

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



**Studium složení a organizace enzymového  
systému cytochromu P450 technikou  
kovalentního síťování**

**Study of the composition and organization of  
cytochrome P450 system by covalent crosslinking**

Diplomová práce

Bc. Monika Koberová

Školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne .....

.....  
Bc. Monika Koberová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracovávání této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Ječmenovi za spolupráci při přípravě foto-cytochromu  $b_5$  a provedené hmotnostní analýzy. Také chci poděkovat RNDr. Věře Černé, Ph.D. a RNDr. Michaele Moserové, Ph.D. za objasnění metodických postupů a poskytnuté rady. A také Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za konzultace a pomoc při sestavování postupu izolace CYP2B4.

Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Poděkování patří také Prof. Lucy Waskell za poskytnutý plazmid pLW01-2B4 pro expresi cytochromu P450 2B4.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (305/09/H008, P207/12/0627, P301/10/0356 a 303/09/0472).

## Abstrakt

Systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém) se významnou rolí podílí na metabolismu endogenních sloučenin i xenobiotik. Tento systém obsahuje cytochrom P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasu a také jsou k němu přiřazovány NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa a cytochrom  $b_5$ . Bylo prokázáno, že cytochrom  $b_5$  může stimulovat nebo inhibovat reakce katalyzované cytochromy P450, a dokonce může měnit poměr vzniklých metabolitů. Mechanismus působení cytochromu  $b_5$  nebyl dosud zcela objasněn. Zjištění protein-proteinových interakcí v MFO systému a určení topologie tohoto systému by mohlo pomoci k objasnění mechanismu působení cytochromu  $b_5$ . Vhodnou metodou pro identifikaci protein-proteinových interakcí uvnitř membrány je technika kovalentního síťování. Cytochrom  $b_5$  obsahuje 3 methioniny, z čehož jsou 2 lokalizovány v C-terminální membránové kotvě. Po záměně těchto dvou methioninů za fotoaktivovatelný analog methioninu (foto-methionin) a následné fotoaktivaci lze určit interakce s cytochromem P450 v membránovém prostředí.

Tato práce se zabývá expresí a izolací foto-cytochromu  $b_5$  (foto-cyt  $b_5$ ), analogu cytochromu  $b_5$  s inkorporovaným foto-methioninem. Podmínky pro inkorporaci foto-methioninu do cytochromu  $b_5$  byly optimalizovány a protein byl purifikován s výtěžkem 7,2 mg z 1 l bakteriální suspenze. Izolovaný foto-cyt  $b_5$  byl použit k identifikaci interakcí s cytochromem P450 2B4 (CYP2B4). Reakční směs obsahující CYP2B4 a foto-cyt  $b_5$  byla fotolyzována a následně separována SDS elektroforézou. Na elektroforéze byly detekovány 3 heterooligomery, které byly analyzovány hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF/TOF). Heterooligomery obsahovaly CYP2B4 a foto-cyt  $b_5$  v molárním poměru 1:1, 1:2 a 2:1.

Dále se práce zabývá expresí a izolací králíčího CYP2B4 pro budoucí přípravu CYP2B4 s inkorporovaným foto-methioninem.

**Klíčová slova:** cytochrom  $b_5$ , chemická modifikace, MALDI-TOF

## Abstract

The system of mixed function oxygenase (MFO system) participates in significant roles in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. This system contains cytochrome P450, NADPH:cytochrome P450 reductase, and also there are assigned NADH: cytochrome b<sub>5</sub> reductase and cytochrome b<sub>5</sub>. It was proved that cytochrome b<sub>5</sub> can stimulate or inhibit cytochrome P450 (CYP)-dependent reactions and even change the ratio of resulting metabolites. The mechanism of cytochrome b<sub>5</sub> action has not been fully elucidated yet. Elucidation of protein-protein interactions in MFO system and determination of topology of this system could explain the mechanism of cyt b<sub>5</sub> action. The covalent cross-linking technique is suitable method for identifying protein-protein interactions within the membrane. Cytochrome b<sub>5</sub> contains 3 methionines and in 2 cases the methionines are localized in a short hydrophobic C-terminal membrane anchor. Interactions with cytochrome P450 in the membrane environment can be identified by substitution of two methionine for photoactivatable analogue of methionine (photo-methionine) and subsequent photoactivation.

This work is focused on expression and isolation of photo-cytochrome b<sub>5</sub> (photo-cyt b<sub>5</sub>), cytochrome b<sub>5</sub> analogue with incorporated photo-methionine. Conditions for photo-methionine incorporation into cytochrome b<sub>5</sub> were optimized and the protein was purified in a yield of 7.2 mg from 1 liter of bacterial suspension. The isolated photo-cyt b<sub>5</sub> was used to identify interactions with cytochrome P450 2B4 (CYP2B4). The reaction mixture containing CYP2B4 and photo-cyt b<sub>5</sub> was activated by photolysis and then separated by SDS electrophoresis. The electrophoresis was found 3 heterooligomers, which were analyzed by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). Heterooligomers contained CYP2B4 and photo-cytb<sub>5</sub> in a molar ratio of 1:1, 1:2 and 2:1.

The thesis also deals with the expression and isolation of rabbit CYP2B4 for the future preparation of CYP2B4 incorporating the photo-methionine.

**Keywords:** cytochrome b<sub>5</sub>, chemical modification, MALDI-TOF

[IN CZECH]

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
1.1 MFO systém .....	12
1.1.1 Cytochromy P450 .....	12
1.1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450.....	13
1.1.1.2 Substrátová specifita cytochromů P450 .....	13
1.1.1.3 Struktura cytochromů P450.....	14
1.1.1.4 Reakční cyklus cytochromu P450 .....	15
1.1.1.5 Cytochrom P450 2B4 .....	17
1.1.2 NADPH:Cytochrom P450 reduktasa.....	18
1.1.3 Cytochrom b <sub>5</sub> .....	19
1.1.3.1 Izoformy cytochromu b <sub>5</sub> .....	20
1.1.3.2 Funkce cytochromu b <sub>5</sub> .....	20
1.1.3.3 Struktura cytochromu b <sub>5</sub> .....	21
1.1.3.4 Vliv cytochromu b <sub>5</sub> na reakce katalyzované cytochromy P450.....	23
1.1.3.5 Mechanismus cytochromu b <sub>5</sub> .....	23
1.1.4 NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa.....	24
1.2 Vztah struktury a funkce složek MFO systému.....	25
1.2.1 Protein-proteinové interakce v MFO systému.....	25
1.2.1.1 Interakce proteinů s membránou .....	25
1.2.1.2 Interakce mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou ....	27
1.2.1.3 Interakce cytochromu P450 s cytochromem b <sub>5</sub> .....	30
1.2.1.4 Interakce mezi NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasou a cytochromem b <sub>5</sub> .....	32
1.2.1.5 Interakce mezi cytochromy P450 .....	32
1.2.2 Metody pro zjišťování protein-proteinových interakcí .....	34
1.2.2.1 Síťovací techniky.....	35
1.2.2.2 Síťovací činidla.....	35
1.2.2.3 Příprava a použití fotoaktivovatelných proteinů (foto-síťování).....	36
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>39</b>
3.1 Použitý materiál a chemikálie.....	39
3.2 Použité přístroje.....	41
3.3 Metody.....	42
3.3.1 Analytické metody.....	42
3.3.1.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.....	42

---

3.3.1.2	Stanovení koncentrace foto-cytochromu $b_5$ z absolutního spektra.....	43
3.3.1.3	Stanovení koncentrace cytochromu P450 .....	43
3.3.1.4	Stanovení aktivity CYP2B4 .....	44
3.3.2	Elektromigrační metody .....	45
3.3.2.1	SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu .....	45
3.3.2.2	Metoda „Western blotting“ .....	47
3.3.2.3	Agarosová elektroforéza.....	47
3.3.3	Příprava rekombinantního foto-cytochromu $b_5$ .....	48
3.3.3.1	Příprava agarových ploten .....	48
3.3.3.2	Transformace kompetentních buněk .....	48
3.3.3.3	Přeočkování bakteriálních buněk <i>E. coli</i> metodou „single-cell“ .....	49
3.3.4	Kultivace bakterií a produkce foto-cytochromu $b_5$ .....	49
3.3.4.1	Optimalizace použité koncentrace fMet.....	49
3.3.4.2	Produkce foto – cytochromu $b_5$ pro izolaci .....	51
3.3.5	Izolace foto - cytochromu $b_5$ z bakteriálních buněk.....	51
3.3.5.1	Izolace membránové frakce.....	51
3.3.5.2	Solubilizace foto - cytochromu $b_5$ z membrán.....	52
3.3.5.3	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B .....	52
3.3.6	Příprava rekombinantního CYP2B4 .....	53
3.3.6.1	Extrakce plazmidu pLW01-2B4 z filtračního papíru .....	53
3.3.6.2	Izolace plazmidové DNA .....	54
3.3.6.3	Restrikční analýza plazmidu pLW01-2B4.....	55
3.3.6.4	Produkce cytochromu P450 2B4.....	55
3.3.7	Izolace cytochromu P450 2B4.....	56
3.3.7.1	Příprava sféroplastů.....	56
3.3.7.2	Sonikace buněk a solubilizace CYP2B4 .....	57
3.3.7.3	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B .....	57
3.3.7.4	Chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose .....	58
3.3.7.5	Chromatografie na hydroxylapatitu.....	59
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>60</b>
4.1	Optimalizace produkce cytochromu $b_5$ s inkorporovaným foto-methioninem.....	60
4.1.1	Optimalizace koncentrace foto-methioninu v DMEM-LM mediu .....	60
4.1.2	Optimalizace inkorporace foto-methioninu do cytochromu $b_5$ .....	63
4.2	Izolace foto-cytochromu $b_5$ .....	65
4.2.1	Solubilizace .....	65
4.2.2	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B .....	65
4.3	Charakterizace finálního foto-cytochromu $b_5$ .....	68

---

4.3.1	Spektrofotometrická charakterizace foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....	68
4.3.2	Stanovení koncentrace proteinů a foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....	69
4.3.3	Kovalentní síťování mezi foto-cytochromem b <sub>5</sub> a cytochromem P450 2B4 .....	70
4.4	Příprava a izolace CYP2B4 .....	70
4.4.1	Amplifikace a restriční analýza plazmidu pLW01-2B4 .....	70
4.4.2	Izolace CYP2B4 .....	71
4.4.2.1	Sonikace a solubilizace CYP2B4 z bakteriální membrány .....	71
4.4.2.2	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B .....	72
4.4.2.3	Chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose .....	74
4.4.2.4	Chromatografie na koloně hydroxylapatitu .....	75
4.5	Charakterizace finálního preparátu CYP2B4 .....	78
4.5.1	Spektrofotometrická charakterizace CYP2B4 .....	78
4.5.2	Stanovení koncentrace CYP2B4 a proteinů ve finálním preparátu .....	79
4.5.3	Aktivita CYP2B4.....	79
<b>5.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>81</b>
5.1	Optimalizace koncentrace a inkorporace foto-methioninu .....	81
5.2	Purifikace a charakterizace foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....	82
5.3	Kovalentní síťování foto-cytochromem b <sub>5</sub> a cytochromu P450 2B4.....	83
5.4	Izolace cytochromu P450 2B4.....	83
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>85</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>86</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>aaRSs</b>	aminoacyl-tRNA synthetasy
<b>AMK</b>	aminokyselina
<b>Amp</b>	ampicilin
<b>Arg</b>	arginin
<b>Asp</b>	asparagová kyselina
<b>A<sub>x</sub></b>	absorbance při vlnové délce x nm
<b>BiFC</b>	bimolekulární fluorescenční komplementace
<b>bp</b>	páry bazí (base pairs)
<b>BCA</b>	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
<b>BIS</b>	N,N-methylen-bis-akrylamid
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>c</b>	molární koncentrace
<b>CBB</b>	Coomassie Brilliant Blue
<b>CPR</b>	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
<b>cyt b<sub>5</sub></b>	cytochrom b <sub>5</sub>
<b>cyt b<sub>5</sub>R</b>	NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>Da</b>	dalton
<b>DEAE-Sepharosa CL6B</b>	diethylaminoethyl-Sepharosa CL6B
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMEM-LM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Limiting Medium
<b><i>E. coli</i></b>	Escherichia coli
<b>EDTANa<sub>2</sub></b>	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
<b>FAD</b>	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
<b>/FADH/FADH<sub>2</sub></b>	/semichinoidní radikál/hydrochinon
<b>fAMK</b>	fotoaktivovatelné aminokyseliny
<b>fMet</b>	L-foto-methionin (L-photo-methionine)
<b>fLeu</b>	L-foto-leucin (L-photo-leucine)
<b>FMN</b>	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
<b>/FMNH/FMNH<sub>2</sub></b>	/semichinoidní radikál/hydrochinon
<b>foto-cyt b<sub>5</sub></b>	foto-cytochrom b <sub>5</sub>
<b>FRET</b>	fluorescenční rezonanční přenos energie

---

<b>Glu</b>	glutamová kyselina
<b>GTE</b>	pufr obsahující glukosu, Tris-HCl, EDTA
<b>His</b>	histidin
<b>IPTG</b>	isopropylthio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
$k_{cat}$	katalytická konstanta
$K_m$	konstanta Michaelis-Mentenové
$l$	optická dráha
<b>LB medium</b>	Luria Broth medium
<b>Leu</b>	leucin
<b>Lys</b>	lysin
<b>M</b>	mol/l
<b>MALDI-TOF</b>	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
<b>Met</b>	methionin
<b>MetRS</b>	methionin-tRNA synthetasa
<b>MFO</b>	systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
<b>NADP<sup>+</sup></b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný
<b>NADPH</b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>OD<sub>600</sub></b>	optická denzita při 600 nm
<b>PBS</b>	fosfátový pufr obsahující NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , a NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (phosphate buffered saline)
<b>PEG</b>	polyethylenglykol
<b>Phe</b>	fenylalanin
<b>Pro</b>	prolin
<b>PVDF</b>	polyvinyliden fluorid
<b>R</b>	resorufin
<b>RH</b>	substrát
<b>ROH</b>	hydroxylovaný produkt
<b>RT</b>	laboratorní teplota
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>TB medium</b>	Terrific broth (modified) medium

---

<b>TE</b>	roztok obsahující Tris-HCl a EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>tRNA</b>	transferová ribonukleová kyselina
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>v/v</b>	objem/objem
<b>Val</b>	valin
<b>VIS</b>	viditelné záření
<b>w/v</b>	hmotnost/objem
$\epsilon_x$	absorpční molární koeficient při vlnové délce x nm
<b><math>\delta</math>-ALA</b>	$\delta$ -aminolevulová kyselina
$\lambda$	vlnová délka

## 1. Úvod

V dnešní době se v životním prostředí zvyšuje množství cizorodých látek (xenobiotik), které mohou negativně ovlivňovat organismy. Za xenobiotika považujeme látky, které se v organismu normálně nevyskytují a nejsou nezbytné pro jeho zdravý vývoj a ani neslouží jako zdroj energie [1]. Jsou přijímány buď neúmyslně z potravy či prostředí, nebo záměrně jako například léčiva.

Cytochromy P450 jsou jedny z nejdůležitějších enzymů, které se podílí na biotransformaci xenobiotik. Xenobiotika jsou těmito enzymy biotransformována na polárnější sloučeniny, které mohou být z těla vyloučeny a nedochází tak k jejich bioakumulaci v organismu (tzv. detoxikace). Vedle detoxikace těchto sloučenin mohou cytochromy P450 přispívat ke vzniku biologicky aktivnějších sloučenin (aktivace), čehož lze využít při vzniku aktivní formy některých léčiv. Jiné sloučeniny mohou být přeměněny na sloučeniny toxické, mutagenní či karcinogenní.

Cytochromy P450 nefungují samostatně, pro svou funkci potřebují dodávat elektrony od svých redoxních partnerů. Jedním z redoxních partnerů je cytochrom  $b_5$ , který je v poslední době zkoumán právě v souvislosti s metabolismem léčiv a xenobiotik. Bylo prokázáno, že cytochrom  $b_5$  je schopen ovlivňovat některé reakce katalyzované cytochromy P450. V závislosti na formě cytochromu P450, cytochrom  $b_5$  může reakce katalyzované cytochromy P450 inhibovat, stimulovat nebo dokonce měnit poměr vzniklých metabolitů [2,3]. Mechanismus působení cytochromu  $b_5$  nebyl ještě zcela objasněn, přestože je intenzivně sledován. Vysvětlení mechanismu by mohlo mít velký význam především pro farmakologii, kdy je zapotřebí vědět, zda se léčivo přemění na aktivní formu, nebo naopak dojde k přeměně na neúčinnou formu, nebo dokonce na potenciálně karcinogenní látku. K objasnění mechanismu by mohla přispět znalost vzájemného uspořádání enzymů v MFO systému a určení jejich vzájemných interakcí. Vhodnou metodou pro zjištění protein-proteinových interakcí je technika kovalentního síťování, která je schopná propojit jednotlivé proteiny a zafixovat tak jejich vzájemné interakce.

## 1.1 MFO systém

Systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém z angl. „mixed function oxidase“) je systém enzymů vázaných v membráně hladkého endoplazmatického retikula nebo mitochondrií. Tento enzymový systém katalyzuje inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Skládá se ze tří základních složek: **NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR)**, která slouží jako dělič elektronového páru a přenáší elektrony na cytochrom P450, **cytochromu P450 (CYP)**, který je terminální oxidasou MFO systému a **membrány** endoplazmatického retikula či mitochondrie. Dále jsou k němu přiřazovány NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa a cytochrom b<sub>5</sub> [4]. Cytochrom P450 potřebuje ke své funkci 2 elektrony, první elektron je přenášen na cytochrom P450 pouze NADPH:cytochrom P450 reduktasou, druhý elektron může být přenášen NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo cytochromem b<sub>5</sub>.

### 1.1.1 Cytochromy P450

Klingenberg a Garfinkel objevili v roce 1958 nový jaterní mikrosomální pigment, který je po redukcí schopný vázat oxid uhelnatý a vytvářet s ním komplex, který se vyznačuje absorpčním maximem při 450 nm [5,6]. Hemoproteinový charakter tohoto pigmentu prokázali v roce 1964 Omura a Sato a pojmenovali ho cytochrom P450 (CYP) [7].

Cytochromy P450 (CYP) jsou v organismech především zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace, jež vedou k detoxikaci chemických sloučenin. Katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce, které jsou součástí různých metabolických drah xenobiotik a endogenních látek [8]. Kromě detoxikace se mohou podílet i na bioaktivaci, kdy jsou neškodné látky metabolicky přeměněny na látky, které mohou být toxické nebo karcinogenní [9].

