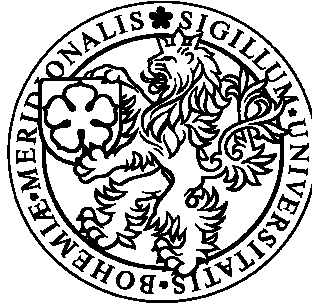


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Studium rekombinantních proteinů Sericinu-2 bource  
morušového (*Bombyx mori*)**

Diplomová práce

**Tereza Stašková**

Školitel: doc. RNDr. Michal Žurovec CSc.

České Budějovice 2012

**Stašková, T., 2012:** Studium rekombinantních proteinů Sericinu-2 bource morušového (*Bombyx mori*). [Study of recombinant proteins derived from *Ser-2* gene of *Bombyx mori*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 75 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Four different variants of recombinant proteins derived from *Bombyx mori Ser-2* gene were expressed in bacteria. The ability of these proteins to coat hydrophobic surfaces and to support growth of various types of adherent cells *in vitro* were examined. It was shown that these proteins support cell adhesion and proliferation, and could be used as coating agents to realize surfaces suitable for growth of vertebrate and insect cells.

Práce byla financována z grantu GA ČR P502/10/2382.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala 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 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 dne 27. dubna 2012

.....  
Tereza Stašková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli, doc. Michalu Žurovcovi, za vedení práce, odborné rady, trpělivost a věnovaný čas při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat prof. Františku Sehnalovi za financování práce a účasti na projektu AVČR. Další poděkování patří Mgr. Petru Koníkovi nejen za metodickou pomoc při analýze proteinů, ale i za cenné rady a připomínky. Také bych chtěla poděkovat členům všem laboratoře a kamarádům, kteří mi při práci pomáhali. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a celé rodině za podporu při studiu.

V Českých Budějovicích dne 5. května 2009

.....  
Tereza Stašková

# Obsah

1	Úvod.....	Chyba! Záložka není definována.
2	<b>Literární přehled</b> .....	2
2.1	Biomateriály .....	2
2.2	Adhezivní povrchy pro tkáňové kultury.....	2
2.3	Sericiny – adhezivní proteiny.....	5
3	<b>Cíle práce</b> .....	8
4	<b>Materiál</b> .....	9
4.1	Pokusné organismy .....	9
4.2	Buněčné kultury .....	9
4.3	Konstrukty.....	10
4.4	Oligonukleotidy.....	10
4.5	Média.....	11
5	<b>Metodika</b> .....	14
5.1	Klonování – práce s DNA .....	14
5.2	Expese rekombinantních proteinů.....	20
5.3	Charakterizace izolovaných rekombinantních proteinů.....	23
6	<b>Výsledky</b> .....	28
6.1	Klonování – práce s DNA, příprava konstruktů pro expresi rekombinantních proteinů.....	28
6.2	Expese rekombinantních proteinů.....	32
6.3	Charakterizace izolovaných rekombinantních proteinů.....	37
7	<b>Diskuse</b> .....	49
7.1	Lepivé vlastnosti rekombinantního proteinu BmS2-GL2 .....	49
7.2	Aplikace rekombinantních proteinů genu <i>Ser-2</i> ve tkáňových kulturách .....	49
8	<b>Závěr</b> .....	54
8.1	Příprava rekombinantních proteinů.....	54
8.2	Charakterizace adhezivních vlastností izolovaných proteinů .....	54
9	<b>Seznam použité literatury</b> .....	56
10	<b>Přílohy</b> .....	60

# 1 Úvod

Bioadhezivní látky jsou přírodní polymerní molekuly s lepidlymi schopnostmi patřící převážně mezi proteiny nebo sacharidy. Adhezivní proteiny se staly díky svým vlastnostem (biokompatibilita a degradovatelnost v organismu) vhodnými kandidáty pro vývoj nových materiálů v medicíně. Mezi takovéto produkty patří i lepidly proteiny hedvábí bource morušového, sericiny. V této práci jsme se zaměřili na výzkum adhezivních vlastností sericinů a perspektivu jejich použití pro úpravu plastových povrchů pro růst hmyzích a savčích buněk. Z genu *Ser-2* jsme vybrali čtyři krátké sekvence, vložili je do expresního vektoru a příslušné proteiny jsme exprimovali v bakteriálním expresním systému. Adhezivní vlastnosti těchto rekombinantních proteinů byly pak testovány na schopnost lepit hydrofobní povrchy, schopnost pokrývat povrch plastu a umožňovat růst hmyzích a savčích buněčných kultur *in vitro*. Již v předběžných pokusech se ukázalo, že všechny zkoumané rekombinantní sericiny BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 v různé míře ovlivňovaly všechny testované buněčné kultury ve schopnosti růstu s přichycením k povrchu misky. S hmyzí (C18+) a savčí (NIL-2) buněčnou linií byly pak provedeny kvantitativní testy adheze, proliferace a vitality buněk (zejména BmS2-GL2 u hmyzích buněk C18+ a BmS2-A u savčí buněčné linie NIL-2), které tyto výsledky potvrdily. U proteinu BmS2-GL2 byly navíc prokázány lepidly schopnosti. Rekombinantní sericiny by mohly být v budoucnu využity k dalšímu výzkumu směřujícímu k výrobě adhezivních biomateriálů pro aplikaci ve tkáňovém inženýrství nebo jiných medicínských oborech.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Biomateriály

Vývoj adhezivních látek zaznamenal v uplynulých letech nebývalý rozmach otevírající velmi široké možnosti aplikací v medicínských oborech, farmaceutickém průmyslu, nebo tkáňovém inženýrství. Vědecká pracoviště neustále hledají nové biomateriály kompatibilní například s lidským imunitním systémem, fyziologickými pochody, jež by zároveň byly po určité době degradovatelné, anebo si naopak zachovávaly pružnost a odolnost po dlouhou dobu. Důležitou vlastností takovýchto materiálů bude rovněž jejich cenová dostupnost. Další vývoj v této oblasti vyžaduje zcela nová řešení.

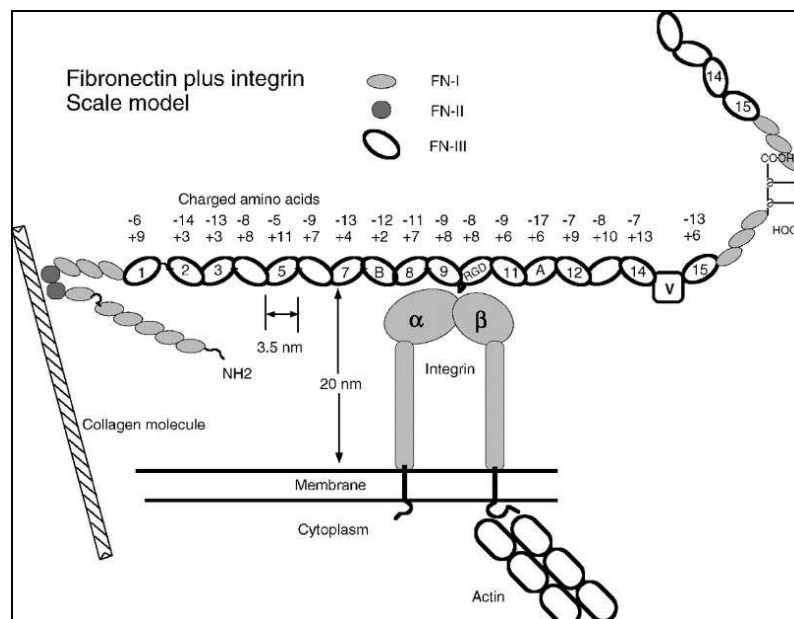
Řada aplikací biologických adheziv směřuje k využití v medicínských oborech., a to od hojení ran, po tkáňové inženýrství, kloubní náhrady a zubní implantáty. Je potřeba aby nové adhezivní materiály byly plně kompatibilní s okolní tkání, podporovaly proliferaci osteocytů, chondrocytů a jiných typů buněk (Anselme, 1999). Pokud totiž nedojde u buněk závislých na adhezi k přichycení podkladu, buňka zahájí anoikis, neboli apoptózu závislou na ztrátě kontaktu buňky s okolím (Stein & Pardee, 2004). Další výzvou v oblasti adhezivních biomateriálů je výroba syntetické arteriální stěny, která by mohla na implantátu díky speciálně upravenému povrchu iniciovat tvorbu vlastního epitelu (Huang X., 2010). Využití by také mohly uplatňovat adhezivní biomateriály ve formě ochranných náplastí při léčbě kožních onemocnění (*Dermatitis bullosa*), nebo regeneračních procesech při poškození kůže (popáleniny, bércové vředy, dekubity a jiné chronické rány). A konečně, stále nedosaženým cílem je výroba vhodného materiálu pro přímou kultivaci a řízenou diferenciaci pluripotentních kmenových buněk (Lutolf at al., 2009), kde je buněčná adheze rovněž klíčovým faktorem úspěchu.

### 2.2 Adhezivní povrchy pro tkáňové kultury

Dosud nejosvědčenější, rychlou a jednoduchou metodou k vytvoření adhezivního povrchu vhodného pro růst buněk v podmínkách *in vitro* je ionizace jinak neadhezivního polystyrenu plazmou (Ramsey at al., 1984). Plazma ovšem poskytuje polystyrenovému povrchu pouze jednotný, negativní náboj a její aplikace je materiálně omezená na polymerní materiály typu polystyrenu. Dalším ze způsobů, jak modifikovat inertní povrch na povrch adhezivní, je ošetření materiálu nevhodného pro růst buněk proteinovým filmem, nebo

přírodním polymerem, které by nahradily přirozené prostředí organismu – extracelulární matrix (ECM). Již v roce 1979 se objevily snahy upravit polystyrenový povrch určený ke kultivaci buněčných kultur pomocí agarózy modifikované kovalentně navázanými proteiny (Carlsson at al., 1979). V 80. letech byl také sledován vliv poly-L-lysinu na buněčnou adhezi. (Yavin et al., 1974). Tento produkt, který se komerčně vyrábí (Sigma, Kat. č. P4707), poskytuje buněčné kultuře pozitivní náboj a je určen pro buněčné linie, které špatně adherují na negativně nabitou Petriho misku. Dalším příkladem povrchu pro kultivaci buněk závislých na přichycení k povrchu jsou želatinové gely (Sigma, Kat. č. G1393). Postupem času se začaly objevovat další návrhy, jak vyrobit vhodný biomateriál pro přichycení a proliferaci buněk. Slibným materiálem se pro práci s tkáňovými kulturami stal hydrogel, polymerní sloučenina, která je schopná zadržovat vodu a vytvářet jakési strukturní „lešení“ pro tkáňové kultury. Základem vhodného hydrogelu může být například polyetylglykol (PEG), nebo polyvinylalkohol (PVA) a další přidaná složka, která podporuje buněčnou adhezi (Hern at al., 1997; Nuttelman at al., 2001; Mandal et al., 2009). Polymerní sloučeniny mohou také tvořit základ pro výrobu nanovláken vhodných pro pěstování buněčných kultur (Schindler at al. 2005). Ačkoli jsou hydrogely slibným biomateriálem, stále ovšem nenašly praktické uplatnění a zůstávají pouhou výzvou do budoucnosti (Burdick & Mauck, 2011).

Již bylo zmíněno, že vhodné aditivum ve formě krátkého peptidu může vylepšit adhezivní vlastnosti jinak neadherentního biomateriálu. Například S. M. Moreira vyvinul dextrinový hydrogel obohacený o krátkou sekvenci RGD (Moreira et al, 2008). Známa RGD (Arg – Gly – Asp) sekvence je specifickým vazebným motivem buněčných integrinů (Ruoslahti, 1996). Integriny, adhezivní receptory buňky, interagují v organismu s různými proteinovými komponentami ECM, zejména s kolageny, lamininy, vitronektinem a fibronektinem. Právě fibronektin obsahuje ve své molekule, kromě vazebných sekvencí k ostatním složkám ECM (FN-I a FN-II), integrinový vazebný motiv RGD (vazebná sekvence III) (Lodish et al, 2008).



**Obrázek 1 – zobrazení molekuly fibronektinu po vazbě buněčného integrinu na RGD sekvenci (Johnson et al, 1999).**

Slibným řešením výroby adhezivních biomateriálů se tedy zdála být produkce syntetické RGD sekvence. Nakonec se ukázalo, že je pro simulaci extracelulární matrix je třeba i dalších komponent ECM a samotná přítomnost rekombinantní sekvence RGD nestačí (Huang et al., 2010). Přínosné se zatím zdají být kombinace motivu RGD s již zmiňovanými hydrogely (Moreira et al., 2008; Huang et al., 2010).

Dalším cílem vývoje vhodného kultivačního povrchu bylo nahradit extracelulární matrix proteinovou strukturou, která se v ECM přirozeně vyskytuje. Běžně se pro kultivaci pluripotentních kmenových buněk používá jako podkladní materiál vrstva primárních myších fibroblastů (MEF). Fibroblasty jsou buňky mezodermálního původu a jejich hlavní funkcí je aktivní sekrece komponent extracelulární matrix, neboli kyseliny hyaluronové, proteoglykanů, fibronektinu, kolagenu typu I a III a elastinu, a tvorba pojivové tkáně. Pěstování buněk na vrstvě fibroblastů je osvědčenou metodou, která splňuje nároky na kultivaci kmenových buněk. Je to ale zároveň metoda obtížná a značně nepraktická.

Jedním z materiálu, který umožňuje pěstování buněk ve tkáňové kultuře je kolagen (Chevallay & Herbage, 2000). Kolagen dokáže poskytovat buňkám i 3-D strukturu a simulovat tak přirozený povrch ECM. Tento materiál je komerčně dostupný dokonce v několika formách (Sigma, C6745, C7624). Kyselina hyaluronová je další složkou ECM, která byla z hlediska buněčné adheze studována. V kombinaci s RGD sekvencí vytváří vhodnou matrix pro buněčnou adhezi (Glass et al., 1995). Na bázi kyseliny hyaluronové založená syntetická ECM, která se dnes již komerčně vyrábí (Sigma, Kat. č. HYS020). Tyto



materiály ovšem nejsou univerzální ke všem aplikacím, nebo je nevýhodou vysoká cena komerčního produktu. Začaly se tedy hledat další přírodní materiály proteinového charakteru, které by mohly ECM nahradit. Jejich výhodou by měla být materiální i cenová dostupnost a adhezivní charakter.

## 2.3 Sericiny – adhezivní proteiny

Organismů, které v průběhu svého životního cyklu využívají adhezivních proteinů jako přírodních lepidel je celá řada. Lepivé proteiny hedvábí pavouků (*Araneae*), nebo motýlů (*Lepidoptera*) jsou příkladem suchozemských adheziv. Ve sladkovodním prostředí přírodní lepidivé proteiny produkují chrostíci (*Trichoptera*) a v podmořském světě se pro své silné adhezivní vlastnosti stala proslulou slávka jedlá (*Mutilus edulis*) (Stewart et al., 2011). Dalším příkladem je adhezivní protein trypanozomy americké (*Trypanosoma cruzi*), který pravděpodobně zajišťuje přichycení trypomastigotů v hostitelském organismu (Chuenkova, & Pereira, 1995).

Jak už bylo řečeno, škeble slávka jedlá vyniká vysokou přilnavostí k povrchu pod vodní hladinou. Umělá výroba lepivých produktů v podobě lepidla pro vodní prostředí, nebo silně adhezivního materiálu, které by dosahovaly kvalit přírodního proteinu slávky jedlé zůstává prozatím výzvou do budoucnosti. Již se objevily snahy o komerční využití adhezivních proteinů slávky výrobkem Cell-Tak (BD Biosciences, Kat. č. 354240), ovšem účinnost tohoto výrobku nepřesahuje adhezivní vlastnosti syntetických rekombinantních proteinů, nebo fůzních proteinů s RGD sekvencí (Hwang et al., 2007 a, b, c).

Jiným typem přirozeně adhezivních proteinů jsou sericiny bource morušového (*Bombyx mori*). Sericiny tvoří složku hedvábí, která slouží ke slepování fibroinových vláken při formování hedvábného kokonu. Nejen, že zajišťují stabilitu kokonu, ale zároveň slouží jako ochranná vrstva před vlhkem a infekčním agens (Sinhara, 1979). Sericinové proteiny také přitahují pozornost svou dostupností, jelikož jsou při výrobě surového hedvábí odstraňovány jako odpadní frakce. Proto by jejich využití znamenalo obrovský přínos pro země, kde se hedvábí zpracovává (Japonsko, Čína, Jižní Korea, Indie, Turecko, a další).

Z přirozené funkce sericinů jako lepícího materiálu při spřádání kokonu vyplývá potenciální využití sericinových proteinů k výrobě přírodního lepidla. Tyto proteiny ale při zpracování surového hedvábí, neboli procesu „deguminace“ (povaření hedvábného kokonu v horké alkalické vodě, „deguming“) lepivost ztrácí. Dle dostupných informací se v současnosti sericiny jako lepidlo komerčně nevyužívají.

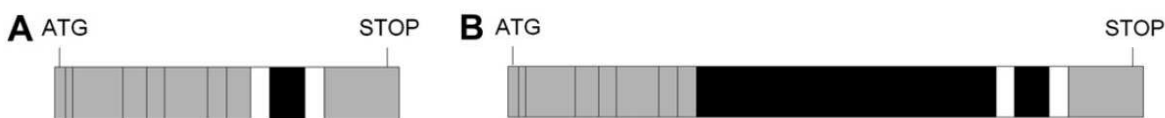
Tsubouchi K. tyto proteiny studoval z hlediska buněčné adheze (Tsubouchi et al., 2005). Z této publikace vyplývá, že povrch ošetřený sericiny zvyšuje adhezi a proliferaci buněk. Dalším pokrokem ve využití sericinů byla příprava sericinového gelu, který by mohl potenciálně sloužit k regeneračním účelům (Teramoto et al., 2008). Efekt sericinů na buněčnou proliferaci byl také pozorován u savců, kdy roztok sericinů, narozdíl od běžného roztoku solí, zajistil rychlejší zahojení porušené oční rohovky Potkana obecného (*Rattus norvegicus*) (Nagai et al., 2009). Ze sericinového extraktu byla vyrobena membrána vhodná ke kultivaci fibroblastů (Nayak et al., 2012). S úspěchem byly dále syntetizovány první biomateriály založené na kombinaci sericinů a proteinové matrix (kolagenu, nebo želatiny) vytvářející 3 – D strukturu, nebo 2 – D proteinový film. Tyto struktury byly testovány pro růst a proliferaci buněk závislých na adhezi. Ukázalo se, že proteinová matrix doplněná o sericinovou složku může sloužit ke kultivaci fibroblastů a být vhodným východiskem pro výrobu umělých tkání, nebo imunokompatibilních štěpů k transplantaci. Dalším možným využitím sericinové matrix by byly ochranné náplasti, které by poskytovaly vhodné podmínky pro hojení poraněné pokožky, popálenin, nebo bércových vředů (Mandal et al., 2009; Akturk et al., 2011).

Používání sericinů připravených přímou extrakcí z hedvábných kokonů může mít ale při studiu adhezivních vlastností těchto proteinů značné nevýhody. Nejen že je komerční sericin směsí několika proteinů produkovaných snovacími žlázami, ale mohl by také obsahovat nežádoucí příměsi, například detergenty, které by měly na kultivaci buněk negativní vliv. Proto jsme se v této práci zaměřili na produkci rekombinantních sericinů, které by nenesly výše uvedená rizika a zároveň pokryly vlastnosti přírodních sericinů (lepivost, hydrofilní profil, biodegradovatelnost, schopnost zadržovat vodu a polymerovat dohromady s ostatními molekulami).

Sericiny byly z hlediska exprese proteinů a struktury genu u bource morušového velice podrobně prostudovány. Jsou to proteiny produkované středním úsekem snovacích žláz (MSG) v průběhu larválního vývoje bource. Sericiny tvoří skupinu několika proteinů o velikosti 65 – 400 kDa, které jsou kódovány třemi geny, *sericin 1 (Ser-1)*, *sericin 2 (Ser-2)* a *sericin 3 (Ser-3)*. Variabilita proteinů je dána nejen alternativním sestřihem genů, ale i alelovým polymorfismem. (Takasu et al., 2010).

Pro přípravu rekombinantních proteinů byl vybrán gen *Ser-2*, který ve své molekule obsahuje vysoce repetitivní sekvenci. Zde byla nalezena až 30% homologie s adhezivními proteiny slávky jedlé a trypanosomy americké a předpokládá se, že za lepivý charakter sericinových proteinů je zodpovědný právě gen *Ser-2* (Kludkiewicz et al., 2009). Sekvence

genu navíc obsahuje vysoké zastoupení lysinu (16,9 %) a byly v ní dokonce objeveny krátké adhezivní motivy (RE, RD, NGR a KLEK), které by mohly být rozpoznávány integrinovými receptory. Zajímavý je také alternativní sestřih exonu 9b, který dává vzniku dvěma variantám mRNA a proteinům o molekulové hmotnosti 220 kDa (1758 AK) a 130 kDa (900 AK). Protein o velikosti 220 kDa vykazuje vysoký podíl nabitých aminokyselin (17,1% lysinu, 15,1% serinu, 11,7% k. asparagové a 11,1% k. glutamové), ale zároveň poměrně vysoké zastoupení nenabitých aminokyselin. 130 kDa protein má podobné aminokyselinové složení, chybí zde ovšem repetitivní, lysin / serin bohatá sekvence kódovaná exonem 9a, která je procesem alternativního sestřihu vyštěpena (Kludkiewicz et al, 2009).



