

Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Vliv optimalizace genu na rekombinantní expresi lidského cytochromu P450
3A4
Effect of gene optimization on recombinant expression of human cytochrome
P450 3A4

Diplomová práce

Bc. Barbora Svobodová
Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto 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, 26.4.2012

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D., za jeho vedení, trpělivost a poskytnutou podporu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Věře Černé Ph.D., za její rady a poskytnutý materiál. Také chci poděkovat Mgr. Janu Milichovskému a Bc. Marii Kostelanské za ochotu a trpělivost při zaučování do metod molekulární biologie.

Děle děkuji všem členům Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí plného dobrých rad a inspirace.

Abstrakt:

Cytochrom P450 3A4 je integrální protein vyskytující se v membráně endoplasmatického retikula. U člověka se v nejvyšší míře vyskytuje v jaterní tkáni. Je důležitým enzymem metabolismu xenobiotik. V procesech biotransformace přeměňuje zhruba polovinu všech používaných léčiv.

Hlavním cílem diplomové práce bylo ověřit vliv genové optimalizace na heterologní expresi lidského cytochromu P450 3A4. Při řešení práce byly nejprve připraveny a ověřeny expresní konstrukty založené na vektoru pET22b. Byla porovnána efektivita exprese zkrácené formy zájmového proteinu za použití syntetického genu optimalizovaného pro produkci v hostitelském organismu odvozeném od parentálního kmene K-12 vůči produkci stejně zkráceného cytochromu P450 3A4 v témže vektoru ovšem s originálním lidským genem získaným z cDNA. Bylo potvrzeno, že optimalizace nukleotidové sekvence genu pro hostitelský organismus *E. coli* skutečně činnost exprese zkrácené formy proteinu zvyšuje, i když množství aktivní formy proteinu nedosahuje výtěžků obvyklých u jiných netoxických solubilních proteinů.

Kromě toho byl učiněn pokus o produkci kompletní nezkrácené formy lidského cytochromu P450 3A4 v expresním vektoru pET22b. Množství této formy proteinu přítomné v bakteriální membránové frakci však bylo ve srovnání se zkrácenou formou mnohem nižší.

Klíčová slova: cytochrom P450 3A4, heterologní exprese, pET22b, genová syntéza

Abstract:

Cytochrome P450 3A4 is integral membrane protein residing in endoplasmic reticular membrane. In human the highest concentration cytochrome P450 3A4 is expressed in liver, where it plays a major role in metabolism of many drugs and xenobiotics.

The main aim of the thesis was to evaluate the effect of gene optimization on heterologous expression of human cytochrome P450 3A4. At first expression constructs based on vectors pET22b were prepared. Then the efficiency of heterologous expression of optimized vs. natural gene sequence encoding truncated form of the human cytochrome P450 3A4 compared. The results show that the gen sequence optimized for *E. coli* strains K12 was expressed in significantly higher efficiency than the original human gene based on cDNA sequence.

Another aim was to evaluate the suitability of pET22b based expression vectors for recombinant production of native (complete) form of human cytochrome P450 3A4. The amount of native form of the protein found in bacterial membrane was however substantially lower then that of the truncated form.

Keywords: cytochrome P450 3A4, heterologous expression, pET22b, gene synthesis

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1. Úvod.....	10
1.1 MFO SYSTÉM	10
1.2 CYTOCHROMY P450.....	11
1.2.1 Nomenklatura cytochromů P450.....	12
1.2.2 Lokalizace cytochromů P450.....	13
1.2.3 Mechanismus katalýzy CYP.....	14
1.3 ISOFORMY LIDSKÉ PODRODINY CYP3A.....	15
1.3.1 CYP3A4.....	16
1.3.2 CYP3A5.....	17
1.3.3 CYP3A7.....	17
1.3.4 CYP3A43.....	18
1.4 STRUKTURA LIDSKÉHO CYP3A4.....	18
1.5 REKOMBINANTNÍ EXPRESE	20
1.5.1 Klonovací vektor - plasmid pUC19.....	21
1.5.2 Expresní plasmid pET22b.....	23
1.6 cDNA.....	24
1.7 PREFERENCE GENETICKÉHO KÓDU.....	25
2. Cíl diplomové práce	26
3. Materiál a metody	27
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	27
3.2 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	28
3.2.1 Použité roztoky	29
3.2.2 Použité enzymy	31
3.2.3 Použité bakteriální kmeny	31
3.2.4 Použité vektory	31
3.3 METODY	32
3.3.1 Příprava agarových ploten.....	32
3.3.2 Příprava roztoku DNA.....	32
3.3.3 Transformace buněk <i>E. coli</i>	32
3.3.4 Kultivace buněk <i>E. coli</i> metodou „single-cell colony“.....	33
3.3.5 Izolace plasmidové DNA-minipreparace (JETquick-Plasmid miniprep Spin Kit).....	33
3.3.6 Izolace plasmidové DNA fenol-chloroformovou metodou.....	34

3.3.7	<i>Polymerasová řetězová reakce – PCR</i>	36
3.3.8	<i>Štěpení DNA pomocí endonukleas EcoRI a HindIII</i>	36
3.3.9	<i>Štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a NdeI</i>	37
3.3.10	<i>Agarosová elektroforéza</i>	38
3.3.11	<i>Izolace DNA z gelu-JETquik Gel Extraction Spin Kit</i>	38
3.3.12	<i>Ligace</i>	39
3.3.13	<i>Kultivace buněk E. coli ve velkém objemu</i>	40
3.3.14	<i>Indukce exprese</i>	40
3.3.15	<i>Sklízení buněk</i>	40
3.3.16	<i>Izolace membránové frakce</i>	41
3.3.17	<i>SDS-PAGE elektroforéza</i>	42
3.3.18	<i>Westernův přenos</i>	43
3.3.19	<i>Stanovení koncentrace cytochromů P450 a P420</i>	45
3.3.20	<i>Stanovení koncentrace a čistoty DNA</i>	46
4.	Výsledky	47
4.1	SYNTETICKÝ ZKRÁCENÝ GEN PRO LIDSKÝ CYP3A4.....	47
4.1.1	<i>Amplifikace insertu obsahujícího syntetický gen pro CYP3A4</i>	48
4.1.2	<i>Příprava expresního vektoru</i>	49
4.1.3	<i>Exprese zkrácené formy cytochromu P450 3A4 v E. coli</i>	49
4.2	PŘIROZENÝ ZKRÁCENÝ GEN PRO LIDSKÝ CYP3A4 ZÍSKANÝ Z CDNA.....	53
4.2.1	<i>Příprava expresního vektoru</i>	54
4.2.2	<i>Exprese cytochromu P450 3A4 E. coli BL-21 Codon plus (DE3)-RIL</i>	56
4.3	PŘIROZENÝ GEN PRO LIDSKÝ CYP3A4 Z CDNA.....	58
4.3.1	<i>Příprava expresního vektoru</i>	59
4.3.2	<i>Exprese nezkrácené formy cytochromu P450 3A4 v E. coli</i>	60
4.4	STANOVENÍ KONCENTRACE CYTOCHROMŮ P450.....	64
5.	Diskuse	65
6.	Závěr	69
7.	Seznam literatury	70

Seznam zkratek

BCIP/NBT	z anglického („5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium chloride“)
bp	páry bazí („base pairs“)
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
D	kyselina asparagová
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E	kyselina glutamová
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
EST	esterasy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FMO	flavinové monooxygenasy
Fw	přední („forward“)
GTE	pufr obsahující glukosu, Tris-HCl, EDTA
I	isoleucin
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
kb	kilobáze
K-AC	roztok obsahující octan draselný a kyselinu octovou
L	leucin
LB médium	Luria-Broth médium, růstové médium
MAO	monoaminoxidasy
MFO	systém oxidas se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid
NAT	N-acetyltransferas
PBS	pufr obsahující Na ₂ HPO ₄ ; NaH ₂ PO ₄ , NaCl („Phosphate Buffered Saline“)

PCR	polymerasová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
Phe	fenylalanin
PVDF	polyvinyliden fluorid
R	arginin
RH	substrát (zde nepolární xenobiotikum)
RPM	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
rv	zadní („reverse“)
S	serin
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrilamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SR	receptor pro částici rozpoznávající signál („signal recognition“)
SRP	částice rozpoznávající signál („signal recognition particle“)
TAE	pufr obsahující Tris, octovou kyselinu a EDTA („Tris, acetic acid, EDTA“)
TB médium	Terrific Broth médium, růstové médium
TBE	TRIS-borát-EDTA
TE	roztok obsahující Tris-HCl a EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSE	pufr obsahující Tris-acetát, sacharosu a EDTA
UGT	UDP-glukuronyltransferasy
v/v	objem látky v mililitrech ve 100 ml („volume/volume“)
w/v	počet gramů látky ve 100 ml roztoku („weight/volume“)
δ ALA	δ-aminolevulová kyselina

1. Úvod

S rozmachem nových technologií se zvyšuje také podíl cizorodých látek (xenobiotik) v životním prostředí. Tyto látky jsou produkovány a využívány v průmyslu a zemědělství. Většina z nich jsou potenciálně škodlivé chemické sloučeniny, které se mohou akumulovat v prostředí, čímž narušují ekosystém, nemluvě o neblahém vlivu na lidské zdraví.

Mezi nejčastější polutanty životního prostředí patří například aromatické aminy, fenolické látky, nitrosloučeniny a průmyslová barviva [1]. Mnohé z nich jsou chemické karcinogeny, tedy látky způsobující nebo napomáhající vzniku rakovinného bujení. Tento proces vzniká reakcí karcinogenů s DNA, kde následně vznikají genetické změny. Mnoho karcinogenů se stává nebezpečnými až po metabolické aktivaci. Xenobiotika stejně jako karcinogeny podstupují po vstupu do organismu biotransformační reakce [2]. Jejich cílem je detoxikovat transformací škodliviny na metabolity, které je možné z těla snadněji vyloučit.

Tento proces zahrnuje dvě fáze. První je derivatizační, při které se k molekule xenobiotika připojí reaktivní skupina (oxidace, redukce, dehydratace...). Ve druhé-konjugační fázi dochází ke spojení modifikované molekuly xenobiotika s polární endogenní sloučeninou (glutathion, acetylkoenzym A, kyselina glukuronová aj.). Takto modifikovaná xenobiotika jsou snadněji vyloučena z organismu, nejčastěji žlučí nebo močí.

Na první fázi biotransformace cizorodých látek se majoritně podílí enzymy cytochromy P450 [1,2,3,4].

1.1 MFO systém

Systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém) se vyskytuje ve všech žijících organismech. Hraje důležitou roli při metabolismu exogenních složek a to konkrétně při derivatizační fázi biotransformace. Uplatňuje se například při biotransformaci exogenních látek jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, pesticidy aj., konkrétně se jedná o jejich oxidaci, přičemž je jeden atom molekulárního kyslíku

inkorporován do molekuly xenobiotika v podobě hydroxylové skupiny nebo oxoskupiny a druhý atom je redukován na molekulu vody. Toto se odehrává v aktivním centru cytochromu P450, který je terminální oxydasou monooxygenasového systému. MFO tedy funguje jako elektron transportní řetězec, přičemž je redukční ekvivalent přenesen z NADPH na terminální oxydasu, tedy cytochrom P450 [5,6].

MFO systém je lokalizován v membráně endoplazmatického retikula nebo ve vnitřní membráně mitochondrií. Jeho složkami jsou hemthiolátový protein cytochrom P450 (CYP), flavoproteinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa, která má úlohu děliče elektronového páru a zároveň elektrony do systému dodává, a membrána, která zajišťuje správnou orientaci jednotlivých komponent. Součástí systému je také cytochrom b₅ se svojí NADH:cytochrom b₅ reduktasou, který má pouze fakultativní funkci a jeho přítomnost nemá zásadní vliv na práci systému [7]. Cytochrom b₅ může být redukován i NADPH:cytochrom P450 reduktasou [8].

U bakterií je MFO systém lokalizován v cytoplazmě, tím pádem je solubilní [7].

1.2 CYTOCHROMY P450

V padesátých letech minulého století byla objevena Martinem Klingenbergem nová třída proteinů s enzymatickou aktivitou. Tento německý vědec si všiml širokého absorpčního pásu při vlnové délce 450 nm, který protein vykazuje v redukované formě v přítomnosti oxidu uhelnatého [5,9,10].

Později v roce 1962 byl Ryo Satem a Tsuneo Omurou tento pigment charakterizován jako nový mikrosomální hemoprotein a jimi byl též pojmenován jako cytochrom P450 [11].

Cytochromy P450 se vyskytují ve všech formách života, jak ukazuje tabulka 1. Pravděpodobně se vyvinuly z jednoho genu, který dal vzniknout prvnímu cytochromu P450 a to u předchůdců prokaryot zhruba před 3,5 miliony let.

Jen u člověka bylo dodnes přečteno 57 aktivních genů kódujících 18 rodin a 43 podrodin cytochromů P450 [12,13].

1.2.1 Nomenklatura cytochromů P450

Název cytochrom má kořeny v řeckém jazyce. Počátek slova „*cyto*“ odráží lokalizaci v buňce a „*chrome*“ zase fotochemické vlastnosti. Značení P450: písmeno **P** je počáteční písmeno slova pigment, číslo **450** značí vlnovou délku, při které má redukováná forma proteinu v komplexu s CO absorpční maximum [14,10].

V různých živočišných druzích bylo identifikováno velké množství isoform a isoenzymů cytochromů P450. Pro lepší orientaci bylo nutné rozdělit cytochromy P450 do rodin a podrodin na základě homologie jejich aminokyselinové sekvence.

Rodina zahrnuje cytochromy P450, které mají homologii primární struktury proteinu vyšší než 40 %, do jedné podrodiny patří ty s homologií vyšší než 60 %.

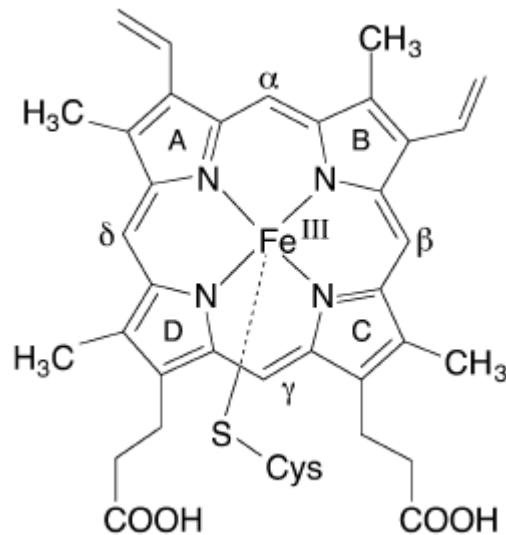
Konkrétní rodina je označena arabskou číslicí za zkratkou P450, podrodina je charakterizována velkým písmenem a nakonec je použita arabská číslice náležící příslušnému isoenzymu. Čili isoforma P450 3A4 náleží do rodiny 3, podrodiny A.

Pro další usnadnění byla zavedena Nebertem a kol. v roce 1987 zkratka CYP, která označuje formu cytochromů **P**450. Lze tedy použít nejen názvu cytochrom P450 3A4, ale i CYP3A4 [15,16,17].

Tab. 1. Počet cytochromů P450 a jejich rodin u jednotlivých forem života (rok 2010) Upraveno z [12,13].

Organismus	Počet rodin CYP	Počet CYP
Obratlovci	18	1461
Rostliny	126	4267
Houby	399	2784
Bakterie	333	1042
Archebakterie	13	26
Viry	2	2

Cytochromy P450 jsou hemthiolátové proteiny obsahující hemovou prostetickou skupinu (obrázek 1) vázanou železitým iontem porfyrinového skeletu přes -SH skupinu cysteinu [14]. Aminokyselinová sekvence v okolí vazby prostetické skupiny je pro různé isoformy cytochromů P450 stejná i přes poměrně nízkou substrátovou specifitu, což dokázala rentgenová krystalografie [18,19].



Obr. 1 Hem (ferri-protoporfyrin IX)
Prostetická skupina cytochromů P450. Převzato z [14]

1.2.2 Lokalizace cytochromů P450

Převážná většina cytochromů P450 je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula (ER). Jsou to integrální proteiny [20]. Můžeme je ovšem najít i ve vnitřní membráně mitochondrií [21]. U rostlin nebyla prokázána přítomnost cytochromů P450 v mitochondriích, z čehož lze předpokládat, že lokalizace v mitochondriální membráně je evolučně podmíněna.

O umístění do zmíněných buněčných kompartmentů rozhoduje primární struktura proteinu na jeho N-terminálním úseku. Mikrosomální cytochromy jsou syntetizovány na ribozomech vázaných k drsnému ER, naopak ty mitochondriální syntetizují volné ribozomy jako preproteiny, které jsou po odštěpení úseku na N-terminálním konci uvolněny do cytoplazmy a specificky transportovány do mitochondrií.

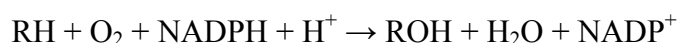
Takzvaná "cílová sekvence" na N-konci mikrosomálních CYP určuje lokalizaci v ER a také kotví složený protein v jeho membráně [22,23,24]

Tato sekvence je rozpoznána SRP (*signal recognition particle*) ribonukleoproteinem, který odpovídá za inkorporaci CYP do mikrosomální membrány. SRP se váže na SR (*signal recognition*) receptor, který je na povrchu ER [25]. Sekvence obsahuje hydrofobní aminokyseliny, kterým předchází záporně nabitě aminokyseliny, a za ní následuje krátký úsek bohatý na prolin. Takové uspořádání zajišťuje správnou topologii v membráně ER

(N-terminální konec na straně lumen a C-terminální konec na cytoplazmatické straně ER) [24,23,26].

1.2.3 Mechanismus katalýzy CYP

Monooxygenasovou reakci katalyzovanou cytochromem P450 shrnuje tato rovnice:



CYP obsahuje v nativním stavu hemovou prostetickou skupinu s atomem železa ve ferri formě (oxidační číslo III) v hexakoordinovaném (nízkospinovém) stavu. Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je vázán přes síru cysteinu v aktivním centru CYP, čili atom síry tvoří pátý ligand železa v protoporfyrinu IX. Šestáým ligandem je molekula vody.

Jakmile vstoupí molekula substrátu (RH) do aktivního centra, dochází k odštěpení molekuly vody a atom železa se stává pentakoordinovaným (vysokospinovým). Zároveň je na základě elektrostatických sil atom železa přitahován cysteinem z roviny protoporfirynu IX, čímž se komplex stává dobrým elektronovým akceptorem (1).

Příjmem elektronu z NADPH:CYP reductasy se redukuje železo na Fe^{2+} (ferro-formu), přičemž zůstává v pentakoordinovaném stavu (2).

Na takto redukované železo se může vázat molekulární kyslík, čímž vzniká oxo-ferri komplex (v tomto kroku je možná vazba CO). Tím vzniká hexakoordinovaný stav s atomem železa Fe^{3+} . Tento intermediát je pravděpodobně poslední stabilní meziprodukt reakčního cyklu (3).

V následujícím kroku dochází k redukci druhým elektronem buď z NADPH:CYP reductasy nebo z NADH:cytochrom b_5 reductasy. Tím vzniká peroxo-ferri forma (4), která je následně protonována a vzniká tak hydroperoxo-ferri forma (5a).

Poté dochází k hydrolýze vazby mezi atomy kyslíku (redukci atomu kyslíku vzdálenějšího od atomu železa). Vzniká tak „sloučenina I“ - oxo-ferryl intermediát a voda (5b).

V dalším kroku dochází k inkorporaci atomu kyslíku do molekuly substrátu (6).

