

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Martin Dvořák

Příprava rekombinantního cytochromu P450 1A1

Preparation of Recombinant Cytochrome P450 1A1

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Dagmar Svášková, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 29.8. 2011

Podpis:

Rád bych na tomto místě zejména poděkoval své školitelce **RNDr. Dagmar Sváškové, Ph.D.** za profesionální vedení, cenné rady a postřehy, zadání zajímavého tématu a také čas, který se mnou strávila při vyhotovení mé diplomové práce.

Dále bych chtěl velmi poděkovat **RNDr. Věře Černé, Ph.D.** a **RNDr. Michaele Moserové** za nesmírně velkou ochotu a pomoc při vypracovávání mé diplomové práce. Též moje díky patří **RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D.**, **RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D.**, **Mgr. Boženě Kubíčkové** a celému kolektivu laboratoře 219 a 221 za morální podporu při vykonávání nesnadné a časově náročné práce v laboratoři.

Abstrakt

Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) je jednou z hlavních isoform z celé „superrodiny“ cytochromů P450 (CYP). Jedná se zejména o extrahepatální enzym, který se podílí na oxidaci mnoha polycyklických aromatických uhlovodíků a jiných xenobiotik. Vedle úlohy v detoxifikačním metabolismu je bohužel CYP1A1 také jeden z nejvýznamnějších CYP v aktivaci prokarcinogenů.

Cílem této práce bylo připravit pomocí genové syntézy s optimalizací kodónů pro expresi v *E. coli* dvě různé varianty genu kódujícího potkaní CYP1A1, tj. „*wild type*“ (wt1A1) a s pozměněnou N-terminální kotvou (mod1A1) (u obou pak modifikace s nebo bez His kotvy na C-konci), porovnat jejich expresi v různých typech buněk *E. coli* a případně se pokusit o purifikaci a srovnání enzymové aktivity genových produktů.

Z navržených oligonukleotidů byly syntetizovány 2 „syntony“ (části genu), vloženy samostatně do plasmidu pUC19, po ověření sekvence „vyštěpeny“, spojeny a vloženy do expresního plasmidu pET-22b. Takto připravenými vektory byly transformovány 3 kmeny buněk *E. coli*, a to BL-21 (DE3) GOLD, RIL a RIPL. Byly testovány různé podmínky produkce požadovaných proteinů: teplota (18, 22, 24, 27 a 37 °C), čas produkce (až 48 hodin), koncentrace IPTG (0,1; 0,2; 0,5 a 1mM), OD₆₀₀ při indukci (0,4; 0,6; 0,8; 0,9 a 1) a přidání ALA (0, 30, 60, 120 nebo 150 minut před indukci). Exprese *CYP1A1* probíhala ve všech 3 kmenech buněk srovnatelnou měrou, ve všech kmenech byl však pozorován daleko vyšší stupeň exprese *wt1A1(His)* než *mod1A1(His)*. Nejvyšší exprese projevující se i nejvyšší aktivitou membránové frakce vůči 7-ethoxyresorufinu bylo dosaženo v případě *wt1A1*, a to v buňkách BL-21 (DE3) GOLD produkcí při 22 °C po dobu 12 hodin (indukce při 0,9 OD₆₀₀ 0,1mM IPTG). Dále byly optimalizovány kroky směřující k purifikaci wt1A1 z buněčného lyzátu; nejefektivnější solubilizace wt1A1 z membránové frakce se docílilo použitím směsi 0,6% (v/v) Triton X-100 s 0,6% (v/v) cholátem sodným.

Lze tedy shrnout, že byly připraveny expresní vektory pro přípravu rekombinantního potkaního wt1A1 a jeho tří modifikací, byly optimalizovány podmínky produkce všech čtyř variant tohoto proteinu v *E. coli*. Následně byl vytyčen optimální postup k získání solubilizovaného wt1A1 z membrán *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD.

Klíčová slova: rekombinantní potkaní CYP1A1, genová syntéza, EROD aktivita, solubilizace, heterologní exprese, *E. coli*

Abstract

Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) is one of the major isoforms of the cytochrome P450 superfamily. It is primarily an extrahepatic enzyme which is responsible for oxidation of many polycyclic aromatic hydrocarbons and other xenobiotics. Besides of the role in detoxification metabolism CYP1A1 is the one most important isoform involved in activation of procarcinogens.

The main aim of this project was preparation of two modifications of the rat CYP1A1 gene with codon optimization for expression in *E. coli* by gene synthesis. One was wild type (wt1A1) and the other was with modified N-terminal anchor (mod1A1) - for both modifications with or without His Tag at the C-end of CYP1A1. Furthermore, an aim was to compare their level of expression in different strains of *E. coli* and try to purify and assess enzymatic activity of the gene's products.

From pre-prepared oligonucleotides 2 „syntons“ (parts of gene) were synthesized and separately inserted into pUC19. After verified sequence of the „syntons“ they were cleaved from pUC19 and inserted together into pET-22b. These vectors were prepared for transformation of 3 strains of *E. coli* (BL-21 (DE3) GOLD, RIL a RIPL). For production of proteins many conditions were tested: temperature (18, 22, 24, 27 a 37 °C), time of production (untill 48 hours), concentration of IPTG (0,1; 0,2; 0,5 a 1mM), induction in different OD₆₀₀ (0,4; 0,6; 0,8; 0,9 a 1) and addition of ALA (0, 30, 60, 120 or 150 minutes before induction). Within 3 strains of *E. coli* expression of all *CYP1A1* modifications were on the same level with much higher expression for *wt1A1* than for *modCYP1A1*. The highest yield in production and activity of CYP1A1 was observed within production of wt1A1 in the BL-21 (DE3) GOLD cells (22 °C, 12 hours, induction in 0,9 OD₆₀₀ with 0,1mM IPTG). In the next steps conditions for solubilization of wt1A1 were optimized. The most effective solubilization of wt1A1 was observed with 0,6% (v/v) Triton X-100 together with 0,6% (v/v) sodium cholate.

Within the project 1) expression vectors for preparation of recombinant rat wt1A1 and his 3 other modifications were prepared, 2) conditions for production of 4 modifications of CYP1A1 in *E. coli* were optimized and 3) solubilization step of wt1A1 from membranes of *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD was optimized.

Key words: recombinant rat CYP1A1, gene synthesis, EROD assay, solubilization, heterologous expression, *E. coli* (In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod a přehled literatury	10
1.1 Cytochromy P450	12
1.1.1 <i>Formy a názvosloví cytochromů P450</i>	12
1.1.2 <i>Funkce cytochromů P450</i>	14
1.1.3 <i>Reakční cyklus cytochromů P450</i>	16
1.1.4 <i>Výskyt cytochromů P450 v organismu</i>	18
1.1.5 <i>Genetický polymorfismus lidských cytochromů P450</i>	21
1.2 Cytochromy P450 z rodiny 1	23
1.2.1 <i>Cytochrom P450 IA1</i>	23
1.2.2 <i>AhR signalizační dráha</i>	26
1.3 Heterologní exprese enzymů biotransformujících xenobiotika	29
1.3.1 <i>Heterologní exprese savčích cytochromů P450</i>	29
1.3.2 <i>Heterologní exprese cytochromu P450 IA1</i>	31
2 Cíl práce	33
3 Materiál a metody	34
3.1 Použitý materiál a chemikálie.....	34
3.2 Použité přístroje	37
3.3 Použité metody	38
3.3.1 <i>Práce s DNA</i>	38
3.3.1.1 <i>PCR - polymerasová řetězová reakce (včetně přípravy vzorků)</i>	38
3.3.1.2 <i>Horizontální elektroforéza na agarose</i>	39
3.3.1.3 <i>Izolace DNA z gelu: JET quick-Gel Extraction Spin Kit</i>	40
3.3.1.4 <i>Dvojitý štěpení DNA restrikčními endonukleasami</i>	40
3.3.1.4.1 <i>Endonukleasy EcoRI a HindIII</i>	40
3.3.1.4.2 <i>Vyštěpení syntonů z klonovacího plasmidu pUC19, štěpení expresního plasmidu pET-22b</i>	41
3.3.1.4.3 <i>Kontrolní štěpení s XhoI a NdeI endonukleasou</i>	41
3.3.1.5 <i>Ligace</i>	42
3.3.1.5.1 <i>Vytvoření vektoru pUC19 se syntonem 1 či 2</i>	42
3.3.1.5.2 <i>Ligace obou syntonů do plasmidu pET-22b – vytvoření celého genu</i>	42
3.3.1.6 <i>Příprava kompetentních buněk E. coli (DH5α; dcm⁻/dam⁻; BL-21 (DE3) GOLD, RIL, RIPL)</i>	43
3.3.1.7 <i>Transformace buněk E. coli (DH5α; dcm⁻/dam⁻; BL-21 (DE3) GOLD, RIL, RIPL) tepelným šokem, amplifikace vektoru</i>	44
3.3.1.8 <i>Izolace plasmidové DNA</i>	45
3.3.1.8.1 <i>JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit</i>	45
3.3.1.8.2 <i>GenEluteTM Plasmid Midiprep Kit</i>	45
3.3.1.9 <i>Určení koncentrace a čistoty DNA</i>	46
3.3.1.10 <i>Příprava vzorků na sekvenování</i>	46
3.3.2 <i>Produkce a separace rekombinantních proteinů</i>	47
3.3.2.1 <i>Optimalizace exprese rekombinantního wt/mod1A1</i>	47

3.3.2.2	<i>Izolace membránové frakce</i>	47
	a) <i>Standardní postup</i>	48
	b) <i>Zjednodušený postup: odstředění nerozbitých buněk a inkluzních tělísek v jednom kroku</i>	49
3.3.2.3	<i>Optimalizace solubilizace cytochromu P450 1A1 z membrán</i>	49
3.3.3	<i>Analýza vzorků z hlediska obsahu proteinů, stanovení koncentrace cytochromu P450 a jeho aktivity</i>	50
3.3.3.1	<i>Diskontinuální SDS elektroforéza</i>	50
3.3.3.2	<i>Metoda Western blotting</i>	51
3.3.3.3	<i>Imunochemická detekce cytochromu P450 1A1</i>	52
	a) <i>Králičí (komerční) polyklonální protilátka</i>	52
	b) <i>Slepičí polyklonální protilátka</i>	53
3.3.3.4	<i>Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny</i>	54
3.3.3.5	<i>Stanovení Ethoxyresorufin-O-deethylasové aktivity</i>	54
3.3.3.6	<i>Stanovení koncentrace cytochromu P450</i>	57
4	<i>Výsledky a diskuze</i>	58
4.1	<i>Příprava vektorů pro expresi cytochromu P4501A1</i>	58
4.1.1	<i>Návrh oligonukleotidů pro syntézu genu wt1A1(.His) resp. mod1A1(.His)</i>	58
4.1.2	<i>PCR – příprava syntonů z oligonukleotidů</i>	64
4.1.3	<i>Purifikace syntonů a jejich vložení do plasmidu pUC19, amplifikace vektoru</i>	65
4.1.4	<i>Kontrolní restriční štěpení EcoRI a HindIII endonukleasami a sekvenační analýza plasmidové DNA</i>	66
4.1.5	<i>Vyštěpení syntonů z klonovacího plasmidu pUC19 a jejich vložení do expresního plasmidu pET-22b</i>	68
4.2	<i>Optimalizace exprese wt1A1(.His) a mod1A1(.His)</i>	72
4.2.1	<i>Sledování inkorporace rekombinantních CYP1A1 do membrán expresních buněk při různých podmínkách produkce</i>	74
4.2.2	<i>Optimalizace produkce wt1A1 kmenem GOLD s ohledem na enzymovou aktivitu CYP1A1 v membránové frakci</i>	78
4.2.3	<i>Optimalizace solubilizace</i>	82
5	<i>Závěr</i>	85
	<i>Seznam použité literatury</i>	87

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor aromatických uhlovodíků
ALA	δ -aminolevulová kyselina
ARNT	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BSA	hovězí sérový albumin („ <i>Bovine Serum Albumin</i> “)
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP, P450	cytochrom(y) P450
CYP1A1	cytochrom P450 forma 1A1
DME	enzymy metabolizující léčiva („ <i>Drug Metabolizing Enzymes</i> “)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP(s)	deoxynukleosidtrifosfát(y)
dsDNA	dvojvláknová („ <i>double strand</i> “) deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylasová
EtOH	ethanol
GIT	gastrointestinální trakt
HAc	octová kyselina
HLH	doména „ <i>helix-loop-helix</i> “
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
LB	Luria Broth
mod1A1	CYP1A1 s modifikovanou N-terminální kotvou
mod1A1.His	CYP1A1 s modifikovanou N-terminální kotvou a s His kotvou na C-konci
modS1	synton 1 s modifikovanou N-terminální kotvou
modS2	synton 2 bez STOP kodonu
MQ	deionizovaná voda

NaAc	octan sodný
NADPH	nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	doména „ <i>Per-ARNT-Sim</i> “
pb	párů basí
PCR	polymerasová řetězová reakce
pDNA	plasmidová deoxyribonukleová kyselina
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
PVDF	polyvinylidenfluorid
RPM	počet otáček za minutu („ <i>Revolutions Per Minute</i> “)
SDS	dodecylsírán sodný („ <i>Sodium dodecyl sulfate</i> “)
TAE	pufr Tris-Acetát-EDTA; složení viz Kap. 3.3.1.3
TE	pufr Tris-EDTA; složení viz Kap. 3.3.1.9.1
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
wt1A1	nemodifikovaný („ <i>wild type</i> “) CYP1A1
wt1A1.His	nemodifikovaný („ <i>wild type</i> “) CYP1A1 s His kotvou na C-konci
wtS1	nemodifikovaný („ <i>wild type</i> “) synton 1
wtS2	nemodifikovaný („ <i>wild type</i> “) synton 2

1 Úvod a přehled literatury

Lidé jsou každým dnem vystaveni nepříznivému vlivu cizorodých látek (xenobiotik), se kterými se v našem životě setkáváme nepřetržitě... různé látky ve vzduchu, stravě, lécích, atd. Jako xenobiotika se označují takové látky, které se v organismu normálně nevyskytují a nejsou potřebné pro jeho zdravý vývoj ani jako zdroj energie.^[1] Xenobiotika v našem životním prostředí představují velký počet chemických sloučenin, která mohou být buď přírodního či syntetického původu. Náleží sem léky, agrochemikálie nebo všudypřítomné polutanty (znečišťující látky, např. těžké kovy), alkaloidy, zvířecí nebo rostlinné toxiny, apod.^[2] Chemický průmysl se uvádí jako primární zdroj syntetických xenobiotik a za sekundární zdroj se označují takové oblasti lidské činnosti, kde jsou tyto produkty chemického průmyslu používány.

Pro organismus jsou tedy xenobiotika neprospěšné, či záměrně narušují jeho „správný chod“. Proto snahou většiny organismů je dané xenobiotika přeměňovat a eliminovat pryč. U xenobiotik je důležité si uvědomit, že riziko poškození organismu je přímo závislé, kromě toxicity látky, i na její koncentraci a době působení.^[1] V mnoha případech je překážkou k eliminaci xenobiotik z organismu jejich vysoká hydrofobicita. Nejen, že jsou lipofilní sloučeniny pro organismus potenciálně toxické, ale mohou se v organismu také akumulovat, pokud se nepřemění na polárnější sloučeniny, které může organismus přirozenou cestou eliminovat (močí, výkaly).^[2]

Biotransformační procesy usnadňující vyloučení xenobiotik z organismu jsou katalyzovány řadou enzymů často označovaných jako DME – „*Drug Metabolizing Enzymes*“. Tyto enzymy sehrávají zásadní role ve střevní absorpci (permeabilita), metabolismu, eliminaci a detoxifikaci xenobiotik. Značná část xenobiotik je schopna ovlivňovat svůj vlastní metabolismus a exkreci tím, že pozměňují transkripci celé řady genů v různých tkáních a životně důležitých orgánech, tj. například játra, ledviny, střeva, plíce, mozek, placenta či pankreas.^[3] Regulace genové exprese DME má potenciální dopad na metabolismus, eliminaci a interakci léčiv mezi sebou u mnoha terapeutických látek, stejně jako na schopnost DME chránit lidské tělo proti působení environmentálních xenobiotik.^[4, 5] Identifikace konkrétních enzymů účastnících se přeměny daného léčiva a současně genetických regulátorů příslušných DME by mohla mít mnoho možných klinických využití a značně ovlivnit vývoj medicíny „ušité na míru“ pro každého z nás.^[6]

Ke klíčovým enzymům, které se podílejí na biotransformaci xenobiotik, patří cytochromy P450 (CYP). Tyto enzymy tvoří hlavní skupinu enzymů, která katalyzuje nespočet chemických reakcí, jež jsou považovány za rychlost limitující krok biotransformačních procesů většiny léčiv.^[7] Výzkum zaobírající se cytochromy P450 se velmi rozsáhle rozvíjel a rozvíjí se i nadále. Je mnoho směrů, kam může výzkum CYP směřovat. Například jeden směr se zabývá zkoumáním CYP u patogenů a jejich potenciálního využití při terapeutickém zásahu. Jiný se soustředí na podrobnou analýzu funkce CYP, aby se docílilo odhalení jejich možné role v biosyntéze léčiv, která následně umožní nové manipulace s biomolekulami v naději, že se podaří vyvinout nový lék.^[8]

Díky výzkumu CYP již nyní dokážeme vysvětlit metabolismus a toxicitu nebo kancerogenní účinky řady cizorodých látek včetně podávaných léčiv. S těmito znalostmi můžeme často s dostatečně velkou přesností předurčit, jak bude určitý lék v lidském organismu metabolizován.^[9] Nicméně stále nejsou naše vědomosti ohledně cytochromů P450 úplné, a proto se nadále a neustále pokračuje ve výzkumu těchto důležitých enzymů.

1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou enzymy, které jsou známé již přes 50 let. Nacházejí se u živočichů, rostlin, hub, protist, bakterií, virů a *Archaea*. U lidí se CYP nacházejí ve všech tkáních lidského organismu a mají poměrně složitou strukturu a širokou oblast aktivity.^[10] Jejich původ je datován až k archaebakteriím.^[11] Cytochromy P450 jsou hemoproteiny tvořící velkou „superrodinu“ genů. Tyto enzymy přeměňují velmi různorodé substráty (široká substrátová specifita) a katalyzují pestrou škálu chemických reakcí. CYP mohou kromě biotransformace xenobiotik v rámci různých organismů plnit další rozmanité funkce, např. biosyntéza barviv květů, mastných kyselin, kyseliny skořicové, hormonů, vitamínu D, prostaglandinů a strukturních komponent.^[12] Jednotlivé formy cytochromů P450, které se účastní biotransformace xenobiotik, se sice obecně nepovažují za životně důležité enzymy, ale jako celek slouží k obraně proti škodlivým efektům přírodních (např. alkaloidy, terpeny) či syntetických produktů (např. polutanty). CYP tedy poskytují základní obranný systém a jejich široká substrátová specifita zasahuje jak do přeměny léčiv, tak i dalších syntetických chemikálií.^[13]

1.1.1 Formy a názvosloví cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzymech, isoformách), které jsou řazeny do rodin a podrodin dle stupně homologie primární struktury proteinových molekul. Do stejné rodiny náleží takové CYP, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny patří ty, které vykazují více než 60 %.^[12, 14] Název P450 je odvozen od toho, že komplex redukovaného CYP s oxidem uhelnatým (viz též Obr. 1.3 na str. 17) vykazuje charakteristické absorpční maximum při 450 nm; P označuje pigment.

Názvosloví cytochromů P450 se tvoří dle následujícího schématu.^[15]

- ⇒ vezme se kořenový symbol CYP ze slova cytochrom P450
- ⇒ dále pak se vloží za symbol CYP arabská číslice, která symbolizuje rodinu
- ⇒ za arabskou číslici se dává písmeno, označující podrodinu
- ⇒ na konec se opět vkládá arabská číslice, označující individuální (určitý) protein, resp. gen

např. CYP3A4 náleží do rodiny 3 a patří do její podrodiny A

Některé formy cytochromů P450 v rámci jedné podrodiny mají velmi vysokou sekvenční podobnost (např. lidský CYP2C9 a CYP2C19 vykazují až 91% sekvenční shodu). Proto při rozlišování jednotlivých CYP ve stejné podrodině často selhávají běžně používané metody založené na rozpoznání proteinů protilátkami (např. „*immunoblotting*“). Z tohoto důvodu se v současné době vedle klasických postupů hojně využívá hmotnostní spektrometrie. Ta umožňuje co se týče jednotlivých isoform CYP značně citlivou a specifickou analýzu.^[16]

V současnosti je známo u bakterií 333 rodin, u *Archaea* 13 rodin, u protist 62 rodin, u rostlin 126 rodin, u hub 399 rodin, u virů 2 rodiny a u zvířat 156 rodin CYP; z toho savci (lidé) mají 18 rodin a 44 podrodin.^[17, 18] Dosud bylo popsáno 57 isoform (Tab. 1.1) lidského cytochromu P450.^[9, 19] Bylo také identifikováno 58 pseudogenů (nefunkční kopie) CYP.^[20]

Tabulka 1.1

Klasifikace lidských cytochromů P450 založené na hlavním substrátu (převzato z [19])

<i>Steroly</i>	<i>Xenobiotika</i>	<i>Mastné kyseliny</i>	<i>Eikosanoidy</i>	<i>Vitamíny</i>	<i>Neznámé</i>
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

1.1.2 Funkce cytochromů P450

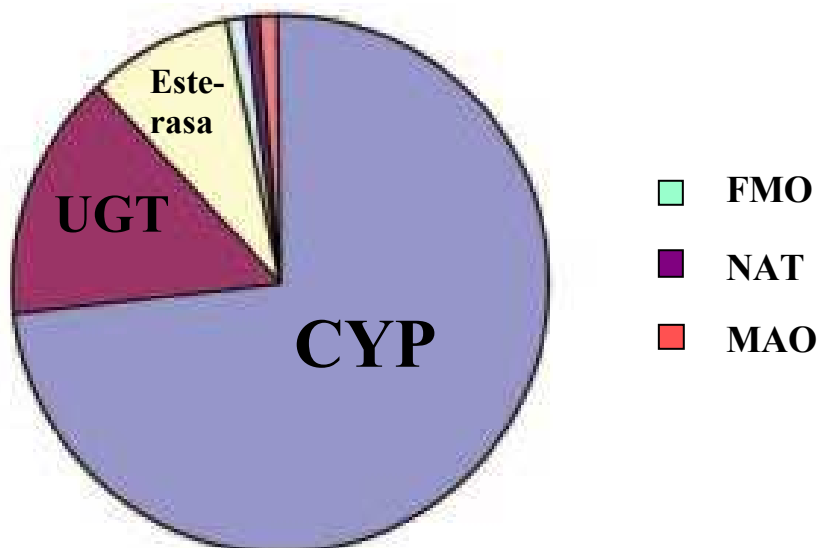
Cytochromy P450 jsou enzymy katalyzující biotransformaci hydrofobních substrátů za vzniku hydrofilnějších (polárnějších) produktů, které mohou být pak vyloučeny přirozenou cestou z organismu a nedochází tak k jejich bioakumulaci. CYP jsou tedy v organismu zodpovědné hlavně za reakce I. fáze biotransformace cizorodých látek, vedoucí k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buněk a exkreci z organismu. Vedle detoxikace hydrofobních substrátů (sloučenin) může docházet i ke vzniku určitých derivátů, které jsou biologicky aktivnější: některé z pozitivního hlediska (např. aktivní formy různých léčiv), další mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní. Významnou roli v rozvoji a progresi nádorů sehrávají také CYP, protože zprostředkovávají jejich iniciaci a promoci, jelikož mohou aktivovat nebo deaktivovat většinu karcinogenů (většina karcinogenů, které tvoří adukty s DNA, vyžaduje metabolickou aktivaci).^[21, 22]

Hlavní zdroje interindividuální (fyziologické a patologické rozdíly mezi jedinci) a intraindividuální (fyziologické a patologické změny, které se týkají individua) variability

v aktivitě CYP jsou různé environmentální vlivy, jako inhibice či indukce xenobiotiky (vzájemné interakce), biologické faktory (pohlaví, fyziologický stav – hormonální stav, nemoc, cirkadiánní rytmus) a genetický polymorfismus v genech CYP a jejich regulátorů. Existují také velké rozdíly mezi jednotlivými isoformami CYP týkající se jejich citlivosti na zmíněné vlivy.^[23]

CYP, jak bylo zmíněno výše, mohou aktivovat molekuly léčiv uvnitř organismu, aby bylo docíleno léčivého účinku. Ne vždy ovšem dochází k pozitivnímu účinku na organismus, může naopak docházet k jeho poškození. Například jedno léčivo může ovlivňovat působení jiného léčiva prostřednictvím CYP. Může též docházet ke snížení aktivity určitého CYP díky vlivu podaného léku. Proto jedna z příčin nežádoucích reakcí léků je též způsobena interakcí léčiv mezi sebou. Samozřejmě záleží i na podávané dávce léků, genetické výbavě CYP, kolik léků se dohromady užívá, apod.^[9] Proto jsou tyto interakce velmi pečlivě zkoumány.

Metabolismus léčiv musí být zohledňován již při vývoji léků, kdy se sleduje farmakologický a toxikologický důsledek léčby na celý organismus. Mnoho léčiv neprojde klinickým testováním, protože jsou například odbourávány příliš rychle nebo mají rezistenci vůči aktivačním enzymům (např. vůči oxidaci - rosuvastatin, vareniclin).^[24, 25]



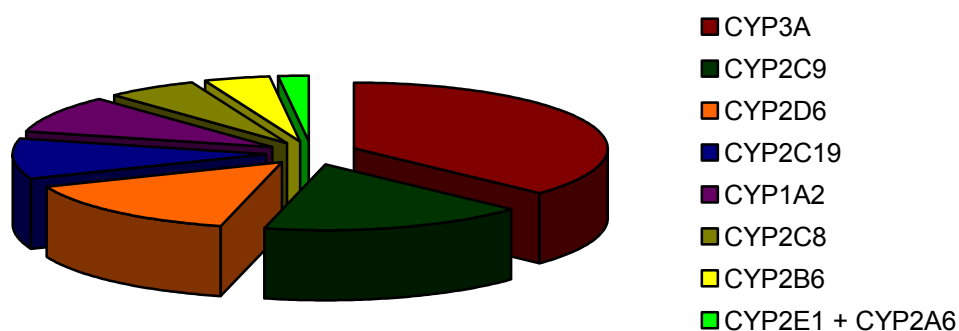
Obrázek 1.1

Účast enzymů participujících na biotransformaci dostupných léčiv (převzato z ^[26])

UGT – UDP-glukuronosyltransferasa; FMO – flavinmonooxidasa;

NAT – N-acetyltransferasa; MAO – monoaminoxidasa.

CYP se podílí téměř ze 75 % na biotransformaci všech dostupných léčiv (Obr. 1.1).^[26, 27] Metabolismu xenobiotik se účastní zejména tři rodiny cytochromu P450, a to CYP1, CYP2 a CYP3 (Tab. 1.1 a Obr. 1.2), v menší míře též rodina CYP4.^[22, 28] CYP zodpovědné za syntézu endogenních substrátů, jako jsou steroidy, mastné kyseliny a prostaglandiny, patří především do rodin CYP11, CYP17, CYP19 a CYP21 (viz Tab. 1.1).^[29] Rozdělení lidských CYP dle převažujícího typu substrátu je uvedeno v Tab. 1.1 na straně 14.



Obrázek 1.2

Účast hlavních isoformů CYP na metabolismu léčiv, které jsou v dnešní době na trhu (2008) (dle ^[23])

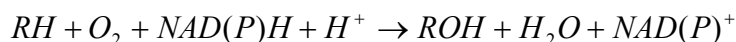
Rodina CYP3A (především 3A4) se podílí na biotransformaci léčiv z 37 %, CYP2C9 ze 17 %, CYP2D6 z 15 %, CYP2C19 z 10 %, CYP1A2 z 9 %, CYP2C8 z 6 %, CYP2B6 ze 4% a CYP2E1 společně s CYP2A6 ze 2 %.

