

# Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Barbora Mikulová

## **Expres vaskulárního endotelového růstového faktoru a jeho využití v cévním tkáňovém inženýrství**

Vascular Endothelial Growth Factor Expression  
and its Application in Vascular Tissue Engineering

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Školitel: doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Praha, 2015

Tato diplomová práce byla vypracována na Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství na Fyziologickém ústavu AV ČR, v Praze v období říjen 2013 - září 2015.

### ***Prohlášení***

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením mých školitelů doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a doc. MUDr. Lucie Bačákové, CSc. Všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne .....

Podpis.....

## ***Poděkování***

Ráda bych vyjádřila své poděkování všem kolegům a kolegyním, kteří se na této diplomové práci jakýmkoliv způsobem podíleli, za příjemnou spolupráci a pomoc, kterou mi během práce ochotně poskytli. Ráda bych poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Konvalinkovi z Katedry biochemie (PřF UK) za cenné rady a podporu, mé velké díky patří také našim spolupracovníkům z Ústavu makromolekulární chemie, zejména Ing. Tomáši Riedelovi, Ph.D., Ing. Milanu Houskovi, CSc. a RNDr. Eduardu Bryndovi, CSc., za mnoho užitečných rad v oblasti týkající se modifikace povrchu biomateriálu. Další, komu patří slova díky, je prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc., FRSC, vedoucí Laboratoře biotransformací (MBÚ AV ČR), za podporu a odborné rady při expresi proteinu.

Velké poděkování patří mým konzultantům Ing. Janě Havlíkové z Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství (FgÚ AV ČR) a Ing. Ondřeji Kaplanovi, Ph.D. z Oddělení biomateriálů a bioanalogických systémů (ÚMCH AV ČR), za vždy vstřícnou spolupráci, trpělivost, cenné rady, přátelskou atmosféru a čas, který mi během práce věnovali.

Nejhlubší poděkování bych ráda věnovala své školitelce doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc., vedoucí Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství (FgÚ AV ČR), za pečlivé vedení celé diplomové práce, cenné rady, podporu a motivaci.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia a v neposlední řadě děkuji svým rodičům za dlouholetou podporu v mé cestě za vzděláním.

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá expresí vaskulárního endotelového růstového faktoru (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) a jeho využitím v tkáňovém inženýrství cévní stěny. V průběhu práce byla sledována interakce endotelových buněk s modifikovaným biomateriálem na bázi fibrinu, do kterého byl inkorporován růstový faktor cévního endotelu (VEGF-A121). Tato modifikace podpořila adhezi a růst endotelových buněk.

Vaskulární endotelový růstový faktor VEGF-A121 je signální glykoprotein, který aktivuje transmembránové receptory na endotelových buňkách. VEGF-A121 je klíčovým regulátorem při vaskulogenezi, angiogenezi, proliferaci, migraci a přežití endotelových buněk. V rámci této práce byl tento protein heterologně exprimován s fúzním partnerem thioredoxinem v expresním systému *E. coli* Origami B (DE3). Rekombinantní VEGF-A121 byl navíc koexprimován s bakteriálními chaperony GroEL/GroES pro možné zvýšení jeho rozpustnosti a biologické aktivity.

V další části této práce byla na povrchu polystyrenu katalytickým působením trombinu navázaným na adsorbovanou monovrstvu fibrinogenu připravena tenká fibrinová síť. Takováto síť byla dále obohacena o růstový faktor cévního endotelu (VEGF-A121), který do ní byl kovalentně inkorporován pomocí enzymové aktivity transglutaminasy (faktoru XIIIa).

Poslední část je věnována cévnímu tkáňovému inženýrství, kdy byl sledován vliv růstového faktoru VEGF-A121 na růst endotelových buněk pomocí testů metabolické aktivity. Aktivita VEGF-A121 byla následně porovnána s komerčně dostupným růstovým faktorem. Rekombinantně připravený růstový faktor VEGF-A121 vykazoval vyšší biologickou aktivitu a podpořil růst endotelových buněk na povrchu substrátu, a sice polystyrenu.

**Klíčová slova:** růstový faktor, VEGF-A121, endotelové buňky, povrchová modifikace, heterologní exprese, cévní tkáňové inženýrství

## ABSTRACT

This paper deals with the expression of vascular endothelial growth factor (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) and its use in tissue engineering of vascular wall. During the work interaction of endothelial cells with the modified fibrin-based biomaterial into which vascular endothelial growth factor (VEGF-A121) has been incorporated was monitored. This modification supported the adhesion and growth of endothelial cells.

Vascular endothelial growth factor VEGF-A121 is signal glycoprotein that activates transmembrane receptors on endothelial cells. VEGF-A121 is a key regulator in vasculogenesis, angiogenesis, proliferation, migration and survival of endothelial cells. In this work, this protein was heterologously expressed at a thioredoxin fusion partner in an expression system of *E. coli* Origami B (DE3). Recombinant VEGF-A121 was additionally coexpressed with bacterial chaperones GroEL/GroES for potential increase of its solubility and biological activity.

In the next part of this work thin fibrin network was prepared by catalytic action of thrombin on the polystyrene-bound monolayer of fibrinogen. This network has been further enriched by vascular endothelial growth factor (VEGF-A121), which was covalently incorporated in it by enzyme activity of transglutaminase (factor XIIIa).

The last part of the thesis is devoted to the vascular tissue engineering. The influence of the growth factor VEGF-A121 on endothelial cell growth was monitored using tests of metabolic activity. The activity of VEGF-A121 was then compared with a commercially available growth factor. Recombinantly prepared growth factor VEGF-A121 showed higher biological activity and promoted endothelial growth of cells on the substrate surface, namely polystyrene.

**Keywords:** growth factor, VEGF-A121, endothelial cells, surface modification, heterologous expression, vascular tissue engineering

(in Czech)

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1. LITERÁRNÍ ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
1.1 Stavba cév .....	10
1.1.1 <i>Tunica intima</i> .....	10
1.1.2 <i>Tunica media</i> .....	10
1.1.3 <i>Tunica externa</i> .....	11
1.2 Tkáňové komponenty cévní stěny.....	12
1.2.1 <i>Endotel</i> .....	12
1.2.2 <i>Hladká cévní svalovina</i> .....	13
1.2.3 <i>Mezibuněčná hmota</i> .....	13
1.3 Patologie cév .....	14
1.3.1 <i>Endotelová dysfunkce</i> .....	15
1.3.2 <i>Ateroskleróza</i> .....	15
1.4 Tkáňové inženýrství .....	16
1.5 Cévní náhrady a materiály pro jejich konstrukci .....	17
1.5.1 <i>Syntetické polymery</i> .....	18
1.5.2 <i>Přírodní polymery</i> .....	20
1.6 Využití fibrinových sítí v tkáňovém inženýrství.....	23
1.6.1 <i>Vazba proteinů na fibrin</i> .....	24
1.7 Růstové faktory .....	25
1.7.1 <i>Vaskulární endotelový růstový faktor</i> .....	27
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIÁL .....</b>	<b>30</b>
3.1 Chemikálie a materiály .....	30
3.1.1 <i>Mikroorganismy a plasmidy</i> .....	30
3.1.2 <i>Kultivační a udržovací media</i> .....	30
3.1.3 <i>Roztoky a pufry</i> .....	32
3.1.4 <i>Chemikálie, kity a další materiál</i> .....	35
3.2 Přístroje a pomůcky.....	36
<b>4. METODY .....</b>	<b>38</b>
4.1 Návrh a příprava konstruktů pro expresi VEGF-A121 .....	38
4.2 Příprava kompetentních hostitelských buněk <i>E. coli</i> .....	39
4.3 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> tepelným šokem .....	39
4.4 Kultivace bakteriálních buněk <i>E. coli</i> na tuhém mediu .....	40
4.5 Příprava kryokonzerv buněk <i>E. coli</i> .....	40
4.6 Submerzní kultivace bakteriálních buněk <i>E. coli</i> .....	40
4.7 Heterologní exprese rekombinantního proteinu VEGF-A121 .....	40

4.8 Koexprese rekombinantního proteinu s molekulárními chaperony .....	41
4.9 Gravimetrické stanovení buněčné sušiny .....	42
4.10 Extrakce proteinů z rekombinantních bakterií E. coli.....	42
4.11 Purifikace proteinů .....	43
4.12 SDS elektroforéza .....	44
4.13 Stanovení proteinů .....	45
4.14 Stanovení aktivity rekombinantního proteinu VEGF-A121 .....	45
4.15 Příprava fibrinových sítí.....	46
4.16 Štěpení fibrinové sítě.....	46
4.17 ELISA VEGF-A121 .....	47
4.18 Nasazování buněk .....	47
4.19 Barvení buněk .....	48
4.20 Měření relativního počtu buněk na základě jejich metabolické aktivity.....	48
4.21 Měření relativního počtu buněk na základě kvantitativního stanovení DNA.....	49
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>50</b>
5.1 Návrh genu kódující růstový faktor VEGF-A121.....	50
5.2 Produkce proteinu VEGF-A121 .....	50
5.3 Purifikace proteinu VEGF-A121 .....	53
5.4 Štěpení fúzní části rekombinantního proteinu VEGF-A121 .....	55
5.5 Ověření biologické aktivity rekombinantního proteinu VEGF-A121 .....	59
5.6 Zabudování rekombinantního proteinu VEGF-A121 do fibrinové sítě .....	61
5.7 Proliferace endotelových buněk s imobilizovaným VEGF-A121 na fibrinových povrchích.....	61
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>66</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>73</b>

## SEZNAM ZKRATEK

2YT	kultivační medium pro bakteriální kultury
AMP	ampicilin
APS	amonium persulfát
ATB	antibiotikum
BSA	hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CAM	chloramfenikol
CFE	buněčný extrakt ( <i>cell free extract</i> )
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBM-2	kultivační medium pro tkáňové kultury ( <i>endothelial basal medium-2</i> )
ECM	mezibuněčná hmota ( <i>extracellular matrix</i> )
EDTA	ethylendiamintetraacetát sodný
EGF	epidermální růstový faktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGM-2	kultivační medium pro tkáňové kultury ( <i>endothelial growth medium-2</i> )
ELISA	enzymatická imunosorbentní eseje ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EtOH	ethanol
FGF	růstový faktor fibroblastů ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FXIII, FXIIIa	faktor XIII, aktivovaný faktor XIII
HEK	označení buněčné linie lidských embryonálních ledvinných buněk ( <i>human embryonic kidney</i> )
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HUVEC	endotelové buňky z lidské pupečnickové žíly ( <i>human umbilical vein endothelial cell</i> )
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor-I ( <i>insulin-like growth factor-I</i> )
IPTG	isopropyl-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
KAN	kanamycin
L-ara	L-arabinoza
LB	kultivační medium pro bakteriální kultury
LDL	nízkodenzitní lipoprotein ( <i>low density lipoprotein</i> )



mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NRP-1	neuropilin-1
OD, OD <sub>610</sub>	optická denzita, optická denzita při 610 nm
PBS	fyziologický roztok pufovaný fosfáty ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PDGF	růstový faktor odvozený od krevních destiček ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
PET	polyethylentereftalát
PIGF	placentární růstový faktor ( <i>placental growth factor</i> )
PTFE	polytetrafluorethylen
PU	polyuretan
Pufr "A"	Tris/HCl pufr
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
SOB	medium pro přípravu kompetentních buněk
TE	pufr Tris/HCl/EDTA
TET	tetracyklin
TGF- $\beta$	transformační růstový faktor- $\beta$ ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VascuLife	kultivační medium pro tkáňové kultury
VE-kadherin	vaskulární endotelový kadherin
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR	receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru ( <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> )
XTT	2,3-Bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

# 1. LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1 Stavba cév

Cévní soustava je rozsáhlý systém trubic, kterými proudí tělní tekutiny. Podle obsažené tekutiny se cévní soustava dělí na systém krevních cév, ve kterých cirkuluje krev v uzavřeném oběhu a na systém lymfatických cév obsahujících lymfu, která se sbírá z mezibuněčných štěrbin vaziva většiny orgánů a tkání do mízních vlásečnic. Z nich postupně protéká mízními cévami do větších mízních kmenů, které nakonec vyústí do krevních cév. Vnitřní povrch každé cévy tvoří jedna vrstva endotelových buněk.

Cévní stěny odpovídají svojí strukturou funkčním nárokům jednotlivých úseků cévního řečiště. K těmto stavebně charakteristickým úsekům patří tepny (arterie), které se postupně větví ve stále tenčí až v nejtenčí, zvané arterioly. Ty následně přecházejí ve vlásečnice a kapiláry, které pokračují do nejtenčích žil, které se nazývají venuly<sup>1</sup>.

Ve stěnách většiny cév se rozlišují tři vrstvy, jsou to vnitřní *tunica intima*, střední *tunica media* a vnější *tunica externa (adventitia)* (Obr. 1.1)<sup>1, 2</sup>.

### 1.1.1 Tunica intima

Tunica intima (vnitřní vrstva) je složena z jedné vrstvy endotelových buněk, které jsou podloženy sítí elastických a kolagenních vláken nebo elastickými blankami. Elastická vlákna a blanky se souhrnně označují jako *membrana elastica interna*. Na straně dotýkající se lumen je vystlána endotelem, který se nachází na bazální membráně (lamina basalis). Bazální membrána, tvořená kolagenem typu IV a lamininem, nasedá na subendotelovou vrstvu vaziva a může obsahovat hladké svalové buňky. Vnitřní vrstvě cévní stěny dodává dostatečnou pružnost při objemových změnách. Ve větších tepnách je ještě mezi endotel a elastická vlákna vložena jemná vrstva vaziva<sup>1, 2</sup>. Tato vrstva subendotelového řídkého vaziva se skládá převážně z mezibuněčné hmoty (ECM), která je tvořena kolagenem, elastinem, lamininem, fibronektinem a glukosaminoglykany, které produkují endotelové buňky (heparinsulfát) a buňky hladkého svalstva (kyselina hyaluronová)<sup>3, 4</sup>.

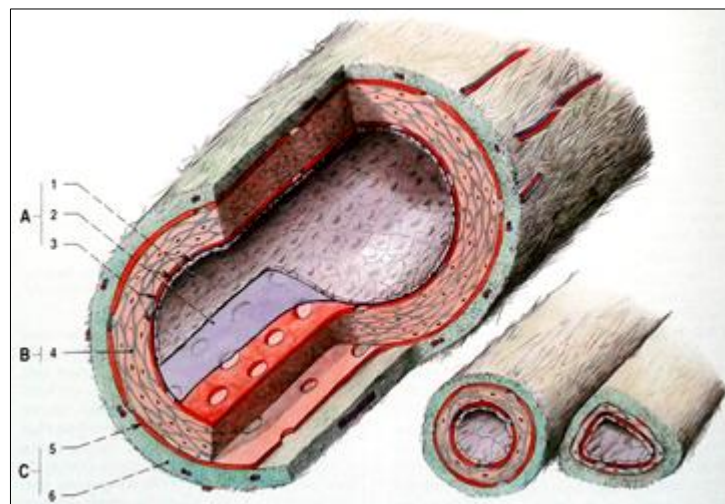
### 1.1.2 Tunica media

Tunica media (střední vrstva) je nejsilnější vrstva stěny tepny. Skládá se z hladké svaloviny, jejíž buňky probíhají cirkulárně nebo v nízkých spirálovitých závitech a mezi

nimiž a kolem nichž je mezibuněčná hmota, která je tvořena kolagenem typu III, elastinem a proteoglykany. Všechny tyto složky produkují buňky hladké svaloviny. Poměr mezi buňkami hladké svaloviny a ECM závisí na typu cévy. *Membrana elastica externa* je dvourozměrná síť z elastických vláken, syntetizovaných hladkými svalovými buňkami medie. *Membrana* je prostoupena otvory, které umožňují difuzi látek skrze cévní stěnu. Tunica media dodává cévě schopnost kontrakce, díky které odolává krevnímu tlaku<sup>1, 2, 4</sup>.

### 1.1.3 Tunica externa

Tunica externa (cévní adventitia, zevní vrstva) je povrchovou vrstvou cévy, tvořenou z fibrilárního vaziva s kolagenními (kolagen typu I) a elastickými vlákny, která se na povrchu cévy síťovitě překládají a přecházejí do vaziva v nejbližším okolí cévy, jímž ji pružně fixují k okolí. Adventitia obsahuje fibroblasty, proteoglykany, převážně orientovaná elastická vlákna a kolagenní vlákna poskládaná do podoby harmoniky. Kromě toho jsou v této vrstvě obsaženy i další podpůrné struktury jako jsou nervy a krevní nebo lymfatické cévy cévní stěny (*vasa vasorum*). *Vasa vasorum* neboli cévy cév zásobují cévní stěnu živinami<sup>1, 2, 4</sup>.



**Obr. 1.1: Schéma obecné stavby cévní stěny.**

Vrstvy cévní stěny u arterie střední velikosti, svalového typu; vpravo zobrazeny proporce jednotlivých vrstev stěny (upraveno podle [1]).

A tunica intima : (1) endotel, (2) lamina basalis endotelu a subendotelová vrstva vaziva, (3) membrana elastica interna, B tunica media: (4) buňky hladké svaloviny, C tunica externa: (5) membrana elastica externa, (6) vazivo adventicie

## 1.2 Tkáňové komponenty cévní stěny

Nejdůležitějšími histologickými součástmi cévní stěny jsou endotelové buňky, hladká cévní svalovina a mezibuněčná hmota. Endotelové buňky vystylají cévy a představují bariéru mezi intra- a extravaskulárním prostorem. Hladká cévní svalovina, je zodpovědná za napětí cévní stěny, regulaci průsvitu cévy a tvorbu mezibuněčné hmoty. Mezibuněčná hmota je tvořena proteoglykany, kolagenními a elastickými vlákny, a spoluurčuje mechanické vlastnosti cévní stěny<sup>2</sup>.

### 1.2.1 Endotel

Endotel, epitel mezenchymálního původu, se skládá z jedné vrstvy polygonálních buněk. Tyto buňky leží na bazální lamině a jsou svojí dlouhou osou orientovány ve směru proudu krve. Mezi endotelovými buňkami existují tři typy buněčných spojení: adhezivní (desmozomy), které zajišťuje transmembránový protein (VE-kadherin), těsná spojení (tight junctions) a komunikační (gap junctions). Tyto spoje ovlivňují průnik složek plazmy a zabraňují styku krevních buněk s mezibuněčnou hmotou.

Endotel je pokryt silnou vrstvou glykokalyxu složeného z oligosacharidů, glykoproteinů a proteoglykanů. Jeho funkcí je chránit buňku před mechanickým a chemickým poškozením. Glykokalyx propůjčuje endotelovým buňkám nesmáčivý povrch a silný záporný náboj, který je důležitý pro selektivní propustnost endotelu. Řada procesů uvnitř krevních cév, je ovlivněna vazbou protizánětlivých látek, růstových faktorů, cytokinů, chemokinů a enzymů. Vazba těchto molekul je také zprostředkována pomocí glykokalyx<sup>2,3</sup>.

Endotelové buňky tvoří s mezibuněčnou hmotou buněčné spoje nazývané fokální adheze, které ovlivňují průtok a napětí v tepnách<sup>2,5</sup>. Ke komunikaci s okolím a interakcím buněk s mezibuněčnou hmotou dochází pomocí buněčných receptorů, mezi něž patří velká skupina adhezních receptorů (integriny). Tvoří rozsáhlou nadrodinu přibližně 20 rozdílných heterodimerů glykoproteinové povahy, z nichž každý obsahuje nekovalentně vázanou alfa a beta ( $\alpha$  a  $\beta$ ) podjednotku<sup>6</sup>. Integriny spojují ECM vně buňky s cytoskeletem uvnitř buňky. Za spojení zodpovídá fibronectin, u něhož jedna část molekuly se váže na kolagen, zatímco jiné části jsou přichytnými místy pro buňku. Extracelulární doména integrinu se váže k fibronektinu, druhý konec integrinové molekuly, ten v cytosolu, vytváří přichytné místo pro aktinová vlákna (Obr. 1.2)<sup>7</sup>. Dále pak endotelové buňky odpovídají

za vznik řady dalších molekul, mezi které patří růstové faktory nebo vazoaktivní látky působící na průsvit cév jako např. prostaglandiny, tromboxany, oxid dusný (NO) a endoteliny<sup>2, 5</sup>.

### **1.2.2 Hladká cévní svalovina**

Hladká cévní svalovina se vyskytuje téměř ve všech částech oběhové soustavy, jedinou výjimkou jsou kapiláry, kde ji nahrazují pericyty, které obklopují endotelové buňky. Hladké svalové buňky tvoří jedinou buněčnou složku *tunica media* elastických tepen a hlavní složku této vrstvy ve svalových tepnách. V menší míře se vyskytuje i v intimě a adventicii cév.

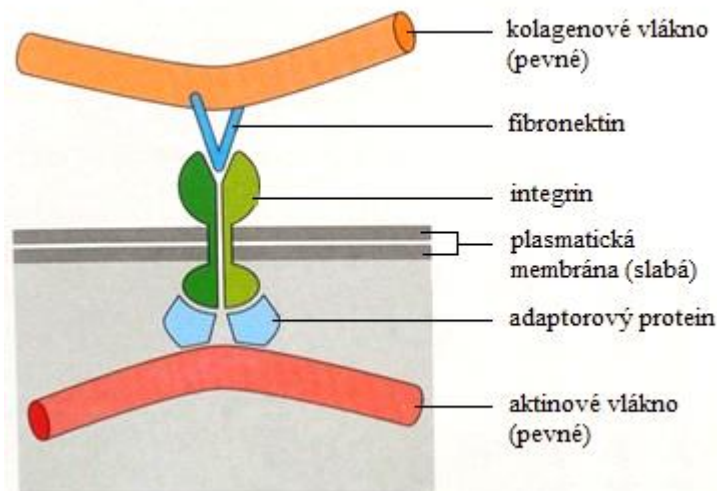
Každá hladká svalová buňka je obklopena extracelulární vrstvou, kterou sama vytváří, a kde se vyskytuje především kolagen typu III, který umožňuje ukotvit buňku k sousedním elastickým vláknům. Toto uspořádání zajišťuje smršťování sítí elastických vláken a membrán. Komunikaci mezi buňkami a přenos nervových signálů umožňují tzv. nexy, které spojují svalové buňky<sup>8</sup>.

### **1.2.3 Mezibuněčná hmota**

Mezibuněčná hmota (extracelulární matrix, ECM) je základním strukturním elementem tkání, a je složena z polysacharidů a proteinů. Extracelulární matrix poskytuje buňkám mechanickou oporu, obsahuje molekuly jako proteoglykany, fibronektin, kolagen či laminin, mající určité funkční domény, které slouží jako vazebné ligandy pro adhezi buněk. Mechanická pevnost tkáně je určena množstvím a typem kolagenů v příslušné tkáni, zatímco pružnost tkáně je dána prostřednictvím proteoglykanů. Tuhost a pružnost jednotlivých struktur je dána stupněm agregace a vzájemným poměrem vláknitých a amorfních složek ECM.

Mezibuněčná hmota se uplatňuje při procesu hojení ran. Poškození tkáně je provázáno porušením cévních stěn a srážením krve. Krevní destičky produkují proteiny mezibuněčné hmoty. Spolu s těmito proteiny napomáhají hojení i bílé krvinky, neutrofilové buňky, keratinocyty a makrofágy řídící výstavbu nové tkáně. Složky ECM hrají významnou roli v každém stupni hojení, během tohoto procesu vytvoří dočasnou matici ("lešení"), která je nezbytná k regeneraci poškozené tkáně. Zmíněné komponenty ECM také zastávají komunikační funkci tím, že přenášejí signály během

probíhající biologických reakcí. V procesu hojení složky ECM stimulují adhezi a migraci buněk a zároveň zprostředkovávají interakci mezi buňkami a matricí, dále pak slouží jako modulátory cytokinů a růstových faktorů. Dočasná matrice, tvořená především fibrinem a fibronektinem, je nahrazena kolagenem. Kolagenní vlákna navíc obsahují proteoglykany, glykosaminoglykany a nekolagenní glykoproteiny (laminin). Prozatímní tkáň se nazývá granulační, tvořená hlavně kolagenem typu I a III, která je způsobena vrůstáním cévních pupenů. Matrice granulační tkáň obsahuje velké množství kyseliny hyaluronové a fibronektinu. Molekuly kyseliny hyaluronové mají schopnost bobtnání a vytváří strukturu, která umožňuje proniknout buňkám do poraněné oblasti. Po čase se tkáň stahuje a nakonec vytvoří jizvu<sup>9</sup>.



**Obr. 1.2: Molekulové spojení mezibuněčné hmoty a cytoskeletu.**

Transmembránové spojení zprostředkované integrinovou molekulou. Molekula integrinu přenáší napětí přes plasmatickou membránu, uvnitř buňky je připojena k cytoskeletu a vně přes fibronektin k extracelulární matrix (upraveno podle [7]).

### 1.3 Patologie cév

Kardiovaskulární onemocnění představují příčinu přibližně 50 % úmrtí. Jedním ze způsobů, jak tomuto problému zabránit, je zlepšení preventivních opatření, která vedou k odhalení nemoci v počátečních fázích a přispějí k včasnému zahájení léčby. V počátečních fázích rozvoje procesu, který může vyústit v komplikované aterosklerotické

léze, jsou zjistitelné pouze funkční změny. Toto stadium, které vzniku aterosklerotických lézí předchází, se nazývá endotelová dysfunkce.

Poškozením struktury endotelu vzniká aterosklerotická léze, která může být způsobena různými škodlivinami. V místě porušení adherují trombocyty a uvolňují mitogeny (látky navozující mitózu), které stimulují proliferaci hladkého svalstva a produkci mezibuněčné hmoty. Nadbytek mezibuněčné hmoty způsobuje vyšší syntézu kolagenu, elastinu i proteoglykanů<sup>10, 11</sup>.

Dysfunkce endotelu je vnímána jako plně reverzibilní předstupeň aterosklerózy, která předchází vzniku prvních morfologicky patrných změn arteriální cévní stěny. Vznik a rozvoj endotelové dysfunkce je podmíněn souhrou řady faktorů, známých jako rizikové faktory aterosklerózy. Nejdůležitější rizikové faktory endotelové dysfunkce a aterosklerózy jsou kouření, diabetes mellitus 2. typu, arteriální hypertenze, obezita a stres<sup>11</sup>.

### **1.3.1 Endotelová dysfunkce**

Endotelová dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu. Toto poškození způsobuje zvýšenou propustnost cévní stěny, nerovnováhu mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími nebo stimujícími látkami<sup>12</sup>. Dysfunkční endotel v počáteční fázi vzniku aterosklerózy má vyšší propustnost pro aterogenní lipidy a makrofágy<sup>13</sup>.

Při endotelové dysfunkci dochází ke zvýšené expresi adhezivních molekul a produkci cytokinů, které usnadňují hromadění monocytů v cévní stěně a jejich přeměnu v makrofágy a pěnové buňky. Nedostatečná produkce NO vede k uplatnění řady růstových faktorů, stimujících buňky hladkého svalstva k migraci do subendotelových prostorů a k produkci extracelulární vazivové komponenty aterosklerotických lézí<sup>12</sup>.

### **1.3.2 Ateroskleróza**

Ateroskleróza je jednou z hlavních příčin kardiovaskulárních onemocnění. Jde o chronické zánětlivé onemocnění, charakterizované endotelovou dysfunkcí s následným hromaděním lipidů, leukocytů, hladkých svalových buněk a extracelulární matrix v intimě cév, což vede k zužování až k úplnému ucpání cévní stěny a zamezení krevního průtoku.

Mechanismus vzniku a rozvoje aterosklerózy není dosud jednoznačně objasněn. Nejrozšířenější je tzv. response-to-injury teorie. Poškození endotelu způsobuje vaskulární

zánět s následnou fibroproliferativní odpovědí. Za možné příčiny tohoto poškození se považuje LDL (*Low Density Lipoprotein = nízkodenzitní lipoprotein*), infekční agens, toxiny včetně produktů cigaretového kouře, hyperglykemie a hyperhomocysteinemie. Cirkulující monocyty přestupují do intimy a působí jako úklidové buňky, pohlcují cholesterol a mění se v lipofágy, tzv. pěnové buňky. Tyto buňky produkují množství faktorů, některé mohou endotel poškozovat, některé působí jako růstové faktory stimulující hladké svalové buňky k proliferaci.

Místa aterosklerotického poškození nejsou náhodná. Aterosklerotické pláty se charakteristicky vyskytují v místech větvení či zakřivení tepen a tam, kde krevní proud podstupuje rychlé změny ve směru a rychlosti toku. Typický aterosklerotický plát se skládá z měkkého lipidového trombogenního jádra pokrytého směrem k cévnímu lumen fibrózním krytem, který obsahuje hladké svalové buňky a zánětlivé buňky, především makrofágy. Makrofágy obsahují převážně oxidované LDL. Ateroskleróza může postihovat tepny mozku, srdce, ledvin i dalších orgánů a také končetin<sup>14-16</sup>.

#### **1.4 Tkáňové inženýrství**

V některých případech, v pokročilých stavech nemoci, je nutné nevratně poškozenou cévu nahradit a to náhradou autologní nebo náhradou umělou<sup>17</sup>. Problematikou především umělých náhrad se zabývá tkáňové inženýrství.

Tkáňové inženýrství vzniklo jako reakce na nedostatek tkání a orgánů vhodných pro transplantace. Jedná se o mezioborovou disciplínu, která kombinuje inženýrské metody s přírodními vědami za účelem vývoje biologických náhrad. Biologické náhrady by měly obnovit či zlepšit funkci poškozených tkání a orgánů<sup>18</sup>. V tkáňovém inženýrství se k vytvoření takové biologické náhrady používají biomateriály jako podpůrné struktury v kombinaci s buňkami, které prorůstají materiálem, až dojde k vytvoření nové tkáně. Pro účely náhrad se používají buď biologické nosiče jako např. decelularizované tkáně, nebo se jako nosiče využívají umělé materiály, které mají stimulovat mezibuněčnou hmotu daného štěpu<sup>19</sup>.

Umělý nosič buněk neslouží pouze jako mechanická opora, ale měl by také napodobovat funkci mezibuněčné hmoty. To znamená, že umělý materiál reguluje rozsah a sílu adheze buněk, jejich růstovou aktivitu, diferenciaci a maturaci buněk do určitého fenotypu a další buněčné funkce. Materiály, které se v současnosti používají



v cévním tkáňovém inženýrství pro vývoj umělých cévních náhrad, lze rozdělit do dvou základních skupin: syntetické a přírodní polymery<sup>20,21</sup>.

### **1.5 Cévní náhrady a materiály pro jejich konstrukci**

V klinické praxi se za nejkvalitnější náhradu poškozených cév považuje autologní céva. Typickým příkladem je aortokoronární bypass vytvořený z podkožních žil dolních končetin pacienta. Nicméně tyto náhrady mají řadu nevýhod. Značným problémem je dostupnost kvalitní cévy pro vytvoření náhrady, protože značná část starší populace trpí cévními chorobami (ateroskleróza). U zdravých pacientů bývá problémem odebrání dostatečného množství tkáně pro vytvoření umělé cévní náhrady<sup>21</sup>. Pokud pacient nemá vhodné cévy, které by mohly být použity jako cévní štěp, je možné mu implantovat cévní náhradu z umělého materiálu, která není osazena buňkami.

V současné době se využívají cévní náhrady vyrobené ze syntetických polymerů, jako jsou polyethylentereftalát (PET) nebo polytetrafluoroethylen (PTFE). Tyto materiály mají poměrně dobré mechanické vlastnosti a jsou odolné proti tlaku v cévním řečišti<sup>22</sup>. Tyto cévní protézy mají však poměrně mnoho negativních fyzikálních vlastností. Především zabraňují úspěšnému vhojení a jsou vysoce hydrofobní. To je hlavní faktor, který omezuje adhezi buněk, tedy i případný vznik souvislé zralé endotelové vrstvy. Vrstva endotelu je považována za nejkvalitnější povrch, na kterém nedochází ke vzniku krevních sraženin. Umělé cévy s velkými průměry nemají uvnitř vrstvu endotelových buněk, avšak její absence není faktorem, který by omezoval dlouhodobou průchodnost cévy. Samotná rychlost průtoku krve totiž zamezuje adhezi trombocytů a dalších krevních buněk v cévní náhradě<sup>20,21</sup>.

U cévních náhrad o průměru menším než 6 mm, je však průtok krve pomalejší, a tak může dojít k hromadění trombocytů, krevních elementů a buněk imunitního systému při stěnách cévní náhrady. Po určité době může dojít k zúžení až úplnému uzavření cévy<sup>21</sup>.

Cévní náhrada je označována v tkáňovém inženýrství jako protéza, která se skládá z umělého nosiče a buněk. Umělý nosič by měl být vyroben v podobě trojrozměrné porézní nebo vláknité sítě. Tomuto uspořádání se v odborné literatuře říká „scaffolds“ (lešení), neboť skutečně představuje podpůrnou strukturu pro uchycení buněk. Vnitřní část umělého materiálu je určena pro osídlení hladkými svalovými buňkami, které by měly vytvářet několikavrstevnou kontraktilní strukturu. Dále zde dochází k vrůstání vyživujících kapilár (tzv. *vasa vasorum*) a nervových vláken. Vnitřní povrch takovéto náhrady pak bude pokryt

buňkami endotelovými, které budou vytvářet souvislou, fenotypicky vyzrálou a tudíž polopropustnou, neimunogenní a netrombogenní vrstvu. Cévní náhrada by měla sloužit jako podpůrná struktura stimulující regeneraci poškozené cévy<sup>20, 21</sup>.

Buněčná složka cévní náhrady je představována diferencovanými endotelovými a hladkými svalovými buňkami, které jsou obvykle odebrány pacientovi před operací z podkožních žil. Buňky jsou poté namnoženy v podmínkách *in vitro* a nasazeny na umělý nosič. Po určité době, kdy buňky dozrají do požadovaného stavu, může být připravený konstrukt implantován do organismu pacienta. Po čase lze očekávat, že se syntetický nosič vstřebá a pacientovi se v místě implantované umělé náhrady vytvoří nová vlastní plnohodnotná céva<sup>23</sup>. Pokud pacient nemá dostatek diferencovaných endotelových a hladkých svalových buněk, lze využít i jeho vlastní kmenové buňky přítomné v kostní dřeni, krvi nebo tukové tkáni, které jsou následně v kultivačním mediu diferencovány v požadovaný fenotyp. Avšak tyto cévní náhrady jsou spíše otázkou budoucnosti, v současných podmínkách jsou na úrovni experimentů *in vitro* či na laboratorních zvířatech<sup>21, 24</sup>.

### 1.5.1 Syntetické polymery

Jak již bylo uvedeno výše, dnes se v klinické praxi využívají cévní náhrady vyrobené z polyethylentereftalátu (PET) a polytetrafluorethylenu (PTFE). Vhodným materiálem pro přípravu cévních protéz je polyuretan (PU), který byl v souvislosti s cévním systémem zatím aplikován ve formě hemodialyzačních katétrů<sup>21</sup>. Další polymery, které jsou také testovány pro konstrukci cévních protéz, jsou tzv. biostabilní (polypropylen) nebo tzv. degradabilní (polylaktidy, polyglykolidy, polykaprolakton a jejich kopolymery)<sup>25</sup>.

#### ***Polyethylentereftalát (PET)***

Polyethylentereftalát byl poprvé představen v roce 1939 v Anglii. Následně byl v roce 1950 patentován jako Dacron společností DuPont (Obr. 1.3). PET je termoplastický polymer z rodiny polyesterů, vzniklý procesem polykondenzace, katalyzátorem je kyselina ftalová. Jedná se o vysoce hydrofobní polymer<sup>26</sup>.

Pro výrobu cévních náhrad se využívá především ve formě tlustších vláken, která se následně zpracovávají tkaním přes sebe nebo pletením do požadovaného tvaru, který napodobuje skutečnou cévu<sup>21, 23</sup>. Velkým problémem při konstrukci protéz je propustnost

výsledného materiálu, především pro vodu, která je vyšší u pletených náhrad. Proto jsou protézy impregnovány některými proteiny, jako jsou albumin, kolagen nebo želatina. Dlouhodobá přítomnost těchto proteinů, obvykle xenogenního původu, v organismu je nežádoucí, proto je vhodné tyto proteiny předem upravit, např. albumin pomocí glutaraldehydu nebo formaldehydu, aby došlo k jeho samovolné degradaci za několik týdnů po implantaci. Avšak tato úprava způsobuje samovolné nežádoucí uvolňování cytotoxických látek z materiálu<sup>27</sup>.

Po interakci jakéhokoli materiálu s krví je okamžitě spuštěna kaskáda hemokoagulačních reakcí, tj. proces adsorpce a desorpce plazmatických proteinů, která je následována depozicí krevních destiček, bílých a červených krvinek a adhezí, migrací a pokrytím endotelovými nebo hladkými svalovými buňkami. Během prvních hodin po implantaci se vytvoří fibrinová depozita, která obsahují krevní destičky a krevní buňky, až se utvoří tzv. vnitřní fibrinová vrstva. Volná místa cévní náhrady jsou také vyplněna fibrinem. Po několika měsících dochází k prorůstání kapilár a fibroblastů a k vytvoření fibrinové vrstvy. Avšak vnitřní vrstva kompaktního fibrinu u Dacronu představuje omezení napojení kapilár na málo endotelizovaný krevní povrch cévní náhrady<sup>21, 22</sup>.

### ***Polytetrafluorethylen (PTFE)***

Polytetrafluorethylen je známý pod obchodními názvy Teflon a Goretex. Teflon byl patentován firmou DuPont v roce 1937 a Goretex je patentem firmy Gore, která ho uvedla na trh v roce 1969. Jedná se o termoplastický fluorovaný polymer, který má vysoké kyslíkové číslo, je téměř nehořlavý a je teplotně odolný.

Pro klinické využití je molekula PTFE biostabilní, povrch tohoto materiálu má nízkou reaktivitu ke krevním komponentám. Pro výrobu cévních náhrad se používá expandovaný polymer (ePTFE). Technologie jeho výroby spočívá v tom, že se tepelně upravuje, natahuje a protlačuje, za vzniku porézní struktury. Pro výrobu cévních protéz má PTFE dobré mechanické vlastnosti<sup>28</sup>. Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou podobné jako u PET. PTFE je velmi hydrofobní, což je vlastnost tohoto polymeru, která limituje adhezi buněk k povrchu materiálu, a to v případě jeho využití pro přípravu uměle vytvořených cévních protéz<sup>21, 23, 29</sup>.

### ***Polyuretany (PU)***

Polyuretany jsou elastické polymery, které obsahují uretanovou skupinu. Tato velká skupina polymerů byla vyvinuta ve 30. letech v Německu, uvedena na trh byla v roce 1962 firmou DuPont. V klinické praxi se používá od 60. let. PU jsou kopolymery, které se skládají ze tří různých monomerů. Jedná se o segment amorfní (měkký) odpovídající za flexibilitu, krystalický (tvrdý), který odpovídá za rigiditu a třetí monomer prodlužující řetězec.

První generace PU byla na bázi polyesteru, její velkou nevýhodou však byla hydrolytická degradace, která vedla k přerušení klinického pokusu. Poté vznikla generace PU na bázi polyetheru, která byla odolná proti hydrolyze nicméně náchylná k oxidaci. Úspěšně prošla klinickým hodnocením jako hemodialyzační cévní přístup, v roce 2000 byla schválena agenturou Food and Drug Administration (FDA). Nejnovější generace PU je na bázi polykarbonátu. Je odolná vůči hydrolytické degradaci a je i oxidačně stabilní.

Polyuretany můžeme na základě jejich struktury rozdělit na vláknité a pěnovité. Po implantaci je krevní povrch vláknitého PU pokryt fibrinovou vrstvou<sup>30</sup>. Cévní protézy vyrobené z PU mají řadu dobrých vlastností, např. přítomnost souvislé vrstvy endotelových buněk i za nepříznivých podmínek, dobré vhojování atd. Klinická cévní chirurgie však dosud nemá dostatečné zkušenosti s tímto materiálem, a proto je nutný jeho další výzkum<sup>21, 31, 32</sup>.



**Obr. 1.3: Umělá cévní náhrada.**

Cévní protéza vyrobená z PET (Dacron) (převzato z [33]).

### **1.5.2 Přírodní polymery**

Buňka se k připraveným biomateriálům váže pomocí proteinů mezibuněčné hmoty, tyto proteiny se spontánně adsorbují k povrchu materiálu. V podmínkách *in vivo* se

proteiny ECM adsorbují z tělních tekutin (krev, intercelulární tekutina), v případě podmínek *in vitro* jsou obsaženy v biologických roztocích (kultivační medium). Také mohou být syntetizovány a na polymer ukládány přímo buňkami. Buňky se mohou zachytit na povrchu materiálu i bez adsorbovaných proteinů pomocí slabých chemických interakcí mezi molekulami buněčné membrány a povrchem materiálu. Jedná se o vazbu nescifickou a tato vazba není zprostředkována adhezními receptory. Tudíž nemohou být do buněk přenášeny signály, které zaručují jejich životaschopnost, růst, diferenciaci a další funkce, které buňka nezbytně potřebuje<sup>20, 23, 34</sup>.

Mezi proteiny mezibuněčné hmoty, které zprostředkovávají adhezi buněk na povrch materiálu, patří kolagen, elastin, fibronectin, vitronectin, laminin a fibrin. Tyto proteiny výrazně ovlivňují funkci buněk, jako je jejich rozprostření, tvar, uchycení, migrace, proliferační a metabolická aktivita, životaschopnost, diferenciaci a fenotypická maturace. Jedná se o molekuly, které se účastní procesu hojení ran. Tyto proteiny se proto používají pro vhodnou modifikaci povrchu biomateriálu<sup>35, 36</sup>. Proteiny ECM jsou součástí cévní stěny *in vivo*, a tudíž jsou nezbytné při její rekonstrukci a regeneraci<sup>25</sup>.

### ***Kolagen***

Kolagen je protein, který je důležitou složkou mezibuněčné hmoty nejrůznějších tkání. Tvoří až 30 % všech proteinů v savčím organismu. Lidský genom obsahuje více než dvacet forem genů pro kolagen, přibližně devět z nich vzniká v cévní stěně (kolagen typu I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII a XIV)<sup>37</sup>. V případě poranění cév se jednotlivé krevní komponenty dostávají do kontaktu s fibrilárními kolageny I a III. Nejrozšířenější je kolagen typu I - tento typ kolagenu představuje 90 % kolagenu v organismech (v kůži, šlachách, kostech a zubech). Je také součástí mezibuněčné hmoty cévních vrstev *tunica media* a *tunica adventitia*. Vlákenný kolagen je tvořen třemi polypeptidovými řetězci, které jsou kolem sebe ovinuty. Molekuly kolagenu polymerují v extracelulární kolagenové fibrily, které jsou navzájem spojeny kovalentními vazbami. Tyto vazby dávají celé síti dobrou mechanickou pevnost. Kolagen typu IV spolu s lamininem je přítomen v bazální membráně buněk<sup>38</sup>.

### ***Elastin***

Elastin je nerozpustný protein, který je majoritní složkou elastických vláken v živočišných tkáních, jako jsou vlákna šlach, průdušek, plic a cévních stěn. Obsahuje

alifatické aminokyseliny (alanin, valin, leucin a isoleucin), glycin, prolin a dále bazické aminokyseliny (lysin). Velké množství elastinu se vyskytuje v cévní stěně velkých cév u srdce (hrudní aorta)<sup>39</sup>.

### ***Fibronektin***

Fibronektin je nerozpustný heterodimerní glykoprotein, který se nachází v plazmě a ECM. Tento glykoprotein obsahuje vazebná místa pro jiné molekuly ECM a pro fibronektinový receptor buněk. Fibronektin umožňuje vazbu mezi buňkami a molekulami ECM do souvislé sítě. Kromě výskytu v mezibuněčné hmotě ho můžeme nalézt na povrchu buněčných membrán nebo volně v tělních tekutinách<sup>23</sup>.

### ***Vitronektin***

Vitronektin patří mezi plazmatické glykoproteiny cirkulující v krvi. Je to jeden z hlavních glykoproteinů, který umožňuje buněčnou adhezi. Vitronektin je hlavním ligandem vitronektinových receptorů buněk. Mezi jeho další funkce patří vazba k heparinu a kolagenu<sup>36</sup>.

### ***Laminin***

Laminin je vysokomolekulární glykoprotein, který se skládá ze tří samostatných řetězců, které jsou propojeny disulfidickými můstky. Spolu s kolagenem IV a proteoglykany je součástí buněčné bazální membrány. Společně s dalšími molekulami, udržuje v cévní stěně hladké svalové buňky v klidovém diferencovaném kontraktilem stavu<sup>15</sup>.

### ***Fibrin***

Fibrin (aktivní forma koagulačního faktoru I) je vláknitý nerozpustný protein, který vzniká z fibrinogenu (neaktivní forma koagulačního faktoru I) proteolytickým působením serinové proteasy trombinu v poslední fázi koagulační kaskády<sup>41</sup>. Trombin odštěpuje z fibrinogenu dva řetězce, fibrinopeptid A a fibrinopeptid B. Dochází ke změně vlastností fibrinogenu a po aktivaci vznikají monomery fibrinu, které spolu spontánně polymerují za vzniku nerozpustné fibrinové sítě (krevní sraženina)<sup>42</sup>. Vznik fibrinu z fibrinogenu je fyziologicky velmi důležitý děj, který je součástí procesu hemostázy. Hemostáza je složitý, vysoce regulovaný sled současně probíhajících reakcí, které vedou ke vzniku krevní

sraženiny při poranění cév<sup>43</sup>. V experimentálních podmínkách závisí strukturní i mechanické vlastnosti fibrinové sítě na polymeračních podmínkách, na počáteční koncentraci fibrinogenu a trombinu, iontové síle pufru, pH a koncentraci vápníku<sup>44-46</sup>.

Fibrin spolu s fibrinogenem hrají významnou roli při srážení krve, fibrinolýze, zánětech, hojení ran, regeneraci a tvorbě nové tkáně<sup>41</sup>. Fibrin je známý jako biokompatibilní a biologicky odbouratelný materiál. Při kontaktu s tkání nevyvolává zánět, trombózu, nekrózu ani fibrózu<sup>47, 48</sup>. Fibrin je používán v celé řadě biomedicínských aplikací. Díky své vnitřní schopnosti poskytnout buňce vhodné podmínky pro regenerační procesy, se využívá při hojení, např. po operacích. Fibrin tvoří provizorní mezibuněčnou hmotu při poranění tkání<sup>49</sup> a lze ho izolovat pacientům přímo z krve, což je výhodou při konstrukci cévní náhrady, protože při pokryvu protézy vlastními molekulami fibrinu nedochází ke vzniku negativní reakce imunitního systému<sup>50</sup>.

## **1.6 Využití fibrinových sítí v tkáňovém inženýrství**

Proces hojení poranění se skládá z vysoce organizovaného sledu reakcí vedoucího k obnově poškozené tkáně<sup>51, 52</sup>. Proces hojení lze rozdělit do čtyř fází, na tyto jednotlivé etapy nelze pohlížet jako na přesně oddělené fáze, ale přechod z jedné etapy do druhé je postupný. Při poranění dochází k porušení integrity cévního systému, což způsobuje únik tekutiny mimo cévní řečiště do okolí poraněného místa. Organismus se s tímto stavem snaží vyrovnat tak, že aktivuje sled reakcí koagulační kaskády, které vedou ke vzniku fibrinové sítě a agregaci destiček<sup>53</sup>. Po několika minutách od poranění dojde ke kontrakci sousedních cév, a tím ke snížení ztrát krve. Poté začnou krevní destičky vylučovat látky, které způsobují vasodilataci a zvýšení permeability cév.

V místě poranění vzniká krevní sraženina (fibrinový klot či fibrinová zátka), která ucpává poraněné místo a tím chrání cévy před krvácením. Vzniklá fibrinová síť neslouží pouze k zástavě krvácení, ale také podporuje migraci leukocytů, fibroblastů a endotelových buněk do místa poranění, kde slouží jako dočasná podpůrná struktura pro jejich zachycení a proliferaci<sup>53-56</sup>.

Na fibrinovou síť se vážou různé proteiny mezibuněčné hmoty a růstové faktory, společně tak přispívají k obnově poraněné tkáně. Těchto vlastností fibrinové sítě se velmi využívá v tkáňovém inženýrství<sup>57</sup>. V medicíně se používají tzv. fibrinová lepidla k zástavě krvácení, jako náhrada sešití poraněných tkání, k léčbě tříselné kýly a k léčbě poškození jater, chrupavek a kostí<sup>58-60</sup>. Nejčastěji se aplikují vysoce koncentrované roztoky

fibrinogenu, který se smíchá s trombinem a tato směs se poté velmi rychle přemění na fibrinový gel<sup>61</sup>. Fibrinové lepidlo může značně urychlit endotelizaci cévních protéz a snížit nežádoucí reakce, které vznikají v místě poraněné cévní stěny (intimální hyperplazie). Nadměrný proces hojení vede k lokálnímu ztluštění intimy cév, která zasahuje do lumen cévy a dochází k patologickému zúžení průchodnosti cévy (stenóza). Pro cévní náhrady se tloušťka vrstvy fibrinu pohybuje v rozmezí 4-800  $\mu\text{m}$ <sup>62</sup>.

Na fibrinovou síť můžeme navázat různé proteiny, jako např. fibronektin, vitronektin, růstový faktor cévního endotelu (VEGF)<sup>63-65</sup>. Tyto proteiny se mohou navázat kovalentně přes transglutaminasovou doménu pomocí faktoru XIIIa<sup>66</sup>. V jiném případě lze využít vazby přes heparin, ten působí jako spojka, pro navázání proteinů, které se za běžných podmínek na fibrin nevážou.

### 1.6.1 Vazba proteinů na fibrin

Fibrinová síť je kovalentně stabilizována vazbami mezi jednotlivými molekulami fibrinogenu. Vytvořená fibrinová síť je následně stabilizována pomocí plazmatické transglutaminasy faktoru XIIIa (EC 2.3.2.13), která zvyšuje mechanické vlastnosti krevní sraženiny a zároveň ji činí odolnější proti proteolyse. Faktor XIII je přeměněn na aktivní faktor XIIIa pomocí trombinu za přítomnosti vápenatých iontů a fibrinu<sup>67</sup>. Molekulová hmotnost faktoru XIII je 326 kDa a je přítomen např. v krevní plazmě<sup>68</sup>.

Některé proteiny reagují s fibrinem a mění jeho vlastnosti a strukturu. Na fibrinovou síť se váží proteiny mezibuněčné hmoty a proteiny, které jsou zodpovědné za proces hojení poranění. Takovými proteiny jsou fibulin-1<sup>69</sup>, vitronektin<sup>70</sup> a fibronektin<sup>71</sup>, který je kovalentně ukotven do fibrinové sítě pomocí faktoru XIIIa, dále pak růstový faktor fibroblastů (*fibroblast growth factor*, *FGF*) a růstový faktor cévního endotelu (*vascular endothelial growth factor*, *VEGF*). Růstové faktory jsou přítomny při procesu hojení, přitahují endotelové buňky do poraněného místa a podporují jejich proliferaci a angiogenezi (tvorba nových cév)<sup>64, 65, 72</sup>.



## 1.7 Růstové faktory

Růstové faktory (RF) jsou látky, nejčastěji bílkovinné povahy, které jsou produkovány různými buňkami těla. V lidském organismu ovlivňují a regulují proliferaci, diferenciaci a zrání buněk či tkání. Působí na více druhů buněk, mají svou nezastupitelnou roli v průběhu vývoje organismu a podílejí se též na regeneraci poškozených tkání<sup>73-75</sup>. Růstové faktory mohou na buňku působit autokrinně (buňka RF sama vyrábí), parakrinně (RF syntetizuje sousední buňka) i endokrinně (RF jsou syntetizovány vzdálenými buňkami)<sup>76</sup>. Po objevení růstových faktorů, počátkem 90. let 19. století, a po zjištění jejich biologické aktivity, byly uskutečněny první pokusy s jejich terapeutickým využitím<sup>77-79</sup>.

Pro buňky *in vitro* (v kultivačním mediu) i *in vivo* jsou růstové faktory hlavními regulačními molekulami růstu. Netransformované buňky vyžadují obvykle přítomnost několika růstových faktorů. Při běžných podmínkách kultivace jsou růstové faktory nejrychleji vyčerpány v porovnání s ostatními složkami media, což je limitující faktor pro rychlost proliferace<sup>80</sup>. Růstové faktory jsou nezbytné při metabolických procesech. Od esenciálních látek, kofaktorů a živin se liší tím, že nedostačují pro iniciaci buněčného dělení. Společně se živinami mohou zahájit mitosu v klidových buňkách.

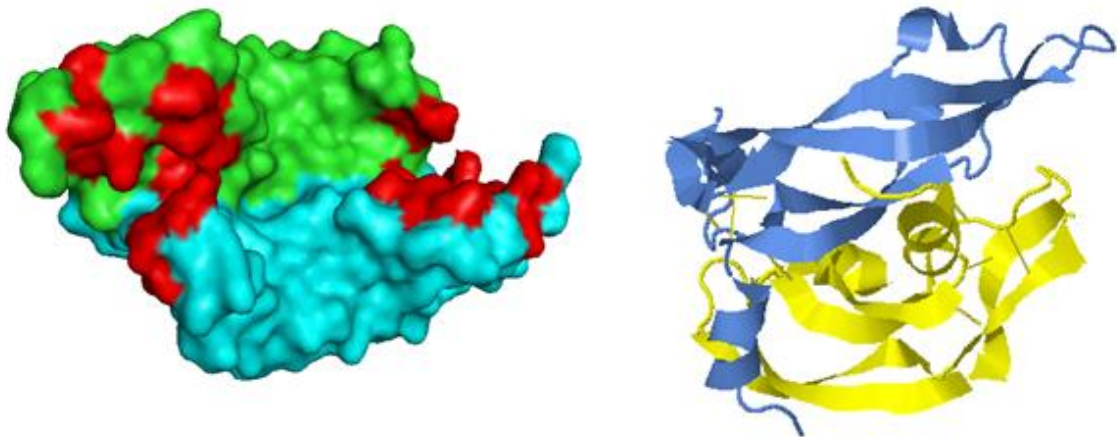
Růstové faktory hrají významnou roli při procesu hojení ran a regeneraci poškozené tkáně. Účastní se procesu srážení krve a vyvolávají degranulaci krevních destiček. V granulích krevních destiček jsou obsaženy např. růstový faktor odvozený od krevních destiček (*platelet-derived growth factor, PDGF*), transformující růstový faktor- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$* ), epidermální růstový faktor (*epidermal growth factor, EGF*) a insulinu podobný růstový faktor-I (*insulin-like growth factor-I, IGF-I*). Tyto růstové faktory se uvolňují z krevních destiček a zahajují kaskádu reakcí vedoucí k regeneraci tkáně. Sled reakcí je zahájen pohybem (chemotaxí) zánětlivých buněk, fibroblastů, epitelových a endotelových buněk na místo poranění. Poté jsou degradovány proteasami. Nové růstové faktory, převážně bílkovinné povahy, které jsou důležité pro dokončení regenerace tkáně, jsou následně syntetizovány fibroblasty, buňkami zánětlivými a epitelovými<sup>76</sup>.

K zachování normálního krevního zásobení musí v rostoucí tkáni docházet k proliferaci krevních cév. Tvorba nových cév (angiogeneze) je významná, jak během fetálního vývoje, tak pro růst po narození. V dospělosti je důležitá při procesu hojení ran, tvorbě žlutého tělíska po ovulaci a v řadě dalších procesů. V průběhu embryonálního

vývoje vznikají cévy z angioblastů vytvářejících trubice, které se spojují. Tomuto procesu se říká vaskulogeneze. Jinými slovy, angiogeneze je tvorba cév růstem z již dříve existujících cév, kdežto vaskulogeneze je tvorba zcela nových cév z jejich mezodermálních prekursorů.

Mnoho růstových faktorů angiogenezi stimuluje (VEGF, angiogenin, FGF) nebo inhibuje (angiostatin, destičkový faktor 4)<sup>81</sup>. Účinek růstových faktorů je nejprve zahájen vazbou na jejich receptory, které se nacházejí na plazmatické membráně cílových buněk. Růstový faktor (ligand) a jeho receptor mají k sobě vysokou afinitu. Po aktivaci této vazby je stimulována řada dějů včetně již zmíněného procesu hojení ran. Přesný mechanismus, který vede k regeneraci tkáně v přítomnosti růstových faktorů, není ještě zcela objasněn.

Existuje minimálně pět rodin růstových faktorů, které významně přispívají k regeneraci poškozené tkáně. Jsou to EGF, TGF- $\beta$ , IGF, PDGF (VEGF) a FGF. Rodina PDGF zahrnuje dva růstové faktory, PDGF a VEGF. Oba tyto růstové faktory mají podobnou strukturu, ale váží se na různé receptory a stimulují odlišné děje. PDGF je především mitogenem (látka navozující mitosu) pro buňky mezenchymálního původu a VEGF je mitogen výhradně pro endotelové buňky<sup>76</sup> (Obr. 1.4).



**Obr. 1.4: 3D projekce a stužkový model vaskulárního endotelového růstového faktoru.**

3D projekcí (vlevo) jsou modře a zeleně zvýrazněny dva monomery růstového faktoru VEGF-A a červeně jsou naznačena vazebná místa. Na stužkovém modelu (vpravo) jsou modře a žlutě znázorněny dva monomery růstové faktoru VEGF-A (převzato z [82]).

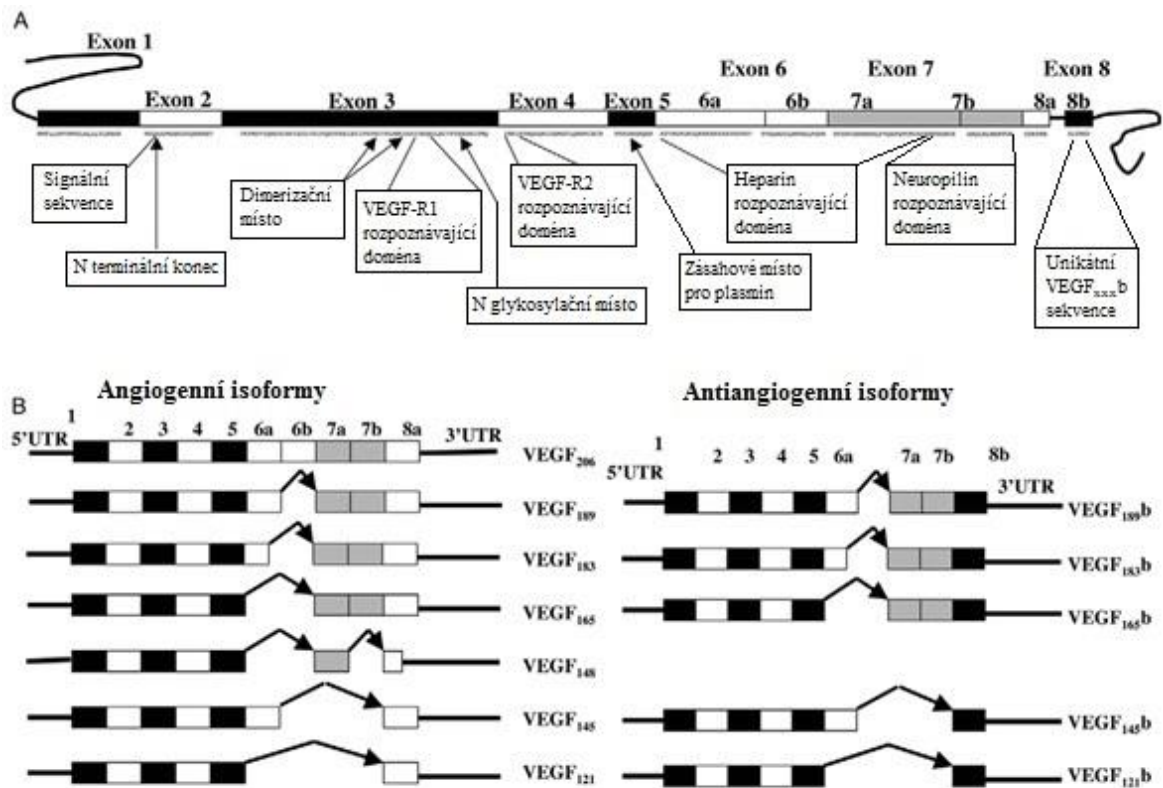
### 1.7.1 Vaskulární endotelový růstový faktor

Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) je signální glykoproteinový ligand aktivující transmembránové receptory v plazmatické membráně na endotelových buňkách. Rodina VEGF obsahuje sedm glykoproteinů VEGF A-F a placentární růstový faktor (*placental growth factor, PlGF*)<sup>83, 84</sup>. VEGF-A je klíčovým regulátorem při vaskulogenezi a angiogenezi. Angiogeneze je přísně regulovaný proces, který vede k tvorbě nových cév. VEGF a jeho receptory hrají také důležitou roli v průběhu patologických stavů, při růstu nádorů a metastáz. VEGF také ovlivňuje proliferaci, migraci a přežití endotelových buněk<sup>85, 86</sup>. Biologické účinky jsou zprostředkovány třemi receptorovými tyrosinkinasami VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3, které se liší v signálních vlastnostech<sup>87</sup>. VEGF-A se váže na receptory VEGFR-1 a VEGFR-2. Po vazbě VEGF-receptor vzniká receptorový dimer a dochází k autofosforylaci. Po této vazbě byl sledován vliv na růst endotelových buněk a zahájení angiogeneze.

Lidský gen pro VEGF-A se skládá z osmi exonů. Prostřednictvím alternativního sestřihu mRNA z VEGF-A genu vzniká pět hlavních isoform, mající 121, 145, 165, 189 a 206 aminokyselin (VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 a VEGF-A206). Jednotlivé isoformy se liší molekulovou hmotností i biologickými vlastnostmi. Exony 1-5 jsou konzervovány ve všech isoformách a alternativní sestřih se vyskytuje v exonu 6 a 7. VEGF-A206 je nejdelší isoformou kódující exony E1-E8a. VEGF-A189 obsahuje exony E1-E6a, E7 a E8. VEGF-A165 postrádá exon 6 (E1-E5, E7, E8) a VEGF-A121 neobsahuje exony 6 a 7 (E1-E5 a E8). VEGF-A121 neobsahuje heparin rozpoznávající doménu a tudíž neváže heparin<sup>88</sup> (Obr. 1.5).

První čtyři exony kódují signální peptid, tato sekvence rozpoznává VEGFR-1, VEGFR-2, dimerizační a glykosylační místa. Exon 5 kóduje deset aminokyselin, tato sekvence obsahuje hlavní štěpné místo pro plasmin<sup>89-91</sup>. Sekvence exonu 6 a 7 obsahuje heparin vázající doménu. Vazebná doména NRP-1 (neuropilin-1) byla původně popsána v kódované sekvenci exonu 7<sup>93</sup>, nicméně nejnovější údaje potvrzují její výskyt i na C-terminálním konci exonu 8, obsahujícím 6 aminokyselin<sup>92-95</sup>. Role a význam exonů 8a a 8b je stále předmětem zkoumání. Předpokládá se, že šest aminokyselin z E8a působí tzv. angiogenně a tedy stimulačně na vznik nových cév, zatímco šest aminokyselin kódovaných E8b jsou mnohem méně aktivní nebo dokonce neaktivní tzv. antiangiogenní. Jejich mechanismy a fyziologický význam je stále předmětem diskuze<sup>96, 97</sup>. Proteiny VEGF-A165 a VEGF-A121 jsou fyziologicky nejvíce aktivní<sup>98</sup>. VEGF-121 je homodimer

obsahující disulfidickou skupinu, a mající molekulovou hmotnost 28 kDa. Ve své monomerní formě má molekulovou hmotnost 16 kDa<sup>99</sup>.



**Obr. 1.5: Struktura lidského genu kódujícího VEGF a jeho sestřihové varianty VEGF-A.**

Na obrázku je zobrazen (A) gen pro VEGF-A (B) dvě rodiny isoform VEGF-A, angienní (a) a antiangienní (b). Lidský VEGF gen obsahuje osm exonů E1-E8. Prostřednictvím alternativního sestřihu mRNA z VEGF genu vzniká sedm isoform VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A148, VEGF-A165, VEGF-A183, VEGF-A189 a VEGF-A206. Exon E1-E5 obsahují všechny isoformy VEGF-A. Tato sekvence rozpoznává VEGFR-1, VEGFR-2, dimerizační a glykosylační místa. Exon E5 obsahuje hlavní štěpné místo pro plasmin. Sekvence exonů 6 a 7 kódují heparin rozpoznávající doménu a sekvence exonů 7 a 8 rozpoznávají vazebnou doménu NRP-1 (upraveno podle [100]).

## 2. CÍL PRÁCE

- Heterologní exprese růstového faktoru VEGF-A121 v *E. coli*
- Potvrzení biologické aktivity rekombinantního VEGF-A121
- Inkorporace VEGF-A121 do fibrinové sítě
- Stanovení množství inkorporovaného VEGF-A121, případně sledování kinetiky jeho uvolňování z fibrinové sítě
- Sledování vlivu VEGF-A121 na růst endotelových buněk

## 3. MATERIÁL

### 3.1 Chemikálie a materiály

#### 3.1.1 Mikroorganismy a plasmidy

Použitý bakteriální expresní kmen *E. coli* Origami B (DE3) (Novagen, USA) pochází z komerčního zdroje a byl uchováván buď na LB agaru s příslušnými antibiotiky při 4 °C nebo jako kryokonzerva - suspenze buněk v LB mediu v 10 % glycerolu při -80 °C. Kompetentní buňky *E. coli* byly udržovány v transformačním pufru a skladovány při -80 °C (viz odstavec 3.1.2).

Bakteriální DNA vektory pET-32a(+) (Novagen, USA) a pGro7 (Takara, Japonsko), které byly v průběhu této práce použity, pocházejí z komerčních zdrojů. Konstrukt pro expresi růstového faktoru VEGF-A121 byl navržen Ing. Ondřejem Kaplanem, Ph.D. (Ústav makromolekulární chemie, oddělení Biomateriálů a bioanalogických systémů) a zhotoven společností Shanghai Generay Biotechnology (Shanghai, Čína).

#### 3.1.2 Kultivační a udržovací media

##### Kultivační media pro práci s bakteriálními kulturami

###### LB medium

<u>Komponenta</u>	<u>(g/l)</u>
Trypton	10,0
Kvasničný autolyzát	5,0
NaCl	10,0
(Agar pro ztužení	15,0)

(Pro skladování bakteriální kultury ve formě kryokonzerv byl přidán glycerol 100,0 g/l)

Výše uvedené komponenty byly rozpuštěny v destilované vodě, objem byl upraven na 1 l a pH 7,0, roztok byl sterilizován (121 °C, 20 min), případně byly přidány roztoky aditiv (antibiotika, L-arabiosa, IPTG) sterilizované filtrací.

## **2YT medium**

<u>Komponenta</u>	<u>(g/l)</u>
Trypton	16,0
Kvasničný autolyzát	10,0
NaCl	5,0

(Pro skladování bakteriální kultury ve formě kryokonzerv byl přidán glycerol 100,0 g/l)

Výše uvedené komponenty byly rozpuštěny v destilované vodě, objem byl upraven na 1 l a pH 7,0, roztok byl sterilizován (121 °C, 20 min), případně byly přidány roztoky aditiv (antibiotika, L-arabiosa, IPTG) sterilizované filtrací.

## **SOB medium (pro přípravu kompetentních buněk)**

<u>Komponenta</u>	<u>(g/l)</u>
Trypton	20,0 g
Kvasničný autolyzát	5,0 g
NaCl	0,5 g
pH	7,4

Výše uvedené komponenty byly rozpuštěny v 990 ml destilované vody, pH roztoku bylo upravit na 7,4 pomocí 40 % KOH, následně byl roztok sterilizován (121 °C, 20 min).

Po sterilizaci byly přidány filtračně sterilizované roztoky:

1 M MgSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	10 ml
1 M MgCl <sub>2</sub>	10 ml

## **Kultivační media pro práci s tkáňovými kulturami**

**EBM-2 medium** (Lonza, Česká republika)

**EGM-2 medium** (Lonza, Česká republika)

**VascuLife medium** (LifeLine, Německo)

### **3.1.3 Roztoky a pufrы**

#### **PBS**

10 mM fosfátový pufr (1 tableta byla rozpuštěna ve 200 ml deionizované vody)

2,7 mM KCl

137 mM NaCl

pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,2-7,4, roztok byl sterilizován (121 °C, 20 min).

#### **Pufr "A" - Tris/HCl pufr (50mM, pH 7,2 - 9,0)**

(50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4)

Tris                6,1 g

NaCl               5,8 g

CaCl<sub>2</sub>            0,4 g

Výše uvedené komponenty byly rozpuštěny v 500 ml destilované vody, pH roztoku bylo upravit na 7,4 pomocí koncentrované HCl, objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 l, roztok byl sterilizován filtrací.

#### **Transformační pufr**

Hepes             0,72 g

CaCl<sub>2</sub>            0,66 g

KCl                5,60 g

Výše uvedené komponenty byly rozpuštěny v 250 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno na 6,7 pomocí 40 % KOH.

Poté byl přidán MnCl<sub>2</sub> 3,3 g.

Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 300 ml a sterilizován filtrací.

#### **Tris/glycinový elektroforézový pufr pro SDS-PAGE**

(25 mM Tris, 250 mM glycin, pH 8,3)

Zásobní roztok (5 x koncentrát):

Tris                15,1 g

Glycin             94,0 g

10 % roztok SDS    50,0 ml

Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 l a před použitím byl 5 x zředěn destilovanou vodou.



### **2 x redukující vzorkový pufr pro SDS-PAGE**

Tris/HCl (pH 6,8)	100 mM
Dithiothreitol	200 mM
SDS (pro elektroforézu)	4 % <i>hm.</i>
Bromfenolová modř	0,2 % <i>hm.</i>
Glycerol	20 % <i>hm.</i>

### **Separáčnı́ gel pro SDS-PAGE (12 %), cca 20 ml (4 gely):**

<u>Komponenta</u>	<u>(ml)</u>
H <sub>2</sub> O	6,6
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0
30 % akrylamid*	8,0
10 % SDS	0,2
10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	0,2 (čerstvý roztok)
TEMED	0,016

*-převrstvit n-butanolem*

\*) vodný roztok obsahující 3,3 % *hm.* N,N'-methylenbisakrylamidu

### **Koncentračnı́ gel pro SDS-PAGE (5 %), cca 12 ml (4 gely):**

<u>Komponenta</u>	<u>(ml)</u>
H <sub>2</sub> O	8,2
1,0 M Tris (pH 6,8)	1,5
30 % akrylamid*	2,0
10 % SDS	0,12
10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	0,12 (čerstvý roztok)
TEMED	0,024

\*) vodný roztok obsahující 3,3 % *hm.* N,N'-methylenbisakrylamidu

### **SDS-PAGE barvicı́ roztok:**

Coomassie Brilliant Blue R-250	3,0 g
Methanol	450 ml
H <sub>2</sub> O	450 ml
Ledová kyselina octová	100 ml

**SDS-PAGE odbarvovací roztok:**

Methanol	450 ml
H <sub>2</sub> O	450 ml
Ledová kyselina octová	100 ml

**Antibiotika**

Zásobní roztoky použitých antibiotik (Biotika, Slovenská republika) (Tab. 3.1) byly sterilizovány filtrací (průměr pórů 0,22 μm) a skladovány při -20 °C.

**Tab. 3.1: Použité zásobní roztoky antibiotik.**

Antibiotikum	Zkratka	Rozpouštědlo	Zásobní koncentrace (mg/ml)	Koncentrace v kultivačním mediu (mg/ml)
Chloramfenikol	CAM	EtOH	35 mg/ml (1000x)	35 mg/l
Tetracyklin	TET	EtOH	5 mg/ml (400x)	12,5 mg/l
Kanamycin	KAN	H <sub>2</sub> O	50 mg/ml (1000x)	50 mg/l
Ampicilin	AMP	H <sub>2</sub> O	150 mg/ml (1000x)	150 mg/l

**Zásobní roztok L-arabiny (150,13 g/mol) (P-LAB, Česká republika)**

Zásobní 100 x koncentrát L-arabiny pro indukci rekombinantních chaperonů GroEL/GroES byl připraven rozpuštěním L-arabiny v deionizované vodě na výslednou koncentraci 0,17 g/ml. Vzniklý roztok byl sterilizován filtrací (průměr pórů 0,22 μm). Pro indukci chaperonů byl používán ve finální koncentraci 1,7 g/l bakteriálního kultivačního media.

**Zásobní roztok IPTG (238,3 g/mol) (P-LAB, Česká republika)**

Zásobní koncentrát pro indukci rekombinantního VEGF byl připraven rozpuštěním IPTG v deionizované vodě na výslednou 0,5 M koncentraci. Vzniklý roztok byl sterilizován filtrací (průměr pórů 0,22 μm) a uskladněn při -20 °C. Pro indukci rekombinantního VEGF byl IPTG v bakteriálním kultivačním mediu používán ve finální 0,02 mM koncentraci.

### 3.1.4 Chemikálie, kity a další materiál

Agar (Oxoid, UK)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Alexa Fluor 488 (Invitrogen™, USA)

Ampicilin (Biotika, Slovenská republika)

APS (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Bromfenolová modř (Lachema, Česká republika)

BSA (New England Biolabs, USA)

Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Švýcarsko)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, USA)

Činidlo dle Bradfordové (Bio-Rad, Německo)

DMSO (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

DTT (Serva, USA)

ELISA Kit, *Human VEGF* (Invitrogen™, USA)

Endotelové buňky "HUVEC" (Lonza, Česká republika)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

Glycin (Fluka, Švýcarsko)

HEPES (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Hydroxid draselný, KOH (Merck, Německo)

Chloramfenikol (Biotika, Slovenská republika)

Chlorid draselný, KCl (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Chlorid hořečnatý, MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Chlorid manganatý, MnCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Chlorid sodný, NaCl (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Chlorid vápenatý, CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

IPTG (P-LAB, Česká republika)

Kanamycin (Biotika, Slovenská republika)

Koncentrátor Amicon Ultra (cut-off 10 kDa) (Millipore, USA)

Kvasničný autolyzát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Kyselina chlorovodíková, HCl (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina octová, CH<sub>3</sub>COOH (Lach-Ner, Česká republika)

L-arabinoza (P-LAB, Česká republika)

Matrice Talon Metal Affinity Resin (Clontech, USA)  
Membránový filtr (průměr pórů 0,22 μm) (Millipore, USA)  
Methanol (Lach-Ner, Česká republika)  
N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)  
PBS tablety (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)  
Phalloidin (Invitrogen™, USA)  
Proteinový marker (GE Healthcare, UK)  
Quant-iT<sup>MT</sup> PicoGreen<sup>®</sup> dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen™, USA)  
Růstový faktor VEGF-A121 (Protein Specialists, USA)  
SDS (Jersey Lab Supply, USA)  
Síran hořečnatý, MgSO<sub>4</sub> (New England Biolabs, USA)  
TEMED (Serva, USA)  
Tetracyklin (Biotika, Slovenská republika)  
Tris (Roth, Německo)  
Trypton (Oxoid, UK)

### **3.2 Přístroje a pomůcky**

24-jamkové plastová destička (TPP, Švýcarsko)  
Analytické váhy AE 200 (Mettler, Německo)  
Biohazardní box třídy II (Dynex Technologies, ČR)  
Centrifuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Německo)  
Centrifuga Hettich 16 R (Hettich Zentrifugen, Německo)  
Digitální kamera (AxioCam MRc5, ZEISS, Německo)  
Flow box MSC 9 (Jouan, Německo)  
Fluorescenční mikroskop (Axioplan2, ZEISS, Německo)  
Mikrocentrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Německo)  
Mrazák na -80°C Jouan VX 380 E/S (Thermo Fisher Scientific, USA)  
Orbitální třepačka IKA KS 4000i (MERCİ, ČR)  
Parní sterilizátor Kestrel (LTE Scientific, UK)  
Parní sterilizátor PS 261A (Chirana, Česká republika)  
pH metr pH/ION 340i (WTW, Německo)  
Přístroj na přípravu deionizované vody a vody pro HPLC, Watrex Rowapur 200 and Watrex Ultrapur (Watrex, Česká republika)

Souprava pro SDS-PAGE (Bio-Rad, Německo)  
Spektrofotometer UV-1202 (Shimadzu, Japonsko)  
Steri-Cycle CO<sub>2</sub> Incubator HEPA class 100 (Thermo Electron Corporation, USA)  
Světelný mikroskop Olympus IX 51 (OLYMPUS, Japonsko)  
Synergy HTX Multi-Mode Microplate Readers (BioTek, USA)  
Thermomixer Compact a Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo)  
Třepačka Lab-Shaker (Adolf Kühner AG, Švýcarsko)  
Ultrazvukový homogenizátor 4710 Series (Cole – Parmer, USA)  
Váhy MXX-412 (Denver Instrument, USA)  
Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, USA)  
Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA)  
xCELLigence RTCA DP Instrument (Roche, Švýcarsko)

## 4. METODY

### 4.1 Návrh a příprava konstruktů pro expresi VEGF-A121

Růstový faktor VEGF-A121 byl exprimován jako fúzní protein sestávající z těchto součástí (směrem od *N*-terminálního konce): fúzní partner thioredoxin, histidinová kotva, zásahové místo pro proteasu trombin, zásahové místo pro faktor XIII a samotný růstový faktor cévního endotelu, varianta A121 („VEGF-A121“) (Obr. 4.1). Fúzní partner thioredoxin zajišťuje zvýšení rozpustnosti některých exprimovaných proteinů, čímž může být potlačena tvorba inkluzních tělísek. Histidinová kotva umožňuje purifikaci pomocí afinitní chromatografie. Fúzní protein byl navržen tak, aby bylo možné fúzní část zahrnující thioredoxin a histidinovou kotvu po purifikaci odštěpit trombinem v zásahovém místě „THR“. Zásahové místo „FXIII“ umožňuje kovalentní uchycení růstového faktoru do fibrinové sítě pomocí transglutaminasové aktivity faktoru XIII (Obr. 4.1). Navržený expresní konstrukt byl zhotoven společností Shanghai Generay Biotechnology (Shanghai, Čína) zaklonováním syntetického genu kódujícího modifikovanou variantu VEGF-A121 mezi restrikční místa *Msc* I a *Xho* I vektoru pET-32a(+). Insert byl zaklonován ve stejném čtecím rámci jako fúzní partner thioredoxin, který je kódován na vektoru pET-32a(+). U syntetického genu byla provedena optimalizace zastoupení kodonů pro expresi v *E. coli*.

TRX	6xHIS	THR	FXIII	VEGF-A121
-----	-------	-----	-------	-----------

**Obr. 4.1: Schematické znázornění primární struktury rekombinantního VEGF-A121 s fúzním partnerem a přidruženými peptidovými sekvencemi.**

Jednotlivé zkratky představují součásti expresního konstruktů směrem od *N*-terminálního konce: fúzní partner thioredoxin (TRX), hexahistidinová kotva pro afinitní purifikaci (6xHIS), zásahové místo pro trombin (THR), zásahové místo pro faktor XIII (FXIII) a růstový faktor VEGF varianta A121 (VEGF-A121) (detailně Obr. 5.1).

## 4.2 Příprava kompetentních hostitelských buněk *E. coli*

Nejprve bylo připraveno inokulum, bakteriální kolonií byl zaočkován 1 ml LB media (s příslušnými ATB). Roztok byl ponechán inkubovat přes noc v 15-ml plastové zkumavce v Thermomixeru při 500 RPM a 37 °C. Pomocí 0,1 ml výše uvedeného inokula bylo zaočkováno 200 ml SOB media v 1-l Erlenmeyerové baňce. Kulturu byla ponechána inkubovat na orbitální třepačce při 18 °C a 220 RPM, dokud nedosáhla  $OD_{610} = 0,6 - 0,7$ . Kultura s požadovaným OD byla odstavena a umístěna na 10 min na led. Kultura byla centrifugována ve sterilních kyvetách při 2 500 x g, 10 min a 4 °C. Buňky byly opatrně resuspendovány v 10 ml transformačního pufru (0 °C) a umístěny na 10 min na led. Roztok buněk byl centrifugován ve sterilních kyvetách při 2 500 x g, 10 min a 4 °C. Buňky byly opět resuspendovány v 10 ml transformačního pufru (0 °C) a opatrně byl po kapkách přidán 1 ml DMSO a roztok byl opatrně promíchán, následně byl umístěn na 10 min na led. Vzorokly o objemu 0,1 - 0,4 ml byly zamrazeny pomocí tekutého dusíku a uskladněny v -80 °C.

## 4.3 Transformace kompetentních buněk *E. coli* tepelným šokem

### Transformace kmene *E. coli* Origami B (DE3)

Mikrozkumavka kompetentních buněk byla převedena na led a ponechána zvolna roztát (0 °C, 15 - 20 min). Do mikrozkumavky obsahující rozmražené kompetentní buňky (100 µl) bylo přidáno 1 - 5 µl s cca 2 ng/µl rekombinantního vektoru a roztok byl opatrně promíchán. Dále byla směs ponechána inkubovat 15 - 20 min na ledu. Poté byl proveden tepelný šok následujícím způsobem: mikrozkumavka s buňkami a vektorem byla umístěna na 40 - 50 s do 42 °C a vrácena zpět na led (0 °C, 2 min). Poté byly buňky resuscitovány: byl přidán 1 ml sterilního LB media (bez ATB) a roztok byl ponechán inkubovat 1 hod v Thermomixeru při 37 °C a 400 RPM. Buňky byly centrifugovány při 5000 x g, po dobu 1 - 2 min a poté resuspendovány v 1 ml sterilního LB media. Suspenze buněk (1 ml) byla nanesena na Petriho misku s LB-agarem obsahujícím příslušná antibiotika. Buňky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

### Transformace kmene *E. coli* Origami B (DE3) dvěma plasmidy

Pro účely koexprese rekombinantního proteinu s chaperony byly buňky *E. coli* Origami B (DE3) transformovány současně dvěma plasmidy. Použitý postup byl analogický jako při transformaci jedním plasmidem, bylo však použito současně 10 ng/µl

rekombinantního vektoru pro VEGF a 30 ng/μl vektoru rekombinantních chaperonů pGro7.

#### **4.4 Kultivace bakteriálních buněk *E. coli* na tuhém mediu**

Pro kultivaci *E. coli* na tuhém mediu byly používány sterilní plastové Petriho misky o průměru 9 cm s cca 20 ml LB media ztuženého agarem. Povrch ztuženého media byl inokulován za pomoci očkovací kličky příslušnou kulturou. Petriho misky pak byly inkubovány 16 - 48 hodin při 37 °C a poté skladovány při 4 °C.

#### **4.5 Příprava kryokonzerv buněk *E. coli***

Inokulum pro výrobu kryokonzerv bylo připraveno přenesením oddělené kolonie buněk z LB agaru do 50-ml plastové zkumavky s 10 ml LB media obsahujícího příslušná antibiotika. Buňky byly kultivovány přes noc v Thermomixeru při 28 °C a 400 RPM. Z tohoto inokula byly přidavkem 10 % glycerolu připraveny kryokonzervy, které byly dlouhodobě skladovány při -80 °C.

#### **4.6 Submerzní kultivace bakteriálních buněk *E. coli***

Pro expresi rekombinantního proteinu bylo 45 μl obsahu kryokonzervy rekombinantních bakterií *E. coli* Origami B (DE3) zaočkováno 2YT medium na počáteční  $OD_{610} = 0,001 - 0,01$ . Submerzní kultivace probíhala v 500-ml Erlenmeyerových baňkách s 200 ml 2YT media při 37 °C a 220 RPM na orbitální třepačce. Jakmile bakteriální kultura dosáhla  $OD_{610} = 0,4 - 0,6$ , byl sterilně přidán 0,02 mM IPTG (induktor rekombinantního proteinu), popřípadě 0,02 mM IPTG a L-arabinoza 1,7 g/l (induktor rekombinantních chaperonů). Teplota byla následně snížena na 25 °C. Pro produkci potřebného množství cílového proteinu rostla kultura cca 24 hod. Všechny použité kmeny bakterií byly dlouhodobě uchovávány ve formě kryokonzervy (suspenze buněk v LB mediu s 10 % glycerolu) při -80 °C.

#### **4.7 Heterologní exprese rekombinantního proteinu VEGF-A121**

Pro expresi rekombinantního proteinu VEGF-A121 byl v této práci využit expresní systém pET-32a(+), na bázi promotoru T7, kdy je příslušný zaklonovaný gen pod kontrolou silných transkripčních a translačních signálů bakteriofága T7.



Rekombinantní protein VEGF-A121 byl exprimován v expresním kmeni *E. coli* Origami B (DE3). Expresní kmen byl transformován plasmidem pET-32a(+) a kultivován ve 2YT mediu s příslušnými antibiotiky. Exprese proteinu byla indukována přidavkem 0,02 mM IPTG. Kultivace probíhala na orbitální třepačce při 25 °C a 220 RPM. Cca 20 - 24 hod po indukci byla kultura sklizena, buňky desintegrovány sonikací a protein purifikován pomocí afinitní chromatografie.

Pomocí oddělené kolonie rekombinantních buněk *E. coli* Origami B (DE3) (obsahující plasmid pET-32a(+)) bylo zaočkováno 10 ml LB media v 50-ml plastové zkumavce s příslušnými antibiotiky a roztok byl inkubován v Thermomixeru při 28 °C a 400 RPM přes noc. Pro přípravu kryokonzerv bylo smícháno 400 µl suspenze buněk a 100 µl sterilního LB media s 50 % glycerolu (výsledná směs obsahuje 10 % glycerolu), výsledný roztok byl zamražen při -80 °C. Poté bylo 200 ml 2YT media s příslušnými antibiotiky v 500-ml Erlenmeyerových baňkách zaočkováno 45 µl obsahu kryokonzervy na počáteční  $OD_{610} = 0,001 - 0,01$ . Kultura byla inkubována při 37 °C a 220 RPM, dokud nedosáhne  $OD_{610} = 0,4 - 0,6$ . Byl odebrán 1 ml kultury (kontrolní vzorek před indukci), a zaznamenáno  $OD_{610}$ . Následně byla indukována exprese proteinu pomocí přidavku IPTG, popřípadě L-arabiny a bylo pokračováno v kultivaci. Inkubovat kultura bylo inkubována při 25 °C a 220 RPM přes noc. Cca 24 hod po indukci byla zaznamenána finální  $OD_{610}$  v rozmezí cca 6,0 až 9,0. Bylo odebráno 0,5 ml buněčné suspenze pro analýzu. Poté byla sklizena kultura tímto postupem: kultura byla centrifugována 4 min, 4000 RPM a 4 °C, resuspendována v 8 ml pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) a centrifugována 8 min, 4500 RPM a 4 °C. Buňky byly buď zpracovány, nebo zamrazeny při -80 °C.

#### **4.8 Koexprese rekombinantního proteinu VEGF-A121 s molekulárními chaperony**

Rekombinantní protein VEGF-A121 byl koexprimován s molekulárními chaperony. Expresní kmen *E. coli* Origami B (DE3) byl transformován dvěma plasmidy: pET-32a(+), který kóduje rekombinantní VEGF a plasmidem pGro7 kódujícím molekulární chaperony GroEL/GroES. Rekombinantní buňky byly následně kultivovány ve 2YT mediu s příslušnými antibiotiky. Chaperony byly indukovány přidavkem L-arabiny (1,7 g/l) a protein VEGF-A121 pomocí 0,02 mM IPTG. Kultivace probíhala při 37 °C a 220 RPM,

po indukci byla teplota snížena na 25 °C a cca 24 hod po indukci byla kultura sklizena. Poté byla provedena elektroforetická analýza vzorků buněk odebraných před a po indukci.

Obsahem kryokonzervy (*E. coli* Origami B (DE3) obsahující plasmid pET-32a(+) a plasmid pGro7; 45 µl) bylo zaočkováno 200 ml 2YT media v 500-ml Erlenmeyerových baňkách obsahujícího kanamycin 50 µg/ml a chloramfenikol 20 µg/ml na počáteční  $OD_{610} = 0,001 - 0,01$ . Kultura byla inkubována při 37 °C a 220 RPM dokud nedosáhne  $OD_{610} = 0,4 - 0,6$ . Byl odebrán 1 ml vzorku kultury, byla zaznamenána  $OD_{610}$ , poté byly indukovány chaperony přidavkem L-arabiny (1,7 g/l) a exprese proteinu VEGF-A121 přidavkem 0,02 mM IPTG. Teplota byla snížena na 25 °C, dále bylo pokračováno v kultivaci při této teplotě. Cca 24 hod po indukci byla zaznamenána finální  $OD_{610}$  v rozmezí cca 6,0 až 9,0. Bylo odebráno 0,5 ml kultury. Následně byla kultura sklizena: kultura byla centrifugována při 4000 RPM, 4 °C a po dobu 4 min, resuspendována v 8 ml pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) a poté centrifugována při 4500 RPM, 4 °C, po dobu 8 min. Buňky byly buď zpracovány, nebo zamrazeny při -80 °C.

#### **4.9 Gravimetrické stanovení buněčné sušiny**

Peleta buněk ze 14 ml bakteriální biomasy byla promyta 8 ml pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) a v předvážených 15-ml plastových zkumavkách vložena do sušárny (120 °C, 4 hod). Hmotnost sušiny byla následně stanovena z váhového rozdílu.

#### **4.10 Extrakce proteinů z rekombinantních bakterií *E. coli***

Bakteriální biomasa buněk *E. coli* Origami B (DE3) byla po submerzní kultivaci sklizena centrifugací (4 min, 4000 RPM, 4 °C). Buňky byly následně resuspendovány v pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) a opět zcentrifugovány (8 min, 4500 RPM, 4 °C). Získaná promytá bakteriální biomasa byla ve formě pelety následně zamrazena při -80 °C.

Pro extrakci proteinů byla suspenze bakteriálních buněk resuspendována v 75 µl pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) desintegrována sonikací v 1,5-ml plastových zkumavkách umístěných na ledu. Intenzita pulzu byla nastavena na 80 %. Po pěti jednosekundových pulzech byla zkumavka umístěna zpět na led. Tento proces byl opakován 4 krát. Po desintegraci byly buněčné zbytky odstraněny centrifugací

(13 400 RPM, 10 min, 4 °C). Supernatant (75 µl) byl odebrán do čisté plastové mikrozkušavky. Vzorky byly následně použity pro SDS-PAGE (viz odstavec 4.12).

Pro přípravu většího množství buněčného extraktu pro účely purifikace byl proces převeden do většího měřítka. Biomasa bakteriální kultury byla resuspendována ve 20 ml pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) a desintegrována pomocí 200 jednosekundových pulzů za současného chlazení ledem. Intenzita pulzu byla nastavena na 80 %. Po desintegraci byl získaný roztok zředěn pufrům "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) na 8,0 ml, promíchána buněčné zbytky odstraněny centrifugací (5 000 RPM, 30 min, 4 °C). Supernatant (cca 8,0 ml) byl poté odebrán do čisté 15-ml plastové zkumavky a dále zpracován.

## **4.11 Purifikace proteinů**

### **Afinitní chromatografie**

Rekombinantní protein VEGF-A121 exprimován s polyhistidinovou fúzní sekvencí byl purifikován pomocí afinitní chromatografie na matici Talon Metal Affinity Resin.

Buněčný extrakt (19,8 ml) s promytou maticí Talon (5,0 ml) v 50-ml plastové zkumavce byl za mírného míchání inkubován 30 min při 4 °C na třepačce gelů. Matrice s navázaným proteinem poté byla přenesena do 25-ml skleněné kolony s fritou. Nenavázané proteiny (TAL 1, 38 ml) a proteiny vykazující slabou interakci (TAL 2, 15,6 ml) s maticí byly vymyty výše uvedeným pufrům (8 ml) a potom stejným pufrům s 1 mM imidazolem (8 ml). Cílový protein (TAL 3', 16,2 ml) byl následně eluován pomocí 8 ml pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) s 200 mM imidazolem. Přítomný imidazol byl ze vzorku následně odstraněn dialýzou a zakonzentrován pomocí centrifugační filtrační jednotky koncentrátorů Amicon Ultra (cut-off 10 kDa) a přítomný imidazol byl následně naředěn pufrům "A" : získaný roztok (TAL 3, 13,2 ml) byl přenesen do dialyzačního střeva (cut-off 1 kDa) a dialyzován proti 8 l pufru "A" (4 °C, 16 hod, pomalé míchání). Průběh purifikace byl sledován pomocí SDS elektroforézy (viz odstavec 4.12) a byla změřena koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové<sup>111</sup> (viz odstavec 4.13).

### **Štěpení fúzní části proteinu VEGF-A121 v analytickém měřítku**

Pro štěpení fúzní části proteinu v malém měřítku bylo smícháno 10 µg (31,2 µl, 0,32 mg/ml) rekombinantního proteinu VEGF-A121 a 0,6 µl (0,06 U/ml), 3,0 µl (0,3

U/ml) a 15,0  $\mu$ l (1,5 U/ml) trombinu, jednotlivé vzorky byly doplněny na celkový objem 50  $\mu$ l pufrém "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Tyto reakce probíhaly v Thermomixeru při 22 °C. V průběhu reakcí byly provedeny čtyři odběry vzorků (10  $\mu$ l) v 0, 4, 16 a 70 hod. Reakce byly ukončeny přidávkem 10  $\mu$ l 2 x redukujícího vzorkového pufru, vzorky byly následně inkubovány v Thermomixeru (5 min, 95 °C). Z odebraných vzorků byla provedena kontrolní SDS elektroforéza (viz odstavec 4.12), pomocí které byl sledován průběh odštěpování fúzního proteinu. Na základě výsledků z SDS elektroforézy a praktického využití byla zvolena koncentrace 1,5 U/ml trombinu a reakční doba 4 hod.

### **Štěpení fúzní části proteinu VEGF-A121 v preparativním měřítku**

Pro urychlení přípravy finálního proteinu VEGF-A121 z fúzního proteinu byla připravena reakční směs obsahující rekombinantní protein VEGF-A121 ( $c_p = 0,32$  mg/ml, 13,2 ml), trombin (50 U/ml, 280  $\mu$ l), pufr "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) (8188  $\mu$ l) a navíc matrici Talon Metal Affinity Resin (3332  $\mu$ l). Z důvodu přítomnosti imidazolu z předchozí části purifikace byla současně provedena dialýza proti 1000-násobnému přebytku pufru "A". Doba reakce i dialýzy byla 4 hod při laboratorní teplotě. Obsah dialyzačního střeva byl převeden do 15-ml plastové zkumavky a zakoncentrován pomocí centrifugační filtrační jednotky Amicon Ultra (cut-off 10 kDa). Výsledky purifikovaný protein byl sterilizován filtrací (průměr pórů 0,22  $\mu$ m) do sterilní 15-ml plastové zkumavky, poté byl roztok proteinu rozdělen po 100  $\mu$ l do 2-ml plastových zkumavek a zamražen při -80 °C. Čistota proteinu byla sledována pomocí SDS elektroforézy (viz odstavec 4.12) a byla změřena koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové<sup>111</sup> (viz odstavec 4.13).

### **4.12 SDS elektroforéza**

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného byla prováděna podle Laemmliho. Vzorky byly inkubovány 5 min při 95 °C se vzorkovým pufrém obsahujícím dithiothreitol. Na gel bylo aplikováno 5 nebo 10  $\mu$ l vzorku. Jako marker byly použity standardy proteinů o molekulových hmotnostech v rozsahu 14,4 - 97 kDa (GE Healthcare). Velikost proteinů byla prokázána na základě evaluace s využitím programu GelAnalyzer<sup>102</sup>.

Gely byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 a odbarvovány směsí destilovaná voda, methanol a kys. octová.

### **Podmínky elektroforetické separace**

Složení gelů, vzorkového a elektrodového pufru, barvicích a odbarvovacích roztoků je uvedeno v odstavci 3.1.3. Pro fokusaci 4 gelů bylo použito 80 V, 60 mA a 3 W, po dobu cca 10 min a poté pro separaci 130 V, 100 mA a 7 W, po dobu cca 70 min.

### **Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250**

Gel byl ponořen na cca 1 hod do barvicího roztoku obsahujícího Coomassie Brilliant Blue R-250, poté byl barvicí roztok vyměněn a ponechán barvit přes noc. Následně byl gel odbarven pomocí roztoku obsahujícího destilovanou vodu, methanol a kys. octovou (viz odstavec 3.1.3).

Peleta buněčné suspenze byla resuspendována v 75  $\mu$ l pufru "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4), následně byl vzorek desintegrován sonikací v 1-ml plastových zkumavkách umístěných na ledu (viz odstavec 4.10), roztok byl centrifugován při 13 400 RPM, 10 min. Bylo odebráno 75  $\mu$ l supernatantu do čisté zkumavky a přidáno 75  $\mu$ l 2 x redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Ke zbylé peletě z každého odběru bylo přidáno 150  $\mu$ l 1 x redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE a peleta byla resuspendována. Pelety buněk před indukcí byly resuspendovány ve 30  $\mu$ l 1 x redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE (tyto dráhy sloužily jako negativní kontroly). Všechny vzorky pro SDS-PAGE byly inkubovány 5 min při 95 °C a pak centrifugovány při 13 400 RPM, 20 s. Byla provedena SDS-PAGE supernatantu i pelety, vždy bylo nanášeno 5  $\mu$ l výše uvedeného vzorku. Gely byly obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Byla provedena vizuální analýza gelů a byly určeny proužky odpovídající příslušnému rekombinantnímu proteinu s využitím neindukované kultury jako negativní kontroly.

### **4.13 Stanovení proteinů**

Proteiny byly stanovovány podle Bradfordové<sup>111</sup> (1976) pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, USA). Kalibrace byla provedena pomocí standardu hovězího

sérového albuminu (BSA) v rozsahu koncentrací 0,12 – 0,96 mg proteinu/ml. Měření probíhalo na spektrofotometru Shimadzu UV mini-1240 při 595 nm.

#### **4.14 Stanovení aktivity rekombinantního proteinu VEGF-A121 (xCELLigence)**

Biologická aktivita rekombinantně připraveného růstového faktoru VEGF-A121 byla ověřena monitorováním proliferace endotelových buněk v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence (Roche, Švýcarsko). Tento přístroj umožňuje sledovat adhezi a růst buněk na základě zvyšující se impedance, tedy odporu, který klade buňka adherovaná na zlatém čipu kultivační destičky přístroje.

Buňky byly nasazeny v chudém EBM-2 médiu bez růstových faktorů v koncentraci 3500 buněk/jamka 96 jamkové destičky. Pak byly naředěny růstové faktory a byly připipetovány do odpovídajících jamek tak, aby výsledná koncentrace byla 20 ng/ml, 50 ng/ml a 100 ng/ml. Následně byla monitorována proliferace buněk po dobu 7 dní a byly porovnány růstové křivky buněk, které rostly v jamkách s přidaným rekombinantně připraveným VEGF-A121 s buňkami rostoucími v médiu obohaceném o komerčně dostupný VEGF-A121 o stejné koncentraci a růstem buněk v chudém médiu bez přídavku VEGF-A121.

#### **4.15 Příprava fibrinových sítí<sup>101</sup>**

Povrch substrátu (např. polystyrenu) byl inkubován s roztokem fibrinogenu o koncentraci 5 µg/ml, 90 min při pokojové teplotě. Poté byl odstraněn roztok fibrinogenu a povrch byl 2 x promyt pufrém "A" (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Povrch byl inkubován s roztokem trombinu o aktivitě 2 U/ml, 15 min při pokojové teplotě. Byl odstraněn roztok trombinu a povrch byl 2 x promyt pufrém "A". Povrch byl inkubován s roztokem fibrinogenu (640 µg/ml), antitrombinu III (0,5 U/ml) a eventuálně heparinu (60 µg/ml), 60 min při pokojové teplotě.

V případě inkorporace VEGF-A121 dále: byla přidána směs obsahující PBS, trombin (2 U/ml), FXIII (5 U/ml) a růstový faktor VEGF-A121 (0,02 µg/ml), roztok byl inkubován 2 hod při 37 °C. Směs byla odsáta a promyta PBS. Povrch byl sterilizován pomocí UV záření v laminárním boxu (Biohazardní box třída II, Dynex Technologies, ČR) 15 min a pak inkubován přes noc v CO<sub>2</sub>-inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

#### 4.16 Štěpení fibrinové sítě

Digestce fibrinové sítě pro následné stanovení množství inkorporovaného růstového faktoru VEGF-A121 byla prováděna enzymaticky za použití serinové proteasy plasminu (Sigma-Aldrich). Fibrinová síť na dně jamek destičky pro tkáňové kultury byla 2 x promyta roztokem PBS. Poté bylo přidáno 300  $\mu$ l roztoku plasminu (50  $\mu$ g/ml) a vzorek byl inkubován přes noc na třepačce v CO<sub>2</sub>-inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po digesti plasminem byl vzorek solubilizované fibrinové sítě naředěn příslušným množstvím PBS a uložen do -80 °C. Poté bylo provedeno imunologické stanovení VEGF pomocí VEGF ELISY.

#### 4.17 ELISA VEGF-A121

Množství VEGF-A121, které bylo imobilizováno do fibrinové sítě, bylo stanovováno pomocí kitu "VEGF ELISA" (ELISA Kit, *Human VEGF*, Invitrogen, USA).

Do příslušných jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l inkubačního pufru a 100  $\mu$ l standardního pufru. Dále bylo nutné připravit kalibrační řadu: do řady jamek ELISA-destičky bylo přidáno 100  $\mu$ l kalibračního standardu VEGF (0 – 1500 pg/ml). Pro přípravu vzorků bylo do jamek ELISA-destičky vždy přidáno 50  $\mu$ l vzorku a 50  $\mu$ l standardního pufru. Vzorky byly inkubovány 2 hod ve tmě při laboratorní teplotě. Důkladně byl odstraněn roztok z jamek, 4 x byla destička promyta 400  $\mu$ l promývacího pufru. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku protilátky proti VEGF konjugované s biotinem. Vzorky byly inkubovány 1 hod ve tmě při laboratorní teplotě. Důkladně byl odstraněn roztok z jamek, 4 x byla destička promyta 400  $\mu$ l promývacího pufru. Pak bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku streptavidinu-HRP (streptavidinem značená křenová peroxidasa) a roztok byl inkubován 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Důkladně byl odstraněn roztok z jamek, 4 x byla destička promyta 400  $\mu$ l promývacího pufru. Bylo přidáno 100  $\mu$ l stabilizačního roztoku a vzorky byla ponechány 20 - 25 min inkubovat ve tmě při laboratorní teplotě. Pak bylo přidáno 100  $\mu$ l STOP pufru. Nakonec byla spektrofotometricky stanovena koncentrace, měřením absorbance při vlnové délce  $\lambda = 450$  nm (Versa Max Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, USA).

#### 4.18 Nasazování buněk

Endotelové buňky (HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*, Lonza, ČR) v kulturační láhvi byly opláchnuty roztokem PBS. Byly přidány 3 ml roztoku trypsinu

v EDTA a mírným nakláněním ze strany na stranu byly buňky roztokem převrstveny. Kultivační láhev s buňkami byla ponechána inkubovat cca 5 min v CO<sub>2</sub>-inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), dokud nedošlo k oddělení buněk ze dna. Bylo přidáno 8 ml kultivačního media EGM-2 (Lonza, ČR). Buněčná suspenze byla centrifugována při 300 x g, 5 min a 21 °C. Poté byl odstraněn supernatant. Peleta buněk byla resuspendována v 10 ml kultivačního media EGM-2 (Lonza, ČR). Bylo odebráno 700 µl buněčné suspenze na stanovení populační hustoty buněk („koncentrace“ buněk byla měřena pomocí automatického analyzátoru Vi-Cell XR; Beckman Coulter, USA). Buněčná suspenze byla naředěna kultivačním médiem tak, aby v jedné jamce destičky pro tkáňové kultury bylo 20 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Destička s nasazenými buňkami byla umístěna do CO<sub>2</sub>-inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

#### **4.19 Barvení buněk**

Buňky v kultivační lahvi byly opláchnuty roztokem PBS a bylo přidáno 300 µl 70 % ethanolu. Pro fixaci vzorku byly buňky ponechány inkubovat 15 min. Buňky byly opláchnuty roztokem PBS. Poté byly přidány barvicí roztoky fluorescenčních barviv: Phalloidin (barví buněčná aktinová vlákna červeně) a Hoechst (barví buněčná jádra modře), nebo Alexa Fluor 488 (barví proteiny buněčné membrány a cytoplazmy zeleně) a Hoechst 33342 (barví buněčná jádra modře). Barvicí roztoky byly připraveny ředěním komerčních koncentrátů pomocí PBS (Phalloidin 1:500, Hoechst 33342 1:200, Alexa Fluor 488 1:500). Vzorky byly inkubovány 1 hod při pokojové teplotě. Buňky byly opláchnuty roztokem PBS. Následně byly buňky pozorovány fluorescenčním mikroskopem (AxioPlan2, ZEISS, Německo; objektiv s digitální kamerou AxioCam MRc5, ZEISS, Německo).

#### **4.20 Měření relativního počtu buněk na základě jejich metabolické aktivity (XTT assay)**

Relativní množství endotelových buněk bylo primárně stanovováno metodou, která je založena na principu sledování metabolické aktivity buněk pomocí chromogenního substrátu XTT (2,3-Bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid). Pro toto stanovení byla použita komerčně dodávaná souprava (Cell Proliferation Kit II, XTT, Roche).



Z roztoků komerční soupravy byl připraven pracovní roztok XTT: bylo smícháno 19 600  $\mu\text{l}$  roztoku „XTT labeling reagent“ a 400  $\mu\text{l}$  roztoku „electron-coupling reagent“. Buňky ve 24-jamkové destičce pro tkáňové kultury byly promyty 500  $\mu\text{l}$  PBS. Bylo přidáno EGM-2 bez růstových faktorů (500  $\mu\text{l}$  / jamka) a poté roztok XTT (250  $\mu\text{l}$  / jamka). Destička se vzorky byla umístěna na 2 hod do CO<sub>2</sub>-inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po inkubaci bylo převedeno 150  $\mu\text{l}$  obsahu každé jamky do 96-jamkové destičky a byla měřena absorbance při 470 nm. Vyhodnocení metabolické aktivity bylo provedeno jako relativní srovnání s kontrolními vzorky (Versa Max Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, USA).

#### **4.21 Měření relativního počtu buněk na základě kvantitativního stanovení DNA (PicoGreen assay)**

Relativní množství endotelových buněk bylo experimentálně ověřováno nezávislou metodou, která je založena na principu kvantifikace celkového množství buněčné dsDNA. Pro kvantitativní stanovení DNA byla použita komerčně dodávaná souprava (Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits, Invitrogen, USA).

Byl připraven 1 x konc. TE pufr (z 20 x konc. zásobního koncentrátu), 1 % roztok SDS a 1 x konc. roztok PicoGreen (z 200 x konc. zásobního koncentrátu zředěn TE pufr). Dále byl připraven roztok DNA  $\lambda$  (standard) o koncentraci 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a jeho ředěním byla vytvořena kalibrační řada. Pro lyzaci buněk: k buňkám na 24-jamkové destičce pro tkáňové kultury bylo přidáno 0,05 % SDS (300  $\mu\text{l}$  / jamka), vzorky byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo převedeno 100  $\mu\text{l}$  buněčného lyzátu do nové, tmavé 96-jamkové destičky. Těsně před měřením (3 - 5 min) byl přidán ke standardům a stanovovaným vzorkům roztok PicoGreen (1 x konc.; 100  $\mu\text{l}$  / jamka). Pak byla měřena fluorescence, excitace: 480 nm, emise 520 nm (reader mikrotitračních destiček Synergy HTX Multi-Mode Microplate Readers, BioTek, USA).

#### ***Statistika***

Ke statistickému vyhodnocení byl použit program SigmaStat (Jandel Corporation, U.S.A.) a program R<sup>104</sup>. Pro zjištění statistické významnosti rozdílů mezi skupinami byla použita jednoparametrická ANOVA a následně Dunnettův test<sup>105</sup> nebo Tukeyho post hoc test na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Návrh genu kódující růstový faktor VEGF-A121

Pro expresi růstového faktoru VEGF-A121 v hostitelských bakteriích *E. coli* byl nejprve navržen vhodný expresní konstrukt. Růstový faktor byl exprimován jako fúzní protein (detailní popis viz odstavec 4.1), jehož primární struktura je znázorněna na Obr. 5.1. Konstrukt byl navržen konzultantem diplomové práce, Ing. Ondřejem Kaplanem, Ph.D. (Ústav makromolekulární chemie), a zhotoven společností Shanghai Generay Biotechnology (Shanghai, Čína). Syntetický gen kódující modifikovanou variantu VEGF-A121 byl zaklonován mezi restrikční místa *Msc* I a *Xho* I do expresního vektoru pET-32a(+).

```
MSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP  
G TAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGS  
GHMHHHHHSSGLVPRGS GMNQEQVSP  
APMAEGGGQNHHEVVKFMVDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDE  
GLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR*
```

**Obr. 5.1: Primární struktura rekombinantního proteinu VEGF-A121 s fúzním partnerem a přidruženými peptidovými sekvencemi.**

Na základě peptidové sekvence byl navržen syntetický gen kódující modifikovanou variantu VEGF-A121, který byl zaligován mezi restrikční místa *Msc* I a *Xho* I expresního vektoru pET-32a(+). Zastoupení kodonů v syntetickém genu bylo optimalizováno pro expresi v bakteriích *E. coli*, („\*“ označuje stop kodon). Zeleně je vyznačen fúzní partner thioredoxin kódovaný vektorem pET-32a(+), 109 aminokyselin, molekulová hmotnost 11,8 kDa, žlutě je označen růstový faktor VEGF-A121 s následujícími přidruženými peptidovými sekvencemi: šedě hexahistidinová kotva pro afinitní purifikaci, růžově zásahové místo pro trombin (místo štěpení: LVPR/GS), červeně zásahové místo pro faktor XIII a sekvence vyznačená žlutě a zároveň podtržená představuje VEGF-A121, 121 aminokyselin, molekulová hmotnost 14,1 kDa.

### 5.2 Produkce proteinu VEGF-A121

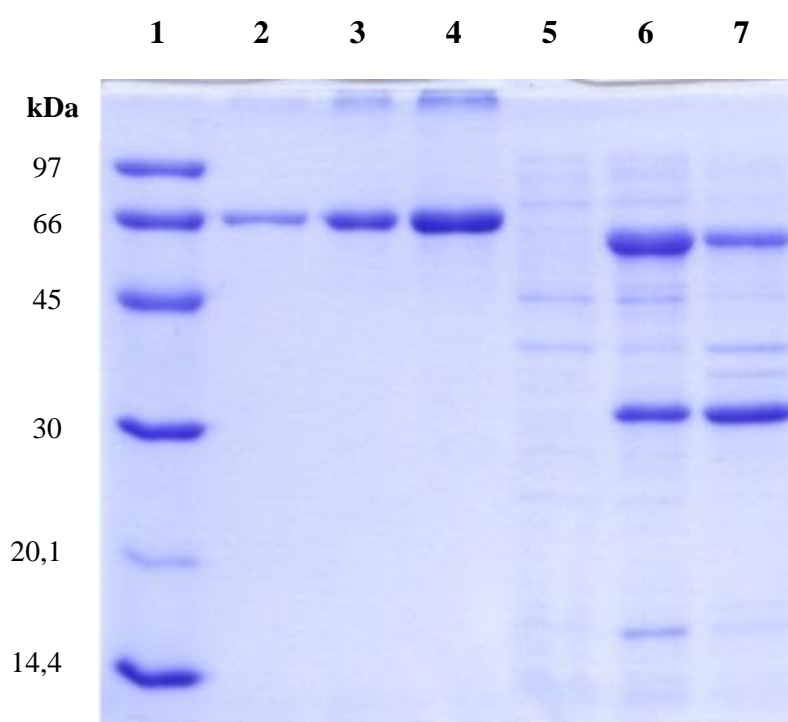
Expres rekombinantního proteinu VEGF-A121 byla provedena využitím vektoru pET-32A(+) a hostitelského kmene *E. coli* Origami B (DE3). Rekombinantním vektorem kódujícím VEGF-A121 byly metodou tepelného šoku transformovány kompetentní buňky *E. coli* Origami B (DE3). S ohledem na předchozí experimentální zkušenosti byly buňky dále kotransformovány komerčním plasmidem pGro7 kódujícím bakteriální chaperonový tandem GroEL/GroES. Koexpres s molekulárními chaperony vedla v případě exprese

některých proteinů ke zvýšení jejich rozpustnosti, či biologické aktivity. Transformované buňky byly vysety na Petriho misku s LB agarem a antibiotiky (ampicilin, kanamycin, chloramfenikol a tetracyklin), zajišťující selekci žádaných klonů. Po 16 - 48 hodinách byl na miskách pozorován nárůst více než 200 pozitivních transformantů, tedy kolonií buněk obsahujících oba dva plasmidy (navržený konstrukt a plasmid pGro7). Dva náhodné klony byly izolovány a po následné submerzní kultivaci a indukci u nich byla pomocí SDS elektroforézy potvrzena přítomnost proteinů velikostně odpovídajících růstovému faktoru VEGF-A121 a chaperonům GroEL a GroES. Submerzní kultivací těchto izolovaných bakteriálních buněk byly připraveny kryokonzervy, které byly uchovány při -80 °C.

Pro expresi rekombinantního proteinu VEGF-A121 bylo obsahem kryokonzervy rekombinantních bakterií *E. coli* Origami B (DE3) zaočkováno 2YT medium na počáteční  $OD_{610} = 0,001 - 0,01$ . Kultivace bakteriální kultury probíhala ve 200 ml 2YT media v 500-ml Erlenmeyerových baňkách při 37 °C a 220 RPM. Jakmile rostoucí kultura dosáhla optické denzity přibližně  $OD_{610} = 0,5$ , byla zahájena exprese růstového faktoru VEGF-A121 přidávkem induktoru, 0,02 mM IPTG, a molekulárních chaperonů přidávkem L-arabiny. Kultivační teplota byla po přidávku induktorů snížena z 37 na 25 °C a kultivace probíhala při této teplotě dalších 20 - 22 hodin. Teplota byla snížena na základě předchozích úspěšných kultivací. Bakteriální kultura dosáhla finálního  $OD_{610} = 5,22 \pm 0,04$ . Po kultivaci byla bakteriální kultura sklizena, promyta pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM  $CaCl_2$ , pH 7,4 a ve formě pelety uchována při -80 °C pro další zpracování, tedy extrakci proteinů a purifikaci.

Hrubý buněčný extrakt byl připraven sonikací bakteriální suspenze (viz odstavec 4.10). Proteiny obsažené v buněčném extraktu expresních buněk byly vizualizovány pomocí SDS elektroforézy a následným barvením pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (viz kapitola 4.12). Na polyakrylamidový gel byl ve vzorkovém pufru nanesen vzorek supernatantu a solubilizované pelety po extrakci, tedy vzorek rozpustné a nerozpustné proteinové frakce. Zpracování nanášeného vzorku bylo zvoleno tak, aby intenzity proužků rekombinantního proteinu v rozpustné a nerozpustné frakci odpovídaly poměru množství proteinu v rozpustné a nerozpustné proteinové fázi uvnitř expresních buněk. Pomocí SDS elektroforézy byla prokázána přítomnost proteinu o velikosti 31,5 kDa, což bylo v souladu s očekáváním - teoretická velikost fúzního proteinu je 29,2 kDa. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí SDS elektroforézy (Obr. 5.2) na základě porovnání intenzit proužků na gelu s kalibračním standardem, kterým byl hovězí sérový albumin. K vyhodnocení dat

byl využit program GelAnalyzer<sup>102</sup>. Velikost jednotlivých proteinů (fúzního VEGF-A121 a chaperonu GroEL a GroES) byla stanovena porovnáním s proteinovým markerem. Využitím programu GelAnalyzer bylo zjištěno, že rozpustná proteinová frakce obsahovala 0,5 mg/ml rekombinantního fúzního proteinu (43 %) a nerozpustná proteinová frakce obsahovala 0,7 mg/ml rekombinantního fúzního proteinu (57 %). Bylo tedy dosaženo stavu, kde je téměř polovina produkovaného fúzního VEGF-A121 rozpustná (Obr. 5.2). V rozpustné i nerozpustné frakci byl navíc přítomen protein o velikosti přibližně 60 kDa, patrně rekombinantní bakteriální chaperon GroEL.



**Obr. 5.2: SDS elektroforéza extraktu bakteriální kultury exprimující růstový faktor VEGF-A121 koexprimovaný s bakteriálními chaperony GroEL/GroES.**

Záznam z SDS elektroforézy zachycující množství rekombinantního proteinu v bakteriích těsně před indukcí a 20 - 22 hodin po indukci. Hostitelský kmen: *E. coli* Origami B (DE3), velikost nanášky 5  $\mu$ l (barveno Coomassie Brilliant Blue R-250). Dráha 1: marker, dráha 2: BSA ( $c = 0,24$  mg/ml), dráha 3: BSA ( $c = 0,48$  mg/ml), dráha 4: BSA ( $c = 0,96$  mg/ml), dráha 5: buňky *E. coli* před indukcí, dráha 6: buňky *E. coli* po indukci fúzního VEGF-A121 a chaperonů GroEL/GroES, rozpustná proteinová frakce VEGF-A121 (supernatant), dráha 7: buňky *E. coli* po indukci fúzního VEGF-A121 a chaperonů GroEL/GroES, nerozpustná proteinová frakce VEGF-A121 (peleta).

### 5.3 Purifikace proteinu VEGF-A121

Purifikace rekombinantního fúzního proteinu VEGF-A121 z bakteriální kultury byla provedena pomocí sonikace a afinitní chromatografie získaného buněčného extraktu. Buněčná peleta získaná z 200 ml 2YT media byla promyta pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 a zamražena při -80 °C, kde byla uložena do okamžiku purifikace.

Tato peleta buněk byla následně resuspendována ve 20 ml pufru 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 a sonikací byl připraven hrubý buněčný extrakt (viz odstavec 4.10). Buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací (5000 RPM, 30 min, 4 °C). Supernatant (buněčný extrakt) byl oddělen a dále zpracován. Koncentrace proteinů v buněčném extraktu byla změřena metodou podle Bradfordové<sup>111</sup> ( $c_p = 2,1$  mg/ml), kdy byl pro kalibraci použit roztok BSA o koncentraci 0,67 mg/ml (viz odstavec 4.13).

Buněčný extrakt (CFE) byl inkubován 30 min při 4 °C s maticí Talon, která byla promyta pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Matrice s navázaným proteinem byla převedena na skleněnou kolonu s fritou. Poté byly odděleny nenavázané proteiny (podíl TAL 1) a matrice byla promyta pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Proteiny vykazující slabou interakci (podíl TAL 2) s maticí byly poté eluovány pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 s imidazolem o nízké koncentraci (1 mM). Cílový protein (podíl TAL 3') byl eluován pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4 s imidazolem o vysoké koncentraci (200 mM). Cílový protein byl zahuštěn pomocí centrifugační filtrační jednotky Amicon Ultra (cut-off 10 kDa), přítomný imidazol byl ze vzorku během zahušťování v několika krocích vyředěn pufrům 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Poté byl odštěpen fúzní partner thioredoxin obsahující histidinovou kotvu, který byl za současné dialýzy z reakční směsi vyvážen maticí Talon (viz odstavec 4.11).

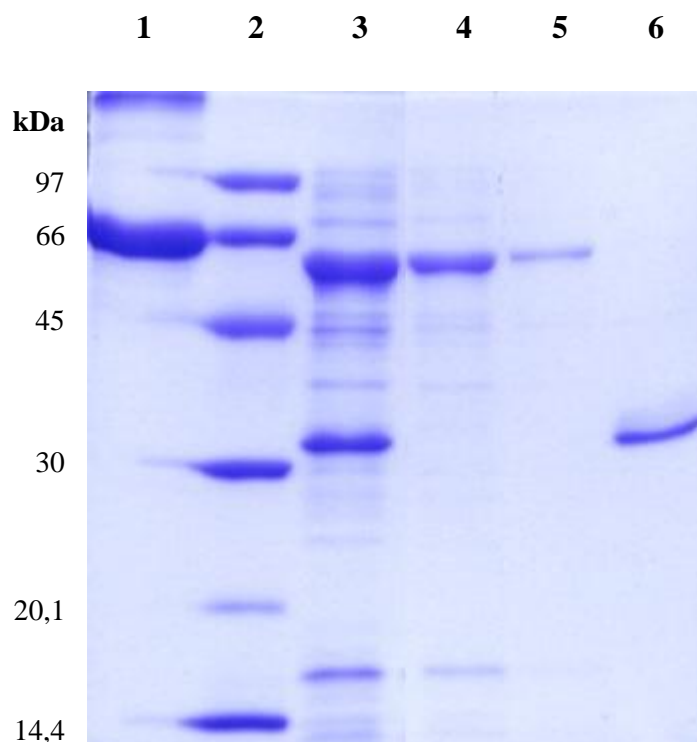
Průběh purifikace byl monitorován pomocí SDS elektroforézy, kdy byl v každém kroku odebrán vzorek frakce, který byl nanesen na polyakrylamidový gel (Obr. 5.3).

Purifikací z 200 ml bakteriální biomasy bylo získáno 4,2 mg fúzního proteinu, ze kterého bylo připraveno 0,3 mg čistého VEGF-A121 bez fúzní části. To odpovídá výtěžku 1,4 mg/l bakteriální kultury. Bilance purifikace je uvedena v Tab. 5.1.

**Tab. 5.1: Purifikační bilance rekombinantního VEGF-A121.**

Purifikace rekombinantního VEGF-A121 z 200 ml bakteriální kultury *E. coli* Origami B (DE3). Proteiny stanovovány metodou dle Bradfordové<sup>111</sup>.

<b>Frakce</b>	<b>Objem frakce [ml]</b>	<b>Koncentrace proteinu [mg/ml]</b>	<b>Proteiny celkem [mg]</b>
CFE (buněčný extrakt)	19,8	2,1	41,6
TAL 1 (nenavázané proteiny)	38,0	-	-
TAL 2 (eluze 1 mM imidazolem)	15,6	-	-
TAL 3 (eluze 200 mM imidazolem, zahuštěno pomocí jednotky Amicon; purifikovaný VEGF-A121 s fúzním partnerem)	13,2	0,3	4,2
TAL 4 (odštěpení fúze + dialýza; purifikovaný VEGF-A121 bez fúzního partnera)	4,0	0,1	0,3



**Obr. 5.3: Purifikace růstového faktoru VEGF-A121 monitorovaná pomocí SDS elektroforézy.**

Záznam z SDS elektroforézy zachycující průběh purifikace růstového faktoru VEGF-A121 (molekulární hmotnosti proteinů: VEGF-A121 s fúzním partnerem cca 31,5 kDa, molekulární chaperony GroEL a GroES cca 58 kDa a 16 kDa, velikost nanášky 10  $\mu$ l (barveno Coomassie Brilliant Blue R-250). Dráha 1: BSA (c = 0,96 mg/ml), dráha 2: marker, dráha 3: hrubý buněčný extrakt VEGF-A121 (CFE), dráha 4: podíl TAL 1, nenavázané proteiny, chaperony GroEL/ES a rekombinantní fúzní protein VEGF-A121 (31,5 kDa), dráha 5: podíl TAL 2, proteiny se slabou interakcí, eluované 1 mM imidazolem, chaperony GroEL/ES, dráha 6: podíl TAL 3, rekombinantní fúzní protein VEGF-A121 (31,5 kDa) eluovaný 200 mM imidazolem.

#### 5.4 Štěpení fúzní části rekombinantního proteinu VEGF-A121

Expresní konstrukt byl navržen tak, aby exprimovaný fúzní protein obsahoval zásahové místo pro trombin. Toto štěpné místo bylo využito pro odštěpení fúzní části rekombinantního proteinu, která obsahovala thioredoxin a histidinovou kotvu (Obr. 5.1).

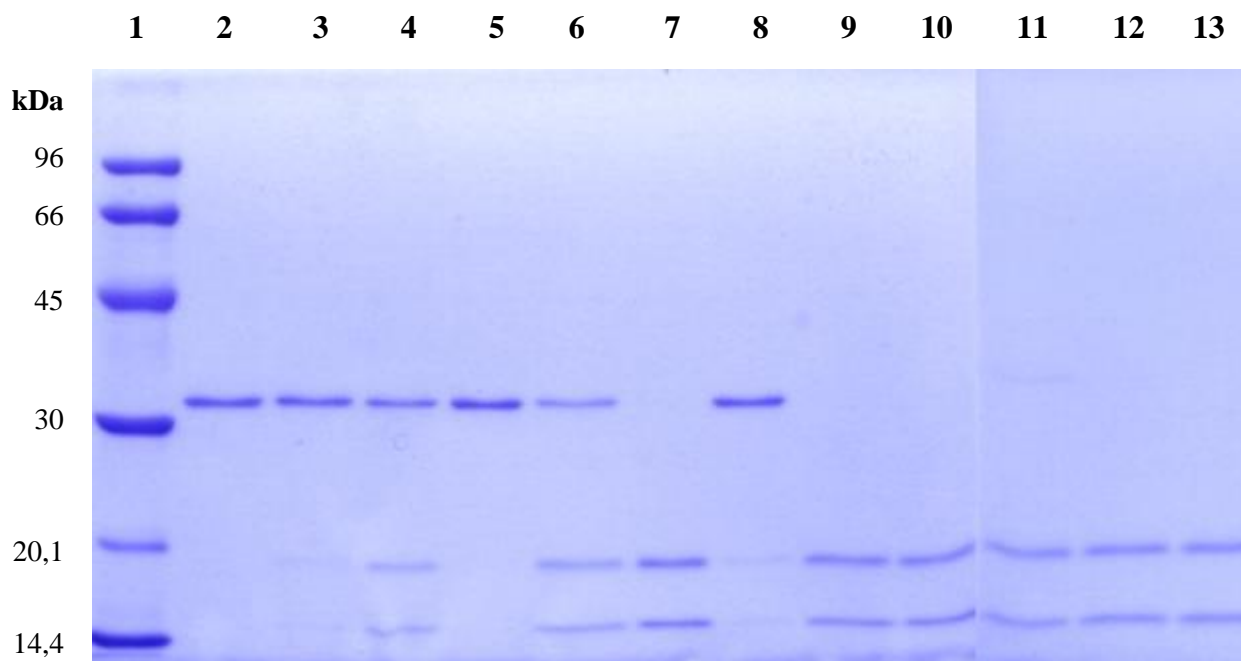
Pro správnou volbu experimentálních podmínek bylo nejprve odštěpení fúzní části provedeno v analytickém měřítku (objem reakční směsi 50  $\mu$ l). Bylo smícháno vždy 10  $\mu$ g rekombinantního fúzního proteinu VEGF-A121 (31,2  $\mu$ l, 0,32 mg/ml) a tři různá množství trombinu (0,003 U, 0,015 U a 0,075 U). Objem reakční směsi byl doplněn na 50  $\mu$ l puforem

50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Reakce probíhala ve 1,5-ml plastových zkumavkách v Thermomixeru při 22 °C a 850 RPM. V průběhu probíhající reakce byly prováděny odběry vzorku (10 µl), v čase 0, 4, 16 a 70 hod. Reakce byla ukončena přidávkem 10 µl 2 x redukujícího vzorkového pufru pro SDS elektroforézu a následnou inkubací 5 min při 95 °C. Z odebraných vzorků byla provedena kontrolní SDS elektroforéza, která měla prokázat odštěpení fúzní části proteinu (Obr. 5.4). V případě odběru vzorku v 70 hod byly na polyakrylamidovém gelu přítomny jen proužky odpovídající thioredoxinu (11,8 kDa) a VEGF-A121 (14,1 kDa), což naznačuje, že trombin skutečně štěpil pouze ve specifickém místě navrženého proteinu a nedošlo k rozštěpení proteinu na menší fragmenty. Proužek na gelu odpovídající trombinu na gelu pozorován nebyl. Na základě výsledků z SDS elektroforézy bylo potvrzeno odštěpení fúzní části proteinu. Cílem tohoto experimentu bylo nalezení vhodných podmínek pro štěpení fúzní části proteinu, jednak s přihlédnutím na množství použitého trombinu a na dobu reakce. Z praktického využití a s ohledem na výsledky kontrolní SDS elektroforézy byla zvolena koncentrace 1,5 U/ml trombinu a reakční doba 4 hod.

Pro praktické urychlení přípravy finálního růstového faktoru VEGF-A121 z fúzního proteinu byla do reakční směsi přidána matrice Talon pro afinitní chromatografii, která na sebe rovnou vážala odštěpenou fúzní část rekombinantního proteinu v průběhu proteolytického štěpení. Z důvodu možné přítomnosti imidazolu z předchozí části purifikace, která by mohla rušit interakci odštěpené fúzní části obsahující histidinovou kotvu s matricí Talon, probíhalo odštěpování fúzní části přímo v dialyzačním střevu za současné dialýzy proti 1000-násobnému přebytku pufru 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Reakční směs tedy obsahovala fúzní protein VEGF-A121 (0,32 mg/ml), trombin (50 U/ml), matrici Talon a pufr 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Reakce probíhala 4 hod při laboratorní teplotě. Obsah dialyzačního střeva byl poté převeden do 15-ml plastové zkumavky, centrifugován (5000 RPM, 30 min, 4 °C) a zahuštěn na centrifugační filtrační jednotce Amicon Ultra (cut-off 10 kDa). Výsledný purifikovaný protein byl nakonec zfiltrován přes sterilní filtr (velikost pórů 0,22 µm), rozdělen do sterilních 1,5-ml plastových zkumavek a uložen při -80 °C. Při zahuštění na centrifugační filtrační jednotce Amicon Ultra byl pozorován vznik bílého zákalu, což naznačuje, že mohlo dojít k precipitaci cílového proteinu. Tato skutečnost by se projevila sníženým výtěžkem, k čemuž skutečně došlo. Rovněž mohlo dojít ke ztrátě cílového proteinu v průběhu koncentrování tím, že protein prošel přes póry centrifugační filtrační



jednotky Amicon Ultra, protože velikost pórů (cut-off 10 kDa) je o něco málo menší než byla velikost cílového proteinu (14,1 kDa).



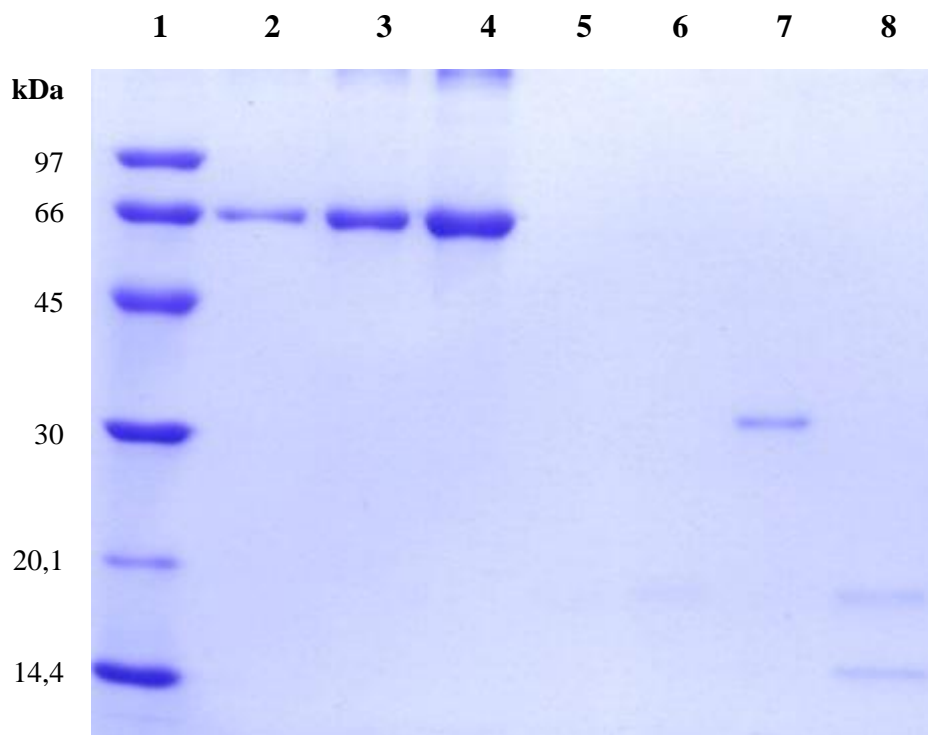
**Obr. 5.4: Odštěpování fúzní části rekombinantního VEGF-A121 v analytickém měřítku monitorované pomocí SDS elektroforézy.**

Záznam z SDS elektroforézy zachycující průběh odštěpování fúzního partnera v analytickém měřítku (VEGF-A121 s fúzním partnerem (10 µg), trombin (0,06; 0,3 a 1,5 U/ml), reakční objem 50 µl, reakční podmínky: 22 °C, 850 RPM, odběry vzorků: 0 hod, 4 hod, 16 hod a 70 hod), molekulární hmotnosti proteinů: VEGF-A121 s fúzním partnerem cca 31,5 kDa, thioredoxin cca 11,8 kDa a VEGF-A bez fúzní části cca 14,1 kDa, velikost nanášky 5 µl (barveno Coomassie Brilliant Blue R-250). Dráha 1: marker, dráha 2: trombin 0,06 U/ml, reakční doba 0 hod, dráha 3: trombin 0,06 U/ml, reakční doba 4 hod, dráha 4: trombin 0,06 U/ml, reakční doba 16 hod, dráha 5: trombin 0,3 U/ml, reakční doba 0 hod, dráha 6: trombin 0,3 U/ml, reakční doba 4 hod, dráha 7: trombin 0,3 U/ml, reakční doba 16 hod, dráha 8: trombin 1,5 U/ml, reakční doba 0 hod, dráha 9: trombin 1,5 U/ml, reakční doba 4 hod, dráha 10: trombin 1,5 U/ml, reakční doba 16 hod, dráha 11: trombin 0,06 U/ml, reakční doba 70 hod, dráha 12: trombin 0,3 U/ml, reakční doba 70 hod, dráha 13: trombin 1,5 U/ml, reakční doba 70 hod.

Purifikací byly získány 4 ml rekombinantního proteinu VEGF-A121 s odštěpenou fúzní částí o výsledné koncentraci 0,07 mg/ml. Čistota purifikovaného proteinu byla ověřována pomocí SDS elektroforézy (Obr. 5.5). Koncentrace cílového proteinu byla však

pro vizualizaci velmi nízká, tudíž jej nebylo možné touto metodou uspokojivě detekovat (dráha 6). Jako kontrola byl použit vzorek VEGF-A121 s fúzní částí (dráha 7) a reakční směs po odštěpení fúzního partnera (dráha 8, Obr. 5.5).

Celkem bylo tedy z 200 ml 2YT media získáno 0,3 mg purifikovaného VEGF-A121 (bez fúzní části), což odpovídá koncentraci cca 1,4 mg proteinu/1 l kultivačního media 2YT.

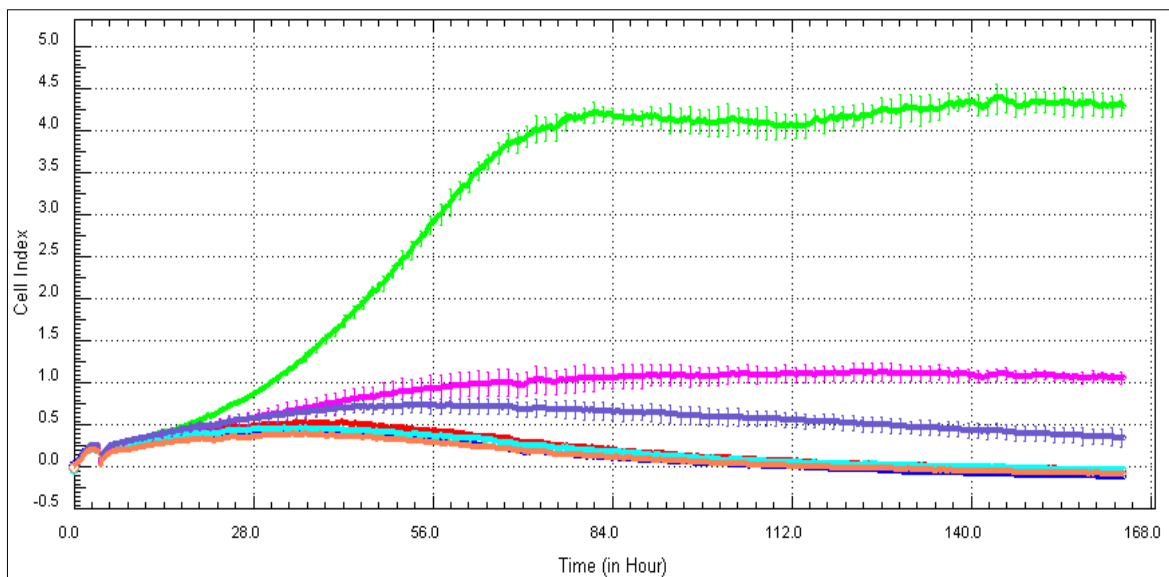


**Obr. 5.5: Odštěpování fúzní části rekombinantního VEGF-A121 v preparativním měřítku monitorované pomocí SDS elektroforézy.**

Elektroforeogram odštěpení fúzního partnera v preparativním měřítku [VEGF-A121 s fúzním partnerem 4,22 mg, trombin 1,5 U/ml, reakční objem 25 ml, teplota 22 °C, reakční čas 4 hod, molekulární hmotnosti proteinů: VEGF-A121 s fúzním partnerem cca 31,5 kDa, thioredoxin cca 11,8 kDa a VEGF-A bez fúzní části cca 14,1 kDa, velikost nanášky 10  $\mu$ l (barveno Coomassie Brilliant Blue R-250)]. Dráha 1: marker, dráha 2: BSA (c = 0,24 mg/ml), dráha 3: BSA (c = 0,48 mg/ml), dráha 4: BSA (c = 0,96 mg/ml), dráha 5: Purifikovaný VEGF-A121, dráha 6: Purifikovaný VEGF-A121, dráha 7: VEGF-A121 s fúzní částí, dráha 8: VEGF-A121 reakční směs po odštěpení fúzního partnera.

## 5.5 Ověření biologické aktivity rekombinantního proteinu VEGF-A121

Aktivita rekombinantně připraveného VEGF-A121 byla ověřena měřením proliferace endotelových buněk v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence (viz odstavec 4.14). Aktivita rekombinantního proteinu VEGF-A121 byla porovnána s biologickou aktivitou komerčně dostupných růstových faktorů VEGF-A121. K tomuto účelu byly zakoupeny rekombinantní růstové faktory exprimované v *E. coli* a v savčích buňkách (HEK). Jako negativní kontrola bylo použito EGM-2 medium bez růstových faktorů. Pro sledování vlivu růstového faktoru na proliferaci endotelových buněk byly použity tři koncentrace růstového faktoru: 20, 50 a 100 ng/ml. Srovnání ukázalo, že námi vyrobený růstový faktor měl silnější vliv na proliferaci endotelových buněk než komerčně dostupné růstové faktory (Obr. 5.6, uvedená koncentrace 50 ng/ml). Tento vliv byl patrný při všech třech sledovaných koncentracích. Porovnání relativní aktivity během exponenciální fáze proliferace ukázalo, že růstový faktor vyráběný v rámci této práce má zhruba 4 x silnější vliv než komerčně dostupný VEGF-A121.



**Obr. 5.6: Stanovení biologické aktivity rekombinantního proteinu VEGF-A121 pomocí xCELLigence senzoričského systému.**

Vliv VEGF-A121 na proliferaci endotelových buněk. Na záznamu z xCELLigence je zobrazeno kontinuální měření proliferace endotelových buněk. Křivka modrá znázorňuje EGM-2 médium bez růstových faktorů (blank), fialová komerčně dostupný růstový faktor VEGF-A121 exprimovaný v savčích buňkách HEK, koncentrace 50 ng/ml, růžová komerčně dostupné VEGF-A121 exprimované v bakteriích *E. coli*, koncentrace 50 ng/ml a zelená růstový faktor VEGF-A121 exprimovaný v rámci této práce, koncentrace 50 ng/ml. Na ose X je čas v hod a na ose Y je bezrozměrný parametr Cell Index (CI), který je odvozen jako relativní změna v měřené elektrické impedanci zastupující stav buněk.

## 5.6 Zabudování rekombinantního proteinu VEGF-A121 do fibrinové sítě

Rekombinantní VEGF-A121 s ověřenou biologickou aktivitou byl následně imobilizován do fibrinové sítě postupem popsáným v kapitole 4.15.

Imunologickým stanovením (viz odstavec 4.17) bylo prokázáno, že se růstový faktor VEGF-A121 podařilo imobilizovat do tenké fibrinové sítě v množství odpovídajícím 412 pg/cm<sup>2</sup> (Tab. 5.2).

**Tab. 5.2: Imunoanalytické stanovení koncentrace růstového faktoru VEGF-A121 imobilizovaného do tenké fibrinové sítě.**

Naměřené množství imobilizovaného VEGF-A121 pomocí faktoru XIIIa a bez použití faktoru XIIIa. Jako negativní kontrola byl použit polystyren a fibrinová síť inkubovaná s EGM-2 médiem, které obsahovalo VEGF-A (viz odstavec 4.17).

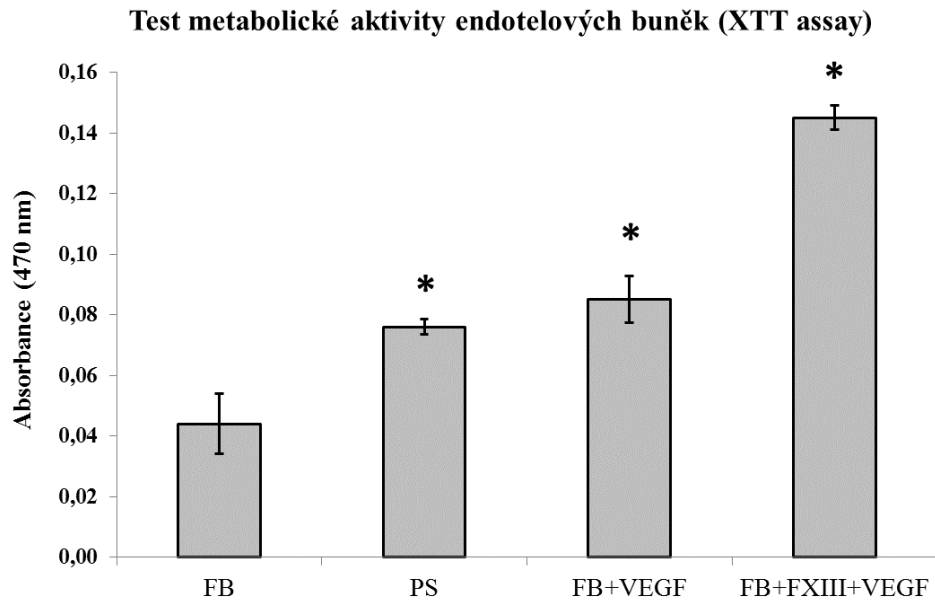
Vzorek	Absorbance* (450 nm)	Koncentrace (pg/ml)	Koncentrace (pg/cm <sup>2</sup> )
Fibrinová síť+ FXIII+VEGF-A121	0,5443	2556,4	412
Fibrinová síť+VEGF-A121	0	0	0
Fibrinová síť	0	0	0
Polystyren	0	0	0

\* Vzorky byly 5 x naředěny puřrem PBS

## 5.7 Proliferace endotelových buněk s imobilizovaným VEGF-A121 na fibrinových povrřích

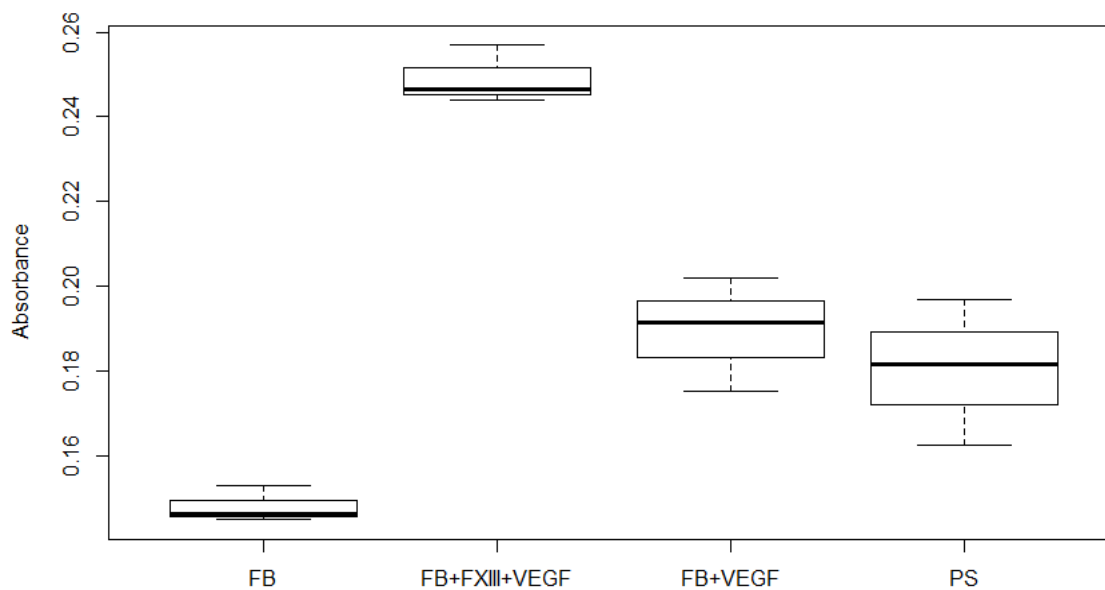
Vliv růstového faktoru VEGF-A121 inkorporovaného do fibrinové sítě na proliferaci endotelových buněk byl sledován dvěma nezávislými metodami: měřením metabolické aktivity buněk (XTT assay, viz odstavec 4.20) a kvantitativním stanovením koncentrace DNA na vzorku (PicoGreen assay, viz odstavec 4.21). Výsledky se statistickým vyhodnocením těchto stanovení jsou uvedeny na grafech na Obr. 5.7 - 5.9.

XTT testem byl zjiřtěn významný vliv VEGF-A121 imobilizovaného do fibrinové sítě pomocí faktoru XIIIa na proliferaci endotelových buněk. Fibrinová síť + VEGF bez faktoru XIIIa vykazoval stejné hodnoty absorbance jako polystyren. Oba tyto vzorky se rovněž významně liřily od kontrolní fibrinové sítě.



**Obr. 5.7: Test metabolické aktivity endotelových buněk (XTT assay).**

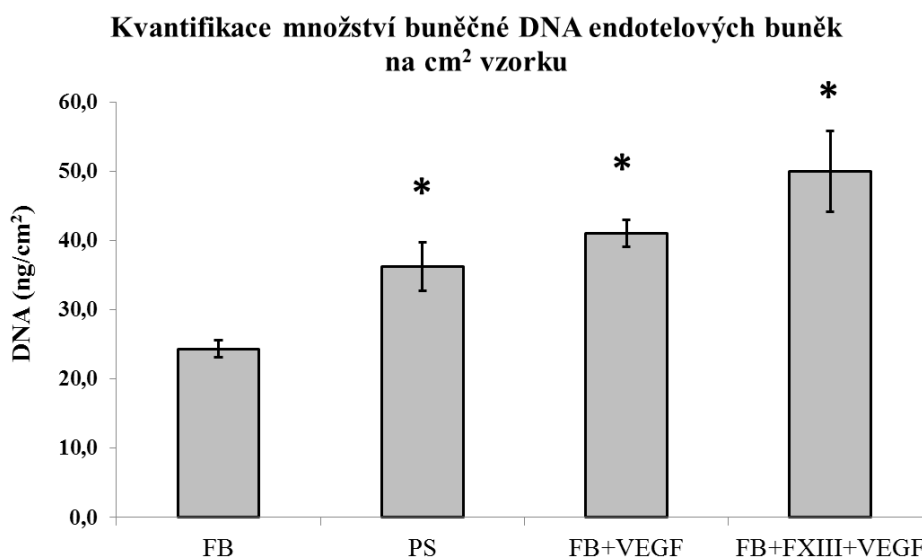
Z grafu je patrná metabolická aktivita endotelových buněk kultivovaných na jednotlivých površích, která je úměrná počtu buněk. \* označuje vzorky, které se statisticky významně liší od kontrolní fibrinové sítě ( $p \leq 0.05$ ). FB je kontrolní fibrinová síť, PS je plasmovaný polystyren, standardní kultivační povrch, FB+VEGF je fibrinová síť inkubovaná s médiem obsahujícím VEGF-A121 a FB+FXIII+VEGF je fibrinová síť, do které byl navázán růstový faktor VEGF-A121 pomocí FXIIIa.



**Obr. 5.8: Krabicový graf znázorňující rozdíly mezi datovými soubory pro XTT assay.**

Rozdíly v naměřených souborech dat znázorňuje boxplot, ze kterého je patrný rozdíl naměřených hodnot absorbancí na kontrolním fibrinovém povrchu oproti ostatním povrchům. Tento fakt byl potvrzen pomocí jednofaktorové ANOVY (pravděpodobnost, že rozptyly naměřených hodnot jsou shodné, byla menší než hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ). Dunnettův test potvrdil statistickou významnost rozdílů hodnot naměřených na fibrinovém povrchu vůči všem ostatním studovaným povrchům. Statistická významnost těchto rozdílů byla potvrzena rovněž párovým post hoc Turkeyho testem, který za statisticky významné ( $\alpha = 0,05$ ) označil všechny kombinace kromě PS a FB+VEGF.

Kvantifikace buněčné DNA pomocí PicoGreen testu potvrdila výsledky získané pomocí testu metabolické aktivity XTT.



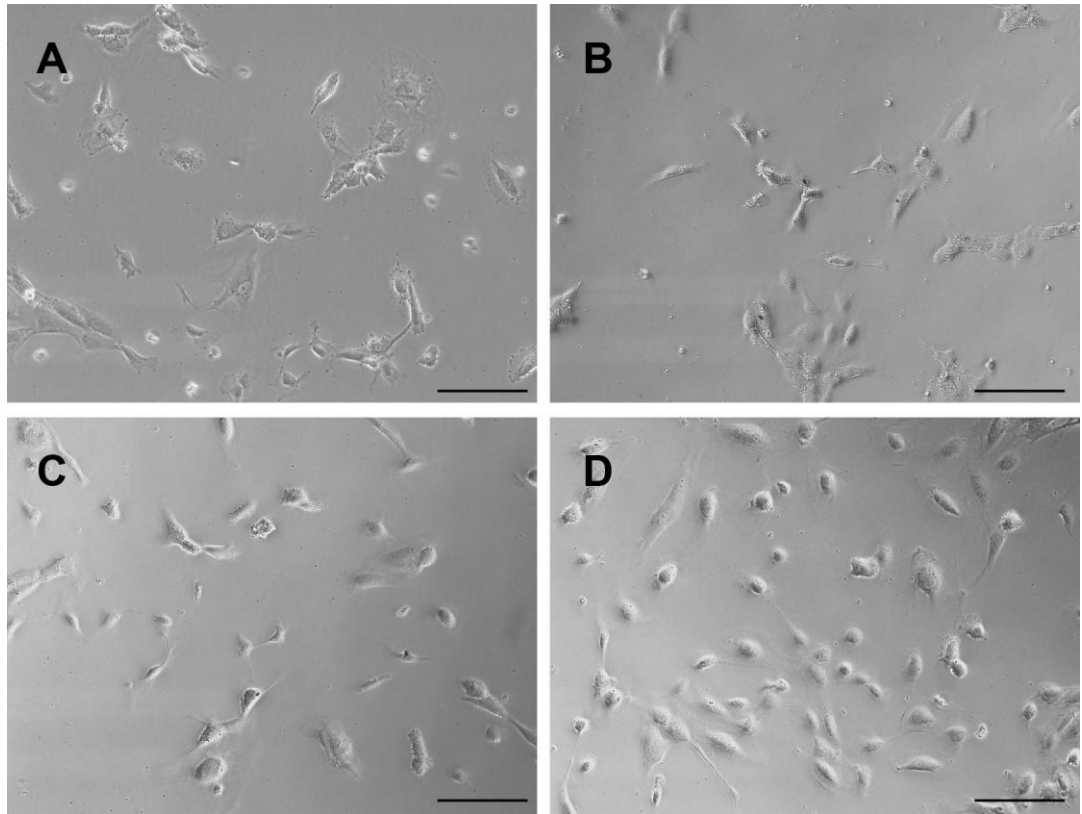
**Obr. 5.9: Kvantifikace celkového množství dsDNA endotelových buněk kultivovaných na testovaných vzorcích (PicoGreen assay).**

Množství DNA koreluje s počtem buněk na vzorcích. \* označuje povrchy, které se statisticky signifikantně liší od kontrolní fibrinové sítě ( $p \leq 0.05$ ). FB je kontrolní fibrinová síť, PS je plasmovaný polystyren, standardní kultivační povrch, FB+VEGF je fibrinová síť inkubovaná s médiem obsahujícím VEGF-A121 a FB+FXIII+VEGF je fibrinová síť, do které byl navázán růstový faktor VEGF-A121 pomocí FXIIIa.

### **Nativní mikroskopie testovaných povrchů**

Vliv inkorporovaného VEGF-A121 na proliferaci buněk byl rovněž vizuálně ověřen pomocí nativní mikroskopie. Endotelové buňky byly na testovaných površích kultivovány po dobu 3 dnů a sledovány světelným mikroskopem Olympus IX 51. Nejvyšší počet buněk byl pozorován na vzorku D (Fibrinová síť+FXIII+VEGF) (Obr. 5.10). Na fibrinovém povrchu, kde byl VEGF-A121 přidáván do média, buňky proliferovaly srovnatelně s polystyrenem, který se používá jako standardní kultivační povrch. Na nemodifikované fibrinové síti byl v porovnání s ostatními vzorky pozorován nejnižší počet buněk.





**Obr. 5.10: Nativní mikrofotografie testovaných povrchů.**

Měřítko: 100  $\mu\text{m}$ , vzorek A: polystyren, vzorek B: fibrinová síť, vzorek C: fibrinová síť+VEGF-A121, vzorek D: fibrinová síť+FXIII+VEGF-A121.

## 6. DISKUZE

Experimentální část této diplomové práce byla vypracována na třech pracovištích. První část zabývající se expresí rekombinantního proteinu VEGF-A121 byla prováděna v Laboratoři Biotransformací (MBÚ AV ČR). Ve druhé části byl rekombinantně připravený růstový faktor využit k modifikaci fibrinového povrchu (tato část byla zpracována ve spolupráci s oddělením Biomateriálů a bioanalogických systémů (ÚMCH AV ČR)) a v závěrečné části byla studován vliv připraveného biomateriálu na růst endotelových buněk (Oddělením biomateriálů a tkáňového inženýrství (FgÚ AV ČR)).

Cévní náhrady, které se používají v současné klinické praxi, vykazují řadu nedostatků. Ty se projevují především u cévních náhrad o průměru menším než 6 mm, kde je menší průtok krve a vyšší riziko vzniku trombu a ucpání cévy. Tomu by se však dalo předejít vhodnou modifikací povrchu cévní protézy. Jednou z možností, jak zvýšit dlouhodobou průchodnost umělých cév, je endotelizace povrchu.

Tato diplomová práce se soustředí na vývoj povrchové modifikace biomateriálu na bázi fibrinu s inkorporovaným růstovým faktorem VEGF-A121. Fibrin byl zvolen proto, že se jedná o hemokompatibilní materiál, který se uplatňuje v přirozeném procesu hojení ran. V případě poranění cévy tvoří provizorní extracelulární hmotu, dočasnou podpůrnou strukturu pro hojivé procesy, která je kolonizována endotelovými buňkami a po čase zcela nahrazena novou endotelovou tkání<sup>106</sup>. Pokud by se podařilo tento přirozený proces napodobit a adaptovat do klinické praxe, bylo by možné zhotovit cévní protézy se zvýšenou dlouhodobou průchodností. Takováto adaptovaná technologie by dále mohla nalézt uplatnění při vývoji umělých srdečních chlopní či kardiovaskulárních stentů. Výhodou fibrinu je jeho dostupnost, lze jej totiž snadno izolovat z krve dárce. Biomateriál založený na fibrinu by tedy mohl podpořit kolonizaci protézy endotelovými buňkami, které aktivně zabraňují tvorbě krevní sraženiny. V přirozeném procesu hojení však figuruje velké množství bioaktivních látek, které proces akcelerují. Jedná se zejména o širokou rodinu růstových faktorů a signálních proteinů, které ovlivňují proliferaci, migraci a diferenciaci endotelových buněk. V této práci jsme se pokusili tento složitý proces zredukovat na jednodušší experimentální model, kdy jsme se do fibrinové sítě pokusili navázat vaskulární endotelový růstový faktor, variantu A121(VEGF-A121).

První část této práce je zaměřena na expresi rekombinantního proteinu VEGF-A121. Vaskulární endotelový růstový faktor je signální glykoprotein, který aktivuje

transmembránové receptory v plazmatické membráně endotelových buněk<sup>83, 84</sup>. Tento růstový faktor je důležitý při vaskulogenezi a angiogenezi. Ze strukturálního hlediska je VEGF-A121 homodimer, který obsahuje jednu disulfidickou skupinu, kterou jsou obě podjednotky spojeny. Molekulová hmotnost tohoto dimeru je 28 kDa<sup>98, 99</sup>.

Pro expresi růstového faktoru VEGF-A121 byl navržen expresní konstrukt (návrh: Ing. Ondřej Kaplan, Ph.D., ÚMCH, odd. Biomateriálů a bioanalogických systémů), který byl následně vyroben společností Shanghai Generay Biotechnology (Shanghai, Čína). Konstrukt měl zajistit, aby byl růstový faktor exprimován jako fúzní protein s přidruženými peptidovými sekvencemi, které umožní jeho produkci, purifikaci a následnou inkorporaci do fibrinové sítě. Od *N*-terminálního konce byl protein kódovaný expresním konstruktem sestaven z těchto částí: fúzní partner thioredoxin, histidinová kotva, zásahové místo pro proteasu trombin, zásahové místo pro faktor XIII a samotný vaskulární endotelový růstový faktor, varianta A121 (Obr. 4.1, Obr. 5.1). Fúzní partner thioredoxin měl zvýšit rozpustnost exprimovaného proteinu, a tím potlačit tvorbu inkluzních tělísek. K tomuto jevu při expresi rekombinantních proteinů dochází velice často a s ohledem na dostupnou literaturu byl tento jev v případě VEGF očekáván<sup>103</sup>. Histidinová kotva umožňuje jednoduchou purifikaci pomocí afinitní chromatografie. Konstrukt pro expresi VEGF-A121 byl navržen tak, aby bylo možné po purifikaci exprimovaného proteinu pomocí trombinu odštěpit fúzní část obsahující thioredoxin a histidinovou kotvu ve specifickém zásahovém místě. Dále konstrukt kóduje zásahové místo pro faktor XIII, který umožňuje kovalentní immobilizaci růstového faktoru VEGF-A121 do fibrinové sítě pomocí transglutaminasové aktivity faktoru XIII (FXIIIa). Tato metoda, která využívá unikátní schopnosti faktoru XIIIa kovalentně konjugovat fibrinové monomery a určité další proteiny, byla v minulosti rozpracována v sérii vědeckých prací<sup>107</sup>.

Přirozená úloha faktoru XIIIa, což je jeden z faktorů účastnících se koagulační kaskády, je kovalentně prokřížit fibrin. Proto se tento faktor také nazývá fibrin-stabilizující faktor a z biochemického hlediska se jedná o enzym transglutaminasu. FXIIIa je schopen rozpoznat určité krátké peptidové sekvence v molekulách proteinů (především fibrinu, inhibitoru plasminu  $\alpha_2$ , kolagenu a dalších) a v místě těchto sekvencí proteiny spojit kovalentní vazbou<sup>108</sup>. Je-li takováto sekvence, v našem případě NQEQVSPL odvozená od inhibitoru plasminu  $\alpha_2$  (zvaný také  $\alpha_2$ -antiplasmin), uměle vnesena do jiného proteinu, například do molekuly růstového faktoru, může být tento růstový faktor kovalentně

konjugován k fibrinu. Expresní konstrukt, navržený pro tuto práci, byl vytvořen zaklonováním syntetického genu kódujícího modifikovanou variantu VEGF-A121 mezi restrikční místa *Msc* I a *Xho* I vektoru pET-32a(+). Insert byl zaklonován ve stejném čtecím rámci jako fúzní partner thioredoxin, který je kódován na vektoru pET-32a(+). U syntetického genu byla provedena optimalizace zastoupení kodonů pro expresi v bakteriích *E. coli*.

Pro produkci rekombinantního proteinu byl zvolen bakteriální expresní systém, jehož výhoda spočívá především v experimentální jednoduchosti, nízkému riziku kontaminace kultury a ekonomii procesu. Nevýhodou tohoto expresního systému je nemožnost zajištění posttranslačních modifikací, jakými jsou například glykosylace, které jsou často důležité pro správnou funkci proteinu. Dalším úskalím je vysoká pravděpodobnost exprese proteinu v nerozpustné formě, ve formě tzv. inkluzních tělísek. V takovém případě a je třeba vzniklý protein izolovat a provést jeho renaturaci.

Z tohoto důvodu byl růstový faktor exprimován jako fúzní protein s fúzním partnerem thioredoxinem, který by měl tvorbu inkluzních tělísek potlačit. Navrženým vektorem kódujícím VEGF-A121 a vektorem pGro7 kódujícím molekulární chaperony GroEL/GroES byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* Origami B (DE3). Tento proces byl navržen podle předchozích úspěšných produkcí jiných proteinů, např. FGF-1, FGF-2 (zatím nepublikováno) a eukaryotních nitrilas<sup>109</sup>. Pomocí SDS elektroforézy bylo zjištěno, že tvorba inkluzních tělísek byla snížena přibližně na polovinu. Na základě evaluace elektroforeogramu pomocí programu GelAnalyzer<sup>102</sup> bylo u rekombinantního fúzního proteinu určeno zastoupení rozpustné (43 %) a nerozpustné proteinové frakce (57 %). Rekombinantní protein VEGF-A121 byl dále koexprimován s bakteriálními chaperony GroEL/GroES, které mohly zajistit vyšší rozpustnost proteinu, popřípadě zvýšit jeho biologickou aktivitu. Ukázalo se, že protein koexprimovaný s chaperony vykazoval ve srovnání s dvěma analogickými komerčními preparáty vyšší biologickou aktivitu. Ta byla studována na základě interakce růstového faktoru s endotelovými buňkami. Je možné, že toto zvýšení biologické aktivity bylo způsobeno lepším sbalením proteinu, zajištěným dodatečnými molekulárními chaperony.

Rekombinantní fúzní protein byl podroben purifikaci pomocí afinitní chromatografie. Principem této metody je reverzibilní interakce histidinového konce proteinu s kobaltnatými ionty, které jsou imobilizovány na matici. Purifikace zahrnovala několik kroků vedoucích k získání fúzního proteinu. Průběh purifikace byl sledován

pomocí SDS elektroforézy (Obr. 5.3). Po vizualizaci byly na gelu přítomny intenzivní proužky odpovídající velikostem 31,5 kDa (patrně požadovaný fúzní VEGF-A121) a 57,8 kDa (pravděpodobně bakteriální chaperon GroEL). V konečné fázi purifikace bylo nutné odštěpit dále nepotřebnou fúzní část rekombinantního proteinu obsahující thioredoxin a histidinovou kotvu. Pro tento účel bylo v expresním konstruktu cíleně navrženo zásahové místo pro trombin. Pro nalezení vhodných experimentálních podmínek bylo nejprve provedeno odštěpování fúzního partnera v analytickém měřítku (v objemu 50  $\mu$ l). Ze tří reakčních směsí obsahujících různé koncentrace trombinu (0,06; 0,3 a 1,5 U/ml) a 10  $\mu$ g fúzního proteinu byly v časech 0, 4, 16 a 70 hod odebrány vzorky. Tyto vzorky byly naneseny na SDS elektroforézu a na gelu byly sledovány proužky odpovídající celému fúznímu proteinu (31,5 kDa), thioredoxinu (11,8 kDa) a VEGF-A121 (14,1 kDa; Obr. 5.4). Pro preparativní odštěpení fúzního partnera byla zvolena koncentrace trombinu 1,5 U/ml a reakční doba 4 hod. Za těchto podmínek byly na záznamu z SDS elektroforézy pozorovány jen proužky odpovídající velikostem thioredoxinu a VEGF-A121, proužek odpovídající fúznímu proteinu již pozorován nebyl. To naznačuje, že byl veškerý fúzní protein v reakční směsi rozštěpen. Vzhledem k přítomnosti pouze dvou výrazných proužků na gelu lze přepokládat, že trombin štěpil pouze ve specifické sekvenci a u žádaného proteinu nedošlo k jeho rozštěpení na menší fragmenty.

Pro přípravu VEGF-A121 v preparativním měřítku bylo z důvodu časové úspory současně prováděno štěpení fúze a její vyvázání z reakční směsi za současné dialýzy, která měla odstranit zbytkový imidazol z předchozí části purifikace. Výsledný roztok proteinu byl zkoncentrován na centrifugační filtrační jednotce Amicon Ultra (cut-off 10 kDa). Při zahuštění byl pozorován vznik bílého zákalu. Pravděpodobně došlo k precipitaci proteinu, což mohlo negativně ovlivnit celkový výtěžek. Není vyloučena ztráta cílového proteinu v průběhu zakoncentrování proteinu. Část proteinu by za určitých podmínek mohla projít přes póry centrifugační filtrační jednotky Amicon Ultra, jejíž velikost pórů (cut-off 10 kDa) je jen o něco málo menší než velikost cílového proteinu ve formě monomeru (14,1 kDa). Čistota finálního proteinu byla ověřena pomocí SDS elektroforézy (Obr. 5.5). Koncentrace cílového proteinu byla však nízká a vizualizace pomocí SDS elektroforézy tudíž byla obtížnější. Koncentrace výsledného preparátu VEGF-A121 byla stanovena metodou podle Bradfordové<sup>111</sup> na 0,07 mg/ml. Přepočtem bylo zjištěno, že z jednoho litru kultivačního media 2YT bylo získáno 1,4 mg proteinu. Takový výtěžek je v porovnání s publikovanými výsledky poměrně nízký, neboť jiní autoři uvádí výtěžky kolem 5 mg/l

media<sup>103</sup>. K největším ztrátám pravděpodobně došlo během zakoncentrování proteinu, kdy mohlo dojít k precipitaci značného podílu cílového proteinu.

Biologická aktivita růstového faktoru VEGF-A121 byla ověřena měřením proliferace endotelových buněk v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence. Vliv rekombinantně připraveného VEGF-A121 na proliferaci endotelových buněk byl porovnán s aktivitou komerčně dostupných růstových faktorů VEGF-A121 exprimovaných v *E. coli* nebo v savčích buňkách HEK. Během experimentu byly porovnány tři koncentrace VEGF-A121: 20, 50 a 100 ng/ml (Obr. 5.6). Rekombinantní růstový faktor připravený v rámci této práce vykazoval zhruba 4 x větší vliv na stimulaci proliferace endotelových buněk než dva komerčně dostupné preparáty VEGF-A121.

Růstový faktor byl následně imobilizován do fibrinové sítě. Postup přípravy fibrinové sítě, který byl převzat od našich spolupracovníků z Ústavu makromolekulární chemie, spočívá v postupné inkubaci polystyrenového povrchu s roztoky reagentů, fibrinogenem, trombinem a směsí fibrinogenu, antitrombinu a heparinu<sup>101</sup>. Pomocí aktivity faktoru FXIIIa (enzymu transglutaminasy) byl do této fibrinové sítě následně inkorporován námi připravený rekombinantní růstový faktor VEGF-A121. Množství navázaného proteinu bylo sledováno pomocí imunologického stanovení ELISA. Bylo prokázáno, že se podařilo růstový faktor VEGF-A121 imobilizovat do tenké fibrinové sítě v množství odpovídajícím 412 pg/cm<sup>2</sup> (Tab. 5.2). Ačkoliv byl postup imobilizace dále optimalizován, ani zvýšená koncentrace VEGF-A121, ani prodloužená reakční doba pro navázání VEGF-A121 nezvýšily významně množství inkorporovaného VEGF-A121 do fibrinové sítě.

Proliferace endotelových buněk na fibrinových površích s navázaným růstovým faktorem VEGF-A121 byla sledována dvěma nezávislými metodami: měřením metabolické aktivity (viz odstavec 4.20 a odstavec 5.6) a kvantitativním stanovením koncentrace DNA ve vzorku (viz odstavec 4.21 a odstavec 5.6). Výsledné grafy jsou uvedeny na Obr. 5.7 a Obr. 5.9. Měřením metabolické aktivity tzv. XTT testem bylo zjištěno, že kovalentně imobilizovaný růstový faktor VEGF-A121 do fibrinové sítě přes faktor XIII významně ovlivňuje proliferaci endotelových buněk. Jeho absorbance byla téměř dvojnásobná oproti absorbanci, která byla naměřena na povrchu, který tvořila fibrinová síť s VEGF-A121 bez faktoru XIII. Druhá metoda, která kvantitativně stanovuje koncentraci DNA pomocí PicoGreen testu, jen potvrdila výsledky získané pomocí XTT testu. Vliv navázaného rekombinantního růstového faktoru VEGF-A121 na proliferaci

endotelových buněk byl vizuálně ověřen pomocí nativní mikroskopie (Obr. 5.10). Nejvyšší počet buněk byl pozorován na fibrinovém povrchu s imobilizovaným VEGF-A121 pomocí faktoru XIIIa. Počty buněk na fibrinové síti, kde byl růstový faktor VEGF-A121 přidáván do média a na polystyrenu, který zde slouží jako kontrolní kultivační povrch, byly srovnatelné. Nejnižší počet buněk byl pozorován na nemodifikované fibrinové síti. Třebaže se v této práci podařilo navázat do fibrinové sítě jen cca 0,5 ng VEGF-A121/cm<sup>2</sup>, což je výrazně nižší koncentrace, než má VEGF v komerčních médiích, dle provedených experimentů se zdá, že tato koncentrace je dostatečná k tomu, aby významně ovlivnila růst endotelových buněk. To může být způsobeno například tím, že se VEGF po navázání na receptor VEGFR neinternalizuje do buňky, ale zůstává ukotven na fibrinovém povrchu a stimuluje další receptor. Tento efekt byl již pozorován<sup>110</sup>.

## 7. ZÁVĚR

Růstový faktor VEGF-A121 byl úspěšně exprimován v rekombinantních bakteriích *E. coli* Origami B (DE3) v rozpustné formě.

Rekombinantní VEGF-A121 byl purifikován ve výtěžku 1,4 mg/l bakteriální kultury a jeho biologická aktivita byla experimentálně potvrzena na buňkách cévního endotelu. Tato biologická aktivita byla cca 4 x vyšší v porovnání se dvěma komerčně dodávanými preparáty.

Růstový faktor byl aktivitou faktoru XIIIa kovalentně inkorporován do fibrinové sítě v množství odpovídající cca 412 pg/cm<sup>2</sup>.

Inkorporací VEGF-A121 do fibrinové sítě byl zvýšen vliv na proliferaci endotelových buněk.



## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Čihák, R., Druga, R., Grim, M.: Anatomie 3. 2. vydání, Grada Publishing, Praha, str. 3, 71-72 (2004)
2. Lüllmann-Rauch, R.: Histologie. 3. vydání, Grada Publishing, Praha, str. 212-216 (2012)
3. Kubisz, P., Hrubíšková, K., Pařízek, M., Holan, J.: Trombocyty a trombocytopenie. 1. vydání, Osveta, Martin, str. 296 (1987)
4. Jarkovská, D., Martínek, J.: Histologie I. 1. vydání, Karolinum, Praha, str. 54 (1997)
5. Ganong, W. F.: Přehled lékařské fyziologie. 20. vydání, Galén, Praha, str. 582, 598 (2005)
6. Gartner, L. P., Hiatt, J. L.: Color Atlas of Histology. 4. vydání, Lippincott Williams&Wilkins, USA, str. 45-48 (2006)
7. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Základy buněčné biologie. 2. vydání, Espero Publishing, Ústí nad Labem, str. 593-603 (1998)
8. Jelínek, R., Dostál, M., Likovský, Z., Halašková, M., Maňáková, E., Peterka, M., Peterková, R., Titlbach, M., Velický, J., Zemanová, Z., 3. LF UK v Praze, Histologie embryologie: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf> (9.6.2015)
9. Olczyk, P., Mencner, A., Komosinska-Vassev, K.: BioMed Res. Int. 2014, 1-8 (2014)
10. Ross, R., Harker, L.: Science. 193, 1094-1100 (1976)
11. Vrablík, M., Janotová, M., Motyková, E., Prusíková, M.: Med. praxi. 8, 119-122 (2011)
12. Karásek, D., Vaverková, H., Halenka, M., Hutýra, M.: Interní medicína pro praxi. 9, 450-453 (2004)
13. Malík, J., Melenovský, V., Wichterle, D.: Cas. Lek. Cesk. 139, 197-202 (2000)
14. Dufek, M.: Interní medicína-meziohorové přehledy. 3, 16-21 (2003)
15. Bačáková-Řeřábková, L.: Československá fyziologie. 39, 412-427 (1990)

16. Rohatgi, A., Owens, A. W., Khera, A., Ayers, C. R., Banks, K., Das, S. R., Berry, J. D., McGuire, D. K., de Lemos, J. A.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1684-1690 (2009)
17. Slevin, M., Krupinski, J., Badimon, L.: *J. Angiogenes. Res.* 21, 1-4 (2009)
18. Langer, R., Vacanti, J. P.: *Science.* 260, 920-926 (1993)
19. Linez-Bataillon, P., Monchau, F., Bigerelle, M., Hildebrand, H. F.: *Biomol. Eng.* 19, 133-141 (2002)
20. Bačáková, L., Filová, E., Rypáček, F., Švorčík, V., Starý, V.: *Physiol. Res.* 53, 35-45 (2004)
21. Chlupáč, J., Filová, E., Bačáková, L.: *Physiol. Res.* 58, 119-139 (2009)
22. Xue, L., Greisler, H. P.: *J. Vasc. Surg.* 37, 472-478 (2003)
23. Pařízek, M., Novotná, K., Bačáková, L.: *Physiol. Res.* 60, 419-437 (2011)
24. Filová, E., Straka, F., Mirejovský, T., Mašín, J., Bačáková, L.: *Physiol. Res.* 58, 141-158 (2009)
25. Pařízek, M.: Interakce cévních a kostních buněk s bioaktivními polymery pro konstrukci tkáňových náhrad. Dizertační práce, Fyziologie a patofyziologie člověka, 2. LF UK Praha (2012)
26. Švorčík, V., Kubová, O., Slepíčka, P., Dvořánková, B., Macková, A., Hnatowicz, V.: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17, 229 (2006)
27. Marois, Y., Chakfé, N., Guidoin, R., Duhamel, R. C., Roy, R., Marois, M., King, M. W., Douville, Y.: *Biomaterials.* 17, 3-14 (1996)
28. Guidoin, R., Maurel, S., Chakfé, N., How, T., Zhang, Z., Therrien, M., Formichi, M., Gosselin, C.: *Biomaterials.* 14, 694-704 (1993)
29. Heitz, J., Švorčík, V., Bačáková, L., Ročková, K., Ratajová, E., Gumpenberger, T., Bauerle, D., Dvořánková, B., Kahr, H., Graz, I., Romanin, C.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* 67, 130-137 (2003)
30. Zilla, P., Bezuidenhout, D., Human, P.: *Biomaterials.* 34, 5009-5027 (2007)
31. Zdrahala, R.: *J. Biomater. Appl.* 11, 37-61 (1996)
32. Tiwari, A., Salacinski, H., Seifalian, A. M., Hamilton, G.: *Cardiovasc. Surg.* 10, 191-197 (2002)
33. <http://www.bbraun.es/cps/rde/xchg/cw-bbraun-es-es/hs.xsl/products.html?prid=PRID00003021> (15.6.2015)

34. Bačáková, L., Filová, E., Pařízek, M., Ruml, T., Švorčík, V.: *Biotechnol. Adv.* 29, 739-767 (2011a)
35. Brynda, E., Pacherník, J., Houska, M., Pientka, Z., Dvořák, P.: *Langmuir*. 21, 7877-7883 (2005)
36. Filová, E., Brynda, E., Riedel, T., Bačáková, L., Chlupáč, J., Lisá, V., Houska, M., Dyr, J. E.: *J. Biomed. Mater. Research, Part A*. 90, 55-69 (2009b)
37. Nieswandt, B., Watson, S. P.: *Blood*. 102, 449-461 (2003)
38. Bačáková, L., Lisá, V., Kubínová, L., Wilhelm, J., Novotná, J., Eckhart, A., Herget, J.: *Virchows Arch.* 440, 50-62 (2002)
39. Gobin, A. S., West, J. L.: *J. Biomed. Mater. Research, Part A*. 67, 255-259 (2003)
40. Dufourcq, P., Couffinhal, T., Alzieu, P., Daret, D., Moreau, C., Duplâa, C., Bonnet, J.: *Cardiovasc. Res.* 53, 952-962 (2002)
41. Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., Meh, D. A.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 11-30 (2001)
42. Litvinov, R. I., Gorkun, O. V., Owen, S. F., Shuman, H., Weisel, J. W.: *Blood*. 106, 2944-2954 (2005)
43. Kotlín, R., Dyr, J. E.: *Chem. Listy*. 102, 314-318 (2008)
44. Potier, E., N, J., Sprecher, C., Ito, K.: *J. Mater. Sci.* 45, 2494-2503 (2010)
45. Duong, H., Wu, B., Tawil, B.: *Tissue Eng., Part A*. 15, 1865-1876 (2009)
46. Ryan, E. A., Mockros, L. F., Weisel, J. W., Lorand, L.: *Biophys. J.* 77, 2813-2826 (1999)
47. Radosevich, M., Goubran, H. A., Burnouf, T.: *Vox Sang.* 72, 133-143 (1997)
48. Jackson, M. R.: *Am. J. Surg.* 182, 1-7 (2001)
49. Brown, A. C., Baker, S. R., Douglas, A. M., Keating, M., Alvarez-Elizondo, M. B., Botvinick, E. L., Guthold, M., Barker, T. H.: *Biomaterials*. 49, 27-36 (2015)
50. Hasegawa, T., Okada, K., Takano, Y., Hiraishi, Y., Okita, Y.: *Artif. Organs*. 29, 880-886 (2005)
51. Mutsaers, S. E., Bishop, J. E., McGrouther, G., Laurent, G. J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 5-17 (1997)
52. Clark, R. A. F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 355-367 (2001)
53. Andrews, R. K., López, J. A., Berndt, M. C.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 91-105 (1997)

54. Larin, N., Ciano, P. S., Van de Water, L., McDonagh, J., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F.: *J. Immunol.* 140, 2340-2349 (1988)
55. Greiling, D., Clark, R. A. F.: *J. Cell Sci.* 142, 861-870 (1997)
56. Clark, R. A. F., Tonnesen, M. G., Gailit, J., Cheresh, D. A.: *Am. J. Pathol.* 148, 1407-1421 (1996)
57. Albala, D. M., Lawson, J. H.: *J. Am. Coll. Surg.* 202, 685-697 (2006)
58. Martins, R. S., Siqueira, M. G., Da Silva, C. F., Plese, J. P.: *Surg. Neurol.* 64, 10-16 (2005)
59. Mittermayr, R., Wassermann, E., Thurnher, M., Simunek, M., Redl, H.: *Burns.* 32, 305-311 (2006)
60. Ahmed, T. A. E., Dare, E. V., Hincke, M.: *Tissue Eng.* 14, 199-215 (2008)
61. Dunn, Ch. J., Goa, K. L.: *Drugs.* 58, 863-886 (1999)
62. Fernandez, P., Deguet, A., Pothaud, L., Belleannée, G., Coste, P., Bordenave, L.: *Biomaterials.* 26, 5042-5047 (2005)
63. Vara, D. S., Salacinski, H. J., Kannan, R. Y., Bordenave, L., Hamilton, G., Seifalian, A. M.: *Pathol. Biol.* 53, 599-612 (2005)
64. Sahni, A., Francis, C. W.: *Blood.* 96, 3772-3778 (2000)
65. Sahni, A., Odrliin, T., Francis, C. W.: *J. Biol. Chem.* 273, 7554-7559 (1998)
66. Willerth, S. M., Johnson, P. J., Maxwell, D. J., Parsons, S. R., Doukas, M. E., Sakiyama-Elbert, S. E.: *J. Biomed. Mater. Res.* 80, 13-23 (2007)
67. Lorand, L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 291-311 (2001)
68. Muszbek, L., Ariëns, R. A., Ichinose A.: *J. Thromb. Haemost.* 5, 181-183 (2007)
69. Tran, H., Tanaka, A., Litvinovich, S. V., Medved, L. V., Haudenschild, C. C., Argraves, W. S.: *J. Biol. Chem.* 270, 19458-19464 (1995)
70. Podor, T. J., Peterson, C. B., Lawrence, D. A., Stefansson, S., Shaughnessy, S. G., Foulon, D. M., Butchr, M., Weitz, J. I.: *J. Biol. Chem.* 275, 19788-19794 (2000)
71. Makogonenko, E., Tsupura, G., Ingham, K., Medved, L. V.: *Biochemistry.* 41, 7907-7913 (2002)
72. Sahni, A., Sporn, L. A., Francis, C. W.: *J. Biol. Chem.* 274, 14936-14941 (1999)
73. Deuel, T. F.: *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 443-492 (1987)
74. Ferguson, M. W., O'Kane, S.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 839-850 (2004)
75. Gross, M., Dexter, T. M.: *Cell.* 64, 271-280 (1991)

76. Bennett, N. T., Schultz, G. S: *Am. J. Surg.* 165, 728-737 (1993)
77. Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Altmann, B. W., Deuel, T. F., Thomason, A.: *J. Cell. Biochem.* 45, 319-326 (1991)
78. Robinson, C. J.: *Ann. Med.* 25, 535-538 (1993)
79. Sobiczewska, E., Szmigielski, S.: *Przegl. Lek.* 54, 634-638 (1997)
80. Goustin, A. S., Leof, E. B., Shipley, G. D., Moses, H. L.: *Cancer Res.* 46, 1015-1029 (1986)
81. Ganong, W. F.: *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání, Galén, Praha, str. 582 (2005)
82. <http://proteopedia.org/wiki/index.php/VEGF> (6.7.2015)
83. Paz, K., Zhu, Z.: *Front. Biosci.* 10, 1415-1439 (2005)
84. Shibuya, M.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 409-420 (2001)
85. Rak, J., Yu, J. L.: *Semin. Cancer Biol.* 14, 93-104 (2004)
86. Rudge, J. S., Holash, J., Hylton, D., Russell, M., Jiang, S., Leidich, R., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18363-18370 (2007)
87. Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., *et al.* *Cell.* 131, 463-475 (2007)
88. Byrne, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Harmey, J. H.: *J. Cell. Mol. Med.* 9, 777-794 (2005)
89. Claffey, K. P., Senger, D. R., Spiegelman, B. M.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1246, 1-9 (2005)
90. Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., Ferrara, N.: *J. Biol. Chem.* 271, 7788-7795 (1996)
91. Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., Iruela-Arispe, M. L.: *J. Cell Biol.* 169, 681-691 (2005)
92. Soker, S., Fidler, H., Neufeld, G., Klagsbrun, M.: *J. Biol. Chem.* 271, 5761-5767 (1996)
93. Pan, Q., Chantry, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R. K., Kowalski, J., Yee, S. F., Pacheco, G., Ross, S., Cheng, Z., Le Couter, J., Plowman, G., Peale, F., Koch, A. W., Wu, Y., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Watts, R. J.: *Cancer Cell.* 11, 53-67 (2007)
94. Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjallman, A., Ballmer-Hofer, K.: *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 601-615 (2006)

95. Cebe-Suarez, S., Grunewald, F. S., Jaussi, R., Li, X., Claesson-Welsh, L., Spillmann, D., Mercer, A. A., Prota, A. E., Ballmer-Hofer, K.: *FASEB J.* 22, 3078-3086 (2008)
96. Ballmer-Hofer, K., Andersson, A. E., Ratcliffe, L. E., Berger, P.: *Blood.* 118, 816-826 (2001)
97. Harris, S., Craze, M., Newton, J., Fisher, M., Shima, D. T., Tozer, G. M., Kanthou, C.: *PLoS One.* 7, 35237-35231(2012)
98. Ferrara, N.: *Endocr. Rev.* 25, 581-611 (2007)
99. Kim, S., Mohamedali, K. A., Cheung, L. H., Rosenblum, M. G.: *J. Biotechnol.* 128, 638-647 (2007)
100. Nowak, D. G., Woolard, J., Amin, E. M., Konopatskaya, O., Saleem, M. A., Churchill, A. J., Lodomery, M. R., Harper, S. J., Bates, D. O.: *J. Cell Sci.* 121, 3487-3495 (2008)
101. Riedel, T.: Tvorba biokompatibilních fibrinových sítí na povrchu. Dizertační práce, Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha (2010)
102. <http://www.gelanalyzer.com/> (9.7.2015)
103. Kazemi-Lomedasht, F., Behdani, M., Bagheri, K. P., Anbouhi, M. H., Abolhassani, M., Khanahmad, H., Shahbazzadeh, D., Mirzahoseini, H.: *Adv. Pharm. Bull.* 4, 323-328 (2014)
104. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (17.7.2015)
105. Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P.: *Biom. J.* 50, 346-363 (2008)
106. Riedel, T., Brynda, E., Dyr, J. E., Houska, M.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* 88A, 437-447 (2009)
107. Zisch, A. H., Schenk, U., Schense, J. C., Sakiyama-Elbert, S. E., Hubbell, J. A.: *J. Controlled Release.* 72, 101-113 (2001)
108. Péntzes, K., Kövér, K. E., Fazakas, F., Haramura, G., Muszbek, L.: *J. Thromb. Haemostasis.* 7, 627-633 (2009)
109. Petříčková, A., Veselá, A. B., Kaplan, O., Kubáč, D., Uhnáková, B., Malandra, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Weyrauch, P., Křen, V., Bezouška, K., Martínková, L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1553-1561 (2012)

110. Anderson, S. A., Shergill, B., Barry, Z. T., Manousiouthakis, E., Chen, T. T., Botvinick, E., Platt, M. O., Iruela-Arisped, M. L., Segura, T.: *Integr. Biol.* 3, 887-896 (2011)
111. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)

