

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



**Optimalizace exprese fotoaktivovatelných cytochromů P450
jako nano-sond pro studium membránové topologie enzymů
metabolismu léčiv a aktivace karcinogenů**

**Optimization of expression of photoactivatable cytochrome P450 as a
nano-probe for the membrane topology studies of enzymes metabolizing
drugs and carcinogens**

Bakalářská práce

Jana Smolová

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.
V Praze dne.....

.....

Jana Smolová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za trpělivé vedení této bakalářské práce, přínosné informace a cenné rady při jejím vypracovávání.

Také bych na tomto místě chtěla poděkovat Mgr. Monice Koberové za obětavou spolupráci a předání zkušeností. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Cytochromy P450 patří mezi jedny z nejdůležitějších enzymů podílejících se na biotransformaci cizorodých látek v organismu. Jsou součástí tzv. monooxygenasového systému, ve kterém interagují s dalšími enzymy – NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem b₅. Vzájemné interakce enzymů v monooxygenasovém systému nejsou zcela rozřešeny. K objasnění možných protein-proteinových interakcí a jejich důsledků by mohla přispět technika kovalentního síťování. Jednou z možností realizace tohoto záměru je využití fotoaktivovatelného cytochromu P450, který by po expozici UV záření vytvořil kovalentní komplex se složkami monooxygenasového systému, s nimiž je v kontaktu. Tato práce se proto zabývá vypracováním optimálních podmínek pro produkci rekombinantního cytochromu P450 2B4 s cílem získat poznatky pro produkci fotoaktivovatelného cytochromu P450 s inkorporovanými aminokyselinami L-fotomethioninem a L-fotoleucinem. V provedených experimentech byl cytochrom P450 2B4 exprimován ve dvou kmenech *Escherichia coli*, C41 (DE3) a BL21 (DE3) Gold, a ve dvou kultivačních nádobách, skleněné Erlenmayerově baňce a plastové Fernbachově baňce. V průběhu exprese byla měřena optická denzita bakteriální suspenze (absorbance při 600 nm) a koncentrace cytochromu P450. Byla vypracována metodika stanovení koncentrace cytochromu P450 přímo v bakteriální buňce. Exprimovaný cytochrom P450 byl solubilizován a následně zjištěn jeho specifický obsah v solubilizátu. Z porovnání exprese v jednotlivých kmenech *Escherichia coli* vzhledem k testovaným uspořádáním kultivace byly navrženy optimální podmínky pro produkci rekombinantního cytochromu P450 2B4.

Klíčová slova:

exprese proteinu, cytochrom P450, fotoaktivace, zesílení, MFO system

Abstract

The cytochromes P450 are among the most important enzymes involved in the biotransformation of xenobiotics in the body. They are part of the monooxygenase system that interact with other enzymes - NADPH: cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. Mutual interaction of enzymes in monooxygenase system are not completely solved. Covalent crosslinking technique could contribute to clarify the possible protein-protein interactions and their consequences. One of the possible realization of this plan is to use photoactivatable cytochrome P450, which after exposure to UV radiation created covalent complex with components of monooxygenase system, with which it is in contact. Therefore, this paper focuses on developing optimal conditions for the production of recombinant cytochrome P450 2B4 in order to gain knowledge for the production of photoactivatable cytochrome P450 with incorporated amino acids L-photomethionine and L-photoleucine. In experiments was cytochrome P450 2B4 expressed in two strains of *Escherichia coli*, C41 (DE3) and BL21 (DE3) Gold, and two culture flasks, glass Erlenmeyer flask and plastic Fernbach flask. During expression optical density of the bacterial suspension (absorbation at 600 nm) and concentration of cytochrome P450 were measured. Methodology of measuring the concentration of cytochrome P450 in the bacterial cell has been developed. Expressed cytochrome P450 was solubilized and subsequently found its specific content in solubilized solution. Optimal conditions for production of recombinant cytochrome P450 2B4 have been proposed on the basis of comparison of the bacterial expression in different cultivation arrangements.

Keywords:

expression of the protein, cytochrome P450, photoactivation, crosslinking, MFO system

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
1 ÚVOD	7
1.1 MFO systém	7
1.1.1 Cytochrom P450	7
1.1.1.1 Reakční cyklus cytochromu P450	9
1.1.2 Interakce CYP 2B4 s reakčními partnery	11
1.2 Bakteriální exprese	12
1.2.1 Bakteriální zastoupení kodonů při proteosyntéze	12
1.2.2 Složení expresního vektoru	13
1.2.3 Produkce membránových proteinů	14
1.3 Fotochemické přístupy	14
1.3.1 Inkorporace fotolabilních aminokyselin do cytochromu P450	15
2 CÍL PRÁCE	17
3 MATERIÁL A METODY	18
3.1 Použitý materiál a chemikálie	18
3.2 Použité přístroje	19
3.3 Metody	20
3.3.1 Analytické metody	20
3.3.1.1 Stanovení koncentrace cytochromu P450	20
3.3.1.2 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA	21
3.3.2 Příprava rekombinantního cytochromu P450 2B4	22
3.3.2.1 Transformace plazmidu pLW01	22
3.3.2.2 „Overnight“ kultura	22
3.3.2.3 Produkce cytochromu P450 2B4	23
3.3.3 Elektroforetické metody	23
3.3.3.1 SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	23
3.3.3.2 Metoda „Western blotting“	25
3.3.4 Solubilizace cytochromu P450 2B4 z bakteriálních buněk	25
4 VÝSLEDKY	27
4.1 Optimalizace stanovení cytochromu v bakteriálních buňkách	27
4.2 Produkce cytochromu P450 2B4	28
4.3 Solubilizace cytochromu P450 2B4 z bakteriálních buněk	33
5 DISKUZE	36
6 SHRNUTÍ	38
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

Seznam použitých zkratk

A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BCA	4,4' – dikarboxy – 2,2' – bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
c_{CYP}	koncentrace cytochromu P450
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
IPTG	isopropyl- β -D-galaktopyranosid
l	optická dráha
LB medium	Luria Broth medium
M	molární koncentrace
m_b	hmotnost buněk
MFO	systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí
mRNA	mediátorová RNA
n	látkové množství
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
RH	substrát
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	hydroxylovaný produkt
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
$S.O._{CYP}$	specifický obsah cytochromu P450
St	standard
TB medium	Terrific Broth medium
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
ϵ_x	molární absorpční koeficient při vlnové délce x nm
δ -ALA	δ -aminolevulová kyselina

1 ÚVOD

S moderní rychle se vyvíjející technikou se kolem nás neustále zvyšuje výskyt cizorodých látek neboli xenobiotik, které negativně působí na organismy. Jako xenobiotika se označují látky, které se v organismu normálně nevyskytují a nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj a ani pro něj neslouží jako zdroj energie [1].

Po vstupu cizorodé látky do organismu dochází k jeho vstřebání do krve a distribuci v organismu. Aby mohlo být xenobiotikum z těla odstraněno, musí být nejprve přeměněno na látku lépe vyloučitelnou z organismu, látku polárnější. Tento proces se nazývá biotransformace a má dvě hlavní fáze. První fáze zahrnuje chemické pochody, jako jsou například oxidace postranního řetězce, deaminace, tvorba epoxidů, N-hydroxylace, redukce či hydrolytické reakce, které modifikují cizorodé látky tak, aby byly schopné konjugace s aminy, kyselinami a alkoholy [1]. Již zmíněná konjugace je druhou fází biotransformace.

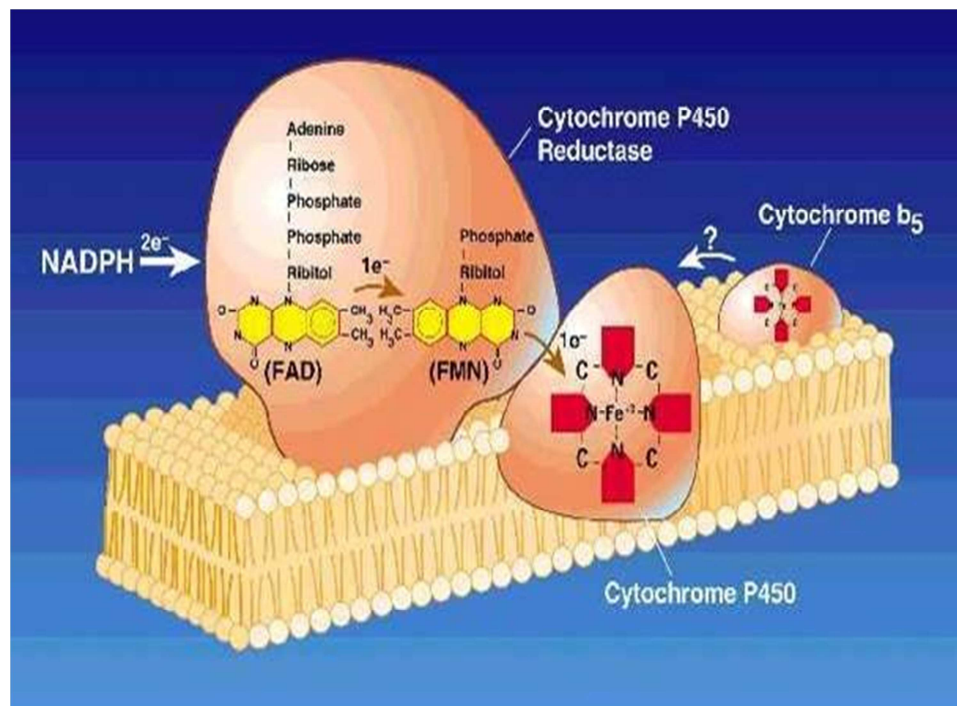
Největší skupinou enzymů biotransformujících cizorodé látky jsou enzymy označované jako oxygenasy. Tyto enzymy pro svojí aktivitu potřebují molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru, který jej aktivuje. Jako kofaktory slouží například přechodné kovy, nejčastěji Fe ve formě hemu, nebo flaviny [2].

1.1 MFO systém

Jedny z nejdůležitějších enzymů metabolizujících xenobiotika jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO z angl. „mixed function oxidases“), v nichž jako terminální oxidasa funguje hemový enzym cytochrom P450 [3]. Tento enzymový systém katalyzuje inkorporaci jednoho atomu kyslíku do hydrofobního substrátu, zatímco druhý atom kyslíku je redukován na vodu [2]. Skládá se z několika enzymů – cytochromu P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasy, která slouží jako dělič elektronového páru, cytochromu b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasy. Celý MFO systém je umístěn v membráně, především v membráně hladkého endoplasmatického retikula (viz obr. 1, strana 8).

1.1.1 Cytochrom P450

V roce 1958 vědci Klingenberg [4] a Garfinkel [5] objevili nový mikrosomální pigment, který váže oxid uhelnatý po redukci redukčním činidlem.



Obr. 1: Teoretické uspořádání složek MFO systému. Převzato z [6]

O několik let později v roce 1962 Omura a Sato zjistili, že tento komplex vykazuje při vazbě s oxidem uhelnatým specifické absorpční maximum ve 450 nm a pojmenovali ho cytochrom P450 [7]. Dva roky poté se podařilo izolovat cytochrom P450 z králičích jater [8].

Dnes již známe více než 2000 cytochromů P450 rozdělených do 265 odlišných rodin podle homologie jejich primárních struktur [9, 14]. Od roku 1991 se cytochromy označují zkratkou CYP, za níž následuje arabská číslice označující rodinu, poté písmeno dělící rodiny do podrodin a nakonec pořadové číslo konkrétního cytochromu (např. CYP 2B4) [10].

Cytochromy P450 jsou v organismu zodpovědné především za reakce I. fáze biotransformace chemických látek. Katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv, environmentálních chemikálií, ale i látek přírodních či endogenních [3]. Cytochrom P450 se tedy významnou měrou podílí na detoxikaci, ale u některých látek může docházet naopak k jejich bioaktivaci, kdy intermediát vzniklý činností CYP může být více toxický nebo karcinogenní [11].

Schopnost všech cytochromů P450 aktivovat molekulární kyslík souvisí se způsobem, jakým je hem (protoporfyrin IX) vázán na apoprotein. Protoporfyrin IX se k proteinové části váže jednak hydrofobně, jednak prostřednictvím thiolátové síry cysteinu, který je

přítomný v aktivním centru. Tento typ vazby umožňuje porfyrinovému skeletu zprostředkovat přesun elektronové hustoty ke kyslíku [10].

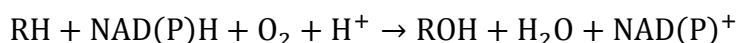
Eukaryotické CYP obsahují obvykle 480 – 560 aminokyselinových zbytků [9] a relativní molekulové hmotnosti se pohybují okolo hodnoty 50 000 [2]. Z krystalových struktur, které již byly u řady cytochromů rozřešeny, vyplývá, že ačkoliv totožnost primární struktury je nejvíce 20 %, sekundární a terciární struktury jsou vysoce konzervovány (obr. 2) [9].



Obr. 2: Cytochrom P450 2B4. Převzato z [12].

1.1.1.1 Reakční cyklus cytochromu P450

Cytochrom P450 spolupůsobí s dalším enzymem lokalizovaným v membráně cytoplazmatického retikula – NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí:

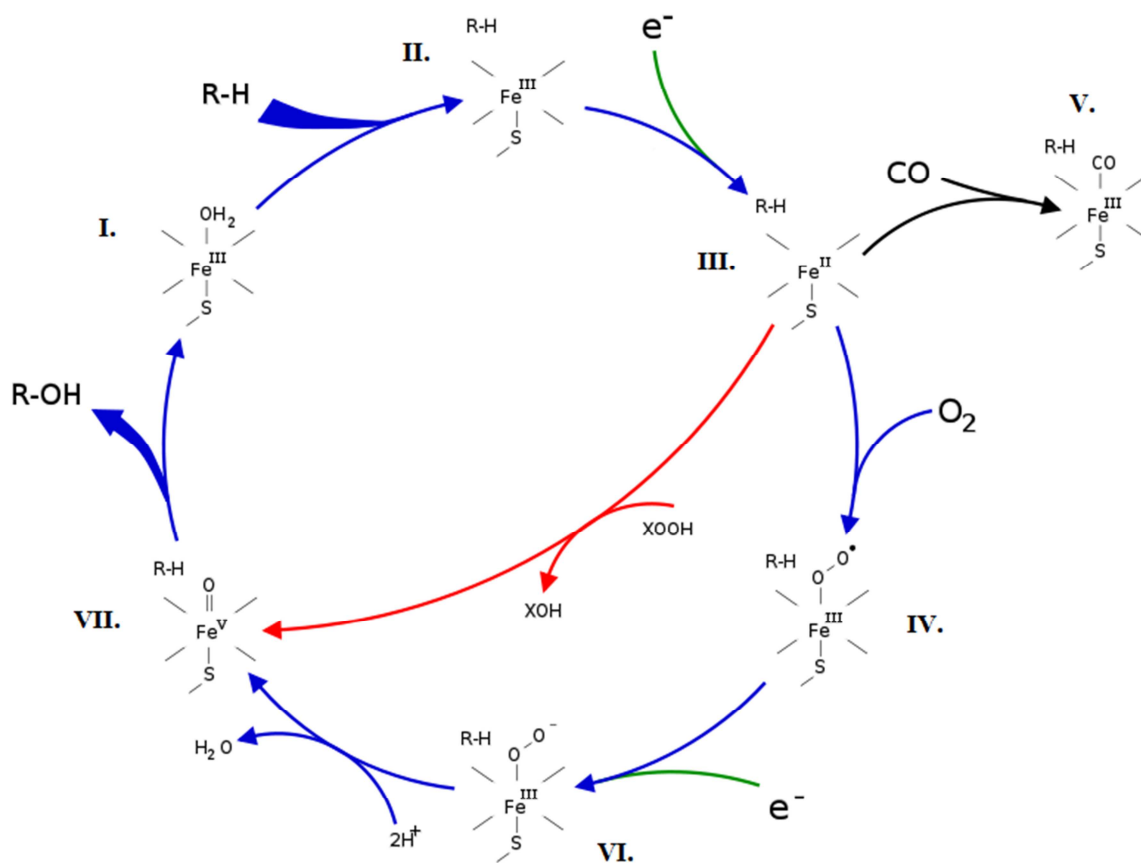


kde RH je substrát a ROH hydrolyzovaný produkt reakce. Reakční cyklus probíhá uspořádaným mechanismem a skládá se z alespoň osmi kroků [2]. Schéma reakčního cyklu je uvedeno na obr. 3, strana 11.

Reakce začínají přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:cytochrom P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochromy P450. Redukovaný cytochrom P450 pak aktivuje molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody [14].

Hemový atom železa je v klidovém stavu ve ferri formě (Fe^{3+}) a je hexakoordinován (nizkospinový stav). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo inertním (aminokyselinovým) ligandem (**I.**). Poté, co se do aktivního místa naváže substrát (RH), dojde k přerušení vazby šestého ligandu atomu železa, který zůstane pentakoordinovaný (ve vysokospinovém stavu). Zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu, což se projeví změnou spektrálních vlastností (posunem absorpčního pásu hemu) (**II.**). Navázání substrátu umožní jedoelektronovou redukcí cytochromu P450 interakcí s NADPH:cytochrom P450 reduktázou, čímž se ferri forma (Fe^{3+}) redukuje na Fe^{2+} (ferro forma), ale atom železa zůstává stále pentakoordinován (ve vysokospinovém stavu). Tato forma enzymu je schopná vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy, například oxid uhelnatý (**III., V.**). Navázáním molekuly kyslíku se vytvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde se atom železa opět dostává do nizkospinového stavu a je hexakoordinován (**IV.**). Takto vzniklý komplex není stabilní a je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž se aktivuje kyslík na peroxidový anion (**VI.**). Po druhé redukcí je komplex cytochromu P450 již zcela aktivovanou formou, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován na vodu, zatímco druhý zůstává vázán na hem ve formě ferrioxenového komplexu (**VII.**). Tento komplex je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík.

Vznikající reaktivní kyslíkový radikál je schopný vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Následně dochází k rekombinaci radikálů, uvolnění hydroxylovaného substrátu (ROH) a vzniku nativní formy enzymu [2].



Obr. 3: Schéma reakčního cyklu cytochromu P450. Převzato a upraveno z [13]. R-H – substrát, R-OH – hydrolyzovaný produkt, XOOH – peroxysloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe – atom hemového železa enzymu.

1.1.2 Interakce CYP 2B4 s reakčními partnery

Nejdůležitějšími reakčními partnery cytochromu P450 jsou NADPH:cytochrom P450 reductasa a cytochrom b₅. Jak cytochrom b₅, tak NADPH:cytochrom P450 reductasa předávají elektrony na cytochrom P450 a mohou s ním vytvářet binární nebo ternární komplexy [16]. Cytochrom b₅ zároveň může inhibovat, stimulovat nebo vůbec neovlivňovat katalytickou aktivitu cytochromu P450 [15].

Poznání správného uspořádání MFO systému je velmi důležité pro odhalení vzájemných interakcí mezi jeho jednotlivými složkami. Pro studium MFO systému je třeba připravit jednotlivé komponenty celého systému. Cytochromy P450 a jejich reductázy se buď izolují přímo ze tkání experimentálních zvířat, nebo se rekombinantně exprimují v bakteriálních systémech. Rekombinantní exprese je využívána zejména pro větší variabilitu manipulací, jelikož je možné exprimované proteiny snadno modifikovat a následně pak zjišťovat jejich vliv na fungování a interakce MFO systému. Jednou z modifikací je záměna určitých

aminokyselin za jejich pozměněné analogy. Tato práce se zabývá optimalizací expresních podmínek pro následnou výměnu dvou aminokyselin, L-methioninu a L-leucinu, za jejich fotolabilní analogy (viz kap. 1.4).

1.2 Bakteriální exprese

Bakterie jsou hojně využívány pro expresi heterologních proteinů. Nejpoužívanější hostitel pro produkci heterologních proteinů je gram-negativní bakterie *Escherichia coli*, jejíž genetika je velice dobře prozkoumána.

Bakterie mají mnoho výhod, pro které jsou využívány jako vhodný expresní systém. Mezi tyto výhody bezesporu patří lehká manipulace s bakteriálním genomem, nepřiliš nákladné prostředky na kultivaci a rychlá schopnost reprodukce. Naproti tomu jejich velké nevýhody jsou – nepřítomnost posttranslačních modifikací (glykosylace, fosforylace atd.), které jsou u mnoha eukaryotických proteinů velice důležité, tvorba inkluzních tělísek nebo precipitace produkovaných proteinů [17].

Jako expresní vektor (molekula DNA schopná přijmout cizorodou DNA) je nejčastěji využíván bakteriální plasmid, krátká kruhová molekula DNA. Obsahuje jedinečná klonovací místa, jež jsou cílem restričních endonukleas. Do klonovacích míst se poté začleňuje cizorodá DNA, většinou gen pro požadovaný protein [18].

Expresní vektor se do bakteriální buňky vpravuje procesem zvaným transformace. Aby byla transformace úspěšná, je potřeba použít buňky, které jsou kompetentní, schopné přijmout cizí DNA, což vyžaduje určité genetické vlastnosti zaručující tvorbu propustné buněčné stěny. Buňka přijímá plasmid při buněčném stresu, čehož se při transformaci využívá – bakterie je vystavena tepelnému šoku a vápenatým iontům [19].

1.2.1 Bakteriální zastoupení kodonů při proteosyntéze

Bakterie využívají při proteosyntéze odlišné kodony (triplety nukleotidů mRNA) než eukaryotické organismy a mají tedy jiné procentuální zastoupení molekul tRNA. V důsledku toho může v průběhu proteosyntézy dojít k vyčerpání určité tRNA a redukci růstu hostitelské buňky, což se může projevit jako toxická odpověď [20]. Výsledek takové situace je zastavení proteosyntézy, substituce aminokyselin nebo přeskočení ribosomu na odlišný čtecí rámec (tzv. „frameshifting“) [21]. Tato komplikace se může řešit buď cílenou mutagenézí nebo současnou expesí genů kodujících chybějící tRNA. V současnosti jsou

k dispozici optimalizované expresní vektory z komerčních zdrojů, které zohledňují odlišné kodonové zastoupení v bakteriích [21].