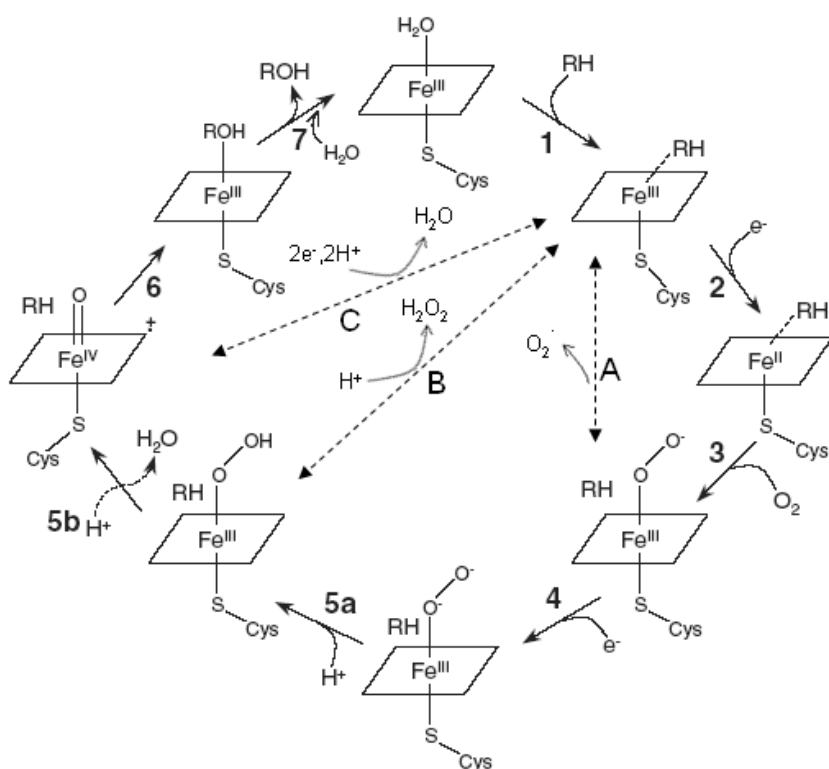
Poslední reakce cyklu je oxygenace substrátu a jeho uvolnění (7).

Popsaná podoba meziproduktů druhé poloviny cyklu je pouze domnělá, zatím není experimentálně potvrzena.

Kromě popsanych reakcí se v cyklu vyskytují další tři zpětné reakce. Jednak může dojít ke vzniku superoxidového aniontu při autooxidaci oxo-ferri formy, přičemž vzniká pentakoordinovaná ferro-forma (A).

Dále je možná disociace peroxidu vodíku z atomu železa a to v případě, že se vodík naváže na neprotonizovaný kyslík (B).

V posledním případě se jedná o oxidaci kyslíku vázaného v oxo-ferryl meziprojektu na vodu, přičemž pak není zapojen do oxygenace substrátu (C) [1,27,16].

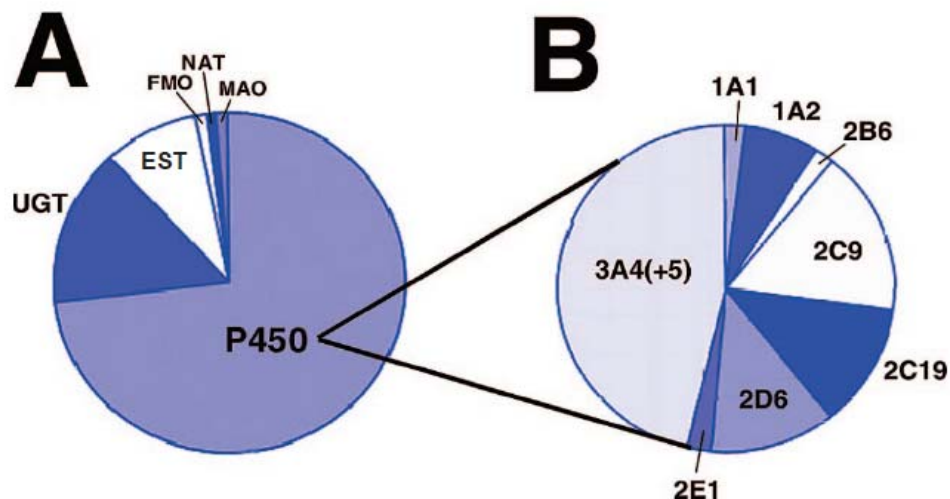


Obr. 2 Reakční mechanismus cytochromů P450.
Převzato a upraveno z [27].

1.3 Isoformy lidské podrodiny CYP3A

Klíčovými enzymy metabolismu léčiv a xenobiotik jsou cytochromy P450. Nejvíce se uplatňují rodiny 1, 2 a 3. Jejich důležitost znázorňuje obrázek 3. Konkrétně rodina 3 se primárně uplatňuje při metabolismu léčiv. Má jednu podrodinu – A, 4 geny (CYP3A4,

CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43) a 2 pseudogeny (CYP3A5P1 a CYP3A5P2) [28]. Geny pro lidskou CYP3A podrodinu jsou lokalizovány na 7. chromosomu [29,30].



Obr. 3 Zastoupení cytochromů P450 v metabolismu léčiv.

A znázorňuje zastoupení enzymů metabolizujících léčiva (prvních 200 předepisovaných v USA). FMO-flavinové monooxygenasy, NAT-N-acetyltransferasy, UGT–UDP-glukuronyltransferasy, EST – esterasy, MAO – monoaminoxidasy.

B znázorňuje podíl jednotlivých CYP na metabolismu léčiv.

Převzato z [31].

1.3.1 CYP3A4

Ze všech isoformů podrodiny 3A je nejvíce zastoupena forma CYP3A4. Například v ledvinách tvoří 95 % CYP3A právě CYP3A4 [32].

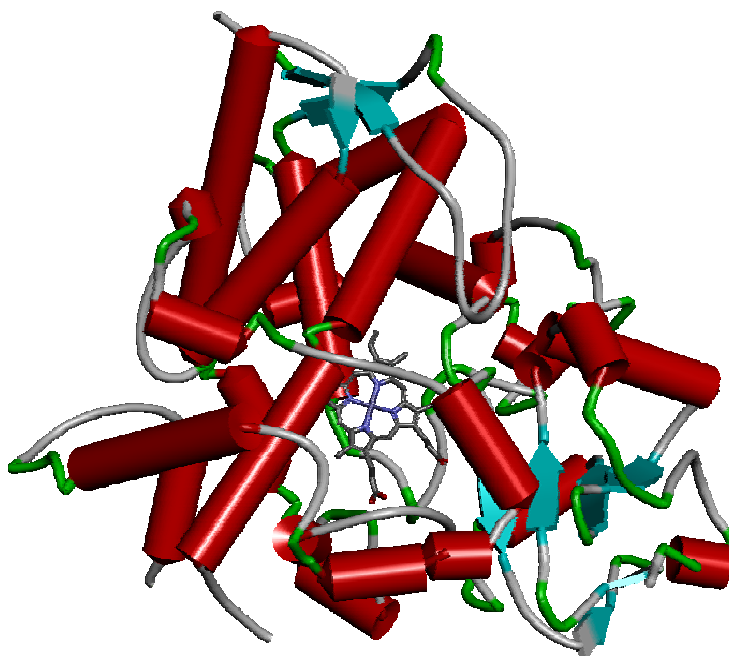
Nejhojněji je CYP3A4 zastoupen v membráně hladkého endoplazmatického retikula v jaterní tkáni, dále pak v plicích a tenkém střevě ovšem zde se nenachází v takové míře. Cytochromy podrodiny 3A, kromě CYP3A4, byly identifikovány také v ledvinách a varlatech [18].

Činnost CYP3A4 může být stimulována cytochromem b_5 v závislosti na substrátu. Tento efekt se ovšem liší u CYP3A5 [33].

Sekvenací oblasti genu kódující CYP3A4 bylo objeveno celkem 28 jednobodových mutací tzv. „*single nucleotide polymorphism*“. Tyto mutace byly zkoumány celkem na 72 jednotlivcích příslušejících do 3 rozdílných rasových skupin. Nejnižší frekvence výskytu

jednobodových mutací byla zaznamenána u bělochů, naopak nejvyšší byla zaznamenána u Afričanů [34].

Molekula cytochromu P450 3A4 je na následujícím obrázku 4.



Obr. 4 Struktura CYP3A4

navržená dle koordinát PDB kód 1TQN RNDr. Václavem Martínkem, Ph.D.

1.3.2 CYP3A5

U 20 pacientů ve věkovém rozmezí 42 – 79 let v zastoupení obou pohlaví byla zkoumána míra exprese mRNA isoform CYP podrodiny 3A v gastrointestinálním traktu. V žaludku se nejvíce exprimují mRNA isoformy 3A4 a méně isoformy 3A5. Stejně je to v tenkém střevě [35].

V plicní tkáni je nejhojněji zastoupena forma CYP3A5. (Kouření cigaret inhibuje zatím neznámým mechanismem jeho expresi) [36]. CYP3A5 je zastoupen také v ledvinách, prostatě a hypofýze [32,37,38].

1.3.3 CYP3A7

Isoforma CYP3A7 je exprimována již v 50. - 60. dni fetálního období jedince a u dospělých se téměř nevyskytuje [18,33]. CYP3A7 byl detekován v játrech, ledvinách a

plicích u lidského plodu, přičemž nejvíce je zastoupen v játrech. Už v prvním týdnu života rapidně klesá množství CYP3A7 a u dospělého jedince tvoří tato isoforma pouze zanedbatelné množství cytochromů P450 v mikrosomech jaterní tkáně [18,39,40].

1.3.4 CYP3A43

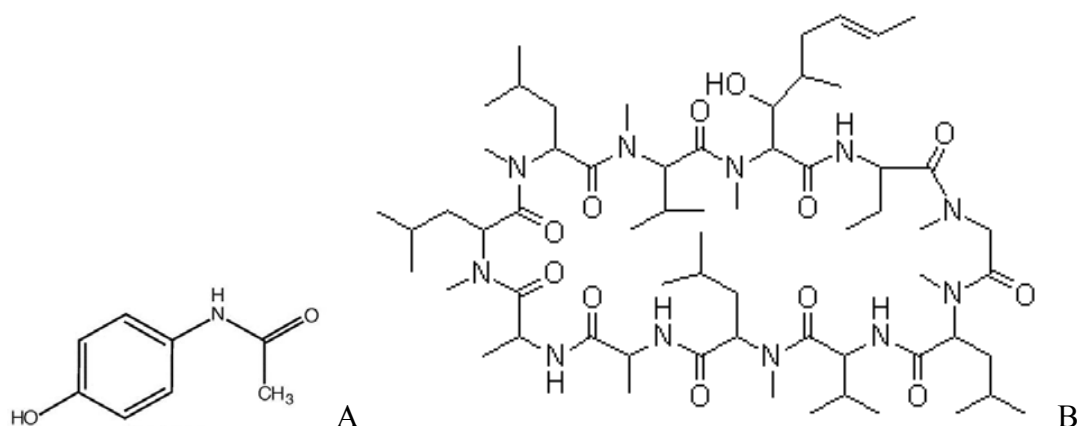
V roce 2001 byla identifikována isoforma CYP3A43. Nejvyšší míra exprese mRNA CYP3A43 probíhá v prostatě, poměrně vysoká je i v játrech a testes [18,41,42]. Bylo prokázáno, že aktivní forma CYP3A43 je chimérická a vzniká spojením exonu 1 genu CYP3A43 a exonů 2-13 genu pro CYP3A4 [29].

Obecně je substrátová specifita všech isoform podrodiny CYP3A podobná [43].

1.4 Struktura lidského CYP3A4

Z výzkumu metabolismu CYP3A4 vzešel předpoklad, že enzym může mít aktivní místo s kapacitou až na tři molekuly substrátu [33].

Aktivní místo enzymu může pojmout acetaminofen – paracetamol (široce rozšířené antipyretikum), který má M_r 151 [44] a stejně tak je schopen metabolizovat i cyklosporin (imunosupresivum) se znatelně vyšší M_r 1201 [45]. Vzorce obou sloučenin jsou zachyceny na obrázku 5.



Obr. 5 Vzorec acetaminofenu (A) a cyklosporinu (B)
Převzato z [46,47].

Při navázání více než jednoho substrátu do aktivního místa nevykazuje enzym kinetiku Michaelise a Mentenové. Tato skutečnost je zřejmě zodpovědná za netypickou kinetiku CYP3A4 [48]. Má také vazebné místo pro efektor, který je schopen ovlivnit katalytickou aktivitu enzymu. V tomto modelu obsazují substrát a efektor odlišná místa, přičemž k reaktivnímu kyslíku má přístup pouze substrát. Aktivní místo je schopné vázat dva až 3 substráty [49,50,51]. Můžeme rozeznat 3 různé konformace CYP3A4 a to v přítomnosti substrátu, v přítomnosti efektoru a inhibitoru. To poukazuje na skutečnost, že se jedná o allosterický enzym.

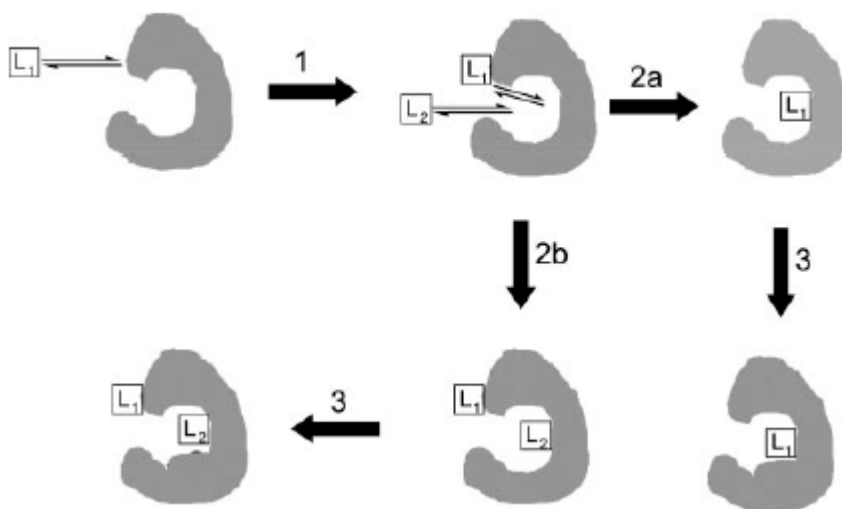
V oblasti nad aktivním centrem je dutina tvořená z fenylalaninů konkrétně z Phe²¹³, Phe²¹⁵, Phe¹⁰⁸, Phe²¹⁹, Phe²²⁰, Phe²⁴¹ a Phe³⁰⁴. Tuto dutinu, která má vliv na metabolismus některých substrátů, má pouze CYP3A4. Při záměně Phe¹⁰⁸ jinou (menší nebo větší) aminokyselinou byla prokázána změna v metabolismu a to sice pokles enzymové aktivity [50]. Dutina tvořená z fenylalaninů je vazbou substrátu do aktivního místa rozrušena [48].

Poměrně široká substrátová specifita je dána přítomností fenylalaninové dutiny. CYP2C9, který dutinu nemá, má sice větší aktivní místo než CYP3A4, ovšem nevykazuje tak širokou substrátovou specifitu [50]. CYP2C8 má podobnou kapacitu aktivního místa jako CYP3A4, ovšem dutina aktivního místa CYP3A4 je v okolí hemového železa větší. Přes tuto nevelkou strukturální odlišnost aktivního centra je substrátová specifita CYP3A4 značně širší.

Poměrně velká dutina blízko katalytického centra enzymu zodpovídá za heterotropní kooperativitu tohoto enzymu [52].

Enzymová reakce savčích cytochromů P450 probíhá ve dvou krocích [53]. Tomu se ovšem vymyká cytochrom P450 3A4. Studium vazby bromocriptinu (agonista dopaminu, léčivo používané při onemocnění diabetu 2. typu a při Parkinsonově chorobě) na CYP3A4 potvrdilo, že se jedná o tři možná i vícekrokovou reakci.

Následující obrázek 6 znázorňuje pravděpodobné modely vazby substrátu na CYP3A4. V prvním kroku se substrát (L_1) naváže do místa vzdálenějšího od hemu (1), následně je tato molekula přenesena k hemu, což způsobí přechod molekuly železa z nízkospinového do vysokospinového stavu (2a), nebo může dojít k vstupu druhé molekuly substrátu (L_2) do aktivního místa a interakci s hemem (2b), zatímco první molekula substrátu je stále v poloze vzdálené od hemu. Poslední třetí krok zahrnuje konformační změnu aktivního místa enzymu (3) [54].



Obr. 6 Pravděpodobný model vazby substrátu na CYP3A4
Převzato z [54].

1.5 Rekombinantní exprese

Donedávna bylo možné studovat pouze ty proteiny, které se vyskytovaly v buňce ve velkém množství. Cesta jeho získání z konkrétní tkáně byla poměrně náročná. Dnes můžeme zkoumat proteiny, jež tvoří jen zlomek hmotnosti buňky, a to díky nástrojům

molekulární biologie. Jedním z nich je i rekombinantní exprese, která poskytuje velké množství požadovaného proteinu.

Jedná se o metodu, při které dochází v hostitelské buňce k expresi rekombinantních genů, které se v ní přirozeně nevyskytují. Rekombinantní gen vzniká spojením požadovaného úseku DNA s vektorem, tím je bakteriální plasmid (cirkulární dvouřetězcová molekula DNA schopná samostatné replikace nezávisle na replikaci chromosomální DNA). V této práci jsem jako hostitelský organismus použila bakteriální buňky *Escherichia coli*.

Tyto bakterie se vyskytují u člověka v tenkém střevě. Patří k nejdůkladněji prostudovaným mikroorganismům [55,56]. Jsou nenáročné na pěstování v laboratorních podmínkách a poskytují vysoký výtěžek exprese požadovaného proteinu za poměrně nízké náklady. Ve srovnání s jinými expresními systémy je snadné rozrušit buněčnou strukturu a purifikovat protein [57].

1.5.1 Klonovací vektor - plasmid pUC19

Pojem klonování označuje proces, který umožňuje vytvořit velké množství molekul rekombinantní DNA z malého množství výchozího materiálu. Dále tento termín označuje purifikaci rekombinantní DNA.

Klonovací vektor musí být relativně malý nejlépe do velikosti 10 kb, protože větší molekuly mají sklon se při purifikaci lámat, takže se s nimi špatně manipuluje [55].

Ve své diplomové práci jsem použila tento vysocekopiový plasmid pro namnožení požadovaného genu.

Pojmenování pUC se odvíjí od standardních pravidel pro názvosloví vektorů:

- „p“ říká, že se jedná o plasmid
- „UC“ označuje umístění laboratoře, kde byl tento plasmid konstruován - University of California [55,58]

Tento malý plasmid o velikosti 2686 bp má vysoký počet kopií v buňce. V rozmezí teplot 37 - 42°C se jedná o 75 až více než 200 plasmidů na jednu buňku [59].

Obsahuje pouze dva geny. První kóduje enzym β -laktamasu, ta mění ampicilin na netoxickou formu, což zajišťuje rezistenci proti tomuto antibiotiku. Druhý gen *lacZ'* (*lacZa*) nese informaci pro tvorbu α -úseku β -galaktosidasy. Tento enzym štěpí laktosu na glukosu a galaktosu a v bakteriích *E. coli* vzniká přirozeně expresí genu *lacZ*. Některé

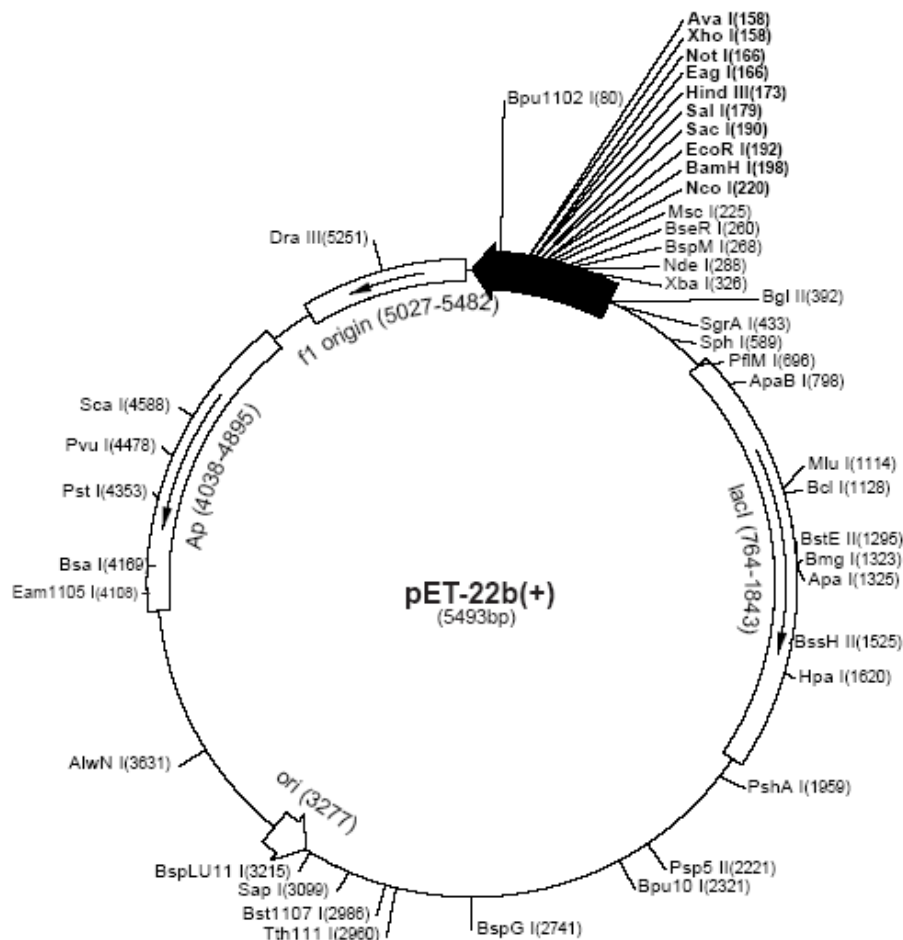
1.5.2 Expresní plasmid pET22b

Při rekombinantní expresi CYP3A4 byl použit tento expresní plasmid, který byl navržen pro klonování a expresi rekombinantních proteinů v bakteriích *E. coli*. Jeho velikost je 5493 bp. Mapu restrikčních míst plasmidu popisuje obrázek 8 [60].

Název tohoto expresního vektoru napovídá, že se jedná o plasmid využívající T7 expresní systém - „plasmids for expression by T7 RNA polymerase“. Gen pro T7 RNA polymerasu se v bakteriích nevyskytuje, proto do nich musí být integrován gen pro tuto polymerasu z bakteriofága T7 jako profág DE3 [61]. Do plasmidu byl vložen také *lac* promotor a to před úsek obsahující gen pro T7 RNA polymerasu. Díky tomu lze zahájit po přidání IPTG translaci genu pro T7 RNA polymerasu, která může následně exprimovat cílový gen, jenž je umístěn za T7 promotorem [60].

T7 RNA polymerasa je velice aktivní ve srovnání s RNA polymerasou, která se přirozeně vyskytuje v bakteriích. Zhruba po třech hodinách je tato T7 RNA polymerasa schopna vyprodukovat tolik cílového proteinu, že tvoří více než 50 % z celkového množství proteinů v hostitelské buňce [62].

V plasmidu je zabudován gen pro β -laktamasu zajišťující rezistenci vůči ampicilinu. Ten se přidává do kultury, v níž jsou buňky kultivovány.



Obr. 8 Mapa expresního vektoru pET22b

Vyznačuje štěpící místa restričních endonukleas, selekční marker a počátek replikace (ori). Převzato z [63].

1.6 cDNA

cDNA („complementary“ DNA) vzniká přepisem mRNA katalyzovaným enzymem reverzní transkriptasou. Ke 3' konci mRNA, který je bohatý na adenin, je komplementárně připojen krátký úsek DNA. Ten funguje jako primer pro reverzní transkriptasu, která následně kopíruje mRNA do komplementárního řetězce DNA, čímž vzniká hybridní šroubovice RNA/DNA. V přítomnosti alkalického pH se RNA rozpadne na jednotlivé nukleotidy a zbude řetězec cDNA, podle něhož je následně DNA-polymerasou dosyntetizován druhý řetězec cDNA [56].

V diplomové práci jsem použila gen pro CYP3A4 vzniklý právě touto cestou.

1.7 Preference genetického kódu

Každá aminokyselina s výjimkou methioninu a tryptofanu je kódována dvěma a více kodony (trojice nukleotidů). Ty se většinou liší v jednom nukleotidu a to na třetí pozici tohoto tripletu. Každý organismus preferuje pro danou aminokyselinu jiné kodony [64,65,66]. To souvisí s množstvím dané tRNA, které souvisí s frekvencí použití příslušného kodonu [67]. Například aminokyselina fenylalanin je u bakterie *E. coli* kódována dvěma triplety, z nichž má nejvyšší zastoupení TTT. Naopak u člověka je fenylalanin kódován častěji kodonem TTC [68].

V případě přenosu genu do hostitelské buňky s odlišnou preferencí genetického kódu („codon usage“) je nutné optimalizovat daný gen pro efektivní produkci v hostitelském organismu, což bylo dokázáno na heterologní expresi několika genů v hostitelské *E. coli* [65,69].

Dalším způsobem, jak zvýšit produkci cílového proteinu v cizím hostitelském organismu, je použít takového hostitele, který má posílenou produkci těch tRNA, které jsou u něj zastoupeny v nízkém počtu. Například buňky *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL obsahují navíc kopie genů, které kódují tRNA pro arginin (R), isoleucin (I) a leucin (L). Buňky *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL obsahují navíc ještě kopii genu kódující tRNA pro prolin (P) [70].

Pro úspěšnou heterologní expresi jsou používány i jiné bakteriální kmeny buněk *E. coli*, například *E. coli* BL21 C41(DE3) nebo *E. coli* BL21 C43(DE3). Ty obsahují mutaci, která zabraňuje buněčné smrti spojené s expresí toxických heterologních proteinů [71].

Tabulka 2 ukazuje kodony, které jsou v bakterii *E. coli* používány jen vzácně.

Tab. 2 Vzácné kodony v *E. coli* převzato z [69].

Aminokyselina	Vzácné kodony
Arginin	AGG, AGA, CGG, CGA
Leucin	CUA, CUC
Isoleucin	AUA
Serin	UCG, UCA, AGU, UCC
Glycin	GGA, GGG
Prolin	CCC, CCU, CCA
Threonin	ACA

2. Cíl diplomové práce

Hlavním cílem předkládané práce bylo ověřit vliv genové optimalizace na heterologní expresi lidského CYP3A4. Konkrétně porovnat expresi zájmového proteinu za použití syntetického genu optimalizovaného pro produkci v kmenech *E. coli* odvozených z parentálního kmene K-12, vůči produkci CYP3A4 ve stejném typu vektoru avšak s originálním lidským genem získaným z cDNA. Dílčími cíly pak bylo připravit a ověřit potřebné expresní konstrukty založené na vektoru pET22b. Dalším cílem bylo též otestovat možnost produkce nezkrácené nativní formy lidského cytochromu P450 3A4 v expresních systémech zavedených v laboratoři.

3. Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy:	40 SM-200A, Pesa HM-200, A&D Instruments LTD.
Předvážky:	440-35-N, Kern EW 600-2M, Kern EK-600H, A&D Instruments LTD
Ohřívač bloků:	LS1, VLM GmbH
Centrifuga:	Stolní minicentrifuga, Labnet Stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab Janetzki K70D, MLW Allegro X-22R, Beckman Coulter (rotory 4250 a F0630) 5415 D/R, Eppendorf
Ultracentrifuga:	Beckman LE-80K, Beckman Coulter (rotor Ti70)
Vortex:	MS2 Minishaker, IKA MS 1 Minishaker Schiller Pharma
Spektrofotometr:	Spekol 11, CARLZEISS, Jena Specord M40 CARLZEISS, Jena NanoVue plus, GE Healthcare
Laminární box:	BIO 126, Labox
Bezdotykový kahan:	Gasprofi2 SCS, VLD-TEC
Termocykler:	Tech gene, TECHNE
Elektroforetická aparatura:	MSMINI-10 Multi Sub Mini Univec miniVE vertical, Amersham Bioscience
Zdroj pro elektroforézu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham Pharmacia Biotech
Transluminátor:	Dark Reader, Clare Chemical Research
Inkubátor:	IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp

Autokláv:	Varioklav 400E, H+P Labortechnik
Ultrazvuková sonda:	Sonoplus HD 3100, Bandelin, sonda KE 76
pH metr:	Model 370, ATI Orion
Magnetická míchačka:	HM 2A, Laboratorní přístroje Praha KMO2 basic, IKA Variomag Monotherm, H+P Laborator technik
Aparatura pro „western blotting“:	SNAP i.d., Milipore Fastblot B43, Biometra BIOHIT, NichipetEX, makropipety Acura 835
Automatická pipeta:	Mini Rocker MR-1, BIOSAN
Mini třepačka:	DNA Speed Vac DNA 110
Vakuová odparka:	DMC-LS65, Panasonic
Fotoaparát:	HP Scanjet 4370
Scanner:	Ultrasonic compact cleaner UC 005 AJI TESLA
Sonikátor:	
Mikrovlnná trouba	ETA
Elektrický vařič:	ČSAV vývojové dílny
Třepačka:	

3.2 Použitý materiál a chemikálie

Biomatik, USA: syntetický gen CYP3A4

Fermentas, Kanada: 2-Log DNA marker, hmotnostní standard pro SDS elektroforézu PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spectra™ Multicolor Broad Range Ladder

Fuka, Švýcarsko: methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), akrylamid, 2-merkptoethanol, dodecylsulfát sodný (SDS)

Genomed, Německo: JETquik-Plasmid Miniprep Spin Kit, JETquik-Gel Extraction Spin Kit

Invitrogen, USA: SYBR Safe™ DNA Gel Stain

Lachema, Brno: MgCl₂, EDTA (chelaton 3), HCl, KH₂PO₄, KOH, NaOH, methanol, ethanol, glycerol, kyselina octová, chloroform, persíran amonný, isopropanol, fenol, isoamylalkohol, 8-hydroxychinolinu

Loba Feinchemie, Rakousko: tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Lucigen, USA: *E. coli* BL21 C41(DE3), *E. coli* BL21 C43(DE3)

Metabion, Německo: oligonukleotidy

New England Biolabs, USA: HindIII (c = 20000 U/ml), EcoRI (c = 20000 U/ml), NdeI (c = 20000), pufru NEB 2 (10x koncentrovaný), pufru NEB 4 (10x koncentrovaný), BSA (100 x koncentrovaný), T4 DNA ligasa, pufr pro T4 DNA ligasu (10 x koncentrovaný), pUC19, pET22b

Roche, Švýcarsko: inhibitory proteas cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Serva, Německo: ampicilin, isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Triton X-100, Coomassie Brilliant Blue R-250

Sigma Aldrich, Česko: protilátka proti králičí protilátce

Stratagene, USA: *E. coli* BL21-Gold, *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL, *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL

3.2.1 Použité roztoky

V diplomové práci byly použity roztoky o následujícím složení:

Barvicí lázeň: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 46 % ethanol (v/v), 9,2 % kyselina octová (v/v)

Blokovací roztok: 5 % sušené mléko v pufru PBS-Triton X-100

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS (w/v) pH 8,3

Fosfátový pufr: (100 mM KH₂PO₄; 2% (v/v) glycerol; pH 7,5)

GTE pufr: 50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA

G1: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 μl/ml RNasa A

G2: 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)

G3: obsah acetátu a guanidin hydrochloridu

G4: NaCl, EDTA, Tris-HCl a ethanol

K-AC: 3 M octan draselný, 5 M kyselina octová, pH 4,8

LB agar: 4 g agaru do 100 ml destilované vody

LB médium: 2,5 g média na 100 ml destilované vody

Lyzační roztok: 200 µl 5 M NaOH, 4,3 ml sterilní vody, 500 µl 10% SDS

L1: chaotropní sole a TBE-solubilizátor

L2: NaCl, EDTA, Tris-HCl a ethanol

NEB 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol pH 7.9

NEB 4: 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM Dithiothreitol pH 7.9

Odbarvací lázeň: 25 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

PBS-Triton X-100: 1.8 mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,134 M NaCl; 0,3% TRITON X-100 (w/v); pH 7,2

PEG: 2,5 M NaCl, 20% polyethylen glykol

Polymerační roztok A: 30 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS (w/v) v pufru A

Polymerační roztok B: 30 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS (w/v) v pufru B

Přenosový pufr: 0,025 M Tris/Cl; 0,192 M glycin; 10% methanol (v/v); pH 8,3

Pufr A: 0,375 M Tris-HCl, 0,1 % SDS (w/v) pH 8,8

Pufr B: 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % SDS (w/v), 0,0006 % bromfenolová modř (w/v) pH 6,8

Pufr pro T4 DNA ligasu

Resuspendační pufr I: 10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,7

Resuspendační pufr II: 10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20 % (v/v) glycerol, pH 7,7

RNasa A: 1 mg/ml

Roztok primární protilátky: zásobní králičí protilátka v blokovacím roztoku do výsledné c = 30 µg/ml

Roztok sekundární protilátky: v PBS ředit 1:30000

TAE: 2 M Tris, 1 M kyselina octová, 50 mM EDTA, pH 8,2

TB médium: 4,76 g média na 100 ml destilované vody s přidavkem 0,8% (v/v) glycerolu

TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TSE pufr: - 100 mM Tris-acetát, pH 7,6, 500 mM sacharosa, 0,5 mM EDTA

Vzorkový pufr: 40 % sacharosa (w/v), 0,1 % bromfenolová modř (w/v)

Vzorkový pufr redukující (4x koncentrovaný): 0,25 M Tris-HCl, 8 % SDS (w/v), 40% glycerol (v/v), 20 % 2-merkптоethanol (v/v), 0,012 % bromfenolová modř (w/v) pH 6,8

75% ethanol

3.2.2 Použité enzymy

Restrikční endonukleasy: EcoRI, HindIII, NdeI, XhoI
králíčí CYP1A2 – poskytl Mgr. Jan Milichovský

RNasa A

T4 DNA ligasa

3.2.3 Použité bakteriální kmeny

E. coli BL21-Codon Plus (DE3)-RIL

E. coli BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL

E. coli BL21 C41(DE3)

E. coli BL21 C43(DE3)

E. coli BL21-Gold

E. coli DH5 α – kompetentní buňky poskytl RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

3.2.4 Použité vektory

pET22b

pUC19

3.3 Metody

3.3.1 Příprava agarových ploten

Sterilní agar byl rozehřán v mikrovlnné troubě (4 g agaru do 100 ml destilované vody, následně autoklávováno), potřebné množství bylo odlito do sterilní zkumavky Falcon o objemu 50 ml. Po zchladnutí agaru zhruba na teplotu 40°C byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 1 mM, agar byl promíchán a nalit na sterilní Petriho misky (kolem 10 ml na jednu Petriho misku) v laminárním boxu (Bio 126, Labox). Poté agar v Petriho miskách tuhnul na vodorovné ploše.

3.3.2 Příprava roztoku DNA

Syntetický gen pro CYP3A4 vložený do plasmidu pUC19 byl dodán v lyofilizované formě. Stejně tak byly dodány i oligonukleotidy. Mikrozskumavky s lyofilizovanou DNA byly vyjmuty z mrazáku (-20°C) a krátce stočeny na stolní centrifuze (stolní minicentrifuga, Labnet), aby nedošlo ke ztrátám způsobeným rozptýlením DNA na stěnách zkumavky a jejím víčku. Následně byla DNA zředěna sterilní vodou na výslednou koncentraci 0,1 mM a uchována v mrazáku v -80°C.

3.3.3 Transformace buněk *E. coli*

Z mrazáku (-80°C) byla vyjmuta mikrozskumavka s 200 µl buněk *E. coli* DH5α (kmen vhodný pro klonování, namnožení vektoru) nebo jiných kmenů vhodných pro expresi a následně byly buňky rozmrazeny na ledu při laboratorní teplotě.

Do mikrozskumavky Eppendorf 1,5 ml bylo převedeno 100 µl buněk a přidáno 20 µl konstruktů založeného na klonovacím vektoru pUC19, v případě transformace buněk konstruktem založeném na plasmidu pET22b byly použity pouze 3 µl konstruktů, při transformaci buněk produktem ligační reakce bylo použito 20 µl tohoto produktu. Buňky byly ponechány 30 minut na ledu.

Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku 42°C (v případě jiných kmenů než DH5α byla délka teplotního šoku snížena na 25 sec) v ohřívací bloků (LS1, VLM GmbH) po dobu 1,5 min a poté byly ponechány 2 min na ledu. Teplotní šok slouží k rozrušení buněčné stěny bakterií, což vede ke snadnějšímu vstupu plasmidu do buňky.

K buňkám bylo přidáno 300 μ l LB média a následně byla směs inkubována hodinu při 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Po vyjmutí z inkubátoru byly buňky stočeny 1 min při 4000 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf), vrchních 150 μ l supernatantu bylo odstraněno a peleta byla opatrně resuspendována ve zbylém supernatantu. Tím bylo docíleno redukce LB média pro snazší vsáknutí směsi do agaru.

Následně byla suspenze přenesena v laminárním boxu (Bio 126, Labox) pipetou na agarovou plotnu a rozetřena sterilními kuličkami.

Takto připravené agarové plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

3.3.4 Kultivace buněk *E. coli* metodou „single-cell colony“

Přes noc narostlé kolonie buněk (vždy po jedné z každé agarové plotny) byly přeočkovány v laminárním boxu (Bio 126, Labox) sterilním párátkem. Do vyžíhané pinzety bylo uchopeno sterilní párátko, kterým byla nabrána kolonie z agarové plotny a následně bylo toto párátko vhozeno do zkumavky Falcon obsahující 10 ml sterilního LB média s 1 mM ampicilinem. Uzavřené zkumavky s ne zcela utaženými šroubovacími uzávěry (zajištění lepší aerace) byly inkubovány přes noc při 37°C a 200 RPM (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp).

Druhý den bylo ze zkumavek odebráno 200 μ l buněčné kultury, k té bylo přidáno 80 μ l kryoprotektiva 50% glycerolu (v/v). Takto připravené buňky byly zamrazeny v -80°C pro případné další použití. Při expresi sloužily zamražené vzorky buněk jako inokula.

3.3.5 Izolace plasmidové DNA-minipreparace (JETquick-Plasmid miniprep Spin Kit)

Vyžíhanou pinzetou byla ze zkumavek Falcon odstraněna párátko. Následně byla suspenze centrifugována 5 min při 4500 RPM (centrifuga Allegro X-22R, Beckman Coulter, rotor 4250), supernatant byl odstraněn a zkumavky byly ponechány 2 min převráceny dnem vzhůru pro lepší odstranění zbytků LB média.

Další kroky byly provedeny podle návodu přiloženého výrobcem k JETquick-Plasmid miniprep Spin Kitu [72]. Roztok G1 byl v objemu 250 μ l přidán k peletám, ty jím byly

resuspendovány a převedeny do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf. Poté bylo do mikrozkušavek přidáno po 250 μ l lyzačního roztoku G2, suspenze byla promíchána převrácením a ponechána stát 5 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby bylo do mikrozkušavek přidáno po 350 μ l neutralizačního roztoku G3. Směs byla opět promíchána převrácením a centrifugována 10 min při maximálních otáčkách 13200 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf).

Pipetou se sterilní špičkou byl supernatant převeden na kolonu JETquick umístěnou v nové sterilní mikrozkušavce Eppendorf a následně byl centrifugován 1 min při 12000 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf). Eluovaný roztok byl odstraněn a na kolonu bylo nanášeno 500 μ l roztoku G4. Následovala centrifugace 1 min při 12000 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf), eluovaný roztok byl odstraněn, kolona byla umístěna zpět do mikrozkušavky a opět centrifugována 1 min při 13200 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf), za účelem odstranění zbytků roztoku G4.

Kolony byly přeneseny do nových sterilních 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf a do jejich středu byla nanášena sterilní voda předehřátá na 65°C o objemu 75 μ l. Po 1 min, kdy stály při laboratorní teplotě, byly odstředěny při 12000 RPM po dobu 2 min (centrifuga 5415, Eppendorf). Kolony byly z mikrozkušavek vyjmuty a eluovaná DNA byla skladována v mrazáku při -80°C.

3.3.6 Izolace plasmidové DNA fenol-chloroformovou metodou

3.3.6.1 Přechištění fenolu

Fenol bylo třeba zbavit produktů, které vznikly oxidací.

Do 50 ml zkumavky Falcon bylo odebráno zhruba 20 ml krystalického fenolu. Následně byl fenol rozpouštěn 20 min v horké lázni při 70°C. Po rozpouštění byl odhadnut objem a přidáno stejné množství 1 M Tris-HCl pH 8,0 a 8-hydroxychinolinu do koncentrace 0,1% (w/v). Směs byla důkladně protřepávána 10-15 min. Po ustavení fáze byla odebrána vrchní fáze, přičemž její část zůstala jako ochranná vrstva. Pro dosažení vyšší čistoty fenolu byl zopakován proces protřepávání. Takto připravený fenol byl smíchán s chloroformem a isoamylalkoholem (fenol:chloroform:isoamylalkohol = 25:24:1) Směs byla uskladněna při 4°C v tmavé lahvi.

3.3.6.2 Izolace plasmidové DNA

Přes noc narostlá kultura buněk *E. coli* o objemu 10 ml byla centrifugována 5 min při 4500 RPM (Allegro X-22, Beckman Coulter rotor SX4250). Peleta byla resuspendována ve 200 µl ledového GTE pufru, přenesena do 1,5 ml mikrozkuhavky Eppendorf a ponechána 5 min stát při laboratorní teplotě.

Následně bylo přidáno 300 µl čerstvě připraveného lyzačního pufru, mikrozkuhavka byla několikrát převrácena a inkubována 5 min při laboratorní teplotě.

Poté bylo přidáno 200 µl ledově vychlazeného roztoku K-AC, mikrozkuhavka byla promíchána převrácením (10 sec), inkubována 10 minut v ledové lázni a centrifugována 10 min 13200 RPM při laboratorní teplotě (centrifuga 5415, Eppendorf).

Supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky Eppendorf a byl k němu přidán stejný objem směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol. Směs byla centrifugována 5 min při 4°C a 13200 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf). Horní vodná fáze byla převedena do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky Eppendorf, byl přidán tentýž objem isopropanolu, směs byla promíchána silným protřepáním a ponechána precipitovat po dobu 10 min v ledové lázni. Následně byla směs centrifugována 10 min při 13200 RPM a 4°C (centrifuga 5415, Eppendorf).

Peleta byla promyta ledově vychlazeným 75% ethanolem a usušena ve vakuové odparce (DNA Speed Vac DNA 110). Poté byla rozpuštěna ve 100 µl TE, byly přidány 2 µl RNasy A (1 mg/ml) a směs byla inkubována 1 hod při 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Následně bylo přidáno 60 µl roztoku PEG a směs byla inkubována v ledové lázni po dobu 1 hod.

Poté byla směs centrifugována 15 min při 13200 RPM a 4°C (centrifuga 5415, Eppendorf). Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 170 µl vychlazeného 75% ethanolu. Peleta byla usušena na vakuové odparce (DNA Speed Vac DNA 110) a nakonec rozpuštěna ve 40 µl sterilní vody a skladována v -20°C.

Izolovaná plasmidová DNA byla použita pro transformaci buněk *E. coli* kmenů BL21-Gold, BL21-Codon Plus (DE3)-RIL, BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL, BL21 C41(DE3) a BL21 C43(DE3).

3.3.7 Polymerasová řetězová reakce – PCR

Navržené oligonukleotidy v lyofilizované formě byly použity jako primery pro PCR. PCR neboli polymerasová řetězová reakce slouží k namnožení požadovaného úseku DNA. Navržené oligonukleotidy byly vždy analyzovány a případně optimalizovány pomocí programu Oligo Analyser [73].

Lyofilizované primery byly rozpuštěny ve sterilní vodě na výslednou koncentraci 100 μM . 10 μl z tohoto zásobního roztoku bylo odebráno a naředěno sterilní vodou na výslednou koncentraci 20 μM . Následně byla připravena reakční směs.

Složení reakční směsi:

- 1 μl fw primeru
- 1 μl rv primeru
- 1 μl směsi deoxynukleotidtrifosfátů (10 mM)
- 5 μl pufru pro Pfu polymerasu (10x koncentrovaný)
- 6 μl MgSO_4
- 2 μl DMSO
- 0,5 μl Pfu polymerasy
- sterilní voda do celkového objemu 50 μl

Reakce probíhala v termocykleru (Tech gene, TECHNE) nastaveném na následující podmínky:

30 cyklů

- 94°C 30 s: rozvolnění DNA
- 58°C 30 s: nasednutí primerů (oligonukleotidů)
- 73°C 2 min: polymerace

1 cyklus

- 78°C 5 min: dosyntetizování částí DNA
- 6 °C do odebrání vzorků

3.3.8 Štěpení DNA pomocí endonukleas EcoRI a HindIII

Za účelem ověření přítomnosti insertu v zakoupeném plasmidu pUC19 byl plasmid štěpen restrikcními endonukleasami HindIII a EcoRI. Podmínky, při kterých jsou obě

endonukleasy aktivní, byly nalezeny na webových stránkách New England Biolabs [74]. Množství enzymů bylo optimalizováno k dosažení maximálního štěpení použité DNA [75].

Restrikce plasmidu pUC19 s insertem:

- 7 μ l plasmidu pUC19 s insertem
- 2 μ l pufru NEB 2 (10x koncentrovaný)
- 2 μ l HindIII
- 1 μ l EcoRI
- sterilní voda do celkového objemu 20 μ l

Reakční směs inkubována 2 hod při 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

3.3.9 Štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a NdeI

Za účelem přípravy expresních konstruktů založených na plasmidu pET22b bylo nutné provést dvojí restrikci jak plasmidu pET22b, tak i PCR produktů a konstruktů nesoucího syntetický zkrácený gen pro CYP3A4 založeného na plasmidu pUC19. Restrikce byla provedena restrikčními endonukleasami XhoI a NdeI, čímž vznikly komplementární konce, které bylo možné následně spojit ligací.

Optimální podmínky pro dvojí restrikci byly nalezeny na webových stránkách New England Biolabs v aplikaci s názvem „Double Digest Finder“ [74]. Podmínky, při kterých enzymy štěpí s maximální efektivitou, byly dále optimalizovány.

Reakční směsi měly následující složení:

- 14 μ l PCR produktu
- 2 μ l pufru NEB 4 (10x koncentrovaný)
- 1 μ l NdeI
- 1 μ l XhoI
- 2 μ l BSA (10x koncentrovaný)

Restrikce probíhala 3 hod při 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Restrikce plasmidu pET22b proběhla analogicky s tím rozdílem, že bylo použito pouze 6 μ l tohoto vektoru a reakční směs byla doplněna do celkového objemu 20 μ l sterilní vodou.

Při dvojí restrikci konstruktu nesoucího syntetický zkrácený gen pro CYP3A4 založený na plasmidu pUC19 bylo použito 13 μ l tohoto konstruktu, jinak reakce probíhala za stejných podmínek.

3.3.10 Agarosová elektroforéza

Jako kontrolní metoda po dvojí restrikci plasmidové DNA byla provedena horizontální agarosová elektroforéza. Tato metoda se používá také za účelem přečištění DNA.

Do 40 ml 1x koncentrovaného TAE pufru pH 8,2 (zásobní roztok je 50x koncentrovaný) byla navážena agarosa v takovém množství, aby byl výsledný roztok 1%. Ohřevem v mikrovlnné troubě byla agarosa rozpuštěna v pufru. Po zchladnutí roztoku na teplotu okolo 40°C byly přidány 4 μ l barviva SYBR Safe™ DNA gel Stain (10000x koncentrováno). Poté byl roztok nalit do elektroforetické nádoby s hřebenem, který slouží k vytváření jamek, do nichž jsou nanášeny vzorky. Po uplynutí 30 min byl vyjmut hřeben ze ztuhlého gelu a nádobka byla vložena do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini, Univec) a zalita 1x koncentrovaným TAE pufrem.

Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem v maximálním množství 25 μ l na jamku. Do jedné z jamek byl nanesen DNA standard 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb) v objemu 6 μ l na jamku.

Elektroforéza probíhala 40 min při napětí 110 V, přičemž byl kladen důraz na správné zapojení elektroforetické nádoby do zdroje napětí (EPS 301). DNA je záporně nabitá, putuje tedy směrem ke kladně nabitě elektrodě.

Po ukončení elektroforézy byl gel analyzován v temné komoře s použitím transluminátoru (Dark Reader, Clare Chemical Research). Výsledek byl zaznamenán fotoaparátem (DMC-LS65, Panasonic).

3.3.11 Izolace DNA z gelu-JETquik Gel Extraction Spin Kit

Agarosový gel byl analyzován pomocí transluminátoru (Dark Reader, Clare Chemical Research). Cílová DNA byla opatrně (aby nedošlo k její kontaminaci) vyříznuta

z agarosového gelu a vložena do předem zvážených 1,5 ml mikrozkuvek Eppendorf. Mikrozkuvka s gelem byla opět zvážena na analytických vahách (HM-200, A&D Instruments LTD). Následující postup probíhal dle návodu výrobce JETquick Gel Extraction Spin Kit [72].

Solubilizační roztok L1 (obsah chaotropních solí a TBE-solubilizátor) byl přidán do mikrozkuvky s vyříznutým gelem (300 μ l L1 na 100 mg gelu). Následně byla mikrozkuvka vložena do ohříváče bloků (LS1, VLM GmbH) nastaveného na 50°C. Za občasných promíchání poklepáním na stěnu zkuvky se gel rozpouštěl po dobu 15 min. Následně byly vzorky převedeny na kolonky JETquick v maximálním objemu 600 μ l, kolonky byly umístěny do 1,5 ml mikrozkuvek Eppendorf a odstředovány 1 min při 12000 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf). Eluovaný roztok byl odstraněn a na kolonky byl nanesen roztok L1 v objemu 500 μ l, čímž byly kolonky promyty. Následně probíhala centrifugace 1 min při 12000 RPM. Eluát byl odstraněn. Poté bylo na kolonky nanášeno 500 μ l roztok L2, který byl opět odstředěn 1 min při 12000 RPM a odstraněn. Kolonky vložené do mikrozkuvek byly následně centrifugovány 1 min při 13200 RPM (centrifuga 5415, Eppendorf), čímž došlo k odstranění nežádoucích zbytků roztoku L2. Poté byly kolonky umístěny do nových sterilních mikrozkuvek Eppendorf a do jejich středu bylo nanášeno 50 μ l sterilní vody přehřáté na 65°C. Takto stály kolonky 1 min při laboratorní teplotě a nakonec byly stočeny 2 min při 12000 RPM, čímž došlo k eluci DNA z kolonek. Eluovaná DNA rozpuštěná ve sterilní vodě byla skladována v mrazáku -80°C.

3.3.12 Ligace

Pro vložení insertu do plasmidu pET22b bylo zapotřebí spojit komplementární konce těchto dvou molekul DNA. K tomu slouží ligační reakce. Byla použita ligasa z bakteriofága T4, protože je efektivnější než ligasa přítomná v bakterii *E. coli*.

Ligační směs:

- 13 μ l štěpeného insertu
- 4 μ l štěpeného plasmidu pET22b
- 2 μ l pufru pro T4 DNA ligasu
- 1 μ l T4 DNA ligasy

Do sterilní mikrozkušavky vhodné do termocyklu byl nejprve převeden insert a plasmid. Po 5 min inkubaci při 45°C v termocyklu (Tech gene, TECHNE), který byl nastaven na požadovaný program, následovala 3 min inkubace na ledu. Poté byly do směsi přidány zbývající komponenty a mikrozkušavky byly umístěny do termocyklu (Tech gene, TECHNE), kde probíhala ligace při 16°C přes noc.

3.3.13 Kultivace buněk *E. coli* ve velkém objemu

Nejprve byla připravena a autoklávována LB média s 1 mM ampicilinem (2,5 g média na 100 ml destilované vody) a TB média s 1 mM ampicilinem (4,76 g média na 100 ml destilované vody s přidavkem 0,8% (v/v) glycerolu) do celkového objemu 300 ml na 2 litrovou Erlenmayerovu baňku. Baňky byly umístěny do inkubátoru 37°C a 220 RPM (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp). Média byla inokulována 300 µl přes noc narostlé buněčné kultury. Při vzrůstu optické denzity na požadovanou hodnotu byla provedena indukce exprese.

3.3.14 Indukce exprese

Optická denzita jednotlivých buněčných kultur byla průběžně měřena na spektrofotometru (Spekol 11, CARLZEISS, Jena) při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀). Denzita byla měřena proti LB a TB médiu v závislosti na druhu použitého média při kultivaci. V okamžiku nárůstu optické denzity okolo 1, byla indukována exprese CYP3A4 přidavkem 0,1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG). Dále byla do média přidána 0,5 mM kyselina δ-aminolevulová (prekurzor prostetické skupiny hemu), 1 mM MgCl₂ a 75 µl roztoku obsahujícího.

Exprese probíhala při 28°C a 180 RPM (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp). Tyto podmínky a složení reakční směsi jsou výsledkem optimalizace.

3.3.15 Sklizení buněk

V různých časech byly odebírány vzorky a měřena optická denzita na spektrofotometru (Spekol 11, CARLZEISS, Jena) při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀). Vždy bylo odebráno 500 µl z dané buněčné kultury do 1,5 ml mikrozkušavky Eppendorf,

vzorek byl odstředován 1,5 min při 7000 RPM na centrifuze (5415 D/R, Eppendorf) a pelety byly resuspendovány v 500 µl destilované vody. Při tom byl kladen důraz také na zabarvení pelet jednotlivých odebraných vzorků. Řádně označené vzorky byly uskladněny v mrazáku -20°C.

Po 20 hod byla ukončena exprese proteinu CYP3A4 centrifugací při 3000 RPM a 4°C v délce trvání 30 min (Janetzki K70D, MLW). Pelety byly resuspendovány v TSE pufru (5ml na 100 ml bakteriální kultury). V tomto kroku je možné vzniklou suspenzi zamrazit v -20°C.

3.3.16 Izolace membránové frakce

3.3.16.1 Ultrazvuková lýze buněk

K takto vzniklé suspenzi buněk byla přidána tableta inhibitorů proteas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets) rozpuštěná sonikací (Ultrasonic compact cleaner UC 005 AJI TESLA) v 1,5 ml resuspendačního pufru I. Následně byly buňky v buněčné suspenzi rozrušeny použitím sonikátoru (Sonoplus HD 3100, Bandelin, sonda KE 76). Přístroj byl nastaven na výkon 40 W. Buňky byly desintegrovány v 7 periodách trvajících 40 sec. Mezi jednotlivými pulzy byly vzorky chlazeny na ledu po dobu 2,5 min. Ultrazvukové vibrace ze sondy generují do svého okolí teplo, které je zapotřebí odvádět, jinak by mohlo dojít k denaturaci proteinu [76].

3.3.16.2 Frakční centrifugace

Za účelem získání buněčných membrán, kde je předpoklad přítomnosti CYP3A4, byla provedena diferenční centrifugace. Nejprve byly lyzované buňky centrifugovány 15 min při 4500 RPM a 4°C (Allegro X-22, Beckman Coulter rotor SX4250), čímž bylo docíleno oddělení nerozbitých buněk a jejich zbytků od cytosolu buňky, který se při sonikaci uvolnil do roztoku. Z pelety byl odebrán vzorek, který byl uchován v mrazáku -20°C.

Supernatant byl dále převeden do kyvet typu Oak Ridge a centrifugován 20 min při 12000 RPM a 4°C (Allegro X-22, Beckman Coulter rotor F0630) I zde byl odebrán a zamražen vzorek pelety -20°C. Tímto krokem došlo k oddělení inkluzních tělísek, která mohla vzniknout během exprese proteinu. I po tomto kroku byl odebrán a zamražen vzorek pelety -20°C.

Následně byl supernatant převeden do polykarbonové ultracentrifugační kyvety a odstředován 75 min při 60000 RPM a 4°C na ultracentrifuze (Beckman LE-80K, Beckman Coulter, rotor Ti70). Zde došlo k sedimentaci membránové frakce s předpokládanou přítomností CYP3A4. V supernatantu zůstávají lehčí molekuly jako například proteiny, inhibitory proteas, nukleové kyseliny, lipidy atd. Vzorek supernatantu byl odebrán a skladován při -20°C.

Peleta byla homogenizována za použití homogenizátoru v chladové místnosti při 5°C v 15 ml resuspendačního pufru II. Výsledný homogenát byl uchován v -20°C.

3.3.17 SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného byla použita za účelem separace proteinů na základě jejich odlišné molekulové hmotnosti. Metoda byla provedena podle Laemmliho postupu [77].

K separaci proteinů byl použit 4% zaostřovací (vrchní) gel a 10% separační (spodní) gel. Gely vznikly kopolymerací N,N-methylen-bis-akrylamidu (BIS) s akrylamidem. Polymeraci gelu iniciují persíran amonný (100 mg/ml) a N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). TEMED stabilizuje volné radikály, které vzniknou působením světla na persíran amonný. Tyto volné radikály způsobí polymeraci akrylamidu a N,N-methylen-bis-akrylamidu [78].

Spodní separační gel byl připraven smícháním 5 ml pufru A s 2,5 ml polymeračního roztoku A. Dále bylo přidáno 7,5 µl TEMEDu a 75 µl persíranu amonného. Roztok byl důkladně promíchán a nalit mezi pečlivě umytá skla oddělená spacery, umístěná vertikálně do elektroforetické aparatury (miniVE Vertical, Amersham Biosciences). Takto nalitý gel zhruba do výšky 6 cm skel byl převrstven destilovanou vodou, čímž bylo zabráněno vzniku nerovností na jeho povrchu. Po uplynutí 30 min byla voda odstraněna a její zbytky byly jemně odsáty pomocí filtračního papíru.

Následně byl gel převrstven 4% separačním gelem, který vznikl smísením 2,6 ml pufru B, 400 µl polymeračního roztoku B, 3 µl TEMEDu a 60 µl persíranu amonného. Roztok byl důkladně promíchán a nanesen mezi skla zhruba 3 mm pod okraj. Následně byl mezi skla umístěn hřeben, který po ztuhnutí gelu vytvořil jamky pro nanášení vzorků.

Po ztuhnutí gelu (30 min) byl hřeben vyjmut, u elektroforetické aparatury bylo odklopeno spodní silikonové těsnění a aparatura byla vložena do elektroforetické vany, která byla následně zalita elektrodočným pufrem, stejně tak jako vrchní prostor aparatury.

