobního roztoku sericinu je třeba na přípravu media pro každou skupinu. Skupina Kontrola –FCS je pouze mediu bez přidaného FCS, do tohoto media se přidává zásobní roztok sericinu.

Příprava zásobního roztoku sericinu

Pomůcky

- Filtr milipor (MILLIPOR, 0,22 µm)
- Injekční stříkačka o objemu 10 ml (Chirana)
- 2 plastové zkumavky (TPP, Orange)
- Digitální váhy
- Kopistka
- Médium bez séra
- Práškový hydrolyzát sericinu (Wako)

Postup

Do plastové zkumavky si navážíme např. 10 mg prášku sericinu, který následně rozpustíme v 10 ml základu media pro daný typ buněk. Prášek se dobře a rychle rozpouští, tudíž nepotřebujeme rozpouštění pomocí míchátko.

Vzniklý roztok přefiltrujeme pomocí filtru miliporu a injekční stříkačky do nové, řádně popsané plastové zkumavky, ve které bude uchováván v lednici.

Barvení pomocí DAPI

Buněčné linie Vero a L929 změnili během pokusu Scratch test svůj tvar z normálního přisedlého na kulatý. Nebylo tedy jasné, zda jsou buňky živé či ne. Proto jsem provedla barvení pomocí fluorescenční barvy DAPI a následné prohlížení pod fluorescenčním mikroskopem.

Pomůcky

- PBS
- Barva DAPI (200 μ g/ml)
- Jamkové panely s dopředu narostlými buněčnými kulturami Vero a L929
- Mikropipety
- Kádinky na odpad a na PBS

Postup

V první části pokusu postupujeme stejně jako v návodu Scratch test. Když provádíme focení posledních snímků buňky v jamkových panelech nabarvíme pomocí barvi DAPI a poté fotíme pod fluorescenčním mikroskopem.

Postup pro barvení

Příprava zásobního roztoku DAPI – měla jsem k dispozici již naředěné DAPI o koncentraci 200 μ g/ml, finální koncentrace DAPI má být 0,5 μ g/ml. Postupovala jsem tedy následujícím způsobem.

roztok 1 - 250 μ l DAPI + 750 μ l PBS

roztok 2 (pracovní roztok) - 120 μ l roztok 1 + 11880 μ l PBS

Množství roztoku 2 je větší, jelikož jsem potřebovala 12ml pracovního roztoku DAPI.

Pro obarvení buněk nejprve odsajeme mikropipetou z jamek medium, které pokrývá buňky. Mikropipetou napipetujeme 1 ml roztoku 2 do každé jamky. Inkubujeme při pokojové teplotě 1-5 minut. Poté dvakrát promyjeme pomocí PBS, do každé jamky pipetujeme 2 ml. Na závěr odsajeme 1 ml PBS, protože kdybychom odsáli celé 2 ml, mohlo by se stát, že by buňky při pozorování a focení pod mikroskopem vyschly a následně zemřeli.

Zamražení buněk s přidavkem sericinu o různých množstvích

Pomůcky

- Zkumavky na zamrazování buněk
- Buněčná kultura narostlá v ink. láhvi
- Centrifugační zkumavka
- Centrifuga
- Mikropipeta + špičky
- PBS
- Trypsin
- DMSO (dimetyl sulfoxid)
- FCS (fetal calf serum)

Postup

V první části postupu pracujeme podle návodu Pasážování. Resuspendované buňky centrifugujeme při 5 minutách na 1200 rpm. Medium opatrně odsajeme, aby nám na dně centrifugační zkumavky zbyl pelet tvořený usazenými buňkami. Pelet resuspendujeme v FCS, ve kterém je přidán práškový sericin. Do jednotlivých zamrazovacích zkumavek dáváme různá množství zásobního roztoku roztoku sericinu o koncentraci 0,001% (roztok v základu média pro daný typ buněk) a FCS, množství DMSO a buněk jsou ve všech zkumavkách stejná (viz Tab4.).

Roztok sericinu (μl)	FCS (μl)	DMSO (μl)	Buňky (μl)
1	399	100	500
5	395	100	500
10	390	100	500
50	350	100	500
100	300	100	500
0	400	100	500
0	400	100	500

Tab4.

Jako první pipetujeme FCS, druhý je roztok sericinu, poté DMSO a jako poslední pipetujeme buněčnou suspenzi. Musíme pracovat velmi rychle, protože DMSO je pro buňky toxická látka, která živé buňky zabíjí.

Po pipetování všechny zkumavky uzavřeme, náležitě označíme a rychle přeneseme do mrazáku (-152°C), kde mohou zůstat uskladněné i několik měsíců. V mém pokusu jsem zamražené buňky použila za cca 3 měsíce.

Rozmrazení buněk

Pomůcky

- Inkubační láhve
- Skleněné, nebo jednorázové plastové pipety
- Pipetovač
- Centrifugační zkumavka
- Bürkerova komůrka
- Pasteurova pipeta
- Trypanová modř
- Medium pro daný typ buněk

Postup

Podle záznamové knihy v laboratoři si nalezneme, v kterém stojanu jsou v mrazáku uloženy buňky, se kterými chceme pracovat. Buňky vyjmeme a ve vodní lázni (37°C) buňky rozehrějeme. Suspenzi buněk přeneseme pomocí Pasteurovi pipety do centrifugační zkumavky, ve které je médium pro daný typ buněk. Zkumavku uzavřeme a centrifugujeme 5 minut při 1200 rpm.

Po centrifugaci odsajeme medium a vzniklý pelet z usazených buněk resuspendujeme v novém přidaném mediu. Pomocí Bürkerovy komůrky a trypanové modři spočítáme množství buněk v suspenzi, a určíme také poměr živých a mrtvých buněk (živé jsou modře zbarvené a mrtvé jsou bílé).

Počítání rozmrazených buněk s přidavkem sericinu o různých množstvích

Pomůcky

- Stejně jako v postupu Rozmrazení buněk.
- FCS

Postup

V mém experimentu jsem pracovala s těmito buněčnými liniemi: HaCaT, NIH3T3 a primární keratinocyty. Uvedené buněčné linie jsem si nejprve rozmrazila, přenesla do ink. láhvi a v inkubátoru nechala přes víkend růst. Jelikož každé buňky mají jinou schopnost

přilnavosti k povrchu ink. láhve, liší se délky působení trypsinu na buňky. Jinak je postup úplně stejný jako u výše uvedeného návodu pro Pasážování.

HaCaT – působení trypsinu - 3 minuty, resuspendování buněk v 1 ml média pro tyto buňky.

NIH3T3 – působení trypsinu je velmi krátké - 3 sekundy, resuspendování buněk v 1 ml média pro tyto buňky.

Primární keratinocyty – působení trypsinu – 3 minuty, resuspendování buněk v 1 ml FCS.

Buňky spočítáme pomocí Bürkerovy komůrky a získaná čísla dosadíme do grafů, z kterých potom vyvodíme výsledky.

Počítání buněk

Suspenzi buněk naředíme s Trypanovou modří 1:1 (100 μ +100 μ l), spočítáme v Bürkerově komůrce.

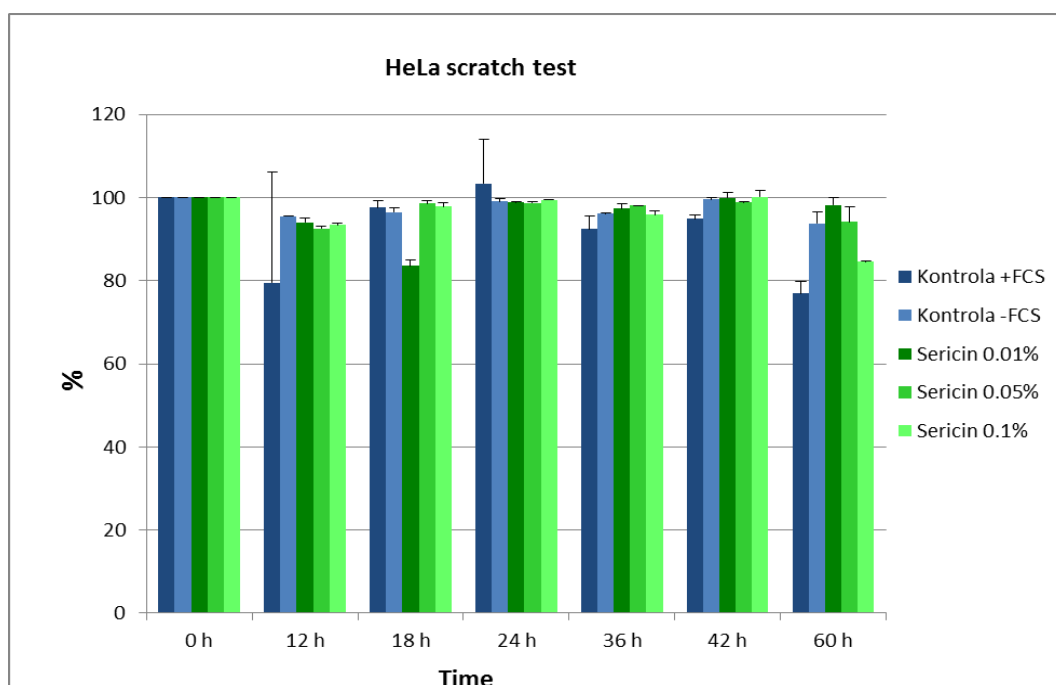
Počet buněk z 25-ti polí x 10000 x ředění = počet buněk v 1 ml.