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než například hemoglobin [10,11]. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií z doby před více než 1,5 miliardami let se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódujících cytochromy P450 prokaryotních i eukaryotních organismů [8]. V současnosti bylo pojmenováno více než 12 000 cytochromů P450 a dalších více než 6000 na pojmenování teprve čeká [12]. Přehled pojmenovaných cytochromů P450 uvádí Tab. 1., str. 13.

**Tab. 1 Zařazení pojmenovaných cytochromů P450 dle typu organismu**

Organismus	Počet CYP	Počet rodin CYP
Živočichové	4088	
Hmyz	2137	67
Obratlovci	1461	18
Bezobratlí (kromě hmyzu)	490	71
Rostliny	4267	126
Houby	2784	399
Protisté	247	62
Bakterie	1042	333
Archebakterie	26	13
Víry	2	2

*počty cytochromů P450 (CYP) jsou uvedeny k březnu 2010, převzato z [12]*

Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu [13]. Nejedná se o klasický cytochrom, ale o hemthiolátový protein, protože klasický cytochrom má protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu.

#### 1.1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450

Jednotná nomenklatura cytochromů P450 byla navržena až v osmdesátých letech minulého století a postupně byla doplňována [14].

Cytochromy P450 se vyskytují v různých izoformách, které jsou řazeny do rodin a podrodin podle míry homologie v aminokyselinové sekvenci proteinových molekul. Do stejné rodiny jsou řazeny izoformy s homologií aminokyselinové sekvence vyšší než 40% a do stejné podrodiny spadají izoformy, které vykazují homologii vyšší než 55 %. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány arabskou číslicí, která je psána za zkratku CYP. Za číslicí následuje velké písmeno charakteristické pro podrodinu a na konci je arabská číslice určující konkrétní izoformu cytochromu P450 [14-16]. Například CYP2B4 patří do rodiny 2, podrodiny B a jeho pořadové číslo je 4.

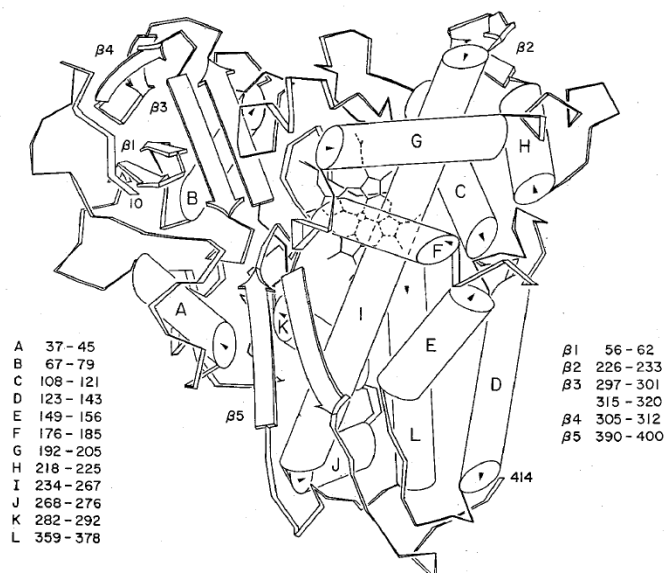
#### 1.1.1.2 Substrátová specifita cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyznačují širokou substrátovou specifikou. Přeměňují tedy celou řadu substrátů. Jednotlivé cytochromy P450 však přeci jen vykazují substrátovou specifitu poněkud odlišnou, i když se jejich schopnost přeměňovat různé substráty částečně překrývá [8]. Metabolizují jak endogenní sloučeniny (např. nasycené a nenasycené mastné

kyseliny, steroly a steroidy, žlučové kyseliny, prostaglandiny, retinoidy, uroporfirinogeny), tak exogenní sloučeniny (např. léčiva, potravinová aditiva, kontaminanty životního prostředí) [1,8,17]. Substráty cytochromu P450 jsou látky s malou molekulovou hmotností jako je třeba methanol ( $M_r = 42$ ), ale i látky s vyšší molekulovou hmotností jako je imunosupresivní léčivo cyklosporin ( $M_r = 1203$ ) [9]. Obecně lze říci, že substráty jsou látky hydrofobní [8], ale lze nalézt i cytochromy P450, které metabolizují i polární látky jako jsou ethanol a aceton. Příkladem cytochromu, který metabolizuje polární substráty je cytochrom P450 2E1 [18].

### 1.1.1.3 Struktura cytochromů P450

Eukaryotické cytochromy P450 jsou obecně membránové proteiny, které obsahují N-terminální transmembránovou doménu. Tato hydrofobní doména činí cytochromy P450 obtížně krystalizovatelnými. Mnoho krystalografických studií vyřešilo tento problém odštěpením hydrofobní domény a krystalizací pouze solubilní části proteinu. Použití NMR spektrometrie bylo dosud limitováno velkou molekulovou hmotností cytochromu P450 (přibližně 50 kDa) a tendencí vytvářet agregáty [19]. Prvním krystalovaným cytochromem P450 byl rozpustný bakteriální cytochrom P450cam z bakterie *Pseudomonas putida* (CYP101) [20]. Schéma jeho struktury je na Obr. 1.



**Obr. 1** Schéma struktury cytochromu P450cam. Písmena A – L značí α-helixy, β značí β-skládané listy a čísla zobrazují rozmezí aminokyselin, které se vyskytují v jednotlivých strukturních motivech. Převzato z [20].

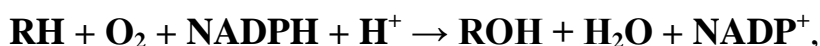
Od první krystalové struktury byly odvozeny homologní modely struktur některých savčích cytochromů P450, například CYP1A1 [21], CYP2B1 [22]. Sekvenční homologie

mezi cytochromem P450cam a savčími cytochromy P450 je nízká (< 20%) a modely mohou být sporné [23]. První krystalová struktura savčího cytochromu P450 2C5 byla získána až v roce 2000 [24]. V dnešní době je již známo i několik krystalových struktur lidských cytochromů P450, například CYP2A6 [25], CYP3A4 [26,27].

Proteinová část cytochromů P450 je tvořena přibližně 500 aminokyselinovými zbytky [28] a jejich molekulové hmotnosti se pohybují kolem hodnoty 50 kDa [4]. Primární struktury cytochromů P450 bývají často rozdílné, ale sekundární a terciární struktury se podobají. Některé strukturní motivy jsou konzervovány ve všech cytochomech P450. Struktura se zpravidla skládá z 12  $\alpha$ -helixů (značených A-L) a 6-8  $\beta$ -skládaných listů. U membránových cytochromů P450 je navíc součástí molekuly 1 transmembránový  $\alpha$ -helix. K oxidaci substrátu dochází na prostetické hemové skupině na proximální straně, která je vysoce konzervovaná (helixy I a L). Naopak nejvíce variabilní částí je vazebné místo pro substrát, které se nachází na distální části molekuly [19]. Na proximální straně se nachází vazebné místo pro redoxní partnery, které obsahuje bazické aminokyseliny. Předpokládá se, že vazebná místa pro cyt b<sub>5</sub> a NADPH:cytochrom P450 reduktasu nejsou identická, ale částečně se překrývají [19,29-31].

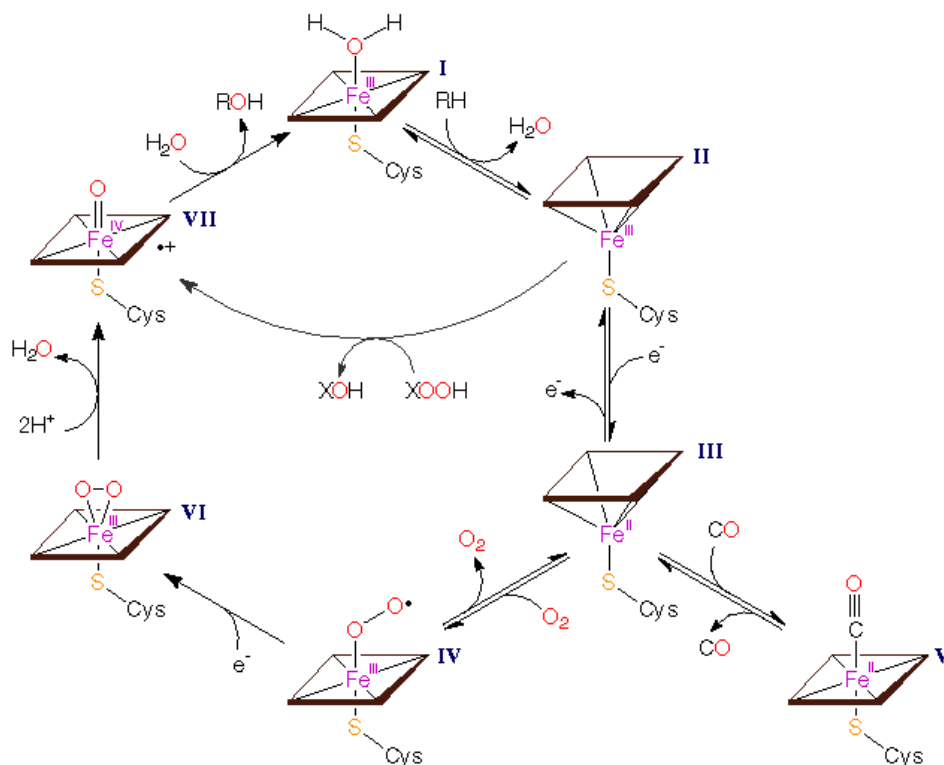
#### 1.1.1.4 Reakční cyklus cytochromu P450

Typickou reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, při které dochází k aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho kyslíku do molekuly substrátu [13]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Průběh monooxygenasové reakce lze obecně vyjádřit sumární rovnicí:



kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce. Reakční cyklus probíhá uspořádaným mechanismem a pravděpodobně se skládá až z osmi kroků [4,8]. Schéma reakčního cyklu je znázorněno na Obr. 2, str. 16.

V klidovém stavu obsahuje cytochrom P450 molekulu hemu, ve kterém je atom železa v oxidovaném stavu ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a je hexakoordinován (nízkospinový stav cytochromu P450), šestá valence je obsazena atomem kyslíku z molekuly vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem (**I**). Po navázání substrátu (RH) do aktivního centra cytochromu P450 dochází k vytlačení šestého ligandu železa (molekuly vody) a atom železa se stává pentakoordinovaným (vysokospinový stav cytochromu P450). A zároveň v molekule enzymu dochází ke konformační změně (**II**).



**Obr. 2 Reakční cyklus cytochromu P450.** Na obrázku je znázorněna i tvorba komplexu s CO a peroxidasová aktivita. RH – substrát, ROH – hydroxylovaný produkt, XOOH – peroxisloučenina (alternativní donor kyslíku). Převzato z [32].

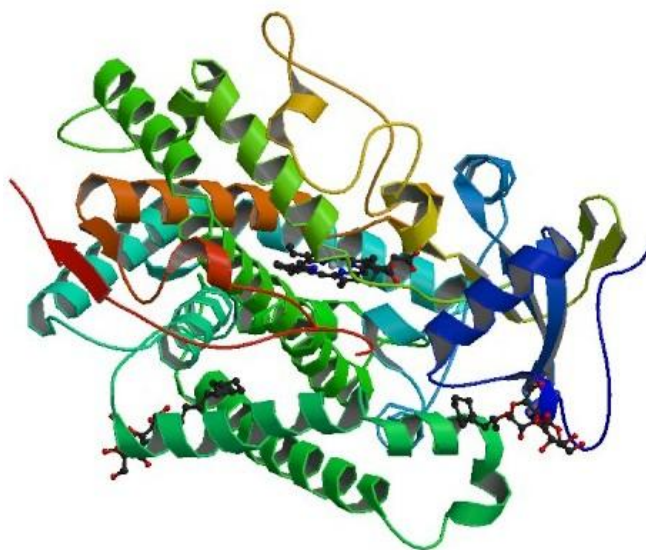
Vysokospinový stav má pozitivnější redukční potenciál a je redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž se atom železa redukuje na  $\text{Fe}^{2+}$  a přetrvává v pentakoordinovaném stavu. Tato forma enzymu je pak schopná vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (III). Navázáním molekulárního kyslíku se tvoří ternární ferri-superoxidový komplex. V tomto komplexu je atom železa opět hexakoordinován. Tento komplex není příliš stabilní a je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou, čímž dochází k aktivaci na peroxidový anion (IV). Vazba molekulárního kyslíku na redukovanou formu III může být inhibována přítomností oxidu uhelnatého, který tvoří ternární komplex cytochrom P450-CO-RH (V). Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku je po druhé redukci již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody (VI), zatímco druhý atom kyslíku zůstane vázán na iontu železa v hemu ve formě ferrioxenového komplexu (VII). Ferrioxenový komplex je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu

a hydroxylového radikálu vázaného na iont železa hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za uvolnění hydroxyderivátu substrátu (ROH) a obnovuje se nativní forma cytochromu P450 [4,33].

Cytochrom P450 může pro oxidační reakce také využívat peroxid a peroxikyseliny, které se stávají donorem již aktivovaného atomu kyslíku. Z komplexu **III** pak přímo vzniká komplex **VII**. Tato reakce bývá označována jako peroxidasová aktivita cytochromu P450, probíhá neuspořádaným mechanismem a vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu [4,8,33].

#### 1.1.1.5 Cytochrom P450 2B4

Králičí cytochrom P450 2B4 (CYP2B4), dříve známý jako cytochrom P450 LM2, patří mezi první savčí cytochromy P450, které byly purifikovány do vysoké čistoty. Pro svou stabilitu a snadnou dostupnost byl po dlouhou dobu používán jako model pro studium savčích cytochromů P450 [34]. Poprvé byl CYP2B4 krystalován ve své otevřené konformaci až v roce 2003 [35]. Struktura otevřené konformace je uvedena na Obr. 3.

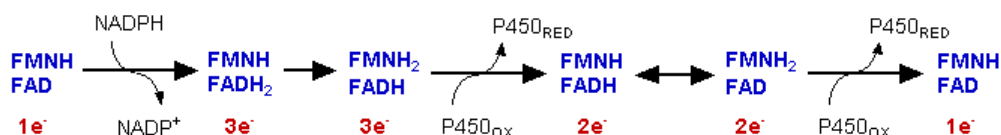


**Obr. 3** Struktura otevřené konformace CYP2B4. Převzato z [36].

CYP2B4 je hemthiolátový protein vázaný v membráně endoplazmatického retikula. Molekulová hmotnost CYP2B4 je 55,7 kDa a sekvence je tvořena 491 aminokyselinami [37]. Reakce katalyzované CYP2B4 mohou být ovlivněny přítomností cyt b<sub>5</sub> (kap. 1.1.3.4).

### 1.1.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) je membránově vázaný protein, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé mikrosomální cytochromy P450 [38]. CPR je schopna přenášet elektrony i na další elektronové akceptory jako jsou cytochrom c [39], cytochrom  $b_5$  [40] a mikrosomalní hemová oxygenasa [41]. CPR je jedním ze dvou savčích enzymů, které obsahují současně FMN a FAD jako prostetické skupiny, druhým enzymem je NO-synthasa. Současná přítomnost těchto dvou koenzymů umožňuje redukovat cytochrom P450 v sekvenčně oddělených krocích a působit tak jako dělič elektronového páru pro přenos na cytochrom P450 [4]. Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů flavinových koenzymů [42,43]. Akceptorem elektronů (resp. atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony předává FMN. Za jednoelektronovou redukci cytochromu P450 je zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon  $\text{FMNH}_2$  (Obr. 4).



**Obr. 4** Schéma přenosů elektronů mezi flavinovými koenzymy FAD a FMN. Převzato z [44].

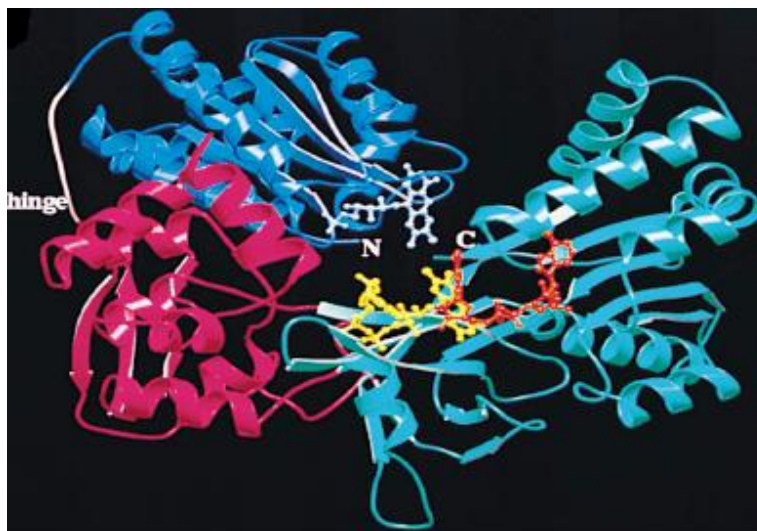
Aminokyselinová sekvence CPR z odlišných druhů, od kvasinek až po člověka, vykazuje vysokou sekvenční homologii, což ukazuje na význam enzymu v průběhu evoluce [45].

CPR obsahuje dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální doménu (6 kDa) a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa). N-terminální doména slouží k ukotvení enzymu do membrány endoplazmatického retikula nebo jaderného obalu buňky, čímž zajišťuje správnou prostorovou orientaci pro přenos elektronů mezi reduktasou a cytochromy P450.

Struktura CPR se skládá ze čtyř strukturních domén: FMN-vazebné domény, spojovací domény, FAD- a NADPH-vazebné domény (Obr. 5, str. 19) [46].

C-terminální funkční doména se skládá z FMN a FAD-vazebné domény, které jsou propojeny spojovací doménou. Spojovací doména zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FMN je umístěno na C-terminální straně  $\beta$ -skládaných listů v FMN-vazebné doméně. FAD a FMN se vzájemně nepřekrývají, ale jsou v kontaktu

prostřednictvím 7- a 8-methylových skupin isoalloxazinových kruhů flavinů. Isoalloxazinové kruhy svírají úhel  $150^\circ$  a jsou postaveny blízko sebe, nejbližší vzdálenost mezi nimi je 4 Å. Toto uspořádání naznačuje, že tok elektronů je přímý a není zprostředkován aminokyselinovými zbytky [46].



**Obr. 5** Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy. FMN-vazebná doména je znázorněna tmavě modře, spojovací doména červeně, a FAD- a NADPH-vazebná doména světle modře [46].