**Obrázek 2 – schematické znázornění alternativního sestřihu genu *Ser-2*. Obrázek A představuje kratší produkt sestřihu, který kóduje protein o molekulové hmotnosti 130 kDa. Schéma B zobrazuje delší produkt alternativního sestřihu kódující 220 kDa protein. Jednotlivé exony jsou odděleny svislými čarami, exon 9a představuje nejdelší černý úsek na obrázku B (Kludkiewicz et al, 2009).**

Vybrané krátké sekvence rekombinantních proteinů odvozených od genu *Ser-2* byly navrženy tak, aby pokryly všechny zajímavosti genu. Obsahují vysoký podíl aminokyseliny lysinu a adhezivní motivy (RE, RD, NGR a KLEK), které se v těchto sekvencích několikrát opakují. Dále také kódují část repetitivní sekvence genu *Ser-2*, nebo jsou produktem jeho alternativního sestřihu. Podstatou této práce je zjistit adhezivní potenciál uvedených rekombinantních proteinů.

### 3 Cíle práce

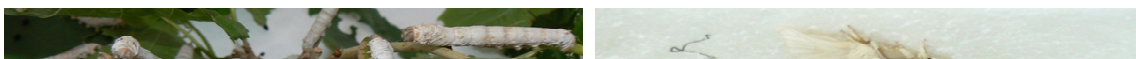
- Příprava rekombinantních variant Sericinu 2 a jejich exprese v *E. coli*.
- Charakterizace adhezivních vlastností izolovaných rekombinantních proteinů.

## 4 Materiál

### 4.1 Pokusné organismy

#### **Bourec morušový (*Bombyx mori*, kmen Daizo p50)**

Bourec morušový byl chován v laboratoři a krměn čerstvými listy moruše bílé (*Morus alba*) a moruše černé (*Morus nigra*).



DH5 alpha	<i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	
One Shot® TOP10 Competent Cells / TOP10	<i>E. coli, F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen / C4040-10
BL21 Star™(DE3) One Shot® / BL21 Star	<i>E. coli, F - ompT hsdS B (r B - m B - ) gal dcm rne131 (DE3) Bl21 Star™ (DE3)pLysS</i> <i>is offers less basal level expression of heterologous genes than BL21 Star™ (DE3).</i>	Invitrogen / C6010-03

### 4.3 Konstrukty

Název	Popis	Zdroj / Kat. č.
pGEM®-T Vector	Klonovací vektor, 3018 bp	Promega A1360
pET160/GW/D-TOPO®	Expresní vektor, 5839 bp	Invitrogen K160-01
pET15b	Expresní vektor, 5708 bp	Novagen 69661-3
SerGenEx	DNA, sekvence části genu Ser2 optimalizovaná pro expresi v <i>E.coli</i> , 1793 bp	GenScript
SynGenEx	DNA, sekvence odvozená od části genu Ser2 optimalizovaná pro expresi v <i>E.coli</i> , 767 bp	GenScript

### 4.4 Oligonukleotidy

Název	Sekvence	Ta	c (μmol/μl)	Zdroj / Kat. č.
T - fw	caccggctcgaagagcggcgtcacag	63	100	Sigma
T - rev	tcagtctttatccgatgaccgatc	63	100	Sigma
Oligo(dT) <sub>20</sub>	20 - mer	50	50	Invitrogen 18418-020
T7-term_Inv / T7 rev	tatgctagtattgctcag	50	50	Generi Biotech
T7-prom / T7 fw	taatacgaactcactataggg	50	50	Generi Biotech

## 4.5 Média

Všechny média byla sterilizována, nebo připravována sterilním postupem.

### **LB médium**

Tryptone	10 g
Yeast extract	5g
NaCl	10 g
Doplnit H <sub>2</sub> O	do1 litru
Ph 7,0	

### **LB médium - selekční**

Tryptone	10 g
Yeast extract	5g
NaCl	10 g
Ampicilin, c = 0,1 µg · ml <sup>-1</sup>	
Doplnit H <sub>2</sub> O	do1 litru
pH 7,0	

### **LB agar**

Tryptone	10 g
Yeast extract	5g
NaCl	10 g
Agar	10 g
Doplnit H <sub>2</sub> O	do1 litru
pH 7,0	

### **LB agar - selekční**

Tryptone	10 g
Yeast extract	5g
NaCl	10 g
Ampicilin, c = 0,1 µg · ml <sup>-1</sup>	
Agar	10 g
Doplnit H <sub>2</sub> O	do1 litru
pH 7,0	

### **XYT médium**

Tryptone	16 g
Yeast extract	10 g
NaCl	5 g
Doplnit H <sub>2</sub> O	do1 litru
pH 7,0	

**CL8+ kompletní médium – CM (*Sigma*)**

Shields and Sang M3	9,85 g
KHCO <sub>3</sub>	0,125 g
Extrakt z drozofily	2,5%
Fetal Bovine Serum (FBS)	2%
Penicilin / streptomycin	1%
Insulin	125 IU · l <sup>-1</sup>
Doplňit H <sub>2</sub> O	do 250 ml
pH 6,5	

**CL8+ minimální médium – MM (*US Bio*)**

Shields and Sang M3	9,85 g
Penicilin / streptomycin	1%
Insulin	125 IU · l <sup>-1</sup>
Doplňit H <sub>2</sub> O	do 250 ml
pH 6,5	

**D8 kompletní médium**

Schneider's Insect Medium	6,1 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,125 g
Extrakt z drozofily	2,5%
Fetal Bovine Serum (FBS)	10%
Penicilin / streptomycin	1%
Insulin	125 IU · l <sup>-1</sup>
Doplňit H <sub>2</sub> O	do 250 ml
pH 6,5	



**NIL-2 kompletní médium**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	500 ml
Bovine Calf Serum	1%
Fetal Bovine Serum	5%
Penicilin / streptomycin	1%

**MEF kompletní médium**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	500 ml
Fetal Bovine Serum	10%
L-glutamine	0,292 g
Penicilin / streptomycin	1%

Ostatní materiál (pufry a roztoky, pracovní kity, enzymy, protilátky, antibiotika, molekulární markery, chemikálie, ostatní reagentie, pracovní pomůcky, přístrojové a programové vybavení) je vzhledem ke svému rozsahu uveden v příloze 1.

## 5 Metodika

### 5.1 Klonování – práce s DNA

#### 5.1.1 Horizontální elektroforéza

Vzorky DNA byly nanášeny do 0,5 – 1 % agarózového gelu s EtBr (Etidium Bromid) o koncentraci 0,01 %. Elektroforéza byla puštěna v  $1 \times$  TAE pufru při napětí 50 V, 70 min. Jako velikostní marker byl ke každé analýze použit GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

#### 5.1.2 Izolace mRNA

Střední úsek snovacích žláz larvy Bource morušového ve stádiu 5. instaru byl vypreparován v Ringerově roztoku, zmražen tekutým dusíkem a homogenizován ve vymražené třecí misce. Izolace mRNA dále probíhala přesně podle návodu kitu RNeasy. Pro izolaci mRNA bylo použito 20  $\mu$ g materiálu.

#### 5.1.3 Reverzní transkripce

Syntéza prvního vlákna cDNA byla provedena přesně podle protokolu kitu SuperScript II. Pro reverzní transkripci bylo použito 100 ng mRNA a 400 ng Oligo(dT) primeru.

#### 5.1.4 PCR

##### 5.1.4.1 PCR – amplifikace inzertu

Pracovní směs:

Složka	objem ( $\mu$ l)
10X Taq Buffer	2,5
25mM MgCl <sub>2</sub>	2
dNTP mix (2,5 mM)	2
Primer T-fw	1
Primer T-rev	1
Templátová DNA (0,01-0,5 $\mu$ g $\cdot$ $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1

H <sub>2</sub> O	15,5
Taq DNA Polymerase	0,25

#### Podmínky reakce:

Fáze	čas	teplota (°C)	počet opakování
denaturace	2 min.	94	1
denaturace	30 sek.	94	30
nasedání primerů	30 sek.	63	
polymerace	45 sek.	72	
polymerace	10 min.	72	1
konec reakce	-	4	-

#### 5.1.4.2 PCR z bakteriálních kolonií

Jednotlivé bakteriální kolonie byly přeneseny sterilní špičkou z agarové plotny do 20 µl H<sub>2</sub>O. Směs byla promíchána vortexem, inkubována 5 min při 95°C a následně ochlazena na ledu. Následovala centrifugace 1 min. při 10 000 rpm a 10 µl supernatantu bylo použito jako templát pro RCR (viz protokol 4.1.4.1.).

#### 5.1.4.3 PCR – Syntéza tupých konců DNA

Při syntéze tupých konců DNA je k amplifikaci DNA využívána *Pfx* DNA polymeráza. Tento enzym nepřidává na 3' konce amplifikovaného inzertu adenin, proto se netvoří A přesahy (tzv. lepivé konce DNA). Syntéza tupých konců DNA byla využita při ligaci inzertu do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO®. Reakce probíhala podle následujícího protokolu.

#### Pracovní směs:

Složka	objem (µl)
10 × <i>Ampli</i> Buffer	2,5
50 mM MgSO <sub>4</sub>	0,5
dNTP mix (2,5 mM)	3
Primer T-fw	0,75
Primer T-rev	0,75

Templátová DNA (0,01-0,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )	1
H <sub>2</sub> O	14
enhancer	2,5
Platinum® Pfx DNA Polymerase	0,2

**Podmínky reakce:**

Fáze	čas	teplota (°C)	počet opakování
denaturace	2 min.	94	1
denaturace	30 sek.	94	30
nasedání primerů	30 sek.	62	
polymerace	45 sek.	72	
polymerace	10 min.	72	1
konec reakce	-	4	-

### 5.1.5 Příprava elektrokompetentních buněk (BL21 Star)

50 – 100  $\mu\text{l}$  rozmražených bakteriálních buněk bylo skleněnou hokejkou rozetřeno na LB agar a inkubováno přes noc při 37°C. Z narostlé bakteriální kultury byla selektována jedna kolonie, kterou bylo inokulováno 10 ml XYT média. Tekutá bakteriální kultura byla inkubována na třepačce přes noc, 220 rpm při 37°C. Pomocí 5 ml takto připravené kultury bylo inokulováno 500 ml XYT média a inkubováno na třepačce při 220 rpm, 37°C do optické hustoty  $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,9$ . Kultura byla po 250 ml rozdělena do centrifugačních nádob a následovala centrifugace 25min., 4000 rpm, při 4°C. Supernatant byl odstraněn a sediment rozsuspendován v 200 ml H<sub>2</sub>O vytemperované na 4°C. Následovala centrifugace za stejných podmínek, sediment byl rozsuspendován ve 100 ml vychlazené H<sub>2</sub>O a opět zcentrifugován za stejných podmínek. Pelet byl rozsuspendován ve 20 ml vychlazeného 10 % glycerolu a centrifugován 10 min., 4000 rpm, při 4°C. Pelet byl rozsuspendován v 0,5 ml 10 % glycerolu a bakteriální suspenze byla rozpipetována po 40  $\mu\text{l}$  do vychlazených Eppendorfek. Buňky byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při -80°C.

## 5.1.6 Ligace

### 5.1.6.1 Ligace inzertu do vektoru pGEM®-T Easy

Vektor pGEM®-T Easy je tzv. klonovací vektor, který slouží pro zaklonování PCR produktu s přesahem adeninu na 3' konci molekuly DNA po amplifikaci Taq DNA polymerázou. Klonovací systém pGEM®-T Easy je vysoce efektivní a nabízí tzv. modro – bílou selekci pro snadné rozlišení pozitivních klonů.

Ligační reakce byla provedena přesně podle manuálu kitu pGEM®-T Easy Vector System. V reakci bylo použito 50 ng DNA. Ligační směs byla do chemicky kompetentních buněk TOP10 transformována teplotním šokem.

### 5.1.6.2 Ligace inzertu do vektoru pET160/GW/D-TOPO®

Vektor pET160/GW/D-TOPO® je expresní vektor upravený pro přímou ligaci PCR produktu s tupými konci pomocí enzymu Topoizomeráza I. Vektorový systém pET160/GW/D-TOPO® dále disponuje regulovatelnou expresí rekombinantního proteinu pomocí T7 promotoru, syntézu luminiscenční kotvy a hexahistidinové kotvy pro snadnou detekci a purifikaci rekombinantních proteinů.

Ligační reakce byla provedena přesně podle manuálu kitu Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology. Pro ligaci bylo použito 5 ng DNA s tupými konci.

### 5.1.6.3 Ligace inzertu do vektoru pET15b

pET15b je expresní vektor vhodný pro klasické klonování pomocí restričních endonukleáz. Vektor obsahuje klonovací místo se širokou škálou restričních míst, regulovatelnou expresi rekombinantního proteinu pomocí T7 promotoru a syntézu hexahistidinové kotvy pro detekci a purifikaci exprimovaného proteinu.

Vektorová DNA byla smíchána s inzertem v poměru 3:1. Ligační reakce byla připravena podle následujícího protokolu.

Reagencie	reakce 1, objem (μl)	reakce 2, objem (μl)
Inzert (767 bp, c = 44 ng · μl <sup>-1</sup> )	1,7	-
Inzert (1793 bp, c = 58 ng · μl <sup>-1</sup> )	-	2,8
Vektorová DNA (5708 bp, c = 76 ng · μl <sup>-1</sup> )	3,3	2,2
2 × Ligační pufr	5	5
T4 DNA Ligase	1	1

Ligační směs byla inkubována 15 hod. při 16°C a transformována do chemicky kompetentních DH5α buněk. Transformace probíhala podle protokolu 4.1.7.1.

## **5.1.7 Transformace plazmidu**

### **5.1.7.1 Transformace plazmidu do chemicky kompetentních bakteriálních buněk teplotním šokem**

Ligační směs, nebo plazmid byly smíchány s rozmraženými buňkami v poměru 10-50 ng DNA a 100 μl buněk. Směs byla inkubována 30 min. na ledu, poté 45 sekund při 42°C a opětovně přenesena na led. Do zkumavky s transformační směsí byl přidán 1ml LB media vytemperovaného na 37°C a zkumavka byla inkubována na třepačce 60 min., 220 rpm při 37°C. Následovala centrifugace 1 min., 2500 rpm při RT. Z zkumavky bylo odebráno 800 μl supernatantu a pelet byl ve zbylém supernatantu rozsuspendován. 100 μl takto připravených buněk bylo pomocí skleněné hokejky rozetřeno na LB agar se specifickou selekcí transformantů. Celý proces byl proveden za sterilních podmínek.

### **5.1.7.2 Transformace plazmidu do elektrokompetentních buněk elektroporací – exprese proteinů**

Ligační směs, nebo plazmid byly smíchány s rozmraženými buňkami v poměru 10-50 ng DNA a 100 μl buněk. Směs byla inkubována 30 min. na ledu a přenesena do elektroporační kyvety. Elektroporace probíhala pod napětím 1700 V. Do zkumavky s transformační směsí byl přidán 1 ml LB media vytemperovaného na 37°C a zkumavka byla inkubována na třepačce 60 min., 220 rpm při 37°C. Následovala centrifugace 1 min., 2500 rpm při RT. Z zkumavky bylo odebráno 800 μl supernatantu a pelet byl ve zbylém supernatantu rozsuspendován. Suspenze byla napipetována do 20 ml LB media se specifickou selekcí transformantů. Takto inokulované médium bylo inkubováno na třepačce 16 hod., 220 rpm při 37°C.

## **5.1.8 Purifikace DNA z gelu**

DNA byla z 1 % agarózového gelu purifikována přesně podle manuálu kitu MinElute Gel Extraction Kit. Vzorek DNA byl eluován v 50 μl H<sub>2</sub>O.

### 5.1.9 Purifikace plazmidu

Izolace plazmidu z bakteriální kultury probíhala přesně podle návodu kitu QIAprep Spin Miniprep Kit. Bylo použito 5 ml bakteriální kultury inkubované 16 hod. při 37°C a 190 rpm. Plazmid byl eluován v 50 µl H<sub>2</sub>O.

### 5.1.10 Restrikce

Restrikční reakce byla připravena podle následujícího protokolu.

Reagencie	Objem (µl)
Plazmid (50 – 2000 µg)	2 - 14
10 × Puf 2	2
10 × BSA	2
Xho I	1
Nco I	1
H <sub>2</sub> O	doplnit do 20 µl

Reakční směs byla inkubována 2 hodiny, nebo přes noc v termostatu při 37°C. S produktem restrikce byla spuštěna elektroforéza na agarózovém gelu. Specifická DNA byla vyříznuta z gelu a extrahována pomocí kitu MinElute Gel Extraction Kit (viz 4.1.8.)

### 5.1.11 Sekvenace

Sekvenační analýza byla provedena na specializovaném pracovišti (Laboratoř genomiky, UMBR, BC AVCR). Vzorky DNA byly sekvenovány na přístroji ABI PRISM 3130xl. Sekvenace PCR produktu byla provedena s primery T – fw a T – rev, k sekvenaci plazmidů byly použity primery T7 – fw a T7 – rev. Koncentrace a množství vzorku bylo upraveno podle požadavků pro sekvenační analýzu.

## 5.2 Expresse rekombinantních proteinů

### 5.2.1 Expresní kinetika

Expresní vektor s příslušným inzertem byl transformován do elektrokompetentních BL21 buněk podle protokolu 4.1.7.2. S přes noc narostlou bakteriální kulturou o objemu 1 ml bylo inokulováno 21 ml LB media s ampicilinem o finální koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . V log fázi ( $\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,8$ ) bakteriální kultury byl odebrán 1 ml vzorku (čas 0 h) a kultura byla rozdělena do 2 baněk po 10 ml kultury. V jedné baňce byla pomocí IPTG o finální koncentraci 0,8 mM aktivována exprese proteinu. Následovala 4 hod. inkubace na třepačce 220 rpm při  $37^{\circ}\text{C}$ . Z obou baněk byly v jednohodinových intervalech odebírány 1 ml vzorky (čas 1 – 4 h), které byly skladovány při  $4^{\circ}\text{C}$ . Na konci experimentu byly vzorky centrifugovány 1 min., 10000 rpm při  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v 250  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru B-PER. Z lyzátu byly připraveny vzorky pro další analýzu.

### 5.2.2 Expresse proteinů v bakteriálním systému

Expresní vektor s příslušným inzertem byl transformován do elektrokompetentních BL21 buněk podle protokolu 4.1.7.2. S přes noc narostlou bakteriální kulturou o objemu 6 ml bylo inokulováno 250 ml LB media s ampicilinem. V log fázi ( $\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,8$ ) bakteriální kultury byla pomocí IPTG o finální koncentraci 0,8 mM aktivována exprese proteinu. Následovala 4 hod. inkubace na třepačce 220 rpm při  $37^{\circ}\text{C}$ . Bakteriální kultura byla centrifugována 10 min.,  $3000 \times g$  při  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn a pelet zamražen při  $-80^{\circ}\text{C}$ , nebo ihned využit pro přípravu bakteriálního lyzátu

### 5.2.3 Purifikace rekombinantního proteinu z cytozolu

#### 5.2.3.1 Příprava bakteriálního lyzátu

Bakteriální pelet byl rozsuspendován v 40 ml lyzačního pufru NLB a inkubován 30 min. na ledu. Lyzát byl sonikován intenzitou  $6 \times 10$  pulzů, 40% výkonu sonikátoru. Následovala centrifugace 15 min.,  $3000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ . Ze supernatantu bylo odebráno 20  $\mu\text{l}$  vzorku a zbylý supernatant byl zamražen při  $-20^{\circ}\text{C}$ , nebo ihned využit pro purifikaci rekombinantního proteinu afinitní chromatografií.



### **5.2.3.2 Afinitní chromatografie**

Kolonka s 2 ml Ni-NTA agarózy byla připravena přesně podle protokolu kitu Ni-NTA Purification System. Do kolonky bylo přidáno 20 ml supernatantu připraveného v bodě 4.2.3.1. a následovala inkubace na rotátoru 1 hod. při 4°C. Pufř s nenavázanými proteiny byl odebrán gravitačním spádem přes filtr kolony. Do kolonky byl přidán zbytek supernatantu a opět následovala inkubace a odběr vzorku. Kolonka byla poté postupně promyta promývacími pufry NWB 1, 2, 3 a 4 o zvyšující se koncentraci imidazolu. Následovalo uvolnění navázaného proteinu 4 ml elučního pufřu NEB a opětovná eluce 2 ml elučního pufřu. Všechny frakce byly uschovány pro další analýzu.

## **5.2.4 Purifikace rekombinantního proteinu z inkluzních tělísek**

### **5.2.4.1 Příprava bakteriálního lyzátu**

Bakteriální pelet byl rozsuspendován v 40 ml pufřu IBB 1. a inkubován 45 min. na ledu. Lyzát byl sonikován intenzitou  $6 \times 10$  pulzů, 40% výkonu sonikátoru.

### **5.2.4.2 Extrakce inkluzních tělísek**

Bakteriální lyzát byl centrifugován 15 min.,  $3000 \times g$ , 4°C. Supernatant byl odebrán a pelet rozsuspendován ve 4 ml pufřu IBB 2., centrifugován při maximálních otáčkách a celý proces s pufřem IBB 2. byl opakován 2  $\times$ . Supernatant byl odebrán a pelet rozsuspendován v 50 ml pufřu IBB 3., centrifugován při maximálních otáčkách a celý proces s pufřem IBB 3. byl opakován 4  $\times$ . Supernatant byl odstraněn a pelet rozpuštěn v 10 ml 8 M močoviny. Všechny frakce byly uschovány pro další analýzu.

## **5.2.5 Dialýza**

Vzorky byly napipetovány do dialyzační membrány a dialyzovány proti 1,5 litru dialyzačního roztoku. Dialyzační roztok byl vyměněn každých 12 hod. celkem 3  $\times$ . Proteiny purifikované z buněčného cytozolu byly dialyzovány proti 1  $\times$  PBS, proteiny purifikované z inkluzních tělísek byly dialyzovány proti 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

## **5.2.6 Stanovní koncentrace rekombinantních proteinů**

S purifikovanými proteiny byla provedena vertikální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Po obarvení gelu proteinovým barvivem „commissie blue“ byla pořízena fotografie. Koncentrace rekombinantních proteinů byla z fotografie stanovena v

programu Image Quant, pomocí kterého byla kvantifikována velikost specifického pruhu charakterizující pozorovaný protein. Jako standard byl použit bovinní sérový albumín (BSA) o známé koncentraci.

### **5.2.7 Lyofilizace a finální úprava rekombinantního proteinu**

Dialyzované vzorky byly zmrazeny při  $-80^{\circ}\text{C}$ , lyofilizovány a skladovány při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Před vlastním použitím byly proteiny purifikované z buněčného cytozolu rozpuštěné v  $\text{H}_2\text{O}$ , proteiny purifikované z inkluzních tělísek byly rozpuštěné v koncentrované kyselině mravenčí. Množství kyselině mravenčí bylo závislé na požadované koncentraci vzorku.

### **5.2.8 Detekce proteinu**

#### **5.2.8.1 Vertikální elektroforéza (SDS-PAGE)**

Vzorky DNA byly nanášeny do 10 % polyakrylamidového gelu. Elektroforéza byla puštěna v RB pufru při napětí 70 V, 2 hod. Gel byl inkubován 60 min. v roztoku barvy „commassie blue“ a následně odbarvován v  $\text{H}_2\text{O}$  přes noc.

#### **5.2.8.2 Western blot**

Proteiny byly rozděleny metodou SDS-PAGE (viz protokol 4.3.1.). Proteiny z neobarveného gelu byly přeneseny technikou tzv. mokrého transferu na PVDF membránu v TB pufru při napětí 100 V, 1 hod. Membrána byla inkubována 2 hod. v blokovacím roztoku a dále v roztoku primární protilátky po stejnou dobu. Následovalo promytí  $3 \times 15$  min. v roztoku PBS – tween, inkubace se sekundární protilátkou po dobu 1 hod. a promytí  $3 \times 15$  min. v  $1 \times$  PBS. Membrána byla inkubována 2 min. s roztokem substrátu podle protokolu kitu Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate a chemiluminiscenční signál byl detekován na přístroji Luminescent Image Analyzer LAS 3000.

#### **5.2.8.3 Sekvenační analýza**

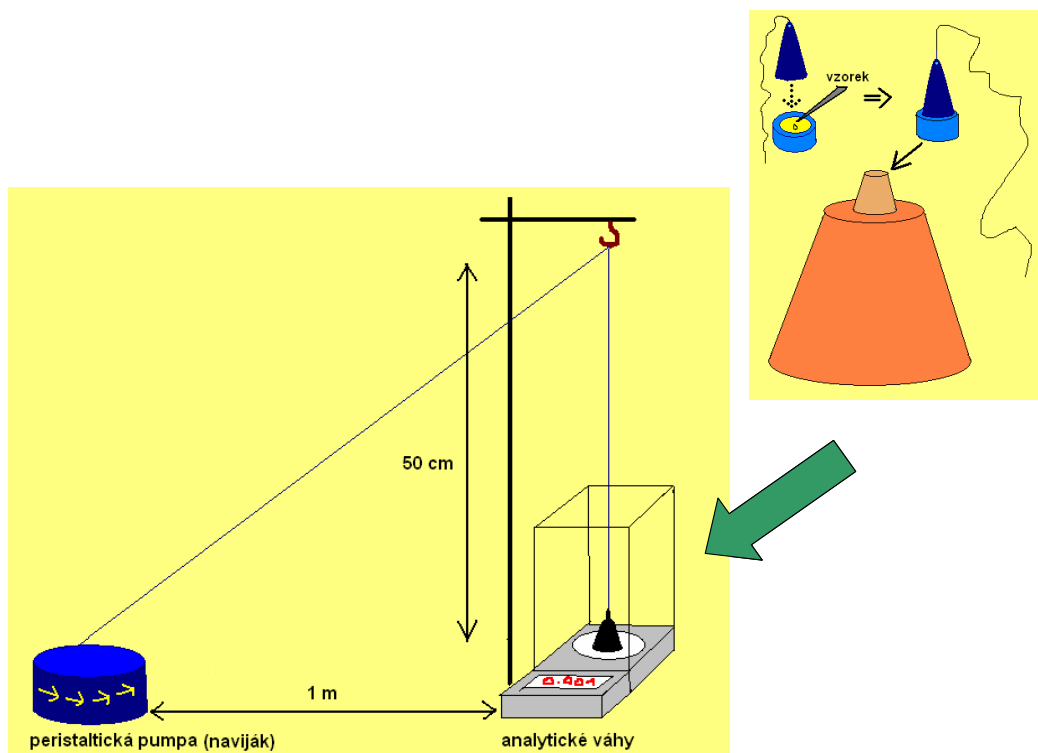
Sekvence proteinů byla provedena ve specializované laboratoři přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a biologického centra AVČR. Identifikace proteinů byla provedena z polyakrylamidového gelu. Vzorky byly analyzovány na hmotnostním spektrometru Q-ToF Premier (Waters) připojeném na Nano Acquity UPLC (Waters). Data byla zpracována softwarem PLGS 2,3 (Waters). Při zpracování byly použity specifické databáze proteinů z *B. mori* dostupné na serverech Uniprot a NCBI.

## 5.3 Charakterizace izolovaných rekombinantních proteinů

### 5.3.1 Test lepivosti

Rekombinantní protein BmS2-GL2 o objemu 10  $\mu\text{l}$  a koncentraci 2, nebo 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  byl nanesen na plastickou plochu (uříznuté víko od Eppendorfy) o obsahu 0,44  $\text{cm}^2$  a přiklopen uzavřenou PCR zkumavkou, jejímž dnem byla provlečena nit dlouhá přibližně 2 m. Vzorek proteinu se nechal zaschnout po dobu 1 hod. Víko s přilepenou PCR zkumavkou bylo nasazeno na závaží (gumový kužel) o hmotnosti 34 g. Celá aparatura byla přenesena na analytické váhy a nit byla provlečena háčkem a uchycena na peristaltické pumpě, která v aparatuře sloužila jako naviják. Po vynulování číselníku vah byla spuštěna peristaltická pumpa rychlostí průtoku 0,11  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a byl sledován úbytek hmotnosti na číselníku. V momentě odtrhnutí zkumavky od závaží byla zaznamenána záporná hodnota na číselníku, která představovala nosnost proteinu.

Kontrolou pro měření představoval CS o stejném objemu a koncentraci 2 a 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , BSA o koncentraci 2 a 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , kostní klíč o koncentraci 2 a 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , a škrobový klíč (připravený podle návodu) o koncentraci 75  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Ostatní rekombinantní proteiny nebyly pro test použity z důvodu nízké koncentrace. Schéma pokusu je zakreslen na obrázku 4.



Obrázek 4 - schéma měření nosnosti vzorku lepidla.

## 5.3.2 Buněčné testy

### 5.3.2.1 Kultivace buněk

#### CI8+ a D8

Buňky byly pěstovány v CM v termostatu při 25°C a pasážovány každý třetí den. K pasážování nebyl používán trypsin, buňky byly z kultivačního povrchu uvolněny proudem média ze špičky. Buňky byly ředěny v poměru 1 : 5.

#### NIL-2 a MEF

Buňky byly kultivovány v kompletním DMEM médiu v termostatu při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> atmosféře. Buňky byly pasážovány každý třetí den. Při pasážování byly propláchnuty roztokem 1×PBS a trypsinizovány po dobu 2 – 5 min. a naředěny v poměru 1 : 3.

### 5.3.2.2 Testování adheze buněk CI8+, D8, NIL-2, MEF k polystyrenové Petriho misce ošetřené sericinovým filmem

Na dno polystyrenové Petriho misky o průměru 55 mm bylo naneseno 5 μl rekombinantního proteinu BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1, BmS2-GL2 o koncentraci 0,5 mg · ml<sup>-1</sup>. Jako kontrola účinku sericínu byl použit CS koncentrací 0,5 mg · ml<sup>-1</sup>. Další kontrolou byl BSA o koncentraci 0,5 mg · ml<sup>-1</sup>. Roztok proteinu byl rozetřen na plochu 1cm<sup>2</sup> a nechal se ve sterilním boxu zaschnout. Pozitivní kontrolu tvořily buňky kultivované na standardním povrchu a negativní kontrolou byla prázdná Petriho miska bez proteinu. Na vnější stranu misky byly fixou zakresleny souřadnice pro fotografování buněk.

Buňky CI8+ a D8 byly v CM naředěny na koncentraci 5 · 10<sup>5</sup> · ml<sup>-1</sup>, buňky NIL-2 a MEF byly naředěny v poměru 1 : 3. 3 ml takto připravené buněčné kultury byly přeneseny do testovací misky. Následovala inkubace 3 dny za standardních podmínek. Po třetím dni kultivace byly pod světelným mikroskopem ve fázovém kontrastu pořízeny fotografie.

### 5.3.2.3 Měření životaschopnosti buněk CI8+ a NIL-2 (MTS test)

MTS test byl proveden pouze na buňkách CI8+ a NIL-2 z následujících důvodů: CI8+ buňky rostou jednotlivě a lze na kultuře rozlišit přesnou morfologii buňky. NIL-2 je buněčná linie fyziologicky velice blízká primárním fibroblastům. Výhodou je možnost nekonečného pasážování buněk, MEF se na rozdíl od NIL-2 mohou pasážovat pouze 20×.

### **MTS test buněk C18+**

Celé dno Petriho misky o průměru 55 mm bylo kompletně pokryto 120  $\mu\text{l}$  rekombinantního proteinu BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1, BmS2-GL2, CS a BSA o koncentraci  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Pozitivní kontrolu tvořily buňky kultivované na standardním povrchu a negativní kontrolou byla prázdná Petriho miska bez proteinu. Kontrolu apoptózy představovaly v případě buněčné linie C18+ buňky kultivované za standardních podmínek ozářené 3,5 hod. před vlastním testem UV světlem o intenzitě  $180 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^2$ .

Buňky C18+ byly v MM naředěny na koncentraci  $12 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$  a 2,5 ml takto připravené buněčné kultury bylo přeneseno do testovací misky. Následovala inkubace 24 hod. za standardních podmínek. Z každé misky bylo odebráno 1,5 ml média. Ke zbylému 1 ml média bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  CellTiter 96 Aqueous One Solution reagent a následovala inkubace 3 hod. za standardních podmínek. Absorbance byla změřena na *Microplate Reader* při vlnové délce 490 nm.

### **MTS test buněk NIL-2**

Pokusný materiál byl připraven stejně jako při MTS testu s buňkami C18+. Odlišně připravená byla pouze UV kontrola, protože je buněčná linie NIL-2 vůči UV záření odolnější. Buňky byly ozářeny intenzitou UV světla  $180 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^2$  ihned po přisednutí k povrchu misky a dále kultivovány s ostatními kulturami.

Buňky NIL-2 byly naředěny v poměru 1 : 3 a kultivovány standardně v kompletním médiu po dobu 24 hod. Před vlastním testem bylo kompletní médium odebráno a buňky byly propláchnuty v  $1 \times \text{PBS}$ . Do každé misky bylo přidáno 1 ml minimálního média (MM pro C18+) a 200  $\mu\text{l}$  CellTiter 96 Aqueous One Solution reagent a následovala inkubace 1 hod. za standardních podmínek. Absorbance byla změřena na *Microplate Reader* při vlnové délce 490 nm.

#### **5.3.2.4 Měření proliferace buněk C18+ a NIL-2**

Pro měření proliferace byly použity pouze buňky C18+ a NIL-2 ze stejných důvodů jako v případě měření proliferace buněk v bodě 4.3.2.3.

### **Proliferace a morfologie C18+**

Pokusný materiál byl připraven stejně jako při testování adheze v bodě 4.3.2.2. a kultivace buněk probíhala rovněž za stejných podmínek. Buňky byly fotografovány pod světelným mikroskopem ve fázovém kontrastu 1. a 3. den růstu. Fotografie byly pořízeny ve stejném, přesně vyznačeném bodě kultivační misky. Počet buněk na fotografii byl manuálně spočítán a zaznamenán do grafu. U buněk byla rozlišena morfologie a každá buňka byla zařazena skupiny standardní nebo kulaté buňky. Buněčné shluky nebyly do výsledků započítávány.

### **Proliferace NIL-2**

Celé dno Petriho misky o průměru 55 mm bylo kompletně pokryto 120  $\mu$ l rekombinantního proteínu BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1, BmS2-GL2, CS a BSA o koncentraci 0,5 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Pozitivní kontrolu tvořily buňky kultivované na standardním povrchu a negativní kontrolou byla prázdná Petriho miska bez proteínu. Buňky byly naředěny v poměru 1 : 3 a kultivovány po dobu 24 hod. v kompletním médiu. Médium bylo odstraněno a buňky promyty v 1  $\times$  PBS. K buňkám byl přidán 1 ml krystalové violeti a následovala kultivace 10 min. při pokojové teplotě. Misky byly proplachovány v kádi s vodou, dokud ještě odtékala nenavázaná barva. Přebytečná voda byla z misky odklepnuta a k nabarveným buňkám byly přidány 2 ml metanolu. Zabarvený roztok byl pipetován po 200  $\mu$ l do 96 jamkového panelu. Absorbance vzorků byla měřena na změřena na *Microplate Reader* při vlnové délce 595 nm.

#### **5.3.2.5 Příprava buněčného preparátu a barvení aktinových vláken NIL-2 buněk čínidlem Texas Red-X Phalloidin**

Na dno polystyrenové Petriho misky o průměru 55 mm bylo naneseno 5  $\mu$ l rekombinantního proteínu BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1, BmS2-GL2 o koncentraci 0,5 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Jako kontrola účinku sericínu byl použit CS koncentraci 0,5 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Další kontrolou byl BSA o koncentraci 0,5 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Roztok proteínu byl rozetřen na plochu 1cm<sup>2</sup> a nechal se ve sterilním boxu zaschnout. Pozitivní kontrolu tvořily buňky kultivované na standardním povrchu a negativní kontrolou byla prázdná Petriho miska bez proteínu. Na vnější stranu misky bylo fixou označeno místo nanesení proteínu pro lepší orientaci na preparátu.

Buňky NIL-2 byly naředěny v poměru 1 : 3. 4 ml takto připravené buněčné kultury byly přeneseny do testovací misky. Následovala inkubace 24 hod. za standardních podmínek.

Z kultivační misky bylo odstraněno médium a přichycené buňky byly promyty 1 ml 1 × PBS. Následovala fixace 1 ml 3 % paraformaldehydu po dobu 20 min. Buňky byly 3 × promyty 1 ml 1 × PBS po dobu 5 min. Místo o ploše 1 cm<sup>2</sup>, kde byl nanesen vzorek proteinu, resp. kontroly, bylo ohrazeno nesmáčivou kosmetickou tužkou a okraje kultivační misky byly odstraněny kleštěmi pro jednodušší manipulaci preparátu při mikroskopii. Buňky byly dále inkubovány 40 × ředěným Texas Red-X konjugovaným phaloidinem (45 μl na plochu 1 cm<sup>2</sup>), ve tmě a při pokojové teplotě po dobu 60min. Buňky byly 3 × promyty 1 × PBS (100 μl na plochu 1 cm<sup>2</sup>) po dobu 5min. a následně inkubovány 10 min. s fluorescenční barvou DAPI o koncentraci 0,2 μg · ml<sup>-1</sup>, ve tmě a při pokojové teplotě. Buněčný preparát byl zamontován do montovacího média vectashield. Preparát byl pozorován a dokumentován na konfokálním mikroskopu pod zvětšením 20 ×.

### **5.3.3 Statistické vyhodnocení dat**

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu STATISTICA jednosměrnou analýzou variance (ANOVA). Data byla pro statistickou analýzu transformována.

## 6 Výsledky

### 6.1 Klonování – práce s DNA, příprava konstruktů pro expresi rekombinantních proteinů

#### 6.1.1 Charakteristika kódujících sekvencí rekombinantních proteinů

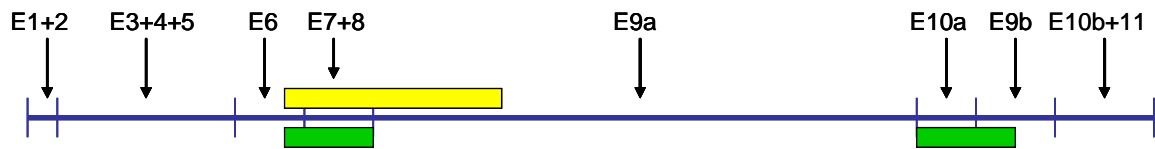
K pokusům byl vybrán gen *Ser-2* Bource morušového, jelikož vyniká vysokým zastoupením lysinu (16,9 %), dále obsahuje zajímavé repetitivní sekvence a alternativní sestřih genu. Pro přípravu rekombinantních proteinů odvozených od genu *Ser-2* byly zvoleny dva úseky přírodní sekvence a pojmenovány pod pracovními názvy BmS2-A a BmS2-B.

První úsek kódující část genu *Ser-2* (BmS2-A) je sekvence 299 aminokyselin, ve které převažují polární aminokyseliny (lysin 20,7 %, serin 17,7 %, k. asparagová 10,7 %, k. glutamová 10 %). Tato sekvence kódující protein o velikosti 33,5 kDa obsahuje zároveň několik nenabitých aminokyselin (alanin 3 %, valin 2,3 %, prolin 1,3 %), ale má hydrofilní profil. Sekvence proteinu BmS2-A začíná na konci šestého exonu (E6), pokrývá celý exon E7 a E8 a končí na začátku exonu E9a. Rekombinantní protein BmS2-A obsahuje dva krátké motivy RE a RD, oba motivy se v proteinu vyskytují ve čtyřech opakováních.

Skvence kódující rekombinantní protein BmS2-B má 266 aminokyselin a kóduje protein o velikosti 30,2 kDa. Protein BmS2-B je stejně jako BmS2-A odvozen od genu *Ser-2* a má rovněž čistě přírodní charakter. Je to produkt alternativního sestřihu exonu E9a genu *sericin 2*. Sekvence úseku kódujícího rekombinantní protein BmS2-B je zčásti identická se sekvencí proteinu BmS2-A (první část sekvence od konce exonu E6 do začátku exonu E9a), liší se v druhém oddílu sekvence kódovanou exonem E10 a částečně exonem E9b. Rekombinantní protein BmS2-B má také hydrofilní charakter s převahou aminokyseliny serinu (18,8 %), lysinu (15 %), k. glutamové (13,9 %) a k. asparagové (9,4 %). Z nenabitých aminokyselin v sekvenci BmS2-B převažuje alanin (3 %), valin (2,3 %) a fenylalanin (1,5 %). BmS2-B obsahuje čtyři RE a čtyři RD motivy, k tomu další adhezivní motiv NGR.

Kódující sekvence proteinů BmS2-A a BmS2-B jsou schematicky znázorněny na obrázku 5. Přesné sekvence obou proteinů a vyznačení v mapě genu *Ser-2* jsou uvedeny v příloze 2.

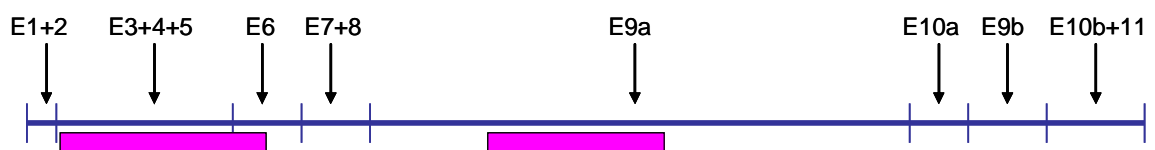




Obrázek 5 – schématické znázornění pozice sekvencí rekombinantních proteinů BmS2-A a BmS2-B v genu *sericin 2*.

Kromě uvedených přírodních sekvencí (BmS2-A a BmS2-B) byly navrženy dvě umělé sekvence BmS2-GL1 a BmS2-GL2 s optimalizovaným výběrem kodonů, které kódují jednoduché syntetické proteiny.

Sekvence BmS2-GL1 má celkem 589 aminokyselin a kóduje protein o velikosti 67,6 kDa. Protein se skládá ze dvou úseků genu *sericin 2*. První úsek tvoří sekvence exonu E3, E4, E5 a částečně E6. Tento úsek charakterizuje střídání nepolárních aminokyselin (leucin 6,3 %, valin 3,8 %, izoleucin 2,8 % a fenylalanin 2,8%) s aminokyselinami nabitými (k. glutamová 19,9 % a lysin 17 %). Druhou částí proteinu BmS2-GL1 je 317 aminokyselin dlouhá repetitivní oblast exonu E9a, bohatá na lysin (18,7 %), k. asparagovou (15,8 %) a serin (15 %). Poměrně vysoké zastoupení v druhé části proteinu BmS2-GL1 mají nepolární aminokyseliny prolin (11,8 %) a alanin (4,4 %). BmS2-GL1 obsahuje adhezivní motivy KLEK, NGR, RE (2 ×), RD (4 ×). Ačkoli jsou u proteinu BmS2-GL1 pozměněné kodony, sekvence aminokyselin, která je od genu *Ser-2* odvozená zůstala identická. Schéma porovnání sekvence rekombinantního proteinu BmS2-GL1 a genu *Ser-2* je znázorněno na obrázku 6. Přesnou sekvenci proteinu a její vyznačení v mapě genu *Ser-2* obsahuje příloha 2.



Obrázek 6 – schématické znázornění sekvence rekombinantního proteinu BmS2-GL1 v genu *sericin 2*.

Rekombinantní protein BmS2-GL2 je plně syntetický. Jeho chimerická sekvence byla vytvořena na základě homologie mezi sekvencí genu *Ser-2* (*Bombyx mori*), adhezivního proteinu Slávky jedlé (*Mytilus edulis*) a adhezivního proteinu Trypanosomy americké (*Trypanosoma cruzi*). Sekvence proteinu BmS2-GL2 je plně repetitivní a tvoří ji motiv DYEKANYRSPSHR, který se v molekule opakuje celkem osmnáctkrát. Rekombinantní



### 6.1.3 BmS2-B

DNA konstrukt pro expresi rekombinantního proteinu BmS2-B byl připraven v rámci mé bakalářské práce (Staskova, 2009). Sekvence části genu Ser-2 kódujícího rekombinantní protein BmS2-B je uvedena v příloze 2.

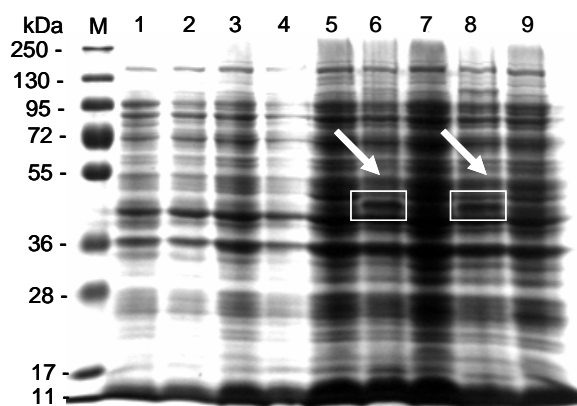
### 6.1.4 BmS2-GL1, BmS2-GL2

Rekombinantní DNA sekvence o velikosti 1793 bp (konstrukt SerGenEx pro rekombinantní protein BmS2-GL1) a 767 bp (konstrukt SynGenEx pro rekombinantní protein BmS2-GL2) byla syntetizována ve specializované firmě GenScript z důvodu unikátní sekvence a úpravy kodonů pro expresi proteinů v *E. coli*. K oběma konstruktům byla nasyntetizovaná hexahistidinová kotva, dále „Start“ a „Stop“ kodon. Expresní vektor *pET15b* a oba konstrukty (SynGenEx a SerGenEx) s nasyntetizovanými inzerty byly naštěpeny restričními endonukleázami a izolovány z agarózového gelu. Z takto připravených úseků DNA byly ligační reakcí a následnou transformací do chemicky kompetentních *DH5 alpha* buněk připraveny konstrukty pro expresi proteinů. Přítomnost inzertu v expresním vektoru byla ověřena restriční reakcí a dále sekvenací plazmidu. Sekvence části genu Ser-2 kódujícího rekombinantní protein BmS2-GL1 a syntetické sekvence kódující rekombinantní protein BmS2-GL2 jsou uvedeny v příloze 2.

## 6.2 Expresse rekombinantních proteinů

### 6.2.1 Expresní kinetika

S plazmidy připravenými v bodech 6.1.2. – 6.1.4. byla v expresních buňkách BL21 provedena expresní kinetika, neboli ověření exprese rekombinantních proteinů v čase 1 – 4 hodiny po indukci exprese. Vzorky bakteriálního lyzátu s exprimovanými proteiny byly analyzovány metodou SDS – PAGE. Vzorky byly nanášeny vždy v pořadí: proteinový marker (dráha M), bakteriální lyzát v čase 0 hod., tj. před vlastní indukcí exprese proteinů (dráha 1), bakteriální lyzát s indukovanou expresí proteinů v čase 1 – 4 hod. (dráhy 2, 4, 6 a 8) a bakteriální lyzát bez indukce exprese (dráhy 3, 5, 7 a 9). Výsledky expresní kinetiky jsou znázorněny na dokumentačních obrázcích 8 - 11.



**Obrázek 8 – expresní kinetika rekombinantního proteinu BmS2-A (33,5 kDa) na SDS-PAGE**

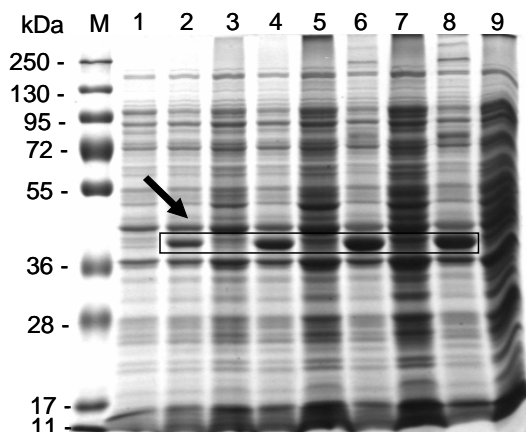
Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1811)

Dráha 1: Bakteriální lyzát v čase 0 h.

Dráha 2, 4, 6, 8: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., indukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Dráha 3, 5, 7, 9: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., neindukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Pozn.: Expresse proteinu BmS2-A označena šipkou a orámována bíle.



**Obrázek 9 – expresní kinetika rekombinantního proteinu BmS2-B (30,2 kDa) na SDS-PAGE**

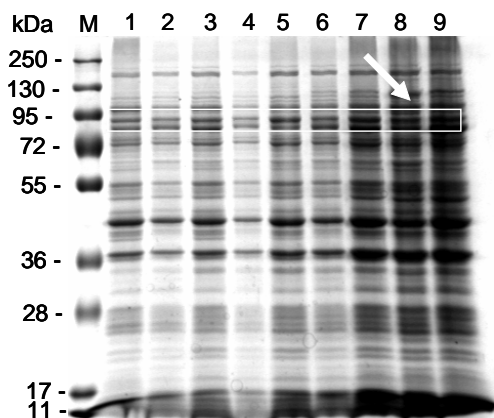
Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1811)

Dráha 1: Bakteriální lyzát v čase 0 h.

Dráha 2, 4, 6, 8: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., indukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Dráha 3, 5, 7, 9: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., neindukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Pozn.: Expresse proteinu BmS2-B označena šipkou a orámována černě.



**Obrázek 10 – expresní kinetika rekombinantního proteinu BmS2-GL1 (67,6 kDa) na SDS-PAGE**

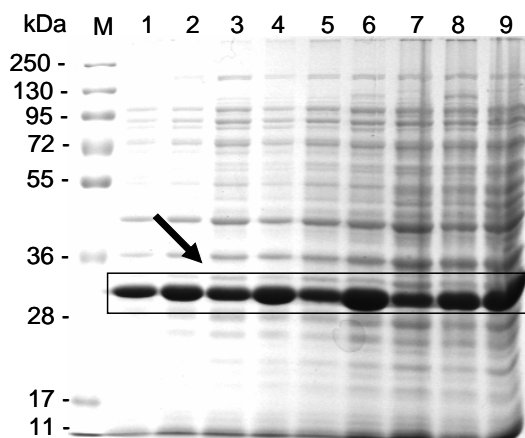
Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1811)

Dráha 1: Bakteriální lyzát v čase 0 h.

Dráha 2, 4, 6, 8: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., indukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Dráha 3, 5, 7, 9: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., neindukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Pozn.: Exprese proteinu BmS2-GL1 označena šipkou a orámována bíle.



**Obrázek 11 – expresní kinetika rekombinantního proteinu BmS2-GL2 (30,2 kDa) na SDS-PAGE**

Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1811)

Dráha 1: Bakteriální lyzát v čase 0 h.

Dráha 2, 4, 6, 8: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., indukovaná exprese rekombinantního proteinu.

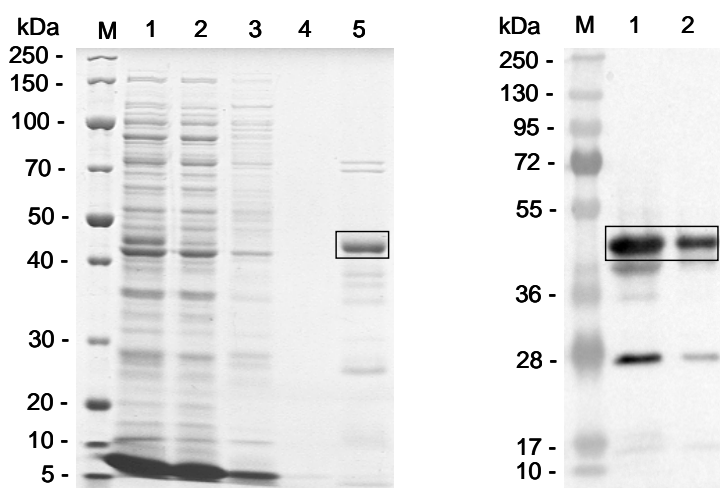
Dráha 3, 5, 7, 9: Bakteriální lyzát v čase 1 – 4 h., neindukovaná exprese rekombinantního proteinu.

Pozn.: Exprese proteinu BmS2-GL2 označena šipkou a orámována černě.

Z výsledků expresní kinetiky vyplývá, že exprese rekombinantních proteinů v indukovaných vzorcích ve všech případech snížila expresi vlastních bakteriálních proteinů. Největší množství rekombinantních proteinů se v bakteriálním lyzátu vyskytuje 3. a 4. hodinu po indukci exprese, což je pro expresi proteinů v klasické Erlenmayerově baňce optimální doba. Proteiny BmS2-B a BmS2-GL2 jsou bakteriálními buňkami produkovány ve velké míře. Protein BmS2-A je expimován v menším množství a protein BmS2-GL1 je již velice těžké odlišit od ostatních bakteriálních proteinů, což může být způsobeno vysokou molekulovou hmotností proteinu (67,6 kDa).

## 6.2.2 Exprese rekombinantních proteinů

Proteiny BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 byly dále purifikovány afinitní chromatografií pomocí hexahistidinové kotvy, protein BmS2-GL2 byl purifikován z inkluzních tělísek. Obě metody purifikace byly u všech proteinů vizualizovány vertikální elektroforézou. Ověření přítomnosti proteinu BmS2-A a BmS2-B proběhlo pomocí specifických protilátek proti hexahistidinové kotvě metodou western blot. Přítomnost všech rekombinantních proteinů byla dále ověřena sekvenační analýzou na hmotnostním spektrofotometru (výsledky sekvencace nejsou v práci znázorněny).



**Obrázek 12 (vlevo) – purifikace rekombinantního proteinu BmS2-A (33,5 kDa) afinitní chromatografií**

Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1881)

Dráha 1: Bakteriální lyzát před pročištěním.

Dráha 2: Frakce nenavázaná na chromatografickou kolonu.

Dráha 3: Promývací frakce 1.

Dráha 4: Promývací frakce 4.

Dráha 5: Eluční frakce 1.

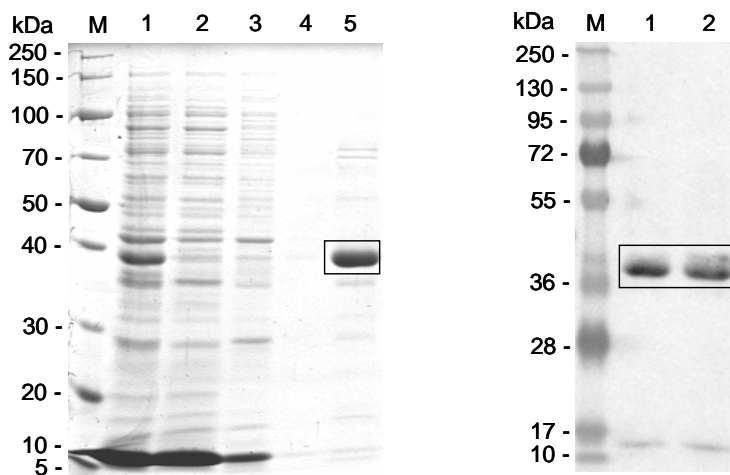
**Obrázek 13 (vpravo) – detekce rekombinantního proteinu BmS2-A (33,5 kDa) metodou western blot**

Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1811)

Dráha 1: Eluční frakce 1.

Dráha 2: Eluční frakce 2.

Pozn.: Protein BmS2-A orámován černě.



**Obrázek 14 (vlevo) – purifikace rekombinantního proteinu BmS2-B (30,2 kDa) afinitní chromatografií**

Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1881)

Dráha 1: Bakteriální lyzát před pročištěním.

Dráha 2: Frakce nenavázaná na chromatografickou kolonu.

Dráha 3: Promývací frakce 1.

Dráha 4: Promývací frakce 4.

Dráha 5: Eluční frakce 1.

Pozn.: Protein BmS2-B orámován černě.

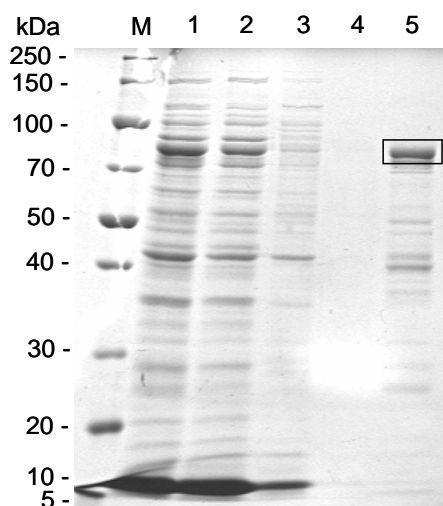
**Obrázek 15 (vpravo) – detekce rekombinantního proteinu BmS2-B (30,2 kDa) metodou western blot**

Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1811)

Dráha 1: Eluční frakce 1.

Dráha 2: Eluční frakce 2.

Pozn.: Protein BmS2-A orámován černě.



**Obrázek 16 – purifikace rekombinantního proteinu BmS2-GL1 (67,6 kDa) afinitní chromatografií**

Dráha M: Proteinový marker (Fermentas, SM1881)

Dráha 1: Bakteriální lyzát před pročištěním.

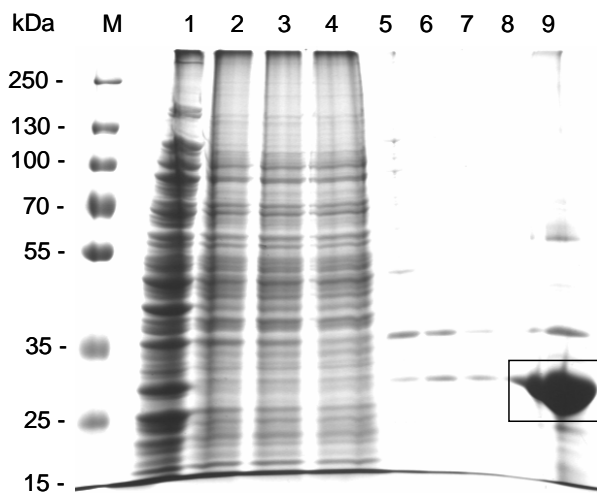
Dráha 2: Frakce nenavázaná na chromatografickou kolonu.

Dráha 3: Promývací frakce 1.

Dráha 4: Promývací frakce 4.

Dráha 5: Eluční frakce 1.

Pozn.: Protein BmS2-GL1 orámován černě.



**Obrázek 17 – purifikace rekombinantního proteinu BmS2-GL2 z inkluzních tělísek**

Dráha M: Proteinový marker (Thermo, 26619)

Dráha 1 – 8: Promývací frakce.

Dráha 9: Inkluzní tělíska.

Pozn.: Protein BmS2-GL2 orámován černě.

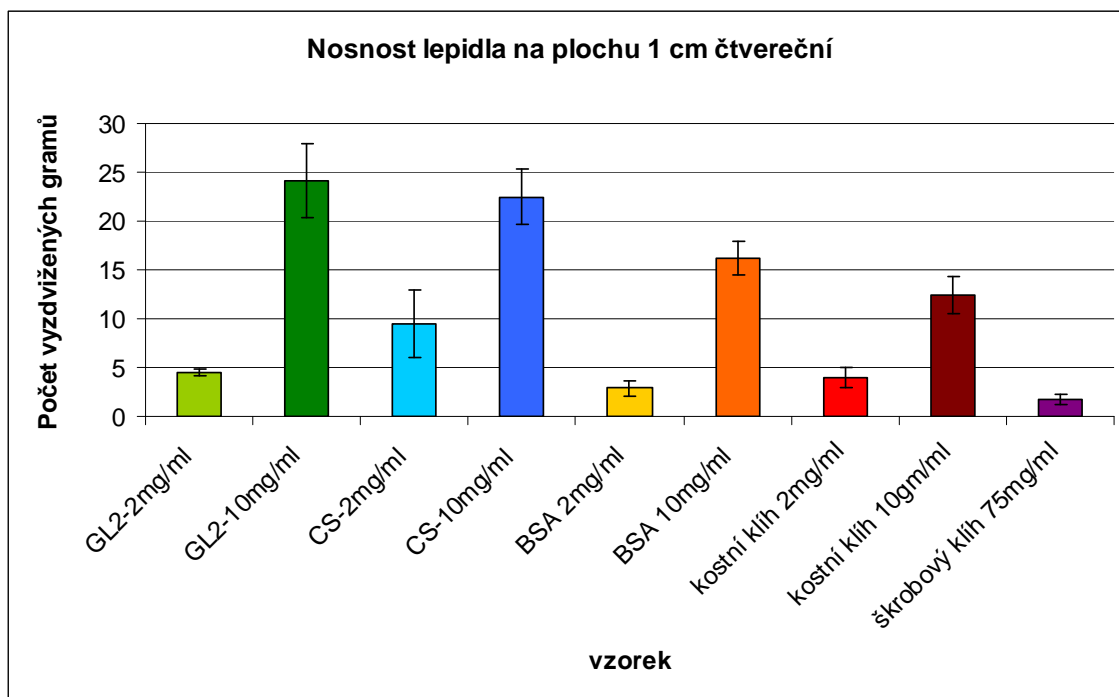
Rekombinantní proteiny byly z bakteriálního lyzátu úspěšně purifikovány a jejich identita byla ověřena metodou western blot (BmS2-A, BmS2-B) a hmotnostní spektrometrií (BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2). Proteiny BmS2-A a BmS2-B byly na polyakrylamidovém gelu identifikovány s větší molekulovou hmotností, jelikož jsou exprimovány ještě s hexahistidinovou kotvou a luminiscenčním markerem (Lumio-tag), jejichž sekvence nejsou zahrnuty v molekulové hmotnosti proteinů. Oba proteiny jsou purifikovány s poměrně vysokým výnosem a v elučních frakcích je přítomno málo bakteriálních kontaminantů. Protein BmS2-GL1 má na gelu zhruba o 10 kDa větší molekulovou hmotnost, než byla vypočítána. Jelikož přímo ve své sekvenci obsahuje počátek translace (Met) a histidinovou kotvu, není jasné, proč protein vykazuje větší molekulovou hmotnost. Tento rekombinantní protein je v rámci purifikace zároveň nejproblematictější. Na gelu si můžeme všimnout, že část exprimovaného proteinu je odmyta již před použitím promývacích roztoků, další část při samotném promývání. Eluční frakce tedy obsahuje požadovaný rekombinantní protein, ale v poměrně nízké koncentraci a s řadou bakteriálních příměsí. Řešením nízkého výtěžku by byla optimalizace exprese a purifikace tohoto proteinu. Rekombinantní protein BmS2-GL2 byl exprimován do inkluzních tělísek v poměrně vysokém množství. Molekulová hmotnost proteinu na gelu odpovídala očekávané hmotnosti 30,2 kDa. Metoda purifikace byla proto nejen levná, ale i vysoce účinná. Purifikovaný protein byl sice při izolaci denaturován, nakonec se ale ukázalo, že denaturace proteinu nemá na funkční testy vliv a po rozpuštění v kyselině mravenčí může tento protein sloužit k požadovaným účelům.



## 6.3 Charakterizace izolovaných rekombinantních proteinů

### 6.3.1 Měření lepivosti proteinů

Lepivost rekombinantního proteinu BmS2-GL2 byla měřena na mechanickém zařízení popsaném v kapitole 5.3.1. Díky předchozímu pozorování přilnavosti sericinových proteinů k hydrofóbnímu povrchu byl pro test jako lepený materiál použit polypropylen, z něhož jsou běžně vyráběny Eppendorfovy a PCR zkušebnice. Adhezivita rekombinantního proteinu byla porovnána s komerčním sericinem (CS), BSA (protein bez známých lepivých vlastností), kostním kličem (proteinové lepidlo) a škrobovým kličem přírodního původu (bramborový škrob). Kostní klič a škrobové lepidlo jsou materiály využívané pro lepení různých povrchů v běžné praxi. Výsledek měření je znázorněn v grafu 1.



**Graf 1 – měření lepivosti proteinů**

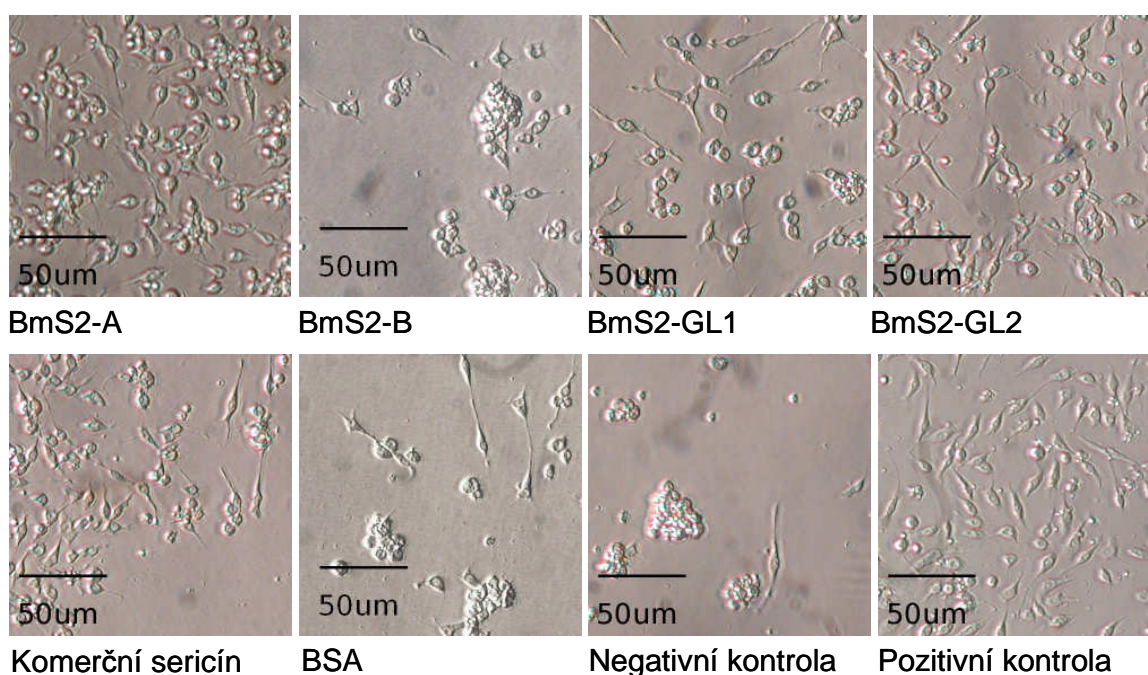
Rekombinantním proteinem BmS2-GL2 (GL2), komerčním sericinem (CS), bovinním sérovým albumínem (BSA) a kostním kličem o koncentraci 2 a 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  a objemu 10  $\mu\text{l}$  byly slepeny dva polypropylenové povrchy o průměru 0,44  $\text{cm}^2$ . Lepivost proteinů byla charakterizována jako nosnost vyjádřená v gramech na plochu 1  $\text{cm}^2$ .

Z výsledků znázorněných v grafu 1 vyplývá, že rekombinantní protein BmS2-GL2 o koncentraci 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  má v porovnání s ostatními vzorky nejvyšší lepivost. Tento protein se liší od ostatních přítomností repetitivní sekvence a je schopný adherovat k hydrofóbnímu polypropylenovému povrchu.

## 6.3.2 Buněčné testy

### 6.3.2.1 Testování buněčné adheze

Pro testování přichycení buněk k povrchu ošetřeném sericiny a jejich přežívání byly vybrány dva typy hmyzích buněk (C18+ a D8) a dva typy buněk savčích (NIL-2 a MEF), všechny jsou striktně závislé na adhezi. Buňky nanesené na misku ošetřenou proteinovým filmem byly sledovány ve čtyřech různých aspektech, a to zda adherují k povrchu, proliferují, vykazují standardní morfologii, a dále byla měřena životaschopnost buněk. Výsledky pozorování jsou znázorněny na následujících fotografiích a grafech.



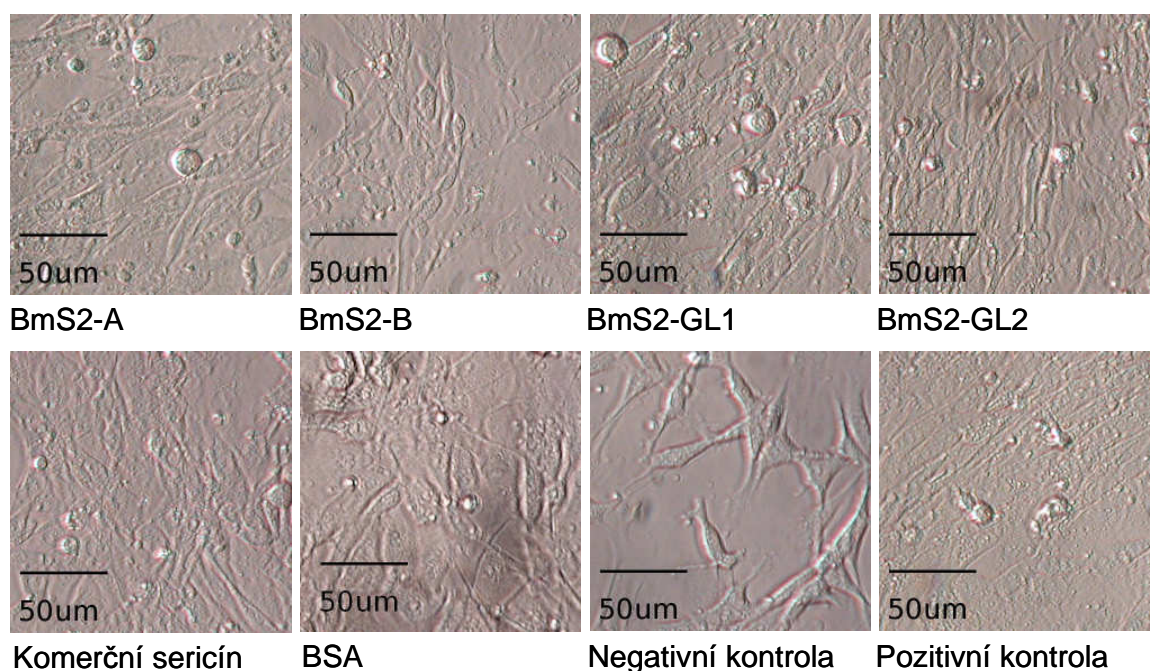
**Obrázek 18 – Adheze buněk k povrchu, buněčná linie C18+**

Obrázky BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 představují buňky C18+ kultivované na rekombinantních proteinech na standardní Petriho misce pro bakteriologii. Podobně komerční sericín a bovinní sérový albumín (BSA). Negativní kontrolu představují buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce s neupraveným povrchem, pozitivní kontrolu buňky na standardním povrchu pro tkáňové kultury. Fotografie byly pořízeny 3. den kultivace v kompletním médiu.

Buňky C18+ rostou za standardních podmínek přichycené k povrchu a jednotlivě. Morfologicky jsou to protáhlé buňky, které koncovými výběžky komunikují s okolím (viz pozitivní kontrola). Pokud se buňka zakulatí, je to signál právě probíhajícího buněčného dělení, nebo nepřírozené ztráty kontaktu s povrchem vedoucí k apoptóze. Shluky buněk se vytvoří, když nepřichycené buňky volně plovoucí v médiu adherují samy na sebe a celá skupina se pak zachytí za zdravou přichycenou buňku.

Výsledek testu adheze C18+ buněk na různé typy proteinových filmů vykazuje značnou variabilitu. V případě vzorku BmS2-A se vyskytují spíše buňky s normální morfologií, kulatých je menší podíl. Buňky mají tendenci držet se při sobě, shluky ovšem netvoří. Na proteinovém filmu BmS2-B přežívá malý počet buněk. Několik buněk vypadá morfologicky standardních, ale neúspěšně se snaží o kontakt s okolím. Převažují buňky kulaté a shluky. Na rekombinantním sericinu BmS2-GL1 rostou buňky standardní morfologie i kulaté, shluky se netvoří. Na proteinu BmS2-GL2 buňky proliferují a vykazují standardní morfologií, několik buněk je kulatých. Buňky netvoří shluky a jsou rovnoměrně rozrostlé po ploše.

Komerční sericin je kontrolním podkladem, na kterém buňky C18+ opět rostou se standardní morfologií a kulaté. Na BSA se kromě standardních a kulatých buněk vyskytují shluky buněk, buňky jsou řídké a neproliferují. V negativní kontrole převažují shluky buněk, buňky kterým se podařilo adherovat k povrchu mají buď příliš dlouhé výběžky, nebo jsou kulaté (obrázek 18).



**Obrázek 19 – Adheze buněk k povrchu, buněčná linie NIL-2**

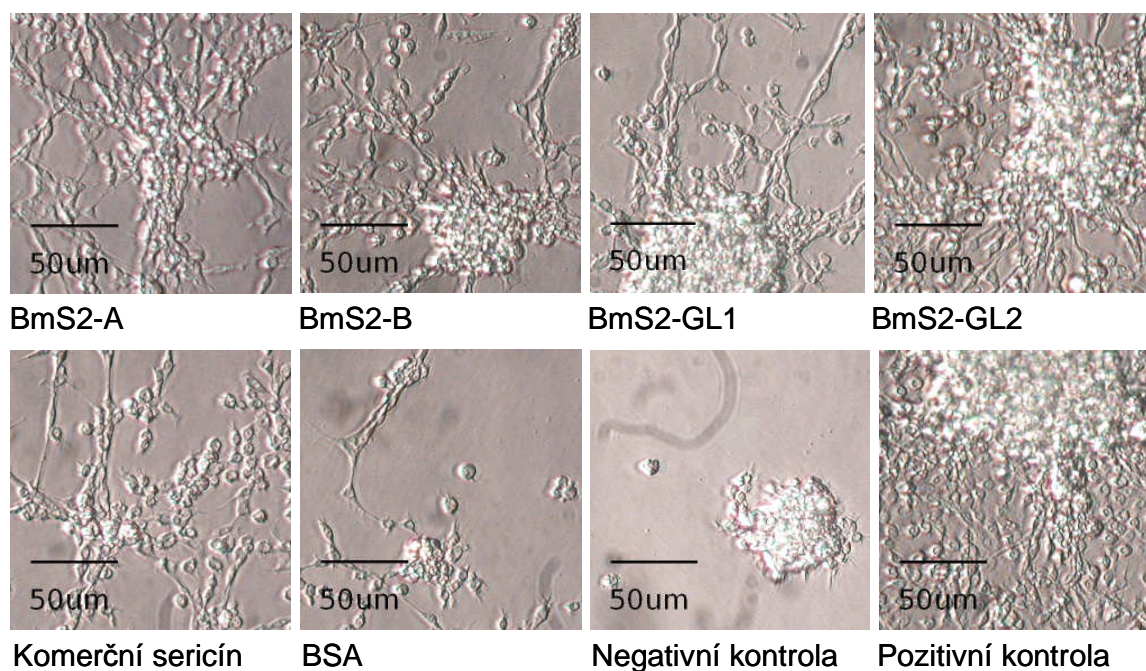
Obrázky BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 označují rekombinantní proteiny, na kterých byly kultivovány buňky NIL-2. Podobně komerční sericin a bovinní sérový albumín (BSA). Negativní kontrolu představují buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce bez proteinů, pozitivní kontrolu buňky na standardním povrchu pro tkáňové kultury. Fotografie byly pořízeny 3. den kultivace v kompletním médiu.

Buňky NIL-2 jsou protáhlé, dlouhé fibroblasty, které na podkladu vytváří souvislou buněčnou vrstvu, kde lze morfologii světelnou mikroskopií špatně rozlišit. Buňky však



rostou zpravidla jedním směrem (viz pozitivní kontrola). Částečně adherují i na nepřilnavém povrchu buňky, ale využívají především intercelulárních adhezivních molekul a vytváří jakési záchranné sítě (viz negativní kontrola). Pokud buňka ztratí kontakt s okolím, zakulatí se a odumírá.

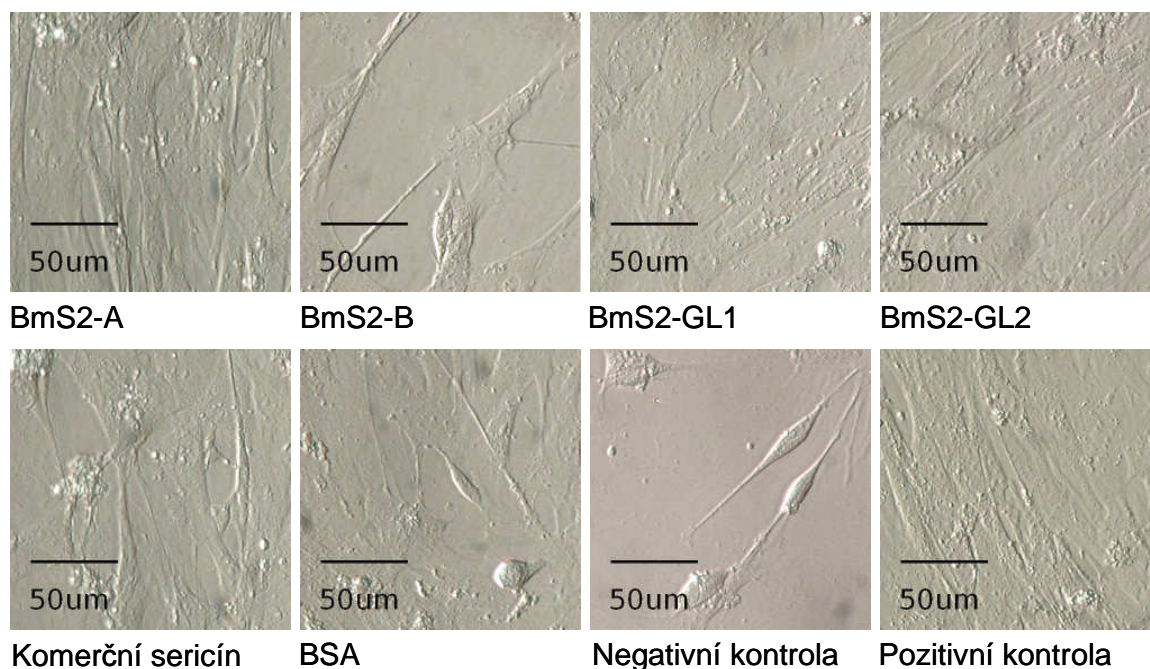
Na všech sericinech včetně komerčního buňky NIL-2 rostly stejně dobře a standardně. V případě BSA je vidět nesoulad ve směru růstu, buňky ovšem na BSA proteinovém filmu adherují a proliferují (obrázek 19).



**Obrázek 20 – Adheze buněk k povrchu, buněčná linie D8**

Obrázky BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 představují rekombinantních proteiny nanesené na Petriho misky pro kultivaci buněk D8 kultivované na. Podobně komerční sericín a bovinní sérový albumín (BSA). Negativní kontrolu představují buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce bez nanesených proteinů, pozitivní kontrolu buňky na standardním povrchu pro tkáňové kultury. Fotografie byly pořízeny 3. den kultivace v kompletním médiu.

Buňky D8 jsou fyziologicky i morfologicky podobné buněčné linii C18+. D8 buňky příležitostně tvoří prostorové sítě a vyrůstají do klastrů (viz pozitivní kontrola). Při testování buněčné adheze se přichytily a proliferovaly na všech typech sericinových rekombinantních proteinů. Na kontrolním komerčním sericinu proliferovaly méně, na BSA se buňky nedělily a neprosperovaly. V případě negativní kontroly byly přítomné pouze shluky buněk beze známky života (obrázek 20).



**Obrázek 21 – Adheze buněk k povrchu, primární buněčná kultura MEF**

Obrázky BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 představují buňky MEF kultivované na rekombinantních proteinech s příslušnými názvy. Podobně komerční sericin a bovinní sérový albumín (BSA). Negativní kontrolu představují buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce bez rekombinantních proteinů, pozitivní kontrolu buňky na standardním povrchu pro tkáňové kultury. Fotografie byly pořízeny 3. den kultivace v kompletním médiu.

MEF jsou myší primární fibroblasty, fyziologicky a morfologicky velice podobné s buněčnou linií NIL-2. Jsou to velké, dlouhé, vláknité buňky závislé na mezibuněčném kontaktu a adhezi. Kultivační povrch porůstají souvislou vrstvou, kde nelze jednotlivé buňky snadno rozlišit (viz pozitivní kontrola). K neadhezivnímu povrchu (negativní kontrola) se buňky přichycují špatně, neproliferují a snaží se navázat kontakt se zbývajícími buňkami. Pokud MEF nemohou kontakt navázat, zakulatí se a apoptizují, popř. se uvolní do kultivačního média.

Testy buněčné adheze na proteinový film ukázaly, že buňky se daří kultivovat na rekombinantním proteinu BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2. Buňky pěstované na proteinu BmS2-B jsou morfologicky srovnatelné s negativní kontrolou. MEF na komerčním sericinu a BSA neporostly celý povrch, ale morfologicky se jeví v pořádku (obrázek 21)..

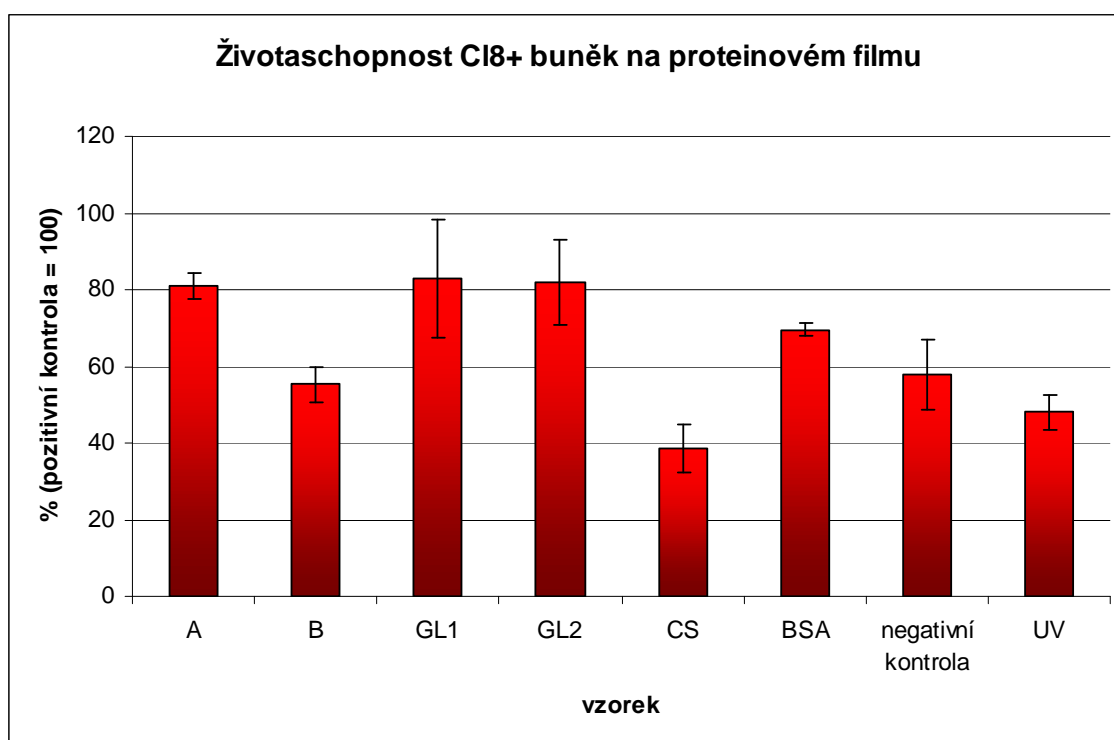
#### **Testování buněčné adheze – shrnutí:**

Test schopnosti buněk C18+, D8, NIL-2 a MEF ukázal, že jsou všechny typy buněk schopné do jisté míry na proteinových filmech adherovat. Pro další testy kvantitativního charakteru byly vybrány buněčné linie C18+ (zástupce hmyzí buněčné linie) a NIL-2 (zástupce savčích buněk).

### 6.3.2.2 Měření životaschopnosti buněk CI8+ a NIL-2 (MTS test)

MTS test je kolorimetrická metoda, která kvantitativně měří životaschopnost testovaných buněk. Principem metody je redukce tetrazoliových solí dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk na červený formazán, který je rozpustný v kultivačním médiu. Intenzita zabarvení je pak přímo úměrná aktivitě sledované buněčné populace.

#### MTS test buněk CI8+



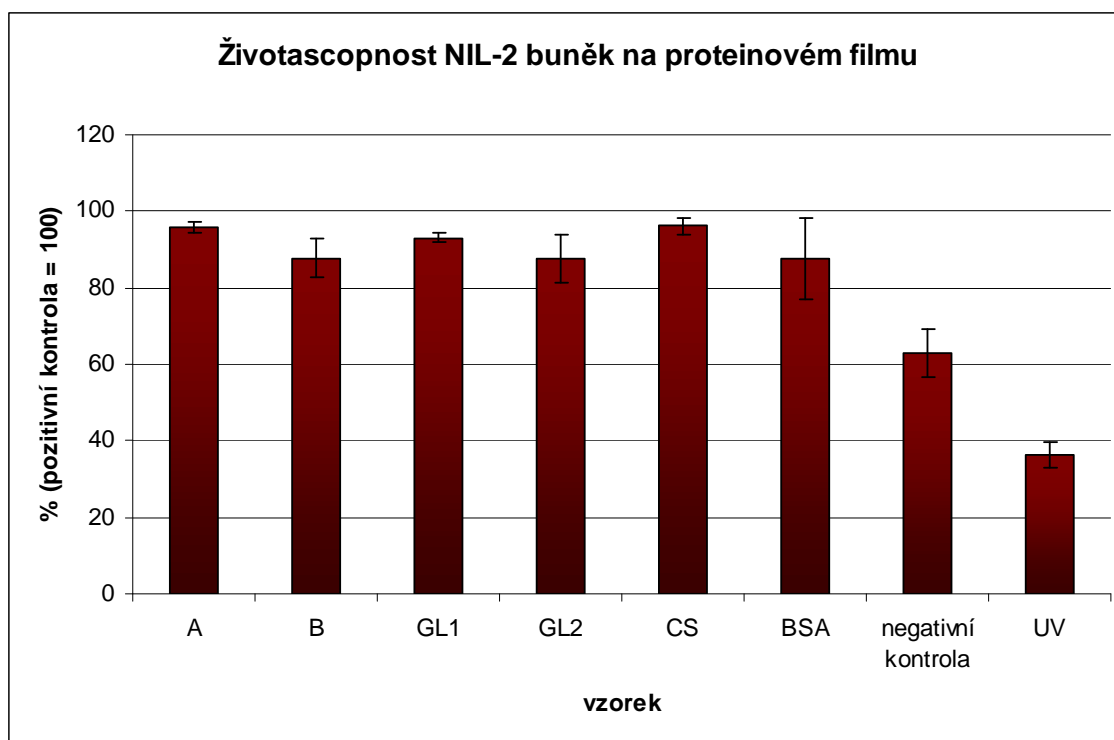
**Graf 2 – Měření životaschopnosti buněk CI8+**

Graf prezentuje životaschopnost buněk CI8+ po 24 hod. kultivace na proteinovém filmu. Buňky CI8+ byly v minimálním médiu naneseny na testované povrchy a dále kultivovány za standardních podmínek. Posléze byl s buněčnými kulturami proveden MTS test. Vzorek A, B, GL1 a GL2 symbolizuje rekombinantní protein BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2. Komerční sericin je v grafu znázorněn pod zkratkou CS, bovinní sérový albumín jako BSA. Negativní kontrola znázorňuje buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce, vzorek UV představuje buňky ozářené ultrafialovým zářením pro indukci apoptózy. Pozitivní kontrola (buňky pěstované na povrchu standardním pro tkáňové kultury) představuje 100 % metabolickou aktivitu buněk a není v grafu znázorněna.

Z grafu 2 vyplývá, že buňky pěstované na rekombinantních proteinech BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 dosahují přibližně 80 % aktivity buněk kultivovaných za standardních podmínek. Metabolická aktivita buněk kultivovaných na rekombinantním proteinu BmS2-B činila necelých 60 % a je srovnatelná s aktivitou buněk negativní kontroly. Nejhůře se buňkám dařilo na komerčním sericinu, jejichž aktivita nedosahovala ani 40 %. Naopak, životaschopnost buněk kultivovaných na BSA filmu dosahuje téměř 70 %. Buňky ozářené

UV světlem jsou apoptické a dokazují, že metabolická aktivita při apoptóze klesá. Statistická analýza potvrdila pozitivní efekt rekombinantních sericinů BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2, na kterých buňky oproti negativní kontrole prosperují. Zarážející je fakt, se buňkám kultivovaným na komerčním sericinu dařilo méně, než v negativní, nebo UV kontrole. Tento jev může být vysvětlen kultivací buněk v minimálním médiu bez obsahu fetálního bovinního séra (FBS), které by za standardních podmínek (v celkovém médiu) poskytlo buňkám jakousi ochranu před možným vnějším agens obsaženým v komerčně vyráběném sericinu (graf 2).

### MTS test buněk NIL-2



**Graf 3 – Měření životaschopnosti buněk NIL-2**

Graf prezentuje životaschopnost buněk NIL-2 po 24 hod. kultivace na proteinovém filmu. Buňky NIL-2 byly v kompletním médiu naneseny na testované povrchy a dále kultivovány za standardních podmínek. Posléze byl s buněčnými kulturami proveden MTS test. Vzorek A, B, GL1 a GL2 symbolizuje rekombinantní protein BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2. Komerční sericin je v grafu znázorněn pod zkratkou CS, bovinní sérový albumín jako BSA. Negativní kontrola znázorňuje buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce, vzorek UV představuje buňky ozářené ultrafialovým zářením pro indukci apoptózy. Pozitivní kontrola (buňky pěstované na povrchu standardním pro tkáňové kultury) představuje 100 % metabolickou aktivitu buněk a není v grafu znázorněna.

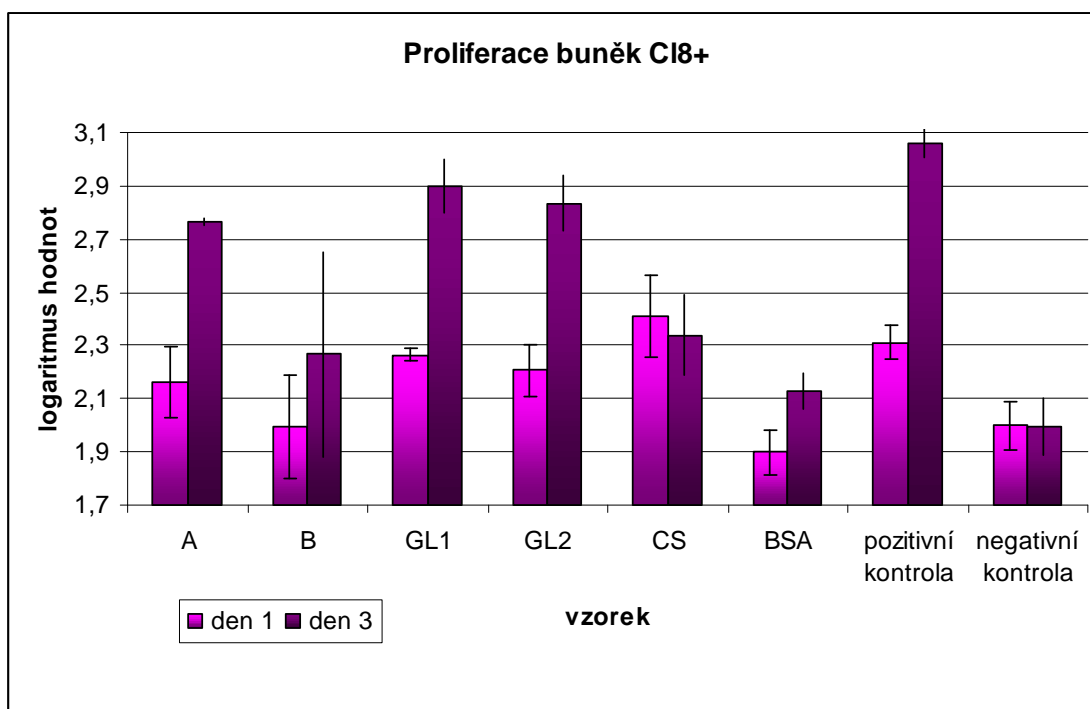
U buněčné linie NIL-2 jsou naměřené hodnoty metabolické aktivity velice vysoké u všech sledovaných vzorků, vyjma negativní a UV kontroly. Nejvyšší naměřenou hodnotu dokonce představuje samotný kontrolní vzorek, komerční sericin, který se ovšem svými 96

% vyrovná s rekombinantním proteinem BmS2-A (95,8 %). Výsledky statistické analýzy potvrzují signifikantní rozdíly mezi proteinovými filmy a negativní kontrolou, resp. UV kontrolou (graf 3).

### Měření životaschopnosti buněk – shrnutí

MTS test prokázal u obou typů buněčných linií (C18+ a NIL-2) pozitivní vliv rekombinantních sericinů na životaschopnost buněk. Ke komplikaci došlo až při naměření extrémně nízkých hodnot metabolické aktivity buněk C18+ po kultivaci na komerčním sericinu, kde pravděpodobně došlo k ovlivnění testu kultivací buněk v minimálním médiu. U buněčné linie NIL-2 naopak nebyly zřetelné rozdíly mezi testovanými vzorky (vyjma negativní a UV kontroly). Proto byly s buňkami provedeny další testy (viz dále).

#### 6.3.2.3 Kvantitativní stanovení adheze a proliferace buněk C18+



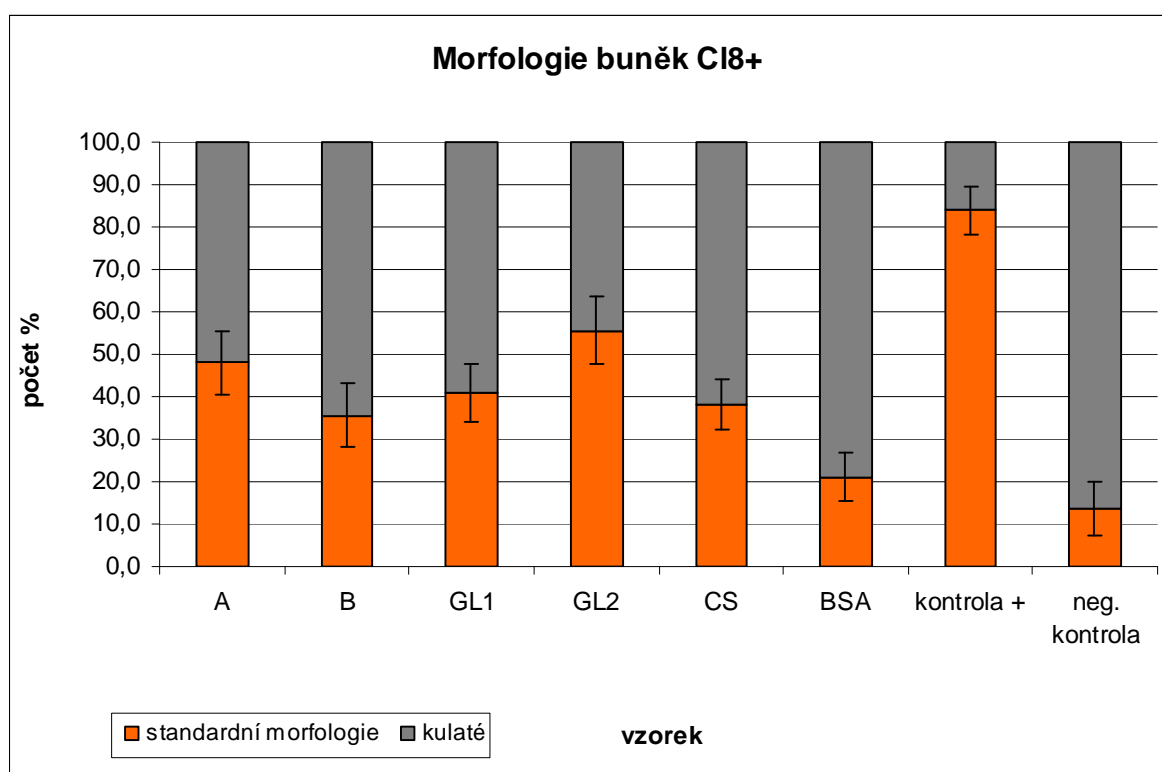
**Graf 4 – Stanovení počtu buněk C18+ první a třetí den kultivace**

Graf znázorňuje nárůst C18+ buněk první den (první sloupec) a třetí den (druhý sloupec) kultivace na ploše 0,36 mm<sup>2</sup>. Absolutní naměřená hodnota je vyjádřena jako počet procent vztahených na negativní kontrolu. Data byla transformována na logaritmus hodnot. Buňky C18+ byly v kompletním médiu naneseny na testované povrchy a kultivovány za standardních podmínek po dobu tří dnů. Vzorek A, B, GL1 a GL2 symbolizuje rekombinantní protein BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2. Komerční sericin je v grafu znázorněn pod zkratkou CS, bovinní sérový albumín jako BSA. Negativní kontrola znázorňuje buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce a pozitivní kontrolou jsou buňky pěstované na povrchu standardním pro tkáňové kultury.



Z výsledku můžeme pozorovat profil proliferace buněk na testovaných vzorcích. První den kultivace jsou počty buněk téměř vyrovnané, nízkých hodnot dosahuje vzorek BmS2-B, kontrolní protein BSA, které se shodují s negativní kontrolou. Počet buněk kultivovaných na proteinu BmS2-GL1 a BmS2-GL2 se téměř vyrovná počtu buněk v pozitivní kontrole. V případě proteinu BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 se počet buněk oproti prvnímu dni kultivace do třetího dne výrazně zvýšil, v případě proteinu BmS2-B a BSA byl zaznamenán slabší nárůst počtu buněk. Výsledky statistického vyhodnocení potvrzují, že se rekombinantní proteiny BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 signifikantně neliší od kontroly pozitivní a mají zároveň průkazně lepší účinek na buněčnou proliferaci, než negativní kontrola, BSA a protein BmS2-B. Mírný pokles počtu buněk je zaznamenán u komerčního sericinu a pozitivní kontroly (graf 4).

#### 6.3.2.4 Morfologie C18+ buněk (%)



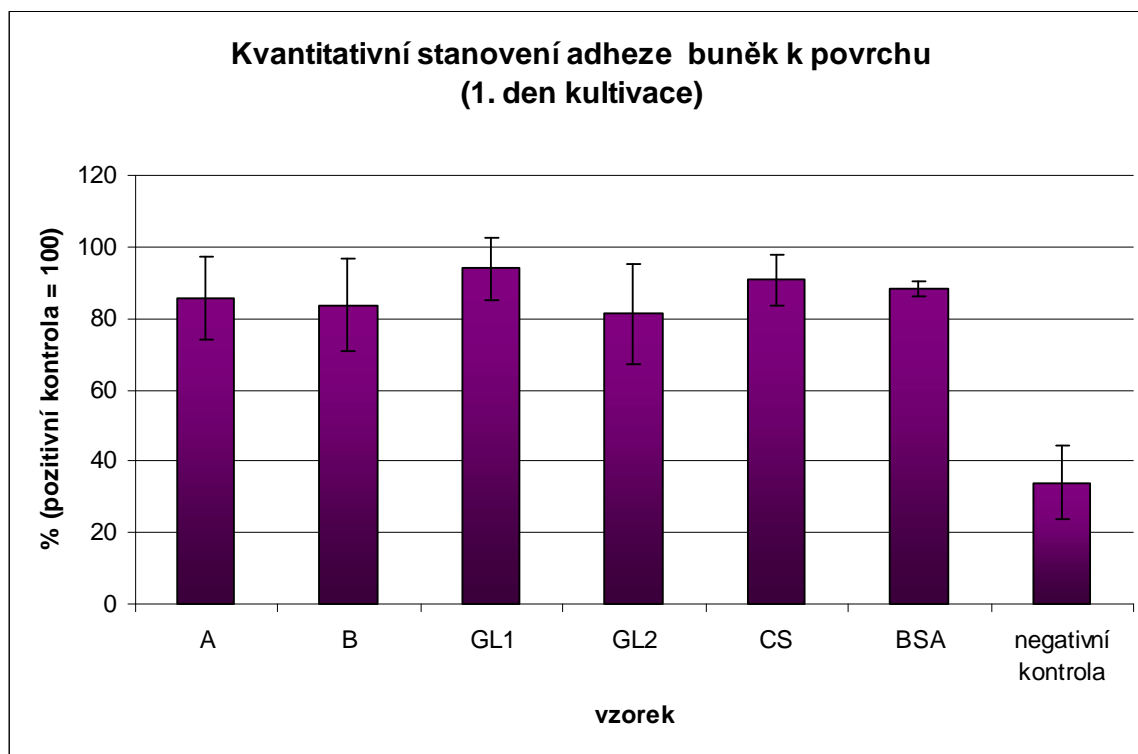
**Graf 5 – Rozlišení morfologie C18+ buněk**

Graf znázorňuje morfologii C18+ buněk, které jsou rozděleny do kategorie a) standardní morfologie (spodní sloupec) a b) kulaté buňky (horní sloupec). Morfologie byla sledována první a třetí den kultivace na ploše 0,36 mm<sup>2</sup> a hodnoty v grafu tvoří průměr těchto hodnot. Absolutní naměřená hodnota je vyjádřena jako počet procent z celkového počtu buněk. Buňky C18+ byly v kompletním médiu naneseny na testované povrchy a kultivovány za standardních podmínek po dobu tří dnů. Vzorek A, B, GL1 a GL2 symbolizuje rekombinantní protein BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2. Komerční sericin je v grafu znázorněn pod zkratkou CS, bovinní sérový albumín jako BSA. Negativní kontrola znázorňuje buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce a pozitivní kontrolou jsou buňky pěstované na povrchu standardním pro tkáňové kultury.

U proteinu BmS2-A je poměr buněk se standardní morfologií a buněk kulatých téměř vyrovnaný s mírnou převahou kulatých buněk. U rekombinantních proteinů BmS2-B a BmS2-GL1 převažují kulaté buňky a u proteinu BmS2-GL2 je mírná převaha buněk se standardní morfologií. U komerčního sericinu se vyskytují převážně buňky kulaté. Buňky pěstované na BSA jsou převážně kulaté a graf má stejný profil jako negativní kontrola. Můžeme si všimnout, že pozitivní kontrola s převahou buněk se standardní morfologií je pravým opakem kontroly negativní, kde převažují buňky kulaté (graf 5).

### 6.3.2.5 Kvantitativní stanovení adheze buněk NIL-2

Množství NIL-2 buněk adherovaných k testovanému povrchu bylo stanoveno jejich obarvením krystalovou violetí. Krystalová violet' je modrofialové barvivo, které proniká do buněk a pevně se k nim váže. Violet' se z buněk nedá odmyt vodou, ale uvolňuje se až po rozpuštění v čistém metanolu. Intenzita zabarvení metanolu je pak přímo úměrná množství adherovaných buněk (*Cell Adhesion Protocol Manual, BD Biosciences*).



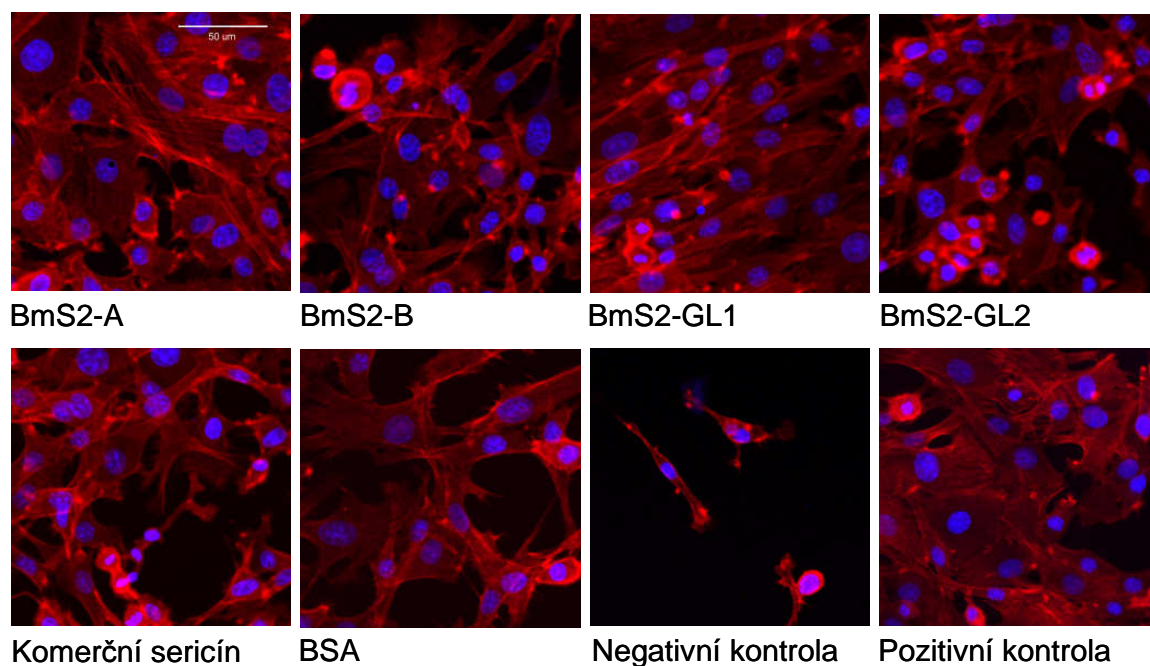
**Graf 6 – Kvantitativní stanovení adheze NIL-2 buněk k testovanému povrchu**

Graf prezentuje množství buněk NIL-2 adherovaných k proteinovému filmu po 24 hod. kultivace. Buňky NIL-2 byly v kompletním médiu naneseny na testované povrchy a kultivovány za standardních podmínek. Vzorek A, B, GL1 a GL2 symbolizuje rekombinantní protein BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2. Komerční sericin je v grafu znázorněn pod zkratkou CS, bovinní sérový albumín jako BSA. Negativní kontrola znázorňuje buňky kultivované na bakteriologické Petriho misce. Pozitivní kontrola (buňky pěstované na povrchu standardním pro tkáňové kultury) představuje 100 % a není v grafu znázorněna.

Výsledky ukazují, že buňky kultivované na jakémkoli proteinovém filmu, včetně komerčního sericinu a BSA, adherují k povrchu a jejich množství činí více jak 80 % pozitivní kontroly. Největší nárůst buněk vykazuje rekombinantní protein BmS2-GL1. Negativní kontrola, která dosahuje pouze 34 %, dokazuje fakt, že na pouhém polystyrenovém povrchu buňky NIL-2 neprosperují. Všechny proteinové povrchy signifikantně zlepšují podmínky pro buněčnou adhezi a proliferaci (graf 6).

### 6.3.2.6 Morfologie buněk NIL-2

Vizualizace buněčného cytoskeletu pomocí fluorescenčního barvení je velice citlivá metoda, která dokáže v kombinaci s konfokální mikroskopií zobrazit detailní rozdíly v morfologii buněk. Principem metody je specifická vazba fluorescenčně značeného phaloidinu na aktinová vlákna buňky (F – aktin). Jaderná DNA je značena fluorescenční látkou DAPI, která se váže specificky na DNA a emituje modrou fluorescenci.



**Obrázek 22 – Vizualizace cytoskeletu buněk NIL-2 po adhezi na testované povrchy.**

Fotografie buněk znázorňují zformování aktinových vláken a jaderného chromatinu buněk NIL-2 po 24 hod. kultivaci na proteinových filmech vytvořených z rekombinantních sericinů BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2, komerčního sericinu a BSA, za standardních podmínek. Negativní kontrolu představovaly buňky kultivované na polystyrenové bakteriologické misce a pozitivní kontrolu buňky rostoucí na povrchu standardním pro tkáňové kultury. Aktinová vlákna buněk byla vizualizována fluorescenčně značeným phaloidinem (Texas Red®-X phalloidin) červeně, buněčná jádra pomocí fluorescenčního barviva DAPI modře. Uvedené snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu.

Výsledek vizualizace buněčného cytoskeletu linie NIL-2 vypovídá o kondici testovaných buněk. Buňky NIL-2 vytváří za standardních podmínek síť aktinových vláken v buňce rovnoměrně rozprostřených. Jádra buněk jsou relaxovaná a velká (viz pozitivní kontrola, obr. 22). Při nedostatečném přichycení buňky k povrchu dochází ke smrštění a nahromadění aktinových vláken, vytvoření fibroidního tvaru buňky, nebo jejího zakulacení (Caron, 2003) a jádra buněk jsou kondenzovaná, což je charakteristické pro probíhající apoptózu (viz negativní kontrola, obr. 22).

NIL-2 kultivované na proteinovém filmu BmS2-A jsou relaxované a aktinová vlákna jsou v buňkách rovnoměrně rozprostřená. Buňky vytváří souvislou vrstvu s intercelulárními kontakty a jen občas se vyskytuje nahromadění aktinu. Na rekombinantním proteinu BmS2-B stále nalezneme buňky se standardní morfologií, již se ovšem vyskytují buňky zakulacené a buňky se scvrklými jádry, kterých je asi 30 %. Na povrchu BmS2-GL1 mají buňky většinou relaxovaná jádra i aktinová vlákna. Morfologicky se od pozitivní kontroly liší protáhlým tvarem. Stejně jako u proteinu BmS2-B se zde objevují kulaté buňky s kondenzovanými jádry a nahromaděným aktinem. Na proteinovém filmu BmS2-GL2 buňky tvoří příliš ucelenou strukturu. Poměr kulatých buněk s kondenzovaným chromatinem a buněk se standardní morfologií je asi 1 : 2. Morfologie buněk kultivovaných na komerčním sericinu je srovnatelná se vzorkem BmS2-GL2. Na povrchu tvořeném BSA buňky téměř neobsahují nahromaděná aktinová vlákna a kondenzovaný chromatin, nevytváří ovšem ucelený buněčný celek a neproliferují (buňky tvoří na BSA povrchu jakési buněčné mapy); (obrázek 22).

## 7 Diskuse

### 7.1 Lepivé vlastnosti rekombinantního proteinu BmS2-GL2

Dosud se nepodařilo uměle připravit přírodní adhezivního proteiny typu přírodního lepidla slávky jedlé, nebo bource morušového, aniž by neztratily většinu svých vlastností. Proto jsme se v této práci syntézou takového biomateriálu zabývali.

Srovnáním sekvencí kódujících lepivý protein sericin 2 bource morušového s dosud známými sekvencemi proteinů byla nalezena nápadná shoda s adhezivními proteiny slávky jedlé a trypanosomy americké (až 30 % identita aminokyselin) (Kludkiewicz et al., 2009). Na základě konsensu uvedených proteinů byla připravena syntetická sekvence kódující rekombinantní protein nazvaný BmS2-GL2. Tento protein byl v rámci této práce úspěšně exprimován v bakteriálním expresním systému a purifikován z inkluzních tělísek. V testech adhezivity (míra lepivosti, která byla měřena jako nosnost proteinového lepidla na plochu 1 cm<sup>2</sup> polypropylenu) se prokázalo, že roztok proteinu BmS2-GL2 (protein rozpuštěný v kyselině mravenčí) má lepivý potenciál a v našich pokusech dokonce předčil lepivé vlastnosti kostního klíhu. Při srovnání výsledků s podobným testem lepivosti sericinových proteinů (Kludkiewicz et al, 2009) je v našich pokusech lepivá síla kontrolního kostního klíhu poměrně nízká. Důvodem může být volba jiného lepeného materiálu (hydrofobní polypropylen oproti dřevu) a poměrně nízká použitá koncentrace klíhu úměrná s koncentrací rekombinantního proteinu BmS2-GL2. Z výsledků testu rovněž vyplývá, že se zvyšující se koncentrací roste nosnost testovaného lepidla. Zajímavé by proto bylo například ještě o řád zvýšit koncentraci proteinu BmS2-GL2 a porovnat míru lepivosti se současnými výsledky. Izolace rekombinantních proteinů ve větším množství je ale při expresi proteinů v Erlenmayerových baňkách poměrně náročná. Pro zvýšení výtěžku proteinů by bylo zapotřebí použít fermentor.

### 7.2 Aplikace rekombinantních proteinů genu *Ser-2* ve tkáňových kulturách

Řada aplikací biologických adheziv směřuje do medicíny od hojení ran, po tkáňové inženýrství, kloubní náhrady a zubní implantáty. Je zapotřebí, aby nové adhezivní

materiály byly plně kompatibilní s okolní tkání, podporovaly proliferaci osteocytů, chondrocytů a jiných typů buněk (Anselme, 1999).

V této práci se zabýváme možným použitím sericinů ve tkáňových kulturách podrobněji. Pro funkční testy byly připraveny čtyři kratší rekombinantní proteiny odvozené od genu Ser-2 (BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2), ve kterých se v různé míře nachází potenciální adhezivní motivy integrinových receptorů (Ruoslahti, 1996). Pro testování byly použity 4 typy hmyzích a savčích buněk striktně závislých na přichycení k povrchu (C18+, D8, NIL-2 a MEF). Výsledky testů adhezivnosti ukázaly, že po porovnání s pozitivní kontrolou jsou všechny typy buněk schopné adherovat k rekombinantním proteinům BmS2-A, BmS2-GL1, BmS2-GL2 a komerčnímu sericinu (CS). Na proteinový film BmS2-B adherují pouze buněčné linie NIL-2 a D8. Adheze buněk C18+ a MEF k proteinu BmS2-B a BSA je srovnatelná s negativní kontrolou.

Výsledky kvantitativních testů, které byly provedeny na hmyzích buněčné linii C18+ dokazují, že rekombinantní sericiny BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 mají dobrý vliv jak na proliferaci, tak na životaschopnost buněk. Nejlepší výsledky jsou ale zaznamenány u proteinu BmS2-GL2, na kterém rostou buňky C18+ převážně se standardní morfologií. V publikacích, ve kterých se autoři zabývají buněčnou adhezí, nejsou ovšem hmyzí buněčné linie používány jako modelové. Proto byly experimenty dále provedeny se savčí buněčnou linií NIL-2, jejíž fyziologické vlastnosti jsou velice podobné fibroblastům.

Kvantitativní stanovení účinku rekombinantních proteinů na adhezi buněčné linie NIL-2 potvrdilo, že jsou buňky velmi odolné, a adherují a prosperují na všech typech proteinů, včetně kontrol. Pouze negativní kontrola vykazovala nízký stupeň adheze, proliferace a metabolické aktivity. Mohlo by se zdát, že malé rozdíly mezi testovanými vzorky mohou být způsobeny měřením v prvním dni kultivace, ovšem fotodokumentace adheze buněk NIL-2 dokazuje, že se buňkám na proteinovém filmu dařilo i třetí den. Jelikož se přesná morfologie NIL-2 buněk dala pod světelným mikroskopem ve fázovém kontrastu odhadnout jen těžce, byla provedena vizualizace buněčných jader a cytoskeletu konfokální mikroskopií. Z morfologického hlediska se zdá být nejvhodnějším povrchem pro adhezi NIL-2 buněk rekombinantní protein BmS2-A, na kterém rostou buňky se standardní morfologií. U ostatních vzorků se začínají objevovat kulaté buňky s kondenzovanými jádry, což signalizuje apoptózu (Gill et al., 1997). Dalším nápadným znakem je přestavba aktinových vláken, které jsou klíčovou součástí cytoskeletu. Buňky jsou buď úzké a protáhlé, nebo mají nahromaděný aktin zřejmě v místech fokální adheze. Tento fenotypový projev morfologicky nápadně připomíná fibroblasty (NIH 3T3)

kultivované dřívě v laboratoři Dr. Schindlery na syntetické třídimenzionální nanofibrilární matrix, která byla vyrobena k účelům kultivace tkáňových kultur (Schindler et al., 2005). Po vizualizaci aktinových vláken fluorescenčně značeným phalloidinem se jeví značné rozdíly mezi buňkami kultivovanými na standardním povrchu (sklo, 2-D) a buňkami kultivovanými na nanofibrilární 3-D matrix. Morfologie buněk kultivovaných na skle je prakticky identická s pozitivní kontrolou uvedenou v této práci a v případě 3-D matrix připomínají morfologii buněk NIL-2 pěstovaných na rekombinantních proteinech BmS2-B, BmS2-GL2 a komerčním sericinu (nahromadění aktinu v místech fokální adheze). Autor v závěru práce uvádí, že morfologické změny jsou způsobené 3-D strukturou kultivačního podkladu a simulují přirozenou morfologii buněk organismu adherovaných k extracelulární matrix. Zde je na místě úvaha, zda by nemohly rekombinantní proteiny 3-D strukturu připomínat. Bohužel ale nebyla provedena charakterizace fyzikálních vlastností proteinových filmů. Náš výsledek vizualizace aktinových vláken je rovněž podobný výsledkům v další publikaci (Kamal et al., 2005), kde je reorganizace cytoskeletu NIH 3T3 fibroblastů spojována do souvislosti s aktivací Rac buněčné signalizace, která vede k depolymeraci F-aktinu a růstu filopodií, resp. lamelipodií. Pozorovaná reorganizace aktinu naznačuje migraci buněk, což by mohlo znamenat snahu o hledání příznivějšího prostředí k růstu. V publikacích bohužel nejsou uvedena data, která by charakterizovala buněčnou vitalitu (např. kondenzace jader u apoptických buněk).

Je zřejmé, že zkoumané rekombinantní proteiny v různé míře podporují buněčnou adhezi, ačkoli se nevyrovnají kultivaci buněk na standardním povrchu (pozitivní kontrola). Ovšem naše výsledky dosahují kvalit výsledků publikovaných. Například K. Tsubouchi uvádí, že film připravený ze sericinu M (proteinová frakce pravděpodobně odvozená od genu *Ser-1*) zvyšuje proliferaci lidských fibroblastů až o 250% (Tsubouchi, 2005). Sericiny jsou ale v tomto případě aplikovány na Petriho misku upravenou pro tkáňové kultury a právě součinnost se standardním povrchem by mohla pozitivně ovlivnit výsledek testu. V této práci jsme se rovněž pokusili ošetřit standardní povrch rekombinantními sericiny, při následné kultivaci buněk NIL-2, nebyly ovšem pozorovány žádné výrazné změny v jejich proliferaci (data nejsou znázorněna). Proto byl k pokusům vybrán povrch striktně nevhodný pro kultivaci buněk (polystyrenová bakteriologická miska), po jehož úpravě rekombinantními sericiny byl pozorován účinek samotného proteinu.

V práci O. Akturka je analyzováno využití membrány připravené ze směsi kolagenu a komerčního sericinu při regeneraci tkání. Při studiích *in vitro* nevykazuje kolagen obohacený sericinem lepší hodnoty, než kolagen samotný, nebo standardní povrch pro

tkáňové kultury (podobně jako výsledek testů provedených v této práci). Autoři se ale dále zaměřili na sledování regenerační schopnosti testovaného materiálu *in vivo*. Z pozorování rychlosti regenerace tkáně vyplývá, že by mohl být kolagen obohacený o sericinovou složku vhodným materiálem k ošetření poraněné tkáně, nebo popálenin (Akturk et al., 2011).

Dalším reprezentativním výsledkem je využití sericinů v kombinaci s želatinou při výrobě 3-D struktur a 2-D filmů k aplikaci ve tkáňovém inženýrství (Mandal et al., 2009). Tato práce prezentuje vitalitu, morfologie a schopnost proliferace fibroblastů (AH927) na biomateriálech obohacených sericinovou složkou. Výsledky morfologie buněk zobrazené konfokální mikroskopií se do velké míry shodují s výsledky uvedenými v této práci. Autoři dále testovali imunitní odpověď buněk při přítomnosti sericinů a data potvrzují, že v porovnání s bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) sericiny nevyvolávaly silnější imunitní reakci makrofágů. Tento výsledek poukazuje na kompatibilitu sericinů s živočišnou tkání.

Z uvedených prací tedy vyplývá, že využití sericinů k výrobě různých adhezivních materiálů pro tkáňové inženýrství má svůj význam. Publikace o biomateriálech obohacených sericiny jsou příkladem vhodného využití těchto adhezivních proteinů. Z hlediska aplikace samotných rekombinantních sericinů, které byly v této práci připraveny, není jejich využití vzhledem k běžnému povrchu používanému pro tkáňové kultury signifikantní. Ale například v kombinaci s hydrogelem by mohly být tyto proteiny využity k výrobě adhezivního biomateriálu. Například v publikaci (Nuttelman et al., 2001) jsou prezentovány pozitivní účinky polyvinylalkoholového hydrogelu obohaceného fibronektinem na buněčnou adhezi, proliferaci a migraci buněk. Výsledky vykazují dobrý stav a morfologii buněk (NIH 3T3 fibroblastů) kultivovaných na testovaném povrchu a počet buněk lehce převažuje nad standardním povrchem pro tkáňové kultury. Pokud by se podařilo do hydrogelu inkorporovat třeba rekombinantní protein BmS2-A, který měl dobrý vliv na proliferaci a buněčnou morfologii, vedl by možná tento krok k vylepšení takového materiálu. Inspirací pro využití rekombinantních sericinů se také stala publikace, která se zabývá syntézou biomateriálu vyrobeného kombinací kyseliny polyglykolové (PGA, organická sloučenina využívaná k výrobě vstřebatelného šicího materiálu) a krátkého proteinového adhezivního motivu RGD (Huang al, 2010). PGA / RGD materiál podporuje adhezi a proliferaci endoteliálních buněk a je plně kompatibilní s okolní tkání. Výhledem do budoucna by mohly být pro vybrané rekombinantní sericiny podobné



aplikace v podobě proteinových membrán, hydrogelů, vláken, nebo 3-D struktur, které by našly uplatnění nejen v tkáňovém inženýrství, ale i v podobě regeneračních biomateriálů.

## 8 Závěr

### 8.1 Příprava rekombinantních proteinů

- V rámci této práce byly připraveny plazmidové vektory pro expresi rekombinantních proteinů BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2, konstrukt pro expresi proteinu BmS2-B byl připraven v rámci méj bakalářské práce (Staskova, 2009).
- Rekombinantní proteiny BmS2-A, BmS2-B, BmS2-GL1 a BmS2-GL2 byly exprimovány v bakteriálním expresním systému.
- Proteiny BmS2-A, BmS2-B a BmS2-GL1 byly purifikovány za nativních podmínek pomocí afinitní chromatografie.
- Protein BmS2-GL2 byl purifikován z inkluzních tělísek bakterií za denaturačních podmínek.
- Purifikované rekombinantní proteiny byly dialyzovány a lyofilizovány.

### 8.2 Charakterizace adhezivních vlastností izolovaných proteinů

#### 8.2.1 Měření lepidlosti proteinů

- U rekombinantního proteinu BmS2-GL2L byla měřena míra adheze (tj. lepidlost) k hydrofobnímu povrchu (polypropylenu). Lepidlost proteinu byla vyjádřena jako nosnost lepidla na plochu  $1 \text{ cm}^2$ . Průměrná nosnost rekombinantního proteinu BmS2-GL2 byla  $24,2 \text{ g} \cdot \text{cm}^2$ .

#### 8.2.2 Buněčné testy

- Všechny rekombinantní proteiny byly použity k ošetření povrchu nevhodného pro pěstování buněčných kultur, polystyrenové bakteriologické misky, proteinovým filmem.
- Vliv proteinového filmu na buněčnou adhezi byl testován pomocí buněk striktně závislých na přichycení k povrchu (C18+, D8, NIL-2 a MEF). Výsledky testu ukázaly, že všechny typy buněk jsou schopné adherovat k rekombinantním proteinům BmS2-A, BmS2-GL1, BmS2-GL2. Na proteinový film BmS2-B adherují pouze buněčné linie NIL-2 a D8.

- U vybraných buněčných linií (C18+ a NIL-2) byla kvantitativně stanovena životaschopnost buněk, proliferace a buněčná morfologie.
- Kvantitativní testy potvrdily, že buňky C18+ prosperují na proteinech BmS2-A, BmS2-GL1 a BmS2-GL2, protein BmS2-B není vhodným povrchem pro kultivaci buněk.
- Výsledky kvantitativních testů, provedených s buněčnou linií NIL-2, dosahují vysokých hodnot u všech rekombinantních proteinů. Z morfologického hlediska má nejlepší vliv na adhezi buněčné linie NIL-2 rekombinantní protein BmS2-A, dále pak BmS2-GL1. Při kultivaci buněk na proteinovém filmu BmS2-B a BmS2-GL2 se již morfologie buněk od morfologie standardní poměrně liší.

## 9 Seznam literatury

**Akturk O., Tezcaner A., Bilgili H., Deveci M. S., Gecit M. R., Keskin D. (2011)** Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 112, Issue 3, September 2011, Pages 279–288

**Anselme K. (1999)** Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21 (2000) 667}681

**Burdick J. A., Mauck R. L. (2011)** *Biomaterials For Tissue Engineering Applications – A Rewiev of the Past and Future Trends*. Springer-Verlag/Wien, ISBN 978-3-7091-0384-5

**Caron E. (2003)** Rac signaling: a radical view. *Nature Cell Biology* 5, 185 – 187.

**Carlsson J., Gabel D., Larsson E., Ponten J., Westermarck B. (1979)** Protein – coated agarose surfaces for attachment of cells. *In Vitro*, Volume 15, No. 11, 1979

**Chevallay B., Herbage D. (2000)** Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2000, 38, 211-218

**Chuenkova, M., Pereira, M.E. (1995)** Trypanosoma cruzi trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 181, 1693e1703.

**Gill G. M., Shimamura A, Bates R. C., Savage R. E., Fisher D. E. (1997)** Loss of Matrix Adhesion Triggers Rapid Transformation-Selective Apoptosis in Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, Volume 138, Number 4, August 25, 1997 901–911

**Glass J. R., Dickerson K. T., Stecker K., Polarek J. W. (1996)** Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix. *Biomaterials* 17 (1996) 1101-1108

- Hern D. L., Hubbell J. A. (1997)** Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res.* 1998 Feb;39(2):266-76.
- Huang X., Zauscher S., Klitzman B., Truskey G. A., Reichert W. M., Kenan D. J., Grinstaff M. W. (2010)** Peptide Interfacial Biomaterials Improve Endothelial Cell Adhesion and Spreading on Synthetic Polyglycolic Acid Materials. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 38, No. 6, June 2010 (\_ 2010) pp. 1965–1976
- Hwang D. S., Sim S. B., Cha H. J. (2007a)** Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials* 28 (2007) 4039–4046
- Hwang D. S., Gim Y., Yoo H. J., Cha H. J. (2007b)** Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151. *Journal of Biotechnology* 127 (2007) 727–735
- Hwang D. S., Gima Y., Kanga D. G., Kima Y. K., Cha H. J. (2007c)** Recombinant mussel adhesive protein Mgf-5 as cell adhesion biomaterial. *Journal of Biotechnology* 127 (2007) 727–735
- Johnson K. J., Sage H., Briscoe G., Erickson H. P. (1999)** The Compact Conformation of Fibronectin Is Determined by Intramolecular Ionic Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 22, Issue of May 28, pp. 15473–15479, 1999
- Kludkiewicz B., Takasu Y., Fedic R., Tamura T., Sehnal F., Zurovec M. (2009)** Structure and expression of the silk adhesive protein Ser2 in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (2009) 938e946
- Kamal A. N-E., Ahmed I., Kamal J., Schindler M., Meiners S. (2005)** Three dimensional nanofibrillar surfaces induce activation of Rac. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (2005) 428–434

**Lodish H., Berk A., Kaiser Ch. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. (2008)** Molecular cell biology, 6th edition

**Lutolf M. P., Gilbert P. M., Blau H. M. (2009)** Designing materials to direct stem-cell fate. Nature. 2009 Nov 26;462(7272):433-41.

**Mandal B. B., Priya A. S., Kundu C. S. (2009)** Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. Acta Biomaterialia 5 (2009) 3007–3020

**Moreira S. M., Andrade F. K., Domingues L., Gama M (2008)** Development of a strategy to functionalize a dextrin-based hydrogel for animal cell cultures using a starch-binding module fused to RGD sequence. BMC Biotechnol. 2008 Oct 14;8:78.

**Nagai N., Murao T., Ito Y., Okamoto N. and Sasaki M. (2009)** Enhancing Effects of Sericin on Corneal Wound Healing in Rat Debrided Corneal Epithelium Biological & Pharmaceutical Bulletin 5: 933-936

**Nayak S., Talukdar S., Kundu S. C. (2012)** Potential of 2-D crosslinked sericin membranes with improved biostability for skin tissue engineering. Cell Tissue Res (2012) 347:783–794

**Nuttelman Ch. R., Mortisen D. J., Henry S. M., Anseth K. S. (2001)** Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. Inc. J Biomed Mater Res 57: 217–223, 2001

**Ramsey W. S., Hertl W., Nowlan E. D., Binkowski J. (1984)** Surface treatments and cell attachment. In Vitro, Vol. 20, No. 10. October 1984

**Ruoslahti E. (1996)** RGD and other recognition sequences for integrins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1996. 12:697–715

**Schindler M., Ahmed I., Kamal J., Nur-E-Kamal A., Grafe T. H., Young Chung H. Y., Meiners S. (2005)** A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture. *Biomaterials*. 2005 Oct;26(28):5624-31.

**Sinohara H. (1979)** Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 87-91.

**Staskova T. (2009)** Klonování a exprese části genu Ser-2 Bource morušového. Faculty of Science, University of South Bohemia;2009

**Stein G. S., Pardee A. B. (2004)** Cell Cycle and growth control: biomolecular regulation and cancer, 2th edition

**Stewart R. J., Ransom T. C., Hlady V. (2011)** Natural Underwater Adhesives. *Journal of polymer science, part B: Polymer Physics* 2011, 49, 757–771

**Takasu Y,<sup>1</sup> Hata T, Uchino K, Zhang O. (2010)** Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 (2010) 339e344

**Teramoto H., Kameda T., Tamada Y. (2008)** Preparation of Gel Film from *Bombyx mori* Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 72 (12), 3189-3196, 2008

**Tsubouchi K., Igarashi Y., Takasu Y., Yamada H. (2005)** Sericin enhances attachment of human skin fibroblasts. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 69 (2), 403-405, 2005

**Yavin E., Yavin Z. (1974)** Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on poly lysine – coated surface. *The Journal of Cell Biology*, Volume 62, 1974. 540-546

## 10 Přílohy

### 10.1 Příloha 1 – dodatek k materiálu

#### 10.1.1 Pufry a roztoky

Všechny roztoky byly sterilizovány, nebo připravovány sterilním postupem.

##### 10.1.1.1 Fyziologické roztoky

###### Ringerův roztok

NaCl	10,93 g
KCl	1,57 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,83 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,83 g
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1 litru

###### 10 × PBS, zásobní roztok

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1 litru
pH 7,4	

###### 1 × PBS, pracovní roztok

10 × PBS	100ml
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1 litru

##### 10.1.1.2 Elektroforéza

###### 50 × TAE puf, zásobní roztok

Tris	242 g
Ledová kyselina octová	57,1
0,5 M EDTA	100ml
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1
litru	
pH 8,0	

###### 1 × TAE puf, pracovní roztok

50 × TAE	20 ml
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1 litru



**RB pufr (Running Buffer)**

Tris	3,02 g
Glicine	18,8g
20 % SDS	5ml
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1 litru

**TB pufr (Transfer Buffer)**

Tris	3,02 g
Glicine	14,41 g
100% metanol	200 ml
Doplnit H <sub>2</sub> O	do 1 litru

**10.1.1.3 Polyakrylamidový gel (10%)**

Chemikálie	Separační gel (10 ml)	Zaostřovací gel (2 ml)
destil. H <sub>2</sub> O sterilní	4 ml	1,4 ml
30 % akrylamide mix_Bis	3,3 ml	330 μl
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	250 μl
10 % SDS	100 μl	20 μl
10 % APS	150 μl	40 μl
TEMED	6 μl	2 μl

**10.1.1.4 Western blot****Roztok primární protilátky**

Primární protilátka 10 μl

Blokovací roztok 10 ml

**Roztok primární protilátky**

Sekundární protilátka 2 μl

Blokovací roztok 10 ml

**Blokovací roztok**

Skim Milk Powder 12,5 g

Doplnit 1 × PBS do 250 ml

**PBS – tween**

Tween – 20 100 μl

Doplnit 1 × PBS do 1 litru

### **10.1.1.5 Purifikace rekombinantních proteinů z cytozolu**

#### **IBB 1. pufr (Inclusion Bodies Buffer 1.)**

100 mM Tris / HCl

100mM NaCl

1 mM EDTA

0,1% Lysozym

0,1mM PMSF

pH 7,0

#### **IBB 2. pufr (Inclusion Bodies Buffer 2.)**

60 mM EDTA

2 % Triton X – 100

1,5 M NaCl

pH 7,0

#### **IBB 3. pufr (Inclusion Bodies Buffer 3.)**

100 mM Tris / HCl

100 mM NaCl

20 mM EDTA

pH 7,0

**NLB pufr (Native Lysis Buffer)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

0,1% Lysozym

0,1mM PMSF

pH 8.0

**NBB pufr (Native Binding buffer)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

pH 8.0

**NWB 1. pufr (Native Wash Buffer 1.)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

20mM imidazol

pH 8.0

**NWB 2. pufr (Native Wash Buffer 2.)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

30mM imidazol

pH 8.0

**NWB 3. pufr (Native Wash Buffer 3.)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

40mM imidazol

pH 8.0

**NWB 4. pufr (Native Wash Buffer 4.)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

50mM imidazol

pH 8.0

**NEB pufr (Native Elution Buffer)**25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 M NaCl

250mM imidazol

pH 8.0

### 10.1.2 Pracovní kity

Název	Využití	Zdroj / Kat. č.
RNeasy®	Extrakce RNA	Qiagen 74106
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Reverzní transkripce	Invitrogen 18064-022
pGEM®-T Easy Vector System	Klonování PCR produktu	Promega A1360
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology	Expresce rekombinantních proteinů	Invitrogen K160-01
MinElute®	Purifikace DNA z gelu	Qiagen 28006
QIAprep Spin Miniprep Kit	Purifikace plazmidu	Qiagen 27106
Ni-NTA Purification System	Purifikace rekombinantních proteinů	Invitrogen K950-01
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Western blot	Pierce 32132
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	MTS test	Promega G3581

### 10.1.3 Enzymy

Název	Využití	Zdroj / Kat. č.
Taq DNA Polymerase	PCR	Fermentas EP0402
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Syntéza tupých konců PCR produktu	Invitrogen 11708-013
T4 DNA Ligase	Ligační reakce	Promega M1801
Xho I	Restrikce	BioLabs R0146S
Nco I	Restrikce	BioLabs R0193S

### 10.1.4 Protilátky

Název	Vlastnosti	Zdroj / Kat. č.
Monoclonal Anti-polyHistidine antibody	Primární protilátka, ředění 1 : 1000	Sigma H1029

produced in mouse		
Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat	Sekundární protilátka, ředění 1 : 5000	Sigma A4416

### 10.1.5 Antibiotika

Název	Vlastnosti	Zdroj / Kat. č.
Ampicilin	H <sub>2</sub> O roztok, c = 100 mg · ml <sup>-1</sup>	Sigma A9518-5G
Penicillin-Streptomycin	-	Sigma P4333

### 10.1.6 Molekulární markery

Název	Vlastnosti	Zdroj / Kat. č.
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	1 kb DNA marker	Fermentas #SM0313
PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder	Proteinový marker, 250 – 5 kDa	Fermentas #SM1881
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Proteinový marker, 250 – 10 kDa	Fermentas #SM1811
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Proteinový marker, 10 – 250 kDa	Thermo #26619

### 10.1.7 Chemikálie

Název	Sumární vzorec / Vlastnosti	Zdroj / Kat. č.
Chlorid sodný	NaCl	Sigma S3014
Hydrogenuhličitan draselný	KHCO <sub>3</sub>	Sigma 60339
Chlorid vápenatý	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Serva 15587
Chlorid hořečnatý	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Sigma M8054
Chlorid draselný	KCl	Fluka 60130
Hydrogenuhličitan draselný	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Fluka 09830
Hydrogenfosforečnan sodný	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma S0876

Dihydrogenfosforečnan draselný	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Penta 60220 1
Hydrogenuhlíčan sodný	$\text{NaHCO}_3$	Penta 71628 1
Hydrogenuhlíčan draselný	$\text{KHCO}_3$	Penta 60338 1
Skim Milk Powder	-	Fluka 70166
EDTA	-	Gerbu D69251
Glicine	-	Serva 23390
Glycerin	-	Penta 49770 1
Metanol	-	Penta 65550 1
Kyselina chlorovodíková	HCl	Penta 844256 1
Ledová kyselina octová	-	Penta 45732 1
Kyselina mravenčí	-	Sigma 94318
Močovina	8 M roztok	Sigma U1250
Imidazol	3 M roztok	Amresco 0527
Triton X – 100	-	Serva 37240
Tween – 20	PBS – tween	Sigma P7949
Tris / Tris(hydroxymethyl)aminomet hane	-	Serva 37180
SDS / Dodecylsulfát sodný	-	Serva 20765

### 10.1.8 Ostatní reagentie

Název	Vlastnosti / Využití	Zdroj / Kat. č.
dNTP mix	10 mM	Biogen R0192
NEBuffer Set (1, 2, 3, 4 & BSA) FAQ	Restrikce	BioLabs B7000S
Shields and Sang M3 Insect Medium	C18+ kompletní médium (CM)	Sigma S8398

Shields and Sang M3 Insect Medium w/ L-Glutamine, w/o Lysine, Arginine, Yeast Extract (Powder)	Cl8+ minimální médium (MM)	US Biological S1013-01
Schneider's Insect Medium	D8	Sigma S9895
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose	NIL2 / MEFs	Sigma 5546
Fetal Bovine Serum	Cl8+ (CM) / NIL2 / MEFs	Sigma F4135
Bovine Calf Serum	NIL2	Sigma 12133C
Extrakt z drozofily	Cl8+ médium (CM)	-
Tryptone	LB médium / agar	Sigma T9410
Yeast Extract	LB médium / agar	Sigma 92144
Agar Agar SERVA Kobe I	LB agar	Serva 1139503
Pure Sericin	1 × PBS roztok, c = 10 mg · ml <sup>-1</sup>	Wako 163-22683
Albumin bovine Fraction V	1 × PBS roztok, c = 10 mg · ml <sup>-1</sup>	Serva 11926
B-PER	Lyzační pufr	Thermo 78248
Lysozym	100 mg · ml <sup>-1</sup>	Sigma 62971-10G-F
PMSF / Phenylmethanesulfonyl fluoride	10 mM roztok v izopropanolu / NLB pufr	Thermo 36978
IPTG / Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	0,8M / Expresse proteinů	Serva 26600.04
MALBENKA škrobový malířský klič	Škrobové lepidlo, H <sub>2</sub> O roztok, c = 75 mg · ml <sup>-1</sup>	Škrobárny Pelhřimov, a.s.
Kostní klič	Proteinové lepidlo, H <sub>2</sub> O roztok, c = 2 a 10 mg · ml <sup>-1</sup>	Kittfort DGO01
Texas Red®-X Phalloidin	Barvení aktinových vláken	Ivitrogen T7471
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Barvení buněčných jader	Invitrogen D1306
VECTASHIELD Mounting Medium	Montovací médium	Vector H-1000
Paraformaldehyde	Fixace buněk	Sigma P6148

### 10.1.9 Pracovní pomůcky

Název	Využití	Zdroj / Kat. č.
Chromatografické sloupečky	afinitní chromatografie	Pierce 89898
SERVAPOR(R) dialyzační membrána	dialýza	Serva 4414601
Miska Petriho, plastová – sterilní postup výroby, 55 mm	Testování buněčné adheze	Merci 331 999 000 060
Tissue Culture Petri Dishes, 60 mm	Testování buněčné adheze	TPP TPP93060
Eppendorfova zkumavka (Eppendorfka)	Měření lepivosti proteinů	TreffLab E49630
PCR zkumavka	Měření lepivosti proteinů	TreffLab E49640
Elektroporační kyvety	Elektroporace	Invitrogen / P450-50
Nitrocellulose Membrane, 45µm	western blot	BioRad 162- 0115

### 10.1.10 Přístrojové vybavení

Název	Využití	Zdroj
Thermocycler 3000	PCR	Biometra
Centrifuge 5804R	Centrifugace	Eppendorf
Bio Photometer / AG 22331	Spektrofotometrie	Eppendorf
Orion 3 STAR pH Benchtop	pH metr	Thermo
Mupid 21	Horizontální elektroforéza	Cosmo Bio Co. Ltd
High voltage power pack PP 2000	Vertikální elektroforéza	Biometra
Ultrasonis homogenizer 4710	Sonikace	Cole palmer
Freeze dryer ALPHA 1-2 / LD plus	Lyofilizace	Christ
SpectraMax 340PC384 Absorbance Microplate Reader	MTS test	FAST PORT



DM IL Inverted Microscope	Mikroskopie	Leica
Luminescent Image Analyzer LAS 3000	Detekce chemiluminiscence	Fujifilm
UVC 500 UV Crosslinker	Indukce apoptózy	Amersham Life Science
Camedia C-3030 ZOOM	Fotografování buněk	Olympus
Minipuls 3 Peristaltic Pump	Měření lepivosti proteinů	Gilson
Fluoview FV 1000	Konfokální mikroskopie	Olympus
Q-Tof Premier	Hmotnostní spektrometr	Waters
Nano Acquity UPLC	Kapalinová chromatografie	Waters

### 10.1.11 Programové vybavení

Název	Využití	Zdroj
Microsoft Windows	Operační systém	Microsoft
BioEdit	Práce s DNA a proteinovou sekvencí	Tom Hall
GENTle	Plánování ligační reakce	GPL
ImageQuant™ TL	Kvantifikace proteinů	GE Healthcare
Statistica	Statistické vyhodnocení dat	StatSoft
PLGS 2,3	Sekvenační analýza proteinů	Waters



## 10.2.2 Sekvence části genu Sericin 2 kódujícího rekombinantní protein BmS2-A

Sekvence rekombinantního proteinu BmS2-A obsahuje 299 aminokyselin a kóduje protein o velikosti 33,5 kDa. Sekvence BmS2-A je vyznačena v sekvenci genu Ser-2 žlutě.

```

EREKSESNNK SREFENKEAE SSTYRDKNRS VNSGSERKSS GKDEEYSEQN SSNKSFNDDGD
ASADYQTKSK KVEKNSARDK KEKEKTDTRN SDGTYKTSER EKEQSSRVNQ SKGSNSRDSS
ESDKSGRKVN KETETYSDDK AQTSESEERTQ SKEKNTAPK NKGKGTSTE TDGVTKNASK
QKEKVPKDGK KSSTNDSEGK QKNKDQSKGQ KNNQDGDSS TNENSKKTTDD NVAKKEEPNN
QKREQKGKTR CGSRKTESSK AKEDRSKKST TDKDQRDDKK DSSSKNIDKP KDSSSDKD

E1+E2 MKIPYVLLFLV_GVAVVNALP E1/12 residues; and E2/9
E3 NPLFGGLVKSLSKKKQIFED
  KFENLKENVGEKFKENLKENVGEKVENLKENVGEKLENIKEKAGEKFKENLKDNDVGEKFKENLKDNDVGDKLEAAEKAGE
  IKKKLVDDVGEDLDKDELTEDEKIKIKISISKDEGLTLEKEGYKSDYDRNEYEERRSEHQ E3/153
E4 EDNDSGSSYKSGSEYEKYGEKYEERRTHDKFSIGKNGISAERTKSKRGERKEVEGEYEKDYERK E4/66
E5 ENNGSSEYSERERESLEKSKERYGEQSSKSFSLGKSLKQDNSKSYSDKEESKLEKKEY E5/62
E6 KKTINNERQLDEEDENERTTVVGRDEQRQDDQSRDDQSDDEETGSDSDKNRDKTDDKYSETGKTGKRDG
  TNKSSETSKSGVTVEREKSESNNKSREFENKEAESSTYR (E6/116)
E7 DKNRSVNSGSERKSSGKDEEYSEQNSSNKSFNDDGDASADYQTKSKKVEKNSARDKKEKTD T E7/63
E8 RNSDGTYSEREREKQSSRVNQSKGSNSRDSSSESDKSGRKVNKETETYSDDKAQTSESEERTQSK E8/64
E9a EKKNTAPKNKGKGTSTETDGVTKNASKQKEKVPKDGSKSSTNDSEGKQKNKDQSKGQKNNQDQ
  DSSTNENSKKTTDDNVAKKEEPNNQKREQGKTRCGSRKTESSKAKEDRSKKSTTDKQDQDDKSSSKNIDKPKD
  GSSSDKDSEKAKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSSPSHKDEKAKHNDRSPSKDTEKAKPND
  RSPSHKDEKVKPNDRSPSHKDEKVKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSHKDEKVKPND
  RSPSYKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSHKDEKVKPNDRSPSHKDEKAKPND
  RSPSDRDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPND
  RSPSKDTEKAKPNDRSPSHKDEKVKPNDRSPSYKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKAKPND
  RSPSHKDEKVKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSPSDRDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKVKPND
  RSPSHKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSHKDEKVKPNDRSPSYKDEKAKPND
  RSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSHKDEKVKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSPSDRDEKAKPND
  RSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKVKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSPSKDTEKAKPNDRSPSKDTEKAKPND
  IDNKRPKDGSSSDKNVEQERENYKSESSRNEFENQKSAHSRYE (E9a/858)

10a DNGGLKEKSSQSKNYGRDEKYSEEKERSSTGKFGSNDRARSTKAE EHVRSQEETHSEQR E10a/62
9b EKTRSDGVTKYNDGDEHFDSDDETEKTKPNDRSPSHKDEKAKPNDRSSSDKDTEKPFDKN
  IANKRPKDGSSSDKNVEQERENYKSESSRNEFENQKSAHSRYE E9b/103
E10b DNGGLKEKSSQSKNYGRDEKYSEEKERSSTGKSGSNDRARSTKAE EHVRSQEETHSEQR E10b/62
E11 GRTRSDGATTSDNDKQYDSDDKNSSTKHKKTVMRSEQSDSSQENSTSESKKFAKT
  GSNKYEAESSHKQEQARKQSNRVVEKSTDGDNEESYRSESSSSSSSSSSSSSSSSSTYTGSDDSSSE E11/232

```





## 10.2.5 Syntetická sekvence kódující rekombinantní protein BmS2-GL2

Sekvence rekombinantního proteinu BmS2-GL2 obsahuje 246 aminokyselin a kóduje protein o velikosti 30,2 kDa.

```
MEFDYKANY RSPSHRDYK ANYRSPSHRD YEKANYRSSH RGSEFDYKA NYRSPSHRDY  
EKANYRSPSH RDYEANYRSP SHRDYKANY RSPSHRDYK ANYRSPSHRD YEANYRSPSH  
RDYKANYRS PSHRDYKAN YRSPSHRDYE ANYRSPSHRD YEKANYRSPS HRDYKANYR  
SPSHRDYEAN YRSPSHRDYE KANYRSPSHR DYKANYRSP SHRDYEANYR SPSHRGSRGS  
HHHHHH
```

### 10.3 Příloha 3 – seznam zkratk

**BSA** / hovězí sérový albumín

**CM** / kompletní médium

**CS** / komerční sericin

**ECM** / extracellular matrix/ extracelulární matrix

**EtBr** / etidium bromid

**FBS** / fetální bovinní sérum

**His-Tag** / hexahistidinová kotva

**H<sub>2</sub>O** / deionizovaná sterilizovaná voda

**IPTG** / izopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid

**LPS** / lipopolysacharid

**Lumio-Tag** / luminiscenční marker

**MM** / minimální médium

**MSG** / střední úsek snovacích žláz

**PAA** / polyakrylamid

**PCR** / polymerázová řetězcová reakce

**PGA** / kyselina polyglykolová

**RGD** / sekvence aminokyselin agrinin – glycin – k. aspaagová

**RT** / pokojová teplota

**SDS – PAGE** / vertikální elektroforéza na PAA gelu

**Ser-2** / gen Sericin 2 bource morušového (*Bombyx mori*)