Při práci v laboratoři tkáňových kultur musíme dodržovat hygienické zásady, abychom předešli kontaminaci materiálů.

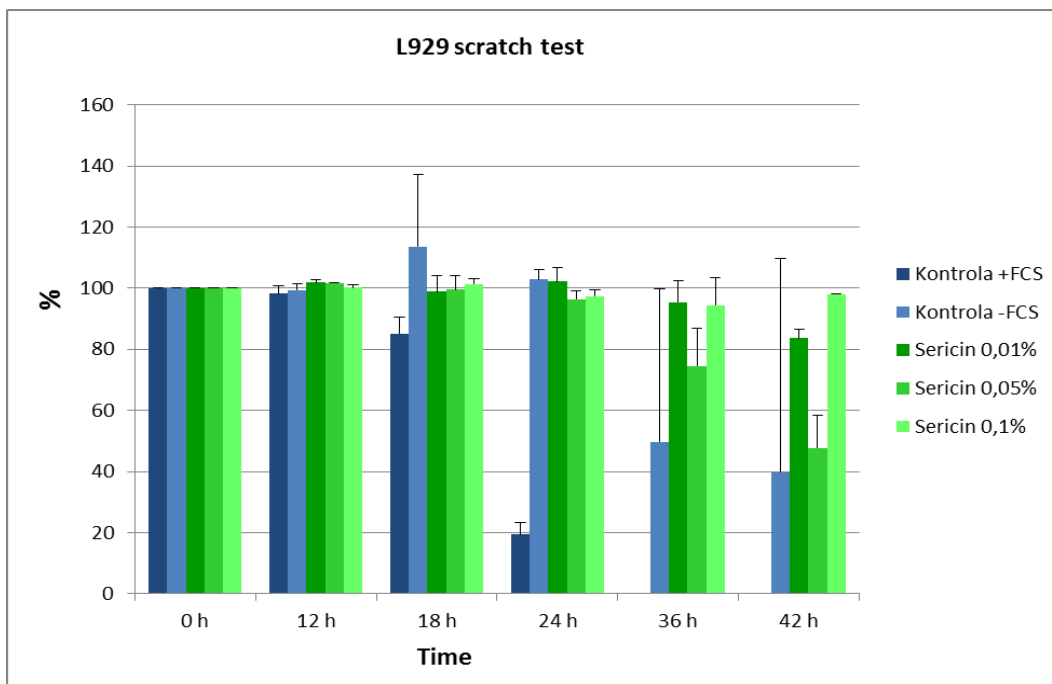
4. VÝSLEDKY

Provedené pokusy jsou velmi podrobně popsány v části Materiál a Metodika. V následující části diplomové práce se omezují na shrnutí výsledků formou grafů a na fotografickou dokumentaci (fotografie všech skupin buněk jsou na přiloženém CD). Popis u grafů upozorňuje na závěry, které lze z pokusů učinit. Jsem si vědoma, že dosud provedené pokusy poskytují jen dílčí výsledky, které by bylo třeba ověřit v dalším výzkumu. Nicméně poskytují dílčí výsledky pro další výzkum velmi dobrou základnu.

4.1. Scratch test



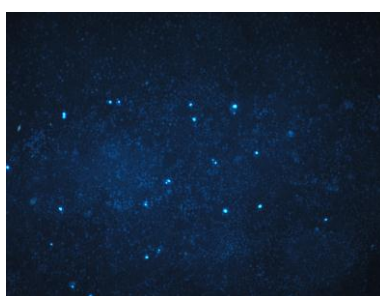
Graf č. 1 – Při inkubaci 12 hodin je nejrychlejší dělení buněk v médiu s FCS, u medií s přidanými sericiny je rychlost dělení srovnatelná jako v médiu bez FCS i bez sericinů. Po 18 hodinách je rychlost dělení naopak nejvyšší u média s přidaným sericinem o koncentraci 0,01%. Při 24 hodinové inkubaci je rychlost dělení buněk srovnatelná u všech pěti skupin. To přetrvává i za 36 a 42 hodin. Zlom nastává až po 60 hodinách, kdy je rychlost dělení buněk nejvyšší opět u média s přidaným FCS, u sericinů je nejvyšší rychlost dělení u koncentrace 0,1%.



Graf č. 2 – Při 12 hodinové inkubaci je rychlost dělení buněk shodná jako v okamžiku vytvoření rýhy (0 hodin). V médiu s přidaným FCS je rychlost růstu nejvyšší a rýha je plně zarostlá již za 36 hodin. U médií s přidanými sericiny je situace shodná a později horší jako v médiu bez FCS a bez sericinů. V médiu bez FCS dochází k pozvolnému růstu buněk, v médiích se sericiny rychlost růstu buněk nejvyšší při koncentraci 0,05%, v médiu s přidaným 0,1% sericinem se zdá že buňky vůbec nerostou ani po 42 hodinách. Dalším problémem v růstu buněk bylo, že v médiích se sericiny změnila buňky po 24 hodinách tvar z normálního na kulatý a méně rostly. Podle fotografií z fluorescenčního mikroskopu vidíme, že po 42 hodinách bylo v médiu s 0,1% roztokem sericinu srovnatelné množství mrtvých buněk jako v kontrole bez FCS. V normálním médiu bylo mrtvých buněk minimální množství.



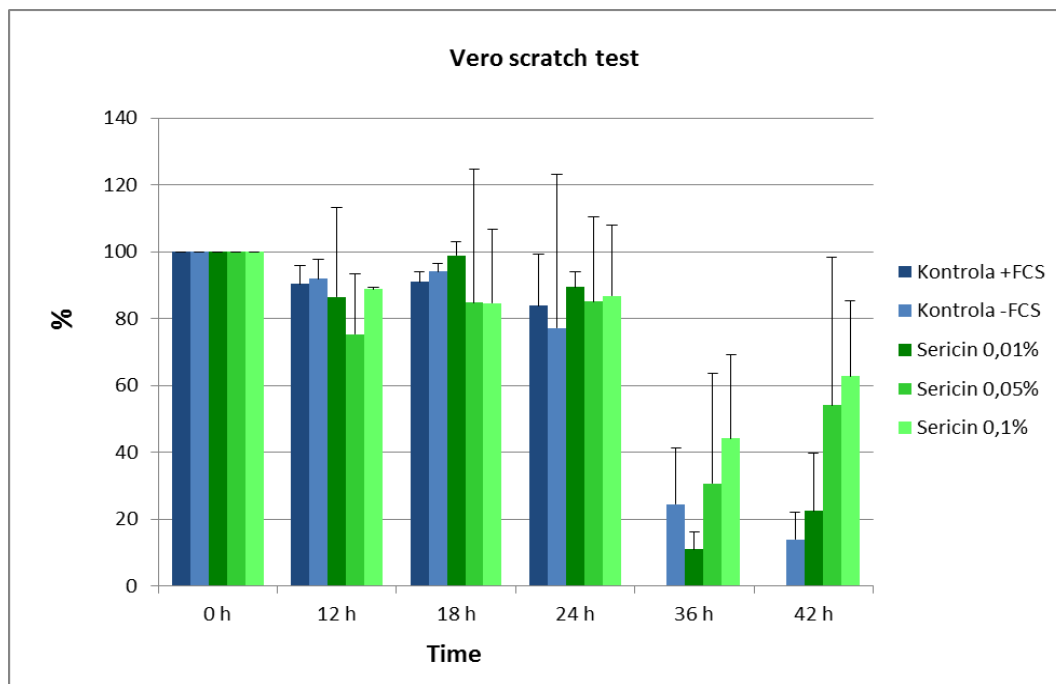
Ko -FCS



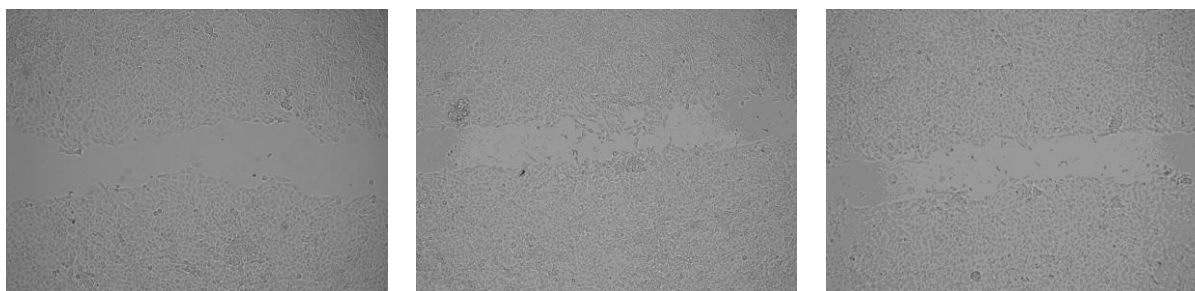
Ko +FCS



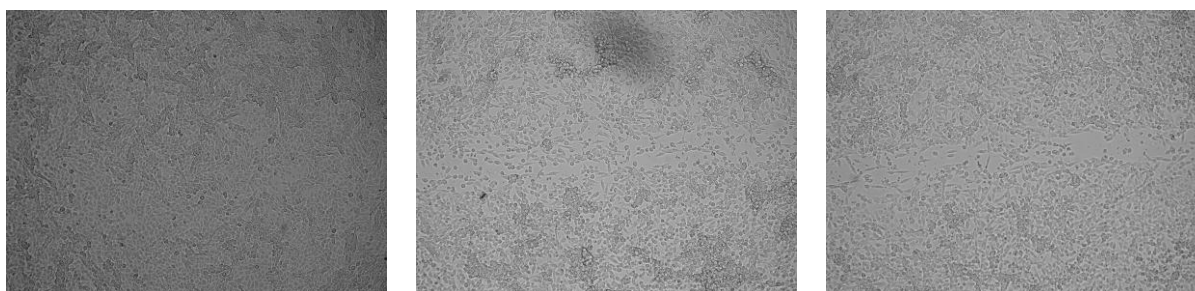
S 0,1%



Graf č. 3 – Již při 12 hodinách inkubace vidíme, že buňky rostou nejlépe v médiu s 0,05% sericinem. Po 24 hodinách nastal stejný problém jako u linie L929, buňky v médiích se sericiny začali měnit svůj tvar na kulatý a již nedocházelo k dalšímu růstu buněk, spíše úbytku, proto se při 36 a 42 hodinách blíží množství buněk údajům jako na při 24 hodinách. Po 12 hodinách inkubace rostou buňky s 0,05% sericinem rychleji než v kontrolním médiu s FCS.