1.1.3 Reakční cyklus cytochromů P450

Cytochromy P450 patří mezi externí monooxidasy.

Monooxidasy (oxidasy se smíšenou funkcí) katalyzují začlenění jednoho atomu molekulárního kyslíku do substrátu se souběžnou redukcí dalšího atomu na vodu. Dělí se na dvě třídy: interní (vnitřní) a externí (vnější) monooxidasy. Interní monooxidasy potřebují dva redukční ekvivalenty ze substrátu na samotnou redukcí jednoho atomu molekulárního kyslíku na vodu, kdežto externí monooxidasy využívají externího redukčního činidla, zde $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$.^[10]

Rámcová reakce katalyzována systémem cytochromů P450 je vyjádřena následujícím schématem (podrobnější schéma znázorňuje Obr. 1.3):



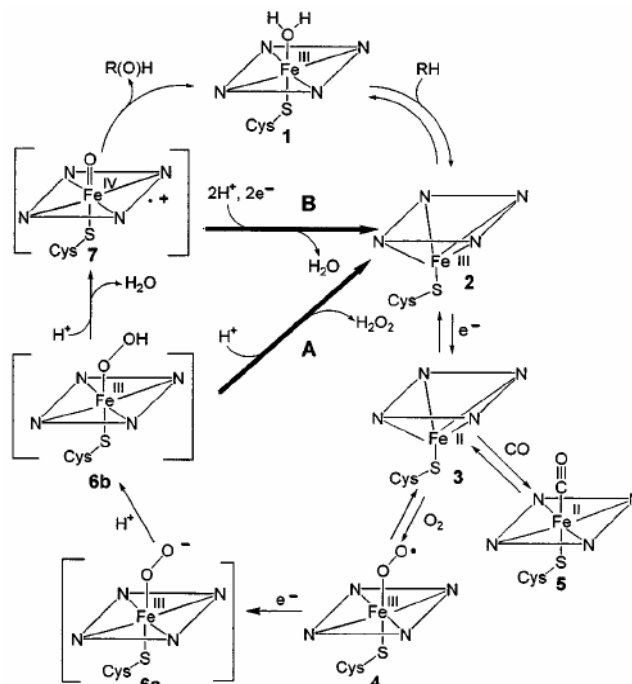
(RH = substrát, ROH = hydroxylovaný produkt)

Obrázek 1.3

Reakční cyklus cytochromu P450

(převzato z [30])

1. Ion železa v hemu je ve ferri formě (s oxidačním číslem III) a nachází se v nízkospinovém stavu.
2. Po navázání substrátu (RH) se ion železa dostává do vysokospinového stavu (vytlačení šestého ligandu iontu železa substrátem).
3. Příjem elektronu od NAD(P)H:cytochrom P450 reduktasy redukuje ion železa z ferri (Fe^{III}) na ferro formu (Fe^{II}). Tato forma se stále nachází ve vysokospinovém stavu a umožňuje navázání ligandů (O_2 nebo CO).
4. Po navázání molekulového kyslíku (O_2) vzniká superoxidový komplex ferri formy železa, které přešlo zpátky do nízkospinového stavu (ion železa se vrátil do původní polohy).
5. Vazba oxidu uhelnatého (CO) způsobí karbonylaci iontu železa, které se navrácí do původní polohy (nízkospinový stav). Ale ion železa zůstává nadále ve ferro formě. CO tedy způsobí inhibici a molekulový kyslík se tak už nemůže vázat. Tento komplex vykazuje při 450 nm charakteristický pík.
6. Druhá redukce (zprostředkovaná NAD(P)H:cytochrom P450 reduktasou či cytochromem b_5) je považována za rychlost limitující krok v celém cyklu. Adice elektronu má za následek vznik peroxidového aniontu (6a), který může přijímat proton (H^+) za vzniku hydroxyperoxidového komplexu (6b).
7. Navázání protonu na již protonizovaný atom kyslíku a heterolytické štěpení peroxidové O-O vazby má za následek uvolnění molekuly vody a vznik oxo-ferrylního radikálového intermediátu. Tento intermediát pak přenáší kyslíkový atom na uhlovodíkový substrát za vzniku hydroxylovaného produktu (ROH) a nativní formy CYP (1).



Dvě alternativní cesty v případě málo reaktivního substrátu jsou znázorněny v dráze A a B:

- A) Příjem protonu (formou 6b) neprotonizovaným kyslíkem může v případě málo reaktivního substrátu vést k uvolnění peroxidu vodíku a vzniku neoxidovaného produktu (2).
- B) Alternativní redukce dvěma elektrony a konkurenční příjem protonů formou (7) vede k uvolnění druhé molekuly vody (oxidasová reakce) a regeneraci formy 2.

Na stejném principu (jako na Obr. 1.3) probíhají různorodé reakce katalyzované CYP, jako např. hydroxylace, N-, O- a S-dealkylace, sulfoxidace, epoxidace, deaminace, desulfurace, dehalogenace, peroxidace, N-oxidace, apod.

Schopnost předurčit místa a rychlost oxidace nových substrátů (xenobiotik) by mohlo hodně usnadnit celý vývoj nových léků, stejně jako posouzení, zda se bude jednat o potencionálně karcinogenní či toxickou látku.^[9] Proto je ve výzkumu CYP brán zřetel hlavně na vazbu substrátu do jeho aktivního místa. I když existuje mnoho technologicky vyspělých přístrojů, jsou dostupné vysokorozlišovací techniky (jako je rentgenostrukturní analýza) pro zobrazení krystalové struktury a je k dispozici plno cenných výsledků z narůstajících detailních studií, zůstává tu stále nespočet nezodpovězených otázek týkajících se cytochromů P450 a hlavně reakčního kroku při vazbě substrátu do aktivního místa CYP.^[31]

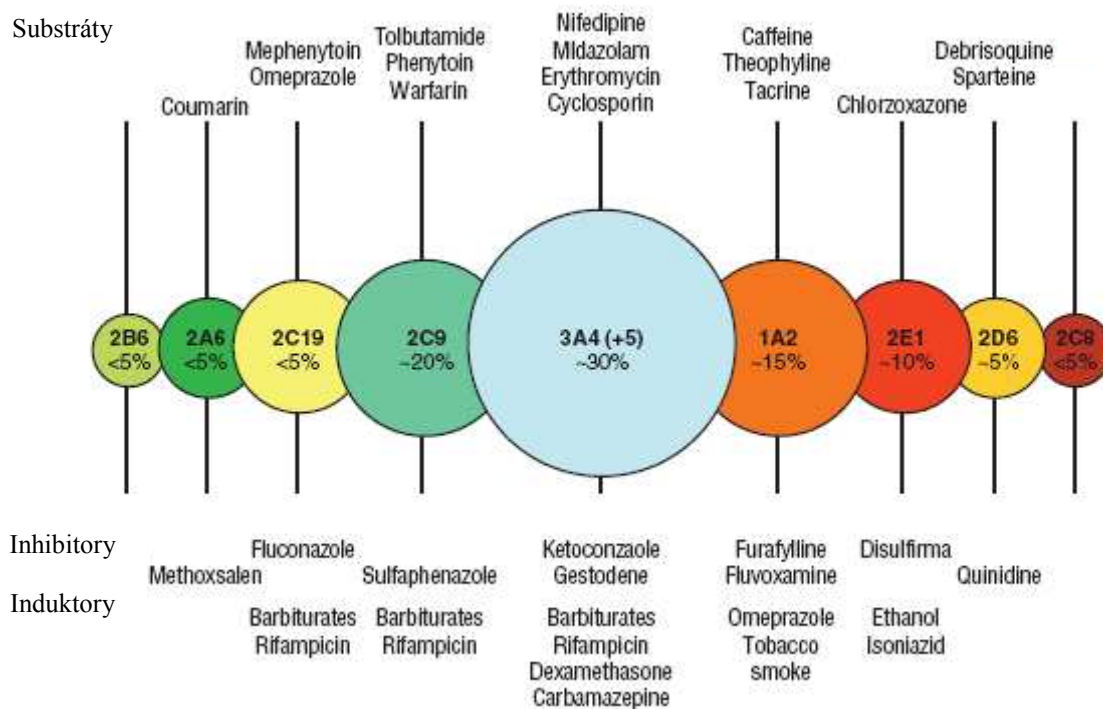
1.1.4 Výskyt cytochromů P450 v organismu

Cytochromy P450 se vyskytují zejména v játrech (Obr. 1.4 na následující straně), ale významné jsou i jejich koncentrace v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách (Tab. 1.2 na straně 20).^[12] U savců jsou všechny CYP vázány v membránách (bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné^[32]). Většina z nich (formy metabolizující převážně xenobiotika) se nachází v membránách endoplasmatického retikula, ale formy CYP účastnící se metabolismu endogenních steroidů jsou lokalizovány v mitochondriích.^[4]

Všechny CYP v endoplasmatickém retikulu na sebe vzájemně působí a přijímají elektrony od jediného flavoproteinu, NADPH:cytochrom P450 reduktasy (druhý elektron může přijímat CYP i od cytochromu b₅). Mitochondriální CYP používají řetězový elektronový transport s Fe-S proteinem adrenodoxinem a flavoproteinem adrenodoxin reduktasou.^[4]

CYP jsou enzymy jak konstitutivní tak inducibilní (Tab. 1.2 na straně 20). Inducibilní formou CYP se rozumí, že i když je určitý cytochrom P450 v organismu (tkáních, orgánech) přítomný jen v mizivém množství, může se jeho koncentrace za určitých podmínek extrémně zvýšit.^[12] U konstitutivních CYP je to jiné. Ty se nalézají v určitých tkáních přibližně s konstantní koncentrací, která je podmíněná především

geneticky, věkem, pohlavím, atd. Množství cytochromů P450 v lidských tkáních je tedy závislé na různých faktorech, jako je např. genetický polymorfismus, výživa, kouření, konzumace alkoholu, stáří, působení podávaných léčiv, nebo také vliv vnějších podmínek (polutanty) – Tabulka 1.3 na straně 20. K silně inducibilním patří většina forem.



Obrázek 1.4

Relativní zastoupení hlavních CYP metabolismu xenobiotik v játrech (převzato z ^[4])
Jsou uvedeny vybrané substráty, inhibitory a induktory CYP.

Tabulka 1.2

Tkáňová distribuce extrahepatálních cytochromů P450 metabolizujících cizorodé látky u člověka (dle ^[12])

<i>CYP</i>	<i>Inducibilita</i>	<i>Tkáň</i>
1A1	konstitutivní i inducibilní	plíce, ledviny, gastrointestinální trakt (GIT), placenta, kůže, lymfocyty
1B1	inducibilní	ledviny, kůže, prostata, děloha, lidský plod, (prsní žlázy)
2A6	inducibilní	plíce
2B6	konstitutivní i inducibilní	GIT, plíce
2C	konstitutivní i inducibilní	hltn, GIT, plíce
2D6	konstitutivní i inducibilní	GIT
2E1	konstitutivní i inducibilní	plíce, placenta a další
3A (3A4,3A5)	konstitutivní i inducibilní	ledviny, děloha, plod.plíce, GIT, placenta

Tabulka 1.3

Faktory ovlivňující množství cytochromů P450 u člověka (převzato z ^[12])

<i>CYP</i>	<i>Faktor</i>
1A1, 1A2, 2E1, 3A3, 3A4, 3A5	výživa
1A1, 1A2	kouření
2E1	alkohol
1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 3A3, 4, 5	léčiva
1A1, 1A2, 2A6, 1B, 2E1, 3A3, 4, 5	vnější prostředí (polutanty)
1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1	genetický polymorfismus

1.1.5 Genetický polymorfismus lidských cytochromů P450

Geny pro lidské cytochromy P450 jsou vysoce polymorfní. Aktualizovaný seznam dosud známých alel pro lidské CYP je k dispozici na webových stránkách <http://www.cypalleles.ki.se>. Nejvyšší variabilita alel byla dosud zaznamenána u *CYP2D6* (128 alel), pak *CYP2A6* (80), *CYP2B6* (54), *CYP2C9* (42), *3A4* (41) a *IA2* (41), následují další CYP jako *CYP2C19* (36), *1B1* (26), *2C8* (16), *1A1* (13),... V současnosti existuje více než 350 funkčně rozdílných alel u lidských CYP, tedy alel, které ovlivňují funkci a/nebo aktivitu celého genu. Ale genetický polymorfismus CYP nemusí vždy způsobit změny v expresi proteinu a katalytické aktivitě.^[33-35]

Polymorfismus CYP zahrnuje mimo jiné delecí či duplikaci genu a bodové mutace (SNP – „*Single Nucleotide Polymorphism*“) vytvářející často inaktivní genové produkty. Malé inserce či delece genu v důsledku mutací mohou způsobit posunutí ve čtecím rámci, tedy zásadní změnu primární struktury výsledného proteinu. Kromě toho i malé změny v aminokyselinové sekvenci mohou také způsobit změnu v substrátové specifitě. Pro funkci CYP nejsou důležité pouze mutace v otevřeném čtecím rámci, ale je také mnoho příkladů, kde např. mutace v intronech způsobí změnu v sestřihových místech.^[33] Nicméně existuje mnoho bodových mutací v genech i jiné sekvenční variace, avšak většina z nich není funkčně významná, tzn. nevykazují viditelnou změnu v expresi, substrátové selektivitě či enzymové aktivitě.^[23]

Důležitým aspektem v polymorfismu CYP je různý počet kopií genu; více funkčních kopií jedné alely může způsobit například urychlení metabolismu léčiva a absenci odpovědi na léčivo podané v běžné dávce.

Existují hlavní tři typy fenotypu:^[33] 1) ultrarychlí metabolizátoři – UM „*ultrarapid metabolizers*“ (s více jak 2 aktivními geny daného CYP), 2) rychlí metabolizátoři – EM „*extensive metabolizers*“ (mají 2 funkční geny; lidé s normální metabolickou aktivitou), 3) pomalí metabolizátoři – PM „*poor metabolizers*“ (chybí funkční enzymy díky defektním nebo odstraněným genům; lidé s defektní metabolickou aktivitou). Někdy se rozlišuje ještě mezistupeň mezi EM a PM, a to jsou středně rychlí metabolizátoři – IM „*intermediate metabolizers*“ (obvykle mají v genomu jednu funkční a jednu defektní alelu).

Důsledkem polymorfismu CYP tedy mohou nastat rozdíly v metabolických profilech jednotlivců a tím také v poměrech mezi detoxikací a aktivací prokarcinogenů.

Mnoho epidemiologických studií naznačilo, že existují přímé souvislosti mezi výskytem polymorfismů a rozvojem některých onemocnění, především nádorových.^[36]

Polymorfní CYP participující na metabolismu xenobiotik je možné rozdělit do dvou skupin:^[37]

Skupinu I tvoří formy značně konzervované, nevykazují důležitý funkční polymorfismus a aktivně se podílí na metabolismu prekarcinogenů a léčiv. Do této skupiny patří CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 a CYP3A4. U těchto forem cytochromu P450 byly sice popsány polymorfní varianty s mutacemi v otevřeném čtecím rámci (např. CYP1A1, viz str. 24), ale nejedná se o značně významný polymorfismus.

Skupina II zahrnuje formy vysoce polymorfní a aktivně podílející se na metabolismu léčiv, nikoliv však na biotransformaci prekarcinogenů. Patří sem CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6.

CYP1B1 představuje zvláštní případ, u něhož bylo do současnosti identifikováno několik vzácných defektních alel, jejichž výskyt je spojován s glaukomem. Dále bylo u CYP1B1 objeveno mnoho běžných variant haplotypů s nesynonymními mutacemi (tzv. „*missense*“ mutace), které sice jsou distribuovány v populaci, ale jejich funkční důsledky jsou méně výrazné.^[37, 38]

Odhaduje se, že genetická variabilita genů *CYP2C9*, *CYP2C19* a *CYP2D6* může mít na účinnost léčby významný vliv (až 25%). Jsou tudíž z klinického hlediska dosti důležité pro dosažení optimálních výsledků v léčebné terapii.^[33, 39]

1.2 Cytochromy P450 z rodiny 1

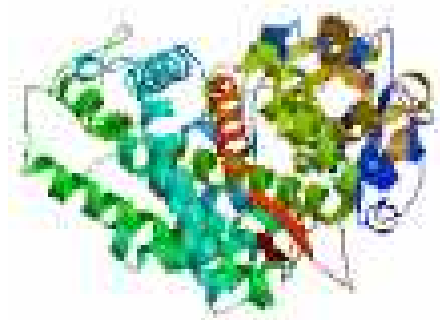
Cytochromy P450 z rodiny 1 (CYP1) jsou velmi důležité enzymy při I. fázi biotransformace mnoha xenobiotik, obzvláště xenobiotik s charakteristickým typem struktury jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH – „*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*“), heterocyklické nitrosloučeniny a jejich deriváty, zahrnující (hetero)aromatické aminy a amidy, jako kofein a 2-acetylaminofluoren (AAF). Většina substrátů pro CYP1 jsou planární molekuly složené ze dvou nebo více kondenzovaných aromatických nebo heterocyklických kruhů a dusíku, který se v nich často vyskytuje jako část heterocyklu a/nebo v substituční skupině. CYP1 jsou enzymy, které se primárně účastní detoxifikačního metabolismu, nicméně při biotransformaci xenobiotik může docházet i k metabolické aktivaci velkého počtu mutagenů a karcinogenů, takových jako benzo(a)pyren a β -naftylamin.^[40]

U lidských CYP1 jsou známy 3 isoformy, a to CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Z toho je však konstitutivně v organismu významněji zastoupen jen CYP1A2 (obr. 1.4 na str. 19).^[40] Genetický polymorfismus byl nalezen u všech tří isoform lidských *CYP1*, a to hlavně ve spojení s různými druhy rakoviny.^[23, 41]

1.2.1 Cytochrom P450 1A1

Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) je jednou z hlavních isoform z celé „superrodiny“ cytochromů P450. Lidský CYP1A1 je zejména mimojaterní (extrahepatální) enzym. V játrech je exprimován konstitutivně ve velmi malých koncentracích, ale jeho množství může až stonásobně vzrůst působením induktorů. Forma CYP1A1 je inducibilní ve všech tkáních lidského těla včetně endoteliálních buněk cév, plodu, epiteliálních buněk kůže a gastrointestinálního traktu.^[42] Tento enzym je zodpovědný za oxidaci mnoha polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), N-dealkylaci arylaminů a hydroxylaci steroidních hormonů. CYP1A1 je vedle úlohy v detoxifikačním metabolismu bohužel jeden z nejvýznamnějších CYP v aktivaci prokarcinogenů, neboť velké množství látek potenciálně kancerogenních je aktivováno právě touto formou CYP.^[43] Cytochrom P450 1A1 se příliš neliší ve své substrátové specifitě mezi různými druhy živočichů.

Mezidruhové rozdíly CYP1A1 jsou shrnuty v tabulce 1.4. Jeho 3D struktura zatím nebyla rozluštěna, ale existuje hypotetická 3D struktura založená na sekvenční shodě potkaní formy s lidským mikrosomálním CYP1A2 (viz Obr. 1.5).



Obrázek 1.5

Hypotetický 3D model potkaního cytochromu P450 1A1 (převzato z ^[44])

Jako templát byl použit lidský mikrosomální CYP1A2 v komplexu s α -naftoflavonem.

Genetický polymorfismus *CYP1A1* může mít za následek rakovinu plic, tlustého střeva nebo prsu.^[36, 45] Mnoho studií průkazně dokázalo, že např. mutace m1 (*MspI*) a m2 (I462V) alely u *CYP1A1* má u kuřáků za následek zvýšení pravděpodobnosti vzniku rakoviny plic.^[46] Genetické varianty *CYP1A1* jsou dávány do souvislosti s rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu (u Číňanů) či ischemické srdeční choroby, obzvláště když jsou daní jedinci vystaveni karcinogenům, jako je tabákový kouř.^[47, 48] U *CYP1A1* bylo v současnosti identifikováno celkově 13 alel.^[34] Samozřejmě, že zastoupení genetického polymorfismu *CYP1A1* u různých etnických skupin je jiné. Pro výzkumné účely je genetický polymorfismus *CYP1A1* velmi důležitý.

CYP1A1 je současně vysoce inducibilní enzym, který je indukován zejména polycyklickými aromatickými uhlovodíky, jako je benzo(a)pyren, a dioxiny (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin).^[49, 50] Dioxiny patří do skupiny halogenovaných aromatických uhlovodíků (HAH – „*Halogenated Aromatic Hydrocarbons*“). Je například známo, že kouření tabáku vyvolává indukcii CYP1A1 v plicích a placentě. V plicích se tak může rozvinout rakovinové bujení.^[40, 51] CYP1A1 též přispívá k rakovině dutiny ústní.^[52] Faktory ovlivňující množství cytochromu P450 1A1 v organismu jsou uvedeny v Tabulce 1.3 na straně 20.

Indukce cytochromu P450 1A1 polycyklickými aromatickými uhlovodíky a dioxiny je příkladem regulace exprese genu xenobiotiky. PAH a dioxiny se váží na cytoplasmatický receptor AhR („*Aryl hydrocarbon Receptor*“), který aktivuje celou kaskádu dějů známou jako AhR signalizační dráha.^[2, 49]

Tabulka 1.4

Hlavní mezidruhové rozdíly cytochromu P450 1A1 (dle ^[53-57])

<i>CYP1A1</i>	<i>Počet amk</i>	<i>Hlavní induktory</i>	<i>Sekvenční shoda</i> ¹⁾
Potkaní	524	3-methylcholantren (3-MC), β-naftoflavon (BNF)	100%
Myší	524	3-methylcholantren	93%
Lidský	512	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin (TCDD)	79%

1) Sekvenční shoda s potkaním CYP1A1; porovnáváno v programu ClustalW

1.2.2 AhR signalizační dráha

AhR signalizační dráha, jak již bylo zmíněno výše, je sled biochemických reakcí zapříčiňující stimulaci exprese CYP1.

Na neaktivovaném Ah receptoru, který se nachází v cytoplasmě, jsou navázány dva proteiny Hsp90 („*Heat shock protein 90*“), protein p23 a jeden 38 kDa velký, dosud neurčený, protein (protein příbuzný s immunofilinem – XAP2).^[58, 59] Navázáním ligandů (PAH, dioxiny apod.) na AhR dochází k aktivaci tohoto Ah receptoru, AhR se uvolní (dochází ke konformační změně) z cytoplasmatického multiproteinového komplexu a vstupuje do jádra, kde se spojuje s ARNT („*Ah-receptor nuclear translocator*“) proteinem.^[49] Takto vzniklý heterodimer se jakožto aktivní transkripční faktor váže s vysokou afinitou na specifická místa v DNA, tzv. XRE („*Xenobiotic-responsive element*“), uvnitř promotorové oblasti pro AhR-regulované geny a tak může docházet k jejich zvýšené transkripci, v našem případě ke zvýšení exprese cytochromu P450 1A1.^[58] Schéma indukce CYP1A1 pomocí Ah receptoru se nachází na Obrázku 1.6 na následující straně.

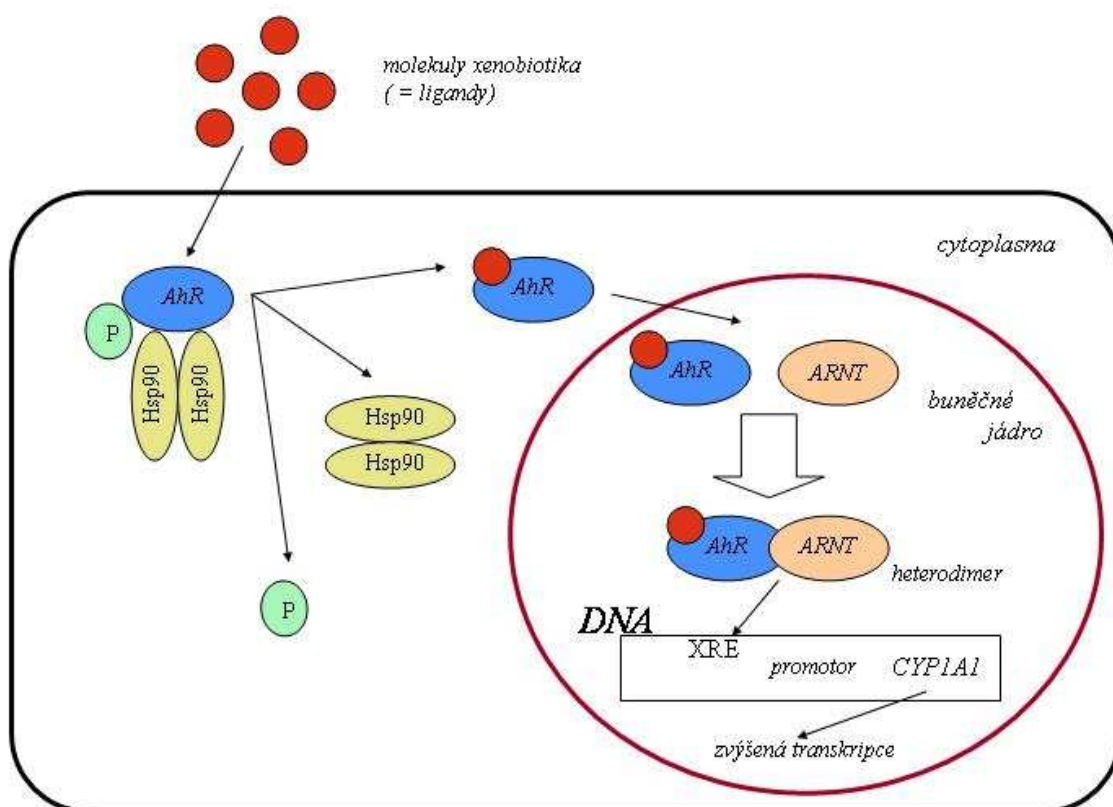
V úvahu se bere také možnost, že se Ah receptor nemusí odštěpovat od multienzymového komplexu hned po navázání ligandů. Celý komplex tak může vstupovat do jádra, tam dochází k jeho disociaci a AhR se následně váže na ARNT za vzniku heterodimeru.^[2]

AhR (i ARNT) patří do rodiny basických „*helix-loop-helix - Per-ARNT-Sim*“ (bHLH-PAS) proteinů, transkripčních regulátorů (faktorů), které regulují rozmanité vývojové a fyziologické jevy, včetně neurogenese, vývoje průdušnic a slinných žláz, metabolismu toxinů, denních rytmů (biologických), odezvy na hypoxii, a funkci receptorů hormonů.^[58] AhR i ARNT jsou konstitutivně exprimovány v mnoha tkáních.^[50]

Tyto proteiny obsahují nejméně tři domény, N-terminální basickou HLH („*helix-loop-helix*“) doménu, vysoce konzervovanou PAS („*Per-ARNT-Sim*“) doménu a C-terminální transaktivační doménu.^[60] Basická část HLH domény je zodpovědná za vazbu DNA a vlastní oblast HLH pak za dimerizaci. PAS doména tvořená cca 300 aminokyselinami je bohatá na nepolární zbytky; ovlivňuje interakce protein-protein, rozpoznání DNA a navázání ligandu. C-terminální transaktivační doména obsahuje četné stimulační a inhibitorové subdomény.^[50]

Dimerizace Ah receptoru a jeho nukleárního partnera ARNT na aktivní formu transkripčního faktoru (komplexu) se stala modelem pro studování mechanismu funkcí všech bHLH-PAS proteinů.^[58]

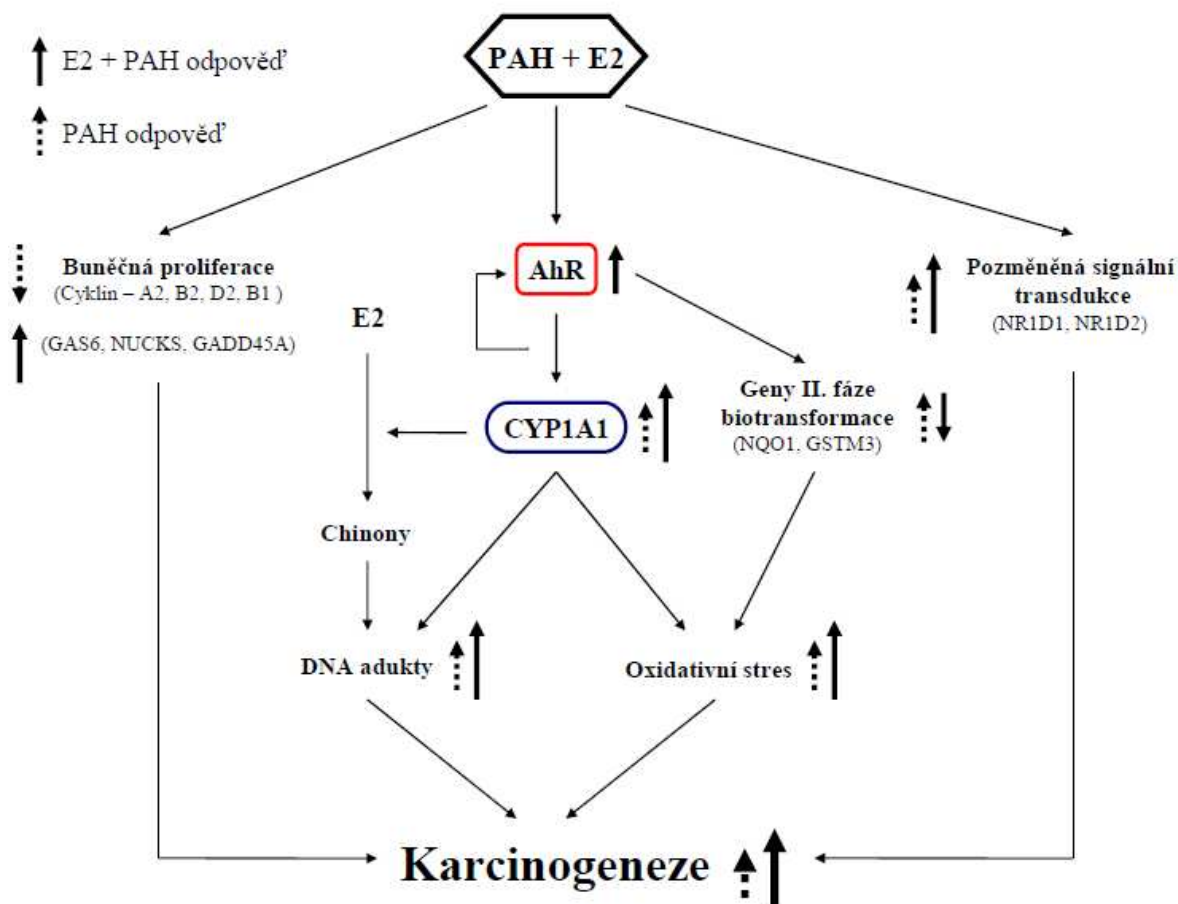
Byl popsán například hypotetický model (Obr. 1.7 na straně 28), kde dochází k automatickému zvýšení exprese (tzv. „upregulaci“) AhR genu v důsledku interakce mezi estradiolem (E2) a 7, 12-dimethylbenz(a)anthracenem (DMBA). Výsledkem je pak zvýšení účinnosti první fáze biotransformace (aktivace prekarcinogenů) a naopak k redukci druhé fáze biotransformace (detoxikace, zvýšená proliferace a redukce apoptózy v prekarcinogenních buňkách). Tento model naznačuje, že ženy v premenopauze jsou vystaveny většímu riziku vzniku karcinogeneze spojené s PAH.^[61]



Obrázek 1.6

Schéma indukce CYP1A1 pomocí AhR signální dráhy (dle ^[2])

P v obrázku značí XAP2 („X-associated protein 2“) a p23. Bližší popis obrázku se nachází v textu.



Obrázek 1.7

Hypotetický model tzv. „auto-upregulace“ genu pro AhR a karcinogeneze (dle ^[61])

Působení PAH vede k aktivaci CYP1A1, tvorbě aduktů DNA, oxidativnímu stresu a pozměněné signální transdukci, která může vyústit v karcinogenezi (přerušovaná šipka). Působení PAH v přítomnosti estradiolu (E2) zapříčiňuje automatickou indukci AhR (a s ní související AhR signalizaci), zvýšenou indukci CYP1A1, generování chinonů a volných radikálů, zvýšení oxidativního stresu, tvorbu DNA aduktů, buněčnou proliferaci a zvýšení pozměněné signální transdukce (nepřerušovaná šipka).

1.3 Heterologní exprese enzymů biotransformujících xenobiotika

Heterologní exprese je exprese klonovaného genu v odlišném typu buňky, kde se normálně tento gen nevyskytuje.^[62] Velkou výhodou heterologní exprese určitých enzymů je, že se jedná o syntetickou cestu výroby a tudíž není potřeba živé tkáně na izolaci enzymu. Též při izolaci jednotlivého enzymu z živé tkáně nastává velký problém, jelikož některé isoformy mají např. téměř stejnou molekulovou hmotnost či sekvenční shodu a nedají se tak snadno rozpoznat. V současnosti se využívají rekombinantní enzymy pro různé účely. Např. v rozvoji nových farmaceutických přípravků je velmi důležité vědět, které cytochromy P450 a další enzymy participují na jejich biotransformaci. Na základě *in vitro* experimentů s rekombinantními enzymy je možné popsat biologickou dostupnost, toxicitu a vzájemné interakce mezi léčivými a dalšími xenobiotikami.^[63] Využití exprese rekombinantních CYP je též začleněno do komerční výroby indiga a vytváření nových barev, které jsou pak „vlozeny“ do okrasných rostlin (např. modré růže).^[64] Další využití rekombinantně připravených enzymů je např. pro určení struktury daného proteinu, studium enzymové aktivity (po vložení bodové mutace), apod. Metody přípravy rekombinantních enzymů biotransformujících xenobiotika jsou nadále cíleně vylepšovány a zdokonalovány.

Biotransformační enzymy byly úspěšně exprimovány ve většině dostupných systémů, jako jsou bakterie (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* a jiné), hmyzí buňky a různé typy savčích buněk (COS^[65], CHO^[66] a jiné).

1.3.1 Heterologní exprese savčích cytochromů P450

Cytochromy P450 byly v polovině 80. let minulého století exprimovány nejdříve v bakteriích, pak v COS buňkách^[65] a v kvasinkách^[67], ale počáteční úsilí o expresi CYP v bakteriích bylo komplikováno proteolýzou a přítomností CYP v inkluzních tělískách. Vysoká úspěšnost v bakteriální expresi byla dosažena z počátku 90. let minulého století.^[62]

Je známo, že savčí CYP metabolizující xenobiotika (CYP 1, 2, 3, 4) jsou zakotveny v endoplasmatickém retikulu jedním transmembránovým segmentem, který

se nachází na N-terminálním konci proteinu. Modifikace cDNA sekvence v oblasti kódující transmembránový úsek se zdá být nutná k docílení adekvátního stupně exprese v *E. coli*. Skupině vědců v čele s F. Guengerichem se podařilo úspěšně exprimovat CYP (1A1, 1A2, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 a 3A7) v *Escherichia coli* po modifikaci N-terminální (5') sekvence.^[63] Ovšem Kim a kol.^[68] úspěšně exprimovali lidský CYP1A2 bez konvenční N-terminální modifikace v *E. coli* a mohly tak být porovnány enzymové vlastnosti modifikovaného a nemodifikovaného („wild type“) CYP.

Nebyla prováděna pouze bakteriální exprese, ale pokračovalo se též v experimentech s kvasinkami. Imaoka a kol.^[69] a Masimirembwa a kol.^[7] úspěšně exprimovali devět forem lidských P450 v *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky (*S. cerevisiae*) byly zvoleny jako systém pro heterologní expresi lidských CYP, jelikož splňovaly následující požadavky: 1) snadná manipulace, 2) vysoký výtěžek z produkce stabilního enzymu bez modifikované cDNA sekvence pro většinu CYP a 3) přítomnost endoplasmatického retikula.^[7, 70]

Díky požadavkům na redoxní partnery (NADPH:CYP reductasa případně cytochrom b₅) heterologní exprese samotného CYP nevede většinou k systému s optimální katalytickou aktivitou. Pro zajištění normální enzymové aktivity musí být CYP purifikován a rekonstituován se svým redoxním partnerem nebo tento redoxní partner musí být exprimován současně s CYP.^[71]

Jeden z prvních velmi významných výsledků v expresi CYP byl vývoj více rozpustných forem enzymů, které mohly lépe krystalizovat, čímž byla usnadněna strukturně-funkční analýza.^[62]

V posledních letech se též studuje vliv kodonové optimalizace a chaperonové koexprese na heterologní expresi savčích CYP v *E. coli*. Zdá se, že oba tyto efekty poskytují realizovatelnou cestu ke zlepšení funkční proteinové exprese.^[72]

1.3.2 Heterologní exprese cytochromu P450 1A1

Expresa v *Escherichia coli*:

U exprese *CYP1A1* v *E. coli* je převážně využíván expresní systém s vektorem pCWori⁺ a buňkami DH5 α . V následujících studiích byl využit pro heterologní expresi *CYP1A1*, ve kterém byla vždy modifikována N-terminální kotva, právě tento expresní systém.

- Cvrk a Strobel zkoumali roli Thr501 v aktivním místě CYP1A1^[43] a úlohu Lys271 a Lys279 v interakci CYP1A1 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou.^[73] Vyhodnocovali vliv záměny Thr v pozici 501 za Glu nebo Phe na vazbu substrátu a enzymovou aktivitu a dále vliv záměny Lys v pozici 271 nebo 279 za Ile na vlastnosti CYP1A1 a zejména kinetiku jeho redukce NADPH:cytochrom P450 reduktasou.
- Guo a kol.^[74] sledovali vliv různých modifikací 5' terminálního konce CYP1A1 cDNA a pak podrobně zkoumali vlastnosti (katalytická aktivita, rozpustnost, absorpční spektrum,...) modifikovaných CYP.
- Iwata a kol.^[70] dosáhli vysoké katalytické aktivity CYP1A1 v membráně *E. coli* exprimující vedle lidských cytochromů P450 také lidskou NADPH:cytochrom P450 reduktasu.
- Harnastai a kol.^[75] našli vylepšení heterologní exprese CYP (včetně *CYP1A1*) pomocí koexprese s glutamyl-tRNA reduktasou, což je klíčový enzym při syntéze hemu. Díky vyšší expresi glutamyl-tRNA reduktasy může docházet k vysokému stupni exprese CYP.

Expres v jiných systémech:

- Grant a kol.^[76] exprimovali potkaní *CYP1A1* v hmyzích buňkách SF-21 pomocí bakulovirového vektoru.
- Meyer a kol.^[28] sledovali vliv inhibice syntézy hemu sukcinylacetonem na CYP1A1 přechodně exprimovaný v COS-1 buňkách (ledvinné buňky z opic infikovaných virem SV40).
- Eugster a kol.^[77] a Ching a kol.^[78] úspěšně exprimovali lidský nemodifikovaný („wild type“) *CYP1A1* v kvasinkách.^[74]
- Chung a kol.^[79] dokázali získat funkční rybí CYP1A1, který byl klonován v kvasinkách (*S. cerevisiae*).

2 Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo:

1. Připravit vektory nesoucí optimalizovaný gen pro expresi potkaního *CYP1A1* v *E. coli*, tj. syntéza různých variant genu z oligonukleotidů, a to s modifikovanou N-terminální kotvou (*mod1A1*) resp. „wild type“ (*wt1A1*), pro obě tyto verze pak modifikace s využitím resp. bez His kotvy (*wt1A1.His*, *mod1A1.His*)
2. Exprimovat *CYP1A1* v různých typech buněk *E. coli*, dále je izolovat, purifikovat a následně sledovat jejich vlastnosti a enzymovou aktivitu (srovnání všech čtyř modifikací CYP1A1)

3 Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

SIGMA-ALDRICH USA	GenElute™ Plasmid Midiprep Kit, sacharosa, Luria Broth, dimethylsulfoxid (DMSO), nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchinová kyselina (BCA), dithiothreitol (DTT), cholát sodný, 7-ethoxyresorufin, Luria Agar, sekundární protilátka proti králičí polyklonální protilátce (IgG) značená alkalickou fosfatázou, sekundární protilátka proti slepičí polyklonální protilátce (IgY) značená alkalickou fosfatázou, 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), resorufin, Brij-35
SERVA Electrophoresis Německo	Triton X-100, Coomassie Brilliant Blue R-250, N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid (IPTG), ampicillin (sodná sůl)
Bio Basic Inc. Kanada	Tris (Base) [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], EDTA
Top-Bio Česká republika	PCR agarosa, DNA marker (155 – 970 pb)
Fermentas Kanada	Pfu DNA polymerasa (+ pufr, + 25mM MgSO ₄), λ DNA/EcoRI + HindIII, 2-Log DNA marker, marker na SDS elektroforézu „PageRuler™ Broad Range“, marker na „Western blotting“ – „Spectra™ Multicolor Broad Range“
NEW ENGLAND BioLabs USA	HindIII, pUC19, T4 DNA Ligasa (+ pufr), EcoRI (+ pufr), BclI, NdeI, XhoI, NEB3 pufr, NEB4 pufr, BSA (100x konc.), dam ⁻ /dcm ⁻ (C2925) buňky

INVITROGEN USA	SYBR Safe™ DNA Gel Stain
Erba Lachema Česká republika	ethanol, bromfenolová modř, octan sodný, dithioničitan sodný, EDTANa ₂ (chelaton 3), KOH, persíran amonný, NaCl, Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, vínan sodný (tartarát sodný), NaOH, NaHCO ₃ , Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O, CuSO ₄ ·5H ₂ O
East Port Česká republika	oligonukleotidy, dNTPs
Penta Česká republika	methanol, glycin
Fluka Švýcarsko	akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), β-merkptoethanol, dodecylsírán sodný (SDS), Tween 20, Tris (Base) [Tris(hydroxymethyl)aminomethan]
Linde Česká republika	dusík (g), oxid uhelnatý
Pharmacia Švédsko	DEAE Sepharosa CL-6B, CM Sepharosa CL-6B
Sevapharma Česká republika	hovězí sérový albumin (BSA)
Abcam Velká Británie	Primární králičí polyklonální protilátka (IgG) proti CYP1A1
Ubichem Velká Británie	CaCl ₂

AppliChem Německo	δ-aminolevulová kyselina (ALA)
Whatman USA	Chromatografický papír č. 3
Millipore USA	Immobilon™ PVDF (polyvinylidenfluorid) membrány, membrána PM-30
Lach-Ner Česká republika	kyselina octová (HAc), glycerol, HCl, KH ₂ PO ₄ , KCl
Roche Švýcarsko	Inhibitory proteas (tablety „cOmplete Mini“)
GENOMED Německo	JET quick-Gel Extraction Spin Kit, JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit
Agilent Technologies USA	Buňky <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) GOLD, RIL, RIPL
Gentest Corporation USA	Supersomální potkaní CYP1A1 rekonstituovaný s reduktasou

- Primární slepičí polyklonální protilátka (IgY) proti CYP1A1/2 byla poskytnuta prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.
- NADPH:cytochrom P450 reduktasa byla izolována na Katedře Biochemie RNDr. Michaelou Moserovou a RNDr. Věrou Černou, Ph.D
- Kompetentní buňky *E. coli* DH5α a pET-22b poskytl RNDr. Marek Ingr, Ph.D

3.2 Použité přístroje

Centrifugy:

5415 R (Eppendorf)
Allegra X-22R (Beckman Coulter; rotor 4250, 630)
Janetzki K70 D (MLW)
Optima™ LE-80K (Beckman Coulter; rotor Ti 70)

Přístroje pro ohřev vzorků:

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator (Flow Laboratories)
G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Edison, N.J. USA)
ORBI-SAFE TS NetWise (Gallenkamp)
Thermocycler Techgene (TECHNE)
Vodní třepačka GFL, typ 1092 (Labor-Technik GmbH)
Vodní lázeň TE-10D Tempunit (TECHNE)
Vodní lázeň Julabo TW8 (Julabo Labortechnik GmbH)

Spektrofotometry:

E8453 (Hewlett Packard)
Spekol 11 (Carl Zeiss Jena)
Helios α (Thermo Spectronic)
Specord M40 (Carl Zeiss Jena)
Fluorimetr Luminescence Spectrometer LS-55 (Perkin Elmer)

Váhy:

Analytické váhy 40SM-200A (PESA)
Předvážky EW600-2M (KERN)

Přístroje pro elektromigrační a související detekční metody:

Aparatura na horizontální elektroforézu MSMINI 10-Multi Sub Mini (Uvitec)
Zdroj EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)
Dark Reader transiluminátor (Clare Chemical Research)
Aparatura na SDS elektroforézu miniVE Vertical (Amersham Bioscience)
Aparatura na „Western blotting“ B-43 (Biometra)
Aparatura „SNAP i.d.™ Protein Detection System“ (Millipore)

Další přístroje:

Sonikátor Sonopuls, sonda KE 76 (Bandelin)
Třepačka Mini Rocker MR-1 (BioSan)
Třepačka Yellow line OS 2 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG)
Sběrač frakcí, model 2128 (Bio-Rad)
Sonikátor Elmasonic E 30 H (P-LAB)
Peristaltická pumpa PP-05 (Laboratorní přístroje Praha)
Automatické pipety (Biohit)
Biohazard Box Bio 126 (Labox)

3.3 Použité metody

3.3.1 Práce s DNA

Všechn spotřební materiál, který byl použit pro práci s DNA (špičky, zkumavky Falcon, mikrozkmavky Eppendorf, připravené pufry, MQ voda, média a další), byl sterilizován autoklávováním (121 °C 20 minut).

3.3.1.1 PCR - polymerasová řetězová reakce (včetně přípravy vzorků)

Lyofilizované oligonukleotidy, připravené firmou East Port, byly rozpuštěny ve sterilní vodě na 100 μ M koncentraci a poté byly opět zředěny ve sterilních mikrozkmavkách Eppendorf na konečnou 20 μ M koncentraci. 20 μ M roztoky oligonukleotidů byly použity jako zásobní pro PCR.

PCR je metoda pro *in vitro* enzymovou syntézu a amplifikaci cílové DNA sekvence pomocí specifických párů primerů (oligonukleotidů). PCR se provádí v thermocycleru, který je schopen střídát různé teploty v krátkém časovém úseku během jednoho cyklu.^[80]

Se vzorky bylo vždy manipulováno v Biohazard Boxu se sterilními špičkami, mikrozkmavkami Eppendorf (na PCR) a v rukavicích. Složení reakční směsi bylo následující: (v závorkách koncentrace zásobních roztoků)

- sterilní MQ voda (do celkového objemu 50 μ l)
- 5 μ l pufry pro *Pfu* polymerasu (10x konc., obsahujícího 20mM MgSO₄)
- 1 μ l dNTPs (10mM)
- oligonukleotidy / primery po 1 μ l (20 μ M)
- templát (různá množství)
- 2,5 μ l DMSO (100%)
- 6 μ l MgSO₄ (25mM)
- 0,5 μ l *Pfu* polymerasy

Reakční podmínky v thermocyleru byly následující:

30 cyklů

94 °C	30 s	(= rozvolnění DNA)
60 °C	30 s	(= nasednutí oligonukleotidů / primerů)
73 °C	2 min	(= polymerace)

73 °C 8 min (= polymerasa dosyntetizuje segment DNA)

6 °C (udržování této teploty, dokud nebyly vzorky odebrány)

Upřesnění ve složení reakční směsi je uvedeno v kapitole výsledky a diskuze.

3.3.1.2 *Horizontální elektroforéza na agarose*

Principem elektroforézy je dělení nabitých částic dle různé elektroforetické pohyblivosti. Při elektroforéze je působící elektrická síla v rovnováze s třením (odporem prostředí), což vede v podstatě ke konstantní rychlosti částice. Molekuly DNA mají díky fosfátovým skupinám záporný náboj, jehož velikost je dána v podstatě pouze délkou řetězce, proto se při horizontální elektroforéze dělí zejména dle své velikosti a případně tvaru.^[81-83]

Byla připravena 1 či 1,5% (w/v) agarosa v 60 ml 1xTAE pufru (50x konc.- pH 8,3; 2M Tris, 1M HAc, 50mM EDTA). Agarosa v pufru TAE byla zahřívána v mikrovlnné troubě do té doby než se rozpustila. Po zchladnutí roztoku bylo přidáno 6 μ l SYBR SafeTM DNA Gel Stain (10.000x konc.). Gel byl přelit do vaničky na elektroforézu a do gelu byl vložen hřeben, který vytvořil jamky pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu byl hřeben odstraněn, vanička byla umístěna do aparatury MSMINI 10 a aparatura byla naplněna elektrodovým 1xTAE pufrem. Dále byly do jamek nanášeny vzorky se vzorkovým pufrem (5x konc., 40% sacharosa, 0,1% bromfenol. modř). Do jedné jamky byly vždy aplikovány 3 μ l DNA-markeru, λ -markeru nebo 2-Log DNA-markeru (po ředění vzorkovým pufrem). Elektroforéza probíhala 30 – 45 minut za použití zdroje EPS 301 při napětí 110 V. Po ukončení elektroforézy byl gel umístěn na Dark Reader transiluminátor, kde bylo pozorováno elektroforetické rozdělení molekul DNA.

3.3.1.3 Izolace DNA z gelu: JET quick-Gel Extraction Spin Kit

Izolace DNA z gelu byla provedena dle návodu výrobce.^[84]

Po elektroforéze byly vyříznuty proužky gelu obsahující požadovanou DNA a zváženy (pro jednu izolaci méně než 400 mg). Ve sterilních mikrozkušavkách Eppendorf k nim byl přidán solubilizační pufr L1 (na 100 mg gelu 300 µl L1) a byly dány na 15 minut do ohřívače bloků LS1, nastaveného na 50 °C. Každé tři minuty byly promíchány poklepem na stěnu zkumavky. Vzorky byly po 600 µl aplikovány na kolonky a centrifugovány při 12.000 g 1 minutu (Centrifuga 5415 R). Eluovaný roztok byl vylit do výlevky. V případě že gel vážil více než 250 mg, byla v následujícím kroku ještě kolonka promyta 500 µl L1 (opět centrifugace při 12.000 g 1 minutu). Na kolonky bylo aplikováno 500 µl pufru L2 (s EtOH) a odstředěno při 12.000 g 1 minutu. Eluovaný roztok byl opět vylit do výlevky. Zbytky L2 byly odstraněny centrifugací při nejvyšších otáčkách (13 200 RPM) 1 minutu. Kolonky byly přeneseny do čistých 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf a na kolonky se aplikovalo 40 µl předehřáté (65 °C) MQ vody. Po 1 minutě byla DNA eluována odstředěním při 12.000 g 2 minuty.

3.3.1.4 Dvojitý štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Sekvenčně specifické štěpení DNA se provádí pomocí enzymů – restrikčních endonukleas. Substrátem těchto enzymů je dsDNA, kterou štěpí uvnitř vlákna.^[81]

3.3.1.4.1 Endonukleasy *EcoRI* a *HindIII*

Dvojitý štěpení syntonů a plasmidu pUC19 bylo provedeno *EcoRI* a *HindIII* endonukleasami. Nejdříve bylo zjištěno, v jakém pufru budou obě dvě endonukleasy aktivní. Na webových stránkách „*New England BioLabs*“ se zjistilo, že optimálním pufrům je pufr pro *EcoRI* endonukleasu.^[85] Reakční směs pro dvojitý štěpení tedy obsahovala vedle vzorku DNA (16 µl syntonu 1 či 2; 0,5 µl pUC19) resp. 7 µl pDNA, 2 µl pufru pro *EcoRI* (10x konc.), po 1 µl *EcoRI* a *HindIII* a sterilní MQ vodu (do celkového objemu reakční směsi 20 µl); inkubace probíhala při 37 °C přes noc (inkubátor IR 1500).

3.3.1.4.2 *Vyštěpení syntonů z klonovacího plasmidu pUC19, štěpení expresního plasmidu pET-22b*

Restrikční štěpení pET-22b bylo provedeno XhoI a NdeI endonukleasami, pro pUC19 se syntonem 1 NdeI a BclI endonukleasami a v případě pUC19 se syntonem 2 XhoI a BclI endonukleasami. Nejdříve bylo proto zjištěno, v jakém pufru budou obě dvě endonukleasy aktivní. Na webových stránkách „*New England BioLabs*“ se zjistilo, že optimálním pufrům pro štěpení pET-22b je pufr NEB4 a pro pUC19 se syntonem 1 a 2 je to pufr NEB3.^[85]

Reakční směs pro dvojí štěpení pET-22b obsahovala: 10 μ l pET-22b, 2 μ l NEB4 pufru (10x konc.), po 1 μ l XhoI a NdeI, 2 μ l BSA (10x konc.) a sterilní MQ vodu (do celkového objemu reakční směsi 20 μ l); inkubace probíhala při 37 °C přes noc (IR 1500).

Reakční směs pro restrikční štěpení pUC19 se syntonem 1 obsahovala: 20 μ l vzorku DNA, 3 μ l NEB3 pufru (10x konc.), 1 μ l NdeI a sterilní MQ vodu (do celkového objemu reakční směsi 30 μ l); inkubace probíhala při 37 °C v thermocycleru po různě dlouhou dobu (1,5 až 10 hodin). Do reakční směsi byl přidán 1 μ l BclI endonukleasy a teplota byla zvýšena na 50 °C. Inkubace v thermocycleru byla prováděna po různě dlouhou dobu.

Restrikční štěpení pUC19 se syntonem 2 probíhalo naprosto stejně jako se syntonem 1, až na výjimku, že namísto NdeI endonukleasy byla přidána XhoI endonukleasa a k ní ještě 3 μ l BSA (10x konc.).

3.3.1.4.3 *Kontrolní štěpení s XhoI a NdeI endonukleasou*

Kontrolní štěpení bylo provedeno s XhoI a NdeI endonukleasou. Složení reakční směsi bylo: 14 μ l vzorku DNA (plasmid pET-22b s vloženým inzertem), 2 μ l pufru NEB4 (10x konc.), 2 μ l BSA (10x konc.), 1 μ l XhoI a 1 μ l NdeI. Inkubace probíhala 3 hodiny při 37 °C (IR 1500).

3.3.1.5 *Ligace*

Ligací se rozumí vzájemné spojování dvou či více řetězců DNA nebo cirkularizace lineárních molekul. Ligace *in vitro* se provádí pomocí ligas – enzymů katalyzujících tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5' fosfátovou skupinou a 3' OH skupinou nukleotidů spojované DNA. Největší praktické využití má T4 DNA ligasa, která spojuje nejen kohezivní (přečnávající a komplementární), ale i tupé (zarovnané) konce DNA molekul.^[81]

3.3.1.5.1 *Vytvoření vektoru pUC19 se syntonem 1 či 2*

Pro ligaci fragmentů DNA do pUC19 bylo potřeba: 15,5 µl vzorku DNA, 2 µl pufru pro T4 DNA ligasu (10x konc.), 2 µl pUC19 a 0,5 µl T4 DNA ligasy. Vzorky se nechaly ligovat při laboratorní teplotě 3 hodiny.

