

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Příprava rekombinantních proteinů pro použití
v tkáňových kulturách**

Diplomová práce

Bc. Klára Mičulková

Vedoucí práce: Mgr. Robert Fedič Ph.D.
Školitel: Prof. RNDr. František Sehnal, CSc.

České Budějovice 2012

Diplomová práce

Mičulková K. (2012): Příprava rekombinantních proteinů pro použití v tkáňových kulturách. [Preparation of recombinant proteins for use in tissue cultures. Mgr. Thesis, in Czech]-61p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: cDNA derived from exons 2 and 3 of the *Ser2* (Sericin 2) gene of *Bombyx mori* and encoding 121 amino acids was expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein with hexahistidine to allow purification by affinity chromatography on Ni-resin column. Several expression systems were used and the codon usage was optimized but the yield of recombinant protein remained low. Commercial sericin extract was therefore used in assay with human embryonic stem cells (hESC) – the extract in some cases reduced defects (amplification of centrosomes) in hESC proliferating under in vitro conditions.

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

V Českých Budějovicích 20.4.2012

.....

Klára Mičulková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Františkovi Sehnalovi, CSc. za umožnění spolupráce na tomto projektu, dále Mgr. Robertu Fedičovi, Ph.D. za vedení mé práce a odborné rady a všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí, zejména pak Tereze Staškové a Tomáši Krůčkovi. Velmi děkuji Doc. MVDr. Aleši Hamplovi, CSc. za vřelou spolupráci a také všem členům jeho laboratoře za pomoc při provádění experimentů. V neposlední řadě děkuji Zdeňkovi Vernerovi za cenné rady a také mé rodině a Ondřeji Jurečkovi za podporu při mém studiu.

Obsah

1.	ABSTRAKT	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1.	HISTORIE HEDVÁBÍ.....	2
2.2.	BOUREC MORUŠOVÝ	3
2.3.	SNOVACÍ ŽLÁZY	4
2.4.	HEDVÁBÍ	5
2.4.1.	Složení a produkce hedvábí.....	5
2.4.2.	Složky hedvábí.....	6
2.4.2.1.	Proteiny jádra vlákna	6
2.4.2.2.	Minoritní komponenty hedvábí	8
2.4.2.3.	Sericiny.....	9
2.5.	VYUŽITÍ SERICINŮ	11
2.5.1.	Kosmetické přípravky	12
2.5.2.	Antioxidanty	12
2.5.3.	Léčba zranění.....	12
2.5.4.	2-D a 3-D struktury	12
2.5.5.	Membrány	13
2.5.6.	Protimrznoucí efekt.....	13
2.5.7.	Medicínské využití	13
2.6.	KMENOVÉ BUŇKY.....	14
2.6.1.	Embryonální kmenové buňky.....	15
2.6.2.	Lidské embryonální kmenové buňky.....	16
2.6.3.	Kultivace hESC	17
2.6.3.1.	Podkladová vrstva, matrice a kultivační médium	17
2.6.4.	Limitující faktory použití hESC v buněčné terapii	18
2.7.	SOUČASNÝ VÝZKUM A CÍLE PRÁCE	19
3.	PRAKTICKÁ ČÁST	20
3.1.	MATERIÁL A METODIKA	20
3.1.1.	Expresce proteinu sericin 2	20
3.1.1.1.	Transformace plasmidu do expresních buněk BL21.....	20
3.1.1.2.	Pilotní experiment	20
3.1.1.3.	SDS-PAGE	21
3.1.1.4.	Western blot	21
3.1.2.	Izolace RNA z peletu bakteriální kultury.....	22
3.1.2.1.	SuperScript III First Strand Syntesis Systém pro RT-PCR (Invitrogen)	22
3.1.2.2.	Elektroforéza vzorků z PCR	23

3.1.3.	Úprava podmínek Pilotního experimentu	23
3.1.4.	Expres Ser2 v Rosetta blue	23
3.1.5.	Optimalizace kodonové sekvence <i>Ser2</i>	23
3.1.5.1.	Příprava plasmidu s optimalizovanou „codon-usage“ <i>Ser2</i>	24
3.1.5.2.	Ligační reakce.....	24
3.1.5.3.	Transformace do buněk TOP10.....	25
3.1.5.4.	PCR a sekvenace pro ověření správné orientace inzertu v plasmidu v bakt. koloniích	25
3.1.5.5.	Analýza rekombinantních proteinů s optimal. „codon-usage“ v BL21 a Rosetta blue	26
3.1.6.	Příprava elektrokompetentních buněk	26
3.2.	TESTOVÁNÍ ÚČINKU SERICINŮ NA HESC	27
3.2.1.	Biologický materiál	27
3.2.2.	Příprava sericinů a kultivace hESC.....	27
3.2.3.	Značení centrozomu	28
4.	VÝSLEDKY	29
4.1.	PŘÍPRAVA PROTEINŮ	29
4.1.1.	Analýza rekombinantních proteinů.....	29
4.1.2.	Izolace RNA a syntéza cDNA z peletu bakteriální kultury.....	29
4.1.3.	Úprava podmínek pro zvýšení exprese	30
4.1.4.	Expres v buňkách Rosetta blue.....	31
4.1.5.	Příprava expresního plasmidu s optimalizovanou „codon-usage“ <i>Ser2</i>	32
4.1.6.	Analýza rekombinantních proteinů s optimal. u „codon-usage“ v BL21 a R. blue	33
4.1.7.	Přečištění proteinu přes afinitní chromatografii	34
4.2.	KMENOVÉ BUŇKY	37
5.	DISKUZE	40
6.	ZÁVĚR	44
7.	SEZNAM LITERATURY	45
8.	PŘÍLOHY	55

1. Abstrakt

Sericiny (Ser) jsou složkou hedvábí používanou v kosmetice a perspektivní pro využití v lékařství i průmyslu. V této studii byl na základě cDNA odvozené z malé části genu *Ser2* bource morušového připraven v expresním vektoru *Escherichia coli* rekombinantní protein s histidinovou kotvou, která umožnila jeho čištění afinitní chromatografií na niklové koloně. Bylo použito několik expresních systémů (plasmid pET-160 a pET-15b v *E. coli* kmenů BL21 a Rosetta blue) a bylo optimalizováno použití kodonů, výtěžky rekombinantního proteinu však byly ve všech případech malé. Výsledkem této části práce je tedy ověřený postup exprese rekombinantního derivátu *Ser2*, avšak v malých množstvích. Vliv sericinu na lidské kmenové embryonální buňky (hESC) byl zkoumán s použitím komerčního preparátu, který je špatně definovanou směsí zčásti hydrolyzovaných sericinů extrahovaných z kokonů. Při proliferaci hESC in vitro dochází k defektům, jakým je např. zmnožení centrozomů. Ve třech testech s komerčním sericinem nebyl prokázán žádný vliv, avšak u dvou šarží hESC bylo statisticky prokázáno snížení defektu. Toto pozorování je východiskem pro další studium.

2. Literární přehled

2.1. Historie hedvábí

Hedvábí je známo již tisíce let a je pro své jedinečné vlastnosti neustále velice ceněno. Technologie zpracování hedvábí byla objevena v Číně již ve 3. tisíciletí před naším letopočtem. K objevu této technologie se váže řada legend, z nichž jedna vypráví o čínské princezně, které spadl zámotek bource morušového do horkého čaje. Když jej vytahovala, začalo se z něj odmotávat jemné, ale pevné vlákno. Spojením několika vláken vznikla hedvábná nit. Později se v Číně naučili tato vlákna spřádat do tkanin. Housenky bource se začaly cíleně chovat, aby produkovaly hedvábné vlákna. Princip výroby hedvábí byl po staletí čínským tajemstvím a prozrazení bylo trestáno smrtí. I přes přísný zákaz se však technologie výroby hedvábí rozšířila do Koreje, Japonska a později také do Evropy (Hyde 1984).

Hedvábná cesta spojující Evropu s Asií byla ve své době naprosto unikátním jevem a stala se nejdůležitější transkontinentální cestou v dějinách lidstva. Byla pojmenována podle hlavního obchodního artiklu, který se po ní převážel, a tím bylo právě hedvábí. Putování po této cestě započalo již v druhém století před naším letopočtem a trvalo až do 14. století našeho letopočtu (Synek 2009). Hedvábná cesta se vinula z Chang'an na východě Číny a končila na západním břehu Středozemního moře (Hyde 1984). Vedle svého ekonomického přínosu se také stala významným kulturním a informačním mostem mezi západem a východem (Synek 2009). Od 8. století se hedvábnictví rozšířilo ve Španělsku, ve 13. století také ve Francii a Itálii. V Čechách se objevil obchod s hedvábím ve 14. století, ale bourec se zde začal chovat až v první polovině 17. století (Čechmánek, Hrabák 2006).

S pokrokem vědy se v minulém století stal bourec morušový vyhledávaným modelovým organismem. Zkoumání bource značně přispělo k dnešní znalosti hmyzí fyziologie a genetiky. Na poli chemie vedlo krystalografické měření hedvábí k porozumění peptidického složení a uspořádání v β -listu (Pauling, Corey 1953). Fibroinový gen byl mezi prvními eukaryotickými geny exprimovanými v bakteriálním systému a analýza těchto dějů částečně odhalila mechanismy regulace genů (Hui, Suzuki 1995). Bourec morušový je také dobrým modelovým organismem pro vývoj nových prostředků proti škodlivým motýlům (The international Silkworm Genome Consortium 2008).

2.2. Bourec morušový

Bourec morušový je nyní plně domestikovaný živočich, který se od původní divoké formy velmi liší. Tento rozdíl se projevuje především zvýšenou žravostí a minimální pohyblivostí. Dnešní hybridní druh *Bombyx mori* vznikl křížením původního divokého druhu *B. mori*, který se dnes již volně nevyskytuje, a *B. mandarina* (Sehnal 2007).

Celý vývoj od vylíhnutí vajíčka do zapředení kokonu trvá za letních teplot 28-32 dní u monovoltinních ras a 24-25 dní u bovoltinních (Obr. 1.). U monovoltinních ras je líhnutí přerušeno diapauzou, která vyžaduje dvouměsíční ochlazení na teplotu 5°C. Po vylíhnutí se housenky krmí listy moruše bílé (*Morus alba*) nebo moruše černé (*Morus nigra*). V dnešní době se často využívá umělá potrava tvořená sušenými listy moruše a agarem, doplněná o minerály a vitamíny.

Během růstu se housenky čtyřikrát svlékají. První svlékání nastává čtvrtý den po vylíhnutí. Druhý instar trvá 2 dny, třetí 3-4 dny, čtvrtý instar 4-5 dní a během něj několika násobně (až 380x) vzroste hmotnost housenky. Poslední instar trvá 6-8 dní, v tuto chvíli dorůstají larvy do velikosti až 6 cm a jejich hmotnost je až 10000krát větší oproti vylíhnutým larvám. Larvy v pátém instaru přestávají žrát, vyprazdňují střevo a hledají místo k zakuklení. Nejprve si vytvoří uchycení kokonu a pak se celé zapředou do hedvábného kokonu. Zapřádání je dokončeno během 2-3dnů a za další dva dny se larva uvnitř kokonu přemění na kuklu (Kislingová 2006; Sehnal 1985).

Ve stádiu kukly dochází k intenzivní morfogenezi, při níž se histolýzou zbavuje nepotřebných orgánů (např. snovacích žláz) a dotváří se nové orgány z imaginálních terčků (např. křídla). Pomocí sekretu ze zachovalé a přeměněné malé části snovacích žláz, si motýl natráví stěnu kokonu a vzniklým otvorem vyleze ven (Chapman 1969; Sehnal 1985).



Obr. 1: Vývoj Bource morušového (*Bombyx mori*)

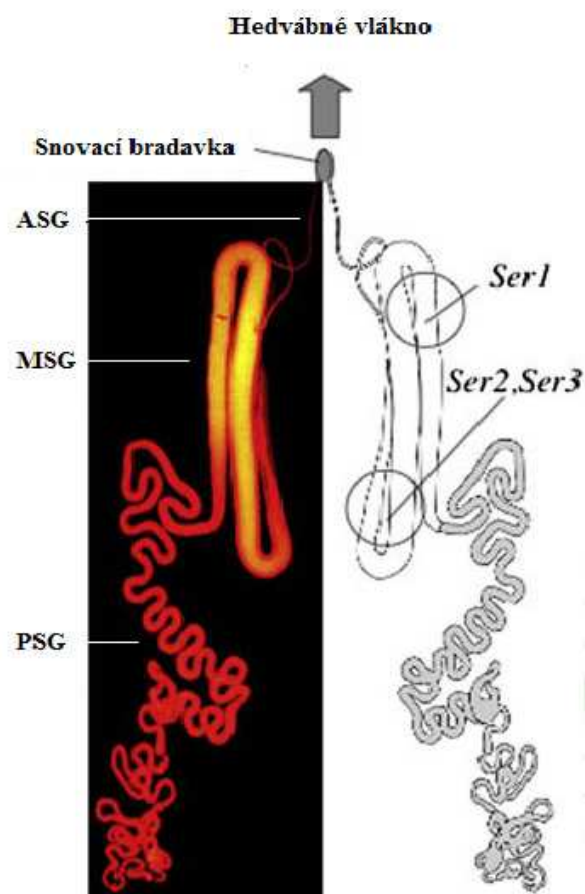
Zleva: larva, kukla, dospělec, samička s nakladenými vajíčky na kokonu

Motýli se líhnou 10. až 12. den po zakuklení. Dospělí motýli nejsou schopni letu, nepřijímají potravu, během 24 hodin se spáří a samičky vykladou během dalších 48 hodin 300 až 450 vajíček. Vajíčka mají oválný, ze stran zploštělý tvar, jsou o málo větší než zrnka máku, po vykladení jsou běložlutá a během tří dnů ztmavnou (Krejčík 1936).

2.3. Snovací žlázy

Pod pojmem snovací žlázy rozumíme orgán produkující hedvábné vlákno. Obvykle se jedná o párový orgán, který se během fylogeneze vyvinul u několika řádů hmyzu a klepítkačů (*Chelicerata*). Snovací žlázy jsou vždy ektodermálního původu. Mohou vznikat buď primárně jako vchlípenina povrchu těla (typické pro klepítkačce), nebo sekundárně odvozením z jiných typů žláz, jak je tomu většinou u hmyzu. U bource morušového jsou tyto žlázy, tak jako u všech motýlů, odvozeny z labiálních slinných žláz. Jsou tvořeny jednovrstevným tubulárním epitelem, který je podélně rozdělen na tři funkčně rozdílné části: zadní (PSG-posterior silk gland), střední (MSG-medium silk gland) a přední (ASG-anterior silk gland). V každé z těchto částí se tvoří jiný typ proteinů a dohromady dávají vznik hedvábnému vláknu (Žurovec et al. 1998; Nirmala et al. 2001a,b).

Snovací žlázy bource morušového získávají svůj konečný tvar 60 hodin po invaginaci během embryonálního vývoje. V tuto chvíli se přední část skládá z 250, střední z 300 a zadní z 500 buněk, které se již dále nedělí. Za 132 hodin po invaginaci začínají být buňky polyploidní (Akai 1984). Během postembryonálního vývoje buňky výrazně rostou (Ono 1951). Sekreční polyploidní buňky obsahují jádra s četnými výběžky, v nichž se nacházejí početná jádérka. Intenzivní syntéza hedvábí je



Obr. 2: Struktura snovacích žláz *Bombyx mori*

(zdroj: The International Silkworm Genome Consortium 2008)

umožněna zmnožením potřebných buněčných struktur, zejména hrubého endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu a sekrečních váčků, z nichž jsou proteiny uvolňovány do lumenu snovací žlázy (Prudhomme et al. 1985; Akai 1965). Snovací žlázy dosahují největší velikosti v posledním larválním instaru.

Vývoj a funkce snovacích žláz jsou pod hormonální kontrolou juvenilního hormonu, ekdysteroidů a neurohormonů (Sehnal, Akai 1990; Kodrík 2004). Komerčně je možné zvýšit produkci hedvábí až o 10% pomocí aplikace agonistů juvenilního hormonu (juvenoidů) larvám vhodného stáří. Hormon způsobí prodloužení posledního larválního instaru, snovací žlázy jsou pak déle udržovány v tzv. akumulární fázi, kdy larvy hromadí vyšší množství živin a po odeznění účinku hormonu produkují větší množství hedvábí (Kodrík 2004).

Snovací žlázy bource morušového jsou také velmi zajímavým orgánem pro studium základních mechanismů genové regulace a orgánové diferenciaci (Suzuki et al. 1990a). Během vývoje larvy se mění produkce hedvábí a s tím souvisí i změna genové exprese. V posledním instaru dochází k výrazné obměně složení tRNA. Vyskytují se zde hlavně specifické tRNA, jejichž kodony se v sekrečních proteinech vyskytují nejvíce např. glycinová, alanylová a serinová tRNA (Goldsmith, Kafatos 1984).

2.4. Hedvábí

2.4.1. Složení a produkce hedvábí

Hedvábí bource morušového je slouženo primárně ze dvou typů proteinů:

- Fibroin- jádro vlákna je složené z bílkovin: těžký H fibroin, lehký L fibroin a fibrohexamerin. Dominující těžký fibroin vytváří organizované struktury β -listu a semikrystalinní oblasti zodpovědné za pevnost a elasticitu hedvábí
- Sericiny- směs nejméně sedmi lepivých proteinů obklopujících vlákno fibroinu

Hlavní složkou surového hedvábí je fibroin, zatímco sericiny tvoří 20 až 30 % a menší komponenty jsou zastoupeny 1 % soli a 2 % vosku. Směs sericinů obsahuje až 30 % serinu a dělá hedvábí třpytivým a poloprůhledným. Ze surového hedvábí jsou sericiny odstraněny procesem deguminace. Základem deguminace je povaření v mírně alkalické vodě při teplotě 95 °C. Tímto se sericiny z části degradují a rozpustí se ve vodě (Terada et al. 2002).

Fibrohexamerin neboli P25 je glykoprotein podmiňující spojení H a L fibroinu (Chen 2010). Všechny tyto složky jsou syntetizovány v zadní části SŽ, kde jejich koncentrace

dosahuje 12-15% a má konzistenci podobnou vaječnému bílku. Poté jsou proteiny transportovány do středního oddílu, kde jsou skladovány jako viskózní gel několik dní až týdnů. Sericin je syntetizován ve středním oddíle SŽ a ukládá se na povrchu sloupce fibroinů. Proteiny se posunují do předního oddílu SŽ, kde se zahušťují a polymerizují v nerozpustné komponenty (Magoshi 1985). Během tohoto procesu fibroin podstupuje sérii změn fází: z gelu na koloidní roztok sol, z něj na krystalickou tekutinu a ta se mění na nerozpustný filament. Vše je řízeno dosud nedostatečně známými změnami v předním oddílu SŽ, jako je změna pH, dehydratace, množství kationtů a mechanické vlivy (Tanaka 2001; Dicko 2004; Ochi 2002; Foo 2006). Tyto změny vedou k vytváření finálního vlákna při optimálním vynaložení energie pro transport, skladování a polymerizaci fibroinu (Iizuka 1985). Fibroin, díky amfifilickému motivu s převládajícími hydrofóbními strukturami s hydrofilními koncovými skupinami, se může vyskytovat ve formě micel a krystalinní tekutiny a později v důsledku změny orientace molekul a dehydrataci polymerovat v pevnou fázi (Zhou et al. 2000; Jin, Kaplan 2003; Iizuka 1964; Kerkam et al. 1991; Knight, Vollrath 2002; Knight, Vollrath 2001). Při polymerizaci jsou molekuly fibroinu, za zvýšeného tahu v postupně se zužujícím vývodu žlázy, uspořádány do vlákna (Iizuka 1985). Sericiny uložené ve střední části SŽ se na povrchu sloupce fibroinu polymerizují se zpožděním a spojují fibroinové filamenty z levé a pravé SŽ v jedno vlákno (Kodrík 2004; Sehnal 2008). Sericiny se tak na tvorbě vlákna významně podílejí a jsou nezbytné pro slepování vláken při tvorbě kokonu (Terry 2004; Ochi 2002). Na parametry vlákna (tloušťka, mechanické vlastnosti) má vliv rychlost předení, kterou určují pohyby hlavy předoucí housenky (Matsumoto 2008).

2.4.2. Složky hedvábí

2.4.2.1. Proteiny jádra vlákna

Fibroiny se tvoří pouze v zadním oddíle SŽ a jsou hlavní složkou osových filamentů hedvábného vlákna (Gamo et al. 1977). Jsou to hydrofóbní strukturální proteiny nazvané těžký (H) a lehký (L) řetězec o molekulové hmotnosti okolo 390 kDa a 25 kDa (Gamo et al. 1977; Tanaka 1999; Zhou 2000). L a H řetězce jsou spolu spojeny pomocí disulfidických můstků. S rozvojem biologických molekulárních technik byla později rozeznána i další struktura obsažena ve vláknu tzv. P25 neboli fibrohexamerin. L a H fibroin a P25 jsou sestaveny v endoplazmatickém retikulu do základní sekreční jednotky v poměru 6:6:1 (Inoue et al. 2000).

Těžký řetězec fibroinu (H-fibroin)

H-fibroin je velký protein (391 kDa), jehož gen je lokalizován na 25. chromozomu. Gen byl poprvé částečně charakterizován v roce 1972 (Suzuki, Brown 1972) a obsahuje dva exony (Kimura et al. 1985). První exon je malý (67 bp), za ním následuje intron (971 bp) a druhý velký exon (15750 bp). Sekvence z 5' konce je vysoce konzervovaná a nezbytná pro expresi H-fibroinu. Většina exprimované oblasti se skládá z repetice s vysokým obsahem GC (až 63%). Odvozená aminokyselinová sekvence je 5263 dlouhá a isoelektrický bod je 4,22 (Zhou et al. 2000). Primární struktura těžkého fibroinu je charakterizována vysoce repetitivními hydrofobními motivy GAGAGS, GAGAGY a GAGAGVGY, která jsou zodpovědné za tvorbu antiparalelních β -listů v polymerovaném H fibroinu (Case 1994). Uspořádání do β -listu spolu s krystalickou strukturou přispívá ke stabilitě a některým unikátním mechanickým vlastnostem vlákna (Cunniff 1994).

Lehký řetězec fibroinu (L-fibroin)

Struktura L-fibroinu byla objasněna u bource morušového (Kikuchi et al. 1992), poprvé v roce 1985. Gen je umístěn na 14. chromozomu a obsahuje 13472 nt (Kimura et al. 1985). Kódující oblast obsahuje 7 exonů a je přerušována šesti introny, z nichž první intron je největší a zabírá se svojí velikostí 8145 bp okolo 60% celkové délky genu (Kikuchi et al. 1992). Oproti tomu první exon obsahuje 41 bp zaváděcí nekódující sekvence a 36 bp sekvence kódující signální peptid. Sekretovaný L-fibroin obsahuje 244 aminokyselin s acetylovaným serinem na N-konci a jeho molekulová hmotnost je 25,8 kDa (Yamaguchi et al. 1989).

P25 neboli fibrohexamerin

Tento glykoprotein tvoří díky disulfidickým můstkům kompaktní strukturu, ale s fibroiny je spojen nekovalentními silami (Tanaka et al. 1999a). Gen P25 je v genomu *B.mori* přítomen v jedné kopii, je dlouhý 3500 nt a zahrnuje 5 exonů 1173 nt (Couple et al. 1985; Chevillard et al. 1986a,b). Fibrohexamerin obsahuje tři N-glykosylovaná místa u bource a dvě místa u jiných zkoumaných druhů motýlů (Tanaka, Mizuno 2001). V důsledku odlišné glykosylace se vyskytuje ve dvou velikostech, které u bource morušového činí 27 kDa a 30 kDa (Tanaka 1993).

2.4.2.2. Minoritní komponenty hedvábí

Byly popsány nízkomolekulární proteiny s neznámou funkcí, některé údajně nezbytné pro strukturu hedvábí (Sasaki, Noda 1973; Shimura et al. 1976). Již delší dobu je známo, že kokony Lepidopter nejsou napadány bakteriemi, houbami, roztoči ani hmyzem (Akai 1997). Lze proto předpokládat, že mají antimikrobiální a jiné obranné vlastnosti, za které mohou být zodpovědné právě minoritní komponenty. Pomocí RT-PCR a EST databáze byly klasifikovány dvě třídy nestrukturálních proteinů: seroiny a inhibitory proteáz (Kodrík 1992; Mita et al. 1999).

Seroiny

Poprvé byly tyto nízkomolekulární složky charakterizovány u *G. mellonella* a pojmenovány seroiny (Nirmala et al. 2001a). Později byl zjištěn homolog také u *B. mori* (Nirmala et al. 2001b). U bource morušového byly objeveny dva geny. Seroin-1 obsahuje 108 aminokyselinových zbytků, postrádá prolin a cystein a celková cDNA má 769 nt. Kompletní cDNA genu seroinu-2 obsahuje 1413 nt kódující 112 aminokyselinových zbytků. Opět zde chybí prolin a cystein (Nirmala et al. 2001a). Seroinové geny *B. mori* pravděpodobně vznikly duplikací genu následovanou několika delecemi a bodovými mutacemi (Nirmala et al. 2001a). Oba seroiny se exprimují současně ve středním a z malé části v zadním oddílu SŽ během posledního larválního instaru (Fedič 2002).

Proteázové inhibitory

Na rozdíl od seroinů byly dva inhibitory proteáz popsány dříve u *B. mori* a později jejich homology u *G. mellonella*. První z nich byl nazván BmSPI1 a byl zařazen mezi inhibitory Kunitzova typu (Kurioka et al. 1999). Protein o velikosti zhruba 6 kDa obsahuje 76 aminokyselinových zbytků je produktem mRNA 394 nt. Druhý peptid byl pojmenován BmSPI2 a patří k inhibitorům Kazalova typu (Kurioka, Hirano 1995, Kludkiewicz et al. 2005). Jeho cDNA je tvořena 411 nt a kóduje protein okolo 4,7 kDa s 66 aminokyselinovými zbytky. SPI1 i 2 inhibují proteázy bakterií a hub (subtilisin a proteinázu K), čímž vytvářejí ochranu kokonu proti napadení mikroby (Nirmala et al. 2001a). Jsou exprimovány ve střední, SPI1 také v zadní, části SŽ v pátém instaru (Fedič 2002).

2.4.2.3. Sericiny

Sericiny jsou u bource zastoupeny 6 až 15 proteiny lišícími se stupněm glykosylace (Gamo 1977). Vnitřní vrstva sericinů spojuje dva filamentsy fibroinu z pravé a levé snovací žlázy k sobě během průchodu snovací bradavkou, vnější vrstva slepuje vypředená vlákna v kokonu dohromady a slouží také k uchycení vlákna k podkladu při stavbě kokonu. Je nezbytné aby sericiny tuhly postupně, avšak mechanismus tohoto tuhnutí není ještě objasněn (Kodrík 2004; Jin, Kaplan 2003; Fedič 2002). Zastoupení sericinů během předení kokonu se mění. Pomocí proteinové analýzy byla odhalena přítomnost tří až pěti hlavních složek (Gamo 1977; Couble 1983), podle jejich přítomnosti lze kokon rozdělit na vnitřní, střední a vnější vrstvu. Vnější vrstva, která se tvoří nejdříve, obsahuje až 30% sericinů z celkového množství proteinů v kokonu (Suzuki 1977). Střední vrstva má již nižší obsah sericinů a ve vnitřní vrstvě, která se spřádá jako poslední, je jich minimum.

Sericiny se dají rozdělit podle rozpustnosti v horké vodě na čtyři typy (sericin I-IV), přičemž nejlépe je skrze svoji amorfní strukturu rozpustná vnější vrstva I. Vrstva IV má nejvíce krystalinní strukturu a je proto nejhůře rozpustná, díky tomu drží dvě vlákna fibroinů dohromady i po deguminaci (Komatsu 1975; Mondal et al. 2007).

Všechny proteiny sericinového typu jsou produkovány se střední části snovacích žláz (MSG). Transkripty sericinů byly u bourců zjištěny už při svlékání, ale maxima dosahují až v období posledního instaru těsně před předením (Ishikawa, Suzuki 1985). Struktura genů *Ser1* a *Ser2* je velmi komplikovaná (Couble 1987; Garel 1997), zatímco gen *Ser3* má jediný exon (Takasu et al. 2002). Molekulová hmotnost sericinů se pohybuje v rozmezí 65 až 400 kDa (Sinohara 1979; Gamo 1982). Převládající sericiny zahrnují protein o velikosti 150 kDa ze zadní (sericin P), 400 kDa ze střední (sericin M) a 250 kDa z přední části MSG (sericin A) (Takasu 2002). Mají vysoký obsah serinu 16-42% a hydrofilních aminokyselin, což způsobuje jejich dobrou rozpustnost v horké, mírně alkalické vodě (Komatsu 1975; Gamo 1977).

Sericin 1

Gen *Ser1* je lokalizován na *src* lokusu (Doira 1983). Poprvé byl klonován a částečně osekvenován 1982 (Okamoto et al. 1982; Michaille et al. 1986; Garel et al. 1997). Obsahuje 9 exonů a celková velikost je 23 kb. Část genu vykazuje podobnost s genem H-fibroinu (Okamoto et al. 1982). Z primárního transkriptu *Ser1* vznikají alternativních sestřihem čtyři různé mRNA o velikostech 2,8 kb/2,9 kb, 4,0 kb, 9,0 kb a 10,5 kb (Michaille et al. 1986),

z nichž jsou odvozeny proteiny o mol. hmotnosti 330, 284, 123 a 76 kDa (Garel et al. 1997). Exony 1,2,7,8 a 9 jsou společné pro všechny mRNA, zatímco 3,4,5 a 6 jsou alternativní (Garel et al. 1997). Největší je exon 6 dlouhý 6,6 kb obsahující 114 bp s charakteristicky 60x se opakujícím motivem, jehož peptidická sekvence je tvořena 38 aminokyselinami: SRTSGGTSTYGYSSSHRGGSVSSTGSSSNTDSSTKNAG. Ostatní exony neobsahují repetitivní sekvence (Fedič 2002). Gen *Ser1* se exprimuje ve střední (sericin M) a zadní (sericin P) části MSG během pátého instaru (Garel et al. 1997, Takasu et al. 2005). Protein obsahuje menší množství serinu oproti sericinu 2 a 3 a tvoří díky repetitivním β -list, který může být i v antiparalelní formě (Garel et al. 1997).

Sericin 2

Ser2 gen byl označen jako hlavní protein tzv. larvální hedvábí (Takasu et al. 2010), obsahuje dva hlavní lepivé proteiny o velikostech 230 a 120 kDa (Michaille et al. 1990a). Exprimuje se v přední a slabě ve střední části MSG (Couple et al. 1987). Jeho transkript se objevuje od 2. dne pátého instaru a zvyšuje se do 6. dne. Exprese tohoto genu byla zjištěna i ve 3 a 4 instaru na rozdíl od *Ser1* a *Ser3*. Sericin 2 je tedy produkován po celou dobu života larvy a jeho tvorba ustává šestého dne pátého instaru, kdežto sericin 1 a 3 se tvoří jen v období těsně před spřádáním kokonu (Takasu et al. 2010).

Gen *Ser2* je umístěn na 11. chromozomu (Gamo 1982), je vysoce polymorfní a obsahuje 13 exonů, které se pohybují v rozmezí 28-2574 bp (Michaille et al. 1990a). Uspořádání exonů genu *Ser2* je 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 10a, 9b, 10b a 11 (Kissinger et al. 1990). *Ser2* gen objevila Michaille a kolektiv (1990a) a byl důkladně zmapován pomocí restriktáz EcoRI, HincII, KpnI, HincII a XbaI. Byl lokalizován jeho start transkripce a 3' konec a byla identifikována jeho hlavní repetice důležitá pro polymerizaci sericinů (Huang et al. 2003). Gen *Ser2* tvoří alternativním sestřihem dvě varianty mRNA první 3,1 kb a druhá alelická varianta se objevuje ve velikostech 5,0, 5,5 a 6,4 kb (Michaille 1990a,b). Delší varianta kóduje protein o 198 kDa (resp. 230 kDa) s isoelektrickým bodem 8,5 a kratší o 102kDa (resp.120kDa) a isoelektrickém bodu 5,4 (Kludkiewicz et al. 2009). Produkt *Ser2* je charakterizován vysokým počtem hydrofilních aminokyselin. Větší protein je složen ze 17,1% Lys, 15,1%Ser, 11,7%Asp, 11,1%Glu, 5,8%Thr a 5,6%Pro. Menší protein odpovídá většímu proteinu a má navíc opakující se oblasti bohaté na lysin a prolin.

Aminokyselinová sekvence *Ser2* začíná hydrofóbním signálním peptidem MKIPYVLLFLVGVAVVNA, která je kódována 2 a 3 exonem. Exon 3 startuje krátkou

unikátní sekvencí a v jeho centrální části se vyskytuje 7krát se opakující sekvence KFENLDKDNVGE. Konec exonu 3, celé exony 4, 5, 6, 7, 8 a část exonu 9a obsahuje dlouhou unikátní sekvenci s vysokým obsahem nabitým aminokyselin vyskytujících se v páru (KK, EE). Velká část exonu 9a je tvořena konzervovanou sekvencí o 45 opakováních RSPSHKDTEKAKPND. Exon 6 vykazuje shodu s unikátní sekvencí exonu 9a, zejména v distribuci oligopeptidů ERE, KSES, EFEN a KxAxS. 11. exon má shodu s 9b. Proteiny vznikající z exonů 10a a 10b jsou identické. Celý protein Ser2 obsahuje 6 N-glykosylačních míst (Kludkiewicz et al. 2009).

Mezi základní vlastnost sericinu 2 patří přilnavost k povrchům způsobená nabitými aminokyselinami, které umožňují elektrostatické interakce s molekulami na povrchu substrátu. Menší protein tvoří strukturu α -helixu, zatímco druhý protein, kódovaný exonem 9a, ne. Převaha nabitých aminokyselin v repeticích a pravidelné rozdělení prolinu brání tvorbě β -listu a struktura proteinu je vytvořena pomocí elektrostatických sil (Levitt 1978). Jelikož jsou zásoby sericinu 2 vyčerpány před koncem pátého instaru, nemůže být tento typ sericinu izolován z kokonu (Kludkiewicz et al. 2009).

Sericin 3

Protein sericinu 3 obsahuje 1271 aminokyselinových zbytků, 18 zbytků na N- konci tvoří signální peptid. Z výsledků studie Takasu 2005 vyplývá, že *Ser3* gen kóduje protein (sericin A) vznikající v přední části MSG. Transkript *Ser3* je zjizitelný od pátého dne posledního instaru do 7. dne (Takasu et al. 2010). *Ser3* gen je tvořen 3 exony kódujícími z velké části repetice, složené z 86 a 8 aminokyselin. Tyto repetice mají vysoký obsah serinu, až 45% (Okamoto et al. 1982, Garel et al. 1997). Podle struktury je Ser3 více hydrofilní než Ser1, oproti Ser1 má ale nižší přítomnost β listů (Garel a kol. 1997, Takasu et al. 2007).

2.5. Využití sericinů

Sericiny jsou získávány jako odpadní produkt tzv. degumováním při zpracování hedvábí. Ročně se tímto způsobem vyrobí přes padesát tisíc tun sericinů (Zhang 2002). Sericiny jsou používány ve farmaceutickém průmyslu a jsou přidávány do nejrůznějších kosmetických přípravků. Mezi významné vlastnosti sericinů patří antibakteriální, antioxidační, antikoagulační, zvlhčující a protirakovinný účinek a mají také ochrannou

aktivitu proti UV, pozitivní vliv na proliferaci buněk a jsou biokompatibilní (Zhang 2002; Zhaorigetu et al. 2003; Sehnal 2008).

2.5.1. Kosmetické přípravky

Nejvíce se v současnosti přidávají sericiny do kosmetických přípravků. V krémech a mastích pomáhají zvyšovat elasticitu kůže a udržovat její vlhkost, čímž působí proti vzniku vrásek (Voegeli et al. 1993; Yamada et al. 1998). V opalovacích krémech posilují efekt UV filtru (Yoshioka et al. 2001). Přípravky pro úpravu vlasů s příměsí sericinu redukuje poškození vlasů navázáním na jejich povrch (Hoppe 1984). Sericinové hydrolyzáty jsou účinné také jako kondicionéry (Padamwar 2004).

2.5.2. Antioxidanty

V nedávné době bylo popsáno mnoho funkcí sericinů a jejich možné využití. Minoura a kolektiv (1995) popsali zvýšenou proliferaci myších fibroblastů na filmu tvořeném sericiny. Sericiny působí také jako antioxidant inhibující tyrozinázu a lipidovou peroxidázu (Kato 1998). Sericinová dieta by mohla být potencionálním inhibitorem karcinogeneze. Myši krmené sericinovou dietou měly potlačený vznik karcinomu tlustého střeva (Sasaki et al. 2000a). Sericiny mohou také zlepšit odbourávání některých těžkých kovů u potkanů (Sasaki et al. 2000b).

2.5.3. Léčba zranění

Sericiny obsahují 30 % sericinu, což dělá ze sericinů výborné zvlhčující agens. Navíc jsou lehce odbouratelné, čehož může být využito při léčbě zranění. Aramwit a Sangcakul (2007) zjišťovali účinek sericinu na zranění u potkanů. Výsledkem jejich studie je, že zranění léčená sericiny měly menší zánětlivou reakci a větší procento vyléčení než u kontrolních oblastí během sledovaného období. Na histologickém vyšetření vzorků léčených sericiny bylo zjištěno kompletní uzdravení bez vředů a zvýšení kolagenu.

2.5.4. 2-D a 3-D struktury

Sericiny samy o sobě tvoří gel a v kombinaci s dalšími polymery vytvářejí 2-D film a 3-D kostru, což může mít uplatnění v tkáňovém inženýrství (Aramwit et al. 2011). Některé studie prokázaly dobrou přilnavost a proliferaci lidských fibroblastů na povrchu tvořeném směsí sericinů a želatiny (Mandal et al. 2009). Wakabayashi a Sugioka (1994) připravili

polyesterová vlákna modifikovaná sericiny. Tato vlákna zadržují až pětkrát více vlhkosti než neupravená polyesterová vlákna.

Siritientong a jeho kolektiv zjišťovali změnu velikosti pórů, absorpčních a mechanických vlastností 3-D struktury sericinu v závislosti na použité metodě sterilizace. Osvědčila se sterilizace gamma zářením, kdy docházelo k nejmenším změnám fyzikálních vlastností 3-D kostry. Naopak etanol nebyl dostatečně účinný a poškozoval strukturu polymeru (Siritientong et al. 2011). Polymery ze sericinů lze autoklávovat.

2.5.5. Membrány

Membrány používané k separaci látek, např. při odsolování, přečišťování vody a chemických látek, mohou být obohacené o sericiny (Zhang 2002; Yamada et al. 1993). Nerozpustná fibroinová membrána je zase vhodná k rozdělení směsi alkoholu a vody (Chisti 1998). Film z fibroinů a sericinů má výbornou propustnost pro kyslík a má podobné funkční vlastnosti jako lidská rohovka (Murase 1994). Membrány ze směsi kolagenu a sericinů lépe zadržují vodu a jsou nepropustné pro mikroorganismy, proto jsou vhodným materiálem pro krytí zranění a léčbu kožních lézí (Tsubouchi et al. 2005; Akturk et al. 2010).

2.5.6. Protimrznoucí efekt

Další praktickou vlastností sericinů je protimrznoucí efekt. Sericiny mohou sloužit k ošetření povrchů, které jsou vystavené mrazu, např. chladicí vozy či jiná chladicí zařízení. Do budoucna by se tohoto efektu dalo využít také k ochraně vozovek a střech před mrazem (Tanaka 2001). Rekombinantní sericiny měly ochranný vliv na buňky *E. coli* během jejich zamrazení (Tsujimoto et al. 2001).

2.5.7. Medicínské využití

Významné je využití sericinů v tkáňových kulturách jako náhrada bovinního séra. Většina savčích buněk vyžaduje během kultivace médium obsahující sérum. Nejvíce používaným sérem je fetální bovinní sérum, které však může být kontaminované viry, priony nebo BSE (Terada 2002). Sérum obsahuje neznámé faktory různých funkcí, proto je přečištění sér velice obtížné a dochází ke ztrátám těchto produktů. Séra jsou dávka od dávky různá a každý buněčný typ vyžaduje jiné sérum. Pro překonání těchto potíží bylo vyvinuto médium bez séra (Murakami 1984). V médiu bez séra je důležitý pro přenos lipidů a minerálních látek zejména albumin, který je do těchto sér přidáván v koncentraci 1-10 mg/ml. Chang úspěšně vytvořil v r. 1980 médium bez séra, na kterém proliferovalo několik

linií hybridních buněk (Chang et al. 1980). Toto médium bylo obohaceno o inzulín (Kelley 1978) a transferin (Guilbert, Iscov 1976), což zlepšovalo růst buněk. Přidání sericinu do média zvyšuje proliferaci ve všech testovaných kulturách, díky čemuž by mohl být sericin široce využívaným doplňkem pro savčí buněčné kultury. Může na buňky působit podobně jako proteiny albuminového typu, např. BSA (bovine serum albumin). Sericin má účinek na buňky zejména v počátečních fázích růstu, tzv. lag fáze, a buňky pod jeho účinkem vstupují dříve do logaritmické fáze. Naproti tomu BSA má účinek v pozdějších fázích růstu buněk. Proto by byl sericin vhodnou náhradou BSA, nebo alespoň dobrým doplňkem sér s BSA. Kultura v přítomnosti 0,1 % sericinu měla výrazně zvýšenou denzitu buněk (Terada et al. 2002). Naproti tomu života schopné buňky nebyly detekovány v kultuře s 1 % sericinem, to naznačuje, že vysoká koncentrace sericinu je pro buněčné kultury škodlivá. Pozitivní efekt na proliferaci buněk byl zaznamenán u různých typů buněk s možným praktickým využitím, např. u ostrůvků pankreatických buněk (Ogawa et al. 2004).

Pro uplatnění sericinů v biomedicíně je ještě potřeba učinit rozsáhlé výzkumy a klinické studie. Materiál získaný z kokonů “degumováním“ je sice levný a dá se ho získat velké množství, ale kvalita je pro použití v medicíně nedostatečná. Proto se řada laboratoří snaží připravit rekombinantní sericinové deriváty s optimalizovanými vlastnostmi (Sehnal 2008).

2.6. Kmenové buňky

Kmenové buňky mají schopnost diferencovat do různých typů tělních buněk. Slouží jako zásoby reparačního systému, dělí se po celý život jedince a doplňují chybějící buňky, když je to potřeba. Při dělení mají vznikající dceřiné buňky možnost buď zůstat kmenovými buňkami, nebo se stát buňkami se specializovanou funkcí. Kmenové buňky můžeme dále dělit podle jejich výskytu a schopnosti diferenciaci na :

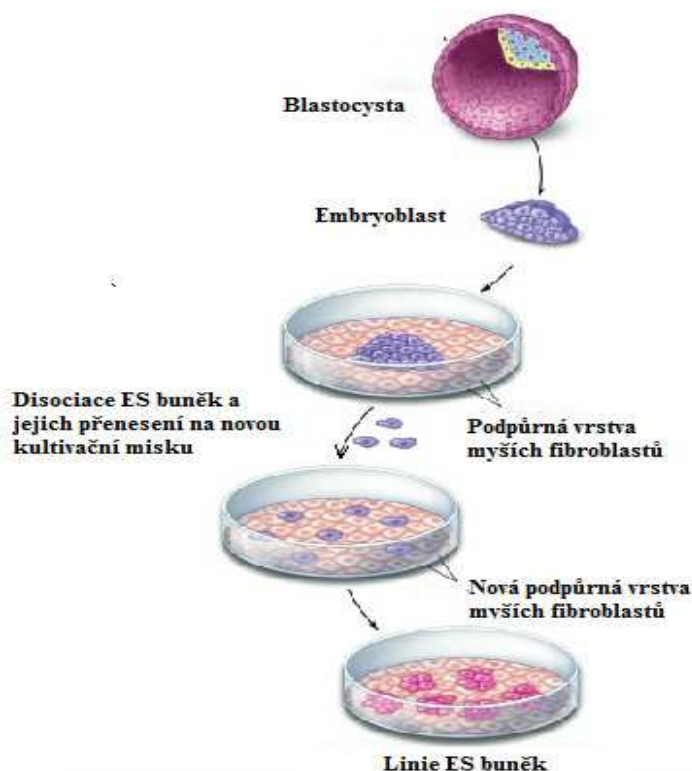
- Embryonální kmenové buňky (viz dále)
- Tkáňové či orgánové kmenové buňky - vyskytují se v určitých tkáních a orgánech v tzv. nikách a diferencují do určitých buněčných typů, např. buňky kostní dřevě, které se používají pro transplantace a diferencují do všech typů krevních buněk
- Indukované pluripotentní buňky - se získávají z již diferencovaných buněk, které jsou dočasně přeprogramovány zapnutím transkripčních faktorů typických pro kmenové buňky, takto byly použity např. kožní fibroblasty

2.6.1. Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells-ES buňky) jsou odvozené z pluripotentních buněk časného savčího embrya, které jsou schopné neomezené a nediferencované proliferace *in vitro*. Pluripotentní buňky byly poprvé odvozeny z myšího teratokarcinomu varlat. Tyto buňky měly schopnost diferencovat do všech buněčných typů a neomezeně proliferovat (Stevens 1962), ale pro svůj původ v nádorových buňkách, nebyly vhodné pro výzkum zaměřený na zdroj buněk pro terapeutické využití. Proto byla snaha o získání zdravých pluripotentních buněk, což se o několik let později zdařilo a v roce 1981 byly ESC odvozeny z embryoblastu zdravého myšího embrya (Evans, Kaufman 1981).

Díky svým vlastnostem se staly myší ES buňky nenahraditelným modelovým systémem pro studium řady aspektů vývoje mnohobuněčného organismu, např. pro studium genetických poruch, raného vývoje embrya, buněčného cyklu, signálních drah zodpovědných za schopnost sebeobnovy, ale také pro studium mechanismů a aktivace apoptózy (Thomson et al. 1998, Bárta et al. 2010). Nejvíce pozornosti se ovšem věnuje studiu diferenciačních procesů, které jsou i v současnosti stále velkou neznámou. Pochopení těchto procesů nám umožní použití ES buněk v buněčné terapii. Další využití tyto buňky nacházejí ve farmacii při testování účinků léčiv (Evans, Kaufman 1981, Thomson et al. 1998).

ESC lze získat poměrně jednoduchým způsobem, avšak příprava homogenního preparátu vyžaduje hodně zkušeností a velkou pečlivost. Pro získání savčích ESC je východiskem blastocysta v době nidace. Vypreparovaný embryoblast je umístěn na misku s podpůrnými buňkami (mitoticky inaktivované myší fibroblasty) a růstového faktoru LIF (leukemický inhibiční faktor). Po několika dnech se myší ES buňky disociují a jsou přemístěny na novou kultivační misku, opět pokrytou vrstvou podpůrných buněk. Po pár dnech získáme linii myších ES buněk (Obr. 3).



Obr. 3: Izolace a kultivace myších ES buněk

(zdroj: <http://stemcells.nih.gov/>)

2.6.2. Lidské embryonální kmenové buňky

Myší ES buňky jsou sice výborným modelovým systémem, avšak nejsou zcela vhodné pro studium obdobných otázek u člověka. Dlouhou dobu se nedařilo získat ES buňky ani u jiných živočišných druhů, které by byly více vyhovující pro výzkum výše zmíněných problematik u lidí. Velký zlom v této oblasti nastal v roce 1998, kdy se skupině Dr. Jamese Thomasona podařilo připravit první linii lidských ES buněk (Thomson et al. 1998). Postup přípravy lidských ES buněk byl podobný jako u myších linií, jediným rozdílem byl použitý růstový faktor, namísto původního LIF faktoru, zde byl použit bazický fibroblastový růstový faktor (FGF2). Po uveřejnění této zprávy započal po celém světě velký zájem o studium vlastností těchto buněk a jejich potencionálního využití v medicíně. Také Česká republika nezůstala pozadu a zásluhou badatelů Hampla a Dvořáka získala v roce 2003 první linii lidských ES buněk (Bárta et al. 2010).

Lidské ES buňky (dále jen hESC- human embryonic stem cells) jsou odvozeny z raného lidského embrya, s informovaným souhlasem dárců, kteří podstoupili program

umělé reprodukce (in vitro fertilization IVF). Lidské embryo je kultivováno do stádia blastocysty, z které je poté pomocí enzymů, komplementu a protilátek izolován embryoblast a ten je přenesen do kultury na vrstvu podpůrných buněk, kde roste a tvoří kolonie hESC (Thomson et al. 1998).

2.6.3. Kultivace hESC

2.6.3.1. Podkladová vrstva, matrice a kultivační médium

Podkladová vrstva je nejčastěji tvořena mitoticky inaktivovanými myšími embryonálními fibroblasty (MEF), které jsou velice důležité pro produkci růstových faktorů, mezibuněčné hmoty a pomáhají hESC buňkám adherovat na povrch, čímž podporují proliferaci hESC (Eiselleova et al. 2008, Greber et al. 2007). Nevýhodou těchto podpůrných buněk je však riziko imunologické reakce a nebezpečí přenosu zvířecích infekcí při užití hESC k léčbě lidí. V dnešní době se začínají čím dál více nahrazovat myší fibroblasty buněčnými typy získanými z prenatálního nebo postnatálního lidského organismu (např. fetální buňky kůže, děložní sliznice, plic, jejichž použití je však často kontroverzní, naproti tomu užití neonatálních předkožkových fibroblastů nevyvolává etické problémy) (Richards et al. 2003, Lee et al. 2004).

Pro dobré přichycení buněk k podkladu, je nezbytná správná matrice. Dnes je nejvíce využíván komerčně vyráběný Matrigel (BD Biosciences), což je směs proteinů produkovaných myšími nádorovými buňkami Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), obsahující laminin, kolagen, heparan sulfát proteoglykan a entaktin/nidogen, navíc může obsahovat TGF-beta (transforming growth factor), kožní růstový faktor (RF), RF inzulinového typu, fibroblastový RF, tkáňový plasminogenový aktivátor a jiné růstové faktory (Sjögren-Jansson et al. 2005).

Kultivační médium má za úkol zajistit pro proliferující buňky dostatečný obsah iontů, prekurzorových sloučenin a růstových faktorů. Kultivační médium je v dnešní době připravováno komerčně (Invitrogen). Složení se od původního receptu příliš neliší, základem jsou následující složky KnockOut DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), tepelně inaktivované fetální bovinní sérum (FBS), L-Glutamin, neesenciální aminokyseliny, penicilin - streptomycin, β -2-merkapt ethanol (Thomson et al. 1998). Opět se tu vyskytuje problém s rizikem přenosu infekcí z FBS, a proto je neustálá snaha o nalezení přípravku, který by FBS nahradil (např. sericiny). Sericiny by mohly být vhodné také jako doplněk či přímo náhrada matrice nebo MEF.

2.6.4. Limitující faktory použití hESC v buněčné terapii

Mezi potencionální možnosti terapie kmenovými buňkami patří např. regenerace tkáně poškozené při zranění nebo nemoci, kdy kmenové buňky hrají roli stimulatoru růstu ostatních buněk, znovuosídlení poškozené nebo odumřelé tkáně buňkami vzniklými přímo z ES buněk, odstranění zbytkové populace nemocných buněk tkáně implantací zdravých kmenových buněk (Bárta et al. 2010). Ale toto potenciální využití ES buněk k léčbě má řadu limitujících faktorů:

- lidské embryonální KB jsou kultivovány *in vitro* při nevhodných podmínkách
- během *in vitro* kultivace akumulují změny ve svém genomu
- při transplantaci hrozí odmítnutí štěpu imunitním systémem příjemce
- musí být zaručena diferencovanost opravdu všech buněk, které se dávají do pacientova těla

V této práci jsme se soustředili na druhý bod, tedy hromadění změn v genomu hESC. Podobné změny genomu jsou často nacházeny u nádorových buněk, proto je nanejvýš nutné, aby buňky hESC nepodléhaly těmto poruchám. Jedním ze zdrojů genetických změn je chybění důležitých složek signálních drah, které kontrolují poškození DNA (protein p53). Druhou příčinou je porucha funkce centrozomu, který je součástí dělicího vřeténka. Na sledování této poruchy jsme se zaměřili (Holubcová et al. 2011, Bárta et al. 2010).

Během buněčného dělení organizuje centrozom dělicí vřeténko, které zajišťuje rovnoměrné rozdělení genetického materiálu mezi dceřiné buňky. Při normálně probíhajícím dělení má buňka dva centrozomy, orientované na opačných pólech buňky. Pokud se při dělení v buňce vyskytne větší počet centrozomů, dojde k nerovnoměrnému rozdělení genetického materiálu (aberantní dělení) a nestabilitě genomu. V *in vitro* kultuře hESC byl zjištěn vyšší výskyt aberantních dělení, což může být potencionální příčinou hromadění genetických poruch v genomu (Holubcová et al. 2011, Bárta et al. 2010).

2.7. Současný výzkum a cíle práce

Je řada publikací prokazujících vliv sericinových extraktů a jejich rekombinantních derivátů na růst buněk v primárních i trvalých kulturách. Bohužel se neví, která složka sericinových extraktů z kokonů na růst buněk příznivě působí, proto je hledání účinného rekombinantního derivátu do velké míry věcí náhody. Nejvíce pozornosti bylo dosud věnováno určitým úsekům Sericinu 1, protože jeho aminokyselinová sekvence byla známá. Má práce je zaměřená na Sericin 2, jehož strukturu se podařilo objasnit v Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR teprve poměrně nedávno (Kludkiewicz et al. 2009). Současně byly prokázány jeho lepidivé vlastnosti, které se mohou uplatnit při interakcích s buňkami. Druhou odlišností mé práce od předchozích studií je testování získaného proteinu na lidské embryonální kmenové buňky, které ve výzkumu účinku sericinů dosud nebyly použity. Moje práce si tedy kladla dva cíle:

1. Připravit rekombinantní protein z genu Ser2 bource morušového, najít vhodné podmínky k jeho dostatečné expresi a přečistit jej pro testování na buněčných kulturách
2. Testovat směs komerčního sericinového lyzátu a připraveného rekombinantního sericinu na lidských embryonálních kmenových buňkách

3. Praktická část

3.1. Materiál a metodika

3.1.1. Exprese proteinu sericin 2

3.1.1.1. Transformace plasmidu do expresních buněk BL21

Na transformaci do expresních buněk jsem použila již dříve připravený a sekvencí ověřený plasmid (vektor pET 160/GW/D-TOPO-Invitrogen se zaklonovanou částí genu *Ser2*, viz Příloha 1 a 3). Plasmid byl transformován do buněk BL21 StarTM (DE3) One shot[®] chemicky kompetentních *E. coli* buněk dle protokolu ChampionTM pET Expression System (Invitrogen). Celý obsah mikrozkušavky po hodinové inkubaci při 37°C přemístit do 25 ml LB media (25 g/l, LB Broth, Amresco) s 25 µl ampicilinu (100 mg/ml, Amresco), nechat růst přes noc při 37°C na třepačce. Z narostlé kultury použít 500 µl do Pilotního experimentu.

3.1.1.2. Pilotní experiment

Připravit si v Erlenmeyerově baňce 10 ml LB media s 10 µl ampicilinu. Přidat 500 µl kultury narostlé přes noc a nechat narůst do optické denzity (OD)₆₀₀ 0,4-0,6. Kulturu poté rozdělit do dvou Erlenmeyerových baňek po 5 ml, z obou odebrat 500 µl do mikrozkušavky (čas nula-T₀), do jedné kultury přidat 0,8 M IPTG (Serva) (indukovaná kultura), aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM do druhé nic (neindukovaná kultura). Každou hodinu (T₁-T₄) odebrat 500 µl z obou kultur, centrifugovat 1 minutu při 5000rpm, supernatant slít a zamrazit pelet v -20°C nebo ihned použít na elektroforézu (viz dále).

Pelety rozsuspendovat v 500 µl Lyzovacího pufru (100 ml Lyzovacího pufru-0.3 ml KH₂PO₄, 4.7 ml K₂HPO₄, 2.3 g NaCl, 0.75 g KCl, 10 ml glycerol, 0.5 ml Triton X-100, 68 mg imidazole, pH 7,8, rozpustit v dest. H₂O, autoklávovat, chemikálie Amresco). Sonikace 3x 10 cyklů (Ultrasonic Homogenizer, Biologics.INC.), chladit na ledu. Přesrážet vzorky pomocí 100% TCA (Serva), přes noc ve 4°C nebo 1 hodinu v -80°C. Centrifugovat 20 minut 13000 rpm, 4°C, supernatant slít. Přidat 200 µl acetonu (Amresco) a opět centrifugovat 10 minut, 13000 rpm, 4°C (2x opakovat). Pelet rozsuspendovat v 15 µl 1x PBS (1 l 1x PBS-8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, pH 7,4, rozpustit v dest. H₂O, autoklávovat, Amresco). Přidat 5 µl 4x proteinového Nanášecího pufru, zahřát 10 minut na 90°C (10 ml 4x prot. Nanášecí pufr-4 ml 100% glycerolu, 2.4 ml 1M Tris pH 6.8, 0.8 g SDS, 4 mg bromfenolové modři, 0.5 ml β-mercaptoetanolu, 3.1 ml H₂O). Ochladit

vzorky a nanést 20 µl na 15% polyakrylamidový gel, očekávaná molekulová hmotnost proteinu je 18 kDa.

3.1.1.3. SDS-PAGE

Reagencie	Základní gel 10 ml	Krycí gel 2 ml
H ₂ O	3,1	1,4
30 % Acrylamide – Bis 29:1 (SERVA)	7,5	0,33
1,5 M Tris pufr (Amresco)	3,8	-
1 M Tris pufr (Amresco)	-	0,25
10 % SDS (Amresco)	0,15	0,02
10 % APS (Amresco)	0,15	0,02
TEMED (Amresco)	0,006	0,002

Tab. 1: 15% polyakrylamidový gel

Do jamek nanést 20 µl vzorku s 4x proteinovým Nanášecím pufrém a Marker Page Ruler Plus Prestained (Fermentas). Polyakrylamidová elektroforéza probíhá ve stejnosměrném elektrickém poli při 100-150 V v Elektroforetickém pufru (1 l Elektroforetický pufr-14,4 g glycinu, 3,02 g Tris báze, 1 g SDS, rozpustit v dest. H₂O, Amresco). Po doběhnutí elektroforézy fixovat gel 15 minut ve Fixačním roztoku (1 l Fixační roztok-450 ml metanolu, 450 ml dest. H₂O, 100 ml kys. octové) a poté barvit 1 hodinu Coomassie Brilliant blue (Amresco), odbarvovat přes noc v dest. H₂O.

3.1.1.4. Western blot

Polyakrylamidový gel (příprava viz SDS-PAGE) 15 min. promývat v 1 x Blotovacím roztoku (1 l 1x Blotovací pufr-14,4 g glycinu, 3,02 g Tris báze, 100 ml metanolu (Penta), rozpustit v dest. H₂O), poskládat sendvič. Membránu opláchnout 10 sekund v metanolu, pak v dest. H₂O (Amersham Hybond-P PVDF Membrane, 0,45 µm, GE Healthcare). Pustit Western blot na 100 V 1 hodinu, chladit na ledu. Po doběhnutí promýt membránu v 1x PBS. Vložit membránu do Blokovacího roztoku (50 ml Blokovací pufr-5 g Skim milk (Difco TM), rozpustit v 1x PBS), blokovat přes noc při 4°C. Membránu inkubovat 2 hodiny s primární protilátkou (Monoklonal Anti- polyHistidine antibody produced in mouse, SIGMA, ředěno 1:2000 v Blokovacím pufru). 3x promýt 1x PBS + 0,1% Tween (Amresco). Membránu inkubovat 1,5 hodiny se sekundární protilátkou (Stabilized Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated, Thermo, ředěno 1:5000 v Blokovacím pufru). 3x promýt 1x PBS + 0,1% Tween. Namíchat reagenty 1 a 2 (Direct Nuclei, GE Healthcare RPN3000) v poměru 1:1 a nanést na membránu, barvit 3 minuty ve tmě.

3.1.2. Izolace RNA z peletu bakteriální kultury

Použít pelet z Pilotního experimentu po 4 hodinové kultivaci od přidání IPTG (T₄) a držet ho zamražený v tekutém dusíku. Postupovat dle kitu Trizol[®] Reagent (Invitrogen). Pelet rozpustit v 20 µl RNA free H₂O a inkubovat 10 min při 55 °C. Změřit koncentraci RNA na spektrofotometru (WPA LIGHTEAVE II), skladovat RNA v -20°C.

3.1.2.1. SuperScript III First Strand Synthesis Systém pro RT-PCR (Invitrogen)

Dvoukroková syntéza prvního vlákna

Trikant: 5' - TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTA -3'

First Strand Synthesis	µl
Celková RNA (3,2 µg)	2
Trikant (Invitrogen)	1
10mM DTP Mix (Fermentas)	1
H ₂ O	6
Celkový objem	10

Inkubace 5 minut při 65°C na cykleru, pak ihned 1 minutu na led

cDNA Synthesis Mix	µl
10x RT pufr (Invitrogen)	2
25 mM MgCl ₂ (Fermentas)	4
0,1M DTT (Invitrogen)	2
RNáza OUT (40 U/ µl) (Invitrogen)	1
SuperSkript III RT (200 U/ µl) (Invitrogen)	1

10 µl této cDNA Mix reakce přidat k 10 µl RNA First Strand Synthesis, jemně promíchat a inkubovat 50 minut při 50°C v cykleru. Zahřát na 85°C 5 minut a ihned na led. Přidat 1 µl RNázy H (Takara) a inkubovat 20 minut při 37°C. Vzniklou cDNA skladovat v -20°C.

Genově specifické primery:

BM2Ex forward : 5' -GCGTGGCTGTGGTCAACG- 3'

BMSer2 reverse : 5' -CAGAGATCTGAAAGACGAGC- 3'

PCR reakce	µl /reakci
10x Loading pufr (Fermentas)	2,5
2,5 mM DTP Mix (Fermentas)	2
10 µM BM2Ex (Generi-biotech)	1
10 µM BMSer2 (Generi-biotech)	1
cDNA (ředěná 1:10)	1
DreamTaq polymeráza (Fermentas)	0,2
H ₂ O	17,3
Celkový objem	25

Program na cykleru:

Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
94	120	-
94	15	35
49	300	35
72	20	35
72	600	-

3.1.2.2. Elektroforéza vzorků z PCR

1% agarózový gel (Amresco), s přidanou barvou SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) použití 1 μ l/10ml gelu. Použít 25 μ l reakce a 5x proteinový nanášecí pufr (Fermentas). Vzorky (RNA) nanést na gel spolu se srovnávacím markerem 1 Kbp (Gene Ruler 1kb DNA Ladder, 0,1 μ g/ μ l, Fermentas). Gel vložit do aparatury s 1x TAE pufrem (1 l 50x TAE-242 g Tris báze, 57,1 ml ledové kys. octové, 100 ml 0,5 M EDTA, rozpustit v H₂O), pustit na 100 V.

3.1.3. Úprava podmínek Pilotního experimentu

Přidat 1% glukózu (Amresco) do LB média během kultivace, 37°C na třepačce 180rpm, přes noc.

Snížit teplotu kultivace na 27°C a kultivovat 24-48 hodin na třepačce 180 rpm.

Přidat rozdílné množství IPTG, aby konečná koncentrace v LB médiu byla 0,5 mM, 0,8 mM a 1,5 mM, kultivovat při 37°C, na třepačce 180 rpm, přes noc.

3.1.4. Expresse Ser2 v Rosetta blue

Expresi provést podle stejného postupu (viz výše), namísto v Lyzovacím pufru, rozpouštět buněčné pelety v B-PER (Thermo science). Buňky BL21 nahradit elektrokompetitivními buňkami *E.coli* Rosetta blue (DE3), které obsahují plasmid pLysS a mají rezistenci na tetracyklin (Novagen).

3.1.5. Optimalizace kodonové sekvence Ser2

Pro zvýšení exprese jsem si nechala upravit kodonovou sekvenci části genu *Ser2* s přidaným His-tagem na C-konci. Tím se změnila velikost na 407 pb oproti původním 362 pb, molekulová hmotnost proteinu je 14,4 kDa, původní protein byl 18 kDa. Optimalizaci provedla firma GenScript. Upravenou sekvenci jsem obdržela zaklonovanou do vektoru pUC57. Z tohoto vektoru bylo potřeba vyštípnout úsek Ser2 restrikcími enzymy a zaklonovat jej do expresního vektoru pET-15b (Novagen).

4 µg vektoru pUC57 rozpustit ve 40 µl DEPC vody, tím získáme koncentraci 100 ng/µl. Takto připravený zásobní roztok vektoru uchovávat v -20°C. Z něj si připravit pracovní koncentraci vektoru o 10 ng/µl.

3.1.5.1. Příprava plasmidu s optimalizovanou „codon-usage“ Ser2

Transformace vektoru pUC57 a pET-15b do elektrokompetentních buněk XL1 a sure (Stratagene). Vytemperovat na ledu elektrokyvety a na pokojovou teplotu vytemperovat S.O.C. medium (Invitrogen). K buňkám napipetovat plasmid 5-10 ng, špičkou lehce promíchat, přenést buňky do kyvety a provést elektroporaci při 1700 V. Buňky opatrně přetáhnout do nové mikrozkušavky, ihned přidat 960 µl S.O.C. media. Inkubovat 1 hod. při 37°C na třepačce 180 rpm. Po inkubaci rozočkovat 100 µl buněk na plotnu (Agar 15 g/l, rozpustit v H₂O, autoklávat, Invitrogen) s ampicilinem a nechat růst přes noc při 37°C. Narostlé kolonie pomnožit v LB mediu, provést přečištění plasmidu kitem MidiPrep PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen). Změřit koncentraci plasmidů.

Inzert je komerčně zaklonován ve vektoru pUC57, z něj je potřeba ho vyštípnout a vložit do expresního vektoru pET-15b (Novagen). Restrikční reakce byla provedena restrikčními enzymy NcoI a BamHI.

Restrikční reakce

Reagencie	µl	µl
10x pufr NEB 4	5	5
Vektor pET-15b 268 µg/ml	8	-
Vektor pUC57 160 µg/ml	-	20
NcoI 20 U/ µl	0,5	0,5
BamHI 20 U/ µl	0,5	0,5
H ₂ O	36	24
Celkový objem	50	50

Restrikční reakci nechat běžet 2 hodiny při 37°C. Vzorky poté nanést na 1% agarózový gel, po proběhlé elektroforéze vyříznout proužky o velikosti 407 pb u vektoru pUC57 a 6000 bp u vektoru pET-15b. Přečistit kitem Gel Extraction (Qiagen).

3.1.5.2. Ligační reakce

Podle této rovnice vypočítat optimální množství Ser2 (PCR produkt) do ligační reakce.

$$20 \text{ ng inzertu} = \frac{50 \text{ ng vektoru pET} - 15b \times 0,4 \text{ kb inzertu}}{2,7 \text{ kb vektor pUC57}} \times \frac{3}{1}$$

Namíchat ligační směs podle tabulky, promíchat a inkubovat při 4°C, přes noc

Ligační reakce

Reagencie	μl
Ser2 (PCR produkt)	1
pET-15b	1
2x Ligační pufr (Invitrogen)	2
T4 ligáza (Invitrogen)	0,5
H ₂ O	15,5
Celkový objem	20

3.1.5.3. Transformace do buněk TOP10

pET-15b byl transformován do chemicky kompetentních buněk TOP10 *E. coli* dle protokolu Champion™ pET Expression System (Invitrogen). Později byly buňky TOP10 nahrazeny chemicky kompetentními buňkami SURE (STRATAGENE).

3.1.5.4. PCR a sekvenace pro ověření správné orientace inzertu v plasmidu v bakteriálních koloniích

Na ověření, zda byl insert zaligován do plasmidu, a je-li ve správné orientaci, byly použity primery T7 forward a reverse, jejichž sekvence je součástí vektoru pET-15b.

Primery:

T7 forward 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

T7 reverse 5' TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG 3'

PCR reakce

Reagencie	μl
10x dream Taq pufr (Fermentas)	2,5
2,5 mM dNTP Mix (Fermentas)	2
Plasmid (pET-15b+Ser2 120 ng/μl)	1
10 μM T7 forward (Invitrogen)	1
10 μM T7 reverse (Invitrogen)	1
Dream Taq DNA polymeráza (Fermentas)	0,4
H ₂ O	8
Celkový objem	25

Program na cykleru:

Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
94	120	-
94	15	35
55	300	35
72	20	35
72	600	-

Po doběhnutí PCR reakce provést elektroforézu na 1% agarózovém gelu, gel vyfotit a vyhodnotit. Vybrané kolonie byly pomnoženy v LB mediu s ampicilinem do optimální optické denzity (OD_{600} 1-2) a přečištěny kitem MiniPrep (Invitrogen).

Sekvence plasmidu byla provedena na pracovišti ÚMBR AV ČR sekvenátorem Applied Biosystems 3130x1 za použití primerů T7 forward a reverse.

3.1.5.5. Analýza exprese rekombinantních proteinů s optimalizovanou „codon-usage“ v BL21 a Rosetta blue

Na transformaci byly použity buňky BL21 (Invitrogen) a Rosetta blue (Novagen). Podmínky transformace stejné (viz výše). Proveden Pilotní experiment a detekce proteinu pomocí Western blotové analýzy.

Získaný protein byl přečištěn dle kitu Ni-NTA Purification System (Invitrogen) za nativních podmínek. Z odebraných frakcí (Lyzát, Proteklá frakce, Promývací frakce 1-4, Eluční frakce 1-4) bylo použito 15 μ l vzorku na SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu. Protein byl dále přečištěn pomocí kitu Mini Dialysis Kit, 8 kDa cut-off (GE Healthcare) proti 1x PBS, přes noc, při 4°C. Koncentrace získaného proteinu byla zjištěna kitem BCATM Protein Assay Kit (Thermo Science). Přečištěný a dialyzovaný protein byl lyofilizován na přístroji ALPHA 1-2 LD plus CHRIST. Vzorky skladovat v -20°C.

3.1.6. Příprava elektrokompetentních buněk

Těmito buňkami jsme nahradili buňky TOP10. Elektrokompetentní buňky mají efektivnější transformaci a dají se snadno a levně připravit. Zásobní roztok SURE buněk (STRATAGENE) inokulovat na Petriho misku s ampicilinem a kolonie nechat růst při 37°C přes noc. Další den kličkou odebrat 1 kolonii a naočkovat startovací kulturu do 10 ml 2XYT média (1 l 2XYT média-16 g Bacto Tryptonu, 10 g Bacto-yeast extraktu, 5 g NaCl, rozpustit v H₂O, Serva, autoklávovat) na 37°C přes noc na třepačku. Ráno Startovací kulturu naočkovat do 1 l 2 XYT média (předehřáté na LT) a kulturu dát třepat při 37 °C. Požadovaná OD je v rozmezí 0,4-0,6 (log fáze růstu). Po dosažení optimální OD buňky uložit ihned na led a rozlít do 2x 250 ml centrifugačních nádob (vychlazených na 4 °C). Centrifugovat 3500 rpm 25 minut na 4 °C. Buňky uložit na led a odstranit supernatant (nutno pracovat velice rychle, buňky ihned vzlínají). Buňky rozpustit v 200 ml vychlazené sterilní dest. H₂O. Centrifugovat 3500 rpm 25 min. na 4 °C. Supernatant odlít a buňky rozmíchat ve 100 ml vychlazené sterilní dest. H₂O. Centrifugovat 3500 rpm 25 min. na 4 °C. Supernatant odlít a buňky rozmíchat v 20 ml vychlazeného 10% glycerolu a přelít do 50 ml flakonek.

Centrifugovat 3500 rpm 10 min na 4 °C. Supernatant odlít a buňky rozmíchat v 0,5 ml vychlazeného 10% glycerolu. Buňky umístit na led a rozpipetovat po 45 µl do 1,5 ml mikrozkušavek a ihned zamrazit v tekutém dusíku, skladovat v -80°C.

3.2. Testování účinku sericinů na hESC

3.2.1. Biologický materiál

Práce s hESC byla provedena na Oddělení molekulární embryologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR v Brně pod vedením pana doc.MVDr. Aleše Hampla, CSc. a za pomoci jeho týmu. Podle standardních protokolů používaných na tomto pracovišti byly nejprve pasážováním připraveny myší fibroblasty jako podpůrné buňky pro kultivaci a poté byly kolagenovou pasáží připraveny hESC buňky.

K testování byly použity hESC linie v nízké pasáži CCTL 10 P53, CCTL 12 P59, CCTL 12 P52, CCTL 14 P35 a CCTL 14 P47. (CCTL - Centre of Cell Therapy Line, P – počet pasáží). Tyto linie byly izolovány v roce 2003, podrobnosti o jejich izolaci viz web a Hampl A. (2006).

(<http://www.iscr-admin.com/Default.aspx?Action=viewsc&StemCellLine=509&StemCelName=CCTL%2014>)

(<http://www.mendeley.com/research/derivation-characterization-new-human-embryonicstem-cell-lines-czech-republic/>)

Jako podpůrná vrstva buněk pro kultivaci hESC byly použity myší embryonální fibroblasty (MEF, myší kmen CF-1, mitoticky inaktivované), které se připravují průběžně v laboratoři z 12,5 dne starého myšího embrya.

3.2.2. Příprava sericinů a kultivace hESC

Do komůrek Lab-Tek™ II, Chamber Slide™ Systém (Thermo Scientific) (Obr.4) nanést naředěný komerční sericin (PureSericin, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan) v koncentracích 0,05%, 0,1% a 0,5% a standardně používanou 0,1% sterilní želatinu (Sigma-Aldrich). Nechat inkubovat v 37°C, 5% CO₂, přes noc. Druhý den sterilizovat komůrky s proteiny gama zářením 20 Grey, 10 minut. Odsát tekutinu, nanést zpasážované a správně naředěné MEF (předtím nutné spočítat buňky v Bürkrově komůrce a naředit na požadovanou koncentraci 23000 buněk/cm²). Inkubovat v 37°C, 5% CO₂, přes noc, po třech hodinách zkontrolovat, zda MEF nasedají na povrch a pokud ano, vyměnit médium. Druhý den odsát médium, propláchnout 1x sterilním PBS. Nanést lidské ES buňky. Tyto buňky se 14 dní před použitím musí pasážovat (Kolagenová pasáž). Nechat růst hESC do optimálního nárustu

buněk, 2-3 dny, kontrolovat nárůst buněk pod mikroskopem. Buňky nesmí začít tvořit embryoidní tělíska (kulovitá uskupení buněk, která se později diferencují v buňky ento-, mezo- a ektodermu). K obarvení a dobrému odečítání centrozomů je ideální jen jedna vrstva buněk.



Obr. 4: Lab-Tek™ II, Chamber Slide™ Systém (Thermo Scientific)

3.2.3. Značení centrozomu

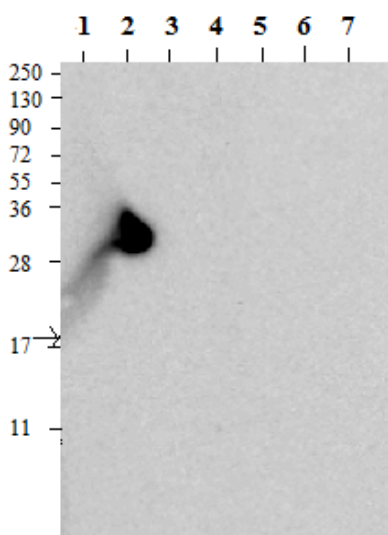
Odsát médium, propláchnout 1x PBS 5 minut. Odsát PBS a přidat 0,5 ml Fixačního roztoku (95% etanol, 1% kys. octová, 4% H₂O) vychlazeného na 4°C. Inkubace 30 minut na ledu. Odsát Fixační roztok a promýt sestupnou alkoholovou řadou 0,5 ml, 10 minut (90%, 70% a 50% etanol), neustále chladit. Rychlý oplach vychlazenou dest. H₂O a pak 0,5ml 1x PBS, odsát. Přidat 0,2 ml Blocking roztoku 1 (1% BSA, 0,1% Triton v PBS, Amresco), inkubovat 15 min. na ledu, odsát. 3x oplach 0,5 ml 1x PBS, 5 min, odsát. Přidat 0,2 ml Blocking roztoku 2 (1% BSA, 0,03% Tween, 0,01% azid v PBS), inkubovat 1 hodinu na ledu, odsát. Oplach 1x PBS+0,05% Tweenem. Přidat 0,2 ml Primární protilátky PERICENTRIN (ab4448, Abcam, 1:5000 v 1x PBS+0,05% Tween), inkubovat do druhého dne při 4°C. Odsát a 3x propláchnout v 0,5 ml 1x PBS+0,05% Tweenem, 5 min, odsát. Přidat Sekundární protilátku (F9887, Sigma-Aldrich, 1:500 v 1x PBS+0,05% Tween), inkubovat 1 hodinu v temnu. Oplach v 1x PBS+0,05% Tween, odsát. Přidat 0,2 ml DAPI (Sigma-Aldrich, 1μl/ml v 1x PBS), 5 min v temnu. 5x oplach v 0,5ml 1x PBS+0,05% Tweenem, 10 min, odsát. Pomocí speciálního držáku odstranit komůrky ze sklíčka. Na podložní sklíčko s buňkami kápnout Moviol (Sigma-Aldrich), odstranit bubliny a přiložit krycí sklíčko. Nechat tuhnout v temnu při 4°C do druhého dne. Pozorovat v konfokálním mikroskopu IX51 (C&S Ltd., Olympus).

4. Výsledky

4.1. Příprava proteinů

4.1.1. Analýza rekombinantních proteinů

Z kultury buněk BL21 kultivovaných přes noc jsem odebrala inokulum (500 μ l) do 2 Erlenmeyerových baněk s LB médiem a ampicilinem. Kultivovala jsem buňky na třepače při 37°C. Po dosažení optimální OD (0,4-0,6) jsem k jedné kultuře buněk přidala IPTG tak, aby finální koncentrace byla 1mM (indukovaná kultura). K druhé kultuře jsem nepřidávala nic (neindukovaná kultura). Každou hodinu od přidání IPTG jsem odebrala 500 μ l kultury do mikrozkuřavky a označila jako čas 1-4 (T₁₋₄). Z těchto vzorků jsem provedla SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu a následnou Western blotovou analýzu. Protein byl detekován protilátkami proti His-tagu. (Obr. 5)



Obr. 5: Western blot

1- Marker Page Ruler Plus Prestained (Fermentas)

2- Pozitivní kontrola-připravena a ověřena u nás v laboratoři

3-6- Vzorky po indukci IPTG odebírané v hodinových intervalech (T₀-T₄)

7- Vzorek bez přidání IPTG ze 4. hodiny

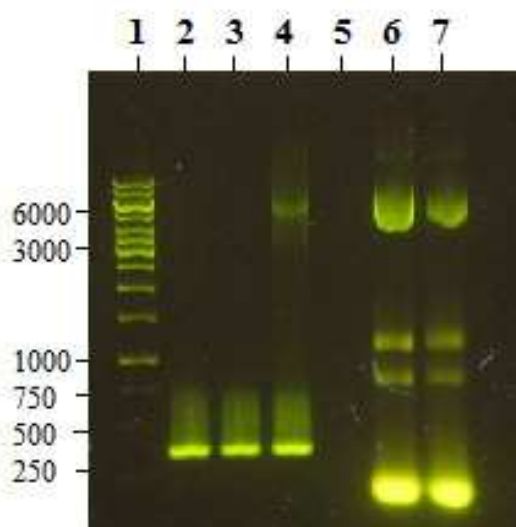
Šipkou naznačena očekávaná velikost proteinu

Western blotová analýza ukázala silný signál pozitivní kontroly, zbylé vzorky zůstaly bez detekovatelného signálu. Mohla jsem tedy vyloučit chybu při SDS-PAGE a následném přenosu proteinů na membránu. Negativní výsledky v indukovaných drahách lze vysvětlit buď neúspěšnou expresí (4.1.2.), nebo chybou v postupu, kdy jsem zprvu vzorky nestrážela pomocí TCA.

4.1.2. Izolace RNA a syntéza cDNA z peletu bakteriální kultury

Protože jsem si nebyla jistá, zda není exprese nízká již na úrovni RNA, rozhodla jsem se ověřit expresi pomocí izolace RNA z bakteriálních kolonií Trizolem (Invitrogen) a následnou syntézou cDNA pomocí soupravy SuperScript III First Strand Syntesis Systém

(Invitrogen), za použití genově specifických primerů. Provedla jsem izolaci RNA ze dvou bakteriálních peletů po 4 hodinové kultivaci, jeden po indukci IPTG (indukovaná kultura) a druhý bez indukce (neindukovaná kultura). Jako pozitivní kontrola mi posloužila plasmidová DNA, rovněž zpracovaná s genově specifickými primery. (Obr. 6)



Obr. 6: Izolace RNA a syntéza cDNA genově specifickými primery z peletu bakt. kultury

1-Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder, 0,1 µg/µl, (Fermentas)

2-cDNA z neindukované kultury

3-cDNA z indukované kultury

4-Pozitivní kontrola-plasmidová DNA

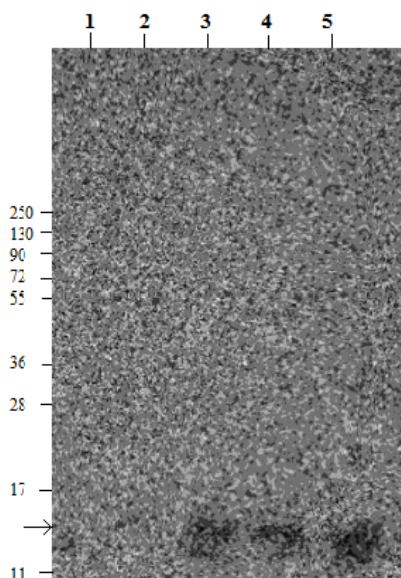
6-RNA z neindukované kultury

7-RNA z indukované kultury

Tímto pokusem jsem si ověřila, že bakteriální buňky transkribují můj inzert Ser2. Přesnější zjištění o skutečné tvorbě mRNA by bylo pomocí RT-PCR, z které bych získala kvantitativní výsledky, tu jsem ale neprováděla.

4.1.3. Úprava podmínek pro zvýšení exprese

Dále jsem měnila podmínky kultivace a indukce, abych dosáhla vyšších výtěžků proteinu při expresi. Nejprve jsem upravila teplotu během kultivace z 37°C na 27°C, poté jsem do LB média přidávala 1% glukózu a nakonec jsem zkoušela použít různé koncentrace IPTG (0,5 mM, 0,8 mM a 1,5 mM) (Obr. 7).



Obr. 7: Různé koncentraci IPTG

1- Marker Page Ruler Plus Prestained (Fermentas)

2-pelet z T₄ bez indukce

3-pelet z T₄ indukováno 0,5mM IPTG

4-pelet z T₄ indukováno 0,8mM IPTG

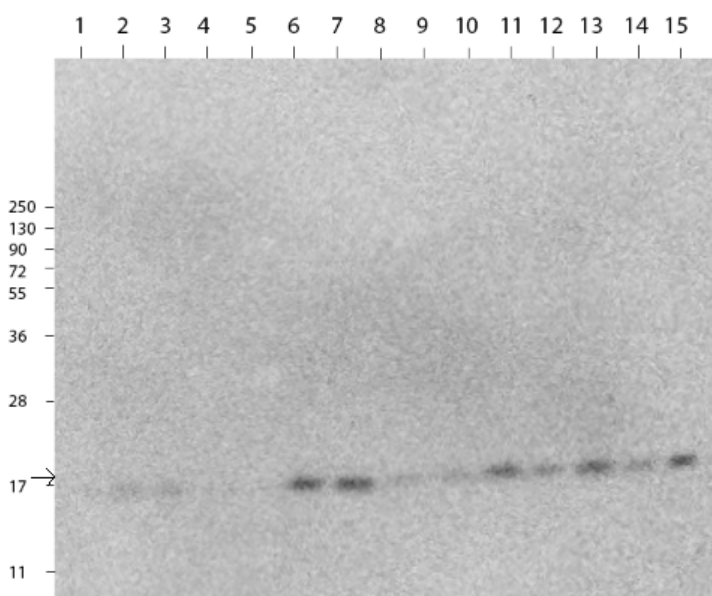
5-pelet z T₄ indukováno 1,5mM IPTG

Všechny uvedené úpravy kultivace, ani rozdílné koncentrace IPTG výrazně nezvýšily hladinu exprese proteinu.

4.1.4. Expresa v buňkách Rosetta blue

Pro další testování jsem použila *E.coli* Rosetta BlueTM DE3 pLysS elektrokompetentní buňky (Novagen). Tento kmen *E. coli* obsahuje plasmid pLysS, který je schopný produkovat T7 lysozym. T7 lysozym se váže na T7 RNA polymerázu a inhibuje transkripci. Tím se sníží základní hladina T7 polymerázy, což vede ke snížené expresi heterogenních genů řízených T7, čímž se posílí exprese našeho inzertu.

Elektroporací jsem transformovala plasmid pET160/GW/D-TOPO s inzertem Ser2 do Rosetta blue DE3 pLysS. Buňky jsem kultivovala při 37°C v LB médiu s ampicilinem ve 2 Erlenmeyerových baňkách do optimální OD (0,4-0,6). Do jedné kultury jsem přidala IPTG do konečné koncentrace 1mM (indukovaná kultura) a druhá kultura byla bez indukce (neindukovaná kultura). Z obou kultur jsem po dobu čtyř hodin každou hodinu odebírala 1 ml, který jsem následně centrifugovala a získaný pelet jsem rozpustila v B-PER (Thermo science). Takto získaný vzorek jsem rozdělila na polovinu do dvou mikrozkušavek. Jeden vzorek jsem sonikovala a druhý vzorek jsem nejdříve centrifugovala, tím jsem získala supernatant a pelet jsem znovu rozpustila v B-PER. Nakonec jsem všechny tři vzorky přesrážela TCA. Provedla jsem SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu a přenesla proteiny na membránu Western blotem. Detekci proteinů jsem udělala pomocí protilátek proti His-tagu. (Obr. 8)



Obr. 8: Western blot *R.blue*

1, 15-T₃ a T₄ bez indukce IPTG, sonikace

2, 6, 9, 12-T₁-T₄, indukce 1mM IPTG, sonikace

3, 7, 10, 13-T₁-T₄, indukce 1mM IPTG, pelet

4, 8, 11, 14-T₁-T₄, indukce 1mM IPTG, supernatant

5- Marker Page Ruler Plus Prestained (Fermentas)

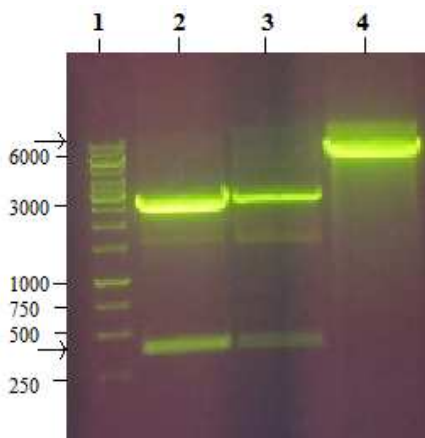
T-čas odběru, každou hodinu od přidání IPTG, po dobu 4. hodin

Z výsledků vyplývá, že exprese probíhá, a že výsledná bílkovina ukládána ve srovnatelném množství jak do inkluzních tělísek, tak do cytosolu. Na tomto obrázku lze také vidět nárůst exprese v čase, kdy se po druhé hodině množství již výrazně nemění. Vzorky po sonikaci mají silnější signál než vzorky bez sonikace. Neindukované vzorky po čtyřech hodinách vykazují, stejnou hladinu exprese jako indukované vzorky po dvou hodinách.

4.1.5. Příprava expresního plasmidu s optimalizovanou „codon-usage“ Ser2

I přes úspěšnou expresi v Rosetta blue, bylo množství získaného proteinu velmi malé, proto jsem si nechala komerčně optimalizovat „codon-usage“ části genu *Ser2* s His-tagem přidaným na C-konec proteinu. Optimalizaci provedla firma GenScript. Upravenou sekvenci jsem obdržela zaklonovanou do vektoru pUC57. Z tohoto vektoru bylo potřeba vyštípnout úsek *Ser2* restriktčními enzymy a zaklonovat jej do expresního vektoru pET-15b.

Vektor pUC57 s optimalizovanou sekvencí *Ser2* a vektor pET-15b jsem štěpila enzymy NcoI a BamHI. Tím jsem získala optimalizovaný *Ser2* z pUC57 a zároveň si naštěpila pET-15b, abych do něj mohla inzerovat *Ser2* zaligovat. Restriktční reakce jsem nanesla na 1 % agarózový gel se SybrGreen (Obr. 9).

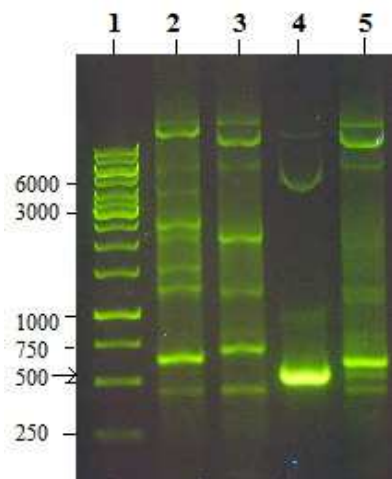


Obr. 9: Restriktční reakce

- 1- Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, (Fermentas)
- 2-3-vektor pUC57, šipkou naznačen vyštípnutý fragment *Ser2*, který byl vyříznut
- 4-vektor pET-15b, šipkou označen proužek na vyříznutí a přečištění

Proužky o velikosti 284 pb v 2. a 3. jamce a 6000 pb ve 4. jamce jsem vyřízla a přečistila kitem Gel Extraction (Qiagen). Po změření koncentrace vektoru pET-15b a inzertu *Ser2* jsem si vypočetla ideální množství obou těchto složek a provedla ligaci přes noc při 4 °C. Druhý den jsem ligační reakci transformovala do buněk TOP10 (Invitrogen), vysela tyto buňky na plotnu s ampicilinem a kultivovala do dalšího dne v termostatu při 37°C.

Abych ověřila úspěšnost ligace a transformace plasmidu do buněk TOP10 udělala jsem PCR reakci s primery specifickými pro vektor pET-15b, tedy T7 forward a reverse. PCR produkt jsem nanesla na 1% agarózový gel se SybrGreen.



Obr.10: PCR z bakteriálních kolonií pro ověření správné orientace inzertu

1- Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder, 0,1 µg/µl, (Fermentas)

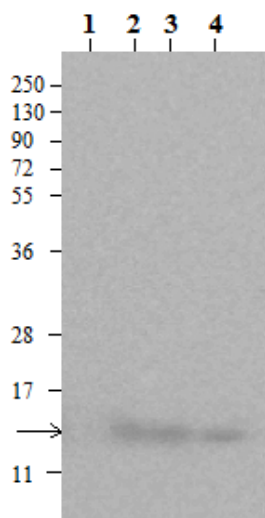
2, 3, 5 - Bakt. kolonie neobsahují správně zaklonovaný inzert Ser2

4 - Bakt. kolonie obsahuje inzert Ser2 ve správné orientaci

Výsledek ukazuje, že je inzert Ser2 úspěšně zaklonován do expresního vektoru pET-15b ve správné orientaci. Abych vyloučila přítomnost bodové mutace, byla správnost inzertu ověřena také sekvenací.

4.1.6. Analýza exprese rekombinantních proteinů s optimalizovanou „codon-usage“ v BL21 a Rosetta blue

Vektor pET-15b se zaklonovaným inzertem Ser2 jsem transformovala do buněk Rosetta blue pLysS (Novagen) a BL21 (Invitrogen). Kultivovala jsem buňky po přidání IPTG do finální koncentrace 1 mM po 4 hodiny při 37 °C. Odebraný 1 ml vzorku z obou kultur po čtvrté hodině jsem centrifugovala a pelet rozpustila v B-PER. Tento roztok jsem rozdělila do dvou mikroskopavek. V jedné jsem vzorek pouze sonikovala (vzorek-Sonikace). V druhé jsem vzorek znovu centrifugovala, supernatant (vzorek-Supernatant) jsem odsála a pelet rozpustila v B-PER (vzorek-Pelet). Všechny tři vzorky jsem nanesla na 15% polyakrylamidový gel. Po doběhnutí SDS-PAGE jsem udělala Western blotovou analýzu a následnou detekci proteinu s protilátkami proti His-tagu.



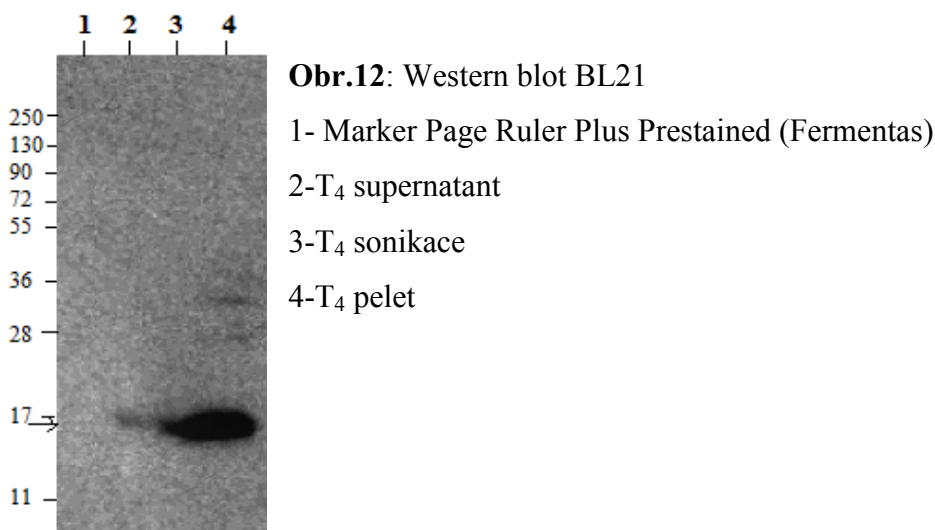
Obr.11: Western blot R. blue

1- Marker Page Ruler Plus Prestained (Fermentas)

2-T₄ supernatant

3-T₄ sonikace

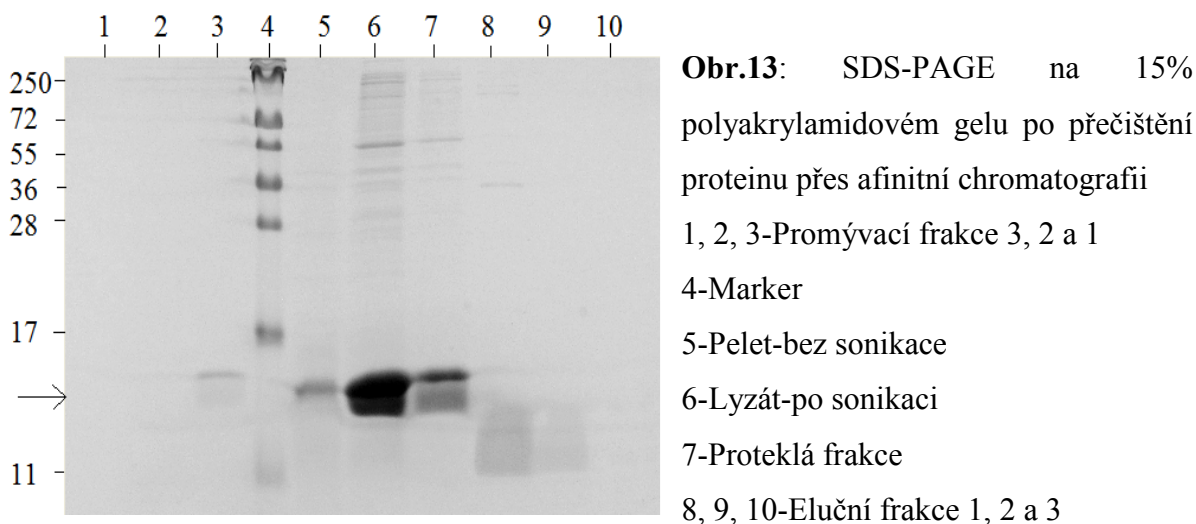
4-T₄ pelet



Z předložených výsledků vyplývá, že exprese proteinu probíhá u obou typů buněk. U buněk Rosetta blue je exprese do cytosolu a inkluzních tělísek srovnatelná, oproti tomu v buňkách BL21 je exprese celkově výraznější a probíhá více do inkluzí než do cytosolu.

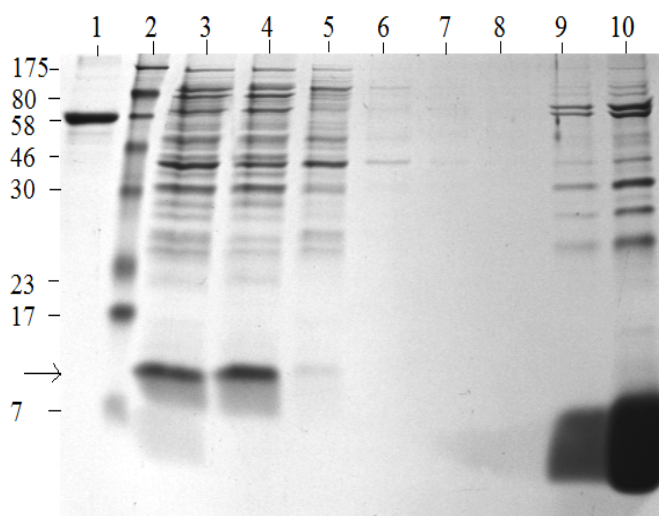
4.1.7. Přečištění proteinu přes afinitní chromatografii

Postupovala jsem podle kitu Ni-NTA Purification System (Invitrogen) za nativních podmínek. Z kultury inkubované 4 hodiny při 37°C a po indukci IPTG jsem centrifugací získala pelet, který byl dále rozsuspendován v Nativním pufru (vzorek-Pelet bez sonikace). Poté jsem provedla opakovanou sonikaci proteinu a znovu centrifugovala (vzorek-Lyzát po sonikaci). Supernatant jsem nanasla na připravenou kolonku z Ni-NTA agarózy a nechala prokapat (vzorek-Protoklá frakce). Poté jsem kolonku promyla Promývacím roztokem (Promývací frakce) a nakonec Elučním roztokem (Eluční frakce). Ze sesbíraných frakcí jsem odebrala část vzorku na SDS-PAGE (Obr. 13). Marker Page Ruler Plus Prestained (11-250kDa) (Fermentas). Šipkou naznačena očekávaná velikost proteinu.



Výsledky shrnuté na Obr. 13 ukázaly přítomnost velkého množství bílkoviny ve frakci Lyzátu a Proteklé frakci, která velikostně (14,4 kDa) odpovídá rekombinantnímu proteinu. Vzhledem k tomu, že z bioinformatické analýzy (www.expasy.org) vychází, že C-konec proteinu zřejmě tvoří alfa-helix, domnívala jsem se, že His-tag je pro Ni-NTA nepřístupný. Z toho důvodu jsem proužek Proteklé frakce z gelu vyřezala a poslala na analýzu pomocí hmotnostního spektrofotometru. Jediným identifikovaným proteinem byl však lysozym, jež je součástí Nativního pufru a má molekulovou hmotnost 14,4 kDa.

V dalším kroku jsem tedy zahustila eluční frakci (obr. 14). Po zahuštění jsem na gelu detekovala proužek o přibližné velikosti 13kDa, který jsem opět analyzovala hmotností spektrofotometrií. Z této analýzy již vyšlo, že proužek je mnou exprimovaný Ser2 (obr.15).



Obr.14: SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu po přečištění proteinu přes afinitní

1-BSA (0,1mg/ml)

2-ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad range (7-175kDa) (BioLabs)

3-Lyzát-vzorek rozpuštěný v Nativním pufru po sonikaci

4-Proteklá frakce-Frakce nenavázaná na chromatografickou kolonu

5, 6, 7, 8-Promývací frakce 1, 2, 3 a 4

9-Eluční frakce bez zakoncentrování

10-Eluční frakce 10x zkoncentrovaná

Šipkou naznačená očekávaná velikost proteinu

SER2_BOMMO Coverage Map

1	VAVVMALPNP	LFGGLVKSL	KKKQIFEDKF	ENLKENVGEK	FENLKENVGE
51	KVENLKENVG	EKLENIKEKA	GEKFENLKDN	VGEKFENLKD	NVGDKLEAAK
101	EKAGEIKKKL	VDVGEDLKDE			



Obr. 15: Proteinová analýza vzorku z Eluční frakce na hmotnostním spektrofotometru (modře vyznačeny úseky na proteinové sekvenci Ser2, které byly získány z proteinové analýzy)

Podařilo se tedy exprimovat protein Ser2, ale pro jeho získání je nutné velké zakoncentrování. Vzorek v Eluční frakci na gelu má nižší molekulovou hmotnost, což je způsobeno velkým zahuštěním vzorku, a tím tedy nelze odečíst přesnou molekulovou hmotnost. Podle výsledků proteinové analýzy by nemělo docházet ke štěpení proteinu Ser2 během přečištění přes kolonku. Zároveň však z těchto výsledků vyplynulo, že protein Ser2 tvoří pouze pětinu všech proteinů ve vzorku a zbývající část jsou bakteriální proteiny z *E. coli*.

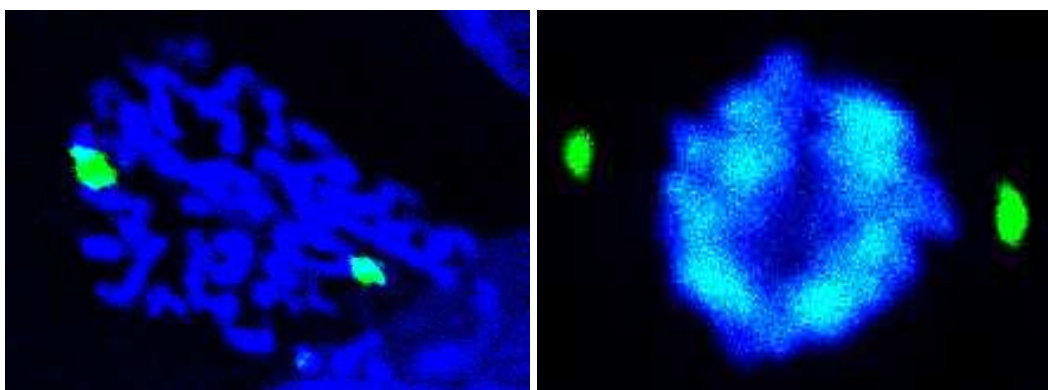
Procentuální zastoupení aminokyselin v exprimované části proteinu Ser2

Aminokyselina	%
Lysin	19,8
Kyselina glutámová	17,3
Asparagin	10,7
Leucin	10,7
Valin	9,9
Glycin	9,0
Kyselina asparágová	5,7
Alanin	4,9
Fenylalanin	4,9
Isoleucin	2,4
Prolin	1,6
Serin	1,6
Glutamin	0,8

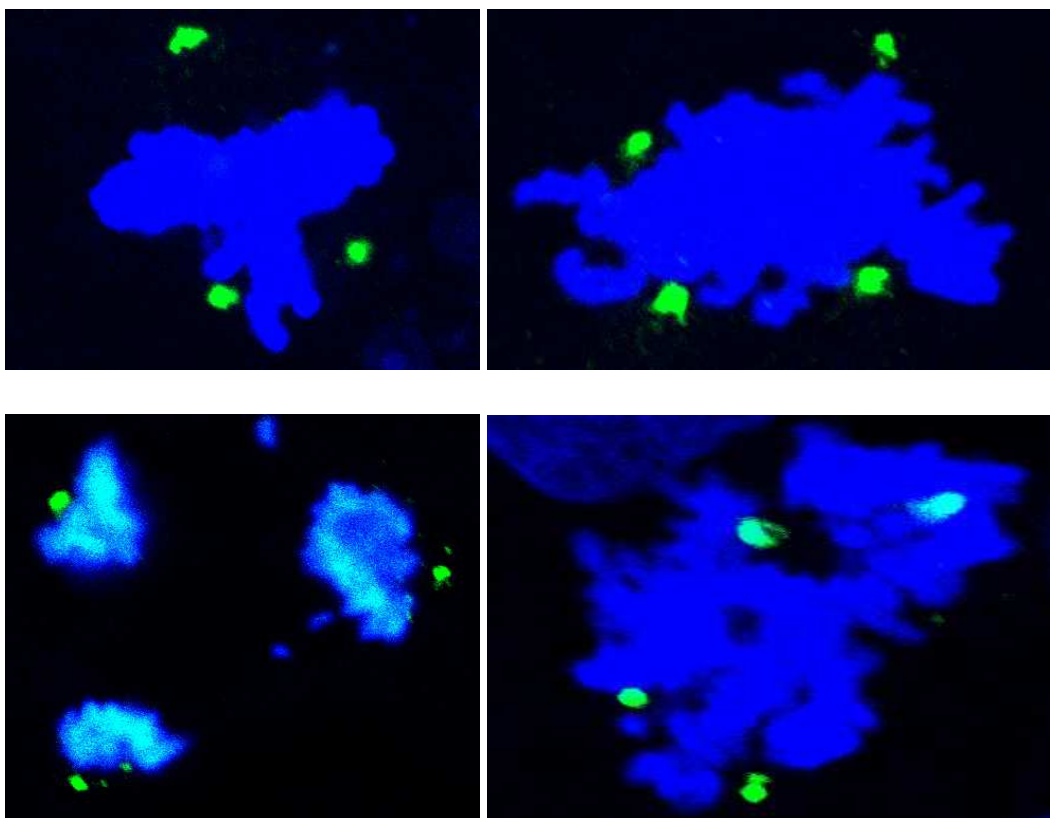
4.2. Kmenové buňky

Kultivace hESC (human embryonic stem cells) byla provedena na Oddělení molekulární embryologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR v Brně pod vedením pana doc.MVDr. Aleše Hampla, CSc. a za pomoci jeho týmu. Podle standardních protokolů používaných na tomto pracovišti byly nejprve pasážováním připraveny myší fibroblasty jako podpůrné buňky pro kultivaci a poté byly kolagenovou pasáží připraveny hES buňky. Do komůrek byl v různém ředění nanesen komerčně připravený sericin (PureSericin, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan), který se nechal adherovat do druhého dne. Na tuto vrstvu byly nanесeny myší fibroblasty a po několika hodinách hES buňky.

Po dvou a půl denní kultivaci jsem narostlé hESC fixovala a obarvila centrozomy pomocí protilátky PERICENTRIN. Je třeba uvést, že se při kultivaci hESC často vyskytuje zmnožení centrozomů, které je možná hlavní překážkou jejich možného terapeutického použití. Předběžné pokusy se sericinovými extrakty připravenými na Přírodovědecké fakultě MU Mgr. J. Benešovou naznačovaly, že extrakty zmnožení centrozomů ve srovnání se standardně používanou želatinou snižují. Hodnocení hESC jsem prováděla na mikroskopu IX51 (C&S Ltd., Olympus, zvětšení 20x a 40x). Spočítala jsem výskyt poškozených mitóz vzhledem ke zdravě probíhajícím mitózám (Obr. 14, 15). Výsledky jsem statisticky vyhodnotila v programu Statistica v. 6.0. Hodnotila jsem počet poškozených mitóz (zmnožených centrozomů) vzhledem ke zdravě probíhajícím mitózám v každém z 5 nezávislých pokusů.



Obr. 14: Ukázka zdravě probíhající mitózy buněk hESC



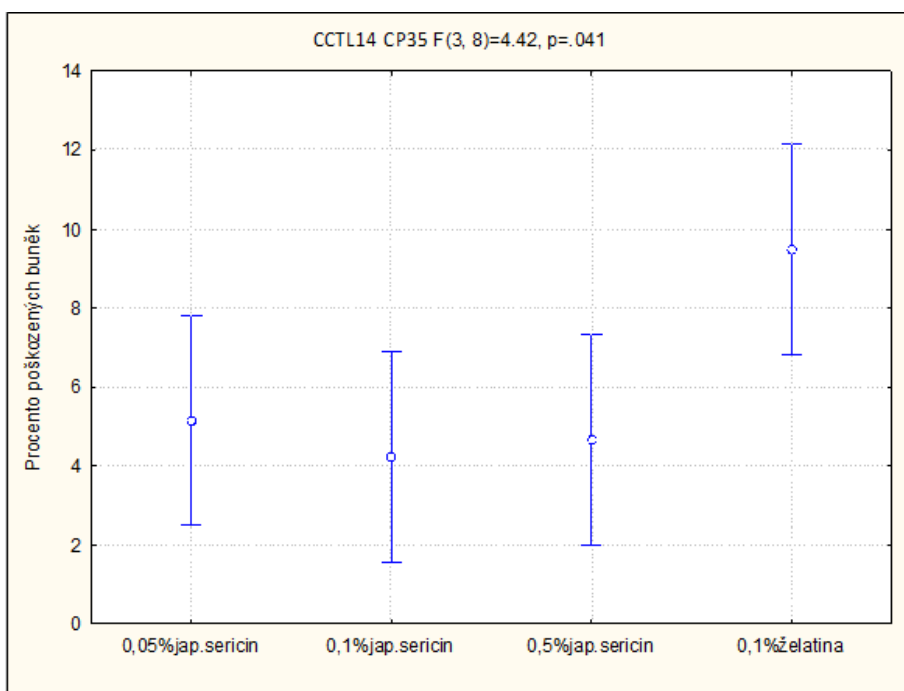
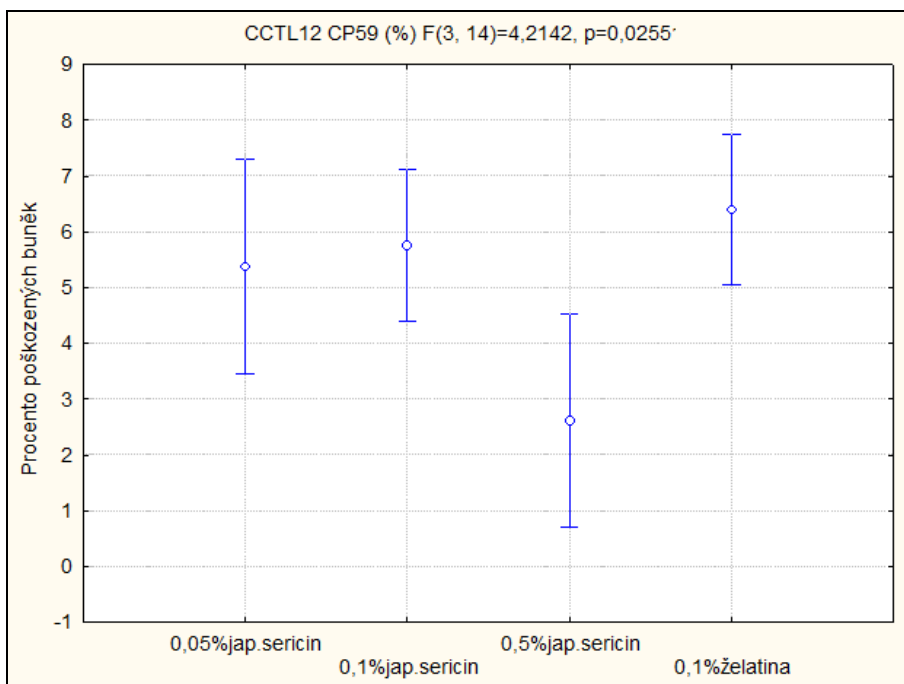
Obr. 15: Ukázka mitózy se zmnoženými centrozomy

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu: Jednocestná analýza variance (ANOVA), počítáno v programu Statistica v. 6.0. Zjistila jsem, že u třech kultivací nebyl v četnosti defektů prokazatelný rozdíl mezi hESC na sericinovém a na želatinovém podkladu:

CCTL 10 P53	(F= 2.28, df= 3, 8, p=0.1568)
CCTL 14 P47	(F= 1.07, df= 3, 8, p=0.4135)
CCTL 12 P52	(F= 0.70, df= 3, 8, p=0.5753)

U dvou dalších kultivací byla četnost defektů buněk na sericinu prokazatelně menší (Obr. 16 a 17):

CCTL 12 P59	(F= 4.21, df= 3, 14, p=0.0255)
CCTL 14 P35	(F= 4.42, df= 3, 8, p=0.0411)



Obr. 16 (nahore) Buňky hESC CCTL 12 P59. **Obr. 17** (dole) Buňky hESC CCTL 14 P35. Jednocestná analýza variace, program Statistica v 6.0. Chybové úsečky představují 0.95% konfidenční interval.

V těchto pokusech byl použit komerčně připravený sericinový lyzát. Signifikantní vliv sericinů byl pozorován u buněk CCTL 12 P59 a CCTL 14 P35, u ostatních buněčných typů nebyl zaznamenán pozitivní vliv sericinů oproti kontrole (0,1% želatina). U buněk CCTL 12 P59 měly výrazný vliv sericiny o koncentraci 0,5%, zatímco u buněk CCTL 14 P35 působily více sericiny o koncentraci 0,1%.

5. Diskuze

V předchozí bakalářské práci se mi podařilo zaklonovat úsek genu Ser2 do expresního vektoru pET-160. Cílem této práce bylo zvýšení exprese, aby bylo získáno dostatečné množství rekombinantního proteinu pro testování jeho možného účinku na buněčné kultury. Pozitivní vlastnosti sericinových proteinů jsou známé z mnoha prací (viz např. Sehnal 2008). V současnosti se využívají sericinové směsi, zejména v kosmetickém průmyslu, jako přísady do krémů a přípravků pro péči o vlasy (Voegeli et al. 1993, Yamada et al. 1998). Nás jejich unikátní vlastnosti zajímají z biomedicínského hlediska. Zejména nalezení náhrady séra v médiích pro kultivaci buněk pro terapeutické použití je v dnešní době aktuálním tématem. Z dřívějších studií je zjevný pozitivní vliv sericinů na proliferaci buněk (Terada et al. 2002). Zatím se ale vždy používaly k testování směsi sericinů, takže se přesně neví, která jejich složka má vliv na buňky. Proto byla moje práce zaměřena na získání rekombinantního proteinu odvozeného ze sekvence Ser2. Tento sericin byl vybrán kvůli vysokému obsahu nabitých kyselin, které propůjčují proteinu dobré adhezivní vlastnosti a také proto, že jeho úplná struktura byla objasněna teprve nedávno a to v Českých Budějovicích (Kludkiewicz et al. 2009).

Expresa vybraného úseku cDNA se ukázala velmi obtížnou. Příčinu obtíží se mi bohužel nepodařilo objasnit. Během přípravy proteinu jsem narazila na řadu úskalí, které jsem se snažila vyřešit. Prvním z nich byla optimalizace Western blotové analýzy, jelikož mi nevyšly pozitivní kontroly. Další chybou v postupu bylo, že jsem nesrážela vzorky pomocí TCA. Bez přesrážení nebylo možné zachytit pozitivní signál na membráně protilátkami proti His-tagu. Po těchto neúspěšných pokusech jsem nabyla dojmu, že buňky *E. coli* nejsou schopné exprese mého proteinu, proto jsem provedla izolaci RNA z bakteriálního peletu po indukci. Tímto jsem si ověřila, že bakterie mohou transkribovat můj inzert. Dále jsem se zabývala zlepšením podmínek kultivace, abych dosáhla vyšší exprese proteinu, ale ani tady jsem nebyla příliš úspěšná a na Western blotové analýze jsem zaznamenávala jen slabé signály exprimovaného proteinu. Jako další krok jsem zvolila jiný kmen buněk *E. coli*, resp. Rosetta blue (DE3) pLysS, které jsou navrženy pro vysoce účinnou expresi (Dong et al. 1996). Zlepšení exprese bylo ihned viditelné, ale přesto ne dostačující, a proto jsem si zároveň nechala upravit kodonovou sekvenci, abych snížila výskyt vzácných kodonů pro *E. coli* (Kane 1995). Po úspěšném zaklonování upravené "codon usage" jsem pokračovala v expresi proteinu Ser2. Výsledný protein jsem purifikovala chelatační chromatografií využívající afinitu His-tagu k Ni^{2+} iontům. Na SDS-PAGE jsem zaznamenala

silný proužek v Proteklé frakci a usoudila jsem, že se His-tag neváže na Ni^{2+} ionty. To by odpovídalo předpokladu, že konce Ser2 tvoří α -helix. Tato hypotéza se však nepotvrdila a mou velkou chybou byla záměna rekombinantního proteinu s lysozymem, který byl přítomen v pufru použitým pro extrakci proteinů. Naprostá shoda molekulové hmotnosti lysozymu a exprimovaného rekombinantního proteinu byla neočekávaná a podařilo se ji prokázat až pomocí sekvenování proteinu. Tato zkušenost je pro mne obrovským poučením pro další práci. Nakonec jsem zakoncentrovala vzorek z Eluční frakce a sekvenováním proteinu v něm byla prokázána přítomnost proteinu Ser2, který byl ale značně znečištěn bakteriálními proteiny. V tomto ohledu jsem splnila 1. cíl mé diplomové práce, ačkoli ne na takové úrovni, jak jsem si představovala.

Protože se mi nepodařilo připravit dostatečné množství čistého rekombinantního proteinu, omezilo se moje směřování k dosažení 2. cíle mé práce na testování komerčního preparátu směsi sericinů, která měla být původně použita jen pro porovnání s účinkem rekombinantního proteinu. Přes toto zúžení původního plánu byla práce na lidských embryonálních kmenových buňkách průkopnická a bylo by vhodné v ní pokračovat. Účinek sericinů na hESC nebyl dosud vůbec studován a rovněž použití zvýšeného počtu centrozomů jako ukazatele poruch v proliferaci hESC je unikátní. Mnou získané výsledky dávají určitou naději na využití sericinu v kultivaci hESC: jejich účinek byl buď obdobný jako u standardně používané želatiny, nebo byl lepší. Tím se potvrdily výsledky dřívějších pokusů s extrakty sericinů, které rovněž působily pozitivně (Hampl, Benešová, Sehnal, osobní sdělení), a byl do určité míry splněn 2. cíl mé práce.

Použití lidských embryonálních kmenových buněk (hESC) je velmi široké, např. regenerace tkáně poškozené při zranění nebo nemoci, ale toto potenciální využití buněk k léčbě má řadu limitujících faktorů (Bárta et al. 2010). Na překážku je zejména jejich složitá a přitom neuspokojivá kultivace *in vitro*, při které může docházet k poškození jejich genetické informace. Při transplantaci pak v důsledku vadné exprese některých genů hrozí odmítnutí štěpu imunitním systémem příjemce. Změny v genomu rovněž omezí či špatně nasměrují žádoucí diferenciaci všech buněk, které se dávají do pacientova těla. Změny v genomu během *in vitro* kultivace kumulují podobně jako je tomu u nádorových buněk (Pihan et al. 2003; Fukasawa 2005). Vzhledem k nebezpečí nekontrolované proliferace je nezbytné tyto procesy v kultivovaných hESC správně pochopit a předejít jim. Jednou z nežádoucích genetických změn je absence důležitých složek signálních drah, například protein p53, který je zodpovědný za kontrolu poškozené DNA a působí jako supresor aktivace protoonkogenů. Dalším defektem v kultivovaných hESC je porucha funkce

centrozomu, kterou jsem se zabývala v této práci. Během kultivace hESC *in vitro* byl zjištěn vyšší výskyt aberantních dělení, vedoucí k akumulaci genetických poruch v genomu. V těchto případech docházelo k nerovnoměrnému rozložení genetického materiálu, což bylo způsobeno vyšším počtem centrozomů během dělení buňky (Holubcová et al. 2011, Bárta et al. 2010).

Je neustálá snaha o zlepšení kultivačních podmínek pro hES buňky, aby se docílilo jejich nejlepší kvality a minimalizovaly se abnormality v jejich genomu. V několika předešlých pracích byly pokusy pasážovat hES buňky na komerčně vyráběných a chemicky přesně definovaných médiích bez použití podkladové vrstvy myších fibroblastů a s přidanými růstovými faktory (Amit et al. 2004; Stover, Schwartz 2011). Byl také zjištěn značný rozdíl mezi kvalitou buněk kultivovaných na skleněném nebo polyetylovém povrchu ošetřeném buď želatinou nebo kombinací laminu a fibronektinu. Z těchto čtyř možných kombinací byl nejvyšší výskyt nadpočetných centrozomů pozorován u skleněného povrchu pokrytého želatinou, naopak nejnižší výskyt poškozených centrozomů byl u polyetylového povrchu ošetřeného fibronektinem s laminem (Holubcová et al. 2011).

V této práci jsem se pokusila snížit výskyt nadpočetných centrozomů použitím sericinů během kultivace. Motivací byla možnost, že sericiny by mohly být potencionální náhradou fetálního bovinního séra, čímž by se snížilo riziko přenosu infekcí. Z publikací a z práce kolegyně Terezy Staškové vím, že deriváty sericinů podporují adhezi buněk k podkladu. Ztráta schopnosti adherovat k podkladu je dobře známou vlastností kancerogenních buněk a může být jednou z příčin defektního dělení hESC. Zvýšení adheze by mohlo zkvalitnit růst buněk, včetně snížení výskytu nadpočetných centrozomů. Podle dřívějších studií mají sericinové lyzáty pozitivní vliv na mitogenetickou aktivitu u vybraných typů buněk. Např. jejich přidání do média bez sérových komponent zlepšuje proliferaci myších hybridomů 2E3-O (Terada et al. 2005). Také při testování na buňkách lidského hepatoblastomu HepG2, lidských epiteliálních buňkách HeLa a lidských ledvinných embryonálních buňkách 293 byla pozorována lepší proliferace buněk, zejména při koncentraci sericinů 0,1% (Terada et al. 2002).

Z našich výsledků je patrný pozitivní efekt na snížení nadpočetných centrozomů, ale pouze u dvou buněčných typů CCTL 12 P59 a CCTL 14 p35. Použité hES buňky CCTL 10, 12 a 14 byly vybrány proto, že se u nich častěji vyskytují změny genomu a lze tedy dobře pozorovat efekt přidaných sericinů. Pro experimenty byl použit komerčně vyráběný sericinový lyzát v koncentraci navržených ve spolupráci s týmem docenta Hampla v Brně. I v našem případě se potvrdilo, že sericiny jsou účinné v nižších koncentracích, stejně jak

tomu bylo v dřívějších pracích při zkoumání účinku sericinů na dělení několika typů (ne všech) kultivovaných buněk (Terada et al. 2002). Experimenty byly záměrně prováděny na skleněném povrchu, aby byl patrný vliv sericinů. Jako kontrola nám sloužila želatina, která se standardně používá jako podkladová vrstva pro adhezi hES buněk. Tyto pokusy je však nutné ještě dále zopakovat a případně použít rekombinantní sericiny, abychom mohli učinit konkrétní závěry.

6. Závěr

Podařilo se mi exprimovat protein Ser2, ale ne v dostatečném množství, aby mohl být testován na buněčných kulturách. V průběhu práce jsem se snažila připravit také další proteiny z genu *Ser2* a to z exonu 9a, 10a, 9b, 10b a 11, ale nedospěla jsem k expresi těchto proteinů před ukončením této práce.

Zabývala jsem se testováním komerčního sericinového lyzátu na kulturách lidských embryonálních kmenových buněk. Z dosavadních výsledků se zdají být sericinové proteiny jako vhodní kandidáti na zlepšení kultivace hES buněk. Toto byl ovšem jen první krok k optimalizování metod a postupů a je potřeba další práce, aby výsledky byly náležitě ověřeny.

7. Seznam literatury

- Akai H. (1984)** The ultrastructure functions of the silk gland cells of *Bombyx mori* In: R. C. King and H. Akai (eds.) *Insect Ultrastructure*, Vol.2.Plenum, New York: 323-364
- Akai H. (1997)** Anti-bacteria function of natural silk materials: *Int. J. wild Silkmoths Silk*, **3**: 79-81
- Akai H., Nagashima T., Aoyagi S. (1993)** Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm, *Antherae myllita* Drury (Lepidoptera • Saturniidae). *Int. J. insect morphol. Embryol.*, **22**: 497-506
- Akai H. T., Nagashima T., Inoue S., Kobayashi I., Tarmura T. (2005)** Functional recovery of transgenic silk gland. 20th congress of international sericultural commission, Bangalore, India 15-18th December 119
- Akturk O., Tezcaner A., Bilgili H., Deveci M. S., Gecit M. R., Keskin D. (2010)** Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**(3): 279-288
- Amit M., Shariki C., Margulets V. (2004)** Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.*, **70**: 837-845
- Aramwit P., Sangcakul A. (2007)** The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats. *Bios. Biotechnol. Biochem.*, **71**(10), 2473-2477
- Aramwit P., Kanokpanont S., De-Eknamkul W., Srichana T. (2009)** Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *J. Bioscience and engineering*, **107**(5): 556-561
- Aramwit P, Siritientong T, Srichana T. (2011)** Potential applications of sil sericin, a natural protein from textile industry by-products. *Waste manag. Res.*, **30**(3): 217-24
- Bárta T., Doležalová D., Hampl A., Holubcová Z., Jaroš J., Vinařský V. (2010)** Od fyziologie k medicíně, Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití. *Vydala Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*: 1-48
- Case S. T., Powers J., Hamilton R.,Burton (1994)** M.J. *Silk Polymers*, 544: 80
- Čechmánek Z., Hrabák R. (2006)** Život motýlů střední Evropy. *Granit, s.r.o., Praha*:69-70
- Chen Y. G., Zi M., Hai L. N., Zhang Y. (2002b)** Analysis of amino acids from silkworm chrysalis. *Yunnan Chem. Technol. China*, **6**: 22-23
- Chen Z., Liao S., Li Q., Chen L., Wu Y., Yao X. (2002a)** Study on multivoltine yellow blood silkworm for edible and medicine utilization. *Silkworm Sci. China*, **28**: 73-76

- Chevillard M., Deleage G., Couble P. (1986)** Aminoacid sequence and putative conformational characteristics of the 25KD silk protein of *Bombyx mori*. *Sericologia*, **26**: 435-449
- Chisti Y. (1998)** Strategies in downstream processing. In: Subramanian G., editor. *Bioseparation and bioprocessing: a handbook*, vol. **2**. New York: Wiley-VCH, 3-30
- Couple P., Michaille J. J., Couble M.L., Prudhomme J.C. (1987)** Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland.. *Dev. Biol.*, **124**: 431-440
- Couple P., Chevillard M., Moine A., Ravel-Chapuis P., Prudhomme J. C. Structural (1985)** Organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5' flanking DNA with that of the fibroin gene. *Nucleic Acids Res.*, **13**(5): 1801-1814
- Cunniff P. M., Fossey S. A., Auerbach M. A., Song J. W., Kaplan D. L., Adams W. W., Eby R. K., Mahoney D., Vezie D.L.(1994)** *Polym.Adv.Technol.*, **5**: 401
- Dicko C., Vollrath F., Kenny J. M., (2004)** *Biomacromolecules*, **5**: 704
- Doira H. (1983)** Linkage map of *Bombyx mori* – Status quo in 1983. *Sericologia* **23**: 245-269.
- Dong H., Nilsson L., Kurland C. G. (1996)** Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.*, **260**(5): 649-63
- Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A. and Dvorak, P. (2007)** Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 353 – 363.
- Evans, M. and Kaufman, M. (1981)** Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154–56.
- Fedič R. (1996)** Characterisation of Sericin 1 Gene in *Bombyx mori*. (*Bachelor theses*)
- Fedič R., Žurovec M., Sehnal F. (2002)** The Silk of Lepidoptera. *Journal of Insect Biotechnology and Serology*, **71**: 1-15
- Foo C.W.P., Bini E., Hensman J., Knight D.P., Lewis R., Kaplan D.L. (2006)** *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, **82**: 223
- Fukasawa K. (2005)** Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.*, **230**: 6-19
- Gamo T. (1982)** Genetics variants of the *Bombyx mori* silkworm encoding sericin proteins of different length. *Biochem. Genet.*, **20**: 165-177
- Gamo T., Inokuchi T., Laufer H. (1977)** Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **7**: 285-295

- Garel A., Deleage G., Prudhomme J.C. (1997)** Structure and organization of the *Bombyx mori* Sericin 1 gene and of the Sericins 1 deduced from the sequence of the ser1B cDNA. *Insect biochem. Molec. Biol.*, **27**(5): 469-477
- Goldsmith MR, Kafatos FC. (1984)** Developmentally regulated genes in silkmoths. *Annu Rev Genet.*, **18**: 443-87
- Greber B, Lehrach H, Adjaye J. (2007)** Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells*, **25**(2): 455-64
- Guilbert L. J., Iscove N. N. (1976)** Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* *14*; **263**(5578): 594-5.
- Hampl A., Kořková S., Vodinská M., Dvorák P. (2006)** Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines in Czech Republic. 1-13
- Holubcová Z., Matula P., Sedláčková M., Vinařský V., Doležalová D., Bárta T., Dvořák P., Hampl A. (2011)** Human Embryonic Stem Cells Suffer from Centrosomal Amplification. *Stem Cells*, **29**: 46-56
- Hoppe U, Koerbaeher K., Roeckl M. (1984)** Hair and bath preparations containing sericin. Ger Offen DE 3233388 A1 (to Beiersdorf A G, Ger) P 15; *Chem. Abst.* **100**: 215305
- Huang J., Valluzzi R., Bini E., Vernaglia B., Kaplan D.L. (2003)** Cloning, expression, and assembly of sericin-like protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 46117-46123
- Hui C.C., Suzuki Y. (1995)** Regulation of the silk protein genes and the homeobox genes in silk gland development. In *Molecular model Systems in the Lepidoptera* (M.R. Goldsmit and A.S. Wilkins, eds.), *Cambridge University Press*, 249-271
- Hyde N. (1984)** The queen of textiles. *National Geographic* **165**: 3-49
- Chapman R. F. (1969)** The insect, structure and function. *Science*, **168**(3935): 1082
- Chen W. Q., Priewalder H., John J. P., Lubec G. (2010)** Silk cocoon of *Bombyx mori*: proteins and posttranslational modifications--heavy phosphorylation and evidence for lysine-mediated cross links. *Proteomics*, **10**(3): 369-79.
- Iizuka E. (1964)** *Biorheology*, **3**: 1
- Iizuka E. (1985)** *J.Appl.Polym. Sci.* **41**: 173
- Inoue S., Tanaka K., Arisaka F., Kimura S., Ohtomo K., Mizuno S. (2000)** Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.*, **275**: 40517-40528

- Ishikawa E., Suzuki Y. (1985)** Tissue- and stage-specific expression of sericin genes in the middle silk gland of *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, **27**: 73-82
- Jin H. J., Kaplan D.L. (2003)** *Nature*, **424**: 1057
- Kato N., Sato S., Yamanaka A., Yamada H., Fuwa N., Nomira M. (1998)** Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 145-147
- Kane J. F. (1995)** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**(5): 494-500
- Kelley D. S., Becked J. E., Potter V. R. (1978)** Effect of insulin, dexamethasone, and glucagon on the amino acid transport ability of four rat hepatoma cell lines and rat hepatocytes in culture. *Cancer Res.*, **38**: 4591-4601
- Kerkam K., Viney C., Kaplan D. L., Lombardi S. J. (1991)** *Nature*, **349**: 596
- Kikuchi Y., Mori K., Suzuki S., Yamaguchi K., Mizuno S. (1992)** Structure of the *Bombyx mori* fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. *Gene. Jan 15.*, **110**(2): 151-8
- Kimura K., Oyama F., Ueda H., Mizuno S., Shimura K. (1985)** Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Experientia*, **41**: 1167-1171
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO. (1990)** Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell*. **63**(3):579-90.
- Kislingová I. (2006)** Genetické aspekty chovu bource morušového (*Bombyx mori* L.). *Bakalářská práce*. Masarykova Univerzita v Brně
- Kludkiewicz B., Takasu Y., Fedič R., Tamura T., Sehnal F., Žurovec M. (2009)** Structure and expression of the silk adhesive protein Ser2 in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **39**:938-946
- Kludkiewicz B., Kodrik D., Grzelak K., Nirmala X., Sehnal F. (2005)** Recombinant, structurally Unix Kazal-type proteinase inhibitor retains activity when C-terminally extended and glycosylated. *Protein Expr Purif* **43**: 94-102
- Knight D. P., Vollrath F. (2001)** *Naturwissenschaften*, **88**: 179
- Knight D. P., Vollrath F. (2002)** *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **357**: 155
- Kodrik D. (2004)** Fyziologie hmyzu. Učební texty. Entomologický ústav AVČR a Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta

- Kodrík D. (1992)** Small protein components of the cocoons in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) and *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Acta ent. Bohemoslov.*, **89**: 269-273
- Komatsu K. (1975)** Studies on dissolution behaviors and structural characteristics of silk sericin. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, **26**: 135-256
- Krejčík A. (1936)** Chov bource morušového. Nakl. Brázda, Praha 45
- Kurioka A., Yamazaki M., Hirano H. (1999)** Primary structure and possible function of trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.*, 259: 120-126
- Kurioka A., Hirano H. (1995)** Partial amino acid sequence of a 11 kDa cocoon shell Kazal-type protein. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **64**: 392-394
- Lee J., Rhee B. K., Bae G. Y., Han Y. M., Kim J. (2005)** Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein. *Stem Cells*, **23**(6): 738-51
- Levitt M. (1978)** Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry.*, **17**: 4277-4285
- Magoshi J., Magoshi Y., Nakamura S. (1985)** Physical properties and structure of silk. 9. Liquid crystal formation of silk fibroin. *Polym. Comm.* **26**, 60–61
- Mandal M., Trivedi K., Nirmal Kumar S. (2007)** The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. *Caspian J. Env. Sci. Vol. 5 No. 2*: 63-76
- Mandal B. B., Priya A. S., Kundu S. C. (2009)** Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffold and 2-D films: fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. *Acta Biomater.*, **5**: 3007-20
- Matsumoto A., Lindsay A., Abedian B., Kaplan D. L. (2008)** Silk fibroin solution properties related to assembly and structure. *Macromol Biosci.*, **8**(11): 1006-18.
- Michaille J., Garel A., Prudhomme J. C. (1990b)** Cloning and characterization of the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. *Gene*, **86**: 177-184
- Michaille J. J., Couble P., Prudhomme J. C., Garel A. (1986)** A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. *Biochimie*, **68**: 1165-1173
- Michaille J. J., Garel A., Prudhomme J. C. (1989)** The expression of five middle silk gland specific genes is territorially regulated during the larval development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **19**: 19-27
- Michaille J. J., Garel A., Prudhomme J. C. (1990a)** Expression of Ser 1 and Ser2 genes in the middle silk gland of *Bombyx mori* during the fifth instar. *Sericologia*, **30**: 49-6

- Minomura N., Aiba S., Gotoh Y., Tsukada M., Imai Y. (1995)** Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**: 1215-1221
- Mita K., Kasahara M., Sasaki S., Nagayasu Y., Yamada T., Kanamori H., Namiki N., Kitagawa M., Yamashita H., Yasukochi Y., Kadono-Okuda K., Yamamoto K., Ajimura M., Ravikumar G., Shimomura M., Nagamura Y., Shin I. T., Abe H., Shimada T., Morishita S., Sasaki T. (2004)** The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.*, **11**: 27-35
- Mita K., Morymio M., Okano K., Shimada T., Maeda S. (1999)** The construction of EST-database for genome analysis of *Bombyx mori*. *RIKEN Rev.*, **22**: 63-67
- Murakami H. (1984)** Serum-free cultivation of plasmacytomas and hybridomas. In: DW Barnes, DA Sirbasku and GH Sato (Eds) *Methods for Serum-free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells. Alan R. Liss Inc.*, 197-206
- Murase M. (1994)** Method for solubilizing and molding cocoon silk, artificial organ made of cocoon silk, and medical element made of cocoon silk. Japan patent 06-166850A
- Nirmala X., Kodrik D., Žurovec M., Sehnal F. (2001a)** Insect silk contains both a Kunitz-type and unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, **268**(7): 2064-2073
- Nirmala X., Mita K., Vanisree V., Žurovec M., Sehnal F. (2001b)** Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, **10**(5): 437-445
- Ochi A., Nemoto N., Magoshi J., Ohyama E., Hossain K. S. (2002)** *J. Soc. Rheol. Jpn.*, **30**: 289
- Ogawa A., Terada S., Kanayama T., Miki M., Morikawa M., Kimura T., Yamaguchi A., Sasaki M., Yamada H. (2004)** Improvement of Islet Culture with Sericin. *J. Bioscience and Bioengineering*, **98**, No. 3, 217-219
- Okamoto H., Ishikawa E., Suzuki Y. (1982)** Structural analysis of Sericin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.*, **257**: 15192-15199
- Ono M. (1951)** Studies on the growth of the silk gland cell in silkworm larvae. *Bull. Sericult. Exp. Stn.* **13**: 247-303
- Padamwar M. N., Pawar A. P. (2004)** Silk sericin and its applications: A Review. *J. of Scientific and Ind. Research*, **63**: 323-329
- Pauling L., Corey R. B. (1953)** Two rippled-sheet configurations of polypeptide chains, and a note about the pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **39**: 253-256

- Pihan G. A., Wallace J., Zhou Y. (2003)** Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.*, **63**: 1398-1404
- Prudhomme J. C., Couble P., Garel J.P., Daille J. (1985)** Silk synthesis. *In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (edited by Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), 571-594
- Richards M., Tan S., Fong C. Y., Biswas A., Chan W. K., Bongso A. (2003)** Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, **21**(5): 546-56
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Dec.*, **74**(12): 5463-5467
- Sasaki M., Kato N., Watanabe H., Yamada H. (2000a)** Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Oncol. Rep.*, **7**: 1049-1052
- Sasaki M., Yamada H., Kato N., (2000b)** Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. *Nutr. Res.*, **20**: 1505-1511
- Sasaki T., Noda H. (1973)** Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. I. Molecular weight determination in guanidine hydrochloride or urea solutions. *Biochim. Biophys Acta*, **310**: 91-103
- Sehna F. and Sutherland T. (2008)** Silks produced by insect labial glands. *Prion* **2**: 1-9.
- Sehna F. (2008)** Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomol. Res.* **38** (Suppl. 1): S1-S8.
- Sehna F. & Žurovec M. (2004)** Construction of silk fiber core in Lepidoptera. *Biomacromolecules* **5**: 666-674.
- Sehna F., Akai H. (1990)** Insect silk gland: Their types, development and function , and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, **19**: 79-132
- Shimura K., Kikuchi A., Ohmoto K., Katagata Y., Hyodo A (1976)** Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Biochem.*, **80**: 693-702
- Sinohara H. (1979)** Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **63 B**: 87-91
- Siritientong T, Srichana T, Aramwit P. (2011)** The effect of sterilization methods on the physical properties of silk sericin scaffolds. *AAPS PharmSciTech.*, **12**(2): 771-81

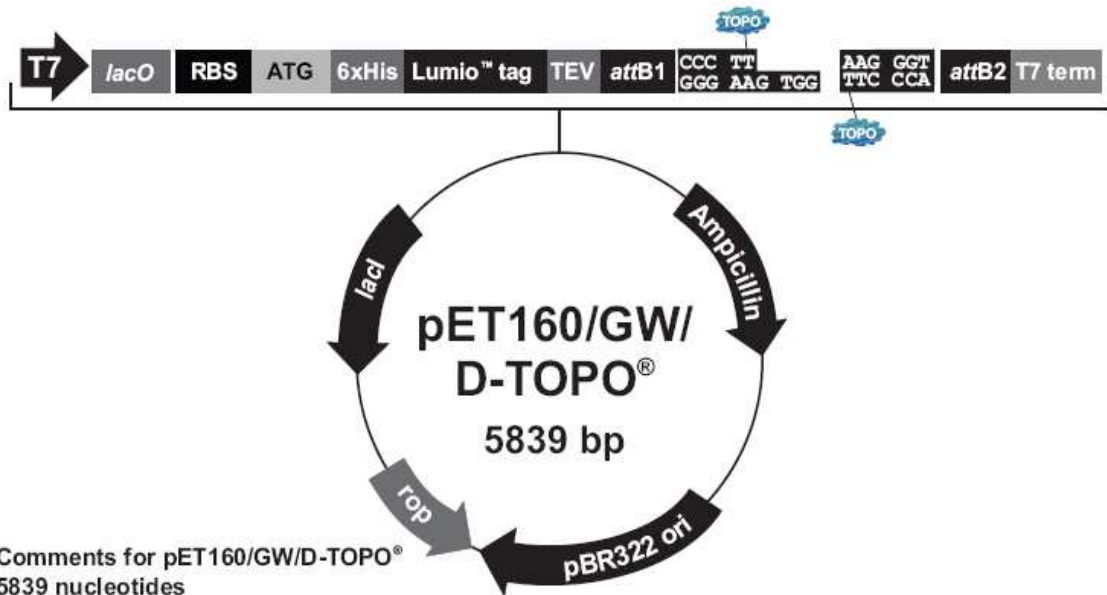
- Sjögren-Jansson E., Zetterström M., Moya K., Lindqvist J., Strehl R., Eriksson P. S. (2005)** Large-scale propagation of four undifferentiated human embryonic stem cell lines in a feeder-free culture system. *Dev. Dyn.*, **233**(4): 1304-14
- Sulitková J. (1999)** Charakterizace sericinových genů Zavíječe voskového (*Galleria mellonella* L.). *Magisterská práce*. České Budějovice.
- Suzuki Y. (1977)** Differentiation of the silk gland. A model system for the study of differential gene action. *Results Probl Cell Differ.*, **8**:1-44.
- Suzuki Y., Brown D. D. (1972)** Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. *J Mol Biol.* **63**(3): 409-29
- Stevens, L. C. (1962)** The biology of teratomas including evidence indicating their origin from primordial germ cells. *Annee Biol.* **1**, 585-610.
- Stover A. E., Schwartz P. H. (2011)** Adaptation of human pluripotent stem cells to feeder-free conditions in chemically defined medium with enzymatic single-cell passaging. *Methods Mol. Biol.*, **767**: 137-46
- Synek L. (2009)** Hedvábnou stezkou po stopách dávných karavan
- Takasu Y., Hata T., Uchino K., Zhang Q. (2010)** Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. And Molecular Biology* **40**: 339-344
- Takasu Y., Yamada H., Saito H., Tsubouchi K. (2005)** Characterization of *Bombyx mori* sericins by the partial amino acid sequences. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **74**: 103-109
- Takasu Y., Yamada H., Tamura T., Sezutsu H., Mita K., Tsubouchi K. (2007)** Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, **37**: 1234-1240
- Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K.(2002)** Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**(12): 2715-2718
- Takei F., Kikuchi Y., Kikuchi A., Mizuno S., Shimura K (1987)** Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells. *J. Cell. Biol.*, **105**(1): 175-180
- Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. (1999a)** Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**: 269-276

- Tanaka K., Kajiyama N., Ishikura A., Waga S., Kikuchi A., Ohtomo K., Takagi T., Mizuno S. (1999b)** Determination of the side of disulphide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biophys. Acta*, **1432**: 92-103
- Tanaka K., Kajiyama N., Ishikura K., Waga s.,Kikuchi A., Ohtomo K., Takagi T., Mizuno S. (1999)** Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. *Mol. Enzymol.*, **1432**: 92
- Tanaka K., Mizuno S. (2001)** Homologues of fibroin L-chain and P25 of *Bombyx mori* are present in *Dendrolimus spectabilis* and *Papilio xuthus* but not detectable in *Antheraea yamamai*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**: 665-677
- Tanaka T. (2001)** Antifrosting method, antifrosting agent and snow melting agent. Japan Patent 2001-055562A
- Terada S., Nishimura T., Sasaki M., Yamada H., Miki M. (2002)** Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology.*, **40**: 3-12
- Terada S., Sasaki M., Yanagihara K., Yamada H. (2005)** preparation of silk protein sericin as mitogenic faktor for better mammalian cell culture. *J. Bioscience and Bioengineering*, **100 (6)**: 667-671
- Terry A. E., Knight D. P., Porter D., Vollrath F. (2004)** *Biomacromolecules.*, **5**: 768
- The International Silkworm Genome Consortium. (2008)** *Insect Biochem. And Mol. Biol.*, **38**: 1036-1045
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. (1998)** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147
- Tsubouchi K., Igarashi Y., Takasu Y., Yamada H. (2005)** Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**: 403-405
- Tsujimoto K., Takagi H., Takahashi M., Yamada H., Nakamori S. (2001)** Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J. Biochem.*, **129**: 979-986
- Vogeli R., Meier j., Blust R. (1993)** Sericin silk protein: unique structure and properties. *Cosmet Toilet*, **108**: 101-108
- Wakabayashi S., Sugioka M. (1994)** Synthetic fiber improved in hygroskopicity. Japan Patent 06-017372A

- Yamada H., Fuha Y., Yuri O., Obayashi M., Arashima T. (1998)** Collagen formation promoters containing sericin, or its hydrolyzates and antiaging cosmetics, Jpn Kokai Tokkyo Koho. JP 10226653 A2 (to Noevirco Ltd, Seiran co Ltd, Japan) P 8; *Chem. Abst.*, **129**(14): 179985
- Yamada H., Fuwa Y. (1993a)** Pervaporation membrane and production thereof. Japan Patent 05 -345118A
- Yamada H., Fuwa Y. (1993b)** Filter membrane and production thereof. Japan Patent 05-345117A
- Yamaguchi K., Kikuchi Y., Takagi T., Kikuchi A., Oyama F., Shimura K., Mizuno S. (1989)** Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol.*, **210**: 127-139
- Yoshioka M., Segawa A., Veda A., Omi S. (2001)** UV absorbing compositions containing fine capsules., Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 2001049233 A2 (to Seiwa Kasei K K Japan) P 14. *Chem. Abst.*, **134**(14): 197870
- Zhang Y.-Q. (2002)** Application of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotech. Advances*, **20**: 91-100
- Zhaorigetu S., Yanaka N., Sasaki M., Watanabe H., Kato N. (2003)** Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem photobiol B* **71**: 11-7.
- Zhou C. Z., Confalonieri F., Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguet M., Perasso R., Li Z. G. (2000)** Fine organization of Bombyx mori fibroin Heavy chain gene. *Nucleic Acid Res.*, **28**: 2413-2419
- Žurovec M., Yang C., Kodrík D., Sehnal F. (1998)** Identification of novel type of silk protein and regulation of its expression. *J. Biol. Chem.*, **273**(25): 15427-15428

8. Přílohy

Příloha 1: Mapa a charakteristika vektoru pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen)



1 AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA
T7 promoter/priming site lac operator

61 TTCCCCTCTA GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACAT **ATG** CAT CAT
RBS
TAC GTA GTA
Met His His

118 CAC CAT CAC CAT GGT GCT GGT GGC TGT TGT CCT GGC TGT TGC GGT GGC
 GTG GTA GTG GTA CCA CGA CCA CCG ACA ACA GGA CCG ACA ACG CCA CCG
 His His His His Gly Ala Gly Gly Cys Cys Pro Gly Cys Cys Gly Gly
6xHis tag Lumio™ tag

166 GGC GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGA ATT ATC ACA AGT TTG TAC AAA AAA
 CCG CTT TTG GAC ATA AAA GTC CCT TAA TAG TGT TCA AAC ATG TTT TTT
 Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ile Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys
TEV recognition site attB1 site
TEV cleavage site

214 GCA GGC TCC GCG GCC GCC CCC TTC ACC AAGGGTGGGC GCGCCGACCC
 CGT CCG AGG CGC CGG CGG GGG AAG TGG TTCCCACCCG CGCGGCTGGG
 Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Phe Thr
PCR product

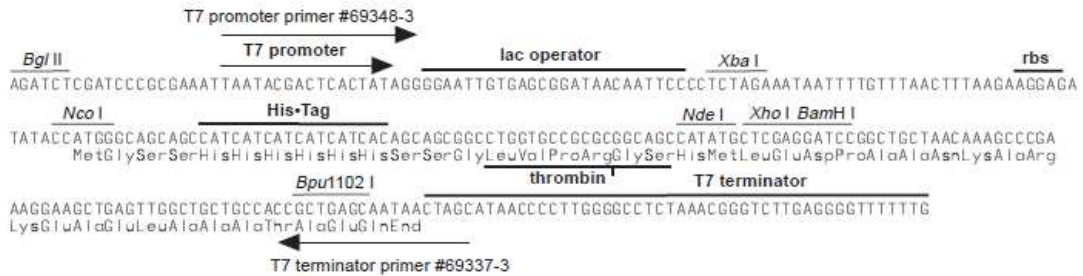
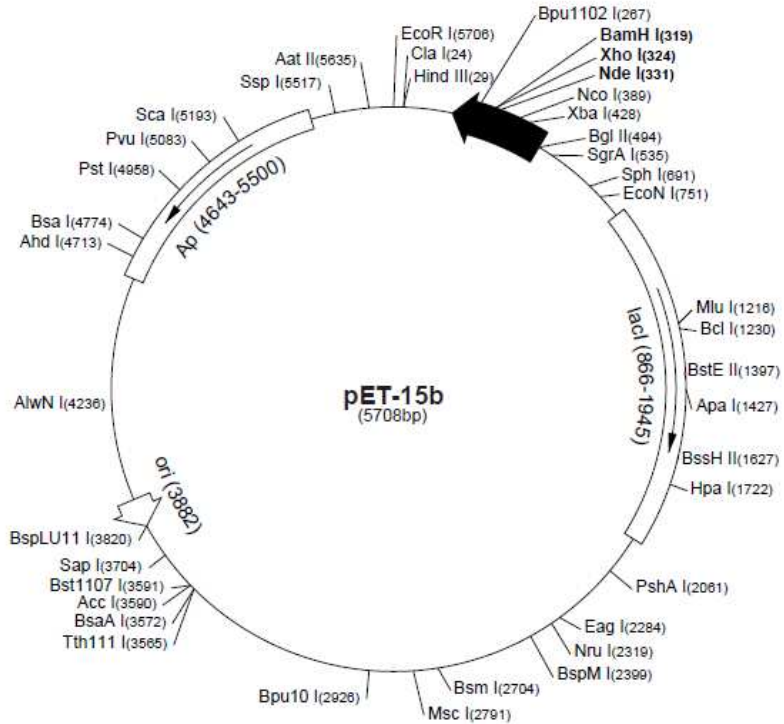
261 AGCTTTCTTG TACAAAGTGG TGATAATTAA TTAAGATCAG ATCCGGCTGC TAACAAAGCC
 TCGAAAGAAC ATGTTTCACC ACTATTAATT
attB2 site

321 CGAAAGGAAG CTGAGTTGGC TGCTGCCACC GCTGAGCAAT AACTAGCATA ACCCCTTGGG
T7 transcription termination region T7 reverse priming site

Příloha 2: Mapa a charakteristika vektoru pET-15b (Novagen)

pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	453-469
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



pET-15b cloning/expression region

Příloha 3: Sekvence genu *Ser-2 Bombyx mori* (žlutě jsou označeny genově specifické

primery).

atgaagatcccatcacgtcttctgtgttccttctgtggg**gcgtggctgtgggtcaacg**cattgccc
M K I P Y V L L F L V G **V A V V N** A L P
aatccacttttcggggcttagttaaatcgcttagcaaaaaaaaaacaaatttttgaggac
N P L F G G L V K S L S K K K Q I F E D
aaatgtgaaaatctcaaagagaatgtgggtgaaaaatttgaaaatctcaaagaaaacgtg
K F E N L K E N V G E K F E N L K E N V
gggtgaaaaagttgaaaatctcaaagagaatgttgggtgaaaaatttagaaaatcaaaagag
G E K V E N L K E N V G E K L E N I K E
aaggctggagaaaaatttgaaaatctcaaagacaatgttggagaaaaatttgaaaatctc
K A G E K F E N L K D N V G E K F E N L
aaagacaatgttggagacaaattagaagcagctaaagaaaaagctggagaaatcaaaaag
K D N V G D K L E A A K E K A G E I K K
aaactagtgatgtcgg**cgaaagatctgaaagacgagc**tcacggaagacaaaaataaag
K L V D V G **E D L K D E** L T E D K K I K
atatccatctcgaaagacgaaggattgactttagaaaaagaaggatacaagtctgattac
I S I S K D E G L T L E K E G Y K S D Y
gatcgtaatgaatatgaagaacgcagatctgaacaccaggaggataacgacagcgacggc
D R N E Y E E R R S E H Q E D N D S D G
tcatacagcaaaagttccgaatacgaaaaaatacgggtgaagaggaaaagtatgaagaacgt
S Y S K G S E Y E K Y G E E E K Y E E R
aggacccacgacaagttctccattggcaagaacggtattagtgcgagcgaacgaaatca
R T H D K F S I G K N G I S A E R T K S
aagagaggtgaaagaaaagaagtcgaaggcgaatatgagaaagactacgaaaggaaagag
K R G E R K E V E G E Y E K D Y E R K E
aacaacggcggatcctccgaatattcagagagagaaagagagagtttgaaaaatcaaaa
N N G G S S E Y S E R E R E S L E K S K
gaaaggtacggcgagcagtcgtctaagtccttctcgttgggtaaatccggcttgaagaag
E R Y G E Q S S K S F S L G K S G L K K
caggataattcaaaatcgtattccgacaaggaagagtcgaaactggaaaaggaaaagaaa
Q D N S K S Y S D K E E S K L E K E K K
tatgaaaagaaaacaaaaatcaacaatgaaaggcagttagatgaagatgagaacgaaagg
Y E K K T K I N N E R Q L D E D E N E R
agaactggttagggccgagatgagcaaaaggcaagatgaccaaagccgagacgaccaaagc
R T V V G R D E Q R Q D D Q S R D D Q S
cgagatgaccaaagccaagatgaggaaaactggcagcgacgatagtgacaaaaatagagga
R D D Q S Q D E E T G S D D S D K N R G
aaggatactgacgataaatattccgagacaggaaccaataaatcatcagaaacgaagaca
K D T D D K Y S E T G T N K S S E T K T
ggcaagcgtgatggctcgaagagcggcgtcacagtcgaaagggaaaaatccgaatccaac
G K R D G S K S G V T V E R E K S E S N
aagaaaagtcgtgaatttgaaaataaagaagctgaatcttcgacctatagggataagaat
K K S R E F E N K E A E S S T Y R D K N
cggtcagtgaacagtggtcggaaacgcaagagttccggtaaaagacgaggagtacagtgaa
R S V N S G S E R K S S G K D E E Y S E
cagaactccagtaataaatcctttaacgacggcgatgcatcggctgactaccaaaccaaa
Q N S S N K S F N D G D A S A D Y Q T K
tctaagaaggttgaaaagaattctgccagagataaaaagaaaagaaaaaactgacaca
S K K V E K N S A R D K K E K E K T D T
agaaattctgacggaacgtacaaaaacttctgagcgcgaaaaagaacaatcttctagagtg
R N S D G T Y K T S E R E K E Q S S R V
aatcaaaagtaagggcagcaactctcgggattcctcggagtcagacaaatctggccgaaaa
N Q S K G S N S R D S S E S D K S G R K
gtgaataaagaaacagaaacgtactctgacaaaagacgcgcagacttcagaaagtgaacgt
V N K E T E T Y S D K D A Q T S E S E R
actcaaagtaagaaaaaaaatacagcgcaccaagaataagggaaggaacctct
T Q S K E K K N T A P K N K G K K G T S

acagaaacagatggagtcactaagaatgctagtaagcagaaggagaaggtgcctaaagat
T E T D G V T K N A S K Q K E K V P K D
ggaagtaaaagctccacgaatgatagcgaaggcaaacaaaaaaacaaagaccaatcaaag
G S K S S T N D S E G K Q K N K D Q S K
ggacagaaaaataatcaagacggacaagactcttcgacgaacgaaaattccaaaaagaca
G Q K N N Q D G Q D S S T N E N S K K T
gatgataatgttgcaaagaaagaagaacccaataatcaaaagagagaacaaaaaggaaag
D D N V A K K E E P N N Q K R E Q K G K
acaagatgtggctctagaaaaactgagagttccaaagcgaagaagatagaagcaagaaa
T R C G S R K T E S S K A K E D R S K K
agcactaccgataaaagaccagcgcgacgacaaaaaagattcctccagcaaaaacatagac
S T T D K D Q R D D K K D S S S K N I D
aagcctaaagatgggtcatcatcggataaagactcagagaaggctaagcctaacgacaga
K P K D G S S S D K D S E K A K P N D R
tcaccatcgcataaaagacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaa
S P S H K D T E K A K P N D R S P S D K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagttcaccatcgcataaaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D S S P S H K D T E K A
aagcataacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K H N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggtaaaacctaacgacagatcaccatcgcataaaagacacagagaaggct
D T E K V K P N D R S P S H K D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaagct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaagctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaagctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaagctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaagctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaaagacacagagaaggtaaaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga

K P N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaaacgacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaagacacagagaaggtaaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagataagacattcgacaaaaacata
K P N D R S P S D K D T D K T F D K N I
gacaataaaaggcccaaggacggttcacatcgcgataagaacgtagagcaggaaaggag
D N K R P K D G S S S D K N V E Q E R E
aactacaaatccgaatctagccgaaatgaatttgaaaacaaaaatctgcacattcgaga
N Y K S E S S R N E F E N Q K S A H S R
tatgaggataacggtggtttgaaagaaaaaagctcgcaatctaagaattacggaagagac
Y E D N G G L K E K S S Q S K N Y G R D
gagaagtacagtgaagagaaggagaggagttccactgggaagtttgatcgaatgactcc
E K Y S T E E K E R S S T G K F G S N D S
cgagcacggttctacaaaagccgaagaggaacatgtcaggaagtcacaagaagaacacat
R A R S T K A E E E H V R K S Q E E T H
tcagagcaacgagaaaaaacaagatctgacggagtgactaaatacaacgatggtgatgag
S E Q R E K T R S D G V T K Y N D G D E
catttcgattcagacgatacagagaagactaagcctaatggcagatcaccatcgcataaa
H F D S D D T E K T K P N G R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcatcctcggataaagacacagagaagcca
D T E K A K P N D R S S S D K D T E K P
tttgacaaaaacatagccaataaaaggcccaaggacggttcacatcgcgataagaacgta
F D K N I A N K R P K D G S S S D K N V
gagcaggaaaggggagaactacaaatccgaatctagccgaaatgaatttgaaaacaaaa
E Q E R E N Y K S E S S R N E F E N Q K
tctgcacattcgagatatgaggataacggtggtttgaaagaaaaaagctcgcaatctaag
S A H S R Y E D N G G L K E K S S Q S K
aattacggaagagacgagaagtacagtgaagagaaggagaggagttccactgggaagtct
N Y G R D E K Y S E E K E R S S T G K S
ggatcgaatgactcccagacggttctacaaaagccgaagaggaacatgtcaggaagtca
G S N D S R A R S T K A E E E H V R K S
caagaagaacacattcagagcaacgaggaagaacaagatctgacggagcaactacgtcc
Q E E T H S E Q R G R T R S D G A T T S
aacgataatgataagcaatacagattcagacgacaagaacaacagtagcaccaaacataag
N D N D K Q Y D S D D K N N S S T K H K
aaaacggtcatgagatctgagcaatcagattcgtctcaaatgaaaattctacctcgaa
K T V M R S E Q S D S S Q N E N S T S E
tccaaaaagttcgcaaaaactgatggctccaacaaatatgaagcggaatcaagttcgcat
S K K F A K T D G S N K Y E A E S S S H
aaacaacaagaagcgcgcaaacagagcaatagagtagtagagaagagcactgatggggac
K Q Q E A R K Q S N R V V E K S T D G D
aatgaggaatcctacaggagcgaagcagcagcagcagcagcagcagttctagtagtagt
N E E S Y R S E S S S S S S S S S S S S S S
cgaagcagttcctcaagcacctacaccggctcccattgatgatagctccgaggaatgacga
R S S S S S T Y T G S H D D S S E E -
Atgggaacatcaactttaacaaaccttgacattaccttatggctttgtgtagttttaagtt

Příloha 4: Aminokyselinová sekvence Sericinu 2

Červeně-zaklonovaný a exprimovaný úsek Ser2

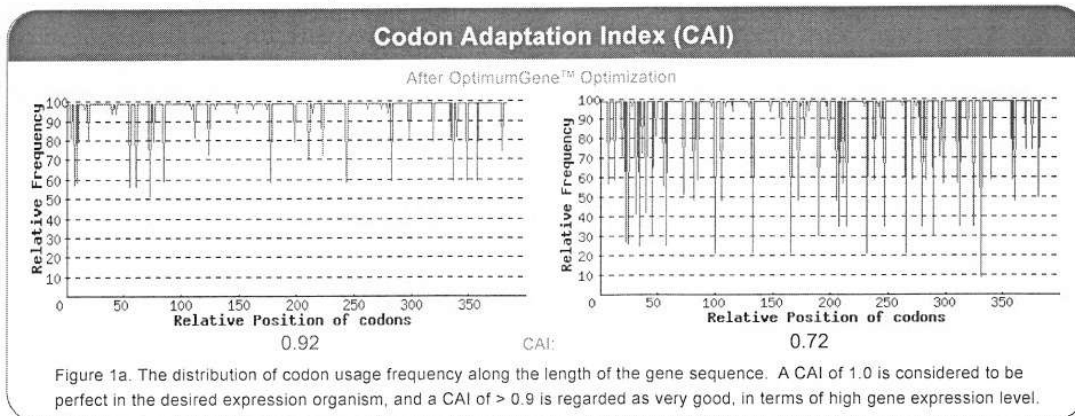
Modře-úsek Ser2, který jsem také klonovala

E1+E2	<u>MKIPYVLLFLV</u> <u>GVAVVNALP</u>	E1/12 residues; and E2/9
E3	<u>NPLFGGLVKSLSKKKQIFED</u>	
	<u>KFENLKENVGEKFNLENVGEKVENLKENVGEKLENIKEKAGEKFNLKDENVGEKFNLKDENVGDKLEAAKEKAGE</u>	
	<u>IKKKLV DVG EDL KDEL T E D K K I K I S I S K D E G L T L E K E G Y K S D Y D R N E Y E E R R S E H Q</u>	E3/153
E4	EDNDS DGSYSKGS EY E K Y G E E K Y E E R R T H D K F S I G K N G I S A E R T K S K R G E R K E V E G E Y E K D Y E R K	E4/66
E5	ENNGSSEYSERERESLEKSKERYGEQSSKSFSLGKSLKQDNSKSYSDKEESKLEKEKYY	E5/62
E6	EKKTKINNERQLDEDENERRTVVGRDEQRQDDQSRDDQSRDDQSDDEETGSDSDSKNRGKDTDDKYSETGKTGKR DG TNKSSETSKSGVTVEREKSESNNKSREFENKEAESSTYR (E6/116)	
E7	DKNRSVNSGSEKSSGKDEEYSEQNSSNKSFN DGDASADYQTKSKKVEKNSARDKKEKEKTD T	E7/63
E8	RNSDGYKTSEREKEQSSRVNQSKGSNRSDESSEKSGRKNVNETETYSKDAQTSERTQSK	E8/64
E9a	EKKNTAPKNGKGGTSTETDGVTKNASKQKEKVPKDGSKSSTNDSEGKQKNKDQSKGQKNNQDGQ DSS TNENSKKTD DNVAKKEEPNNQKREQKGRTRCGSRKTESSKAKEDRSKSTTDKDQRDDKDS SSKNIDKPKD GSSSDK DSEKAKPND <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>SSPSHKDTEKAKHND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSYKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDRDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSYKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDRDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSYKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSHKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDRDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKVKPND</u> <u>RSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTEKAKPND</u> <u>RSPSDKDTDKTFDKN</u>	(E9a/858)
10a	<u>DNGGLKEKSSQSKNYGRDEKYSEEKERSSTGKFGSND SRARSTKAEEEHV RKSQEETHSEQR</u>	E10a/62
9b	<u>EKTRSDGVTKYNDGDEHFDSDDTEKTKPNGRSPSHKDTEKAKPND</u> <u>RSSSDKDTEKPF DKN</u> <u>IANKRPKDGSSSDKNVEQERENYKSESSRNEFENQKSAHSRYE</u>	
E9b/103		
E10b	<u>DNGGLKEKSSQSKNYGRDEKYSEEKERSSTGKSGSND SRARSTKAEEEHV RKSQEETHSEQR</u>	E10b/62
E11	<u>GRTRSDGATTSNDNDKOYDSDDKNNSSTKHKKTVMRSEQSDSSQENSTSESKKFAKTD</u> <u>GSNKYEAESSHKQEQARKQSNRVVEKSTDGDNEESYRSESSSSSSSSSSSSSSSSSSSTYTGS HDSSE</u>	E11/232

Příloha 5: Optimalizovaná sekvence Ser2 (červeně vyznačeny změny kodonů oproti originální sekvenci)

Optimized	12	GGC GT TGCTGT GT GTGAATGC CC TGCCGA ACC CGCT GT TT GG TGGTCT GG TGAAATCG CTG
Original	12	GGCGTGGCTGTGGTCAACGCATTGCCCAATCCACTTTTCGGGGGCTTAGTTAAATCGCTT
Optimized	72	T CG AAAAAAAAA CAAA T CT TT TGAA GACAAATTTGAA AA CC TGAAA G AAA AT GT TTGGCGAA
Original	72	AGCAAAAAAAAAA CAAA TTTT TGAG GACAAATTTGAA AA CT CAAA GAGAAATGTGGGTGAA
Optimized	132	AAAT TC GAA AA CT GA AA GAAA CGTGGGTG AAAA AG TG GAA AA CT GA AA GAAA AT GT C
Original	132	AAATTTGAA AA CT CAAA G AAA CGTGGGTG AAAA AG TT GAA AA CT CAAA GAGAAATGT T
Optimized	192	GGCG AAAA CT GA AA AA CA TCAA AG AAA AG CAG GTG AAAA AT TC G AAA CC TG AA AG AT
Original	192	GGT GAAA AA TTAG AA AA TAT CAAA GAGAA AGC TGGAG AAAA AT TT G AAA CT CAAA AG C
Optimized	252	AAC GT CG CG CA AA AA ATTT GAAA AT CT G AA AG AT AA TGT GGGTG ACAAA CT GG AA GC GG CC
Original	252	AA TGT TTGGAG AAAA ATTT GAAA AT CT CA AA AG CA AT GT TTGGAG CAAA TT TA G AA GC AG CT
Optimized	312	AAAG AAAA AG CG GG CG AA ATCAA AA AAAA CT GT TT GAC GT TG CG GAAG AC CTG AA AG AC
Original	312	AAAG AAAA AG CT GGAG AAATCAA AA AGAA ACT AG TGGAT GT CG CG GA AGATCT G AA AG AC
Optimized	372	GAAC AT CAT CAT CAT CAT CAT CA CTAA
Original	372	GAG CAT CAT CACC AT CACC ATT G A

1. Codon usage bias adjustment



2. GC Content Adjustment