Po 42 hodinách inkubace přestávají buňky v médiích se sericiny růst, což je patrné z fotografií i z grafu.

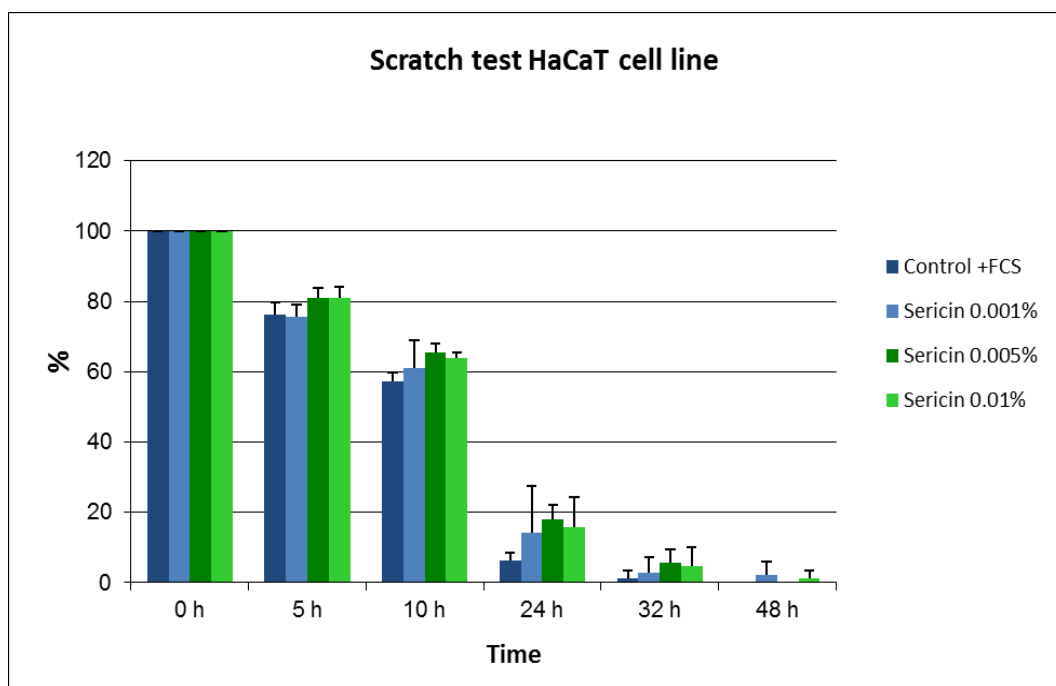


Ko +FCS

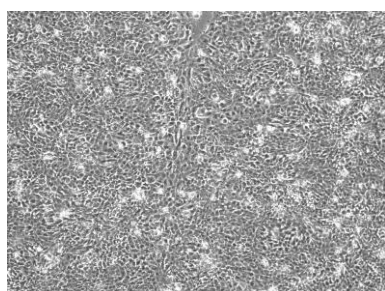
S 0,05%

S 0,1%

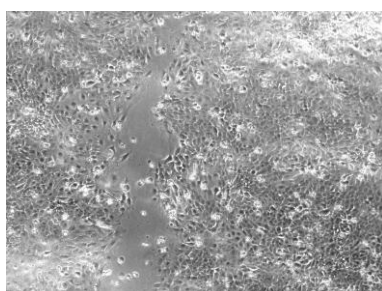
U následujících grafů byl sericin přidán do média pouze jako dodatek (supplement), médium tedy obsahovala FCS i sericin. Časy měření jsou také jiné, protože jsem tyto pokusy dělala na pracovní stáži v Medizinische Hochschule Hannover.



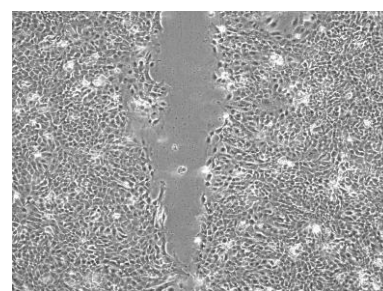
Graf č. 4 – Rychlosti dělení buněk jsou celkově velmi srovnatelné. V médiu s FCS rostou buňky nejrychleji, nejprve je rychlost růstu buněk hodně podobná v médiích s FCS a v médiu s přidáním sericinu o koncentraci 0,001%. Při 32 a 48 hodinách jsou rychlosti opět velmi stejné, při 48 hodinách jsou nepratrné rozdíly v médiích s FCS a se sericiny.