3.3.1.5.2 *Ligace obou syntonů do plasmidu pET-22b – vytvoření celého genu*

Rekonstrukce celého genu byla provedena ligací dvou syntonů do expresního plasmidu pET-22b. Složení ligační směsi bylo následující: 4 µl pufru pro T4 DNA ligasu (10x konc.), 4 µl pET-22b (po dvojitým štěpení XhoI a NdeI), 15 – 15,5 µl syntonu 1 (po dvojitým štěpení NdeI a BclI), 15 – 15,5 µl syntonu 2 (po dvojitým štěpení XhoI a BclI), 1 – 2 µl T4 DNA ligasy. Vzorky se nechaly ligovat při laboratorní teplotě 3 hodiny nebo při 16 °C přes noc. V případě ligace přes noc při 16 °C byl nejprve smíchán pET-22b, synton 1 a synton 2. Směs byla inkubována 5 minut při 45 °C v thermocyleru a následně byla ponechána 3 minuty na ledu (tímto způsobem dochází k rozrušení nežádoucích vazeb mezi komplementárními konci^[86]). Dále byl ke směsi přidán pufr pro T4 DNA ligasu a T4 DNA ligasa.

3.3.1.6 **Příprava kompetentních buněk *E. coli* (DH5 α ; dcm⁻/dam⁻; BL-21 (DE3) GOLD, RIL, RIPL)**

Aby byly buňky *E. coli* schopny DNA přijmout, musí se nacházet ve stavu kompetence. Přirozená kompetence je stav buňky, ve kterém může být DNA přijata z vnějšího prostředí. K navození umělé kompetence u buněk *E. coli* pomáhá inkubace s CaCl₂ za snížené teploty. Buňky se kultivují do počátku exponenciální fáze růstu (optimální fyziologický stav), kdy se optická densita při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀) nachází v rozmezí 0,3 až 0,5.^[81, 86, 87]

Den předem bylo připraveno a přes noc sterilizováno pomocí autoklávu LB (Luria Broth) medium, 50% glycerol (v/v), 100mM CaCl₂ a 500 ml Erlenmayerova baňka (se zátkou z gázy). V Biohazard Boxu bylo do 500 ml Erlenmayerovy baňky sterilně přidáno 200 ml LB media. Následně bylo do LB media přidáno 200 μ l buněk *E. coli*. Buňky v LB mediu byly inkubovány ve vodní třepačce GFL 1092 při 37 °C a 200 RPM tak dlouho, než optická densita OD₆₀₀ byla mezi 0,3 až 0,5. Průběžně byla proto měřena optická densita buněk *E. coli* v LB mediu proti samostatnému LB mediu. Kultivace byla ukončena, když OD₆₀₀ dosáhla hodnoty 0,4. Narostlé buňky byly přeneseny do čtyř 50 ml centrifugačních zkumavek Falcon a ponechány na ledu po dobu 10 minut. Poté bylo provedeno odstředování v centrifuze Allegra X-22R (rotor 4250) při 4 °C, 4000 RPM 10 minut. Supernatant byl odlit a zkumavky byly ponechány 2 minuty v obrácené poloze, aby se odstranily zbytky přebytečného media. Ke každé peletě bylo přidáno 10 ml 100mM CaCl₂ předem vychlazeného na 0 °C. Pelety byly resuspendovány vychlazenou špičkou a nechány na ledě 10 minut. Po tomto kroku byly opět zkumavky Falcon centrifugovány (4 °C, 4000 RPM 10 minut). Supernatant byl odstraněn a zkumavky byly ponechány 2 minuty v obrácené poloze (odstranění zbytků CaCl₂). Ke každé peletě bylo poté přidáno 2 ml 100mM CaCl₂ předem vychlazeného na 0 °C. Pelety byly opět resuspendovány předem vychlazenou špičkou a ponechány na ledu po dobu 2 – 3 hodin (24 hodin v případě *E. coli* BL-21 (DE3) RIPL). Nakonec bylo do každé zkumavky Falcon přidáno 2 ml sterilního 50% glycerolu (v/v) a 200 μ l alikvoty byly přeneseny do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf. Buňky DH5 α , dcm⁻/dam⁻ a BL-21 (DE3) GOLD, RIL a RIPL byly skladovány v mrazícím boxu při - 80 °C.

3.3.1.7 Transformace buněk *E. coli* (DH5 α ; *dcm*⁻/*dam*⁻; BL-21 (DE3) GOLD, RIL, RIPL) tepelným šokem, amplifikace vektoru

Transformace buněk tepelným šokem je jednoduchá metoda pro vnášení DNA do recipientních buněk *E. coli*, nacházejících se ve stavu kompetence. Vnášená DNA se smísí s kompetentními buňkami a ponechá se nějaký čas na ledu, aby mohla adherovat k jejich povrchu. Pak je suspenze vystavena teplotnímu šoku, který usnadní vstup DNA do buněk. Buňky jsou poté kultivovány na neselektivním médiu, aby došlo k syntéze proteinů kódovaných vstupující DNA, které zajistí např. rezistenci k antibiotiku. Potom jsou buňky vysety na pevné médium obsahující příslušné antibiotikum, aby bylo možno selektovat transformanty.^[81, 87, 88]

Nejdříve byly nality plotny s antibiotikem: v pootevřené lahvi se rozehřál dle návodu předem připravený agar, z něho se odebralo potřebné množství do sterilní zkumavky Falcon, byl přidán 100mM ampicillin (1000x zředěn) a cca po 10 ml se agar s ampicilinem nalil do Petriho misek, takto připravené médium se nechalo ztuhnout. Byl vyjmut potřebný počet alikvotů (po 200 μ l) z mrazícího boxu (-80 °C) a nechán cca 10 minut na ledu při laboratorní teplotě. Následně bylo 100 μ l buněk přidáno k připravenému vektoru (2, 20 nebo 40 μ l) a směs nechána na ledu po dobu 30 minut. Buňky s vektorem byly podrobeny 45 sekund (90 sekund v případě buněk DH5 α) „*heat-shocku*“ ve vodní lázni TE-10D, nastavené na 42 °C. Vzorky byly ihned dány na 3 minuty na led. Následovalo přidání 300 μ l LB media (cca trojnásobek objemu buněk) bez ampicillinu a inkubace při 37 °C 45 minut (inkubátor IR 1500). 300 μ l suspenze bylo nanášeno na připravené agarové plotny, sterilními kuličkami rozetřeno po celém povrchu ploten a plotny byly inkubovány při 37 °C přes noc (IR 1500). Druhý den byly vzniklé kolonie sterilně přeočkovány v Biohazard Boxu do 50 ml centrifugačních zkumavek Falcon s 5 ml LB media (s 5 μ l 100mM ampicillinu) nebo do 100 ml Erlenmayerových baněk se zátkou z buničiny s 40 ml LB media (s 40 μ l 100mM ampicillinu). Přeočkováno bylo sterilním párátkem vždy několik kolonií z každé plotny, pak byly plotny obaleny parafilmem a uloženy do lednice. Zkumavky Falcon či Erlenmayerovy baňky s přeočkovánými buňkami byly inkubovány při 37 °C a 200 RPM přes noc (G24 Environmental Incubator Shaker).

3.3.1.8 *Izolace plasmidové DNA*

3.3.1.8.1 *JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit*

Izolace pDNA byla provedena dle návodu výrobce.^[84]

5 ml přes noc narostlé buněčné kultury bylo odstředěno v centrifuze Allegra X-22R (rotor 4250) při 4500 RPM 5 minut a následně byl pipetou odstraněn supernatant. Buňky byly resuspendovány v 900 µl TE pufru (10mM Tris, 1mM EDTA; pH 8), suspenze byly přeneseny do sterilních mikrozkušavek Eppendorf a centrifugovány 2 minuty při nejvyšších otáčkách (Centrifuga 5415 R, 13 200 RPM) – promytím buněk TE pufrem se odstranilo přebytečné LB medium, které v izolaci vadí. Supernatant byl opatrně odsán pipetou a buňky byly resuspendovány ve 250 µl G1 pufru. 250 µl pufru G2 bylo přidáno na lyzi buněk, vzorky byly opatrně promíchány převrácením (nesmí se míchat pomocí Vortexu) a byly inkubovány při laboratorní teplotě 5 minut. 350 µl pufru G3 bylo přidáno na neutralizaci (promíchání převrácením). Vzorky byly odstředovány 10 minut při nejvyšších otáčkách. Supernatant byl opatrně odsán a aplikován na kolonku. Po centrifugaci (1 minutu při 12.000 g) byl eluovaný roztok odstraněn. Na kolonku bylo potom aplikováno 500 µl promývacího pufru G4 (s EtOH) odstředěno opět 1 minutu při 12.000 g. Eluovaný roztok byl vylit do výlevky. Zbytky pufru G4 byly odstraněny centrifugací při nejvyšších otáčkách 1 minutu. Kolonky byly následně umístěny do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky Eppendorf, bylo na ně aplikováno 75 µl předehřáté (65 °C) sterilní MQ vody, vyčkalo se 1 minutu a pak se odstředovalo 2 minuty při 12.000 g (eluce plasmidové DNA). Plasmidová DNA byla skladována při - 20 °C.

3.3.1.8.2 *GenElute™ Plasmid Midiprep Kit*

Izolace pDNA byla provedena dle návodu výrobce.^[89]

40 ml přes noc narostlé buněčné kultury bylo přelito do sterilních centrifugačních zkumavek Falcon a bylo odstředováno v centrifuze Allegra X-22R (rotor 4250) při 4 °C, 4500 RPM 10 minut. Supernatant byl odlit a zkumavky se nechaly 2 min v převrácené poloze, aby se odstranilo zbylé LB medium. Buňky byly resuspendovány v 1,2 ml k tomu určeného roztoku a přeneseny do sterilních centrifugačních kyvet Oak Ridge. Bylo přidáno 1,2 ml roztoku na lyzi buněk, vzorky byly opatrně promíchány

převrácením (nesmí se míchat pomocí Vortexu) a byly inkubovány při laboratorní teplotě maximálně 5 minut. Bylo přidáno 1,6 ml neutralizačního roztoku (promíchání převrácením). Vzorky byly odstředovány v centrifuze Allegra X-22R (rotor 630) při 4 °C, 15.000 g 15 minut. DNA vazebné kolonky byly připraveny tak, že se aplikovaly 3 ml přípravného roztoku na kolonku, která byla v 15 ml zkumavce (dodávaná s kitem), a odstředovalo se (rotor 4250) při 4500 RPM 2 minuty. Supernatant (lyzát) byl po neutralizaci a následné centrifugaci buněk aplikován na kolonku a centrifugován při 4500 RPM 2 minuty. Eluovaný roztok byl odstraněn a kolonky byly promyty 3 ml promývacího roztoku (odstředění při 4500 RPM 5 minut). Zbytky promývacího roztoku byly odstraněny centrifugací při 4500 RPM 1 minutu. Kolonky byly následně umístěny do nové sterilní 15 ml zkumavky, byl na ně aplikován 1 ml sterilní MQ vody a odstředovalo se 5 minut při 4500 RPM (eluce plasmidové DNA). Plasmidová DNA byla skladována při - 20 °C.

3.3.1.9 Určení koncentrace a čistoty DNA

Nejdříve bylo změřeno na spektrofotometru E8453 absorpční spektrum vzorků (ředěny 100x) od 200 do 350 nm (proti destilované vodě). Koncentrace plasmidové DNA byla určena ze vztahu $A_{260} - A_{320} = 1 \leftrightarrow c = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$. Dále byl určen následující poměr, pro který by pro účely sekvenace mělo platit:

$$\triangleright \frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}} > 1,8$$

3.3.1.10 Příprava vzorků na sekvenování

Sekvenováním se myslí zjištění pořadí nukleotidů (basí) v sekvenci daného segmentu DNA.

Na sekvenaci bylo dáno cca 600 ng DNA v PCR-mikrozkumavkách Eppendorf, které byly doplněny sterilní MQ vodou do celkového objemu 13 μl . Sekvenace pDNA byla provedena Centrem servisních laboratoří biologické sekce Přírodovědecké Fakulty Univerzity Karlovy.

3.3.2 *Produkce a separace rekombinantních proteinů*

E. coli jako systém pro heterologní expresi mnoha proteinů je velmi využívaný díky své snadné genetické manipulaci, nenáročné a levné kultivaci a dostatečně vysokému stupni exprese. Pro rekombinantní proteinovou expresi se využívá několik expresních systémů, jako pET, pGEX, pMAL, pTRX, pUC, aj. Expresní systém pET-22b obsahuje velmi silný promotor z bakteriofága T7. K expresi proteinu se využívá buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které obsahují gen *l*, kódující T7 RNA polymerasu, z bakteriofága T7. Tento gen je pod kontrolou IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid) – inducibilního *lacUV5* promotoru. Po přidavku IPTG tedy nastává indukce exprese daného genu, který se nachází v expresím systému (pET-22b).^[87]

3.3.2.1 *Optimalizace exprese rekombinantního wt/mod1A1*

150 μ l přes noc narostlé kultury (BL-21 (DE3) RIL, RIPL, GOLD) bylo inokulováno do 10 ml LB media (s 10 μ l 100mM ampicillinu). Zaočkované medium bylo inkubováno při 37 °C a 200 RPM (ORBI-SAFE TS). Indukce exprese byla iniciovaná IPTG (konečná koncentrace 0,1; 0,2; 0,5 a 1mM) při různých hodnotách OD₆₀₀ – 0,4; 0,6; 0,8 a 1. Před přidáním IPTG byla ještě přidána kyselina δ -aminolevulová (ALA) v konečné koncentraci 0,5mM. Následná inkubace již probíhala při 18, 27 nebo 37 °C a 180 RPM po dobu 48 hodin. V průběhu experimentu byly odebírány vzorky a byla měřena OD₆₀₀ proti čistému LB mediu. Vzorky po 0,5 ml byly pak stočeny na 12.000 g 1 minutu (Centrifuga 5415 R) a pelety byly resuspendovány ve 100 μ l MQ vody.

3.3.2.2 *Izolace membránové frakce*

Po sklizení buněk a jejich resuspendování musí dojít k rozrušení buněčné stěny, aby bylo docíleno uvolnění produkovaného proteinu, který se nalézá uvnitř buněk. Běžně používaná a jednoduchá metoda je například ultrazvuk. Pomocí ultrazvuku jsou buňky narušovány zvukem o vysoké frekvenci (sonikace). Nevýhodou je, že ultrazvuk zapříčiňuje ohřívání vzorku a tak se musí vzorek konstantně chladit. Před započítím sonikace je

výhodné k suspenzi buněk přidat inhibitory proteas, aby nedocházelo k degradaci proteinu.^[90]

250 ml LB media (s 250 μ l 100mM ampicillinu) bylo inokulováno 1 ml přes noc narostlé kultury (BL-21 (DE3) RIL, RIPL, GOLD) a inkubováno při 37 °C a 200 RPM (ORBI-SAFE TS). Indukce exprese byla provedena IPTG (konečná koncentrace 0,1 nebo 0,5mM) při hodnotě OD₆₀₀ 0,4 či 0,9. ALA (konečná koncentrace 0,5mM) byla přidána v době indukce nebo 30, 60, 120 či 150 minut před indukci. Dále již inkubace probíhala při 18, 22 nebo 27 °C a 180 RPM 12 až 24 hodin. Narostlé buňky byly druhý den stočeny v centrifuze Janetzki K70 D při 4 °C, 3000 RPM 20 minut. Vzniklé pelety byly resuspendovány ve 20 ml M1 pufru (100mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 7,4) a směs byla přenesena do zkumavek Falcon. Tableta s inhibitory proteas byla rozpuštěna sonikací v 1 ml M1 pufru a tento roztok byl přidán k resuspendovaným buňkám. Suspenze byla podrobena dezintegraci buněk sonikací (Sonopuls, sonda KE 76) (10 cyklů po 1 minutě, 40% výkon). Po každém cyklu byla suspenze ponechána 2 minuty na ledu. Po sonikaci buněk bylo postupováno dvěma různými způsoby:

a) Standardní postup

Směs byla odstředována v centrifuze Allegra X-22R (rotor 4250) při 4 °C, 4500 RPM 15 minut (peleta resuspendována ve 20 ml M1 pufru). Supernatant byl přelit do centrifugačních kyvet Oak Ridge a centrifugován při 4 °C, 20.000 g (rotor 630) 30 minut (peleta resuspendována ve 20 ml pufru M1). Vzniklý supernatant byl přelit do ultracentrifugačních kyvet a membránová frakce byla odstředována 75 minut při 4 °C, 60 000 RPM (OptimaTM LE-80K, rotor Ti 70). Vzniklá peleta byla kvantitativně převedena do Potter-Elvehjemova homogenizátoru a homogenizována ve 2 ml pufru W1 (50mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 7,4; 20% (v/v) glycerol) v chladové místnosti (5 °C). Homogenizát byl buď rozpipetován po 100 μ l alikvotech a skladován v - 80 °C, nebo ponechán ve 2 ml zkumavce Eppendorf na ledu pro následné experimenty.

b) Zjednodušený postup: odstředění nerozbitých buněk a inkluzních tělísek v jednom kroku

Suspenze buněk po rozbití ultrazvukem byla přelita do centrifugačních kyvet Oak Ridge a bylo odstředováno na centrifuze Allegra X-22R (rotor 4250) při 4 °C, 12.000 g 15 minut (peleta resuspendována ve 20 ml pufru M1). Vzniklý supernatant byl podroben ultracentrifugaci (viz výše). Dále bylo postupováno stejně jako u centrifugace inkluzních tělísek.

3.3.2.3 Optimalizace solubilizace cytochromu P450 1A1 z membrán

Solubilizace je jedním z nejkritičtějších kroků při přípravě membránových proteinů. Během solubilizace totiž dochází k extrakci membránových proteinů z jejich přirozeného prostředí (lipidová membrána) do vodného prostředí za použití detergentů. Detergenty zapříčiňují dezintegraci lipidové dvojvrstvy a tak dochází k inkorporaci lipidů a proteinů do micel detergentu.^[90]

Po izolaci membránové frakce (viz výše) a stanovení koncentrace proteinu v membránách *E. coli* (**Kap. 3.3.3.4**) byla suspenze buněk zředěna puftrem W1 a detergenty, aby finální koncentrace proteinu byla 2 mg/ml. Použité detergenty byly následující:

a) 0,6% (v/v) Triton X-100 + 0,6% (v/v) cholát sodný; b) 1% cholát sodný (v/v) + 0,5% (v/v) Tween 20; c) 1% (v/v) Triton X-100; d) 0,4% (v/v) Brij-35 + 0,6% (v/v) cholát sodný. K suspenzi buněk byl či nebyl přidán roztok inhibitorů proteas. Solubilizace probíhala na ledu v chladové místnosti (5 °C) za stálého míchání po dobu 1 – 3 hodin. Po ukončení solubilizace byla suspenze stočena na ultracentrifuze Optima™ LE-80K (rotor Ti 70) při 4 °C, 60 000 RPM 75 minut. Supernatant byl rozpipetován po 100 µl alikvotech a skladován při - 80 °C. Peleta byla homogenizována v 1 ml pufru W1 a též skladována při - 80 °C.

3.3.3 *Analýza vzorků z hlediska obsahu proteinů, stanovení koncentrace cytochromu P450 a jeho aktivity*

3.3.3.1 *Diskontinuální SDS elektroforéza*

Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je široce používaná metoda k separaci proteinových molekul dle jejich molekulové hmotnosti. SDS (aniontový detergent) denaturuje proteiny jejich rozbavením a udílí tak (svou vazbou na protein) negativní náboj celému polypeptidovému řetězci. Rychlost migrace proteinů není tedy zapříčiněna velikostí elektrického náboje samotného polypeptidu, ale jeho molekulovou hmotností.^[91]

Při diskontinuální elektroforéze jsou využívány dva typy gelů, tj. zaostřovací a separační gel. Oba dva gely vznikají kopolymerací akrylamidu a N,N-methylen-bis-akrylamidu (BIS). Dalšími složkami jsou persíran amonný a N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), které iniciují polymeraci. Polymerace akrylamidu a BIS je způsobena volnými radikály, které vznikají rozkladem persíranu amonného díky působení světla. TEMED se používá pro stabilizaci volných radikálů.^[92]

Složení roztoků:

- **Pufř A:** 0,375M Tris/HCl; pH 8,8; 0,1% (v/v) SDS
- **Polymerační roztok A:** 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS, v pufřu A
- **Pufř B:** 0,125M Tris/HCl; pH 6,8; 0,1% (v/v) SDS, 0,0006% (w/v) bromfenol.modř
- **Polymerační roztok B:** 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS, v pufřu B
- **Elektrodový pufř:** 0,192M glycin, 0,025M Tris/HCl; pH 8,3; 0,1% (w/v) SDS
- **Vzorkový redukující pufř (4x konc.):** 0,25M Tris/HCl, 8% (v/v) SDS, 20% (v/v) β -merkapt ethanol, 40% (v/v) glycerol, 0,003% (w/v) bromfenol. modř; pH 6,8
- **Barvicí lázeň:** 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyselina octová
- **Odbarvovací lázeň:** 25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Nejdříve byla připravena aparatura na SDS elektroforézu miniVE Vertical se dvěma skly (10 x 10,5 cm) a „spacery“ mezi nimi. Mezi skla byl nalit 8% separační gel,

jehož složení bylo: 5,5 ml pufru A, 2 ml polymeračního roztoku A, 7,5 μ l TEMEDu a 75 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Okamžitě po aplikaci byl gel převrstven destilovanou vodou a cca 30 minut gel tuhnul. Destilovaná voda byla odlita a odstraněna filtračním papírem a byl aplikován 4% zaostřovací gel s následujícím složením: 2,6 ml pufru B, 400 μ l polymeračního roztoku B, 3 μ l TEMEDu, 60 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Po nalití zaostřovacího gelu byl do gelu zasazen hřeben (na 10 či 15 jamek) a cca 15 – 20 minut gel tuhnul. Mezitím byly smíseny vzorky a standard potkaního CYP1A1 se vzorkovým pufrům (4x konc.), které byly povařeny ve vodní lázni (100 °C) 5 minut. Vzorky byly stočeny na stolní minicentrifuze. Po ztuhnutí gelu byl hřeben vytažen a do horního elektrodového prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr. Následně byly všechny vzorky, marker (7 μ l) či standard potkaního CYP1A1 (8 μ l) aplikované pomocí mikrostříkačky Hamilton (7 – 12 μ l; upřesnění viz výsledky a diskuze) do jamek na gel. Spodní část aparatury se pootevřela (aby probíhal proud), celá aparatura byla umístěna do vany s již nalitým elektrodovým pufrům a překryta víkem. Elektroforéza probíhala cca 2 hodiny za použití zdroje EPS 301. Nejdříve elektroforéza probíhala 30 minut při konstantním napětí 80 V a po uplynutí této doby bylo napětí zvýšeno na 150 V a elektroforéza probíhala dalších 60 – 90 min.

Po ukončení elektroforézy byl zaostřovací gel odříznut, separační gel byl přenesen do Petriho misky s barvicí lázní a miska byla umístěna na třepačku po dobu 45 minut. Poté byla barvicí lázeň odlita, na gel byla nalita odbarvovací lázeň a Petriho miska s gelem byla opět umístěna na třepačku. Po cca 1 hod byla odbarvovací lázeň odlita, na gel byla nalita nová odbarvovací lázeň a gel byl na třepačce odbarvován přes noc.

3.3.3.2 *Metoda Western blotting*

U metody „*Western blotting*“ neboli „*imunoblotting*“ se využívají proteiny separované pomocí elektroforézy, které jsou následně elektroforeticky přeneseny například na PVDF (polyvinylidenfluorid) membránu. Poté je membrána „zablokována“ nespecifickým proteinem (často kasein z odtučněného sušeného mléka), aby se v dalších krocích zabránilo adsorpci proteinů na prázdná místa na membráně. Membrána je inkubována postupně s primární a sekundární protilátkou a nakonec se substrátem, který se váže na sekundární protilátku. Vzniklý barevný precipitát by měl označit pouze daný

protein. Tyto metody umožňují specifickou detekci velmi malých koncentrací proteinu ve vzorku.^[93]

Gel po SDS elektroforéze byl nejprve zbaven zaostřovacího gelu a změřen. Poté byl vložen do Petriho misky s transferovým pufrém (0,025M Tris/HCl, 0,192M glycin, pH 8,3) a 10% (v/v) methanolem a dán na třepačku na 10 minut. Mezitím bylo nastříháno šest kusů chromatografického papíru Whatman (o 0,5 cm více na každé straně) a PVDF membrána dle změřeného gelu. Tři kusy chromatografického papíru Whatman byly smáčeny v transferovém pufru a přeneseny do aparatury pro „*Western blotting*“. PVDF membrána byla smáčena na 10 sekund ve 100% methanolu, pak 30 sekund v destilované vodě a nakonec 1 minutu v transferovém pufru. Následně byla membrána přenesena (lesklou stranou nahoru) na aparaturu se třemi kusy papíru Whatman, na ní byl posléze položen gel a ten byl překryt dalšími třemi kusy papíru Whatman, které byly smáčeny v transferovém pufru. U tohoto „sendviče“ byly pomocí skleněné tyčinky odstraněny bublinky a na něj byla opatrně přiložena druhá strana aparatury. Aparatura byla připojena ke zdroji EPS 301 a celý proces probíhal za konstantního proudu 3,5 mA/cm² gelu 50 minut.

3.3.3.3 *Imunochemická detekce cytochromu P450 1A1*

Po ukončení přenosu pomocí metody „*Western blotting*“ byly opatrně odstraněny papíry a gel a membrána byla přenesena (lesklou stranou nahoru) do Petriho misky s blokovacím pufrém [5% (w/v) odtučněné sušené mléko v PBS Triton X-100 pufru (0,134M NaCl, 1,8mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1mM NaH₂PO₄·2H₂O; pH 7,2; 0,3% (v/v) Triton X-100)]. Následující postup je závislý na použití primární protilátky proti CYP1A1: a) králičí (komerční) protilátka nebo b) slepičí protilátka.

a) Králičí (komerční) polyklonální protilátka

Miska s blokovacím pufrém a membránou dána na třepačku na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Blokovací pufr byl odstraněn a do misky s membránou byl aplikován roztok primární králičí polyklonální protilátky (10 ml 5% (w/v) odtučněného sušeného mléka v PBS Triton X-100 pufru + 10 µl protilátky (1 mg/ml)) proti potkanímu CYP1A1.

Miska byla překryta větší Petriho miskou a obě dvě misky byly k sobě připevněny pomocí parafilmu. Inkubace s primární protilátkou probíhala na třepačce MR-1 při 5 °C přes noc. Druhý den byl roztok primární protilátky přelit do lékovky, membrána byla převrstvena cca 20 ml PBS Triton X-100 pufru a Petriho miska byla dána na 5 minut na třepačku při laboratorní teplotě. Poté byla použita aparatura „SNAP *i.d.*TM Protein Detection System“ na promytí membrány pufrům PBS Triton X-100 a její inkubaci (10 minut) s roztokem sekundární protilátky proti králičí polyklonální protilátce značené alkalickou fosfatasou (2,1 µl protilátky + 3 ml PBS Triton X-100 pufru) dle návodu uvedeného výrobcem.^[94] Následně byla membrána z aparatury vyjmuta, vložena do Petriho misky s destilovanou vodou a dána na 5 minut na třepačku. Pak byla membrána přendána do nové Petriho misky a přelita roztokem substrátu pro alkalickou fosfatasu (tableta SIGMAFASTTM BCIP/NBT rozpuštěna sonikací v 10 ml destilované vody). Když byly vidět vzniklé precipitáty, byla membrána přenesena do Petriho misky s destilovanou vodou (tzv. „dovyvolání“) a usušena na filtračním papíře.

b) Slepičí polyklonální protilátka

Miska s blokovacím pufrům a membránou byla překryta větší Petriho miskou a obě dvě misky byly k sobě připevněny pomocí parafilmu. „Blokování“ probíhalo přes noc při 5 °C. Druhý den byl blokovací pufr odstraněn, do misky s membránou byl aplikován roztok primární slepičí polyklonální protilátky (10 ml 5% (w/v) odtučněného sušeného mléka v PBS Triton X-100 pufru + 10 µl protilátky) proti potkanímu CYP1A1 a miska byla dána na třepačku Yellow line OS 2 basic na 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl roztok primární protilátky přelit do lékovky, membrána byla převrstvena cca 20 ml PBS Triton X-100 pufru a Petriho miska byla dána na 5 minut na třepačku při laboratorní teplotě. Dále bylo postupováno jako při inkubaci s králičí polyklonální protilátkou, byla použita sekundární protilátka proti slepičí protilátce značená alkalickou fosfatasou.

