

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra Biochemie**

Studijní program: Biochemie



**Eliška Zvolská**

**Optimalizace přípravy rekombinantního CYP3A4**  
**Optimization of recombinant CYP3A4 preparation**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Věra Černá, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 11.5.2025

Eliška Zvolská

## Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za jeho ochotu a trpělivé vedení práce a RNDr. Věře Černé, Ph.D. za cenné rady. Rovněž děkuji své rodině za podporu při studiu.

## Abstrakt

Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) je nejvíce zastoupeným cytochromem P450 v lidském těle. Hraje zásadní roli v metabolismu xenobiotik, kdy se podílí na metabolismu 30 až 50 % všech klinicky využívaných léčiv. Rovněž se účastní metabolismu endogenních substrátů a roli hraje i v některých rakovinných onemocněních. Z těchto důvodů je CYP3A4 nutno získávat pro vědecké účely. Nejvíce využívanými expresními systémy pro jeho přípravu jsou bakterie, konkrétně *E. coli*. V této práci byl využit kmen DH5 $\alpha$ , který byl transformován plazmidem nesoucím gen pro CYP3A4 a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktázu (CPR). Cílem práce bylo najít vhodné podmínky exprese tohoto konstruktů.

Prvním cílem bylo ověření pozitivního vlivu  $\delta$ -aminolevulové kyseliny ( $\delta$ ALA) na expresi CYP3A4 a určení optimální doby exprese. Dalším krokem pak bylo provedení expresí za čtyř různých podmínek – exprese byly provedeny při 20; 25 a 30 °C při 120 rpm a dále pak při 30 °C a 180 rpm. V rámci každé série byly testovány tři optické hustoty – OD<sub>600</sub> 0,4; 0,6 a 0,8. Pro OD<sub>600</sub> 0,6 byly v rámci každé série testovány tři různé koncentrace IPTG jako induktoru – 0,1; 1 a 5mM IPTG.

Pomocí sonikace a několika centrifugací byly pro každý vzorek izolovány bakteriální membrány obsahující membránově vázaný CYP3A4 a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktázu. V membránové frakci byla pomocí diferenčních CO spekter měřena koncentrace CYP3A4. Pro všechny vzorky byla rovněž provedena SDS elektroforéza následovaná western blotem a imunochemickou detekcí CYP3A4. Ve vzorcích byla také proměřena aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktázy. Pro ověření aktivity samotného CYP3A4 byla provedena markerová reakce CYP3A4 – 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu. Metabolity této reakce byly detekovány pomocí HPLC.

V práci byl potvrzen pozitivní vliv přítomnosti  $\delta$ ALA při expresi CYP3A4. Nejlepší aktivita CYP3A4 pak byla zjištěna u vzorků exprimovaných při 20 °C po dobu 46 hodin a vzorků exprimovaných při 180 rpm po dobu 20 hodin, které byly indukovány při OD<sub>600</sub> 0,6 pomocí 0,1mM IPTG. Vzorky exprimované při 20 °C po dobu 46 hodin zároveň vykazovaly i nejvyšší aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktázy. Rovněž bylo prokázáno, že indukci 0,1 či 1mM IPTG lze docílit vyšších aktivit CPR a CYP3A4 než při indukci 5mM IPTG.

Klíčová slova: cytochrom P450, CYP3A4, rekombinantní exprese, optimalizace exprese

## Abstract

Cytochrome P450 3A4 is the most abundant cytochrome in the human body. It plays a key role in the metabolism of xenobiotics, being involved in the metabolism of 30 to 50 % of all clinically used drugs. It also participates in the metabolism of endogenous substrates and is involved in certain cancerous diseases. For these reasons, it is necessary to produce CYP3A4 for scientific purposes. The most commonly used expression system for its production is bacteria, specifically *E. coli*. In this study, the DH5 $\alpha$  strain was used, transformed with a plasmid carrying the genes for CYP3A4 and NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase (CPR). The aim of this work was to identify suitable conditions for expression of this construct.

The first goal was to verify the positive effect of  $\delta$ -aminolevulonic acid ( $\delta$ ALA) on CYP3A4 expression and to determine the optimal time of expression. The next step was to perform expression under four different conditions – at 20; 25; and 30 °C shaking at 120 rpm, and at 30 °C shaking at 180 rpm. For each condition, three optical densities were tested – OD<sub>600</sub> 0,4; 0,6; and 0,8. At OD<sub>600</sub> 0,6, three different IPTG concentrations were tested – 0,1; 1; and 5mM IPTG.

Using sonication and several centrifugation steps, bacterial membranes containing the membrane-bound CYP3A4 and NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase were isolated from each sample. In the membrane fraction, the concentration of CYP3A4 was measured using CO-difference spectroscopy. SDS-PAGE followed by western blotting and immunochemical detection of CYP3A4 was also performed for all samples. The activity of NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase was also measured. To confirm the activity of CYP3A4 itself, a marker reaction – the 6 $\beta$ -hydroxylation of testosterone – was carried out. The metabolites of this reaction were detected using HPLC.

This study confirmed the positive effect of  $\delta$ ALA on the expression of CYP3A4. The highest CYP3A4 activity was observed in samples expressed at 20 °C for 46 hours and in samples expressed at 180 rpm for 20 hours, which were induced at OD<sub>600</sub> 0,6 with 0,1mM IPTG. The samples expressed at 20 °C for 46 hours also showed the highest activity of NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. It was also demonstrated that induction with 0,1 or 1mM IPTG resulted in higher CPR and CYP3A4 activities than induction with 5mM IPTG.

Keywords: cytochrome P450, CYP3A4, recombinant expression, expression optimization

[IN CZECH]

## Obsah

<b>1</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>9</b>
1.1	Úvod.....	9
1.2	Cytochromy P450.....	10
1.2.1	Mechanismus funkce CYP.....	11
1.2.2	Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4).....	11
1.3	Expresní systémy.....	12
1.3.1	Prokaryotní systémy.....	13
1.3.2	Eukaryotní systémy.....	13
1.4	Rekombinantní exprese CYP3A4.....	14
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Materiály a metody.....</b>	<b>18</b>
3.1	Použité chemikálie.....	18
3.1.1	Transformace a exprese.....	18
3.1.2	Izolace membrán.....	18
3.1.3	Stanovení koncentrace proteinu.....	18
3.1.4	SDS elektroforéza.....	18
3.1.5	Western blot a imunochemická detekce.....	19
3.1.6	Měření koncentrace CYP3A4.....	19
3.1.7	Měření aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktázy.....	19
3.1.8	Metabolická studie.....	19
3.2	Použité přístroje.....	20
3.3	Použité metody.....	21
3.3.1	Transformace buněk <i>E. coli</i> .....	21
3.3.2	Exprese.....	22
3.3.3	Izolace membrán.....	23
3.3.4	Stanovení koncentrace proteinu.....	23
3.3.5	Elektroforéza.....	24
3.3.6	Western blot.....	24
3.3.7	Imunochemická detekce.....	24
3.3.8	Měření koncentrace cytochromu.....	25
3.3.9	Měření aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktázy.....	25
3.3.10	Metabolická studie.....	26
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>27</b>
4.1	Vliv kyseliny $\delta$ -aminolevulové.....	27
4.2	Imunochemická detekce – optimalizace exprese.....	28
4.3	Koncentrace CYP3A4.....	33

4.4	Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktázy .....	36
4.5	Metabolická studie.....	37
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>

## Seznam zkratek

- APS – peroxodisíran amonný (z anglického *ammonium persulfate*)
- BCA – bicinchoninová kyselina (z anglického *bicinchoninic acid*)
- CPR – NADPH:cytochrom P450 reduktáza
- CYP – cytochrom P450
- EDTA – ethylendiaminotetraoctová kyselina
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického *High Performance Liquid Chromatography*)
- IPTG – isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
- LB médium – z anglického *Lysogeny broth*; médium pro růst bakterií
- NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- NADPH – redukováná forma NADP
- PVDF – polyvinylidenfluorid
- OD<sub>600</sub> – optická denzita (absorbance) při vlnové délce 600 nm
- rpm – otáčky za minutu (z anglického *revolutions per minute*)
- SDS – dodecylsírán sodný (z anglického *sodium dodecyl sulfate*)
- TAE pufr – Tris/kyselina octová/EDTA pufr
- TB médium – z anglického *Terrific broth*; LB médium obohacené o živiny
- TEMED – tetramethylethylendiamin
- Tris – triviální název pro tris(hydroxymethyl)aminomethan
- $\delta$ ALA – delta-aminolevulová kyselina (resp. 5-aminolevulová či 5-amino-4-oxoalerová kyselina)

# 1 Literární přehled

## 1.1 Úvod

Obrovský rozvoj medicíny za posledních několik desítek let lidstvu umožnil zvýšení kvality života a výrazné prodloužení doby dožití. Zatímco průměrná doba dožití v České (resp. Československé) republice činila v roce 1950 přibližně 64 let, nyní se již průměrný občan dožije 80 let [1]. Se vzrůstající kvalitou zdravotního systému a pokrokem vědy se zároveň na trh dostaly stovky nových, nyní běžně používaných léčiv. Přibližně 70 až 80 % léčiv využívaných v klinické praxi je metabolizováno cytochromy P450, přičemž zásadní roli hraje cytochrom P450 3A4, který metabolizuje okolo 30 % všech těchto klinicky významných látek [2].

Primárně jsou cytochromy P450 spojovány s inaktivací xenobiotik a jejich vyloučením z organismu, což může být pro lidské tělo jak prospěšné, tak i škodlivé, kdy některá léčiva nemusí mít dost času dosáhnout svého plného účinku. Cytochromy P450 nicméně ale mohou zapříčinit i bioaktivaci některých látek, a to jak pro nás žádoucích, tedy aktivaci proléčiv, tak i nežádoucích a zdraví ohrožujících, tedy aktivaci například prekarcinogenů.

Nejen s delší dobou dožití souvisí také větší prevalence rakoviny v rámci populace. V roce 2022 bylo na světě diagnostikováno téměř dvacet milionů rakovinných onemocnění, zároveň bylo zaznamenáno až deset milionů úmrtí na rakovinu [3]. Tato čísla však mohou být výrazně vyšší, vezmeme-li v potaz, že mnoho úmrtí, ať už v pokročilém věku či méně ekonomicky vyvinutých státech, nemusí být nutně spojováno s rakovinou. Cytochromy P450 zde hrají zásadní, avšak velmi komplikovanou roli. Jedním z prognostických markerů rakoviny může být i míra exprese CYP3A4 v postižených tkáních pacienta. Například nadměrná exprese CYP3A4 u periferních T-buněčných lymfomů, hepatocelulárních karcinomů či nádorů prsu je spojována s menší pravděpodobností remise, větší mortalitou a slabší odpovědí na konvenční léčbu [4], [5], [6].

Pro co nejlepší pochopení mechanismu účinku léků a vylepšení léčebných metod je nutné znát průběh biotransformace xenobiotik v těle, tedy se věnovat funkci cytochromů P450, v čele s CYP3A4. V tomto procesu je tedy mimo jiné třeba získávat CYP3A4 pro vědecké účely. Nabízí se izolace z lidských tkání, či exprese v eukaryotních a prokaryotních systémech. Pro svou ekonomickou nenáročnost (v porovnání se zbylými metodami) a flexibilitu bývá nejčastěji využita exprese pomocí prokaryotních systémů. Odborné publikace uvádějí rozličné podmínky exprese CYP3A4, jako je různá teplota, počet otáček při expresi proteinu, složení růstového média či doba exprese. Cílem této práce bylo pokusit se najít optimální podmínky pro získání metabolicky funkčního cytochromu P450 3A4 z prokaryotního expresního systému, který by mohl být dále využit ve výzkumných činnostech.

## 1.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450, taktéž CYP, jsou rozsáhlá skupina hemoproteinů objevená v padesátých letech minulého století. V odborné literatuře byly poprvé zmíněny v roce 1958 jako „mikrosomální pigment vázající oxid uhelnatý“ extrahovaný z potkaních jater [7], [8]. Jako o cytochromech P450 bylo o této skupině enzymů poprvé psáno v roce 1962 [7], [9]. Číslo 450 v názvu těchto proteinů pochází z vlnové délky absorpčního maxima aktivních CYP s vázaným oxidem uhelnatým. Cytochromy P450 byly objeveny ve všech formách života, od protist až po rostliny a živočichy. K roku 2013 bylo v živých organismech evidováno přibližně 21 000 rozličných CYP [10].

V lidském organismu je známo 57 CYP – 50 se vyskytuje v endoplazmatickém retikulu a zbylých 7 v mitochondriích, všechny CYP jsou membránově vázané [11]. Cytochromy P450 se u člověka vyskytují převážně v játrech, můžeme je ovšem nalézt i například v plicích, tenkém střevě, ledvinách, nadledvinách či mozku [11]. Cytochromy P450, jejichž sekvence mají alespoň 40% shodu, řadíme do stejných rodin značených arabskou číslicí. Cytochromy se shodou sekvence alespoň 55 % pak patří do stejné podrodiny značené velkým tiskacím písmenem [12]. U lidí celkem rozlišujeme 18 rodin a 43 podrodin CYP [13].

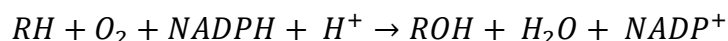
Cytochromy P450 obsahují porfyrinové jádro s centrálním atomem železa, který umožňuje přechodem mezi oxidačními stavy +2 a +3 přenos hydroxylové skupiny na substráty, čímž zvyšuje jejich polaritu a umožňuje vyloučení z organismu. Porfyrinové jádro (protoporfyrin IX) CYP je v proteinu stabilizováno především interakcí centrálního atomu železa s thiolátovou sírou aminokyseliny cysteinu přítomné v aktivním místě enzymu (pátý ligand železa); částečně se na stabilizaci podílí i hydrofobní interakce [14]. Aminokyselina cystein je lokalizována v charakteristické konzervované sekvenci pro CYP FXXGXXXCXG [13].

Cytochromy P450 jsou hlavními enzymy první fáze biotransformace. Hrají významnou roli v biotransformaci jak endogenních, tak exogenních substrátů – zajišťují metabolismus léků, steroidů, vitamínů rozpustných v tucích, mastných kyselin či karcinogenů a pesticidů [15]. Celkem se CYP podílí na 95 % všech oxidačně-redukčních reakcích organických látek, které tyto (oxidačně-redukční) reakce v těle podstupují [16]. Cytochromy P450 metabolizují 70 až 80% léčiv [17].

Rozdílné hladiny CYP v těle zapříčiňují různě rychlou, či dokonce zcela odlišnou odpověď na podané xenobiotikum. Interindividuální odpověď na xenobiotika, a tedy i hladiny CYP, závisí například na věku, stravě, pohlaví, etnicitě, environmentálních faktorech, užívaných lécích či na genetické a epigenetické regulaci [13], [18]. Cytochromy P450 mohou být také indukovány či inhibovány rozličnými xenobiotiky [13].

