

## 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), OD<sub>600</sub> 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 OD<sub>600</sub> 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*