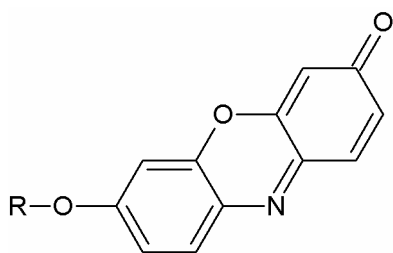
3.3.3.4 *Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny*

Koncentrace proteinu byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol.^[95], při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin totiž redukují měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilizované jako vlnanový komplex) na měďné, intenzita zabarvení, stanovená spektrofotometricky při 562 nm (A_{562}), je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny. Jako standard je využíván hovězí sérový albumin (BSA).

Nejdříve bylo připraveno činidlo pro stanovení koncentrace proteinu. Sonikací byla rozpuštěna BCA ve 49 dílech roztoku A (0,4% (w/v) NaOH; 0,95% (w/v) NaHCO₃; 2% (w/v) Na₂CO₃·10H₂O; 0,16% (w/v) vlnan sodný; pH 11,25) a v 1 díle roztoku B (4% (w/v) CuSO₄·5H₂O v destilované vodě) tak, aby výsledná koncentrace byla 1% (w/v) BCA v 50 dílech. Dále byly připraveny vzorky a standard BSA do sterilních 2 ml zkumavek Eppendorf. Vzorky byly ředěny 25x, 50x a 100x destilovanou vodou. Od každé koncentrace byly připraveny triplety. U standardu BSA byly koncentrace 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml (k tomu dva „slepé“ vzorky). Vzorky i standardy BSA byly rozpipetovány po 10 µl a k nim bylo přidáno 490 µl činidla. Všechny zkumavky se vzorky a standardy BSA byly promíchány na Vortexu, vloženy do vodní lázně Julabo TW8 a nechány inkubovat při 60 °C 1 hodinu. Po zchladnutí všech vzorků byla proměřena absorbance standardů BSA na spektrofotometru He λ ios α ve skleněných kyvetách na 0,5 ml (optická dráha 1 cm) při 562 nm proti „slepému“ vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 10 µl destilované vody. Stejně byly změřeny absorbance vzorků. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla určena ze sestavené kalibrační křivky.

3.3.3.5 *Stanovení Ethoxyresorufin-O-deethylasové aktivity*

Stanovení 7-ethoxyresorufin-O-deethylasové (EROD) aktivity je používáno jako marker pro určení enzymové aktivity CYP1A1/2. Substrát je tedy metabolizován CYP1A1 na fluorescenční produkt, resorufin (Obr. 3.1). Ke stanovení enzymové aktivity CYP1A1 byla použita modifikovaná metoda dle Burka and Mayera.^[96]



Sloučenina	R
Resorufin	H
7-Ethoxyresorufin	C ₂ H ₅

Obrázek 3.1
Struktura resorufinu a 7-ethoxyresorufinu

Složení zásobních roztoků:

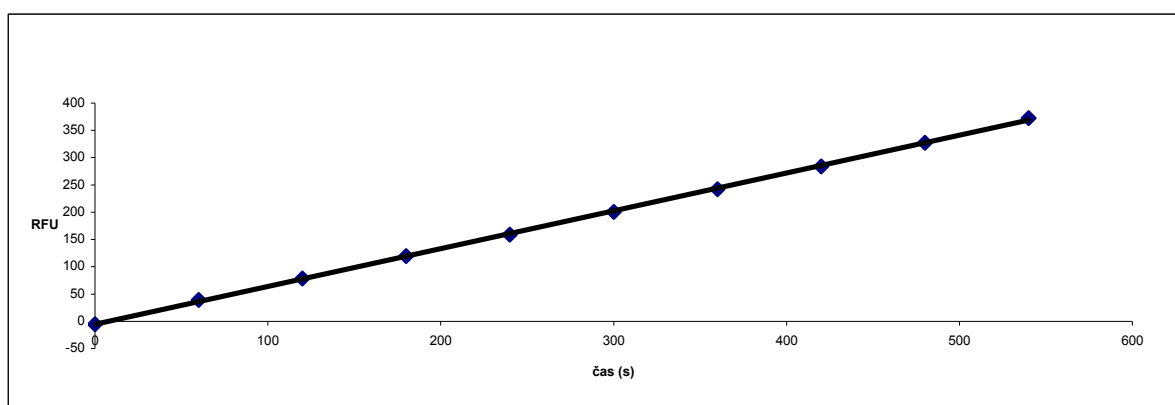
- **Draselnofosfátový pufr:** 100mM KH₂PO₄, pH 7,4 (upraveno pomocí KOH)
- **Roztok resorufinu:** 10μM resorufin rozpuštěný v methanolu (MetOH)
- **Roztok 7- ethoxyresorufinu:** 0,2mM 7-ethoxyresorufin rozpuštěný v DMSO
- **Roztok kofaktoru:** 5mM NADPH

Nejdříve byly připraveny neinkubované standardy resorufinu naředěné draselnofosfátovým pufrem na konečnou koncentraci 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 a 0,4μM. „Slepý“ vzorek obsahoval pouze pufr. Všechny standardy a „slepý“ vzorek byly vortexovány. Fluorescence byla měřena na fluorimetru Luminescence Spectrometer LS-55 s 96 jamkovou čtečkou. Použité excitační a emisní vlnové délky byly 530 nm (štěrbina 15) a 585 nm (štěrbina 10).

Byly připraveny „premixy“ o celkovém objemu 0,5 ml obsahující membránové frakce ředěné draselnofosfátovým pufrem na konečnou koncentraci 0,5; 0,25 nebo 0,125 mg/ml proteinu rekonstituované s různým množstvím CYP reductasy (koncentrace zásobního roztoku 16,7μM). Ihned se vzorky vložily do stojánku Eppendorf a nechaly se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě a cca 300 RPM (Yellow line OS 2 basic). Bylo přidáno 5,62 μl 0,2mM roztoku 7-ethoxyresorufinu a vzorky se nechaly stát při laboratorní teplotě 3 minuty. Každý takto připravený „premix“ byl rozpipetován po 150 μl do tří jamek na 96 jamkové destičce. Do první jamky se záhy přidalo 17 μl pufru, jako „slepý“ vzorek, a do zbývajících dvou bylo přidáno 17 μl NADPH (konečná koncentrace 0,5mM). Tím byla zahájena reakce, destička se ihned vložila do fluorimetru a fluorescence byla měřena v deseti 60 sekundových cyklech. Enzymová aktivita CYP1A1 byla určena porovnáním

s resorufinovými standardy a vyjádřena jako *pmol resorufinu/min.mg.pmol reductasy*. Konečná jednotka aktivity CYP1A1 (*pmol resorufinu/min.mg proteinu*) byla vztažena na *pmol reductasy*, jelikož při každém měření bylo dáváno do směsi jiné množství reductasy.

Při určování EROD aktivit musel být celý průběh reakce lineární, jinak musel být vzorek více naředěn, aby mohla být správně určena aktivita CYP1A1 (Graf 3.1). Byly vyzkoušeny tři různé konečné koncentrace membránové frakce v měřeném vzorku, tzn. 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml, a v něm různý poměr reductasy, aby reakce probíhala lineárně. U *mod1A1* a *mod1A1.His* musela být membránová frakce ředěna na konečnou koncentraci 0,5 mg/ml a v rámci této koncentrace k ní bylo přidáno stejné množství reductasy (poměr 1:1; např. 17 μ l vzorku + 17 μ l reductasy). Pro *wt1A1* a *wt1A1.His* byla konečná koncentrace membránové frakce 0,125 mg/ml a v rámci této koncentrace k ní bylo přidáno poloviční množství reductasy (poměr 2:1; např. 4 μ l vzorku + 2 μ l reductasy). Příklad EROD aktivity *wt1A1* je zobrazen na Grafu 4.1. Konečná aktivita určovala přeměnu 7-ethoxyresorufinu na resorufin za 1 minutu vztaženou na miligram proteinu v jamce. Jednotka EROD aktivity tudíž byla následující: *pmol resorufinu/min.mg*. Jelikož bylo do směsi vždy přidáváno jiné množství reductasy (záleželo na množství přidaného vzorku membránové frakce), byla konečná jednotka EROD aktivity ještě vztažena na *pmol reductasy*. Tímto způsobem byla posuzována EROD aktivita u všech měřených vzorků.



Graf 3.1

Stanovení EROD aktivity membránové frakce kmene GOLD exprimujícího *wt1A1*

Tvorba resorufinu detekovaná jako lineární nárůst fluorescence. *wt1A1* byl produkován při 22 °C po dobu 15 hodin v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD při indukci 0,1mM IPTG po dosažení OD_{600} kolem 0,9. RFU – „Relative Fluorescence Units“.

3.3.3.6 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentrace cytochromu P450 byla určena dle spektrofotometrické metody popsané Omurou a Satem.^[97] Tato metoda je založená na měření diferenčního spektra komplexu redukovaného CYP s oxidem uhelnatým při vlnové délce 450 nm, kdy se tvoří charakteristické absorpční maximum.

20 μl homogenizátu z membránové frakce (viz. **Kap. 3.3.2.2**) bylo přidáno do 980 μl draselnofosfátového pufru (100mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 2% (v/v) glycerol). Poté byl ke směsi přidán pevný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (přibližně 3 mg). Směs byla opatrně promíchána a po 0,5 ml byla rozdělena do dvou křemenných kyvet na 0,5 ml (optická dráha 1 cm). Obě dvě kyvety byly vloženy do spektrofotometru Specord M40 a byla změřena tzv. „baseline“ v rozsahu 400 – 490 nm (integrační čas 1; štěrbina 0). Následně byla ze spektrofotometru vyndána vzorková kyveta a opatrně „probublána“ oxidem uhelnatým po dobu 60 sekund. Vzorková kyveta byla opět vložena do spektrofotometru a bylo změřeno diferenční spektrum ve stejném rozsahu vlnových délek jako „baseline“.

Koncentrace CYP byla vypočtena ze vztahu:

$$c_{\text{CYP}} = (A_{450} - A_{490} / \epsilon_{450-490}) \times \text{ředění}$$

c_{CYP}	koncentrace CYP [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
A_{450}, A_{490}	absorbance při 450 nm, resp. 490 nm
$\epsilon_{450-490}$	molární absorpční koeficient CYP při 450 nm, resp. 490 nm ($\epsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

4 Výsledky a diskuze

4.1 Příprava vektorů pro expresi cytochromu P4501A1

4.1.1 Návrh oligonukleotidů pro syntézu genu *wt1A1(.His)* resp. *mod1A1(.His)*

Nejdříve byla zjištěna aminokyselinová sekvence potkaního (wt – „wild type“) CYP1A1 (Obr. 4.1) z proteomického serveru ExPASy („Expert Protein Analysis System“)^[98]. Pro přípravu modifikovaného CYP1A1 byla tato sekvence upravena (dle^[43]) na N-konci (Obr. 4.2), tedy v oblasti membránové kotvy.

```
MPSVYGFPAFTSATELLLLAVTTTFCLGFVWVRVTRTWVPKGLKSPPGWGLPFIGHVLTG
KNPHLSLTKLSQQYGDVLQIRIGSTPVVVLVSLGNTIKQALVKQGDDFKGRPDLYSFTLIA
NGQSMTFNPDSPGLWAARRRLAQNALKSFSIASDPTLASSCYLEEHVSKEAEYLISKFQK
LMAEVGHFDPFKYLVVSVANVICAICFGRRYDHDDQELLSIVNLSNEFGEVTGSGYPADF
IPILRYLPNSSLDAFKDLNKKFYFSFMKKLIKEHYRTFEKGHIRDITDSLIEHCQDRRLDE
NANVQLSDDKVITIVFDLFGAGFDTITTAISWSLMYLVTNPRIQRKIQEELDTVIGRDRQ
PRLSDRPQLPYLEAFILETFRHSSFPFTTIPHSTIRDTSLNIFYIPKGHCVFVNQWQVNH
DQELWGPNEFRPERFLTSSGTLDKHLSEKVIILFGLGKRKCIGETIGRLEVFLFLAILLQ
QMEFNVSPGKVDMPAYGLTLKHARCEHFQVQMRSSGPQHLQA
```

Obrázek 4.1

Aminokyselinová sekvence potkaního wt1A1 (převzato z^[98])

wt1A1

MPSVYGFPAFTSATELLLLAVTT**FCLGFVWVRVTRTWVPKGLKSPPG**... atd.

M ALLLVVVL**FCLGFVWVRVTRTWVPKGLKSPPG**... atd.

mod1A1

Obrázek 4.2

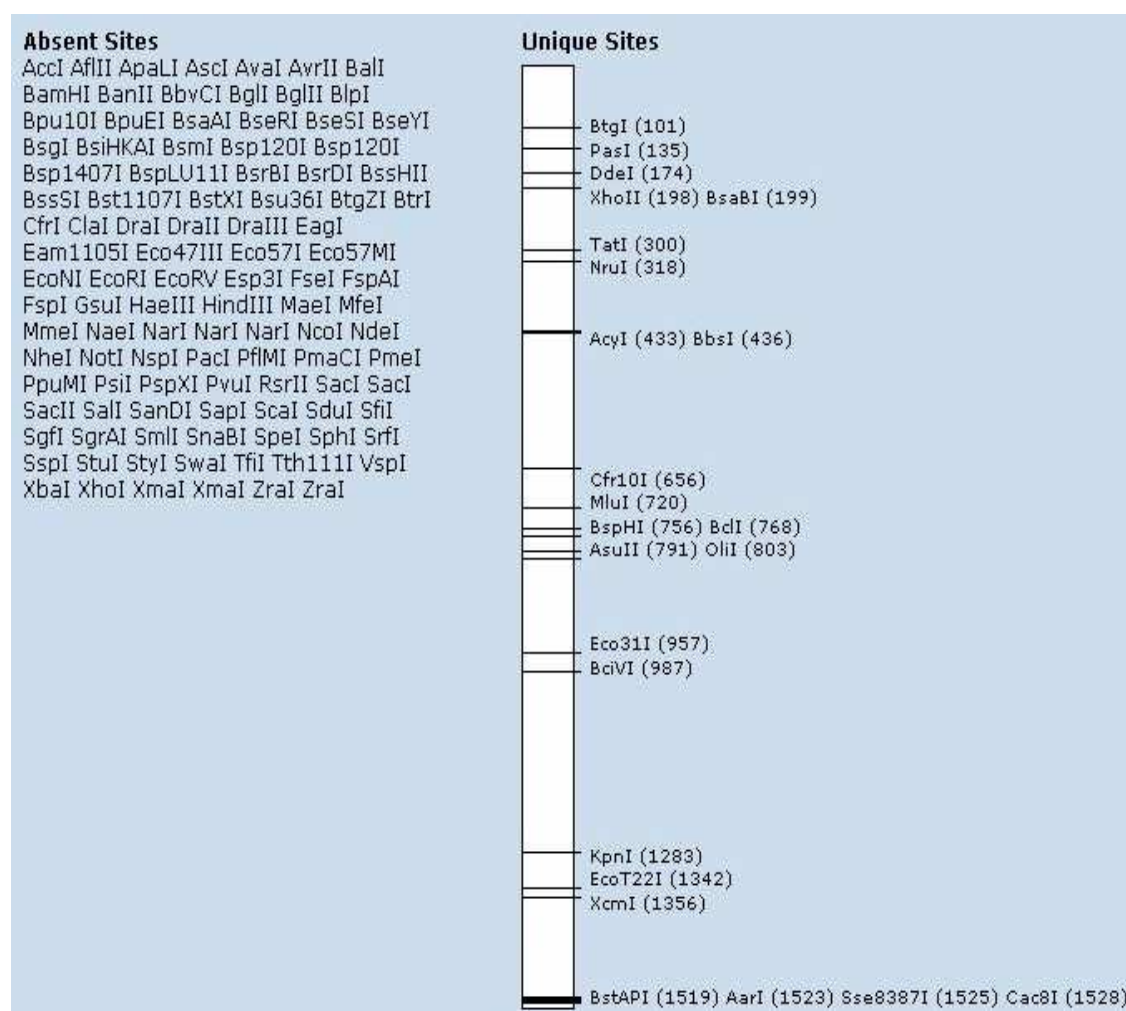
Modifikace N-terminální kotvy potkaního CYP1A1 (dle^[43])

Aminokyselinové sekvence potkaního (wt1A1) a modifikovaného (mod1A1) CYP1A1.

Následně byl programem „EBI Dbfetch“ na webových stránkách „European Bioinformatics Institute“^[99] proveden reverzní překlad a s pomocí programu „Optimizer“^[100] byla učiněna optimalizace kodonů pro expresi v *E. coli*. Dále bylo záměnou kodonů zajištěno, aby se uvnitř sekvence nevyskytovala restriční místa, která

byla navržena na vložení sekvence do pUC19 (EcoRI, HindIII) a pET-22b (NdeI, XhoI), aby tedy nedošlo k nežádoucímu štěpení *mod1A1* a *wt1A1* restričními endonukleasami uvnitř kódující sekvence.

Bylo rozhodnuto, že celý gen bude rozdělen na dva cca stejně dlouhé úseky (syntony), které budou separátně vloženy do klonovacího vektoru pUC19. Důvodem k tomuto rozhodnutí byla snaha o snížení pravděpodobnosti chyb při PCR a zkrácení sekvenovaných úseků. Uprostřed celé sekvence bylo vytipováno vhodné restriční místo (TGATCA) rozpoznávané BclI endonukleasou (Obr. 4.3).^[101] Díky tomuto restričnímu místu tedy mohly být z oligonukleotidů separátně syntetizované 2 syntony následně spojeny do celého genu pro *wt1A1* resp. *mod1A1* (Obr. 4.4 na straně 63).



Obrázek 4.3

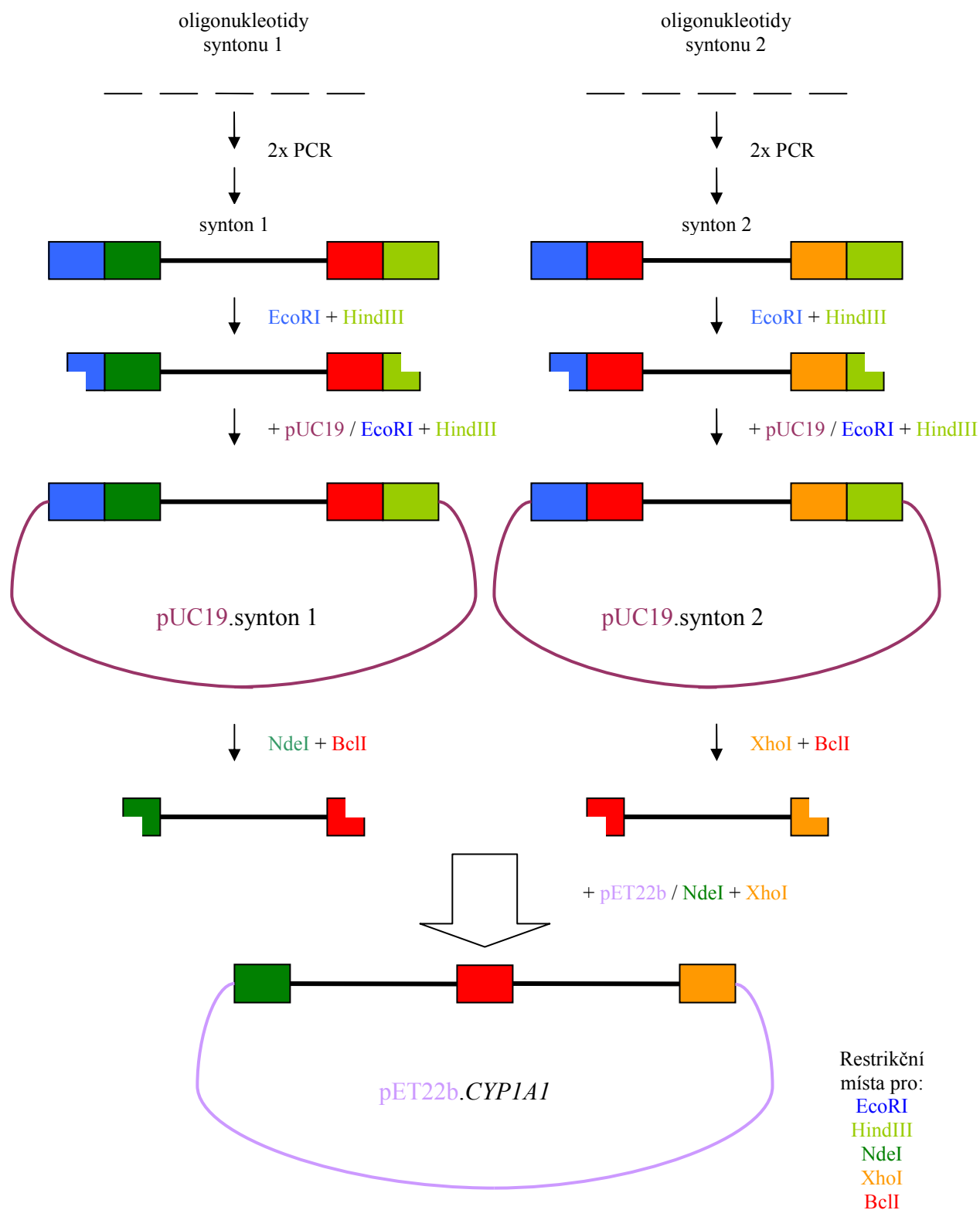
Analýza navrhované sekvence pro *wt1A1* ^[101]

Na obrázku jsou vyznačeny jednou se vyskytující restriční místa pro různé endonukleasy, které se nacházejí v *wt1A1* („Unique Sites“) a které tam naopak nejsou („Absent Sites“). Restriční místo pro BclI (768) se nachází téměř uprostřed celé sekvence *wt1A1*. Analýza navrhované sekvence pro *mod1A1* se shoduje s výše uvedenou analýzou (rozdíl je pouze v počtu basí).

Tím, že se protein (Obr. 4.1) a tím pádem i sekvence kódující wt1A1 respektive mod1A1 liší jen v úvodní části sekvence obsažené pouze v syntonu 1 (wtS1, Obr. 4.5 resp. modS1, Obr. 4.6), bylo možné pro obě varianty genu použít tentýž synton 2 (wtS2, Obr. 4.7). Byla však navržena také verze syntonu 2 bez STOP kodónu (modS2), což v rámci exprese proteinu pomocí expresního vektoru pET-22b umožňuje pokračování translace i v oblasti sekvence plasmidu kódující „His Tag“ a tedy připojení histidinové kotvy k C-konci rekombinantního proteinu.

K navrhovaným syntonům na příslušná místa v sekvenci byl dopsán STOP kodón (u syntonu „wtS2“, Obr. 4.7) a restrikční místa pro klonování do pUC19 a pET-22b (Obr. 4.4, 4.5, 4.6 a 4.7). Následně byly navrženy oligonukleotidy (Obr. 4.8, 4.9), pro syntézu všech čtyř syntonů. Podmínky při navrhování byly následující:

- 1) Délka oligonukleotidů: ≤ 80 basí
- 2) Teplota tání oligonukleotidů: $55\text{ °C} \geq T_m \geq 50\text{ °C}$



Obrázek 4.4
 Celkové schéma pracovního postupu pro přípravu vektoru pro expresi *wt1A1* respektive *mod1A1*

forward

s1F GACGAATTCATATGCCGTCTGTTACGGTTTTCCCGGCGTTCCACCTCTG
s101 CCCGGCGTTCCACCTCTGCGACCGAACGCTGCTGGCGGTTACCACCTTCTGCCTGGGTTTCTG
s103 CCGCCGGGTCCTGGGGTCTGCGGTTTCATCGGTCACGTTCTGACCTGGGTAACCCCGCACCTGTCTCTGACCAAAC
s105 CCCCGGTTGTTGTTCTGTCTGGTCTGAACACCATCAAACAGGCGCTGGTTAAACAGGGTGACGACTTCAAAGGTCGTCC
s107 CCTTCAACCCGGACTCTGGTCCGCTGTGGCGGCGCTGCTGCTGGCGCAGAACGCGCTGAAATCTTTCTCTATCCG
s109 CACGTTTCTAAAGAAGCGGAATACCTGATCTCTAAATTCAGAACTGATGGCGGAAGTTGGTCACTTCGACCCGTTCAA
s111 CGGTCGTCGTTACGACCACGACGACCAGGAACGCTGCTATCGTTAACCTGTCTAACGAGTTTGGTGAAGTTACCGGA

reverse

s102 CCACGACCCCGCGGAGATTTTCAGACCTTTTCGGAACCCAGGTACGGGTAACACGAACAACCCAGAAACCCAGGCAGAAG
s104 AGAACAAACAACCCGGGTAGAACCGATACGGATCTGCAGAACGTCACCGTACTGCTGAGACAGTTTGGTCAGAGACAGGT
s106 GAGTCCGGGTTGAAGGTCATAGACTGACCGTTCGCGATCAGGGTAAAGAGTACAGGTCCGGACGACCTTTGAAGTCG
s108 CCGCTTCTTTAGAAACGTGTTCTTCCAGGTAGCAAGAAGACGCCAGGGTCGGGTCAGACGCGATAGAGAAAGATTTTCAGC
s110 GGTTCGTAACGACGACCGAAGCAGATCGCGCAGATAACGTTCCAAACAGAAACAACCCAGGTATTTGAACGGGTCGAAGTGA
s112 GTCCAGAGAAGGTTCCGCGAGGTAACGACGAGTCCGGATGAAGTCCGCCGGGTAACCCAGAACCCGGTAACTTCCACCAAAC
s1R TACAAGCTTTGATCAGTTTTTTCATGAAAGAGTAGAATTTTTTGTTCAGGTCCTTTGAACGCGTCCAGAGAAGAGTTCGG

modS1 - forward

s1F01m GACGAATTCATATGGCGCTGCTGCTGGTTGTTGTTCTGCTTCTGCCTGGGTTTCTG

Obrázek 4.8

Oligonukleotidy navržené pro wtS1 resp. modS1 (psány od 5' k 3')

Oligonukleotidy označené jako „*forward*“ jsou psány po směru (tedy od 5' k 3') a ty označené jako „*reverse*“ jsou k navrhované sekvenci komplementární. Čísla za s1 označují pořadí jednotlivých oligonukleotidů v sekvenci wtS1. Modře vyznačené oligonukleotidy byly navrženy jako primery pro amplifikaci celého syntonu wtS1. Pro syntézu modS1 byl navržen oligonukleotid „s1F01m“ nahrazující „s1F“ a „s101“. Podtrhané sekvence ukazují, kde jsou části oligonukleotidů na sebe komplementární.

forward

s2F GACGAATTCATGATCAAAGAACAACCTACCGTACCTTCGAAAAAGGTCACATCCGTGACATCACCGACTCTCTGATCGAAC
s201 CCGACTCTCTGATCGAACACTGCCAGGACCGTCTGCTGACGAAAACCGGAACGTTCCAGCTGTCTGACGACAAAAGTTAT
s203 ATCACCACCCGATCTCTTGGTCTCTGATGTACCTGGTTACCAACCCGCGTATCCAGCGTAAATCCAGGAAGAACTGG
s205 GTCCGCGACTGCCGTACTTGGGAAGCG TTCATCTGGAAACCTTCCGTCACCTCTTCTTCGTTCCGTTCCACCATCCCCG
s207 GGTCACTGCGTTTTTCGTTAACCCAGTGGCAGGTTAACCCAGCAGGAACTGTGGGGTGACCCGAAACGAGTTTCGTCCCGGA
s209 TGAAAAAGTTATCTCTGTTCCGTTCTGGGTAACGTAATGCATCGGTGAAACCATCGGTCTGTGGAAGTTTTCTGTTC
s211 CCGGGTGAAAAAGTTGACATGACCCCGCGTACGGTCTGACCTGAAACACGCGCGTTGCGAACA

reverse

s202 GAGATCCGGTGGTGTGGTGTGAAACCCGACCCGAACAGGTCGAAAAACGATGGTGATAACTTTGTCTGTCAGACAGC
s204 TACGGCAGCTCGGACGGTCAGACAGACGCGGCTGACGGTACGACCGATAACGGTGTCCAGTTCTTCTGGATTTTAC
s206 ACGAAAACGCAGTGACCTTTCCGGATGTAGAAACCGTTCAGAGAGGTGTACGGATGGTAGAGTGCAGGGATGGTGAACGG
s208 CCGAACAGGATAACTTTTTTCAGACAGGTGTTTTGTCCAGGTACCAGAAGAGGTCAGGAAACGTTCCCGACGAAACTCGT
s210 TGTCAACTTTTTTACCCGGAGAAACGTTAAACTCCATCTGCTGCAGCAGGATCGCCAGGAAACAGGAAAACCTTCCAGAC
s212 CGCCTGCAGGTGCTGCGGACGAGAAGAACGCATCTGAACCTGGAAGTGTTCGCAACGCGCGT
s2R TACAAGCTTCTCGAGCTACCGCTGCAGGTGCTGCG

modS2 - reverse

s2RHis TACAAGCTTCTCGAGCGCTGCAGGTGCTGCG

Obrázek 4.9

Oligonukleotidy navržené pro wtS2 resp. modS2 (psány od 5' k 3')

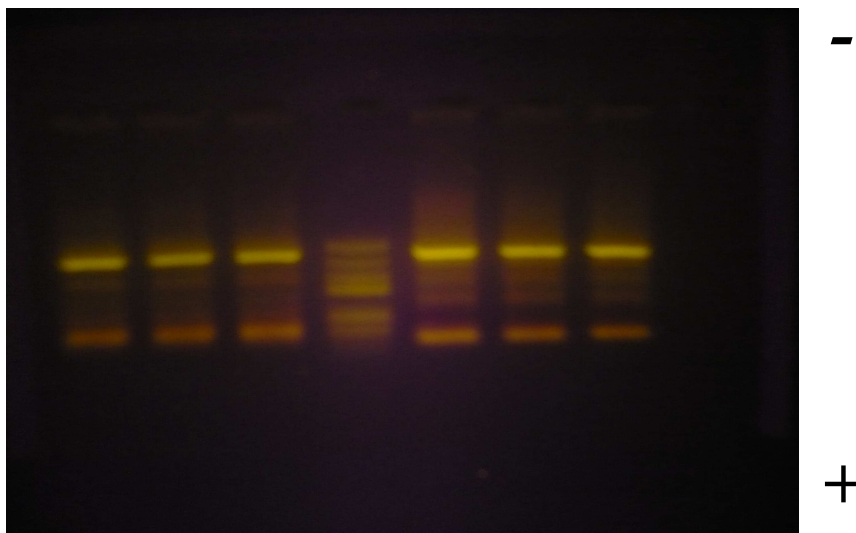
Oligonukleotidy označené jako „*forward*“ jsou psány po směru (tedy od 5' k 3') a ty označené jako „*reverse*“ jsou k navrhované sekvenci komplementární. Čísla za s2 označují pořadí jednotlivých oligonukleotidů v sekvenci. Modře vyznačené oligonukleotidy byly navrženy jako primery pro amplifikaci celého syntonu wtS2. U posledního oligonukleotidu je v rámečku zvýrazněna komplementární sekvence STOP kodonu, která je vynechána v oligonukleotidu „s2RHis“ nahrazujícím „S2R“ při syntéze modS2. Podtrhané sekvence ukazují, kde jsou části oligonukleotidů na sebe komplementární.

4.1.2 PCR – příprava syntonů z oligonukleotidů

Oligonukleotidy navržené pro genovou syntézu čtyř modifikací CYP1A1 (viz předchozí Kap.) byly připraveny firmou East Port.

V prvním kroku byla provedena syntéza fragmentu genu ze 12-ti oligonukleotidů pomocí PCR. V reakční směsi byly jako templát a zároveň i primery použity všechny oligonukleotidy od daného syntonu (tedy 12x 1 μ l od každého oligonukleotidu), viz též Obr. 4.8 a Obr. 4.9.

V dalším kroku byly celé syntony amplifikovány za použití koncových oligonukleotidů jakožto primerů. Jako templát se vzala reakční směs z předchozí PCR (3 μ l). Výsledné amplifikované sekvence (čtyři syntony) byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy se SYBR SafeTM (viz Obr. 4.10). Na základě porovnání s fragmenty DNA-markeru (155 – 970 pb) mobilita všech čtyř amplifikovaných sekvencí odpovídala předpokládané velikosti syntonů, tj. pro modS1 793 pb, wtS1 831 pb, modS2 791 pb a wtS2 794 pb. Kromě celých syntonů reakční směs obsahovala i kratší úseky DNA a neopolymerované oligonukleotidy.



Obrázek 4.10

Reakční směs po PCR obsahující syntetizovaný modS1 a wtS2 separovaná elektroforézou na 1,5% gelu

Vzorky aplikované na agarosovou elektroforézu zleva: 3x tentýž vzorek amplifikovaného modS1 (793 pb); DNA-marker (970 / 750 / 595 + 544 / 447 / / 305 / 293 / 194 / 155 pb); 3x tentýž vzorek amplifikovaného wtS2 (794 pb).

4.1.3 ***Purifikace syntonů a jejich vložení do plasmidu pUC19, amplifikace vektoru***

Všechny čtyři syntony, které byly syntetizovány pomocí PCR, byly po separaci pomocí agarosové elektroforézy se SYBR SafeTM (Obr. 4.10) izolovány z gelu.

Následně byly dvojím štěpením s EcoRI a HindIII endonukleasou vytvořeny „lepivé konce“ u syntonů izolovaných z gelu a plasmidu pUC19. Směs byla nanášena na elektroforézu za účelem odstranění nadbytečných odštěpených fragmentů. Pro určení mobility dsDNA v závislosti na délce řetězce byl použit λ /EcoRI + HindIII marker (564 – 21.226 pb). Proužek obsahující štěpený pUC19 (2.635 pb) se nacházel mezi proužkem λ -markeru odpovídajícím fragmentu 2.027 pb a proužkem tvořeným pravděpodobně nerozdělenými fragmenty o délce 3.530 až 5.148 pb. Proužky obsahující štěpené syntony se nacházely mezi dvěma nejkratšími fragmenty markeru (831 a 564 pb), wtS1 byl ve stejné rovině jako proužek o 831 pb. Všechny syntony a pUC19 byly po purifikaci z gelu podrobeny působení ligasy a poté byly celé inkubační směsi použity pro transformaci buněk DH5 α .

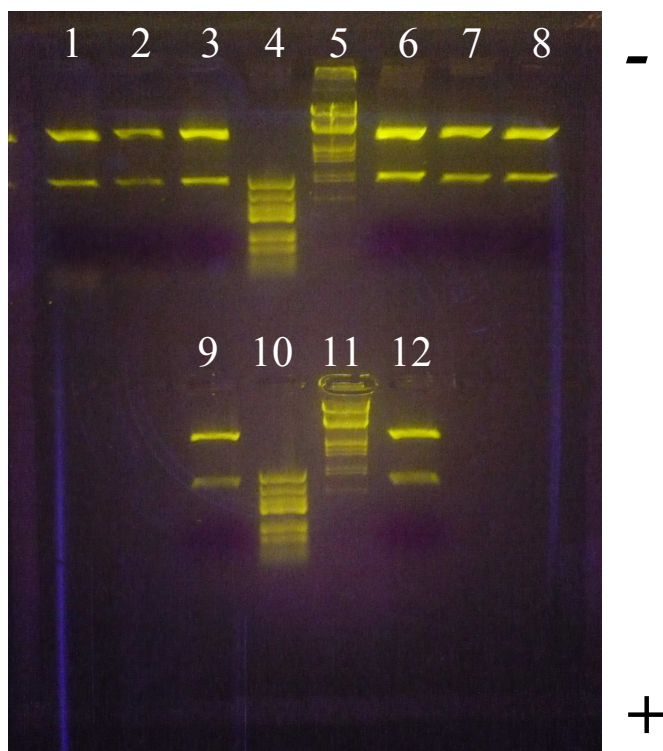
Byla také udělána kontrolní transformace buněk samotným pUC19, aby se zjistilo, zda je pUC19 opravdu dobře naštěpen pro vložení DNA. Na kontrolní plotně nevyrostla žádná kolonie a proto se můžeme domnívat, že pUC19 byl vskutku správně naštěpen.

Transformace buněk DH5 α připravenými vektory byla úspěšná: na selektivním médiu bylo vidět velké množství vzniklých kolonií. Vybrané kolonie byly jednotlivě přeočkovány a z přes noc narostlé kultury byla izolována amplifikovaná plasmidová DNA za použití kitu „*JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit*“.

4.1.4 **Kontrolní restriční štěpení *EcoRI* a *HindIII* endonukleasami a sekvenční analýza plasmidové DNA**

Pro kontrolu, že plasmidová DNA izolovaná z jednotlivých klonů buněk obsahuje synton 1 či 2, bylo využito restričních endonukleas *EcoRI* a *HindIII*. Tímto kontrolním restričním štěpením se zjistilo, zda byl daný segment DNA (synton) opravdu vložen do plasmidu.

Výsledek kontrolního štěpení připravených vektorů byl zjišťován pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 4.11). Na identifikaci fragmentů pUC19 a všech čtyř syntonů byly použity dva DNA standardy, DNA marker (155 – 970 pb) a λ /*EcoRI* + *HindIII* marker (564 – 21.226 pb). U většiny testovaných klonů byla (stejně jako na Obr. 4.11) přítomnost inzertu o odpovídající elektroforetické mobilitě potvrzena.



Obrázek 4.11

Analýza reakční směsi po kontrolním štěpení připravených vektorů s *EcoRI* a *HindIII* endonukleasami elektroforézou na 1,5% gelu

V dráze 1 a 2 jsou dva různé klony vektoru s modS1 (793 pb); v dráze 3 a 6 jsou dva různé klony s wtS2 (794 pb); v dráze 4 a 10 je DNA-marker (155 – 970 pb); v dráze 5 a 11 je λ -marker (21.226 / 5.148 + 4.973 / 4.268 / 3.530 // 2.027 / 1.904 / 1.584 / 1.375 // 947 / 831 // 564 pb); v dráze 7 a 8 jsou dva různé klony s wtS1 (831 pb); v dráze 9 a 12 jsou dva různé klony s modS2 (791 pb). Fragment pUC19 odpovídá 2.635 pb.

U vzorků pDNA obsahujících inzert byla následně spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota DNA (viz Tab. 4.1).

Tabulka 4.1

Příklad určení čistoty a koncentrace vzorků pDNA

Vzorky byly před měřením ředěny 100x. Výsledná koncentrace vzorků je již přepočítána na neředěný vzorek.

<i>pDNA</i>	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	$c(pDNA)$ [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
modS1/1	0,0136*	0,0178	0,0131	0,0069	1,76	54,9
wtS2/1	0,0077*	0,0105	0,0059	0,0009	1,92	48,0
wtS1/1	0,0104*	0,0156	0,0088	0,0012	1,89	72,1
modS2/1	0,0100	0,0162	0,0096	0,0021	1,88	70,6

* místo A_{230} byla použita vlnová délka minima, tj. A_{235}

Správnost sekvence vložených syntonů byla ověřena pomocí sekvenační analýzy dané pDNA, která byla provedena Centrem servisních laboratoří biologické sekce Přírodovědecké Fakulty Univerzity Karlovy. Na sekvenaci byly odeslány vzorky o dostatečné čistotě, tj. u nichž poměr A_{260}/A_{280} (s korekcí na pozadí) byl větší/roven než 1,8.

Sekvence byla provedena jak ve směru „*forward*“, tedy za použití primeru „M13F-21“ rozeznávajícího na plasmidu pUC19 5'-terminální oblast LacZ genu, tak z druhé strany „*reverse*“ (použit primer „M13R“). Sekvence určité pDNA byla porovnávána s původní pomocí programu ClustalW. Když byla sekvence ve směru „*forward*“ správná, byl odeslán další vzorek stejné pDNA na sekvenaci z druhé strany pro potvrzení správnosti celé sekvence. Na sekvenační analýzu bylo odesláno přibližně 100 vzorků, než byly získány všechny čtyři ověřené sekvence daných syntonů.

Na základě této analýzy byly nalezeny vzorky plasmidu obsahující wtS1, wtS2 resp. modS2 bez mutace, inserce či delece ve vložené sekvenci DNA. Vzorek modS1 vybraný pro další experimenty obsahoval jednu bodovou mutaci (12G>A), která ovšem nemění aminokyselinové složení výsledného proteinu.

Všechny čtyři vektory vybrané pro použití v následujících experimentech byly amplifikovány v buňkách DH5 α (2 μl pDNA na 100 μl buněk) a izolovány pomocí kitu „*JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit*“.

4.1.5 *Vyštěpení syntonů z klonovacího plasmidu pUC19 a jejich vložení do expresního plasmidu pET-22b*

Abychom mohli spojit syntony dohromady a vytvořit expresní vektor obsahující kompletní gen, muselo být nejdříve provedeno „vyjmutí“ inzertů z klonovacího plasmidu pUC19 a štěpení expresního plasmidu pET-22b pomocí zvolených restričních endonukleas, tj. NdeI a BclI na vyštěpení syntonu 1, XhoI a BclI v případě syntonu 2 a XhoI a NdeI na štěpení plasmidu pET-22b. Všechny reakční směsi po dvojím štěpení byly naneseny na elektroforézu za účelem odstranění nadbytečných odštěpených fragmentů. Pro určení mobility DNA v závislosti na délce řetězce byl použit 2-Log DNA marker (100 – 10.000 pb).

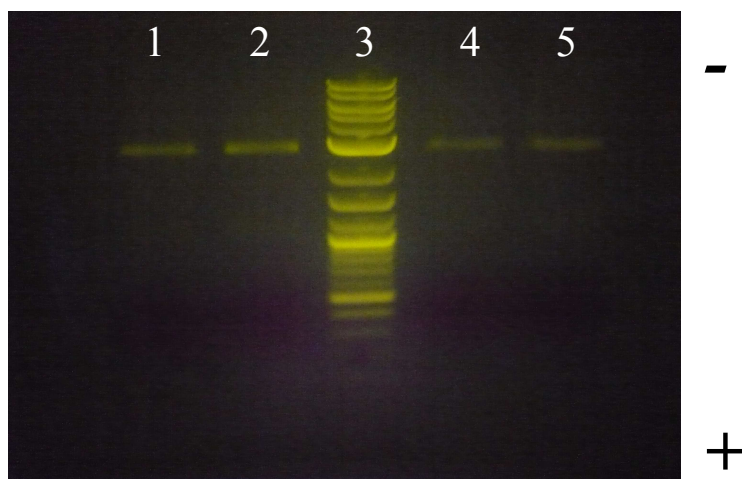
Zatímco štěpení plasmidu pET-22b probíhalo správně, při prvotních pokusech se nedařilo restričním štěpením „vyjmout“ ani jeden ze syntonů. Plasmid pUC19 a jednotlivé syntony zůstaly spojeny v jeden dlouhý fragment (kolem 4.000 pb). U následujících pokusů byl proto změněn pracovní postup pro restriční štěpení tak, že byla prodloužena inkubační doba (až 20 hodin) a bylo zvýšeno množství enzymů v reakční směsi. Též byly provedeny experimenty pouze s jednou endonukleasou, aby bylo zjištěno, které enzymy jsou aktivní. Bylo prokázáno, že enzymy NdeI a XhoI štěpí danou sekvenci správně, ale endonukleasa BclI v daných sekvencích neštěpí. Důvodem inhibice aktivity BclI bylo zřejmě to, že v buňkách *E. coli* DH5 α dochází k methylovaní DNA vláknem, aby bylo zajištěno jeho ochránění proti degradaci.^[102] K methylovaní DNA dochází v sekvenci GATC, která je i součástí restričního místa pro BclI endonukleasu (TGATCA), a proto je tato restriční endonukleasa blokována. Tudiž byly na další experimenty použity buňky *E. coli*, které nemethylují DNA, tj. jsou dam^- („DNA adenine methylase“ negativní).

Plasmidová DNA nesoucí správnou sekvenci DNA (pro každý synton) byla tedy amplifikována v *E. coli* dam^-/dcm^- buňkách (2 μ l pDNA na 100 μ l buněk), izolována pomocí kitu „JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit“ a podrobena restričnímu štěpení za účelem „vyjmutí“ syntonů (viz výše). Z důvodu zviditelnění fragmentů pUC19 a všech čtyř syntonů byla doba elektroforézy zkrácena na 30 minut a byl použit 1,5% agarosový gel. Po elektroforetickém rozdělení reakční směsi již byly detekovány fragmenty DNA mobilitou odpovídající správně naštěpeným syntonům a pUC19 (tj. srovnatelný výsledek jako Obr. 4.11 na straně 65).

Po izolaci dsDNA z agarosového gelu, kde se již nacházela „lepivá místa“ pro spojení dvou syntonů a plasmidu pET-22b dohromady, byla provedena ligace syntonů wtS1 a wtS2, wtS1 a modS2, modS1 a wtS2 resp. modS1 a modS2 do expresního plasmidu pET-22b. Pro rekonstrukci celého genu *wt1A1(His)* resp. *mod1A1(His)* bylo vždy smíseno 2x 15,5 µl naštěpeného syntonu 1 resp. 2, 4 µl naštěpeného expresního plasmidu pET-22b, 4 µl pufru pro T4 DNA ligasu a 1 µl T4 DNA ligasy; ligace probíhala po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Ligační směs (40 µl) byla použita pro transformaci buněk DH5α tepelným šokem. Po vysetí buněk na agarové plotny byly vzniklé kolonie druhý den sterilně přeočkovány do LB media a následující den byla izolovaná pDNA pomocí kitu „JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit“.

S izolovanou pDNA bylo provedeno kontrolní restriční štěpení s XhoI a NdeI endonukleasami, zda se v expresním plasmidu pET-22b nalézá odpovídající gen kódující CYP1A1. U kontrolního štěpení restričními endonukleasami bylo však zjištěno, že proužky detekované na agarosovém gelu (Obr. 4.12) svou mobilitou neodpovídají očekávané velikosti DNA, tj. u expresního plasmidu pET-22b 5.363 pb, u modifikací genu pro CYP1A1 kolem 1.550 pb. Pro určení délky fragmentů byl použit 2-Log DNA marker (100 – 10.000 pb). Na Obrázku 4.12 jsou pouze vidět fragmenty, které mobilitou odpovídají fragmentu markeru o délce 3.001 pb. Na agarosovém gelu byly též detekovány fragmenty, které odpovídaly velikosti 1.000 pb, ale na pořízeném snímku (Obr. 4.12) nejsou tyto fragmenty rozpoznatelné.

K získání expresních vektorů pro všechny 4 modifikace CYP1A1 a tedy i fragmentů o správné velikosti po kontrolním štěpení pDNA bylo proto zopakováno restriční štěpení plasmidu pET-22b a všech čtyř syntonů, ligace a následná transformace buněk DH5α. Po několika neúspěšných experimentech bylo rozhodnuto, že budou změněny podmínky ligace. Nejprve byly smíseny pET-22b (4 µl), synton 1 a synton 2 (po 15 µl). Směs byla inkubována 5 minut při 45 °C a následně byla ponechána 3 minuty na ledu (tímto způsobem dochází k rozrušení nežádoucích vazeb mezi komplementárními konci ^[86]). Dále byl ke směsi přidán pufr pro T4 DNA ligasu a T4 DNA ligasa ve dvojnásobném množství oproti původním podmínkám (tj. 2 µl). Vlastní ligace pak probíhala přes noc při 16 °C.



Obrázek 4.12

Elektroforetické rozdělení fragmentů pDNA („pET-22b.CYP1A1“) ukazující „nesprávné“ velikosti fragmentů DNA po kontrolním štěpení s XhoI a NdeI endonukleasou

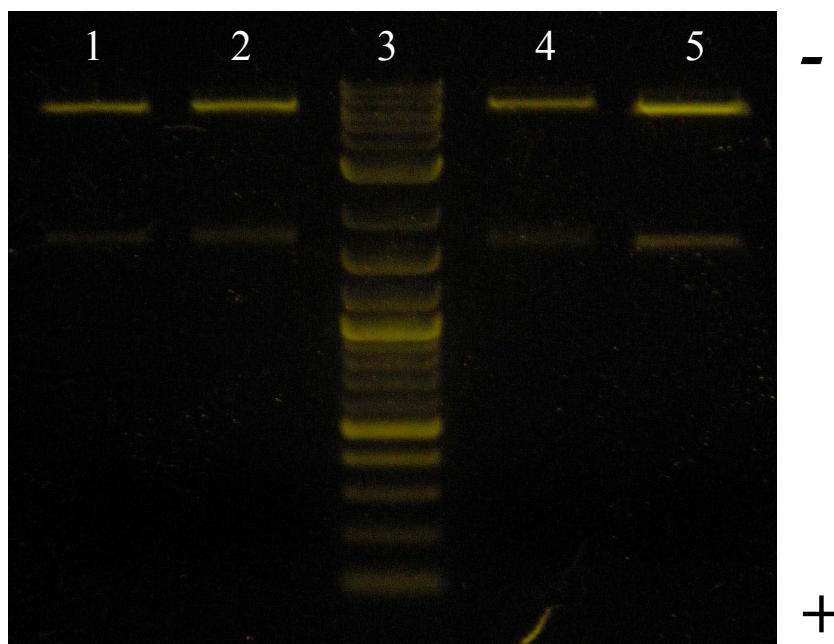
V dráze 1 se nachází klon vektoru s wt1A1, v dráze 2 klon vektoru s mod1A1, v dráze 3 2-Log DNA marker (10.002 / 8.001 / 6.001 / 5.001 / 4.000 / 3.001 / 2.017 / 1.517 / 1.200 / 1.000 / 900 / 800 / 700 / 600 / 517 + 500 / 400 / 300 / 200 / 100 pb), v dráze 4 klon vektoru s wt1A1.His a v dráze 5 klon vektoru s mod1A1.His. Elektroforéza probíhala 45 minut a byl použit 1% gel.

Po transformaci buněk DH5 α tepelným šokem a navazující amplifikaci buněk byly vzniklé kolonie na agarových plotnách sterilně přeočkovány do LB media a následující den byla izolovaná od všech čtyř vektorů pDNA pomocí kitu „JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit“.

Izolovaná pDNA byla štěpena restrikními endonukleasami XhoI a NdeI a na výsledném agarosovém gelu (Obr. 4.13) již byly vidět fragmenty o očekávané velikosti, tj. naštěpený plasmid pET-22b (5.363 pb) a fragmenty obsahující všechny čtyři modifikace genu pro CYP1A1, tj. sekvenci kódující nemodifikovaný CYP1A1 (wt1A1, 1.575 pb), sekvenci kódující CYP1A1 s modifikovanou N-terminální kotvou (mod1A1, 1.537 pb), sekvenci kódující CYP1A1 bez STOP kodonu (wt1A1.His, 1.572 pb), sekvenci kódující CYP1A1 s modifikovanou N-terminální kotvou a bez STOP kodonu (mod1A1.His, 1.534 pb) (Obr. 4.13).

Vysvětlení proč byla ligace při laboratorní teplotě neúspěšná není zcela jasné. Mezi oběma syntony a plasmidem pET-22b mohlo docházet k nesespecifickému spojení, jelikož spojení tří fragmentů specificky dohromady je daleko obtížnější reakce než propojení pouze dvou fragmentů, jako například ligace syntonu 1 či 2 do plasmidu pUC19. Nižší teplota zřejmě přispěla ke specifitější reakci mezi „lepivými místy“ na syntonech a plasmidu pET-22b.

Po ověření kontrolním štěpením, že daná modifikace genu je přítomna v expresním plasmidu pET-22b, byly všechny čtyři vektory amplifikovány v buňkách DH5 α (2 μ l pDNA na 100 μ l buněk) a izolovány pomocí kitu „GenElute™ Plasmid Midiprep Kit“. U jednotlivých vzorků izolované pDNA byla následně určena koncentrace DNA (viz Tab. 4.2).



Obrázek 4.13

Elektroforetické rozdělení fragmentů pET-22b.CYP1A1 po kontrolním štěpení s XhoI a NdeI endonukleasou

Elektroforéza trvala 45 minut a byl použit 1% gel. Klon vektoru pET-22b.wt1A1 (dráha 1), klon vektoru pET-22b.wt1A1.His (dráha 2), 2-Log DNA marker (100 – 10.000 pb) (dráha 3), klon vektoru pET-22b.mod1A1 (dráha 4) a klon vektoru s pET-22b.mod1A1.His (dráha 5).

Tabulka 4.2

Určení koncentrace pDNA ve finálních preparátech expresních vektorů pro 4 modifikace potkaního CYP1A1

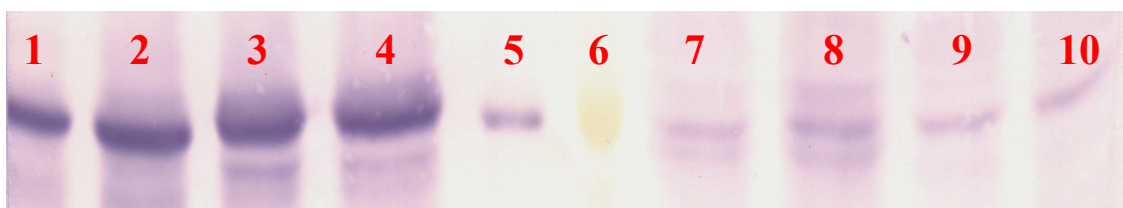
Vzorky byly před měřením ředěny 100x. Výsledná koncentrace vzorků je již přepočítána na neředěný vzorek.

<i>pDNA</i>	A_{235}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$c(pDNA)$ [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
wt1A1	0,0078	0,0110	0,0066	0,0006	52,0
wt1A1.His	0,0076	0,0108	0,0066	0,0009	49,5
mod1A1	0,0106	0,0144	0,0088	0,0012	66,0
mod1A1.His	0,0126	0,0166	0,0114	0,0038	64,2

4.2 Optimalizace exprese wt1A1(.His) a mod1A1(.His)

Pro testování exprese *CYP1A1* pomocí vektorů pET22b.wt1A1(.His) resp. pET22b.mod1A1(.His) byly zvoleny tři kmeny buněk *E. coli* BL-21 (DE3), a to GOLD, RIL a RIPL. Všechny čtyři vektory nesoucí různé modifikace genu pro CYP1A1 byly nejdříve amplifikovány v těchto expresních buňkách (2 μ l pDNA na 100 μ l buněk), transformace buněk byla provedena tepelným šokem při 42 °C po dobu 45 sekund. Po vysetí buněk na agarové plotny byly druhý den vzniklé kolonie jednotlivě a sterilně přeočkovány, přes noc narostlá kultura (150 μ l) byla zaočkována do LB media (10 ml) a při dosažení OD₆₀₀ kolem 1 byla iniciovaná exprese *CYP1A1* pomocí 0,5mM IPTG, současně byla přidána 0,5mM ALA. Byla sledována produkce ve všech 3 kmenech buněk *E. coli* při 18, 27 a 37 °C po dobu 24 hodin.

Pro vizualizaci produkce všech 4 modifikací CYP1A1 byla použita metoda SDS elektroforézy. Ale vzhledem k tomu, že CYP1A1 nebyl v buňkách *E. coli* obsažen jako majoritní protein, byla pro identifikaci CYP1A1 použita metoda „Western blotting“ (Obr. 4.14). Poloha proužku obsahujícího CYP1A1 (59 kDa) byla vedle samotného rozpoznání specifickou protilátkou určena také na základě mobility standardu supersomálního potkaního CYP1A1 a za pomoci „Multicolor Broad Range Protein“ markeru (10 – 260 kDa) – modifikace CYP1A1 svou mobilitou přibližně odpovídaly proužku markeru o velikosti 50 kDa (zelený proužek).



Obrázek 4.14

Porovnání produkce wt1A1, wt1A1.His, mod1A1 a mod1A1.His v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD při 18 °C po indukci 0,5mM IPTG při OD₆₀₀ kolem 1

Na SDS elektroforézu byly nanášeny vzorky ředěné na stejnou OD₆₀₀ (12 μ l / jamku). Obsah CYP1A1 byl detekován metodou „Western blotting“ s využitím primární králičí polyklonální protilátky. V dráze 1 a 2 se nalézají wt1A1, v dráze 3 a 4 wt1A1.His, v dráze 5 je supersomální standard potkaního CYP1A1 (8 μ l), v dráze 6 „Multicolor Broad Range Protein“ marker (7 μ l) (10 – 260 kDa), v dráze 7 a 8 se nachází mod1A1 a v dráze 9 a 10 mod1A1.His. V dráhách 1, 3, 7 a 9 jsou vzorky po 8 hodinách od indukce a v dráhách 2, 4, 8 a 10 jsou vzorky po 24 hodinách od indukce.

Při identifikaci CYP1A1 pomocí metody „*Western blotting*“ byly testovány dva typy primárních polyklonálních protilátek, slepičí a králičí. Králičí protilátka vykazovala mnohem větší specifitu vůči CYP1A1 než protilátka slepičí, proto byly následující pokusy již prováděny pouze s primární králičí polyklonální protilátkou.

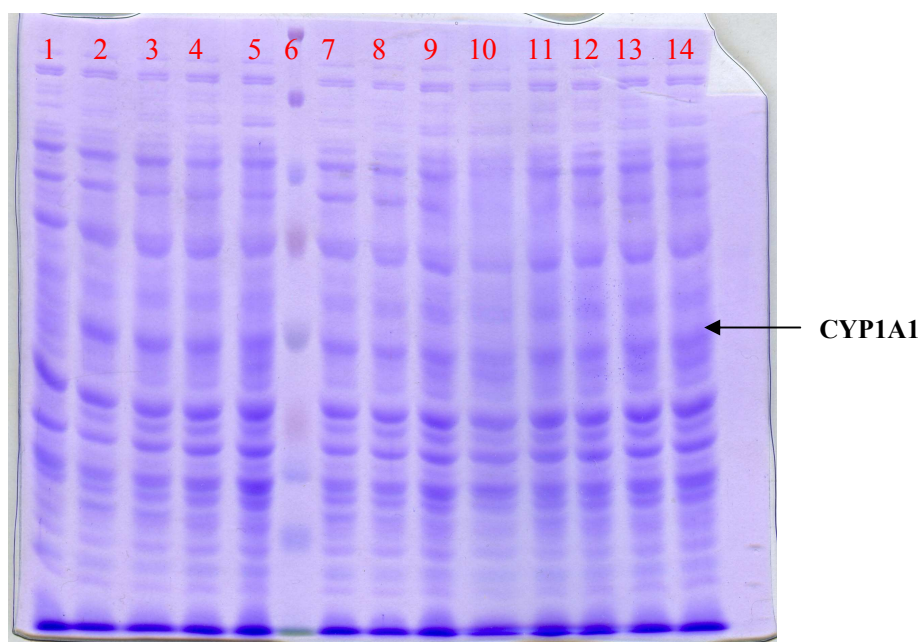
Ve všech 3 kmenech buněk *E. coli* BL-21 (DE3) docházelo ke stejnému stupni exprese odpovídajících modifikací *CYP1A1*. Ovšem na Obrázku 4.14 je zcela očividné, že exprese *mod1A1* a *mod1A1.His* není zdaleka tak velká jako u *wt1A1* a *wt1A1.His*. Můžeme tedy říci, že modifikace N-terminálního konce CYP1A1 v tomto expresním systému nezajišťuje jeho větší expresi než v případě nativní sekvence (wt).

Produkcí při 37 i 27 °C zdaleka nebylo dosaženo takové exprese jako v případě produkce při 18 °C (Obrázek neuveden). Na základě tohoto výsledku a současně také proto, že se obecně předpokládá, že nižší teplota produkce způsobuje pomalejší syntézu proteinu a umožňuje tím jeho lepší skládání (tzv. *foldi*ng), bylo rozhodnuto, že v dalších experimentech produkce bude probíhat pouze při teplotě 18 °C po dobu 24 hodin.

V dalším kroku byl sledován vliv OD_{600} (0,4; 0,6 a 0,8) a současně také koncentrace IPTG (0,1; 0,2; 0,5 či 1mM) při indukci na expresi všech modifikací *CYP1A1* ve všech 3 kmenech buněk *E. coli*. Pomocí SDS elektroforézy bylo potvrzeno, že největší stupeň exprese *wt1A1.His* byl u všech tří kmenů buněk *E. coli* BL-21 (DE3) po 24 hodinách produkce iniciované při OD_{600} cca 0,4 (např. pro *wt1A1.His*, viz Obr. 4.15). U indukce při vyšších hodnotách OD_{600} byl znatelný pokles produkce proteinu (Obr. 4.15). V případě *mod1A1* a *mod1A1.His* opět nebyla exprese téměř detekovatelná.

Konečná koncentrace IPTG použitého při indukci (0,1; 0,2; 0,5 či 1mM) neměla téměř žádný vliv na výslednou expresi *CYP1A1* (Obrázek neuveden).

Z dosažených výsledků tedy vycházelo, že z hlediska množství produkovaného *wt1A1.His* ve všech kmenech buněk *E. coli* byly optimální podmínky následující: produkce při 18 °C po dobu 24 hodin iniciovaná IPTG (koncentrace nemá vliv) při dosažení OD_{600} cca 0,4. V případě *mod1A1.His* bylo množství produkovaného proteinu ve všech experimentech na hranici detekovatelnosti, proto byly nadále používány i pro jeho produkci optimální podmínky nalezené pro produkci *wt1A1.His*.



Obrázek 4.15

Vliv OD_{600} při indukci 0,5mM IPTG na produkci wt1A1.His v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD

Na SDS elektroforézu byly nanášeny vzorky ředěné na stejnou OD_{600} (12 μ l / jamku). V dráze 1 se nachází vzorek před indukcí, v drahách 2 – 5 jsou vzorky indukované při OD_{600} kolem 0,4; v dráze 6 je „Multicolor Broad Range Protein“ marker (7 μ l) (~260 / ~140 / ~100 / ~70 / ~50 / ~40 / ~35 / ~25 / ~15 / ~10 kDa), v drahách 7 – 10 jsou vzorky indukované při OD_{600} kolem 0,6 a v drahách 11 – 14 kolem 0,8. V drahách 2, 7, 11 jsou vzorky po 8 hodinách od indukce, v drahách 3, 8, 12 po 24 hodinách od indukce, v drahách 4, 9, 13 po 34 hodinách od indukce a v drahách 5, 10, 14 po 48 hodinách od indukce. Produkce probíhala při 18 °C.

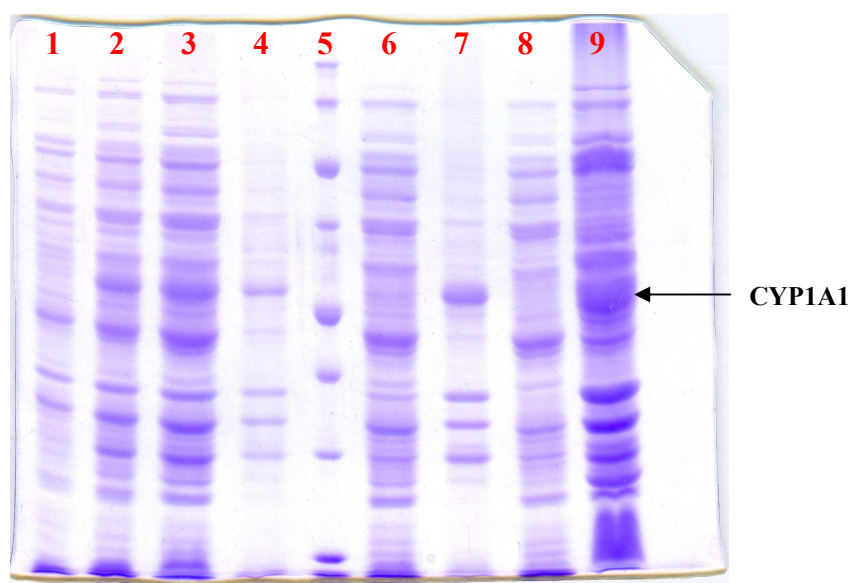
4.2.1 Sledování inkorporace rekombinantních CYP1A1 do membrán expresních buněk při různých podmínkách produkce

Jelikož CYP1A1 je membránový protein, předpokládali jsme, že je produkován do membrán *E. coli*. Pro získání dostatečného množství vzorku membránové frakce pro určení koncentrace, stupně exprese a aktivity všech modifikací genu pro CYP1A1 v membránách *E. coli* bylo nutno produkovat CYP1A1 ve větším množství. Proto byly použity výše uvedené optimální podmínky, tj. indukce při dosažení OD_{600} kolem hodnoty 0,4 a produkce při 18 °C po dobu 24 hodin, pro produkci ve 250 ml LB média, a to nejdříve pouze pro wt1A1 v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD. Pro indukci exprese byla zvolena 0,5mM koncentrace IPTG a zároveň byla přidána 0,5mM ALA.

K získání membránové frakce byly nejprve rozrušeny stěny buněk sonikací, pak odstraněny centrifugací nerozbité buňky, ze supernatantu opětovnou centrifugací odstraněny inkluzní tělíska a následnou ultracentrifugací jako sediment byla získána membránová frakce. Na gelu po SDS elektroforéze vzorků získaných v průběhu izolace membránové frakce (Obr. 4.16) byl zřetelně vidět velmi silný proužek, který odpovídá wt1A1 produkovanému do inkluzních tělísek (dráha 7). V supernatantu po odstředění inkluzních tělísek (dráha 6) bylo již naopak množství wt1A1 prakticky nedetekovatelné.

Při experimentech, kdy byla produkce indukována po dosažení OD_{600} kolem 0,4, byl wt1A1 do membrán *E. coli* inkorporován jen z velmi malé části. Cytochrom P450 se v membránové frakci nedařilo detekovat ani spektrofotometricky, tj. nebylo zaznamenáno absorpční maximum při 450 nm charakteristické pro komplex redukováného CYP s oxidem uhelnatým.

V následujících pokusech, když byla iniciována exprese až po dosažení OD_{600} kolem 0,9 pomocí IPTG o koncentraci 0,5mM resp. 0,1mM, bylo zjištěno, že použití vyšší OD_{600} při indukci vede ke zvýšení inkorporace wt1A1 do membrán, zatímco koncentrace IPTG na produkci wt1A1 do inkluzních tělísek nemá vliv (Obrázek neuveden).



Obrázek 4.16

Produkce wt1A1 v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD po indukci 0,5mM IPTG při dosažení OD_{600} kolem 0,4

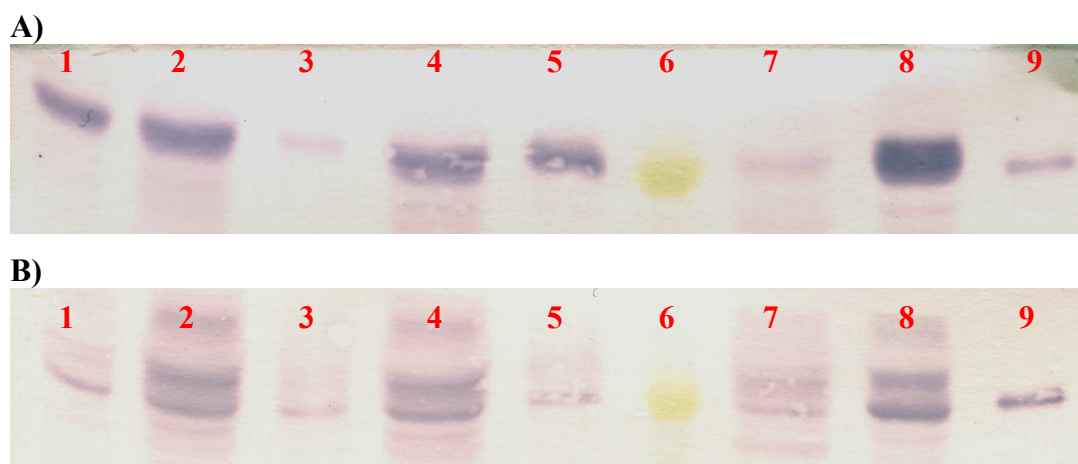
Na SDS elektroforézu byly vzorky aplikovány po 9 μ l s 3 μ l 4x konc. vzorkového pufru. Buněčná kultura před (dráha 1) a 24 hodin po indukci (dráha 2), supernatant (dráha 3) a peleta (dráha 4) po sonikaci, „Broad Range Protein“ marker (7 μ l, dráha 5) (250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa), supernatant (dráha 6) a peleta (dráha 7) po centrifugaci inkluzních tělísek, supernatant (dráha 8) a peleta (dráha 9) po ultracentrifugaci. Produkce probíhala při 18 °C po dobu 24 hodin.

V dalších experimentech proto byly změněny podmínky produkce: indukce byla provedena při vyšší OD_{600} (přibližně 0,9), konečná koncentrace IPTG byla zvolena 0,1mM. Obdobným postupem jako v jako v předcházejících experimentech pak byly izolovány membránové frakce z následujících buněčných kultur:

E. coli BL-21 (DE3) RIL – produkce všech čtyř modifikací CYP1A1

E. coli BL-21 (DE3) GOLD – produkce wt1A1

E. coli BL-21 (DE3) RIPL – produkce wt1A1.His



Obrázek 4.17

Izolace membránové frakce u wt1A1 (A) resp. mod1A1 (B) produkovaných při teplotě 18 °C v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD (A) resp. RIL (B) po indukci 0,1mM IPTG při OD_{600} kolem 0,9

Obsah CYP1A1 byl detekován metodou „*Western blotting*“ s využitím primární králičí polyklonální protilátky. Buněčná kultura po 24 hodinách od indukce (7 μ l, dráha 1), supernatant (9 μ l, dráha 2) a peleta (2 μ l, dráha 3) po sonikaci, supernatant (9 μ l, dráha 4) a peleta (2 μ l, dráha 5) po centrifugaci inkluzních tělísek, „*Multicolor Broad Range Protein*“ marker (7 μ l, dráha 6), supernatant (9 μ l, dráha 7) a peleta (2 μ l, dráha 8) po ultracentrifugaci a supersomální standard potkaního CYP1A1 (8 μ l, dráha 9). Objem v závorkách zobrazuje kolik (doředěno dest. vodou na 9 μ l) bylo přidáno k 4x konc. vzorkovému pufru před nanesením na SDS elektroforézu.

Protože produkované proteiny nebylo možno jednoznačně identifikovat pomocí SDS elektroforézy, bylo pro sledování průběhu izolace membránových frakcí opět využito metody „*Western blotting*“. Na PVDF membránách u wt1A1 (Obr. 4.17 A) produkovaný v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD a mod1A1 (Obr. 4.17 B) produkovaný v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) RIL je prokazatelně vidět, že jak celkové množství produkovaného proteinu (dráha 2) tak i jeho množství v membránové frakci (dráha 8) je mnohonásobně vyšší u wt1A1 než u mod1A1. Sice se v případě wt1A1 část proteinu nalézá v inkluzních

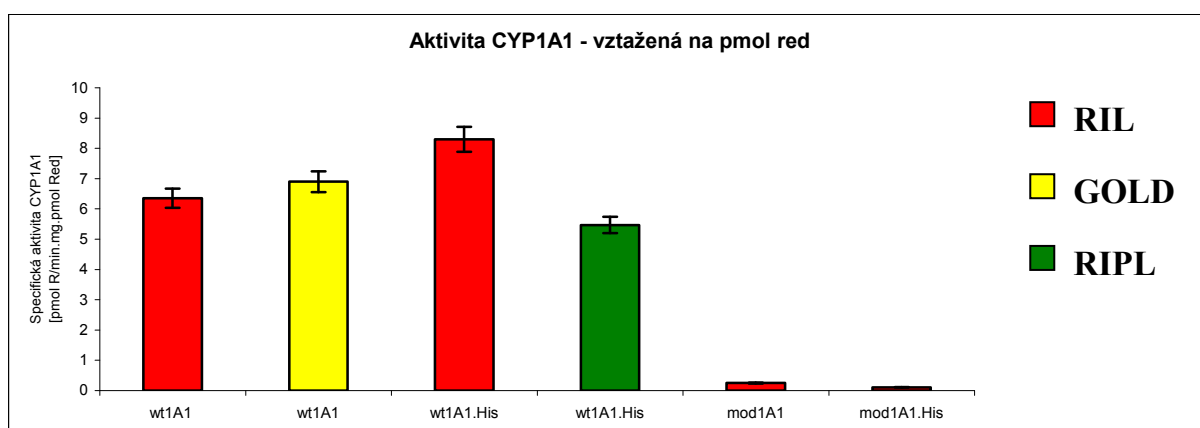
tělískách (dráha 5), ale podstatná část je lokalizovaná v membránách. K analogickému výsledku u těchto buněk došlo i při sledování produkce wt1A1.His resp. mod1A1.His.

V případě produkce v buňkách BL-21 (DE3) RIPL docházelo k malé inkorporaci sledovaného proteinu (wt1A1.His) do membrán *E. coli*. Téměř polovina proteinu byla produkována do inkluzních tělísek (Obrázek neuveden). Produkce i inkorporace wt1A1 do membrán *E. coli* v rámci buněk BL-21 (DE3) RIL byla na stejné úrovni jako v případě buněk BL-21 (DE3) GOLD (obdobný výsledek jako na Obr. 4.17 A).

U všech membránových frakcí byla následně změřena koncentrace CYP, určena koncentrace proteinů pomocí metody s bicinchoninovou kyselinou (souhrnná tabulka koncentrace proteinu ve všech izolovaných membránových frakcích je uvedena na str. 80) a stanovena EROD aktivita.

U žádné z membránových frakcí opět nebyl spektrofotometricky detekován cytochrom P450, tj nebylo zaznamenáno absorpční maximum při 450 nm charakteristické pro komplex redukováného CYP s oxidem uhelnatým. Na spektru bylo patrné pouze absorpční maximum při 420 nm (nefunkční CYP).

Stanovení EROD aktivity membránových frakcí (Graf 4.1) ukázalo, že v případě produkce wt1A1 i wt1A1.His je do membrán inkorporován aktivní enzym; nejvyšší specifická aktivita byla stanovena u wt1A1.His produkovaného v buňkách BL-21 (DE3) RIL (>> RIPL) a následně u wt1A1 produkovaného kmenem GOLD (> RIL). Aktivita mod1A1 a mod1A1.His (produkovaných kmenem RIL) byla na hranici detekovatelnosti (Graf 4.1).



Graf 4.1

Porovnání EROD aktivity CYP1A1 v membránách *E. coli* po produkci v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) kmenů GOLD, RIL a RIPL. Produkce jednotlivých modifikací CYP1A1 probíhala 24 hodin při teplotě 18 °C po indukci 0,1mM IPTG při OD₆₀₀ kolem 0,9.

4.2.2 Optimalizace produkce wt1A1 kmenem GOLD s ohledem na enzymovou aktivitu CYP1A1 v membránové frakci

Bylo rozhodnuto, že další optimalizace budou prozatím zaměřeny na produkci wt1A1. Pro produkce byl na základě předchozích experimentů zvolen kmen *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD.

Jelikož bylo potvrzeno, že při indukci 0,1mM IPTG po dosažení OD₆₀₀ kolem 0,9 jsou produkované CYP1A1 inkorporovány i do membrán *E. coli* a neprodukují se jen do inkluzních tělísek (Obr. 4.17 A a 4.17 B), byl zjednodušen postup při izolaci membránové frakce, a sice odstraněním nerozbitých buněk a inkluzních tělísek z buněčného lyzátu během jedné centrifugace.

Předpokládali jsme, že tvorba hemu je při 18 °C velmi pomalá, inkorporace hemu do struktury CYP by tudíž mohla být kritickým krokem pro tvorbu aktivního enzymu. V následujících experimentech bylo proto testováno přidávání ALA do buněčné kultury ještě před indukci. Byly provedeny tři paralelní produkce wt1A1 při 18 °C po dobu 20 hodin, kde byla ALA přidána v době indukce, 30 minut nebo 60 minut před indukci. Dle zabarvení kultury při indukci bylo možné usuzovat, že při inkubaci za teploty 37 °C byl opravdu syntetizován hem do LB média. Ze všech tří buněčných kultur byla zmiňovaným zjednodušeným způsobem izolována membránová frakce, určena EROD aktivita a zjišťována koncentrace CYP.

Stanovení CYP opět nevedlo k detekci P450, byl pouze detekován P420. Výsledná EROD aktivita v rámci těchto tří paralelních produkcí byla tím vyšší, čím byla ALA přidána dříve před indukci, avšak pouze statisticky nevýznamně.

Další experimentální produkce wt1A1 byly proto realizovány při vyšších teplotách a zároveň ALA byla přidána před indukci, aby byla zajištěna dostatečná kapacita syntézy hemu.

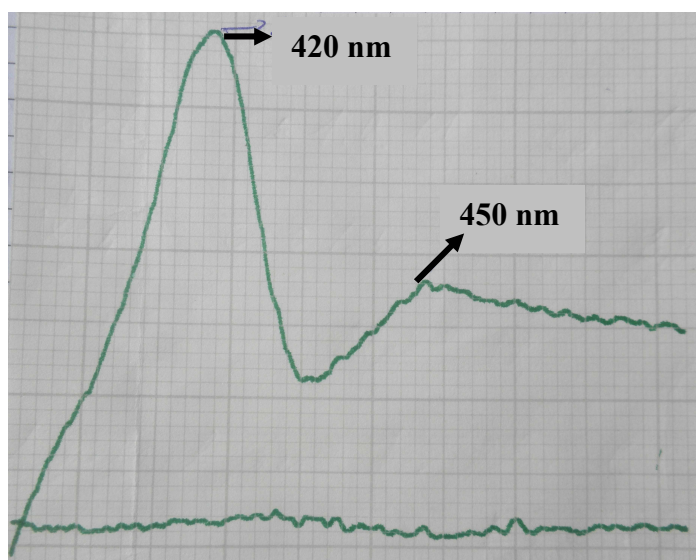
Byla vyzkoušena produkce wt1A1 při 27 °C (po dobu 24 hodin, ALA přidána 60 minut před indukci). U izolované membránové frakce bylo měřeno diferenční spektrum CYP. Na spektru bylo pozorováno výrazné maximum absorbance při 420 nm, ale při 450 nm se neobjevil ani malý „pík“. Zřejmě většina CYP byla nefunkční. Potvrzovala to i EROD aktivita membránové frakce, která byla velmi nízká (Graf 4.2 na str. 81).

Z tohoto i předchozích experimentů (Kap. 4.2) jsme usoudili, že při vyšší teplotě je nutno zkrátit dobu produkce, protože zřejmě dochází k rychlejší syntéze proteinu a po určité časové době zase k jeho degradaci.

Pro následující produkce wt1A1 byla testována teplota 24 a 22 °C a doba produkce byla 12, 13 nebo 15 hodin. Produkce při 24 °C probíhala 13 hodin (ALA byla přidána 60 minut před indukcí), při 22 °C 12 hodin (ALA přidána 150 minut před indukcí) nebo 15 hodin (ALA přidána 120 minut před indukcí).

Stanovení CYP v membránových frakcích ze všech tří produkcí opět vedlo k detekci P420, u obou membránových frakcí získaných z produkce wt1A1 při 22 °C bylo však na diferenčním spektru patrné i maximum při 450 nm charakteristické pro nativní (funkční) cytochrom P450 (Obr. 4.18). Díky tomu bylo možné určit koncentraci CYP v těchto membránových frakcích: 1,6 μ M (12h produkce při 22 °C) resp. 1,9 μ M (15h produkce při 22 °C).

Stanovení EROD aktivity membránových frakcí vedlo ke zjištění, že wt1A1 produkovaný při 22 °C (po dobu i 15 hodin) měl výrazně vyšší aktivitu oproti produkci při vyšších (24 °C resp. 27 °C) i nižších (18 °C) teplotách (Graf 4.2).



Obrázek 4.18

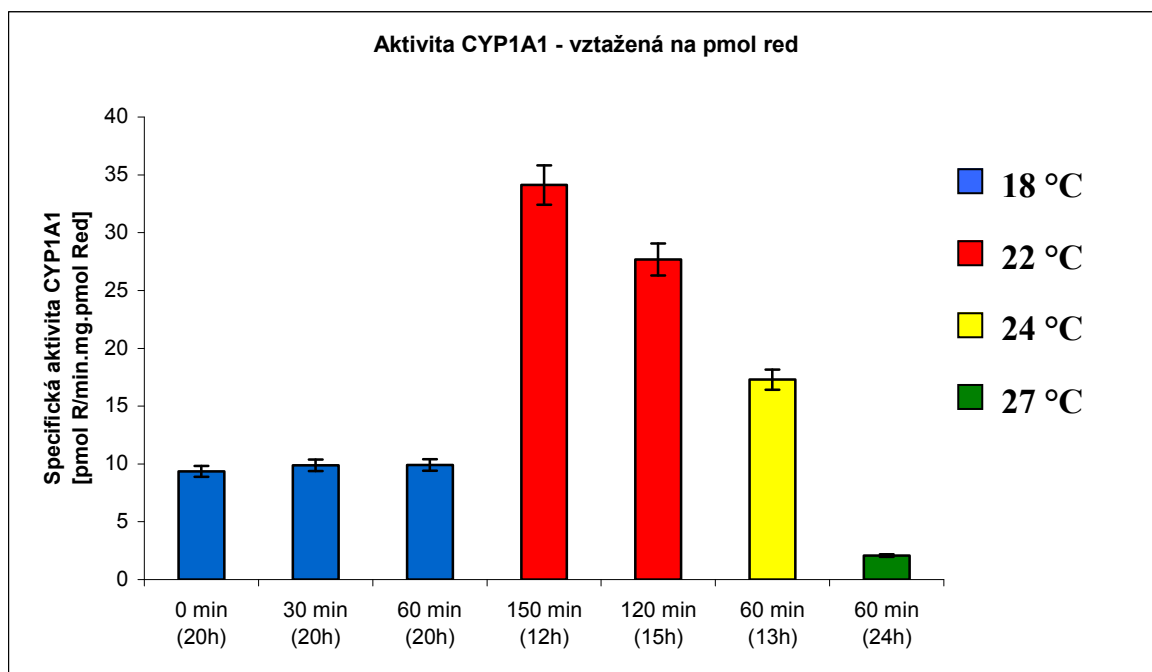
Diferenční spektrum redukováného wt1A1 v komplexu s oxidem uhelnatým

wt1A1 produkovaný v membránách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD při 22 °C po dobu 15 hodin. Dole na obrázku se nachází „baseline“ a „píky“ znázorňují absorpční maxima při 420 resp. 450 nm. Rozsah vlnočtu odpovídá rozsahu vlnových délek 400 – 490 nm. Jeden dílek odpovídal 0,001 absorbance.

Tabulka 4.3

Souhrnná tabulka koncentrace proteinu v izolovaných membránových frakcích

<i>Produkováný protein</i>	<i>Kmen buněk E. coli BL-21 (DE3)</i>	<i>Doba produkce [h]</i>	<i>Teplota produkce [°C]</i>	<i>Přidání ALA před indukcí [min]</i>	<i>Koncentrace membránové frakce [mg/ml]</i>
wt1A1	RIL	24	18	0	11,3
mod1A1	RIL	24	18	0	16,3
wt1A1.His	RIL	24	18	0	7,0
mod1A1.His	RIL	24	18	0	14,7
wt1A1	GOLD	24	18	0	7,3
wt1A1.His	RIPL	24	18	0	11,7
wt1A1	GOLD	20	18	0	13,8
wt1A1	GOLD	20	18	30	10,6
wt1A1	GOLD	20	18	60	10,6
wt1A1	GOLD	24	27	60	22,6
wt1A1	GOLD	15	22	120	16,4
wt1A1	GOLD	13	24	60	16,4
wt1A1	GOLD	12	22	150	16,2



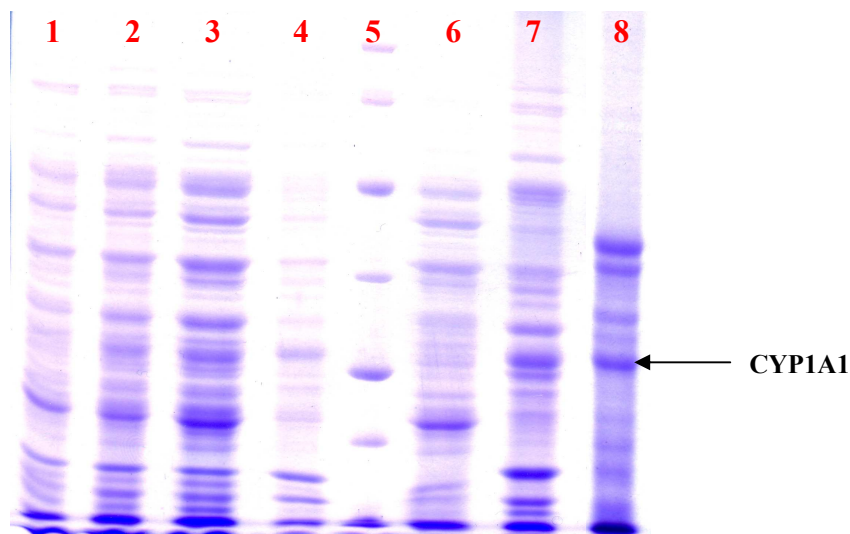
Graf 4.2

Srovnání EROD aktivity wt1A1 produkovaného v membránách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD za různých podmínek

Údaje minutách udávají čas přidání ALA před indukci a v závorkách se nalézá čas produkce. Indukce exprese 0,1mM IPTG proběhla vždy při hodnotě OD_{600} kolem 0,9.

Pomocí SDS elektroforézy (Obr. 4.19) bylo zjištěno, že během produkce při 22 °C je malá část proteinu produkována do inkluzních tělísek (dráha 4), většina wt1A1 je však inkorporována do membrán (dráha 7).

Nejvyšší produkce a aktivity wt1A1 v membránách kmene GOLD bylo tedy dosaženo u inkubace při 22 °C po dobu 12 resp. 15 hodin, kdy ALA byla přidána 120 resp. 150 minut před samotnou indukcí. Zdá se, že přidání ALA do buněčné kultury ještě před indukcí přispívá společně s produkcí proteinu při vyšší teplotě k tvorbě enzymově aktivního proteinu.



Obrázek 4.19

Izolace membránové frakce u wt1A1, který byl produkován při 22 °C po dobu 15 hodin

Na SDS elektroforézu byly vzorky aplikovány po 9 μ l s 3 μ l 4x konc. vzorkového pufru. Buněčná kultura před (9 μ l, dráha 1) a 15 hodin (6,6 μ l, dráha 2) od indukce, supernatant (9 μ l, dráha 3) a peleta (2 μ l, dráha 4) po centrifugaci inkluzních tělísek a nerozbitých buněk, „Broad Range Protein“ marker (7 μ l, dráha 5) (250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa), supernatant (9 μ l, dráha 6) a peleta (2 μ l, dráha 7) po ultracentrifugaci a supersomální potkaní CYP1A1 rekonstituovaný s reduktasou (8 μ l, dráha 8). Objem v závorkách zobrazuje kolik (doředěno dest. vodou na 9 μ l) bylo přidáno k 4x konc. vzorkovému pufru.

4.2.3 Optimalizace solubilizace

Cílem v další fázi práce bylo určit, který detergent resp. směsi detergentů budou nejučinnější pro solubilizaci wt1A1, a tak dokončit celý proces optimalizace před samotnou izolací proteinu. Pracovalo se pouze s membránovými frakcemi wt1A1, které byly izolovány v rámci předchozí Kapitoly.

Po (zjednodušené) izolaci membránové frakce, a změření koncentrace proteinů v membránách *E. coli* pomocí metody s bicinchoninovou kyselinou byla započata solubilizace wt1A1 z membrán pomocí následujících detergentů vytypovaných na základě literární rešerše:

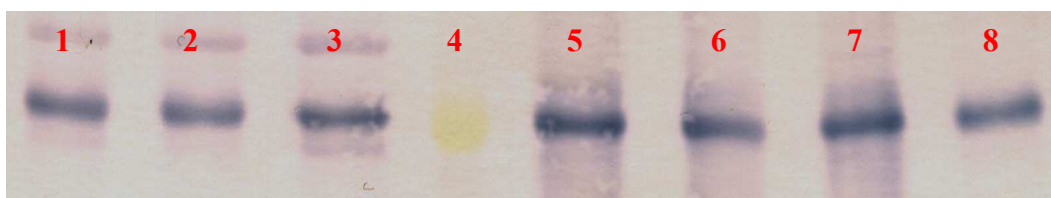
- 1% Triton X-100
- směs 0,4% Brij-35 s 0,6% cholátem sodným
- směs 0,6% Triton X-100 s 0,6% cholátem sodným
- směs 0,5% Tween 20 s 1% cholátem sodným

Účinnost detergentů byla srovnána při solubilizaci probíhající 1 hodinu (Obr. 4.20; Obr. 4.21 – dráha 1), většina wt1A1 však zůstávala inkorporována do membrán *E. coli* a proto byla doba solubilizace zvýšena na 3 hodiny (Obr. 4.21 – dráha 2, 3). Po první solubilizaci bylo z membrán solubilizováno cca 50 % proteinu (Obr. 4.20 a 4.21). Následně byla vyzkoušena druhá solubilizace, zda by se výtěžek solubilizace wt1A1 z membrán nedal zvýšit. Nicméně výtěžek po druhé solubilizaci byl zanedbatelný (Obr. neuveden).

K nejvyššímu stupni solubilizace docházelo působením 1% Triton X-100 (Obr. 4.20 – dráha 3). S takovým procentem detergentu ve směsi však hrozí, že detergent obalí celý protein a při izolaci proteinu tak znemožní jeho zachycení na koloně.

Jako nejvhodnější se tedy jeví směs 0,6% Triton X-100 s 0,6% cholátem sodným (Obr. 4.21 – dráha 1), neboť výtěžek solubilizovaného wt1A1 byl vyšší než u směsi 0,5% Tween 20 s 1% cholátem sodným (Obr. 4.21 – dráha 2) či směsi 0,4% Brij-35 s 0,6% cholátem sodným (Obr. 4.21 – dráha 3).

Též bylo vyzkoušeno, zda bude solubilizace se směsí 0,6% Triton X-100 s 0,6% cholátem sodným probíhat lépe v přítomnosti inhibitorů proteas (jestli nedochází během solubilizace k degradaci proteinu). Potvrdilo se, že s i bez přídavku inhibitorů proteas je výtěžek solubilizace stejný (Obr. neuveden).



Obrázek 4.20

Srovnání účinnosti detergentů při solubilizaci wt1A1 z membrán *E. coli* po dobu 1 hodiny

Na SDS elektroforézu byly vzorky aplikovány po 9 μ l s 3 μ l 4x konc. vzorkového pufru. Pelety byly ředěny 26x, tj. na objem supernatantu po ultracentrifugaci. Obsah CYP1A1 byl detekován metodou „Western blotting“ s využitím primární králičí polyklonální protilátky. Supernatanty (dráha 1, 2, 3) a pelety (dráha 5, 6, 7) po solubilizaci s využitím směsi 0,6% Triton X-100 s 0,6% cholátem sodným (dráha 1, 5); směsi 0,5% Tween 20 s 1% cholátem sodným (dráha 2, 6); a 1% Triton X-100 (dráha 3, 7); „Multicolor Broad Range Protein“ marker (7 μ l, dráha 4); supersomální standard potkaního CYP1A1 (8 μ l, dráha 8).



Obrázek 4.21

Srovnání účinnosti solubilizace wt1A1 z membrán *E. coli* po dobu 1 a 3 hodin

Na SDS elektroforézu byly vzorky aplikovány po 9 μ l s 3 μ l 4x konc. vzorkového pufru. Pelety byly ředěny 26x, tj. na objem supernatantu po ultracentrifugaci. Obsah CYP1A1 byl detekován metodou „*Western blotting*“ s využitím primární králičí polyklonální protilátky. Supernatant (dráhy 1, 2) a peleta (dráhy 5, 6) po solubilizaci probíhající 1 hodinu (dráhy 1, 5) resp. 3 hodiny (dráhy 2, 6) 0,6% Triton X-100 s 0,6% cholátem sodným; supernatant (dráha 3) a peleta (dráha 7) po 3 hodiny probíhající solubilizaci 0,4% (v/v) Brij-35 a 0,6% cholátem sodným; „*Multicolor Broad Range Protein*“ marker (7 μ l, dráha 4); supersomální standard potkaního CYP1A1 (8 μ l, dráha 8).

5 Závěr

V rámci předkládané práce byl navržen postup syntézy dvou sekvencí optimalizovaných pro expresi v *E. coli* kódujících potkaní *CYP1A1* („wild type“, *wt1A1*) a jeho modifikaci s pozměněnou N-terminální membránovou kotvou (*mod1A1*). Obě tyto sekvence pak byly syntetizovány ve verzi s a bez STOP kodonu, tj. v rámci vektoru pET-22b exprimované bez resp. s His kotvou (*wt1A1* resp. *wt1A1.His*, *mod1A1* resp. *mod1A1.His*). Úspěšně byly připraveny klonovací vektory pUC19 se syntony, jejichž sekvence dle sekvenační analýzy odpovídaly námi navrhovaným částem genu. Spojením syntonů a plasmidu pET-22b se následně podařilo vytvořit expresní vektory nesoucí čtyři výše uvedené sekvence.

Všechny čtyři varianty *CYP1A1* byly úspěšně exprimovány v *E. coli* BL-21 (DE3). V použitém expresním systému byl oproti předchozím pracem^[43, 73, 74] *wt1A1(His)* produkován v mnohem větší míře než *mod1A1(His)*. Bylo optimalizováno v jakém typu buněk (GOLD / RIL / RIPL) a za jakých podmínek (teplota a délka produkce, OD₆₀₀ při indukci, koncentrace IPTG, čas přidání ALA) bude docíleno nejvyššího stupně exprese daných proteinů. Byly izolovány membránové frakce buněk produkujících jednotlivé rekombinantní *CYP1A1* za různých podmínek a testovány z hlediska enzymové aktivity vůči 7-ethoxyresorufinu považovanému za markerový substrát *CYP1A1*. Detekovaná EROD aktivita membránových frakcí zejména v případě *wt1A1* a *wt1A1.His* potvrdila, že proteiny produkované zvoleným expresním systémem opravdu vykazují svou typickou enzymovou aktivitu.

Nejvyšší enzymové aktivity *wt1A1* v membránách bylo dosaženo produkcí v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) GOLD při teplotě 22 °C po dobu 12 hodin, kdy exprese byla iniciována 0,1mM IPTG po dosažení OD₆₀₀ kolem 0,9, přičemž ALA byla do buněčné kultury přidána 150 minut před indukci.

V další fázi práce byly testovány různé podmínky pro solubilizaci *wt1A1* z membrán. Optimální extrakce *wt1A1* z buněčného lyzátu bylo docíleno použitím směsi 0,6% (v/v) Triton X-100 s 0,6% (v/v) cholátem sodným solubilizací po dobu 3 hodin.

Přestože tedy nebyly splněny všechny konkrétní vytyčené cíle, v rámci předkládané práce se podařilo vypracovat detailní pracovní postup pro nadcházející přípravu rekombinantních potkaních CYP1A1 a jejich enzymologické studie.

Seznam použité literatury

1. Knejzlík, Z., Káš, J. & Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chemicke listy*. 94, 913-918.
2. Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G. & Rahmani, R. (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?, *Toxicology*. 153, 73-82.
3. Tolson, A. H. & Wang, H. (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR, *Adv Drug Deliv Rev*. 62, 1238-49.
4. Guengerich, F. P. (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases, *Mol Interv*. 3, 194-204.
5. Muntane, J. (2009) Regulation of drug metabolism and transporters, *Curr Drug Metab*. 10, 932-45.
6. Glubb, D. M. & Innocenti, F. (2010) Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters, *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*.
7. Masimirembwa, C. M., Otter, C., Berg, M., Jonsson, M., Leidvik, B., Jonsson, E., Johansson, T., Backman, A., Edlund, A. & Andersson, T. B. (1999) Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research, *Drug Metab Dispos*. 27, 1117-22.
8. Lamb, D. C., Waterman, M. R., Kelly, S. L. & Guengerich, F. P. (2007) Cytochromes P450 and drug discovery, *Curr Opin Biotechnol*. 18, 504-12.
9. Guengerich, F. P. (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology, *Chem Res Toxicol*. 21, 70-83.
10. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J Biotechnol*. 124, 128-45.
11. Zuber, R., Anzenbacherova, E. & Anzenbacher, P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism, *J Cell Mol Med*. 6, 189-98.
12. Stiborova, M., Hudecek, J., Hodek, P. & Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chemicke listy*. 93, 229-237.
13. Isin, E. M. & Guengerich, F. P. (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes, *Biochim Biophys Acta*. 1770, 314-29.
14. Stiborová, M., Hudeček, J. & Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chemicke listy*. 98, 876-890.
15. McKinnon, R. A. (2000) Cytochrome P450:1. Multiplicity and Function, *Aust J Hosp Pharm*. 30, 54-56.
16. Redlich, G., Zanger, U. M., Riedmaier, S., Bache, N., Giessing, A. B., Eisenacher, M., Stephan, C., Meyer, H. E., Jensen, O. N. & Marcus, K. (2008) Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry, *J Proteome Res*. 7, 4678-88.
17. <http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>. (ke dni 25.7. 2011)
18. Nelson, D. R. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450, *Biochim Biophys Acta*. 1814, 14-8.
19. Guengerich, F. P. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity, *Aaps J*. 8, E101-11.
20. <http://drnelson.uthsc.edu/hum.html>. (ke dni 25.7. 2011)

21. Stiborova, M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Multioborový sborník "Otevřená věda"*.
22. Murray, G. I. (2000) The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy, *J Pathol.* 192, 419-26.
23. Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K. & Schwab, M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation, *Anal Bioanal Chem.* 392, 1093-108.
24. Lin, J. H. & Lu, A. Y. (1997) Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development, *Pharmacol Rev.* 49, 403-49.
25. Guengerich, F. P. (2009) Cataloging the Repertoire of Nature's Blowtorch, P450, *Chem Biol.* 16, 1215-6.
26. Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., Peterkin, V., Koup, J. R. & Ball, S. E. (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios, *Drug Metab Dispos.* 32, 1201-8.
27. Guengerich, F. P. & Rendic, S. (2010) Update Information on Drug Metabolism Systems-2009, Part I, *Curr Drug Metab.*
28. Meyer, R. P., Podvinec, M. & Meyer, U. A. (2002) Cytochrome P450 CYP1A1 accumulates in the cytosol of kidney and brain and is activated by heme, *Mol Pharmacol.* 62, 1061-7.
29. McFadyen, M. C., Melvin, W. T. & Murray, G. I. (2004) Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics, *Mol Cancer Ther.* 3, 363-71.
30. Kadkhodayan, S., Coulter, E. D., Maryniak, D. M., Bryson, T. A. & Dawson, J. H. (1995) Uncoupling oxygen transfer and electron transfer in the oxygenation of camphor analogues by cytochrome P450-CAM. Direct observation of an intermolecular isotope effect for substrate C-H activation, *J Biol Chem.* 270, 28042-8.
31. Isin, E. M. & Guengerich, F. P. (2008) Substrate binding to cytochromes P450, *Anal Bioanal Chem.* 392, 1019-30.
32. Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story, *Genome Biol.* 1, REVIEWS3003.
33. Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A. & Rodriguez-Antona, C. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects, *Pharmacol Ther.* 116, 496-526.
34. <http://www.cypalleles.ki.se/>. (ke dni 25.7. 2011)
35. Shimada, T. (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metab Pharmacokinet.* 21, 257-76.
36. Souček, P., Šarmanová, J., Šušová, S., Týnková, L., Benešová, K., Vodička, P. & Gut, I. (2002) Genetické polymorfismy biotransformačních enzymů a jejich sledování v populaci České republiky, *klinická onkologie.* 15, 161-165.
37. Rodriguez-Antona, C. & Ingelman-Sundberg, M. (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer, *Oncogene.* 25, 1679-91.
38. Libby, R. T., Smith, R. S., Savinova, O. V., Zabaleta, A., Martin, J. E., Gonzalez, F. J. & John, S. W. (2003) Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase, *Science.* 299, 1578-81.
39. Johansson, I. & Ingelman-Sundberg, M. (2010) Genetic Polymorphism and Toxicology - with Emphasis on Cytochrome P450, *Toxicol Sci.*

40. Lewis, D. F., Lake, B. G., George, S. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., Beresford, A. P., Goldfarb, P. S. & Guengerich, F. P. (1999) Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102, *Toxicology*. 139, 53-79.
41. Landi, M. T., Sinha, R., Lang, N. P. & Kadlubar, F. F. (1999) Human cytochrome P4501A2, *IARC Sci Publ*, 173-95.
42. Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B. & Gonzalez, F. J. (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer, *J Biol Chem*. 279, 23847-50.
43. Cvrk, T. & Strobel, H. W. (2001) Role of THR501 residue in substrate binding and catalytic activity of cytochrome P4501A1, *Arch Biochem Biophys*. 389, 31-40.
44. http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&pmpuid=1000000010446&range_from=1&range_to=524&ac=P00185&zid=async. (ke dni 20.8. 2011)
45. Sergentanis, T. N. & Economopoulos, K. P. (2010) Four polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene and breast cancer risk: a meta-analysis, *Breast Cancer Res Treat*. 122, 459-69.
46. Bartsch, H., Nair, U., Risch, A., Rojas, M., Wikman, H. & Alexandrov, K. (2000) Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 9, 3-28.
47. Li, R., Shugart, Y. Y., Zhou, W., An, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhang, B., Lu, D., Wang, H., Qian, J. & Jin, L. (2009) Common genetic variations of the cytochrome P450 1A1 gene and risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population, *Eur J Cancer*. 45, 1239-47.
48. Yeh, C. C., Sung, F. C., Kuo, L. T., Hsu, W. P. & Chu, H. Y. (2009) Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, cigarette smoking and risk of coronary artery disease, *Mutat Res*. 667, 77-81.
49. Barouki, R. & Morel, Y. (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications, *Biochem Pharmacol*. 61, 511-6.
50. Whitlock, J. P., Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39, 103-25.
51. Nedelčeva, V. & Gut, I. (1993) Lidské a potkaní cytochromy P450: význam jejich srovnání pro toxikologii a metody jejich studia, *Státní zdravotní ústav*, 58-67.
52. Takiguchi, M., Darwish, W. S., Ikenaka, Y., Ohno, M. & Ishizuka, M. (2010) Metabolic activation of heterocyclic amines and expression of CYP1A1 in the tongue, *Toxicol Sci*. 116, 79-91.
53. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04798>. (ke dni 20.8. 2011)
54. http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?org=Rat&hgg_gene=NM_012540&hgg_chrom=none&db=rn4. (ke dni 20.8.2011)
55. http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgsid=207836869&hgg_section_swissProtComments_close=0#swissProtComments. (ke dni 20.8. 2011)
56. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00185>. (ke dni 20.8. 2011)
57. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00184>. (ke dni 20.8. 2011)
58. Pocar, P., Fischer, B., Klönisch, T. & Hombach-Klönisch, S. (2005) Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction, *Reproduction*. 129, 379-89.

59. Zhang, N. & Walker, M. K. (2007) Crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia on the constitutive expression of cytochrome P450 1A1 mRNA, *Cardiovasc Toxicol.*, 282-290.
60. Soprano, D. R. & Soprano, K. J. (2003) Pharmacological doses of some synthetic retinoids can modulate both the aryl hydrocarbon receptor and retinoid receptor pathways, *J Nutr.* 133, 277S-281S.
61. Singhal, R., Shankar, K., Badger, T. M. & Ronis, M. J. (2008) Estrogenic status modulates aryl hydrocarbon receptor--mediated hepatic gene expression and carcinogenicity, *Carcinogenesis.* 29, 227-36.
62. Guengerich, F. P. & Parikh, A. (1997) Expression of drug-metabolizing enzymes, *Curr Opin Biotechnol.* 8, 623-8.
63. Guengerich, F. P., Parikh, A., Johnson, E. F., Richardson, T. H., von Wachenfeldt, C., Cosme, J., Jung, F., Strassburg, C. P., Manns, M. P., Tukey, R. H., Pritchard, M., Fournel-Gigleux, S. & Burchell, B. (1997) Heterologous expression of human drug-metabolizing enzymes, *Drug Metab Dispos.* 25, 1234-41.
64. Gillam, E. M. & Guengerich, F. P. (2001) Exploiting the versatility of human cytochrome P450 enzymes: the promise of blue roses from biotechnology, *IUBMB Life.* 52, 271-7.
65. Zuber, M. X., Simpson, E. R. & Waterman, M. R. (1986) Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells, *Science.* 234, 1258-61.
66. Ding, S., Yao, D., Burchell, B., Wolf, C. R. & Friedberg, T. (1997) High levels of recombinant CYP3A4 expression in Chinese hamster ovary cells are modulated by coexpressed human P450 reductase and hemin supplementation, *Arch Biochem Biophys.* 348, 403-10.
67. Sakaki, T., Oeda, K., Yabusaki, Y. & Ohkawa, H. (1986) Monooxygenase activity of *Saccharomyces cerevisiae* cells transformed with expression plasmids carrying rat cytochrome P-450MC cDNA, *J Biochem.* 99, 741-9.
68. Kim, D. H., Kim, K. H., Isin, E. M., Guengerich, F. P., Chae, H. Z., Ahn, T. & Yun, C. H. (2008) Heterologous expression and characterization of wild-type human cytochrome P450 1A2 without conventional N-terminal modification in *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif.* 57, 188-200.
69. Imaoka, S., Yamada, T., Hiroi, T., Hayashi, K., Sakaki, T., Yabusaki, Y. & Funae, Y. (1996) Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic characterization and comparison with those of the rat, *Biochem Pharmacol.* 51, 1041-50.
70. Iwata, H., Fujita, K., Kushida, H., Suzuki, A., Konno, Y., Nakamura, K., Fujino, A. & Kamataki, T. (1998) High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli*, *Biochem Pharmacol.* 55, 1315-25.
71. Crespi, C. L. & Miller, V. P. (1999) The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future, *Pharmacol Ther.* 84, 121-31.
72. Wu, Z. L., Qiao, J., Zhang, Z. G., Guengerich, F. P., Liu, Y. & Pei, X. Q. (2009) Enhanced bacterial expression of several mammalian cytochrome P450s by codon optimization and chaperone coexpression, *Biotechnol Lett.* 31, 1589-93.
73. Cvrk, T. & Strobel, H. W. (2001) Role of LYS271 and LYS279 residues in the interaction of cytochrome P4501A1 with NADPH-cytochrome P450 reductase, *Arch Biochem Biophys.* 385, 290-300.

74. Guo, Z., Gillam, E. M., Ohmori, S., Tukey, R. H. & Guengerich, F. P. (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties, *Arch Biochem Biophys.* 312, 436-46.
75. Harnastai, I. N., Gilep, A. A. & Usanov, S. A. (2006) The development of an efficient system for heterologous expression of cytochrome P450s in *Escherichia coli* using hemA gene co-expression, *Protein Expr Purif.* 46, 47-55.
76. Grant, D. F., Greene, J. F., Pinot, F., Borhan, B., Moghaddam, M. F., Hammock, B. D., McCutchen, B., Ohkawa, H., Luo, G. & Guenther, T. M. (1996) Development of an in situ toxicity assay system using recombinant baculoviruses, *Biochem Pharmacol.* 51, 503-15.
77. Eugster, H. P., Sengstag, C., Meyer, U. A., Hinnen, A. & Wurgler, F. E. (1990) Constitutive and inducible expression of human cytochrome P450IA1 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an alternative enzyme source for in vitro studies, *Biochem Biophys Res Commun.* 172, 737-44.
78. Ching, M. S., Lennard, M. S., Tucker, G. T., Woods, H. F., Kelly, D. E. & Kelly, S. L. (1991) The expression of human cytochrome P450IA1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Pharmacol.* 42, 753-8.
79. Chung, W. G., Sen, A., Wang-Buhler, J. L., Yang, Y. H., Lopez, N., Merrill, G. F., Miranda, C. L., Hu, C. H. & Buhler, D. R. (2004) cDNA-directed expression of a functional zebrafish CYP1A in yeast, *Aquat Toxicol.* 70, 111-21.
80. (2004) PRIMER SETS AND PCR MANUAL in, ENDOGEN BRAND,
81. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. B., Moore, D. D., J.G., S., Smith, J. A. & Struhl, K. (1998) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York.
82. Táborský, O., Štern, P., Valovičová, E., Bezouška, K. & Novák, M. (1990) *Metody klinické biochemie*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
83. Krajhanzl, A. & Hladík, J. a. k. (1991) *Biochemické metody – návody k pokročilým cvičením*, Karolinum, Praha.
84. <http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/JETQUICK-Protocol.PDF>. (ke dni 25.7. 2011)
85. <http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp?> (ke dni 25.7. 2011)
86. Rumlová, M., Pačes, V., Ruml, T. (2003) *Základní metody genového inženýrství*, VŠCHT, Praha.
87. Sambrook, J. & Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
88. Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. & Sugino, Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells, *Nucleic Acids Res.* 18, 6169.
89. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/pld140bul.Par.0001.File.tmp/pld140bul.pdf>. (ke dni 25.7. 2011)
90. (2007) *Purifying Challenging Proteins - Principles and Methods*, GE Healthcare.
91. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227, 680-5.
92. Káš, J., Kodíček, M. & Valentová, O. (2006) *Laboratorní techniky biochemie*, VŠCHT, Praha.
93. Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008) *Lehninger's Principles of Biochemistry*, Fifth edn, W. H. Freeman and Company, New York.

94.
[http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5b02a62da847a7858525742c0009d09c/\\$FILE/00103870.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5b02a62da847a7858525742c0009d09c/$FILE/00103870.pdf). (ke dni 25.7. 2011)
95. Wiechelman, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation, *Anal Biochem.* 175, 231-7.
96. Burke, M. D. & Mayer, R. T. (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene, *Drug Metab Dispos.* 2, 583-8.
97. Omura, T. & Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties, *J Biol Chem.* 239, 2379-85.
98. <http://expasy.org/>. (ke dni 25.7. 2011)
99. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/dbfetch/dbfetch?db=emblcds&id=CAA25153>.
(ke dni 25.7.2011)
100. <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>.(ke dni 25.7. 2011)
101. <http://slam.bs.jhmi.edu/gd/index.html>. (ke dni 25.7. 2011)
102.
http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/dam_dcm_cpg_methylation.asp. (ke dni 25.7. 2011)

„Svoluji k zapůjčení této diplomové práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka