

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Martina Mazurová

Heterologní exprese lidské NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Heterologous expression of human NADPH:cytochrome P450 reductase

Bakalářská práce

školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2011

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 2. 6. 2011

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat svému školiteli, RNDr. Václavu Martínkovi, PhD., za kvalitní vedení, všechny rady a pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za nejen finanční podporu v průběhu mého studia.

Abstrakt

Se studiem karcinogeneze přímo souvisí studium metabolismu xenobiotik, neboť ta se mohou na vzniku rakoviny podílet. Systém monooxygenas se smíšenou funkcí, který se na odbourávání cizorodých látek významně podílí, je v laboratoři, v níž byla práce prováděna, studován především pomocí experimentů *in vitro*. Pro získání potřebných rekombinantních enzymů se v současnosti hojně využívá metoda heterologní exprese.

V této práci byla tato metoda použita pro přípravu lidské NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, membránového enzymu, který redukuje cytochrom P450 a tím umožňuje jeho katalytickou aktivitu.

Byly připraveny a ověřeny vektory, nesoucí syntetický gen pro lidskou NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu, založené na plasmidech pUC19 a pET22b. Reduktasa byla produkována v buňkách *E. coli* BL21-Gold a *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL. Celková produkce proteinu v buňkách byla vysoká, problémem však bylo, že vznikající protein byl přítomen převážně v inkluzních tělískách. Byly částečně optimalizovány podmínky exprese tak, aby zvětšil podíl nativního proteinu v bakteriální membránové frakci.

Klíčová slova: NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, heterologní exprese, xenobiochemie

Abstract

Study of carcinogenesis is associated with study of xenobiotics metabolism, which is topic studied in our laboratory. Mixed-function oxygenase system (MFO system) is significantly contributing to the metabolism of xenobiotics. Pure recombinant proteins participating in MFO system are frequently utilized in *in vitro* metabolic experiments. The heterologous expression method is often used to obtain the pure recombinant enzymes.

Heterologous expression was employed to prepare human NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. This membrane enzyme reduces cytochrome P450 and enables its catalytic activity.

Vectors with synthetic gene for human NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase based on pUC19 and pET22b plasmids were prepared and verified. Recombinant protein was produced in *E. coli* BL21-Gold and *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL cells. Both cell strains produced high levels of the protein; however the major part of the protein was present predominantly in inclusion bodies. Expression conditions were therefore optimized to obtain higher yields of native protein bound in bacterial membrane fraction.

[In Czech]

Key words: NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase, heterologous expression, xenobiochemistry

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Biotransformace xenobiotik	1
1.2. Oxygenasy se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“)	2
1.3. Cytochrom P450	4
1.4. NADPH:cytochrom P450 reduktasa	5
1.5. Heterologní exprese	10
2. Cíle	12
3. Materiál a metody	13
3.1. Přístroje	13
3.2. Materiál	13
3.3. Metody	15
3.3.1. Ředění plasmidu	15
3.3.2. Příprava agarových ploten	15
3.3.3. Transformace kompetentních buněk plasmidem	15
3.3.4. Kultivace transformovaných buněk – metoda „single-cell colony“	15
3.3.5. Minipreparace DNA	16
3.3.6. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami Eco RI a Hind III	16
3.3.7. Agarosová elektroforesa	17
3.3.8. Midipreparace DNA	17
3.3.9. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami Nde I a Xho I	18
3.3.10. Izolace DNA z agarosového gelu	18
3.3.11. Ligace	19
3.3.12. Maxipreparace DNA	19
3.3.13. Spektroskopické stanovení DNA	20
3.3.14. Testovací exprese	20
3.3.15. SDS elektroforesa ve vertikálním uspořádání	21

3.3.16. Produkce proteinu.....	22
3.3.17. Zpracování buněk a izolace membránové frakce	22
3.3.18. Solubilizace membránové frakce	23
4. Výsledky.....	24
4.1. Namnožení klonovacího plasmidu	24
4.2. Příprava expresního plasmidu	25
4.3. Transformace expresních buněk a testovací exprese	27
4.4. Exprese hCPR při různých podmínkách a izolace membránové frakce.....	28
4.5. Solubilizace membránové frakce	33
5. Diskuse	36
6. Závěr.....	38
7. Seznam použité literatury	39

Seznam zkratek

2', 5' -ADP	2', 5'-adenosindifosfát
Asp	kyselina asparagová
A _{xxx}	absorbance při vlnové délce xxx nm
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
CPR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
CYP	cytochrom P450
Cys	cystein
Da	Dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-911	Emulgen 911
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadeninmononukleotid
hCPR	lidská NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
LB medium	lysogeny broth medium (často též Luria-Broth)
MFO systém	systém oxygenas se smíšenou funkcí
mQ voda	vysoce deionizovaná voda
mRNA	mediátorová („messenger“) ribonukleová kyselina
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NOS	NO synthasa
OD ₆₀₀	optická densita při vlnové délce 600 nm
reduktasa	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (není-li uvedeno jinak)
RNasa	ribonukleasa

rpm	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	serin
TAE pufr	pufr obsahující tris, acetát a EDTA
TBE pufr	pufr obsahující tris, borát a EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
Trp	tryptofan
v/v	objemový zlomek látky v roztoku, „volume/volume“
w/v	zlomek látky v roztoku, hmotnost rozpuštěné látky/objem roztoku, „weight/volume“

1. Úvod

Již od prvního vyrobeného nástroje přetváří lidstvo svět k obrazu svému, toto přetváření mu však není vždy ku prospěchu. Od průmyslové revoluce výrazně stoupá míra znečištění životního prostředí, což s sebou nese neblahé důsledky pro lidské zdraví. Náš organismus přijímá zvýšené množství cizorodých látek, xenobiotik, a snaží se s nimi vypořádat, proto je metabolizuje a následně vylučuje. Metabolismus však může mít na organismus i negativní dopad, neboť některá xenobiotika se tím stanou mnohem reaktivnějšími a z hlediska toxicity také nebezpečnějšími [1].

Typickým příkladem jsou chemické karcinogeny, které se buď přímo, ale častěji právě po metabolické aktivaci naváží na DNA a vytvářejí s ní kovalentní adukty. Nejsou-li tyto kovalentní modifikace DNA opraveny, dochází ke vzniku mutací v DNA, jež následně mohou vést až k propuknutí rakoviny. Z celosvětového počtu úmrtí připadalo v roce 2004 na nádorová onemocnění 11,8 % u žen a 13,4 % u mužů, a tím představovala 3. nejčastější příčinu [2].

1.1. Biotransformace xenobiotik

Smyslem biotransformace xenobiotik je zvýšit hydrofilitu látky a usnadnit tak její vyloučení z organismu, což probíhá ve dvou fázích [3].

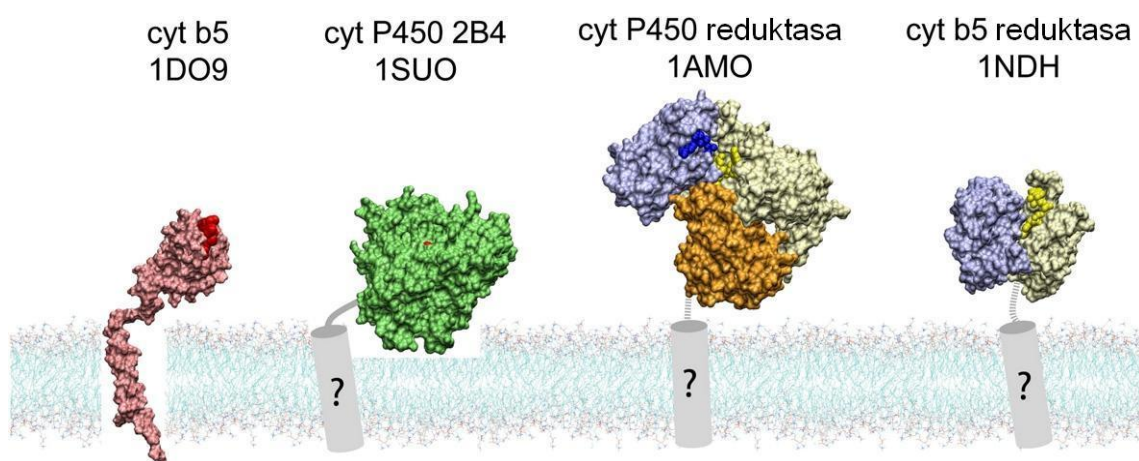
- I. fáze – obvykle oxidace nebo jiná modifikace, na látku je vnesena nebo je demaskována funkční skupina zvyšující její polaritu.
- II. fáze – konjugace metabolizované látky s endogenní polární molekulou (např. kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem), produkt konjugace je polárnější a má vyšší molekulovou hmotnost.

První fáze je významná z hlediska toxicity, ne vždy totiž příslušná modifikace sníží „nebezpečnost“ dané látky, naopak některé produkty jsou reaktivnější než původní látka – mluvíme o tzv. bioaktivaci [4]. Přítomnost xenobiotika navíc často vyvolá zvýšení aktivity enzymů zodpovědných za metabolismus cizorodých látek.

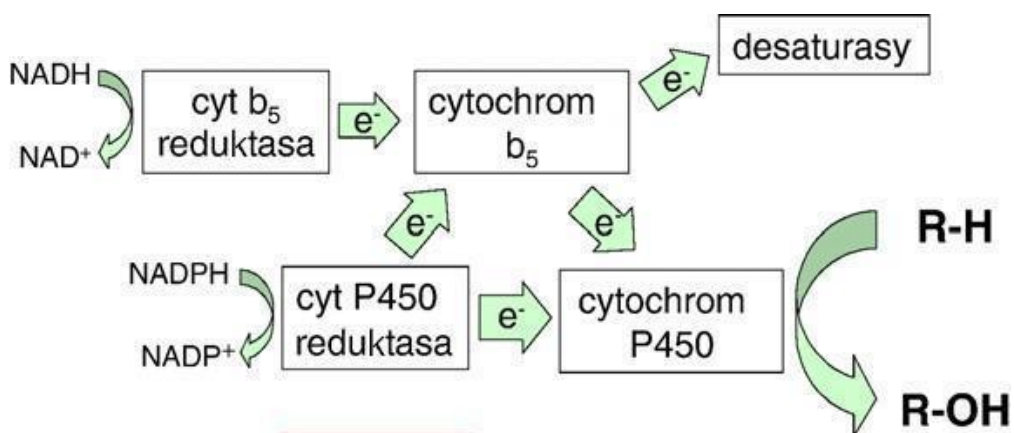
Na první fázi biotransformace se významně podílí tzv. MFO systém, tedy systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO = „mixed-function oxygenase“).

1.2. Oxygenasy se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“)

MFO systém je skupina proteinů, které řetězovitě přenášejí elektrony z NADPH či NADH na cytochrom P450, který posléze oxiduje vlastní substrát; tím může být xenobiotikum, ale i látka organismu vlastní (například při syntéze cholesterolu či metabolismu mastných kyselin) [5]. Do této skupiny patří NADPH:cytochrom P450 reductasa, NADH:cytochrom b5 reductasa, cytochrom b5 a cytochrom P450. Všechny uvedené enzymy a přenašeče jsou u eukaryot lokalizovány v membráně endoplasmatického retikula, membránové prostředí také vyžadují pro umožnění vzájemných interakcí (Obrázek 1). Přenos elektronů „směřuje“ od obou reduktas k cytochromu P450, schematicky je znázorněn na obrázku (Obrázek 2). Cytochromy P450 a b5 se v endoplasmatickém retikulu nacházejí v přibližně stejném množství, cytochrom P450 reductasy je zde 10krát méně [6].

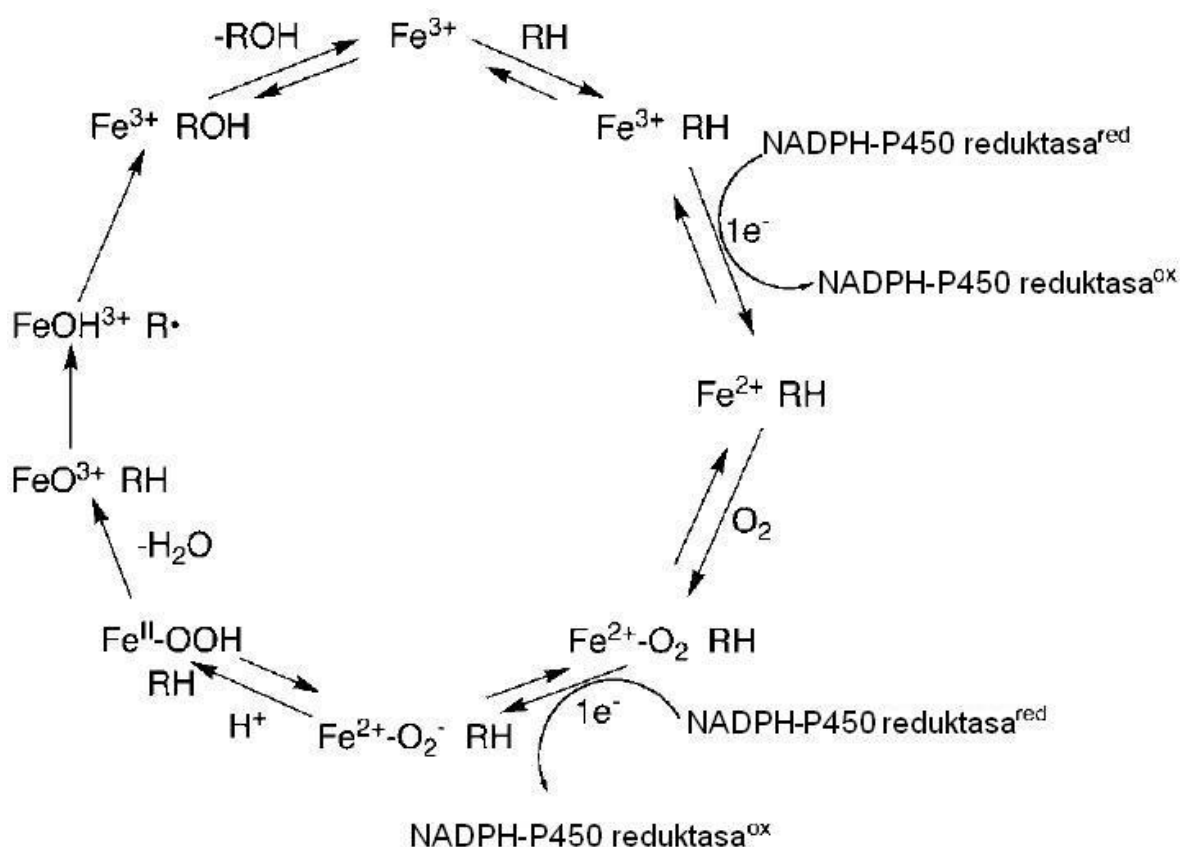


Obrázek 1: Model struktur cytochromu b₅, cytochromu P450 a jejich reduktas. Obrázek také ukazuje pravděpodobnou orientaci těchto proteinů v membráně. Upraveno dle [6]



Obrázek 2: Schematické znázornění interakcí a směru přenosu elektronů v rámci MFO systému. Upraveno dle [6].

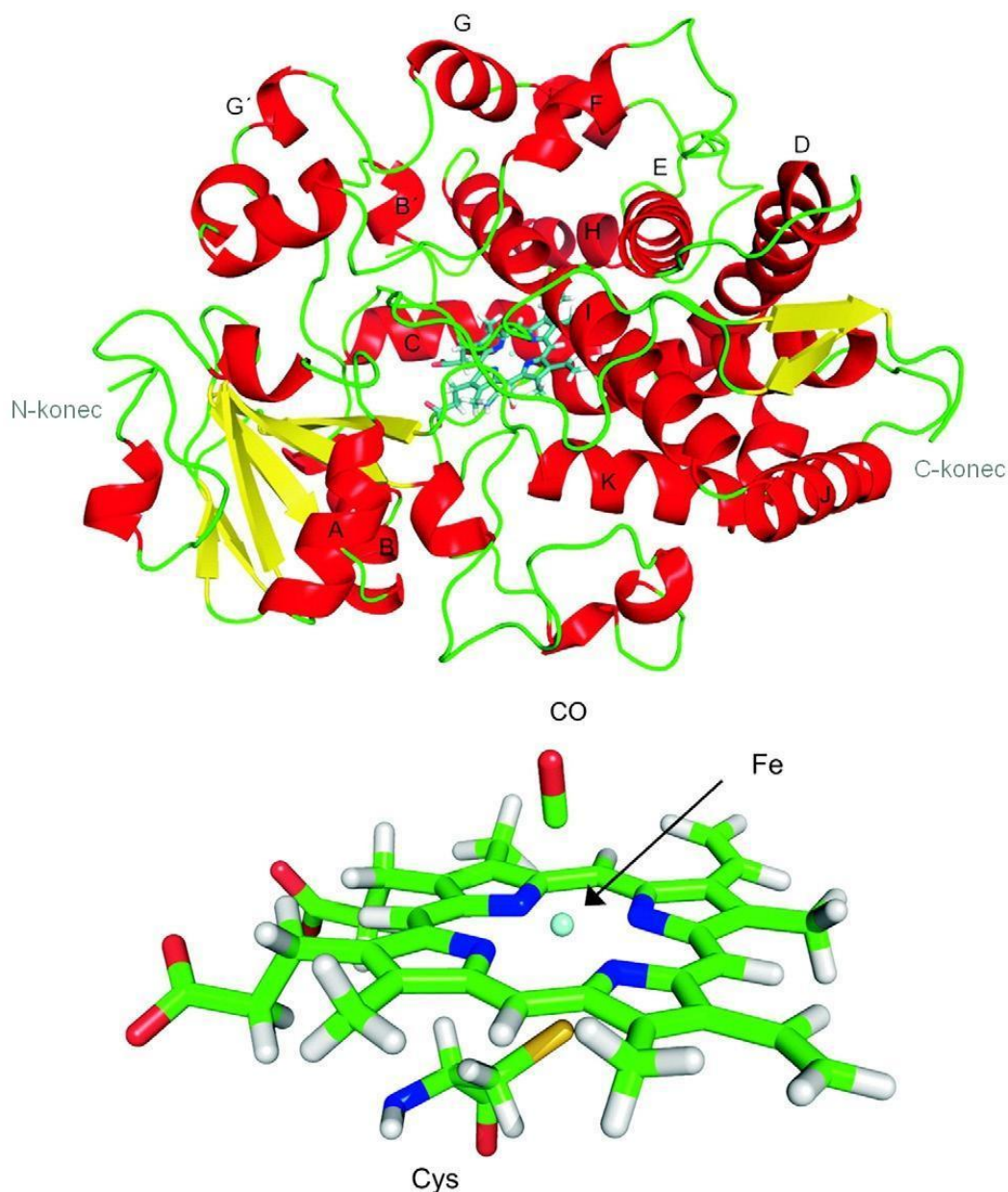
Oxidasy se smíšenou funkcí (též monooxygenasy) katalyzují oxidaci substrátu molekulárním kyslíkem začleněním jednoho atomu do substrátu za současné redukce druhého atomu na molekulu vody. Průběh je následující: substrát se naváže na cytochrom P450, jehož atom železa je v oxidačním stavu 3+. Poté dojde k jednoelektronové redukci pomocí elektronu přeneseného z NADPH prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 reduktasy na hem, což způsobí změnu oxidačního stavu železa na 2+. Tento komplex reaguje s molekulou kyslíku a vzniká komplex O_2-Fe^{2+} -substrát. V tuto chvíli dojde k redukci dalším elektronem, který může být přenesen buď NADPH-cytochrom P450 reduktasou, nebo cytochromem b_5 . Ve dvakrát redukované soustavě jsou následně atomy přeuspořádány, jeden atom kyslíku se váže na substrát a druhý vytváří molekulu vody. Po disociaci komplexu vzniká cytochrom P450 ve výchozím stavu, oxidovaný substrát a molekula vody. Schematicky je celý proces nakreslen na obrázku (Obrázek 3).



Obrázek 3: Základní cyklus katalyzovaný MFO systémem. RH značí neoxidovaný substrát.
Upraveno z [7].

1.3. Cytochrom P450

Cytochromy P450 představují terminální oxidasu MFO systému, oxidují nejrůznější látky, například léky, karcinogeny, látky znečišťující životní prostředí obecně. (Kromě toho oxidují i endogenní metabolity.) Všechny cytochromy P450 mají podobnou strukturu s konzervovanými α -helixy, označovanými A-L (viz Obrázek 4). Helixy I a L jsou v kontaktu s hemem, helixy B, F a I jsou v kontaktu se substrátem. Další konservovanou strukturou je oblast kolem cysteinu, který je koordinován na železo v hemu [8].



Obrázek 4: Struktura cytochromu P450. Nahoře: Prostorové uspořádání cytochromu P450 (zde 3A4), jednotlivé α -helixy jsou označeny písmeny. Hem je vyznačen tyčinkovým modelem. Dole: Struktura hemu, atom železa je koordinován na molekulu CO a cystein a vázán na protoporphyrin IX. Upraveno dle [9]

Název cytochrom P450 v sobě zahrnuje hned několik vlastností tohoto proteinu. Cytochromem byl nazván pro podobné vlastnosti, jaké má cytochrom b₅, P je zkratka pro pigment a 450 je vlnová délka absorpčního maxima diferenčního spektra komplexu redukovaného cytochromu P450 po přidání CO [10].

Cytochromy P450 se vyskytují v mnoha isoformách. V lidském genomu bylo nalezeno 57 potenciálně funkčních genů pro tyto isoformy [11]. Jednotlivé isoformy mají stejnou funkci a liší se v substrátové specifitě, přičemž některé oxidují jen úzkou skupinu látek, jiné mají „pole působnosti“ širší (obvykle isoformy podílející se na oxidaci xenobiotik). Některé isoformy se podílejí i na biosyntéze sterolů, mastných kyselin a jiných látek běžně se vyskytujících v organismu. Řízenou evolucí lze získat nové isoformy s jinou substrátovou specifitou, které by bylo možné využít průmyslově [12].

Za významnou funkci cytochromů P450 je považován jejich podíl na odbourávání xenobiotik. Cytochromy P450 se hojně vyskytují v játrech, kde jsou proto xenobiotika hydroxylována a tím je zvyšována jejich hydrofilita. Zastoupení jednotlivých isoform se u různých jedinců liší, proto se také liší reakce jednotlivců například na podaný lék (nebo jiná xenobiotika). Této skutečnosti by bylo možné v budoucnosti běžně využívat při výběru léků pro konkrétního pacienta [13][14].

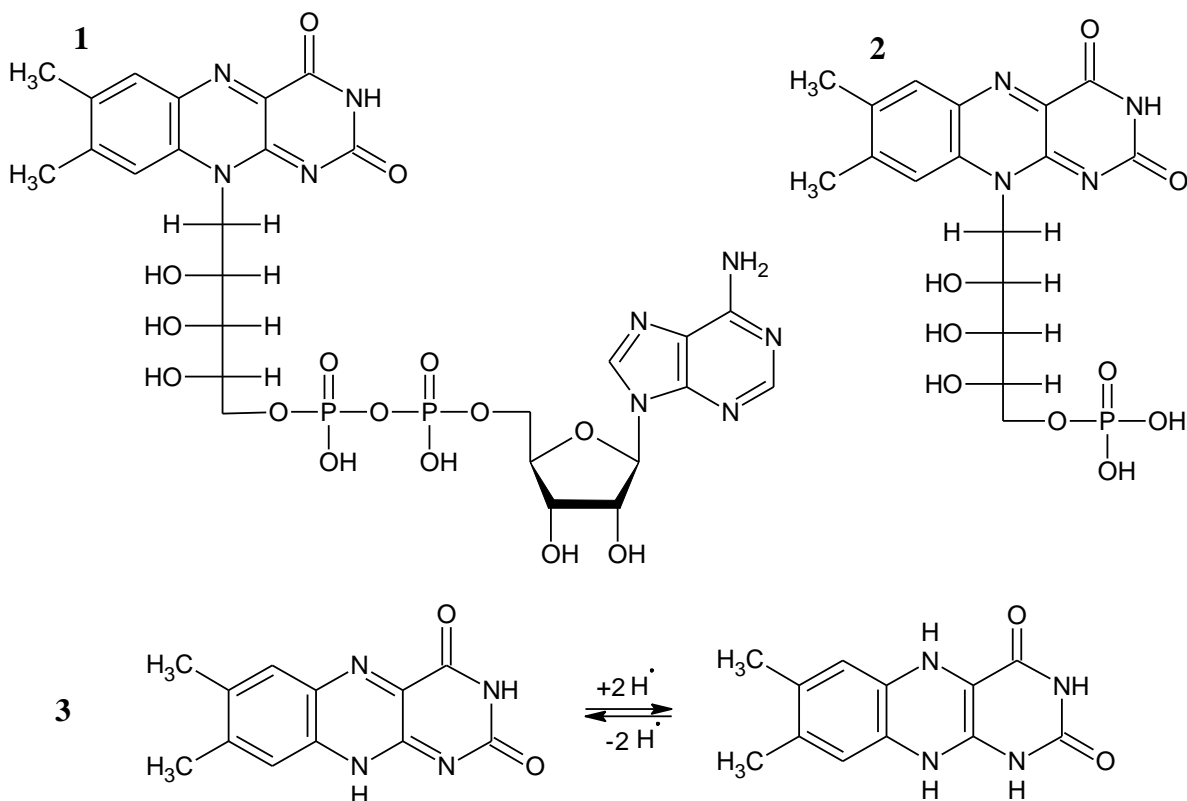
Cytochromy P450 využívají jako zdroj redukčních ekvivalentů NADPH:cytochrom P450 reduktasu nebo jiný donorový systém. Interakce cytochromů P450 s elektronovým donorem je nezbytnou podmínkou jejich katalytické aktivity [15].

Navzdory velkému množství isoform cytochromu P450 existuje pouze jedna forma reduktasy, proto se předpokládá, že vazebné místo pro reduktasu je ve všech isoformách stejné nebo velmi podobné. Za rozpoznání vazebného místa a správnou vzájemnou orientaci obou proteinů jsou zodpovědné solné můstky. Některé mikrosomální cytochromy P450 mohou druhý elektron přijmout také od cytochromu b₅ [15].

1.4. NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Enzym NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR) (EC 1.6.2.4) je flavinový protein o velikosti 78 kDa obsahující dva kofaktory – FMN a FAD (Obrázek 5). Oba tyto kofaktory obsahují isoalloxazinový kruh, který může reverzibilně redukován jedním či dvěma elektrony. V závislosti na redoxním stavu molekuly se mění absorpční maximum,

čehož je možné využít při spektrofotometrickém sledování průběhu reakce. Flavinové kofaktory jsou ve většině proteinů pevně vázány k proteinu, v některých případech (sukcinát dehydrogenasa) dokonce kovalentně [16].



Obrázek 5: Flavinové kofaktory. 1 – FAD, 2 – FMN (obojí v oxidované formě), 3 – oxidovaná a redukováná forma isoalloxazinu.

Funkcí reduktasy je přenos elektronů z NADPH na cytochrom P450 (CYP), je však schopna redukovat i jiné proteiny, například cytochrom c, cytochrom b₅ nebo systém metabolizující řetězce mastných kyselin. Přenos elektronů probíhá z NADPH na FAD, poté na FMN a následně na CYP (nebo jiný substrát).

CPR je membránový protein, nachází se na cytoplasmatické straně membrány endoplasmatického retikula a v membráně je uchycen N-terminální hydrofobní kotvou o velikosti 6 kDa. Při strukturálních analýzách bývá kotva obvykle odstraněna, takto modifikovaný enzym však již nedokáže na cytochrom P450 přenést elektrony [17].

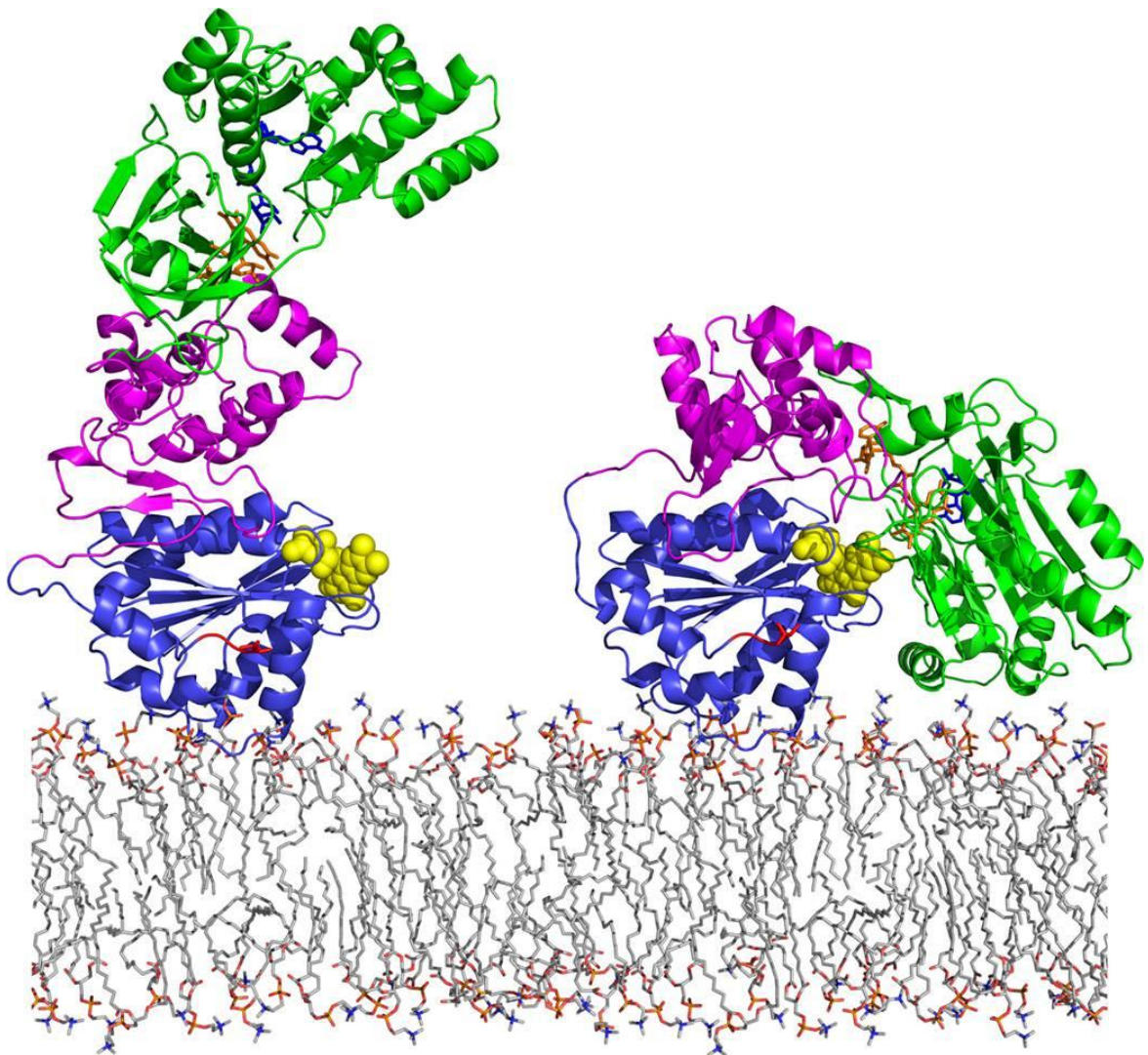
Krystalograficky získaná struktura CPR (po odstranění hydrofobní membránové kotvy) ukazuje tři oddělené domény, kterými je enzym tvořen. Nejbližší membránové kotvě (na N-konci) se nachází doména vázající FMN. Ta je pomocí 15 aminokyselin dlouhé vysoce flexibilní domény („hinge“) spojena s propojovací doménou („linker domain“), za

níž následuje FAD a NADPH vázající doména. Celý enzym je stočen tak, že doména vázající FMN se nachází vedle domény vázající FAD a NADPH (Obrázek 6 vpravo). Toto uspořádání umožňuje velké přiblížení koenzymů FAD a FMN, nutné pro úspěšný přenos elektronů, minimální vzdálenost mezi isoalloxazinovými kruhy činí 4 Å [17]. Předpokládá se, že propojovací doména kontroluje vzájemnou pozici obou koenzymů a to pomocí elektrostatických interakcí s FMN doménou. Popsaná „kompaktní“ struktura je výhodná pro přenos elektronů mezi jednotlivými koenzymy [18].

Pomocí NMR analýzy bylo však zjištěno, že reduktasa se musí vyskytovat ještě v jiné konformaci, v níž je FMN doména vystavena působení rozpouštědla. Terciární struktura je přitom pravděpodobně regulována oxidačním stavem reduktasy a vazbou koenzymu NADPH. Reduktasa redukovaná 4 elektrony zaujímá výše popsanou kompaktní strukturu, zatímco oxidovaná forma má tvar spíše podlouhlý (Obrázek 6 vlevo). Dalšími experimenty bylo ukázáno, že podobně ovlivňuje tvar interakce s NADPH, přičemž NADH změnu v konformaci nezpůsobuje, zatímco 2', 5' -ADP ano. Samotná vazba koenzymu nicméně nezpůsobí takovou změnu jako vazba koenzymu společně se změnou redoxního stavu enzymu [19].

Interakce CPR s CYP je podmíněna vzájemným elektrostatickým působením, vazebné místo na CPR obsahuje negativně nabitě zbytky kyseliny asparagové a glutamové, zatímco v okolí hemu se v CYP nacházejí pozitivně nabitě zbytky argininu a lysinu. Vazebná místa cytochromu c, b₅ a P450 na CPR se vzájemně překrývají, nejsou však identická [20]. V průběhu interakce je vzdálenost mezi FMN a hemem menší než 9 Å [17].

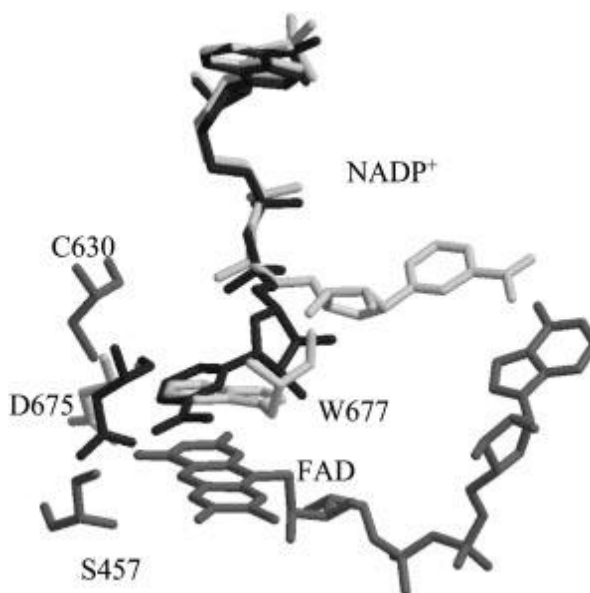
Pro úspěšnou interakci CPR s CYP je nezbytné vystavit FMN rozpouštědlu. Bylo ukázáno, že v otevřené konformaci je tato podmínka splněna, zbývá tedy zjistit, jak se CPR do této konformace dostane. Existují dva modely této změny – kyvný („swinging“) a rotační („rotating“). Kyvný model předpokládá, že doména vázající NADPH a FAD a propojovací doména se vzdálí od membrány, enzym se tím doslova „otevře“ a cytochrom bude mít volný přístup k FMN. Rotační model předpokládá, že doména vázající FMN se horizontálně otočí a tím zpřístupní FMN pro interakci s hemem. Spekuluje se i o možnosti, že se oba modely uplatní současně, tedy že doména vázající NADPH a FAD a propojovací doména se vzdálí od membrány (ale ne tak výrazně, jako v případě čistě kyvného modelu) a současně dojde k rotaci domény vázající FMN [18].



Obrázek 6: Dvě konformace CPR. Vpravo kompaktní forma, při níž dochází k interflavinovému přenosu elektronů, vlevo potom otevřená konformace zodpovědná za oxidaci CYP. Modře je znázorněna doména vázající FMN, fialově propojovací doména a zeleně FAD a NADPH vázající doména. Žlutými kuličkami je znázorněn FMN, oranžovými tyčinkami FAD a modřými tyčinkami NADPH. Převzato z [19]

Při vazbě NADPH na CPR se uplatňují dvě interakce – 2'-fosfát z AMP se váže na pozitivně nabitou část povrchu proteinu a nikotinamid interaguje s isoalloxazinovou částí FAD zanořenou v doméně vázající FAD a NADPH. Vazba NADPH a následné uvolnění NADP^+ jsou regulovány prostřednictvím Trp-677 (v krysí CPR, v lidské reductase mu odpovídá Trp-676), jehož indolový kruh brání navázání nikotinamidového kruhu z NADPH na isoalloxazinový kruh FAD (Obrázek 7). V průběhu přenosu hydridového aniontu jsou oba aromatické kruhy uspořádány paralelně, posléze je však paralelní

struktura narušena, čímž je současně oslabena interakce mezi NADP^+ a FAD a indolový kruh z Trp-677 potom napomáhá disociaci nikotinamidu z jeho vazebného místa [21].

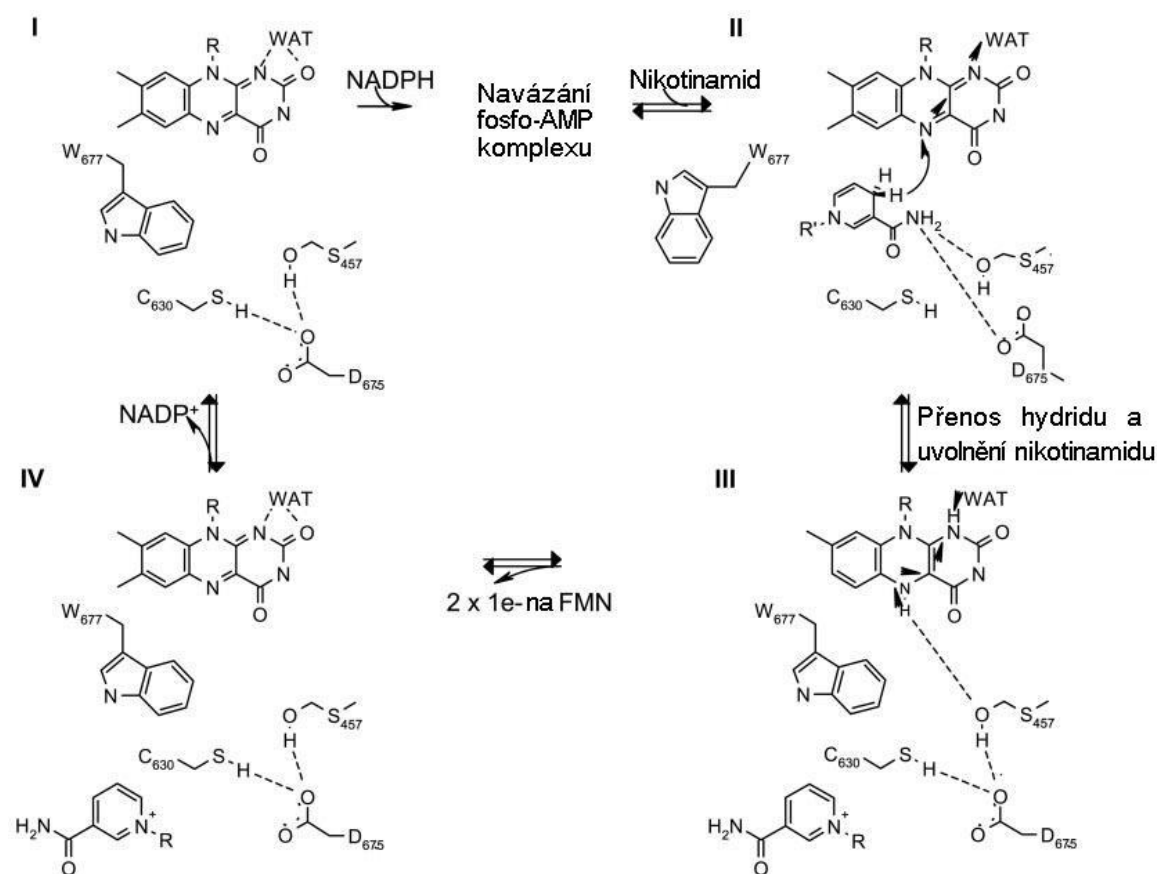


Obrázek 7: Schéma interakce NADPH s FAD kofaktorem CPR. Světle šedou barvou je znázorněna vzájemná pozice v situaci, kdy je interakce nikotinamidu s FAD znemožněna přítomností Trp-677 (W677), černě je znázorněna vzájemná pozice v mutantním proteinu, kde byl Trp-677 odstraněn. Předpokládá se, že podobně vypadá také interakce nikotinamidu s FAD v molekule nemodifikovaného proteinu, tato struktura se však nedaří krystalizovat. V levé části jsou znázorněny další interagující aminokyseliny (cystein, serin a kyselina asparagová). Převzato z [21].

Přenosu hydridu dále napomáhají další aminokyselinové zbytky a to sice Ser-457, Cys-630 a Asp-675. Ser-457 a Asp-675 jsou nejspíše zodpovědné za orientaci NADPH do optimální pozice. Všechny tři zbytky zároveň vytváří síť vodíkových vazeb, která podporuje uvolnění protonu z hydrochinonu/semichinonu. Tato síť je po navázání NADPH porušena, z čehož vyplývá, že nejdříve musí být NADP^+ uvolněn z aktivního místa a teprve potom disociuje proton z N-5 atomu FAD [21] (Obrázek 8).

CPR je příbuzná reduktasové části NO synthasy (NOS). NOS produkuje oxid dusnatý, který se uplatňuje jako signální molekula v procesech vasodilatace a přenosu nervových vzruchů. Oba enzymy své substráty oxidují (NOS oxiduje L-arginin na L-citrulin a NO) a využívají stejné skupiny pro přenos elektronů – NOS obsahuje hem, FAD a FMN (tedy to samé, co CYP a CPR dohromady) a navíc ještě jako kofaktor tetrahydrobiopterin (BH_4). Sekvence flavinové části NOS je nápadně podobná CPR, hemová doména se však cytochromu sekvencí prakticky nepodobá. Přesto má hemová

doména NOS velmi podobné vlastnosti jako CYP a to včetně posunu absorpčního maxima v diferenčním spektru po navázání CO [22].



Obrázek 8: Schéma přenosu hydridového aniontu z NADPH na FAD. (I) Enzym bez NADPH, Trp-677 blokuje vazebné místo. NADPH se váže nejprve přes fosfo-AMP na povrch enzymu, poté do aktivního místa. (II) Trp-677 změnil pozici, NADPH tvoří vodíkové vazby se Ser-457 a Asp-675, čímž je narušena původní síť vodíkových můstků. Přenos hydridu je podpořen pozicí Cys-630. Molekula vody vázaná na N-1 v FAD umožňuje výměnu protonů s rozpouštědlem. (III) po oxidaci NADPH je tento „vystrčen“ z vazebného místa Trp-677. Po uvolnění nikotinamidu je obnovena síť vodíkových vazeb, což umožňuje deprotonaci N-5 na FAD (IV). Upraveno dle [21]

1.5. Heterologní exprese

Heterologní exprese je postup, kterým je možné získat protein například pro krystalografické analýzy, a to obvykle snáze než izolací z živého organismu. Využívá se přitom hostitelský organismus, který není s původním příbuzný, ale dokáže protein exprimovat. Jedním z obvyklých hostitelů je bakterie *Escherichia coli* [23].

Pro vnesení genetické informace do buňky (tzv. transformaci) se využívají plasmidy, krátké kruhové fragmenty DNA, které bakterie běžně využívají pro přenos doplňkové

genetické informace. Bakterie plasmid přijme obvykle v situaci, kdy jí dává nějakou výhodu (například přežít v nepříznivém prostředí) nebo když je ve stresu. Obojího se při transformaci využívá – buňka je vystavena stresu v podobě vápenatých iontů a tepelného šoku [24] a kromě toho plasmid obsahuje geny kódující rezistenci na antibiotikum, v jehož prostředí je buňka následně kultivována. Tato rezistence zároveň plní funkci selekčního markeru, neboť všechny buňky, které přežily, musely plasmid přijmout [24].

Při heterologní expresi se využívají dva druhy plasmidů – klonovací a expresní. Klonovací plasmid slouží k namnožení DNA, expresní plasmid k produkci proteinu. Oba obsahují rezistenci na antibiotika (případně jiný selekční marker) a tzv. restriční místo, což je oblast, kde může být plasmid štěpen a díky tomuto štěpení do něj může být vložen příslušný gen [23]. Expresní plasmid kromě toho obsahuje promotor, od kterého začíná transkripce genu do mRNA [23].

2. Cíle

Primárním cílem předkládané práce bylo ověřit potenciál heterologní exprese pro přípravu nativní formy lidské NADPH:cytochrom P450 reduktasy.

Dílčími cíli pak bylo ověřit dodaný klonovací vektor (pUC19) nesoucí syntetický lidský gen a izolovat jej v množství potřebném pro archivaci i navazující experimenty. Dále pak připravit a verifikovat expresní vektor (založený na pET22b) nesoucí výše zmíněný syntetický gen. Následně najít podmínky vhodné pro heterologní expresi lidské NADPH:cytochrom P450 reduktasy v buňkách *E. coli*.

3. Materiál a metody

3.1. Přístroje

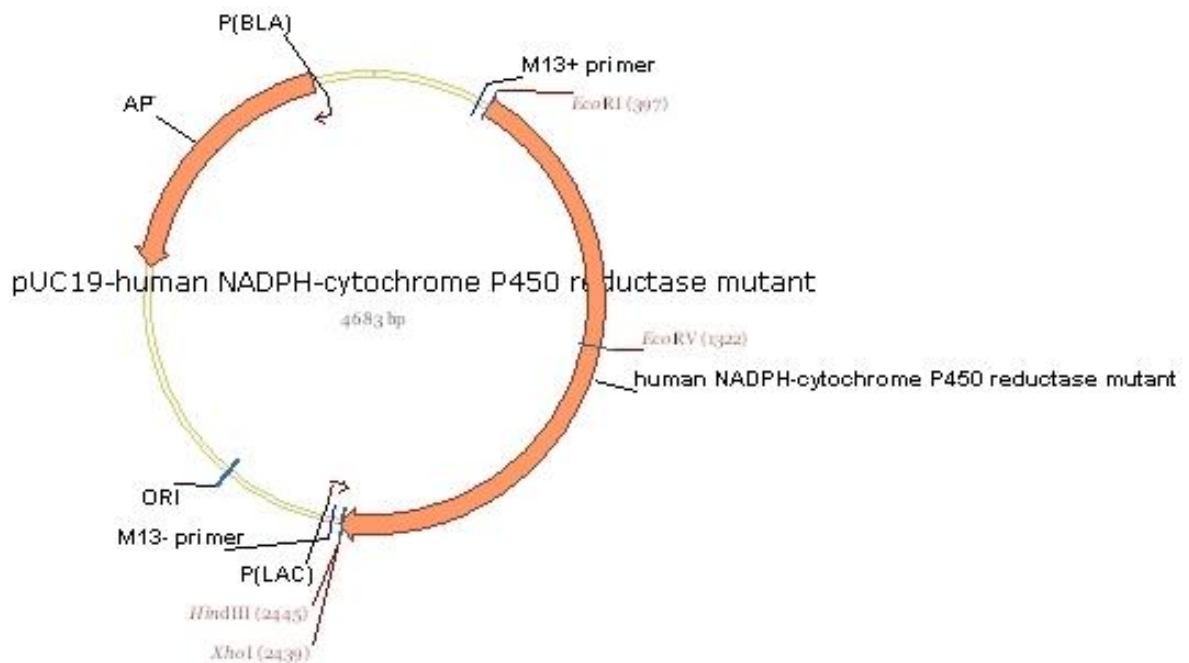
- vodní lázeň Julabo TW2, Biotech
- ohřívač bloků LS1, VLM GmbH
- centrifuga 5415 D/R Eppendorf
- centrifuga Janetzki K70D, MLW
- centrifuga Allegro X-22R, Beckman Coulter
- ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter
- spektrofotometr Spekol 11, CARLZEISS, Jena
- spektrofotometr Diod Array 8453, Hewlett-Packard
- spektrofotometr NanoVue Plus, GE Healthcare
- sběrač frakcí BioLogic BioFrac 2128, BIO RAD
- peristaltická pumpa PP05, Laboratorní přístroje Praha
- elektroforetická aparatura MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec
- elektroforetická aparatura miniVE Vertical, Amersham Biosciences
- zdroj pro elektroforesu EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech
- transluminátor Dark Reader, Clare Chemical Research
- termocykler Tech gene, TECHNE
- ultrazvuková sonda Sonoplus SH 70G, Bandelin
- inkubátor IR1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories
- inkubátor CORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp
- vodní lázeň s třepačkou Typ 1092, Gesellschaft für Laborortechnik mbH
- laminární box BIO 126, Labox
- autokláv Varioklav Dampfsterilisator, H+P Laborortechnik GmbH

3.2. Materiál

Atlas Co.	Emulgen 911
Biomatik	plasmid pUC19 se syntetickým genem pro NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu
Fermentas	IPTG
Geneaid	Plasmid Maxi Kit
Genomed	JET quick – Plasmid Miniprep Spin Kit, JET quick – Gel Extraction Spin Kit
Invitrogen	agarosa, SYBR® Safe DNA gel stain
Lach:ner	isopropanol, kyselina octová, dihydrogenfosforečnan draselný
Lachema	persíran amonný, glycin, bromfenolová modř, EDTA

New England BioLabs	endonukleazy EcoR I (+ pufr), Hind III, Nde I, Xho I, pufr NEB4, BSA, T4 ligasa (+ pufr), 2-Log DNA Ladder, plasmid pET22b
Penta	glycerol
P-Lab	ethanol
Roche Applied Science	směs inhibitorů proteas v tabletách Complete a Complete Mini
Serva	ampicilin, SDS, TEMED, Triton X-100
Sigma	LB medium, LB agar, GenElute™ Plasmid Midiprep Kit, Trizma base, standard molekulových hmotností ColorBurst™, akrylamid, BIS, 2-merkaptoethanol, Coomassie Brilliant Blue R250, riboflavin, DTT, cholát sodný, Brij 35, roztok inhibitorů proteas
Stratagene	buňky <i>E. Coli</i> BL21-Gold a <i>E. Coli</i> BL21-CodonPlus-RIL

Kompetentní buňky *E. Coli* DH5 α poskytl RNDr. Marek Ingr, PhD.