Xia a kol. navrhli hypotézu, že pro funkci CPR je nezbytná konformační změna. Pro ověření hypotézy připravili mutantní CPR, ve které nahradili Asp417 a Arg514 cysteinem a vytvořili tak disulfidický můstek mezi FMN- a FAD-vazebnou doménou. Mutantní protein vykazoval výrazný pokles rychlosti přenosu elektronů mezi flaviny a až 90% pokles rychlosti přenosu elektronů na redoxní partnery, cytochrom c a CYP2B4. Po redukci disulfidové vazby byla obnovena schopnost mutantní CPR redukovat redoxní partnery [47].

### 1.1.3 Cytochrom $b_5$

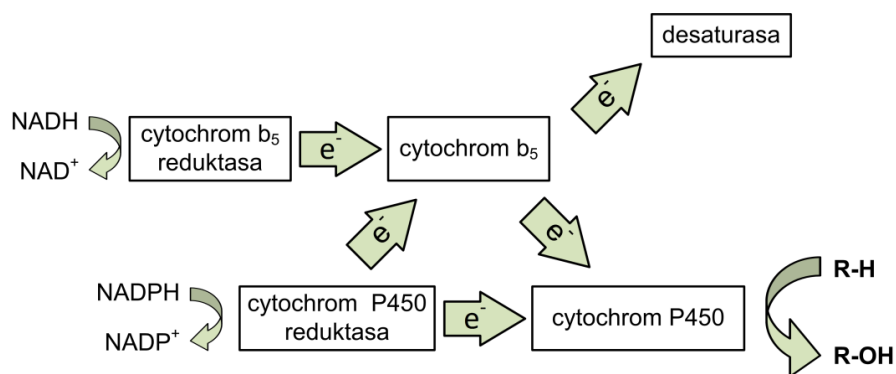
Cytochrom  $b_5$  (cyt  $b_5$ ) je malý membránový protein s molekulovou hmotností kolem 17 000 Da [48]. Cyt  $b_5$  byl poprvé objeven v larvě bource morušového v roce 1950 [49]. Z evolučního hlediska se cyt  $b_5$  objevil velmi brzy a byl nalezen nejen u živočichů, ale také u rostlin a hub [50]. Primární struktura cyt  $b_5$  je vysoce konzervovaná. Doména vázající hem je nejvíce konzervovaným úsekem cyt  $b_5$ . Například králičí cyt  $b_5$  sdílí 74 - 95% sekvenční homologii s obratlovci a 40 - 59% homologii s cyt  $b_5$  přítomným u bezobratlých a rostlin. U C-terminální domény byla nalezena nižší sekvenční homologie [51].

### 1.1.3.1 Izoformy cytochromu b<sub>5</sub>

U savců byly objeveny tři izoformy cyt b<sub>5</sub>, dvě izoformy jsou membránově vázané a třetí izoforma je rozpustná. Membránové formy se vyskytují na vnější membráně mitochondrií a na vnější straně endoplazmatického retikula (mikrosomální cyt b<sub>5</sub>). Volně rozpustná forma se nalézá v cytoplazmě erytrocytů [50]. Dříve se předpokládalo, že erytrocytární forma vzniká posttranslační proteolýzou mikrosomálního cyt b<sub>5</sub> [52]. Tento předpoklad byl vyvrácen, když byla určena kompletní aminokyselinová sekvence erytrocytárního cyt b<sub>5</sub>, z které vyplynulo, že erytrocytární cyt b<sub>5</sub> nemůže vznikat proteolýzou z mikrosomální formy. Erytrocytární cyt b<sub>5</sub> vzniká pravděpodobně alternativním sestřihem genu pro mikrosomální cyt b<sub>5</sub>. Mikrosomální cyt b<sub>5</sub> je syntetizován na volných ribozomech a je posttranslačně vkládán do membrány endoplazmatického retikula bez participace signál rozpoznávající částice („signal recognition particle“). Posledních 10 aminokyselinových zbytků na C-terminálním konci nese informaci potřebnou k ukotvení cyt b<sub>5</sub> do membrány endoplazmatického retikula [53-56].

### 1.1.3.2 Funkce cytochromu b<sub>5</sub>

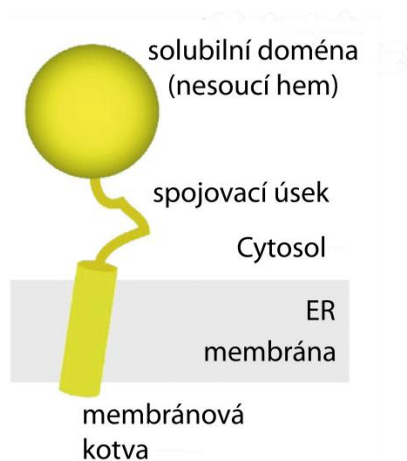
Cyt b<sub>5</sub> se účastní mnoha dějů spojených s přenosem elektronů [2]. Mitochondriální cyt b<sub>5</sub> se účastní metabolismu endogenních sloučenin, například biosyntézy androgenů [57]. Erytrocytární cyt b<sub>5</sub> spolu s NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou redukuje methemoglobin na funkční hemoglobin, který je schopný vázat a přenášet kyslík [58]. Mikrosomální cyt b<sub>5</sub> se podílí na desaturaci mastných kyselin [50,59,60], biosyntéze plasmalogenu [50,61] a cholesterolu [62], ale také na metabolismu xenobiotik za účasti MFO systému [63]. V MFO systému může cyt b<sub>5</sub> přijímat elektron z NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy [64,65] nebo NADPH:cytochrom P450 reduktasy [66,67] a následně ho přenášet na cytochromy P450. Cytochrom P450 potřebuje ke své funkci 2 elektrony, první elektron je přenášen na cytochrom P450 pouze NADPH:cytochrom P450 reduktasou, druhý elektron může být přenášen NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo cytochromem b<sub>5</sub>. Redoxní potenciál cyt b<sub>5</sub> je 20 mV, a proto nemůže přenášet elektrony na cytochrom P450 s atomem železa Fe<sup>3+</sup>, protože tento cytochrom má nižší redoxní potenciál (-230 mV). Redukcí cytochromu P450 NADPH:cytochrom P450 reduktasou se atom železa redukuje na Fe<sup>2+</sup> a redoxní potenciál roste na hodnotu + 50 mV a druhý elektron pak může být přenesen z cyt b<sub>5</sub> nebo NADPH:cytochrom P450 reduktasy [68,69]. Přenos elektronů v MFO systému je znázorněn na Obr. 6, str. 21.



**Obr. 6** Schematické znázornění přenosu elektronů mezi cytochromem P450, cytochromem b<sub>5</sub> a jejich reduktasami. Převzato a upraveno z [19].

### 1.1.3.3 Struktura cytochromu b<sub>5</sub>

Cyt b<sub>5</sub> je tvořen 6  $\alpha$ -helixy a 5  $\beta$ -skládanými listy, které jsou uspořádány do dvou domén: větší N-terminální hydrofilní domény, která obsahuje hem a vazebné místo pro redoxní partnery, a menší C-terminální hydrofobní domény, která slouží k ukotvení proteinu do membrány endoplazmatického retikula nebo mitochondrie. C-terminální a N-terminální domény jsou spojeny vysoce flexibilním peptidovým řetězcem („linker“), tvořeným 15 aminokyselinovými zbytky [31,38,70]. Topologie cyt b<sub>5</sub> je znázorněna na Obr. 7.

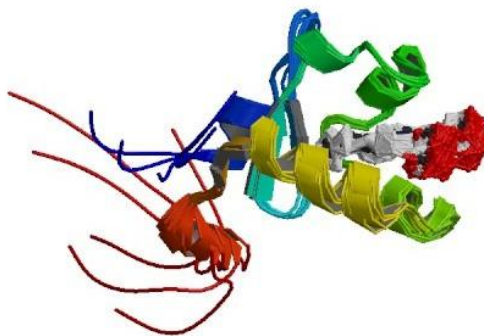


**Obr. 7** Topologie cytochromu b<sub>5</sub>. Převzato a upraveno z [19].

Membránové formy cyt b<sub>5</sub> jsou pevně ukotveny v membráně endoplazmatického retikula a mitochondrie a předpokládá se, že spojovací úsek poskytuje flexibilitu hydrofilní doméně pro vazbu cyt b<sub>5</sub> na rozdílné redoxní partnery. Bylo prokázáno, že spojovací úsek musí obsahovat alespoň 7 aminokyselin. Zkrácení úseku ( $\leq 7$  AMK) vedlo ke snížení

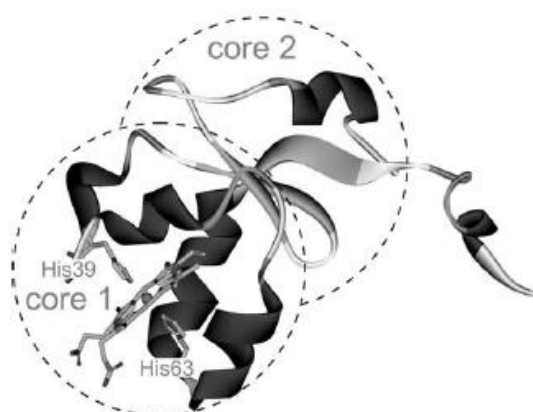
schopnosti cyt  $b_5$  vázat se na CYP2B4. Naopak přidání 2-16 alaninů neovlivnilo schopnost cyt  $b_5$  vytvářet komplex s CYP2B4 [51].

Struktura celého proteinu ještě nebyla rozřešena, protože hydrofobní doména je překážkou pro krystalizaci a rentgenostrukturní analýzu. Byly provedeny studie se zkráceným cyt  $b_5$ , u kterého byla odštěpena membránová kotva. Struktura solubilní domény byla určena rentgenovou krystalografií [70,71] a NMR spektrometrií (Obr. 8) [72].



**Obr. 8 NMR struktura mikrosomálního králičího cytochromu  $b_5$ .** Převzato z [73].

N-terminální solubilní doména je tvořena dvěma hydrofobními jádry [71,74-76] (Obr. 9). Jádro 1 obklopuje hem a má funkční roli. Hemová skupina je koordinována pomocí dvou histidinových zbytků (His 39 a His 63). Vazba histidinů jako pátého a šestého ligandu na železo zabraňuje jeho přímé interakci s molekulárním kyslíkem [2]. Druhé jádro má pouze strukturní roli. Pokud není v molekule cyt  $b_5$  přítomen hem, dochází k rozvolnění struktury jádra 1 a struktura proteinu se stává méně stabilní [77]. Struktura jádra 2 není nepřítomností hemu ovlivněna a po asociaci s hemem dojde k opětovnému sbalení jádra 1 [74].



**Obr. 9 3D struktura solubilní domény potkaního mikrosomálního cyt  $b_5$ .** Převzato z [78]. core 1 – jádro 1, core 2 – jádro 2.

#### 1.1.3.4 Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na reakce katalyzované cytochromy P450

Cyt b<sub>5</sub> může stimulovat, inhibovat nebo nijak neovlivňovat reakce katalyzované cytochromy P450. Ovlivnění reakcí záleží i na typu účastníčoho se substrátu a na formě cytochromu P450 [2]. Například cyt b<sub>5</sub> stimuluje metabolismus methoxyfluranu, který je katalyzován CYP2B4, zatímco metabolismus benzfetaminu není přítomností cyt b<sub>5</sub> výrazně ovlivněn [79]. Dále bylo zjištěno, že ovlivnění reakcí katalyzovaných cytochromem P450 záleží na molárním poměru cyt b<sub>5</sub>:CPR v rekonstituovaném systému. Když je poměr cyt b<sub>5</sub>:CPR  $\leq 1$ , cyt b<sub>5</sub> stimuluje aktivitu CYP2B4 zvýšením rychlosti katalýzy a tím zvyšuje efektivitu reakce přibližně o 15% nezávisle na substrátu. V případě, kdy je molární poměr cyt b<sub>5</sub> a CPR  $\geq 1$ , cyt b<sub>5</sub> inhibuje aktivitu CYP2B4. Aktivita je inhibována tím, že se cyt b<sub>5</sub> váže na CYP2B4, na kterém se vazebné místo pro cyt b<sub>5</sub> a CPR pravděpodobně překrývají. A CPR se nemůže vázat na CYP2B4 a redukovat tak CYP2B4 s atomem železa s oxidačním číslem III a zahájit tak katalýzu [30,80,81].

Cyt b<sub>5</sub> může také měnit poměr vzniklých metabolitů u reakcí, které jsou katalyzované cytochromy P450. Cyt b<sub>5</sub> mění poměr metabolitů ellipticinu, které jsou tvořeny rekonstituovanými systémy s izolovanými CYP1A1 a CYP1A2. Na úkor detoxikačních produktů 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu jsou tvořeny aktivační produkty 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, které vytváří adukty s DNA [3].

#### 1.1.3.5 Mechanismus působení cytochromu b<sub>5</sub>

Mechanismus působení cyt b<sub>5</sub> je zkoumán již několik desetiletí [2,50,82], přesto nebyl ještě zcela objasněn. Byly navrženy různé teorie pro vysvětlení mechanismu působení cyt b<sub>5</sub>:

První mechanismus předpokládá přímý přenos druhého elektronu z cyt b<sub>5</sub> na cytochrom P450. Právě přenos druhého elektronu bývá považován za rychlost určující krok monooxygenasové reakce [83]. Přenos elektronu z redukovaného cyt b<sub>5</sub> bývá rychlejší než transport elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy [63,84]. Rychlejší přijetí elektronu předchází uvolnění částečně aktivovaného kyslíku ve formě superoxidového anionradikálu, který se pak mění na méně toxický peroxid vodíku. K uvolnění superoxidového anionradikálu dochází v různém rozsahu u všech monooxygenasových reakcí [2].

Druhý mechanismus je založen na představě, že cyt b<sub>5</sub> vytváří s cytochromem P450 komplex, který může sloužit jako akceptor dvou elektronů během jediné interakce s NADPH:cytochrom P450 reduktasou [85]. Cyt b<sub>5</sub> po redukcí cytochromu P450 rychle

odebírání elektronu z cytochromu P450 ( $\text{Fe}^{2+}$ ), který poté může okamžitě přijmout další elektron. A následně je cyt  $\text{b}_5$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oxidován cytochromem P450 s molekulárním kyslíkem, který se tím redukuje. Kdyby nebyl přítomný cyt  $\text{b}_5$ , tak by cytochrom P450 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mohl disociovat od reduktasy, následně interagovat s kyslíkem a požadovat druhou interakci s reduktasou [2]. Přijetí dvou elektronů v jediném reakčním kroku vede ke zvyšování rychlosti tvorby aktivovaného kyslíku a tedy k urychlení celé monooxygenasové reakce.

Třetí mechanismus navrhuje, že cyt  $\text{b}_5$  funguje jako pozitivní modifikátor monooxygenas tím, že snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Právě přes cyt  $\text{b}_5$  může druhý elektron vstoupit rychleji do monooxygenasové reakce a předejít tak rozpojení komplexu [63,84,86]. A dochází tedy ke zvýšení tvorby produktu na úkor tvorby peroxidu vodíku.

Čtvrtý nejnovější mechanismus předpokládá, že cyt  $\text{b}_5$  slouží jako efektor bez redoxní role v monooxygenasové reakci. Tento předpoklad je založen na představě, že cyt  $\text{b}_5$  pomáhá při rozpadu komplexu cytochromu P450 s molekulárním kyslíkem na produkty a cytochrom P450 s atomem železa v oxidovaném stavu  $\text{Fe}^{3+}$ . Navázání cyt  $\text{b}_5$  na cytochrom P450 způsobuje strukturální změny, které mají vliv na schopnost monooxygenasy podstoupit redoxní změny [2]. Pro tento mechanismus svědčí i fakt, že monooxygenasové reakce může ovlivňovat i apo-cyt  $\text{b}_5$ . V některých případech může být apo-cyt  $\text{b}_5$  stejně efektivní jako cyt  $\text{b}_5$  [87]. Z tohoto poznatku lze vyvodit, že cyt  $\text{b}_5$  nemusí prodělavat redoxní změny, ani přenášet elektron na cytochrom P450.

#### 1.1.4 NADH:cytochrom $\text{b}_5$ reduktasa

NADH:cytochrom  $\text{b}_5$  reduktasa (cyt  $\text{b}_5\text{R}$ ) přenáší elektrony z NADH na cyt  $\text{b}_5$  [64,65]. Skládá se z C-terminální hydrofobní domény (3 kDa), která protein ukotvuje do membrány a hydrofilního segmentu, který plní katalytickou funkci [88]. Podle krystalové struktury katalytický segment obsahuje dvě domény: N-terminální doména váže prostetickou skupinu FAD a C-terminální doména je odpovědná za vazbu redukčního činidla NADH [89].

## 1.2 Vztah struktury a funkce složek MFO systému

### 1.2.1 Protein-proteinové interakce v MFO systému

Proteinové složky MFO systému mohou vytvářet různě organizované komplexy. Cytochrom P450 je schopen vytvářet binární komplex s CPR i s cyt  $b_5$ . Možné je i vytváření ternárního komplexu mezi těmito složkami [2]. Dokonce byla navrhována i možnost, že se cytochrom P450 podílí na vytváření ternárního či kvarterního komplexu s CPR [90]. Cyt  $b_5$  vytváří binární komplex s NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou. Studium protein-proteinových interakcí může vést k objasnění tvorby těchto komplexů a k objevení komplexů nových.

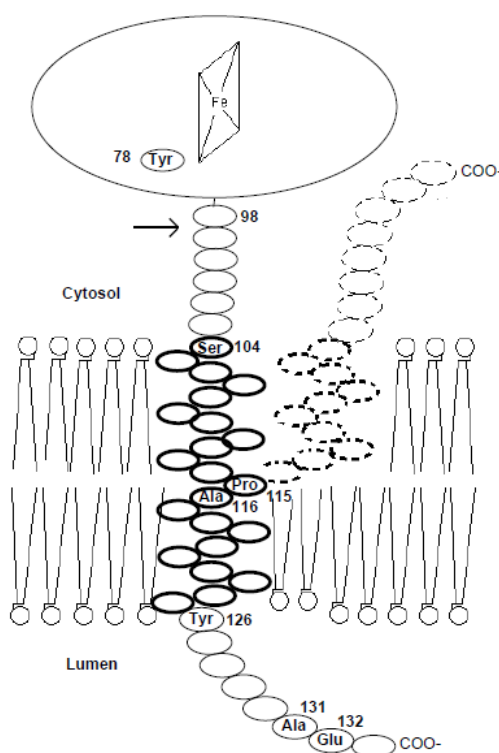
#### 1.2.1.1 Interakce proteinů s membránou

Membrána je velmi důležitou složkou MFO systému. Zřejmě fixací proteinů v jednom směru umožňuje vznik organizovaných reakčních komplexů při laterálním pohybu proteinů v membráně. Podle některých představ by mohla membrána sloužit i jako možný zdroj hydrofobních substrátů pro cytochromy P450.

CPR je do membrány endoplazmatického retikula zakotvena poměrně malým hydrofobním N-terminálním úsekem (6-10 kDa), který směřuje do lumen endoplazmatického retikula [91]. Reduktasa zkrácená o N-terminální konec ztrácí schopnost vazby do membrány a vyskytuje se jako solubilní forma [92-94]. Zkrácená reduktasa může přijmout elektrony z NADPH a přenést je na cytochrom c [46], ale není schopna přenést elektrony na cytochrom P450 a redukovat tak atom železa v hemu [95].

Cytochrom P450 je do membrány vázaný pomocí N-terminálního hydrofobního konce, který směřuje do lumen endoplazmatického retikula [28,96,97]. Hydrofobní N-terminální konec obsahuje speciální signální sekvenci, která umožňuje zakotvení cytochromu P450 do membrány. Signální sekvence je rozpoznána "signal recognition particles" a usměrněna do membrány. Vložení do membrány je zprostředkováno translokací [98,99]. Cytochromy P450 zkrácené o N-terminální hydrofobní úsek mají stejnou nebo sníženou katalytickou aktivitu. Záleží na druhu cytochromu P450 a na délce úseku, o který je cytochrom P450 zkrácen [100,101]. Například zkrácená forma králičího CYP2B4 ( $\Delta$ 2-27) byla mnohem méně aktivní než nezkrácený CYP2B4 v oxidaci benzfetaminu, *N,N*-dimethylanilinu, nebo 1-fenylethanolu [101]. Zkrácení a modifikace N-terminálních úseků CYP2E1 a CYP2B4 mají obecně za následek změnu umístění cytochromu v buňce, a to z membrány do cytosolu [101].

Cyt  $b_5$  je do membrány zanořen pomocí C-terminální kotvy. Otázkou však zůstává struktura membránové kotvy a její uspořádání v membráně. Byly navrženy dvě základní možnosti: první předpokládá, že membránová kotva ve formě  $\alpha$ -helixu prochází celou membránou až do lumen endoplazmatického retikula [50,102]. Druhá možnost upřednostňuje vlásenkovité uspořádání kotvy, která zasahuje jen asi do poloviny síly membrány, kde se v pozici Pro115 obrací a směřuje zpět do cytosolu [50,103]. Obě možnosti jsou uvedeny na Obr. 10.



**Obr. 10** Možnosti uspořádání membránové kotvy cyt  $b_5$ . Převzato z [104].

Cyt  $b_5$  je syntetizován na volných ribozomech v cytoplazmě a je posttranslačně vkládán do membrány endoplazmatického retikula bez účasti “signal recognition particles“. Pro vložení cyt  $b_5$  do membrány je důležitý signální úsek deseti AMK na C-terminálním konci, který nese informaci nezbytnou pro nasměrování proteinu do membrány. Zkrácení C-terminálního konce o 11 a více AMK vede ke ztrátě schopnosti nasměrování a ukotvení proteinu do membrány [53]. Prodloužení membránové kotvy o 5 AMK způsobilo transport proteinu do plazmatické membrány COS buněk. Membránová kotva je důležitá pro některé biologické aktivity cyt  $b_5$  [105]. Po odštěpení hydrofobní kotvy je cyt  $b_5$  stále schopný přenášet elektrony na solubilní elektronové

akceptory jako je cytochrom c, ale není schopný přenášet elektrony na mikrosomální cytochromy P450 [51].

### 1.2.1.2 Interakce mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou

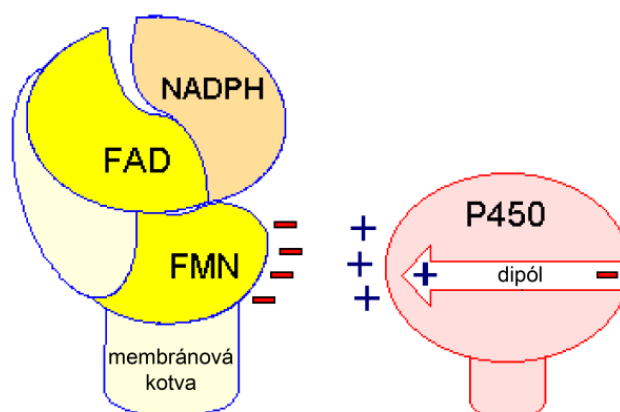
Cytochrom P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa nejsou v MFO systému přítomny v ekvimolárním poměru. Cytochrom P450 je přítomen ve velkém nadbytku oproti NADPH:cytochrom P450 reduktase. Jejich molární poměr nelze zcela jednoznačně určit, protože závisí na aktuálním stavu indukce cytochromů P450. Uvádí se, že v membránách endoplazmatického retikula jaterní tkáně na jednu molekulu reduktasy připadá 10-20 molekul cytochromu P450 [106]. V případě indukce cytochromu P450 fenobarbitalem může být poměr mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou 30:1 [106,107]. Nadbytek cytochromu P450 vyvolává otázku organizace proteinů v membráně. Protože cytochrom P450 vytváří komplex s reduktasou v poměru 1:1 [108,109], musí být reduktasa schopna dodávat elektrony různým cytochromům P450. V případě, že určitý cytochrom P450 má vyšší afinitu pro asociaci s reduktasou, tak elektrony budou přednostně přeneseny na tento cytochrom. Pro cytochromy P450, které jsou méně schopné soutěžit o reduktasu, by měl existovat mechanismus, který jim též umožní přijmout elektrony.

V reakčním cyklu cytochromu P450 je přenos elektronu na komplex cytochrom P450-substrát považovaný za rychlý, ale vykazuje dvoufázovou kinetiku. Rychlý proces je následován pomalejším procesem [110]. Peterson a kol. přišli s konceptem, který by mohl vysvětlovat, jak reduktasa může dodávat elektrony velkému nadbytku cytochromů P450 a proč je redukce cytochromu P450 dvoufázový proces [111]. Z jejich výsledků vyplývá, že až 70 % cytochromů P450 je redukováno v rychlé fázi. A navrhli, že je v membráně několik molekul cytochromu P450 seskupeno kolem jedné molekuly reduktasy. Zbývající molekuly cytochromů P450 jsou redukovány až v pomalejší fázi, když pohybem v membráně dojde k asociaci s reduktasou. Další studie se zabývaly vlivem poměru reduktasy a cytochromu P450 na redukci cytochromu P450. A získaná data nasvědčují, že při zvýšení množství reduktasy dochází ke zvýšení rychlostních konstant pomalé i rychlé fáze, ale množství redukovaného cytochromu P450 v pomalé fázi zůstává neovlivněno [112]. Tyto výsledky jsou v rozporu s předchozími, kdy bylo uvažováno, že v pomalé fázi jsou redukovány cytochromy P450, které jsou vzdálenější od reduktasy. Vliv rozložení cytochromů a reduktas v membráně na redukci cytochromů je předmětem dalšího studia.

Interakce mezi reduktasou a cytochromem P450 jsou ovlivněny několika faktory, typem cytochromu P450 [113-115], iontovou silou media [114,115] a substrátem [116]. K utváření komplexu mezi cytochromem P450 a CPR dochází na základě párování elektrických nábojů, hydrofobních a van der Waalsových interakcí [117,118]. Obecně spolu interagují pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky (Arg a Lys) na proximální straně cytochromu P450 s negativně nabitými aminokyselinovými zbytky (Asp a Glu) na CPR. Úseky na CPR obsahující Asp207-Asp208-Asp209 a Glu213-Glu214-Asp215 jsou pravděpodobně odpovědné za interakci s cytochromem P450 [119]. Modifikací prvního klastru, konkrétně výměnou Asp208 za asparagin, dochází ke snížení  $k_{cat}$  pro cytochrom P450, ale nedochází k poklesu redukce cytochromu c. Modifikací v druhém úseku klesá specifická aktivita pro redukci cytochromu c bez ovlivnění demethylace benzfetaminu, kterou katalyzuje cytochrom P450 [119,120].

Dále cytochrom P450 vytváří dipól s pozitivním nábojem na proximální straně proteinu, kde je hem nejbliže k povrchu molekuly (Obr. 11). Tato část cytochromu P450 se zdá být nejvhodnějším místem pro přenos elektronů z CPR [121].

Hydrofobní síly, ke kterým přispívají nepolární aminokyseliny (Leu, Trp a Val), mohou být zodpovědné za přiblížení dvou proteinů blízko sebe, aby mohlo dojít k přenosu elektronů [122].

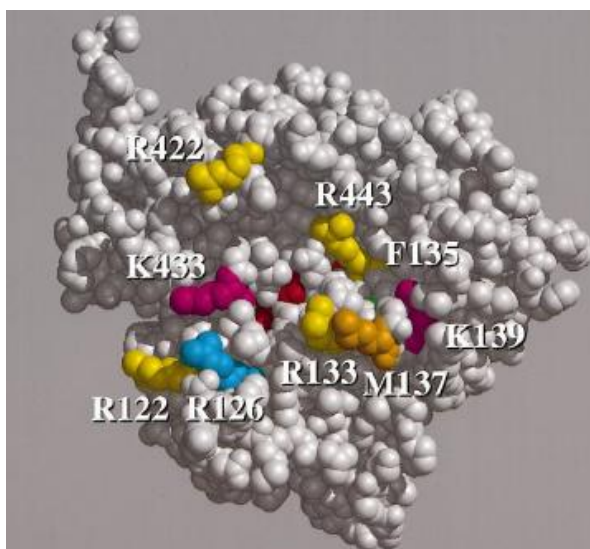


**Obr. 11 Interakce mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou.**  
*Převzato a upraveno z [44].*

#### **Interakce mezi CYP2B4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou**

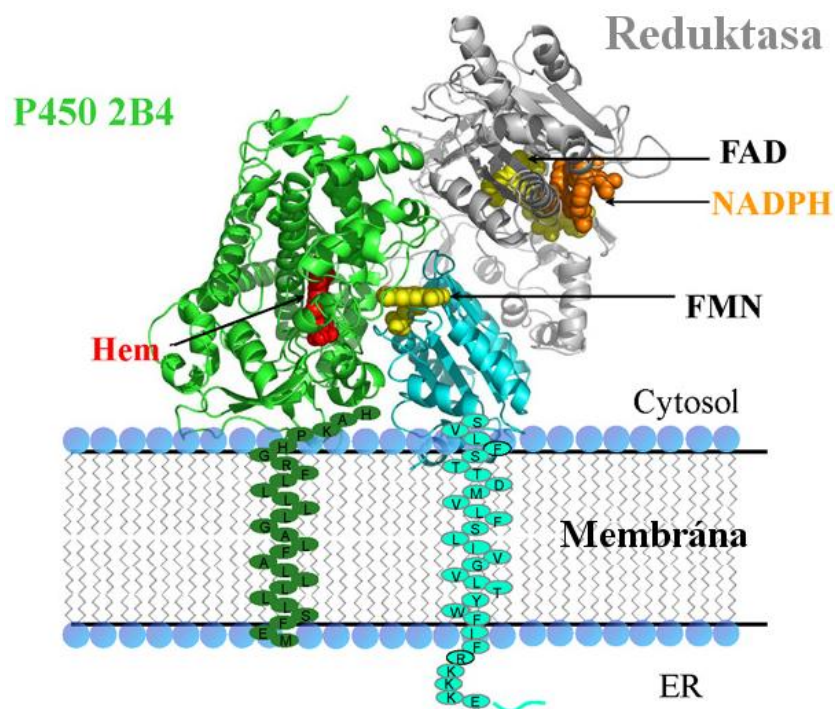
Interakce CYP2B4 a CPR byly předmětem mnoha studií. Byly identifikovány bazické aminokyselinové zbytky na proximálním povrchu CYP2B4, které interagují s kyselými zbytky na CPR. Strobel a kol. chemicky modifikovali 8 Lys v molekule CYP2B1 (85% homologie s CYP2B4) a aktivita CYP2B1 poklesla o 95% [123,124].

Kuriyama a kol. cílenou mutagenézí nahradili silně konzervované Lys a zaznamenali 2-4x sníženou schopnost vázat CPR. Některé z těchto zbytků odpovídají Arg422, Lys433, Lys443 na proximálním povrchu CYP2B4 [125]. Bridges a kol. identifikovali vazebné místo na CYP2B4 pro CPR pomocí homologního modelování a cílené mutagenéze. Za vazbu CPR jsou pravděpodobně odpovědné aminokyselinové zbytky: Arg122, Arg126, Arg133, Phe135, Met137, Lys139, Lys433, Arg422 a Arg443 (Obr. 12). Všechny, kromě Lys433, se vyskytují na proximálním povrchu CYP2B4 blízko hemu a jejich nahrazením alaninem byla snížena schopnost vázat CPR [31].



**Obr. 12 Vazebné místo cytochromu P450 2B4 pro NADPH:cytochrom P450 reduktasu.** Hem a cysteinový ligand jsou označeny červeně; K-Lys, R-Arg, F-Phe, M-Met. Převzato z [31].

Krystalová struktura CPR byla určena v konformaci vhodné pro přenos elektronů mezi flaviny, ve které jsou oba flaviny spojené [46]. Bylo navrženo, že flavinové domény musí být oddělené, aby se FMN-vazebná doména mohla zakotvit v cytochromu P450. Pro podporu toho návrhu byla připravena mutantní CPR, ve které byla odstraněna čtvrtá aminokyselina ve spojovacím úseku mezi FMN-vazebnou doménou a zbytkem proteinu. U této mutantní CPR byly určeny tři konformace, ve kterých byly flaviny vzdáleny 30 – 60 Å [126]. Lze předpokládat, že nemutovaná CPR prodělává stejné konformační změny v průběhu přenosu elektronu z FAD na redoxní partnery [19]. Model komplexu CYP2B4 s otevřenou konformací CPR je uveden na Obr. 13, str. 30.



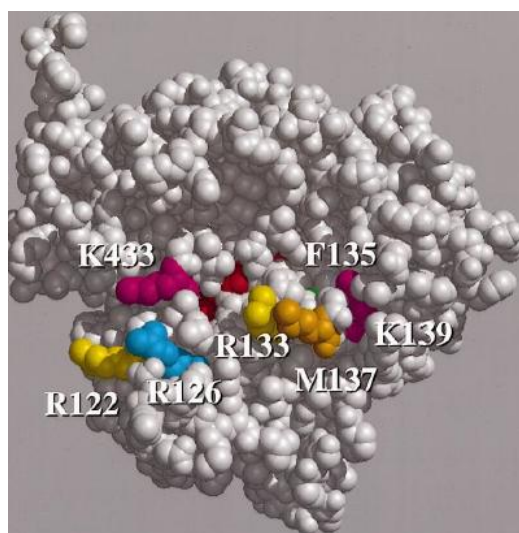
**Obr. 13 Model komplexu cytochromu CYP2B4-CPR v membráně.** CPR je v otevřené konformaci. Převzato a upraveno z [19].

### 1.2.1.3 Interakce cytochromu P450 s cytochromem b<sub>5</sub>

Do interakcí mezi cytochromem P450 a cyt b<sub>5</sub> jsou zapojeny negativně nabitě karboxylové skupiny na cyt b<sub>5</sub> a pozitivně nabitě skupiny na cytochromu P450. Dále se interakcí účastní hydrofobní úsek, který se váže ke komplementárnímu povrchu na cytochromu P450 [127].

#### Interakce mezi cytochromem P450 2B4 a cytochromem b<sub>5</sub>

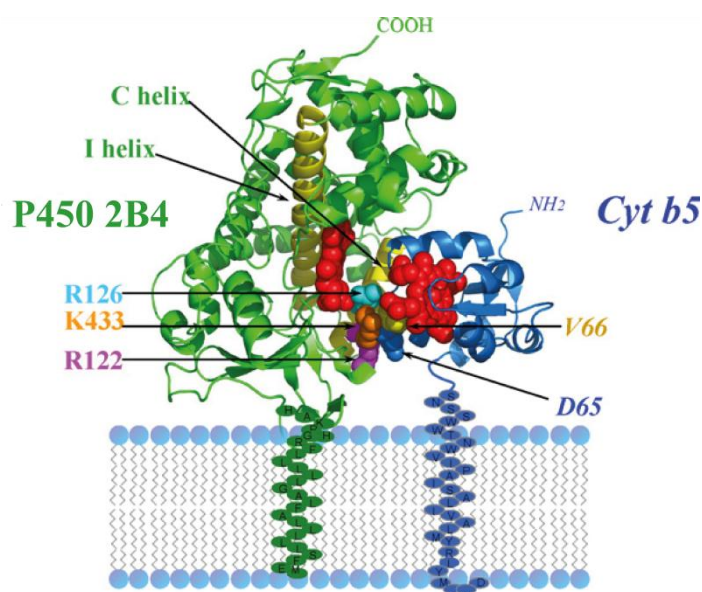
Vazebné místo pro cyt b<sub>5</sub> na CYP2B4 bylo charakterizováno stejně jako v případě s CPR [31]. Bridges a kol. navrhli, že se na vazbě cyt b<sub>5</sub> pravděpodobně podílejí stejné aminokyselinové zbytky jako při vazbě CPR s výjimkou Arg422 a Arg443 (kap. 1.2.1.2). Aminokyselinové zbytky jsou lokalizovány na proximálním povrchu CYP2B4 blízko hemového ligandu Cys436 (Obr. 14, str. 31). Všechny aminokyselinové zbytky, kromě Lys433, se vyskytují buď v C nebo C\* helixu nebo ve smyčce na konci těchto helixů. Lys433 je lokalizován v β-výdutí. Tato studie naznačuje, že se vazebná místa pro CPR a cyt b<sub>5</sub> překrývají, ale cyt b<sub>5</sub> a CPR nemohou být navázány současně.



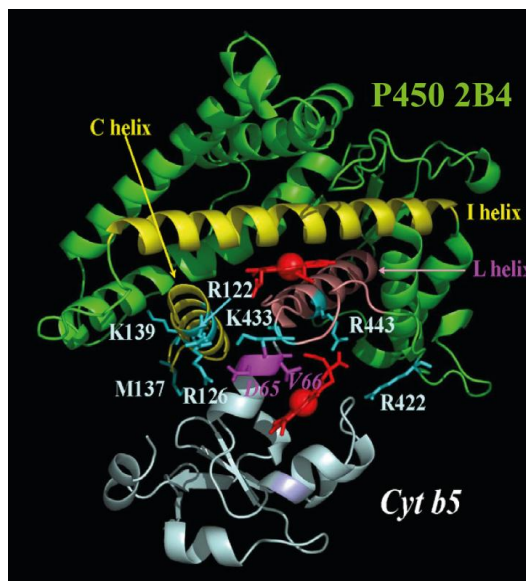
**Obr. 14** Vazebné místo na CYP2B4 pro cytochrom  $b_5$ . Hem a cysteinový ligand jsou označeny červeně; K-Lys, R-Arg, F-Phe, M-Met. Převzato z [31].

