

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra biochemie



PŘÍPRAVA DELEČNÍCH MUTANTŮ LIDSKÉHO CYTOCHROMU b_5
POMOCÍ GENOVÉ SYNTÉZY

CONSTRUCTION OF DELETION MUTANTS OF HUMAN CYTOCHROME
 b_5 USING GENE SYNTHESIS

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Václava Martínka, Ph.D. a všechny použité zdroje jsem řádně citovala.

V Praze dne 16.8.2015

Iveta Kotlánová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit své poděkování vedoucímu mé práce, doc. RNDr. Václavu Martínkovi, PhD. za skvělé vedení, cenné rady, podněty, informace, které mi s velkou ochotou a trpělivostí poskytnul při řešení této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Milichovskému za všestrannou pomoc při práci v laboratoři.

Abstrakt

Cytochrom b_5 je malý amfipatický protein. Jeho lidská forma se nachází ukotvena ve vnější membráně endoplazmatického retikula a mitochondrií, volně se nachází v červených krvinkách. Skládá se ze dvou domén: Větší hydrofilní doména váže hem, menší hydrofobní doména ukotvuje cytochrom b_5 v mikrosomální membráně. Obě domény jsou spojeny linkerem, což je řetězec asi 15 aminokyselin, který dodává proteinu potřebnou flexibilitu. Jeho délka hraje významnou roli při přenášení elektronů na cytochrom P450. Pokud je linkerová doména příliš krátká, cytochrom b_5 nedokáže přenášet elektrony na cytochrom P450 a neúčastní se tak reakcí MFO systému. Ostatní funkce jsou však zachovány.

Cílem této práce bylo navrhnout a pomocí genové syntézy vytvořit 4 deleční mutanty cytochromu b_5 . Jejich linkerová doména obsahovala krátké i dlouhé delece, u kterých se předpokládá narušení interakce s cytochromem P450.

Součástí práce byla heterologní exprese proteinů pomocí buněk *Escherichia coli* kmenů XL10-Gold a DH5 α . Jako expresní vektory pro transformaci byly použity plasmidy pET-30a(+) a pET-22b. DNA byla z buněk izolována a sekvenací byla ověřena správnost genetického kódu.

Klíčová slova: cytochrom b_5 , heterologní exprese, genová syntéza

Abstract

Cytochrome b₅ is a small amphipathic protein. The human form is anchored to the outer membrane of the endoplasmic reticulum and mitochondria, a free form is located in red blood cells. It consists of two domains: a large hydrophilic domain binds heme, a small hydrophobic domain anchors cytochrome b₅ to the microsomal membrane. Both domains are connected by linker chain of about 15 amino acids, which gives a flexibility to the protein. Its length plays an important role in transferring electrons to cytochrome P450. If the linker domain is too short, cytochrome b₅ is not able to transfer electrons to cytochrome P450 and not participates in the reactions of MFO system. Other functions are preserved.

The aim of this study was to design and build 4 deletion mutants of cytochrome b₅ using gene synthesis. The linker domain contains long and short deletions, which are expected to have distortion interaction with cytochrome P450.

Part of this thesis was the expression of heterologous proteins by cells of *Escherichia coli* strain XL10-Gold and DH5 α . As expression vectors for the transformation were used plasmids pET-30a(+) and pET-22b. DNA from cells was isolated and the accuracy of the genetic code was verified using the sequencing.

Keywords: cytochrome b₅, heterologous expression, gene synthesis
(In Czech)

OBSAH

Obsah.....	1
Seznam obrázků	2
Seznam tabulek.....	4
Seznam použitých symbolů a zkratek.....	5
1 ÚVOD	6
1.1 Xenobiotika	6
1.2 Biotransformace xenobiotik	6
1.2.1 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO).....	6
1.2.2 Cytochromy P450.....	6
1.2.3 Cytochrom b ₅	7
1.2.4 Struktura cytochromu b ₅	9
1.2.5 Reakční cyklus cytochromu P-450 a cytochromu b ₅	11
1.2.6 Role délky linkeru cytochromu b ₅ na katalytickou činnost	13
1.3 Escherichia coli jako bakteriální expresní systém.....	13
1.4 Expresní vektor pET-30a(+)......	14
2 Cíl bakalářské práce	16
3 Materiál a metody.....	17
3.1 Použité přístroje.....	17
3.2 Použitý materiál a chemikálie	17
3.3 Genová syntéza delečních mutantů lidského cytochromu b ₅	19
3.3.1 Návrh oligonukleotidů pro genovou syntézu	19
3.3.2 PCR	19
3.3.3 Přečištění a selekce konstruktů DNA užitím agarosové elektroforézy	21
3.3.4 Izolace DNA z gelu	22
3.4 Exprese delečních mutantů cytochromu b ₅	22
3.4.1 Ligace a vnesení genu do vektoru	22
3.4.2 Kontrola štěpení	23
3.4.3 Ligace.....	23
3.4.4 Transformace buněk a amplifikace vektoru	23
3.4.5 Přeočkování metodou „single cell colony“	24
3.4.6 Izolace DNA z buněk pomocí fenol-chloroformu.....	24
3.5 Příprava vzorků na sekvenaci.....	25
4 Výsledky a diskuze.....	26
4.1 Volba delečních mutantů.....	26

4.2 Návrh oligonukleotidů pro genovou syntézu	27
4.3 Přečištění agarosovou elektroforézou.....	27
4.4 Ligace vektoru a inzertů	29
4.5 Kontrola štěpení agarosovou elektroforézou.....	30
4.6 Transformace buněk a amplifikace vektoru	32
4.7 Čistota a koncentrace izolované DNA	33
4.8 Sekvence.....	33
5 Závěr.....	35
Seznam použité literatury.....	36

Seznam obrázků

Obr. 1 Struktura cytochromu P450 3A4

Obr. 2 Cytochrom b_5 v lipidové dvojvrstvě membrány endoplazmatického retikula

Obr. 3 Starší modely zanoření C-koncové domény cytochromu b_5 do mikrosomální membrány

Obr. 4 Novější zobrazení ukotvení cytochromu b_5 v membráně

Obr. 5 Reakční cyklus cytochromu 450

Obr. 6 Escherichia coli DH5 α

Obr. 7 Mapa plasmidového vektoru pET-30a(+)

Obr. 8

Obr. 9 Aminokyselinové sekvence cytochromu b_5 a jednotlivých delečních mutantů

Obr. 10 Agarosová elektroforéza selektující jednotlivé délky DNA

Obr. 11 Marker 2-log DNA Ladder

Obr.12 Vložení inzertu do vektoru

Obr. 13 Kontrola štěpení plasmidu a konstruktů I

Obr. 14 Kontrola štěpení plasmidu a konstruktů II

Obr. 15 Genetický kód delečních mutantů cytochromu b_5 ověřený sekvenací

Seznam tabulek

Tab. 1 Sekvence oligonukleotidů

Tab. 2 Složení delečních mutantů cytochromu b₅

Tab. 3 Složení směsí pro 1. PCR

Tab. 4 Složení směsí pro 2. PCR

Tab. 5 Naměřené absorbance a dopočtené hodnoty určující čistotu a koncentraci DNA

Seznam použitých symbolů a zkratek

°C	stupně Celsia, jednotka teploty
×g	násobky gravitačního zrychlení
μl	mikrolitr
μg	mikrogram
μM	mikromolární
A	adenin, nukleotidová báze
ATP	adenosintrifosfát
C	cytosin, nukleotidová báze
CO	oxid uhelnatý
CYP	cytochrom P450
cyt	cytochrom
kDa	kiloDalton, jednotka molekulové hmotnosti
<i>E.coli bakterie</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetractová kyselina
Fe	železo
g	gram, jednotka hmotnosti
G	guanin, nukleotidová báze
×g	násobky gravitačního zrychlení
H	vodík
H ₂ O	voda
His	histidin
kpb	kilopáry bazí
KAc pufr	draselnoacetátový pufr
LB-medium	Luria Broth tekuté medium
MFO	mixed function oxidases, systém oxidas a oxgenas se smíšenou funkcí
ml	mililitr, jednotka objemu
mQ	značí deionizovanou vodu
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NaOH	hydroxid sodný
nm	nanometry, zde jednotka vlnové délky
NMR	nukleární magnetická rezonance
O	kyslík
Obr.	obrázek 608941040
pb	páry bazí
rcf	Relative Centrifugal Force neboli relativní odstředivá síla, udává míru odstředivého zrychlení působící na centrifugovaný vzorek, udává se v násobcích g
RPM	rotation per minute, počet otáček za minutu
s	sekunda, jednotka času
S	spinové číslo
SDS	dodecylsulfát sodný
SH	thiolátová skupina
T	thymin, nukleotidová báze
Tab.	tabulka
TAE pufr	Tris-acetátový pufr, složený ze složek Tris a EDTA
TE pufr	Tris+EDTA pufr
Tris	tris(hydroxymethyl)aminometanu
V	volt, jednotka napětí

1 ÚVOD

1.1 Xenobiotika

Xenobiotika jsou předmětem zkoumání xenobiochemie. Jsou to látky, které se běžně v organismu nevyskytují a nejsou důležité pro zdravý vývoj ani jako zdroj energie organismu [9].

Z hlediska polaritě dělíme xenobiotika na polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofobní). Z organismu se polární cizorodé látky dostanou aktivním transportem. U látek nepolárních je k vyloučení z organismu nutná jejich polarizace, aby mohly být následně vyloučeny aktivním transportem [21].

1.2 Biotransformace xenobiotik

Cizorodé látky hydrofobní povahy se nespodno vylučují z organismu díky své afinitě k membránám, přes které se snadno dostávají difúzí a mohou nich částečně zůstat. Nepolární xenobiotika musí být tedy nejprve upravena, aby mohla být vyloučena z buňky a posléze z organismu aktivním transportem. Tato přeměna, biotransformace, má u živočichů dvě fáze.

I. fáze biotransformace se nazývá derivatizační. Zde dochází ke vnesení či odkrytí polárnější a snadněji derivatizovatelné skupiny do molekuly hydrofobního xenobiotika. Xenobiotikum je obvykle oxidováno, redukováno či je v něm hydrolytickou reakcí demaskována v něm již přítomná polární skupina [21, 36].

II. fáze biotransformace se nazývá konjugační. Xenobiotikum, které obsahuje snadno derivatizovatelnou skupinu díky reakcím I. fáze biotransformace, v této fázi dále reaguje s polárními látkami organismu vlastními. Jde především o reakce s kyselinou glukuronovou, s aktivním sulfátem, s acetátem, s glutathionem, sacharidy, cysteinem, popř. dalšími aminokyselinami. Původně hydrofobní xenobiotikum se stává polárním, což usnadní jeho detoxikaci a vyloučení z organismu. V případě některých látek však naopak dochází k jejich aktivaci a zvýšení toxicity pro organismus [21].

1.2.1 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO)

Mezi enzymy I. fáze biotransformace patří zejména oxidasy, z nichž nejvýznamnější je systém monooxygenas se smíšenou funkcí (zkratka MFO, z anglického „mixed function oxidases“). Tento systém je umístěn v membráně endoplazmatického retikula. Skládá se z enzymů NADPH:cytochrom P450 reduktasy, cytochromu P450 a lipidové dvojvrstvy tvořící membránu. Fakultativně přítomný může být také cytochrom b₅ a cytochrom NADH:cytochrom b₅ reduktasa [21].

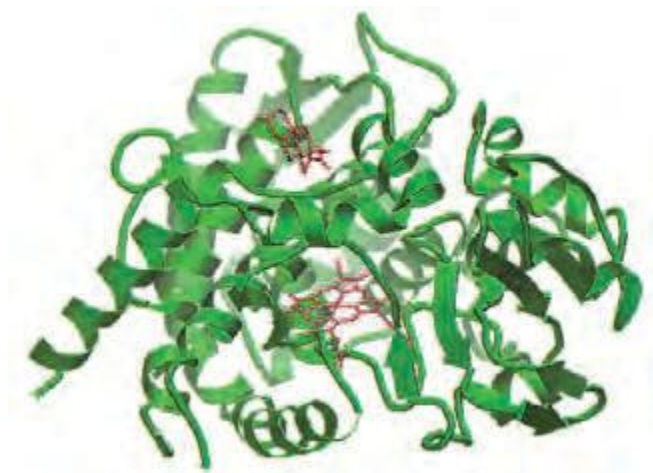
1.2.2 Cytochromy P450

Enzymy důležité při I.fázi biotransformace nazývané cytochromy P450 (CYP) jsou hemové proteiny, ve kterých je hem vázán v hydrofobní kavitě přes SH skupinu cysteinu aktivního centra enzymu. Z evolučního hlediska jde o velmi staré hemoproteiny, dokonce starší, než hemoglobin. Označení „P450“ je odvozeno od hodnoty vlnové délky (450) v nanometrech, při níž má tento enzym v

redukovaném stavu v komplexu s CO charakteristické absorpční maximum, a od počátečního písmene slova „pigment“(P) [22].

Cytochromů P450 existuje celá řada jak v rostlinné, tak v živočišné říši. Jedná se o izoenzymy, které jsou kódované prostřednictvím odlišných genů, mající obdobnou strukturu a katalyzující obdobné reakce. Systematicky se cytochromy P450 dělí na rodiny a podrodiny. Cytochromy s alespoň 40% homologií primární struktury tvoří rodinu, s více než 60% homologií primární struktury potom podrodinu. Tímto způsobem se označují za názvem číslem rodiny, písmenem podrodiny a číslem vlastního enzymu. Např. cytochrom P450 1A2, případně CYP1A2 [22]. Na obr. 1 uvedena struktura cytochromu P450 3A4.

Cytochrom P450 je tvořen čtyřmi pyrrolovými jádry, jejichž atomy dusíku vážou ion železa. To tvoří prosthetickou skupinu enzymu. Pátý (axiální) ligand hemového železa je thiolátový anion konzervovaného cysteinu. Šestý (axiální) ligand je OH skupina molekuly vody či hydroxidového iontu. Enzym se vyskytuje ve dvou formách: nízkospinové (hexakoordinovaný stav, spin $S=1/2$) a vysokospinové (pentakoordinovaný stav, spin $S=5/2$). V obou formách se v základním stavu vyskytuje železitý ion (Fe^{3+}) [11].



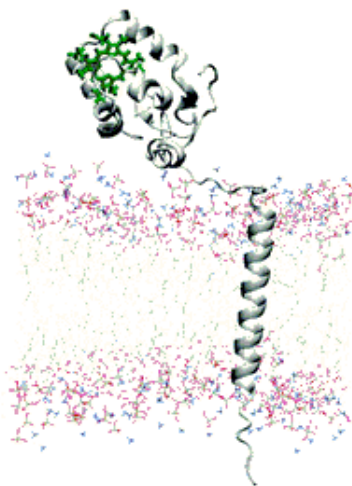
Obr. 1 Struktura cytochromu P450 3A4 (převzato z [17]).

1.2.3 Cytochrom b_5

Cytochrom b_5 je malý hemový protein o velikosti 16,7 kDa [2, 4]. Tento integrální membránový protein se nachází na vnější membráně endoplazmatického retikula a v mitochondriích [12].

Protein má kyselý charakter, tvoří ho 6 α -helixů a 5 β -sheetů. Skládá se ze dvou domén. Větší doména váže hem a je hydrofilní, menší doména obsahuje hydrofobní část, která molekulu ukotvuje v membráně endoplazmatického retikula. Obě domény spojuje peptidový řetězec tvořený asi 15 aminokyselinami [2, 19, 12]. Cytochrom b_5 se vyskytuje také volně v cytoplasmě červených krvinek. Tato solubilní forma enzymu vzniká alternativním sestřihem genu, kdy dojde k nahrazení C-terminální transmembránové části proteinu a jejího linkeru prolinem [12].

Cytochrom b_5 je jednoelektronovým přenašečem, který se účastní se například desaturace a elongace mastných kyselin, biosyntézy cholesterolu, hlavně se však účastní hydroxylačních reakcí MFO systému, kde přenáší elektrony na cytochromy P450 [13, 25].



Obr. 2 Cytochrom b_5 v lipidové dvojvrstvě membrány endoplazmatického retikula

V horní části obrázku je znázorněna struktura hemu, který je obklopen helikálními strukturami v hydrofilní N-terminální doméně. Ve spodní části je zobrazena C-koncová hydrofobní doména ve formě α -helixu zanořena v lipidové dvojvrstvě membrány. Uprostřed je patrný linker, který spojuje obě domény. Převzato z [5].

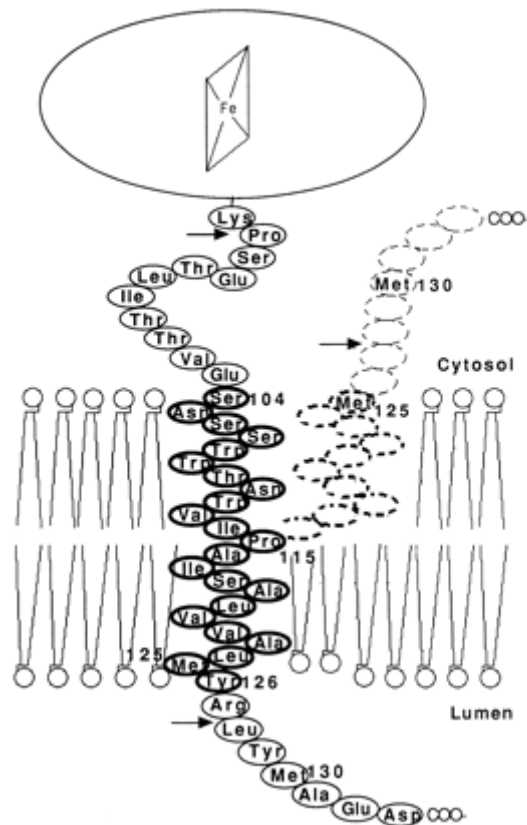
1.2.4 Struktura cytochromu b_5

Hydrofilní doména (N-terminální doména) je tvořena asi 100 aminokyselinami. Tato část cytochromu b_5 váže hem, který je vložen mezi 4 α -helixy v takto utvořené „hydrofobní kapse“. Železo hemu je drženo mezi dvěma postranními řetězci konzervovaných histidinů (u lidské formy His68 a His44) [19, 14].

Hydrofobní doména (C-terminální doména) je menší, skládá se z 14-18 aminokyselin tvořících hydrofobní šroubovici, ke globulární doméně se připojuje řetězcem dlouhým cca 7 aminokyselin. Tento řetězec obsahuje prolin. Za ním je připojen řetězec 7 polárních aminokyselin na úplném konci řetězce. Tato část kotví protein v lipidové dvojvrstvě endoplazmatického retikula (či mitochondrií) [2, 19, 14, 20].

Obě domény jsou spojeny velmi flexibilním řetězcem, který tvoří asi 15 aminokyselinových zbytků. Zajišťuje flexibilitu při vazbě různých elektronových partnerů a přitom zůstává hydrofobní doména cytochromu b_5 umístěna v membráně endoplazmatického retikula (obr. 2). Na případě králičího cytochromu P450 2B4 a králičího cytochromu b_5 bylo experimentálně zjištěno, že minimální délka tohoto spojovacího řetězce (linkeru) je 6-8 aminokyselinových zbytků. Kratší linker přítomný v cytochromu b_5 způsobuje, že molekula cytochromu b_5 neplní funkci přenašeče elektronů pro cytochrom P450 [2].

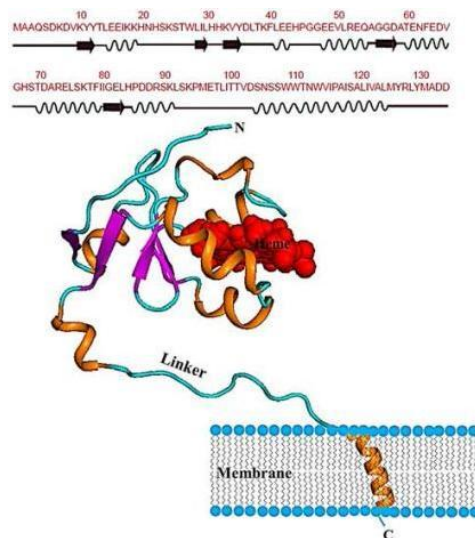
Na zanoření C-konce do lipidové dvojvrstvy membrány byly zpočátku zvažovány dva různé modely: transmembránový, který předpokládá průchod C-konce skrz mikrosomální membránu, a druhým modelem vlásenkové smyčky, ve kterém C-konec cytochromu b_5 prochází jen první vrstvou mikrosomální membrány a vrací se zpět do cytosolu [25].



Obr. 3 Starší modely zanoření C-koncové domény cytochromu b_5 do mikrosomální membrány

Transmembránový model zanoření C-koncové domény do membrány naznačen plnou čarou, přerušovanou čarou pak model vlásečkové smyčky. Převzato z [25, 26].

Současná představa struktury C-terminální domény je bližší transmembránovému modelu. Přesné prostorové uspořádání není dosud známo, existuje však představa o pozici transmembránového helixu získaná ze studií NMR (obr. 4) [15, 29].

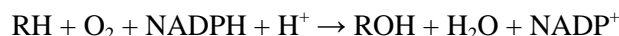


Obr. 4 Novější zobrazení ukotvení cytochromu b_5 v membráně

Model vytvořen pomocí NMR spekter kombinací analýz rozpustné a pevné formy králičího cytochromu b_5 . Nad 3D obrázkem je znázorněna aminokyselinová sekvence proteinu. Převzato a upraveno z [16].

1.2.5 Reakční cyklus cytochromu P-450 a cytochromu b₅

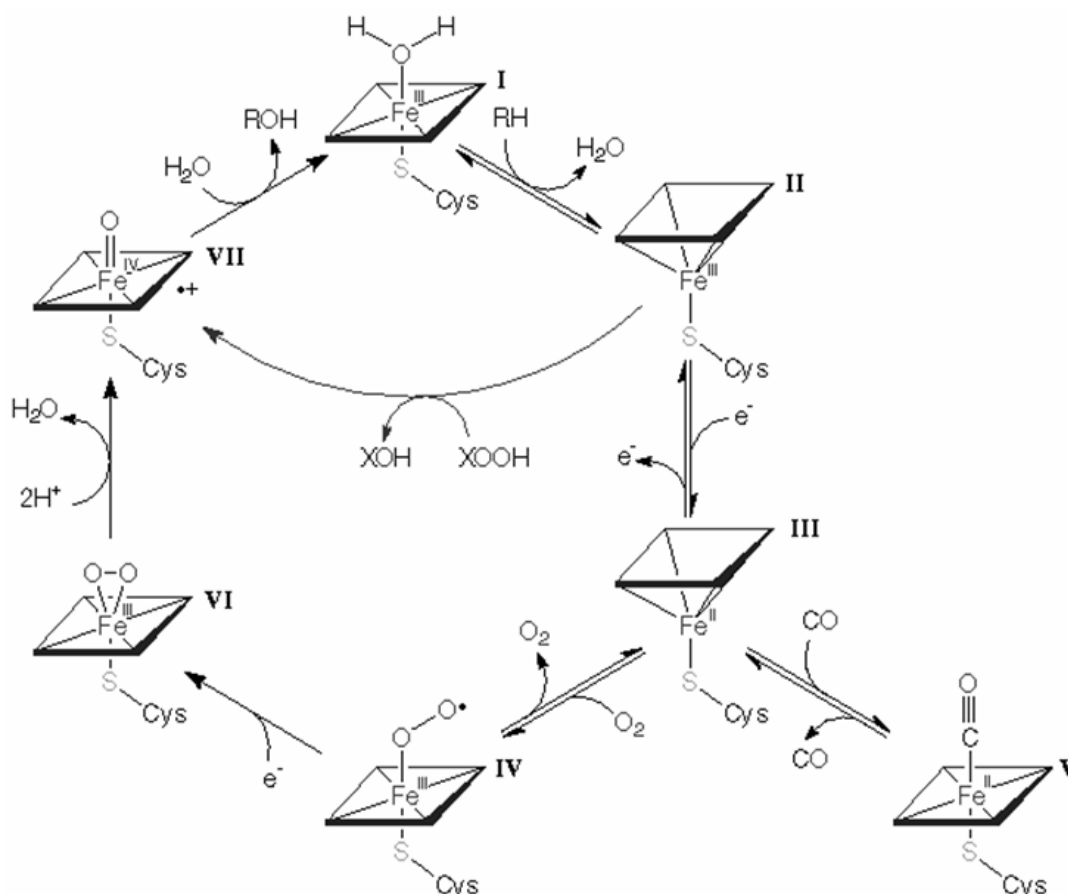
Většinu reakcí katalyzovaných MFO systémem lze vyjádřit rovnicí:



V klidovém stavu je CYP v hexakoordinovaném stavu (nízkospinová forma, low-spin). Železo hemu je v tzv. ferri formě, tedy oxidační číslo +III. Z jedné strany je drženo cysteinovým zbytkem a z druhé strany je navázán kyslík vody (obr. 5, I). Enzym naváže substrát (RH), šestý ligand železa je vytlačen a CYP přechází do pentakoordinovaného stavu (vysokospinová forma, high-spin), železo hemu je stále ve ferri formě. Touto konformační změnou se posouvá i absorpční pás hemu (obr. 5, II). V dalším kroku CYP přijímá elektron z NADPH:cytochrom P450 reduktázy (případně ferredoxin-reduktázy či nehemového Fe-S proteinu v mitochondriích), která přijala elektron z NADPH. Hemové železo je redukováno na ferro-formu (Fe^{+II}), zůstává však pentakoordinované (obr. 5, III). Redukovaný CYP450 pak může vázat ligandy, např. molekulu kyslíku. Vzniká superoxidový hexakomplex s železitým kationtem (obr. 5, IV). Případně se místo kyslíku na redukovaný CYP (obr. 5, III) může navázat CO, železo hemu je taktéž hexakoordinováno a tento komplex (obr. 4, V) má typické absorpční maximum při 450 nm. Reakce CYP s CO je však vedlejší produkt cyklu [23].

Ferri-superoxidový komplex (obr. 5, IV) není moc stabilní a snadno přijme elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Tím aktivuje kyslík, nezmění konformaci CYP, ale vzniká z něj peroxidový anion (obr. 5, VI). Tohoto kroku se může účastnit NADH:cytochrom b₅ reduktasa, která může místo NADPH:cytochrom P450 reduktasy přenést elektron na kyslík. V aktivní formě CYP je rozštěpena vazba O-O za vzniku vody. Železo hemu je hexakoordinováno, dochází k posunu elektronů z thiolátové síry na kyslík a vytvoření dvojné vazby mezi železem a kyslíkem a vytvoření stabilního tzv. ferrioxenového komplexu (obr. 5, VII). Tento radikál může reagovat s vhodným substrátem za vzniku hydroxylovaného radikálu, přičemž vzniká opět nativní forma cytochromu P450 (obr. 5, I) [23].

Cytochromy P450 se vyznačují i tzv. peroxidasovou aktivitou. Znamená to, že pro oxidativní reakce může využívat i peroxidy a peroxikyseliny jako donor atomu kyslíku. Z vysokospinového železitého komplexu může vznikat rovnou komplex nízkospinového CYP, který váže kyslík. Této reakce se také účastní NADPH, ale probíhá neuspořádaným mechanismem [22, 23]. Účinnost je však nižší hlavně z důvodu destrukce a inaktivace samotného enzymu CYP [23].



Obr. 5 Reakční cyklus cytochromu P450

R-H je substrát, O₂ - kyslík, H₂O - voda, naznačen přenos elektronů a vznik nízkospinové i vysokospinové formy cytochromu P450. Převzato z [23].

Cytochrom b₅ spolu s enzymem NADH:cytochrom b₅ reduktasou mohou být součástí reakcí MFO. Účast cytochromu b₅ na reakčním cyklu CYP není zcela objasněna a proto je předmětem mnoha studií. Jsou 4 možná vysvětlení, jak se tato fakultativní složka účastní reakcí MFO.

1. Cytochrom b₅ přenáší druhý elektron z NADH:cytochrom b₅ reduktasy (namísto přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy) na cytochrom P450. Přenos elektronu za účasti cytochromu b₅ je rychlejší [19].

2. Cytochrom b₅ zabraňuje „rozpojení“ monoxygenasových reakcí. Pomalý vstup druhého elektronu by jinak mohl způsobit odpojení od superoxidového aniontu namísto tvorby redukováného dvou-elektronového kyslíku. Rychlejší vstup druhého elektronu přes cytochrom b₅ vede ke vzniku formy „Compound I“ (na obr. 5 označen jako VII), který reaguje se substrátem za vzniku produktu [19].

3. Další navrženou možností je, že cytochrom b₅ tvoří s cytochromem P450 hemoproteinový komplex, ten umožní přijmout 2 elektrony z NADPH:cytochrom P450 reduktasy a tím se zvyšuje rychlost tvorby aktivního kyslíku namísto nutnosti dvou reakcí s reduktasovým enzymem [19].

4. Je také možné, že cytochrom b₅ nemá oxidačně-redukční roli, usnadňuje rozpad okysličeného hemoproteinu na produkty nebo usnadňuje tok elektronů prostřednictvím systému [19].

Bylo prokázáno, že cytochrom b_5 může stimulovat, inhibovat nebo nemít žádný efekt na aktivitu cytochromu P450. Závisí to však i na isoformě CYP a na jeho substrátu. Na metabolismu benzfetaminu a methoxyfluranu cytochromem P450 2B4 bylo zjištěno, že cytochrom b_5 zvyšuje účinnost katalýzy tohoto CYP2B4 snížením tvorby vedlejšího produktu superoxidu. Inhibiční účinek cytochromu b_5 spočívá v jeho kompetici s cytochrom P450 reduktasou, což se projeví pomalejší spotřebou NADPH [2]. Bylo také zjištěno, že cyt b_5 může u některých cytochromů P450 měnit významným způsobem poměr vznikajících metabolitů [24, 10].

1.2.6 Role délky linkeru cytochromu b_5 na katalytickou činnost

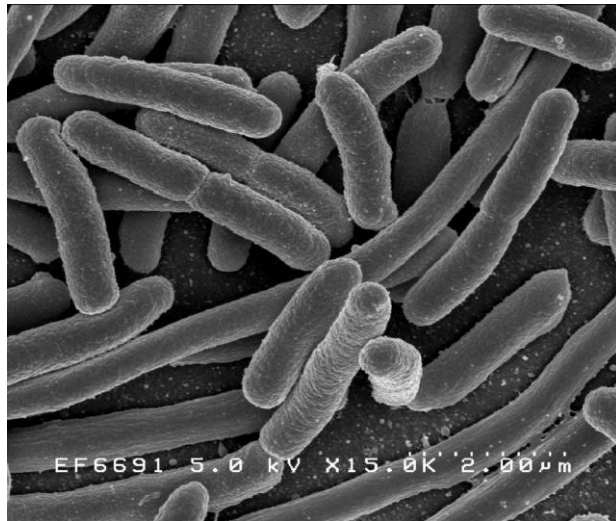
Transmembránová doména cytochromu b_5 se ukázala být důležitou pro jeho participaci na interakci s cytochromem P450. Při odstranění membránové kotvy cytochromu b_5 vzniká solubilizovaná forma jeho hemové domény. Takto vzniklý protein sice přenáší elektrony např. na cytochrom *c*, metmyoglobin či methemoglobin, ale ztrácí schopnost elektronového transferu na mikrosomální cytochrom P450 [2].

Flexibilní peptidový řetězec, který spojuje hemovou doménu a membránovou kotvu, hraje taktéž zásadní roli při účasti cytochromu b_5 na reakcích CYP. Při odstranění 8-10 aminokyselinových zbytků linkeru cytochromu b_5 pozbyl schopnosti tvořit komplex s CYP a přenášet elektrony. Při odstranění méně než 8 aminokyselin z linkeru funkce cytochromu b_5 nebyla pozměněna. Stejně tak nebyla nijak významně ovlivněna schopnost cytochromu b_5 interagovat s cytochromem P450 2B4 při prodloužení linkeru o 16 alaninových zbytků, při obrácení aminokyselinové sekvence či mutování konzervovaných aminokyselinových zbytků linkeru [2].

1.3 *Escherichia coli* jako bakteriální expresní systém

V molekulární biologii se často produkují a purifikují různé proteiny odvozené od konkrétního genu či jeho části. Při tomto procesu se uplatňují různé expresní systémy. Jsou to jednobuněčná eukaryota, např. kvasinky (kmeny *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*). Dále se využívají i složitější systémy pro expresi problematických či post-translačně modifikovaných proteinů, např. hmyzí buňky infikované bakulovirem. Nejrozšířenější expresní systém je však bakteriální buňka. Oblíbené jsou zejména kmeny bakterie *Escherichia coli*. Tento mikroorganismus patří mezi gram-negativní, fakultativně anaerobní tyčkovité bakterie [28, 27, 7]. Žije ve střevech teplokrevných živočichů [33]. *E.coli* coby nástroj pro expresi genů je finančně nenákladná, stejně jako její medium, rychle se množí, výtěžky jsou vysoké a existuje na výběr z mnoha různě upravených kmenů pro různé účely. Nevýhody využití *E.coli* pro expresi proteinů je někdy nedostatečná kvalita vzniklého proteinu kvůli nemožnosti posttranslačních úprav, dále omezená velikost exprimovaných proteinů a denaturace některých větších proteinů shlukující se v inkluzní tělíska [18, 31].

Často používané kmeny *Escherichia coli* mají označení např. DH5 α (obr. 6), XL-1 Blue, SCS110, JM109 TOP10 a BL21 [1].



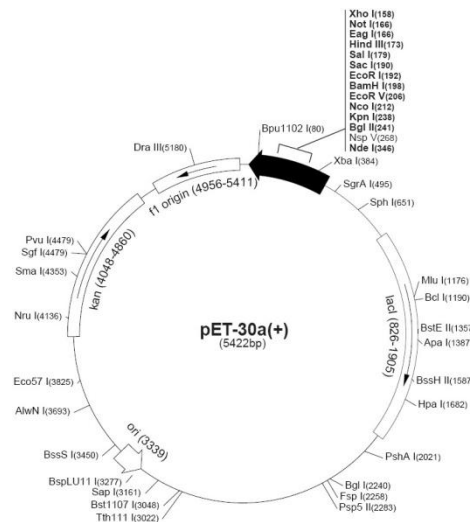
Obr. 6 *Escherichia coli* DH5 α (převzato z [33])

1.4 Expresní vektor pET-30a(+)

Pro přepravu cizorodé DNA do buňky, kde se tato DNA replikuje či exprimuje, se využívá vektorů. Expresními vektory mohou být plasmidy, viry či umělé chromozomy. Nejčastěji bývá pro heterologní expresi proteinu využíván plasmid. Plasmid je malá kruhová molekula extrachromozomální DNA, která se v bakterii autonomně množí. Obsahuje důležitá místa jako replikační počátek, který je rozpoznán DNA polymerasou buňky. Potom je tu zakomponován selekční marker nesoucí např. rezistenci na určitá antibiotika. Dále je v plasmidu polylinker s velkým počtem restričních míst, která mohou být štěpena restričními endonukleasami. Tím je umožněno vložení cizí DNA neboli inzertu do plasmidového vektoru [18, 3, 31].

Inzert je tvořen krátkou lineární DNA, jejíž nukleotidová sekvence kóduje požadovaný protein. Stejně jako plasmid po endonukleasovém štěpení obsahuje tupé („blunt ends“) či kohezivní („sticky ends“) konce. Příslušné konce vektoru a inzertu na sebe nasedají a ligací se spojí, čímž se inzert stává součástí vektoru [18, 3, 31].

Plasmid pET-30a(+) je bakteriální expresní vektor o velikosti 5400 pb, nese rezistenci na antibiotikum kanamycin [30]. Počáteční místo replikace v tomto plasmidu je sekvence označovaná jako T7 promoter. Polylinkerové místo obsahuje palindromová místa štěpitelná restričními enzymy, např. Nde I, Xho I, Hind III (obr. 7) [30].



Obr. 7 Mapa plasmidového vektoru pET-30a(+)

Kruh zobrazuje cirkulární DNA tvořící plasmid, černá šipka naznačuje směr replikace, vyznačena jsou restrikční místa s výčtem restrikčních endonukleas, které je mohou štěpit, vyznačen je Lac operonové místo (lacI) a počátek replikace (ori). Převzato z [35].

2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo připravit a ověřit expresní vektory kódující modifikované formy lidského retikulárního cytochromu b₅. Navrhované modifikace spočívají ve zkrácení linkeru spojujícího solubilní a membránovou doménu. Měly by být připraveny mutanty zkrácené o 4, 6, 8 a 10 aminokyselin.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

blokový ohříváč: LS1 VLM GmbH

elektroforetická aparatura: MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec, zdroj EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham Pharmacia Biotech

flow box: BIO 16, Labox

fotoaparát: DMCLS65, Panasonic

inkubátor: IR 1500 Automatic CO2, Incubator, Flow Laboratories

termocycler: TECHNE, výrobce Techgene

centrifugy: Allegre X-22R, Beckman Coulter

Eppendorf centrifuge 5415 R

Minicentrifuga GmCLab (Gilson)

Minicentrifuga Labnet

vakuová odparka: DNA Speed Vac, DNA 110, Savant

3.2 Použitý materiál a chemikálie

agarosa: agarosa pro elektroforézu, Invitrogen Life technologies

antibiotika: ampicilin 100 µg/ml

kanamycin 100 µg/ml

barvivo: SYBER® Safe SDNA Gel stain 10 000x koncentrovaného, Invitrogen Life, USA

E129 (poskytl doc. Martínek)

kompetentní buňky: XL10-Gold

DH5α

ligasa: T4 DNA ligasa s 10 mM ATP, 10xkoncentrovaná, Biolabs, New England

markery: Lambda DNA/EcoRI+HindIII marker 3 (564-2126 pb)

DNA marker (155-970 pb)

media: LB-medium

masopeptonový agar

plasmidy: pET-22b

pET-30a(+)

pufry: NEB Cut Smart 10xkoncentrovaný, výrobce Bio Labs, New England

TAE pufir 1xkoncentrovaný

pufir pro T4 DNA ligasu, Bio Labs, New England

KAc pufir (vyroben v laboratoři základního praktika)

ednonukleasy: Nde I

Xho I

sada Jet Purification Kit, Genomed

3.3 Genová syntéza delečních mutantů lidského cytochromu b₅

3.3.1 Návrh oligonukleotidů pro genovou syntézu

Pro syntézu delečních mutantů cytochromu b₅ byly použity oligonukleotidy (Tab.1)

Tab. 1 Sekvence oligonukleotidů

Označení	Sekvence oligonukleotidu
1-wt	5'-GACGAATTCATATGGCGGAACAGTCTGACGAAGCGGTTAAATACTACACCCTGGAAGAAATC-3'
2-wt	5'-ATACTACACCCTGGAAGAAATCCAGAAACACAACCACTCTAAATCTACCTGGCTGATCCTGCACCA CAA-3'
3-wt	5'-TTCACGCAGAACTTCTTACCACCCGGGTGTTCTTCCAGGAATTTGGTCAGGTCGTAAACTTTGTG GTGCAGGATCAG-3'
4-wt	5'-TGAAGAAGTTCTGCGTGAACAGGCGGGTGGTGACGCGACCGAAAACCTCGAAGACGTTGGTCAC TCTACCGACGCGC-3'
5-wt	5'-CGTCCGGGTGCAGTTCACCGATGATGAAGGTTTTAGACATTTACGCGCGTCGGTAGAGTG-3'
6-del-4	5'-AACTGCACCCGGACGACCGcCCGAAACTGAACACCCTGATCACCACCATC-3'
6-del-6	5'-AACTGCACCCGGACGACCGcCCGAAACTGAACATCACCACCATCGACTCTTCTTCTTGG-3'
6-del-8	5'-AACTGCACCCGGACGACCGcCCGAAACTGAACACCATCGACTCTTCTTCTTGG-3'
6-del-10	5'-AACTGCACCCGGACGACCGcCCGAAACTGATCGACTCTTCTTCTTGG-3'
7-wt	5-CAACCGCAGAGATCGCCGGGATAACCCAGTTGGTCCACCAAGAAGAAGAAGAGTCGATGGTGGT GATCAGGGT-3'
7-new	5'-CAACCGCAGAGATCGCCGGGATAACCCAGTTGGTCCACCAAGAAGAAGAAGAGTCGAT-3'
8-wt	5'-GTAAAGCTTCTCGAGTTAGTCTTCCGCCATGTACAGACGGTACATCAGCGCAACCGCAACCGCAG AGATCGC-3'

Oligonukleotidy označené „wt“ byly již dříve použity k syntéze přirozené formy lidského cytochromu b₅. Tyto směsi byly uloženy v mrazáku v -20 °C. Oligonukleotidy s označením „del“ jsou navrženy nově, během vypracování této bakalářské práce. Byly dodány v lyofilizované formě firmou East Port Praha. Označení „del“ znamená delece neboli zrušení a číslo za pomlčkou značí počet vynechaných aminokyselin. Míchání oligonukleotidů při přípravě jednotlivých konstruktů je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2 Složení delečních mutantů cytochromu b₅

<i>Konstrukt</i>	<i>Složení</i>							
Del-4	1-wt	2-wt	3-wt	4-wt	5-wt	6-del-4	7-wt	8-wt
Del-6	1-wt	2-wt	3-wt	4-wt	5-wt	6-del-6	7-new	8-wt
Del-8	1-wt	2-wt	3-wt	4-wt	5-wt	6-del-8	7-new	8-wt
Del-10	1-wt	2-wt	3-wt	4-wt	5-wt	6-del-10	7-new	8-wt

3.3.2 PCR

PCR (polymerasová řetězová reakce) je in vitro metoda, při které enzym DNA-polymerasa syntetizuje specifické sekvence DNA podle templátu. Templát je jednovláknová DNA, který vznikne denurací (rozvolněním) původní dvouvláknové DNA. Na obě templátová vlákna nasedají deoxynukleotid trifosfáty (dNTP's). Aby DNA-polymerasa mohla začít polymeraci, je potřeba primeru. To je krátký úsek DNA, který je již komplementárně nasednutý na templátové vlákno, neboť DNA-polymerasa umí pouze přidávat nukleotidy k již existujícímu řetězci. Potom začíná vznikat

nové vlákno přidáváním nukleotidů na 3'-OH konci templátu (prodloužení, extenze). Primery nasedají na templátová vlákna DNA v protisměrné orientaci. Prodloužené primery syntetizovaných produktů jednoho cyklu mohou sloužit jako templáty v dalším cyklu. Počet vzniklých kopií se tedy zdvojnásobuje v každém cyklu, počet molekul cílové DNA tedy roste geometrickou řadou.

Ve dvou po sobě následujících polymerasových řetězových reakcích byly vytvořeny 4 inzerty kódující lidský cytochrom b₅ s delecemi 4, 6, 8 a 10 aminokyselin. V prvním kole PCR na sebe nasedaly oligonukleotidy tvořící střed celého genu. Tím byl vytvořen templát pro další PCR reakci. Objednané směsi oligonukleotidů byly pro snazší manipulaci nejprve krátce stočeny na stolní centrifuze a poté dle návodu na dodacím listě bylo do každé přidáno určité množství sterilní destilované vody, aby výsledná koncentrace takto vzniklého roztoku byla 100 μM. (Například k lyofilizátu 6-del-10, který měl hmotnost 262,0 μg, bylo přidáno 172 μl sterilní destilované vody, molekulová hmotnost byla uvedena na dodacím listu). Poté byly připraveny zásobní roztoky pro PCR o výsledné koncentraci 20 μM tak, že do 40 μl sterilní destilované vody bylo přidáno 10 μl ze 100μM zásobního roztoku oligonukleotidu.

Složení směsí pro 1.PCR je uvedeno v tabulce 3.

Tab. 3 Složení směsí pro 1.PCR

Název konstruktů	Složení směsi	Název konstruktů	Složení směsi
Del-4	1 μl oligonukleotidu 2-wt	Del-6	1 μl oligonukleotidu 2-wt
	1 μl oligonukleotidu 3-wt		1 μl oligonukleotidu 3-wt
	1 μl oligonukleotidu 4-wt		1 μl oligonukleotidu 4-wt
	1 μl oligonukleotidu 5-wt		1 μl oligonukleotidu 5-wt
	1 μl oligonukleotidu 6-del-4		1 μl oligonukleotidu 6-del-6
	1 μl oligonukleotidu 7-wt		1 μl oligonukleotidu 7-new
	5 μl Pfu pufru		5 μl Pfu pufru
	1 μl Pfu-polymerasy		1 μl Pfu-polymerasy
	1 μl dNTP's		1 μl dNTP's
	sterilní destilovaná voda do 50 μl		sterilní destilovaná voda do 50 μl
Del-8	1 μl oligonukleotidu 2-wt	Del-10	1 μl oligonukleotidu 2-wt
	1 μl oligonukleotidu 3-wt		1 μl oligonukleotidu 3-wt
	1 μl oligonukleotidu 4-wt		1 μl oligonukleotidu 4-wt
	1 μl oligonukleotidu 5-wt		1 μl oligonukleotidu 5-wt
	1 μl oligonukleotidu 6-del-8		1 μl oligonukleotidu 6-del-10
	1 μl oligonukleotidu 7-new		1 μl oligonukleotidu 7-new
	5 μl Pfu pufru		5 μl Pfu pufru
	1 μl Pfu-polymerasy		1 μl Pfu-polymerasy
	1 μl dNTP's		1 μl dNTP's
	sterilní destilovaná voda do 50 μl		sterilní destilovaná voda do 50 μl

Všechny směsi byly v mikrozkušnicích vloženy do termocyklu TECHNE od firmy Techgene a byl spuštěn následující program:

- 30 cyklů 30 s při 94 °C
 30 s při 50 °C
 2 min při 73 °C
- 1 cyklus 8 min při 73 °C
- chlazení při 4 °C do odebrání

Složení směsí pro 2. PCR je uvedeno v tabulce 4:

Tab. 4: Složení směsí pro 2.PCR

Název konstruktů	Složení směsi	Název konstruktů	Složení směsi
Del-4	1 µl produktu 1.PCR (pro del-4)	Del-6	1 µl produktu 1.PCR (pro del-6)
	1 µl oligonukleotidu 1-wt		1 µl oligonukleotidu 1-wt
	1 µl oligonukleotidu 8-wt		1 µl oligonukleotidu 8-wt
	1 µl DNA-polymerasy		1 µl DNA-polymerasy
	5 µl Pfu pufu		5 µl Pfu pufu
	1 µl dNTP's		1 µl dNTP's
	sterilní destilovaná voda do 50 µl		sterilní destilovaná voda do 50 µl
Del-8	1 µl produktu 1.PCR (pro del-8)	Del-10	1 µl produktu 1.PCR (pro del-10)
	1 µl oligonukleotidu 1-wt		1 µl oligonukleotidu 1-wt
	1 µl oligonukleotidu 8-wt		1 µl oligonukleotidu 8-wt
	1 µl DNA-polymerasy		1 µl DNA-polymerasy
	5 µl Pfu pufu		5 µl Pfu pufu
	1 µl dNTP's		1 µl dNTP's
	sterilní destilovaná voda do 50 µl		sterilní destilovaná voda do 50 µl

Mikrozkumavky se směsí pro 2. PCR byly opět vloženy do stejného termocykleru a byl spuštěn tentýž program při stejných podmínkách.

3.3.3 Přečištění a selekce konstruktů DNA užitím agarosové elektroforézy

Jednotlivé směsi nasyntetizovaných inzertů z kroku 3.3.2 byly přečištěny elektroforézou na agarosovém gelu v horizontálním provedení. Byl připraven 1,5 % gel agarosy v TAE pufu (na předvážkách navážené množství 0,9 g agarosy přidáno do 60 ml TAE pufu) do Erlenmeyerovy baňky. Směs byla ohřata v mikrovlnné troubě cca 2 minuty, než se vytvořil čirý roztok. Po zchlazení na cca 40 °C bylo do ještě neztuhlého gelu přidáno 6 µl barviva SYBR® Safe DNA Gel stain 10 000x koncentrovaného. Po vylití roztoku do nádoby na elektroforézu a ztuhnutí gelu byly do jamek nanášeny vzorky (vždy 20 µl produktu 1. PCR nebo 2. PCR, 5 µl glycerolu a 0,1 µl barviva SYBR® Safe DNA), markery (10 µl markeru 2-log Ladder) nebo samotné barvivo (pouze pro sledování migrace, zde použit 0,1% roztok barviva E129 v objemu 5 µl barviva a 5 µl glycerinu). Byla spuštěna elektroforéza při 110 V a dobu 40 minut.

3.3.4 Izolace DNA z gelu

Pro další práci se získanou DNA, sloužící jako inzert pro transformaci, bylo nutné izolovat produkt 2. PCR z gelu. To bylo provedeno pomocí sady Jet purification Kit od firmy Genomed. Bylo postupováno dle návodu dodaného v této sadě.

Za podsvícení modrým světlem byly z gelu vyříznuty části v zónách 6a, 7a, 1b, 2b, 3b, 4b, 6b a 7b, které představovaly produkt 2. PCR očištěný od nežádoucích nečistot. Jednotlivé části byly převedeny do mikrozkušavek eppendorf a byl přidán přibližně trojnásobek hmotnosti (převedený na objemové jednotky) pufru L1. Gel byl rozpuštěn v tomto roztoku a směs každé mikrozkušavky nanášena na kolonku zasazenou do nové mikrozkušavky. Takto připravené kolonky byly stočeny 1 minutu při 12 400 rcf na centrifuze Eppendorf centrifuge 5415 R. Filtrát byl odstraněn a na každou kolonku bylo nanášeno 500 μ l roztoku L2 příslušného kitu. Kolonky v mikrozkušavkách byly opět stočeny po dobu 1 minuty na stejné centrifuze při stejných podmínkách. Po stočení byl odstraněn filtrát a ještě jednou bez přidavku dalších komponent byly kolonky stočeny při 12 400 rcf na stejné centrifuze opět 1 minutu, aby bylo odstraněno co nejvíce filtrátu. Kolonky byly přendány do nových mikrozkušavek a na střed každé kolonky bylo přidáno 30 μ l sterilní destilované vody předeřáté na 69 °C v blokovém ohříváči VLM LS1. Po 1 minutě stání byly kolonky 2 minuty stáčeny při 12 400 rcf na stejné centrifuze. Filtrát byl uložen, ten již obsahoval DNA pro další postup.

3.4 Expresse delečních mutantů cytochromu b₅

3.4.1 Ligace a vnesení genu do vektoru

Aby kompetentní buňky mohly přijmout inzert (připravený 2 reakcemi PCR), bylo nutné jak inzert, tak i vektor štěpit na specifických místech restrikčními endonukleasami (Xho I a Nde I), které zajistí ostré konce, které na sebe nasednou při ligaci.

Směs pro štěpení vektoru, neboli plasmidové DNA, byla do mikrozkušavky eppendorf připravena smícháním:

- 0,75 μ l endonukleasy Xho I
- 0,75 μ l endonukleasy Nde I
- 12 μ l plasmidu pET-30a(+), resp. pET-22b
- 2 μ l pufru NEB Cut Smart (10x koncentrovaný) od firmy BioLabs
- sterilní destilovaná voda do 20 μ l

Směs pro štěpení konstruktů (připraveným PCR reakcemi a následným přečištěním po gelové elektroforóze) byla připravena do dalších mikrozkušavek, a obsahovala:

- 0,75 μ l endonukleasy Xho I
- 0,75 μ l endonukleasy Nde I
- 12 μ l produktu 2. PCR

- 2 μ l pufru NEB Cut Smart (10x koncentrovaný) od firmy BioLabs
- sterilní destilovaná voda do 20 μ l

Všechny směsi byly ponechány přes noc na inkubaci při 37 °C v inkubátoru IR 1500 Automatic CO2, Incubator, Flow Laboratories.

3.4.2 Kontrola štěpení

Pro ověření, že byly konstrukt i vektor správně štěpeny, byla provedena agarosová elektroforéza na 1,5% agarosovém gelu. Na předvážkách bylo naváženo 0,6 g agarosy a rozpuštěno ve 40 ml TAE pufru 1x koncentrovaného. Směs byla ohřáta v mikrovlnné troubě, až vznikla čirá tekutina. Po zchlazení na cca 40 °C bylo ke směsi přidáno 4 μ l barviva SYBER® Safe SDNA Gel stain 10 000x koncentrovaného. Směs byla nalita do nádoby na elektroforézu a po zpolymerování a vytvoření zón hřebenem byl do každé dráhy nanesen vzorek o složení:

- vzorky konstruktů - vždy spotřebována směs přečištěné z agarosového gelu (cca 20 μ l směsi)
- vzorek vektoru - použito 12 μ l klonovacího vektoru pET 30a(+), resp. pET-22b
- barvivo E129 připravené zředěním s glycerinem (poměr glycerin:barvivo = 4:1)

Elektroforéza proběhla při 110 V po dobu 36 minut.

3.4.3 Ligace

Do 4 mikrozkušavek eppendorf bylo pipetováno vždy stejné množství komponent, jen dle příslušného konstruktu byl použit del-4, del-6, del-8 nebo del-10. Směs pro ligaci vždy obsahovala:

- 35-40 μ l příslušného konstruktu (použito vše, co bylo po izolaci z gelu uschováno v mrazícím zařízení při -20 °C)
- 4 μ l vektoru pET-30a(+) pro del-8 a del-10, resp. 4 μ l vektoru pET-22b pro del-4 a del-6
- 4 μ l pufru pro T4 DNA ligasu (od firmy BioLabs New England)
- 0,5 μ l T4 DNA ligasy

Mikrozkušavky s připravenou směsí byly vloženy do cykleru TECHNE značky Techgene a směs byla ponechána cca 17 hodin při 16°C.

3.4.4 Transformace buněk a amplifikace vektoru

Buňky *E.coli* XL10-Gold, které obsahují syntetické geny pro cytochrom b₅, byly vyjmuty z mrazáku (-80°C). Nejprve byly rozmrazeny na ledu (-20°C) při laboratorní teplotě. Do čistých mikrozkušavek byly vneseny konstrukty del-4, del-6, del-8 a del-10 zaligované do vektoru pET-30a(+)/pET-22b. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 100 μ l buněk XL10-Gold a 20 μ l ligační směsi. Po dobu 30 minut byla směs ponechána na ledu (při laboratorní teplotě). Poté byl proveden teplotní šok: na 1,5 minuty byly mikrozkušavky se směsí vloženy do blokového ohříváče

LS1 VLM, který byl vyhřátý na 42 °C. Poté byly směsi chlazeny na ledu (při laboratorní teplotě) po dobu 2 minut. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 300 µl LB media (bez přídavku antibiotik) a takto připravená směs byla kultivována 1 hodinu při 37°C v inkubátoru IR 1500 Automatic CO2 Incubator.

Po inkubaci byla směs odstředěna na stolní centrifuze eppendorf centrifuge 5415 při 5000 RPN po dobu 0,5 minuty. 100 µl horní vrstvy supernatantu bylo odebráno a ve zbylém objemu supernatantu byla peleta resuspendována. Suspenze byla přenesena na předem připravené plotny s kanamycinem (o koncentraci 50 µg/ml, 1000x koncentrovaný, do 10 ml ohřátého agaru bylo přidáno 100 µl zásobního roztoku kanamycinu). Vyžihanou hokejkou byla směs po agarové plotně rozetřena a po zaschnutí byla dnem vzhůru inkubována přes noc při 37°C. Paralelně byla provedena kontrola, na samostatnou agarovou plotnu s antibiotikem byly rozetřeny buňky *E. coli* XL10-Gold, resp. DH5α. Takové buňky nenesou plasmid a tím ani rezistenci na antibiotika (kanamycin, resp. ampicilin) a v případě správného postupu na agarové plotně nevyrostou.

Postup proveden ve flow boxu, za použití rukavic, předem sterilizovanou hokejkou, která byla nejdříve promyta 96% et-OH a poté vyžihána v plameni kahanu.

3.4.5 Přeočkování metodou „single cell colony“

Následující den byly kolonie, které vyrostly na agarových plotnách, přeočkovány do tekutého media. Tento postup je zařazen z toho důvodu, že agarové plotny by již nemusely stačit jako výživné medium pro kultivované bakterie.

Sterilním párátkem byla přeočkována vždy 1 náhodně vybraná kolonie z plotny a přenesena do zkumavky Falcon s tekutým LB-mediumem. Všechny směsi byly vloženy do třepačky G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific CO. Inc. Edison, N-J.U.S.A. Třepání probíhalo při 220 RPM a teplotě cca 40°C.

3.4.6 Izolace DNA z buněk pomocí fenol-chloroformu

Nejdříve byla pomocí pinzety odstraněna párátko ze zkumavek s buněčnou směsí. Zkumavky obsahující bakterie byly centrifugovány (přístroj Allegra X-22R Centrifuge) po dobu 20 minut při 4500 RPM a teplotě 4°C. Po stočení byly supernatanty vylity a zkumavky typu Falcon převráceny dnem vzhůru na filtračním papíru. Ke každému sedimentu na dně zkumavky bylo přidáno 200 µl vychlazeného GTE. Po 5 minutách stání při laboratorní teplotě byla směs převedena do 1,5 ml mikrozkušavky eppendorf. Po dalších 5 minutách stání bylo ke směsím přidáno 300 µl lyzačního pufru (připraven smícháním 4,3 ml sterilní mQ vody, 500 µl 10% SDS a 200 µl 5 M NaOH). Dále bylo do směsi přidáno 200 µl vychlazeného draselno-acetátového pufru (KAc). Směs v mikrozkušavce byla promíchána otáčením mikrozkušavky po dobu 10 s, poté byla inkubována 10 minut v lednici. Po ochlazení byly směsi centrifugovány na stolním přístroji Centrifuge 5415R

ependorf po dobu 10 minut při 16100 rcf. Supernatanty byly přeneseny do nových mikrozkuvek, do kterých bylo přidáno 500 μ l směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol v poměru 25:24:1. Tyto směsi byly opět odstředěny po dobu 2 minut při 5400 \times g a teplotě 4 °C na stejné centrifuze. Supernatant byl odsát a k peletě bylo přidáno 190 μ l 70% et-OH na její promytí. Poté byl supernatant odstraněn a vzorky byly dosušeny na přístroji DNA Speed Vac DNA 110 (od firmy Savant), a to při nezavřených mikrozkuvkách a při středním zahřívání. Ke vzorkům bylo po dosušení přidáno 100 μ l TE pufru a 0,5 μ l RNAsy A (10 μ g/ml) a celá směs byla zahřívána ve vyhřívaném bloku na teplotu 60 °C. Po rozpuštění byla směs vyndána, když vytemperovala na laboratorní teplotu, bylo k ní přidáno 60 μ l PEG pufru a směs byla ponechána 1 hodinu na ledové lázni. Poté byla 15 minut centrifugována při 4 °C na stejném přístroji při 15000 \times g. Peleta po slítí supernatantu byla rozpuštěna v 30 μ l sterilní destilované vody o teplotě 55 °C.

Směs byla uložena v mrazáku při -20 °C.

3.5 Příprava vzorků na sekvenaci

Pro ověření správnosti vytvořeného genetického kódu byla využita metoda sekvenace (čtení) DNA. Ta analyzuje pořadí nukleotidových bazí. Nejprve byla určena koncentrace DNA ve vzorcích, jeho čistota poté byla vhodně naředěna, aby její hodnota odpovídala požadavkům sekvenační laboratoře.

Bylo užito vztahu pro výpočet koncentrace DNA:

$$c_{DNA} = (A_{260} - A_{320}) \times \text{ředění} \times 50,$$

kde c_{DNA} je koncentrace DNA [$\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$], A_x je absorbance při vlnové délce x nm, ředění je celé číslo udávající, kolikrát byl vzorek zředěn.

DNA je čistá, pokud neobsahuje různé příměsi a nečistoty. V roztoku mohou být přítomny např. proteiny, které mají absorpčním maximum při 260 nm. Nukleové kyseliny mají absorpční maximum při 280 nm. Čistota DNA se udává poměrem : A_{260}/A_{280} , kde ideální číselná hodnota je ideální mezi 1,8 a 2,0. Dále se využívá poměru A_{260}/A_{280} , jehož optimální výsledek je 1,8.

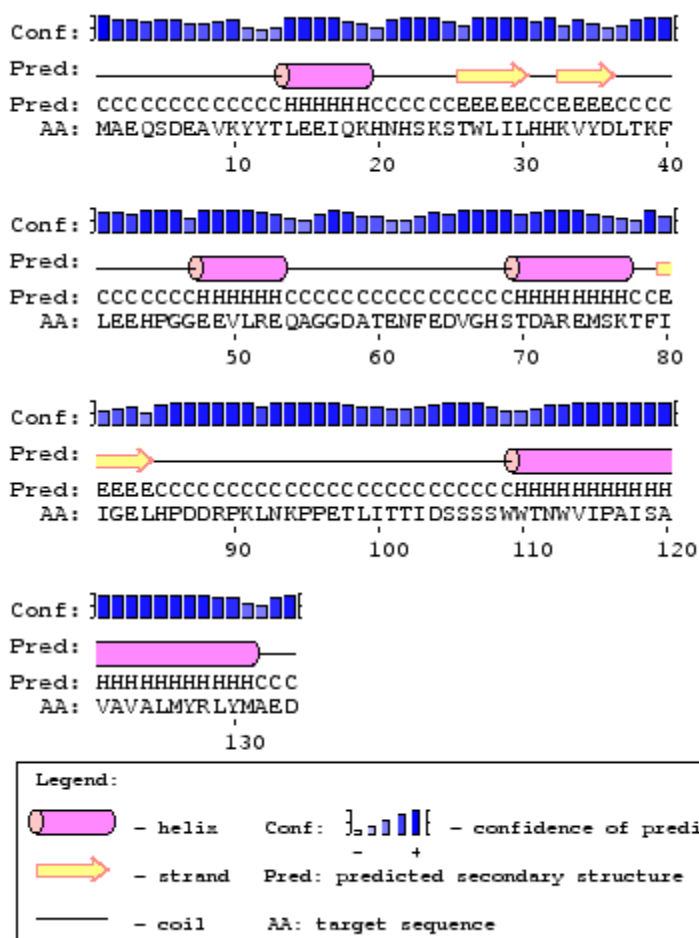
Měření absorpčních spekter vzorků bylo provedeno na spektrofotometru Diod Array 8453, Hewlett-Packard. Absorbance byla měřena proti destilované vodě, pozornost byla věnována hodnotám naměřených při 230, 260 a 280 nm.

Pro sekvenaci bylo potřeba dodržet pokyny sekvenační laboratoře, tedy připravit ideálně 7 μ l roztoku DNA, který obsahuje 3-5 ng DNA na 100 pb plasmidové DNA. Vzorky byly vhodně naředěny sterilní destilovanou vodou a v mikrozkuvkách dodány označené do Laboratoře pro sekvenaci DNA Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7. K analýze DNA byl použit primer T7 promoter.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Volba delečných mutantů

Delece byly prováděny v oblasti linkeru spojujícího solubilní doměnu s membránovou. Přestože struktura celé retikulární formy cytochrom b_5 není známa, na základě predikcí sekundární struktury se zdá, že oblast linkeru (aminokyseliny 90 - 105) ani její bezprostřední okolí nemá žádnou sekundární strukturu (obr. 8). Je tedy málo pravděpodobné, že mutace prováděné v této oblasti by neměly strukturu proteinu významným způsobem destabilizovat.



Obr. 8

Na obrázku je ukázán výsledek predikce sekundárních struktur lidského cytochromu b_5 vytvořený pomocí serverové aplikace PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Deleční mutanti byly navrženy tak, aby zahrnovaly jak delece krátké, které by pravděpodobně neměly mít na funkci cyt b_5 vliv. Tak i dlouhé delece odstraňující prakticky celý linker, u nichž lze předpokládat velký vliv na interakci s cytochromem P450. Sekvence přirozené formy i sekvence delečných mutantů jsou uvedeny na obr. 9.

Přirozená forma cytochromu b₅

MAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHKKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQAGGDATENFEDVGHSTDAREM
SKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITIDSSSSWWTNWVI PAISAVAVALMYRLYMAED

Del_4

MAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHKKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQAGGDATENFEDVGHSTDAREM
SKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITIDSSSSWWTNWVI PAISAVAVALMYRLYMAED

Del_6

MAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHKKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQAGGDATENFEDVGHSTDAREM
SKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITIDSSSSWWTNWVI PAISAVAVALMYRLYMAED

Del_8

MAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHKKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQAGGDATENFEDVGHSTDAREM
SKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITIDSSSSWWTNWVI PAISAVAVALMYRLYMAED

Del_10

MAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHKKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQAGGDATENFEDVGHSTDAREM
SKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITIDSSSSWWTNWVI PAISAVAVALMYRLYMAED

Obr. 9 Aminokyselinové sekvence cytochromu b₅ a jednotlivých delečních mutantů

Podtržená je vždy linkerová část proteinu, červeně jsou u každé sekvence zvýrazněna sekvence, která bude zrušena u dané varianty chybět.

4.2 Návrh oligonukleotidů pro genovou syntézu

Sekvence nukleotidů použitá pro genovou syntézu vycházela ze sekvence optimalizované pro bakterii *E. coli* kmen K12 [8], ta kódovala protein identický s přirozenou formou lidského retikulárního cytochromu b₅. Zde byla použita podobná strategie syntézy s tím, že nukleotidy kódující oblast linkeru byly postupně nahrazovány jinými (kratšími), které byly navrženy tak, aby byly zachovány podmínky vhodné pro genovou syntézu pomocí PCR.

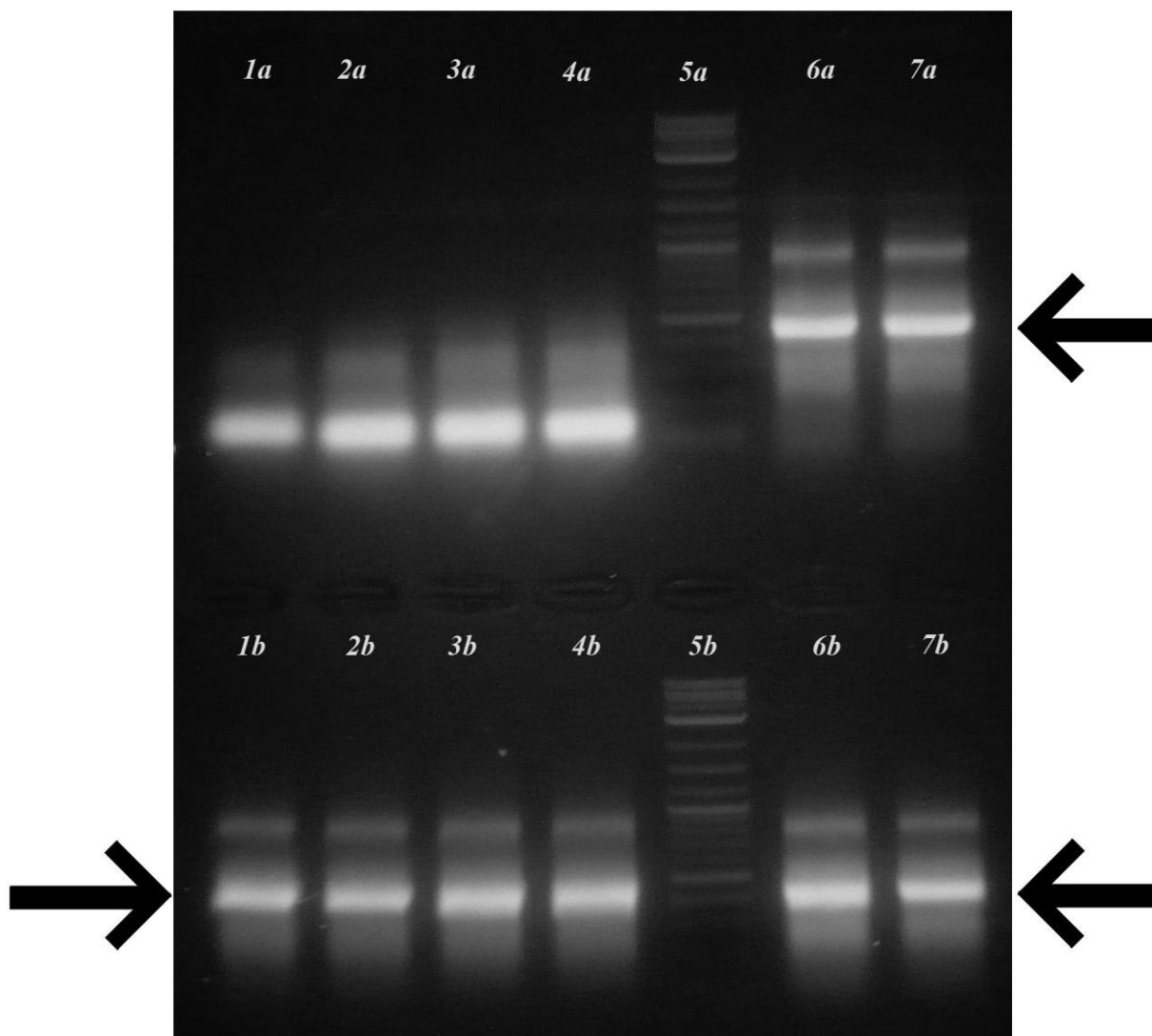
Genová syntéza spočívala v nasedáním oligonukleotidů, tedy řetězců nukleových bází o délce 60-80 pb. Navrženy byly tak, aby obsahovaly komplementární konce s podobnou teplotou nasedání. V oblasti mezidoménového linkeru cytochromu b₅ byly zrušeny 4, 6, 8 a 10 aminokyselin a to takové, které v překladu do DNA kódu nepatřily do oblastí úseků pro nasedání.

Krajní oligonukleotidové řetězce, tedy 1-wt a 8-wt (viz tab. 1) byly opatřeny restrikcími místy pro endonukleasy Nde I a Xho I a také iniciačním kodonem a STOP kodonem.

4.3 Přečištění agarosovou elektroforézou

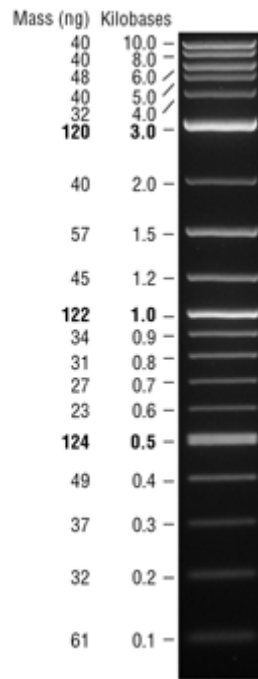
Tento krok byl proveden, protože při PCR vnikají geometrickou řadou žádoucí produkty, ale ve směsi se vyskytují i produkty nežádoucí (např. špatně nasynthetizované, kopie templátu). V celé směsi se tedy vyskytují fragmenty DNA různých délek.

Pomocí agarosové elektroforézy je možné selektovat úseky DNA podle jejich velikostí a poté je z gelu izolovat. Pomocí markeru o známých délkách úseků byly detekovány konstrukty jednotlivých delečních mutantů. Zde byl použit marker 2-log Ladder, který obsahuje úseky DNA od 100 pb do 10000 pb. Jeho dráhy jsou uvedeny na obr. 10.



Obr. 10 Agarosová elektroforéza selektující jednotlivé délky DNA

Horní část gelu: zóna 1a - produkt 1.PCR del-4, zóna 2a - produkt 1.PCR del-6, zóna 3a - produkt 1.PCR del-8, zóna 4a - produkt 1.PCR del-10, zóna 5a - marker 2 log DNA Ladder, zóny 6a, 7a - produkt 2.PCR del 4, zóna 8a - barvivo E129; dolní část gelu: zóny 1b, 2b - produkt 2.PCR del 6, zóny 3b,4b - produkt 2.PCR del 8, zóna 5b - marker 2-log DNA Ladder (obr. 11), zóny 6b,7b - produkt 2.PCR del 10. Černou šipkou označeny zóny, ve kterých se vyskytují jednotlivé konstrukty všech připravovaných delecí cytochromu b_5 . Ty byly dále zpracovány. Vzorok směsí s produkty 1.PCR byly na gelu spíše kvůli zaplnění volných drah gelu.



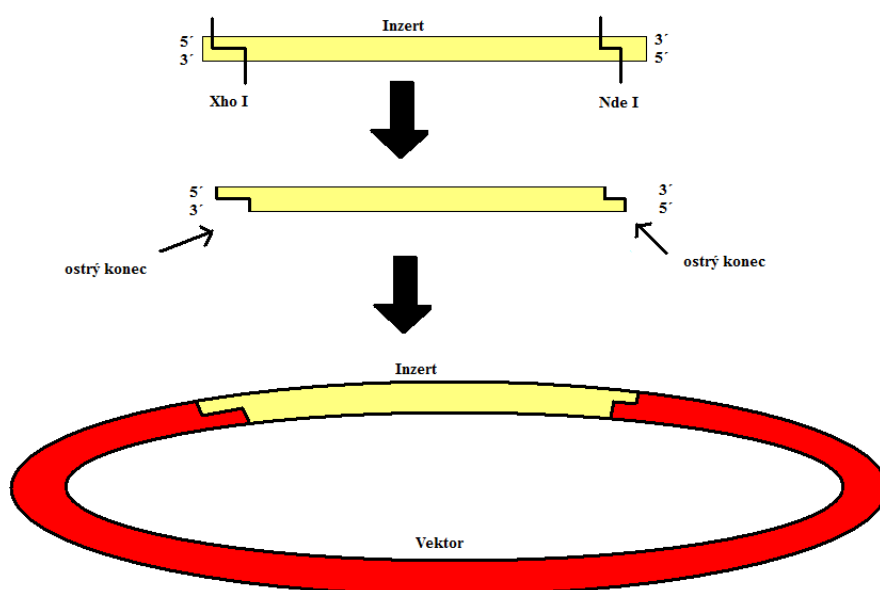
Obr. 11 Marker 2-log DNA Ladder

K jednotlivým úsekům DNA je přiřazena jejich velikost (kpb) a hmotnost (ng). Převzato z [36].

4.4 Ligace vektoru a inzertů

Aby kompetentní buňky mohly přijmout inzert (připravený 2 reakcemi PCR), bylo nutné jak inzert, tak i vektor štěpit na specifických místech restrikčními endonukleasami (Xho I a Nde I), které vytvoří překrývající se konce, které na sebe nasednou při ligaci (obr. 12).

Zapojení krátké DNA nesoucí geny požadovaného produktu do plasmidu zajistila T4 DNA ligasa. To je enzym, který vytváří fosfodiesterové vazby spojující 3' a 5' konce dvou řetězců DNA, k čemuž vyžaduje ATP.

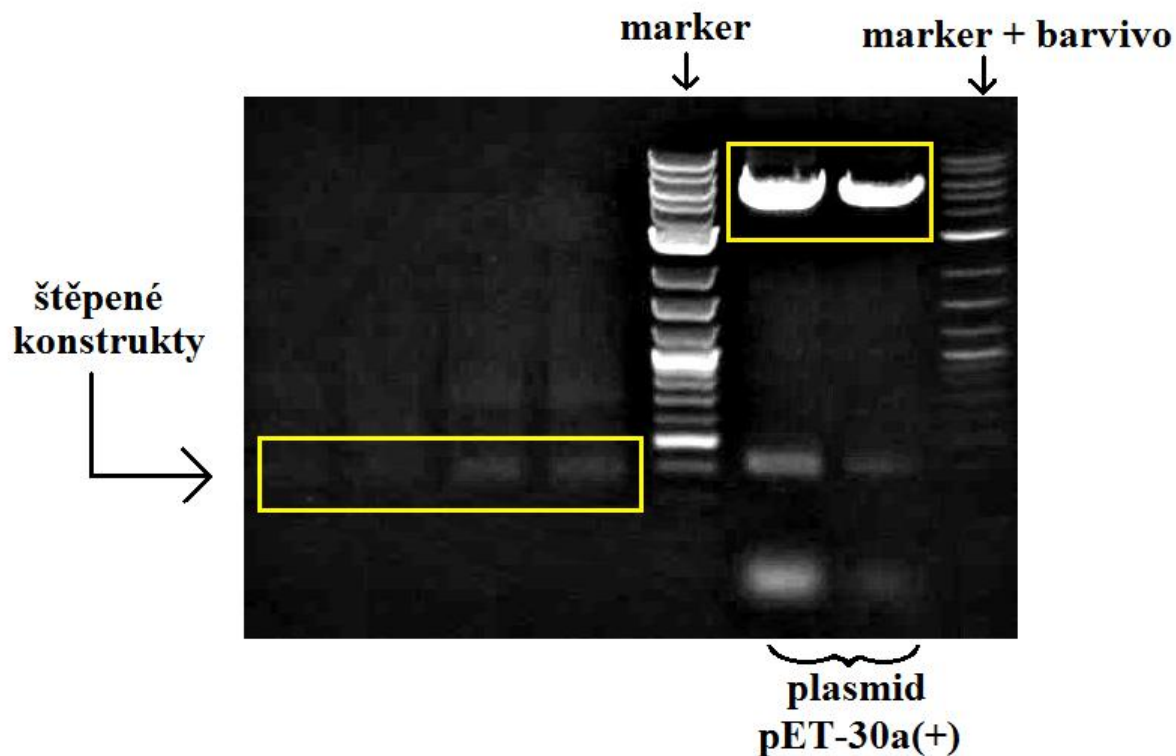


Obr.1 2 Vložení inzertu do vektoru

Na obrázku je schematicky znázorněno, jak je inzert štěpen restričními endonukleasami Nde I a Xho I. Tím vznikají restriční místa s ostrými konci, které se spojují s kompatibilními konci štěpeného vektoru při ligaci. Vytvořeno podle [32, 34, 38, 37].

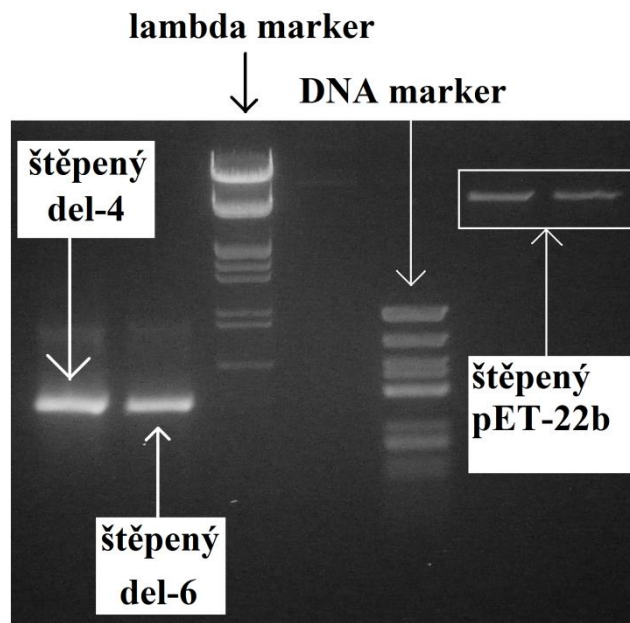
4.5 Kontrola štěpení agarosovou elektroforézou

Po štěpení endonukleasami byla provedena kontrola (vizuálně podle velikosti bandů v drahách gelu v porovnání s markery, obr. 13 a obr. 14).



Obr. 13 Kontrola štěpení plasmidu a konstruktů I

Štěpené konstrukty značí vzorky del-4, del-6, del-8 a del-10 po reakci s restrikčními enzymy, pod označením „marker“ je 2-logLadder, dráhy plasmidu pET-30a(+) štěpeného stejnými enzymy jako konstrukty ve dvou předposledních drahách, žlutě zvýrazněna část připravená přijmout inzert, v dráze „marker+barvivo“ je menší množství 2-log Ladder a barvivo E129. Obrázek je upraven kvůli zesílení slabě viditelných drah štěpeného cytochromu b_5 . V tomto bloku experimentů se konstrukty del-4 a del-6 nezdařilo připravit.



Obr. 14 Kontrola štěpení plasmidu a konstruktů II

Na tomto obrázku je gel po elektroforéze z druhého bloku experimentů, kde byly endonukleasami štěpené konstrukty del-4 a del-6 (první dvě dráhy zleva) a plasmid pET-22b (první dvě dráhy zprava, vyznačeny úseky pro přijetí inzertu). K určení velikostí úseků byly použity markery Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (označen zkráceně jako lambda marker) a DNA marker 155-970 (značen zkráceně DNA marker)

4.6 Transformace buněk a amplifikace vektoru

Pro přijetí vektoru s vloženým inzertem kompetentními buňkami *E.coli* XL 10 Gold (resp. DH5 α) byla zvolena metoda teplotního šoku. Ta spočívá v tom, že změnou teploty je na chvíli oslaben povrch buňky krytý cytoplazmatickou membránou. Tím se integruje vektor dovnitř buňky. Tento krok nesmí trvat dlouho, hned po něm jsou buňky opět chlazeny a je jim přidáno medium s živinami, aby se vzpamatovaly.

V postupu byly použity nejprve pro všechny vzorky buňky kmene *E.coli* DH1, ve kterých proběhly všechny transformace neúspěšně, a XL10-Gold. Do nich se i po několika opakováních zdárně povedlo vložit jen vektory s inzerty del-8 a del-10. Zbylé 2 inzerty s geny pro del-4 a del-6 byly vneseny do buněk DH5 α , a to v plasmidu pET-22b.

Amplifikace znamená zmnožení, tedy zvýšení počtu kopií DNA obsahující geny kódující proteiny, v případě této práce deleční mutanty cytochromu b₅. Probíhá uvnitř buněk, které úspěšně přijaly DNA vloženou do plasmidu. Pro urychlení množení buněk a tím i genů bylo poskytnuto buňkám prostředí optimální teploty 37 °C v inkubátoru a tmavém prostředí a také živiny (agar).

Původní záměr provést transformaci v kmenech DH1 se nepovedl. Na agarových plotnách sice vyrostlo několik kolonií, ale růžové barvy, případně nevyrostly žádné kolonie. Mohlo to být způsobeno špatnou volbou kmene, který nepřijal plasmid, případně mohla být do vzorku s buňkami vnesena kontaminace. Práce s XL10-Gold se podařila pouze ve dvou případech a to i přes

několikanásobné opakování. Zde bylo možné znečištění při manipulaci s vektorem pET-30a(+), proto byl znovu tento prázdný plasmid amplifikován a izolován pro nové pokusy. Ani při dalším použití se transformace zbývajících dvou inzertů nezdařila. Chyba mohla být opět způsobena špatnou manipulací s vektorem, jeho kontaminací či vysokou dávkou antibiotika. Poslední možnost je však málo pravděpodobná, byly provedeny i kultivace na agarových plotnách s nižší koncentrací kanamycinu.

4.7 Čistota a koncentrace izolované DNA

Pro zjištění čistoty a koncentrací DNA jednotlivých konstruktů byly naměřeny hodnoty absorpčních při charakteristických vlnových délkách (tab. 5). Z těchto hodnot byly určeny poměry absorpčních a koncentrace DNA (viz oddíl 3.5).

Tab. 5 Naměřené absorpance a dopočtené hodnoty určující čistotu a koncentraci DNA

Konstrukt	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	c _{DNA} [μg · ml ⁻¹]
Del-4	0,19	0,43	0,21	2,05	2,26	5397
Del-6	0,21	0,52	0,26	2,00	2,47	6526
Del-8	0,0050	0,0124	0,0063	1,96	2,47	249
Del-10	0,0168	0,0367	0,0188	1,95	2,18	460

Z výsledků je patrné, že ne všechny vzorky byly ideálně čisté. To mohlo být způsobeno jednak nedokonalou izolací DNA, jednak znečištěním při manipulaci během měření absorpčních spekter.

4.8 Sekvenace

Za správný výsledek je považována sekvence se 100% shodou genetického kódu jako v návrhu na syntézu. Na obrázku 15 jsou genetické kódy všech konstruktů.

Product del_4:

CATATGGCGGAACAGTCTGACGAAGCGGTTAAATACTACACCCTGGAAGAAATCCAGAAACACAACCACTCTAAA
TCTACCTGGCTGATCCTGCACCACAAAGTTTACGACCTGACCAAATTCCTGGAAGAACACCCGGGTGGTGAAGAA
GTTCTGCGTGAACAGGCGGGTGGTGAACGCGACCGAAAACCTTCGAAGACGTTGGTCACTCTACCGACGCGCGTGAA
ATGTCTAAAACCTTCATCATCGGTGAACTGCACCCGGACGACCGC**CCGAAACTGAACACCCTGATCACCACCATC**
GACTCTTCTTCTTCTTGGTGGACCAACTGGGTTATCCCGGCGATCTCTGCGGTTGCGGTTGCGCTGATGTACCGT
CTGTACATGGCGGAAGACTAA**CTCGAG**

Product del_6:

CATATGGCGGAACAGTCTGACGAAGCGGTTAAATACTACACCCTGGAAGAAATCCAGAAACACAACCACTCTAAA
TCTACCTGGCTGATCCTGCACCACAAAGTTTACGACCTGACCAAATTCCTGGAAGAACACCCGGGTGGTGAAGAA
GTTCTGCGTGAACAGGCGGGTGGTGAACGCGACCGAAAACCTTCGAAGACGTTGGTCACTCTACCGACGCGCGTGAA
ATGTCTAAAACCTTCATCATCGGTGAACTGCACCCGGACGACCGC**CCGAAACTGAACATCACCACCATCGAC**TCT
TCTTCTTCTTGGTGGACCAACTGGGTTATCCCGGCGATCTCTGCGGTTGCGGTTGCGCTGATGTACCGTCTGTAC
ATGGCGGAAGACTAA**CTCGAG**

Product del_8:

CATATGGCGGAACAGTCTGACGAAGCGGTTAAATACTACACCCTGGAAGAAATCCAGAAACACAACCACTCTAAA
TCTACCTGGCTGATCCTGCACCACAAAGTTTACGACCTGACCAAATTCCTGGAAGAACACCCGGGTGGTGAAGAA
GTTCTGCGTGAACAGGCGGGTGGTGAACGCGACCGAAAACCTTCGAAGACGTTGGTCACTCTACCGACGCGCGTGAA
ATGTCTAAAACCTTCATCATCGGTGAACTGCACCCGGACGACCGC**CCGAAACTGAACACCATCGAC**TCTTCTTCT
TCTTGGTGGACCAACTGGGTTATCCCGGCGATCTCTGCGGTTGCGGTTGCGCTGATGTACCGTCTGTACATGGCG
GAAGACTAA**CTCGAG**

Product del_10:

CATATGGCGGAACAGTCTGACGAAGCGGTTAAATACTACACCCTGGAAGAAATCCAGAAACACAACCACTCTAAA
TCTACCTGGCTGATCCTGCACCACAAAGTTTACGACCTGACCAAATTCCTGGAAGAACACCCGGGTGGTGAAGAA
GTTCTGCGTGAACAGGCGGGTGGTGAACGCGACCGAAAACCTTCGAAGACGTTGGTCACTCTACCGACGCGCGTGAA
ATGTCTAAAACCTTCATCATCGGTGAACTGCACCCGGACGACCGC**CCGAAACTGATCGAC**TCTTCTTCTTCTGG
TGGACCAACTGGGTTATCCCGGCGATCTCTGCGGTTGCGGTTGCGCTGATGTACCGTCTGTACATGGCGGAAGAC
TA**ACTCGAG**

Obr. 15 Genetický kód delečních mutantů cytochromu b₅ ověřený sekvenací

Modře jsou podbarveny řetězce DNA kódující zbylou oblast linkerové domény, černě je na začátku zvýrazněn kód pro endonukleasu Nde I, černě je na konci každého genetického kódu zvýrazněno restriční místo pro endonukleasu Xho I.

5 ZÁVĚR

Navzdory počátečním potížím, kdy se zpočátku opakovaně nedařilo připravit dva konstrukty s kratšími delececi, se nakonec všechny čtyři plánované expresní vektory kódující modifikované formy lidského retikulárního cytochromu b_5 podařilo připravit. Finálními preparáty jsou expresní vektory založené na plasmidech pET-30a(+) a pET-22b v množství a čistotě dostatečné pro následnou heterologní expresi delečních mutantů lidského cytochromu b_5 v *E. coli*. Následně byla z těchto buněk amplifikovaná DNA izolována a správnost genetického kódu byla ověřena sekvenací.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Chan, W.T., Verma, Ch.S., Lane, D.P., Gan, S. K.-E.: A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*, *Bioscience Reports*, **33**, (2013), Abstract
2. Clarke, T.A., Sang-Choul, I., Bidwai, A., Waskell, L.: The Role of the Length and Sequence of the Linker Domain of Cytochrome b_5 in Stimulating Cytochrome P450 2B4 Catalysis, *J. Biol. Chem.* **279**, s. 36809–36818 (2004)
3. Čapková-Frydrychová, R., Sýkorová, M., Šíchová, J., Brož, V.: Kurz základních metod molekulární biologie, Ekotech, Investice do rozvoje vzdělávání, dostupné na webu: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/ZMMB4.pdf> [cit. 11.8.2015]
4. Dürr, U. H. N., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: The cytochromes P450 and b_5 and their reductases - Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1768** (12), s. 3235-3259 (2007), použité strany: 3240
5. Dürr, U. H. N., Yamamoto, K., IM, S.-Ch., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: Solid-State NMR Reveals Structural and Dynamical Properties of a Membrane-Anchored Electron-Carrier Protein, Cytochrome b_5 , *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6670–6671 (2007) použito: obrázek
6. Fontana, J., Šajdíková, M., Maďa, P.: Function of Cells and Human Bod, Multimedia textbook, Chap. 4, dostupné na webu: <http://fbt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/> [cit. 16.8.2015]
7. Furchtgott, L., Wingreen, N.S., Huang, K.C.: Mechanism for maintaining cell shape in rod-shaped Gram-negative bacteria, *Mol. Microbiol.*, **81**, s. 340-53, Abstract (2011)
8. Hálková, T.: Příprava rekombinantního lidského cytochromu b_5 , Diplomová práce, PřF UK Praha, katedra biochemie, (2010)
9. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chem. Listy*, **94**, s. 913-918 (2000)
10. Kotrbová V., Mrázová B., Moserová M., Martínek V., Hodek P., Hudeček J., Frei E., Stiborová M.: Cytochrome $b(5)$ shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy, *Biochem. Pharmacol.*, **82**(6), s. 669-80 (2011), Abstract
11. Noordermeer, M.A., Veldink, G.A., Vliegthart J. F.G.: Fatty Acid Hydroperoxide Lyase: A Plant Cytochrome P450 Enzyme Involved in Wound Healing and Pest Resistance, *CHEMBIOCHEM*, **2**, s. 494- 504 (2001)
12. Nunez, M., Guittet, E., Pompon, D., van Heijenoort, C., Truan, G.: NMR structure note: oxidized microsomal human cytochrome b_5 , *J Biomol NMR*, **47**, s. 289-295 (2010)
13. Mitchell, A.G., Martin, Ch.E.: A Novel Cytochrome b_5 -like Domain Is Linked to the Carboxyl Terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* D-9 Fatty Acid Desaturase, *J. Biol. Chem.*, **270**, s. 29766-29772 (1995)
14. Mitoma, J., Ito, A.: The carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b_5 are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum, *The EMBO Journal* **11**, s. 4197 - 4203 (1992)
15. Pandey, M. K., Vivekanandan, S., Yamamoto, K., Im, S. Ch., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: Proton-Detected 2D Radio Frequency Driven Recoupling Solid-state NMR Studius on Micelle-associated Cytochrome- b_5 , *J. Magn. Reson.*, **242**, s. 169-179 (2014)
16. Pandey, M. K., Vivekanandan, S., Yamamoto, K., Im, S. Ch., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: Proton-Detected 2D Radio Frequency Driven Recoupling Solid-state NMR Studius on Micelle-associated Cytochrome- b_5 , *J. Phys. Chem. B.*, **117**, s. 13851–13860 (2013)
17. Rossi, C.B., de Micheli, G., Carrara, S.: P450-Based Nano-Nio-Sensors for Personalized Medicine, Biosensors - Emerging Materials and Applications, Prof. Pier Andrea Serra (Ed.), ISBN:978-953-307-328-6, InTech, dostupné na webu: <http://www.intechopen.com/books/biosensors-emergingmaterials-and-applications/p450-based-nano-bio-sensors-for-personalized-medicine> [cit. 13.8.2015]
18. Růčková E., Müller P., Vojtěšek B.: Expresse a purifikace proteinů, Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, *Klin. Onkol.*, **27**, s. S92–S97 (2014) použité strany: S92-S94 dostupné na webu: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4494.pdf> [cit. 11.8.2015]

19. Schenkman, J.B., Janson, I.: The many roles of cytochrome b₅, *Pharmacology & Therapeutics* 97, s. 139-152 (2003)
20. Sergeev, G. V., Gilep, A. A., Usanov, S.A.: The Role of Cytochrome b₅ Structural Domains in Interaction with Cytochromes P450, *Biochemistry (Mosc.)*, 79, s. 406-16 (2014)
21. Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Sborník z 1. multioborového semináře „Otevřená věda“*, Praha, s. 6-7 (2005)
22. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem. listy*, 93, s. 229-237 (1999)
23. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem. Listy*, 98, s. 876 – 890 (2004)
24. Stiborová M., Indra R., Moserová M., Černá V., Rupertová M., Martínek V., Eckschlager T., Kizek R., Frei E.: Cytochrome b₅ Increases Cytochrome P450 3A4 - Mediated Activation of Anticancer Drug Ellipticine to 13-Hydroxyellipticine Whose Covalent Binding to DNA Is Elevated by Sulfotransferases and *N,O*-Acetyltransferases, *Chem. Res. Toxicol.*, 25, s. 1075–1085 (2012), Abstract
25. Vergères, G., Ramsden, J., Waskell, L.: The Carboxyl Terminus of the Membrane-binding Domain of Cytochrome b₅ Spans the Bilayer of the Endoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.*, 270, s. 3414-3422 (1995)
26. Vergères, G., Waskell, L.: Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology, *Biochemie*, 77, 604-620 (1995)
27. Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J., Six, S.: Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66, s. 3-22, abstract (1994)
28. Xu, C., Dong, J., Ip, M., Wang, X., Leung, A.W.: Sonodynamic action of chlorin e6 on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Ultrasonics*, Abstract (2015)
29. Yamamoto, K., Gildenberd, M., Ahuja, S., Im, S.-Ch., Percy, P., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: Probing the Transmembrane Structure and Topology of Microsomal Cytochrome-P450 by Solid-State NMR on Temperature-Resistant Bicelles, *Sci. Rep.*, 3:2556, s. 1-6 (2013)
30. Vector Database, dostupné na webu: <https://www.addgene.org/vector-database/2576/> [cit. 11.8.2015]
31. <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Expres-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf> [cit. 11.8.2015]
32. <http://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2012/04/11/cohesive-end-cloning> [cit. 14.8.2015]
33. <http://www.computationalbioenergy.org/QSpec/Ecoli.htm> [cit. 12.8.2015]
34. <http://www.di.uq.edu.au/sparqligation> [cit. 13.8.2015]
35. <http://www.genesou.com.img.800cdn.com/uploads/vector/pet30a-vector-map.jpg> [cit. 11.8.2015]
36. https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/A3D8DD0EA528427E84DB365C7BF8E50A/Gel%20Photos/N3200_thumb.gif [cit. 13.8.2015]
37. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5509?lang=en®ion=CZ> [cit. 14.8.2015]
38. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r6379?lang=en®ion=CZ> [cit. 14.8.2015]