Obrázek 9: Schéma použitého klonovacího plasmidu.

3.3. Metody

3.3.1. Ředění plasmidu

10 µg plasmidu bylo rozpuštěno ve 200 µl sterilní destilované vody. Získaný roztok byl rozdělen na dvě části po 100 µl a obě byly zamrazeny v -80 °C.

3.3.2. Příprava agarových ploten

V chladu uchovávaný sterilní 1% agar v LB mediu byl roztaven v mikrovlnné troubě a potřebné množství (10 až 15 ml agaru na jednu plotnu) bylo odlito do sterilní zkumavky Falcon. Po zchladnutí byl přidán ampicilin tak, aby výsledná koncentrace antibiotika byla 100 µl/ml. Médium s antibiotikem bylo promícháno, rozlito do sterilních Petriho misek a ponecháno při laboratorní teplotě ztuhnout.

3.3.3. Transformace kompetentních buněk plasmidem

Kompetentní buňky byly opatrně rozmrazeny na ledu. Do zkumavky Eppendorf bylo přeneseno 100 µl buněk a přidán 1 µl roztoku plasmidu. Poté byly buňky ponechány 30 min na ledu. Po této době byly vystaveny teplotnímu šoku 42 °C v ohřívači bloků (LS1, VLM GmbH), jehož délka se lišila dle typu transformovaných buněk (DH5α 90 s; Gold a RIL 20 s). Následně byly buňky opět ponechány 2 minuty na ledu, bylo k nim přidáno 300 µl LB media a byly umístěny na hodinu do inkubátoru o teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories). Po uplynutí této doby byla kultura vyseta na agarové plotny s ampicilinem (100 µl/ml) a po zasáknutí byly plotny inkubovány v 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories) přes noc.

Jako kontrola bylo použito 100 µl kompetentních buněk bez přídavku plasmidu.

3.3.4. Kultivace transformovaných buněk – metoda „single-cell colony“

Na agarové plotně s narostlými koloniemi byly vybrány kolonie pravidelného vzhledu, dostatečně vzdálené od okolních. Pomocí sterilního párátko byly buňky z těchto kolonií v laminárním boxu (Bio 126, Labox) přeneseny do sterilních zkumavek Falcon, obsahujících 5 ml LB media s ampicilinem (100 µg/ml). Zkumavky byly umístěny v inkubátoru (vodní lázeň s třepačkou, GFL) při teplotě 37 °C přes noc. Získané kultury byly buď zamrazeny pro další použití, nebo z nich byla provedena minipreparace DNA.

3.3.5. Minipreparace DNA

Minipreparace DNA byla prováděna s použitím komerčního kitu „JET quick – Plasmid Miniprep Spin Kit“ firmy Genomed.

Zkumavky Falcon, obsahující 5 ml přes noc kultivované kultury, byly vyváženy a centrifugovány na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 5 minut. Supernatant byl opatrně odebrán, peleta byla resuspendována v 250 µl roztoku G1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, RNasa) a přenesena do zkumavky Eppendorf. K suspenzi bylo přidáno 250 µl roztoku G2 (200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)), roztok byl opatrně promíchán a po 5 minutách k němu bylo přidáno 350 µl roztoku G3 (obsahuje acetát a guanidin hydrochlorid) a opět promícháno. Směs byla centrifugována na centrifuze Eppendorf 5415 D/R rychlostí 13200 rpm po dobu 10 minut. Iontoměničová kolonka z kitu byla umístěna do sběrné zkumavky a bylo na ni nanášeno 800 µl supernatantu. Soustava byla centrifugována na centrifuze Eppendorf 5415 D/R rychlostí 12000 rpm po dobu 1 minuty. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a na kolonku bylo nanášeno 500 µl roztoku G4 (obsahuje NaCl, EDTA a Tris/HCl). Soustava byla centrifugována na centrifuze Eppendorf 5415 D/R rychlostí 12000 rpm po dobu 1 minuty. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a soustava byla centrifugována na centrifuze Eppendorf 5415 D/R rychlostí 13200 rpm po dobu 1 minuty (bez přídavku jakéhokoli roztoku kvůli odstranění zbytků roztoku G4). Sběrné zkumavky byly nahrazeny zkumavkami Eppendorf, na kolonku bylo nanášeno 75 µl sterilní mQ vody o teplotě 65 °C a po přibližně 2 minutách stání byla soustava centrifugována na centrifuze Eppendorf 5415 D/R rychlostí 12000 rpm po dobu 2 minut. Získaný preparát byl skladován obvykle při teplotě -20 °C.

3.3.6. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami Eco RI a Hind III

Do mikrozkumavek Eppendorf byla pipetována následující směs:

- 10 µl vzorku DNA
- 2 µl pufru pro Eco RI
- 5 µl sterilní vody
- 2 µl Hind III
- 1 µl Eco RI

Zkumavky se směsí byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C (IR1500 Automatic CO2 Incubator).

3.3.7. Agarosová elektroforesa

Používaný 1% gel byl připraven rozpuštěním za horka 0,4 g agarosy v 40 ml TAE pufru (40 mM Tris, 20mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0). Po vychladnutí byly do roztoku přidány 4 µl SYBR Safe 10000x, směs byla promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s gumovými spacery na koncích. Do gelu byl vložen hřeben a směs byla ponechána 20 až 30 minut ztuhnout. Mezitím byly připraveny vzorky smícháním 20 µl vzorku DNA s 5 µl vzorkového pufru 5x (40% sacharosa (w/v), 0,1% bromfenolová modř (w/v)). Podobně byla připravena směs se standardem molekulových hmotností 2-Log DNA Ladder (4 díly vody, 1 díl standardu a 1 díl vzorkového pufru). Ze ztuhlého gelu byl vyndán hřeben a byly odstraněny gumové spacery, vanička byla umístěna do elektroforetické aparatury a zalita elektrodovým TAE puftrem. Pomocí automatické pipety byly nanесeny vzorky (25 µl) a standard (6 µl). Elektroforesa byla prováděna při napětí 110 V po dobu přibližně 35 min. Výsledný gel byl vyhodnocován pomocí transluminátoru Dark Reader.

3.3.8. Midipreparace DNA

Midipreparace byla prováděna pomocí komerčního kitu „GenElute™ Plasmid Midiprep Kit“ firmy Sigma dle přiloženého návodu.

U kultury příslušných buněk (narostlé přes noc) byla změřena optická densita (spektrofotometr Spekol 11) a následně bylo vypočítáno optimální množství použité kultury podle vzorce.

$$V(ml) = \frac{80}{OD_{600}} \text{ (pro vysokokopiový plasmid, např. pUC19)}$$

$$V(ml) = \frac{160}{OD_{600}} \text{ (pro nízkokopiový plasmid, např. pET22b)}$$

Vypočtené množství buněčné kultury bylo rozděleno do dvou zkumavek Falcon a po vyvážení centrifugováno na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn, pelety byly spojeny a resuspendovány v celkem 1,2 ml resuspendačního roztoku. Ke směsi bylo přidáno 1,2 ml lyzačního roztoku, po šetrném promíchání byla směs ponechána 4 – 5 minut stát a poté bylo přidáno 1,6 ml

neutralizačního roztoku (obsahuje chaotropní sůl). Směs byla převedena do centrifugační kyvety Oak Ridge a centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 15000 rpm (rotor F 0630) po dobu 15 minut proti kyvetě naplněné vodou.

Iontoměničová kolonka z kitu byla vložena do sběrné zkumavky, byly na ni nanесeny 3 ml ekvilibračního roztoku a tato soustava byla centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 2 min proti kolonce, na niž byly nanесeny 3 ml vody.

Supernatant z kyvety Oak Ridge byl nanесen na takto připravenou kolonku a byl centrifugován na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 2 minut proti kolonce s přibližně stejným množstvím vody. Sběrné zkumavky byly vylity, na kolonku byly nanесeny 3 ml promývacího roztoku a soustava byla centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 5 minut proti kolonce se stejným množstvím vody. Sběrné zkumavky byly vylity a soustava byla centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 1 minuty („nasucho“). Kolonka se zachyceným plasmidem byla přesunuta do čisté sběrné zkumavky a byl na ni nanесen 1 ml mQ vody přehřáté na 65 °C. Soustava byla centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250) po dobu 5 minut proti kolonce se stejným množstvím vody. Získaný roztok plasmidu byl dle potřeby rozdělen do zkumavek Eppendorf a skladován při teplotě -80 °C.

3.3.9. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami Nde I a Xho I

Do mikrozkušavek Eppendorf byla pipetována následující směs:

- 10 µl vzorku DNA
- 5,8 µl sterilní vody
- 0,2 µl BSA
- 2 µl NEB 4 pufry
- 1 µl Nde I
- 1 µl Xho I

Zkušavky se směsí byly inkubovány 3 hodiny při teplotě 37 °C (Automatic CO2).

3.3.10. Izolace DNA z agarosového gelu

Izolace byla prováděna pomocí komerčního kitu „JET quick – Gel Extraction Spin Kit“ firmy Genomed dle přiloženého návodu.

Po provedení agarosové elektroforesy byly části obsahující žádoucí DNA skalpelem vyříznuty a přeneseny do zkumavek Eppendorf. Zvážením zkumavek na analytických vahách byla diferenčně zjištěna hmotnost gelu. Podle toho bylo poté vypočteno potřebné množství roztoku L1 (obsahuje chaotropní sůl a solubilizační pufr TBE) tak, aby 100 mg gelu odpovídalo 300 μ l roztoku. Směs byla 15 minut zahřívána v ohřívači bloků LS1 (VLM GmbH) na teplotu 50 °C. Vzniklý roztok byl nanesen na iontoměničové kolonky a soustava byla centrifugována na centrifuze Eppendorf rychlostí 12000 rpm po dobu 1 minuty. Poté byla kolonka promyta 500 μ l roztoku L1 a opět centrifugována na centrifuze Eppendorf rychlostí 12000 rpm po dobu 1 minuty. Poté byla kolonka promyta 500 μ l roztoku L2 (obsahuje NaCl, EDTA a Tris/HCl) a opět centrifugována na centrifuze Eppendorf rychlostí 12000 rpm po dobu 1 minuty. Soustava byla ještě centrifugována 1 minutu při rychlosti 13200 rpm. Poté bylo na kolonku naneseo 30 μ l mQ vody o teplotě 65 °C a po zasáknutí (cca 1 minuta) byla DNA eluována do čisté sběrné zkumavky centrifugací 2 minuty rychlostí 12000 rpm.

3.3.11. Ligace

Do zkumavek Eppendorf bylo pipetováno celkem 17 μ l směsi plasmidu a insertu (konkrétní poměr viz výsledky). Směs byla zahřívána v termocykleru Tech gene (TECHNE) na 45 °C po dobu 5 minut a poté 3 minuty ochlazována na ledu. Ke směsi byly přidány 2 μ l pufru pro T4 ligasu a 1 μ l T4 ligasy. Poté byla zkumavka se směsí vložena do termocykleru Tech gene (TECHNE) a udržována na teplotě 16 °C přes noc.

3.3.12. Maxipreparace DNA

Maxipreparace byla prováděna pomocí komerčního kitu „Plasmid Maxi Kit“ firmy Geneaid dle přiloženého návodu.

250 ml kultury narostlé přes noc bylo centrifugováno na centrifuze Janetzki K70D rychlostí 3000 rpm po dobu 35 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 10 ml PM1 pufru a směs byla přenesena do zkumavky Falcon. Bylo přidáno 10 ml PM2 pufru, směs byla promíchána několikerým převrácením a ponechána stát asi 2 minuty. Poté bylo přidáno 10 ml PM3 pufru, promícháno a v centrifugačních kyvetách Oak Ridge byla směs centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 15000 g (rotor F 630) po dobu 20 minut.

Mezitím byla připravena iontoměničová kolonka. Kolonka byla uchycena ve svislé poloze, bylo na ni nanášeno 10 ml PEQ pufru a ponecháno volně prokapat. Poté byl na kolonku nanášen centrifugací získaný supernatant a ponechán volně prokapat. Následně byl tento postup zopakován ještě s 30 ml PW pufru. Pod kolonku byla umístěna čistá centrifugační kyveta Oak Ridge, na kolonku bylo nanášeno 12 ml PEL pufru a ponecháno volně prokapat. K roztoku bylo přidáno 9 ml vychlazeného isopropanolu, směs byla promíchána a centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 15000 g (rotor F 630, 4 °C) po dobu 30 minut. Supernatant byl odstraněn, k peletě bylo přidáno 5 ml vychlazeného ethanolu a směs byla centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 15000 g (rotor F 630, 4 °C) po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn, peleta byla 10 minut sušena v laminárním boxu (BIO 126, Labox) a poté rozpuštěna ve 2 ml sterilní vody. Získaný roztok DNA byl uchováván při teplotě -80 °C.

3.3.13. Spektroskopické stanovení DNA

Koncentrace DNA byla stanovována spektroskopicky měřením na spektrofotometru NanoVue Plus. Do prostoru pro vzorek byly nanášeny 4 µl roztoku DNA, přístroj měřil absorbanci vzorku a koncentraci vyhodnocoval automaticky podle vzorce

$$c = (A_{260} - A_{320}) * \text{\textit{ředění}} * 50$$

Měření bylo opakováno dvakrát, z naměřených hodnot byl vypočten průměr.

3.3.14. Testovací exprese

Ve zkumavce Falcon bylo k 40 ml LB media přidáno 40 µl ampicilinu a asi 50 µl zmrzlé buněčné kultury (expresní kmen nesoucí expresní plasmid). Směs byla rozdělena do dvou zkumavek a inkubována při 37 °C (CORBI-SAFE TS). Ze směsi byly odebírány vzorky a byla měřena jejich optická densita (OD₆₀₀) (spektrofotometr Spekol 11). Po dosažení optické density 1 bylo odebráno 200 µl vzorku a ke kultuře bylo přidáno 1M IPTG (konečná koncentrace 0,5 mM). Poté byla jedna ze zkumavek umístěna do inkubátoru o teplotě 17 °C (CORBI-SAFE TS) a druhá do inkubátoru o teplotě 27 °C (vodní lázeň s třepačkou, GFL). Z obou kultur byly odebírány vzorky po 0, 2, 17,5 a 41,5 hodinách. Inkubace byla zastavena po 42 hodinách. Vzorky byly nařaděny na přibližně stejnou optickou densitu a vyhodnoceny pomocí SDS elektroforesy.

3.3.15. SDS elektroforesa ve vertikálním uspořádání

Mezi čistá odmaštěná skla byl nalit separační gel připravený smícháním pufru A (0,375 M TRIS/HCl, 0,1% SDS (w/v), pH 8,8), polymeračního roztoku A (30% akrylamid (w/v), 0,8% BIS v pufru A), TEMEDu a persíranu amonného (100 mg/ml) v množství dle tabulky (Tabulka 1). Po nalití byl gel převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí gelu byla destilovaná voda vylita a separační gel byl převrstven zaostřovacím gelem připraveným smícháním pufru B (0,125 M TRIS/HCl, 0,1% SDS (w/v), pH 8,8), polymeračního roztoku B (30% akrylamid (w/v), 0,8% BIS v pufru B), TEMED a persíranu amonného v množství viz Tabulka 1. Do roztoku byl zasunut hřeben k vytvoření jamek pro nanášení vzorku.

Po ztuhnutí gelu byl hřeben vyjmut, desky byly umístěny do elektroforetické vany a horní i dolní elektrodový prostor byly vyplněny elektrodovým pufrem (0,025 M TRIS/HCl, 0,192 M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Do jamek byly mikrostřikačkou Hamilton naneseny vzorky, které byly před nanášením naředěny vzorkovým redukcujícím pufrem (0,063 M TRIS/HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-merkaptoethanol, 0,003% bromfenolová modř, pH 6,8) v poměru 1:1 (2x koncentrovaný pufr) nebo 3:1 (4x koncentrovaný pufr) a považeny ve vodní lázni po dobu 5 minut.

Tabulka 1: Složení separačních a zaostřovacích gelů různé hustoty. Množství je uvedeno vždy pro jednu elektroforetickou desku.

<u>separační gel</u>	8%	10%	12%	15%
pufr A [ml]	5,5	5	4,5	3,5
polymerační roztok A [ml]	2	2,5	3	3,5
TEMED [μ l]	7,5	7,5	7,5	7
persíran amonný [μ l]	75	75	75	70

<u>zaostřovací gel</u>	3%	4%	5%
pufr B [ml]	2,7	2,6	2,5
polymerační roztok B [μ l]	300	400	500
TEMED [μ l]	3	3	3
persíran amonný [μ l]	60	60	60

Elektroforesa byla prováděna při napětí 80 V po dobu 30 min a poté při napětí 150 V tak dlouho, než „čelo“ elektroforesy „doputovalo“ ke spodnímu okraji separačního gelu.

Poté byl gel přenesen do barvicí lázně (25% Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v), 46% ethanol (v/v), 9,2% kyselina octová (v/v)), v níž byl ponechán po dobu 45 minut. Poté byl odbarvován v odbarvovací lázni (25% ethanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v)) přes noc.

3.3.16. Produkce proteinu

Vzhledem k tomu, že konkrétní podmínky jednotlivých produkcí se lišily, je zde uveden jen velmi stručný postup. Tabulka s konkrétními podmínkami viz Výsledky (kapitola 4.4).

500 ml sterilního LB media s ampicilinem (100 µg/ml) bylo inokulováno expresním kmenem buněk *E. coli* nesoucím expresní plasmid. Kultura byla za stálého míchání kultivována, není-li uvedeno jinak, při 37 °C (inkubátor CORBI-SAFE) do dosažení požadované OD₆₀₀ (v rozmezí přibližně 1 – 1,5). Poté byla indukována produkce proteinu přidáním roztoku IPTG a roztoku riboflavinu (výsledná koncentrace 1 µg/ml). Směs byla kultivována při dané teplotě (v rozmezí 18 až 27 °C) v inkubátoru CORBI-SAFE. Po určité době byla kultivace ukončena a narostlá kultura byla dále zpracována.

3.3.17. Zpracování buněk a izolace membránové frakce

Získaná kultura byla centrifugována na centrifuze Janetzki K70D rychlostí 3000 rpm po dobu 40 min. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v resuspendačním pufru (10 mM KH₂PO₄, 1mM EDTA, pH 7,7) na celkový objem 50 ml. Od této chvíle byla směs udržována v chladu ve směsi led-voda. Směs byla sonikována pulsy délky 30 – 90 s, 40% amplituda, přestávky 0,5 až 1,5 minuty, 5 - 10 pulsů (ultrazvuková sonda Sonoplus SH 70G, Bandelin). Směs byla centrifugována na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 3901 g (rotor 4250, 4 °C) po dobu 15 min. Supernatant byl převeden do centrifugační kyvety Oak Ridge a centrifugován na centrifuze Allegra X-22R rychlostí 18000 g (rotor F 630, 4 °C) po dobu 30 min. Takto získaný supernatant byl převeden do centrifugačních kyvet pro ultracentrifugu a po vyvážení byl centrifugován na ultracentrifuze Optima™ LE-80K rychlostí 60000 rpm (rotor Ti70, 4 °C) po dobu 75 minut. Získaná peleta byla resuspendována ve 4 ml resuspendačního pufru (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,7) a homogenizována. Ke směsi byl přidán glycerol do výsledné koncentrace 20% (v/v) a směs byla do dalšího zpracování zmrazena na teplotu -80 °C. V průběhu

zpracování byly odebírány vzorky supernatantů i pelet, které byly následně vyhodnoceny pomocí SDS elektroforesy.

3.3.18. Solubilizace membránové frakce

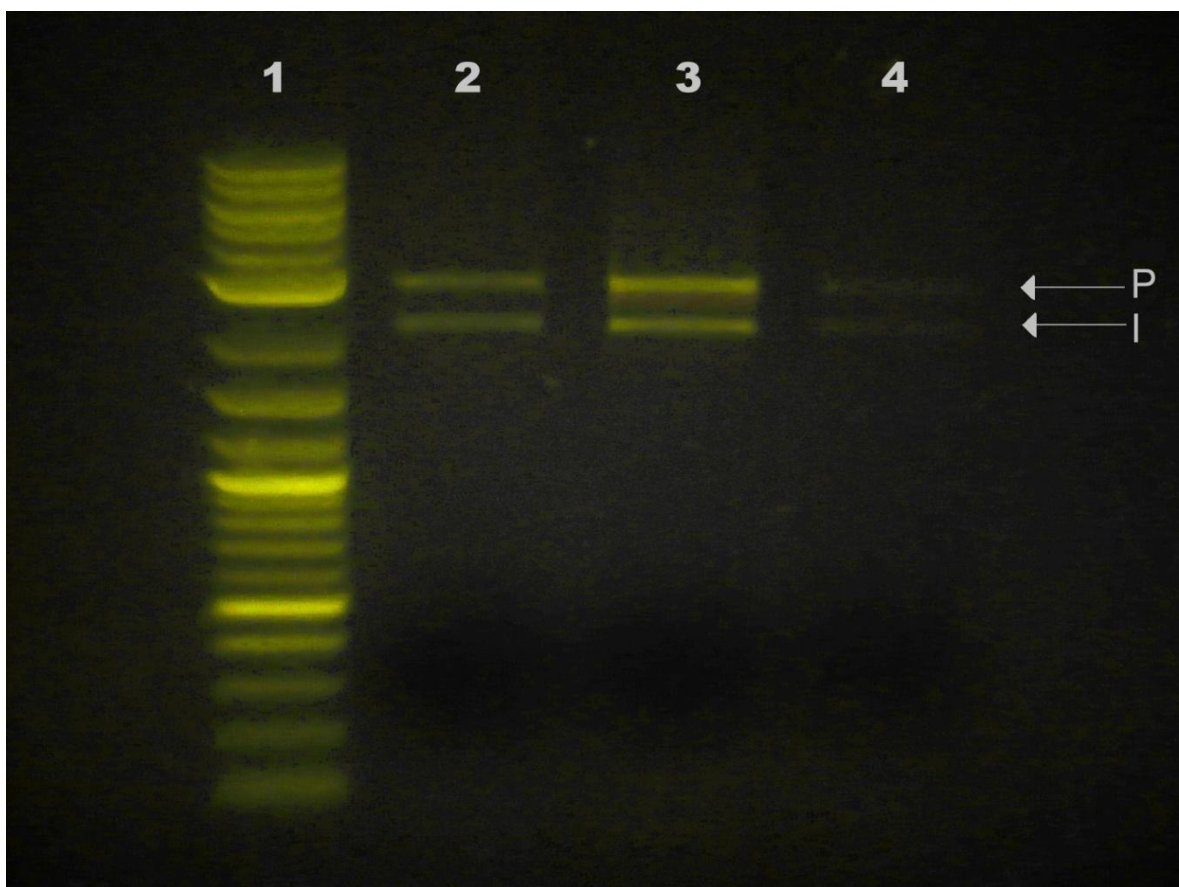
Na solubilizaci membránové frakce byl použit solubilizační pufr o složení 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 20% glycerol (v/v), 0,1 M DTT (přidáno vždy až těsně před použitím), pH 7,8. K tomuto pufru byly přidány detergenty a to sice 0,6% cholát sodný a buď 0,5 – 1 mM Brij 35, nebo 0,5% Triton X-100, nebo 0,6% E-911. Bylo použito vždy 20 ml „základního“ pufru a k tomu příslušné množství detergentu. V některých případech byly přidány inhibitory proteas v podobě roztoku (Sigma, přidáno 100 μ l) nebo tablety (1/2 tablety Complete Mini, Roche).

Postup provedení solubilizace byl následující: Zamražené homogenizované membránové frakce byly přidány k 10 ml základního pufru (případně s ním byly homogenizovány). K této směsi bylo pak postupně přikapáváno zbylých 10 ml pufru s přidávanými detergenty. Vše bylo prováděno za stálého míchání na magnetické míchačce v chladové místnosti (5 °C). Po přidání všech detergentů byla směs míchána 2 hodiny nebo přes noc. Poté byla převedena do centrifugačních kyvet pro centrifugu Beckman a centrifugována na ultracentrifuze OptimaTM LE-80K rychlostí 60000 rpm (rotor Ti70, 4 °C) po dobu 70 min. Poté byly odebrány vzorky supernatantu a pelety a supernatant byl zamražen v -80 °C. V případě opakované solubilizace byla peleta po ultracentrifugaci opět homogenizována s puftrem a postup byl zopakován. Odebrané vzorky byly vyhodnoceny pomocí SDS elektroforesy.

4. Výsledky

4.1. Namnožení klonovacího plasmidu

Plasmid pUC19 s vloženou sekvencí lidské CPR (hCPR) byl vnesen do buněk *E. Coli* DH5 α . Z transformovaných buněk byly vybrány 3 kolonie a ty byly kultivovány metodou „single-cell colony“. Z narostlé buněčné kultury byla provedena minipreparace plasmidové DNA a vzorek této DNA byl kvůli ověření přítomnosti konstruktů štěpen restrikčními endonukleasami EcoR I a Hind III. Výsledky štěpení byly vyhodnoceny pomocí agarosové elektroforesy a jsou zobrazeny na obrázku (**Obrázek 10**).



Obrázek 10: Výsledek štěpení klonovacího plasmidu endonukleasami EcoR I a Hind III.

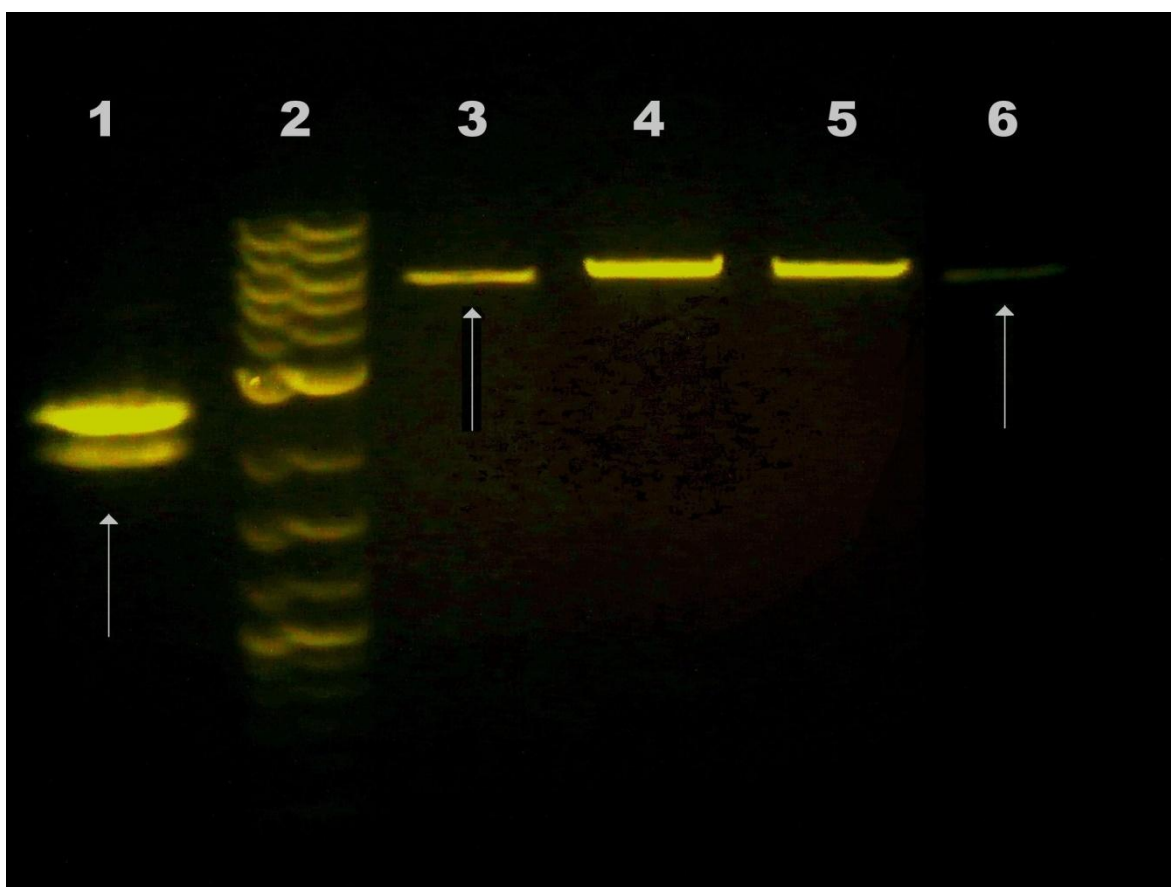
V dráze 1 standard molekulových hmotností (2-log DNA Ladder), v drahách 2 – 4 štěpená DNA ze 3 různých kolonií. P značí proužek plasmidu a I proužek insertu.

Všechny tři kolonie potvrdily přítomnost insertu o molekulové hmotnosti odpovídající teoretické hmotnosti genu pro hCPR (2060 bp). Z kolonie obsahující nejvíce plasmidové DNA (viz dráha 3, Obrázek 10) byla provedena midipreparace většího

množství plasmidové DNA pro uchování plasmidu a následující experimenty. Bylo získáno 156 µg DNA. Kontrolní štěpení viz Obrázek 13 na straně 27.

4.2. Příprava expresního plasmidu

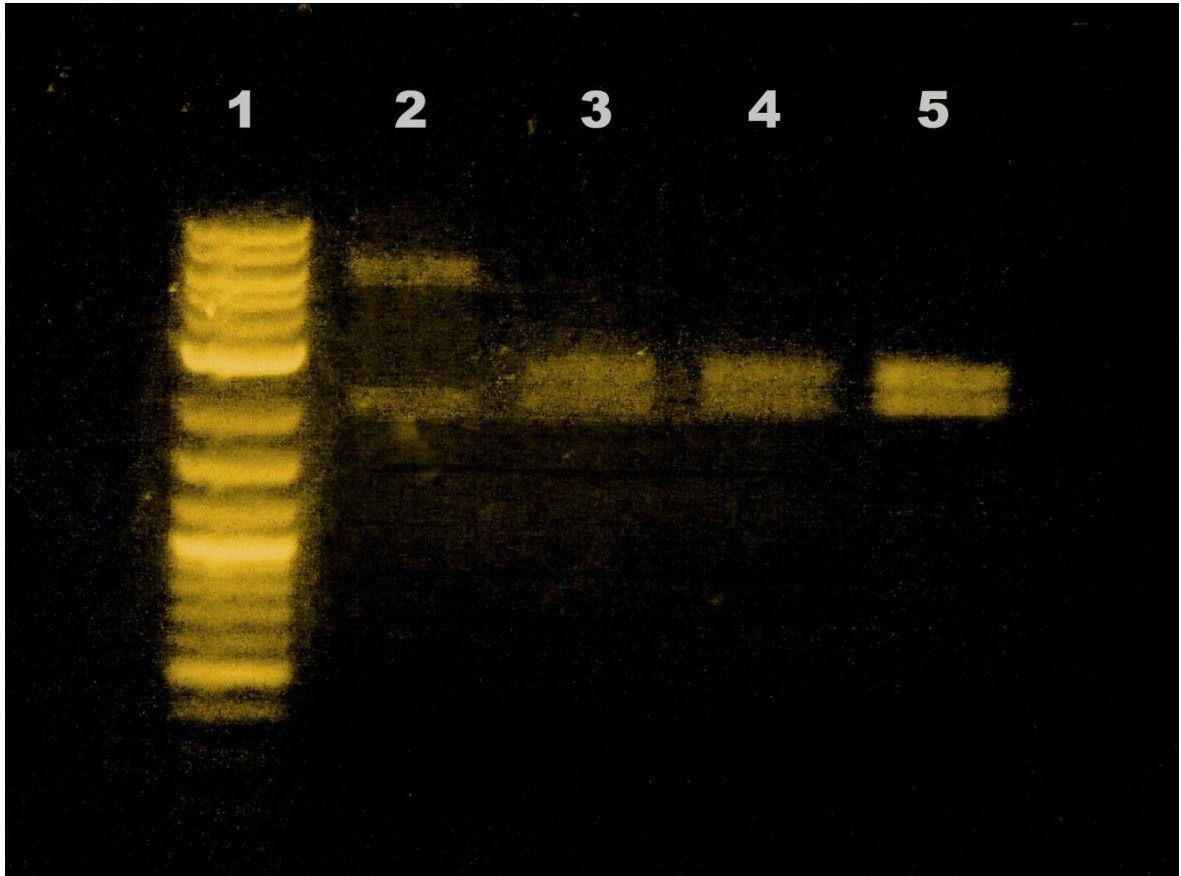
Expresní plasmid pET22b a plasmid pUC19 s vloženou sekvencí hCPR byly štěpeny restrikními endonukleasami NdeI a XhoI. S výslednou štěpicí směsí byla provedena agarosová elektroforesa (Obrázek 11).