Vazba bude záviset na relativní afinitě jednotlivých redoxních partnerů pro cytochrom P450 [30,31]. Překrývající se místa, která nejsou identická, byla zjištěna i v dalších pracích [19,29,30]. Tamburini a Schenkman naopak navrhli, že se vazebná místa pro CPR a cyt  $b_5$  nepřekrývají a jsou oddělená. V jejich práci nebyly identifikovány interagující aminokyseliny, ale bylo prokázáno, že se  $K_m$  pro CPR nelišily v přítomnosti kovalentního komplexu CYP2B4-cyt  $b_5$ , nebo v přítomnosti pouze CYP2B4 [128].

Z dat získaných cílenou mutagenézí byly namodelovány komplexy mezi CYP2B4 a cyt  $b_5$ , které jsou znázorněny na Obr. 15 a Obr. 16, str. 32. V modelech jsou v kontaktu Val66 a Asp65 cyt  $b_5$  a Arg126, Lys433 a Arg122 CYP2B4.



**Obr. 15** Model komplexu cytochrom P450 2B4-cytochrom  $b_5$  vazaný do membrány. V-Val, D-Asp, R-Arg, K-Lys. Převzato a upraveno z [30]



**Obr. 16 Model komplexu cytochrom P450 2B4-cytochrom b<sub>5</sub>. K-Lys, R-Arg, M-Met, D-Asp, V-Val. Převzato a upraveno z [30].**

#### 1.2.1.4 Interakce mezi NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou a cytochromem b<sub>5</sub>

Strittmatter navrhl, že interakce mezi NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou (cyt b<sub>5</sub>R) a cyt b<sub>5</sub> zahrnují elektrostatické interakce mezi pozitivně a negativně nabitými aminokyselinovými zbytky. Konkrétněji interakce zahrnují nábojové párování mezi 3 lysinovými zbytky cyt b<sub>5</sub>R a řadou karboxylových skupin kolem okraje hemu. Lys41 interaguje s Glu52 a/nebo Glu60 cyt b<sub>5</sub> a Lys125 s Glu47 a/nebo Glu48 cyt b<sub>5</sub>. A Lys163 interaguje pravděpodobně s propionylovou skupinou hemu [129]. Účast těchto lysinových zbytků byla potvrzena v další práci, kdy v případě nahrazení lysinových zbytků byla snížena  $k_{\text{cat}}/K_m$  v porovnání s divokým typem cyt b<sub>5</sub> [130]. Dále Bando a kol. zjistili, že jsou možné interakce mezi Glu56 cyt b<sub>5</sub> a Lys163 cyt b<sub>5</sub>R a Asp60 cyt b<sub>5</sub> a Lys162 cyt b<sub>5</sub>R [131]. Nejnověji bylo zjištěno, že se interakcí mohou účastnit i bazické aminokyseliny Arg91, Arg142 a Lys294 na cyt b<sub>5</sub>R. Arg91 interaguje s Asp66 a Glu69 cyt b<sub>5</sub>, Arg142 silně interaguje s Glu59 a Asp60 cyt b<sub>5</sub> a Lys294 může interagovat s Glu37, Glu38, Glu43 a Glu48 cyt b<sub>5</sub>.

#### 1.2.1.5 Interakce mezi cytochromy P450

Základní charakteristikou eukaryotických cytochromů P450 je jejich tendence se shlukovat, která je z velké části připisována hydrofobní povaze membránových regionů. Cytochromy P450 jsou schopné vytvářet agregáty v roztoku, membráně, rekonstituovaném systému i v buněčných systémech [132].

Data získaná analytickou centrifugací [133,134], gelovou filtrační chromatografií [116,135-137] a elektronovou mikroskopií [134,136] indikují, že králičí CYP2B4 a CYP1A2 existují v roztoku jako hexamery až nonamery. Použitím různých detergentů pro solubilizaci homomerních komplexů cytochromu P450 bylo zjištěno, že v agregaci enzymů jsou zapojeny hydrofobní a elektrostatické síly. Neiontové detergenty jsou schopné komplexy degradovat na dimery a ke kompletní solubilizaci je zapotřebí silný amfipatický detergent jako je dodecylsulfát sodný [133,135-138]. Po odštěpení N-terminální sekvence CYP2E1 [139], CYP2B4 [101,140], CYP1A2 [141] a CYP2C3 [142] stále vytvářejí agregáty a asociují s lipidovou membránou, ale mají mírně snížené katalytické schopnosti.

Sledování tvorby agregátů v membránovém prostředí je poněkud obtížnější. Při studiích rotační pohyblivosti bylo zjištěno, že je část cytochromu P450 imobilizována [143,144]. Cytochrom P450 v imobilizovaném stavu je pravděpodobně důsledkem vytváření velkých agregátů cytochromu P450. Procento imobilizovaného cytochromu P450 je ovlivněno složením lipidů, teplotou a relativním poměrem lipid/protein. Při poměru lipid/cytochrom P450 1:1 (w/w) je přibližně 35 % cytochromu P450 imobilizováno. Zvýšením poměru na 10:1 a 30:1 klesá množství imobilizovaného cytochromu P450 na 7 % a 0 %. Velké množství imobilizovaného cytochromu P450 při poměru 1:1 je pravděpodobně v důsledku vysoké koncentrace membránových proteinů [144]. Zajímavé je, že stupeň imobilizace cytochromu P450 je snížen přidáním CPR [143] nebo cyt  $b_5$  [145]. To může znamenat, že cyt  $b_5$  a CPR jsou schopny narušit agregaci cytochromu P450 v membráně.

Rekonstituce proteinů v membráně je problematická vzhledem k množství inkorporovaných proteinů do membrány. Byly navrženy metody, které umožňují inkorporaci proteinů ve velkém množství. Jsou založeny na solubilizaci proteinu s detergentem a následném odstranění detergentu dialýzou, gelovou filtrací nebo adsorpcí [146-148]. Pomocí jedné z těchto metod bylo prokázáno, že jeden cytochrom P450 nejen ovlivňuje funkci druhého, ale také, že tyto cytochromy P450 tvoří heteromerní komplexy v membráně [149].

V buňce bylo metodami FRET [150] a BiFC [151] prokázáno, že králičí CYP2C2 a CYP2C1 dokážou samy asociovat, když jsou exprimovány v endoplazmatické retikulu.

Přítomnost jednoho typu cytochromu P450 v systému může vést k ovlivnění funkce jiného cytochromu P450 a míra ovlivnění může být závislá na přítomnosti substrátu [152].

Byly sestaveny tři modely, podle kterých by mohly fyzikální interakce mezi cytochromy P450 ovlivňovat interakce funkční.

První model předpokládá, že cytochromy P450 nevytváří komplex, ale soutěží o omezené množství CPR [132]. V souladu s tímto modelem je studie, ve které CYP2A6 soutěží o CPR s CYP2E1 [153].

Druhý model navrhuje tvorbu komplexů mezi dvěma cytochromy P450, přičemž nastává konformační změna, která ovlivňuje relativní schopnost cytochromu P450 vázat se na CPR [132]. Tento model byl využit v práci, která se zabývala interakcí mezi CYP1A2 a CYP2B4. 7-pentoxyresorufin-O-dealkylační aktivita CYP2B4 byla výrazně inhibována v přítomnosti CYP1A2, zatímco 7-ethoxyresorufin-O-dealkylační aktivita CYP1A2 byla synergicky stimulována přítomností CYP2B4. Matematickým modelováním vycházejícím z kinetických měření byla získána data odpovídající utvoření komplexu CYP1A2-CYP2B4, ve kterém vykazuje CYP1A dramatické zvýšení afinity k CPR [154].

Třetí model předpokládá, že tvorba komplexu mezi cytochromy P450 ovlivňuje rychlost, s kterou je substrát přeměňován, aniž by byla ovlivněna schopnost cytochromu P450 vázat se na CPR. Ve shodě s tímto modelem je práce, ve které byly zkoumány funkční interakce 5 lidských cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6 a CYP2E1). V této práci bylo zjištěno, že CYP3A4 zprostředkovaný metabolismus testosteronu je stimulován, když je enzym rekonstituován buď s CYP1A1 nebo CYP1A2, ale není ovlivněn v rekonstituovaném systému s CYP2C9, CYP2D6 nebo CYP2E1 [155]. V rekonstituovaném systému bylo dostatečné množství reductasy pro asociaci se všemi cytochromy P450, a proto jsou výsledky v souladu s tím, že komplex P450-P450 mění účinnost přeměny substrátu [132].

### 1.2.2 Metody pro zjišťování protein-proteinové interakce

Pro studium protein-proteinových interakcí existuje celá řada metod. Metody se dají rozdělit do dvou základních skupin: metody, kdy reaguje „záření s hmotou“, a metody, kdy reaguje „hmota s hmotou“. Do první skupiny metod patří například NMR, UV/VIS spektrometrie, fluorimetrické techniky. A do druhé skupiny se dají například zařadit chemické modifikační metody (síťování) nebo cílená mutagenese („site directed mutagenesis“!).

### 1.2.2.1 Síťovací techniky

Síťovacími technikami lze fixovat dočasné funkční komplexy, které vznikají v průběhu katalýzy MFO systémem. Po propojení částí komplexů lze komplex rozštěpit vhodnými peptidasami a vzniklé fragmenty charakterizovat hmotnostní spektrometrií. Tímto postupem lze vytvořit model binárního komplexu a definovat aminokyseliny, které jsou součástí interakčních povrchů a hrají důležitou roli při tvorbě komplexu.

Síťování („crosslinking“) je proces, při kterém jsou propojeny dvě a více molekul kovalentní vazbou. Pro propojení molekul je zapotřebí síťovacího činidla („crosslinkers“) [156].

### 1.2.2.2 Síťovací činidla

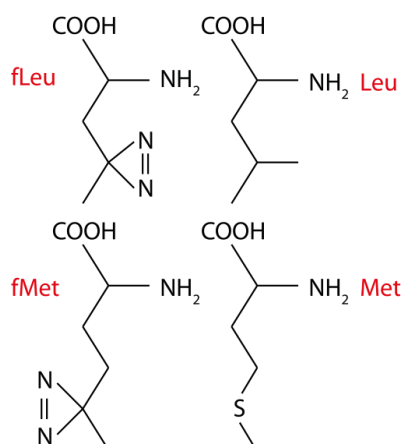
Síťovací činidlo musí splňovat určité požadavky: musí být stabilní a poskytovat stabilní spojení. Nemělo by způsobovat rozsáhlou denaturaci proteinů. Může být disociabilní, což znamená, že by se měl dát vzniklý komplex rozložit. Nesmí být příliš reaktivní, aby nezreagovalo dříve, než se dostane do místa určení. Fotoaktivovatelná činidla musí být aktivovatelná světlem vlnové délky, které závažně nepoškozuje biomakromolekuly. Celkem bezpečné je světlo vlnových délek vyšších než 300 nm. Fotolabilní skupina by v této oblasti měla mít výrazná absorpční maxima garantující dostatečnou účinnost fotolýzy při relativně nízkých výkonech světelných zdrojů. Intermediáty vznikající fotolýzou by měly být vysoce reaktivní s minimální selektivitou. Důležité je i to, aby tyto intermediáty nepodléhaly přesmykům na méně reaktivní deriváty [157].

Síťovací činidla mohou být buď homobifunkční nebo heterobifunkční. Homobifunkční činidla mají dvě identické reaktivní skupiny a často jsou používány k propojení proteinů v jednom kroku. Heterobifunkční činidla mají dvě rozdílné reaktivní skupiny, které umožňují propojení ve dvou krocích a pomáhají minimalizovat nežádoucí polymerace nebo zreagování činidla sama se sebou. Síťovací činidla obsahují reaktivní skupiny, které jsou schopné reagovat se specifickými skupinami na proteinech. Mezi specifické skupiny na proteinech patří zejména: primární aminoskupina (-NH<sub>2</sub>), thiolová skupina (-SH), karboxylová skupina (-COOH) a karbonylová skupina (-CHO) v případě navázaného sacharidu na protein. Reaktivní skupiny na síťovacích činidlech jsou následující: pro karboxylovou skupinu karbodiimid, pro karbonylovou skupinu hydrazin, pro thiolovu maleimid nebo pyridyldisulfid a pro aminoskupinu například iminoester. Když nejsou známy specifické skupiny na proteinu nebo jiné biomakromolekule, je vhodné použít nespécifické reaktivní skupiny, diaziriny a aryl azidy [156,158]. Diaziriny a aryl

azidy patří mezi fotoaktivovatelná činidla. Jsou to chemicky celkem stabilní sloučeniny, které se stávají reaktivní až po aktivaci UV zářením. Jsou vhodné pro studium protein-proteinových interakcí, protože se dají aktivovat až po vytvoření komplexu mezi proteiny. Diaziriny jsou oproti aryl azidům stabilnější a dají se aktivovat vyššími vlnovými délkami (330-370 nm), což zamezuje možnému poškození biomakromolekul [156].

### 1.2.2.3 Příprava a použití fotoaktivovatelných proteinů (foto-sítování)

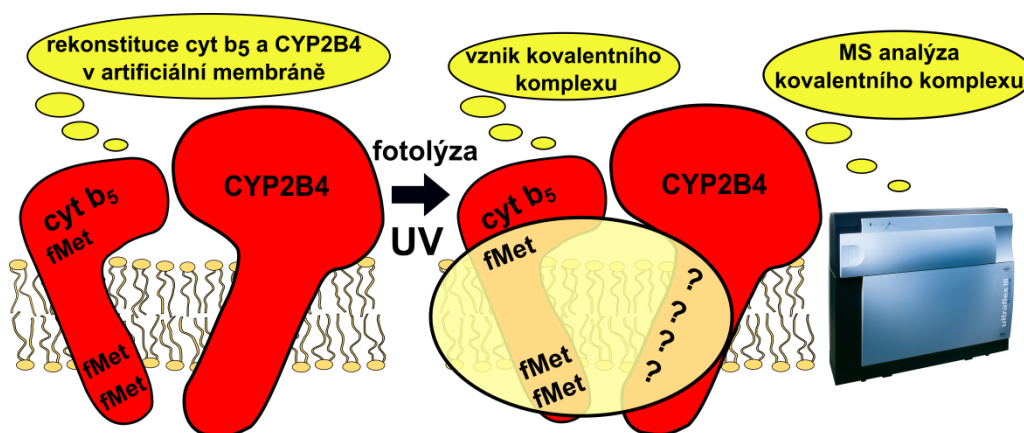
Foto-chemické sítování může být použito ke kovalentnímu zafixování interakcí proteinových komplexů. Hlavní výhodou foto-sítování je možnost sítování uvnitř žijících buněk a větší specifická „zesíťení“ z důvodu krátké životnosti excitovaných intermediátů. Pro foto-sítování je potřeba zavést fotoaktivovatelnou skupinu do proteinu. Možností zavedení této skupiny je inkorporace modifikované aminokyseliny do proteinu během exprese proteinu. Inkorporace modifikovaných aminokyselin do proteinu bez modifikace translačního aparátu jsou vzácné [159] a obvykle omezené na bakterie. A mnoho z nich je založeno na částečné promiskuitě methionin-tRNA synthetasy (MetRS) [160,161]. Další aminoacyl-tRNA synthetasy (aaRSs) jsou více selektivní, a proto nahrazení přirozených aminokyselin je omezeno na případy, které se týkají aminokyselin jako jsou fluorované deriváty leucinu, fenylalaninu a tryptofanu [162]. Tato metoda nepotřebuje speciálně upravené aminoacyl-tRNA synthetasy ani tRNA. Což lze využít k inkorporaci fotoaktivovatelných derivátů aminokyselin, leucinu a methioninu, do proteinu eukaryotickou buňkou [163]. Byly připraveny dvě modifikované aminokyseliny, L-foto-methionin (fMet) a L-foto-leucin [163]. Tyto aminokyseliny jsou strukturně velice podobné L-methioninu a L-leucinu (Obr. 17).



**Obr. 17** Struktury přirozených AMK a fotoaktivovatelných AMK. *fMet* – L-foto-methionin, *fLeu* – L-foto-Leucin

Obě fotoaktivovatelné aminokyseliny (fAMK) obsahují diazirinový kruh, ze kterého se po fotoaktivaci UV zářením odštěpí molekula dusíku a vzniká vysoce reaktivní karbeniový bi-radikál. Karbeniový bi-radikál může vytvářet kovalentní vazbu s blízkým aminokyselinovým řetězcem druhého proteinu nebo jinou molekulou.

Fotoaktivovatelné proteiny by mohly být vhodným nástrojem pro studium protein-proteinových interakcí v rámci MFO systému. V této práci je zkoušena možnost inkorporace foto-methioninu do cyt b<sub>5</sub> a jeho následné použití pro síťování s CYP2B4. Vzniklé kovalentní komplexy a interagující aminokyseliny lze identifikovat hmotnostní spektrometrií. Schéma síťování mezi cyt b<sub>5</sub> a CYP2B4 je zobrazeno na Obr. 18.



**Obr. 18** Schéma síťování mezi cyt b<sub>5</sub> a CYP2B4. *fMet* – *L*-foto-methionin

Cyt b<sub>5</sub> obsahuje 3 methioniny v hydrofobní kotvě a spojovacím úseku, čtvrtý methionin je odštěpován během exprese (Obr. 19). Vzhledem k výskytu methioninů v proteinu, lze touto metodou mapovat interakce proteinů ve fosfolipidové membráně a jejím okolí.

1 (M) AAQSDKDVKYYTLEEIKKHNSKSTWLIILHVKVYDLTKFLEEHPGGEEVLRQAGGDATENFEDVGHST  
71 D ARELSKTFIIGELHPDDRSLKSKPMETLITTVDSNSSWWTNWVIPAISALIVALMYRLYMADD

**Obr. 19** Aminokyselinová sekvence králičího cytochromu b<sub>5</sub> s vyznačenými methioniny. Černě je vyznačena katalytická doména, modře spojovací doména a červeně hydrofobní kotva proteinu.

Při přípravě fotoaktivovatelných proteinů je nezbytné exprimovat proteiny v limitním mediu, které neobsahuje esenciální aminokyseliny (L-methionin a L-leucin). V případě přítomnosti L-methioninu a L-leucinu dochází ke kompetici mezi esenciálními aminokyselinami a fAMK a snižuje se míra inkorporace fAMK. Nevýhodou exprese proteinů v limitním mediu je pokles biosyntézy oproti expresi v kompletním růstovém mediu [163].

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo připravit analog rekombinantního cytochromu  $b_5$  obsahující fotoaktivovatelnou aminokyselinu, L-foto-methionin, místo přírodního methioninu, a ověřit vhodnost tohoto analogu pro mapování protein-proteinových interakcí jednotlivých reakčních partnerů v MFO systému.