1.2.2 Složení expresního vektoru

Expresní vektor, do kterého se vkládají geny pro produkci požadovaných proteinů, musí obsahovat:

- *Promotor* – specifické místo pro navázání RNA polymerázy
Nejběžnějším promotorem využívaným při expresi v *E. coli* je T7 promotor, na nějž nasedá T7 RNA polymerasa získaná z T7 bakteriofága [22]. T7 RNA polymerasa transkribuje pětikrát rychleji než běžné bakteriální polymerasy. *E. coli* gen pro tuto polymerasu přirozeně neobsahuje, proto se specificky vybírají geneticky upravené kmeny, které kopii genu pro T7 polymerasu mají. Tyto kmeny se označují DE3 [7]. Produkce T7 RNA polymerasy je kontrolována *lacUV5* promotorem. Tento promotor se aktivuje nehydrolyzovatelným analogem laktosy – IPTG (isopropyl- β -D-thigalaktopyranosid) [23].
- *Regulační sekvence* – sekvence pro nasedání regulačních proteinů, represorů a aktivátorů. Represory zastavují transkripci genů po nasednutí na DNA, aktivátory navozují transkripci genů navázáním na DNA [25].
- „*Shine-Dalgarnova sekvence*“ – sekvence komplementární s 3' koncem 16S ribosomální RNA následovaná iniciačním kodonem, kterým je většinou AUG [24]
- *Počátek replikace* – tzv. „origin of replication“. Pro úspěšnou transkripci musí být plasmid nejprve replikován. Obvykle je pro expresi požadován vysoký počet kopií plasmidu, u *E. coli* se počet pohybuje mezi 20 a 40 kopiemi na buňku [23].
- *Terminátor* – sekvence ukončující translaci

Do expresních vektorů se většinou přidávají některé další sekvence pro proteiny dávající buňkám určitou selekční výhodu. Nejběžněji přidávaným je gen pro β -laktamasu, enzym schopný štěpit β -laktamový kruh některých antibiotik, čímž buňka získá rezistenci na tyto antibiotika a je schopná žít v mediu, které ho obsahuje. Tento způsob funguje jako selekční marker, kdy při ztrátě plasmidu buňka v prostředí antibiotika nepřežije.

Přímo k sekvenci exprimovaného heterologního proteinu se také často přidávají takzvané „tagy“, tedy sekvence kódující proteiny nebo peptidy, díky kterým můžeme například zvýšit rozpustnost proteinu nebo usnadit jeho následnou purifikaci. Hojně používaným

„tagem“ usnadňujícím purifikaci je hexahistidine (his_6), který se váže na nikelnaté nebo kobaltnaté ionty při afinitní chromatografii [23].

1.2.3 Produkce membránových proteinů

Expres membránových proteinů je určujícím krokem pro jejich strukturální a funkční studie. Bakterie *Escherichia coli* je často využívána, ačkoliv pro produkci eukaryotních membránových proteinů není zcela vhodná. *E. coli* upřednostňuje expresi prokaryotních membránových proteinů před eukaryotními [26].

Mezi běžně využívané kmeny *E. coli* patří BL21 (DE3), který obsahuje T7 RNA polymerasu, která je schopná rychlejší transkripce, a díky tomu buňka obsahuje více kopií expresního vektoru. Přestože mnoho rozpustných proteinů bylo v tomto kmenu úspěšně exprimováno, u membránových proteinů často nebylo dosaženo dostatečného množství, protože exprimovaný protein byl pro buňku ve vyšším množství toxický [27,28].

Z kmene BL21 (DE3) byl před více než 10 lety v laboratoři Johna Walkera izolovány dva mutantní kmeny, C41 (DE3) a C43 (DE3), které byly schopné exprimovat membránové proteiny bez toho, aniž by to na ně mělo toxické účinky [28].

1.3 Fotochemické přístupy

Jedny z mnoha možných přístupů ke studiu struktury biomolekul jsou metody fotochemické. Biomolekula může být studována metodou fotoafinitního značení nebo pomocí fotoaktivovatelného proteinu, který má inkorporované fotolabilní aminokyseliny. Metoda fotoafinitního značení vychází z přirozené afinity mezi ligandem (např. substrátem) a receptorem (např. enzymem). Molekula jednoho z vazebných partnerů je substituována skupinou, která po aktivaci zářením vhodné vlnové délky vytvoří kovalentní komplex s druhým vazebným partnerem [29]. Můžeme tuto metodu využít jak ke studiu aktivního centra biomolekuly, tak například ke studiu topologie membránových proteinů.

Ideální fotoafinitní sonda by měla splňovat několik kritérií [29]:

1. Světelná aktivace fotolabilní skupiny by měla probíhat při ozařování vhodnými vlnovými délkami, které závažně nepoškozují biomolekuly. Relativně bezpečné je světlo vlnových délek vyšších než 300 nm.
2. Sonda by měla být co možná nejvíce podobná původní sloučenině.

3. Inermediáty vznikající fotolýzou sondy by měly být vysoce reaktivní, minimálně selektivní a neměly by podléhat přesmykům na méně reaktivní deriváty.
4. Sonda by měla být stabilní a chemicky inertní v experimentálních podmínkách a při skladování.
5. Fotolabilní sloučenina by měla být jednoduše synteticky dostupná.
6. Kovalentní vazby vznikající po fotoaktivaci by měly být stabilní při použití běžných separačních a charakterizačních metod.

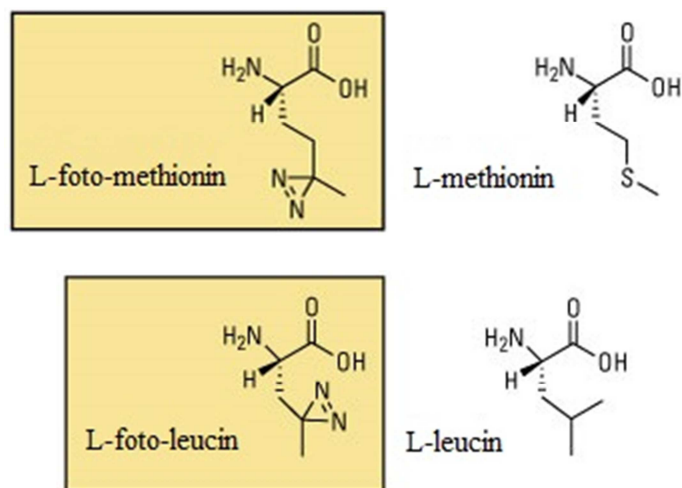
Žádná fotoafinitní sonda nesplňuje všechna kritéria. Většinou je nutné přistoupit ke kompromisu, který vyhovuje zamýšlenému použití.

1.3.1 Inkorporace fotolabilních aminokyselin do cytochromu P450

Jak již bylo zmíněno, proteinů, které obsahují fotoaktivovatelné aminokyseliny, lze využít ke studiu protein-proteinových interakcí. Pomocí fotoaktivovatelného cytochromu P450 můžeme studovat funkční komplexy MFO systému vznikající během monooxygenasové reakce.

Zabudování modifikovaných aminokyselin do proteinu jsou u eukaryotních buněk velmi vzácné a nelze je provádět bez modifikace translačního aparátu [30]. Proto se inkorporace modifikovaných aminokyselin omezuje pouze na bakterie a je založená na mimořádné nespecifitě methionin-tRNA synthetasy (MetRS) [31]. Při expresi fotoaktivovatelného proteinu v prokaryotické buňce tedy není třeba úprava tRNA ani tRNA synthetasy, čehož se využívá k inkorporaci fotolabilních aminokyselin, analogů leucinu a methioninu [31]. Fotolabilní aminokyseliny, L-foto-leucin a L-foto-methionin (obr. 4, strana 16), obsahují diazirinový kruh, který se po aktivaci UV zářením změní na velmi reaktivní karben, který poté reaguje s nejbližší molekulou.

„Cross-linky“ vznikající fotoaktivací je pak možné dále analyzovat např. hmotnostní spektrometrií a zjistit tak orientaci značeného proteinu vůči jeho reakčním partnerům.



Obr. 4: Struktury fotolabilních aminokyselin. Převzato a upraveno z [32].

Aby se předcházelo kompetici mezi přirozenými a fotolabilními aminokyselinami, musí být při produkci fotoaktivovatelného proteinu použito tzv. limitní medium, které neobsahuje L-methionin a L-leucin. Nedostatek těchto dvou esenciálních aminokyselin má bohužel za následek fakt, že dochází k redukci biosyntézy proteinů [31].

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo vypracovat optimální protokol pro expresi králíčího cytochromu P450 2B4, který bude dále využitelný pro expresi fotoaktivovatelného cytochromu P450 jako sondy pro studium proteinových interakcí v MFO systému.

Pro splnění tohoto cíle bylo zapotřebí:

- vyhledat vhodný produkční bakteriální kmen
- optimalizovat produkční podmínky
- vypracovat metodiku stanovení cytochromu P450 přímo v bakteriální buňce
- navrhnout a ověřit postup izolace cytochromu P450 2B4 z bakteriálních buněk

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Duchefa Biochemie, Holandsko	Carbenicilin disodium, Ampicilin sodium
Fermentas, Kanada	Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – barevný standard pro metodu „western blotting“; Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder – standard pro elektroforézu
Fluka, Švýcarsko	akrylamid; dodecylsulfát sodný (SDS); 2-merkaptoethanol; N,N-methylen-bisakrylamid (BIS); tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
Lachema Brno/Lachner, ČR	KH ₂ PO ₄ ; EDTANa ₂ (Chelaton 3); glycerol; ethanol; methanol; kyselina octová; NaHCO ₃ ; Na ₂ CO ₃ ; vlnan sodný; Na ₂ S ₂ O ₄ ; bromfenolová modř; Na ₂ HPO ₄ .10 H ₂ O; NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O; NaOH; KOH; NaCl; persíran amonný
Linde, ČR	dusík (g); oxid uhličitý (g)
Lucigen, USA	bakteriální kmen Escherichia coli C41 (DE3)
Millipore corp., USA	nitroceluloseová membrána
Reanal Budapešť, Maďarsko	glycin
Roche Diagnostic, Německo	Complete mini protease inhibitor – tablety proteázových inhibitorů
Serva, Německo	Yeast extract SERVABACTER powder; Trypton from casein pancreatic; Lysozyme from chicken egg white; Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB); N, N, N', N'-tetramethyldiamin (TEMED); triton X-100
Sigma, USA	Luria agar; isopropyl-β-D-galaktopyranosid (IPTG); cholát sodný; Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) – Alkaline Phosphatase, antibody produced in rabbit – sekundární protilátka s navázanou alkalickou fosfatázou; BCIP®/NBT Alkaline Phosphatase Substrate – tablety se substrátem pro alkalickou fosfatázu; Tergitol NP-10

Stratagene, USA bakteriální kmen *Escherichia coli* BL21 (DE3) Gold
Whatman, USA chromatografický papír č.3, nitrocelulózová membrána

Další materiál:

- Plasmid pLW01 s genem pro králičí cytochrom P450 2B4 byl darován Prof. Lucy Waskel z University od Michigan
- Standard cytochromu P450 2B4 byl připravený Monikou Koberovou
- Slepíčí protilátka proti CYP2B4 byla izolována Prof. Petrem Hodkem

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy	40 SM-200A (Pesa), HM-200 (A&D Instruments LTD)
Předvážky	440-35-N (Kern), EW 600-2M (Kern)
Centrifugy	OPTIMA LE-80K (Beckman), Eppendorf 5415 R (Eppendorf), K70D (Janetzki), Hermle Z 383 K, stolní minicentrifuga (Labnet), stolní minicentrifuga Gilson (GmC Lab)
Inkubátory	IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator (Flow Laboratories), ORBI-SAFE TS Netwise (Gallenkamp), G24 Environmental inkubátor Shaker (New Brunswick Scientific)
Vodní lázeň	Julabo TW2 (Biotech)
Spektrofotometry	SPEKOL 11 (Carl Zeis Jena), SPECORD M40 (Carl Zeis Jena)
Elektroforetická aparatura	Hoefler MiniVE vertical electrophoresis system (Amersham Biosciences)
Zdroj pro elektroforézu	EPS 301 Electrophoresis Power Supply (Amersham Pharma Biotech)
WB aparatura	Whatman Fastblot (Biometra)
Vakuová prosávací aparatura	Snap i.d. (Millipore)
Ultrazvuková sonda	Sonoplus HD 3100 (Bandelin)

Čtečka mikrotitračních destiček	Sunrise (Tecan)
Stolní třepačky	Yellow line OS2 basic (IKA), Minishaker (VWR)
Další	pH metr model 370 (Ati Orion), bezdotykový kahan Gasprofi2 SCS (VLD-TEC), laminární box BIO 126 (Labox), autokláv Varioklav 400 (H+P Labortechnik), automatické pipety BIOHIT, homogenizátor dle Pottera a Elvehjema,

3.3 Metody

3.3.1 Analytické metody

3.3.1.1 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Tato metoda je založena na principu měření diferenčních spekter vzorků cytochromu P450 redukovaných pomocí dithioničitanu sodného v komplexu s CO. (Omura, Sato, 1964, J Biol Chem)

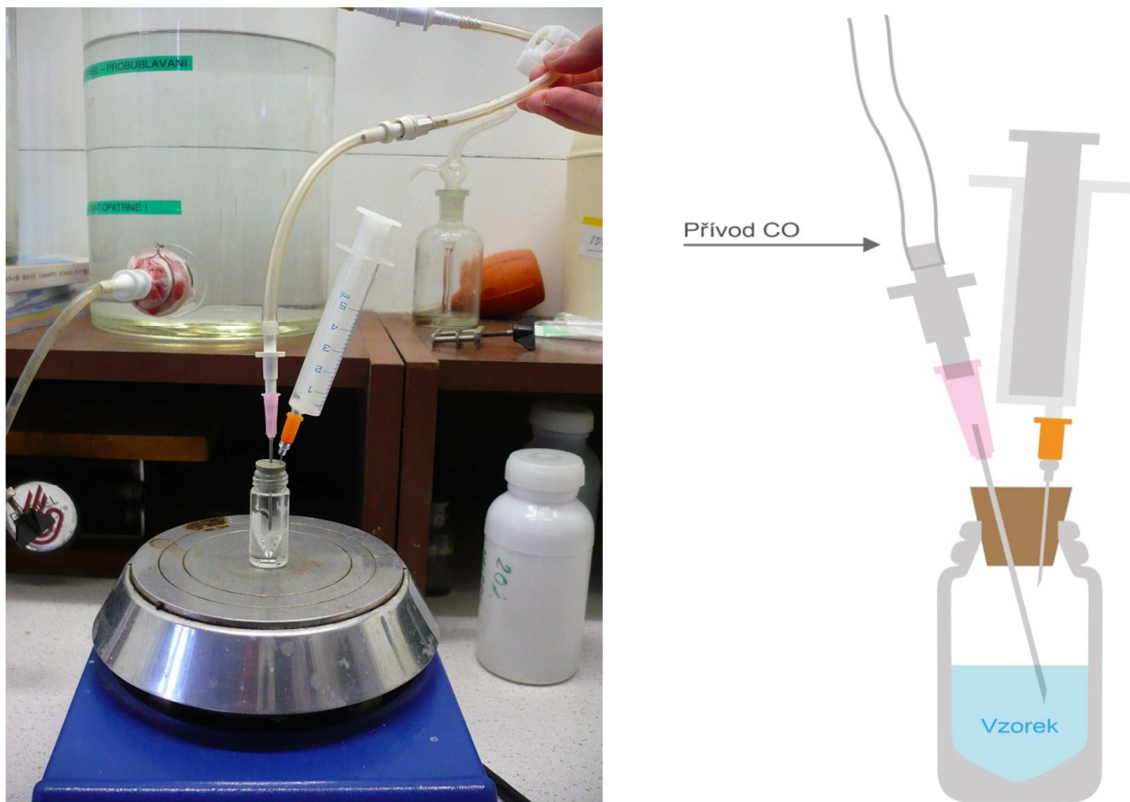
Do plastové mikrozkušavky byl odměřen vzorek a zředěn fosfátovým pufrům (0,1 M K/PO₄, 2% (v/v) glycerol, pH 7,4) do celkového objemu 2 ml. Z tohoto vzorku bylo odebráno 1,9 ml do jiné mikrozkušavky a k němu přidáno 100 µl roztoku dithioničitanu sodného (16 mg/ml), aby výsledná koncentrace dithioničitanu sodného byla 0,8 mg/ml. Poté byl roztok promíchán pomocí automatické pipety a rozdělen do dvou maskovaných semimikro-kyvet o optické dráze 1 cm. Na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M40 byla registrována základní linie v rozmezí vlnových délek 402 až 490 nm. Ze vzorkové kyvety byl roztok převeden do skleněné lahvičky uzavřené gumovou zátkou se zavedenou jehlou a injekční stříkačkou (viz obr. 5, strana 21) a probublán regulovaným proudem CO pomocí injekční stříkačky.

Celkový objem nasátého CO byl 4 ml a roztok byl poté ponechán ještě cca minutu pod atmosférou CO. Následně byl vzorek opět převeden do vzorkové kyvety a bylo proměřeno diferenční spektrum v rozmezí 402 až 490 nm.

Koncentrace CO byla spočítána dle následujícího vzorce:

$$c_{450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\varepsilon_{450} \cdot l} \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}],$$

kde A_x je absorbance při vlnové délce x nm, ϵ_{450} je molární absorpční koeficient cytochromu P450 ($\epsilon_{450} = 0,091 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm}^{-1}$) a l optická dráha [cm].



Obr. 5: Použitá aparatura na probublání CO vzorkem a) fotografie aparatury; b) schématický náčrt

3.3.1.2 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Tato metoda je založena na redukci kationtů Cu^{2+} na Cu^+ postranními skupinami některých aminokyselin v alkalickém prostředí. K barevné detekci měďných kationtů se využívá bicinchoninová kyselina (BCA), která je schopná je chelatovat [33].

K tomuto stanovení byla použita souprava „Perce Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible“ obsahující „BCA Reagent A“, „BCA Reagent B“ a „Compatibility Reagent Solution“, v níž byl „BCA Reagent A“ nahrazen laboratorně připraveným roztokem [34].

Nejprve byly roztoky vzorků naředěny pětkrát, desetkrát a dvacetkrát. Poté bylo do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky pipetováno 9 μl vody, standardů BSA nebo vzorků dle předem připraveného schématu. Standardy BSA o koncentracích 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ byly pipetovány v „dubletech“, vzorky a voda v „tripletech“. Poté byly do každé jamky přidány 4 μl „Compatibility Reagent Solution“, destička byla

promíchána na stolní třepače po dobu cca 1 minuty a poté 15 minut inkubována při 37°C. Mezitím bylo připraveno činidlo A, 1 % roztok BCA, rozpuštěním 0,1 g BCA v 10 ml roztoku A (0,4 % NaOH; 0,95 % NaHCO₃; 2 % Na₂CO₃.H₂O; 0,16 % vínan sodný; pH 11,5). K 10 ml činidla A bylo přidáno 200 µl „BCA Reagent B“, promícháno a do každé jamky destičky bylo pipetováno 260 µl. Poté byla destička opět promíchána po dobu cca 1 minuty a inkubována 30 minut při 37°C. Po vyjmutí z inkubátoru byla destička nechána přibližně 5 minut za laboratorní teploty zchladnout a poté bylo ke stanovení proteinů použito elektronické čtečky mikrotitračních destiček za pomoci programu Kim.

3.3.2 Příprava rekombinantního cytochromu P450 2B4

3.3.2.1 Transformace plazmidu pLW01

Kompetentní buňky *Escherichia coli* C41 (DE3) a *Escherichia coli* BL21 (DE3) Gold připravené metodou chloridu vápenatého byly rozmrazeny a ponechány na ledu. Do čtyř připravených mikrozkušavek bylo napipetováno po 100 µl suspenze kompetentních buněk, vždy jedna mikrozkušavka pro transformaci a jedna jako kontrola. Ke kmenu BL21 (DE3) Gold byl přidán 1 µl plazmidu pLW01 ($c_{DNA} \doteq 0,080 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), ke kmenu C41 (DE3) bylo přidání 0,7 µl téhož plazmidu. Poté byly mikrozkušavky nechány ještě půl hodiny na ledu. Následně byly buňky vystaveny teplotě 42°C po dobu 45 sekund (tepelný šok) a poté ponechány 2 minuty na ledu. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 300 µl sterilního chlazeného LB media. Vzorky byly poté třepány 1 hodinu při 37°C. Mezitím byly připraveny 4 agarové plotny s obsahem ampicilinu 100 µg.ml⁻¹. Po uplynutí 1 hodiny byly suspenze buněk rozetřeny hokejkou na agaru a plotny nechány ve 37°C přes noc.

3.3.2.2 „Overnight“ kultura

Z obou agarových ploten byla sterilním párátkem napíchnuta osamocená kolonie a párátka přeneseno do nádoby typu Falcon s 10 ml TB media, které obsahovalo ampicilin o koncentraci 100 µg.ml⁻¹. Zavíčkované nádoby s mírně povoleným víčkem byly přes noc třepány při 37°C. Druhý den bylo 5 ml „overnight“ kultury přeneseno do 500 ml vytemperovaného (37°C) sterilního TB media, které obsahovalo karbenicilin o koncentraci 100 µg.ml⁻¹, a necháno třepat při 30°C a 220 rpm.

3.3.2.3 Produkce cytochromu P450 2B4

Po dosažení optické denzity při 600 nm (= absorbance suspenze při 600 nm) přibližně 4 bylo k bakteriální suspenzi nejprve přidáno 500 μ l 0,5 M δ -ALA, promícháno a teprve poté byla produkce cytochromu indukována přidáním 350 μ l 1M IPTG. Následně byla kultura nechána třepat při 23°C a 140 rpm po dobu 96 hodin. V průběhu třepání byly odebírány vzorky po 6 hodinách pro měření optické denzity při 600 nm a stanovení cytochromu P450 ve formě CO-redukovaného komplexu. Po uplynutí 96 hodin byly bakteriální suspenze centrifugovány 20 minut při cca 3000 rpm. Peleta byla resuspendována v 20 ml fosfátového pufru s 20 % (v/v) glycerolem a zmražena na -80°C.

3.3.3 Elektroforetické metody

3.3.3.1 SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Používané roztoky:

Pufir A	0,375 M Tris-HCl; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8
Polymerační roztok A	30 % (w/v) akrylamid; 0,8 % (w/v) BIS v pufru A
Pufir B	0,125 M Tris-HCl; 0,1 % (w/v) SDS; 0,0006 % bromfenolová modř; pH 6,8
Polymerační roztok B	30 % (w/v) akrylamid; 0,8 % (w/v) BIS v pufru B
Vzorkový pufr	0,025 M Tris-HCl; 8 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) glycerol; 20 % (v/v) merkaptoethanol; 0,004 % (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8
Elektrodový pufr	0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3
Barvicí lázeň	0,25 % (w/v) Comassie 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
10 % separační gel	5 ml pufru A; 2,5 ml polymeračního roztoku A; 7,5 μ l TEMED; 75 μ l persíranu amonného (100 mg.ml ⁻¹)
3 % zaostřovací gel	2,25 ml pufru B; 250 μ l polymeračního roztoku B; 2,5 μ l TEMED; 50 μ l persíranu amonného (100 mg.ml ⁻¹)

Tato elektroforetická metoda byla prováděna podle postupu popsáního v původní práci Laemmliho [35].

Uvedené postupy jsou pro jeden polyakrylamidový gel, při přípravě více gelů bylo postupováno analogicky.

Dvě elektroforetická skla o rozměrech 10x10 cm byla pečlivě umyta, otřena ethanolem a vložena do elektroforetické aparatury, kde byla uchycena držáky. Byl připraven 10 % separační gel smícháním polymeračního roztoku A, pufru A, TEMED a persíranu amonného. Okamžitě po přidání persíranu byl roztok nalit mezi skla a opatrně převrstven destilovanou vodou, aby gel zpolymeroval vodorovně. Po ztuhnutí gelu byla voda odlita a její zbytky odsáty pomocí filtračního papíru. Následně byl připraven 3 % zaostřovací gel smícháním polymeračního roztoku B, pufru B, TEMED a persíranu amonného. Okamžitě po přidání persíranu byl roztok navrstven na separační gel a vložen 15-jamkový nebo 10-jamkový hřeben pro vytvoření jamek pro vzorky. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a horní elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrem.

Vzorky pro srovnání produkce cytochromu P450 2B4 byly naředěny destilovanou vodou na přibližně stejný počet buněk a doplněny na 45 μ l destilovanou vodou. Do všech vzorků bylo přidáno 15 μ l čtyřikrát koncentrovaného vzorkového pufru a vzorky byly povařeny 5 minut na vodní lázni. Po povaření byly vzorky krátce centrifugovány na stolní minicentrifuze. Do jamek zaostřovacího gelu bylo nanášeno 15 μ l takto připravených vzorků pomocí mikrostříkačky.

Vzorky pro porovnání účinnosti solubilizace byly naředěny na stejnou koncentraci, přibližně 5 mg/ml. Bylo připraveno 30 μ l každého vzorku, ke kterým bylo přidáno 10 μ l čtyřikrát koncentrovaného vzorkového pufru. Následně byly vzorky 5 minut povařeny na vodní lázni a krátce centrifugovány na stolní minicentrifuze. Do jamek zaostřovacího gelu bylo nanášeno 10 μ l vzorku pomocí mikrostříkačky.

Skleněné desky s gely a s nanesenými vzorky byly přemístěny do elektroforetické vany, která obsahovala spodní elektrodový pufr. Po uzavření celé aparatury probíhala elektroforéza nejprve 30 minut při napětí 80 V, které bylo následně zvýšeno na 150 V. Ukončení elektroforézy bylo provedeno, když čelo obsahující bromfenolovou modř dosáhlo ke spodnímu okraji separačního gelu. Skla byla z aparatury vyjmuta, zaostřovací gel byl odstraněn a separační gel byl přenesen do barvicí lázně, kde se za stálého míchání barvil přibližně hodinu. Poté byl gel přenesen do odbarvovací lázně a ponechán odbarvovat přes noc. V případě neúplného odbarvení byla druhý den odbarvovací lázeň vyměněna.

3.3.3.2 Metoda „Western blotting“

Přenosový pufr	0,025 M Tris; 0,192 M glycin; pH 8,3
PBS Triton X-100	0,134 NaCl; 1 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O; 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ ·10H ₂ O; 0,3 % (w/v) Triton X-100; pH 7,2
Blokovací roztok	5 % (w/v) sušené odtučněné mléko v PBS Triton X-100

Metodě „Western blotting“ předchází elektroforéza, po které se gel inkubuje přibližně 15 minut v přenosovém pufru s 10 % methanolem.

Při elektropřenosu byla použita nitrocelulózová membrána, která byla opatrně smočena ve vodě a poté přemístěna na několik minut do přenosového pufru. Chromatografické papíry (Whatman 3) ve velikosti odpovídající gelu byly smočeny v přenosovém pufru. Do aparatury pro elektropřenos byly umístěny 3 vrstvy chromatografického papíru, membrána, na ní pak gel a nakonec se vše překrylo opět 3 vrstvami smočeného chromatografického papíru. Vrstvy byly opatrně uhlazeny válečkem pro odstranění případných bublinek. Elektropřenos byl prováděn 40 minut při proudové hustotě 3,5 mA na 1 cm² membrány.

Po skončení byla membrána přemístěna do Petriho misky a ponechána za stálého míchání v blokovacím roztoku přes noc v 6°C. Druhý den byl blokový roztok odlit a membrána byla ponechána inkubovat se specifickou primární slepičí protilátkou proti CYP2B4 (15 µg/ml) po dobu 2 hodin za stálého míchání při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opláchnuta PBS Triton X-100, přemístěna do prosávacího zařízení SNAP a promyta třikrát 15 ml PBS Triton X-100. Následně byly na membránu navrstveny automatickou pipetou 2 ml sekundární králičí protilátky IgG proti slepičí IgY s navázanou alkalickou fosfatou (ředění: 1 µl sekundární protilátky na 1,5 ml PBS Triton X-100) a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byla membrána opět promyta třikrát 15 ml PBS Triton X-100, vyjmuta z prosávacího zařízení a vyvolána roztokem substrátu pro alkalickou fosfatase (BCIP/NBT) – 1 tableta v 10 ml destilované vody.

3.3.4 Solubilizace cytochromu P450 2B4 z bakteriálních buněk

Peleta bakteriálních buněk z konce produkce byla rozmrazena, centrifugována 15 minut při 5000 RPM a oddělena od supernatantu. Z pelety byly odebrány 4 gramy biomasy a resuspendovány v 25 ml pufru (100 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, 0,4 % (w/v) Tergitol NP-10, 0,1 mg/ml DTT, pH 7,7), do kterého byly přidány proteasové inhibitory („Complete mini“, 2 tablety na 50 ml pufru) a lysozym (8 mg na 50 ml pufru). Tato směs

byla přelita do malých Erlenmayerových baněk (100 ml) a míchána 1 hodinu na ledu pod atmosférou N₂. Směs byla přelita do zkumavky Falcon (50 ml), zmrazena na -20°C, znovu rozmrazena a poté sonikována 5 minut ve vodním sonikátoru s ledem. Následně byly buňky za chlazení ledem a pod atmosférou N₂ desintegrovány pomocí tyčového sonikátoru se sondou KE 76 ponořenou ve vzorku (6 sonikačních cyklů po 30 s, 5 minutové ochlazení po každém cyklu). Zbytky buněk a nerozrušené buňky byly odstraněny centrifugací – 15 minut při 5000 RPM. Na základě stanovení koncentrace proteinů v supernatantu metodou BCA, byl supernatant naředěn na koncentraci 6 mg/ml pufrům (100 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, 0,4 % Tergitol NP-10 (w/v), 0,1 mg/ml DTT, pH 7,7) a ponechán v chlazené místnosti na ledu do druhého dne.

Následně byl do suspenze za stálého míchání přikapán 10 % cholát sodný (w/v) do výsledné koncentrace 1,5 % (w/v). Solubilizace probíhala pod atmosférou N₂ a za stálého míchání po dobu 2 hodin. Nerozpuštěné podíly byly odstraněny centrifugací – 75 minut, 60 000 RPM. K supernatantu byl přidán glycerol do výsledné koncentrace 15 % (v/v) a supernatant byl zmražen kapalným N₂ a uchován pro další zpracování. Peleta byla resuspendována v 25 ml fosfátového pufru (0,1 M K/PO₄, 20% (v/v) glycerol, pH 7,4) a zamražena.

4 VÝSLEDKY

V rámci této bakalářské práce bylo provedeno několik produkcí cytochromu P450 2B4 porovnávající vůči sobě dva bakteriální kmeny, *Escherichia coli* BL21(DE3) Gold a *Escherichia coli* C41(DE3), a dvě různá kultivační uspořádání, skleněnou Erlenmayerovu baňku a Fernbachovu baňku vyrobenou z polykarbonátu (obr. 6).



Obr. 6: Použité kultivační nádoby

Produkce probíhala po dobu 4 dní (96 hodin) dle publikovaného postupu. Změnou oproti původnímu postupu bylo přidání 0,5 mM δ -aminolevulové kyseliny až těsně před tím, než byla indukována produkce po dosažení optické denzity (absorbance při 600 nm) $A_{600} = 4$ přidáním IPTG do výsledné koncentrace 0,7 mM.

4.1 Optimalizace stanovení cytochromu v bakteriálních buňkách

Při první produkci prováděné na kmenu *E.coli* C41(DE3) byla optimalizována technika probublávání vzorku bakteriální suspenze oxidem uhelnatým. Bylo vůči sobě porovnáváno klasické bublání po dobu 45 sekund pomocí jehly ponořené do bakteriální suspenze a

bublání v uzavřené nádobce, kdy objem přivedeného CO byl regulován posunem pístu připojené injekční stříkačky (viz kap. 3.3.1.1).

Tabulka č. 1: Hodnoty koncentrace cytochromu P450 kmenem *E. coli* C41(DE3)

čas (hod)	způsob probublávání	c _{CYP} (nmol/ml)
54	klasicky	405
	uzavřená nádobka	532
60	klasicky	462
	uzavřená nádobka	473
72	klasicky	558
	uzavřená nádobka	596
78	klasicky	516
	uzavřená nádobka	711
84	klasicky	533
	uzavřená nádobka	638

Produkce probíhala v Erlenmayerových baňkách. c_{CYP} je koncentrace cytochromu P450. Klasický způsob probublávání byl prováděn pomocí jehly ponořené do bakteriální suspenze.

Z porovnání hodnot (tabulky č. 1) je patrné, že zavádění CO do uzavřené nádoby je účinnější a je tímto způsobem možné lépe vytvořit CO komplex s redukováným cytochromem P450 obsaženým v bakteriálních buňkách.

4.2 Produkce cytochromu P450 2B4

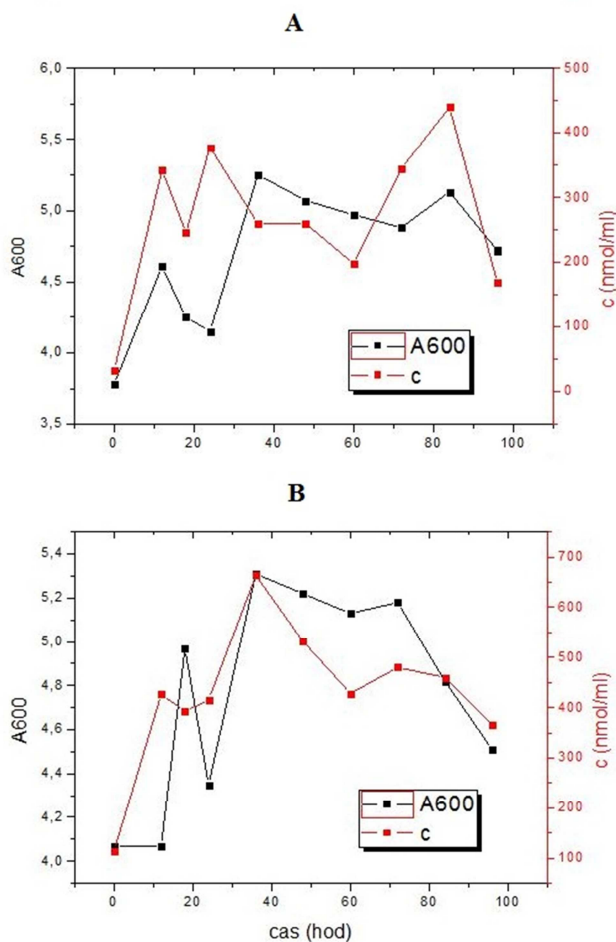
Další produkce již zahrnovala oba bakteriální kmeny. V průběhu produkce byla měřena optická denzita bakteriálních kultur (absorbance při 600 nm) a pomocí CO spektrér zjišťována koncentrace cytochromu P450 (kap. 3.3.1.1).

Produkce byla prováděna v Erlenmayerových baňkách (Tabulka č. 2, Obrázek 7, strana 29) a ve Fernbachových baňkách (Tabulka č. 3, Obrázek 8, strana 30). Indukce proběhla bezprostředně po naměření hodnot v čase 0.

Tabulka č. 2: Hodnoty absorbancí při 600 nm a koncentrací CYP 2B4 v průběhu produkce pro bakteriálními kmeny *E.coli* C41 (DE3) a BL21 (DE3) Gold.

C41 (DE3)			BL21 (DE3) Gold		
hod	A_{600}	c_{CYP} (nmol/ml)	hod	A_{600}	c_{CYP} (nmol/ml)
0	3,78	32	0	4,07	114
6	4,01	365	6	4,40	245
12	4,61	343	12	4,07	426
18	4,25	246	18	4,97	393
24	4,15	378	24	4,35	415
36	5,25	260	36	5,31	664
48	5,07	260	48	5,22	532
60	4,97	198	60	5,13	428
72	4,88	345	72	5,18	480
84	5,13	440	84	4,82	460
96	4,72	169	96	4,51	365

Produkce probíhala v Erlenmayerových baňkách. c_{CYP} – koncentrace cytochromu P450, A_{600} – absorbance při 600 nm.

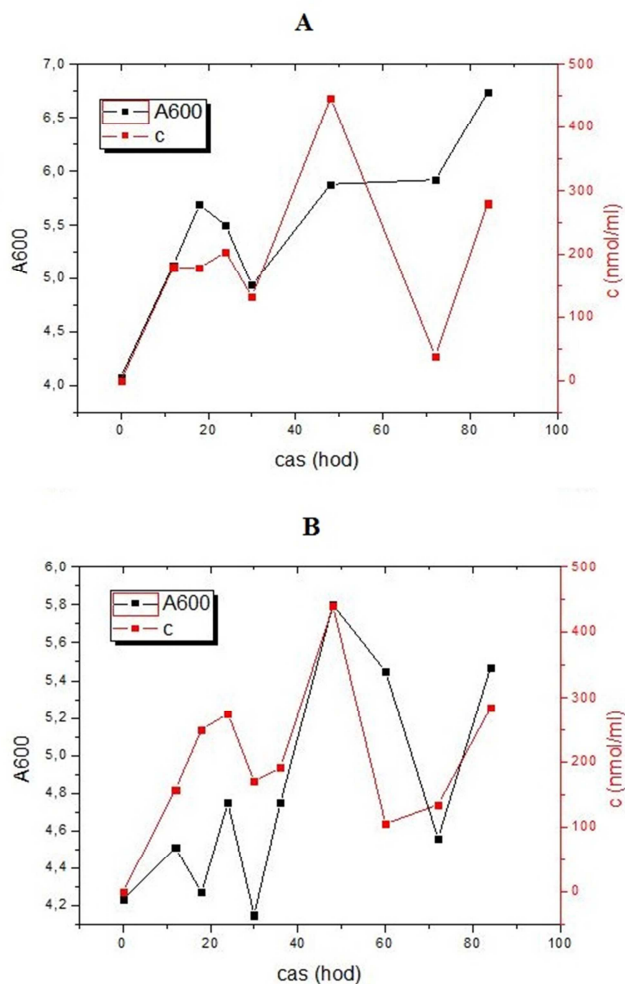


Obrázek 7: Grafy závislostí optických denzit a koncentrací CYP na době kultivace. Kultivace *E.coli* A) C41 (DE3); B) BL21 (DE3) Gold, která probíhala v Erlenmayerových baňkách. c – koncentrace cytochromu P450, A_{600} – absorbance při 600 nm.

Tabulka č. 3: Hodnoty absorbcí při 600 nm a koncentrací CYP 2B4 v průběhu produkce pro bakteriální kmeny *E.coli* C41 (DE3) a BL21 (DE3) Gold.

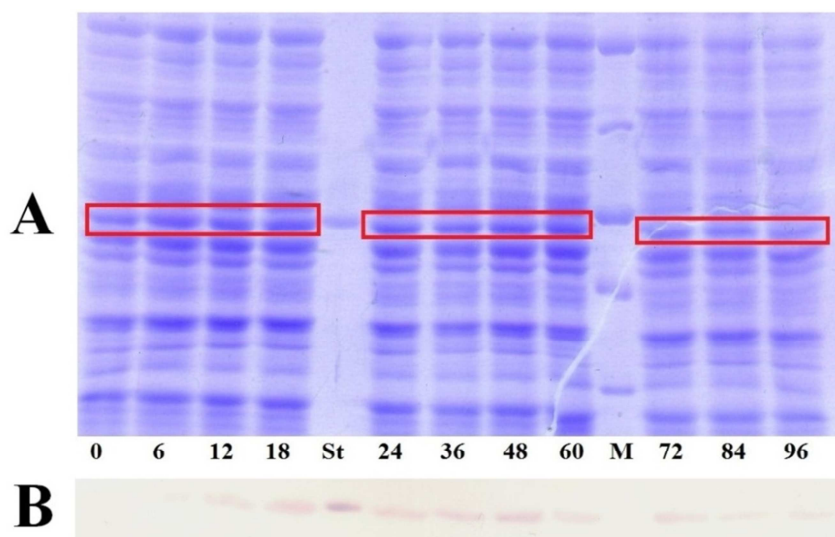
C41 (DE3)			BL21 (DE3) Gold		
hod	A_{600}	c_{CYP} (nmol/ml)	hod	A_{600}	c_{CYP} (nmol/ml)
6	3,9	160	6	4,5	116
12	5,13	180	12	4,51	158
18	5,69	169	18	4,27	251
24	5,5	204	24	4,75	275
30	4,94	133	30	4,15	171
36	5,9	ND	36	4,75	192
48	5,88	447	48	5,8	440
60	6,08	ND	60	5,45	106
72	5,92	39	72	4,56	135
84	6,74	280	84	5,47	284

Produkce probíhala ve Fernbachových baňkách. c_{CYP} – koncentrace cytochromu P450, A_{600} – absorpance při 600 nm, ND – hodnota nebyla naměřená.

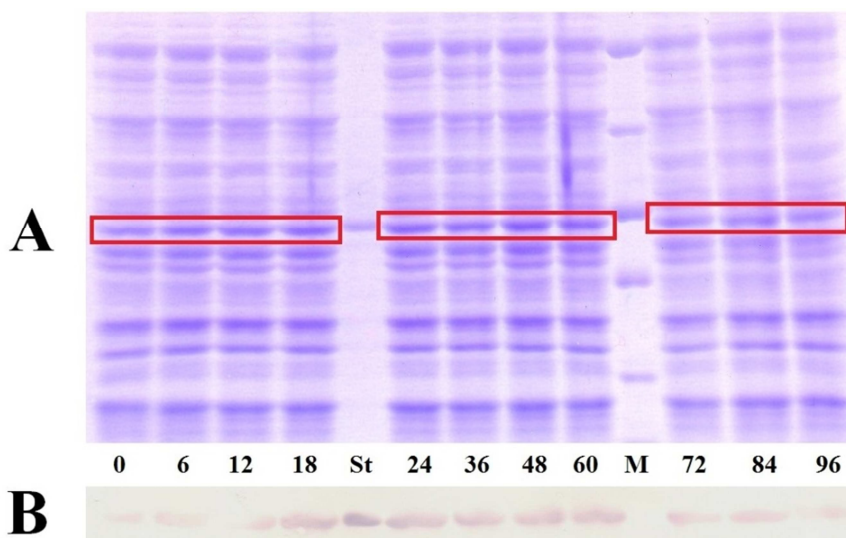


Obr. 8: Grafy závislosti optických denzit a koncentrací CYP na době kultivace. Kultivace *E.coli* A) C41 (DE3); B) BL21(DE3) Gold, která probíhala ve Fernbachových baňkách. c – koncentrace cytochromu P450, A_{600} – absorpance při 600 nm.

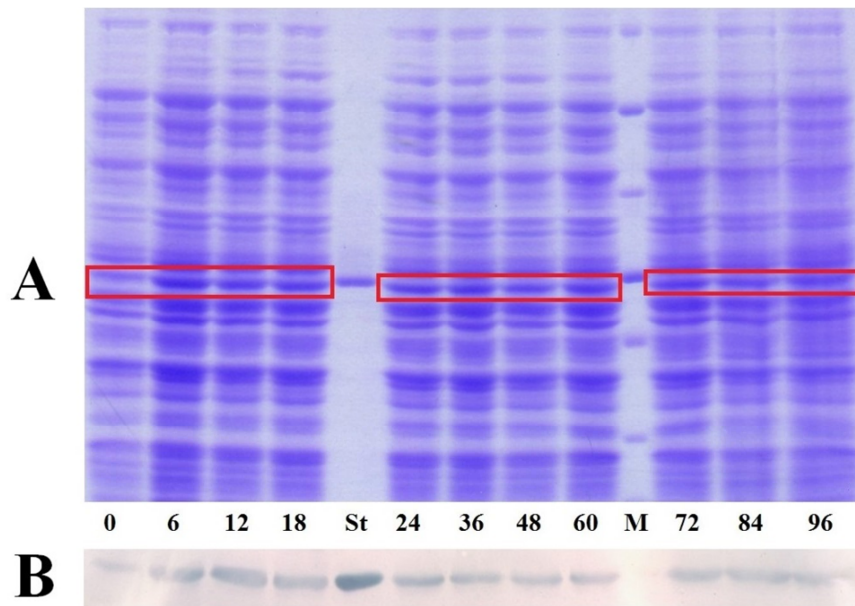
V průběhu produkce byly současně s měřením optické denzity a koncentrace CYP odebírány vzorky na elektroforetické vyhodnocení. Tyto vzorky byly následně naředěny na přibližně stejný počet buněk (kap. 3.3.3.1). Po elektroforéze byl proveden také elektropřenos pomocí metody „Western blotting“ a vizualizace zón cytochromu P450 2B4 imunodetekcí specifickou slepičí protilátkou (obr. 9, obr. 10 a obr. 11, obr. 12, strana 32).



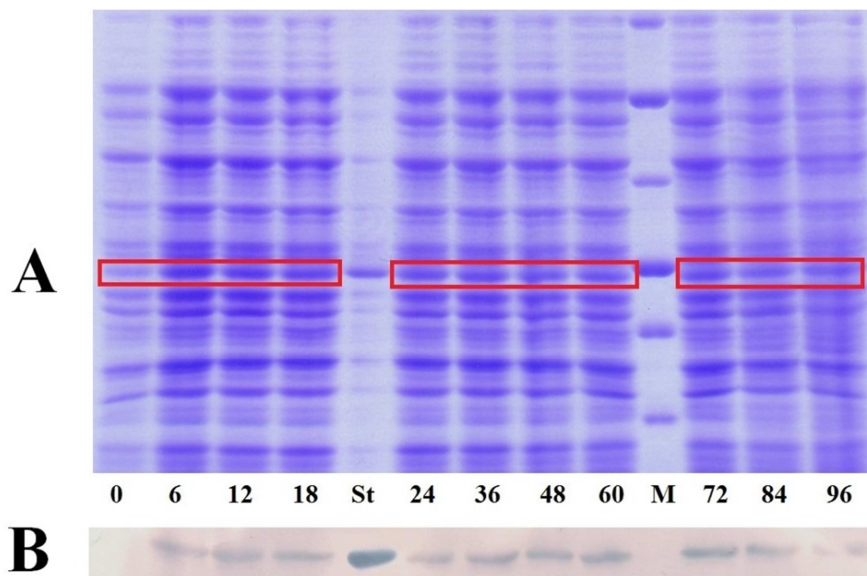
Obr. 9: Průběh produkce cytochromu P450 2B4 v bakteriálním kmenu *E.coli* C41 (DE3) v Erlenmayerově baňce. Panel A: SDS Elektroforéza; Panel B: imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou. Čísla značí počet hodin produkce, při kterých byly vzorky odebírány. St – standard CYP 2B4, M – proteinový marker (Thermo Scientific). Rámečky vyznačují zóny, ve kterých se nachází CYP 2B4.



Obr. 10: Průběh produkce cytochromu P450 2B4 v bakteriálním kmenu *E.coli* BL21 (DE3) Gold v Erlenmayerově baňce. Panel A: SDS Elektroforéza; Panel B: imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou. Čísla značí počet hodin produkce, při kterých byly vzorky odebírány. St – standard CYP 2B4, M – proteinový marker (Thermo Scientific). Rámečky vyznačují zóny, ve kterých se nachází CYP 2B4.



Obr. 11: Průběh produkce cytochromu P450 2B4 v bakteriálním kmenu *E.coli* C41 (DE3) ve Fernbachově baňce. Panel A: SDS Elektroforéza; Panel B: imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou. Čísla značí počet hodin produkce, při kterých byly vzorky odebírány. St – standard CYP 2B4, M – proteinový marker (Thermo Scientific). Rámečky vyznačují zóny, ve kterých se nachází CYP 2B4.



Obr. 12: Průběh produkce cytochromu P450 2B4 v bakteriálním kmenu *E.coli* BL21 (DE3) Gold ve Fernbachově baňce. Panel A: SDS Elektroforéza; Panel B: imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou. Čísla značí počet hodin produkce, při kterých byly vzorky odebírány. St – standard CYP 2B4, M – proteinový marker (Thermo Scientific). Rámečky vyznačují zóny, ve kterých se nachází CYP 2B4.

Po 96 hodinách kultivace byla produkce cytochromu P450 2B4 ukončena a pro oddělení bakteriálních buněk od media byla bakteriální suspenze centrifugována. Výsledné množství získaných buněk bylo zváženo (Tabulka č. 4) a uchováno pro následnou solubilizaci.

Tabulka č.4: Hmotnost bakteriálních buněk po skončení produkce

baňka	bakteriální kmen	m_b (g)
Erlenmayerova	C41 (DE3)	14,95
	BL21 (DE3)	13,27
Fernbachova	C41 (DE3)	24,10
	BL21 (DE3)	20,99

m_b – hmotnost buněk po skončení produkce

4.3 Solubilizace cytochromu P450 2B4 z bakteriálních buněk

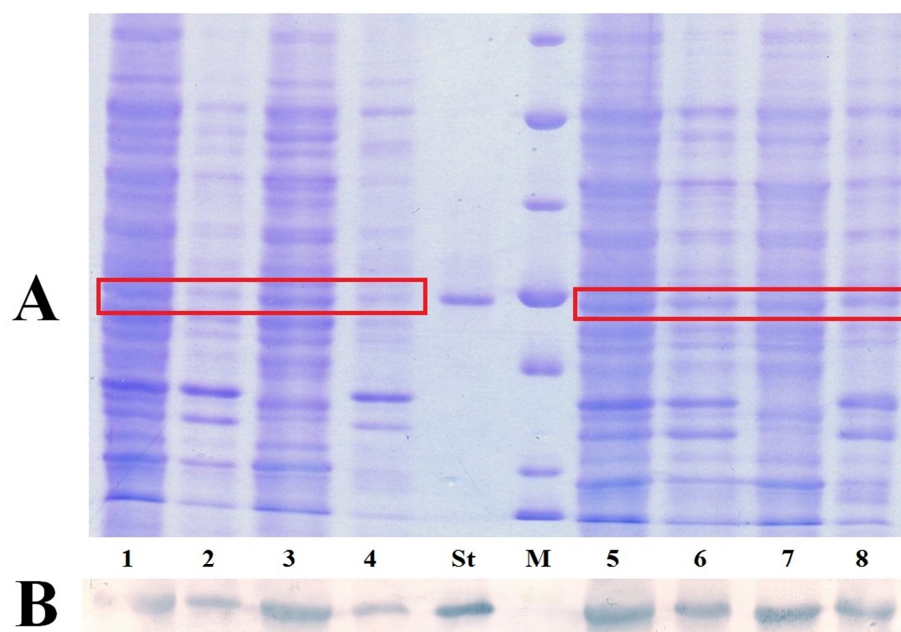
Po heterologní expresi králičího cytochromu P450 2B4 v různých experimentálních uspořádáních byla provedena destrukce bakteriálních buněk a solubilizace. Buněčná stěna byla nejprve narušena lysozymem a pomalým zmražením na -20°C . Následně byly bakteriální buňky rozrušeny sonikací v přítomnosti detergentu (Tergitol NP-10), při které se již částečně solubilizovaly membránové proteiny. Po tomto kroku následovala ještě centrifugace. Pro pokračování solubilizace bylo třeba stanovit obsah proteinů v supernatantu (Tabulka č. 5).

Tabulka č.5: Koncentrace proteinů stanovené metodou BCA v supernatantech

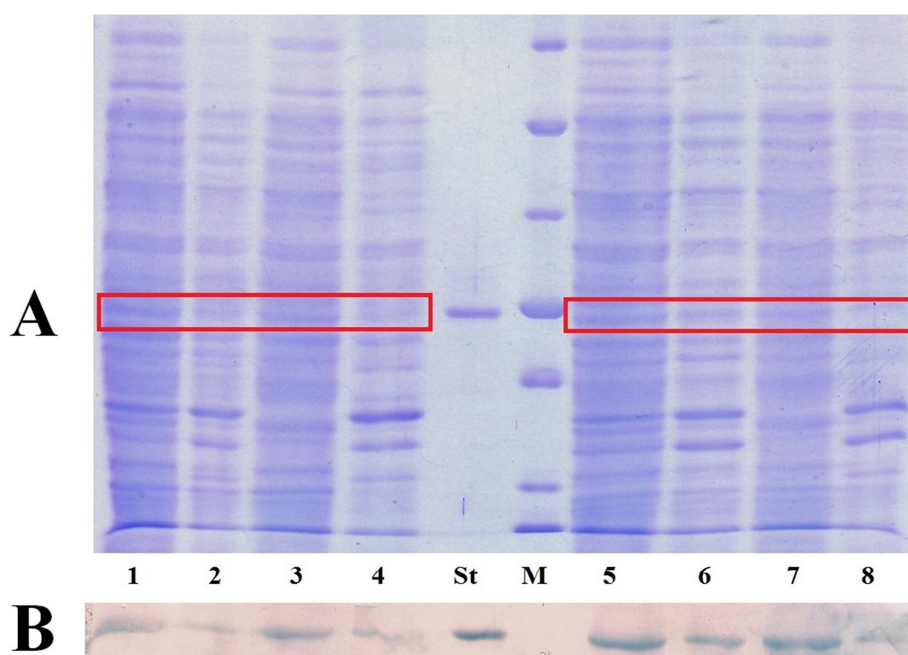
bakteriální kmen	baňka	koncentrace proteinů [mg/ml]
C41 (DE3)	Erlenmayerova	12,0
BL21 (DE3) Gold	Erlenmayerova	15,0
C41 (DE3)	Fernbachova	11,7
BL21 (DE3) Gold	Fernbachova	11,1

Solubilizace byla prováděna ze 4 gramů bakteriálních buněk.

Po skončení solubilizace byla suspenze ultracentrifugována pro oddělení nesolubilních frakcí. Výsledek lyze buněk sonikací a solubilizace je znázorněn na obrázku 13 a obrázku 14, strana 34.



Obr. 13: Výsledky lyze buněk sonikací a solubilizace CYP 2B4 z membrán pro Erlenmayerovy baňky. Panel A: SDS elektroforéza; Panel B: imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou. 1 – 4 C41 (DE3), 5 – 8 BL21 (DE3) Gold. 1,5 – supernatant po lyzi; 2,6 – peleta po lyzi; 3,7 – supernatant po solubilizaci; 4,8 – peleta po solubilizaci; St – standard CYP 2B4; M – proteinový marker (Thermo Scientific). Rámečky vyznačují zóny, ve kterých se nachází CYP 2B4.



Obr. 14: Výsledky lyze buněk sonikací a solubilizace CYP 2B4 z membrán pro Fernbachovy baňky. Panel A: SDS elektroforéza; Panel B: imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou. 1 – 4 C41 (DE3), 5 – 8 BL21 (DE3) Gold. 1,5 – supernatant po lyzi; 2,6 – peleta po lyzi; 3,7 – supernatant po solubilizaci; 4,8 – peleta po solubilizaci; St – standard CYP 2B4; M – proteinový marker (Thermo Scientific). Rámečky vyznačují zóny, ve kterých se nachází CYP 2B4.

Po dokončení solubilizace a následné ultracentrifugaci byla v supernatantu a peletě nakonec stanovena taktéž koncentrace proteinů metodou BCA a změřena koncentrace CYP, ze kterých bylo určeno množství získaného CYP ze 4 gramů bakteriálních buněk (n_{CYP} [nmol]) a celkové množství proteinů obsažených v supernatantu či peletě (m_{prot} [mg]). Tato data pak byla použita pro výpočet specifického obsahu CYP v mg proteinů ($S.O._{CYP}$ [nmol/mg]). Pro srovnání s publikovanými výsledky bylo vypočítáno teoretické množství CYP získané solubilizací 1 litru bakteriální suspenze po 96 hodinách kultivace (n_{teor} [nmol]) (Tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Množství CYP a hmotnost proteinů v supernatantech a peletách po ultracentrifugaci, teoretické množství CYP získané z 1 litru bakteriální suspenze a specifický obsah CYP

<i>baňka</i>	<i>bakteriální kmen</i>	<i>vzorek</i>	n_{CYP} (nmol)	m_{prot} (mg)	n_{teor} (nmol)	$S.O._{CYP}$ (nmol/mg)
Erlenmayerova	C41 (DE3)	sup	13,2	414	112,7	0,0319
		pel	0	37,5	-	-
	BL21 (DE3) Gold	sup	7,05	285	52,5	0,0247
		pel	3,55*	108*	26,6	0,0329
Fernbachova	C41 (DE3)	sup	7,25	289	99,8	0,0254
		pel	0	65	-	-
	BL21 (DE3) Gold	sup	2,06	289	24,4	0,0071
		pel	0	45	-	-

*peleta resuspendována v 25 ml fosfátového pufru s 20 % (v/v) glycerolem a v tomto objemu bylo stanoveno množství CYP a proteinů
sup – supernatant; *pel* – peleta; n_{CYP} – množství CYP získaného solubilizací ze 4 g bakteriálních buněk; m_{prot} – hmotnost proteinů obsažených v supernatantu nebo peletě po ultracentrifugaci; n_{teor} – teoretické množství CYP získané z 1 litru bakteriální suspenze po 96 hodinách kultivace; $S.O._{CYP}$ – specifický obsah CYP v supernatantu nebo peletě po ultracentrifugaci

5 DISKUZE

Úkolem předkládané práce bylo nalezení optimálních podmínek pro expresi cytochromu P450 2B4. Abychom mohli vymezit podmínky, za kterých je možné cytochrom P450 produkovat v limitním mediu, byla nejprve testována produkce nemodifikovaného cytochromu P450. Určení správného expresního systému je velice důležité pro následnou inkorporaci fotolabilních aminokyselin. Fotoaktivovatelný cytochrom P450 2B4 pak bude využit jako nanosonda při studiu protein-proteinových interakcí a vzájemného uspořádání jednotlivých složek MFO systému.

Pro produkci cytochromu P450 byly použity dva různé bakteriální kmeny, *Escherichia coli* C41 (DE3) a *Escherichia coli* BL21 (DE3) Gold, a dvě různé kultivační nádoby, Erlenmayerova a Fernbachova baňka. Z výsledků měření během produkce je patrné, že ve Fernbachových baňkách je větší nárůst biomasy než v baňkách Erlenmayerových. Zřejmě díky zaoblenějšímu tvaru baněk dochází k lepší aeraci. Ve Fernbachových baňkách se také bakterie díky lepší aeraci snadněji dostávají do exponenciální fáze a rychleji dosahují optické denzity 4. Negativním důsledkem rychlejšího nárůstu počtu buněk a dlouhé doby produkce je fakt, že v průběhu produkce se již buňky dostávaly ze stacionární fáze do fáze odumírání (viditelné na membránách z imunodetekce CYP 2B4 specifickou slepičí protilátkou).

Maximální koncentrace stanovitelného CYP bylo dosaženo mezi 24 – 36 hodinami pro Erlenmayerovy baňky a ve 48. hodině pro Fernbachovy baňky, což je patrné z grafického vynesení naměřených dat. Koncentrace cytochromu P450 měřená v průběhu produkce značně kolísala, což bylo pravděpodobně způsobeno při odebírání vzorku. Nesprávně promíchaná, nehomogenní, bakteriální suspenze pak způsobuje velké výkyvy naměřených hodnot. Koncentrace cytochromu P450 přesto většinou korelovala s naměřenou optickou denzitou.

Z naměřených koncentrací CYP a imunochemického vyhodnocení vzorků z průběhu produkce je zřejmé, že před indukcí exprese pomocí IPTG nebyl CYP exprimován, ačkoliv na elektroforéze je viditelná zóna, zřejmě způsobená jinými proteiny o stejné molekulové hmotnosti.

Ačkoli byla práce prováděna dle postupu publikovaného Waskell a kol. [36], nepodařilo se dosáhnout tak vysokých výtěžků solubilizovaného CYP. V uvedené publikaci bylo

dosaženo výtěžku 50 – 60 mg holoproteinů na litr. Teoretické množství CYP získané z jednoho litru bakteriální suspenze (kmen *E. coli* C41 (DE3)) uvedené v tabulce č. 6 odpovídá zhruba 5 – 6 mg. Tak nízký výtěžek může být způsoben použitím odlišného detergentu.

Z výsledků solubilizace vyplývá, že Fernbachovy baňky mají sice lepší aeraci a větší nárůst biomasy, ale dosažené výtěžky jsou srovnatelné s Erlenmayerovými baňkami. Ze všech použitých expresních uspořádání byl CYP 2B4 úspěšně solubilizován, v nesolubilních frakcích částečně zůstal jen v případě bakteriálního kmene *E. coli* BL21 (DE3) z Erlenmayerovy baňky. Získání zbylého CYP z nesolubilní frakce by bylo možné opětovnou solubilizací.

Z použitých bakteriálních kmenů je vhodnější kmen *Escherichia coli* C41 (DE3), který je schopný produkovat membránové proteiny bez toho, aniž by to na něj mělo toxické účinky [28]. Jako nejlepší uspořádání pro produkci cytochromu P450 2B4 se tedy jeví použití *Escherichie coli* C41 (DE3) v Erlenmayerových baňkách. Jelikož ve Fernbachových baňkách dochází k lepší aeraci a rychlejšímu nárůstu bakteriálních buněk, je možné je použít v experimentech, ve kterých je třeba rychle dosáhnout určité optické denzity.

Expresa cytochromu P450 2B4 se úspěšně podařila a optimalizovaný protokol exprese je možné použít pro produkci cytochromu P450 s inkorporovanými fotolabilními aminokyselinami.

6 SHRNU TÍ

Výsledky dosažené v této práci lze shrnout následovně:

- Byly optimalizovány produkční podmínky pro expresi cytochromu P450 2B4. V Erlenmayerových baňkách se dosahuje srovnatelných výsledků jako ve Fernbachových baňkách, ačkoliv Fernbachovy baňky mají díky svému tvaru lepší aeraci a bakteriální buňky se v nich rychleji množí.
- Jako vhodný produkční kmen byla určena *Escherichia coli* C41 (DE3).
- Byla vypracována metodika stanovení CYP přímo v bakteriálních buňkách.
- Z bakteriálních buněk byl úspěšně solubilizován cytochrom P450 2B4.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T., *Chem. listy* 94, 913-918 (2000)
2. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.Jr., Martínek V., Páca J., *Chem. listy* 98, 876-890 (2004)
3. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., *Chem. listy* 93, 229-237(1999)
4. Klingenberg, M., *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386 (1958)
5. Garfinkel, D., *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958)
6. Stiborová, M., Biochemie II, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2012)
7. Omura, T., Sato, R., *J. Biol. Chem.* 237, 1375-1376 (1962)
8. Omura, T., Sato, R., *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385 (1964)
9. Danielson, P.B., *Curr. Drug Metab.* 3, 561-597 (2002)
10. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E., *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 737-747 (2001)
11. Ioannides, C., Lewis, D.F.V., *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1767-1788 (2004)
12. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1PO5> (12.5.2013, 17:30)
13. <http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/6629/=wiki2.png> (12.5.2013, 18:05)
14. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M., *Chem. Listy* 95, 212-222 (2001)
15. Waskell, L., Im, S.Ch., *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 144-153 (2011)
16. Schenkman, J.B., Jansson, I., *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152 (2003)
17. Khoo, O., Suntrarachun, S., *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 159-162 (2012)
18. Rosypal, S., (2003) *Nový přehled biologie* (Scientia)
19. <http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm> (8.5.2013, 20:45)
20. Balbás, P., Lorence, A., (2004) *Recombinant gene expression, Reviews and protocols, 2nd edition* (Humana Press)
21. Burgess-Brown, N.A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., Gileadi, O., *Protein Expression Purif.* 59, 94 – 102 (2008)
22. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W., *Methods Enzymol.* 185, 60-89 (1990)
23. Francis, D.M., Page, R., *Current Protocols in Protein Science*, 5.24.1 – 5.24.29 (2010)
24. Baneyx, F., *Cur. Opin. Biotechnol.* 10, 411 – 421 (1999)
25. <http://www.biomach.cz/biologie-bunky/-regulace-genove-exprese> (18.5.2013, 9:40)

26. Klepsch, M.M., Persson, J.O., de Gier, J.L., *J. Mol. Biol.* 407, 532-542 (2011)
27. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., Vuillard, L., *Protein Expression Purif.* 37, 203-206 (2004)
28. Schlegel, S., Löfblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew, D., Slotboom, D.J., de Gier, J.W., *J. Mol. Biol.* 423(4), 648-59 (2012)
29. Kubíčková, B., Hodek, P., *Chem. Listy* 95, 359-364 (2001)
30. Hendrickson, T.L., de Grecy-Lagard, V., Schimmel, P., *Annu. Rev. Biochem* 73, 147-176 (2004)
31. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C., *Nat. Methods* 2, 261-267 (2005)
32. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=65A33F64-3AE8-4C6F-BA56-B791075902B7> (18.5.2013, 21:20)
33. Smith, P.K., a kol., *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85 (1985)
34. <http://www.piercenet.com/instructions/2161997.pdf> (21.5.2013, 13:05)
35. Laemmli, U. K., *Nature* 227, 680-685 (1970)
36. Waskell, L., Gruenke, L., Saribas, A.S., *Protein Expression Purif.* 21, 303-309 (2001)

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

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka