

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok KOŠIR

HETEROLOGNO IZRAŽANJE IN ENCIMSKA AKTIVNOST
LANOSTEROL 14α -DEMETILAZE PRI SESALCIH

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

HETEROLOGOUS EXPRESSION AND ENZYME ACTIVITY OF
LANOSTEROL 14α -DEMETHYLASE IN MAMMALS

GRADUATION THESIS
University studies

Junij 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za molekularno biologijo, Inštituta za biokemijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani, ter Centru za funkcijo genomiko in biočipe, Inštituta za Biokemijo, pod vodstvom prof. dr. Damjane Rozman.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Rozman.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina Sepčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Damjana Rozman
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo izdal v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 11. junij 2007

Rok Košir

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.2:599(043.2)=863
KG	CYP51/mutageneza/fosforilacija/heterologna ekspresija
KK	
AV	KOŠIR, Rok
SA	ROZMAN, Damjana (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2007
IN	HETEROLOGNO IZRAŽANJE IN ENCIMSKA AKTIVNOST LANOSTEROL 14α -DEMETILAZE PRI SESALCIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 75 str., 12 preg., 34 sl., 46 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Gen CYP51 kodira encim lanosterol 14α -demetilazo (CYP51). Spada v naddružino citokromov P450 in sodeluje v biosintezi holesterola. Je eden najbolj ohranjenih genov <i>CYP</i> in je razširjen pri evkariontih in prokariontih. V diplomskem delu smo želeli povečati topnost proteina CYP51 v <i>E. coli</i> ter preveriti vpliv stopnje fosforiliranosti na njegovo aktivnost. Z mestno specifično mutagenezo N-terminalnega dela CYP51, brez transmembranskega dela, smo želeli povečati topnost proteina. Topnost modificiranih proteinov se ni povečala, kar nakazuje, da na povečanje topnosti vplivajo tudi aminokisline preostalega dela proteina, ne le tiste na N-terminalnem delu. Izražanje v <i>E. coli</i> je po vsej verjetnosti znižano tudi zaradi tvorbe agregatov proteina CYP51, ki povečajo hitrost razgradnje. Stopnjo fosforiliranosti smo želeli preveriti v HepG2 celični liniji ter izolatu jetrnega tkiva miši, s protitelesi proti fosfo-tirozinu ter barvili Pro-Q Diamond Phosphoprotein. Iz rezultatov, ki smo jih dobili, ne moremo sklepati ali je protein CYP51 fosforiliran ali ne. Da bi odgovorili na to vprašanje bo potrebna optimizacija metod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 577.2:599(043.2)=863
CX	CYP51/mutagenesis/phosphorylation/heterologous expression
CC	
AU	KOŠIR, Rok
AA	ROZMAN, Damjana (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department
PY	2007
TI	HETEROLOGOUS EXPRESSION AND ENZYME ACTIVITY OF LANOSTEROL 14α -DEMETHYLASE IN MAMMALS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIV, 75 p., 12 tab., 34 fig., 46 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	CYP51 gene encodes lanosterol 14α -demethylase (CYP51), a member of the cytochrome P450 superfamily that participates in cholesterol biosynthesis. CYP51 is one of most conserved <i>CYP</i> genes that is found in eukaryotes and prokaryotes. The aim of this graduation thesis was to increase the solubility of hCYP51 in <i>E. coli</i> for X-Ray diffraction analysis and to determine the effect of phosphorylation on enzyme activity. Site directed mutagenesis of the N-terminal part of <i>CYP51</i> gene did not increase the protein solubility, indicating that other portions of the protein also play a role in solubilization. Gel filtration analysis shows formation of hCYP51 aggregates which may decrease expression due to higher protein degradation. Phosphorylation studies of CYP51 were carried out on HepG2 cell line and mouse liver tissue, with Phospho-tyrosine antibodies and Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain. It is not yet conclusive whether CYP51 is phosphorylated or not. Further optimization of the methods is necessary to answer this question.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 CITOKROMI P450	2
2.1.1 Razširjenost in funkcija citokromov P450	3
2.1.2 Nomenklatura	5
2.1.3 Mehanizem delovanja	5
2.1.4 Struktura citokromov P450	7
2.2 HETEROLOGNO IZRAŽANJE CITOKROMOV P450	8
2.2.1 Heterologno izražanje v bakterijah	9
2.3 BIOSINTEZA HOLESTEROLA	11
2.4 POTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE	13
2.4.1 Fosforilacija	13
2.4.1.1 Fosforilacija citokromov P450	14
2.5 LANOSTEROL 14α -DEMETILAZA – CYP51	15
2.5.1 Značilnosti in posebnosti gena <i>CYP51</i>	15
2.5.2 Regulacija CYP51	16
2.5.3 Protein CYP51	16
2.5.4 Fosforilacija/defosforilacija CYP51	18
3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	20
4 METODE IN MATERIALI	21
4.1 DELO Z BAKTERIJSKIMI CELICAMI	21
4.1.1 Priprava bakterijskih gojišč	21
4.1.1.1 Tekoče in trdo LB-gojišče (Luria-Bertani)	21

4.1.1.2	Tekoče TB gojišče	22
4.1.2	Transformacija bakterijskih celic	22
4.1.3	Namnožitev plazmidne DNA za izolacijo	23
4.1.4	Izolacija plazmidne DNA	23
4.1.4.1	Izolacija manjših količin plazmidne DNA	23
4.1.4.2	Izolacija večjih količin plazmidne DNA	25
4.1.5	Etanolna precipitacija DNA	25
4.1.6	Merjenje koncentracije plazmidne DNA	26
4.1.7	Priprava trajne bakterijske kulture	26
4.2	ELEKTROFOREZA DNA NA AGAROZNEM GELU	27
4.3	ČIŠČENJE DNA IZ GELA	27
4.4	MUTAGENEZA pET17b hCYP51 a3A4	28
4.4.1	Redčenje oligonukleotidnih začetnikov	29
4.4.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) s <i>Pfu</i> -polimerazo	30
4.4.3	Restrikcija nemutirane plazmidne DNA	31
4.4.4	Izražanje pET17b hCYP51 a3A4 v <i>E. coli</i>	31
4.4.5	Izolacija in čiščenje pET17b hCYP51 a3A4 iz <i>E.coli</i>	33
4.4.6	Merjenje koncentracije mutiranih proteinov CYP51	33
4.5	PRIPRAVA PLAZMIDNE DNA ZA IZRAŽANJE CITOKROM P450 REDUKTAZE V <i>E. coli</i>	34
4.5.1	Polimerazna verižna reakcija (PCR) za namnožitev bCPR iz cDNA	34
4.5.2	Vgnezdena polimerazna verižna reakcija (PCR)	35
4.5.3	Kloniranje bCPR PCR v pET17b ekspresijski vektor	36
4.5.3.1	Ligacija	36
4.6	PRIPRAVA PLAZMIDNE DNA ZA IZRAŽANJE hCYP51-His V SESALSKIH CELICAH	37
4.6.1	Priprava PCR produktov	37
4.6.2	Dodatek deoksiadenozina na 3' konec PCR produktov	38
4.6.3	Kloniranje v pCR4-TOPO	39
4.6.4	Restrikecija z <i>Eco</i> RI	39
4.6.5	Restrikcija s <i>Kpn</i> I in <i>Not</i> I	39
4.7	DELO z NESMRTNIMI CELIČNIMI KULTURAMI	40
4.7.1	Gojenje HepG2-celične linije	40
4.7.2	Transfekcija HepG2-celične linije	41
4.7.2.1	Transfekcija s CaCl_2	42
4.7.2.2	Transfekcija s FuGene HD Transfection Reagent	43
4.7.2.3	Transfekcija z Lipofectamin 2000-transfekcijskim reagentom	43

4.8	NaDS-PAGE ELEKTROFOREZA	44
4.8.1	Vizualizacija proteinov v NaDS-PAGE-gelih	46
4.8.1.1	Barvanje z barvilkom Coomassie	46
4.8.1.2	Barvanje s SYPRO Ruby	46
4.8.1.3	Barvanje s Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen)	46
4.9	PRENOS PO WESTERNU	47
4.9.1	Vizualizacija imunskih kompleksov	48
4.10	IMUNOPRECIPITACIJA	49
4.10.1	Homogenizacija mišjih jeter	49
4.10.2	Imunoprecipitacija	49
5	REZULTATI	51
5.1	MODIFIKACIJA N-TERMINALNEGA DELA hCYP51	51
5.2	IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA hCYP51	54
5.2.0.1	Gelska filtracija	54
5.3	EKSPRESIJSKI PLAZMID pET17b Z GOVEJO CITOKROM-P450- REDUKTAZO (bCPR)	56
5.4	PRIPRAVA PLAZMIDA pcDNA3.1-hCYP51-His	58
5.5	IZRAŽANJE hCYP51-His v HepG2-CELIČNI LINIJI	58
5.6	IMUNOPRECIPITACIJA	61
5.7	STANJE FOSFORILIRANOSTI CYP51	63
6	RAZPRAVA IN SKLEPI	64
6.1	MUTAGENEZA N-TERMINALNEGA DELA ČLOVEŠKEGA CYP51	64
6.2	KLONIRANJE bCPR V EKSPRESIJSKI VEKTOR pET17b	64
6.3	STOPNJA FOSFORILIRANOSTI CYP51	65
6.3.0.2	IMUNOPRECIPITACIJA	67
6.4	SKLEPI	68
7	POVZETEK	69
8	LITERATURA	71

KAZALO SLIK

2.1	CO-diferenčni spekter podganjih jetrnih mikrosomov. (—) CO z redukcijo z NADPH; (---) CO z redukcijo z ditionitom [Klingenbergr 1958].	3
2.2	Katalitični mehanizem encimov P450. Najpogostejsa reakcija je hidroksilacija (insercija kisika), z uporabo reaktivne Fe-okso zvrsti (C). Hidroperokso oblika encima (B) katalizira insercijo hidroksilne (-OH) skupine na specifično mesto v substratu [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000].	6
2.3	Površina citokroma P450 2C5, obarvana glede na hidrofilnost. Hidrofobni del membrane leži pod belo črto, hidrofilne glave se nahajajo nad njo. Hidrofobni deli na dnu molekule (belo in rumeno) omogočajo vezavo z membrano [Williams <i>et al.</i> , 2000].	8
2.4	Primerjava nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nativne in modificirane 17α -hidroksilaze. Spremembe nukleotidov so označene z rdečo barvo. Sprememba druge aminokisline je posledica spremembe kodona TGG v GCT, ki favorizira večje izražanje v bakterijah [Waterman, 1994].	10
2.5	Struktura holesterola. Označeni so štirje sterolovi obroči (A, B, C, D) ter izvor ogljikovih atomov v obročih. Izvor se ugotavlja s pomočjo radioaktivno označenih ogljikov v acetatu, ki je izvorna molekula za sintezo [Nelson and Cox, 2004].	12
2.6	Slika prikazuje esencialne metabolite organizmov, katerih izvorne spojine so intermediati sinteze holesterola. [Nelson and Cox, 2004].	13
2.7	Ciklična fosforilacija in defosforilacija je pogost celični mehanizem regulacije aktivnosti proteinov. V tem primeru je fosforiliran protein (zelen) aktiven, defosforiliran (rdeč) pa neaktiven.	14
2.8	CYP51-katalizirana reakcija demetilacije sterolov pri živalih, glivah in rastlinah. Holesterol, ergosterol in fitosterol so glavni steroli pri teh skupinah organizmov. [Debeljak <i>et al.</i> , 2002]	17
2.9	Prikaz CYP51 katalizirane pretvorbe lanosterola v 4,4-dimetilholesta-8,14,24-trienol (FF-MAS). Oksidativni intermediati matilne skupine C14 so prikazani s krepkimi črkami. [Debeljak <i>et al.</i> , 2002]	18
4.1	Postopek izolacije plazmidne DNA [QIAGEN, 2005].	24
4.2	Slika prikazuje zgradbo naprave za ekstrakcijo DNA iz gela [Millipore, 2002]	28
4.3	Pregled metode mestno specifične mutageneze s QuickChange II site-directed mutagenesis kit [Stratagene, 2004].	29

4.4	Shematični prikaz mehanizma indukcije izražanja rekombinantnega proteina v <i>E. coli</i> z IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktoranozide). IPTG inaktivira lac-represor, kar omogoči vezavo RNA-polimeraze <i>E. coli</i> na lac-promotor in prepis T7 RNA-polimeraze. Slednja omogoča prepis tarčnega proteina na plazmidu pET, ki je pod kontrolo T7-promotorja [Novagen, 2006].	32
4.5	Razporeditev posameznih načinov transfekcij, ki smo jih izvedli na ploščici z 12 vdolbinami.	44
4.6	NaDS-PAGE-elektroforeza XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen).	45
4.7	Način zaznave specifičnega proteina pri prenosu po Westernu. Imunske komplekse (antigen – primarno – sekundarno protitelo), ki nastanejo, zaznamo s pomočjo peroksidaze vezane na sekundarno protitelo, ob dodatku substrata.	47
4.8	Zgradba XCell II Blot Module za prenos proteinov na membrano. Vsi elementi so predhodno namočeni v prenašальнem pufru. Prenos poteka v prenašальнem pufru, 1 h in 30 min pri konstantni napetosti 30 V. Rdeča puščica kaže smer potovanja proteinov v električnem polju.	48
5.1	Grafični prikaz transmembranskih regij hCYP51 na podlagi programa TM-pred. vir: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html .	52
5.2	Poravnava nukleotidnega zaporedja N-terminalnega dela hCYP51 pred (zgoraj) in po (spodaj) mestno specifični mutagenezi. Z rdečo so prikazani spremenjeni nukleotidi, z modro pa aminokisline, ki jih kodirajo.	52
5.3	Poravnava aminokislinskega zaporedja modifcirane govejega CYP51, brez N-terminalnega dela, z visoko stopnjo izražanja ter človeškega CYP51. Spremenili smo aminokislino na sedmem mestu iz Ala v Val ter aminokislini na enajstem in dvanajestem mestu iz Val-Gln v Ala-Pro-Pro. Na slike se vidi, da se proteina razlikujeta še na 15 drugih mestih (16, 18, 25, 110, 129, 144, 154, 235, 248, 295, 339, 345, 348, 390 in 453).	53
5.4	Graf prikazuje uspešnost izražanja posameznih ekspresijskih vektorjev. Podatki o količini CYP51-proteinov v posameznih vzorcih so bili dobljeni s pomočjo CO-diferenčnih spektrov.	55
5.5	CO-diferenčni spekter bCYP51 (modro) in hCYP51 (rdeče) brez mutacij. Večja kot je količina funkcionalnega citokroma P450 v vzorcu, večji je absorbcijski vrh pri 450 nm.	55
5.6	Prenos po Westernu. Vzorec: 1 -pET17b-6; 2 -pET17b-5; 3 -pET17b-2; 4 -pET17b-1; 5 -pET17b-3; 6 -pET17b-4; 7 -pozitivna kontrola	55
5.7	Poravnava aminokislinskega zaporedja proteinov bCPR-1, bCPR-2 in natiivne bCPR. Z modro so označene spremembe aminokislín, ki so posledice mutacij nukleotidnega zaporedja. bCPR-1 ima spremenjeno drugo in četrto aminokislino; bCPR-2 ima spremenjeno četrto aminokislino ter histidin v histidinskem repu.	57

5.8 Cepitev šestih ekspresijskih vektorjev pcDNA3.1 z restrikcijskima encimoma <i>KpnI</i> in <i>XbaI</i> . Plazmidi 1 , 3 in 5 imajo insert hCYP51-His, medtem ko plazmidi 2 , 4 in 6 inserta nimajo; 2/7 - je pozitivna kontrola; 1 kb - je 1 kb DNA-standard (O'geneRuler)	58
5.9 Aminokislinsko zaporedje C-terminalnega dela hCYP51 in hCYP51-His. Pred STOP-kodon (TGA) v hCYP51 smo vstavili 18 nukleotidov dolgo zaporedje CAT CAC CAT CAC CAT CAC, ki kodira 6 His.	58
5.10 Rezultat transfekcije HepG2-celične linije s tremi različnimi transfekcijskimi reagenti (CaCl ₂ , FuGene HD in Lipofectamine) ter dvema različima eksprezijskima plazmidoma z zapisom za GFP (pcDNA3.1-GFP [Cycle 3 GFP] in pEGFP-N1 [EGFP]). Transfekcija je bila uspešna (zelen krog) samo v treh primerih, vdolbine 3, 11 in 12.	59
5.11 Mikroskopski posnetek HepG2-celične linije z invertnim fluorescentnim mikroskopom po transfekciji s CaCl ₂ . Levo – slika ob fluorescenci; desno – transmisija. Za celice so značilna zelo velika jedra. Zeleno obarvane celie so prejele plazmid, in sintetizirajo GFP.	60
5.12 Prenos po Westernu homogenata prehodnih in stabilnih transfekcij HepG2 celičnih linij s plazmidom pcDNA3.1-hCYP51-His. Vzorec: 1 - stabilna transfekcija; 2 - kontrola stabilne transfekcije; 3 - prehodna transfekcija; 4 - kontrola prehodne transfekcije.	60
5.13 Analiza vzorcev po Westernu. Vzorec: 1 - homogenat jeter; 2 - homogenat po centrifugiranju; 3 - homogenat po odstranitvi imunokompleksov; 4–8 - spiranje 9–10 - elucija; 11 - kontrola (rekombinantni bCYP51)	61
5.14 NaDS-PAGE-gel, pobaran s SYPRO-Ruby-barvilom. Vzorec: 1 - homogenat; 2–5 - spiranje; 6 - prva elucija; 7 - kontrola (bCYP51); 8 - proteinski standard; 9 - proteinski standard	62
5.15 Western-analiza NaDS-PAGE-gela druge imunoprecipitacije. Dokazali smo, da je CYP51 v eluatu prisoten, čeprav, da se na gelu, pobaranem s SYPRO-Ruby ne vidi. Ker je količina proteina, vezanega na protitelesa v gelu, večja kot pri prvi imunoprecipitaciji, se ves CYP51 ne spere s prvo elucijo. Po jakosti lise se vidi, da je količina CYP51 v prvi eluciji večja kot drugi. Vzorec: 1 - prva elucija; 2 - druga elucija; 3 - pozitivna kontrola (bCYP51).	62
5.16 Barvanje NaDS-PAGE-gela z barvilm za fosforilirane proteine Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain (Invitrogen). Vzorec: 1 - homogenat celic po centrifugiranju; 2 - homogenat po odstranitvi imunokompleksov; 3–5 - spiranje; 6 - eluat s CYP51; 7 - kontrola (rekombinantni bCYP51); 8 - fosforilirani proteinski standard; 9 - proteinski standard (20-200kDa)	63
6.1 Prikaz emisijskih in ekscitacijskih maksimumov Cycle 3 GFP in EGFP. Vrhovi se nahajajo pri 395 nm, 488 nm, in 507 nm.	66

KAZALO PREGLEDNIC

2.1 Število družin in poddružin citokromov P450 pri različnih skupinah živali [Nelson, 2007].	5
2.2 Prednosti in slabosti različnih heterolognih ekspresijskih sistemov (Gillam 1998)	9
2.3 Značilnosti sesalskih <i>CYP51</i> genov in mRNA [Debeljak <i>et al.</i> , 2002].	16
2.4 Podobnost v aminokislinskem zaporedju CYP51 med različnimi sesalci. Pri- rejeno po [Debeljak <i>et al.</i> , 2000].	17
4.1 Shema redčenja oligonukleotidnih začetnikov na 5 μ M koncentracijo.	30
4.2 Lastnosti HepG2-nesmrtne celiče linije	40
4.3 V preglednici so podane prostornine tripsiniziranih celic, ki smo jih nanesli v vdolbine, da smo dosegli želeno konfluentnost celic na dan transfekcije.	42
4.4 Transfekcijski kompleks za transfekcijo s FuGene HD. Količine dodanih rea- gentov so preračunane na površino vdolbin ($3,66 \text{ cm}^2$)	43
4.5 Količine reagentov za transfekcijo celic z Lipofectaminom 2000. Količine dodanih reagentov so prepreračunane na površino vdolbine ($3,66 \text{ cm}^2$).	44
5.1 Transmembranske regije, ki so jih napovedali različni programi	51
5.2 Ekspresijski plazmidi izraženi v <i>E. coli</i> . Kot kontrolo smo uporabili goveji modificiran CYP51 ter nemodificiran človeški CYP51.	54
5.3 Analiza nukleotidnega zaporedja štirih ekspresijskih plazmidov, ki vsebujejo insert bCPR	56

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A adenozin

Amp ampicilin

bCPR goveja citokrom P450 reduktaza

bdH₂O bidestilirana voda

bp bazni par

C citozin

CRE od cAMP odvisni regulatorni element

CpG področje DNA bogato s CG baznimi pari

BSA (angl. bovine serum albumin) goveji serumski albumin

cDNA (angl. complementary DNA) komplementarna DNA

CO ogljikov monoksid

CPR citokrom-P450-reduktaza

CYP (angl. cytochrome P450) citokrom P450

hCYP51 človeška lanosterol 14α demetilaza

DMEM (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medij za celične linije

DNA deoksiribonukleinska kislina

DTT ditiotreitol

dNTP deoksinukleotidi

EDTA etilendiaminetetraocetna kislina

ER endoplazmatski retikulum

Et-OH etanol

FF-MAS (angl. follicular meiosis activating sterol) folikularni mejozo aktivirajoči sterol

G gvanin

GFP (angl. Green fluorescent protein) zeleni fluorescirajoči protein

EGFP (angl. enhanced GFP) ojačan GFP

HepG2 človeška jetrna nesmrtna celična linija

kb kilobaza

kDa kilo Dalton

LB Luria-Bertanijevo gojišče

LB_{amp} Luria-Bertanijevo gojišče z ampicilinom

min minuta

mRNA (angl. messenger ribonucleic acid) obveščevalna RNA

P450 citoktom P450

PBS fosfatni pufer

PAGE poliakrilamidna gelska elektroforeza

PCR verižna reakcija s polimerazo

PKA protein kinaza A

PVDF poliviniliden difluorid

RNA ribonukleinska kislina

rpm (angl. revolutions per minute) obratov na minuto

SDS natrijev dodecilsulfat

SRE (angl. sterol regulating element) od sterolov odvisni DNA-regulatorni element

SREBP (angl. sterol regulating element binding protein) SRE-vezavni protein

T timidin

TAE pufer s Trisom, EDTA, ocetno kislino

TM transmembranska regija

TRIS tris-hidroksimetil-aminometan

tRNA (angl. transfer RNA) prenašalna RNA

UV ultravijolično

1 UVOD

Lanosterol 14α -demetilaza (CYP51) je encim naddružine citokromov P450, ki sodeluje v poskvalenskem delu biosinteze holesterola pri živalih, sitosterola pri rastlinah in ergosterola pri glivah. Reakcija, ki jo katalizira, je oksidativna odstranitev 14α -metilne skupine lanosterola, 24,25-dihidrolanosterola ali obtusifoliola. Donor elektronov encimu CYP51 v reakciji demetilacije je NADPH:citokrom-P450-reduktaza. CYP51 je izražen v membrani ER vseh sesalskih tkiv. Največ ga je prisotnega v testisih, ovarijsih, nadledvični žlezi, prostatni, ledvicah, jetrih in pljučih.

Edina do danes znana kristalna struktura proteina CYP51 je iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Razrešitev kristalne strukture sesalskega CYP51 bi pomogla k lažjemu molekulskemu modeliranju ostalih CYP51 v sesalcih in evkariontih, saj je podobnost aminokislinskega zaporedja CYP51 med različnimi sesalskimi vrstami velika. Poleg tega bi znana struktura pripomogla k uspešnejšemu načrtovanju inhibitorjev, specifičnih za glivno izoformo encima, ki so široko uporabljana azolna protiglivna zdravila, kot je npr. fluconazol. Zaradi ključne vloge pri biosintezi holesterola je CYP51 tudi možna tarča za hipolipemike.

Raziskave uravnavanja izražanja gena CYP51 so pomembne zaradi njegove vloge pri biosintezi holesterola in zorenju spolnih celic. Promotorska regija CYP51 je zelo ohranjena. Mesta in zaporedja glavnih regulatornih elementov v promotorju so skoraj identična v vseh do zdaj preiskanih sesalskih vrstah. Primarno je prepisovanje gena CYP51 v somatskih celicah uravnavano preko od SRE-vezavnih proteinov odvisne poti. Predvideva se, da na aktivnost proteina CYP51 vpliva tudi fosforilacija in de-fosforilacija, kar pa do zdaj ni neposredno dokazano.

Cilj diplomske naloge je bil pripraviti ekspresijski plazmid človeškega CYP51, ki bi omogočal visoko ekspresijo v *E. coli*, ter preveriti stopnjo fosforiliranosti CYP51 v HepG2 celični liniji oziroma jetrnemu tkivu. Ekspresijski plazmid bi omogočal namnožitev in izolacijo zadostne količine hCYP51 za nadaljnjo kristalizacijo ter rentgensko difrakcijo. Stopnja fosforiliranosti CYP51 pa bi pokazala, ali je aktivnost encima v tkivu regulirana tudi s to posttranslacijsko modifikacijo. Vzporedno smo žeeli v ekspresijski vektor klonirati tudi govejo citokrom-P450-reduktazo, ki bi nam omogočila študij interakcije CYP51 in bCPR.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CITOKROMI P450

Citokrom P450 je generično ime za veliko naddružino hemoproteinov¹, monoooksigenaz², ki metabolizirajo struktурno različno skupino eksogenih in endogenih organskih substratov. Ime izvira iz izrazitega absorpcijskega vrha pri 450 nm, kot posledice predhodnje redukcije in koordinativne vezave ogljikovega monoksida (CO) z železovim ionom v hemu [Meyers, 1996].

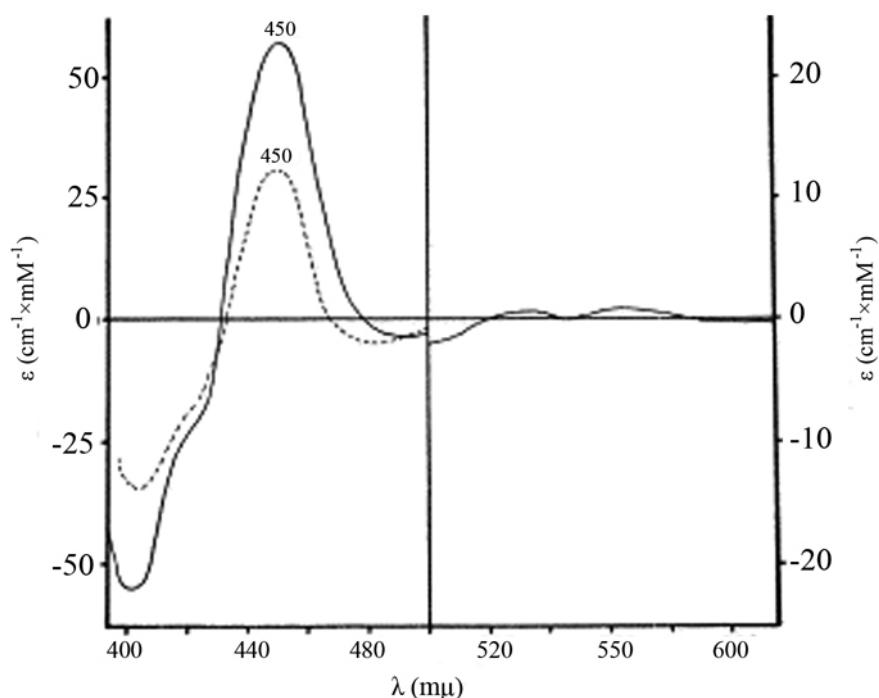
K odkritju citokromov P450 so pripomogle raziskave na treh področjih. Elizabeth in Jim Miller sta v poznih 40. letih 20. st. proučevala metabolizem barvila aminoazo (N-N-dimetil-4-aminoazobenzene) ter njegovo kovalentno vezavo na celične proteine. Ugotovila sta, da je za metabolizem barvila poleg NADPH in kisika potrebna še določena frakcija homogenata zajčjih jetrnih celic, ki sta jo dobila po predhodnem centrifugiranju [Estabrook, 2003]. Istočasno sta se Axelrod in Brodie ukvarjala z razvojem metod za merjenje metabolitov psihoaktivnih substanc, kot so amfetamini in ephedrini. V svojih raziskavah sta dokazala, da so mikrosomalni encimi v jetrih, ki kažejo specifično zahtevo po kisiku in reduciranim NAD, izredno pomembni pri detoksifikaciji številnih zdravil in tujih organskih substanc [Axelrod, 1954]. Tretje pomembno področje, ki je pripomoglo k odkritju citokromov P450, pa so bile raziskave s področja metabolizma steroidnih hormonov. Leta 1956 sta Ryan in Engel dokazala, da so za hidroksilacijo steroidov (progesterona) na C-21 odgovorni mikrosomalni encimi govejih jeter. Kisik v hidroksilni skupini pa izvira iz atmosferskega kisika [Ryan and Engel, 1956].

Prisotnost neznanega CO-vezavnega pigmenta, ki ga danes imenujemo citokrom P450, je prvi odkril Martin Klingenber, leta 1958 pri proučevanju vsebnosti hemina v mikrosomialih podganjih jeter. Celotna vsebnost hemina je bila 2,15-krat večja od vsebnosti citokroma b₅, ki je bil takrat edini znani pigment v jetrih. Le majhen del odvečne količine hemina pa je lahko pripisal hemoglobinu. Hkrati je ugotovil, da se ob dodatku ogljikovega monoksida k z NADPH ali ditionitom reduciranim mikrosomom pojavi izrazit absorpcijski vrh pri 450 nm (slika 2.1), ki ni kazal nobene podobnosti s katerimkoli takrat znamen proteinom [Klingenberg, 1958].

Leta 1962 sta hemoproteinsko naravo CO-vezavnega mikrosomalnega pigmenta dokon-

¹razred proteinov, ki ima kot prostetično skupino hem (tetrapirolov obroč z vezanim Fe ionom)

²skupina encimov, ki katalizira vgraditev enega atoma molekule O₂ v substrat in redukcijo drugega atoma kisika do H₂O



Slika 2.1: CO-diferenčni spekter podganjih jetrnih mikrosomov. (—) CO z redukcijo z NADPH; (---) CO z redukcijo z ditionitom (Klingenberg 1958).

čno dokazala Omura in Sato in mu dala ime P450 (P-pigment) oziroma citokrom P450. Dokazala sta, da lahko CO veže le reducirana oblika P450. Popolna redukcija z NADPH in NADH pa se doseže le v anaerobnih pogojih, medtem ko se v oksičnih pogojih pigment hitro reoksidira z molekularnim kisikom. Vezava etil-izocianida povzroči absorpcijski vrh pri 430 nm, ki je enak in značilen za hemoproteine z vezanim etil-izocianidom. Vrh pri 450 nm pa v primeru solubilizacije P450 izgine in ga nadomestijo vrhovi pri 420 nm, 530 nm in 560 nm (Sorent, α , β). Ti vrhovi so tipični za hemoproteine kot sta hemogoblin in citokrom b₅ [Omura and Sato, 1962] [Omura and Sato, 1964]. Skoraj istočasno z Japoncema so leta 1963 ugotovili, kakšna je funkcija citokromov P450 Estabrook, Cooper in Rosenthal pri proučevanju C21-hidroksilacije 17-hidroksi-progesterona mikrosomov adrenalnega korteksa [Omura, 1999].

2.1.1 Razširjenost in funkcija citokromov P450

Začetna predvidevanja, da se citokromi P450 nahajajo zgolj v mikrosomih živalskega tkiva, so se potrdila kot napačna. Kmalu zatem so njihovo prisotnost odkrili v mitohondrijih različnih živalskih tkiv, kot so nadledvična žleza, rumeno telesce, placentă, testisi, itd. V 60. letih so sledila odkritja citokromov P450 v mikroorganizmih, rastli-

nah, glivah, vretenčarjih in nevretenčarjih. Tako je postalo znano, da so le-ti razširjeni pri vseh oblikah življenja, kjer sodelujejo pri različnih metabolnih reakcijah kot kisik-aktivirajoča komponenta monooksigenaznega sistema. Pri evkariontskih organizmih so citokromi P450 esencialni encimi, potrebni v biosintezi in metabolizmu različnih endogenih substratov, medtem ko za prokarionte to ne velja [Omura *et al.*, 1993].

Citokrome P450 lahko razdelimo v 4 razrede, odvisno od tega, kako se elektroni iz NAD(P)H prenesejo na katalitično mesto:

razred I - proteini potrebujejo tako FAD-vsebujočo reduktazo kot Fe-S-redoksin

razred II - potrebujejo zgolj FAD/FMN-vsebujočo P450-reduktazo

razred III - ne potrebuejo nobenega donorja elektronov

razred IV - prejmejo elektrone neposredno od NAD(P)H

Prokariontski citokromi P450 so citoplazemski proteini, ki bakterijam omogočajo razgradnjo kompleksnih organskih spojin, detoksifikacijo ksenobiotikov, sintezo antibiotikov, sodelujejo pa tudi pri metabolizmu maščobnih kislin. Evkariontske proteine razreda I najdemo v notranji membrani mitohondrijev, kjer sodelujejo pri sintezi steroidnih hormonov in vitamina D₃. Najpogosteje zastopani proteini so proteini razreda II. Ti se skupaj z NADPH-reduktazo nahajajo na zunanji membrani endoplazmatskega retikuluma, kamor so pritrjeni z N-terminalnim hidrofobnim sidrom. Funkcije encimov razreda II so različne. Pri glivah sodelujejo pri sintezi membranskih sterolov in mikotoksinov, detoksifikaciji fitoaleksinov in metabolizmu lipidnih virov ogljika. Pri živalih sodelujejo v biosintezi in anabolizmu signalnih molekul (levkotrieni, prostaglandini), steroidnih hormonov, maščobnih kislin, oksilipinov itd. Rastlinski enicimi so udeleženi pri katabolizmu in biosintezi vseh tipov hormonov, oksigenaciji maščobnih kislin za sintezo kutinov ter v vseh poteh sekundarnega metabolizma - lignifikacija, sinteza pigmentov, obrambnih kemikalij, arom, antioksidantov, zdravil, itd. Encimi razreda III z različno subcelularno lokacijo katalizirajo preureditve in dehidracije alkil-hidroksiperoksidov ter alkil-peroksidov pri sintezi prostaglandinov pri sesalcih in jasmonske kisline pri rastlinah. V razred IV pa trenutno spada zgolj en encim, ki pri glivah reducira NO v N₂O [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000].

Človeška CYP-naddružina je sestavljena iz 57 genov in 58 psevdogenov, ki so razvrščeni v 18 družin in 43 poddružin. Le majhen del teh encimov (15 encimov iz družin CYP1 do CYP4) je pri človeku primarno udeležen v presnovi ksenobiotikov, vendar imajo le-ti izredno velik klinični pomen. Zaradi zelo velike substratne specifičnosti so pomembni pri metabolizmu in inaktivaciji zdravil, ter pospeševanju detoksifikacije in eliminacije ksenobiotikov iz telesa [Gonzales, 2005]. Znotraj teh družin obstaja

veliko alelnih različic posameznih genov, kar vodi v farmakogenetsko heterogenost posameznikov. Ta ima za posledico različne odzive posameznikov na zdravila (uspešnost zdravljenja in toksičnost zdravil) ter na hitrosti detoksifikacije in eliminacije ksenobiotikov. Mutacije znotraj vseh genov *CYP* vodijo v prirojene napake metabolizma, ki se izražajo v številnih boleznih [Nebert and Russell, 2002].

2.1.2 Nomenklatura

Zaradi vedno večjega števila proteinov P450 so leta 1987 uvedli komisijo za poimenovanje citokromov P450. Nomenklatura temelji na evoluciji proteinskega zaporedja, pri čemer se jih uvršča v družine in poddružine. Encime, katerih podobnost aminokislinskega zaporedja znaša več kot 40 %, uvrščamo v isto družino, medtem ko tiste, katerih podobnost je večja od 55 %, v isto poddružino. Tako za gene kot za proteine se uporablja oznaka CYP (Cytochrome P450), ki ji sledi arabska številka družine ter črka poddružine (če obstaja). Za gene uporabljamo poševno pisavo oznake (*CYP51*), medtem ko za proteine, cDNA in mRNA pokončno (*CYP51*) [Nelson *et al.*, 1996]. Število družin in poddružin je prikazano v tabeli 2.1.

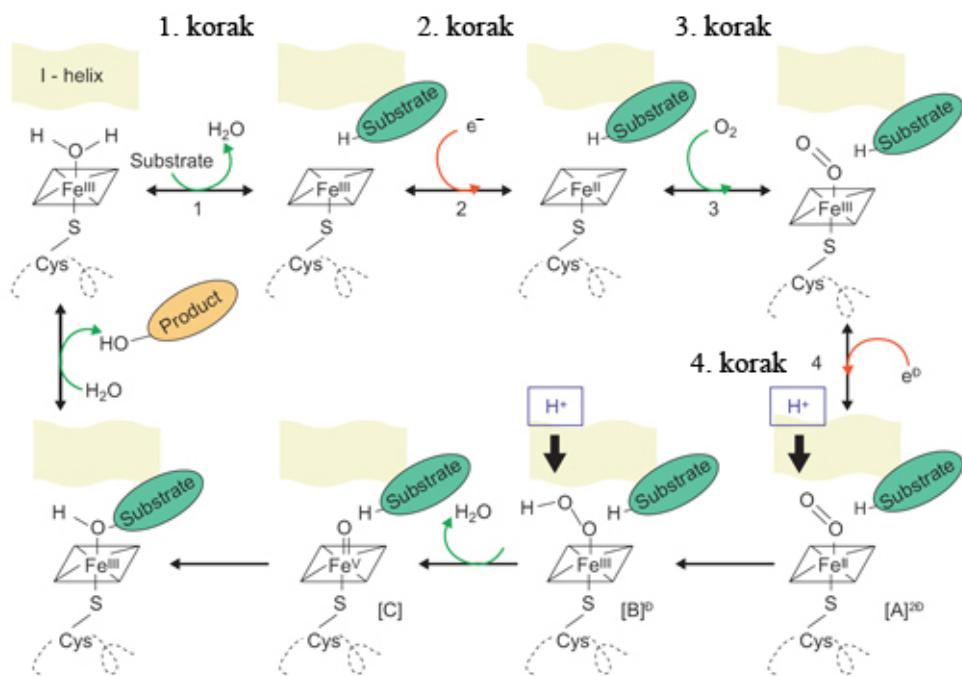
Preglednica 2.1: Število družin in poddružin citokromov P450 pri različnih skupinah živali [Nelson, 2007].

	Število		
	nuk.	zaporedij	družin
živali	2279		99
rastline	2311		94
glive	1001		282
protisti	210		51
bakterije	621		177
arheje	8		5
SKUPAJ	6422		708
			233
			201
			113
			267
			814

2.1.3 Mehanizem delovanja

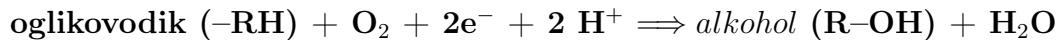
Aktivno mesto citokromov P450 vsebuje v protoporfirin IX s 4 koordinativnimi vezmi vezan železov atom. Peti ligand je tiolatni anion cisteinskega ostanka, odgovoren za vrh pri 450 nm, šesti ligand pa zaseda molekula vode [Porter and Coon, 1999].

Citokromi katalizirajo regiospecifično in sterospecifično vgraditev molekule kisika v sicer stabilen hidrofoben ogljikovodik. Proces poteče v 5 glavnih potezah: **(1) vezava substrata, (2) vezava kisika, (3) cepitev kisika, (4) vrinjenje kisika**



Slika 2.2: Katalitični mehanizem encimov P450. Najpogostejsa reakcija je hidroksilacija (insercija kisika), z uporabo reaktivne Fe-okso zvrsti (C). Hidroperokso oblika encima (B) katalizira insercijo hidroksilne (-OH) skupine na specifično mesto v substratu [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000].

v substrat ter (5) sprostitev produkta, pri čemer se realizira spodaj navedena enačba [Coleman, 2006]:



Dobro okarakteriziran del katalitičnega zaporedja vključuje 4 korake, prikazane na sliki 2.2. V neaktivni obliki je P450 v ferični (Fe³⁺) obliki in ima vezano molekulo topila (običajno molekulo vode). Prvi korak je vezava substrata ter kot posledica sprememba maksimuma absorbance, redoks potenciala in spinskega stanja hem-proteinskega sistema. Znižanje redoks potenciala z -300 mV na -170 mV vodi v redukcijo železa iz Fe³⁺ v Fe²⁺ (2. korak) s sprejemom enega izmed dveh elektronov NADPH. Sledi vezava molekule kisika preko 6. koordinacijske vezi (trans glede na tiolatni anion) (3. korak) in tvorba superoksidnega kompleksa. Tak kompleks je izjemno nestabilen in se, če se hitro ne zgodi druga redukcija, avtooksidira z odcepitvijo O₂⁻. Druga redukcija (4. korak) vodi v tvorbo aktivirane kisikove oblike, ki naj bi bila po najnovejših mnenjih mešanica dveh elektrofilnih oksidantov (Fe-perokso in Fe-okso). Sledi cepitev molekule kisika. En atom kisika sprejme dva protiona in se izloči kot voda, medtem ko drugi atom kisika nekaj časa ostane vezan na železo. V tej obliki lahko aktivira substrat z odstranitvijo vodika ali elektrona iz dela

substratne molekule. Po reakciji se substrat spremeni tako strukturno kot kemijsko in kot tak ne more ostati vezan na aktivnem mestu CYP-proteina, zato se odcepi [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000].

2.1.4 Struktura citokromov P450

Določitev terciarne strukture citokromov P450 z rentgensko difrakcijo je za sesalske encime otežena, ker so ti integralni membranski proteini. Novejši napredki v modifikaciji, izražanju in kristalizaciji proteinov omogočili določitev strukture nekaterih sesalskih citokromov P450, kot so CYP3A4, 2C9, 2C8 in 2A6 [Johnson and Stout, 2005].

Tako za topne prokariotske, kot tudi za membranske evkariotske citokrome P450, je značilna ohranjenost sekundarne strukture in procesa zvijanja proteina. Ponavadi so zgrajeni iz dvanajstih α -vijačnic (A–L) in štirih β -ploskev (1–4) [Johnson and Stout, 2005].

Največjo strukturno ohranjenost najdemo v okolini hema, kar nakazuje podoben mehanizem prenosa elektronov in aktivacije kisika. Na tem področju se nahajajo značilna ohranjena zaporedja [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000], kot so:

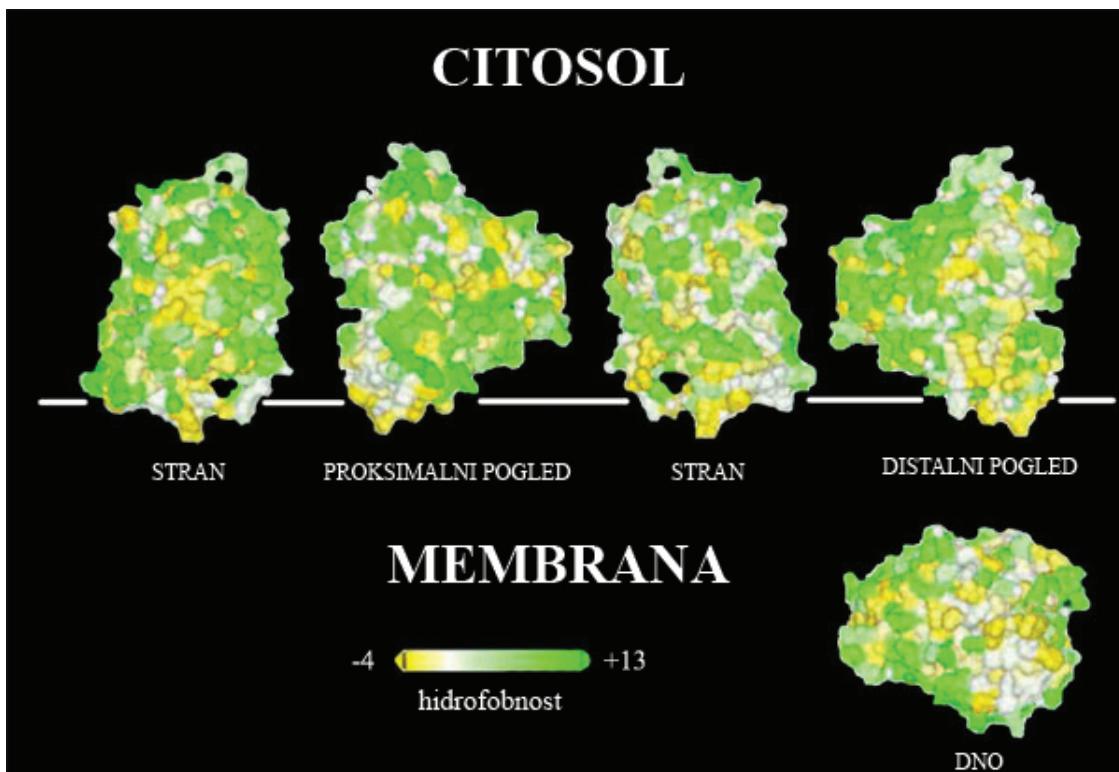
- zanka za vezavo hema (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly), ki vsebuje pri vseh citokromih P450 ohranjen cistein
- motiv Glu-X-X-Arg za stabilizacijo aktivnega mesta in
- motiv Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser, ki sodeluje pri prenosu protonov.

Najbolj spreminjajoče se regije se nahajajo na N-terminalnem membranskem delu in na delu, kjer poteka prepoznavanje in vezava substrata [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000]

Za sesalske citokrome P450 je značilna močno hidrofobna regija na N-terminalnem delu, ki sodeluje pri vezavi v membrano ER in pravilnem zvijanju proteina. Odstranitev le-te pa običajno ne vodi v tvorbo topne oblike proteina, ampak v tvorbo nefunkcionalne oblike, ki je še vedno povezana z membrano. Te ugotovitve nakazujejo prisotnost drugih hidrofobnih predelov, ki sodelujejo pri vezavi v membrano (slika 2.3) [Meyers, 1996].

Pri evkariotskih citokromih P450 se med vijačnicama F in G nahaja velik insert, ki ga pri topnih prokariotskih citokromih ni. Ta insert gradita dve vijačnici (F' in G'),

katerih hidrofobna stran je obrnjena proti zunanjosti proteina in nakazuje mogoče mesto vezave z membrano [Johnson and Stout, 2005].



Slika 2.3: Površina citokroma P450 2C5, obarvana glede na hidrofilnost. Hidrofobni del membrane leži pod belo črto, hidrofilne glave se nahajajo nad njo. Hidrofobni deli na dnu molekule (belo in rumeno) omogočajo vezavo z membrano [Williams *et al.*, 2000].

2.2 HETEROLOGNO IZRAŽANJE CITOKROMOV P450

Tradicionalno so za *in vitro* proučevanje metabolizma zdravil pri človeku uporabljali človeške jetrne mikrosome, jetrne homogenate ali hepatocitne celične linije. Vendar je interpretacija podatkov takih raziskav težavna zaradi velikega števila različnih encimov P450, različne količine posameznih encimov, prispevka proučevanega encima k celotni metabolni poti itd. Izolacija in čiščenje encimov iz tkiv sta težavna zaradi podobnosti med različnimi sorodnimi encimi ter zaradi omejenih količin izvornega tkiva. Tudi ob uspešni izolaciji in čiščenju se pojavi težava pri ponovni vzpostavitvi aktivnosti citokroma P450. Za obširno raziskavo metabolizma zdravil, predvsem bioaktivacije zdravil v toksične, kancerogene, mutagene ali teratogene produkte, je treba preveriti tudi vplive izven jetrnih in zarodnih oblik citokromov P450 [Gillam, 1998].

Z razvojem molekularne biologije (cDNA tehnik) je nastala možnost ločitve sorodnih oblik kot tudi odkritja redkih oblik citokromov P450. Cilj heterolognih ekspresijskih

Preglednica 2.2: Prednosti in slabosti različnih heterolognih ekspresijskih sistemov (Gillam 1998)

	Ekspresijski sistem			
	sesalske celične kul-	kvasovke	insektne celice	bakterije
raven izražanja	nizka do srednja (ni mogoče kvantificirati P450)	srednja	visoka	visoka
tehnične zahteve	zahtevno in drago	enostavno in relativno poceni	srednje zahtevno in drago	enostavno in poceni
kofaktor	ni	ni	običajno hemin	zadosten hem ali δ -ALA
endogeni encimi	izražajo reduktazo, b5 in druge P450	P450, reduktazo, ta lahko deluje slabo z rekombinantnimi P450	akcesorne encime je treba koizraziti	akcesorne encime je treba koizraziti
modifikacije nukleotidnega zaporednja	ni treba	lahko povečamo izražanje	ni treba	običajno treba
prokariont/ ev-kariont	evkariont	evkariont	evkariont	prokariont
mutageneza	enostavna	enostavna	zapletena	enostavna
drugi faktorji	bolj fiziološko okolje, gojitev v majhnem obsegu	gojitev v velikem obsegu	počasi rastejo, litični cikel virusa	gojitev v velikem obsegu

sistemov je določitev encimskega profila specifičnih oblik P450, proučevanje vpliva posameznih aminokislin na encimske in strukturne lastnosti, interakcija z reducirajočimi encimi, subcelularna lokacija, možnost sinteze velikih količin proteinov itd. [Waterman, 1994].

Uspešni sistemi za heterologno izražanje so sesalske celične linije (COS, V79, HepG2, limfoblastoidna celična linija), kvasovke, insektne celice in bakterije, vsaka s svojimi prednostmi oziroma slabostmi (Preglednica 2.2)[Gillam, 1998].

2.2.1 Heterologno izražanje v bakterijah

Bakterije se uporabljajo kot heterologni sistemi predvsem zaradi enostavnosti izvajanja mestno specifične mutageneze ter hitre in visoke stopnje izražanja rekombinantnih proteinov. Slaba stran bakterij je nezmožnost potranslacijskih modifikacij proteinov, kar pa pri citokromih P450 nima odločilne vloge pri katalitični aktivnosti

[Gillam, 1998].

Osnovni princip izražanja kateregakoli proteina v *E. coli* se začne z vključitvijo željenega gena v ekspresijski vektor, običajno plazmid. Ta med drugim vsebuje inducibilni promotor, ki zagotavlja produkциjo velikih količin rekombinantne mRNA ob dodatku induktorja (npr. IPTG). Tako sestavljen konstrukt s transformacijo vnesemo v željeni sev *E. coli* [Ausubel *et al.*, 1991]. Na takšen način so v zadnjem desetletju izrazili več kot 50 citokromov P450 [Kagawa *et al.*, 2002].

V preteklosti so ugotovili, da je težko doseči visoke stopnje izražanja nemodificirane cDNA mikrosomalnih citokromov P450. Vsa uspešna izražanja so zahtevala spremembe 5'-konca cDNA, v obliki spremenjanja kodonov, ki jih *E. coli* prednostno uporablja, in znižanja tvorb potencialnih sekundarnih struktur v mRNA, kar se je odražalo v spremembji aminokislinskega zaporedja N-terminalnega dela citokroma [Pritchard *et al.*, 1997].

Glavni strategiji povečanja izražanja citokromov P450 sta tako bili: (1) modifikacija N-terminalne transmembranske regije ali (2) njena odstranitev. Slednja poveča stopnjo citokromov v citosolu ter hkrati poveča količino encimsko aktivnih citokromov [Kagawa *et al.*, 2002].

Prvo uspešno spremenjeno cDNA za izražanje P450 17α -hidroksilaze v *E. coli* so leta 1991 naredili Barnes in sod. (zaporedje spremenjene cDNA: ATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTT). Z modifikacijo N-terminalnega dela obstoječega zaporedja govejega P450c17 (Slika 2.4) so dosegli izražanje 400 nmolov/L bakterijske kulture. Enake modifikacije (oktapeptid MALLLAVF) so naknadno uvedli v človeško 17α -hidroksilazo in s tem povečali tudi njeno izražanje [Waterman, 1994].

Nativna:	ATG TGG CTG CTC CTG GCT GTC TTT Met Trp Leu Leu Leu Ala Val Phe
Modificirana:	ATG GCT CTG TTA TTA GCA GTT TTT Met Ala Leu Leu Leu Ala Val Phe

Slika 2.4: Primerjava nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nativne in modificirane 17α -hidroksilaze. Spremembe nukleotidov so označene z rdečo barvo. Spremenba druge aminokisline je posledica spremembe kodona TGG v GCT, ki favorizira večje izražanje v bakterijah [Waterman, 1994].

N-terminalna regija citokroma P450 se lahko zamenja z N-terminalnimi regijami drugih P450 citokromov. Kagava in sod. so z uvedbo N-terminalne regije govejega CYP17 (MALLAVFLTLAYLFWPKTKHSGAKYPRSL) in podganjega CYP2C11 (MARQSFGRGKL) povečali izražanje človeške aromataze (CYP19). Hkrati so ugotovili, da se heterologna ekspresija v *E. coli* poveča ob temperaturnem in osmotskem stresu ter stresu, povzročenem z glicerolom in s kloramfenikolom [Kagawa *et al.*, 2002].

Modifikacija N-terminalnih delov včasih ni zadostna za izražanje aktivnih oblik citokromov P450 v *E. coli*. Zamenjava membranske regije goveje 21-hidroksilaze z MAKKTSSKGK-zaporedjem CYP2C3 ni povečala izražanja proteina, čeprav je zaporedje povečalo izražanje drugih citokromov. Šele izražanje šaperona GroES/GroEL skupaj z encim je omogočila izražanje aktivnega proteina P450c21 (1200 nmol/L) [Arase *et al.*, 2006].

Optimizacija kodonov se je izkazala kot eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na izražanje genov v prokariontih. Frekvence, s katerimi se uporabljajo različni kodoni, se močno spreminjajo, tako med različnimi organizmi, kot tudi znotraj enega organizma. Vzrok za variacije med organizmi je predvsem razpoložljivost posameznih tRNA-molekul. Pri *E. coli* je tRNA₄^{Arg}, ki prepozna kodona AGG in AGA, prisotna v zelo nizki koncentraciji, za razliko od drugih tRNA₄^{Arg}, ki prepozna preostale štiri kodone. Na raven izražanja še posebej močno vplivajo kodoni N-terminalnega dela gena [Gustafsson *et al.*, 2004]. Z optimizacijo vseh kodonov ter modifikacijo N-terminalnega dela človeškega proteina P450 27C1 so leta 2005 Wu in sod. uspeli doseči raven izražanja 1350 nmol/L. Tudi v tem primeru je bilo potrebno soizražanje molekulskih šaperonov GroES/GroEL, kar je izražanje povečalo za 15-krat [Wu *et al.*, 2005]. Ker zahteva optimizacija kodonov celotne cDNA želenega gena ogromno dela in hkrati poveča možnost tvorbe sekundarnih struktur v mRNA ter nastanka repetitivnih elementov, ki lahko vplivajo na stabilnost gena, se večina raziskovalcev odloča za povečanje izražanja proteinov v *E. coli* preko modifikacij N-terminalnih delov [Gustafsson *et al.*, 2004], [Cheesman *et al.*, 2003], [Fisher *et al.*, 1992] in [Hanna *et al.*, 1999].

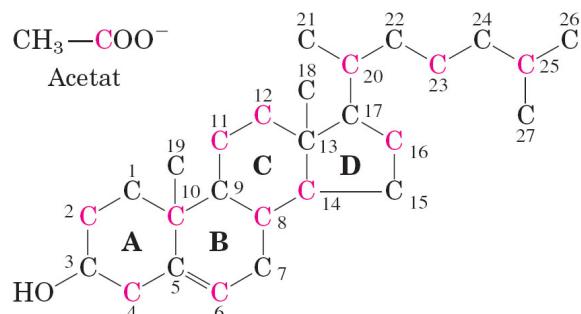
2.3 BIOSINTEZA HOLESTEROLA

Holesterol je v sodobni družbi največkrat prikazan kot sovražnik človeku, zaradi povezave z boleznimi srca in ožilja. Vendar je hkrati kot esencialna komponenta celične membrane nujno potreben za normalno celično delovanje. Pomanjkanje holesterola v embrionalnem razvoju vodi v deformiranost ali celo smrt novorojenčkov [Mason, 2004].

Dnevno s prehrano v telo vnesemo približno 1000 mg holesterola, od katerega se ga približno 30 do 50 % absorbira v prebavnem traktu. Kljub temu telo še vedno potrebuje vsaj 1000 mg dodatnega holesterola, ki se sintetizira *de novo* pretežno v jetrih (70 %) [Mason, 2004].

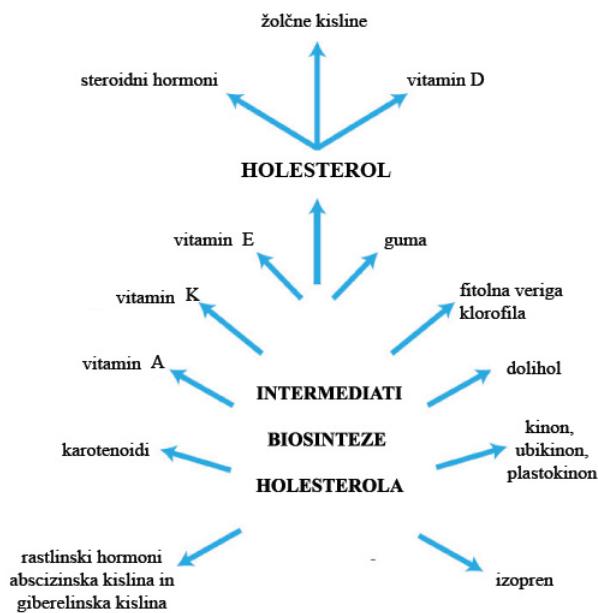
Holesterol je leta 1815 odkril francoski kemik M. E. Chevreul kot eno izmed sestavin žolčnih kamnov. Najprej so to belo kristalno snov, topno v alkoholu in etru, poimenovali cholesterine. Leta 1859 pa so dokazali, da je po svoji kemijski strukturi alkohol, in upoštevajoč to spoznanje, spremenili končnico imena spojine [Vance and den Bosch, 2000].

V prvi četrtni 20. stoletja so se mnogi znanstveniki trudili razvozlati njegovo strukturo (slika 2.5), kar jim je uspelo leta 1932. Holesterol je derivat ciklopentanoperhidrofenantrena s 27 ogljikovimi atomi in spada med nepolarne sterole. Zanj je značilna OH-skupina na mestu 3, ki ga uvršča med alkohole, in razvezana alifatska stranska veriga na atomu C17. Vsi štirje obroči sterolnega jedra (A, B, C, D) so v trans konformaciji, kar mu omogoča zelo učinkovito stabilizacijo fosfolipidnih membran [Vance and den Bosch, 2000].



Slika 2.5: Struktura holesterola. Označeni so štirje sterolovi obroči (A, B, C, D) ter izvor ogljikovih atomov v obročih. Izvor se ugotavlja s pomočjo radioaktivno označenih ogljikov v acetatu, ki je izvorna molekula za sintezo [Nelson and Cox, 2004].

Po eni strani je holesterol končni produkt izoprenoidnega biosinteznega sistema, po drugi pa le substrat za sintezo drugih zelo različnih skupin metabolično aktivnih spojin, kot so steroidni hormoni, žolčne kisline in mnoge signalne spojine (slika 2.6). Intermediati v njegovi sintezi so pomembni za sintezo mnogih esencialnih metabolitov, kot so doliholi, koencim Q10, izopentanil adenin in izoprenoidi, vključeni v potranslacijsko modifikacijo regulatornih proteinov [Nelson and Cox, 2004].



Slika 2.6: Slika prikazuje esencialne metabolite organizmov, katerih izvorne spojine so intermediati sinteze holesterola. [Nelson and Cox, 2004].

Biosintezo holesterola lahko razdelimo na predskvalenski del, v katerem iz Ac-CoA nastane skvalen, in na poskvalenski del, kjer iz skvalena najprej nastane prvi ciklični indermediat lanosterol, od katerega vodita dve alternativni poti preko postopnih dehidrogenacij, redukcij in demetilacij do nastanka holesterola. Zadnja prekursorja holesterola, ki izvirata iz različnih poti, sta 7-dehidroholesterol in dezmosterol [Nelson and Cox, 2004].

2.4 POTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

Potranslacijske modifikacije so kemijske spremembe polipeptidne verige, do katerih pride po translacji proteina in jih lahko razdelimo na nekovalentne in kovalentne modifikacije. Kovalentne modifikacije vključujejo odcepitev signalnih peptidov, tvorbo disulfidnih vezi in cel sklop sprememb aminokislinskih ostankov, kot so fosforilacija, nitracija, glikozilacija, metilacija, acetilacija in prenilacija [Aguiar *et al.*, 2005].

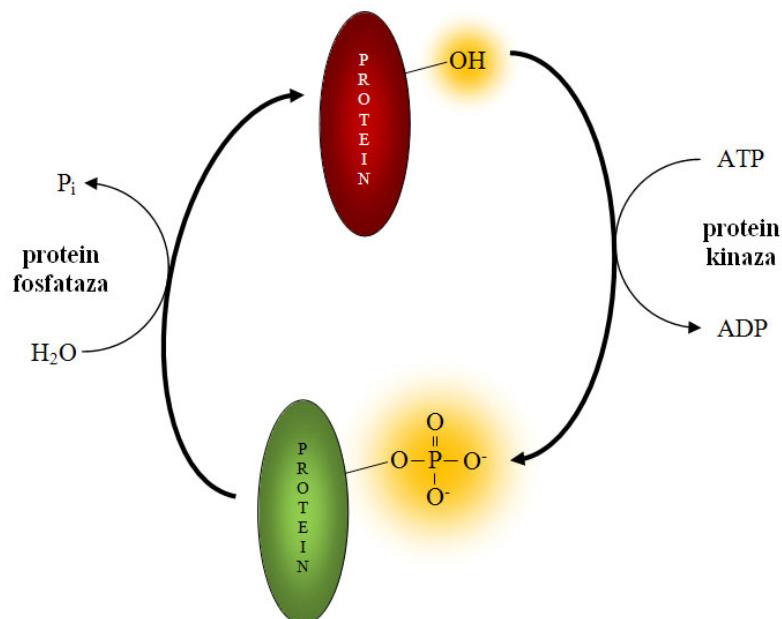
2.4.1 Fosforilacija

Fosforilacija proteinov ima osrednjo vlogo v signalnih poteh, saj omogoča prenos ekstracelularnega signala v notranjost celice in koordinacijo intracelularnih proce-

sov. Preko uravnavanja izražanja genov in sinteze proteinov uravnava celično rast, diferenciacijo in delitev [Yan *et al.*, 1998].

Protein kinaze so encimi, ki fosforilirajo proteine s prenosom terminalne fosfatne skupine ATP (PO_4^{3-}) na hidroksilno skupino (OH) serina, treonina ali tirozina (slika 5.16). Nekatere protein kinaze imajo za tarčo tudi stranske verige histidinskih, argininskih, lizinskih in aspartatnih ostankov [Murray, 2003]. Vezava fosfatne skupine povzroči spremembo konformacije proteina, kar vodi v znižano ali zvišano encimsko aktivnost [Lodish, 2004].

Nasproten proces fosforilacije je defosforilacija, ki ga katalizirajo encimi **fosfataze**. Ti z odstranitvijo fosfatne skupine proteine povrnejo v prvotno stanje [Murray, 2003].



Slika 2.7: Ciklična fosforilacija in defosforilacija je pogost celični mehanizem regulacije aktivnosti proteinov. V tem primeru je fosforiliran protein (zelen) aktiv, defosforiliran (rdeč) pa neaktiv.

2.4.1.1 Fosforilacija citokromov P450

Najpomembnejši protein, ki katalizira fosforilacijo citokromov P450, je **protein kinaza A** (PKA). PKA v polipeptidni verigi prepozna motiv Arg-Arg-Xaa-Ser in katalizira fosforilacijo serina. Motiv je sicer prisoten pri različnih citokromih P450, vendar le pri določenih deluje kot mesto fosforilacije proteina. Aktivnost PKA je odvisna od znotrajceličnih koncentracij cAMP. Te pa so odvisne od koncentracije hormonov,

kot sta adrenalin in glukagon, ter prisotnosti drugih substratov, ki neposredno ali posredno povzročijo dvig koncentracij cAMP. Fosforilacija deluje na citokrome P450 kot stikalo, ki povzroči vklop ali izklop encima [Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2005].

2.5 LANOSTEROL 14α -DEMETILAZA – CYP51

Lanosterol 14α -demetilaza spada v naddružino citokromov P450 in je bila prvič okarakterizirana v kvasovki, *Saccharomyces cerevisiae*. Sodeluje pri odstranitvi 14α -metilne skupine lanosterola in cikloartenola v biosintezi steroidov. Gen za *CYP51* najdemo tako pri evkariontih (živali, glice, rastline) kot tudi pri nekaterih prokariontih (Mycobacteria,

Methylococcus capsulatus, *Streptomyces coelicolor*), kar je izjema znotraj naddružine citokromov P450, saj se vse preostale družine *CYP* nahajajo večinoma le znotraj enega kraljestva [Režen *et al.*, 2004].

2.5.1 Značilnosti in posebnosti gena *CYP51*

Za gene družine *CYP51* so značilne številne posebnosti, ki naj bi bile posledica predvsem esencialne metabolne funkcije [Debeljak *et al.*, 2002].

Človeški funkcionalni gen obsega 22 kb dolgo področje na kromosому 7, označeno s 7q21.2-q21.3. Razdeljen je na 9 intronov in 10 različno dolgih eksonov, ki kodirajo 1527 bp dolg bralni okvir. Izmed štirih ATG startnih kodonov, ki se nahajajo v bralnem okviru, sta ATG2 in ATG3 najverjetnejši mesti začetka translacije. *CYP51* mRNA se izraža v vseh sesalskih tkivih z največjo mero izražanja v modih. Moda pri vseh vrstah vsebujejo tudi dodatno krašo obliko *CYP51* mRNA, ki je prisotna izključno v moški klični liniji (preglednica 5.1). Krajsi mRNA prepis je posledica uporabe bolj navzgor ležečega poliadenilacijskega mesta kot pri somatskih prepisih. Človeški gen *CYP51* ima prisotna tri različna poliadenilacijska mesta [Stromstedt *et al.*, 1996], [Rozman *et al.*, 1996].

Nekateri sesalski genomi vsebujejo tudi gene, podobne *CYP51*, ki ne vsebujejo intronov. Ugotovili so, da so to nefunkcionalni, procesirani psevdogeni. Človek ima dva, ki se nahajata na 3. in 13. kromosomu. Identičnost psevdogena *CYP51P1* s kodirajočim zaporedjem *CYP51* je 96,5 %. Ni prekinjen z introni, vendar ima v svojem bralnem okviru šest stop kodonov zaradi točkastih mutacij. *CYP51P2* je ravno tako brez intronov, njegova identičnost s kodirajočo regijo *CYP51* je 97,2 %. Zaradi vstavljenega dodatnega baznega para po kodonu 9 ima spremenjen bralni okvir. Vsebuje še dodaten

Preglednica 2.3: Značilnosti sesalskih *CYP51* genov in mRNA [Debeljak *et al.*, 2002].

CYP51 vrsta	lokacija	dolžina [kb]	Št. psevdogenov	proc.*	Somatska mRNA [kb]	Testis mRNA [kb]	specifična
Človek	7q 21.2-3	>22	2		3,8	2,0	
Podgana	n.d.	>18	1		3,1, 2,7, 2,3	1,9	
Miš	5A2	>23	0		Two-(n.d.)	Two-(n.d.)	
Prašič	n.d.	>21	0		2,4	1,8	

* - procesiranih

stop kodon ter 131 baznih parov dolg LINE1-element po nukleotidu 606. Psevdogena *CYP51* sta nastala z dvema neodvisnima obratnima prepisovanjem *CYP51* mRNA v zarodnih celicah. Glede na število mutacij v kodirajoči regiji je *CYP51P1* nastal pred približno 9,5 milijona let ter *CYP51P2* pred približno 11,7 milijona. Inaktivirana sta bila kmalu po vključitvi v genom [Rozman *et al.*, 1996].

2.5.2 Regulacija CYP51

Promotorska regija *CYP51* je zelo ohranjena. Mesta in zaporedja glavnih regulatornih elementov v promotorju so skoraj identična v vseh do zdaj preiskanih sesalskih vrstah. Promotor je brez TATA-zaporedja in z visoko vsebnostjo GC-parov, kar je poleg velike ohranjenosti v aminokislinskem zaporedju značilnost hišnih genov. Vezavna mesta transkripcijskih faktorjev so: element, ki veže predstavnike Sp-družine transkripcijskih faktorjev (GC-blok), od cAMP odvisni regulatorni element, regulatorni element, ki veže od sterolov odvisne transkripcijske faktorje (SRE) in nižje ležeči promotorski element (DPE). Primarno je prepisovanje gena *CYP51* v somatskih celicah uravnavano preko od SRE-vezavnih proteinov odvisne poti [Debeljak *et al.*, 2002], [Tacer *et al.*, 2003], [Halder *et al.*, 2002].

2.5.3 Protein CYP51

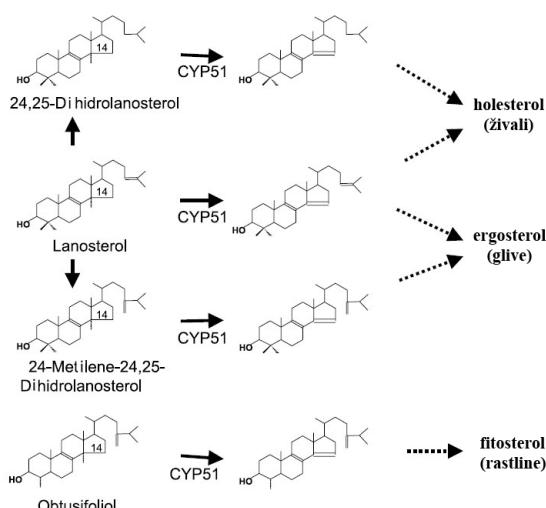
Sesalski *CYP51* je 55 kDa velik protein, ki je vezan v membrano endoplazmatskega retikuluma. Podobnost aminokislinskega zaporedja med različnimi sesalskimi vrstami je velika (Preglednica 2.4), še posebej na področju mest, ki prepoznavajo substrat (SRS).

Visoka ohranjenost vseh šestih SRS-mest potrjuje ključno funkcijo proteina *CYP51* v biosintezi sterolov pri vseh evkariontih. Reakcija, katalizirana s *CYP51* je ključni korak sinteze ergosterolov pri glivah, fitosterolov pri rastlinah in holesterola pri živalih (slika 2.8)[Debeljak *et al.*, 2002]. Demetilacija substratov poteka preko treh zapore-

Preglednica 2.4: Podobnost v aminokislinskem zaporedju CYP51 med različnimi sesalci. Prirejeno po [Debeljak *et al.*, 2000].

	prašič	podgana	miš
človek	95%	93%	91%
prašič		94%	92%
podgana			96%

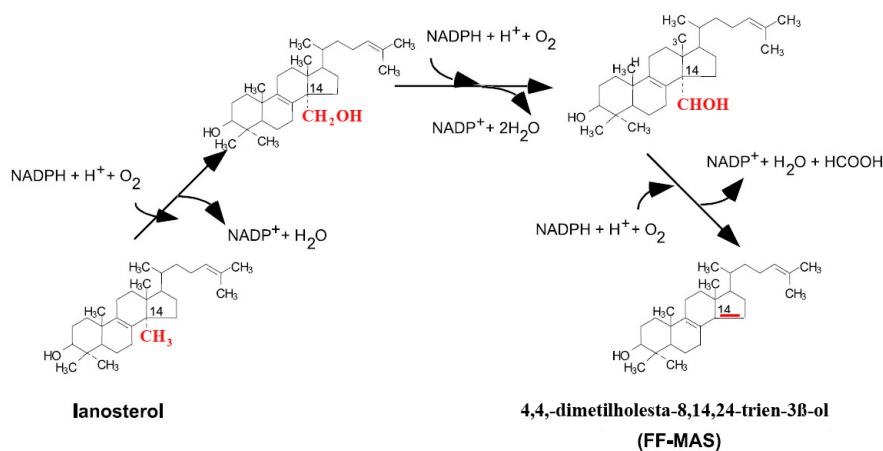
dnih monooksigenacij, pri čemer se intermediati ne sprostijo. Metilna skupina se najprej pretvori v alkohol, nato v aldehid in se v zadnjem koraku odstrani kot metanojska kislina (slika 2.9). Vsaka monooksigenacija zahteva eno molekulo NAPDH in eno molekulo kisika (O_2). Lanosterol 14 α -demetilaza za svoje delovanje potrebuje redoks partnerja, to je NADPH:citokrom-P450-reduktazo.



Slika 2.8: CYP51-katalizirana reakcija demetilacije sterolov pri živalih, glivah in rastlinah. Holesterol, ergosterol in fitosterol so glavni steroli pri teh skupinah organizmov. [Debeljak *et al.*, 2002]

CYP51 iz *Mycobacterium tuberculosis* po aminokislinski sestavi najbolj odstopa od ostalih, vendar so zanj pozneje ugotovili, da ima podobne katalitske sposobnosti kot ostali encimi iz te družine. Prav tako veže azolne inhibitorje CYP51, kot je na primer ketokonazol. Ker je topen, nima za evkarionte značilnega N-terminalnega zaporedja, ki je odgovorno za vsidranje proteina v membrano [Podust *et al.*, 2001].

Najboljša metoda za določanje terciarne strukture proteinov je rentgenska kristalografska analiza. Ta nam omogoča določitev koordinat atomov proteina in s tem njegove tridimenzionalne strukture. Običajno je največja težava pri določevanju kri-



Slika 2.9: Prikaz CYP51 katalizirane pretvorbe lanosterola v 4,4-dimetilholesta-8,14,24-trienol (FF-MAS). Oksidativni intermediati matilne skupine C14 so prikazani s krepkimi črkami. [Debeljak *et al.*, 2002]

stalne strukture proteina njegova kristalizacija. Še posebej zahtevna je kristalizacija membransko vezanih proteinov. Edina do danes znana kristalna struktura proteina CYP51 je iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Pred določitvijo te strukture je bilo mogoče predvideti strukturo CYP51 le s pomočjo primerjave z zaporedji cito-kromov z znanimi kristalnimi strukturami ter molekulskim modeliranjem na osnovi njihove homologije in poznavanja strukture substrata. Razrešitev kristalne strukture topnega CYP51 je pripomogla k lažjemu molekulskemu modeliranju membransko vezanega CYP51 v sesalcih in drugih evkariontih [Podust *et al.*, 2001].

2.5.4 Fosforilacija/defosforilacija CYP51

Predvideva se, da na aktivnost proteina CYP51 vplivata tudi fosforilacija in defosforilacija. Raziskava Sonode s sodelavci kaže na uravnavanje aktivnosti CYP51 preko fosforilacije, vendar to ni nedvoumno in neposredno dokazano. Primerjali so lanosterol 14 α -demetilazno aktivnost mikrosomalnih frakcij iz podganjih jeter, ki so vsebovale CYP51. Aktivnost je bila višja v primeru defosforilacije proteinov s fosfatazo. Njihovi rezultati nakazujejo, da je aktivnost CYP51 zmanjšana s fosforilacijo [Sonoda *et al.*, 1995].

Hitrost biosinteze holesterola v celoti je uravnavana preko encima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-reduktaze (HMGR), ki nastopa v zgodnji fazici biosinteze ter pretvarja 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA v mevalonat. Aktivnost encima je med drugim regulirana s fosforilacijo z AMP-aktivirano protein kinazo (AMPK), ki zmanjša nje-

govo aktivnost. AMPK fosforilira HMGR na serinu 872, kadar je količina celičnega AMP velika. To prepreči sintezo holesterola, ki je energijsko potratna anabolna pot [Nelson and Cox, 2004].

S fosforilacijo je regulirana tudi aktivnost 17α -hidroksilaze (CYP7A1), katere aktivnost se s fosforilacijo poveča. CYP7A1 je hitrost določajoči encim pri biosintezi žolčnih kislin, s čimer sodeluje pri uravnavanju količine holesterola v organizmu. Stroup in Ramsaran sta na očiščenem encimu pokazala, da je CYP7A1 substrat za AMPK. Predvidevata, da je delovanje HMGR ter CYP7A1 usklajeno preko AMPK [Stroup and Ramsaran, 2005].

3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen dela:

1. Spremeniti N-terminalni del človeškega CYP51 in tako povečati njegovo topnost (za določitev strukture proteina)
2. Preveriti stopnjo fosforiliranosti CYP51 v jetrnih celicah.

Hipoteza:

1. Sprememba N-terminalnega dela človeškega CYP51 poveča topnost tega proteina.
2. Aktivnost CYP51 je regulirana s fosforilacijo/defosforilacijo

4 METODE IN MATERIALI

4.1 DELO Z BAKTERIJSKIMI CELICAMI

Med diplomskim delom smo uporabljali naslednje bakterijske seve:

- ***E. coli* One Shot TOP10F' Competent cells** (Invitrogen Cat.No.C3030-03)
Genotip: F' $\{lacIq\} Tn10 (TetR)$ $mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15 \Phi lacX74$
 $recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG$,
- ***E. coli* Library efficiency DH5 α Competent cells** (Invitrogen Cat.No.18263-012)
Genotip: F- $\varphi 80lacZ\Delta M15 \Delta(\Delta lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA$
 $supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda-$,
- ***E. coli* HMS174(DE3) Competent cells** (Novagene Cat.No. 69452-3)
Genotip: F- $recA1 hsdR (r_{K12}^- m_{K12}^+) rif$.

4.1.1 Priprava bakterijskih gojišč

4.1.1.1 Tekoče in trdo LB-gojišče (Luria-Bertani)

Reagenti:

- tripton (10 g)
- kvasni ekstrakt (5 g)
- natrijev klorid (NaCl) (10 g)
- bdH₂O (do 1000 ml)

Za trdno LB-gojišče dodamo še:

- agarozo (20 g)

Postopek:

Za pripravo 1 L LB-gojišča v steklenico dodamo 10 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta in 10 g NaCl ter dopolnimo z bdH₂O do 1 L (za trdo gojišče dodamo še 20 g agaroze). Tako pripravljeno zmes avtoklaviramo. Za pripravo LB plošč zmes po avtoklaviranju razlijemo v petrijeve plošče (25 ml/100 mm petrijevko). LB z ampicilinom pripravimo tako, da avtoklavirano zmes ohladimo na približno 55°C, nato dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 mg ampicilina/100 ml gojišča.

4.1.1.2 Tekoče TB gojišče

Reagenti:

Raztopina I

- tripton, 12 g
- kvasni ekstrakt, 24 g
- glicerol, 4 ml(8 g)
- bdH₂O, do 900 ml

Raztopina II

- KH₂PO₄, 2,31 g
- K₂HPO₄, 12,54 g
- bdH₂, do 100 ml
- 1M Tiamin (Vitamin B1)
- ampicilin (100 mg/ml)
- redke soli (za 100 ml; 2.7 g FeCl₃ × 6 H₂O, 0.2 g ZnCl₂ × 4 H₂O, 0.2 g CoCl₂ × 6 H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄ × 2 H₂O, 0.1 g CaCl₂ × 2 H₂O, 0.186 g CuSO₄ × 5 H₂O, 0.05 g H₃BO₃)

Postopek:

Raztopini I in II smo pripravili v ločenih steklenicah in jih vsako posebej avtoklavirali. Pred inokulacijo z bakterijami in inkubacijo smo raztopini I in II zmešali v razmerju 10:1 ter jima dodali steriliziran tiamin (vitamin B1) do 1 mM koncentracije, ampicilin do koncentracije 100 µl/ml in 250 µl redkih soli.

4.1.2 Transformacija bakterijskih celic

Reagenti:

- kompetentne bakterijske celice
- plazmidna DNA
- S.O.C. medij (2 % tripton, 0.5 % kvasni ekstrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza)

- LBamp-gojišče

Postopek:

Kompetentne celice, shranjene na -70°C , smo odtajali na ledu ter naredili alikvote po $50 \mu\text{l}$ v predhodno ohlajene centrifugirke. Bakterijam smo dodali plazmidno DNA in inkubirali na ledu 30 min. Nato smo bakterije v termobloku za 30-45 s izpostavili 42°C . Povišana temperatura naredi bakterije doveztenejše za sprejem plazmidne DNA. Po 2 min inkubaciji na ledu, smo dodali $0,5 \text{ ml}$ na 37°C ogretega S.O.C medija ter vse skupaj 1h inkubirali na 37°C v stresalniku pri 225 rpm. Tako transformirane bakterije smo prenesli na LBamp plošče ($250 \mu\text{l}$ na ploščo) ter inkubirali na 37°C preko noči. Plazmidna DNA nosi zapis za rezistenco na ampicilin, zaradi česar na ploščah zrastejo le bakterijske celice, ki so sprejele plazmid.

4.1.3 Namnožitev plazmidne DNA za izolacijo

Reagenti:

- transformirane bakterijske celice
- tekoče LBamp-gojišče

Postopek:

Plazmidi, ki smo jih uporabljali, se razlikujejo v številu kopij plazmida na bakterijsko celico.

Namnožitev plazmidov z visokim številom kopij na celico:

V laminariju smo v sterilne centrifugirke (15 ml) odpipetirali 5 ml tekočega LBamp-gojišča ter inokulirali s transformiranimi celicami. V posamezne centrifugirke (15 ml) smo nacepili eno samo kolonijo transformiranih bakterij iz LBamp-plošče. Epruvete smo postavili v stresalnik na 37°C in stresali pri 250 rpm preko noči (okoli 16 h).

Namnožitev plazmidov z nizkim številom kopij na celico:

Postopek je enak, le da smo inokulirali 20 ml tekočega LBamp gojišča.

4.1.4 Izolacija plazmidne DNA

4.1.4.1 Izolacija manjših količin plazmidne DNA

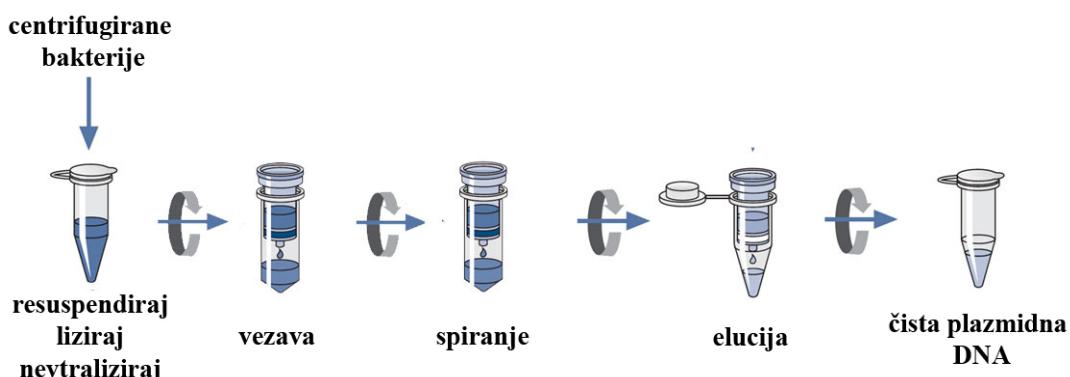
Reagenti:

- QIAprep Spin Miniprep Kit

Postopek:

QIAprep Miniprep Kit deluje na osnovi alkalne lize bakterijskih celic, ki ji sledi adsorbcija DNA na silika-gel membrano v prisotnosti visoke koncentracije soli. Postopek je sestavljen iz treh osnovnih korakov:

1. priprava in čiščenje bakterijskega lizata,
2. adsorbcija DNA na QIAprep-membrano,
3. spiranje in eluiranje plazmidne DNA.



Slika 4.1: Postopek izolacije plazmidne DNA [QIAGEN, 2005].

Prekonočno kulturo bakterijskih celic smo najprej centrifugirali 10 min pri 2000-2500 g. Supernatant (gojišče) smo odlili, pelet, ki ga sestavljajo bakterijske celice, pa smo resuspendirali v 250 μ l pufra P1 z RNase A ter dekantirali v centrifugirke. Dodali smo 250 μ l pufra P2 (pufer za lizo), ki vsebuje NaOH in NaDS. NaDS je močan ionski detergent in povzroči razpad bakterijskih membran, kar vodi v lizo in sprostitev celične vsebine. NaOH pa povzroči denaturacijo plazmidne in kromosomske DNA ter proteinov. Reakcijo smo po 3 min prekinili z dodatkom 350 μ l pufra N3 (nevtralizacijski pufer). Če pustimo reakcijo več kot 5 min, se lahko zgodi ireverzibilna denaturacija plazmidne DNA. Pufer N3 poleg nevtralizacije povzroči vzpostavitev pogojev za adsorbcijo DNA (visoka koncentracija soli). Visoka koncentracija soli povzroči precipitacijo denaturiranih proteinov, kromosomske DNA, celičnih ostankov in NaDS, medtem ko manjša plazmidna DNA renaturira in ostane topna. Zmes rahlo premešamo, da zagotovimo popolno precipitacijo. Kontaminacijo plazmidne DNA s kromosomsko DNA preprečimo tako, da centrifugirke ne vorteksiramo ozziroma močno mešamo. Ločevanje kromosomske in plazmidne DNA temelji na koprecipitaciji kromosomske DNA skupaj z netopnimi kompleksi celične stene. Po dodatu pufra N3 smo centrifugirke centrifugirali 10 min pri 13.500 rpm (17.900 g). Supernatant, ki

vsebuje plazmidno DNA, smo dekantirali v QIAprep-spin kolono ter centrifugirali 30 do 60 s pri 13.500 rpm. Na kolono smo nanesli 500 μ l pufra PB, s čimer smo odstranili ostanke nukleazne aktivnosti, ter centrifugirali 30-60 s pri 13.500 rpm. Nato smo na kolono nanesli 700 μ l pufra PE, s čimer smo odstranili odvečno koncentracijo soli, ter centrifugirali dvakrat po 1 min pri 13.500 rpm. Plazmidno DNA smo eluirali s bdH₂O. In sicer smo na membrano kolone nanesli 50 μ l na 65 °C ogrete bdH₂O ter pustili stati 5 min pri 37 °C, nato smo centrifugirali pri 13.500 rpm 1 min. Vsi uporabljeni pufri (P1, P3, N3, PB in PE) so sestavnici del kompleta QIAprep Miniprep.

4.1.4.2 Izolacija večjih količin plazmidne DNA

Reagenti:

- QIAGEN Megaprep Plasmid Kit

Postopek:

QIAGEN Megaprep Kit deluje na isti osnovi kot QIAprep Spin Miniprep Kit, le da omogoča izolacijo večje količine plazmidne DNA (do 2,5 mg). Delali smo po navodilih proizvajalca (QIAGEN).

4.1.5 Etanolna precipitacija DNA

Reagenti:

- EtOH (95 %)
- EtOH (70 %)
- amonijev acetat CH₃COONH₄ (7,5 M)

Postopek:

Etanolno precipitacijo smo uporabljali za koncentracijo in čiščenje plazmidne DNA, ki smo jo potrebovali za transfekcijo človeške celične linije HepG2. Izolirani plazmidni DNA smo dodali 1/2 volumna 7,5 M amonijevega acetata ter 2,5-kratni volumen 95-odst. EtOH ohlajenega na -20 °C in postavili za 1 h na -20 °C. Ti pogoji povzročijo precipitacijo plazmidne DNA. Po 20 min centrifugiranju pri 4 °C na 15.000 g smo supernatant odlili, pelet pa resuspendirali s 70-odst. EtOH. Nato smo znova centrifugirali 10 min pri 15.000 g, 70-odst. EtOH odpipetirali ter za 5-10 min postavili v inkubator na 37 °C, da je EtOH v celoti izparel. Pelet smo nato resuspendirali v bdH₂O.

4.1.6 Merjenje koncentracije plazmidne DNA

Reagenti:

- bdH₂O
- izolirana plazmidna DNA

Postopek:

Koncentracijo in čistost vzorcev DNA smo merili s pomočjo UV spektrofotometra. Tako DNA kot RNA absorbirata UV svetlobo valovne dolžine 260 nm, zaradi absorbcijskega vrha dušikovih organskih baz (A, T, G, C, U) pri tej valovni dolžini. Ekstinkcijski koeficient (ϵ) nukleotidov pri 260 nm je $20 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$, kadar je pot svetlobnega žarka skozi kiveto enaka 1 cm. Na podlagi tega ekstinkcijskega koeficiente, znaša absorbacija raztopine dsDNA, koncentracije $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, pri 260 nm, v kiveti dolžine 1 cm, natanko 1. Koncentracijo naših vzorcev smo izračunali s pomočjo naslednje enačbe:

$$\text{Koncentracija DNA(ng}/\mu\text{l)} = \text{A}_{260 \text{ nm}} \cdot 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot \text{razredčitev}(50)$$

Vzorce smo najprej redčili 50-krat: $10 \mu\text{l}$ plazmidne DNA na 500 ml bdH₂O. Najprej smo spektrofotometer umerili na bdH₂O, ker smo v njej imeli raztopljeno DNA. Nato smo v kiveto dodajali posamezne raztopine plazmidne DNA in merili absorbanco. Čistost izolirane plazmidne DNA smo določili na podlagi razmerja med absorbenco pri 260 nm (absorbacija nukleinskih kislin) in 280 nm (absorbacija aminokislin - triptofanski ostanki). Razmerje naj bi bilo med 1,65 in 2.

4.1.7 Priprava trajne bakterijske kulture

Reagenti:

- bakterijska kultura
- tekoče LBamp-gojišče
- glicerol

Postopek:

Pripravili smo zmes tekočega LBamp gojišča, ki vsebuje 40 % V/V glicerola. Nato smo v sterilne centrifugirke dodali $500 \mu\text{l}$ zmesi LBamp z glicerolom in $500 \mu\text{l}$ preko noči namnožene tekoče bakterijske kulture. Centrifugirke smo nekajkrat obrnili, da se je zmes dobro premešala ter shranili v skrinjo na -70°C .

4.2 ELEKTROFOREZA DNA NA AGAROZNEM GELU

Reagenti:

- agarozna gelna matrica
- $1 \times$ TAE-puffer (0,4 M Tris, 0,02 M ocetna kislina, 1 mM EDTA)
- etidijev bromid (10 mg/ml)
- barvilo (Fermentas: 6 \times Orange Loading Dye Solution, #R0631)
- 1 kb DNA standard (Fermentas: O'geneRulerTM 1kb DNA Ladder, #SM1163)

Postopek:

Koncentracijo agarognega gela smo izbrali na podlagi dolžine fragmentov, ki smo jih analizirali. V erlenmajerico smo natehtali agarozo, dodali $1 \times$ TAE-puffer in vse skupaj stehtali. Agarozo smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici, dolili vodo do izmerjene mase pred segrevanjem ter dodali etidijev bromid. Raztopino smo vlinili v pripravljen nosilec z glavničkom, ter pustili, da se je gel strdil. Strjen gel smo z nosilcem prenesli v aparat za elektroforezo (Biorad), ki je bil napolnjen z $1 \times$ TAE-elektroforetskim pufrom. Preden smo nanesli DNA v jamice v gelu, smo vzorcem dodali $1 \mu\text{l}$ barvila (6 \times nanašalni puffer). Barvilo ima dvojno funkcijo. Vsebuje glicerol, ki poveča gostoto zmesi, kar olajša nanašanje DNA-vzorca na gel, hkrati pa vsebuje dve barvili (orange G in xylene cyanol FF), ki potujeta različno hitro, glede na njiju lahko sklepamo, kako daleč je prepotovala DNA v našem vzorcu. Elektrofreza je potekala pri 80-100 V od 20 min do 1 h, odvisno od velikosti fragmentov. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod DNR Minibis (DNR Bio-imaging systems) s pomočjo programa GelCapture ver. 3.0 (DNR Bio-imaging Systems). Etidijev bromid se interkalira med dvooverižno DNA in močno absorbira UV-svetlobo, zaradi česar v gelu vidimo svetlo liso.

4.3 ČIŠČENJE DNA IZ GELA

Reagenti:

- Montage DNA Gel Extraction Kit (Millipore, Cat. No. LSKG EL0 50)

Postopek:

Kit deluje na podlagi ločitve DNA-fragmentov s pomočjo elektroforeze na agaroznem gelu ter naknadne izolacije želenega fragmenta iz agarognega gela. S kitom lahko izoliramo fragmente med 100 in 10,000 bp. Kit vsebuje modificiran TAE-puffer, ki se od normalnega razlikuje v nižji koncentraciji EDTA. S tem se zmanjša vpliv EDTA

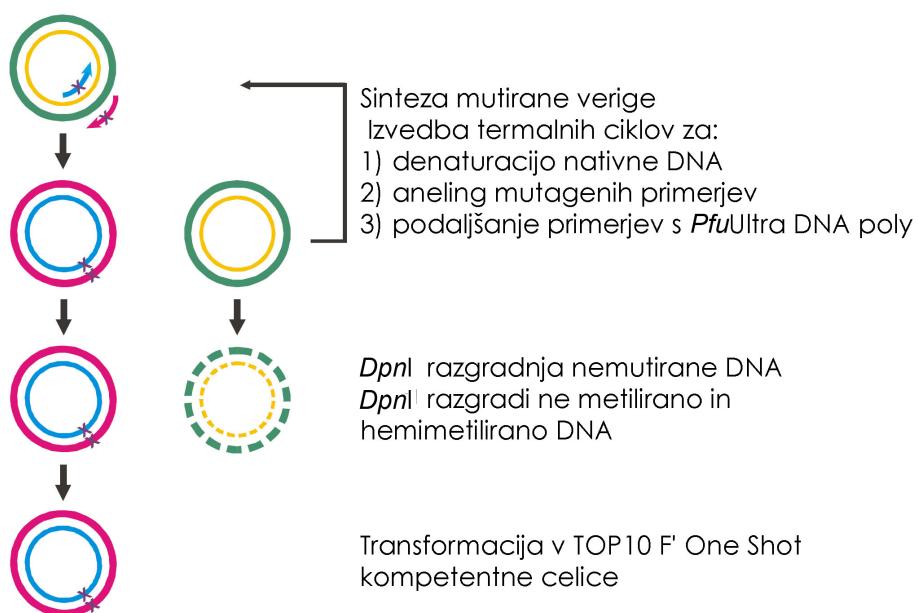


Slika 4.2: Slika prikazuje zgradbo naprave za ekstrakcijo DNA iz gela [Millipore, 2002]

na aktivnost encimov pri nadalnjih postopkih. Zmes ($\approx 20 \mu\text{l}$ DNA + $4 \mu\text{l}$ pufra za nanašanje) smo nanesli na 1.2-odst. agarozni gel (60 ml bdH₂O, 1.2 ml modificiranega 50× TAE-pufera, 0,72 g agaroze in 2 μl EtBr) skupaj z 5 μl 1 kb lestvice ter izvedli elektroforezo 30 min pri 90 V. Željen fragment smo iz gela izrezali pod UV lučjo. Fragment izrežemo čim bolj natančno. Izrezan gel smo položili v Gel Nebulizer, tega v čisto centrifugirko, zaprli in centrifugirali 10 min pri 5000 g. Centrifugalna sila potisne gel skozi Gel Nebulizer in ga pri tem spremeni v fino zmes, ki se ujame v mikroporozni membrani (v sample filter cup). Željena DNA preide skozi membrano in se nabere v centrifugirki, raztopljena v modificiranem TAE-pufru.

4.4 MUTAGENEZA EKSPRESIJSKEGA VEKTORJA pET17b hCYP51 a3A4

Ekspresijski vektor pET17b a3A4 vsebuje skrajšano obliko človeškega encima CYP51, brez transmembranske regije N-terminalnega dela proteina. Naš cilj je bil spremeniti 3 aminokisline N-terminalnega konca skrajšanega proteina, kar bi povečalo topnost letrega v citoplazmi bakterijskih celic. Mutagenezo smo uvedli s pomočjo QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Kit lahko uporabljamo za izvedbo mestno specifične mutageneze, za zamenjavo aminokislin ter za delecijo oziroma insercijo posameznih ali več skupaj ležečih aminokislin. Deluje na podlagi PCR reakcije, kjer tarčno zaporedje mutiramo s pomočjo sintetičnih začetnih oligonukleotidov, ki vsebujejo želeno mutacijo. Začetna oligonukleotida sta komplementarna nasprotnim verigam plazmida in se podaljšujeta med termalnimi cikli s *PfuUltraTM* DNA-polimerazo ter tvorita mutiran plazmid. *PfuUltraTM* DNA-polimeraza ima 18-krat večjo natančnost sinteze DNA kot *Taq* DNA-polimeraza, zaradi česar so skorajda odstranjene neželene mutacije plazmidne DNA. Po termalnih ciklih PCR-produkt izpostavimo



Slika 4.3: Pregled metode mestno specifične mutageneze s QuickChange II site-directed mutagenesis kit [Stratagene, 2004].

delovanju *DpnI* endonukleaze (tarčno zaporedje 5' - *Gm⁶ATC* - 3'). *DpnI* razreže metilirano (nemutirano) in hemimetilirano DNA medtem ko mutirane ne. Prvotni plazmid mora biti zato namnožen v *dam⁺* *E.coli*, sicer se plazmidna DNA ne razgradi. Mutirano plazmidno DNA nato transformiramo v bakterijske celice (slika 4.3).

4.4.1 Redčenje oligonukleotidnih začetnikov

Oligonukleotidne začetnike (PROLIGO (SIGMA)) smo razredčili na 5 μ M koncentracijo z dodatkom bdH₂O (Preglednica 1).

Preglednica 4.1: Shema redčenja oligonukleotidnih začetnikov na 5 μM koncentraciji.

Oligonukleotidni začetnik	Prvotna koncentracija [μM]	Redčitev olig.začetnik [μl]	Redčitev bdH ₂ O [μl]
A7V-hCYP51-f	62	1,61	18,39
A7V-hCYP51-r	72	1,39	18,61
VQ11APP-hCYP51-f	29	3,45	16,55
VQ11APP-hCYP51-r	24	4,17	15,83
A7V-hCYP51m-f	33	3,03	16,97
A7V-hCYP51m-r	32	3,13	16,87
pcDNA-CYP51-f	40	2,50	17,5
pcDNA-CYP51-His-r	16	6,25	13,75
pcDNA-CYP51-GFP-r	25	4	16

4.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) s *Pfu*-polimerazo

Reagenti:

- plazmid pET17b hCYP51 a3A4 1b
- bd H₂O
- 10 \times *Pfu*-polimerazni pufer
- smiselni oligonukleotidni začetniki:
 - A7V-hCYP51: 5' - GCTCGTCGAAAGCCGTTGGCCACCTGGTCCAGCTG - 3'
 - VQ11APP-hCYP51: 5' - GTAAAGCCGCCGGCACCTGGCCCCACCACTGCC-CGCAGGGGTGAAAAGTC - 3'
- protismiselni oligonukleotidni začetniki:
 - A7V-hCYP51: 5' - CAGCTGGACCAGGTGGCCAACGGCTTACGACGAGC - 3'
 - VQ11APP-hCYP51: 5' - GACTTTCACCCCTGCGGGCAGTGGTGCCCCAG-GTGGCCGGCGGCTTAC - 3'
- deoksiribonukleotidi (dNTPmix)
- *Pfu*Ultra DNA-polimeraza

Postopek:

V centrifugirki za PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala $5 \mu\text{l}$ polimeraznega pufra, $0,5 \mu\text{l}$ plazmidne DNA, $1,25 \mu\text{l}$ smiselnega ter $1,25 \mu\text{l}$ protismiselnega oligonukleotidnega začetnika, $0,5 \mu\text{l}$ dNTPmix, $0,5 \mu\text{l}$ *Pfu*-polimeraze ter $16 \mu\text{l}$ bdH_2O (končni volumen $25 \mu\text{l}$). Nastavili smo 2 reakcijski zmesi. Prva je vsebovala smiselni in protismiselni oligonukleotidni začetnik A7V-hCYP51, druga pa VQ11APP-hCYP51. PCR-reakcijo smo izvedli v GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) pri naslednjih pogojih:

začetna denaturacija	95 °C	45 s
18 ciklov:	95 °C	30 s
	55 °C	1 min
	68 °C	6 min
končni korak:	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Pomembno je, da je zadnji korak pri 72°C dovolj dolg, da se v tem času PCR-produkti v celoti podvojijo. PCR produkte smo izpostavili delovanju *DpnI*-endonukleaze.

4.4.3 Restrikcija nemutirane plazmidne DNA

Reagenti:

- PCR-produkti
- *DpnI*-restriktivni encim

Postopek:

Vsakemu PCR produktu smo dodali $0,5 \mu\text{l}$ *DpnI* restriktivnega encima. Zmes smo rahlo premešali s pipetiranjem ter inkubirali 1 h na 37°C . V tem času restriktivni encim razreže metilirano in hemimetilirano plazmidno DNA, ostane pa le na novo namnožena plazmidna DNA. Tako pripravljeno plazmidno DNA smo transformirali v bakterijske celice, namnožili in izolirali ter poslali na določanje nukleotidnega zaporedja, da smo ugotovili če je mutageneza uspela.

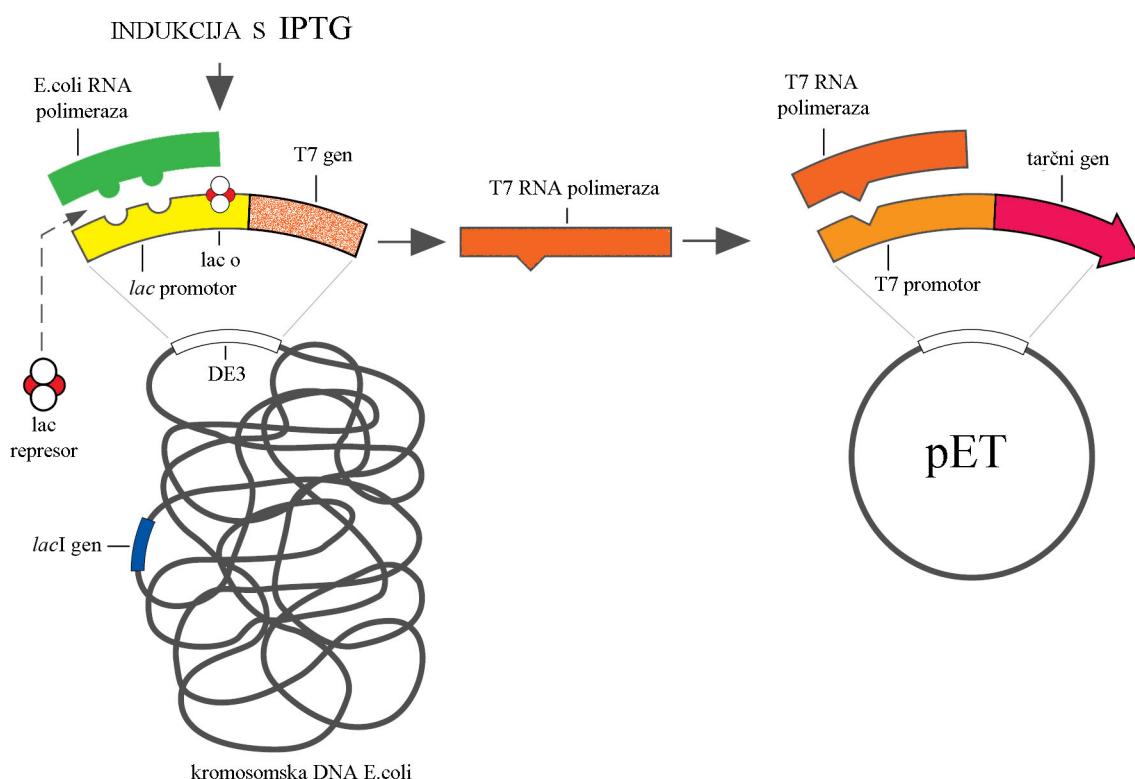
4.4.4 Izražanje pET17b hCYP51 a3A4 v *E. coli*

pET-sistem je bil razvit za kloniranje in izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli*. Izražanje tarčnih genov kloniranih v pET-plazmidu je pod kontrolo bakteriofagnega T7 promotorja in se inducira ob prisotnosti T7 RNA-polimeraze v gostiteljski celici. Aktivnost te je ob popolni indukciji tako velika, da se večina celičnih virov preusmeri v sintezo tarčnega proteina. Tarčne gene prvotno spreminjamamo v sevih, ki ne

vsebujejo T7 RNA-polimeraze, s čimer preprečimo sintezo tarčnih proteinov in morebitno njihovo citotoksičnih. Izražanje tarčnih proteinov lahko induciramo na dva načina:

1. infekcija gostiteljskega seva s λ CE6-bakteriofagom, ki nosi zapis za T7 RNA-polimerazo, pod kontrolo λp_L in p_l promotorjev,
2. transformacija pET-plazmida v ekspresijski sev, ki na kromosomski DNA nosi zapis za T7 RNA-polimerazo, pod kontrolo $lacUV5$.

V drugem primeru je izražanje inducirano s dodatkom IPTG (Slika 4.4).



Slika 4.4: Shematični prikaz mehanizma indukcije izražanja rekombinantnega proteina v *E. coli* z IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktoranozide). IPTG inaktivira lac-represor, kar omogoči vezavo RNA-polimeraze *E. coli* na lac-promotor in prepis T7 RNA-polimeraze. Slednja omogoča prepis tarčnega proteina na plazmidu pET, ki je pod kontrolo T7-promotorja [Novagen, 2006].

Reagenti:

- gojišče TB
- 0,5 M IPTG
- 1 M δ -aminolevulinsko kislino

Postopek:

Dan pred indukcijo izražanja plazmida pET17b smo HMS174-celice nacepili v 10 ml LBamp-gojišča ter preko noči inkubirali na stresalniku pri 37 °C in 200 rpm. Naslednje jutro smo 100 ml TBamp-medija inokulirali z 1 ml prekonočne LBamp-kulture in inkubirali v stresalniku pri 37 °C in 200 rpm 5 h. Po 5 h smo dodali IPTG in δ -aminolevulinsko kislino do 1 mM koncentracije. Inkubacijo smo nadaljevali v stresalniku pri 28 °C in 180 rpm nadaljnjih 67 h. Po končani inkubaciji smo gojišče centrifugirali 10 min na 4 °C pri 3000 g. Supernatant smo odlili, pelet (celice) pa shranili na -70 °C.

4.4.5 Izolacija in čiščenje pET17b hCYP51 a3A4 iz *E.coli*

Reagenti:

- fosfatni pufer (20 mM K-PO₄, pH 8.0, 0,1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0,4 % Triton X-100, 20 % glicerol)
- 1 mM DTT
- 10 µg/ml DNAAze I
- 0,5 mM PMSF
- 0,5 mg/ml lizocima

Postopek:

HMS174 celice smo odtalili na sobni temperaturi in jih resuspendirali v 10 ml fosfatnega pufra, ki smo mu pred tem dodali 0,1 ml DDT, 0,1 ml DNAAze I, 0,5 ml PMSF in 2 ml lizocima (volumni so prepracunani na 100 ml fosfatnega pufra). Celice smo po 45 min inkubaciji na ledu sonificirali (3 krat po 20 s) in 45 min centrifugirali pri 4 °C na 100.000 g. Supernatant smo prelili v centrifugirke (15 ml), odvzeli vzorec 1 ml, zamrznili v tekočem dušiku ter shranili na -80 °C.

4.4.6 Merjenje koncentracije mutiranih proteinov CYP51

Merjenje koncentracije citokromov P450 temelji na njihovih spektroskopskih lastnostih ob redukciji in vezavi CO. Koncentracijo izračunamo na podlagi ekstinkcijskega koeficiente po naslednji enačbi:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4.1)$$

$$c = \frac{A_{450} - A_{490}}{\varepsilon \cdot l} \quad (4.2)$$

Reagenti:

- vzorci hCYP51
- ogljikov monoksid (CO)
- natrijev ditionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
- UV-VIS dual spektrofotometer

Postopek:

V posamezne vzorce hCPY51 smo približno 30 s uvajali CO (hitrost 1 mehurček na s). Po $500 \mu\text{l}$ vzorca smo odpipetirali v dve kiveti in na UV-VIS spektrofotometru izmerili bazno linijo. V eno kiveto smo nato dodali zelo majhno količino $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, premešali ter merili diferenčni spekter pri 400-500 nm. Meritev smo ustavili, ko vrh pri 450 nm ni več naraščal oziroma je začel padati. Koncentracijo smo izračunali po enačbi (4.2). Ekstinkcijski koeficient znaša ($91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Razlika absorbanc se uporablja zato, da se izniči vpliv drugih dejavnikov, na jakost abosrbcije pri 450 nm.

4.5 PRIPRAVA PLAZMIDNE DNA ZA IZRAŽANJE CITOKROM P450 REDUKTAZE V *E. coli*

Citokromi P450 za delovanje potrebujejo donorja elektronov, ki je v primeru CYP51 citokrom P450 reduktaza (CPR). S pomočjo PCR-reakcije smo iz goveje jetrne cDNA namnožili goveji gen za CPR (bCPR) in ga klonirali v ekspresijski vektor pET17b. Uspešnost kloniranja smo preverjali z restrikcijo in z določanjem nukleotidnega zaporedja insertov.

Namnožitev gena bCPR iz cDNA smo najprej izvedli s oligonukleotidnimi začetniki, ki so se povsem prilegali začetnemu in končnemu delu gena. Na dobljenem PCR-produktu smo nato izvedli vgnezden-PCR, z oligonukleotidnimi začetniki, ki so na 3' koncih vsebovali restrikcijska mesta (NdeI in SalII).

4.5.1 Polimerazna verižna reakcija (PCR) za namnožitev bCPR iz cDNA

Reagenti:

- plazmid pET17b
- bdH₂O
- $2\times$ Master Mix-polimerazni pufer
- *Pfu*Turbo DNA-polimeraza

- smiselni oligonukleotidni začetniki:
 - bCPR-fw: 5' - CATGGCAGACTCCAACATGGATGCCGGCACCAC - 3'
- protismiselni oligonukleotidni začetniki:
 - bCPR-a-rv: 5' - CTAGCTCCATACGTCCAGGGAGTAGCGGCCCTG - 3'
 - bCPR-b-rv: 5' - GCTCCATACGTCCAGGGAGTAGCGGCCCTG - 3'

Postopek:

V centrifugirki za PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala 12,5 μ l Master Mix-pufra, 1,5 μ l cDNA, 2,5 μ l smiselnega (CPR-b-fw) ter 2,5 μ l protismiselnega (CPR-a-rv ali CPR-b-rv) oligonukleotidnega začetnika, 0,3 μ l *Pfu*-polimeraze ter 5,7 μ l bdH₂O (končni volumen 25 μ l). Nastavili smo 2 reakcijski zmesi. PCR-reakcijo smo izvedli v GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) pri naslednjih pogojih:

začetna denaturacija	95 °C	5 min
10 ciklov:	95 °C	45 s
	60 °C	30 s
	72 °C	1 min 15 s
15 ciklov:	95°C	45 s
	55 °C	30 s
	72 °C	1 min 15 s
končni korak:	72 °C	10 min
	4 °C	∞

4.5.2 Vgnezdena polimerazna verižna reakcija (PCR)

Reagenti:

- PCR-produkt
- bdH₂O
- 2× Master Mix-polimerazni pufer
- *Pfu*Turbo DNA-polimeraza
- smiselni oligonukleotidni začetniki:
 - N-CPR: 5' - GGAATTCCATATGGCAGACTCCAACATGGATGCCGGCACCAC - 3'
- protismiselni oligonukleotidni začetniki:

- His-CPR: 5' - CTGCTTCTAGATCAGTGATGGTGATGGATGTTGATCTTCG-TTGTAAACGGATAACTGGGTTCTCAGGGGTGTG - 3'

Postopek:

V centrifugirki za PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala $12,5 \mu\text{l}$ Master Mix pufra, $5 \mu\text{l}$ PCR, $2,5 \mu\text{l}$ smiselnega (N-CPR) ter $2,5 \mu\text{l}$ protismiselnega (His-CPR) oligonukleotidnega začetnika, $0,3 \mu\text{l}$ *Pfu*-polimeraze ter $2,2 \mu\text{l}$ bdH_2O (končni volumen $25 \mu\text{l}$). PCR-reakcijo smo izvedli v GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) pri naslednjih pogojih:

začetna denaturacija	95°C	4 min
10 ciklov:	95°C	30 s
	57°C	45 s
	72°C	2 min 20 s
25 ciklov:	95°C	30 s
	52°C	45 s
	72°C	2 min 20 s
končni korak:	72°C	10 min
	10°C	∞

4.5.3 Kloniranje bCPR PCR v pET17b ekspresijski vektor

Na PCR-produktu in vektorju pET17b smo naredili restrikcijo z *NdeI* in *SaII*, očistili iz gela, izvedli ligacijo ter z ligacijsko mešanico transformirali XL1-Blue celice. Iz zraslih kolonij smo namnožili plazmide in jih poslali na določanje nukleotidnega zaporedja.

4.5.3.1 Ligacija

Reagenti:

- PCR-produkt
- vektor pET17b
- T4 DNA-ligaza
- $5 \times$ ligacijski pufer

Postopek:

V centrifugirki smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala $7 \mu\text{l}$ očiščenega PCR-produkta, $2 \mu\text{l}$ $5 \times$ ligacijskega pufra, $0,5 \mu\text{l}$ T4 DNA-ligaze ter $0,5 \mu\text{l}$ očiščenega vektorja pET17b. Zmes smo inkubirali na 16°C preko noči, ter naslednji dan izvedli transformacijo.

4.6 PRIPRAVA PLAZMIDNE DNA ZA IZRAŽANJE hCYP51-His V SESALSKIH CELICAH

Plazmid hCYP51-His smo pripravili s pomočjo CT-GFP Fusion TOPO TA Expression Kita (Invitrogen). Kit omogoča hitro in učinkovito kloniranje PCR-produktov, namnoženih s *Taq*-polimerazo, v linearizirani plazmidni vektor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, in možnost fuzije GFP proteina (green fluorescent protein) na C-terminalni konec produkta. Zapis za GFP-protein se nahaja v plazmidu pcDNA3.1, vendar je treba insert za kloniranje pripraviti tako, da na 3'-koncu ne vsebuje STOP-kodona in da se GFP prepisuje v pravilnem bralnem okviru. GFP, ki se uporablja v teh vektorjih, je spremenjena oblika nativnega GFP, z izboljšanim izražanjem in fluorescenco v sesalskih celicah. *Taq* polimeraza se uporablja zaradi terminalne transferazne aktivnosti, ki PCR produktom na 3'-koncu doda posamezne deoksiadenozine. Vektor pcDNA3.1 ima namreč na 3'-koncih dodan deoksitimidinski ostanek, ki omogoča prieganje vektorja in PCR-produktov ter ligacijo s topoizomerazo I. Če ne uporabljamo *Taq*-polimeraze, moramo PCR-produktom naknadno dodati deoksiadenozine.

4.6.1 Priprava PCR produktov

Reagenti:

- plazmidna DNA
- bdH₂O
- smiselni oligonukleotidni začetnik:
 - pcDNA-Cyp51: 5' - GGAATTCTGGTACCATGGCGGCGGCCTGGATGCTG - 3'
- protismiselni oligonukleotidni začetnik:
 - pcDNA-Cyp51-His: 5' - CTGCTTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGTTT-GATCTCGTTGTAACG GATAACTGGGTCTCAGGGGTGTG - 3'
 - pcDNA-Cyp51-GFP: 5' - CTGCTGATATCTGCAGAATTGCCCTTGATCTCGTT-GTAACGGATAACTGG GTTCTCAGGGGTGTG - 3'
- 10× *Pfu*-polimerazni pufer
- dNTPmix
- *Pfu*Ultra DNA-polimeraza

Postopek:

V centrifugirki za PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala $2,5 \mu\text{l}$ $10\times Pfu$ -polimeraznega pufra, $2 \mu\text{l}$ dNTPmix, $2 \mu\text{l}$ plazmida, $2,5 \mu\text{l}$ smiselnega oligonukleotidnega začetnika, $2,5 \mu\text{l}$ protismiselnega oligonukleotidnega začetnika, $0,5 \mu\text{l}$ Pfu , polimeraze ter $13 \mu\text{l}$ bdH₂O (končni volumen $25 \mu\text{l}$).

Nastavili smo dve reakcijski zmesi, z naslednjimi oligonukleotidnimi pari:

- a) pcDNA-hCYP51 + pcDNAhCYP51-His
- b) pcDNA-hCYP51 + pcDNAhCYP51-GFP

PCR-reakcijo smo izvedli v GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) pri naslednjih pogojih:

začetna denaturacija	95°C	4 min
10 ciklov:	95°C	30 s
	57°C	45 s
	72°C	2 min 20 s
25 ciklov:	95°C	30 s
	52°C	45 s
	72°C	2 min 20 s
končni korak:	72°C	10 min
	4°C	∞

Pfu-polimeraza ima nižjo hitrost vgrajevanja nukleotidov kot *Taq*-polimeraza, zaradi česar smo čas podvajanja pri 72°C nastavili na 2 min 20 s in končni korak na 10 min. Uspešnost PCR reakcije smo preverili na agaroznem gelu, nato smo dobljene produkte očistili in izolirali s pomočjo DNA Gel extraction kita. Tako dobljene očiščene produkte smo s pomočjo kita TOPO TA cloning (Invitrogen) klonirali v plazmidni vektor pCR4-TOPO (3956 bp). Ker je kit prirejen za kloniranje s *Taq*-polimerazo namnoženih PCR-produktov, smo našim produktom na 3'-konec dodali še deoksiadenozine.

4.6.2 Dodatek deoksiadenozina na 3' konec PCR produktov

Reagenti:

- PCR-produkt
- Master mix (dNTPmix, *Taq*-polimeraza, pufer)

Postopek:

$5 \mu\text{l}$ očiščenih PCR produktov, hCYP51-His in hCYP51-GFP, smo dodali $5 \mu\text{l}$ master mixa ter 10 min inkubirali pri 72°C . Nato smo reakcijsko zmes postavili na led in nadaljevali s kloniranjem v pCR4-TOPO.

4.6.3 Kloniranje v pCR4-TOPO

Reagenti:

- PCR-produkt (s 3' deoksiadenozinom)
- raztopina soli (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂)
- TOPO-vektor (pCR4-TOPO)

Postopek:

Za kloniranje smo uporabili TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Pripravili smo dve reakcijski zmesi, ki sta vsebovali 2 μ l PCR produkta, 0,5 μ l raztopine soli ter 0,5 μ l TOPO-vektorja (končni volumen reakcijske zmesi je 3 μ l). Zmesi smo 10 min inkubirali na sobni temperaturi, nato pa plazmidne vektorje transformirali v DH5 α -kompetentne celice. Uspešnost kloniranja smo preverili z namnožitvijo plazmidne DNA v tekoči kulturi, izolacijo ter restrikcijo le-te z *EcoRI*.

4.6.4 Restrikcija z *EcoRI*

Reagenti:

- plazmidna DNA
- 10 \times BSA
- restriktivska endonukleaza *EcoRI* "
- NEBuffer 4
- bdH₂O

Postopek:

V reakcijsko zmes smo dodali 5 μ l plazmidne DNA, 1 μ l 10 \times BSA, 0,3 μ l *EcoRI*, 1 μ l NEBuffer in 2,7 μ l bdH₂O (končni volumen 10 μ l) ter vse skupaj inkubirali 2 h na 37 °C. Zatem smo restriktivsko zmes nanesli na agarozni gel. Uspešno klonirane fragmente smo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja.

4.6.5 Restrikcija s *KpnI* in *NotI*

Plazmidni vektor pCR4 TOPO TA s fragmentom hCYP51-His smo rezali s restriktivskima endonukleazama *KpnI* in *NotI*. *KpnI*-restriktivska mesto smo v vektor vnesli s pomočjo začetnega oligonukleotidnega začetnika, medtem ko je bilo *NotI*-mesto že

vsebovano v plazmidnem vektorju. Na enak način smo razrezali tudi plazmidni vektor pcDNA3.1 TOPO TA, s čimer smo omogočili uspešno ligacijo hCYP51-His fragmenta. Reagenti:

- plazmidna DNA
- restrikcijski endonukleazi (*Kpn*I in *Not*I)
- bdH₂O
- 10 × BSA
- 10 × Multicore-pufer (250 mM tris-acetat, pH 7,5, 1 M natrijev acetat, 100 mM magnezijev acetat, 10 mM DTT)
- Buffer D (60 mM Tris-HCl, pH 7,9, 60 mM, MgCl₂, 1,5 mM NaCl, 10 mM DTT)

Postopek: V centrifugirki smo zmešali 30,4 µl pCR4 plazmidnega vektorja s hCYP51-His_1 insertom, 4 µl 10×BSA, 4 µl 10×NEBuffer 4, 1 µl *Not*I in 0,6 µl *Kpn*I. Zmes smo inkubirali pri 37 °C približno 24 h, ter uspešnost restrikcije preverili na agaroznem gelu.

4.7 DELO z NESMRTNIMI CELIČNIMI KULTURAMI

Delo z nesmrtnimi celičnimi kulturami zahteva visoko stopnjo sterilnosti, da ne pride do virusnih, bakterijskih ali glivičnih okužb. Pri HepG2-celični liniji smo izvedli prehodno transfekcijo s plazmidnim vektorjem pcDNA3.1/CT-GFP TOPO, ki je vseboval insert hCYP51-His.

4.7.1 Gojenje HepG2-celične linije

Lastnosti HepG2-celične linije so prikazane v preglednici 4.2.

Preglednica 4.2: Lastnosti HepG2-nesmrtnne celiče linije

Ime	organizem	tkivo	fenotip	upraba v znanosti
HepG2	človek	jetra	adherentne	stabilne celične transfekcije prehodne celične transfekcije

Reagenti:

- gojišče: 89 % DMEM (koncentracija glukoze 4,5 g/l), 10 % serum mlade govedi, 1 % L-glutamin, pH 7,05 – 7,15,
- PBS-pufer (0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 4,8 mM Na₂HPO₄, 1,9 mM KH₂PO₄),
- raztopina tripsina (0,25-odst. tripsin-EDTA-raztopina)

Postopek:

HepG2-celice smo gojili v stekleničkah za celične kulture (površine 75 cm²) v inkubatorju pri 37 °C, 100 % vlažnosti in 5 % CO₂. Ko so celice preraščale 90-100 % površine stekleničke smo jih precepili v razmerju 1:3. Precepljali smo jih tako, da smo najprej aspirirali gojišče, celice sprali z 10 ml PBS pufra, jim nato dodali 3ml tripsina ter inkubirali pri 37 °C, 5-10 min, dokler niso odstopile od podlage. Tripsin razgrajuje ekstracelularne proteine, s katerimi so celice pritrjene na podlago stekleničke. Delovanje tripsina smo inhibirali z dodatkom svežega gojišča, ki je vsebovalo serum, in celice centrifugirali (sobna temperatura, 5 min, 1000 g). Supernatant smo odlili, celice pa raztopili v 12 ml gojišča ter v alikvotih po 4 ml prenesli v sveže stekleničke za celične kulture.

Celice so bile shranjene v tekočem dušiku pri -196 °C. Odtajanje in ponovno oživljanje je za celice šok, zaradi česar smo pred načrtovano transfekcijo naredili nekaj pasaž, da se je delovanje celic normaliziralo.

4.7.2 Transfekcija HepG2-celične linije

Ker uspešnosti transfekcije HepG2-celic s plazmidom pcDNA3.1 hCYP51-His ni mogoče enostavno preveriti, smo uspešnost transfekcije optimizirali s pomočjo plazmidov pcDNA3.1 GFP in pEGFP-N1. V tem primeru je uspešnost transfekcije celic HepG2 prenosorazmerna s flourescenco le-teh. Plazmida sta med seboj identična in se razlikujeta zgolj v spektralnih lastnostih proteina GFP.

Transfekcije smo izvajali v ploščicah z 12 vdolbinami (površina vdolbine je 3,66 cm²) (Slika 4.5). Posamezni načini transfekcije zahtevajo različno stopnjo konfluentne rasti celic. Tako smo dan pred načrtovano transfekcijo v vdolbine ploščic nacepili različne volumne tripsiniziranih celic in s tem dosegli želeno konfluentnost (preglednica 4.3).

V primeru, ko se tuja DNA vnešena v celico pri transfekciji pred mitozo celic izgubi, govorimo o prehodni transfekciji. Če pa se le-ta vgradi v genomsko DNA celice in se med mitozo ne izgubi, govorimo o stabilni transfekciji.

Preglednica 4.3: V preglednici so podane prostornine tripsiniziranih celic, ki smo jih nanesli v vdolbine, da smo dosegli želeno konfluentnost celic na dan transfekcije.

Tip transfekcije	Zahtevana konfluentnost	Nacepitveni volumen ¹	Volumen dodanega gojišča	Proizvajalec
CaCl ₂	70 %	0,29 ml	1 ml	
FuGene HD	80-90 %	0,39 ml	1 ml	Roche
Lipofectamine 2000	90-95 %	0,44 ml	1 ml	Invitrogen

¹-Volumni so ustrezeni v primeru, ko je konfluentnost celic v stekleničkah za celične kulture, ki smo jih tripsinizirali (75 cm^2) znašala 100 %.

4.7.2.1 Transfekcija s CaCl₂

Transfekcija s CaCl₂ je klasičen način vnosa plazmidne DNA v tarčno celico. CaCl₂ z DNA tvori precipitat, ki se veže na površino sesalskih celic in po do zdaj še neznanem mehanizmu omogoči da do 10 % celic sprejme DNA.

Reagenti:

- bdH₂O
- 2 × HBS-pufer (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM glukoza, 50 mM HEPES, pH 7,05)
- plazmidna DNA (pcDNA3.1-GFP in pEGFP-N1)
- 2 M CaCl₂

Postopek:

Za transfekcijo celic smo v centrifugirki pripravili zmes 30 μl sterilne bdH₂O, 33 μl 2 × HBS-pufra in 2 μg plazmidne DNA (1,4 μg pcDNA3.1-GFP ter 6,7 μg pEGFP-N1), dobro premešali in med mešanjem po kapljicah dodali 4,3 μl CaCl₂. Sledila je 30 min inkubacija na sobni temperaturi, nato smo zmes znova premešali s pipetiranjem ter dodali v vdolbine s celičnimi kulturami. Celice smo vrnili v inkubator in uspešnost transfekcije preverili po 48 h pod invertnim mikroskopom.

4.7.2.2 Transfekcija s FuGene HD Transfection Reagent

FuGene HD transfekcijski reagent je mešanica lipidov in drugih komponent v 80-odst. etanolu, ki z DNA tvori kompleks in ga prenese v živalske celice. Ima nizko stopnjo citotoksičnosti in ne vpliva na morfologijo celic.

Reagenti:

- FuGene HD-transfekcijski reagent
- diluent (DMEM)
- plazmidna DNA (pcDNA3.1-GFP in pEGFP-N1)

Postopek:

V centrifugirkah smo najprej pripravili transfekcijski kompleks, ki vsebuje različna razmerja DNA : FuGene HD (preglednica 4.4). V centrifugirki smo najprej zmešali diluent in plazmidno DNA, nato dodali FuGene HD in močno premešali. Po 15 min inkubacije smo mešanico po kapljicah dodali celičnim kulturam. Celice smo po 48 h inkubacije pogledali pod invertnim mikroskopom.

Preglednica 4.4: Transfekcijski kompleksi za transfekcijo s FuGene HD. Količine dodanih reagentov so preračunane na površino vdolbin ($3,66 \text{ cm}^2$)

	Razmerje (DNA : FuGene)	Diluent [μl]	plazmidna DNA [μl]	FuGene HD [μl]
pEGFP-N1	2 : 3	51	3,7 [1.1 μg]	1,5
	2 : 5	51	3,7 [1.1 μg]	2
pcDNA3.1-GFP	2:3	51	0,8 [1.1 μg]	1,5
	2 : 5	51	0,8 [1.1 μg]	2

4.7.2.3 Transfekcija z Lipofectamin 2000-transfekcijskim reagentom

Reagenti:

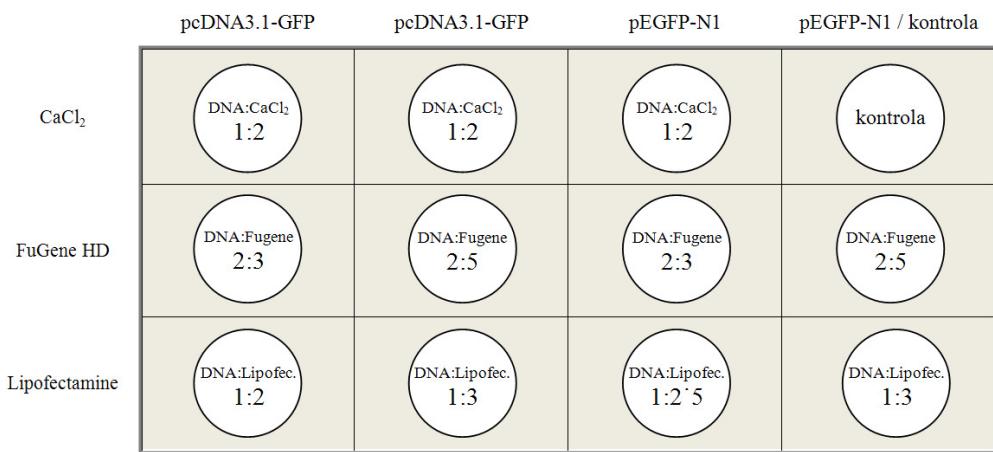
- transfekcijski reagent Lipofectamine 2000
- diluent: Opti-MEM I Reduced serum medium
- plazmidna DNA (pcDNA3.1-GFP in pEGFP-N1)

Postopek:

V centrifugirkah smo ločeno zmešali diluent in DNA ter diluent in Lipofectamin (Preglednica 4.5). Diluent z lipofektaminom smo po 5 min inkubaciji dodali k plazmidni DNA ter inkubirali 20 min pri sobni temperaturi (nastanek kompleksov z DNA). Zatem smo zmes dodali celicam, rahlo premešali in po 48 h inkubaciji pogledali pod invertnim mikroskopom.

Preglednica 4.5: Količine reagentov za transfekcijo celic z Lipofectaminom 2000. Količine dodanih reagentov so prepräčunane na površino vdolbine ($3,66 \text{ cm}^2$).

	Razmerje DNA : Lipofec.	Prva centrifugirka diluent [μl]	DNA [μl]	Druga centrifugirka diluent [μl]	Lipofec. [μl]
pcDNA3.1-GFP	1 : 2	100	1 [1,4 μg]	100	2,8
	1 : 3	100	1 [1,4 μg]	100	4,2
pEGFP-N1	1 : 2,5	100	5 [1,5 μg]	100	3,75
	1 : 3	100	25 [0,5 μg]	100	1,5



Slika 4.5: Razporeditev posameznih načinov transfekcij, ki smo jih izvedli na ploščici z 12 vdolbinami.

4.8 NaDS-PAGE ELEKTROFOREZA

NaDS-PAGE je elektroforezna tehnika, ki se uporablja za ločevanje proteinov na osnovi njihove velikosti (dolžine polipeptidne verige). Ločevanje proteinov poteka na poliakrilamidnih gelih pri pogojih, ki zagotavljajo disociacijo posameznih polipeptidnih podenot in preprečujejo agregacijo le-teh. Za disociacijo proteinov pred nanosom na gel se največkrat uporablja močen anionski detergent NaDS skupaj z reducentom

in s temperaturo. Denaturirane polipeptidne verige vežejo NaDS in tako postanejo negativno nabite. Ker je količina vezanega NaDS prenosorazmerna z velikostjo peptida in je neodvisna od aminokislinskega zaporedja, migrirajo NaDS-peptidni kompleksi v poliakrilamidnem gelu skladno z njihovo molekulsko maso.

NaDS-PAGE elektroforezo lahko izvajamo v dveh oblikah. **Enodimenzionalna gelska elektroforeza** nam omogoča določanje velikosti in čistosti proteina. Poleg tega lahko z njo ugotovimo število in velikost polipeptidnih podenot multimernega proteina. **Dvodimenzionalna gelska elektroforeza** v prvi dimenziji ločuje proteine na osnovi izoelektričnega fokusiranja, medtem ko v drugi dimenziji proteine ločuje na osnovi velikosti v prisotnosti NaDS.

Reagenti:

- celični homogenat
- NuPAGE Novex Bis-Tris Gel (Invitrogen)
- NuPAGE LDS Sample Buffer 4 ×
- NuPAGE Reducing Agent 10 ×
- XCell *SureLock* Mini-Cell (Invitrogen)

Postopek:

NaDS-PAGE-elektroforezo smo izvedli po navodilih XCell *SureLock* Mini-Cell kompleta Invitrogena (Cat. number: EI0001) (slika 4.6).



Slika 4.6: NaDS-PAGE-elektroforeza XCell *SureLock* Mini-Cell (Invitrogen).

4.8.1 Vizualizacija proteinov v NaDS-PAGE-gelih

4.8.1.1 Barvanje z barvilo Coomassie

Barvilo Coomassie se uporablja za detekcijo in kvantifikacijo proteinov na gelu ali v raztopini. V kislem okolju se reagent veže na aromatske in bazične stranske verige aminokislin, predvsem arginina, lizina in histidina, v proteinu. Pri vezavi se barvili spremeni absorbcijski vrh iz 465 nm na 610 nm. Proteini se na gelu obarvajo modro.

Reagenti:

- SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Cat. number: LC6060)

Postopek:

Gel smo po NaDS-PAGE elektroforezi 3-krat po 5 min spirali v 100 ml bdH₂O, nato smo dodali 20 ml SimplyBlue reagenta in inkubirali 1 do 2 h. Po inkubaciji smo gel spirali 1 do 3 h v 100 ml bdH₂O.

4.8.1.2 Barvanje s SYPRO Ruby

SYPRO Rubi-barvilo ni moteče za nadalje analize proteinov, kot sta določanje aminokislinskega zaporedja po Edmanu ali masna spektroskopija, in se uporablja za barvanje glikoproteinov in lipoproteinov, ki se sicer težko obarvajo.

Reagenti:

- SYPRO Rubi-barvilo (Invitrogen prod. number: S12001)
- UV-transiluminator s CCD-kamero

Postopek:

Barvanje smo izvedli po navodilih SYPRO Rubi (Invitrogen). Gel smo slikali s pomočjo sistema za slikanje gela UVITEC (Platinum).

4.8.1.3 Barvanje s Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen)

Pro-Q Diamond Phosphoprotein (Invitrogen) je barvilo, ki selektivno obarva fosforilirane proteine na poliakrilamidnih gelih. Omogoča detekcijo fosfatnih skupin, vezanih na serinske, tirozinske ali treoninske ostanke.

Reagenti:

- barvilo Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen)

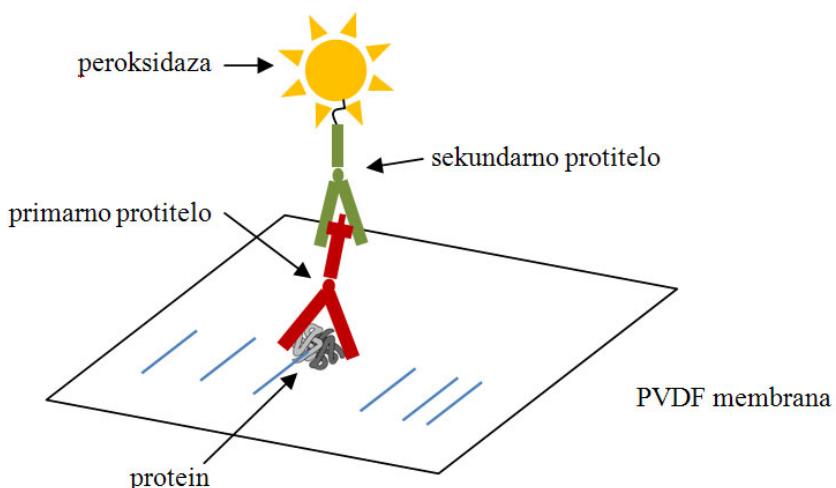
- TECAN skener LS200

Postopek:

Barvanje smo izvedli po navodilih Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen). Gel smo slikali s pomočjo TECAN skenerja, ki uporablja ekscitacijsko valovno dolžino 535 nm, kar se sklada z ekscitacijsko dolžino barvila (555 nm).

4.9 PRENOS PO WESTERNU

Prenos po Westernu se uporablja za specifično identifikacijo proteinov, ki jih prepoznajo monoklonska ali poliklonska protitelesa. Proteine po NaDS-PAGE elektroforezi prenesemo na nitrocelulozno, PVDF ali najlonsko membrano. Prenos temelji na migraciji negativno nabitih proteinov v električnem polju iz gela na membrano. Po prenosu se proteini nahajajo na površini membrane in so tako dostopni primarnim protitelesom. Po vezavi primarnih protiteles membrano speremo in inkubiramo še s sekundarnimi protitelesi (IgG). Komplekse antigen - primarno protitelo - sekundarno protitelo zaznamo na podlagi encimov, konjugiranih s sekundarnim protitelesom (slika 4.7). Po navadi so to hrenova peroksidaza ali alkalna fosfataza.



Slika 4.7: Način zaznave specifičnega proteina pri prenosu po Westernu. Imunske komplekse (antigen – primarno – sekundarno protitelo), ki nastanejo, zaznamo s pomočjo peroksidaze vezane na sekundarno protitelo, ob dodatku substrata.

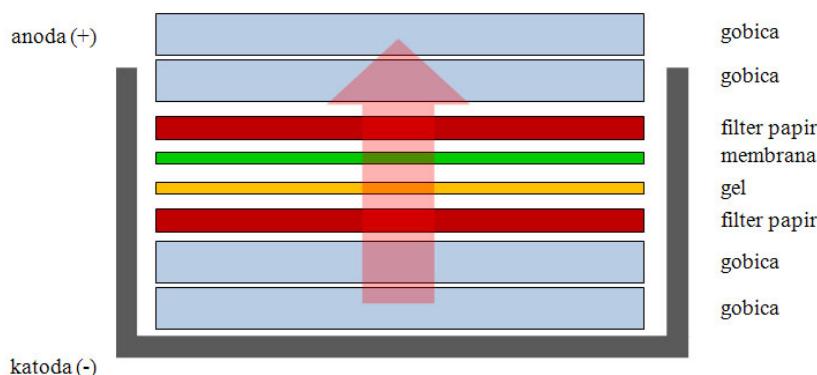
Reagenti:

- PVDF-membrana
- XCell II Blot Module

- primarna protitelesa (anti-hCYP51)
- sekundarna protitelesa s peroksidazo (anti-miš)
- mleko
- PBST-pufer (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05 % Tween 20, 10 mM PBS)

Postopek:

Postopek prenosa proteinov na membrano smo izvedli po navodilih XCell II Blot Module (Invitrogen, Cat.number. EI9051). Shematski prikaz prenosa je prikazan na sliki 4.8.



Slika 4.8: Zgradba XCell II Blot Module za prenos proteinov na membrano. Vsi elementi so predhodno namočeni v prenašальнem pufru. Prenos poteka v prenašальнem pufru, 1 h in 30 min pri konstantni napetosti 30 V. Rdeča puščica kaže smer potovanja proteinov v električnem polju.

Po prenosu proteinov na membrano smo membrano preko noči namočili v 50 ml PBST s 5 % mleka, kar je blokiralo ostala vezavna mesta za proteine na membrani. Sledila je 1 h inkubacija z mišimi primarnimi protitelesi proti človeškemu CYP51 (protitelesa smo redčili 1000-krat v PBST). Po inkubaciji smo membrano sprali v čistem PBST, in sicer 3-krat po 15 min. Sledila je 2 h inkubacija s sekundarnimi protitelesi anti-mouse-IgG (protitelesa smo redčili 2000-krat v PBST). Membrano smo sprali v čistem PBST 2-krat po 15 min, ter še enkrat od 2 do 12 h. Sledila je vizualizacija proteinov s kemiluminiscenco.

4.9.1 Vizualizacija imunskih kompleksov

Reagenti:

- SuperSignal West Pico-kemiluminiscentni substrat (Pierce prod. number. 34080)

- PVDF-membrana
- fotografski papir

Postopek:

Postopek smo izvedli po navodilih SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

4.10 IMUNOPRECIPITACIJA

Imunoprecipitacija je tehnika, pri kateri izoliramo željeni antigen iz vzorca s pomočjo njegove vezave na protitelo. Uporablja se lahko tako poliklonska kot tudi monoklonska protitelesa, ki so kovalentno ali nekovalentno vezana na matriks.

4.10.1 Homogenizacija mišjih jeter

Reagenti:

- 2 g mišjih jeter
- pufer za homogenizacijo ($10 \mu\text{l}$ fosfataznih inhibitorjev (Sigma: P2850), $150 \mu\text{l}$ proteaznih inhibitorjev (Invitrogen), 10 mM NaF , $1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$, $2 \text{ mM } \beta\text{-glicero fosfat}$ ter 4.3 ml M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce Cat. number: 78501)
- homogenator (Potter Elvehjem homogenator)

Postopek:

Tako po evtanaziji smo odvezeli 2 g mišjih jeter in jih shranili v homogenacijskem pufru pri 0°C . Jetra, ki so ostala, smo zmrznili v tekočem dušiku in shranili na -82°C . Homogenacijski pufer je vseboval $10 \mu\text{l}$ fosfataznih inhibitorjev (Sigma: P2850), $150 \mu\text{l}$ proteaznih inhibitorjev (Invitrogen), 10 mM NaF , $1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$, $2 \text{ mM } \beta\text{-glicero fosfata}$ ter 4.3 ml M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce Cat. number: 78501). Homogenatu smo dodali $200 \mu\text{l}$ 10-odst. NaDS in $250 \mu\text{l}$ 20-odst. TritonX-100. Po 4 h inkubaciji pri 4°C smo dodali še protitelesa vezana na AminoLink Plus Gel (Pierce, Cat. number 20501) ter inkubacijo nadaljevali preko noči.

4.10.2 Imunoprecipitacija

Imunoprecipitacijo smo uporabili za izolacijo proteina CYP51 iz mišjih jeter in smo jo izvedli po navodilih Seize Primary Mammalian Immunoprecipitation Kit (Pierce,

Cat. number 45332).

Reagenti:

- Seize Primary Mammalian Immunoprecipitation Kit
- homogenat mišjih jeter

Postopek:

Po navodilih kita (Pierce, Cat. number 45332). Med imunoprecipitacijo smo odvzeli vzorce posameznih korakov ter na NaDS-PAGE in prenosu po Westernu preverili uspešnost postopka.

5 REZULTATI

5.1 MODIFIKACIJA N-TERMINALNEGA DELA hCYP51

Priprava topnega človeškega proteina CYP51 je v prvi stopnji zahtevala odstranitev N-terminalne transmembranske regije, s pomočjo katere je le-ta vsidran v membrano ER. Položaj in velikost TM-regije je mogoče napovedati s pomočjo različnih programov, dostopnih preko spleta (TSEG, TMHMM, TMpred, SOSUI, DAS). Ena izmed napovedi teh programov je prikazana na sliki 5.1, sicer pa so vse napovedi TM-regij posameznih programov povzete v preglednici 5.1.

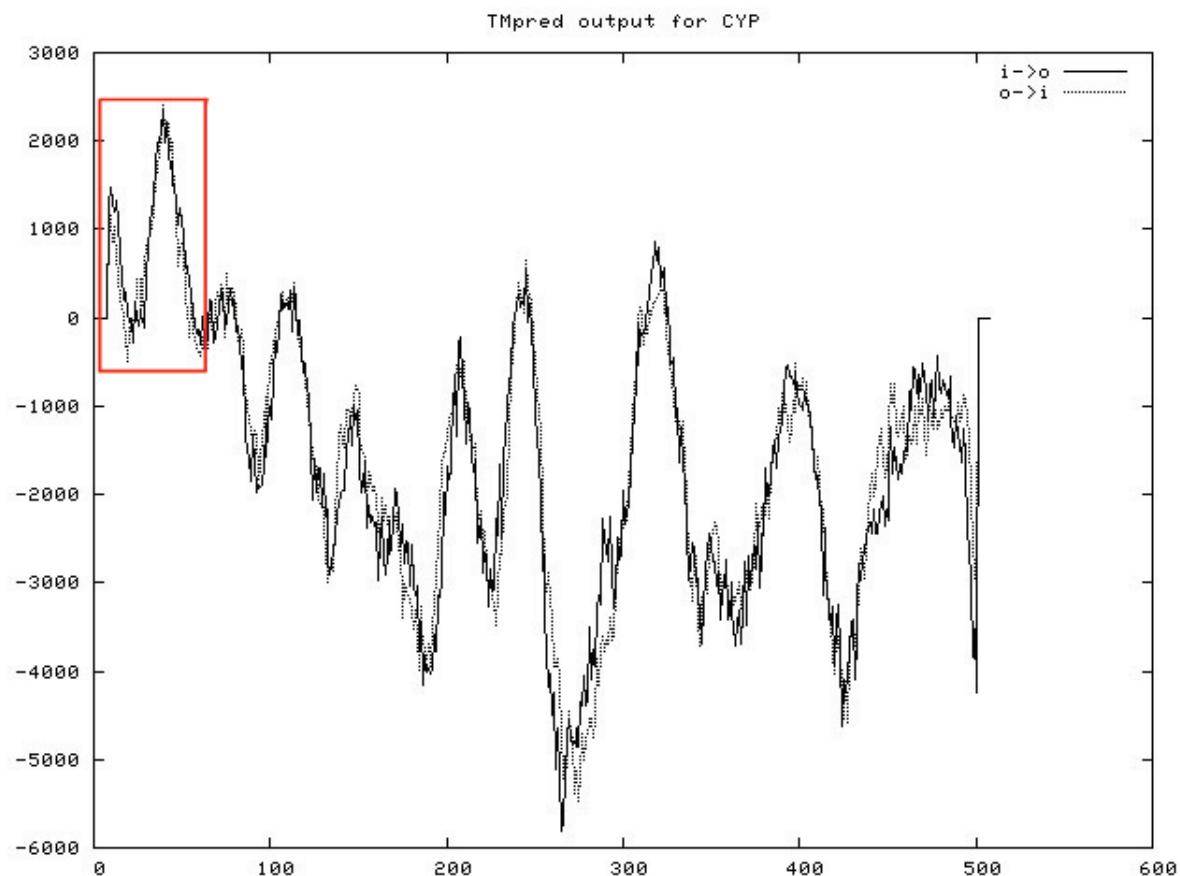
Plazmid, ki smo ga uporabljali za mestno specifično mutagenezo, je pripravil Matej Seliškar. Vseboval je hCYP51 z odstranjeno transmembransko regijo ter spremenjenimi prvimi šestimi aminokislinami. Spremembra prvih šestih aminokislin je bila enaka spremembam uvedenim v goveji CYP51, kjer smo dosegli izražanje pravilno zvitega in neagregiranega proteina v topni obliki (slika 5.2).

Preglednica 5.1: Transmembranske regije, ki so jih napovedali različni programi

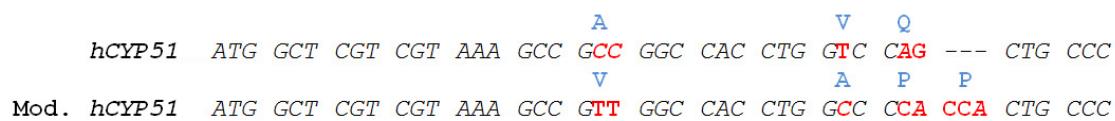
program	I TM regija		II TM regija	
	N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal
DAS	7	16	31	56
SOSUI	1	24	35	57
TMpred	3	30	31	50
TMHMM	4	21	28	50
TSEG	2	23	28	58

V N-terminalni del skrajšanega človeškega proteina CYP51 (CYP51-1b) smo uvedli pet točkovnih mutacij in eno insercijo (kodon CCA). Spremenili smo aminokisline sedem (Ala \Rightarrow Val), enajst (Val \Rightarrow Ala) dvanajst 12 (Gln \Rightarrow Pro) ter za dvanajsto aminokislino dodali še en Pro (slika 5.2). Zaradi sprememb, ki smo jih uvedli, sta aminokislinski zaporedji prvih 15 aminokislin pri skrajšanem bCYP51 in modificiranem hCYP51-1b enaki. Proteina bCYP51 in hCYP51-1b se sicer razlikujeta še na 15 drugih mestih v aminokislinkem zaporedju, vendar smo predvidevali, da na topnost proteina najbolj vpliva N-terminalni del.

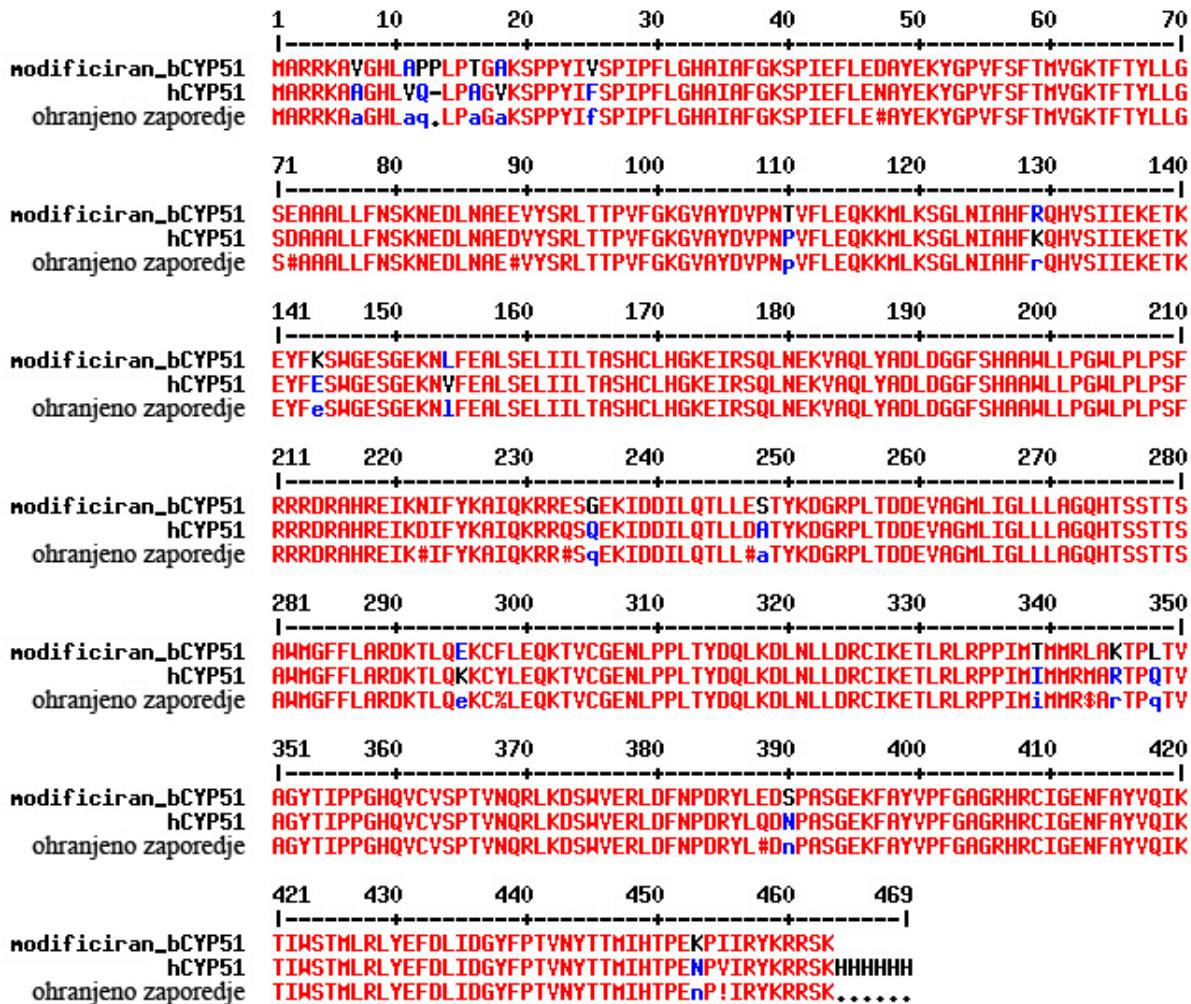
Poleg sprememb željenih aminokislin smo v mutagenezi dobili tudi klon, ki je imel sedmo aminokislino spremenjeno iz Ala v Ile (GTT \Rightarrow ATT).



Slika 5.1: Grafični prikaz transmembranskih regij hCYP51 na podlagi programa TMpred.
vir: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html



Slika 5.2: Poravnavo nukleotidnega zaporedja N-terminalnega dela hCYP51 pred (zgoraj) in po (spodaj) mestno specifični mutagenezi. Z rdečo so prikazani spremenjeni nukleotidi, z modro pa aminokisline, ki jih kodirajo.



Slika 5.3: Poravnava aminokislinskega zaporedja modificiranega govejega CYP51, brez N-terminalnega dela, z visoko stopnjo izražanja ter človeškega CYP51. Spremenili smo aminokislino na sedmem mestu iz Ala v Val ter aminokislini na enajstem in dvanajstem mestu iz Val-Gln v Ala-Pro-Pro. Na slike se vidi, da se proteina razlikujeta še na 15 drugih mestih (16, 18, 25, 110, 129, 144, 154, 235, 248, 295, 339, 345, 348, 390 in 453).

5.2 IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA hCYP51

V *E. coli* smo izrazili šest ekspresijskih plazmidov pET17b, ki so vsebovali različne vključke modificiranega hCYP51-1b (preglednica 5.2). Iz slike 5.4 je videti, da spremembe N-terminalnega dela hCYP51-1b niso povečale izražanja. Največje izražanje je bilo izražanje vektorja pET17b-5 (169 nmol/L), ki je vseboval nemutiran protein. Vsi drugi vektorji, ki so vsebovali mutacije na sedmem, enajstem in dvanajestem mestu, pa so imeli slabše izražanje (preglednica 5.2).

Količino proteina v homogenatu bakterijskih celic smo izračunali na podlagi enačbe 4.2 (stran 34). Vrednosti absorbkcije pri valovnih dolžinah 450 nm in 490 nm smo dobili z merjenjem CO-diferenčnega spektra reducirane in nereducirane ekstrakta celic, ki je vseboval CYP51. (Slika 5.5).

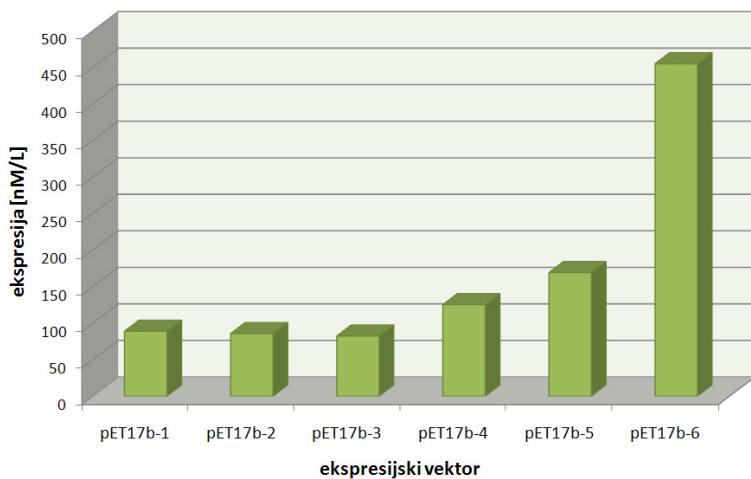
Preglednica 5.2: Ekspresijski plazmidi izraženi v *E. coli*. Kot kontrolo smo uporabili goveji modificiran CYP51 ter nemodificiran človeški CYP51.

plazmid	mutacija	aminokislinska sekvenca	izražanje [nmol/L]
pET17b-1	Ala \Rightarrow Val	MARRKA V GHLVQLPA	89,0
pET17b-2	Ala \Rightarrow Ile	MARRKA I GHLVQLPA	85,7
pET17b-3	Val-Gln \Rightarrow Ala-Pro-Pro	MARRKAAGHL APP LPA	82,4
pET17b-4	Ala \Rightarrow Val in Val-Gln \Rightarrow Ala-Pro-Pro	MARRKA V GHL APP LPA	125,3
pET17b-5	ne mod. hCYP51	MARRKAAGHLVQLPA	169,2
pET17b-6	mod. goveji CYP51	MARRKAVGHLAPPLP	454,9

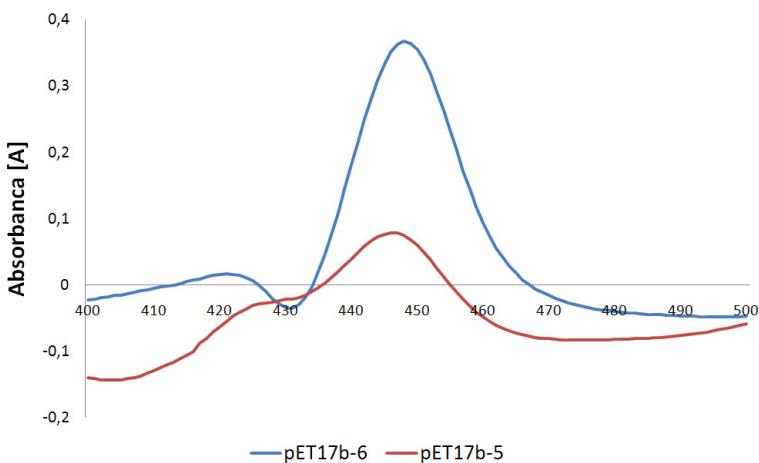
Uspešnost izražanja smo preverili še s pomočjo NaDS-PAGE elektroforeze in prenosa po Westernu. Iz slike 5.6 je videti, da se najmočnejša lisa pojavi pri vzorcu 2 (pET17b-5), kar je skladno s podatki iz slike 5.4. Široka lisa pri vzorcu 1 (pET17b-6) je posledica nanosa prevelike količine proteina bCYP51 na gel.

5.2.0.1 Gelska filtracija

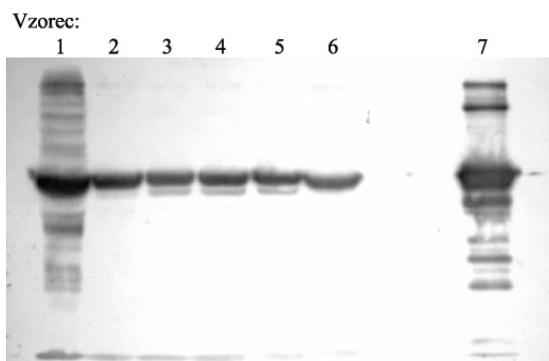
Gelska filtracija je kromatografska metoda, ki proteine ločuje na osnovi velikosti. Stacionarno fazo predstavlja porozni material s točno določeno velikostjo por, ki določa, v katerem velikostnem razredu (kDa) ločujemo proteine. Rezultati gelske filtracije, ki jo je izvedel Matej Seliškar, so pokazali, da protein bCYP51 z modificiranim N-terminalnim delom ne tvori agregatov, medtem ko se pri hCYP51-1b agregati po-



Slika 5.4: Graf prikazuje uspešnost izražanja posameznih ekspresijskih vektorjev. Podatki o količini CYP51-proteinov v posameznih vzorcih so bili dobljeni s pomočjo CO-diferenčnih spektrov.



Slika 5.5: CO-diferenčni spekter bCYP51 (modro) in hCYP51 (rdeče) brez mutacij. Večja kot je količina funkcionalnega citokroma P450 v vzorcu, večji je absorbcijski vrh pri 450 nm.



Slika 5.6: Prenos po Westernu. Vzorec: **1**-pET17b-6; **2**-pET17b-5; **3**-pET17b-2; **4**-pET17b-1; **5**-pET17b-3; **6**-pET17b-4; **7**-pozitivna kontrola

javljajo. Zaradi še nižjega izražanja hCYP51-1b z uvedenimi modifikacijami v N-terminalnem delu se agregati po vsej verjetnosti pojavljam tudi tam.

5.3 EKSPRESIJSKI PLAZMID pET17b Z GOVEJO CITOKROM-P450-REDUKTAZO (bCPR)

Citokrom-P450-reduktaza je donor elektronov številnim citokromom P450, ki se nahajajo v ER, med drugim tudi CYP51. Izolirali smo štiri ekspresijske plazmide pET17b (bCPR-1, bCPR-2, bCPR-3 in bCPR-4), ki so vsebovali govejo citokrom P450-reduktazo s histidinskim repkom. Analiza nukleotidnega zaporedja je pokazala, da vsi ekspresijski plazmidi vsebujejo določene mutacije. Mutacije, ki jih vsebujejo so zbrane v preglednici 5.3.

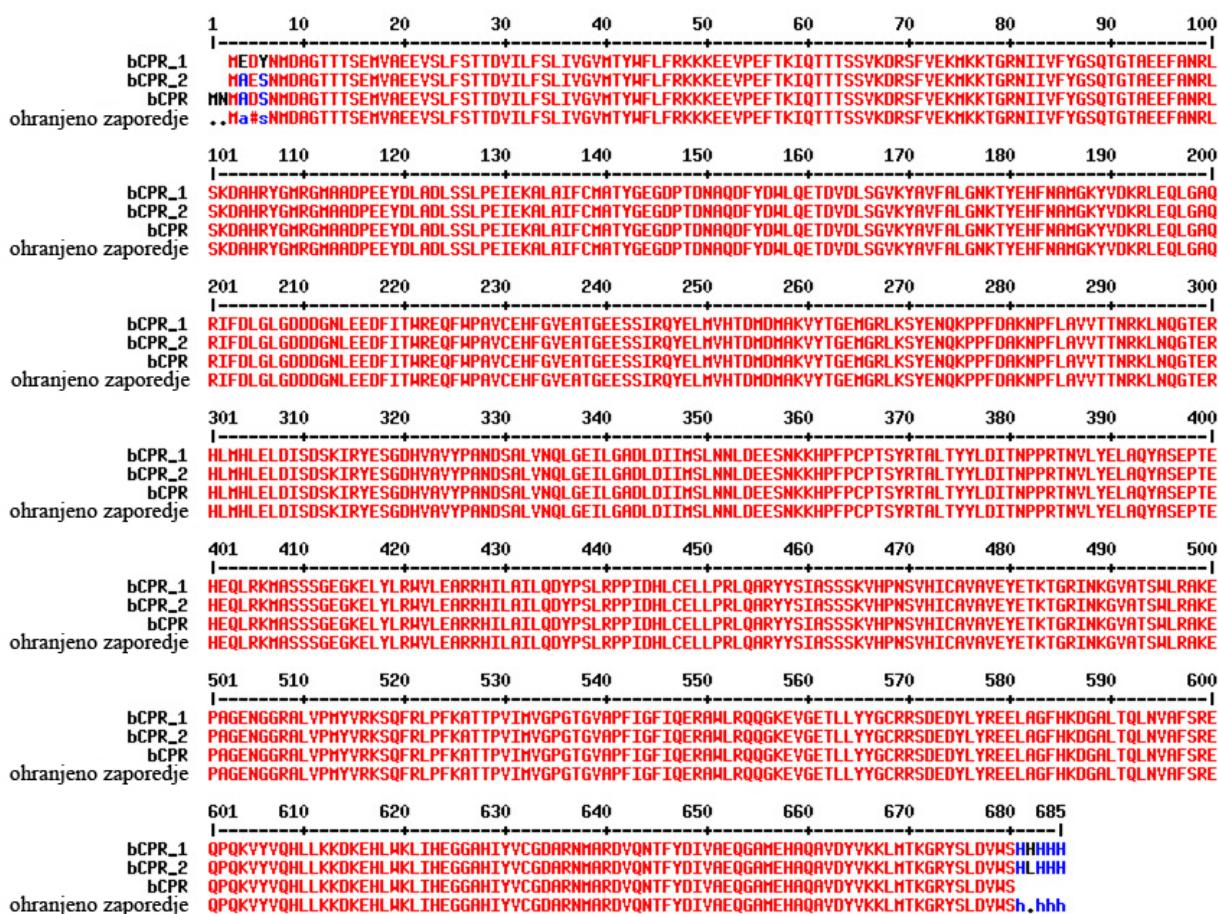
Preglednica 5.3: Analiza nukleotidnega zaporedja štirih ekspresijskih plazmidov, ki vsebujejo insert bCPR

plazmid	nukleotidno mesto*	mutacija	
		sprememba	posledica
bCPR-1	4	A \Rightarrow C	Asn \Rightarrow His
	11	C \Rightarrow A	Ala \Rightarrow Glu
	17	C \Rightarrow A	Ser \Rightarrow Tyr
	1812	G \Rightarrow A	tiha mutacija
bCPR-2	4	A \Rightarrow C	Asn \Rightarrow His
	15	C \Rightarrow A	Asp \Rightarrow Ala
	1683	G \Rightarrow A	tiha mutacija
bCPR-3	4	A \Rightarrow C	Asn \Rightarrow His
	29	C \Rightarrow A	tiha mutacija
	35	C \Rightarrow A	Thr \Rightarrow Lys
	36	C \Rightarrow A	Thr \Rightarrow Lys
	691	G \Rightarrow A	Glu \Rightarrow Asn
	729	insercija 33bp	
bCPR-4	4	A \Rightarrow C	Asn \Rightarrow His
	17	C \Rightarrow A	Ser \Rightarrow Tyr
	1480	A \Rightarrow G	Ser \Rightarrow Gly
	1683	G \Rightarrow A	tiha mutacija
	1839	G \Rightarrow A	tiha mutacija
	2012	delecija	premik bralnega okvirja

*Nukleotidno mesto se nanaša na zaporedje native bCPR (gi:78369373) in se začne s prvim ATG.

Najprimernejši plazmid za nadaljnje delo je bCPR-1. Vseboval je tri mutacije na N-terminalnem delu, ki so povzročile spremembo treh aminokislín, sicer pa je aminokislinsko zaporedje, ki je kodirano v vključku, povsem ohranjeno. Podobno je s pla-

zmidom bCPR-2, ki ima poleg mutacij na N-terminalnem delu še eno mutacijo, ki povzroči spremembo drugega His v Lys v histidinskem repku. Na sliki 5.7 je prikazana aminokislinska poravnava proteinov bCPR-1 in bCPR-2 z bCPR reduktazo (sekvenca, vzeta iz NCBI: gi:78369373).



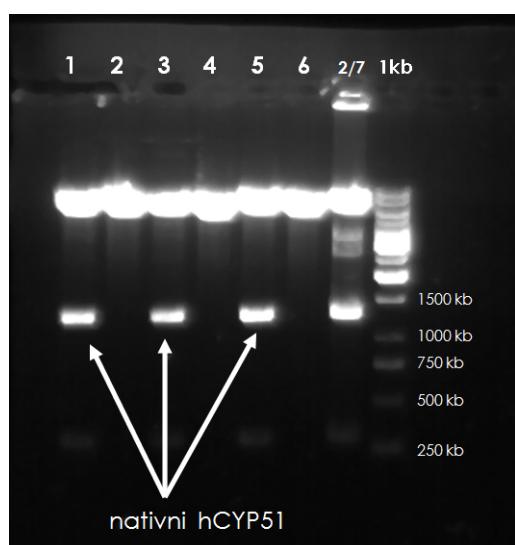
Slika 5.7: Poravnava aminokislinskega zaporedja proteinov bCPR-1, bCPR-2 in natiivne bCPR. Z modro so označene spremembe aminokislin, ki so posledice mutacij nukleotidnega zaporedja. bCPR-1 ima spremenjeno drugo in četrto aminokislino; bCPR-2 ima spremenjeno četrto aminokislino ter histidin v histidinskem repu.

bCPR-3 je vseboval 6 mutacij (1 tiha). Poleg mutacij na 5' delu je vseboval še mutacije na drugih mestih v nukleotidni verigi (mesta 29, 35, 36 in 691), ter 33 bp dolg vključek za bp 729.

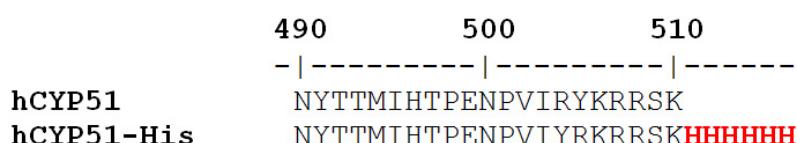
bCPR-4 je vseboval 6 mutacij (2 tihi mutaciji), med katerimi je bila tudi ena delecija nukleotida (2012 bp). Delecija je povzročila premik bralnega okvira.

5.4 PRIPRAVA PLAZMIDA pcDNA3.1-hCYP51-His

Za preverjanje stopnje fosforiliranosti hCYP51 smo pripravili ekspresijski vektor pcDNA3.1-GFP, ki je vseboval nativni hCYP51 s histidinskim repkom na C-terminalnem delu. Šest histidinov, ki predstavlja histidinski repek, omogoča izolacijo hCYP51 iz celičnih linij s pomočjo afinitetne kromatografije na Ni-koloni, poleg tega pa omogoča tudi detekcijo teh proteinov s pomočjo protiteles ANTI-His-tag. Uspešnost kloniranja smo preverili z restrikcijo (slika 5.8). Izmed šestih izoliranih plazmidov so insert s hCYP51-His vsebovali le trije. Preverjanje nukleotidnih zaporedij je pokazalo, da imajo ti plazmidi na C-terminalnem delu histidinski repek (slika 5.9).



Slika 5.8: Cepitev šestih ekspresijskih vektorjev pcDNA3.1 z restriktionskima encimoma *KpnI* in *XbaI*. Plazmidi **1**, **3** in **5** imajo insert hCYP51-His, medtem ko plazmidi **2**, **4** in **6** inserta nimajo; **2/7** - je pozitivna kontrola; **1 kb** - je 1 kb DNA-standard (O'geneRuler)



Slika 5.9: Aminokislinsko zaporedje C-terminalnega dela hCYP51 in hCYP51-His. Pred STOP-kodon (TGA) v hCYP51 smo vstavili 18 nukleotidov dolgo zaporedje CAT CAC CAT CAC CAT CAC, ki kodira 6 His.

5.5 IZRAŽANJE hCYP51-His v HepG2-CELIČNI LINIJI

Pred transfekcijo HepG2-celične linije s hCYP51-His smo uspešnost transfekcije preverjali s pomočjo GFP (vektorja pcDNA3.1-GFP in pEGFP-N1). Transfekcije z GFP-

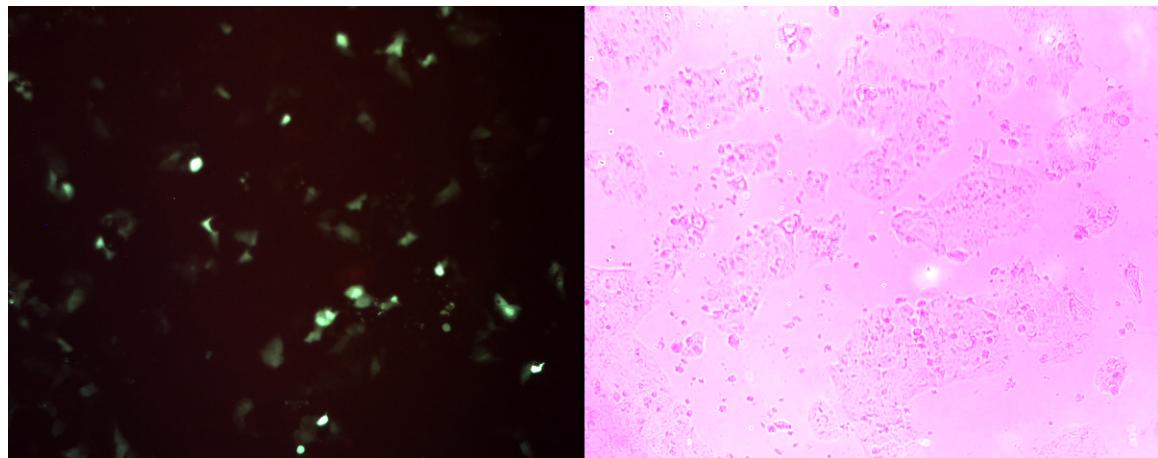
vektorjem smo izvedli s tremi transfekcijskimi reagenti (FuGene, Lipofectamine in CaCl_2) v ploščici z dvajstimi vdolbinicami in uspešnost preverili pod invertnim fluorescentnim mikroskopom. Rezultati transfekcije so prikazani na sliki 5.10. Izmed 11 transfekcij, ki smo jih izvedli, smo fluorescenco zaznali le v vdolbinici 3, 11 in 12 (slika 5.11). V vdolbinici 3 smo transfekcijo izvedli s CaCl_2 , v vdolbinicah 11 in 12 pa z Lipofectaminom. Za najuspešnejšo se je izkazala transfekcija s CaCl_2 , kjer je 10-30% celic izražalo GFP. V vseh primerih, ko smo fluorescenco zaznali, je bil uporabljen vektor pEGFP-N1.

Fluorescence nismo zaznali pri nobeni transfekciji s plazmidom pcDNA3.1-GFP (vdolbinice 1, 2, 5, 6, 9 in 10). Fluorescence tudi nismo zaznali, kadar smo kot reagent za transfekcijo uporabljali FuGene HD (5, 6, 7 in 8). Glede na rezultate smo se odločili, da za nadaljnje transfekcije kot transfekcijski reagent uprABLJAMO CaCl_2 .

	pcDNA3.1-GFP	pcDNA3.1-GFP	pEGFP-N1	pEGFP-N1 / kontrola
CaCl_2	1 	2 	3 	4
FuGene HD	5 	6 	7 	8
Lipofectamine	9 	10 	11 	12

Slika 5.10: Rezultat transfekcije HepG2-celične linije s tremi različnimi transfekcijskimi reagenti (CaCl_2 , FuGene HD in Lipofectamine) ter dvema različnima ekspresijskima plazmidoma z zapisom za GFP (pcDNA3.1-GFP [Cycle 3 GFP] in pEGFP-N1 [EGFP]). Transfekcija je bila uspešna (zelen krog) samo v treh primerih, vdolbine 3, 11 in 12.

Celične homogenate prehodnih in stabilnih transfekcij HepG2-celične linije s pcDNA3.1-hCYP51-His, ki jih je izvedel Matej Seliškar, smo analizirali na NaDS-PAGE-elektroforezi in prenosu po Westernu (slika 5.12). Količina hCYP51 v stabilnih (vzorec 1) kot tudi v prehodnih (vzorec 3) transfekcijah je enaka količini hCYP51 v oben kontrolah (vzorec 2 za stabilno, vzorec 4 za prehodno), kar pomeni, da protein hCYP51-His ne izraža oziroma je izražanje nizko. Prenos po Westernu smo zaznali še s protitelesi proti His-tagu, kjer nismo zaznali lise niti pri stabilni niti pri prehodni transfekciji.



Slika 5.11: Mikroskopski posnetek HepG2-celične linije z invertnim fluorescentnim mikroskopom po transfekciji s CaCl_2 . Levo – slika ob fluorescenci; desno – transmisija. Za celice so značilna zelo velika jedra. Zeleno obarvane celie so prejele plazmid, in sintetizirajo GFP.

Vzorec:



Slika 5.12: Prenos po Westernu homogenata prehodnih in stabilnih transfekcij HepG2 celičnih linij s plazmidom pcDNA3.1-hCYP51-His. Vzorec: **1** - stabilna transfekcija; **2** - kontrola stabilne transfekcije; **3** - prehodna transfekcija; **4** - kontrola prehodne transfekcije.

5.6 IMUNOPRECIPITACIJA

Vzorce, ki smo jih jemali med posameznimi koraki imunoprecipitacije, smo nanesli na NaDS-PAGE-elektroforezo in naredili prenos po Westernu, s čimer smo ocenili jakost vezave CYP51 na protitelo, spiranje iz njega ter uspešnost elucije. CYP51 se med spiranjem imunskih kompleksov z IP pufom ni eluiral, kar nakazuje na močno vezavo s protitelesom. V celoti pa se je eluiral, ko smo ga sprali z elucijskim pufom. (slika 5.13).



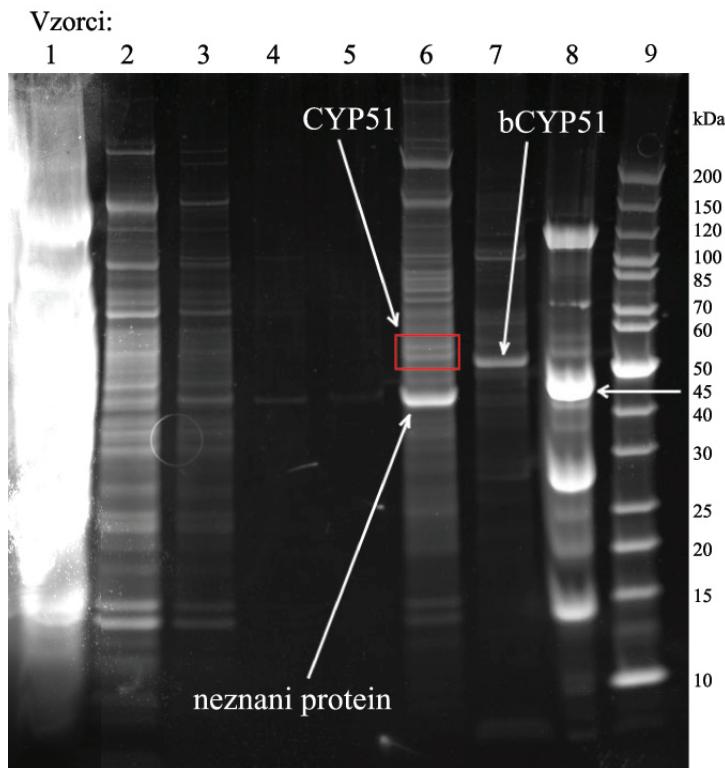
Slika 5.13: Analiza vzorcev po Westernu. Vzorec: **1** - homogenat jeter; **2** - homogenat po centrifugiranju; **3** - homogenat po odstranitvi imunokompleksov; **4–8** - spiranje **9–10** - elucija; **11** - kontrola (rekombinantni bCYP51)

Izvedli smo dve imunoprecipitaciji, ki sta se razlikovali v količini protiteles, vezanih na AminoLink-gel. V prvem primeru smo na gel vezali $100 \mu\text{g}$ protiteles, v drugem primeru pa $500 \mu\text{g}$.

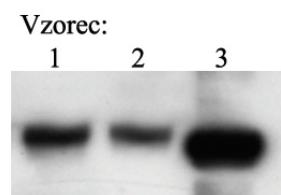
NaDS-PAGE-gele smo barvali s barvilo SYPRO-Ruby. Čeprav smo eluat prve imunoprecipitacije skoncentrirali in ga v celoti nanesli na NaDS-PAGE gel, na njem nismo zasledili lise v višini CYP51 (glede na pozitivno kontrolo). CYP51 je bil v eluatu kljub temu prisoten, saj smo ga dokazali z detekcijo na Westernu.

Ko smo s SYPRO-Ruby barvali gel druge imunoprecipitacije, smo pri prvem eluatu zasledili močno liso, ki pa ne pripada proteinu CYP51 (53 kDa), saj velikost tega proteina znaša približno 45 kDa. Poleg tega višina lise proteina ni skladna z višino lise pri pozitivni kontroli (bCYP51) (slika 5.14). Western analize (slika 5.15) istega gela so pokazale, da je v eluatu prisoten tudi CYP51, vendar je njegova količina v primerjavi z neznanim proteinom veliko nižja. Na sliki 5.14 lahko CYP51 zasledimo kot šibko liso v višini pozitivne kontrole.

Iz slike 5.14 je videti, da se večina nespecifično vezanih proteinov s kolone za imunoprecipitacijo spere po prvem spiranju (vzorec 1). Kljub 6-kratnemu spiranju se ob eluciji ne eluirajo CYP51, ampak tudi nekateri drugi proteini, ki imajo najverjetnejše veliko afiniteto do samega nosilca za vezavo protiteles. O tem lahko sklepamo iz analize po Westernu, kjer teh proteinov s CYP51 protitelesi ne zaznamo (vzorec 5).



Slika 5.14: NaDS-PAGE-gel, pobarvan s SYPRO-Ruby-barvilkom. Vzorec: **1** - homogenat; **2-5** - spiranje; **6** - prva elucija; **7** - kontrola (bCYP51); **8** - proteinski standard; **9** - proteinski standard

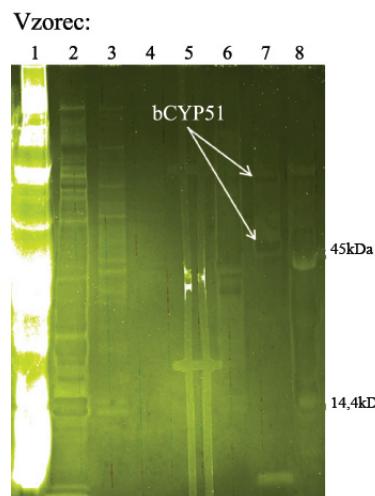


Slika 5.15: Western-analiza NaDS-PAGE-gela druge imunoprecipitacije. Dokazali smo, da je CYP51 v eluatu prisoten, čeprav, da se na gelu, pobarvanem s SYPRO-Ruby ne vidi. Ker je količina proteina, vezanega na protitelesa v gelu, večja kot pri prvi imunoprecipitaciji, se ves CYP51 ne spere s prvo elucijo. Po jakosti lise se vidi, da je količina CYP51 v prvi eluciji večja kot drugi. Vzorec: **1** - prva elucija; **2** - druga elucija; **3** - pozitivna kontrola (bCYP51).

5.7 STANJE FOSFORILIRANOSTI CYP51

Za študije fosforiliranosti smo uporabili protein CYP51, izoliran z imunoprecipitacijo iz jeter miši. Vzorce, ki smo jih jemali med imunoprecipitacijo, smo po prenosu na PVDF-membrano inkubirali z monoklonskimi protitelesi proti fosfo-tirozinu (Phospho-Tyrosine Mouse mAb (P-Tyr-100) – Cell Signaling Technology). Protitelesa se vežejo na fosforiliran tirozin in nimajo navzkrižne reaktivnosti s fosfo-serinom ali fosfo-treoninom. Signal smo dobili zgolj pri homogenatu tkiva, medtem ko ga pri eluatu, v katerem je CYP51, ni bilo.

NaDS-PAGE-gel z vzorci iz imunoprecipitacije smo barvali z barvilm Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain, ki obarva fosforilirane proteine (slika 5.16). Fosforilirani proteini se vidijo kot svetle lise (vzorec 1) in jih najdemo zgolj v tkivnem homogenatu po centrifugiraju.



Slika 5.16: Barvanje NaDS-PAGE-gela z barvilm za fosforilirane proteine Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain (Invitrogen). Vzorec: **1** - homogenat celic po centrifugiraju; **2** - homogenat po odstranitvi imunokompleksov; **3–5** - spiranje; **6** - eluat s CYP51; **7** - kontrola (rekombinantni bCYP51); **8** - fosforilirani proteinski standard; **9** - proteinski standard (20–200kDa)

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

6.1 MUTAGENEZA N-TERMINALNEGA DELA ČLOVEŠKEGA CYP51

Človeškemu proteinu CYP51 s skrajšanim N-terminalnim delom smo želeli povečati topnost in izražanje v *E. coli* s spremembo treh aminokislin na N-terminalnem delu proteina. Spremembe smo izvedli z mestno specifično mutagenezo s pomočjo PCR. Izražanje topnega in pravilno zvitega proteina v heterolognem sistemu bi omogočila poskus kristalizacije ter določitev strukture z rentgensko difrakcijo. Edina do zdaj znana struktura encima iz družine CYP51 je encim *Mycobacterium tuberculosis*. Določitev terciarne strukture sesalskega proteina CYP51 bi omogočila podrobnejši študij strukture, ta pa bi pripomogla k načrtovanju inhibitorjev, specifičnih za glivno izoformo encima. Predvidevali smo, da bi sprememba N-terminalnega dela hCYP51 na enak način, kot je bil spremenjen N-terminalni del bCYP51, povzročila povečano izražanje topnega proteina in posledično tudi izražanje hCYP51 v *E. coli*. Vendar spremembe, ki smo jih uvedli, izražanja niso povečale, temveč se je le-to znižalo (slika 5.4). Ne-modificirani hCYP51-1b se v *E. coli* izraža v agregirani obliki, kar smo dokazali z gelsko filtracijo. Zaradi aggregatov se poveča hitrost razgradnje proteina in s tem zniža izražanje. bCYP51 z modificirano N-terminalno regijo, katerega izražanje znaša 455 nmol/L, v *E. coli* ne tvori aggregatov. Rezultati tako nakazujejo, da povečanega izražanje hCYP51 v *E. coli* ni moč doseči zgolj s spremembami v N-terminalni regiji proteina, temveč je pomemben tudi preostali del polipeptidne verige. hCYP51 in bCYP51 se razlikujeta v 15 drugih aminokislinah (slika 5.3), ki bi lahko bile vzrok za nižje izražanje.

6.2 KLONIRANJE bCPR V EKSPRESIJSKI VEKTOR pET17b

Redoks partner CYP51 v reakciji demetilacije lanosterola in dihidrolanosterola pri živalih je NADPH:citokrom-P450-reduktaza. Malo je znanega o vplivu substrata oz. inhibitorjev na jakost interakcije lanosterol 14α -demetilaze in citokrom P450-reduktaze. Kloniranje bCPR v ekspresijski vektor bi tako omogočilo študij interakcije bCPR z bCYP51 ter določitev vpliva vezave ligandov na interakcijo.

Izmed štirih vektorjev, ki smo jih izolirali, sta za nadaljnje delo primerna bCPR-1 in bCPR-2.

Plazmid bCPR-3 ima 729 bp pravilnega zaporedja, ki mu sledi 33 bp dolgo nepoznano zaporedje, nato pa se do konca nadaljuje pravilno. 33 bp dolgo zaporedje kodira peptid – PQLHPGSPPSS. Bralni okvir se s tem proteinu bCPR ne poruši, vendar se

sintetizira protein, daljši za 11 aminokislin. Insert 11 aminokislin verjetno spremeni terciarno strukturo encima, ki ima lahko za posledico spremembo v aktivnosti ali interakciji s preostalimi proteini.

Plazmid bCPR-4 ima zaradi delecije 2012 bp zamaknjen bralni okvir. Posledica je sprememba C-terminalnega dela proteina. Poleg spremembe zadnjih 10 aminokislin se proteinu doda še novih 30 aminokislin. Aminokislinsko zaporedje novega C-terminalnega dela je RAATPWYGAITITIESTSPVSWNSADIHHTGGRSSRSGC-Stop. Tudi če sprememba C-terminalnega dela ne bi vplivala na aktivnost bCPR, za nadaljne raziskave protein ni primeren, saj ne vsebuje C-terminalnega histidinskega repka.