K dosažení tohoto cíle bylo nutné splnit řadu dílčích úkolů:

- vypracovat podmínky exprese cytochromu  $b_5$  v *E. coli*
- optimalizovat inkorporace L-foto-methioninu do cytochromu  $b_5$  v expresním systému
- zajistit produkci a purifikaci cytochromu  $b_5$  s vysokým obsahem hemu
- aplikací purifikačního protokolu připravit cytochrom  $b_5$  s inkorporovaným L-foto-methioninem
- ověřit fotoreaktivitu připraveného foto-cytochromu  $b_5$  v systému s CYP2B4
- provést identifikaci vzniklých kovalentní komplexů cytochromu  $b_5$  s CYP2B4

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Použitý materiál a chemikálie

**BIO-RAD, USA**

hydroxylapatit

**Biotium inc., USA**

GelGreen<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain

**Fermentas, Kanada**

Spectra<sup>TM</sup> multicolor broad range – barevný standard pro elektroforézu a metodu „Western blotting“; 2-Log DNA marker

**Fluka, Švýcarsko**

akrylamid; dodecylsulfát sodný (SDS); 2-merkaptoethanol; N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS); tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS); lysozym z vaječného bílku

**Invitrogen, USA**

agarosa

**Lachema Brno / Lachner, Česká republika**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; EDTANa<sub>2</sub> (chelaton 3); glycerol; ethanol; methanol; kyselina octová; NaHCO<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; vlnan sodný; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; KCl; octan sodný; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; bromfenolová modř; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; NaOH; KOH; NaCl; persíran amonný

**Linde, Česká republika**

dusík (g); dusík (l); oxid uhelnatý (g)

**Millipore Corp., USA**

Immobilon<sup>TM</sup> - P transfer membrane (PVDF) – membrána pro metodu „Western blotting“

**New England Biolabs, USA**

restrikční endonukleasy Hind III a NcoI

**PAA, Rakousko**

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

**Pierce Biotechnology, USA**

L-foto-methionin (L-Photo-Methionine)

**Pharmacia, Švédsko**

DEAE-Sepharosa CL6B

**Reanal Budapešť, Maďarsko**

glycin

**Roche Diagnostic, Německo**

tablety proteasových inhibitorů (Complete mini protease inhibitor)

**Serva, Německo**

Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED); triton X-100; ampicilin

**Sevapharma, a.s, Česká republika**

hovězí sérový albumin (BSA)

**Sigma, USA**

Luria broth (LB medium); Luria agar; Terrific broth (modified); isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid (IPTG); Brij 35; 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA); cholát sodný; d<sub>3</sub>-methyl-L-methionin; hemin chlorid; Reactive Red 120–Agarose; sekundární králičí protilátka IgG proti slepičí IgY s navázanou alkalickou fosfatasou; BCIP<sup>®</sup>/NBT Alkaline Phosphatase Substrate – tablety se substrátem pro alkalickou fosfatasu; „SigmaMarker<sup>™</sup> Wide range“ - proteinové standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v prostředí SDS; sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES); Tergitol NP-10

**Stratagene, USA**

bakteriální kmen *E. coli* BL-21 (DE3) Gold

**Thermo Scientific, USA**

DMEM-LM (Dulbecco's Modified Eagle's Limiting Medium)

**Whatman, USA**

chromatografický papír č. 3

**Další materiál:**

- plazmid pET-22b s vloženým genem pro králičí jaterní cyt b<sub>5</sub> byl připraven na katedře biochemie PřF UK RNDr. Věrou Černou, PhD
- plazmid pLW01 s genem pro králičí CYP2B4 byl darován Prof. Lucy Waskell z University of Michigan
- bakteriální kmen *E. coli* DH5a byl získán od RNDr. Marka Ingra, PhD
- slepičí protilátka proti CYP2B4 byla izolována Prof. Petrem Hodkem

**3.2 Použité přístroje****Analytické váhy:**

40 SM-200A (Pesa), HM-200 (A&D Instruments LTD)

**Předvážky:**

440-35-N (Kern), EW 600-2M (Kern), EK-600H (A&D Instruments LTD)

**Centrifugy:**

Beckman LE-80K (Beckman Coulter), Eppendorf 5415 D/R (Eppendorf), Janetzki K70D (MLW), Beckman Allegra X-22R (Beckman Coulter), stolní minicentrifuga (Labnet), stolní minicentrifuga Gilson (GmC Lab)

**Vodní lázně:**

Julabo TW2 (Biotech), Julabo TW8 (Biotech), GFL 1092 (MERCY) – třepací

**Spektrofotometry:**

Spectromom 195D (MOM Budapest), Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena), Specord M40 (Carl Zeiss, Jena), Diod Array 8453 (Hewlett-Packard), Helios  $\alpha$  (Thermo Spectronic)

**Inkubátory:**

IR 1500 Automatic CO<sub>2</sub> Incubator (Flow Laboratories), ORBI-SAFE TS Net Wise (Gallenkamp)

**Elektroforetická aparatura:**

MiniVE Vertical (Amersham Biosciences), MSMINI 10-Multi Sub Mini (Uvitec)

**Zdroj pro elektroforézu:**

EPS 301 Electrophoresis Power Supply (Amersham Pharmacia Biotech)

**Další přístroje:**

fluorimetr Luminiscence Spectrometer LS-55 (Perkin Elmer), MS 1 Minishaker (Schoeller Pharma), pH metr model 370 (Ati Orion), magnetické míchačky HM 2A (Laboratorní přístroje Praha) a KMO2 basic (IKA), orbitální třepačka IKA Yellow line OS2 basic (IKA), sběrač frakcí BioLogic BioFrac (BIO-RAD) a sběrač frakcí model 2128 (BIO-RAD), peristaltická pumpa PP 05 (Laboratorní přístroje Praha), ultrafiltrační cela (Amicon), drtič ledu Solid, homogenizátor dle Pottera a Elvehjema, ultrazvuková sonda Sonopuls HD 3100 (Bandelin), sonikátor ELMasonic E 30 H (P-Lab) bezdotykový kahan Gasprofi2 SCS (VLD-TEC), laminární box BIO 126 (Labox), autokláv Varioklav 400 (H+P Labortechnik), automatické pipety BIOHIT a Nichipet EX (Nichiryo), přístroj pro produkci ultračisté vody Simplicity 185 (Millipore), transluminátor Dark Reader (Clare Chemical Research), ohříváč bloků LS1 (WLM GmbH), vakuový rotační koncentrátor DNA Speed Vac DNA110 (Savant)

**3.3 Metody****3.3.1 Analytické metody****3.3.1.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA**

Koncentrace proteinů byla určována metodou podle Wiechelmana a spol. [164], ve které je využívána schopnost postranních skupin některých aminokyselin redukovat měďnaté ionty přítomné v činidle na ionty měďné. Měďné ionty jsou následně chelatovány 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku modro-fialového komplexu, který se dá stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu v roztoku.

Činidlo potřebné pro stanovení koncentrace proteinu ( $V = 30$  ml) bylo připraveno rozpuštěním 0,3 g BCA ve 29,4 ml roztoku A (0,4 % NaOH; 0,95 % NaHCO<sub>3</sub>; 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,16 % vínan sodný; pH 11,25). Po rozpuštění BCA bylo přidáno 0,6 ml roztoku B (4 % CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O v destilované vodě). Koncentrace BCA byla v činidle 1 % (w/v). Činidlo bylo připraveno těsně před přidáním ke standardům a vzorkům.

Do plastových mikrozkuvek (1,5 ml) bylo pipetováno 20  $\mu$ l vzorku a 980  $\mu$ l činidla. Pro sestavení kalibrační křivky bylo do mikrozkuvek pipetováno 20  $\mu$ l standardu BSA o koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, 1,0 a 1,3 mg/ml a přidáno 980  $\mu$ l činidla. Vzorky, u kterých měla být stanovena koncentrace, byly naředěny destilovanou vodou. Standardy byly stanovovány v duplikátech. Referentní vzorky

a vzorky s neznámými koncentracemi v triplikátech. Po přidání činidla byly vzorky promíchány a inkubovány 60 min při teplotě 60 °C v inkubátoru Julambo TW8. Po inkubaci byla změřena absorbance standardů a vzorků při 562 nm proti referentnímu vzorku, který obsahoval 20 µl destilované vody a 980 µl činidla. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka. Z regresní rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace proteinu ve vzorcích. Vypočtené hodnoty byly následně zprůměrovány. Měření bylo prováděno na spektrofotometru Spektromom 195D v kyvetě o optické dráze 1 cm.

### 3.3.1.2 Stanovení koncentrace foto-cytochromu b<sub>5</sub> z absolutního spektra

Cyt b<sub>5</sub> díky navázanému hemu vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 413 nm. Při vlnové délce 280 nm absorbuje cyt b<sub>5</sub> i apo-cyt b<sub>5</sub>. Koncentrace cyt b<sub>5</sub> a apo-cyt b<sub>5</sub> byla stanovena z absolutního absorpčního spektra s použitím molárních absorpčních koeficientů:  $\varepsilon_{413} = 117 \text{ dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [165,166] a  $\varepsilon_{280} = 29,45 \text{ dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [167].

Koncentrace byly počítány podle následujících vzorců:

$$c_{280} = \frac{A_{280} - A_{309}}{\varepsilon_{280} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

$$c_{413} = \frac{A_{413} - A_{500}}{\varepsilon_{413} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

kde  $c_{280}$  a  $c_{413}$  jsou koncentrace proteinů nebo cyt b<sub>5</sub> při vlnové délce absorpčního maxima (x nm) [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ],  $A_x$  absorbance při vlnové délce x nm,  $\varepsilon_x$  molární absorpční koeficient při vlnové délce x nm [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] a  $l$  optická dráha [cm].

### 3.3.1.3 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Tato metoda využívá charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 v redukováném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm [7].

Do plastové mikrozkušavky o objemu 2 ml byl odměřen vzorek a zředěn fosfátovým pufrům (0,1 M K/PO<sub>4</sub>; 2% glycerol (v/v); pH 7,5) do 2 ml. Vzorek byl promíchán a redukován přidáním 2 mg dithioničitanu sodného. Roztok byl promíchán a rozdělen do dvou kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M40 byla proměřena základní linie v rozmezí 402 – 490 nm. Vzorková kyveta byla probublána slabým proudem oxidu uhelnatého po dobu 45 s a následně bylo proměřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena podle následujícího vztahu:

$$c_{450} = \frac{A_{450} - A_{500}}{\varepsilon_{490} \cdot l} \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

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

### 3.3.1.4 Stanovení aktivity CYP2B4

7-pentoxyresorufin-O-dealkylační (PROD) aktivita byla použita jako „markerová“ reakce pro stanovení aktivity CYP2B4. O-dealkylační aktivita CYPB4 byla měřena v rekonstituovaném systému, který byl připraven z umělé membrány tvořené liposomy (DLPC, dilauroylfosfatidylcholin), NADPH:CYP reduktasy a CYP2B4.

Složení rekonstituovaného systému:

- 100 pmol CYP2B4
- 100 pmol NADPH:CYP reduktasy
- 0,05 mg/ml CHAPS (0,5 mg/ml v pufru HEPES)
- 1 mg/ml DLPC (5mg/ml v chloroformu)
- 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok v H<sub>2</sub>O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H<sub>2</sub>O; pH 7,4)

Nejdříve bylo do skleněných zkumavek odměřeno 20  $\mu\text{l}$  roztoku DLPC v chloroformu o koncentraci 5 mg/ml. Roztok byl odpařen pod atmosférou dusíku, aby se na stěnách a na dně vytvořila vrstvička lipidů. Dále bylo do zkumavky přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku HEPES/CHAPS, 10  $\mu\text{l}$  glutathionu (30 mM) a objem byl doplněn takovým množstvím dH<sub>2</sub>O, aby výsledný objem s později přidaným CYP2B4 a NADPH:CYP reduktasou byl 100  $\mu\text{l}$ . Směs byla sonikována 2 x 3 min pro vytvoření liposomů a byly do ní přidány CYP2B4 (200 pmol) a NADPH:CYP reduktasa (200 pmol). Následně byla směs inkubována 10 min při laboratorní teplotě na orbitální třepačce (IKA Yellow line OS2 basic).

Do dvou plastových mikrozkušavek bylo odměřeno 450  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (100 mM K/PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Do každé mikrozkušavky bylo dále přidáno 50  $\mu\text{l}$  rekonstituovaného systému a 5,62  $\mu\text{l}$  7-pentoxyresorufinu (0,2 mM zásobní roztok v methanolu). Směsi byly inkubovány 2 min za laboratorní teploty. Z každé inkubační směsi byly přemístěny alikvoty (150  $\mu\text{l}$ ) do tří jamek 96-ti jamkové destičky. Do jedné ze

tří jamek bylo přidáno 8,5  $\mu$ l fosfátového pufru (blank) a do dvou zbylých bylo přidáno 8,5  $\mu$ l 10 mM NADPH. Přidáním NADPH byla reakce iniciována. Bezprostředně poté byla měřena fluorescence vzniklého resorufinu na fluorimetru (Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55) v programu FL WinLab<sup>TM</sup> Software. Pro měření byla použita excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 580 nm. Množství vzniklého resorufinu bylo odečteno z kalibrační křivky, která byla sestavena pomocí roztoků, ve kterých bylo 1,875; 3,75; 7,5; 15,0; 22,5; 30,0; 45,0 a 60,0 pmol resorufinu na jamku. K přípravě roztoků byl použit zásobní roztok resorufinu (10  $\mu$ M v methanolu), který byl na výsledné koncentrace ředěn fosfátovým pufrem (100 mM K/PO<sub>4</sub>; pH 7,4).

### 3.3.2 Elektromigrační metody

#### 3.3.2.1 SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

##### Použité roztoky:

**Pufr A:** 0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8

**Polymerační roztok A:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru A

**Pufr B:** (0,125 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); 0,0006% bromfenolová modř; pH 6,8

**Polymerační roztok B:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru B

**Elektrodový pufr:** 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3

**Vzorkový pufr:** 0,025 M Tris-HCl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkptoethanol (v/v); 0,004% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

**Barvicí lázeň:** 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)

**Odbarvovací lázeň:** 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

**8% separační gel:** 5,5 ml pufru A; 2 ml polymeračního roztoku A; 7,5  $\mu$ l TEMED; 75  $\mu$ l 10% persíranu amonného

**15% separační gel:** 3,5 ml pufru A; 3,5 ml polymeračního roztoku A; 7  $\mu$ l TEMED; 70  $\mu$ l 10% persíranu amonného

**4% separační gel:** 2,6 ml pufru B; 400  $\mu$ l polymeračního roztoku B; 3  $\mu$ l TEMED; 60  $\mu$ l 10 % persíranu amonného

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS byla prováděna podle postupu popsáno v práci Laemmliho [168].

Příprava polyakralamidového gelu je popsána pro jeden gel, pro přípravu více gelů bylo postupováno analogicky. Skla (10 x 10 cm) určená pro elektroforézu byla umyta, odmaštěna ethanolem a uchycena do držáku pro přípravu gelů. Pro separaci bakteriálních proteinů s cyt b<sub>5</sub> byl použit 15% separační gel, v případě CYP2B4 byl použit 8% separační gel. Mezi skla byl nanesen roztok pro přípravu separačního gelu, který byl připraven smísením pufru A, polymeračního roztoku A, TEMED a 10 % persíranu amonného (w/v). Následně byl roztok pro přípravu gelu opatrně převrstven destilovanou vodou. Po zpolymerování gelu byla destilovaná voda odlita a povrch gelu byl vysušen filtračním papírem. Na separační gel byl nanesen roztok pro přípravu 4% zaostřovacího gelu, který byl připraven z pufru B, polymeračního roztoku B, TEMED a 10 % persíranu amonného (w/v). Do zaostřovacího gelu byl vložen 10-jamkový hřeben k vytvoření jamek pro vzorky. Po zpolymerování byl hřeben vyjmut a horní elektrodový prostor byl vyplněn elektrodovým pufrem.

Vzorky pro porovnání produkce cyt b<sub>5</sub> (kap. 3.3.4.1) byly ředěny destilovanou vodou tak, aby ve všech vzorcích byl přibližně stejný počet bakterií. Vzorky byly připraveny podle následujícího postupu. Byla zvolena optická denzita při 600 nm 1,24 a objem bakteriální suspenze při této denzitě 4  $\mu$ l. U všech vzorků byl přepočítán objem bakteriální suspenze, aby odpovídal optické denzitě 1,24. Následně byly vzorky doplněny dH<sub>2</sub>O na 20  $\mu$ l. V případech, kdy byla zjišťována čistota a množství proteinů ve frakcích při purifikaci proteinů, bylo z jednotlivých frakcí odebíráno 20  $\mu$ l. Všechny vzorky byly dále ředěny 4x koncentrovaným vzorkovým redukujícím pufrem. Poté byly vzorky povařeny 5 min na vodní lázni, krátce centrifugovány a 20 - 25  $\mu$ l vzorku bylo nanášeno pomocí mikrostříkačky do jamek v zaostřovacím gelu.

Skleněné desky s gelem byly umístěny do elektroforetické vany. Spodní a horní elektrodový prostor aparatury byl vyplněn elektrodovým pufrem. Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání nejdříve 30 min při napětí 80 V, které bylo poté zvýšeno na hodnotu 150 V. Elektroforéza byla ukončena, když čelo s bromfenolovou modří dorazilo ke spodnímu okraji separačního gelu. Následně byl gel vyjmut, odstraněn zaostřovací gel a separační gel přenesen do barvicí lázně a barven 60 min. Po nabarvení byl gel přesunut do odbarvovací lázně, kde byl ponechán odbarvovat přes noc.

V případě provedení elektroforesy pro hmotnostní spektrometrii bylo pracováno s rouškou a příkrývkou hlavy, aby gel nebyl kontaminován jinými proteiny, zejména keratiny, které by mohly rušit detekci proteinu.

### 3.3.2.2 Metoda „Western blotting“

**Přenosový pufr:** 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; pH 8,3

**PBS Triton X-100:** 0,134 M NaCl; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O;  
0,3% (w/v) Triton X-100; pH 7,2

**Blokovací roztok:** 5% sušené odtučněné mléko v PBS Triton X-100

Pro metodu „Western Blotting“ byl gel po ukončení elektroforézy inkubován 15 min. v přenosovém pufru. Chromatografické papíry Whatman č. 3 byly smočeny v přenosovém pufru a PVDF membrána byla ponořena na 30 s do methanolu, 1 min do destilované vody a 5 min do přenosového pufru. Do aparatury pro elektropřenos byly postupně navrstveny 3 kusy chromatografického papíru, membrána, gel a vše bylo převrstveno opět 3 kusy chromatografického papíru. Elektropřenos byl prováděn 45 min při 3,5 mA/cm<sup>2</sup> gelu.

Po skončení elektropřenosu byla membrána přenesena do blokovacího roztoku a nechána blokovat přes noc při 6 °C za stálého míchání. Inkubace se specifickou primární slepičí protilátkou proti CYP2B4 (15 µg/ml) probíhala 120 min za míchání při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opláchnuta PBS Triton X-100 a umístěna do systému SNAP i.d. (Millipore). Primární protilátka byla odmyta pufrům PBS Triton X-100 (3x 15 ml). Dále bylo na membránu nanášeno 1,5 ml roztoku sekundární králičí protilátky IgG proti slepičí IgY s navázanou alkalickou fosfatase (ředění: 1,05 µl zásobní protilátky do 1,5 ml PBS Triton X-100; 1:1429). Sekundární protilátka byla opět odmyta pufrům PBS Triton X-100 (3x 15 ml). Membrána byla vyjmuta z přístroje a po promytí v destilované vodě byla vyvolána roztokem substrátu pro alkalickou fosfatase (BCIP/NBT) v 10 ml destilované vody.

### 3.3.2.3 Agarosová elektroforéza

Tato metoda byla použita pro dělení fragmentů DNA, vzniklých při štěpení plazmidové DNA restrikčními enzymy.

Byl připraven 1% (w/v) roztok agarosy ve 40 ml TAE pufru (0,04 M Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH 8,2). Agarosa byla rozpuštěna pomocí mikrovlnné trouby za občasných míchání. Po ochlazení roztoku (cca 40 °C) byly přidány 2 µl 20000x koncentrovaného barviva GelGreen<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain. Roztok byl promíchán a nalit do elektroforetické vaničky a do gelu byl vložen hřeben pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí gelu (30 min) byl hřeben vyndán a vanička s gelem byla umístěna do elektroforetické aparatury, která byla naplněna TAE pufrům. Do jamek bylo aplikováno 25 µl vzorku, který byl tvořen

20  $\mu$ l směsi štěpené endonukleasami a 5  $\mu$ l vzorkového pufru (40% sacharosa a 0,1% bromfenolová modř). Do jedné jamky bylo nanášeno 6  $\mu$ l roztoku DNA markeru 2-Log DNA Ladder. Elektroforéza probíhala 40 min pod napětím 110 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut a umístěn na transiluminátor v temné místnosti. DNA byla vizualizována a gel byl vyfotografován.

### **3.3.3 Příprava rekombinantního foto-cytochromu $b_5$**

#### **3.3.3.1 Příprava agarových ploten**

LB agar byl připraven rozpuštěním 8 g LB agaru ve 200 ml destilované vody a sterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 20 min. Před použitím byl agarový gel roztaven v mikrovlnné troubě a potřebné množství bylo odlito do zkumavky Falcon (50 ml). Po vychladnutí byl do agaru přidán ampicilin (Amp) v takovém množství, aby byla jeho výsledná koncentrace v roztoku 100  $\mu$ g/ml. Směs byla několikrát promíchána převrácením a do sterilních Petriho misek bylo nalito 10 – 15 ml. Misky byly přikryty víčkem a nechány ztuhnout při laboratorní teplotě.

#### **3.3.3.2 Transformace kompetentních buněk**

Suspenze kompetentních buněk *E. coli* byla nechána rozmraznout na ledu. Po rozmrznutí bylo z alikvotu o objemu 200  $\mu$ l odebráno 100  $\mu$ l do sterilní plastové mikrozkušavky. Do jedné mikrozkušavky byly přidány 2 - 3  $\mu$ l (2  $\mu$ l při transformaci buněk plazmidem pET-22b s králičím genem pro cyt  $b_5$  nebo 3  $\mu$ l při transformaci buněk plazmidem pLW01 s genem pro králičí CYP2B4) plazmidu a do druhé byly přidány 2 - 3  $\mu$ l sterilní destilované vody. Buňky s destilovanou vodou sloužily jako kontrola. Obě směsi byly lehce promíchány poklepem prstu na mikrozkušavku a nechány 30 min na ledu. Následně byl proveden tzv. tepelný šok ("heat shock"), kdy byly buňky vystaveny ve vodní lázni (Julabo TW2) teplotě 42°C po dobu 90 s u buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  a na 25 s v případě expresního kmene *E. coli* BL21(DE3) Gold. Ihned poté byly uloženy na led. Po 2 min bylo do každé mikrozkušavky přidáno 300  $\mu$ l sterilního LB media bez antibiotika. Směsi byly promíchány a inkubovány po dobu 60 min při teplotě 37 °C. Dále bylo na předem připravené plotny s LB agarem, který obsahoval 100  $\mu$ g/ml ampicilinu (Amp), nanášeno a rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou 400  $\mu$ l suspenze buněk. Plotny byly po vsáknutí suspenze obráceny dnem vzhůru a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C v inkubátoru.

### 3.3.3.3 Přeočkování bakteriálních buněk *E. coli* metodou „single-cell“

Touto metodou byly připravovány bakteriální kultury, které rostly přes noc (O/N kultury) a byly použity k zaočkování většího množství media.

Práce byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu. Z agarové plotny transformovaných buněk byla vybrána jedna dobře izolovaná kolonie. Špičkou sterilního párátko byla napíchnuta vybraná kolonie a párátko bylo vloženo do zkumavky Falcon (50 ml) s 5 ml LB media s Amp o koncentraci 100 µg/ml. Zkumavka byla nechána pootevřena a inkubována v orbitální třepačce (ORBI-SAFE TS Net Wise) přes noc při 37 °C a 200 RPM.

### 3.3.4 Kultivace bakterií a produkce foto-cytochromu b<sub>5</sub>

#### 3.3.4.1 Optimalizace použité koncentrace fMet

LB medium (30 ml) v Erlenmayerově baňce (100 ml) bylo sterilizováno autoklávováním při 121 °C po dobu 20 min. LB medium bylo temperováno na 37 °C a byl přidán Amp do výsledné koncentrace 100 µg/ml. Následně bylo medium zaočkováno předem připravenou O/N kulturou na počáteční optickou denzitu 0,07 při 600 nm (OD<sub>600</sub>). Po změření počáteční optické denzity byl z květy odebrán vzorek (500 µl) pro elektroforézu. Vzorek byl odstředěn (3 min, 6000 RPM, RT, centrifuga Eppendorf 5415 D/R). Medium bylo odlito a peleta byla resuspendována ve 100 µl destilované vody. Zaočkované medium bylo kultivováno při 37 °C a 200 RPM v orbitální třepačce. Každou hodinu byly odebírány vzorky, měřena jejich optická denzita a byly dále zpracovány podle předchozího postupu. Když optická denzita kultury dosáhla hodnoty okolo 1, byla kultura odstředěna (15 min, 4500 RPM, RT., Beckman Allegra X-22R s úhlovým rotorem 4250). LB medium bylo odlito a peleta byla resuspendována ve 30 ml sterilního PBS pufru (0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; pH 7,2) a znovu odstředěna (5 min, 4500 RPM, RT, Beckman Allegra X-22R s rotorem 4250). Peleta byla PBS pufrem promyta ještě 2x za stejných podmínek. Po promytí byla peleta resuspendována ve 30 ml DMEM-LM s Amp o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Po 20 min bylo do media přidáno 5,25 mg D,L-leucinu ( $c_{\text{Leu}} = 1,6 \text{ mM}$ ) a foto-methinonin (fMet), aby jeho koncentrace v mediu byla 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 mM. Po dalších 10 min byla do kultury přidána  $\delta$ -aminolevulová kyselina ( $\delta$ -ALA) a isopropylthio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (IPTG) v takovém množství, aby výsledná koncentrace  $\delta$ -ALA byla 0,5 mM a IPTG 1 mM. Přidáním IPTG byla indukována produkce cyt b<sub>5</sub>. Kultura byla

kultivována další 4 hod. Opět byla každou hodinu měřena optická denzita a odebírány vzorky. Proteiny ve vzorcích byly rozděleny SDS elektroforézou a zóny s cyt  $b_5$  byly analyzovány hmotnostní spektrometrií.

Další optimalizace byly prováděny pouze s koncentracemi fMet 0,5 a 2 mM. Postup byl stejný jako v předešlém odstavci s tím rozdílem, že medium nebylo zaočkováno O/N kulturou, ale na plotnu s vyrostlými koloniemi byl nanesen 1 ml LB media a v něm byly bakterie resuspendovány. Touto suspenzí bylo medium zaočkováno a bakterie byly převedeny do DMEM-LM, když  $OD_{600}$  dosáhla hodnoty 0,6.

### **Optimalizace inkorporace foto-methioninu do cytochromu $b_5$**

Byla provedena tři různá uspořádání kultivace bakterií a následná produkce foto-cyt  $b_5$ .

V prvním případě (P1) bylo ve zkumavce Falcon připraveno 30 ml DMEM-LM media, které obsahovalo 1,96 mg fMet ( $c_{\text{fMet}} = 0,5 \text{ mM}$ ), 5,25 mg D,L-leucinu ( $c_{\text{Leu}} = 1,6 \text{ mM}$ ) a Amp ( $c_{\text{Amp}} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ). Na plotnu s transformovanými bakteriemi *E. coli* BL21 (DE3) Gold byl nanesen 1 ml DMEM-LM media a byla vytvořena suspenze bakterií, z které bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  a přeneseno do zkumavky Falcon. Bakteriální buňky byly kultivovány při 37 °C a 200 RPM. Po dosažení  $OD_{600}$  0,6 bylo přidáno IPTG a  $\delta$ -ALA v takovém množství, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM a  $\delta$ -ALA 0,5 mM. Protein byl produkován po dobu 4 hod a po 1 hod byly odebírány vzorky pro hmotnostní analýzu inkorporace fMet do cyt  $b_5$ .

V druhém případě (P2) bylo LB medium rovnou zaočkováno příslušným množstvím bakterií, aby  $OD_{600}$  byla 0,6 a aby bylo sníženo množství odumřelých buněk. Na plotnu s transformovanými bakteriemi *E. coli* BL21 (DE3) Gold byl nanesen 1 ml sterilního LB media a byla vytvořena suspenze bakterií. Celý 1 ml byl přenesen do zkumavky Falcon (50 ml) s 29 ml sterilního LB media, které obsahovalo Amp o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Po přenesení bakterií do LB media měla kultura  $OD_{600}$  0,6 a bakterie byly promyty a přeneseny do 25 ml DMEM-LM s Amp ( $c_{\text{Amp}} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) již zmíněným způsobem viz. výše. Po 20 min byly přidány aminokyseliny ve stejném množství jako v prvním případě. Po dalších 10 min bylo přidáno IPTG a  $\delta$ -ALA v takovém množství, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM a  $\delta$ -ALA 0,5 mM. Protein byl produkován po dobu 4 hod a po 1 hod byly odebírány vzorky pro hmotnostní analýzu inkorporace fMet do cyt  $b_5$ .

Ve třetím případě (P3) byl na plotnu s transformovanými bakteriemi *E. coli* BL21 (DE3) Gold nanesen 1 ml sterilního LB media a byla vytvořena suspenze bakterií. Ze suspenze bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  a přeneseno do 30 ml sterilního LB media s Amp

( $c_{\text{Amp}} = 100 \mu\text{g/ml}$ ) ve zkumavce Falcon. Bakteriální kultura byla kultivována při 37 °C a 200 RPM. Po dosažení  $\text{OD}_{600}$  0,6 byly bakterie promyty a přeneseny do DMEM-LM s Amp ( $c_{\text{Amp}} = 100 \mu\text{g/ml}$ ). Dále byl postup stejný jako v P2.

### 3.3.4.2 Produkce foto – cytochromu $b_5$ pro izolaci

Kultivace byla prováděna v 6 zkumavkách Falcon o objemu 50 ml. Nejprve byla připravena bakteriální kultura, která byla použita pro zaočkování zkumavek. Z předem připravené plotny transformovaných bakterií *E. coli* BL21 (DE3) Gold bylo přeneseno několik kolonií do 15 ml LB media s Amp o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Bakteriální kultura byla kultivována při 37 °C a 200 RPM. Když optická denzita kultury dosáhla hodnoty cca 0,6, byly přeneseny 2 ml kultury do zkumavky Falcon, která obsahovala 30 ml sterilního LB media s Amp o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Následovala kultivace za stejných podmínek. Když opět optická denzita kultury dosáhla hodnoty 0,6, byla kultura podrobena centrifugací (5 min, 4500 RPM, RT, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250) a supernatant byl odlit. Peleta byla resuspendována ve 40 ml PBS pufru a centrifugována za výše uvedených podmínek. Resuspendace v PBS pufru a centrifugace byly opakovány ještě 2x. Peleta byla resuspendována ve 30 ml DMEM-LM s Amp ( $c_{\text{Amp}} = 100 \mu\text{g/ml}$ ). Po 20 min bylo do zkumavky přidáno 5,25 mg D,L-leucinu a 1,96 mg fMet ( $c_{\text{fMet}} = 0,5 \text{ mM}$ ). Po dalších 10 min bylo přidáno IPTG a  $\delta$ -ALA v takovém množství, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM a  $\delta$ -ALA 0,5 mM. Protein byl produkován 1 hod při 37 °C a 200 RPM. Po jedné hodině byl odebrán vzorek pro hmotnostní analýzu a zbytek kultury byl centrifugován (5 min, 4500 RPM, RT, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250). Peleta byla resuspendována v pufru pro resuspendování pelet (10 K/PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); pH 7,7) a celkový objem byl upraven na 25 ml. Suspenze byla uchovávána při - 80 °C.

### 3.3.5 Izolace foto - cytochromu $b_5$ z bakteriálních buněk

#### 3.3.5.1 Izolace membránové frakce

Suspenze (kap. 3.3.4.2) o objemu 25 ml byla nechána rozmraznout. Následně byla do suspenze přidána 1 tableta proteasových inhibitorů (“complete mini protease inhibitor“). Buňky byly rozrušeny sonikací pomocí sondy TE 76 ponořené ve vzorku. Bylo provedeno 8 sonikačních cyklů trvajících 2,5 min při výkonu sondy 40 W. Při provádění sonikace byly buňky drženy na ledu a mezi jednotlivými cykly byly chlazeny 5 min ledovou drtí. Zbytky buněk a nerozrušené buňky byly odstraněny centrifugací (15 min, 4500 RPM,

4 °C, Beckman Allegra X-22R s úhlovým rotorem 4250). Supernatant byl přelit do ultracentrifugační kyvety a odstředěn (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, ultracentrifuga Beckman LE-80K s úhlovým rotorem Ti 70). Supernatant byl oddělen a peleta byla homogenizována ve fosfátovém pufru (20 mM K/PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); pH 7,7) a objem byl upraven na 25 ml. V takto získané suspenzi byla stanovena koncentrace proteinů.

### 3.3.5.2 Solubilizace foto - cytochromu b<sub>5</sub> z membrán

Všechny následující postupy byly prováděny v chlazené místnosti při teplotě 4 °C. Membránová frakce byla naředěna fosfátovým pufrům (20 mM K/PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); pH 7,7) na výslednou koncentraci proteinů 4 mg/ml. Následně byla přidána další tableta proteasových inhibitorů. Pro solubilizaci membrán byla do suspenze za stálého míchání po kapkách přidávána směs 30% Brij 35 a 10% cholát sodný (w/v) v takovém množství, aby jejich obsah v roztoku byl 1 mg detergentu na 1 mg proteinu. Dále byl do směsi po kapkách přidán 10 mM hemin v ekvimolárním množství s koncentrací proteinů v membráně (63,5 μl). Roztok byl inkubován za stálého míchání 2 hod na ledu. Nerozpuštěné podíly byly odstraněny centrifugací (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, ultracentrifuga Beckman LE-80K s úhlovým rotorem Ti 70). Supernatant obsahující solubilizovaný foto-cyt b<sub>5</sub> byl nanesen na kolonu s DEAE-Sepharosou CL6B.

### 3.3.5.3 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

DEAE-Sepharosa (V = 10 ml) byla před použitím promyta 3 x 50 ml destilované vody, rozmíchána v 50 ml cyklizačního pufru (1 M K/PO<sub>4</sub>; pH 7,7) a nechána přes noc při 4 °C. Druhý den byla znovu rozmíchána v novém cyklizačním pufru, promyta 3 x 150 ml destilované vody. Voda byla odsáta pomocí vývěvy a gel byl rozmíchán v 50 ml pufru pro nalévání kolony (20 mM K/PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); pH 7,7). Po usazení nosiče byl pufr co nejvíce odstraněn pomocí vývěvy a ve zbývajícím pufru byl nosič rozmíchán a 10 ml bylo vneseno do kolony (1,3 x 15 cm). Po usazení nosiče byla kolona ekvilibrována 90 ml ekvilibračního pufru (20 mM K/PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); 0,6% Brij 35; pH 7,7). Supernatant se solubilizovaným foto-cyt b<sub>5</sub> byl nanášen na kolonu rychlostí 1 ml/min a byly jímány frakce o objemu cca 3 ml. Foto-cyt b<sub>5</sub> byl zachycen na nosiči. Po nanesení vzorku byla kolona promývána ekvilibračním pufrům do poklesu absorbance při 280 nm na hodnotu nižší než 0,005. Foto-cyt b<sub>5</sub> byl eluován lineárním gradientem 2 x 100 ml 0 – 400 mM KCl v ekvilibračním

puftru. U všech frakcí byla změřena absorbance při 413 nm proti první frakci a byl vytvořen graf závislosti absorbance na objemu elučního puftru (eluční profil). U vybraných frakcí byla zjištěna čistota cyt b<sub>5</sub> pomocí SDS elektroforézy. Frakce s vysokým podílem cyt b<sub>5</sub> a dostatečnou čistotou byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací v aparatuře Amicon s membránou PM-10 (Millipore). Zahuštěné frakce byly dialyzovány proti 2 l dialyzačního puftru (15 mM K/PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); 0,3% Brij 35; pH 7,7).