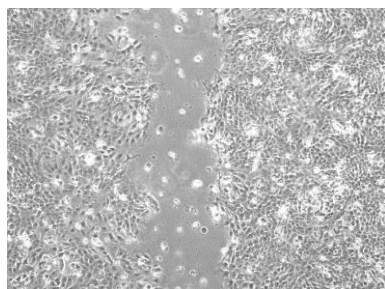
Ko +FCS



S 0,001%

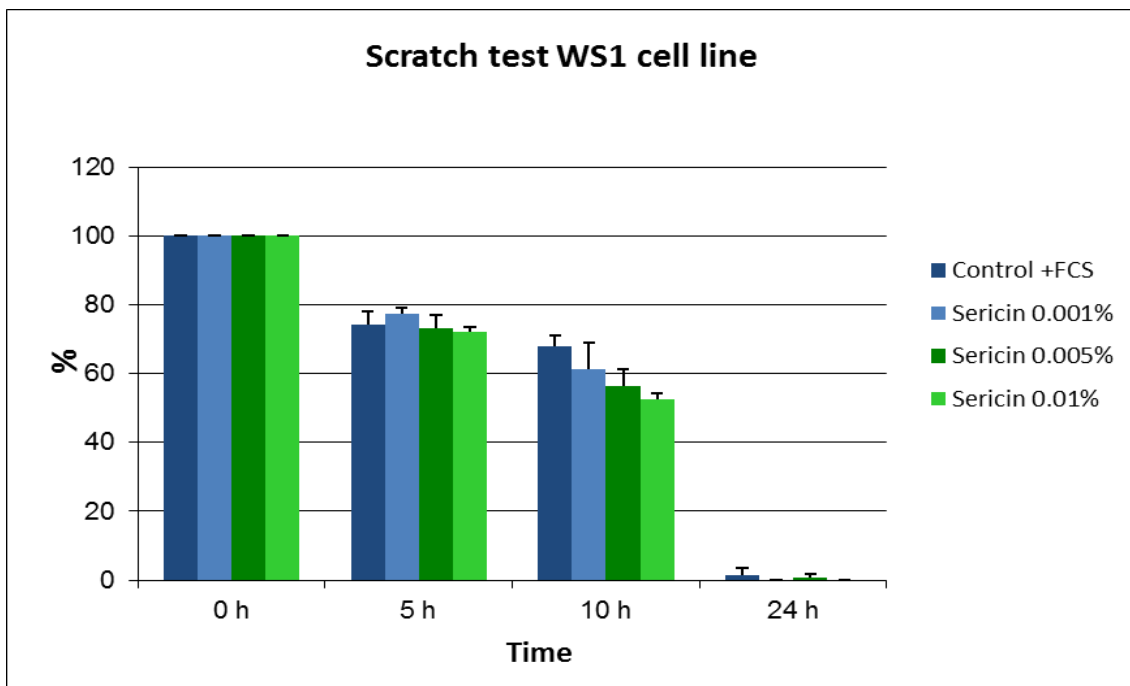


S 0,005%

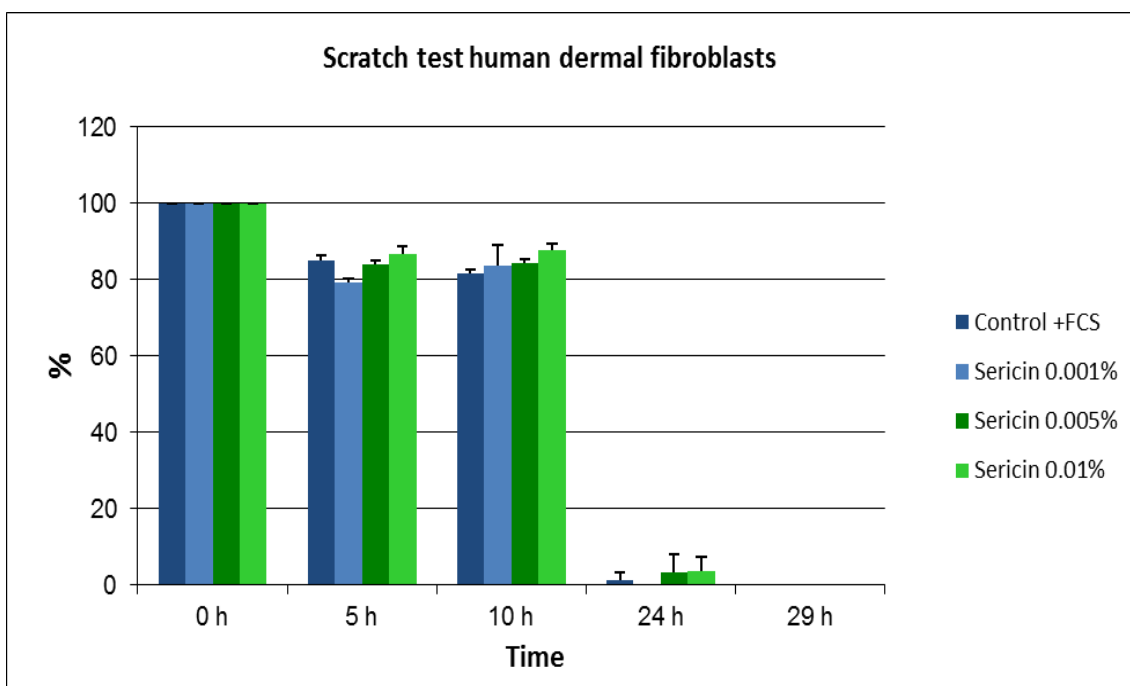


S 0,01%

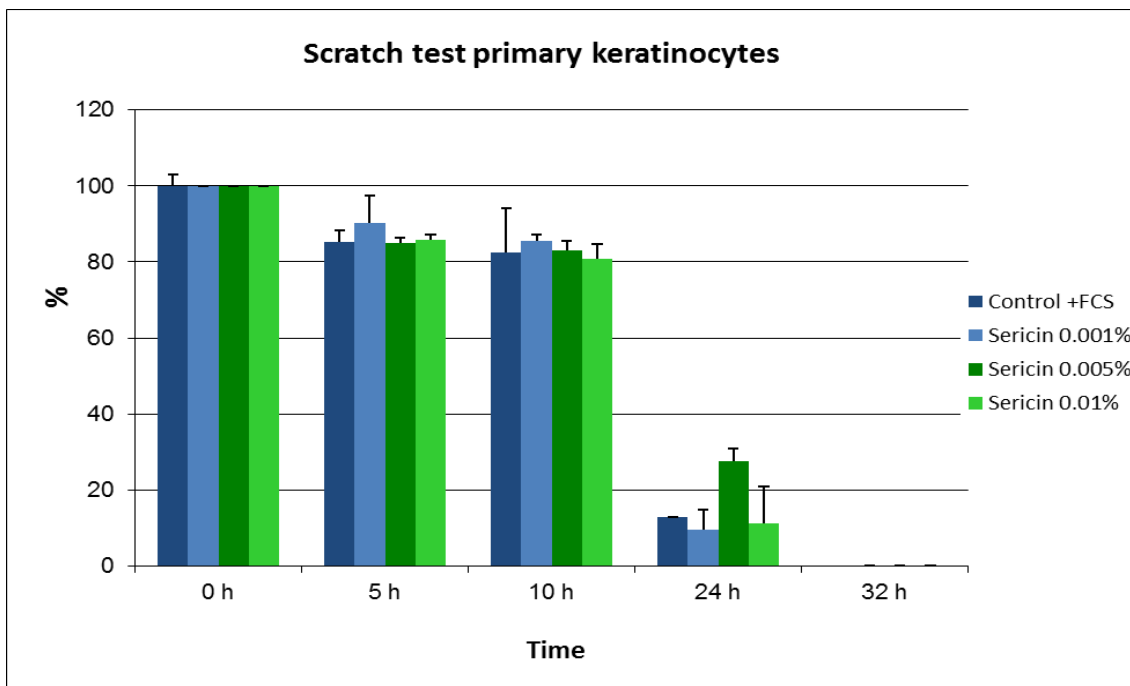
Uvedené fotografie dobře ukazují minimální rozdíly mezi jednotlivými jamkami po inkubaci 48 hodin.



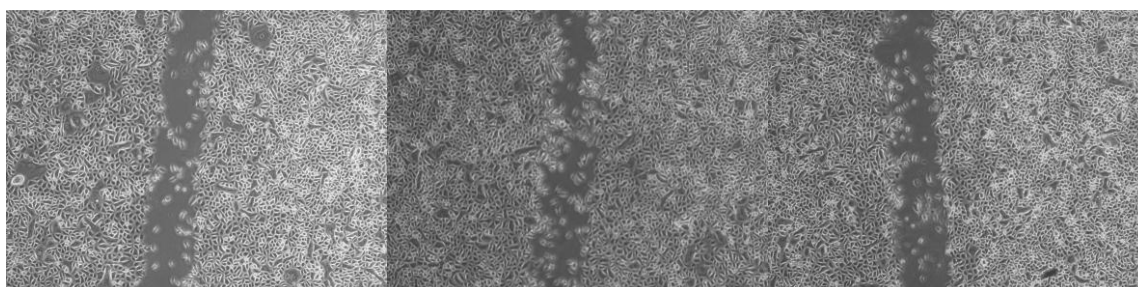
Graf č. 5 – Celkové je rychlost růstu buněk nejlepší v médiu s přidaným sericinem o koncentraci 0,01%, v tomto médiu se buňky dělí lépe než v médiu s FCS.



Graf č. 6 – Rychlost dělení buněk je ve všech skupinách velmi vyrovnaná a to po všechny časy inkubace.



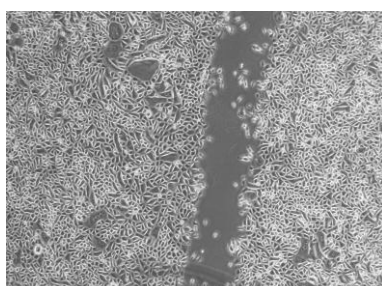
Graf č. 7 – Po 5 a 10 hodinách inkubace jsou rychlosti dělení buněk velmi vyrovnané, rozdíl nastává až po 24 hodinách, kdy je dělení buněk nejpomalejší v médiu s přidaným sericinem o koncentraci 0,005%. Po 32 hodinách je ale rychlost dělení buněk opět stejná, zarostlé jsou všechny rýhy.