Požadované vzorky byly vhodně naředěny a smíchány s odpovídajícím množstvím 4x koncentrovaného redukujícího pufru. Následně byly vzorky povařeny 5 min (elektrický vaříč ETA) a naneseny v objemu 20 μ l na jamku.

Zdroj pro elektroforézu (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham) byl nastaven na napětí 80 V po dobu 30 min. Během této doby procházely vzorky vrchním zaostřovacím gelem. Následně bylo napětí zvýšeno na 150 V. Celková doba trvání elektroforézy byla nastavena na 2 hod.

Po uplynutí 2 hod byla vyjmuta skla z aparatury a opatrně od sebe oddělena. Následně byl odříznut 4% zaostřovací gel a zbylý separační gel byl umístěn na 1 hod do barvicí lázně a lehce třepán na třepačce (ČSAV vývojové dílny).

Následně byl gel přemístěn z barvicí do odbarvovací lázně. Ta byla během obarvování 1x vyměněna (zhruba po 15 min). Celková doba odbarvování byla kolem 2 hod, přičemž byl gel lehce třepán na třepačce (ČSAV vývojové dílny).

Vhodně odbarvený gel byl vložen do fólie a skenován.

3.3.18 Westernův přenos

Nebo-li imunoblot („Western blot“) je analytická metoda sloužící k detekci specifického proteinu ve směsi proteinů pomocí protilátky. Využívá SDS-PAGE elektroforézu, kde jsou proteiny rozděleny na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Následně jsou proteiny z gelu SDS-PAGE elektroforézy přeneseny na PVDF membránu.

3.3.18.1 Přenos proteinů z gelu na membránu

Nejprve byla s požadovanými vzorky provedena podle postupu v předchozí kapitole 3.3.17 SDS-PAGE elektroforéza. Po jejím ukončení byl gel vyjmut z elektroforetické aparatury (miniVE vertical, Amersham Bioscience), změřen pravítkem a vložen na 20 min do přenosového (transferového) pufru, do kterého bylo přilito malé množství methanolu, který zabraňuje rozpínání gelu.

Mezi tím bylo nastříháno 6 kusů filtračního papíru a PVDF membrána vše o tomtéž rozměru, jaký byl naměřen u gelu. Jednotlivé 3 kusy filtračního papíru byly namočený do přenosového pufru a umístěny na sebe na spodní díl (anodu) přenosového zařízení (Fastblot B43, Biometra). Poté byla PVDF membrána pinzetou vyjmuta z ochranného pouzdra a připravena následujícím způsobem:

15 sec namočená v methanolu

3 min ve sterilní vodě

5 min v přenosovém pufru

Takto připravená membrána byla umístěna na namočené filtrační papíry a na ní byl opatrně umístěn gel. Následně byl gel převrstven zbývajících filtračními papíry namočenými v přenosovém pufru. Při pokládání jednotlivých vrstev byl kladen důraz na to, aby nedocházelo ke vzniku vzduchových bublin.

Poté byl přiložen vrchní díl (katoda) a přenosové zařízení (Fastblot B43, Biometra) bylo zapojeno do zdroje napětí (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham). Hodnota elektrického proudu byla nastavena v závislosti na velikosti plochy gelu 4 mA na 1 cm². Přenos trval 40 min.

Po ukončení přenosu byla membrána přenesena do blokovacího roztoku, ve kterém byla inkubována 1 hodinu při 5°C na mini-třepačce (Mini Rocker MR-1, BIOSAN).

Následně byla membrána přenesena do Petriho misky s primární králičí protilátkou proti lidské formě CYP3A4 rozpuštěnou v blokovacím roztoku na výslednou koncentraci 30 µg/ml. Membrána byla takto inkubována přes noc v chladové místnosti v 5°C na mini-třepačce (Mini Rocker MR-1, BIOSAN).

3.3.18.2 Vizualizace pomocí protilátky

Následující den byla membrána přemístěna do přístroje snap i.d. (SNAP i.d., Milipore), kde byla nejprve odmyta nenavázaná primární protilátka 3 x 15 ml pufru PBS-Triton X-100. Následovala 10 minutová inkubace membrány se 7 µl roztoku sekundární protilátky (proti králičí protilátce), která je konjugovaná s alkalickou fosfatase. Poté byla membrána opět promyta 3 x 15 ml pufru PBS-Triton X-100. Nakonec byla vyjmuta z přístroje snap i.d. (SNAP i.d., Milipore), přemístěna do Petriho misky a proteiny na ní byly vizualizovány pomocí substrátu pro alkalickou fosfatase BCIP/NBT (tableta byla

rozpuštěna v 10 ml sterilní vody). Reakce byla zastavena ponořením membrány do sterilní vody.

3.3.19 Stanovení koncentrace cytochromů P450 a P420

Vzorek membrán získaný frakční centrifugací byl vhodně naředěn fosfátovým pufrům do celkového objemu 2 ml do 2 ml mikrozkušavky Eppendorf. Bylo přidáno několik krystalů dithioničitanu sodného, směs byla promíchána a rozdělena do dvou semimaskovaných kyvet do každé 1 ml. Poté byla na spektrofotometru (Specord M40 CARLZEISS, Jena) změřena základní linie v rozmezí vlnové délky 400 – 490 nm. Pak byl obsah přední kyvety v zadním kyvetovém prostoru probublán oxidem uhelnatým. Jemný proud po dobu 60 sec. Následně bylo změřeno diferenční spektrum.

Pomocí následujícího vzorce byla určena koncentrace cytochromu P450.

$$c_{P450} = (A_{450} - A_{490} / \epsilon_{P450}) \times \text{ředění} [\mu\text{M}]$$

c_{P450} – koncentrace cytochromu P450

A_x – koncentrace při vlnové délce X

ϵ_{P450} – molární absorpční koeficient cytochromu P450 ($\epsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)

$$c_{P420} = (A_{420} - A_{490} / \epsilon_{P420}) \times \text{ředění} [\mu\text{M}]$$

c_{P420} – koncentrace cytochromu P420

A_x – koncentrace při vlnové délce X

ϵ_{P420} – molární absorpční koeficient cytochromu P420 ($\epsilon = 0,111 \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)

Toto měření bylo provedeno u membrán získaných diferenční centrifugací po expresi všech tří genových konstruktů.

3.3.20 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace DNA plasmidové DNA byla měřena na spektrofotometru (NanoVue plus, GE Healthcare). Pro stanovení čistoty DNA byl využit poměr hodnot absorbancí při různých vlnových délkách.

Nejčastěji bývá DNA v roztocích znečištěna proteiny, které absorbují při vlnové délce 280 nm. Proto se používá pro určení čistoty DNA poměr: $(A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})$ jehož výsledná hodnota by se měla pohybovat v rozmezí hodnot 1,7 – 2.

DNA může být znečištěna také přítomností solí a organických látek. Absorbance měřená při vlnové délce 320 nm koriguje přítomnost zákalu v měřeném roztoku DNA. V tomto případě se pro určení čistoty DNA využívá další poměr hodnot absorbancí: $(A_{260}-A_{320}) / (A_{230}-A_{320})$. Hodnota tohoto poměru by se v ideálním případě měla být vyšší než 1,5 [79].

4. Výsledky

4.1 Syntetický zkrácený gen pro lidský CYP3A4

Syntetický gen byl navržen podle sekvence lidského genu pro cytochrom P450 3A4 a optimalizován pro expresi v bakteriálním kmeni *E. coli* K-12 [80,81]. Byl objednán v lyofilizované formě jako insert plasmidu pUC19 od firmy Biomatik. Na jeho 5' konec byla vložena restriční místa, která rozeznávají restriční endonukleasy EcoRI a NdeI, na 3' konci to jsou místa, která rozeznávají restriktasy XhoI a HindIII.

```
5' GACGAATT CATATG GCCCTGCTGCTGGCGGTGAGCCTGGTTCTGCTGTATCTGT
ACGGCACGCACAGCCACGGTCTGTTTAAAGAACTGGGTATCCCGGGTCCAACGCCG
CTGCCATTTCTGGGCAACATCCTGAGCTATCACAAAGGCTTTTGCATGTTTGACAT
GGAGTGCCACAAGAAATATGGCAAGGTGTGGGGCTTCTATGATGGCCAACAGCCGG
TTCTGGCGATCACCGACCCGGATATGATCAAGACGGTGCTGGTGAAAGAATGCTAC
AGCGTGTTTACCAATCGCCGTCCATTCGGCCCAGTTGGTTTTATGAAGAGCGCCAT
CAGCATTGCCGAAGACGAGGAGTGGAACGTCTGCGTAGCCTGCTGAGCCCGACCT
TTACGAGCGGCAAACCTGAAGGAAATGGTTCCGATTATCGCCAGTACGGCGACGTG
CTGGTGCGTAATCTGCGTCGTGAGGCGGAGACCGGTAAGCCGGTGACGCTGAAAGA
CGTGTTTGGCGCGTACAGCATGGACGTTATCACGAGCACCAGCTTTGGCGTGAACA
TTGATAGCCTGAATAATCCGCAGGACCCGTTTGTGAAAACACCAAAAAGCTGCTG
CGCTTCGACTTCCTGGATCCGTTCTTCTGAGCATCACCGTTTTCCCATTCCTGAT
CCCGATCCTGGAGGTGCTGAACATCTGTGTGTTCCCGCGTGAGGTTACGAACTTTC
TGCGCAAGAGCGTTAAGCGCATGAAAGAGAGCCGCCTGGAAGACACGCAGAAGCAC
CGCGTGGATTTCTGACGCTGATGATCGACAGCCAGAATAGCAAGGAGACGGAGAG
CCATAAGGCACTGAGCGACCTGGAACCTGGTGGCCCAAAGCATCATCTTTATCTTCG
CGGGCTATGAGACGACGAGCAGCGTTCTGAGCTTTATCATGTATGAACTGGCGACC
CACCCGGACGTGCAGCAAAAACCTGCAAGAGGAAATTGACGCAGTTCTGCCGAATAA
GGCCCCACCAACCTATGACACCGTTCTGCAAATGGAATACCTGGACATGGTTGTGA
ACGAAACCCTGCGCCTGTTCCCAATTGCGATGCGTCTGGAGCGCGTGTGCAAGAAG
GACGTGGAATTAACGGCATGTTTCATCCCGAAGGGCGTTGTGGTGATGATTCGGAG
CTATGCGCTGCATCGTGACCCAAAGTATTGGACCGAACC GGAAAAGTTTCTGCCAG
AGCGCTTCAGCAAGAAAAACAAGGACAATATCGACCCGTATATCTACACGCCGTTT
GGTAGCGGTCCACGTAACCTGTATTGGTATGCGTTTTTGCCCTGATGAATATGAAGCT
GGCGCTGATCCGTGTGCTGCAGAATTTTAGCTTCAAGCCGTGCAAAGAGACCCAGA
TTCCACTGAAACTGAGCCTGGGCGGTCTGCTGCAACCAGAGAAACCAGTTGTTCTG
AAGGTGGAAGCCGCGATGGTACCGTGAGCGGTGCGTAACTCGAG AAGCTT TAC
3'
```

Obr. 9 Sekvence syntetického zkráceného genu pro CYP3A4.

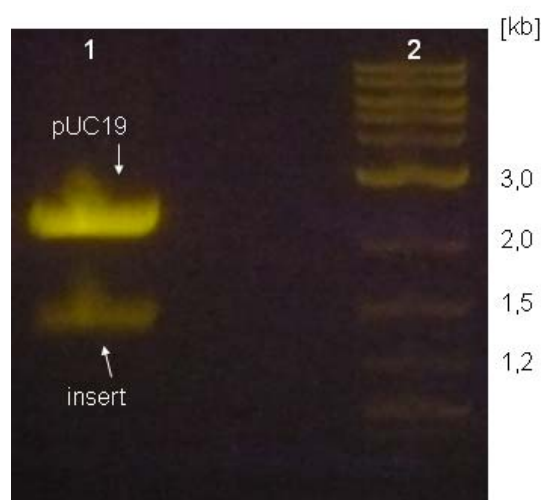
Restriční místa pro EcoRI (modře), NdeI (zeleně), XhoI (červeně) a HindIII (šedě)

Syntetický gen byl oproti lidskému genu zkrácen na 5' konci o 30 nukleotidů tak, aby ze sekvence jeho proteinového produktu byla odstraněna 3. až 12. aminokyselina. Podobná modifikace byla v literatuře popsána jako úprava zvyšující expresi v bakteriálním systému [57]. N-terminální část eukaryotických cytochromů P450 je zanořena v membráně, v prokaryotickém expresním systému jsou však pro integraci do membrány používány jiné mechanismy, lze tedy očekávat, že absence části N-terminální domény povede ke snazší expresi tohoto proteinu.

Sekvence syntetického zkráceného genu spolu s konci upravenými pro následné vložení do vektoru je znázorněna na obrázku 9.

4.1.1 Amplifikace insertu obsahujícího syntetický gen pro CYP3A4

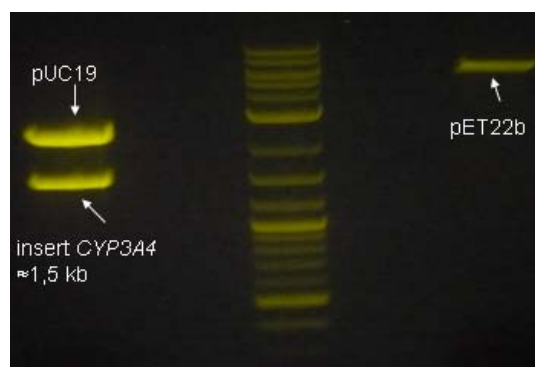
Syntetický zkrácený gen pro CYP3A4 vložený do klonovacího vektoru pUC19 byl amplifikován v bakteriích *E. coli* DH5 α , následně byla jedna kolonie namnožena metodou „single-cell colony“ a plasmid byl z buněčné kultury izolován. Dvojitá restrikce plasmidu restriktčními endonukleasami EcoRI a HindIII byla ověřena přítomnost insertu v zakoupeném plasmidu. Agarosovou elektroforézou byl analyzován výsledek restrikce obrázek 10. Fotografie gelu potvrzuje přítomnost insertu v zakoupeném konstrukt založeném na plasmidu pUC19.



Obr. 10. Kontrolní štěpení pUC19 s vloženým syntetickým genem pro CYP3A4
1. CYP3A4/pUC19 po restrikci EcoRI, HindIII
2. DNA marker 2-Log 0,1 – 10 kb,

4.1.2 Příprava expresního vektoru

Pro přípravu expresního vektoru založeného na plasmidu pET22b (CYP3A4/pET22b) bylo nutné vyjmout pomocí restričních endonukleas XhoI a NdeI gen pro CYP3A4, týmiž endonukleasami provést dvojí restrikci vektoru pET22b, vložit do něj zmíněný gen a následně insert (gen pro CYP3A4) do plasmidu ligovat. Štěpená DNA byla přečištěna agarosovou elektroforézou. Fotografie agarosového gelu ukazuje obrázek 11, na němž jsou jasně viditelné zóny odpovídající přítomnosti insertu v podobě genu pro lidskou CYP3A4 a plasmidové DNA.



Obr. 11 Štěpení plasmidu pCU19 s insertem a pET22b.

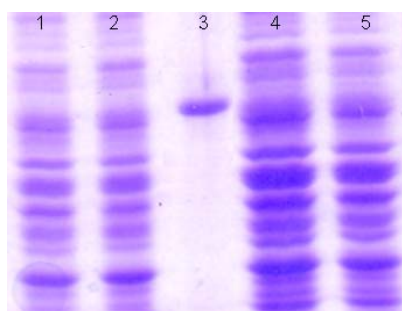
1. CYP3A4/pUC19 po restrikci XhoI a NdeI
2. DNA marker 2-Log 0,1 – 10 kb
3. expresní vektor pET22b po dvojí restrikci XhoI a NdeI

Fragmenty odpovídající insertu a štěpenému vektoru byly ligovány přes noc při 16°C, liguční směs pak byla použita k transformaci buněk DH5 α . Následovala kultivace jedné kolonie „single-cell colony“ a izolace plasmidové DNA obsahující insert fenol-chloroformovou metodou minipreparace. Celkem bylo získáno 40 μ l DNA o koncentraci 656 μ l/ml a vysoké čistotě 2,04 ($(A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})$). Hodnota poměru korigujícího zákal v roztoku DNA byla 1,88 ($(A_{260}-A_{320}) / (A_{230}-A_{320})$).

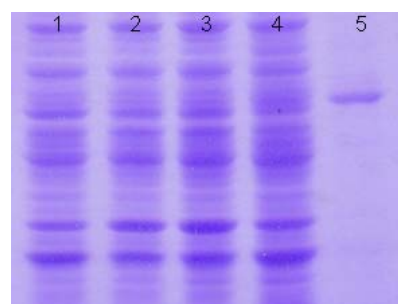
4.1.3 Expres zkrácené formy cytochromu P450 3A4 v *E. coli*

Expresním vektorem byly transformovány následující kmeny bakterie *E. coli*: BL21-Gold, BL-21 Codon plus (DE3)-RIL, BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL, BL21 C41(DE3), BL21 C43(DE3). Na obrázku 12 je výsledek exprese zkráceného syntetického genu pro CYP3A4. Expres byla provedena postupně ve všech kmenech *E. coli* vhodných k expresi,

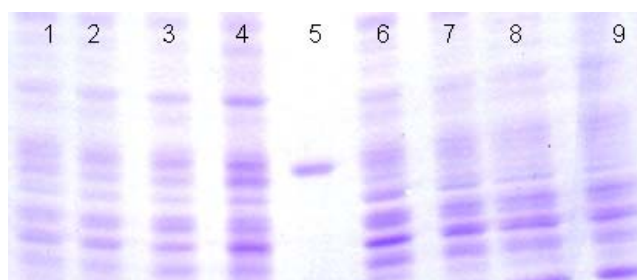
které byly k dispozici. Produkce probíhala v LB médiu 30 hod při 37°C, 180 RPM při indukci 1 mM IPTG s přídavkem 0,5 mM kyseliny δ -aminolevulové. Vzorčky celých buněk byly odebírány v různých časech, následně byly upraveny a byla s nimi provedena SDS-PAGE elektroforéza.



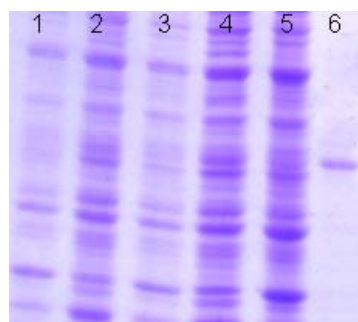
E. coli BL21 C41(DE3) v 15 ml LB média
1. před indukci, 2. po 10 hod expresi, 3. standard králičí CYP1A2, 4. po 20 hod expresi, 5. po 30 hod expresi



E. coli BL21 C43(DE3) v 15 ml LB média
1. před indukci, 2. po 10 hod expresi, 3. po 20 hod expresi, 4. po 30 hod expresi, 5. standard králičí CYP1A2



1.-4. dráha buňky *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL v 15 ml LB média
1. před indukci, 2. po 10 hod expresi, 3. po 20. hod expresi, 4. po 30 hod expresi, 5. standard králičí CYP1A2
6.-9. dráha buňky *E. coli*: BL21-Gold v 15 ml LB média
6. před indukci, 7. po 10 hod expresi, 8. po 20. hod expresi, 9. po 30 hod expresi



Nalevo: buňky *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL v 15 ml LB média
1. před indukci, 2. po 15 hod expresi, 3. po 17 hod expresi, 4. po 20 hod expresi, 5. po 30 hod expresi, 6 standard králičí CYP1A2

Obr. 12 Výsledek exprese zkráceného syntetického genu pro CYP3A4 37°C, 180 RPM, vzorky odebírány v několika časech, exprese v různých bakteriálních kmenech.

Na obrázku 12 není viditelný v případě použití buněk *E. coli*: BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL, BL21 C41(DE3), BL21 C43(DE3) a BL21 Gold nárůst koncentrace cílového

proteinu. Ani zbarvení buněčných kultur nevykazovalo očekávané načervenalé zbarvení, které je pro cytochromy P450 typické. Pouze buněčná kultura *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3) RIL vykazovala ve srovnání s neindukovanou kulturou mírně červené zbarvení. Výsledek SDS elektroforézy taktéž ukazuje po indukci (v drahách 2–5) expresi proteinu s molekulovou hmotností příslušející cytochromům P450. Proto byl tento kmen použit pro další optimalizace exprese.

4.1.3.1 Exprese zkrácené formy cytochromu P450 3A4 v *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL

Expresa v kmeni *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3) RIL byla prováděna při různých časech a teplotách, byla použita dvě různá kultivační média a tři koncentrace induktoru exprese IPTG. Následující tabulka 3 ukazuje přehled podmínek testovaných pro expresi CYP3A4.

Tab. 3 Podmínky exprese zkrácené formy CYP3A4 v *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3) RIL

Expresa	Teplota po indukci (°C)	Čas (hod)	C _{IPTG} (mM)	C _{δ-ALA} (mM)	C _{MgCl₂} (mM)	Orientační výsledek*
I.	37	40	1	0,5	-	+
II.	37	30	1	1	-	+
III.	37	10	0,1	0,5	-	+
IV.	33	20	0,1	1	-	++
V.	30	20	0,2	0,5	1	++
VI.	28	20	0,1	0,5	1	+++

* úspěšnost exprese byla orientačně vyhodnocována jako zčervenání pelet v porovnání se stejně inkubovanou kontrolou bez přidání IPTG, přičemž +, ++ a +++ znamená nízká, střední a vysoká intenzita červeného zbarvení.

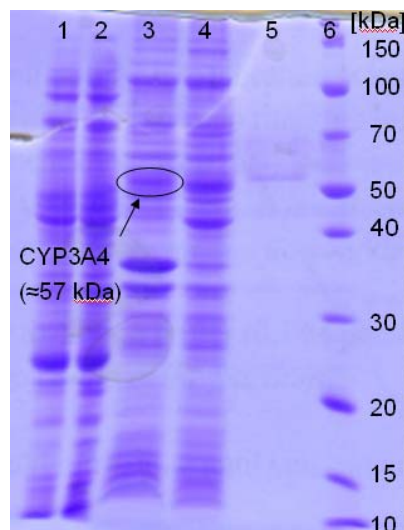
Expresa I., III., IV. a V. probíhaly v LB médiu, zatímco II. a VI. v TB médiu. Všechny exprese byly prováděny při 180 RPM. Jako hlavní faktor zlepšující produkci holoproteinu, tedy CYP3A4 s navázaným hemem, byla snižující se teplota kultivace po indukci.

Nakonec byly nalezeny optimální podmínky exprese. Byla zvolena 20 hodinová doba exprese při 28°C a otáčkách 180 RPM v TB médiu, indukovaná 0,1 mM IPTG. Produkce

byla posílena přidavkem 1 mM MgCl₂ (Mg²⁺ jsou nezbytné pro správnou funkci DNA polymerasy) a 0,5 mM kyselinou δ-aminolevulovou.

E. coli BL-21 Codon plus (DE3)-RIL byl optimální kmen pro expresi CYP3A4. Tato buněčná kultura po indukci IPTG a 20 hodinové kultivaci při 28°C vykazovala ve srovnání s ostatními kmeny výrazné červenohnědé zbarvení.

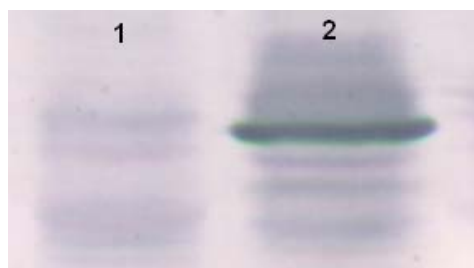
Exprese probíhala simultánně proti kontrole pro snazší porovnání barevné změny v průběhu exprese. CYP3A4 jakožto hemoprotein vykazuje načervenalé zbarvení. Se vzorky odebíranými během izolace byla provedena SDS-PAGE elektroforéza. Její výsledek zachycuje obrázek 13, na kterém je viditelná změna v oblasti molekulové hmotnosti odpovídající cytochromům P450.



Obr.13 SDS-PAGE elektroforéza po 20 hod exprese při 28°C a 180 RPM (buňky *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL) v 300 ml TB média

1. cytosol
2. cytosol kontrola
3. membrány
4. membrány kontrola
5. králičí CYP1A2 jako standard
6. marker wide range

Kromě SDS-PAGE elektroforézy byl výsledek exprese potvrzen také metodou Westernova přenosu. Na obrázku 14 je vidět silný nárůst koncentrace proteinu rozpoznávaného králičí protilátkou proti lidské formě CYP3A4.



Obr. 14 Imunoblot po 20 hod expresi při 28°C a 180 RPM, 300 µl TB média (buňky *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL
1. membránová frakce z kontrolní exprese
2. membránová frakce

4.2 Přirozený zkrácený gen pro lidský CYP3A4 získaný z cDNA

V rámci rozšíření studie byl také učiněn pokus o přípravu zkrácené lidské formy CYP3A4 z cDNA.

Pro porovnání vlivu optimalizace DNA sekvence na expresi genu pro CYP3A4 byl připraven konstrukt založený na stejných vektorech ale s nukleotidovou sekvencí odpovídající lidské cDNA. Ta byla získána jako insert v klonovacím plasmidu pCR4-TOPO. Úsek DNA přirozeného lidského genu odpovídající zkrácené formě CYP3A4 byl amplifikován pomocí PCR dvojicí navržených oligonukleotidů. DNA tak byla zároveň upravena pro vložení do vektoru pET22b a exprimována v několika kmenech *E. coli*. Sekvenci genu CYP3A4 z cDNA knihovny spolu s konci upravenými pro následné vložení do vektoru popisuje následující obrázek 15

5´ GACGAATT CATATGGCTCTTCTCCTGGCTGTCAGCCTGGTGCTCCTCTATCTAT
ATGGAACCCATTACATGGACTTTTTAAGAAGCTTGGAATTCAGGGCCCACACCT
CTGCCTTTTTTGGGAAATATTTTGTCCACCATAAGGGCTTTTGTATGTTTGACAT
GGAATGTCATAAAAAGTATGGAAAAGTGTGGGGCTTTTATGATGGTCAACAGCCTG
TGCTGGCTATCACAGATCCTGACATGATCAAAACAGTGCTAGTGAAAGAATGTTAT
TCTGTCTTCACAAACCGGAGGCCTTTTGGTCCAGTGGGATTTATGAAAAGTGCCAT
CTCTATAGCTGAGGATGAAGAATGGAAGAGATTACGATCATTGCTGTCTCCAACCT
TCACCAGTGGAAAACCAAGGAGATGGTCCCTATCATTGCCCAGTATGGAGATGTG
TTGGTGAGAAATCTGAGGCGGGAAGCAGAGACAGGCAAGCCTGTCACCTTGAAAGA
CGTCTTTGGGGCCTACAGCATGGATGTGATCACTAGCACATCATTGGAGTGAACA
TCGACTCTCTCAACAATCCACAAGACCCCTTTGTGGAAAACACCAAGAAGCTTTTA
AGATTTGATTTTTTGGATCCATTCTTTCTCTCAATAACAGTCTTTCCATTCTCAT
CCCAATTCTTGAAGTATTAAATATCTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTACAAATTTTT
TAAGAAAATCTGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCGAAGATACACAAAAGCAC
CGAGTGGATTTCTTCAGCTGATGATTGACTCTCAGAATTCAAAAGAACTGAGTC
CCACAAAGCTCTGTCCGATCTGGAGCTCGTGGCCCAATCAATTATCTTTATTTTTG
CTGGCTATGAAACCACGAGCAGTGTCTCTCCTTCATTATGTATGAACTGGCCACT
CACCTGATGTCCAGCAGAACTGCAGGAGGAAATGATGCAGTTTTACCCAATAA
GGCACCACCCACCTATGATACTGTGCTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGGTGA
ATGAAACGCTCAGATTATCCCAATTGCTATGAGACTTGAGAGGGTCTGCAAAAAA
GATGTTGAGATCAATGGGATGTTCAATCCCAAAGGGGTGGTGGTGTGATTCCAAG
CTATGCTCTTCACCGTGACCCAAAGTACTGGACAGAGCCTGAGAAGTTCCTCCCTG
AAAGATTCAGCAAGAAGAACAAGGACAACATAGATCCTTACATATACACACCCTTT
GGAAGTGGACCCAGAACTGCATTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAACATGAACT
TGCTCTAATCAGAGTCCTTCAGAACTTCTCCTTCAAACCTTGTAAGAAACACAGA
TCCCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGGACTTCTTCAACCAGAAAAACCCGTTGTTCTA
AAGGTTGAGTCAAGGGATGGCACCGTAAGTGGAGCCTGACTCGAGTATCGATAC
3´

Obr. 15 Sekvence zkráceného přirozeného genu pro lidský CYP3A4 z cDNA
Restrikční místa pro EcoRI (modře), NdeI (zeleně), XhoI (červeně), ClaI (žlutě)

4.2.1 Příprava expresního vektoru

Za účelem vyjmutí originálního lidského genu CYP3A4 a jeho amplifikace byly navrženy následující oligonukleotidy sloužící jako primery při polymerasové řetězové reakci obrázek 16. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby obsahovaly palindromatické sekvence, které rozpoznávají restrikční endonukleasy využívané k ligaci do vektorů používaných v laboratoři. Přední „forward“ primer obsahoval místa, která jsou rozpoznána restrikčními EcoRI a NdeI. Zadní „reverse“ primer obsahoval místa rozeznána restrikčními XhoI a ClaI.

1. 5' - 3' GACGAATTCATATGGCTCTTCTCCTGGCTGTCAGC

2. 5' - 3' GTATCGATACTCGAGTCAGGCTCCACTTACGGT

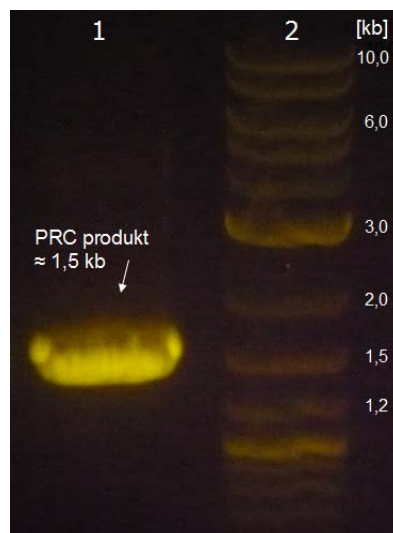
Obr. 16 Navržené oligonukleotidy

1. přední „forward“ primer

2. zadní „reverse“ primer

Restrikční místa pro EcoRI (modře), NdeI (zeleně), ClaI (žlutě), XhoI (červeně)

Produkt PCR byl vizualizován a přečištěn pomocí horizontální agarosové elektroforézy obrázek 17. Zóna v oblasti zhruba 1,5 kb odpovídá molekulové hmotnosti přirozeného lidského genu pro CYP3A4.

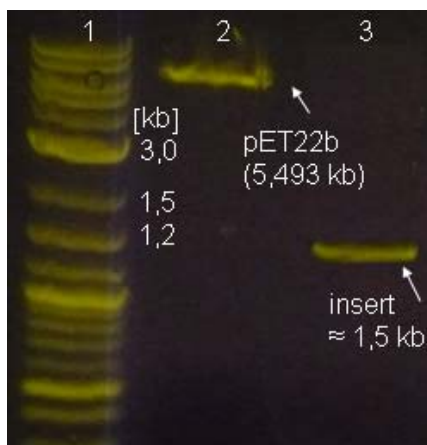


Obr. 17 Přečištění produktu PCR

1. produkt PCR o velikosti zhruba 1,5 kb

2. DNA marker 2-Log 0,1 – 10 kb

Za účelem přípravy expresního vektoru byla provedena dvojitá restrikce produktu PCR a expresního plasmidu pET22b restrikčními endonukleasami XhoI a NdeI. Výsledný produkt reakce byl přečištěn pomocí agarosové elektroforézy - obrázek 18. Štěpení sloužilo zároveň jako kontrola správnosti postupu PCR.



Obr. 18 Příprava expresního vektoru (gen pro CYP3A4 z cDNA knihovny)

1. DNA marker 2-Log 0,1 – 10 kb
2. plasmid pET22b po dvojí restrikci
3. insert po dvojí restrikci

Na obrázku 18 jsou vidět zóny odpovídající svou molekulovou hmotností insertu (genu pro CYP3A4) a plasmidu pET22b.

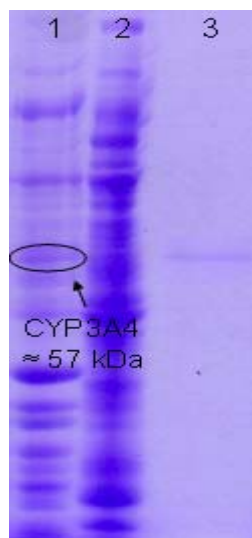
Fragmenty odpovídající štěpenému insertu a štěpenému vektoru byly ligovány přes noc při 16°C, ligační směs pak byla použita k transformaci buněk DH5α. Následovala kultivace jedné kolonie „single-cell colony“ a izolace plasmidové DNA obsahující insert pomocí fenol-chloroformové metody. Celkem bylo získáno 40 μl DNA o koncentraci 240 μl/ml a vysoké čistotě 1,97 ($(A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})$). Hodnota poměru korigujícího zákal v roztoku DNA byla 2,13 ($(A_{260}-A_{320}) / (A_{230}-A_{320})$).

4.2.2 Exprese cytochromu P450 3A4 *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL)

Při expresi zkráceného genu pro lidskou formu CYP4A3 z cDNA knihovny byly využity podmínky optimalizované při expresi předešlého zkráceného konstruktu pro CYP3A4. Výběr bakteriálního kmene optimálního k expresi tohoto konstruktu byl zvolen na základě zabarvení buněk jednotlivých kmenů během exprese. Tentokrát nebyla při výběru nejvhodnějšího kmene prováděna SDS-PAGE elektroforéza, již na základě porovnání barevné změny pelet bylo potvrzeno, že optimální kmen pro expresi je opět *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL.

Díky využití podmínek předešlé optimalizace bylo možné porovnat efektivitu exprese jednotlivých forem genů CYP3A4.

Výsledek exprese zkráceného přirozeného genu pro lidský CYP3A4 z cDNA byl analyzován opět metodou SDS-PAGE obrázek 19, přičemž byl výsledek ještě potvrzen imunoblotem obrázek 20.



Obr. 19 SDS-PAGE elektroforéza po expresi CYP3A4 (zkrácený gen z cDNA) 20 hod, 28°C, 180 RPM, 300 µl TB média (buňky *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL)

1. membránová frakce
2. cytosol
- 3 standard králičí CYP1A2



Obr. 20 Imunoblot po expresi zkráceného genu pro lidský CYP3A4 z cDNA, 20 hod, 28°C, 180 RPM 300 µl TB média (buňky *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL)

1. membránová frakce po diferenční centrifugaci
2. kontrolní membránová frakce

Výsledek SDS-PAGE byl opět potvrzen metodou „Westernova“ přenosu. Na obrázku 20 je vidět zřetelný nárůst koncentrace proteinu, který je rozeznán králičí protilátkou proti lidské formě cytochromu P450 3A4.

4.3 Přirozený gen pro lidský CYP3A4 z cDNA

V rámci rozšíření studie byl také učiněn pokus o přípravu nezkrácené lidské formy CYP3A4 z cDNA.

Pro přípravu tohoto konstruktů byl opět použit plasmid pCR4-TOPO obsahující cDNA s genem pro CYP3A4. Za účelem vyjmutí celého genu byly navrženy oligonukleotidy sloužící jako primery pro PCR. Také tento konstrukt byl založený na stejném vektoru pET22b. Sekvenci genu pro CYP3A4 z cDNA knihovny popisuje následující obrázek 21.

```
5´ GACGAATTCATATGGCTCTCATCCCAGACTTGGCCATGGAAACCTGGCTTCTCC
TGGCTGTCAGCCTGGTGGCTCCTCTATCTATATGGAACCCATTCACATGGACTTTTT
AAGAAGCTTGAATTCCAGGGCCACACCTCTGCCTTTTTTGGGAAATATTTTGTCT
CTACCATAAGGGCTTTTGTATGTTTGACATGGAATGTCATAAAAAGTATGGAAAAG
TGTGGGGCTTTTATGATGGTCAACAGCCTGTGCTGGCTATCACAGATCCTGACATG
ATCAAAACAGTGCTAGTGAAAGAATGTTATTCTGTCTTCACAAACCGGAGGCCTTT
TGGTCCAGTGGGATTTATGAAAAGTGCCATCTCTATAGCTGAGGATGAAGAATGGA
AGAGATTACGATCATTGCTGTCTCCAACCTTCACCAGTGGAAAACCTCAAGGAGATG
GTCCCTATCATTGCCAGTATGGAGATGTGTTGGTGAGAAATCTGAGGCGGGAAGC
AGAGACAGGCAAGCCTGTACCTTGAAAGACGTCTTTGGGGCCTACAGCATGGATG
TGATCACTAGCACATCATTTGGAGTGAACATCGACTCTCTCAACAATCCACAAGAC
CCCTTTGTGGAAAACACCAAGAAGCTTTTAAGATTTGATTTTTTGGATCCATTCTT
TCTCTCAATAACAGTCTTTCCATTCCCTCATCCCAATTCTTGAAGTATTAATATCT
GTGTGTTTCCAAGAGAAGTTACAAATTTTTTAAGAAAATCTGTAAAAAGGATGAAA
GAAAGTCGCCTCGAAGATACACAAAAGCACCGAGTGGATTTCTTCAGCTGATGAT
TGAATCTCAGAATTCAAAGAAACTGAGTCCCACAAAGCTCTGTCCGATCTGGAGC
TCGTGGCCCAATCAATTATCTTTATTTTTGCTGGCTATGAAACCACGAGCAGTGTT
CTCTCCTTCATTATGTATGAACTGGCCACTCACCTGATGTCCAGCAGAACTGCA
GGAGGAAATTGATGCAGTTTTTACCCAATAAGGCACCACCCACCTATGATACTGTGC
TACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGGTGAATGAAACGCTCAGATTATTCCCAATT
GCTATGAGACTTGAGAGGGTCTGCAAAAAGATGTTGAGATCAATGGGATGTTTCAT
TCCCAAAGGGGTGGTGGTGGTATGATTCCAAGCTATGCTCTTCACCGTGACCCAAAGT
ACTGGACAGAGCCTGAGAAGTTCCTCCCTGAAAGATTGAGCAAGAAGAACAAGGAC
AACATAGATCCTTACATATACACACCCTTTGGAAGTGGACCCAGAACTGCATTGG
CATGAGGTTTGTCTCATGAACATGAACTTGCTCTAATCAGAGTCTTCAGAACT
TCTCCTTCAAACCTTGTAAGAAACACAGATCCCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGGA
CTTCTTCAACCAGAAAACCCGTTGTTCTAAAGGTTGAGTCAAGGGATGGCACCCT
AAGTGGAGCCTGACTCGAGTATCGATAC 3´
```

Obr. 21 Sekvence genu pro CYP3A4 z lidské genomové knihovny.
Restrikční místa pro EcoRI (modře), NdeI (zeleně), XhoI (červeně), ClaI (žlutě)

Za účelem vyjmutí genu pro CYP3A4 a jeho amplifikace byly navrženy následující oligonukleotidy sloužící jak primery při polymerasové řetězové reakci obrázek 22. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby obsahovaly palindromatické sekvence, které rozpoznávají restriční endonukleasy využívané k ligaci do vektorů používaných v laboratoři. Přední „forward“ primer obsahoval místa, která jsou rozpoznána restriktasami EcoRI a NdeI. Zadní „reverse“ primer obsahoval místa rozeznána restriktasami XhoI a ClaI.

1. 5′-3′ GACGAATTCATATGCTCTTCTCCTGGCTGTCAGC
2. 5′-3′ GTATCTAGACTCGAGTCAGGCTCCACTTACGGT

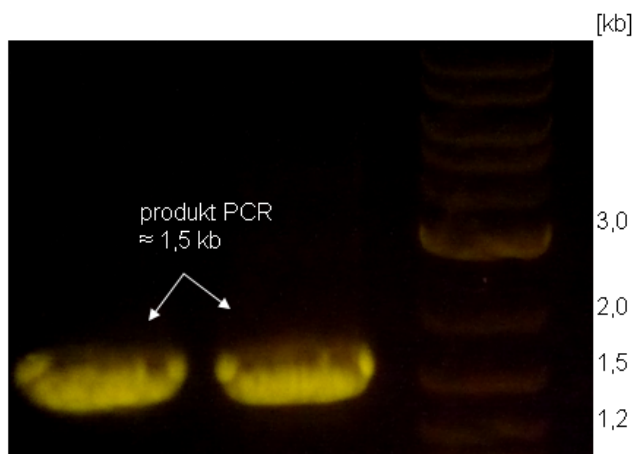
Obr. 22 Navržené primery

1. přední „forward“ primer
2. zadní „reverse“ primer

Restriční místa pro EcoRI (modře), NdeI (zeleně), XhoI (červeně), ClaI (žlutě)

4.3.1 Příprava expresního vektoru

Po provedení PCR za účelem vyjmutí genu pro CYP3A4 z pCR4-TOPO plasmidu byla s produktem provedena horizontální agarosová elektroforéza. Tím bylo docíleno přečištění PCR produktu (obrázek 23).

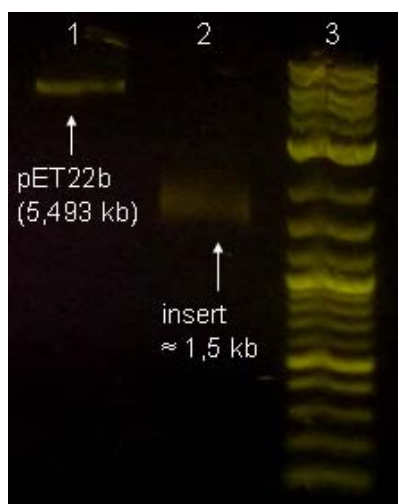


Obr. 23 Vizualizace produktu PCR

- 1, 2. produkt PCR o velikosti zhruba 1,5 kb
3. DNA marker 2-Log 0,1 – 10 kb

Na obrázku 23 je viditelná zóna v oblasti, která svojí velikostí odpovídá genu pro CYP3A4. Přestože bylo na gel naneseno velké množství DNA produktu, nejsou na něm prakticky patrné žádné další fragmenty, což svědčí o tom, že PCR proběhlo úspěšně.

Produkt PCR a expresní vektor pET22b byly štěpeny restrikními endonukleasami XhoI a NdeI. Štěpená DNA byla následně vizualizována pomocí horizontální agarosové elektroforézy obrázek 24. Elektroforéza potvrdila přítomnost fragmentů DNA, které svojí velikostí odpovídají jak genu pro CYP3A4, tak plasmidu pET22b.



Obr. 24 Příprava expresního vektoru založeném na plasmidu pET22b

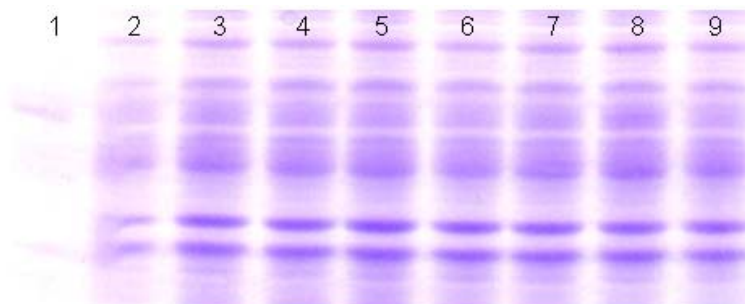
1. plasmid pET22b po dvojí restrikci
3. insert po dvojí restrikci
2. DNA marker 2-Log 0,1 – 10 kb

Fragmenty odpovídající insertu a štěpenému vektoru byly ligovány přes noc při 16°C, ligační směs pak byla použita k transformaci buněk DH5 α . Následovala kultivace jedné kolonie „single-cell colony“ a izolace plasmidové DNA obsahující insert pomocí fenol-chloroformové metody. Celkem bylo získáno 40 μ l DNA o koncentraci 575 μ l/ml a poměrně vysoké čistotě 1,78 ($(A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})$). Hodnota poměru korigujícího zákal v roztoku DNA byla 1,80 ($(A_{260}-A_{320}) / (A_{230}-A_{320})$).

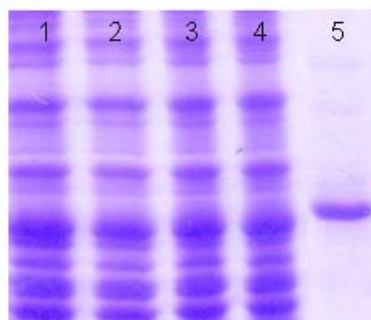
4.3.2 Expresse nezkrácené formy cytochromu P450 3A4 v *E. coli*

Plasmidem nesoucím gen pro CYP3A4 z cDNA knihovny byly transformovány expresní kmeny BL21-Gold, BL21-Codon Plus (DE3)-RIL, BL21-Codon Plus (DE3)-

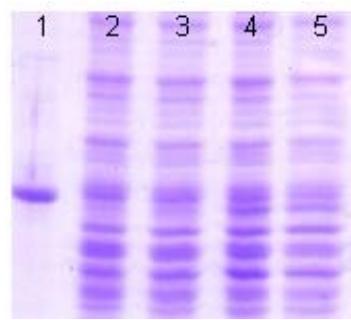
RIPL, BL21 C41(DE3), BL21 C43(DE3). Produkce probíhala v LB médiu 30 hod při 37°C, 180 RPM při indukci 1 mM IPTG s přídavkem 0,5 mM kyseliny δ -aminolevulové. Vzorky celých buněk byly odebírány v různých časech od zahájení exprese, poté byly upraveny a byla s nimi provedena SDS-PAGE elektroforéza obrázek 25.



- 1.-4. dráha buňky *E. coli* BL21 C41(DE3) v 15 ml LB média
1. standard králičí CYP1A2
2. před indukcí
3. po 10 hod expresi
4. po 20. hod expresi
5. po 30 hod expresi
- 6.-9. dráha buňky *E. coli*: BL21 C43(DE3) v 15 ml LB média
6. před indukcí
7. po 10 hod expresi
8. po 20. hod expresi
9. po 30 hod expresi



- E. coli* BL21 Gold v 15 ml LB média
1. před indukcí
 2. po 10 hod expresi
 3. po 20 hod expresi
 4. po 30 hod expresi
 5. standard králičí CYP1A2



- E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL v 15 ml LB média
1. standard králičí CYP1A2
 2. před indukcí
 3. po 10 hod expresi
 4. po 20 hod expresi
 5. po 30 hod expresi

Obr. 25 Výsledek exprese přirozeného genu pro lidský CYP3A4 37°C, 180 RPM, vzorky odebírány v několika časech, exprese v různých bakteriálních kmenech

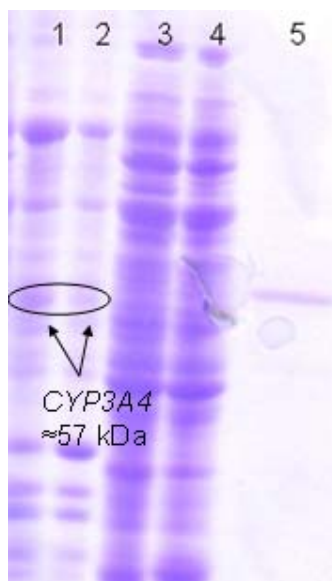
Obrázek 25 ukazuje, že u bakteriálních kmenů vhodných pro expresi proteinů BL21-Gold, BL21 C41(DE3) a BL21 C43(DE3) nebyl v průběhu exprese zaznamenán nárůst proteinu v oblasti odpovídající cytochromu P450. U kmene BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL byl zaznamenán mírný nárůst koncentrace proteinu v oblasti molekulové hmotnosti cytochromů P450. Nakonec byl ovšem jako expresní kmen zvolen *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL. Díky těmto produkcím byla určena předpokládaná maximální doba exprese. Při překročení 30 hodinové doby trvání exprese došlo ke vzniku sraženin v buněčné kultuře, zřejmě lyzí buněk např. z důvodu nedostatečné aerace systému, či nahromadění toxických látek v kultuře.

4.3.2.1 Exprese nezkrácené formy cytochromu P450 3A4 v *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL

E. coli BL-21 Codon plus (DE3)-RIL byl optimální kmen pro expresi CYP3A4. Tato buněčná kultura po indukci IPTG a 20 hodinové kultivaci při 28°C vykazovala ve srovnání s ostatními kmeny výrazné červenohnědé zbarvení.

Podmínky exprese nezkrácené formy cytochromu P450 3A4 byly zvoleny podobné jako v předcházejících experimentech, pouze bylo ověřeno, že zvýšení koncentrace IPTG a prodloužení produkce nevede k nárůstu exprese. Kultura byla indukována 0,1 mM IPTG při optické denzitě 1. Zároveň byla exprese podpořena přidávkem 0,5 mM kyseliny δ -aminolevulové a 1 mM MgCl₂. Exprese probíhala 20 hod při 28°C a 180 RPM (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp).

Pro lepší porovnání efektivity exprese přirozeného lidského genu pro CYP3A4 z cDNA a zkráceného syntetického genu pro CYP3A4 byly provedeny také simultánní exprese těchto genů. Výsledné vzorky získané frakční centrifugací byly analyzovány SDS-PAGE elektroforézou obrázek 26. Potvrzení výsledku exprese už samotného přirozeného genu pro lidskou formu CYP3A4 bylo provedeno imunoblotem obrázek 27.



Obr. 26 Porovnání efektivity exprese genu pro lidský CYP3A4 z cDNA a syntetického zkráceného genu pro CYP3A, 20 hod, 28°C, 180 RPM (buňky *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL) v 300 µl TB média

1. membrány (syntetický gen pro CYP3A4)
2. membrány (CYP3A4 z cDNA)
3. cytosol (syntetický gen pro CYP3A4)
4. cytosol (CYP3A4 z cDNA)
5. králičí CYP1A2 jako standard

Na obrázku 26 jsou viditelné pruhy v oblasti molekulové hmotnosti odpovídající cytochromům P450.



Obr. 27 I imunoblot po expresi genu pro lidský CYP3A4 z cDNA, 20 hod, 28°C, 180 RPM, 300 µl TB média (buňky *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL)

1. membránová frakce
2. cytosol

I v tomto případě byla přítomnost CYP3A4 potvrzena metodou imunoblotu. Cílový protein byl rozeznán králičí protilátkou proti lidské formě CYP3A4. Oproti kontrole je vidět strmý nárůst exprese CYP3A4.

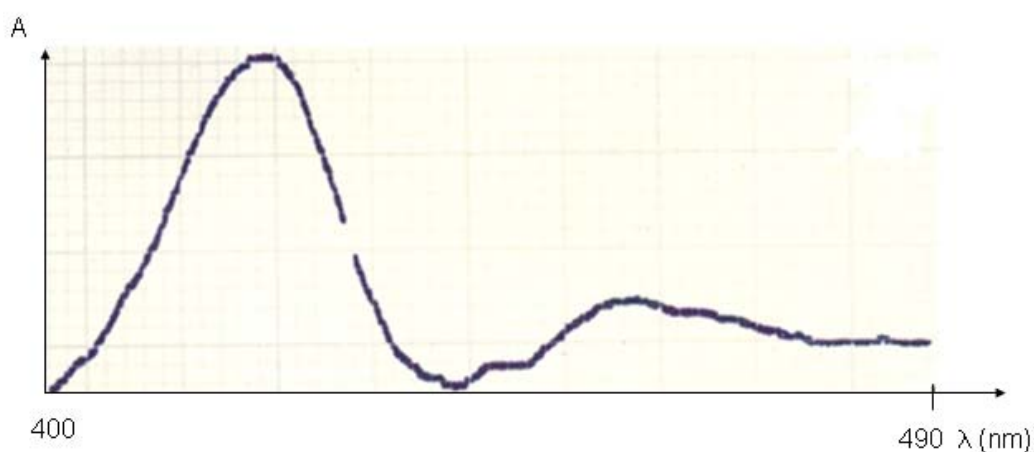
4.4 Stanovení koncentrace cytochromů P450

Měření spekter membránové frakce získané diferenční centrifugací buněk *E. coli* BL-21 Codon plus (DE3)-RIL po 20 hod expresi při 28°C a 180 RPM 300 µl TB média v rozmezí vlnových délek 400-490 nm ukázalo tvar křivky, který není typický pro cytochromy P450. Pouze u membránové frakce získané expresí CYP3A4 založeném na konstruktu syntetického zkráceného genu vykazovalo spektrum mírný nárůst absorbance při vlnové délce 450 nm. Měřená spektra membránových frakcí vzniklých po expresi všech tří jednotlivých genových konstruktů vykazovala absorpční maximum při 420 nm, což svědčí o přítomnosti hemoproteinu. Množství CYP3A4 a hemoproteinu s absorpčním maximem při 420 nm v membránových frakcích znázorňuje tabulka 4. Diferenční spektrum po redukci a probublání CO měřené po expresi syntetického zkráceného genového konstruktu CYP3A4 je na obrázku 28.

Tab.4 Množství CYP3A4 v membránové frakci stanovené dle CO spektra

Genový konstrukt	c (CYP3A4) dle CO spektra	c hemoproteinu dle CO spektra
Syntetický zkrácený gen pro CYP3A4	0,37 µM	0,82 µM
Zkrácený gen pro lidský CYP3A4 z cDNA	X	0,04 µM
Gen pro lidský CYP3A4 z cDNA	X	0,06 µM

X – změřeno netypické spektrum



Obr. 28 Diferenční spektrum po redukci a probublání CO.
Membránová frakce po expresi syntetického genu pro lidský CYP3A4.
Maximum při 420 nm a 450 nm.

5. Diskuse

Předkládaná práce popisuje a rozšiřuje postupy související s heterologní expresí lidského cytochromu P450 3A4, především pak přináší porovnání produkce zájmového proteinu dle neoptimalizované cDNA oproti optimalizovanému syntetickému genu pro stejný protein a to za použití stejného vektoru i hostitelského kmene. Konkrétní výsledky lze shrnout následovně:

Během řešení diplomové práce byly úspěšně zkonstruovány tři expresní vektory nesoucí tři různé geny pro lidský cytochrom P450 3A4. Narozdíl od starších prací publikovaných např. ve skupině prof. Guengeriche byly konstrukty založeny na expresním plasmidu pET22b. První z nich obsahoval zkrácený syntetický gen lidského cytochromu P450 3A4. Tento gen byl optimalizován pro lepší produkci v hostitelském organismu, konkrétně byla provedena optimalizace pro *Escherichia coli* K-12. Další dva konstrukty obsahovaly gen pro lidský cytochrom P450 3A4 z cDNA. Obrázek 29 ukazuje porovnání nukleotidové sekvence tohoto genu se sekvencí přirozeného lidského genu pro CYP3A4 z cDNA.

```
Query 1 ATGGCTCTCATCCCAGACTTGGCCATGGAAACCTGGCTTCTCCTGGCTGTGTCAGCCTGGTG 60
Sbjct 1 .....C-----..G..G.....G..G.....T 60

Query 61 CTCCTCTATCTATATGGAACCCATTACATGGACTTTTTTAAGAAGCTTGGAAATCCAGGG 120
Sbjct 61 ..G..G.....G..C..C..G..CAGC..C..T..G.....A..G..T..C..G..T 120

Query 121 CCCACACCTCTGCCTTTTTTGGGAAATATTTTGTCTACCATAAGGGCTTTTGTATGTTT 180
Sbjct 121 ..A..G..G.....A..C..C..C..CC..AG...T..C..A.....C..... 180

Query 181 GACATGGAATGTCATAAAAAGTATGGAAAAGTGGGGCTTTTATGATGGTCAACAGCCT 240
Sbjct 181 .....G..C..C..G..A.....C..G.....C.....C.....G 240

Query 241 GTGCTGGCTATCACAGATCCTGACATGATCAAAACAGTGCTAGTGAAAGAATGTTATTCT 300
Sbjct 241 ..T.....G.....C..C..G..T.....G..G.....G.....C..CAGC 300

Query 301 GTCTTCACAAACCGAGGCCTTTTGGTCCAGTGGGATTTATGAAAAGTGCCATCTCTATA 360
Sbjct 301 ..G..T..C..T..CC.T..A..C..C.....T..T.....G..C.....AGC..T 360

Query 361 GCTGAGGATGAAGAATGGAAGAGATTACGATCATTGCTGTCTCCAACCTTCACCAGTGG 420
Sbjct 361 ..C..A..C..G..G.....AC.TC.G..TAGCC.....AGC..G.....T..G..C..C 420

Query 421 AAActCAAGGAGATGGTCCCTATCATTGCCAGTATGGAGATGTGTTGGTGAAGAAATCTG 480
Sbjct 421 .....G.....A.....T..G..T..C.....C..C..C..C.....C.T..... 480

Query 481 AGGCGGAAGCAGAGACAGGCAAGCCTGTCACCTTGAAAGACGTCTTTGGGGCTACAGC 540
Sbjct 481 C.T..T..G..G.....C..T.....G..G..GC.....G.....C..G..... 540

Query 541 ATGGATGTGATCACTAGCACATCATTGGAGTGAACATCGACTCTCTCAACAATCCACAA 600
Sbjct 541 .....C..T.....G.....CAGC.....C.....T..TAGC..G..T.....G..G 600

Query 601 GACCCCTTTGTGGAAAACACCAAGAAGCTTTTAAGATTTGATTTTGGATCCATCTTT 660
Sbjct 601 .....G.....T.....A.....GC.GC.C..C..C..CC.....G.....C 660
```

Query	661	CTCTCAATAACAGTCTTTCCATTCCCTCATCCCAATTCTTGAAGTATTAATATCTGTGTG	720
Sbjct	661	..GAGC..C..C..T..C.....G.....G..C..G..G..GC.G..C.....	720
Query	721	TTTCCAAGAGAAGTTACAAATTTTTTAAGAAAATCTGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGC	780
Sbjct	721	..C..GC.T..G.....G..C...C.GC.C..GAGC..T..GC.C.....G..C...	780
Query	781	CTCGAAGATACACAAAAGCACCGAGTGGATTTCCTTCAGCTGATGATTGACTCTCAGAAT	840
Sbjct	781	..G.....C..G..G.....C.....G.....C...AGC.....	840
Query	841	TCAAAGAAACTGAGTCCCACAAAGCTCTGTCCGATCTGGAGCTCGTGGCCCAATCAATT	900
Sbjct	841	AGC..G..G..G...AG...T..G..A...AG...C...A..G.....AGC..C	900
Query	901	ATCTTTATTTTTGCTGGCTATGAAACCACGAGCAGTGTTCCTCCTTCATTATGTATGAA	960
Sbjct	901C..C..G.....G..G.....C.....GAG..T..C.....	960
Query	961	CTGGCCACTCACCTGATGTCCAGCAGAACTGCAGGAGGAAATTGATGCAGTTTTACCC	1020
Sbjct	961G..C.....G..C..G.....A.....A.....C.....C.G..G	1020
Query	1021	AATAAGGCACCACCCACCTATGATACTGTGCTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGGTG	1080
Sbjct	1021C.....A.....C..C..T..G..A.....A..C..G.....T...	1080
Query	1081	AATGAAACGCTCAGATTATTTCCAATTGCTATGAGACTTGAGAGGGTCTGCAAAAAGAT	1140
Sbjct	1081	..C.....C..GC.CC.G.....G...C.T..G...C.C..G.....G..G..C	1140
Query	1141	GTTGAGATCAATGGGATGTTTCATTCCCAAAGGGTGGTGGTATGATTCCAAGCTATGCT	1200
Sbjct	1141	..G..A..T..C..C.....C..G..G..C..T.....G.....G	1200
Query	1201	CTTACCCTGACCCAAAGTACTGGACAGAGCCTGAGAAAGTTCCTCCCTGAAAGATTCAGC	1260
Sbjct	1201	..G..T.....T.....C..A..G..A.....T..G..A..GC.C.....	1260
Query	1261	AAGAAGAACAAGGACAACATAGATCCTTACATATACACACCCTTTGAAGTGGACCCAGA	1320
Sbjct	1261A.....T..C..C..G..T..C.....G..G..C..T..C..T..ACT	1320
Query	1321	AACTGCATTGGCATGAGGTTTGTCTCTCATGAACATGAAACTTGTCTAATCAGAGTCCTT	1380
Sbjct	1321T.....T...C.T.....C..G.....T.....G..G..G..G...C.T..G..G	1380
Query	1381	CAGAACTTCTCCTTCAAACCTTGTAAGAAACACAGATCCCCCTGAAATTAAGCTTAGGA	1440
Sbjct	1381T..TAG.....G..G..C.....G..C.....T..A.....C.G...C.G..C	1440
Query	1441	GGACTTCTTCAACCAGAAAAACCCGTTGTTCTAAAGGTTGAGTCAAGGGATGGCACCGTA	1500
Sbjct	1441	..T..G..G.....G.....A.....G.....G..AAGCC.C.....T.....G	1500
Query	1501	AGTGGAGC 1508	
Sbjct	1501	..C..T.1508	

Obr. 29 Porovnání nukleotidových sekvencí

Červeně je zobrazena sekvence syntetického zkráceného genu CYP3A4, černě sekvence nezkráceného genu pro lidská CYP3A4 z cDNA. porovnání provedeno pomocí programu Blast [82].

Sekvence genů z cDNA nebyla nijak optimalizována pro hostitelský organismus, přičemž jeden z genů byl zkrácen na 5' konci o 30 nukleotidů, stejně jako syntetický zkrácený gen CYP3A4. Tím jsou z proteinového produktu odstraněny 3. až 12. aminokyselina na N-terminálním konci obrázek 30. Podobná modifikace již byla provedena a popsána jako úprava zvyšující expresi v bakteriálním systému [57]. Správnost postupu při konstrukci expresních vektorů byla potvrzena dvojí restrikcí a následnou agarosovou elektroforézou.

1. MA.....LLAVSLVLLYLYGTHSHGLFKK
2. MA.....LLAVSLVLLYLYGTHSHGLFKK
3. MALIPDLAMETWLLAVSLVLLYLYGTHSHGLFKK
4. MA.....LLAVFLVLLYLYGTHSHGLFKK

Obr. 30 Porovnání aminokyselinové sekvence N-terminálního konce proteinových produktů

1. N-terminální konec proteinového produktu zkráceného syntetického genu
2. N-terminální konec proteinového produktu zkráceného přirozeného genu z cDNA
3. N-terminální konec proteinového produktu nezkráceného přirozeného genu z cDNA
4. N-terminální konec proteinového produktu podle [56]

Dále byly expresními vektory transformovány bakteriální hostitelské buňky *E. coli* následujících kmenů vhodných k expresi: BL21-Codon Plus (DE3)-RIL, BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL, BL21 C41(DE3), BL21 C43(DE3) a BL21-Gold. Jako nejvhodnější pro produkci se ukázal být kmen BL21-Codon Plus (DE3)-RIL.

Optimální podmínky exprese byly tedy spíše takové, kde je produkce rekombinantního proteinu stimulována méně. Koncentrace IPTG byla snížena z původní hodnoty 1 mM na konečnou 0,1 mM, teplota byla snižována z původní teploty 37°C až na konečnou 28°C. Expresní vektor pET22b má vysoce aktivní promotor pro T7 RNA polymerasu, zřejmě proto původní vyšší stimulace exprese spolu s optimalizací genu pro expresi v *E. coli* vedly k nadměrné tvorbě cílového proteinu, který se však pravděpodobně nestihl včas složit a docházelo ke tvorbě agregátů. Proto mohlo zeslabení indukce vést k částečnému vyřešení tohoto problému.

Dalším aspektem, který může vést k nepříliš úspěšné produkci cílového proteinu je fakt, že tento eukaryotický membránový protein byl exprimován v prokaryotickém systému, takže nemůže využít eukaryotický systém inkorporace proteinů do membrán a je tak v podstatě závislý na spontánní inkorporaci do membrány bakterie. Přirozený lidský CYP3A4 však na svém N-konci obsahuje 3 aminokyselinová residua s polárním postranním řetězcem (D6, E10 a S18), které mohou znesnadnit spontánní inkorporaci proteinu do membrány (obrázek 30). Zkrácená forma CYP3A4 má dvě z těchto aminokyselin odstraněny (D6, E10) a její inkorporace by tak měla být usnadněna.

Výsledky exprese byly analyzovány metodou SDS-PAGE a imunoblotem. U membránové frakce získané diferenční centrifugací byla měřena diferenční CO spektra. Nárůst absorpance při vlnové délce 450 nm byl zaznamenán pouze po expresi zkráceného

syntetického genu. Tento výsledek ukazuje, že CYP3A4 exprimovaný z konstruktů založeném na cDNA nebyl aktivní. Možné důvody tohoto výsledku jsou shrnuty v předchozích dvou odstavcích.

Výsledky experimentů ukazují, že optimalizace genové sekvence pro daný hostitelský organismus má vliv na produkci cílového proteinu. U genů pro lidský CYP3A4 z cDNA nebyl zaznamenán rozdíl v expresi v závislosti na zkrácení genu na 5' konci.

Na míru exprese má zřejmě vliv i vhodný výběr hostitelského organismu. Kmen *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL obsahuje kopie genů kódující tRNA pro arginin, isoleucin a leucin, které jsou normálně v buňce *E. coli* zastoupeny v malé míře. Poměrně vhodný se zdál také kmen *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL, který má navíc ještě kopii genu kódující tRNA pro prolin. Nebyly zaznamenány větší rozdíly mezi těmito kmeny, nakonec byl pro produkci zvolen kmen *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL.

6. Závěr

Během řešení tématu diplomové práce byly úspěšně zkonstruovány a ověřeny tři expresní vektory založené na plasmidu pET22b. Jeden z vektorů obsahoval syntetický zkrácený gen pro lidskou formu CYP3A4, který byl optimalizován pro produkci v hostiteli *E. coli* K-12. Dále byly připraveny dva vektory obsahující zkrácený a nezkrácený přirozený gen pro lidskou formu CYP3A4 obsahující nukleotidovou sekvenci shodnou s lidskou DNA.

Byly optimalizovány podmínky exprese zkrácené i nezkrácené formy lidského CYP3A4. Při porovnání efektivity exprese syntetického genu pro CYP3A4 a přirozeného genu pro CYP3A4 bylo v souladu s předpoklady zjištěno, že účinnost produkce zvyšuje optimalizace nukleotidové sekvence genu pro hostitelský organismus *E. coli*. Přesto nebyla produkce tohoto membránového proteinu příliš efektivní a odpovídala množství cca 7,4 nmol cytochromu P450 na 1 litr media.

Delece nukleotidů na 5'konci, čili zkrácení N-terminální domény lidského CYP3A4 neměla výrazný vliv na efektivitu jeho produkce. Přičemž efektivita heterologní exprese nezkrácené formy CYP3A4 v *E. coli* byla obecně velmi nízká

7. Seznam literatury

1. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca Jr., J., Martínek, V., Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* **98**, 876-890
2. Penning, T.M. (2011) Chemical Carcinogenesis (Humana Press, London). 1st Ed
3. Watkins III, J.B., Klaassen, C.D. (1986) Xenobiotic biotransformation in livestock: comparison to other species commonly used in toxicity testing. *J. Anim. Sci.* **63**, 933-942
4. Klinger, W., Muller, D. (1976) Developmental aspects of xenobiotic transformation. *Environ. Health Perspect.* **18**, 13-23
5. Ramos, R., García, E. (2007) Induction of mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes in the coral *Montastraea faveolata* on acute exposure to benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol., Part C.* **144**, 348-355
6. Ahmad, S. (1983) Mixed-function oxidase activity in a generalist herbivore in relation to its biology, food plants, and feeding history. *Ecology* **64(2)**, 235-243
7. Potter, T.D. (2002) The role of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 311-316
8. Enoch, H.G., Strittmatter, P. (1979) Cytochrome b₅ Reduction by NADPH-Cytochrome P450 Reductase. *J. Biol. Chem.* **25**, 8976-8981
9. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376-386.
10. Omura, S., Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378
11. Omura, S., Sato, R. (1962) A New Cytochrome in Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**, 1375-1376
12. Nelson, D.R., (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 14-18
13. Deng, J., Carbone, I., Dean, R.A. (2007) The evolutionary history of Cytochrome P450 genes in four filamentous Ascomycetes. *BMC Evol Biol.* **7**, article no. 30
14. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104(9)**, 3947 – 3980
15. Omura, T. (1999) Forty years of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 690-698
16. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy.* **93**, 229-237
17. Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Philips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R. (1987) The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA* **6**, 1-11
18. Ortiz de Montellano, P.R. (2005) Cytochrome P450, Structure, Mechanism, and Biochemistry Third edition, Department of Pharmaceutical Chemistry University of California, San Francisco, CA
19. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem. Rev.* **104(9)**, 3947 – 3980,
20. Alston, K., Robinson, R.C., Park, S.S., Gelboin, H.V., Freidman, F.K. (1991) Interactions Among Cytochromes P-450 in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol.*

- Chem.* **266**, 735-739
21. Harding, B.W., Wong, S.H., Nelson, D.H. (1964) Carbon monoxide-combining substrates in rat adrenal. *Biochim. Biophys. Acta.* **92**, 415-417
 22. Bar-Nun, S., Kreibich, G., Adesnik, M., Alterman, L., Negishi, M., Sabatini, D.D. (1980) Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 965-969
 23. Szczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C., Doray, B., Kemper, B. (1995) The Cytoplasmic and N-terminal Transmembrane Domains of Cytochrome P450 Contain Independent Signals for Retention in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 24327-24333
 24. Omura, T. (2006) Mitochondrial P450s. *Chem.-Biol. Interact.* **163**, 86-93
 25. Sakaguchi, M., Mihara, K., Sato, R. (1984) Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3361-3364
 26. Bar-nun, S., Kreibich, G., Adesnik, M., Alterman, L., Negishi, M., Sabatini, D.D. (1980) Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 965-969
 27. Shebley, M., Kent, U.M., Ballou, D.P., Hollenberg, P.F. (2009) Mechanistic Analysis of the Inactivation of Cytochrome P450 2B6 by Phencyclidine: Effects on Substrate Binding, Electron Transfer, and Uncoupling. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 745-752
 28. Danielson, P.B. (2002) The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Curr. Drug Metab.* **3**, 561-597
 29. Finta, C., Zaphiropoulos, P.G. (2002) Intergenic mRNA Molecules Resulting from *trans*-Splicing. *J. Biol. Chem.* **277**, 5882-5890,
 30. Inoue, K., Inazawa, J., Nakagawa, H., Shimada, T., Zamazki, H., Guengerich, F.P., Abe, T. (1992) Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence *in situ* hybridization. *Jpn. J. Human Genet.* **37**, 133-138,
 31. Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70-83
 32. Koch, I., Weil, R., Wolbold, R., Brockmöller, J., Hustert, E., Burk, O., Nuessler, A., Neuhaus, P., Eichelbaum, M., Zanger, U., Wojnowski, L. (2002) Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metabol. Dispos.*
 33. Patki, K.C., Von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J. (2003) In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450: Role of CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 938-944
 34. Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R.J., Mohrenweiser, H.W., Goldstein, J.A. (2001) Identification of Variants of CYP3A4 and Characterization of Their Abilities to Metabolize Testosterone and Chlorpyrifos. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 825-831
 35. Canaparo, R., Finnström, N., Serpe, L., Nordmark, A., Muntoni, E., Eandi, M., Rane, A., Zara, G.P. (2007) Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 1138-1144
 36. Hukkanen, J., Väisänen, T., Lassila, A., Piipari, R., Anttila, S., Pelkonen, O., Raunio, H., Hakola, J. (2002) Regulation of CYP3A5 by Glucocorticoids and Cigarette Smoke in Human Lung-Derived Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 745-752

37. Yamakoshi, Y., Kishimoto, T., Sugimura, K., Kawashima, H. (1999) Human Prostate CYP3A5: Identification of a Unique 5'-Untranslated Sequence and Characterization of Purified Recombinant Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 676-681.
38. Murray, G.I., Pitchard, S., Melvin, W.T., Burke, M.D. (1995) Cytochrome P450 CYP3A5 in the human anterior pituitary gland. *FEBS Lett.* **364**, 79-82
39. Kitada, M., Kamataki, T., Itahashi, K., Rikihisa, T., Kato, R., Kanakubo, Y. (1985) Immunochemical examinations of cytochrome P-450 in various tissues of human fetuses using antibodies to human fetal cytochrome P-450, P-450 HFLa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 1154-1159
40. Kitada, M., Kamataki, T., Itahashi, K., Rikihisa, T., Kato, R., Kanakubo, Y. (1985) Purification and properties of cytochrome P-450 from homogenates of human fetal livers. *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 275-280
41. Gellner, K., Eiselt, R., Hustert, E., Arnold, H., Koch, I., Hanerl, M., Deglmann, C., Burk, O., Buntfuss, D., Escher, S., Bishop, C., Koebe, H.G., Brinkmann, U., Klenk, H.P., Kleine, K., Meyer, U.A., Wojnowski, L. (2001) Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenet. Genomics.* **11**, 111-121
42. Westlind, A., Malmebo, S., Johansson, I., Otter, Ch., Andersson, T.B., Ingelman Sundeberg, M., Oscarson, M. (2001) Cloning and Tissue Distribution of a Novel Human Cytochrome P450 of the CYP3A Subfamily, CYP3A43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 1349-1355
43. Gillam, E.M.J., Wunsch, R.M., Ueng, Y.F., Shimada, T., Reilly, P.E.B., Kamataki, T., Guengerich, F.P. (1997) Expression of Cytochrome P450 3A7 in *Escherichia coli*: Effects of 5' Modification and Catalytic Characterization of Recombinant Enzyme Expressed in Bicistronic Format with NADPH-Cytochrome P450 Reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 81-90
44. Patten, C.J., Thomas, P.E., Guy, R.L., Lee, M., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., and Yang, C.S. (1993) Cytochrome P450 Enzymes Involved in Acetaminophen Activation by Rat and Human Liver Microsomes and Their Kinetics. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 511-518
45. Combalbert, J., Fabre, I., Fabre, G., Dalet, I., Darencourt, J., Cano J.P., and Maurel, P. (1989) Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III_A gene subfamily. *Drug. Metab. Dispos.* **17**, 197-207
46. Vzorec acetaminophenu převzato z: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=48096> [cit. 16.3.2012]
47. Vzorec cyklosporinu: <http://chemicalspace.wordpress.com/category/cool-science/> [cit. 16.3.2012]
48. Ekroos, M., Sjögren, T. (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13682-13687
49. Khan, K.K., He, Y.Q., Domansky, T.L., Halpert, J.R. (2002) Midazolam Oxidation by Cytochrome P450 3A4 and Active-Site Mutants: an Evaluation of Multiple Binding Sites and of the Metabolite Pathway That Leads to Enzyme Inactivation. *Mol. Pharmacol.* **61**, 495-506
50. Williams, P.A., Cosme, J., Vinkovic, D.M., Ward, A., Angove, H.C., Day, P.J., Vonrhein, C., Tickle, I.J., Jhoti, H. (2004) Crystal Structure of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metirapone and Progesterone. *Science* **305**, 683-686
51. Shou, M., Dai, R., Cui, D., Korzekwa, K.R., Baillie, T.A., Rushmore, T.H. (2001) A

- Kinetic Model for the Metabolic Interaction of Two Substrate at the active Site of Cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.* **276**, 2256-2262
52. Yano, J.K., Wester, M.R., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F. (2004) The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 38091-38094
 53. Yun, C., Kim, K., Calcutt, M.W., Guengerich, F.P. (2005) Kinetic Analysis of Oxidation of Coumarins by Human Cytochrome P450 2A6. *J. Biol. Chem.* **280**, 12279-12291
 54. Isin, E.M., Guengerich, F.P. (2006) Kinetic and Thermodynamics of Ligand Binding by Cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.* **281**, 9127-9136
 55. Brown, T.A. (2007) Klonování genů a analýza DNA Úvod, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc
 56. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2000) Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, Ústí nad Labem
 57. Gillam, E.M.J., Baba, T., Kim, B.R., Ohmori, S. and Guengerich, F.P. (1993) Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and reconstitution of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 123-131
 58. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**, 103-119.
 59. http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/maps/pUC19_map.pdf [cit. 12.2.2012]
 60. pET system manual, Novagen, 10. vydání, (2002)
 61. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89.
 62. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
 63. <http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-22b-map.pdf> [cit. 10.5.2012]
 64. Ikemura, T. (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organism. *Mol. Biol. Evol.* **2**, 13-34
 65. Ermolaeva, M.D. (2001) Synonymous codon usage in bacteria. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**, 91-97
 66. Snustad, D.P., Simmons, M., J. (2009) Genetika, Masarykova univerzita nakladatelství Brno
 67. Kane, J.F. (1995) Effect of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494-500
 68. <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/> [cit.22.3.2012]
 69. Burgess-Brown, N.A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, Ch., Oppermann, U., Gileadi, O. (2008) Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expression Purif.* **59**, 94-102
 70. Stratagene, BL-21 CodonPlus Competent Cells INSTRUCTION MANUAL, (2005)
 71. http://www.overexpress.com/html/information_05.php#faq1 [cit.20.3.2012]
 72. Protocol JETquick Spin Column Technique, Genomed (2009)
 73. <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx> [cit.16.3.2012]

74. <http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp> [cit.29.3.2012]
75. Hálková T. (2010) *Příprava rekombinantního lidského cytochromu b5* (Diplomová práce, Katedra biochemie, PřF UK, Praha).
76. <http://www.opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpsonication101.htm> [cit.7.5.2012]
77. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
78. Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O. (2006) *Laboratorní techniky biochemie*, skriptum VŠCHT, Praha
79. <http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> [cit.7.5.2012]
80. <http://www.uniprot.org/uniprot/P08684> [cit.16.3.2012]
81. <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/> [cit.16.3.2012]
82. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome [cit.5.4.2012]