Histidinski repek smo na C-terminalni del dodali za lažjo izolacijo bCPR iz heterolognih sistemov. Proteine, ki vsebujejo His tag (ali na C- ali na N-terminalnem delu), lahko izoliramo iz homogenata s pomočjo ionske afinitetne kromatografije. Histidin v His-repku se z visoko afiniteto veže z Ni^{2+} -ionom, vezanim na sefarozo. Protein eluiramo s elucijskim pufrom, ki vsebuje veliko količino imidazola.

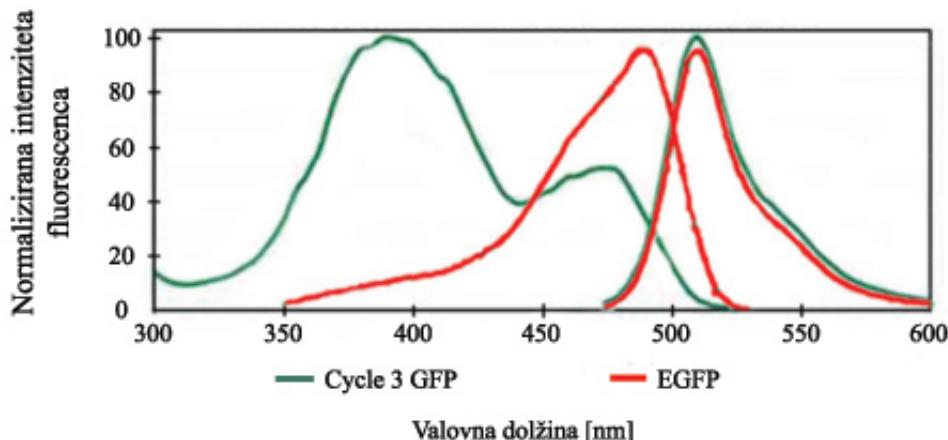
6.3 STOPNJA FOSFORILIRANOSTI CYP51

Hitrost biosinteze holesterola je uravnavana preko encima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaze (HMGR), ki nastopa v zgodnji fazi biosinteze in pretvarja 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA v mevalonat. HMGR je med drugim uravnovan tudi s fosforilacijo serina na mestu 872 z AMP-aktivirano protein kinazo (AMPK), ki njegovo aktivnost zmanjša (Nelson 2004 [Nelson and Cox, 2004]). Podobno je regulirana tudi 7α -hidroksilaza (CYP7A1), katere aktivnost se s fosforilacijo zviša. Udeležena je v biosintezi žolčnih kislin, s čimer sodeluje pri uravnavanju količine holesterola v telesu. Stroup in Ramsaran sta na očiščenem proteinu pokazala, da je le-ta substrat za AMPK (Stroup in Ramsaran 2005 [Stroup and Ramsaran, 2005]). Kot sem omenil že prej, so Sonoda in sodelavci pokazali, da je aktivnost CYP51 uravnavana preko fosforilacije, vendar za to ni nedvoumnih in neposrednih dokazov. Primerjali so lanosterol 14α -demetilazno aktivnost mikrosomalnih frakcij iz podganjih jeter, ki so vsebovale CYP51. Aktivnost je bila višja v primeru defosforilacije proteinov s fosfatazo. Njihovi rezultati nakazujejo, da je aktivnost CYP51 zmanjšana s fosforilacijo (Sonoda in sod. 1995 [Sonoda *et al.*, 1995]).

To hipotezo smo nameravali preveriti s pomočjo prekemernega izražanja CYP51 s histidinskim repkom v človeški nesmrtni celični liniji HepG2. Na podlagi raziskav So-

node in sod. smo predvidevali, da bi zaradi prekomernega izražanja v celicah večina CYP51 bila v fosforilirani obliki (neaktivna).

Uspešnost transfekcije HepG2-celične linije smo v prvi stopnji preverjali s pomočjo transfekcije z GFP-proteinom. Transfekcija s GFP-proteinom omogoča enostavno zaznavo uspešnosti transfekcije, saj celice, ki so plazmid z GFP sprejele, fluorescirajo. Na ta način lahko pod invertnim fluorescentnim mikroskopom določimo uspešnost transfekcije (razmerje med fluorescirajočimi celicami in vsemi celicami). GFP-proteina, ki smo ju uporabili v naših transfekcijah, sta bila EGFP in Cycle 3 GFP. Oba imata enak emisijski maksimum z vrhom pri 507 nm, medtem ko se ekscitacijska maksimuma razlikujeta. Cycle 3 GFP ima dva ekscitacijska maksimuma. Primarni je pri 395 nm, sekundarni pri 478 nm. EGFP ima samo en ekscitacijski maksimum pri 488 nm (slika 6.1). Prav razlika v primarnih ekscitacijskih maksimumih je verjetno vzrok, za to da pri poskusih nikoli nismo zasledili fluorescence pri celicah, transformiranih s Cycle 3 GFP. Invertni mikroskop, ki smo ga uporabljali, ima filter, ki ne prepušča valovnih dolžin, potrebnih za ekscitacijo primarnega ekscitacijskega vrha Cycle 3 GFP, prepušča pa valovne dolžine, potrebne za ekscitacijo EGFP.



Slika 6.1: Prikaz emisijskih in ekscitacijskih maksimumov Cycle 3 GFP in EGFP. Vrhovi se nahajajo pri 395 nm, 488 nm, in 507 nm.

Žal je bila količina izraženega proteina hCYP51-His premajhna, da bi lahko naredili nadaljnje raziskave stopnje fosforiliranosti. Pri pripravi trajnih celičnih linij se insert, ki ga želimo vnesti, vgradi na različna mesta v celično DNA. Če se insert vgradi v področje, kjer ne poteka prepisovanje iz DNA (heterokromatin), se tudi naš insert ne bo prepisoval oziroma se bo prepisoval v zelo majhni meri. Če pa se insert vgradi v evkromatin, kjer poteka aktivna transkripcija, lahko pričakujemo velike količine našega produkta.

Vzrok, za to da nismo zaznali prekomernega izražanja hCYP51-His, je lahko, da je večina celic plazmid vgradila v neaktivno območje DNA. V nadaljnjih poskusih bi tako morali selekcionirati tiste klone (stabilno transformiranih celic), ki izražajo veliko količino proteina. Ker selekcioniranje zahteva veliko časa, tega ni bilo moč izvesti v okviru diplomske naloge. Sočasno smo tudi potrdili primernost peptidnega anti-CYP51-protitelesa za imunoprecipitacijo.

6.3.0.2 IMUNOPRECIPITACIJA

Odločili smo se, da bomo fosforilirani CYP51 poskusili dokazati s pomočjo imunoprecipitacije. Prednost tega načina v primerjavi z določanjem fosforilacije pri prekomernem izražanju CYP51-His v HepG2 so fiziološki pogoji, vendar je analiza težavnejša zaradi manjše količine proteina in nepredvidljive uspešnosti imunoprecipitacije s protitelesom.

Peptidna protitelesa ANTI-CYP51 so se izkazala za uspešna. Western-analiza vzorcev je pokazala, da se CYP51 med spiranjem imunskih kompleksov ne eluira skupaj s preostalimi proteini. To nakazuje na močno in specifično vezavo CYP51 s protitelesi in omogoča, da proces spiranja nadaljujemo, dokler ne izperemo večine drugih proteinov. V prvi imunoprecipitaciji smo na AminoLink Gel vezali le majhno količino protiteles anti-CYP51 ($100 \mu\text{g}$). Ta količina ni bila zadostna, da bi izolirali količino CYP51, ki bi bila vidna na gelu, pobaranem s SYPRO-Ruby. Zaradi tega smo količino protiteles pri drugi imunoprecipitaciji povečali ($500 \mu\text{g}$). Količina izoliranega CYP51 se ni bistveno povečala, vendar se je na gelu,obarvanem z barvilm SYPRO-Ruby, poznala šibka lisa, ki ustreza velikosti protena CYP51 (slika 5.14).

Eluiral se je tudi neznan protein, velik približno 45 kDa, katerega koncentracija je bila precej višja od CYP51 (Slika 5.14). Ker se enaka lisa ne pojavi pri analizi Western, lahko izključimo navzkrižno reaktivnost protiteles anti-CYP51 s tem proteinom. Predvidevamo, da neznan protein interagira z AminoLink gelom. Poleg razlike v količini vezanih anti-CYP51 protiteles smo pri drugi imunoprecipitaciji uporabili tudi večjo količino AminoLink gela ($400 \mu\text{l}$, prva $100 \mu\text{l}$), kar bi lahko pojasnilo, zakaj se je povečala tudi količina neznanega proteina. Identitetu neznanega proteina bomo ugotovili s pomočjo masne spektrometrije.

Na izoliranem CYP51 smo izvedli Western-analizo z monoklonskimi protitelesi proti fosforiliranemu tirozinu (Phospho-Tyrosine Mouse mAb). Glede na to, da je bila ko-

ličina izoliranega proteina verjetno precej majhna, ne moremo z gotovostjo trditi, da CYP51 ni fosforiliran na tirozinu. Delež fosforiliranega proteina, prisotnega v vzocu, je lahko tako majhen, da je pod mejo zaznave metode.

Fosforiliranost CYP51 smo preverili tudi z barvilm Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain, ki obarva proteine, fosforilirane na serinu, treoninu in tirozinu. Do zdaj nismo uspeli potrditi fosforiliranosti CYP51. Vzrok za to je nizka koncentracija proteina CYP51 v vzorcu pa tudi majhen delež fosforiliranih proteinov. Zelo šibek signal smo dobili tudi pri pozitivni kontroli (fosforiliran proteinski standard), katere koncentracija je $0,5 \mu\text{g}$. Za šibek signal je morda kriv tudi način detekcije. Za optimalno detekcijo je potrebna ekstamacija pri 555 nm ter pri emisiji 580 nm . Mi smo uporabljali valovne dolžine čim bliže teh, in sicer ekscitacijo pri 535 nm in emisijo pri 630nm .

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili, ne moremo sklepati ali je protein CYP51 fosforiliran ali ne. Potrebna bo optimizacija metod. Prav tako načrtujemo tretiranje v *E. coli* izraženega in očiščenega CYP51 z različnimi kinazami, kot so AMP-aktivirana kinaza, protein kinaza A ter protein kinaza C. Če katera izmed kinaz fosforilirala protein, bi z masno spektrometrijo ugotovili lokacijo fosforilirane aminokisline ter seveda preverili, če fosforilacija vpliva na aktivnost proteina. Čas, namenjen izdelavi diplomske naloge, pa je za dokončanje vseh eksperimentov žal prekratek.

6.4 SKLEPI

1. Modifikacija N-terminalnega dela hCYP51 ni privedla do povečanega izražanja topne oblike proteina v *E. coli*.
2. Topnost in izražanje hCYP51 nista odvisna zgolj od N-terminalnega dela, ampak tudi od preostalega dela polipeptidne verige.
3. Izražanje hCYP51-His v HepG2-celični liniji je premajhna za nadaljnje raziskave fosforilacije in bi zahtevala selekcijo klonov z visoko izraženim hCYP51-His.
4. Peptidna protitelesa ANTI-CYP51 so primerna za uporabo v imunoprecipitaciji CYP51 iz tkiv.
5. Fosforiliranost proteina CYP51 zaradi izolacije majhnih količin proteina in potrebne optimizacije metod še vedno ni razjasnjena.

7 POVZETEK

Lanosterol 14α -demetilaza (CYP51) je encim naddružine citokromov P450, ki sodeluje v poskvalenskem delu biosinteze holesterola pri živalih, sitosterola pri rastlinah in ergosterola pri glivah. Reakcija, ki jo katalizira, je oksidativna odstranitev 14α -metilne skupine lanosterola, 24,25-dihidrolanosterola ali obtusifoliola. Donor elektronov encimu CYP51 v reakciji demetilacije je NADPH:citokrom-P450-reduktaza. CYP51 je izražen v membrani ER vseh sesalskih tkiv. Največ ga je prisotnega v testisih, ovarijsih, nadledvični žlezi, prostatni, ledvicah, jetrih in pljučih.

Edina do danes znana je kristalna struktura proteina CYP51 iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Razrešitev kristalne strukture sesalskega CYP51 bi pripomogla k lažjemu molekulskemu modeliranju preostalih CYP51 v sesalcih in evkariontih, saj je podobnost aminokislinskega zaporedja CYP51 med različnimi sesalskimi vrstami velika. Poleg tega bi znana struktura pripomogla k uspešnejšemu načrtovanju inhibitorjev, specifičnih za glivno izoformo encima, ki so široko uporabljana azolna protiglivna zdravila, kot je npr. fluconazol. Zaradi ključne vloge pri biosintezi holesterola je CYP51 tudi mogoča tarča za hipolipemike.

Raziskave uravnavanja izražanja gena CYP51 so pomembne zaradi njegove vloge pri biosintezi holesterola in zorenju spolnih celic. Promotorska regija CYP51 je zelo ohranjena. Mesta in zaporedja glavnih regulatornih elementov v promotorju so skoraj identična v vseh do zdaj raziskanih sesalskih vrstah. Primarno je prepisovanje gena CYP51 v somatskih celicah uravnavano preko od SRE-vezavnih proteinov odvisne poti. Predvideva se, da na aktivnost proteina CYP51 vpliva tudi fosforilacija in defosforilacija, kar pa do zdaj ni neposredno dokazano.

Cilj diplomske naloge je bil pripraviti ekspresijski plazmid človeškega CYP51, ki bi omogočal visoko stopnjo izražanja v *E. coli*, ter preveriti stopnjo fosforiliranosti CYP51 v HepG2 celični liniji oziroma jetrnemu tkivu. Ekspresijski plazmid bi omogočal namnožitev in izolacijo zadostne količine hCYP51 za kristalizacijo ter nadaljnjo rentgensko difrakcijo. Stopnja fosforiliranosti CYP51 pa bi pokazalam ali je aktivnost encima v tkivu regulirana s fosforilacijo/defosforilacijo, podobno kot pri hitrost dočajočem encimu sinteze holesterola HGM-CoA reduktaza.

S pomočjo mestno specifične mutageneze s PCR smo v N-terminalnem delu človeškega gena CYP51 (brez transmembranske regije) spremenili aminokislini sedem (Ala \Rightarrow Val), enajst (Val \Rightarrow Ala) in dvanaejst (Gln \Rightarrow Pro) ter za dvanaejsto aminokislino

dodali še en Pro. Spremembe, ki smo jih uvedli, so povzročile, da je hCYP51 imel enako aminokislinsko zaporednje N-terminalnega dela kot bCYP51, katerega izražanje v *E. coli* znaša preko 455 nmol/L. Mutacije niso povečale izražanja hCYP51 v *E. coli*, temveč se je ta glede na nemutirani plazmid celo znižala. Skladno s temi rezultati predvidevamo, da na povečano topnost in izražanje hCYP51 nimajo vpliva zgolj aminokisline N-terminalnega dela, ampak tudi druge aminokisline v notranjosti polipeptidne verige.

Transfekcijo HepG2-celične linije smo izvedli s tremi različnimi transfekcijskimi reagenti (CaCl₂, FuGene HD in Lipofectamine). Uspešnost transfekcije smo najprej preverili s transfekcijo HepG2-celic z dvema različnima GFP-proteinoma (Cycle 3 GFP in EGFP), saj se da uspešnost enostavno preveriti pod invertnim fluorescentnim mikroskopom. Najuspešnejša je transfekcija s CaCl₂, ki smo jo uporabili tudi za transfekcijo HepG2-celic z ekspresijskim plazmidom pcDNA3.1-hCYP51-His. Pripravili smo homogenat stabilnih in prehodnih transfekcij HepG2-celic in količino hCYP51-His preverili na NaDS-PAGE-gelu ter prenosu po Westernu. Ugotovili smo, da je izražanje hCYP51 v transformiranih celicah izredno majhno oziračoma ga sploh ni, saj po Western analizi ni bilo razlike med kontrolo in homogenatom transformiranih celic. Vzrok za nizko izražanje hCYP51-His v trajno transformiranih celicah je lahko posledica vključitve plazmida pcDNA3.1 v predel genomske DNA, kjer ne poteka izražanje genov (heterokromatin). Selekacija klona, ki izraža hCYP51-His, v zadostni količini presega čas, namenjen diplomskemu delu.

Stopnjo fosforiliranosti proteina CYP51 smo želeli preveriti tudi v jetrnem tkivu miši, s čimer bi zagotovili optimalne fiziološke pogoje. Jetrno tkivo smo homogenizirali v pufru, ki je vseboval inhibitorje fosfataz, ki preprečijo odstranitev fosfatnih skupin fosforiliranih aminokislin. Imunoprecipitacijo smo izvedli s pomočjo peptidnih protiteles ANTI-CYP51 po navodilih Seize Primary Mammalian Immunoprecipitation Kita. Homogenat tkiva smo inkubirali skupaj s AminoLink gelom z vezanimi protitelesi anti-CYP51, kar je omogočilo tvorbo imunskih kompleksov. Po večkratnem spiranju smo CYP51 eluirali z elucijskim pufrom. Količina protiteles, izoliranih z imunoprecipitacijo, žal ni bila dovolj velika, da bi omogočila natančno raziskavo fosforiliranosti CYP51. Fosforilacijo smo poskušali dokazati s pomočjo fosfo-tirozin specifičnih protiteles, in barvila, ki obarva fosforilirane proteine. Na podlagi, ki smo jih dobili, ne moremo sklepati ali je protein CYP51 fosforiliran ali ne. Za rešitev problema bo potrebna nadaljnja optimizacija metod.

8 LITERATURA

- [Aguiar *et al.*, 2005] Aguiar M., Masse R. and Gibbs B. 2005, Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metabolism Reviews*, 37: 379–404.
- [Arase *et al.*, 2006] Arase M., Waterman M. and Kagawa N. 2006, Purification and characterization of bovine steroid 21-hydroxylase (P450c21) efficiently expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344: 400–405.
- [Ausubel *et al.*, 1991] Ausubel F., Brent R., Kingstone R., Moore D., Seidman J., Smith J. and Struhl K. 1991, Current protocols in molecular biology. United States of America, Greene Publishing Associates and Wiley interscience: Unit 16, 36–39 .
- [Axelrod, 1954] Axelrod J. 1954, The enzymatic deamination of amphetamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 114: 430–438.
- [Cheesman *et al.*, 2003] Cheesman M., Baer B., Zheng Y., Gillam E. and Rettie A. 2003, Rabbit CYP4B1 engineered for high-level expression in *Escherichia coli*: ligand stabilization and processing of the N-terminus and heme prosthetic group. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416: 17–24.
- [Coleman, 2006] Coleman M. 2006, Human drug metabolism: an introduction. England, John Willey and Sons: 36–39 str.
- [Debeljak *et al.*, 2002] Debeljak N., Fink M. and Rozman D. 2002, Many facets of mammalian lanosterol 14α -demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409: 159–171.
- [Debeljak *et al.*, 2000] Debeljak N., Horvat S., Vouk K., Lee M. and Rozman D. 2000, Characterization of the mouse lanosterol 14α -demethylase (CYP51), a new member of the evolutionarily most conserved cytochrome P450 family. *Archives of biochemistry and biophysics*, 379: 37–45.
- [Estabrook, 2003] Estabrook R. 2003, A passion for P450s (remembrance of the early history of research on cytochrome P450). *Drug metabolism and disposition*, 31: 1461–1473.

- [Fisher *et al.*, 1992] Fisher C., Shet M.S., Caudle D.L., Martin-Wixstrom C.A. and Estabrook R.W. 1992, High-level expression in Escherichia coli of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89.
- [Gillam, 1998] Gillam E. 1998, Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 25: 877–886.
- [Gonzales, 2005] Gonzales F. 2005, Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research*, 569: 101–110.
- [Gustafsson *et al.*, 2004] Gustafsson C., Govindarajan S. and Minshull J. 2004, Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22: 346–353.
- [Halder *et al.*, 2002] Halder S., Fink M., Waterman M. and Rozman D. 2002, A cAMP-responsive element binding site is essential for sterol regulation of the human lanosterol 14alpha-demethylase gene (CYP51). *Molecular endocrinology*, 16: 1853–1863.
- [Hanna *et al.*, 1999] Hanna I., Reed J., Guengerich F. and Hollenberg P. 1999, Expression of human cytochrome P450 2B6 in Escherichia coli: characterization of catalytic activity and expression levels in human liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376: 206–216.
- [Johnson and Stout, 2005] Johnson E. and Stout C. 2005, Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases. *Biochemical and biophysical research communications*, 338: 331–336.
- [Kagawa *et al.*, 2002] Kagawa N., Cao Q. and Kusano K. 2002, Expression of human aromatase (CYP19) in Escherichia coli by N-terminal replacement and induction of cold stress response. *Steroids*, 68: 205–209.
- [Klingenberg, 1958] Klingenberg M. 1958, Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75: 376–386.
- [Lodish, 2004] Lodish H. 2004, Molecular cell biology 5th edition. W.H. Freeman and Company, New York: 85–86 str.
- [Mason, 2004] Mason I. 2004, Genetics of steroid biosynthesis and function. London, Routledge, Chapter 2; Sterol Biosynthesis.

- [Meyers, 1996] Meyers R. 1996, Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine. Weinheim, USA: 435–440 str.
- [Millipore, 2002] Millipore 2002, Montage DNA Gel Extraction Kit.
- [Murray, 2003] Murray R. 2003, Harper's illustrated biochemistry 26th edition. New York, McGraw-Hill, str. 87.
- [Nebert and Russell, 2002] Nebert D. and Russell D. 2002, Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360: 1155–1162.
- [Nelson, 2007] Nelson D. 2007, <http://drnelson.utmem.edu>.
- [Nelson and Cox, 2004] Nelson D. and Cox M. 2004, Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition. United States of America, W.H. Freeman and Co: Chapter 21.
- [Nelson *et al.*, 1996] Nelson D., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J., Feyereisen R., Waxman D., Waterman M., Gotoh O., Coon M., Estabrook R., Gunsalus I. and Nebert D. 1996, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1–42.
- [Novagen, 2006] Novagen 2006, pET system manual, 11th edition.
- [Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2005] Oesch-Bartlomowicz B. and Oesch F. 2005, Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme. *Biochemical and biophysical research communications*, 338: 446–449.
- [Omura, 1999] Omura T. 1999, Forty years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266: 690–698.
- [Omura *et al.*, 1993] Omura T., Ishimura Y. and Fujii-Kuriyama Y. 1993, Cytochrome P450 2nd edition. Kodansha Ltd., Japan: 6–7 str., 6–7 .
- [Omura and Sato, 1962] Omura T. and Sato R. 1962, A New Cytochrome in Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 237: 1375–1376.
- [Omura and Sato, 1964] Omura T. and Sato R. 1964, The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239: 2370–2378.

- [Podust *et al.*, 2001] Podust L., Poulos T. and Waterman M. 2001, Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 3068–3073.
- [Porter and Coon, 1999] Porter T. and Coon M. 1999, Cytochrome P-450. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 13469–13472.
- [Pritchard *et al.*, 1997] Pritchard M., Ossetian R., Li D., Henderson C., Burchell B., Wolf C. and Friedberg T. 1997, A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in *Escherichia coli* using bacterial signal peptides: expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 345: 342–354.
- [QIAGEN, 2005] QIAGEN 2005, QIAprep Miniprep Handbook 2nd edition.
- [Režen *et al.*, 2004] Režen T., Debeljak N., Kordiš D. and Rozman D. 2004, New Aspects on Lanosterol 14 α -Demethylase and Cytochrome P450 Evolution: Lanosterol/Cycloartenol Diversification and Lateral Transfer. *Journal of Molecular Evolution*, 59: 51–58.
- [Rozman *et al.*, 1996] Rozman D., Stromstedt M. and Waterman M. 1996, The three human cytochrome P450 lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51) genes reside on chromosomes 3, 7, and 13: structure of the two retrotransposed pseudogenes, association with a line-1 element, and evolution of the human CYP51 family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 333: 466–474.
- [Ryan and Engel, 1956] Ryan K.J. and Engel L.L. 1956, Hydroxylation of steroids at carbon 21. *The Journal of Biological Chemistry*, 225: 103–114.
- [Sonoda *et al.*, 1995] Sonoda Y., Amano C., Endo M., Sato Y., Sekigawa Y. and Fukuhara M. 1995, Lanosterol 14 alpha-demethylase (cytochrome P-45014DM): modulation of its enzyme activity by cholesterol feeding. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 18: 1009–1011.
- [Stratagene, 2004] Stratagene 2004, QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit.
- [Stromstedt *et al.*, 1996] Stromstedt M., Rozman D. and Waterman M. 1996, The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 329: 73–81.

- [Stroup and Ramsaran, 2005] Stroup D. and Ramsaran J. 2005, Cholesterol 7a-hydroxylase is phosphorylated at multiple amino acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 957–965.
- [Tacer *et al.*, 2003] Tacer K.F., Kalanj-Bognar S., Waterman M. and Rozman D. 2003, Lanosterol metabolism and sterol regulatory element binding protein (SREBP) expression in male germ cell maturation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85: 429–438.
- [Vance and den Bosch, 2000] Vance D. and den Bosch H.V. 2000, Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529: 1–8.
- [Waterman, 1994] Waterman M. 1994, Heterologous expression of mammalian P450 enzymes. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 68: 37–66.
- [Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000] Werck-Reichhart D. and Feyereisen R. 2000, Cytochrome P450: a success story. *Genome Biology*, 1: 3003.1–3003.7.
- [Williams *et al.*, 2000] Williams P., Cosme J., Sridhar V., Johnson E. and McRee D. 2000, Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase Structural Adaptations for Membrane Binding and Functional Diversity. *Molecular Cell*, 5: 121–131.
- [Wu *et al.*, 2005] Wu Z., Bartleson C.J., Ham A.L. and Guengerich F.P. 2005, Heterologous expression, purification, and properties of human cytochrome P450 27C1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445: 138–146.
- [Yan *et al.*, 1998] Yan J., Packer N., Gooley A. and Williams K. 1998, Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *Journal of chromatography*, 808: 23–41.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Damjani Rozman, da me je sprejela v svojo raziskovalno skupino ter za vso pomoč, nasvete in razumevanje tekom nastajanja diplomske naloge.

Hvala Mateju Seliškarju, mojemu delovnemu mentorju, za odgovore na nešteta vprašanja ter za vse nasvete in pomoč, ki mi jo je nudil, tekom eksperimentalnega dela in pisanja diplomske naloge.

Hvala članoma komisije prof. dr. Gregorju Anderluhu in prof. dr. Kristini Sepčič za hiter in natančen pregled diplomske naloge ter dane nasvete.

Hvala vsem iz Inštituta za biokemijo na Medicinski fakulteti, za strokovna pojasnila in pomoč, ter za prijetne ure sproščajočega druženja.

Hvala Mateju Jazbinšku za lektoriranje diplomskega dela.

Za vso razumevanje in brezmejno podporo v vseh preteklih letih bi se še posebej rad zahvalil mami in očetu.