Ko +FCS

S 0,001%

S 0,005%

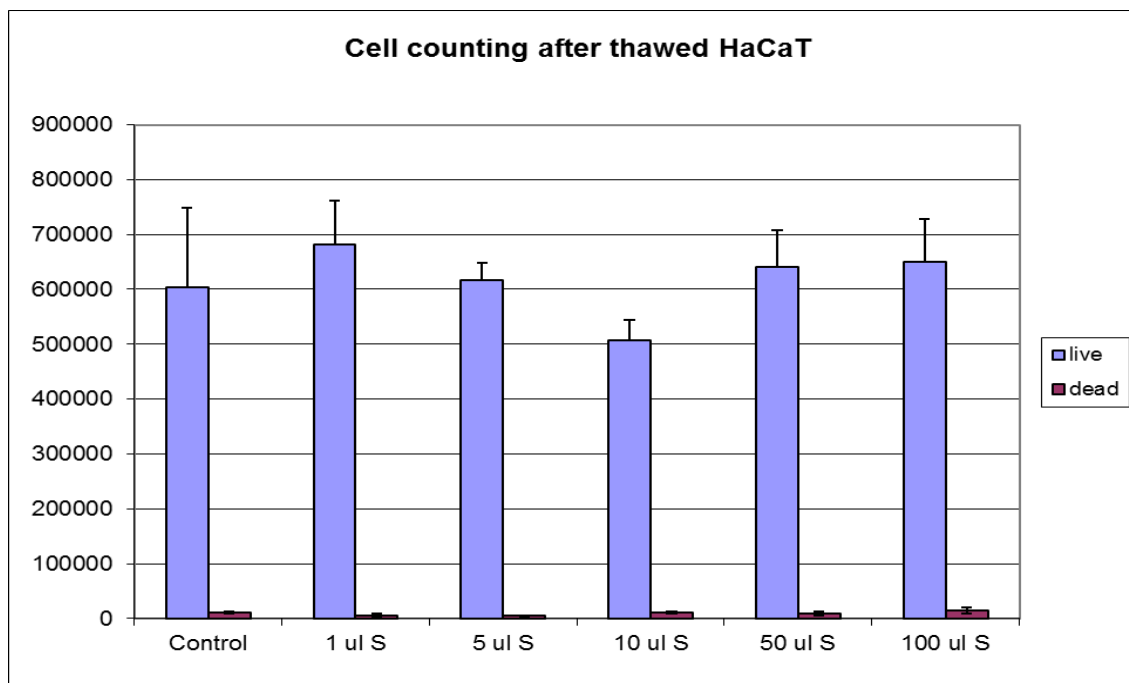


S 0,01%

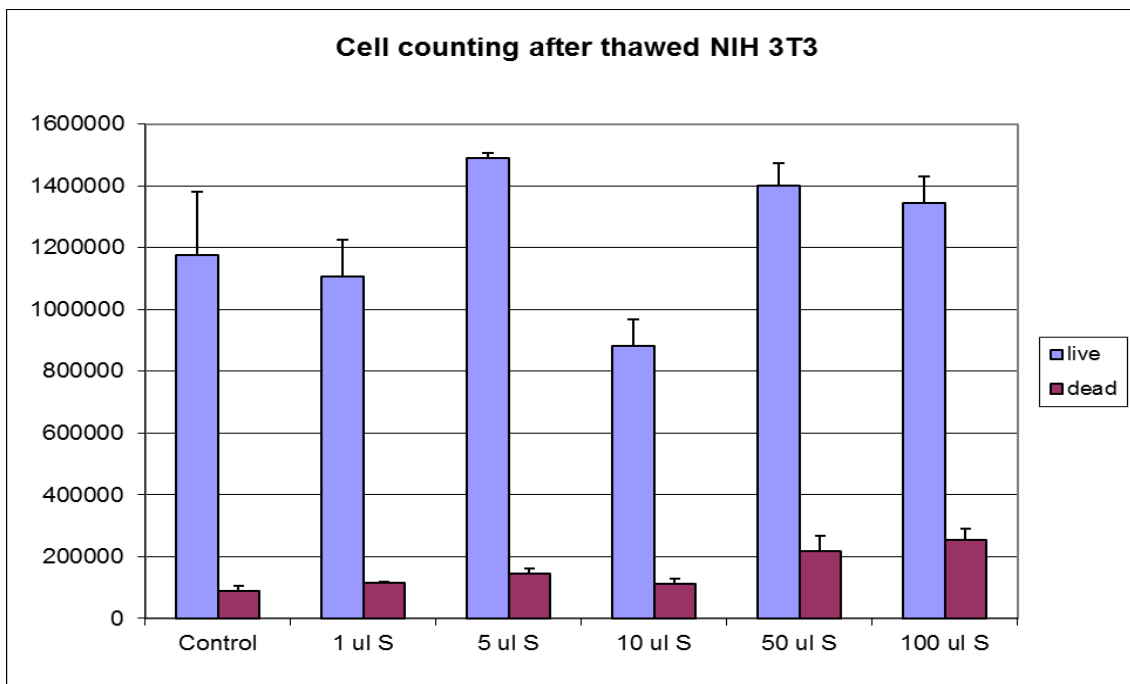
Ukázka fotografií buněk po inkubaci 5 hodin. Nejlépe rostou buňky v médiu s přidaným 0,001% sericinem.

4.2. Efekt sericinu na zamrazené buňky

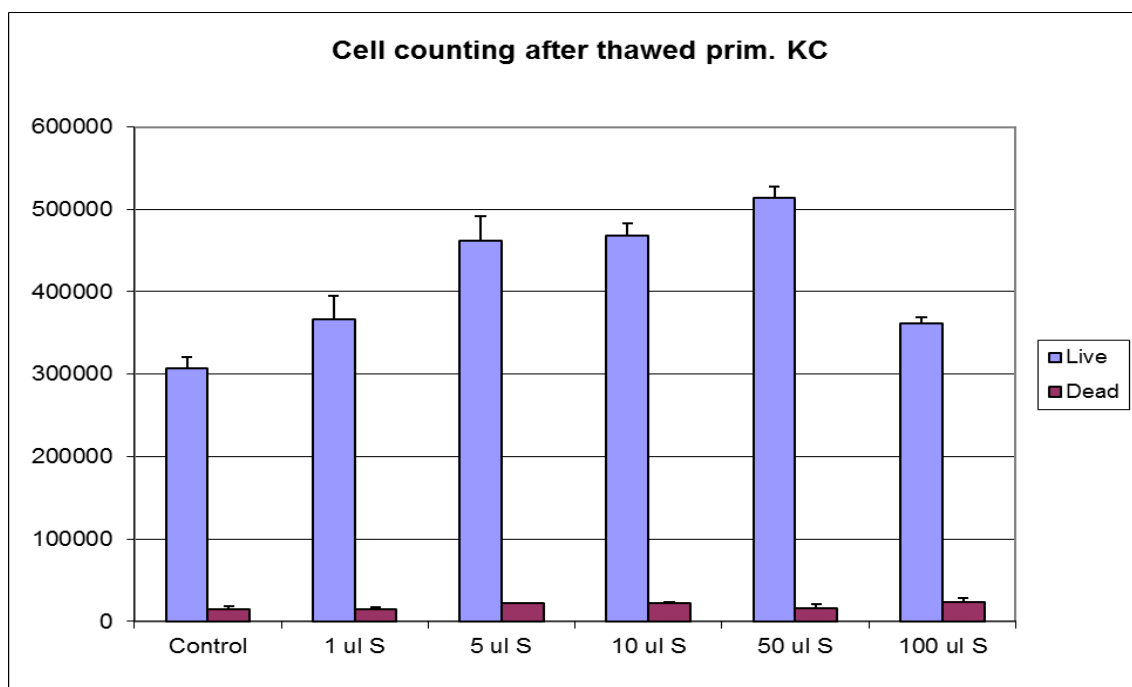
Při tomto pokusu byly buňky nejprve zamrazeny na dobu 3 měsíců, poté byly zpět rozmrazeny, ponechány přes víkend v inkubátoru růst v inkubačních lahvích a poté byly spočítány.



Graf č. 8 – Z grafu na první pohled určíme, že množství mrtvých buněk bylo u všech skupin minimální, nejméně mrtvých buněk bylo v médiu, kam bylo přidáno 5 μ l roztoku sericinu. Počet živých buněk byl nejlepší v médiu, kam byl přidán 1 μ l roztoku sericinu. V Kontrole (pouze médium bez přidaného sericinu), 5, 50 a 100 μ l přidaného roztoku sericinu byl počet buněk velmi stejný. Nejméně živých buněk bylo v médiu s 10 μ l přidaného roztoku sericinu, jejich počet byl o sto tisíc nižší.



Graf č. 9 – Množství mrtvých buněk je vyšší než u předešlé linie. Nejvíce mrtvých buněk bylo v médiích, kam bylo přidáno 50 a 100 μ l roztoku sericinu. V ostatních skupinách bylo množství mrtvých buněk srovnatelné. Při počítání živých buněk vznikly velké rozdíly. Nejvíce živých buněk bylo v médiu s 5 μ l přidaného roztoku sericinu. O dva stotisíce méně buněk bylo v médiu s 50 μ l roztoku sericinu, a o další dva stotisíce méně buněk bylo v médiu se 100 μ l přidaného roztoku sericinu. Nejméně živých buněk bylo v médiu s 10 μ l roztoku sericinu. V Kontrole bylo množství buněk srovnatelné jako v médiu s 1 μ l sericinu.



Graf č. 10 – Množství mrtvých buněk je nižší než u předešlé linie a velmi srovnatelné u všech skupin. Nejvíce živých buněk bylo v médiu s 50 μ l přidaného roztoku sericinu. V médiích s 5 a 10 μ l roztoku sericinu byla množství srovnatelná. Stejná množství byla také v médiích s 1 a 100 μ l přidaného sericinu. Kupodivu nejméně živých buněk bylo v Kontrolním médiu.

5. DISKUSE

Tkáňové kultury jsou využívány pro objasnění různých nemocí v lidské populaci, ale také pro zjištění jak bude daná tkáň reagovat na působení různých medikamentů. Pro podporu růsti buněk v pěstovaných v živných médiích se používá fetální bovinní sérum (FCS). Velkým problémem, zejména pro případné terapeutické použití je možná kontaminace séra původci zákeřné nemoci BSE, a proto se vědci snaží nalézt za něj nějakou náhradu. Náhradou by podle některých autorů mohl být sericin, což je směs několika ve vodě rozpustných proteinů z hedvábných kokonů bource morušového (*Bombyx mori*). Předmětem mé práce bylo ověření účinku komerčního preparátu sericinu na růst několika typů buněk v kultuře.

Testovala jsem následující buněčné linie: HeLa – lidské epiteliální buňky z karcinomu děložního čípku; L929 – myší fibroblasty; Vero – pochází z opičích epiteliálních buněk; NIH 3T3 – standartní buněčná linie fibroblastů z myši; HaCaT – linie tvořená dospělými kožními fibroblasty; WS1 – kožní fibroblasty z embrya člověka; primární fibroblasty a keratinocyty – buněčné kultury byly získány v laboratoři z explantátů lidské kůže.

Pro zjištění, zda má sericin nějaký efekt na růst buněk, jsem použila dvě metody. První byl tzv. Scratch (seškrábnutí) test, druhou bylo počítání buněk, které přežily zamrazení standartním způsobem buď bez sericinu, nebo s přidavkem sericinu. Rozdílná byla i množství sericinu a také to, že nejprve jsem sericin přidávala do růstového média, které obsahovalo i FCS a v druhém případě jsem se pokoušela FCS sericinem úplně nahradit.

Má studie vycházela z řady dřívějších publikací. Např. Terada et al. (2002) zkoumali účinek sericinu na buněčné dělení. Ve svých pokusech tým pracoval s buněčnou linií HeLa, linií 293, buňkami lidského hepatoblastomu HepG2 a myšími hybridomy 2E3-O. Sericin byl přidáván do růstového média po dva dny a poté určovali buněčnou hustotu. Při provádění pokusu s hybridomy byl sericin do média přidáván po dva dny. Růst buněk se prokazatelně zvýšil v médiu, kde byl přidán sericin o koncentraci 0,1%, ale v médiu kde byl sericin o koncentracích 0,03 a 0,01% nebyl prokázán účinek. V buněčné kultuře s HeLa buňkami 0,03% sericin zvýšil jejich množství, ale 0,3% neprokázal účinek. U linie HepG2 došlo k prokazatelnému zvýšení růstu buněk při koncentracích sericinu 0,03% a 0,1%, ale 0,3% koncentrace sericinu neměla vliv na růst buněk. Terada a jeho kolektiv zkoušeli nahradit FCS za sericin u buněčné linie 293, buňky se však bez FCS přestaly dělit. Částečná obnova buněčného dělení nastala při přítomnosti 0,1% sericinu.

Při použití „Scratch“ testu jsem pracovala s roztokem sericinu o pěti různých koncentracích 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05% a 0,1%. V pokusech presentovaných v grafech číslo 1, 2 a 3 měl sericin plně nahradit FCS. Z Grafu č. 1 pro HeLa zjišťuji, že po 60 hodinách inkubace je rychlost dělení buněk rostoucích v médiu s FCS asi o 5% lepší než v médiu s 0,1% sericinem. Ve zbývajících jamkách, ve kterých se nachází buňky v negativní kontrole, což je růstové médium bez FCS, a v jamkách s 0,01% a 0,05% sericinem je rychlost dělení buněk srovnatelná.

Z Grafu č. 2 pro linii L929 je zřejmé, že buňky výborně rostou v médiu s FCS, rýha je zcela zarostlá už po 24 hodinách. V jamkách, ve kterých je místo FCS sericin rostou buňky dobře v koncentraci 0,05%, ale rychlost dělení je srovnatelná s negativní kontrolou. V koncentracích 0,01 a 0,05% je rychlost dělení pomalá.

Velmi dobrý účinek na dělení buněk je viditelný v Grafu č. 3 pro linii Vero, kde je rýha zarostlá také po 24 hodinách. Nejlepší účinek na dělení buněk má v tomto případě 0,01% roztok sericinu při 36 hodinách, ale změna nastává při 42 hodinách, kdy se rýha opět zvětšuje a buňky mění svůj tvar na kulaté. Tento jev je možná způsoben toxicitou sericinu na buňky, nebo také tím že buňky vyčerpali své vnitřní zásoby FCS a přestávají být přilnavé k povrchu jamky. Problém je zda si buňky nějaké zásoby dělají.

V následujících grafech č. 4, 5, 6 a 7 byl sericin přidáván do média které již obsahovalo FCS. Tudíž nelze přesně určit jak velký má sericin účinek na tyto buněčné linie. V grafu č. 4 pro linii HaCaT vidíme, že účinek sericinů je podobný působení FCS ve standardním médiu. Rýha je plně zarostlá po 32 hodinách v médiích s FCS a se sericinem o koncentraci 0,005%. V médiích s 0,001% a 0,01% sericinem je rychlost dělení buněk pomalejší.

Jak je viditelné z grafu č. 5 pro linii WS1, buňky rostou lépe v médiu s 0,01% sericinem než v médiu s FCS. Po 24 hodinách je však rýha zarostlá ve všech čtyřech skupinách.

Grafy č. 6 a 7 ukazují účinek sericinu na dělení buněk primárních kultur. U primárních keratinocytů v grafu č. 6 je účinek FCS srovnatelný se sericiny o koncentracích 0,001% a 0,01%. V médiu se sericinem o koncentraci 0,005% je růst buněk dvakrát pomalejší. Na růst primární kultury fibroblastů (Graf č. 7) má nejlepší vliv sericin o koncentraci 0,001%, který je nepatrně lepší než médium s FCS. Úplně stejná je rychlost dělení buněk u médií s přídatkem sericinů o koncentracích 0,005% a 0,01%.

5.1. Účinek sericinu na zamražené buňky

DMSO je nejvíce používaný kryoprotektant, který se přidává do média před zamražením buněk. Působí však do určité míry toxicky a proto se hledá náhrada sericinu (Sasaki et al. 2005).

Při mém pokusu byla jako mrazící látka použita směs sericinu, FCS a DMSO (přesná množství viz. Tab4. v Metodice). Zamrazeny byly tři linie buněk: HaCaT, NIH 3T3 a primární keratinocyty. U linie HaCaT bylo po rozmrazení a spočítání nejvíce živých buněk ve zkumavce kam byl předtím přidán 1 μ l sericinu, v kontrolní zkumavce kde bylo normální médium bez přidaného sericinu bylo o sto tisíc méně buněk a nejméně buněk bylo v médiu s 5 μ l přidaného sericinu, nejméně buněk bylo ve zkumavce s 10 μ l přidaného sericinu (Graf č. 8).

U buněčné linie NIH 3T3 (Graf č. 9) byli srovnatelné počty buněk ve zkumavkách kam bylo přidáno 5, 50 a 100 μ l sericinu - množství buněk v těchto zkumavkách bylo vyšší cca o dva statisíce než ve zkumavce kde bylo normální médium s DMSO. Ve zkumavce s přídatkem 10 μ l sericinu bylo nejméně buněk, což je shodné jako u linie HaCaT. Působení sericinu jako podpůrného prostředku pro zamrazení buněk se u této linie moc neosvědčilo, jelikož stoupla množství mrtvých buněk. Nejvíce mrtvých buněk bylo u zkumavek, kam bylo přidáno 50 a 100 μ l sericinu, nejméně jich naopak bylo v médiu bez sericinu, tedy v kontrolní zkumavce. Linie primárních keratinocytů (Graf č. 10) reagovala na sericin velice dobře. Ve všech zkumavkách s přidaným sericinem bylo více živých buněk než ve zkumavce bez sericinu. Nejvíce živých buněk bylo ve zkumavce s 50 μ l přidaného sericinu. Při počítání byly zjištěny také nějaké mrtvé buňky, ale jejich množství může být zanedbatelné v porovnání s linií NIH 3T3. Pro primární kultury by mohlo připadat v úvahu nahrazení DMSO sericinem, nebo alespoň jeho přidávání před zamražením.

6. ZÁVĚR

Pomocí metody scratch test jsem testovala vliv komerčního sericinového hydrolyzátu na buněčné linie HeLa, Vero, L929, HaCaT, WS1 a na primární linie keratinocytů a fibroblastů. Na liniích HaCaT, NIH3T3 a primárních keratinocytech jsem vyzkoušela, zda sericin pomáhá buňkám přežít zmrazení a jejich uchování v zamraženém stavu po dobu 3 měsíců.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Akai H. (1984)** The ultrastructure and functions of the skin gland cells of *Bombyx mori.*, In: R. C. King and H. Akai (eds.) Insect Ultrastructure, Vol. 2. Plenum, New York, 323-364
- Akai H. (1997)** Anti-bacterial function of natural silk materials. International Journal of Wild Silkmoths & Silk, 3:79-81
- Akai H., Nagashima T., Aoyagi S. (1993)** Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm., *Antheraea mylitta Drury* (Lepidoptera * Saturniidae) Int. J. Insect. Morphol. Embryol; 22: 497-506
- Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., et al. (2003)** Silk-based biomaterials. Biomaterials, 24(3): 401-16
- Annamaria S., Maria R., Tullia M., Silvio S., Orio C. (1998)** The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. Int. Biodeterior. Biodegrad., 42(4): 203-11
- Arunkumar K.P., Metta 1., Muralidhar, Nagaraju J. (2006)** "Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA". Molecular Phylogenetics and Evolution, 40(2): 419–427
- Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., et al. (February 2010)** "Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines". Int. J. Cancer. doi: 10.1002/ijc. 25242. PMID 20143388., 127(1): 1–8
- Carrel A. (1912)** On the permanent life of tissues outside the organism. J. Exp. Med., 15: 516-528
- Couble P., Michaille J.J., Couble M.L., Prudhomme J.C. (1987)** Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland. Developmental Biology, 124: 431-440
- Couble P., Chevillard M., Moine A., Ravel-Chapuis P., Prudhomme J.C. (1985)** Structural organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5' flanking DNA with that of the fibroin gene. Nucleic Acids Res., 13(5): 1801-1814
- Couble P., Michaille J.J., Couble M.L., Prudhomme J.C. (1987)** Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland. Dev. Biol., 124: 431-440
- Craig C.L. (1997)** Evolution of arthropod silks. Annual Review of Entomology, 42: 231-267
- Desmyter J., Melnick J., Rawls W.E. (1968)** Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). J. Virol. Oct., 2(10): 955-61.
- Driever W., Stemple D., Schier A., Solnica-Krezel L. (1994).** Zebrafish: Genetic tools for studying vertebrate development. Trends Genet., 10: 152-159
- Dulbecco R. (1952)** Production of plaques in monolayers of tissue cultures by single particles of an

- animal virus. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 38: 747
- Eagle H. (1955)** The specific amino acid requirements of mammalian cells (strain L) in tissue culture. J. Biol. Chem., 214: 839
- Eagle H. (1959)** Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130: 432
- Fedic R. (1996)** Characterisation of Sericin 1 Gene in *Bombyx mori*. (Bachelor theses, in Czech)
- Fisher H. W., Puck T. T., Sato G. (1958)** Molecular growth requirements of single mammalian cells: The action of fetuin in promoting cell attachment of glass. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44: 4-10
- Fischer A. (1925)** Tissue culture. Studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro. London, Heinemann
- Freshney R. I. (2005)** Culture of animal cells. A manual of basic technique. Fifth Edition., 642
- Fusenig N. E., Boukamp P., Breitkreutz D., Hülsen A., Petrussevska S., Cerutti P., Stanbridge E. (1990)** In vitro transformation of human skin epithelial cells: Role of RAS oncogene in malignant progression. Toxicology in vitro. Volume 4. Issue s 4-5. 627-634
- Gamo T (1982)** Genetics variants of the *Bombyx mori* silkworm encoding sericin proteins of different length. Biochemical Genetics 20: 165-177
- Gamo T., Inokuchi T., Laufer H. (1977)** Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. Insect Biochemistry, 7: 285-295
- Garel A., Deleage G., Prudhomme J. C. (1997)** Structure and organization of the *Bombyx mori* Sericin 1 gene and the Sericins 1 deduced from the sequence of the ser 1B cDNA. Insect Biochem. Molec. Biol., 27(5): 469-477
- Gey G. O., Coffman W. D., Kubicek M. T. (1952)** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res., 12: 364-365
- Goldsmith M. R., Shimada T., Abe H. (2005)** The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. Annu Rev Entomol. PMID 15355234, 50:71-100.
- Ham R. G. (1963)** An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Exp. Cell Res., 29: 515
- Ham R. G. (1965)** Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53: 288
- Hamada Y., Yamashita O., Suzuki Y. (1987)** Haemolymph control of sericin gene expression studied by organ transplation. Cell Differ; 20: 65-76
- Harrison R. G. (1907)** Observations on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 4: 140-143
- Hatakeyama H. (1996)** Biodegradable sericin-containing polyurethane and its production. Japan Patent 08-012738A
- http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/resources/Grzimek_insects/Lepidoptera/Bombyx_mori.jpg/view.html

<http://bioinformatics.istge.it/cldb/cl4732.html>

http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline

<http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin>

<http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=fibroblast>

<http://chestofbooks.com/reference/American-Cyclopaedia-11/Silkworm.html>

<http://www.fibre2fashion.com/industry-article/16/1510/a-value-added-finish-from-silk-degumming-waste-liquor1.asp>

Huang J., Valluzzi R., Bini E., Vernaglia B., Kaplan D.L. (2003) Cloning, expression and assembly of sericin-like protein. *J. Biol. Chem.*, 278: 46117-46123

Hyde N. (1984) The queen of textiles. *National Geographic*, 165: 3-49

Hyvonen T., Alakuijala L., Andersson L., Khomutov A. R., Khomutov R. M., Eloranta T. O. (1988) 1-Amino-oxy-3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by interfering with polyamine synthesis. *J. Biol. Chem.*, 263: 1138-1144

Chevillard M., Deleage G., Couble P. (1986) Aminoacid sequence and putative conformational characteristics of the 25kD silk protein of *Bombyx mori*. *Sericologia*, 26: 435-449

Inoue S., Tanaka K., Arisaka F., Kimura S., Ohtomo K., Mizuno S. (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 40517-40528

Inoue S., Tanaka K., Tanaka H., Ohtomo K., Kanda T., Imamura M., et al. (2004) Assembly by of the silk fibroin elementary unit in endoplasmic reticulum and a role of L-chain for protection of α 1,2-mannose residues in N-linked oligosaccharide chains of fibrohexamerin/P25. *Eur J Biochem.*, 271: 356-366

James W., Berger T., Elston D. (2005) *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology* (10th ed.). Saunders ISBN 9780721629216. Retrieved 2010-06-01, 5-6

Kaminska B., Kaczmarek L., Grzelakowska-Sztabert B. (1990) The regulation of G0-S transition in mouse T lymphocytes by polyamines. *Exp. Cell Res.*, 191: 239-245

Kaplan D., Adams W. W., Farmer B., Viney C. (1994) Silk-biology, structure, properties, and genetics. *ACS Symp Ser*; 544: 2-16

Kaplan D. L., Mello C.M., Arcidiacono S., Fossey S., Senecal K., Muller W. (1998) Silk. In: McGrath K, Kaplan DL, editors. *Protein based materials*. Boston: Birkhauser; P., 103-131

Kato N., Sato S., Yamanaka A., Yamada H., Fuwa N., Nomura M. (1998) Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci , Biotechnol , Biochem.*, 62(1): 145-7

Kimura K., Oyama F., Ueda H., Mizuno S., Shimura K. (1985) Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Experientia*, 41: 1167-1171

Kludkiewicz B., Takasu Y., Fedič R., Tamura T., Sehnal F., Žurovec M. (2009) Structure and

- expression of the silk adhesive protein Ser2 in *Bombyx mori*. Insect Biochem. Mol. Biol., 39: 938-946
- Kodřík D. (1992)** Small protein components of the cocoons in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) and *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). Acta Entomologica Bohemoslovaca, 89: 269-273
- Komatsu K. (1975)** Studies on dissolution behaviors and structural characteristics of silk sericin. Bull. Seric. Exp. Stn., 26: 135-256
- Krejčík A. (1936)** Chov bource morušového. Nakl. Brázda, Praha, 45
- Kristensen N. P., Scoble M. J., Karsholt O. (2007)** Lepidoptera phylogeny and systematics: The state of inventorying moth and butterfly diversity. Zootaxa, 1668: 699-747
- Kurioka A. (1998)** Application of silk proteins to new biomaterial (Silk Sci Res Inst Tokyo, Japan), Zairyo Gijutsu, 16(5): 195-201
- Leibovitz A. (1963)** The growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. Am. J. Hyg., 78: 173-183
- Lucas F., Rudall K. M. (1968)** Extracellular fibrous proteins: The silks. In: Florkin M, Stota EH (eds) Comprehensive Biochemistry Elsevier, Amsterdam, 26B: 475-558.
- Maekawa H., Takada N., Mikitani K., Ogura T., Miyajima N., Fujiwara H., Kobayashi M., Ninaki O. (1988)** "Nucleolus organizers in the wild silkworm *Bombyx mandarina* and the domesticated silkworm *B. mori*". Chromosoma (Biology of the Nucleus) (Springer-Verlag). doi:10.1007/BF00286912. Retrieved 7 November 2010., 96(4): 263-269
- McGrath J. A., Eady R. A. J., Pope F. M. (2004)** "Anatomy and Organization of Human Skin". In Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C.. Rook's Textbook of Dermatology (7th ed.). Blackwell Publishing. doi:10.1002/9780470750520.ch3. ISBN 9780632064298. Retrieved 2010-06-01., 4190
- Midgley C. A., Craig A. L., Hite J. P., Hupp T. R. (1998)** Baculovirus expression and the study of the regulation of the tumor suppressor protein p53. In Ravid, K., & Freshney, R. I. (eds.), DNA transfer to cultured cells. New York, Wiley-Liss, 27-54
- Michaille J. J., Couble P., Prudhomme J. C., Garel A. (1986)** A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. Biochemie 68: 1165-1173
- Michaille J. J., Garel A., Prudhomme J. C. (1990b)** Cloning and characterisation on the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. Gene, 86: 177-184
- Michaille J. J., Garel A., Prudhomme J. C. (1990a)** Expression of Ser1 and Ser2 genes in the middle silk gland of *Bombyx mori* during the fifth instar. Sericologia, 30: 49-60
- Michajlov M. (1952)** Šelkovodstvo. Selchozgiz, Moskva, 480
- Mita K., Ichimura S., James T. C. (1994)** Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. Journal of Molecular Evolution, 38: 583-592
- Morgan J. G., Morton H. J., Parker R. C. (1950)** Nutrition of animal cells in tissue culture; I: Initial

studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73: 1

- Mori K., Kanai T., Kaneda M., Sakai Y. (1997)** Absorptive article. Japan Patent 09-322911A
- Mori K., Tanaka K., Kikuchi Y., Waga S., Mizuno S. (1995)** Production of chimeric fibroin-light chain polypeptide in a fibroin secretion deficient naked pupa mutant of the silkworm *Bombyx mori*. J. Mol. Biol., 251: 217-228
- Murase M. (1994)** Method for solubilizing and molding cocoon silk, artificial organ made of cocoon silk, and medical element made of cocoon silk. Japan Patent 06-166850A
- Nakamura K., Sato R., Shioraki H. (1985)** Sericin containing vinyl graft polymers Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 60233119 A2 (Kanagawa Prefecture Japan), Showa P4; Chem Abstr, 104(20) (1986) 169122
- Nirmala X., Mita K., Vanisree V., Žurovec M., Sehnal F. (2001b)** Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. Insect Molecular Biology, 10: 437-445
- Nirmala X., Kodrík D., Žurovec M., Sehnal F. (2001a)** Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. Eur. J. Biochem., 268(7): 2064-73
- Nomura M., Iwasa Y., Araya H. (1995)** Moisture absorbing and desorbing polyurethane foam and its production. Japan Patent 07-292240A
- Nomura M., Yamada H. (1996)** Skin caring fiber product. Japan Patent 08-060547A
- Okamoto H., Ishikawa E., Suzuki Y. (1982)** Structural analysis of sericin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequence. J. Biol. Chem., 257: 15192-15199
- Ono M. (1951)** Studies on the growth of the silk gland cell in silkworm larvae. Bull. Sericult. Exp. Stn., 13: 247-303
- Padamwar M. N., Pawar A. P. (2004)** Silk sericin and its applications: A review. Journal of Scientific & Industrial Research. Vol. 63 , 323-329
- Park K. J., Jin H. H., Hyun C. K. (2002)** Antigenotoxicity of peptides produced from silk fibroin. Process Biochemistry, 38: 411-418
- Parker R. C. (1961)** Methods of tissue culture, 3rd ed., London, Pitman Medical, 47
- Parker R. C., Healy G. M., Fisher D. C. (1954)** Nutrition of animal cells in tissue culture. VII. Use of replicate cell cultures in the evaluation of synthetic media. Canad. J. Biochem. Physiol., 32: 306
- Pauling L., Corey R. B. (1953)** Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 39: 253-256
- Peigler R. S. (1993)** Wild silk of the world. American Entomologist, 39: 151-161
- Rahbari R., Sheahan T., Modes V., et al. (2009)** "A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification.". Biotechniques, 46(4): 277–84.
- Rawlings N. D., Barrett A. J. (1994)** "Families of serine peptidases". Meth. Enzymol. doi:10.1016/0076-6879(94)44004-2. PMID 7845208, 244: 19–61.
- Rising A., Nimmervoll H., Grip S., Fernandez-Arias A., Storckenfeldt E., Knight D. P., et al. (2005)** Spider silk proteins – mechanical property and gene sequence. Zool Sci. 22(3): 273-81