Obrázek 11: Výsledek štěpení plasmidu a insertu. V dráze 1 je štěpený plasmid pUC obsahující jako insert gen pro hCPR, v dráze 2 standard, v drahách 3 a 6 štěpený plasmid pET. Šipkou vyznačené proužky byly následně izolovány. V drahách 4 a 5 jsou vzorky štěpené vždy pouze jednou z použitých endonukleas, slouží jako kontrola přítomnosti a jedinečnosti restrikního místa.

Bylo ověřeno, že restrikní místa pro obě endonukleasy jsou jedinečná. Proužky obsahující plasmid pET22b a insert obsahující gen pro hCPR (viz **Obrázek 11**) byly izolovány z gelu a oba fragmenty DNA byly spojeny ligací. Na ligaci byly použity dvě směsi plasmidu a insertu – směs 1 obsahovala 10 µl plasmidu (roztoku izolovaného z gelu)

a 7 μ l insertu, směs 2 obsahovala 12 μ l plasmidu a 5 μ l insertu. Po skončení ligace byly výslednou směsí transformovány buňky *E. Coli* DH5 α . Z transformovaných buněk bylo vybráno 8 kolonií (4 z každé ligační směsi), ty byly kultivovány metodou „single-cell colony“, opět byla provedena minipreparace DNA a následně kontrolní štěpení restrikcí endonukleasami NdeI a XhoI. Výsledek v podobě elektroforezy viz Obrázek 12.

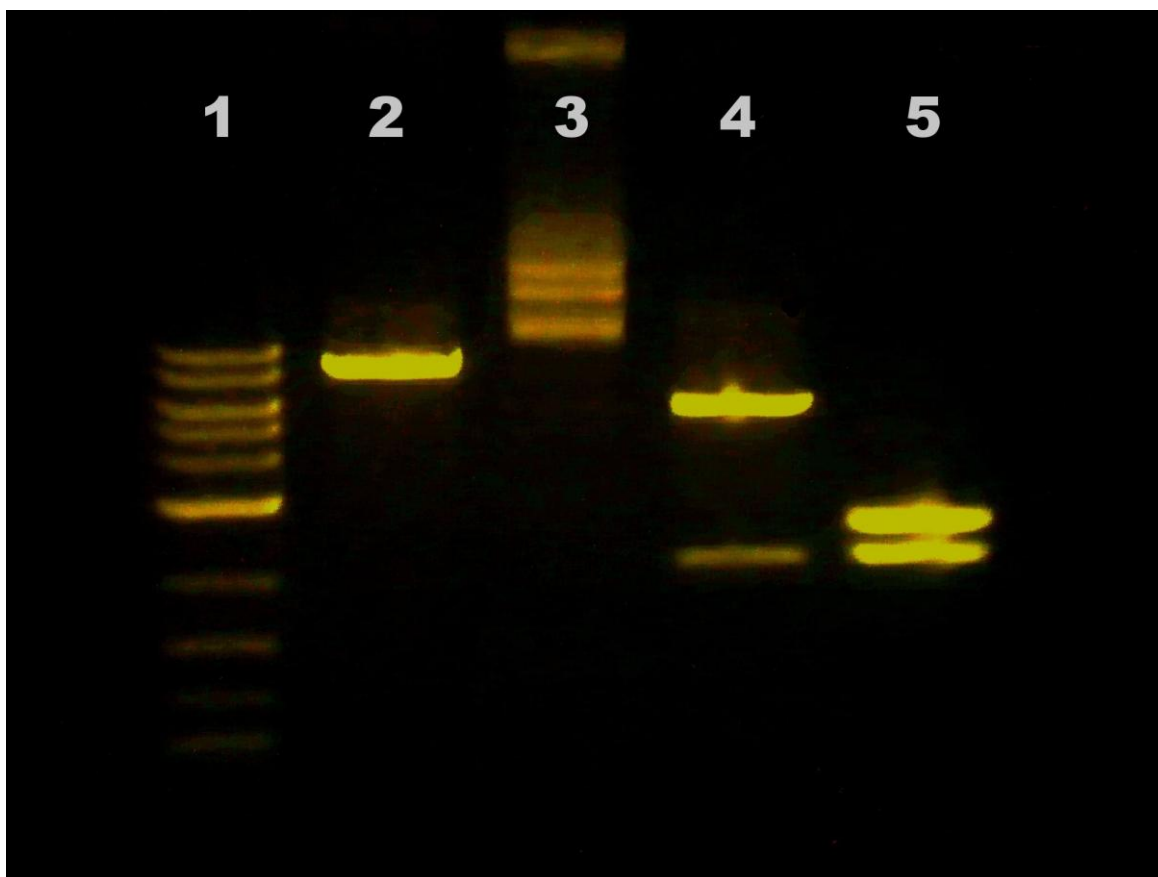


Obrázek 12: Výsledek kontrolního štěpení plasmidu pET + hCPR. V dráze 1 standard, v drahách 2 a 3 štěpený plasmid z kolonií transformovaných směsí 1, v drahách 4 a 5 štěpený plasmid z kolonií transformovaných směsí 2. Obrázek byl upraven, aby byly nevýrazné proužky vidět. Štěpené plasmidy z ostatních kolonií byly výrazné ještě méně.

Pouze jedna z vybraných kolonií prokazatelně obsahovala expresní plasmid (viz dráha 2, Obrázek 12), v ostatních byl (soudě podle velikosti fragmentů) nejspíše obsažen klonovací plasmid pUC + hCPR (viz dráhy 3 až 5, Obrázek 12, srovnej s drahami 2 až 4, Obrázek 10).

Z kolonie obsahující expresní plasmid byla provedena maxipreparace DNA pro použití v dalších experimentech. Bylo získáno přibližně 140 μ g DNA o vysoké čistotě (viz

dráha 2, Obrázek 13). Připravený konstrukt založený na vektoru pET22b byl pro kontrolu štěpen restrikčními endonukleasami pro prokázání přítomnosti požadovaného insertu (viz dráha 4, Obrázek 13). Stejným způsobem byl ověřen i konstrukt založený na vektoru pUC19 (viz dráha 5, Obrázek 13)

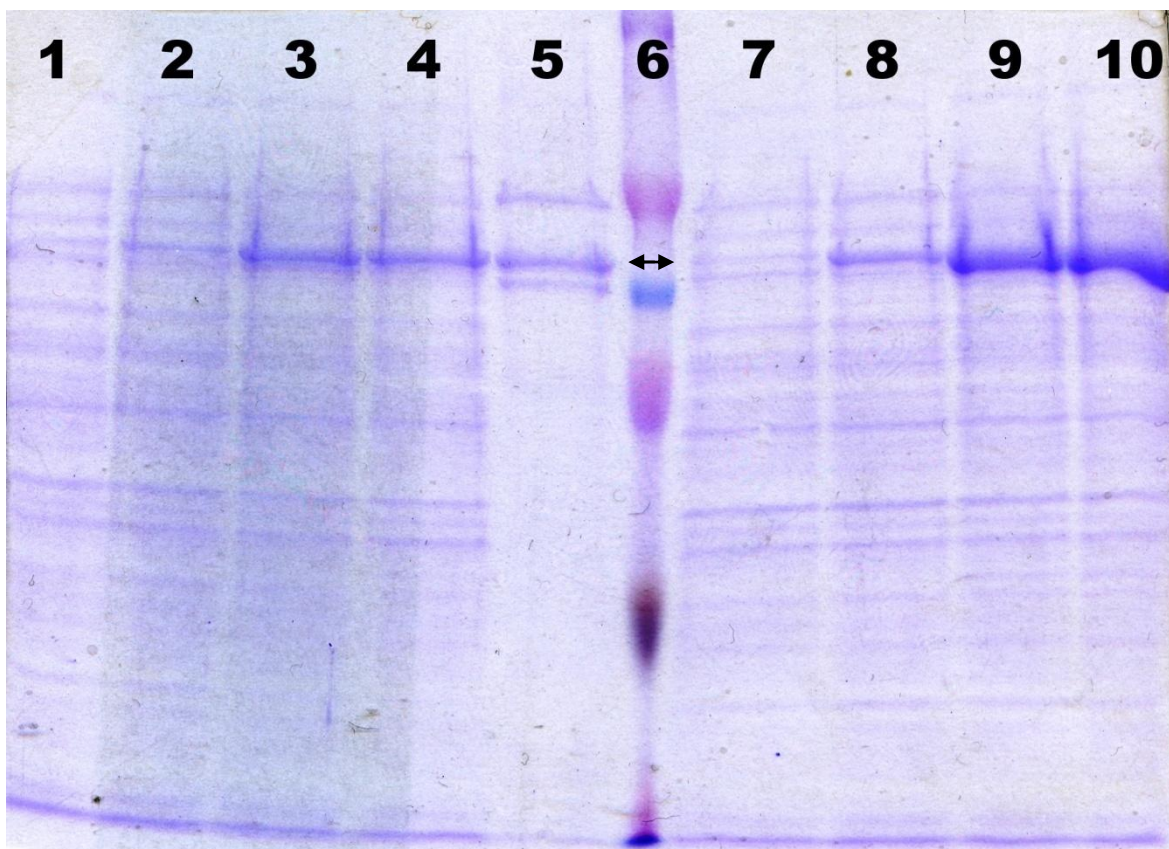


Obrázek 13: Kontrolní štěpení izolovaného expresního konstruktů. V dráze 1 standard, v dráze 2 konstrukt štěpený endonukleasou NdeI, v dráze 3 neštěpený konstrukt, v dráze 4 konstrukt štěpený endonukleasami NdeI a XhoI. V dráze 5 pro srovnání plasmid pUC s vloženým genem pro lidskou CPR, štěpený endonukleasami NdeI a XhoI.

4.3. Transformace expresních buněk a testovací exprese

Získaný expresní plasmid pET s genem pro hCPR byl vnesen do buněk *E. Coli* BL21-Gold a do buněk *E. Coli* BL21-CodonPlus-RIL. Vybrané kolonie byly kultivovány metodou „single-cell colony“ a získaná buněčná kultura byla zamražena pro další použití.

S transformovanými buňkami kmene BL21-Gold byla provedena testovací exprese. Výsledek v podobě SDS elektroforesy viz Obrázek 14.



Obrázek 14: Výsledky testovací exprese. V drahách 1 až 4 jsou vzorky kultury inkubované při 17 °C odebrané v čase 0 h (dráha 1), 2 h (dráha 2), 17,5 h (dráha 3) a 41,5 h (dráha 4) od indukce. V dráze 5 je pro srovnání velikosti vzorek králičí CPR, v dráze 6 je standard molekulových hmotností ColorBurst. V drahách 7 až 10 jsou vzorky kultury inkubované při 27 °C odebrané v čase 0 h (dráha 7), 2 h (dráha 8), 17,5 h (dráha 9) a 41,5 h (dráha 10) od indukce. Šipkou je vyznačen proužek reduktasy. Vzorky byly řaděny tak, aby množství v každé dráze odpovídalo podobnému množství buněk.

Testovací exprese ukázala, že při obou teplotách dochází k tvorbě významného množství proteinu o velikosti odpovídající reduktase, při teplotě 27 °C byl nárůst výraznější než při teplotě 17 °C (srovnej dráhy 4 a 10, Obrázek 14). Při obou teplotách byl patrný rozdíl mezi vzorkem v čase 2 h od inkubace a vzorkem v čase 17,5 h od inkubace (viz dráhy 2, 3, 8 a 9, Obrázek 14), při teplotě 27 °C byl podstatný nárůst koncentrace reduktasy v buňkách patrný již po 2 h.

4.4. Expese hCPR při různých podmínkách a izolace membránové frakce

S využitím informací z testovací exprese byly provedeny postupně 4 produkce reduktasy, podmínky pro jednotlivé exprese jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 2). Po

ukončení produkce byly buňky sonikovány, konkrétní podmínky sonikace se mírně lišily a jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 2: Shrnutí podmínek při jednotlivých produkcích hCPR. Při produkci (3) bylo LB medium inokulováno buňkami seškrábnutými stěrkou z povrchu agarové plotny s transformovanými buňkami. Při produkci (4) bylo použito LB medium s vyšší koncentrací živin (místo obvyklých 12,5 g směsi/500 ml vody bylo použito 17 g hotové směsi) a v okamžiku indukce měla směs teplotu 18 °C.

produkce	teplota produkce	OD ₆₀₀ před indukci	V (1M IPTG)	doba produkce	expresní kmen
(1)	27 °C	0,940	250 µl	17 h	GOLD
(2)	18 °C	1,296	5 µl	19 h	GOLD
(3)	23 °C	1,124	2 µl	17 h	RIL
(4)	18 °C	1,831	2 µl	3 h	RIL

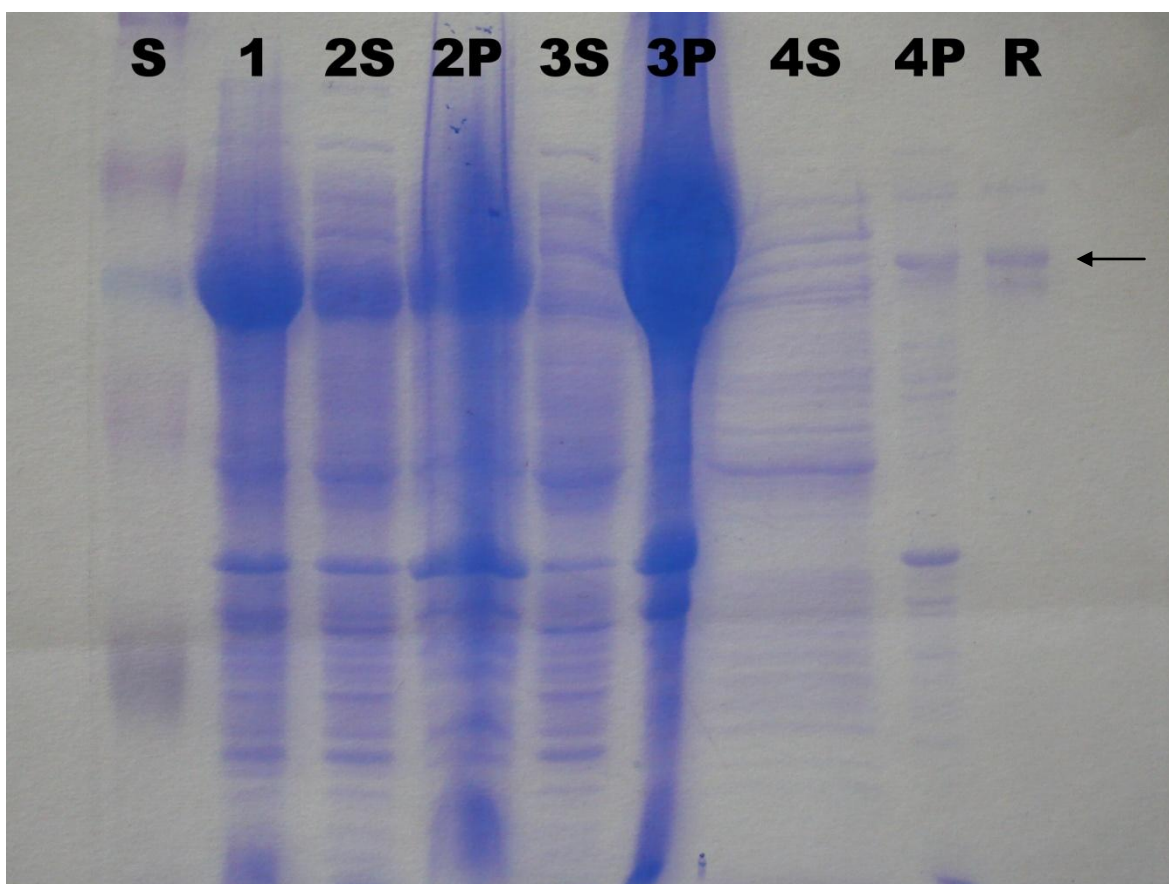
Tabulka 3: Shrnutí podmínek při sonikaci. Před sonikací (3) bylo ke směsi přidáno 600 µl roztoku inhibitorů proteas, před sonikací (4) byla přidána jedna tableta inhibitorů proteas Complete.

produkce	délka pulsu	přestávka mezi pulsy	počet pulsů
(1)	30 s	0,5 min	7
(2)	90 s	1,5 min	5
(3)	90 s	1,5 min	5
(4)	60 s	1 min	10

Následně byla z buněk centrifugací izolována membránová frakce. První centrifugací byly odděleny nerozbité buňky, druhou centrifugací byla oddělena inkluzní tělíska a třetí centrifugací byly odděleny membrány. Ze vzorků odebraných v průběhu izolace byla provedena SDS elektroforesa.