### 1.2.1 Mechanismus funkce CYP

Většinu reakcí katalyzovaných CYP lze zapsat jako:



Cytochromy P450 vyžadují ke své funkci reductázy. Cytochromy P450 působící v endoplazmatickém retikulu využívají enzym NADPH:cytochrom P450 reductázu, menší skupina CYP vyskytující se v mitochondriích spolupůsobí s ferredoxin reductázou [14]. V nativním stavu je atom železa hexakoordinovaný, kdy je šestým substrátem molekula vody a železo se nachází v nízkospinovém stavu. Po navázání substrátu do aktivního místa dojde k oddisociování vody, a železo se tak stává pentakoordinovaným a vysokospinovým. Prvním krokem oxidace substrátu je přenos elektronu z NADPH na NADPH:cytochrom P450 reductázu, pokud se CYP nachází v endoplazmatickém retikulu, případně na ferredoxin reductázu a nehemový Fe-S protein v případě mitochondriálních CYP [14]. Následně je elektron přenesen na samotný cytochrom, kde dojde k redukci železa z oxidačního stavu +3 na +2. Dalším krokem je navázání molekuly kyslíku, kdy se železo opět stává hexakoordinovaným, následuje další redukce, tentokrát kyslíku. Odstoupením vody je získán reaktivní meziproduct označovaný „Compound I“. Tento meziproduct odebere atom vodíku ze substrátu za vzniku meziproductu „Compound II“ a radikálu substrátu. Ty spolu ihned reagují za vzniku hydroxylovaného produktu. Produkt oddisociuje a na jeho místo se koordinuje voda, přičemž je obnovena nativní forma enzymu [19], [20].

### 1.2.2 Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4)

Cytochrom P450 3A4 lze na základě množství jím metabolizovaných xenobiotik považovat za nejvýznamnější cytochrom P450 [14]. Cytochrom P450 3A4 je rovněž nejvíce zastoupeným CYP v lidském těle [11]. Původně byl CYP3A4 pojmenován CYP3A<sub>NF</sub> na základě schopnosti oxidovat dihydropyridinový blokátor vápenatých kanálů nifedipin [14], [21]. V játrech tvoří CYP3A4 15 až 30 % všech CYP, v tenkém střevě je jeho zastoupení ještě vyšší (přibližně 78 %) [22], [23]. V menší míře pak CYP3A4 nalezneme například v žaludku, plicích či mozku, a to jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni samotného proteinu [24], [25], [26]. U plodů v děloze není CYP3A4 prakticky vůbec přítomný, jeho hladiny však začnou stoupat již po porodu a v prvním měsíci života dosáhnout asi 30 až 40 % aktivity dospělého člověka [27].

V 3A podrodině CYP u lidí se kromě CYP3A4 vyskytují další tři enzymy: CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43 [28], [29]. Celá podrodina CYP3A je u lidí lokalizovaná na chromozomu 7, konkrétně v úseku 7q22.1 [17]. Cytochrom P450 3A4 je tvořen 503 aminokyselinami [30].

Cytochrom P4503A4 hraje zásadní roli v první fázi biotransformace xenobiotik, kdy metabolizuje 30 % všech klinicky užívaných léčiv [2]. Některé zdroje však udávají až 50 %

metabolizovaných léčiv [30], [31]. Stejně jako u ostatních CYP se exprese a funkce CYP3A4 výrazně liší jak interindividuálně, tak intraindividuálně. Následkem je pak rozdílná a těžko předvídatelná odpověď na požití xenobiotik [22]. Přibližně 90 % této variability je zapříčiněno geneticky a v současné době je známo přes 50 alel CYP3A4 [32], [33]. Nejlépe odhadnutelným faktorem ovlivňujícím funkci CYP3A4 jsou lékové interakce, které působením na pregnanový X receptor a konstitutivní androstanový receptor způsobí indukci enzymu [22]. Stejně tak mohou funkci CYP3A4 inhibovat či indukovat některé potraviny. Velmi známým příkladem inhibice enzymu je grepový džus [34]. Dále expresi tohoto proteinu ovlivňují i fyziologické faktory, jako jsou věk či zánětlivé procesy [22].

U léků, které jsou metabolizované CYP3A4, jsou často pozorovány rozdíly v clearance (tedy vyloučení látky z organismu) u mužů a žen. Pravděpodobně se ale nejedná přímo o fenomén způsobený rozdílnou mírou exprese CYP3A4 u obou pohlaví, ale o jev zprostředkovaný různou mírou membránově vázaného plazmatického přenašeče, P-glykoproteinu. Interakce mezi P-glykoproteinem a léčivem vede k rozdílné míře přístupnosti substrátu pro enzym a různé rychlosti metabolismu látky [26].

Aktivní místo CYP3A4 je v porovnání s ostatními CYP velké a flexibilní, čímž umožňuje metabolismus rozličných xenobiotik [35]. Do aktivního místa se vejdou molekuly až do objemu  $520 \text{ \AA}^3$  [36], [37]. Mezi větší léčiva, která jsou metabolizována CYP3A4 patří například některá imunosupresiva (cyklosporin A), makrolidová antibiotika (erythromycin) nebo cytostatika (paklitaxel) [17]. Mezi další substráty CYP3A4 řadíme například tamoxifen, benzodiazepiny, opioidy, některá antidepresiva či statiny [17]. Zároveň CYP3A4 metabolizuje i endogenní látky, jako je testosteron, progesteron či kortizol [17]. Pozornost při studiu CYP3A4 je věnována i metabolismu karcinogenů – CYP3A4 metabolizuje aflatoxin B<sub>1</sub>, jeden z nejsilnějších karcinogenů vůbec, přičemž dochází k  $3\alpha$ -hydroxylaci vedoucí k detoxifikaci sloučeniny, ale paralelně i vzniku silně aktivního mutagenního 8,9-exo-epoxidu [11]. Mezi další karcinogeny metabolizované CYP3A4 řadíme aflatoxin G<sub>1</sub>, sterigmatocystin nebo 4,4'-metylenbis(2-chloranilin) (známý jako MOCA) [11].

### 1.3 Expresní systémy

Ze širokého spektra látek metabolizovaných CYP3A4 a jeho vysokého zastoupení v lidském těle je zřejmé, že je třeba získávat tento cytochrom pro vědecké studie. Jednou z možností je cytochromy přímo izolovat z lidských, případně savčích tkání. Tento přístup je však cenově i časově náročný. Vystávají i určité etické otázky. Alternativou jsou expresní systémy, kdy jsou kóžené proteiny připraveny pomocí eukaryotních či prokaryotních buněk.

### 1.3.1 Prokaryotní systémy

*Escherichia coli* je jedním z nejvíce využívaných expresních systémů vůbec [38]. Mezi její hlavní výhody patří nenáročnost kultivace, rychlost růstu a cenová dostupnost celého procesu, od média až po laboratorní pomůcky a přístroje [39]. Co se exprese prokaryotních proteinů týče, je *E. coli* organismem první volby, je však často využívána i pro expresi eukaryotních proteinů [39]. V porovnání s eukaryotními expresními systémy má *E. coli* řadu nevýhod – na exprimovaných proteinech nemůže zajistit některé posttranslační modifikace (např. glykosylace) a často se vyskytují problémy u skládání komplexních proteinů, jako jsou membránové proteiny či vícepodjednotkové proteiny [39].

Při rychlé či nadměrné expresi může u *E. coli* dojít ke směrování proteinů do inkluzních tělísek, kdy je dále velmi obtížné a nákladné dané proteiny složit do biologicky aktivní formy; celkový výtěžek proteinu je pak také velmi malý [40]. Proteiny mohou být produkovány do cytoplazmy, periplazmy či sekretovány mimo buňku [39]. V periplazmě není tak redukční prostředí jako v cytoplazmě, což umožňuje tvorbu disulfidických můstků; v periplazmě je rovněž menší proteolytická aktivita [39]. Lokalizace proteinu do periplazmy ovšem vyžaduje umístění signální sekvence na N-konec proteinu [39]. Nejčastěji využívaným kmenem *E. coli* pro expresi proteinů je BL21(DE3) a příbuzné kmeny, dále pak AD494 nebo JM83 [38], [39].

Dalším významným bakteriálním expresním systémem je gram-pozitivní *Lactococcus lactis*. *L. lactis*, na rozdíl od *E. coli*, neobsahuje endotoxiny a běžně se využívá v potravinářství, což z něj činí atraktivní expresní systém pro expresi proteinů k biofarmaceutickým účelům [41], [42]. *L. lactis* se snadno kultivuje a umožňuje expresi proteinů do růstového média [42]. Alternativou k *E. coli* může být i *Pseudomonas*, například *P. fluorescens* nebo *aeruginosa*, schopna produkce množství proteinu srovnatelného s *E. coli* [43]. K expresi proteinů lze využít i *Streptomyces*, gram-pozitivní bakterii, která podobně jako *L. lactis* sekretuje velké množství proteinů do růstového média [43]. Nejčastěji se díky své nízké endogenní proteolytické aktivitě využívá *Streptomyces lividans* [43].

### 1.3.2 Eukaryotní systémy

Savčí buňky nalézají uplatnění primárně při expresi větších či membránových eukaryotních proteinů, kdy jsou schopny lépe napodobit přirozené prostředí výskytu těchto proteinů a zajištění správných komplexních posttranslačních modifikací [39]. Ze savčích buněk se užívá nejčastěji buněčná linie HEK 293 (z anglického *Human embryonic kidney*) z lidských embryonálních ledvinových buněk; nebo CHO linie (z anglického *Chinese hamster ovary*) odvozená z buněk vaječníků křečka čínského [39].

Pro vnesení genu pro cílový protein do buněk se zde využívá jak transfekce, tak transdukce [39]. Vektory využívané pro vnesení cizího genu do savčích buněk jsou vytvořeny

na bázi široké škály virů – například adenovirů, bakulovirů, herpesvirů či polyomavirů [38]. Další možností vnesení genetické informace do savčí buňky je využití plazmidu či chemicky zprostředkovaná transfekce, kdy se pro vpravení informace do buňky užívá polyethylenimin a fosforečnan vápenatý [38]. Výhodou savčích buněk je i možnost transientní transfekce [44]. Komplikací při užití savčího systému je složité technické provedení kultivace buněk, vyšší cena (a to jak buněk, tak i média a potřebného vybavení) a menší celkový výnos proteinu [45].

Dále mohou být jako expresní systémy využity i kvasinky, jednobuněčné eukaryotní organismy kombinující některé vlastnosti bakteriálních a savčích systémů [39]. Oproti savčím buňkám je kultivace kvasinek levnější a jednodušší a tento expresní systém je rovněž lépe geneticky modifikovatelný [46]. Velkou výhodou oproti bakteriálním systémům je eukaryotní dráha syntézy proteinů – kvasinky dokáží provést některé posttranslační modifikace typické pro savčí proteiny, jako je glykosylace, fosforylace či acetylace [47]. Způsoby provedení těchto modifikací nicméně nejsou zcela totožné se savčími mechanismy [47].

Kromě výše zmíněných expresních systémů se k expresi proteinů rovněž běžně využívají hmyzí buňky (např. *Spodoptera frugiperda*), kdy se k zavedení genu do buňky využívá bakulovirový vektor [39]. Další možností produkce proteinů je pak exprese v tzv. *cell-free* systémech, tedy exprese prováděna mimo buňku. Výhodou tohoto systému je možnost exprese proteinů v přítomnosti ligandů či stabilizátorů, které by byly jinak pro buňku toxické [39].

#### 1.4 Rekombinantní exprese CYP3A4

Expresní systémy využívané pro získání CYP3A4 momentálně zahrnují lidské, hmyzí, kvasinkové i bakteriální buněčné linie [45]. Exprese CYP3A4 v hmyzích buňkách je technicky i finančně náročná, avšak může poskytnout výjimečně vysoké výtěžky cytochromu [45]. Jelikož je CYP3A4 lokalizován v endoplazmatickém retikulu, vyžaduje ke své funkci NADPH:cytochrom P450 reduktázu. V závislosti na volbě expresního systému je tedy někdy nutné tento enzym koexprimovat s CYP3A4. V hmyzích buňkách je sice NADPH:cytochrom P450 reduktáza přítomna, její množství však není pro expresi CYP dostatečné, a tak musí být koexprimována spolu s CYP [45]. Výhodou exprese v savčích buňkách je přítomnost endogenní NADPH:cytochrom P450 reduktázy; nevýhodou je ovšem opět technická náročnost procesu a delší doba kultivace [45].

Oproti savčím či hmyzím buňkám je kultivace kvasinek a bakterií mnohem jednodušší. I když je výtěžek z exprese CYP v kvasinkách menší než v bakteriích, může být exprese v kvasinkách výhodná díky přítomnosti buněčných struktur, čímž se prostředí, kde dochází k expresi, blíží nativnímu tkáňovému prostředí CYP [45]. Konkrétně je produkce CYP u *E. coli* 50 až 100krát vyšší než u *Saccharomyces cerevisiae* [48]. Obdobně jako u hmyzích buněk

neobsahují kvasinky dostatek NADPH:cytochrom P450 reduktázy, která je tak v buňkách dodatečně exprimována [49].

Pro CYP obecně je nejvíce používaným expresním systémem *E. coli*. Kromě již zmíněných výhod je její velkou předností absence vlastních CYP [45]. Cytochrom P450 3A4 je v lidském těle asociovaný s endoplazmatickým retikulem. Předpokládá se, že většina CYP asociovaných s endoplazmatickým retikulem se vyskytuje v cytozolárním prostoru a N-konec proteinu pak prochází membránou retikula, přičemž je koncový methionin lokalizován v retikulu [50]. N-konec proteinu, v podobě transmembránového  $\alpha$  helixu, obsahuje hydrofobní aminokyseliny, které interagují s membránou [51]. Tyto koncové signální sekvence však nemusí být správně rozpoznány bakteriálním expresním systémem, což vede k nízkému výtěžku CYP [51]. Tento problém lze obejít díky inkorporaci bakteriálních signálních sekvencí na začátek CYP; typicky se využívají sekvence *ompA* (*outer membrane protein A*) a *pelB* (*pectate lyase B*) [52]. Dalším způsobem optimalizace exprese je inkorporace sekvence LLLAVFL na N-konec proteinu. Tato sekvence zajistí rozpoznání na ribozomu a maximální iniciaci translace [51]. Druhým přístupem ke zlepšení exprese je odstranění N-terminální sekvence či nahrazení aminokyselin na N-konci za hydrofilní za účelem zlepšení rozpustnosti CYP v cytozolu bakterie [51], [53].

Pro expresi CYP3A4 v *E. coli* se využívá expresní vektor pcWori+ [51], [54], [55]. Tento vektor obsahuje tac promotor vzniklý kombinací *trp* a *lac* promotorů. Tac promotor je díky své sekvenci velmi dobře rozpoznáván nativní RNA polymerázou [56]. Indukce exprese je zahájena IPTG a míra exprese je, vzhledem k využití jen jednoho indukibilního promotoru, přímo úměrná koncentraci induktoru [56]. Exprese se většinou zahajuje přidáním IPTG do koncentrace 1 mmol/l [51]. Vektor mimo jiné obsahuje i gen pro rezistenci na antibiotikum ampicilin, který slouží jako selekční marker po úspěšné transformaci buněk [51].

V publikacích uváděné teploty při indukci a expresi se liší, ale většinou se pohybují v rozmezí 20 až 30 °C, přičemž nejčastější jsou teploty 28 až 30 °C [51]. A. Parikh et al. postulovali, že teploty nad 30 °C negativně ovlivňují expresi CYP3A4 [57]. P. Guengrich et al. ale například jako optimální teplotu pro expresi uvádí 32 °C [55]. Většina expresí je prováděna při 30 °C po dobu 24 hodin [52], [54], [57].

Exprese je běžně prováděna v TB médiu, kde je poměr LB média z noční kultury (tedy buněk, kterými zaočkováváme TB médium) a TB média 1:100 [51]. Do TB média je dodávána kyselina  $\delta$ -aminolevulová, která napomáhá rychlejší syntéze hemu pro CYP; kyselina  $\delta$ -aminolevulová je většinou přidávána do koncentrace 0,5 mM [51]. Parikh et al. po přidání  $\delta$ ALA pozorovali trojnásobné zvýšení produkce CYP3A4 [57]. Často se do TB média přidává i 1mM thiamin [51], [55]. Některé zdroje uvádějí jako další složku TB média i některé soli, jako chlorid hořečnatý či železitý, tyto látky však nejspíše nehrají v expresi zásadní roli [55].

Jedním z možných přístupů pro zvýšení exprese CYP by mohlo být i přidání arabinózy vedoucí ke zvýšení osmotického stresu, což vede ke správnějšímu skládání rekombinantního proteinu a vyšším výtěžkům [58].

Indukce exprese bývá zahájena v rozmezí od  $OD_{600}$  0,4 do  $OD_{600}$  0,8 [51]. Pro expresi CYP3A4 se běžně využívá kmen *E. coli* DH5 $\alpha$  [54], [55], [57]. Lze využít i jiné kmeny, jako JM109 či BL21, ovšem DH5 $\alpha$  dosahuje nejlepších výsledků [57].

## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce byla optimalizace exprese rekombinantního cytochromu CYP3A4 za využití prokaryotního systému *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ . Jako faktory ovlivňující expresi daného proteinu byly zkoumány teplota, za které probíhala exprese; optická denzita buněk při indukci exprese; koncentrace IPTG indukujícího expresi cytochromu a rovněž celková doba exprese. Cílem bylo také ověření pozitivního vlivu  $\delta$ ALA na expresi CYP3A4.

## 3 Materiály a metody

### 3.1 Použité chemikálie

#### 3.1.1 Transformace a exprese

- LB médium – 10 g tryptonu (Bio Basic Canada, Kanada), 10 g NaCl (Lach:ner, ČR) a 5 g kvasničného extraktu (Lab Logistics Group, Německo) na litr média
- TB médium – 24 g drožd'ového extraktu (Lab Logistics Group, Německo), 12 g tryptonu (Bio Basic Canada, Kanada), 4 ml glycerolu (Lach:ner, ČR), 12,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lach:ner, ČR) a 2,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach:ner, ČR) na litr média
- 100mM CaCl<sub>2</sub> (Penta, ČR)
- ampicilin – zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml (ampicilin – Duchefa Biochemie, Holandsko)
- LB agar – 4% (zásobní agar – Oxoid, UK)
- 50mM δALA (zásobní δALA – Chemos CZ, Česká republika)
- 100 a 500mM IPTG (zásobní IPTG – Duchefa Biochemie, Holandsko)
- expresní plazmid P4503A4 pCW/NF14 pro CYP3A4 a NADPH:cytochrom P450 reduktázu, poskytnut prof. F. P. Guengerichem (zprostředkovan doc. RNDr. Pavlem Součkem, CSc.)
  - CYP3A4: delece aminokyselin 3 až 12; zavedení signální sekvence LLLAVFL na pozici 13 až 19

#### 3.1.2 Izolace membrán

- cOmplete ULTRA tablety, EDTA-free, Roche Diagnostics, Německo
- 100mM TAE pufr o pH 7,6 (Tris base – NZYtech, Portugalsko); s obsahem 0,5mM EDTA (Lach:ner, ČR)
- 100mM fosfátový pufr o pH 7,4 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lach:ner, ČR); 20% glycerol (v/v) (Lach:ner, ČR))

#### 3.1.3 Stanovení koncentrace proteinu

- Microplate BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, USA
  - BCA reagent A – uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vitan sodný a bicinchinová kyselina; v 0,1M hydroxidu sodném
  - BCA reagent B – 4% síran měďnatý

#### 3.1.4 SDS elektroforéza

- 30% akrylamidová směs (roztok) (29% akrylamid a 1% bisakrylamid – Serva, Německo)
- 1,5M Tris-HCl pufr o pH 8,8 (Tris base – NZYtech, Portugalsko)
- 1,5M Tris-HCl pufr o pH 6,8 (Tris base – NZYtech, Portugalsko)

- 10% SDS (zásobní SDS – Serva, Německo)
- 10% APS (zásobní APS – Bio-Rad, Japonsko)
- TEMED, Sigma-Aldrich, Čína
- elektrodový pufr o pH 8,5 a složení: 25mM Tris (NZYtech, Portugalsko), 150mM glycin (Lach:ner, ČR), 0,1% SDS (Serva, Německo)
- vzorkový pufr Laemmli; Bio-Rad, Japonsko
- standard CYP3A4 a NADPH-cytochrom P450 reduktáza – Corning® Supersomes™ CYP3A4+OR; USA
- marker pro elektroforézu – Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standard; Japonsko

### 3.1.5 Western blot a imunochemická detekce

- primární králičí protilátka proti CYP3A4 – Proteintech Group, Německo
- sekundární protilátka kozí anti-rabbit IgG s alkalickou fosfatázou, Sigma-Aldrich, USA
- Immobilion-P<sup>SQ</sup> PVDF (polyvinylidenfluorid) membrána, póry 0,1 μm, Sigma-Aldrich, Německo
- blotovací roztok PBS s Triton X-100, pH 7,2 (7,85g NaCl (Lach:ner, ČR); 0,65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lach:ner, ČR); 0,15g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach:ner, ČR); 0,3% (w/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Německo))
- přenosový pufr, pH 8,3 (7,2 g glycin; 1,5 g Tris; 10 % methanol – Lach:ner, ČR)
- 100% methanol (Lach:ner, ČR)
- Pufr pro alkalickou fosfatázu, pH 9 (100mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 1mM MgCl<sub>2</sub> – Lach:ner, ČR)
- NBT (Nitro-Blue Tetrazolium) – tetrazoliumchlorid; 50 mg/ml; PROMEGA, USA
- BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát *p*-toluidinová sůl); 50 mg/ml; PROMEGA, USA

### 3.1.6 Měření koncentrace CYP3A4

- oxid uhelnatý; Linde, Irsko
- dithioničitan sodný; Penta, ČR
- pufr, pH 7,5 (100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2% glycerol (v/v) – Lach:ner, ČR)

### 3.1.7 Měření aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktázy

- pufr, pH 7,4 (300mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTANa<sub>2</sub> – Lach:ner, ČR)
- roztok cytochromu c o koncentraci 25 mg/ml – Start Enterprises, UK
- 10mM roztok NADPH (sodná sůl); Reanal, Maďarsko

### 3.1.8 Metabolická studie

- fosfátový pufr, pH 7,4 (100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Lach:ner, ČR)
- NADPH-generující systém, zásobní roztok

- 10mM MgCl<sub>2</sub> (Lach:ner, ČR); 10mM glukosa-6-fosfát; 1mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenáza – Sigma-Aldrich, Německo
- fenacetin, zásobní 1mM roztok v methanolu (zásobní fenacetin – Sigma Aldrich, Německo)
- dichlormethan; Lach:ner, ČR
- testosteron, zásobní 10mM roztok v methanolu (zásobní testosteron – Sigma Aldrich, Německo)
- 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/2M NaCl – Lach:ner, ČR

### 3.2 Použité přístroje

- ultrasonická homogenizační sonda typu KE 76; Bandelin, Německo
- ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD 3100; Bandelin, Německo
- ultracentrifuga Beckman Coulter OPTIMA LE-80K; USA
- ultracentrifugační rotor Beckman Coulter typ 70 Ti (70 000 rpm); Irsko
- suchá lázeň MINI Dry Bath, typ MINIB-100, Hangzhou Miu Instruments, Čína
- centrifuga HERMLE Z 383 K, Německo
- rotor HERMLE 220.86, Německo
- Centrifuga Allegra X-30R, Beckman Coulter, USA
- rotor Beckman Coulter SX4400 a F0630, USA
- třepačka, typ ES-60, Hangzhou Miu Instruments, Čína
- termostatový orbitální inkubátor Infors HT Multitron Pro, Švýcarsko
- vodní lázeň Julabo TW2, Německo
- elektroforetická aparatura Bio-Rad, Japonsko
- Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, Singapur
- spektrofotometr Specord 250 Plus, Analytik Jena, Německo
- čtečka mikrotitračních destiček Sunrise, Tecan, Rakousko
- odparka Acid-Resistant CentriVap Concentrator; LABCONCO, USA
- Thermomixer compact 5350, Eppendorf, Německo
- stolní centrifuga 5418, Eppendorf, Německo
- HPLC systém Agilent 1200; Agilent Technologies, USA
- kolona CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 HD; Macharey-Nagel, Německo

### **3.3 Použité metody**

#### **3.3.1 Transformace buněk *E. coli***

##### **3.3.1.1 Příprava kompetentních buněk**

Do 40 ml LB média ve zkumavce Falcon bylo přeneseno 25  $\mu$ l zásobních buněk *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ . Zkumavka byla ponechána v orbitální třepačce při 37 °C a 180 rpm do dosažení OD<sub>600</sub> 0,4. Bakterie byly dále centrifugovány v centrifuze HERMLE Z 383 K při 4000 rpm a chlazení na 4 °C po dobu 10 minut; využito bylo rotoru HERMLE 220.86. Byl odlit supernatant a zkumavka byla ponechána vyschnout dnem vzhůru položená na buničině. Dále bylo k peletě bakterií přidáno 10 ml 100mM sterilního chloridu vápenatého a peleta byla resuspendována. Zkumavka byla ponechána deset minut na ledu. Dále byla zopakována centrifugace, a to za stejných podmínek jako předchozí. Opět byl odlit supernatant a zkumavka byla otočena dnem vzhůru a ponechána vyschnout. Peleta byla resuspendována ve 2 ml 100mM sterilního chloridu vápenatého a zkumavka byla ponechána hodinu na ledu. Následně byly k buňkám přidány 2 ml 50% glycerolu a buňky byly zamrazeny v alikvotech po 200  $\mu$ l.

##### **3.3.1.2 Příprava agarových ploten**

Pro přípravu agarových ploten byl využit sterilní zásobní LB agar, který byl rozehrán v mikrovlnné troubě. Ze zásobní láhve pak bylo odlito 30 ml tekutého agaru do zkumavky Falcon, na každou plotnu tedy bylo spotřebováno 15 ml agaru. Po zchlazení agaru bylo do zkumavky přidáno 30  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml, koncentrace ampicilinu v agaru tedy dosáhla 100  $\mu$ g/ml. Agar byl nalit do sterilních plastových Petriho misek a byl ponechán ztuhnout.

##### **3.3.1.3 Transformace**

Z mrazícího boxu byla vyjmuta mikrozskumavka s kompetentními buňkami (200  $\mu$ l) a rovněž plazmid. Jak buňky, tak plazmid byly ponechány roztát na ledu. Kompetentní buňky byly rozděleny do dvou mikrozskumavek po 100  $\mu$ l. Do jedné byl přidán 1  $\mu$ l plazmidu a do druhé, tedy do kontrolní, byl přidán 1  $\mu$ l sterilní destilované vody. Mikrozskumavky byly ponechány 30 minut na ledu. Následně byly na 90 s podrobeny tepelnému šoku ve vodní lázni nastavené na 42 °C. Ihned po vyjmutí z lázně byly na tři minuty položeny na led. Poté bylo do obou vzorků přidáno 300  $\mu$ l LB média předehřátého na 42 °C. Vzorky byly ponechány 60 minut v inkubátoru nastaveném na 37 °C. Z každé mikrozskumavky bylo odebráno 300  $\mu$ l roztoku a přeneseno na agarové plotny s ampicilinem, kde byla suspenze rozetřena sterilní mikrobiologickou hokejkou. Plotny byly přes noc inkubovány v inkubátoru při 37 °C.

### 3.3.2 Exprese

#### 3.3.2.1 Příprava noční kultury

Do zkumavky typu Falcon bylo přelito 10 ml sterilního LB média a přidáno 10  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Buněčná kultura byla zaočkována metodou single-cell, kdy byla pomocí sterilní špičky sebrána jedna kolonie transformované *E. coli* a vložena do zkumavky s médiem. Buněčná kultura se nechala přes noc inkubovat na orbitální třepačce při 37 °C a 180 rpm.

#### 3.3.2.2 Exprese – optimalizace podmínek

Pro prvotní experiment za účelem posouzení vlivu  $\delta$ ALA na expresi byla exprese prováděna ve čtyřech 50ml zkumavkách typu Falcon. Ve dvou bylo LB médium a ve dvou TB médium. Médium obsahovalo 10  $\mu$ l ampicilinu o zásobní koncentraci 100 mg/ml. Do 10 ml každého média bylo přeneseno 100  $\mu$ l noční kultury. Po 4 hodinách od zaočkování a dosažení  $OD_{600}$  cca 0,5 byla exprese indukována pomocí 1mM IPTG, přičemž do jedné zkumavky od každého typu média byla přidána  $\delta$ ALA do koncentrace 0,5 mM. Po 2; 5; 18; 24 a 48 hodinách od začátku exprese byly z každé zkumavky Falcon odebírány vzorky. Vzorky byly uskladněny při -80 °C.

Pro exprese ve větším měřítku k posouzení vlivu dalších faktorů bylo do Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml přelito 100 ml TB média. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml a jeden ml buněčné suspenze z noční kultury. Baňky byly vloženy do třepačky nastavené na 120 rpm a 37 °C. V momentě, kdy dosáhly suspenze požadované optické denzity při 600 nm, byla zahájena indukce exprese.

Indukce byly prováděny při  $OD_{600}$  0,4; 0,6 a 0,8. Do baněk byly přidány zásobní roztoky  $\delta$ ALA a IPTG do požadované koncentrace. Koncentrace  $\delta$ ALA byla vždy 0,5mM a koncentrace IPTG pro všechny optické denzity 1mM, přičemž byly vždy pro  $OD_{600}$  0,6 zkoumány i vlivy indukce pomocí 0,1 a 5mM IPTG. Celkem tedy byla exprese prováděna v pěti Erlenmayerových baňkách.

Experiment byl prováděn třikrát pro tři různé teploty – 20, 25 a 30 °C – při 120 rpm. Rovněž byl proveden čtvrtý experiment, kdy byla zvýšena frekvence otáčení, a to na 180 rpm. Tento experiment byl prováděn za teploty 30 °C.

Pro všechny experimenty byly v časech 20 a 46 hodin od zahájení exprese odebrány 50ml frakce, které byly stočeny na centrifuze HERMLE Z 383 K při 5000 g a chlazení na 4 °C po dobu 10 minut; využito bylo rotoru HERMLE 220.86. Supernatant byl odlit a pelety byly zamraženy a uchovány v -20 °C.

### 3.3.3 Izolace membrán

#### 3.3.3.1 Sonikace

Prvním krokem k získání buněčných membrán byla sonikace vzorků získaných při jednotlivých expresích. Zamražené pelety byly resuspendovány v 100mM TAE pufru o pH 7,6 s obsahem 0,5mM EDTA. Pufr byl obohacen o proteázové inhibitory, a to v koncentraci jedné tablety cOmplete ULTRA na 50 ml pufru. Na jeden gram pelety bylo přidáno 8 ml pufru.

K sonikaci byla využita ultrasonická sonda KE 76. Každý vzorek byl sonikován celkem osmkrát, a to po dobu 80 vteřin a za konstantního chlazení v ledové lázni. Amplituda pulzu byla nastavena na 50 %. Mezi sonikacemi byl přibližně osmiminutový rozestup, kdy byly vzorky nadále chlazeny na ledu.

#### 3.3.3.2 Centrifugace

Po sonikaci následovala série centrifugací. Jako první byly vzorky deset minut centrifugovány při 4000 g v centrifuze Allegra X-30R při chlazení na 4 °C (SX4400). Supernatant z této centrifugace byl dále dvacet minut centrifugován při 18 000 g, opět v centrifuze Allegra X-30R při chlazení na 4 °C (rotor F0630). Supernatant byl opět znovu centrifugován, tentokrát v ultracentrifuze OPTIMA LE-100K firmy Beckman Coulter. Byl využit rotor typu 70 Ti (firmy Beckman Coulter), centrifugováno bylo na 45 000 rpm po dobu 65 minut, centrifugační prostor byl chlazen na 4 °C.

Peleta z této ultracentrifugace byla resuspendována v jednom ml 100mM fosfátového pufru o pH 7,4 s 20% objemovým podílem glycerolu. Pro resuspendaci pelety bylo využito Potter-Elvehjemova homogenizátoru. Pelety byly zamrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při -80 °C. V příloze 2 je vidět gel po SDS elektroforéze vzorků supernatantů a pelet odebraných po jednotlivých centrifugacích pro kontrolu exprese CYP v membráně.

### 3.3.4 Stanovení koncentrace proteinu

Ke stanovení celkové koncentrace proteinu ve finální, tedy membránové frakci, byla využita analýza pomocí BCA – bicinchoninové kyseliny. Jako standardy byly využity roztoky BSA (z anglického *bovine serum albumin*), hovězího sérového albuminu, o koncentracích 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 a 2000 µg/ml. Do mikrotitrační destičky bylo postupně pipetováno 9 µl destilované vody jako blanku (v triplicátu), standardů (v duplikátech) a jednotlivých vzorků resuspendovaných pelet (v duplikátech). Pelety z expresí ukončených po dvaceti hodinách byly ředěny pětkrát a pelety z exprese po čtyřiceti šesti hodinách byly ředěny desetkrát. Do každé jamky bylo přidáno 260 µl roztoku připraveného smícháním BCA činidel A a B v poměru 50:1. Mikrotitrační destička byla 30 minut inkubována při teplotě 37 °C. Následně byla stanovena koncentrace proteinů ve čtečce mikrotitračních destiček Sunrise při 562 nm.

### 3.3.5 Elektroforéza

K elektroforéze byl využit 10% separační a 4% zaostřovací gel. Separační gel na 1 sklo sestával ze 2 ml destilované vody, 1,65 ml 30% akrylamidu, 1,25 ml 1,5M Tris (pH 8,8), 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% APS a 2  $\mu$ l TEMED. Zaostřovací gel byl složen z 1,1 ml destilované vody, 200  $\mu$ l 30% akrylamidu, 190  $\mu$ l 1,5M Tris (pH 6,8), 15  $\mu$ l 10% SDS, 15  $\mu$ l 10% APS a 1,5  $\mu$ l TEMED. Po nalití separačního gelu byl gel převrstven destilovanou vodou. Přibližně po 40 minutách gel ztuhl a voda mohla být odlita, následovalo nalití vrchního, tedy zaostřovacího gelu. Jeho polymerace trvala přibližně 20 minut.

Pro experiment posuzující vliv  $\delta$ ALA byly na gel nanášeny vzorky inkubované v TB médiu po ředění na stejnou optickou denzitu a po přidavku vzorkového pufru. Vzorky byly ponechány 10 minut v termobloku při teplotě 95 °C. Do jamek bylo nanášeno 10  $\mu$ l vzorků a standardu, markeru bylo nanášeno 5  $\mu$ l. Elektroforéza byla 15 minut prováděna při 100 V a dále přibližně hodinu při 210 V.

Pro experiment posuzující vliv dalších faktorů na expresi byly na gel nanášeny vzorky pelet po ultracentrifugaci (tedy membránová frakce), pro něž byla stanovována koncentrace proteinu metodou BCA (viz. příloha 1). Do každé jamky bylo naneseno celkem 15  $\mu$ g proteinu. Vzorky byly před nanesením v případě potřeby naředěny a byl k nim přidán vzorkový pufr, následně byly ponechány 10 minut v termobloku při teplotě 95 °C. Do jamek bylo nanášeno 10  $\mu$ l vzorků a standardu, markeru byly nanášeny 3  $\mu$ l. Elektroforéza byla 15 minut prováděna při 100 V a přibližně hodinu při 210 V.

### 3.3.6 Western blot

Po dokončení elektroforézy byly gely na 10 minut přemístěny do přenosového pufru. Pro blot byly vystříženy membrány o velikosti 10 $\times$ 7,5 cm a stejně velké obdélníky filtračního papíru Whatman. Membrány byly na 30 vteřin smočeny ve 100% methanolu, dále v destilované vodě a nakonec byly přibližně pět minut ponechány v přenosovém pufru. Filtrační papíry byly smočeny v přenosovém pufru. Do kazet přístroje Trans-Blot Turbo na sebe byly položeny tři smočené papíry, dále membrána, gel a nakonec opět tři smočené filtrační papíry. Obsah kazety byl uhlazen válečkem. Western blot probíhal 10 minut při 25 V a 0,5 A.

### 3.3.7 Imunochemická detekce

Membrány po Western blotu byly hodinu promývány na třepačce v blotovacím roztoku obsahujícím 5 % (w/w) sušeného mléka. Dále byly přesunuty do blotovacího roztoku s primární protilátkou proti CYP3A4 (ředěno 600 $\times$ ). Membrány byly inkubovány přes noc na třepačce v chladové místnosti. Další den byly membrány třikrát propláchnuty v blotovacím

roztoku (na třepačce), každé promytí trvalo pět minut. Membrány byly přeneseny do blotovacího roztoku obsahujícího sekundární protilátku značenou alkalickou fosfatázou (ředěno 10000×) a byly hodinu a půl ponechány inkubovat. Následně byly třikrát propláchnuty v blotovacím roztoku a jednou v destilované vodě, pokaždé po pěti minutách. Pro čtyři membrány bylo k vizualizaci připraveno 30 ml roztoku APL pufru s 198 μl NBT (Nitro-Blue Tetrazolium) a 99 μl BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát *p*-toluidinová sůl). Tento roztok byl nalit na membrány a membrány byly cca 10 minut ponechány na tmavém místě, poté byla reakce zastavena vložením membrán do destilované vody.

### 3.3.8 Měření koncentrace cytochromu

Pro změření koncentrace CYP3A4 a detekci aktivní a neaktivní formy cytochromu byla využita metoda dle Omury a Sata [59]. Vzorky z pelet po ultracentrifugaci byly desetkrát naředěny ve 100mM fosfátovém pufru o pH 7,5 obsahujícím dvě objemová procenta glycerolu. Naředěné vzorky byly 45 vteřin probublávány oxidem uhelnatým a následně proměřeny ve dvoupraprskovém spektrofotometru Specord 250 Plus; měřeno bylo spektrum pro vlnové délky 390 až 550 nm. Do vzorkové kyvety byl přidán dithioničitan sodný (na špičku kopistky) a kyveta byla promíchána. Následně bylo opět proměřeno spektrum absorbance. Koncentrace aktivní formy CYP3A4 vztažená na obsah proteinů v membráně byla vypočítána ze vzorce:

$$c_{CYP3A4} = \frac{A_{450} - A_{490}}{l * (\epsilon_{450} - \epsilon_{490}) * c_p} * \text{ředění} \quad (1)$$

Písmeno  $l$  v rovnici označuje délku kyvety, která byla 1 cm;  $c_p$  značí koncentraci proteinů v membránové frakci. Rozdíl molárních extinkčních koeficientů je 0,091 μmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup> [60]. Ředěno bylo desetkrát. Pro vzorky byla rovněž vypočítána koncentrace CYP3A4 při vlnové délce 420 nm, tedy neaktivní formy CYP3A4. Bylo využito vzorce:

$$c_{CYP3A4} = \frac{A_{420} - A_{490}}{l * (\epsilon_{420} - \epsilon_{490}) * c_p} * \text{ředění} \quad (2)$$

Písmeno  $l$  v rovnici označuje délku kyvety, která byla 1 cm;  $c_p$  značí koncentraci proteinů v membránové frakci. Rozdíl molárních extinkčních koeficientů je 0,120 μmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup> [60]. Ředěno bylo desetkrát.

### 3.3.9 Měření aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktázy

Měření aktivity reduktázy bylo provedeno na spektrofotometru Specord 250 Plus. V referenční kyvetě bylo smícháno 760 μl 300mM fosfátového pufru obsahujícího 1mM EDTANa<sub>2</sub> a 10 μl zásobního roztoku cytochromu c o koncentraci 25 mg/ml. Ve vzorkové kyvetě bylo smícháno 760 μl pufru, 10 μl zásobního roztoku cytochromu c o koncentraci 25 mg/ml a 20 μl vzorku

z pelety po ultracentrifugaci. Po přidání 20  $\mu$ l 10mM NADPH byla vzorková kyveta promíchána a byla měřena absorbance při vlnové délce 550 nm po dobu jedné minuty. Vzorky byly v případě nutnosti ředěny pro dosažení lineární závislosti absorbance na čase. Specifická aktivita reduktázy ( $a_{CPR}$ ) byla vypočítána z rovnice:

$$a_{CPR} = \frac{\Delta A_{550}}{l * \epsilon_{CPR,550} * t * c_p} * \text{\textit{ředění}} \quad (3)$$

Písmeno  $l$  značí délku kyvety (1 cm);  $\Delta A_{550}$  rozdíl absorbancí po jedné minutě;  $\epsilon_{CPR,550}$  molární extinkční koeficient pro NADPH:cytochrom P450 reduktázu při vlnové délce 550 nm ( $21,0 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$ ) [61];  $t$  značí čas měření (1 minuta);  $c_p$  je koncentrace proteinu v membránové frakci.

### 3.3.10 Metabolická studie

Standardní reakcí na ověření funkce CYP3A4 je hydroxylace testosteronu do polohy 6 $\beta$ . Pro každou peletu po ultracentrifugaci bakterií byly pro tuto studii připraveny čtyři vzorky, každý o objemu 0,5 ml. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla 0,25 mg/ml, vzorky byly připraveny ve 100mM fosfátovém pufru o pH 7,4. Do každého vzorku byl přidán zásobní roztok 10mM testosteronu do výsledné koncentrace 0,05 mmol/l. Dále bylo ke vzorkům přidáno 50  $\mu$ l NADPH-generujícího systému a vzorky byly ponechány 15 minut inkubovat při 37  $^{\circ}$ C a 400 rpm na thermomixeru. Reakce byla zastavena přidáním 200  $\mu$ l roztoku 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /2M NaCl a intenzivním promícháním při 1400 rpm. Ke vzorkům bylo přidáno 20  $\mu$ l 1mM fenacetinu v methanolu jako vnitřního standardu a 1 ml dichlormethanu. Vzorky byly minutu třepány při 1400 rpm a následně centrifugovány 3 minuty při 15 000 g na stolní centrifuze. Dále byla z každého vzorku odebrána organická fáze a extrakce se ještě jednou analogicky opakovala. Nakonec byly zkumavky s dichlormethanovou fází odneseny na odpadku a odpařeny do sucha. Zkumavky byly uskladněny v -20  $^{\circ}$ C do doby analýzy.

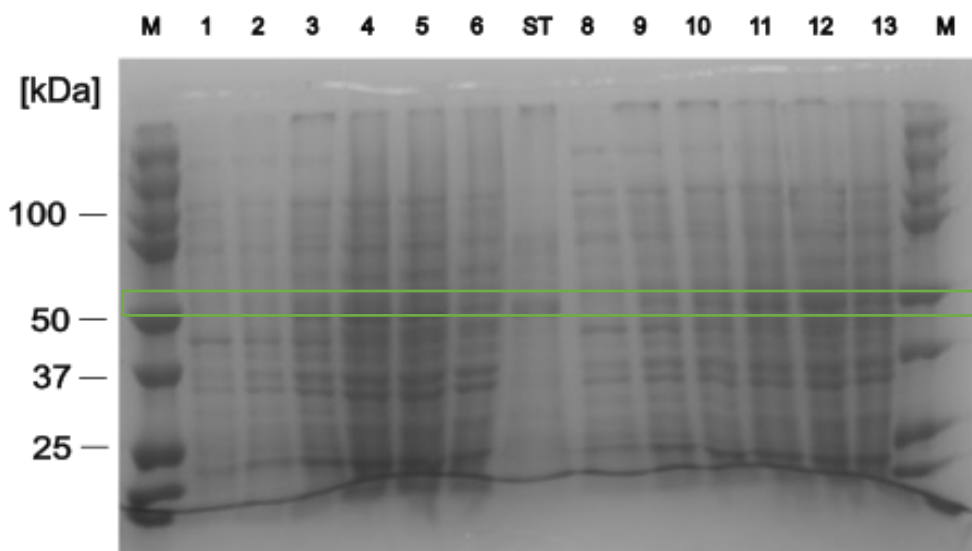
Extrahované vzorky byly resuspendovány v 50  $\mu$ l methanolu. Pro oddělení 6- $\beta$ -hydroxytestosteronu bylo využito HPLC. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18 (Macharey-Nagel), která byla ohřívána na 35  $^{\circ}$ C. Nástřik vzorku byl 25  $\mu$ l. Eluce byla prováděna gradientem methanolu z 50 % na 75 %. Detekce metabolitu byla prováděna při 254 nm a jeho kvantifikace byla uskutečněna vztahením k ploše píku vnitřního standardu, tedy fenacetinu.

## 4 Výsledky

### 4.1 Vliv kyseliny $\delta$ -aminolevulové

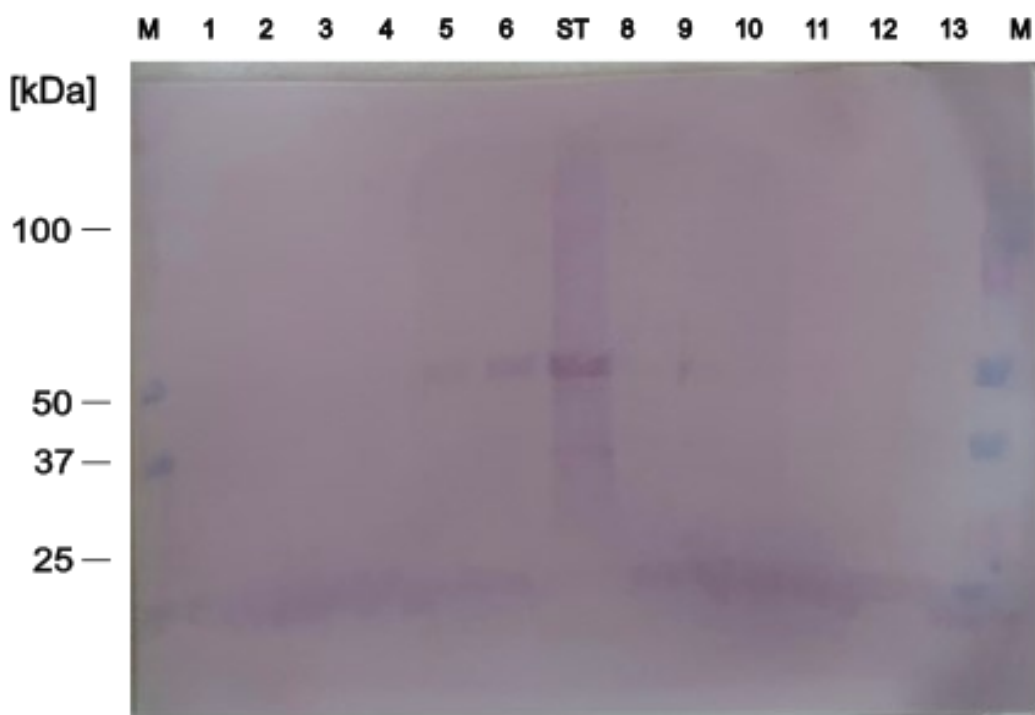
Na začátku práce byla provedena exprese CYP3A4 v menším měřítku – zkoumán byl vliv média, přítomnosti  $\delta$ ALA a doby exprese na tvorbu CYP3A4 v bakteriích. V časech 2; 5; 18; 24 a 48 hodin po indukci exprese byla v každém ze vzorků proměřena optická denzita. Pro vzorky kultivované v LB a TB médiu byla provedena elektroforéza, kde vzorky z TB média dosahovaly vyšších intenzit bandů CYP3A4 než vzorky LB média. Se vzorky inkubovanými v TB médiu byla tedy dále prováděna další elektroforéza (obrázek 1) a imunodetekce (obrázek 2, strana 28) pro přesnější zjištění exprese v jednotlivých časech.