- Rous P., Jonc F. A. A. (1916)** A method of obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J. Exp. Med.*, 23: 555
- Sasaki M., Kato S., Yamada H., Terada S. (2005)** Development a novel serum-free medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 42, 183
- Sehnal F., Žurovec M. (2004)** Construction of silk fiber core in Lepidoptera, *Biomacromolecules*, 5: 666-674
- Sehnal F. (2008)** Prospect of the practical use of silk sericins. Invited review. *Entomological Research*, 38 S1-S8
- Sehnal F., Akai H. (1990)** Insect silk glands: Their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int.J.Insect Morphol.Embryol.*, 19: 79-132
- Sehnal F., Sutherland T. (2008)** Silks produced by insect labial glands. Review. (*Prion* 2:4, October/November/December 2008); ©2008 Landes Bioscience, 145-153
- Sezutsu H., Yukuhiro K. (2000)** Dynamic rearrangement within the *Antheraea pernyi* silk fibroin gene is associated with four types of repetitive units. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 329- 338
- Sharrer T. (2006)**"HeLa" Herself". *The Scientist*, 20(7): 22.
- Sinohara H. (1979)** Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B, 87-91
- Skloot R. (2010)** *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. New York: Crown/Random House. ISBN 9781400052173.
- Smith V. (2002)** "The Life, Death, and Life After Death of Henrietta Lacks, Unwitting Heroine of Modern Medical Science.". *Baltimore City Paper*. Retrieved 2 March 2010.
- Sponner A. (2007)** Spider silk as a resource for future biotechnologies. *Entomological Research*, 37: 238-250
- Sprague K. (1975)** The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*, 14: 925-31
- Suzuki Y. (1977)** Differentiation of silk gland. A model system for the study of differential gene action. In: Beermann W (ed.) *Results and Problems in Cell Differentiation*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1-44
- Takasu Y., Yamada H., Tamura T., Sezutsu H., Mita K., Tsubouchi K. (2007)** Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 37:1234-40
- Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K. (2002)** Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66: 2715-2718
- Takei F., Kikuchi Y., Kikuchi A., Mizuno S., Shimura K. (1987)** Further evidence for importance

of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells. *Journal of Cell Biology*, 105: 175-180

Tamada Y. (1997) Anticoagulant and its production. Japan Patent 09-227402A

Tamura T., Kubota T. (1989) A determination of molecular weight of fibroin polypeptides in the saturniid silkworms, *Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi*, and *Philosamia Cynthia ricini* by SAD PAGE. In wild Silkmoths 88' (eds. H. Akai nad M. Kiguchi), Natl Inst. Sericult. Insect Sci., Tsukuba, 67-72

Tanaka K., Innoue S., Mizuno S (1999) Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 269-276

Tanaka K., Mizuno S. (2001) Homologues of fibroin L-chain and P25 of *Bombyx mori* and present in *Dendrolimus spectabilis* and *Papilio xuthus* but not detectable in *Antheraea yamamai*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31, 665-677

Tanaka K., Innoue S., Mizuno S. (1999a) Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 269-276

Tanaka K., Kajiyama N., Ishikura A., Waga S., Kikuchi A., Ohtomo K., Takagi T., Mizuno S. (1999b) Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1432: 92-103

Tanaka T. (2001) Antifrosting method, antifrosting agent and snow melting agent. Japan Patent 2001-055562A

Terada S., Nishimura T., Sasaki M., Yamada H., Miki M. (2002) Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology*, 40(1-3): 3-12

Todaro G. J., Green H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.*, 17: 299-313

Tripoulas N. A., Samols D. (1986) Developmental and hormonal regulation of sericin mRNA in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental Biology*, 116: 328-336

Tsubouchi K. (1998) Wound covering material containing silk fibroin and silk sericin as the main components and process for producing the same, PCT Int Appl WO 9857676 A1 (to National Institute of Sericulture, Japan) pp 34; *Chem Abstr*, 130(4) (1999) 43418

Tsubouchi K. (1999a) Wound covering material. US Patent US5951506

- Tsubouchi K. (1999b)** Occlusive dressing consisting essentially of silk fibroin and silk sericin and its production. Japan Patent 11-070160A
- Ueda K., Makita M. (2000)** Rubber molding having durable skincare property. Japan Patent 2000-169595A
- Van Valen L. M., Maiorana V. C. (1991)** "HeLa, a new microbial species". *Evolutionary Theory & Review* 10: 71–4. ISSN, 1528-2619
- Voegeli R., Meier J., Blust R. (1993)** Sericin silk protein: unique structure and properties, *Cosmet Toilet*, 108: 101-108
- Vollrath F., Knight D. P. (2001)** Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*;410(6828):541-8
- Vollrath F. (1999)** Biology of spider silk. *Int J Biol Macromol.*, 24(2-3): 81-8
- Wakabayashi S., Sugioka M. (1994)** Synthetic fiber improved in hygroscopicity. Japan Patent 06-017372A
- Wang Y., Kim H. J., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D. L. (2006)** Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 27: 6064-6082
- Warwicker J. O. (1960)** Comparative studies of fibroins. II. The crystal structures of various fibroins. *Journal of Molecular Biology*, 2: 350-362
- Watts, Watson D. (2010)** "HeLa Cancer Cells Killed Henrietta Lacks. Then They Made Her Immortal.". *The Virginian-Pilot*, 1: 12–14.
- Waymouth C. (1959)** Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB725/1). *J. Natl. Cancer Inst.*, 22: 1003
- Wei D., Li G., Taw J., Liu Z., Xinmin Z. (1989)** Graft copolymerization of styrene onto silk sericin, *Gaofenzi Xuebao*, 6: 740-749
- Westerfield M. (1993)** *Zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. Eugene, OR, University of Oregon Press
- Winkler S., Kaplan D.L. (2000)** Molecular biology of spider silk. *J Biotechnol*;74(2):85-93
- Wong Po Foo C., Kaplan D. L. (2002)** Genetic engineering of fibrous proteins: spider fragline silk and collagen. *Adv Drug Deliv Rev.*, 54(8): 1131-43
- Yamada H., Fuwa N. (1994)** Protein-containing synthetic high molecular material and its preparation. Japan Patent 06-080741A
- Yamada H., Fuwa Y. (1993a)** Pervaporation membrane and production thereof. Japan Patent 05-345118A
- Yamada H., Fuwa Y. (1993b)** Filter membrane and production thereof. Japan Patent 05-345117A
- Yamaguchi K., Kikuchi Y., Takagi T., Kikuchi A., Oyama F., Shimura K., Mizuno S. (1989)** Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol.*, 210: 127-139

- Yasumura Y., Kawakita M. (1963)** "The research for the SV40 by means of tissue culture technique". Nippon Rinsho, 21(6): 1201–1219
- Yonemura N., Sehnal F. (2006)** The design of silk fiber composition in moths has been conserved for more than 150 million years. Journal of Molecular Evolution, 63: 42-53
- Yonemura N., Sehnal F., Mita K., Tamura T. (2006)** Protein composition of silk filaments spun under water by caddisfly larvae. Biomacromolecules, 6: 3370-3378
- Zhang Y-Q. (2002)** Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotechnology Advances, 20: 91-100
- Zhou C. Z., Confalonieri F., Medina N., Zizanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin M., Duguet M., Perasso R. (2000)** Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. Nucleic Acid Res., 28: 2413-2419
- Zhou CZ., Confalonieri F., Jacquet M., Perasso R., Li Z.G., Janin J. (2001)** Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. Proteins Structure and Functional Genetics, 448: 119-122
- Žurovec M., Sehnal F. (2002)** Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*. Journal of Biological Chemistry, 277: 22639-22647
- Žurovec M., Yang C., Kodrík D., Sehnal F. (1998b)** Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. Journal of Biological Chemistry, 273: 15423-15428
- Žurovec M., Yang C., Kodrík D., Sehnal F. (1998)** Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. J. Biol. Chem., 273(25): 15423-15428