Produkce (1)

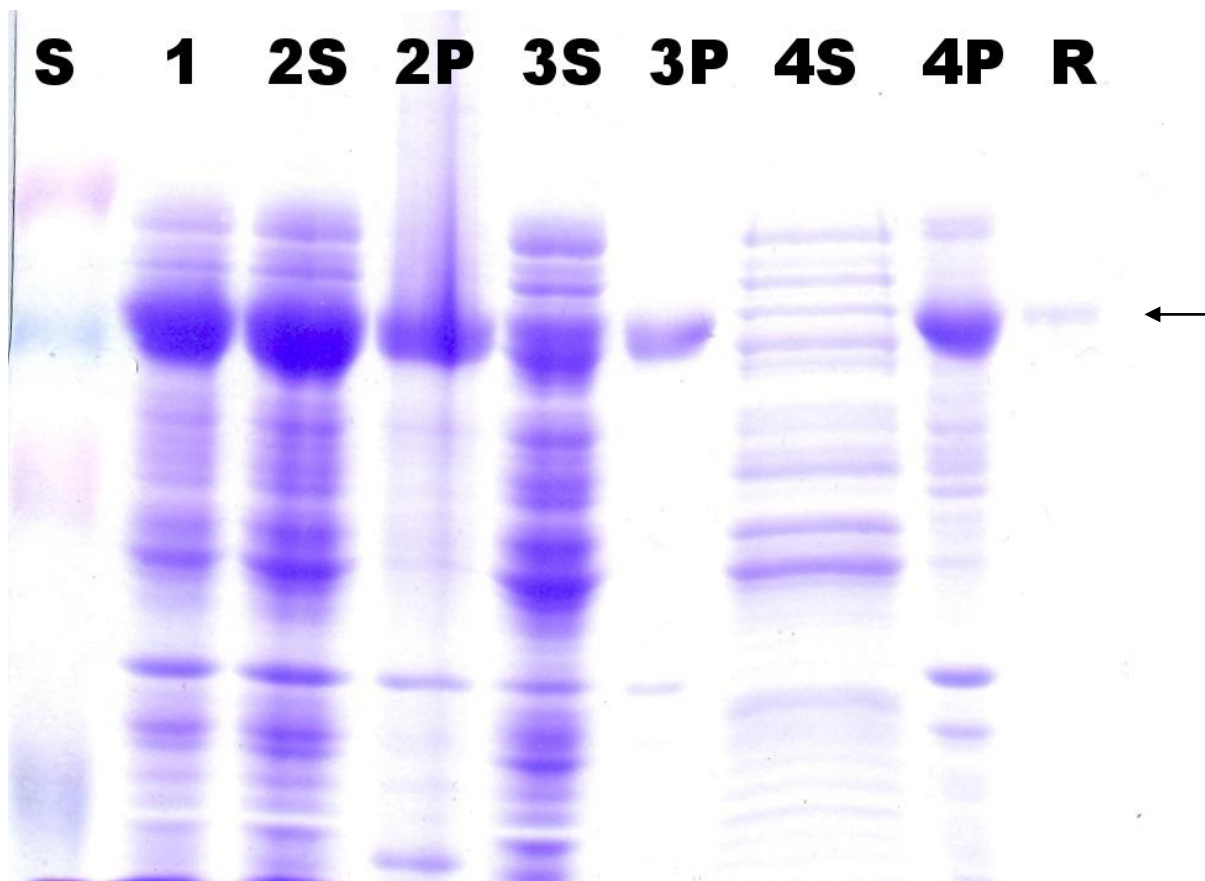
Při této produkci došlo k masivní expresi CPR (viz dráha 1, Obrázek 15), nicméně většina proteinu zůstala v nerozbitých buňkách a hlavně v inkluzních tělískách a objevila se tudíž v peletách (viz dráhy 2P a 3P, Obrázek 15). V membránové frakci je přesto vidět slabý proužek odpovídající velikostí CPR (viz dráhy 4P a R, Obrázek 15). Při dalších produkcích byla proto používána nižší teplota a nižší koncentrace IPTG, aby byla produkce pomalejší a protein měl větší šanci se správně zabudovat do membrány.



Obrázek 15: Izolace membránové frakce z produkce (1). V dráze S je standard molekulových hmotností Color Burst, v dráze 1 vzorek buněk před centrifugacemi, v dráze 2S vzorek supernatantu po první centrifugaci, v dráze 2P vzorek pelety po první centrifugaci (obsahuje nerozbité buňky), v dráze 3S vzorek supernatantu po druhé centrifugaci, v dráze 3P vzorek pelety po druhé centrifugaci (obsahuje inkluzní tělíška), v dráze 4S vzorek supernatantu po třetí centrifugaci, v dráze 4P vzorek pelety po třetí centrifugaci (obsahuje membránovou frakci), v dráze R vzorek králíčí CPR. Šipkou je vyznačen proužek reduktasy. Vzorky v drahách 2P a 3P byly nedostatečně naředěny.

Produkce (2)

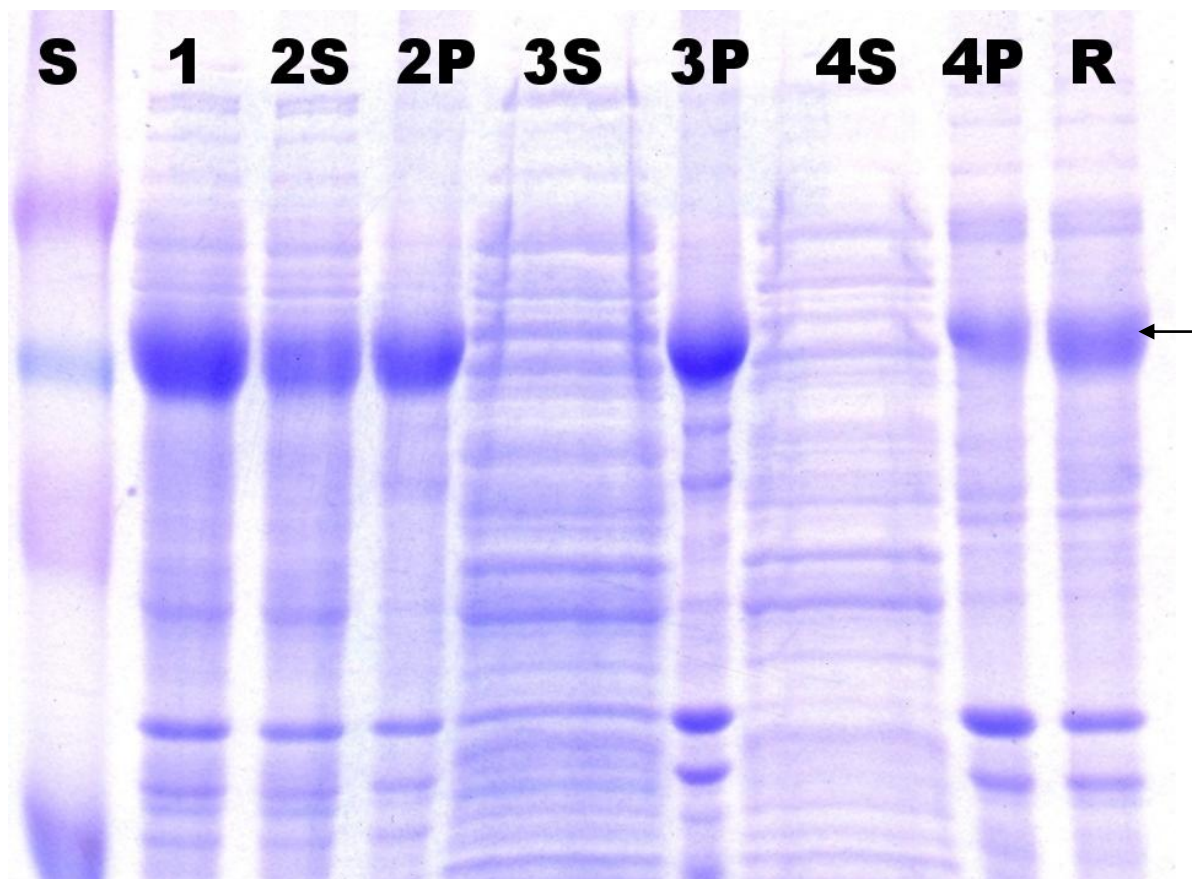
2. produkce probíhala za nižší teploty i koncentrace IPTG a zvýšené počáteční densitě buněk. Při této produkci je opět zřetelný úbytek proteinu po oddělení inkluzních tělísek (srovnej dráhy 2S a 3S, Obrázek 16), v membránové frakci bylo však přítomno výrazně více reduktasy než v předchozím případě (viz dráha 4P, Obrázek 16). I z tohoto důvodu byla tato membránová frakce použita pro srovnání ve vyhodnocování dalších produkcí.



Obrázek 16: Izolace membránové frakce z produkce (2). V dráze S je standard molekulových hmotností Color Burst, v dráze 1 vzorek buněk před centrifugacemi, v dráze 2S vzorek supernatantu po první centrifugaci, v dráze 2P vzorek pelety po první centrifugaci (obsahuje nerozbité buňky), v dráze 3S vzorek supernatantu po druhé centrifugaci, v dráze 3P vzorek pelety po druhé centrifugaci (obsahuje inkluzní tělíska), v dráze 4S vzorek supernatantu po třetí centrifugaci, v dráze 4P vzorek pelety po třetí centrifugaci (obsahuje membránovou frakci), v dráze R vzorek králičí CPR. Šipkou je vyznačen proužek reduktasy.

Produkce (3)

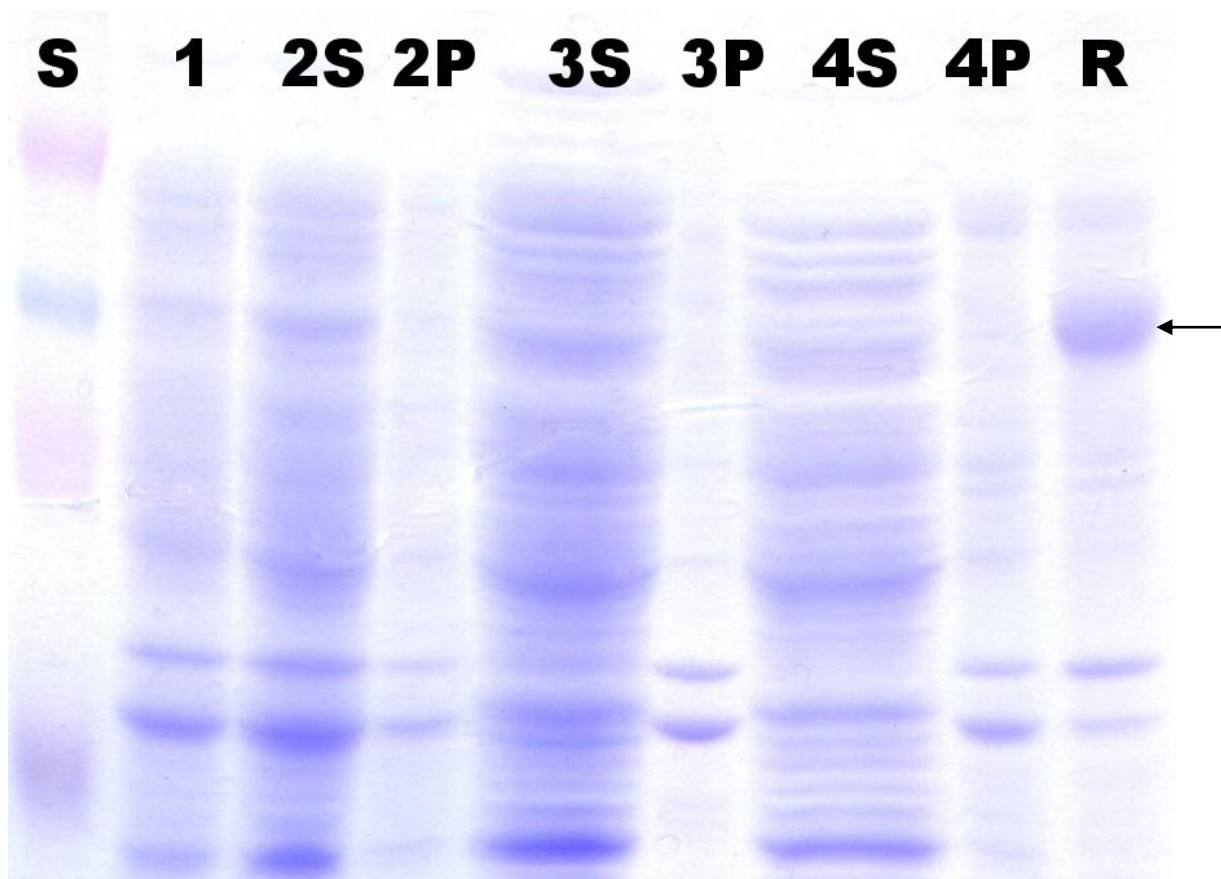
Při této produkci byla ověřována exprese v buňkách *E. Coli* RIL, které se dříve osvědčili při produkci potkaní reduktasy, avšak opět zůstala výrazná část proteinu v inkluzních tělískách (srovnej dráhy 3S a 3P, Obrázek 17, v dráze 3S nijak výrazné množství reduktasy není), navzdory tomu bylo v membránové frakci podobné množství reduktasy jako v předchozí produkci (srovnej dráhy 4P a R, Obrázek 17).



Obrázek 17: Izolace membránové frakce z produkce (3). V dráze S je standard molekulových hmotností Color Burst, v dráze 1 vzorek buněk před centrifugacemi, v dráze 2S vzorek supernatantu po první centrifugaci, v dráze 2P vzorek pelety po první centrifugaci (obsahuje nerozbité buňky), v dráze 3S vzorek supernatantu po druhé centrifugaci, v dráze 3P vzorek pelety po druhé centrifugaci (obsahuje inkluzní tělíška), v dráze 4S vzorek supernatantu po třetí centrifugaci, v dráze 4P vzorek pelety po třetí centrifugaci (obsahuje membránovou frakci), v dráze R vzorek membránové frakce z produkce (2). Šipkou je vyznačen proužek reductasy.

Produkce (4)

Tentokrát byla radikálně zkrácena doba produkce v naději, že se protein přednostně váže na membránu a teprve později přechází do tělísek. Kromě toho byly buňky před indukcí kultivovány při teplotě 18 °C, takže produkce probíhala po celou dobu při teplotě 18 °C. Ukázalo se však, že celkové množství reductasy je už příliš malé, neboť ani ve vzorku před první centrifugací (viz dráha 1, Obrázek 18) není nijak výrazný proužek odpovídající reductase. V membránové frakci (viz dráha 4P, Obrázek 18) pak reductasa prakticky nebyla detekována.



Obrázek 18: Izolace membránové frakce z produkce (4). V dráze S je standard molekulových hmotností Color Burst, v dráze 1 vzorek buněk před centrifugacemi, v dráze 2S vzorek supernatantu po první centrifugaci, v dráze 2P vzorek pelety po první centrifugaci (obsahuje nerozbité buňky), v dráze 3S vzorek supernatantu po druhé centrifugaci, v dráze 3P vzorek pelety po druhé centrifugaci (obsahuje inkluzní tělíska), v dráze 4S vzorek supernatantu po třetí centrifugaci, v dráze 4P vzorek pelety po třetí centrifugaci (obsahuje membránovou frakci), v dráze R vzorek membránové frakce z produkce (2). Šipkou je vyznačen proužek reductasy.