Z obrázku 1 je patrné, že obsah proteinu narůstá s časem od indukce exprese. Ve vzorcích s  $\delta$ ALA je CYP3A4 na elektroforéze například detekovatelný až po pěti hodinách, ve vzorcích bez  $\delta$ ALA je band proteinu slabě viditelný již po dvou hodinách od indukce. Pomocí programu GelAnalyzer byly porovnány intenzity jednotlivých bandů CYP3A4 pro vzorky s a bez  $\delta$ ALA [62]. Analýza ukázala, že bandy vzorků exprimovaných s  $\delta$ ALA mají v průměru o 1,7 % větší intenzitu než vzorky exprimované bez  $\delta$ ALA.



Obr. 1: Gel z SDS elektroforézy (10% dělicí a 4% zaostřovací gel) vzorků inkubovaných v TB médiu s a bez  $\delta$ ALA. *ST* značí standard CYP3A4, *M* značí marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color). Dráhy 1 až 6 obsahují vzorky inkubované s  $\delta$ ALA, dráhy 8 až 13 vzorky bez  $\delta$ ALA. Pro každou sadu jsou vzorky seřazeny (zleva): odběr při indukci, 2; 5; 18; 24 a 48 hodin po indukci. Zelený obdélník značí pozici zkoumaných bandů CYP3A4.

Na obrázku 2 je membrána gelu vzorků exprimovaných v TB médiu s a bez  $\delta$ ALA po provedení western blotu a imunochemické detekci CYP3A4. Z obrázku vyplývá, že největší obsah CYP3A4 byl ve vzorku exprimovaném 48 hodin, a to s  $\delta$ ALA. Band je patrný i u vzorku exprimovaném 24 hodin, a to opět s  $\delta$ ALA. Tyto podmínky (exprese po dobu 24 a 48 (respektive 20 a 46) hodin a přítomnost  $\delta$ ALA) tedy byly zvoleny pro expresi ve větším měřítku.



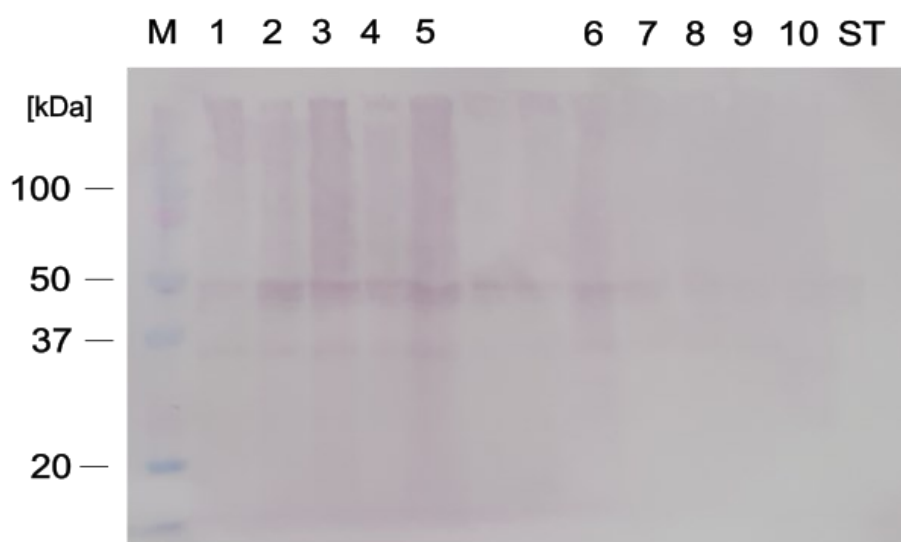
Obr. 2: PVDF membrána po western blotu (gelu po SDS elektroforéze) a imunochemické detekci CYP3A4 ve vzorcích inkubovaných v TB médiu. Vizualizace proběhla pomocí alkalické fosfatázy. *ST* značí standard CYP3A4, *M* značí marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color). Dráhy 1 až 6 obsahují vzorky inkubované s  $\delta$ ALA, dráhy 8 až 13 vzorky bez  $\delta$ ALA. Pro každou sadu jsou vzorky seřazeny (zleva): odběr při indukci, 2; 5; 18; 24 a 48 hodin po indukci.

## 4.2 Imunochemická detekce – optimalizace exprese

Po zjištění optimálního média, doby exprese a ověření pozitivního vlivu  $\delta$ ALA na tvorbu CYP3A4 byly provedeny experimenty zkoumající tři různé teploty – 20; 25 a 30 °C – a rovněž dvě různé intenzity třepání – 120 a 180 rpm. Během každého experimentu byly testovány tři optické denzity –  $OD_{600}$  0,4; 0,6 a 0,8; přičemž pro  $OD_{600}$  0,6 byla exprese indukována vždy

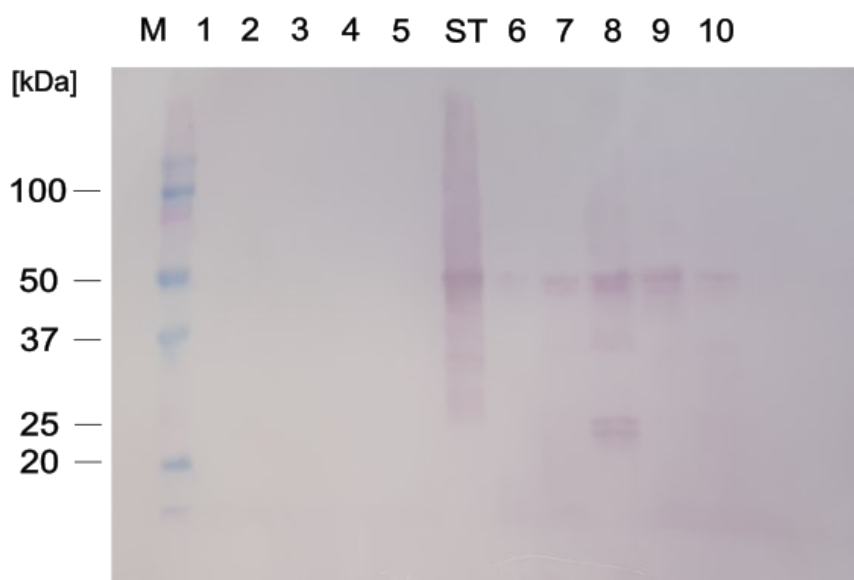
třemi různými koncentracemi IPTG – 0,1; 1 a 5mM. Pro všechny vzorky byly za pomoci sonikace a série centrifugací izolovány membránové frakce obsahující CYP3A4. S těmito membránovými frakcemi byla provedena SDS elektroforéza. Po elektroforéze byly provedeny přenosy proteinu z gelu na PVDF membránu s následnou imunodetekcí CYP3A4. Výsledky přenosu a imunodetekce pro jednotlivé podmínky exprese jsou zobrazeny na následujících čtyřech obrázcích.

Na obrázku číslo 3 vidíme PVDF membránu po western blotu a imunodetekci CYP3A4 vzorků exprimovaných při 20 °C. Pro vzorky exprimované 20 hodin bylo detekováno nejvíce proteinu pro OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 0,1 a 1mM) a 0,8. Pro OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 5mM) je detekovaný band trochu užší, pro OD<sub>600</sub> 0,4 je množství proteinu ještě menší. Vzorky exprimované 46 hodin nejsou na membráně viditelné.



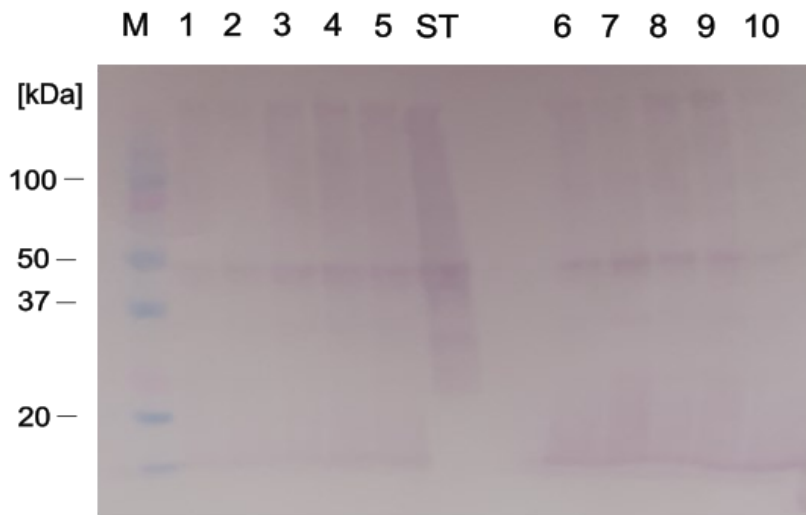
Obr. 3: PVDF membrána gelu po SDS elektroforéze, western blotu a imunochemické detekci CYP3A4 pro vzorky exprimované při 20 °C. *M* značí marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color), *ST* standard (CYP3A4). Dráhy 1 až 5 obsahují vzorky z 20hodinové exprese; dráhy 6 až 10 vzorky ze 46hodinové exprese. Vzorky jsou pro každou sadu seřazeny v pořadí: OD<sub>600</sub> 0,4; OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 0,1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 5mM); OD<sub>600</sub> 0,8. Mezi dráhou 5 a 6 došlo k poničení jamek a přetečení sousedních vzorků.

Na obrázku 4 vidíme PVDF membránu po western blotu a imunodetekci CYP3A4 vzorků exprimovaných při 25 °C. Pro vzorky exprimované po dobu 20 hodin nebyl detekován žádný protein. U vzorků exprimovaných 46 hodin bylo nejvíce proteinu detekováno při OD<sub>600</sub> 0,6, konkrétně u koncentrace IPTG 1 mmol/l. U tohoto vzorku lze rovněž pozorovat další detekované bandy, a to kolem 37 kDa a 23 kDa, kdy by se mohlo jednat o naštěpený CYP3A4. U vzorku o OD<sub>600</sub> 0,4 bylo detekováno jen malé množství proteinu.



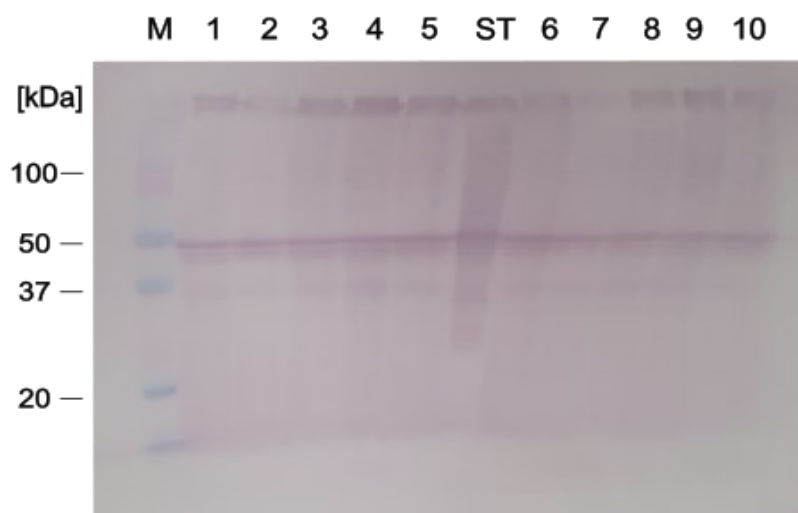
Obr. 4: PVDF membrána gelu po SDS elektroforéze, western blotu a imunochemické detekci CYP3A4 pro vzorky exprimované při 25 °C. *M* značí marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color), *ST* standard (CYP3A4). Dráhy 1 až 5 obsahují vzorky z 20hodinové exprese; dráhy 6 až 10 vzorky ze 46hodinové exprese. Vzorky jsou pro každou sadu seřazeny v pořadí: OD<sub>600</sub> 0,4; OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 0,1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 5mM); OD<sub>600</sub> 0,8.

Na obrázku 5 vidíme PVDF membránu po western blotu a imunodetekci CYP3A4 vzorků exprimovaných při 30 °C. U vzorků exprimovaných po dobu 20 hodin postupně se vzrůstající OD<sub>600</sub> vzrůstalo i množství detekovaného CYP3A4. U vzorků exprimovaných 46 hodin bylo nejvíce proteinu detekováno při OD<sub>600</sub> 0,6, konkrétně u koncentrace IPTG 0,1 mmol/l.



Obr. 5: PVDF membrána gelu po SDS elektroforéze, western blotu a imunochemické detekci CYP3A4 pro vzorky exprimované při 30 °C. *M* značí marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color), *ST* standard (CYP3A4). Dráhy 1 až 5 obsahují vzorky z 20hodinové exprese; dráhy 6 až 10 vzorky ze 46hodinové exprese. Vzorky jsou pro každou sadu seřazeny v pořadí: OD<sub>600</sub> 0,4; OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 0,1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 5mM); OD<sub>600</sub> 0,8.

Na obrázku 6 vidíme PVDF membránu po western blotu a imunodetekci CYP3A4 vzorků exprimovaných při 180 rpm a 30 °C. U všech vzorků je jasně definovaný band okolo 50 kDa (tedy CYP3A4). Další, slabší bandy lze pozorovat těsně pod 50 kDa a okolo 37 kDa.



Obr. 6: PVDF membrána gelu po SDS elektroforéze, western blotu a imunochemické detekci CYP3A4 pro vzorky exprimované při 180 rpm a 30 °C. *M* značí marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color), *ST* standard (CYP3A4). Dráhy 1 až 5 obsahují vzorky z 20hodinové exprese; dráhy 6 až 10 vzorky ze 46hodinové exprese. Vzorky jsou pro každou sadu seřazeny v pořadí: OD<sub>600</sub> 0,4; OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 0,1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 1mM); OD<sub>600</sub> 0,6 (koncentrace IPTG 5mM); OD<sub>600</sub> 0,8.

### 4.3 Koncentrace CYP3A4

Pro vzorky pelet po centrifugacích byla proměřena diferenční CO spektra, kdy byly vzorky probublány oxidem uhelnatým a byl k nim přidán dithioničitan sodný. Koncentrace CYP3A4 jsou vztaženy na mg celkového proteinu v membráně.

Výsledky měření pro aktivní formu CYP, tedy s absorpčním maximem při 450 nm, jsou uvedeny v tabulce číslo 1 na straně 34. Nelze říci, že bychom pozorovali obecný nárůst nebo pokles aktivní formy cytochromu mezi 20 a 46 hodinami. Ve všech sériích se najdou vzorky, kde koncentrace klesají, i kde naopak stoupají. Co se série vzorků inkubovaných při 20 °C týče, byl největší nárůst mezi 20 a 46 hodinami zaznamenán u vzorku indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,6 přídávkem 0,1mM IPTG. Tento vzorek také obsahoval nejvyšší koncentraci aktivní formy CYP3A4, a to pro všechny vzorky ze všech sérií exprimované po dobu 46 hodin.

Ve vzorcích inkubovaných při 25 °C po dobu 20 hodin nebyla v důsledku příliš nízké koncentrace proteinů měřené BCA metodou zjišťována koncentrace CYP. Pro vzorky inkubované 46 hodin při této teplotě byla největší koncentrace zjištěna u vzorku indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,6 přídávkem 5mM IPTG.

U vzorků inkubovaných ve 30 °C po dobu 20 hodin se vymyká vzorek indukovaný při OD<sub>600</sub> 0,4, který obsahuje výrazně více CYP3A4 než zbylé vzorky této série. Tento vzorek obsahuje největší koncentraci CYP3A4 vůbec. Ze vzorků inkubovaných při 30 °C po dobu 46 hodin má nejvyšší obsah CYP3A4 vzorek indukovaný při OD<sub>600</sub> 0,6 přídávkem 0,1mM IPTG. U tohoto vzorku je rovněž pozorován nárůst koncentrace CYP mezi 20 a 46 hodinami.

Vzorky inkubované při 180 rpm (30 °C) mají obecně nejvyšší koncentrace CYP3A4 ze všech vzorků. Nejvyšší koncentrace cytochromu byla pro tuto sadu vzorků naměřena u vzorku indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,6 přídávkem 1mM IPTG, a to jak pro 20, tak 46 hodin. Až na vzorek indukovaný při OD<sub>600</sub> 0,8 zde pro vzorky koncentrace aktivní formy CYP s prodloužením doby exprese klesá.

Tabulka č. 1: Tabulka uvádí vypočítané koncentrace CYP3A4 z měření dle Omury a Sata pro vzorky exprese po 20 a 46 hodinách. Číslo za lomítkem u OD<sub>600</sub> 0.6 znamená, jakou koncentrací (v mmol/l) IPTG byla indukována exprese. Pro vzorky, kde probíhala exprese při 25 °C po dobu 20 hodin, nebyla spektra cytochromu s CO měřena, jelikož vzorky obsahovaly dle stanovení koncentrace proteinů metodou BCA velice málo proteinů. Koncentrace jsou vztaženy na mg proteinu naměřeného v membránové frakci.

Vzorek	Koncentrace CYP3A4 po 20 hodinách [nmol/mg]	Koncentrace CYP3A4 po 46 hodinách [nmol/mg]
20 °C OD <sub>600</sub> 0.4	10,9	5,81
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	0	81,3
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	9,23	65,2
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	22,5	21,6
20 °C OD <sub>600</sub> 0.8	24,7	2,30
25 °C OD <sub>600</sub> 0.4	ND	0
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	ND	13,0
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	ND	0
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	ND	40,3
25 °C OD <sub>600</sub> 0.8	ND	12,0
30 °C OD <sub>600</sub> 0.4	90,9	15,7
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	26,0	37,4
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	22,8	26,6
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	10,1	18,3
30 °C OD <sub>600</sub> 0.8	21,9	19,0
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.4	49,0	36,5
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	50,2	31,5
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/1	73,7	54,7
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/5	59,0	33,3
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.8	47,3	51,4

Pro vzorky byla rovněž vypočítána koncentrace CYP3A4 při vlnové délce 420 nm, tedy koncentrace neaktivní formy cytochromu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce číslo 2 na straně 35. Z tabulky č. 2 je patrné, že s časem obecně stoupá množství denaturovaného proteinu. Výjimkou jsou vzorky exprimované při 20 °C indukované při OD<sub>600</sub> 0,4 či 0,8, množství neaktivní formy cytochromu zde s delší dobou exprese pokleslo. U série inkubované při 20 °C pozorujeme méně drastický nárůst koncentrace neaktivního CYP3A4 než u zbylých sérií.

Důležitá je zde série inkubovaná při 180 rpm. Pro vzorky z této série po 20 hodinách od indukce byly naměřeny vyšší hladiny aktivního cytochromu než jeho neaktivní formy. Pro všechny ostatní vzorky byla naměřena výrazně vyšší hladina neaktivní formy proteinu oproti funkčnímu proteinu.

Tabulka č. 2: Tabulka uvádí vypočítané koncentrace CYP3A4 (chybně složené formy, tedy detekované při 420 nm) z měření dle Omury a Sata pro vzorky exprese po 20 a 46 hodinách. Číslo za lomítkem u OD<sub>600</sub> 0.6 znamená, jakou koncentrací (v mmol/l) IPTG byla indukována exprese. Pro vzorky, kde probíhala exprese při 25 °C po dobu 20 hodin, nebyla spektra cytochromu s CO měřena, jelikož vzorky obsahovaly dle stanovení koncentrace proteinů metodou BCA velice málo proteinů. Koncentrace jsou vztaženy na mg proteinu naměřeného v emmbránové frakci.

Vzorek	Koncentrace CYP3A4 po 20 hodinách [nmol/mg]	Koncentrace CYP3A4 po 46 hodinách [nmol/mg]
20 °C OD <sub>600</sub> 0.4	203	143
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	172	288
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	166	284
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	219	109
20 °C OD <sub>600</sub> 0.8	255	153
25 °C OD <sub>600</sub> 0.4	ND	153
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	ND	233
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	ND	520
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	ND	405
25 °C OD <sub>600</sub> 0.8	ND	136
30 °C OD <sub>600</sub> 0.4	381	257
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	71,0	416
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	53,3	293
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	30,7	347
30 °C OD <sub>600</sub> 0.8	44,4	273
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.4	30,8	124
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	16,1	168
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/1	29,5	96,2
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/5	30,7	69,4
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.8	7,18	120

#### 4.4 Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktázy

V tabulce č. 3 na straně 37 jsou zachyceny výsledky měření specifické aktivity CPR. Obecně lze říci, že se vzrůstajícím časem exprese stoupá i aktivita CPR. Pro vzorky exprimované 20 hodin se aktivity CPR v rámci jednotlivých sérií příliš neliší. Pouze u série inkubované při 20 °C pozorujeme oproti ostatním vzorkům z této série zvýšené aktivity u vzorků indukovaných při  $OD_{600}$  0,4 a 0,8. Tyto vzorky (a celá tato série) dosahují ze všech vzorků inkubovaných po dobu 20 hodin nejvyšší aktivity CPR.

Pro vzorky exprimované 46 hodin již v rámci jednotlivých sérií pozorujeme větší změny, vzorky se od sebe specifickou aktivitou CPR liší až třikrát. Mezi jednotlivými sériemi se hodnoty rovněž odlišují – například pro vzorky inkubované při 25 °C byly (oproti ostatním teplotám) naměřeny velmi nízké hodnoty aktivity CPR. Nejvyšší aktivity CPR byly zjištěny pro vzorky inkubované při 20 °C, kdy celkově největší aktivita CPR ze všech vzorků (20 i 46hodinových) byla naměřena u vzorku indukovaného při  $OD_{600}$  0,6 přidavkem 0,1mM IPTG.

U série inkubované při 30 °C bylo nejvyšší aktivity po 20 hodinách inkubace dosaženo u vzorku indukovaného při  $OD_{600}$  0,8; po 46 hodinách však v této sérii nejvyšší aktivity dosahuje vzorek indukovaný při  $OD_{600}$  0,6 pomocí 0,1mM IPTG. U série inkubované při 180 rpm bylo po 20 hodinách dosaženo nejlepšího výsledku u vzorku indukovaného při  $OD_{600}$  0,6 pomocí 1mM IPTG (po 20 hodinách však v této sérii vzorky dosahovaly velmi blízkých aktivit); po 46 hodinách byla v této sérii pozorována nejvyšší aktivita u vzorku indukovaného při  $OD_{600}$  0,8. Vzorek indukovaný při  $OD_{600}$  0,6 pomocí 0,1mM IPTG se aktivitou blížil tomuto vzorku.

Tabulka 3: Tabulka uvádí vypočítané specifické aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktázy pro vzorky odebrané 20 a 46 hodin po indukci exprese. Číslo za lomítkem u OD<sub>600</sub> 0.6 znamená, jakou koncentrací (v mmol/l) IPTG byla indukována exprese.

Vzorek	Aktivita CPR po 20 hodinách [nmol <sub>cytochrom c</sub> *min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> ]	Aktivita CPR po 46 hodinách [nmol <sub>cytochrom c</sub> *min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> ]
20 °C OD <sub>600</sub> 0.4	1,79	1,85
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	1,05	4,93
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	1,58	4,41
20 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	1,48	2,68
20 °C OD <sub>600</sub> 0.8	1,84	3,60
25 °C OD <sub>600</sub> 0.4	0	0,12
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	0	0,35
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	0	0,46
25 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	0	0,13
25 °C OD <sub>600</sub> 0.8	0	0,13
30 °C OD <sub>600</sub> 0.4	0,45	0,36
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	0,44	0,74
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/1	0,53	0,54
30 °C OD <sub>600</sub> 0.6/5	0,37	0,56
30 °C OD <sub>600</sub> 0.8	0,60	0,58
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.4	0,40	0,37
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/0.1	0,44	1,13
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/1	0,49	0,72
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.6/5	0,42	0,57
180 rpm OD <sub>600</sub> 0.8	0,48	1,23

#### 4.5 Metabolická studie

Z výsledků předchozích podkapitol vyplývá, že se podařilo exprimovat CYP3A4 (byť převážně v neaktivní formě) i CPR. Dalším krokem bylo ověření aktivity CYP3A4. Pro porovnání aktivit CYP3A4 jednotlivých vzorků byla provedena metabolická studie následovaná HPLC. Jako substrát byl použit testosteron, který byl CYP3A4 metabolizován na 6β-hydroxytestosteron. Po provedení HPLC byla vztažena plocha píku tohoto metabolitu k ploše píku vnitřního standardu – fenacetinu. Chromatografie rovněž ukázala přítomnost druhého, ve většině případů minoritního metabolitu – 2β-hydroxytestosteronu. Plocha jeho píku byla rovněž vztažena k ploše píku fenacetinu. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v tabulkách 4 a 5 na stranách 38 a 39. Pro každý vzorek byla provedena čtyři měření, přičemž tabulky 4 a 5 zobrazují jejich průměr a směrodatnou odchylku.

Pro vzorky exprimované 20 hodin (tabulka 4, strana 38) byla zjištěna podobná míra 6β-hydroxytestosteronu, největší množství metabolitu pak byla detekováno ve vzorcích

inkubovaných při 180 rpm. Množství druhého metabolitu se pak mezi jednotlivými sériemi lehce liší, nejvíce tohoto metabolitu však bylo opět detekováno ve vzorcích inkubovaných při 180 rpm. U vzorků exprimovaných po dobu 20 hodin lze říci, že při metabolické studii bylo ve všech vzorcích (kromě vzorku inkubovaného při 180 rpm a indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,6 pomocí 0,1mM IPTG) vytvořeno více 6β-hydroxytestosteronu než 2β-hydroxytestosteronu.

Tabulka 4: Tabulka zobrazuje výsledky HPLC analýzy metabolismu testosteronu exprimovaným CYP3A4. Číselné údaje představují plochy píků metabolitů vztahované k ploše píku fenacetinu. V tabulce jsou uvedeny údaje pro vzorky exprimované po dobu 20 hodin. Číslo za lomítkem u OD<sub>600</sub> 0.6 znamená, jakou koncentrací (v mmol/l) IPTG byla indukována exprese. Údaje jsou vypočítány jako průměr čtyř měření, uvedena je rovněž směrodatná odchylka.

Vzorek	6β-hydroxytestosteron/fenacetin	2β-hydroxytestosteron/fenacetin
20 °C OD <sub>600</sub> 0,4	0,019 ±0,007	0,014 ±0,007
20 °C OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,016 ±0,005	0,008 ±0,007
20 °C OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,019 ±0,003	0,014 ±0,004
20 °C OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,023 ±0,01	0,021 ±0,009
20 °C OD <sub>600</sub> 0,8	0,023 ±0,006	0,018 ±0,008
30 °C OD <sub>600</sub> 0,4	0,019 ±0,004	0,013 ±0,003
30 °C OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,028 ±0,007	0,022 ±0,01
30 °C OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,021 ±0,005	0,015 ±0,004
30 °C OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,027 ±0,003	0,018 ±0,008
30 °C OD <sub>600</sub> 0,8	0,026 ±0,01	0,021 ±0,012
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,4	0,029 ±0,006	0,023 ±0,011
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,037 ±0,007	0,038 ±0,016
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,037 ±0,014	0,032 ±0,034
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,023 ±0,01	0,019 ±0,007
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,8	0,032 ±0,005	0,030 ±0,012

U vzorků exprimovaných 46 hodin (tabulka 5, strana 39) byla pozorována jedna hodnota výrazně se lišící od zbytku výsledků. U vzorku exprimovaného při 20 °C a indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,6 přídavkem 0,1mM IPTG byl pozorován mimořádně vysoký pík 6β-hydroxytestosteronu, který až čtyřikrát převyšoval ostatní naměřené hodnoty. Zároveň však byla pro tento vzorek naměřena vysoká směrodatná odchylka. Pokud odhlédneme od tohoto mimořádně vysokého výsledku, pozorujeme největší píky 6β-hydroxytestosteronu u vzorku inkubovaného při 30 °C a indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,4 a u vzorku inkubovaného při 180 rpm indukovaného při OD<sub>600</sub> 0,6 pomocí 5mM IPTG. 2β-hydroxytestosteron byl i při inkubaci po dobu 46 hodin minoritním metabolitem, nad 6β-hydroxytestosteronem převažoval pouze u tří vzorků.

Tabulka 5: Tabulka zobrazuje výsledky HPLC analýzy metabolismu testosteronu exprimovaným CYP3A4. V tabulce jsou uvedeny údaje pro vzorky exprimované po dobu 46 hodin. Číslo za lomítkem u OD<sub>600</sub> 0,6 znamená, jakou koncentrací (v mmol/l) IPTG byla indukována exprese. Údaje jsou vypočítány jako průměr čtyř měření, uvedena je rovněž směrodatná odchylka.

Vzorek	6β-hydroxytestosteron/fenacetin	2β-hydroxytestosteron/fenacetin
20 °C OD <sub>600</sub> 0,4	0,026 ±0,005	0,030 ±0,009
20 °C OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,104 ±0,071	0,026 ±0,013
20 °C OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,031 ±0,012	0,017 ±0,009
20 °C OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,029 ±0,005	0,023 ±0,016
20 °C OD <sub>600</sub> 0,8	0,029 ±0,011	0,028 ±0,019
25 °C OD <sub>600</sub> 0,4	0,022 ±0,007	0,015 ±0,006
25 °C OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,023 ±0,005	0,016 ±0,004
25 °C OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,030 ±0,018	0,015 ±0,009
25 °C OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,025 ±0,002	0,017 ±0,002
25 °C OD <sub>600</sub> 0,8	0,025 ±0,008	0,021 ±0,004
30 °C OD <sub>600</sub> 0,4	0,035 ±0,021	0,024 ±0,014
30 °C OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,027 ±0,006	0,017 ±0,008
30 °C OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,015 ±0,006	0,025 ±0,015
30 °C OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,020 ±0,004	0,022 ±0,013
30 °C OD <sub>600</sub> 0,8	0,022 ±0,011	0,022 ±0,009
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,4	0,024 ±0,001	0,009 ±0,003
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,6/0,1	0,033 ±0,011	0,033 ±0,02
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,6/1	0,030 ±0,007	0,013 ±0,002
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,6/5	0,036 ±0,009	0,027 ±0,006
180 rpm OD <sub>600</sub> 0,8	0,025 ±0,004	0,016 ±0,004

## 5 Diskuze

Cytochrom P450 3A4 je klíčovým enzymem první fáze biotransformace a jedním z nejdůležitějších enzymů metabolismu širokého spektra klinicky využívaných léčiv. Pro jeho expresi se nabízí vícero organismů, v čele s bakteriálními expresními systémy. Cílem práce bylo optimalizovat expresi tohoto enzymu v *E. coli* DH5a. Odborná literatura neuvádí jednotné doporučené podmínky exprese – v této práci proto byl studován vliv  $\delta$ ALA, teploty, optické denzity, koncentrace IPTG a otáček při inkubaci na vliv exprese CYP3A4.

Prvním krokem bylo ověření pozitivního vlivu  $\delta$ ALA na expresi proteinu a volba vhodné doby trvání exprese.  $\delta$ -aminolevulová kyselina je prekurzorem hemu, tedy sloučeniny nutné pro tvorbu cytochromu. Bakterie je schopna cytochrom exprimovat i bez přítomnosti přidané  $\delta$ ALA, jejím přidavkem však dochází ke zvýšené expresi CYP3A4 [52], [57]. Zároveň ale záleží i na konkrétním využitém plazmidu a modifikacích v genu pro CYP3A4. Např. pro expresi CYP3A4 s *ompA* leader sekvencí přidavek  $\delta$ ALA nevykazuje žádné zlepšení [52]. Pro námi využitý konstrukt byla pozorována přibližně trojnásobná exprese CYP3A4 po přidání  $\delta$ ALA [52], [57]. Co se doby exprese týče, shoduje se většina odborné literatury na 22 až 24 hodinách jako na optimální době pro produkci CYP3A4 v *E. coli* [52], [54], [55], [57]. Pritchard et al. uvádí, že delší doba exprese zmenšuje výtěžky hemoproteinu [52].

Byla provedena elektroforéza vzorků odebraných v různých časech od indukce exprese inkubovaných buď v přítomnosti, nebo nepřítomnosti  $\delta$ ALA v médiu. Po elektroforéze následoval western blot a imunodetekce CYP3A4. Z obrázku 2 na straně 28, je jasně patrné, že při imunodetekci CYP3A4 byl protein detekován pouze ve vzorcích inkubovaných s  $\delta$ ALA. Pozitivní vliv  $\delta$ -aminolevulové kyseliny na expresi CYP3A4 v *E. coli* DH5a při využití konstruktu pCW/NF14 tedy byl jednoznačně potvrzen. *E. coli* DH5a je schopna využít přidanou  $\delta$ ALA, čímž je dosaženo rychlejší a efektivnější produkce CYP3A4. Rovněž by přidavek  $\delta$ ALA mohl pro bakterii znamenat menší energetické vyčerpání, tedy ponechání si více energie na další procesy spojené s tvorbou a transportem cytochromu. Z obrázku 2 na straně 28 je rovněž jasně patrné, že se jako nejlepší jeví časy 24 a 48 hodin po indukci, z praktických důvodů pak byly všechny další exprese prováděny 20 a 46 hodin.

Dalším zkoumaným faktorem byla teplota, při níž je exprese prováděna. V *E. coli* je protein exprimován nejčastěji při 30 °C [52], [57], [63]. Parikh et al. uvádí, že inkubace při vyšší teplotě může zcela zastavit expresi proteinu či snížit jeho enzymovou aktivitu [57]. Inkubace při nižších teplotách pak vede k stabilnější expresi proteinů, nicméně výtěžky exprese bývají nižší [56]. Pro tuto práci tedy byly zvoleny teploty 20; 25 a 30 °C. Na expresi může mít vliv i počet otáček při inkubaci. Expresce cytochromů se provádí v rozmezí 100 až 200 otáček za minutu [51], pro tuto práci tedy byl zvolen počet otáček 120. Při expresi CYP3A4 se však

využívá spíše vyšší intenzita třepání [57], [63], proto byl experiment při 30 °C zopakován pro intenzitu třepání 180 rpm.

Byly tedy provedeny exprese za tři různých teplot 20; 25 a 30 °C (120 rpm) a 30 °C (180 rpm), přičemž při každé teplotě byly zkoumány vlivy tří  $OD_{600}$  (0,4; 0,6 a 0,8). Pro  $OD_{600}$  0,6 byly zkoušeny tři různé koncentrace IPTG jako induktoru (0,1; 1 a 5mM IPTG). Po zisku membránových frakcí všech vzorků byly provedeny elektroforézy následované western blotem a imunochemickou detekcí CYP3A4. Jednalo se o ověření přítomnosti CYP3A4 a první vzhled do výsledků expresí. Zarážející byly výsledky pro sérii inkubovanou při 25 °C po dobu 20 hodin (obrázek 4, strana 29) – pro tuto sérii nebyl detekován žádný cytochrom. To by odpovídalo i výsledkům měření celkové koncentrace proteinů v membránové frakci (příloha 1), kde byla naměřena velmi nízká koncentrace mimo kalibrační rozsah. Rovněž při resuspendaci membránové frakce bylo možné pozorovat velmi malé množství bakteriální membrány v porovnání s ostatními vzorky. V sérii inkubované při 25 °C byla pro kontrolu proměřena i aktivita CPR, kdy vzorky nevykazovaly žádnou aktivitu.

Na PVDF membráně pro vzorky ze série inkubované při 20 °C (obrázek 3, strana 29) lze kromě bandů okolo 50 kDa (stejná úroveň jako standard CYP3A4) vidět i bandy okolo 37 kDa – nejspíše tedy došlo při expresi či během přípravy vzorků k naštěpení proteinu. Na této membráně nejspíš rovněž došlo ke špatnému přenosu jedné části gelu, kdy na membráně prakticky nelze sledovat dráhy obsahující vzorky inkubované 46 hodin a standard. Vzorky inkubované 46 hodin ale jednoznačně obsahují CYP3A4 (viz. tabulka 1 na straně 34 a tabulka 2 na straně 35). Chyba mohla být rovněž provedena během nanášení vzorků na gel.

Na PVDF membráně pro vzorky ze série inkubované při 25 °C po dobu 46 hodin se vymyká vzorek indukovaný při  $OD_{600}$  0,6 pomocí 1mM IPTG. I zde je vidět kromě bandu okolo 50 kDa i band při 37 kDa, navíc pozorujeme dva další bandy mezi 25 a 20 kDa. Při expresi tohoto vzorku tedy nejspíše rovněž došlo k proteolýze, v tomto případě výraznější – tato koncentrace IPTG, optická denzita a teplota mohly způsobit velmi rychlou expresi CYP3A4 a jeho částečnou degradaci. Této teorii by částečně odpovídal i výsledek z metabolické studie aktivity CYP3A4 – vzorek indukovaný 1mM IPTG vykazoval z této série největší metabolickou aktivitu, ve vzorku ho tedy mohlo být velké množství. Teorii ale neodpovídá výsledek měření koncentrace aktivní formy CYP3A4 – pro vzorek indukovaný 1mM IPTG je koncentrace aktivního CYP3A4 nulová. Bandy okolo 37 kDa pozorujeme i pro sérii inkubovanou při 180 rpm. Zde navíc pozorujeme i jeden výrazný nepřerušovaný band, kdy by se mohlo jednat o chybné navázání protilátek.

Pro všechny membránové frakce byla rovněž proměřena koncentrace CYP3A4 pomocí metody dle Omury a Sata. Z tabulek 1 a 2 na stranách 34 a 35 je patrné, že vzorky obecně obsahují spíše více neaktivní formy cytochromu, tedy formy detekované při 420 nm. Vyskytly

se však některé výjimky. Vzorky ze série inkubované při 180 rpm po dobu 20 hodin jako jediné obsahují více aktivní než neaktivní formy CYP3A4. Po 46 hodinách však již i tyto vzorky obsahují více chybně složeného proteinu. Dalo by se tedy předpokládat, že zvýšení otáček při inkubaci a zvýšená aerace média napomáhá při kratší době inkubace správnému skládání CYP3A4. U vzorků inkubovaných při 20 °C po dobu 20 hodin si lze povšimnout vysokého poměru mezi koncentrací neaktivní a aktivní formy CYP3A4 – koncentrace neaktivní formy je až 18krát vyšší než koncentrace aktivní formy. U většiny ostatních vzorků jsou poměry neaktivní a aktivní formy nižší.

Z tabulky 1 na straně 34 a z tabulky 2 na straně 35 je vidět, že ve většině vzorků v čase stoupá hlavně neaktivní forma CYP, opačný trend ale pozorujeme u vzorků inkubovaných při 20 °C indukovaných při OD<sub>600</sub> 0,6 pomocí 1 a 0,1mM IPTG. Zde v čase stoupá aktivní forma CYP. Aktivní forma se v čase zvyšuje i pro vzorky inkubované při 30 °C indukované při OD<sub>600</sub> 0,6 (všemi třemi koncentracemi IPTG).

Pokud porovnáme sérii inkubovanou při 30 °C a 120 rpm a 30 °C a 180 rpm, je patrné, že i zvýšení intenzity třepání způsobí nárůst koncentrace exprimovaného proteinu (až na vzorek indukovaný při OD<sub>600</sub> 0,4). Parikh et al. prováděli expresi při 30 °C a 200 rpm po dobu 24 hodin, exprese byla indukována při OD<sub>600</sub> 0,7 pomocí 1mM IPTG; v médiu byla obsažena 0,5mM δALA. V membránách při tomto experimentu byla naměřena koncentrace CYP3A4 (aktivního) 350 pmol/mg [57]. Z tabulky číslo 1 na straně 34 je patrné, že všechny naše vzorky (až na jednu výjimku) dosahují vyšších koncentrací aktivní formy CYP3A4. Z těchto údajů se lze domnívat, že by intenzita třepání 200 rpm mohla mít negativní vliv na expresi proteinu. To se ale vzhledem k naší pozorované expresi při 180 rpm nejeví jako moc pravděpodobné. Roli v těchto výsledcích mohou hrát i jiné faktory, jako například odlišný využitý bakteriální kmen.

Zásadním rozdílem mezi naší provedeným experimentem a experimentem Parikha et al. je přítomnost denaturovaného proteinu. Parikh et al. zaznamenali CO spektra s výraznými a jasně definovanými píky při 450 nm, zatímco při 420 nm byly detekovány menší píky, jejichž přítomnost byla ve studii přisouzena vlivu cytochromu o [57]. Větší podíl aktivní formy CYP3A4 mohl zajistit přidaný 1mM thiamin. Bylo by tedy vhodné v budoucnu experimenty zopakovat s přítomností thiaminu v médiu.

Dalším ze zkoumaných faktorů ovlivňujících expresi byla koncentrace IPTG jako induktoru exprese. V dříve provedených studiích je používána výhradně 1mM koncentrace IPTG [52], [55], [57], [63]. Bylo tedy rozhodnuto porovnat vliv 1mM, desetkrát nižší a pětikrát vyšší koncentrace IPTG na expresi CYP3A4 indukovanou při OD<sub>600</sub> 0,6. Vliv rozdílných koncentrací je nejlépe vidět ve výsledcích měření aktivity CPR a CYP3A4.

Pro výsledky měření aktivity CPR (tabulka 3 na straně 37) lze pozorovat, že aktivita CPR stoupá s časem od počátku indukce. Největší nárůst aktivity enzymu byl pozorován pro

sérii inkubovanou při 20 °C – zde došlo až k čtyřnásobnému nárustu aktivity CPR, konkrétně u vzorku indukovaného při OD<sub>600</sub> pomocí 0,1mM IPTG. V rámci zbylých sérií pozorujeme obecně menší nárusty aktivity CPR v čase. Zaměříme-li se na vliv koncentrace IPTG u vzorků indukovaných při OD<sub>600</sub> 0,6, pozorujeme u třech sérií podobný trend. Pro vzorky inkubované ve 20 °C, 30 °C a 180 rpm byla pro dobu exprese 20 hodin zjištěna nejvyšší aktivita CPR pro vzorky indukované 1mM IPTG. Pro dobu exprese 46 hodin pak ale nejlepších výsledků dosahuje 0,1mM IPTG. V rámci jednotlivých sérií tedy byly obecně pro vzorky indukované při OD<sub>600</sub> 0,6 naměřeny nejlepší hodnoty pro 0,1 či 1mM IPTG. Vzorky indukované 5mM IPTG dosahovaly menších aktivit než vzorky indukované 0,1 či 1mM IPTG. Zcela nejlepších výsledků bylo dosaženo po 46 hodinách u série inkubované při 20 °C, dalo by se tedy předpokládat, že tato teplota a čas jsou nejlepší pro expresi maximálně aktivní CPR. Pro vzorky inkubované při 30 °C po dobu 46 hodin byl rovněž pozorován nárůst aktivity při zvýšení intenzity třepání ze 120 na 180 rpm. Po 20 hodinách ale lepších výsledků dosahovaly vzorky inkubované za nižších otáček.

Z výsledků měření aktivity CPR by se dalo předpokládat, že budeme u aktivity CYP3A4 pozorovat stejnou závislost, co se koncentrace IPTG a metabolické aktivity týče. Tato závislost však byla potvrzena jen částečně. Z metabolické studie (tabulky 4 a 5 na stranách 38 a 39) lze vyzorovat, že vzorky indukované při OD<sub>600</sub> 0,1mM IPTG v některých sériích vykazují lepší metabolickou aktivitu (pozorování pro 6β-hydroxytestosteron) než vzorky indukované 1 či 5mM IPTG, zároveň v metabolické aktivitě částečně předčívají i vzorky indukované při zbylých dvou optických denzitách. Tento jev se týká série inkubované při 30 °C po dobu 20 hodin, 180 rpm po dobu 20 hodin a 20 °C po dobu 46 hodin. V těchto třech sériích se zároveň jednalo o nejvíce metabolicky aktivní vzorky. V sérii inkubované při 30 °C po dobu 20 hodin byl druhý nejlepší výsledek naměřen u vzorku indukovaného 5mM IPTG; vzorek indukovaný 1mM IPTG pak byl až na čtvrtém místě. V sérii inkubované při 180 rpm po dobu 20 hodin naopak vzorek indukovaný 5mM IPTG vykazoval zcela nejmenší aktivitu; vzorky indukované 0,1 a 1mM IPTG vykazovaly stejnou aktivitu. U zbylých sérií vzorky dosahovaly nejlepších výsledků vždy v jiném pořadí. Stejně jako u aktivity CPR byl pozorován (kromě vzorků indukovaných při OD<sub>600</sub> 0,4) nárůst aktivity pro vzorky inkubované při 30 °C při zvýšení intenzity třepání ze 120 na 180 rpm.

Lze tedy předpokládat, že nižší koncentrace IPTG využitého při indukci exprese umožňuje bakterii při některých dalších podmínkách správněji skládat protein, a to jak CYP3A4, tak CPR, čímž je zajištěna jejich vyšší aktivita. V této práci byla nejvyšší aktivita CPR a CYP3A4 naměřena při využití 0,1mM IPTG u vzorků inkubovaných při 20 °C po dobu 46 hodin. Dobrých výsledků při využití 0,1mM IPTG dosahovaly i vzorky inkubované při 180 rpm – po 20 hodinách byla naměřena vysoká aktivita CYP3A4 a po 46 hodinách vysoká aktivita CPR. Bylo by vhodné provést obdobný experiment s různou koncentrací IPTG i pro OD<sub>600</sub> 0,4 a 0,8. Zároveň bylo pozorováno, že prodloužení doby inkubace výrazně nezvyšuje

metabolickou aktivitu cytochromu, ve většině případů aktivita zůstávala stejná nebo mírně poklesla. Nárůst aktivity byl pozorován jen pro sérii inkubovanou při 20 °C. Vzorke ze série inkubované při 30 °C zůstaly prakticky stejně aktivní, aktivita vzorků ze série inkubované při 180 rpm však mírně poklesla. V tomto ohledu se tedy aktivita CYP3A4 liší od aktivity CPR, která v čase narůstá.

## 6 Závěr

Cílem práce bylo optimalizovat podmínky exprese rekombinantního CYP3A4. Pro optimalizaci bylo zvoleno několik faktorů ovlivňujících expresi CYP3A4 – teplota, přítomnost  $\delta$ ALA, koncentrace IPTG, doba exprese, optická denzita při indukci a rovněž intenzita třepání při expresi proteinu. Pomocí imunodetekce bylo dokázáno, že  $\delta$ ALA má jasně pozitivní vliv na expresi CYP3A4 a že se jako nejlepší doby trvání exprese jeví 24 a 48 hodin. Hlavním indikátorem kvality exprese byla metabolická studie. Nejvyšší aktivitu při ní vykazovaly vzorky exprimované při 20 °C po dobu 46 hodin a vzorky exprimované při 180 rpm po dobu 20 hodin, které byly indukovány při  $OD_{600}$  0,6 pomocí 0,1mM IPTG. Vzorky exprimované při 20 °C po dobu 46 hodin zároveň vykazovaly i nejvyšší aktivity CPR. Rovněž bylo prokázáno, že indukcí 0,1 či 1mM IPTG lze docílit vyšších aktivit CPR a CYP3A4 než při indukci 5mM IPTG. Dalším pozorováním byl pozitivní vliv zvýšení otáček na aktivitu CYP3A4 a koncentraci aktivní formy CYP3A4.

## Seznam použité literatury

- [1] U. N. P. Division, „By Location | Pivot Table | Data Portal“, Population Division Data Portal. Viděno: 23. únor 2025. [Online]. Dostupné z: <https://population.un.org/dataportal/data/indicators/76/locations/203/start/1950/end/2025/table/pivotbylocation?df=a2f14c1c-eaf4-4bdc-bc94-67bd9dda2cc6>
- [2] U. M. Zanger, M. Turpeinen, K. Klein, a M. Schwab, „Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation“, *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 392, č. 6, s. 1093–1108, lis. 2008, doi: 10.1007/s00216-008-2291-6.
- [3] F. Bray *et al.*, „Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries“, *CA. Cancer J. Clin.*, roč. 74, č. 3, s. 229–263, 2024, doi: 10.3322/caac.21834.
- [4] R. Mitra *et al.*, „CYP3A4 Mediates Growth of Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells in Part by Inducing Nuclear Translocation of Phospho-Stat3 through Biosynthesis of ( $\pm$ )-14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid (EET) \*“, *J. Biol. Chem.*, roč. 286, č. 20, s. 17543–17559, kvě. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.198515.
- [5] C. Rodríguez-Antona *et al.*, „Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas“, *Blood*, roč. 110, č. 9, s. 3345–3351, lis. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-02-075036.
- [6] A. Özkan *et al.*, „Tumor Microenvironment Alters Chemoresistance of Hepatocellular Carcinoma Through CYP3A4 Metabolic Activity“, *Front. Oncol.*, roč. 11, čer. 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.662135.
- [7] A. M. McDonnell a C. H. Dang, „Basic Review of the Cytochrome P450 System“, *J. Adv. Pract. Oncol.*, roč. 4, č. 4, s. 263–268, 2013.
- [8] M. Klingenberg, „Pigments of rat liver microsomes“, *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 75, č. 2, s. 376–386, čer. 1958, doi: 10.1016/0003-9861(58)90436-3.
- [9] T. Omura a R. Sato, „A new cytochrome in liver microsomes“, *J. Biol. Chem.*, roč. 237, s. 1375–1376, dub. 1962.
- [10] D. R. Nelson, „The Cytochrome P450 Homepage“, *Hum. Genomics*, roč. 4, č. 1, s. 59, říj. 2009, doi: 10.1186/1479-7364-4-1-59.
- [11] F. P. Guengerich, „Human Cytochrome P450 Enzymes“, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, P. R. Ortiz de Montellano, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 523–785. doi: 10.1007/978-3-319-12108-6\_9.
- [12] J. C. Fogleman a P. B. Danielson, „Analysis of fragment homology among DNA sequences from cytochrome P450 families 4 and 6“, *Genetica*, roč. 110, č. 3, s. 257–265, pro. 2000, doi: 10.1023/A:1012762313991.
- [13] M. Zhao *et al.*, „Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans“, *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 22, č. 23, s. 12808, lis. 2021, doi: 10.3390/ijms222312808.
- [14] M. Stiborova, I. Hudecek, P. Hodek, a E. Frei, „Cytochromes P450 and Human Health“, *Chem. Listy*, roč. 93, č. 4, Art. č. 4, kvě. 1999, Viděno: 1. březen 2025. [Online]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2624>
- [15] F. P. Guengerich, M. R. Waterman, a M. Egli, „Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function“, *Trends Pharmacol. Sci.*, roč. 37, č. 8, s. 625–640, srp. 2016, doi: 10.1016/j.tips.2016.05.006.
- [16] S. Rendic a F. P. Guengerich, „Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals“, *Chem. Res. Toxicol.*, roč. 28, č. 1, s. 38–42, led. 2015, doi: 10.1021/tx500444e.
- [17] U. M. Zanger a M. Schwab, „Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation“, *Pharmacol. Ther.*, roč. 138, č. 1, s. 103–141, dub. 2013, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

- [18] F. P. Guengerich, „Cytochrome P450 and Chemical Toxicology", *Chem. Res. Toxicol.*, roč. 21, č. 1, s. 70–83, led. 2008, doi: 10.1021/tx700079z.
- [19] C. T. Armstrong, D. W. Watkins, a J. L. R. Anderson, „Constructing manmade enzymes for oxygen activation", *Dalton Trans.*, roč. 42, č. 9, s. 3136–3150, úno. 2013, doi: 10.1039/C2DT32010J.
- [20] C. M. Krest *et al.*, „Reactive Intermediates in Cytochrome P450 Catalysis\*", *J. Biol. Chem.*, roč. 288, č. 24, s. 17074–17081, čer. 2013, doi: 10.1074/jbc.R113.473108.
- [21] W. R. Brian, M. A. Sari, M. Iwasaki, T. Shimada, L. S. Kaminsky, a F. P. Guengerich, „Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochemistry*, roč. 29, č. 51, s. 11280–11292, pro. 1990, doi: 10.1021/bi00503a018.
- [22] K. Klein a U. M. Zanger, „Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem", *Front. Genet.*, roč. 4, s. 12, úno. 2013, doi: 10.3389/fgene.2013.00012.
- [23] A. Grangeon, V. Clermont, A. Barama, F. Gaudette, J. Turgeon, a V. Michaud, „Determination of CYP450 Expression Levels in the Human Small Intestine by Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 22, č. 23, s. 12791, lis. 2021, doi: 10.3390/ijms222312791.
- [24] Z. Enlo-Scott, E. Bäckström, I. Mudway, a B. Forbes, „Drug metabolism in the lungs: opportunities for optimising inhaled medicines", *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, roč. 17, č. 5, s. 611–625, kvě. 2021, doi: 10.1080/17425255.2021.1908262.
- [25] C. S. Ferguson a R. F. Tyndale, „Cytochromes P450 in the brain: Emerging evidence for biological significance", *Trends Pharmacol. Sci.*, roč. 32, č. 12, s. 708–714, pro. 2011, doi: 10.1016/j.tips.2011.08.005.
- [26] R. Canaparo *et al.*, „Expression of Cyp3a Isoforms and P-Glycoprotein in Human Stomach, Jejunum and Ileum", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, roč. 34, č. 11, s. 1138–1144, 2007, doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04691.x.
- [27] D. Lacroix, M. Sonnier, A. Moncion, G. Cheron, a T. Cresteil, „Expression of CYP3A in the Human Liver — Evidence that the Shift between CYP3A7 and CYP3A4 Occurs Immediately After Birth", *Eur. J. Biochem.*, roč. 247, č. 2, s. 625–634, 1997, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00625.x.
- [28] L. S. Klyushova, M. L. Perepechaeva, a A. Y. Grishanova, „The Role of CYP3A in Health and Disease", *Biomedicines*, roč. 10, č. 11, s. 2686, říj. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10112686.
- [29] K. Gellner *et al.*, „Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene", *Pharmacogenet. Genomics*, roč. 11, č. 2, s. 111, bře. 2001.
- [30] Y. Zhang *et al.*, „CYP3A4 and CYP3A5: the crucial roles in clinical drug metabolism and the significant implications of genetic polymorphisms", *PeerJ*, roč. 12, s. e18636, pro. 2024, doi: 10.7717/peerj.18636.
- [31] M. Vander Schaaf *et al.*, „CYP3A4 drug metabolism considerations in pediatric pharmacotherapy", *Med. Chem. Res.*, roč. 33, č. 12, s. 2221–2235, pro. 2024, doi: 10.1007/s00044-024-03360-7.
- [32] V. Özdemir *et al.*, „Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method", *Pharmacogenet. Genomics*, roč. 10, č. 5, s. 373, čvc. 2000.
- [33] „PharmVar". Viděno: 12. březen 2025. [Online]. Dostupné z: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>
- [34] D. G. Bailey, G. Dresser, a J. M. O. Arnold, „Grapefruit–medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences?", *CMAJ Can. Med. Assoc. J.*, roč. 185, č. 4, s. 309–316, bře. 2013, doi: 10.1503/cmaj.120951.
- [35] T. Hendrychová *et al.*, „Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: Molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, roč. 1814, č. 1, s. 58–68, led. 2011, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.07.017.

- [36] K. Ohkura, Y. Kawaguchi, Y. Watanabe, Y. Masubuchi, Y. Shinohara, a H. Hori, „Flexible Structure of Cytochrome P450: Promiscuity of Ligand Binding in The CYP3A4 Heme Pocket", *Anticancer Res.*, roč. 29, č. 3, s. 935–942, bře. 2009.
- [37] M. Hendlich, F. Rippmann, a G. Barnickel, „LIGSITE: automatic and efficient detection of potential small molecule-binding sites in proteins", *J. Mol. Graph. Model.*, roč. 15, č. 6, s. 359–363, pro. 1997, doi: 10.1016/S1093-3263(98)00002-3.
- [38] R. Thakur a J. Shankar, „Strategies for Gene Expression in Prokaryotic and Eukaryotic System", in *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes*, V. C. Kalia a A. K. Saini, Ed., Singapore: Springer, 2017, s. 223–247. doi: 10.1007/978-981-10-5511-9\_11.
- [39] A. Schütz *et al.*, „A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production", *STAR Protoc.*, roč. 4, č. 4, s. 102572, pro. 2023, doi: 10.1016/j.xpro.2023.102572.
- [40] G. R. M. Kleiner-Grote, J. M. Risse, a K. Friehs, „Secretion of recombinant proteins from *E. coli*", *Eng. Life Sci.*, roč. 18, č. 8, s. 532–550, dub. 2018, doi: 10.1002/elsc.201700200.
- [41] E. García-Fruitós, „Lactic acid bacteria: a promising alternative for recombinant protein production", *Microb. Cell Factories*, roč. 11, s. 157, pro. 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-157.
- [42] C. M. Jørgensen, A. Vrang, a S. M. Madsen, „Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system", *FEMS Microbiol. Lett.*, roč. 351, č. 2, s. 170–178, úno. 2014, doi: 10.1111/1574-6968.12351.
- [43] R. Chen, „Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond", *Biotechnol. Adv.*, roč. 30, č. 5, s. 1102–1107, zář. 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.
- [44] A. Kesidis *et al.*, „Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts", *Methods*, roč. 180, s. 3–18, srp. 2020, doi: 10.1016/j.ymeth.2020.06.006.
- [45] K. Schroer, M. Kittelmann, a S. Lütz, „Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis", *Biotechnol. Bioeng.*, roč. 106, č. 5, s. 699–706, 2010, doi: 10.1002/bit.22775.
- [46] S. Macauley-Patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil, a L. M. Harvey, „Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system", *Yeast*, roč. 22, č. 4, s. 249–270, 2005, doi: 10.1002/yea.1208.
- [47] P. Patra, M. Das, P. Kundu, a A. Ghosh, „Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts", *Biotechnol. Adv.*, roč. 47, s. 107695, bře. 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107695.
- [48] T. FRIEDBERG *et al.*, „Merits and Limitations of Recombinant Models for the Study of Human P450-Mediated Drug Metabolism and Toxicity: An Intralaboratory Comparison", *Drug Metab. Rev.*, roč. 31, č. 2, s. 523–544, led. 1999, doi: 10.1081/DMR-100101934.
- [49] J. Cheng *et al.*, „Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s in vitro", *Protein Expr. Purif.*, roč. 47, č. 2, s. 467–476, čer. 2006, doi: 10.1016/j.pep.2005.11.022.
- [50] G. Vergères, K. H. Winterhalter, a C. Richter, „Localization of the N-terminal methionine of rat liver cytochrome P-450 in the lumen of the endoplasmic reticulum", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, roč. 1063, č. 2, s. 235–241, dub. 1991, doi: 10.1016/0005-2736(91)90376-J.
- [51] T. Shang, C. M. Fang, C. E. Ong, a Y. Pan, „Heterologous Expression of Recombinant Human Cytochrome P450 (CYP) in *Escherichia coli*: N-Terminal Modification, Expression, Isolation, Purification, and Reconstitution", *BioTech*, roč. 12, č. 1, Art. č. 1, bře. 2023, doi: 10.3390/biotech12010017.
- [52] M. P. Pritchard *et al.*, „A General Strategy for the Expression of Recombinant Human Cytochrome P450s in *Escherichia coli* Using Bacterial Signal Peptides: Expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1", *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 345, č. 2, s. 342–354, zář. 1997, doi: 10.1006/abbi.1997.0265.

- [53] Y. C. Li a J. Y. Chiang, „The expression of a catalytically active cholesterol 7 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in *Escherichia coli*“, *J. Biol. Chem.*, roč. 266, č. 29, s. 19186–19191, říj. 1991.
- [54] Y. Pan, B. A. Abd-Rashid, Z. Ismail, R. Ismail, J. W. Mak, a C. E. Ong, „Heterologous Expression of Human Cytochromes P450 2D6 and CYP3A4 in *Escherichia coli* and Their Functional Characterization“, *Protein J.*, roč. 30, č. 8, s. 581–591, pro. 2011, doi: 10.1007/s10930-011-9365-6.
- [55] E. M. J. Gillam, T. Baba, B. R. Kim, S. Ohmori, a F. P. Guengerich, „Expression of Modified Human Cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and Purification and Reconstitution of the Enzyme“, *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 305, č. 1, s. 123–131, srp. 1993, doi: 10.1006/abbi.1993.1401.
- [56] S. Zelasko, A. Palaria, a A. Das, „Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems“, *Protein Expr. Purif.*, roč. 92, č. 1, s. 77–87, lis. 2013, doi: 10.1016/j.pep.2013.07.017.
- [57] A. Parikh, E. M. J. Gillam, a F. P. Guengerich, „Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450“, *Nat. Biotechnol.*, roč. 15, č. 8, s. 784–788, srp. 1997, doi: 10.1038/nbt0897-784.
- [58] N. Kagawa a Q. Cao, „Osmotic Stress Induced by Carbohydrates Enhances Expression of Foreign Proteins in *Escherichia coli*“, *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 393, č. 2, s. 290–296, zář. 2001, doi: 10.1006/abbi.2001.2516.
- [59] T. Omura a R. Sato, „THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE“, *J. Biol. Chem.*, roč. 239, s. 2370–2378, čvc. 1964.
- [60] T. Omura a R. Sato, „The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. SOLUBILIZATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES“, *J. Biol. Chem.*, roč. 239, č. 7, s. 2379–2385, čvc. 1964, doi: 10.1016/S0021-9258(20)82245-5.
- [61] V. Massey, „The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c“, *Biochim. Biophys. Acta*, roč. 34, s. 255–256, led. 1959, doi: 10.1016/0006-3002(59)90259-8.
- [62] *GelAnalyzer 23.1.1 (dostupné na adrese [www.gelalyzer.com](http://www.gelalyzer.com)) od Istvan Lazar Jr., PhD a Istvan Lazar Sr., PhD, CSc.*
- [63] J. A. R. Blake *et al.*, „Coexpression of a human P450 (CYP3A4) and P450 reductase generates a highly functional monooxygenase system in *Escherichia coli*“, *FEBS Lett.*, roč. 397, č. 2–3, s. 210–214, 1996, doi: 10.1016/S0014-5793(96)01196-9.