4.5. Solubilizace membránové frakce

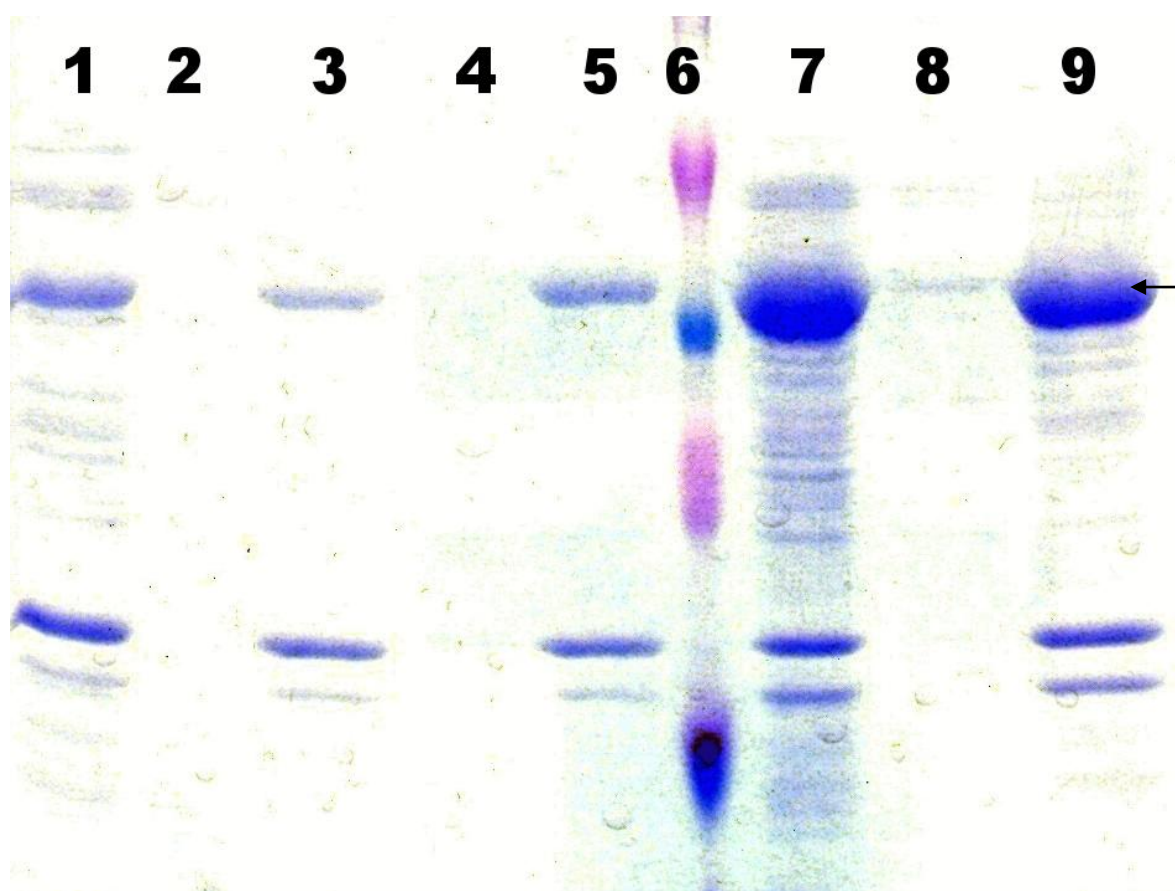
Membránové frakce ze všech produkcí byly solubilizovány pomocí detergentů, membránová frakce z produkce (1) byla provedena dvakrát. Rozdíly mezi jednotlivými solubilizacemi shrnuje Tabulka 4.

Solubilizace (1) a (2)

Při solubilizaci (1) nebylo solubilizováno prakticky nic, a to ani po zopakování postupu. Při solubilizaci (2) se část reductasy solubilizovat podařilo (slabý proužek v dráze 8, Obrázek 19), stále však výrazná část zůstala v peletě.

Tabulka 4: Rozdíly ve složení solubilizačních pufrů. Ostatní složky pufru jsou uvedeny v části Metody. Solubilizace membránové frakce z produkce (1) byla provedena dvakrát, proto je v této tabulce rozlišována solubilizace (1)a a (1)b.

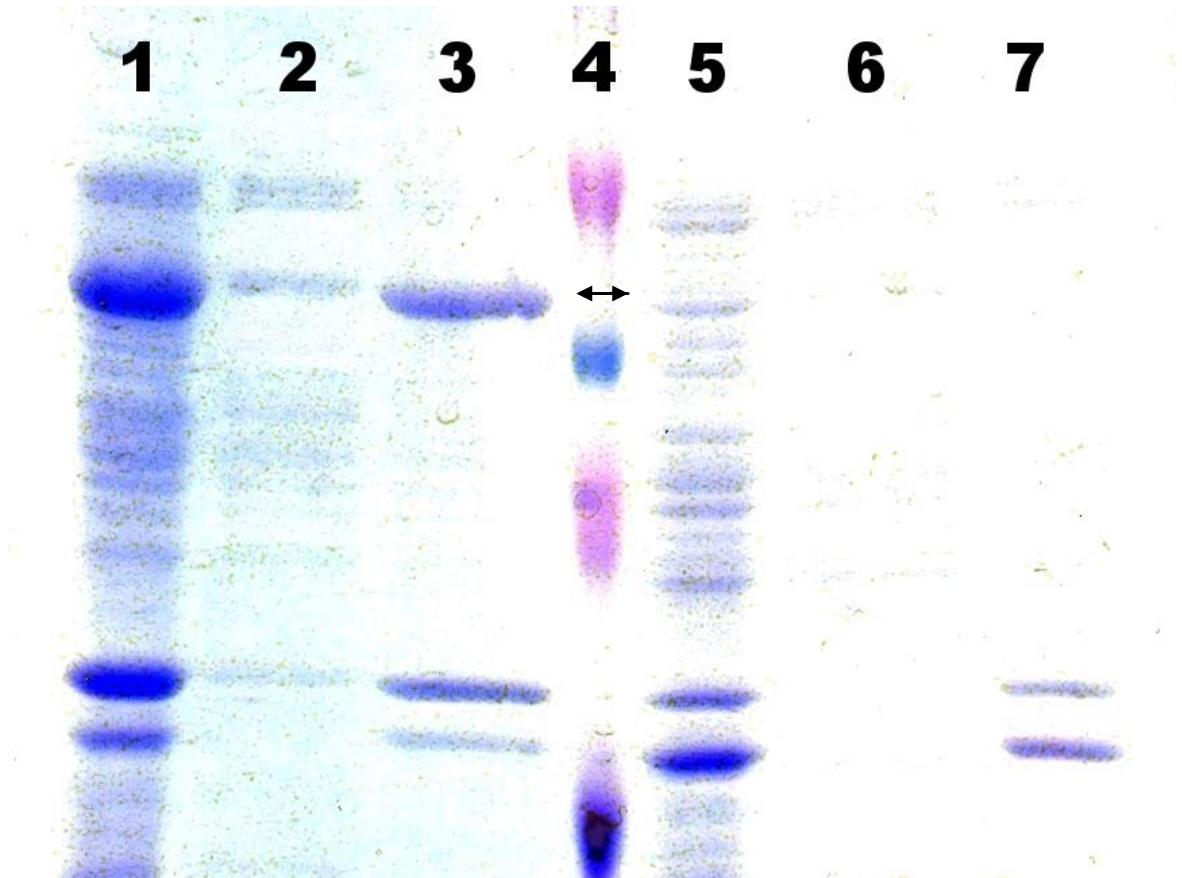
membránová frakce	detergent + množství	inhibitor proteas	doba míchání
(1)a	2,4 ml 10% Brij 35	x	2 h
(1)b	1 ml 10% Triton X-100	x	přes noc
(2)	1,2 ml 10% Brij 35	100 µl roztoku	2 h
(3)	1,2 ml 10% E-911	1/2 tablety Complete Mini	2 h
(4)	1,2 ml 10% E-911	1/2 tablety Complete Mini	2 h



Obrázek 19: Solubilizace membránových frakcí z produkcí (1) a (2). Vlevo solubilizace (1): vzorek před solubilizací (dráha 1), vzorek supernatantu po solubilizaci a (dráha 2), vzorek pelety po solubilizaci a (dráha 3), vzorek supernatantu po solubilizaci b (dráha 4), vzorek pelety po solubilizaci b (dráha 5). Vpravo solubilizace (2): vzorek před solubilizací (dráha 7), vzorek supernatantu po solubilizaci (dráha 8), vzorek pelety po solubilizaci (dráha 9). Uprostřed odděleno standardem molekulových hmotností ColorBurst (dráha 6). Šipkou je vyznačen proužek reduktasy.

Solubilizace (3) a (4)

Při solubilizaci (3) se část proteinu solubilizovat podařilo (viz dráha 2, Obrázek 20), přesto jej stále významná část zůstala v peletě. Při produkci (4) vzniklo velmi málo proteinu, proto ani solubilizace žádné pozitivní výsledky nepřinesla. (Vyhodnocování produkce (4) probíhalo současně s vyhodnocováním solubilizací.)



Obrázek 20: Solubilizace membránových frakcí z produkcí (3) a (4). Vlevo solubilizace (3): vzorek před solubilizací (dráha 1), vzorek supernatantu po solubilizaci (dráha 2), vzorek pelety po solubilizaci (dráha 3). Vpravo solubilizace (4): vzorek před solubilizací (dráha 5), vzorek supernatantu po solubilizaci (dráha 6), vzorek pelety po solubilizaci (dráha 7). Uprostřed odděleno standardem molekulových hmotností ColorBurst (dráha 4). Šipkou je vyznačen proužek reduktasy.

Pro další zpracování se nejlépe jevíly výsledky solubilizací (2) a (3).

5. Diskuse

Laboratoř, ve které práce vznikla, se zaměřuje na studium vlivu cizorodých látek (xenobiotik) na organismy, především pak na enzymy MFO systému a jeho interakce s nejrůznějšími xenobiotiky. Pro tyto studie je nutné vytvořit model MFO systému *in vitro*. Pokud jsou současně studovány interakce protein-protein, je vhodné použít pro model enzymy stejného organismu. Metoda heterologní exprese umožňuje vytvářet tyto modely i pro lidské enzymy. Tato práce se zabývá produkcí lidské NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy.

Dodaný plasmid pUC19 obsahující gen pro lidskou reduktasu optimalizovaný pro heterologní expresi byl namnožen pro další použití. Poté byl z tohoto plasmidu gen vyštěpen a přenesen do plasmidu pET22b. Ukázalo se, že po transformaci buněk tímto plasmidem jen jedna z osmi vybraných kolonií obsahovala vektor založený na plasmidu pET, v ostatních byl přítomen nejspíše konstrukt založený na plasmidu pUC. Toto bylo způsobeno nejspíše kontaminací při vyřezávání insertu z agarosového gelu, neboť proužek obsahující plasmid pUC byl v těsné blízkosti insertu. Při následné ligaci mohlo dojít k opětovnému začlenění insertu do plasmidu pUC a při transformaci byl tento produkt bakteriemi snáze přijímán z důvodu menší velikosti ve srovnání s vektorem založeným na plasmidu pET.

Získaným expresním vektorem byly transformovány buňky *E. coli* BL21-Gold a *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL. S buňkami kmene BL21-Gold byla provedena testovací exprese, která ukázala, že buňky lidskou reduktasu produkují a to při obou testovaných teplotách, 17 °C a 27 °C. Množství vzniklého proteinu bylo přímo úměrné teplotě i času.

Při první produkci proteinu při 27 °C se však vysoká produkce proteinu ukázala být problematickou, jelikož protein se nestihl správně složit, většina ho byla přítomna v inkluzních těliscích a jen velice malé množství v membránové frakci. Další krok tedy směřovat ke zpomalení exprese, konkrétně byla snížena teplota na 18 °C a byla použita 50-ti násobně snížená koncentrace IPTG při produkci proteinu. Díky těmto změnám se množství proteinu v membránové frakci výrazně zvýšilo, stále však výrazná část zůstávala v inkluzních těliscích. Další změny směřovaly k dalšímu snižování rychlosti produkce proteinu a ke zvětšení podílu membrán vzhledem k množství proteinu, aby byla zvýšena šance na správné zabudování proteinu do membrány. Konkrétně byly použity buňky *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL, pro něž nebyl gen optimalizován, což produkci zpomaluje, a indukce exprese pomocí IPTG byla provedena až po dosažení vysoké optické density

buněčné kultury. Výsledky následující produkce se od předchozích nijak výrazně nelišily, podmínky produkce pravděpodobně stále neumožňovaly správné skládání proteinu, proto bylo přistoupeno k radikálnějším změnám. Produkce probíhala při 18 °C pouhé 4 hodiny, optická densita v okamžiku indukce byla ve srovnání s ostatními produkcemi nejvyšší. Došlo k výraznému snížení produkce reduktasy do inkluzí, to však problém zcela nevyřešilo, neboť množství reduktasy v membránové frakci bylo nedetekovatelné.

Solubilizace jednotlivých membránových frakcí probíhaly velmi obtížně, obvykle většina proteinu zůstala v nesolubilizované peletě. Toto mohlo být způsobeno tím, že izolované membránové frakce byly kontaminovány inkluzními tělísky, z nichž není možné protein solubilizovat. Pouze ve 2 případech se podařilo solubilizovat takové množství reduktasy, které bylo viditelné na SDS elektroforese.

Zdá se tedy, že největším problémem heterologní exprese lidské reduktasy s využitím optimalizovaného vektoru je velice rychlá produkce pravděpodobně způsobující hromadění proteinu v inkluzních tělískách. V navazujících experimentech se plánuje využít kompetentní buňky obsahující chaperoniny „ArcticExpress (DE3) Competent Cells“ vykazující vysokou aktivitu také při nízké teplotě, při které produkce reduktasy probíhá.

6. Závěr

Výsledky uvedené v práci odpovídají vytyčeným cílům a lze je shrnout následovně:

1. Bylo ověřeno, že dodaný plasmid pUC19 nese inzert odpovídající genu pro nativní formu lidské NADPH:cytochrom P450 reduktasy, tento vektor pak byl izolován v dostatečném množství a čistotě.
2. Byl připraven, ověřen a izolován expresní plasmid založený na vektoru pET22b, nesoucí výše zmíněný syntetický gen.
3. Byla provedena částečná optimalizace exprese nativní lidské NADPH:cytochrom P450 reduktasy v *E. coli*.

Předkládaná bakalářská práce přináší výsledky, které rozšiřují metodiku heterologní exprese zavedenou v laboratoři, a směřuje k přípravě lidské formy NADPH:cytochrom P450 reduktasy v množství dostatečném pro metabolické studie využívající rekombinantní lidské enzymy MFO systému. Práce zároveň přispívá k řešení grantu Grantové agentury České republiky 203/09/0812a výzkumného záměru MSM0021620808.

7. Seznam použité literatury

1. Stiborova, M., Hudecek, I., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy*. **93**, 229-237.
2. Mathers, C., Fat, D.M., Organization, W.H., Boerma, J.T. (2008) *The global burden of disease: 2004 update* (World Health Organization).
3. Stiborová, M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. *I. Multioborový seminář „Otevřená věda“ Praha*.
4. Sheweita, S.A. (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr. Drug Metab.* **1**, 107-132.
5. Lee, R.F. (1998) Annelid cytochrome P-450. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**, 173-179.
6. Dürr, U.H.N., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b5 and their reductases--promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**, 3235-3259.
7. Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70-83.
8. Guengerich, F. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611-650.
9. Hendrychova, T., Anzenbacherova, E., Hudecek, J., Skopalik, J., Lange, R., Hildebrandt, P., Otyepka, M., Anzenbacher, P. (2011) Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: Molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins & Proteomics.* **1814**, 58-68.
10. Omura, T., Sato, R. (1964) Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes .I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
11. Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M.G., Maltais, L.J., Wain, H.M., Nebert, D.W. (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* **14**, 1-18.
12. Kumar, S., Halpert, J.R. (2005) Use of directed evolution of mammalian cytochromes P450 for investigating the molecular basis of enzyme function and generating novel biocatalysts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 456-464.

13. Evans, W.E., Relling, M.V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. **286**, 487-491.
14. Ingelman-Sundberg, M., Sim, S.C. (2010) Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 90-94.
15. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**, 128-145.
16. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008) *Lehninger principles of biochemistry* (W.H. Freeman).
17. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S., Kim, J.J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8411-8416.
18. Laursen, T., Jensen, K., Møller, B.L. (2011) Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 132-138.
19. Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I.L., Huang, W.-C., Grossmann, J.G., Roberts, G.C.K. (2009) Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J. Biol. Chem.* **284**, 36628-36637.
20. Shen, A.L., Kasper, C.B. (1995) Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **270**, 27475-27480.
21. Hubbard, P.A., Shen, A.L., Paschke, R., Kasper, C.B., Kim, J.J. (2001) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hydride and electron transfer. *J. Biol. Chem.* **276**, 29163-29170.
22. Poulos, T., Raman, C., Li, H. (1998) NO news is good news. *Structure*. **6**, 255-258.
23. Rosypal, S. (2003) *Nový přehled biologie* (Scientia).
24. Raclavský, V. URL: <http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm> [Přístup květen 31, 2011].