Detergent Brij 35 byl odstraněn rechromatografií na koloně DEAE-Sepharosy (1,3 x 15 cm), která byla připravena stejně jako v předchozím případě s tím rozdílem, že byla ekvilibrována rozdílným ekvilibračním pufrem (15 mM K/PO<sub>4</sub>; 1mM EDTA; 20% glycerol (v/v); 0,1% cholát sodný (w/v); pH 7,7). Objem nosiče byl 10 ml. Zahuštěný a dialyzovaný preparát foto-cyt b<sub>5</sub> byl na kolonu nanášen rychlostí 0,4 ml/min. Byly jímány frakce o objemu 4 ml při nanášení, 5 ml při promývání kolony a frakce o objemu 3 ml při eluci foto-cyt b<sub>5</sub> z kolony. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml ekvilibračního puftru pro odmytí detergentu Brij 35. Foto-cyt b<sub>5</sub> byl následně eluován izokraticky pufrem o vysoké iontové síle (200 mM K/PO<sub>4</sub>; 200 mM KCl; 1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); pH 7,7). V jímáných frakcích byly měřeny absorbance při 280 a 413 nm a frakce, které měly hodnotu absorbance při 413 nm minimálně 6 % z maximální hodnoty vrcholu v elučním profilu, byly spojeny a dialyzovány proti 2 l dialyzačního puftru (50 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); pH 7,7). Dialýzou byl odstraněn cholát sodný. Výsledný preparát byl zahuštěn ultrafiltrací (membrána PM-10, Millipore) na 2 ml, rozdělen na alikvoty (200 µl), zamražen v kapalném dusíku a skladován při - 80 °C. Po zjištění nízké koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub> byl preparát zakoncentrován filtrací (13200 RPM, 16100xg, Eppendorf 5415 R) přes filtr Microcon YM-10 Regenerated celulóse 10000 MWCO na 200 µl).

### **3.3.6 Příprava rekombinantního CYP2B4**

#### **3.3.6.1 Extrakce plazmidu pLW01-2B4 z filtračního papíru**

Plazmid pLW01-2B4 byl poskytnut Prof. Lucy Waskell z University of Michigan. Filtrační papír s plazmidem byl pomocí pinzety přenesen do mikrozkmavky Eppendorf (0,5 ml). Do mikrozkmavky bylo přidáno 50 µl TE puftru (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0). Filtrační papír s pufrem byl míchán pomocí Vortexu 30 s a následně inkubován 15 min při laboratorní teplotě. K transformaci bakteriálních buněk *E. coli* DH5α bylo použito 5 µl roztoku plazmidu.

### 3.3.6.2 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována z bakteriálního kmenu *E. coli* DH5 $\alpha$ , který byl transformován plazmidem pLW01-2B4 (kap. 3.3.3.2.).

Z LB-agaru byla přenesena 1 kolonie *E. coli* DH5 $\alpha$  s plazmidem pLW01-2B4 do 10 ml sterilního LB media s Amp (100  $\mu$ g/ml). Buňky byly nechány růst přes noc při 37 °C a 200 RPM. Druhý den byly buňky centrifugovány (5 min, 4500 RPM, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250) a supernatant byl odlit. Peleta buněk byla resuspendována v 200  $\mu$ l GTE pufru (50 mM glukosa; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0) a přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky Eppendorf. Suspenze bakterií byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 300  $\mu$ l čerstvě připraveného lyzačního roztoku (0,2 M NaOH; 1% SDS) a směs byla promíchána několikrát převrácením. Směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 200  $\mu$ l ledově vychlazeného roztoku K-AC (3 M CH<sub>3</sub>COOK; 2 M CH<sub>3</sub>COOH; pH 5,4) a směs byla po dobu 10 s míchána převrácením. Následně byla směs centrifugována (10 min, 15000 g, 4 °C, Eppendorf 5415 D/R). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky Eppendorf a při pipetování byl odečten objem přeneseného supernatantu (550  $\mu$ l). Byl přidán stejný objem roztoku fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a směs byla protřepána a centrifugována (5 min, 15000g, 4 °C, Eppendorf 5415 D/R). Vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky Eppendorf a při pipetování byl opět odečten objem (350  $\mu$ l). K vodné fázi byl přidán stejný objem isopropanolu a směs byla silně protřepána a nechána precipitovat po 10 min na ledu. Následovala centrifugace (20 min, 15000g, 4 °C, Eppendorf 5415 D/R) a isopropanol byl odstraněn. K peletě bylo přidáno 200  $\mu$ l vychlazeného (-20 °C) 75% ethanolu a pomocí pipety byla peleta resuspendována. Resuspendovaná peleta byla centrifugována (2 min, 15000 g, 4 °C, Eppendorf 5415 D/R), ethanol byl odsát vývěvou a peleta byla usušena v přístroji SpeedVac. K usušené peletě bylo přidáno 100  $\mu$ l TE pufru a 0,5  $\mu$ l RNasy (10 mg/ml) a necháno inkubovat do rozpuštění pelety v 50 – 55 °C a následně 10 min ve 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 60  $\mu$ l roztoku PEG (2,5 M NaCl; 20% polyethylenglykol 8000) a směs byla chlazená ledovou tříští 1 hod. Znovu byla směs centrifugována (15 min, 15000g, 4 °C, Eppendorf 5415 D/R). Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 170  $\mu$ l vychlazeného 75% ethanolu. Následovala další centrifugace (2 min, 15000 g, 4 °C, Eppendorf 5415 D/R), ethanol byl odstraněn pomocí vývěvy a peleta byla usušena na přístroji SpeedVac. K peletě bylo přidáno 20  $\mu$ l TE pufru a necháno inkubovat při 50 - 55 °C do rozpuštění pelety. Izolovaná plazmidová DNA byla uchovávána při -20 °C.

### 3.3.6.3 Restrikční analýza plazmidu pLW01-2B4

Restrikční analýza byla použita pro ověření plazmidu, který byl namnožen v buňkách *E. coli* DH5 $\alpha$  a z buněk izolován (kap. 3.3.6.2.).

Pro štěpení byly vybrány restrikční endonukleasy NcoI a HindIII. NcoI štěpí těsně před začátkem genu a HindII štěpí za genem pro CYP2B4.

#### Reakční směs se skládala z:

<b>5 <math>\mu</math>l</b>	<b>plazmidové DNA</b>
<b>2 <math>\mu</math>l</b>	<b>10x konc. pufru NEbuffer 2</b> (1x konc. pufr: 10 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; pH 7,9)
<b>11 <math>\mu</math>l</b>	<b>sterilní dH<sub>2</sub>O</b>
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	<b>NcoI</b> (10 U NcoI; 10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 200 $\mu$ g/ml BSA, 50% glycerol; pH 7,4)
<b>1 <math>\mu</math>l</b>	<b>HindIII</b> (20 U HindIII; 10 mM Tris-HCl; 250 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 500 $\mu$ g/ml BSA; 50% glycerol; pH 7,4)

Reakce probíhala v plastové mikrozkušavce (200  $\mu$ l) 2 hod při 37 °C. Vzniklé fragmenty DNA byly analyzovány na agarosové elektroforéze (kap. 3.3.2.3.).

### 3.3.6.4 Produkce cytochromu P450 2B4

Produkce CYP2B4 byla prováděna v bakteriálním kmeni *E. coli* BL21 (DE3) Gold. Bakteriální kmen byl transformován izolovaným plazmidem pLW01-2B4 (kap. 3.3.3.2.).

Nejdříve byla připravena O/N kultura bakteriálního kmene, která byla použita k zaočkování většího množství media. Její příprava je popsána v kapitole 3.3.3.3. Do sterilního TB media (500 ml) temperovaného na 37 °C bylo přidáno takové množství Amp, aby jeho výsledná koncentrace v mediu byla 100  $\mu$ g/ml. Medium bylo zaočkováno O/N kulturou na počáteční OD<sub>600</sub> 0,05. Buňky byly nechány růst při 30 °C a 140 RPM na orbitální třepačce. Když optická denzita kultury dosáhla hodnoty přibližně 4, byly do kultury přidány  $\delta$ -ALA a IPTG v takovém množství, aby jejich výsledná koncentrace byla 0,5 mM. Protein byl produkován 36 hod při 23 °C a 110 RPM. Produkce byla ukončena odstředěním buněk (20 min, 3000 RPM, 4 °C, centrifuga Janetzki K70D). Peleta byla resuspendována v resuspendačním pufru (0,1 M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); pH 7,4) a celkový objem byl upraven na 25 ml. Suspenze byla uchovávána při - 80 °C.

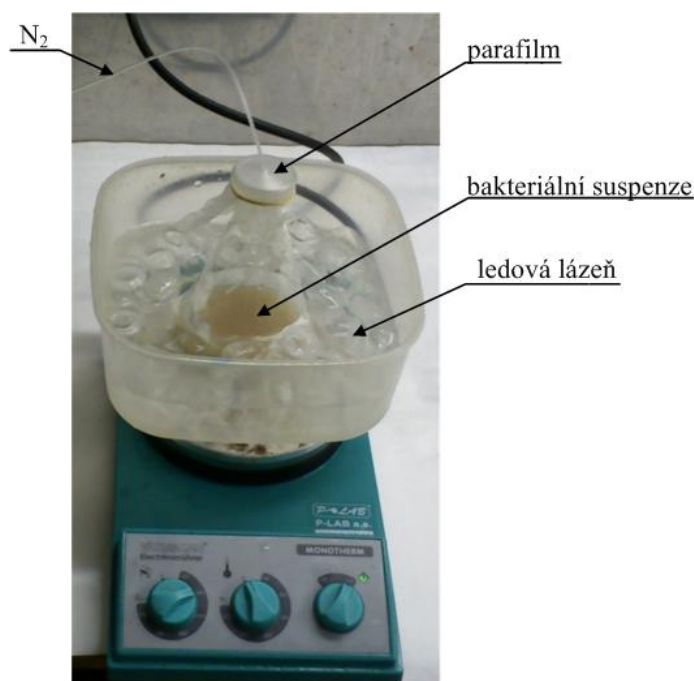
### 3.3.7 Izolace cytochromu P450 2B4

Základní postup izolace CYP2B4 byl poskytnut Prof. Lucy Waskell a Dr. Sang-Choul Imem spolu s plazmidem pLW01-2B4 (osobní sdělení Prof. Lucy Waskell a Dr. Sang-Choul Im). Pro izolaci CYP2B4 byl tento postup ještě upraven.

Všechny postupy byly prováděny v chlazené místnosti při teplotě cca 4 °C.

#### 3.3.7.1 Příprava sféroplastů

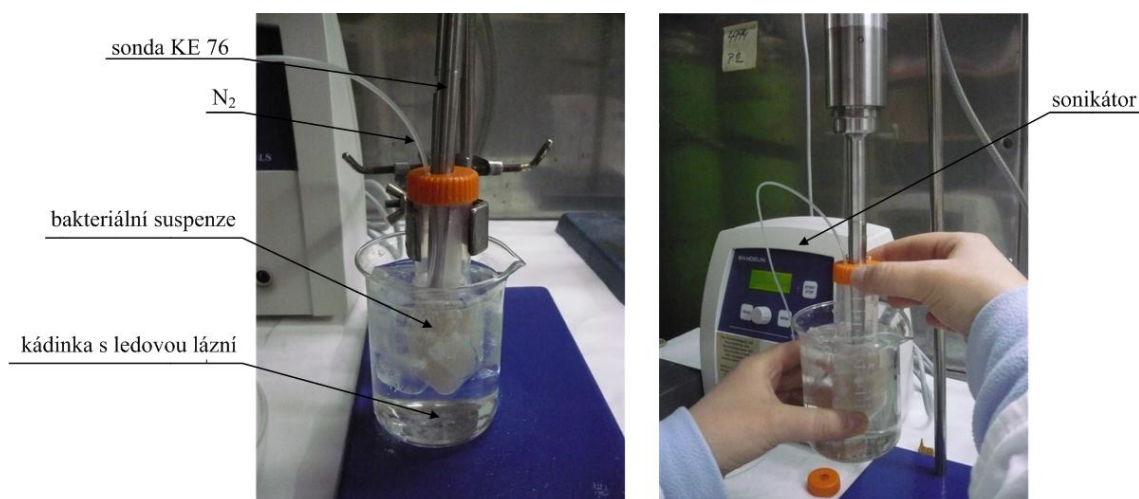
Bakteriální suspenze (kap. 3.3.6.4.) o objemu 40 ml byla rozmrazena při laboratorní teplotě. Po rozmrznutí byla suspenze centrifugována (10 min, 4500 RPM, 4 °C, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250). Supernatant byl odlit a peleta buněk byla resuspendována ve 100 ml pufru (100 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; 0.4% Tergitol NP-10 (w/v); 0,1 mg/ml DTT; pH 7,7;), do kterého byly před použitím přidány 2 tablety proteasových inhibitorů, 16 mg lysozymu a 0,4 mg DNasy I. Směs byla přelita do Erlenmayerovy baňky (250 ml) a míchána pod atmosférou dusíku 45 min v ledové lázni. Použitá aparatura je zobrazena na Obr. 20. Poté byla směs rozdělena do 4 zkumavek Falcon (50 ml) po přibližně 25 ml a zmrazena na – 80 °C.



Obr. 20 Použitá aparatura při přípravě sféroplastů

### 3.3.7.2 Sonikace buněk a solubilizace CYP2B4

Druhý den byly zmražené suspenze (kap. 3.3.7.1.) nechány rozmraznout při laboratorní teplotě. Buňky držené na ledu byly rozbity sonikací pomocí sondy KE 76 ponořené ve vzorku (6 sonikačních cyklů trvajících pokaždé 20 s, 70% amplituda s 5 min ochlazením mezi každým cyklem). Sonikace byla prováděna pod atmosférou dusíku a je znázorněna na Obr. 21.



**Obr. 21 Sonikaci bakteriální suspenze.** a) sestavená aparatura při provedení sonikace; b) provedení sonikace, při které bylo zkumavkou Falcon a vodní lázni pohybováno pro lepší rozrušení buněk

Zbytky buněk a nerozrušené buňky byly odstraněny centrifugací (10 min, 4500 RPM, 4 °C, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250). V supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů metodou BCA (kap. 3.3.1.1) a supernatant byl naředěn na výslednou koncentraci proteinů 6 mg/ml pufrém (100 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; 0,1 mg/ml DTT; 0,4% Tergitol NP-10 (w/v); pH 7,7). Pro solubilizaci membrán byl do suspenze za stálého míchání po kapkách přidán cholát sodný do výsledné koncentrace 1,5% (w/v). Solubilizace probíhala za stálého míchání a pod atmosférou dusíku 2 hod. Nerozpuštěné podíly byly odstraněny centrifugací (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, ultracentrifuga Beckman LE-80K s úhlovým rotorem Ti 70). Supernatant obsahující solubilizovaný CYP2B4 byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu s DEAE-Sepharosou CL6B.

### 3.3.7.3 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

DEAE-Sepharosa (V = 100 ml) byla před použitím promyta 3 x 400 ml destilované vody, rozmíchána v 500 ml cyklizačního pufru (1 M Tris-acetát; pH 7,7) a nechána přes noc při 4 °C. Druhý den byla znovu rozmíchána v cyklizačním pufru, promyta 3 x 400 ml destilované vody. Voda byla odsáta pomocí vývěvy a Sepharosa byla

rozmíchána ve 200 ml pufru pro nalévání kolony (20 mM Tris-acetát; pH 7,7). Po usazení nosiče byl pufr co nejvíce odstraněn pomocí vývěvy a ve zbývajícím pufru byl nosič rozmíchán a 100 ml bylo vneseno do kolony (1,6 cm x 70 cm). Po usazení nosiče byla kolona ekvilibrována 600 ml ekvilibračního pufru (20 mM Tris-acetát; 0,1 mM EDTA; 0,3% Tergitol NP-10 (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,7). Při ekvilibraci kolony bylo porovnáváno pH a vodivost ekvilibračního pufru a eluátu. Vzorek se solubilizovaným CYP2B4 byl nanášen na kolonu rychlostí 1 ml/min a byly jímány frakce o objemu cca 13,5 ml. Po nanesení vzorku na kolonu byla kolona promyta 220 ml ekvilibračního pufru. Proteiny, které se na koloně zachytily, byly eluovány izokraticky nejdříve ekvilibračním pufrům s 200 mM KCl (V = 120 ml), a poté ekvilibračním pufrům s 400 mM KCl (V = 120 ml). Objem jímáných frakcí byl 4 ml. U všech frakcí byla proměřena absorbance při 417 nm proti první frakci a byl vytvořen graf závislosti absorbance na objemu, který protekl kolonou (eluční profil). U vybraných frakcí byla provedena SDS elektroforéza pro zjištění čistoty CYP2B4. Frakce, které měly dostatečnou čistotu a hodnotu absorbance při 417 nm minimálně 10 % z maximální hodnoty vrcholu v elučním profilu, byly spojeny a nanесeny na kolonu s nosičem Reactive Red 120-Agarose.

#### 3.3.7.4 Chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose

Reactive Red 120-Agarosa o objemu 30 ml byla 2x promyta 200 ml destilované vody. Po usazení nosiče byla voda odstraněna pomocí vývěvy a nosič byl ve zbytku vody rozmíchán a vnesen do kolony (1,2 x 30 cm). Kolona byla ekvilibrována ekvilibračním pufrům (20 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); 0,1 mM EDTA; pH 7,4) dokud se nerovnálo pH a vodivost ekvilibračního pufru s pH a vodivostí eluátu. Spojené frakce z DEAE-Sepharosy (170 ml) byly nanáшeny na kolonu rychlostí 0,4 ml/min a byly jímány frakce o objemu 7 ml. Po nanesení vzorku byla kolona promyta cca 300 ml ekvilibračního pufru. Navázané proteiny byly eluovány elučním pufrům (100 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); 1 M NaCl; 0,3% Tergitol NP-10 (w/v); 0,1 mM EDTA; pH 7,7) rychlostí 0,5 ml/min. Frakce byly jímány po 2 ml. U frakcí byla změřena absorbance při 417 nm. U vybraných frakcí byla provedena SDS elektroforéza. Frakce s vysokým podílem čistého proteinu a hodnotou absorbance při 417 nm minimálně 10 % z maximální hodnoty vrcholu v elučním profilu, byly spojeny. Spojené frakce byly zahuštěny ultrafiltrací v aparatuře Amicon s membránou PM 30 (Millipore). Zahuštěné frakce byly dialyzovány přes noc proti 2 x 2 l dialyzačního pufru 1 (10 mM K/PO<sub>4</sub>; 0,1 mM EDTA; 20% glycerol (v/v); pH 7,7). Dialyzovaný vzorek byl nanесen na kolonu hydroxylapatitu.

### 3.3.7.5 Chromatografie na hydroxylapatitu

Při práci s hydroxylapatitem byly všechny roztoky filtrovány přes filtr s póry 0,22  $\mu\text{m}$ , aby nedocházelo k zneprůchodnění hydroxylapatitu nečistotami.

Hydroxylapatit byl rozmíchán v destilované vodě a nechán hydratovat (1 g suchého nosiče poskytuje 3 ml gelu v koloně). Následně byl promyt 2x 100 ml destilované vody pro vymytí nečistot. Přebytečná voda byla odsáta pomocí vývěvy a nosič se zbytkem vody byl rozmíchán a 6 ml bylo vneseno do kolony (1 x 15 cm). Kolona byla ekvilibrována 90 ml ekvilibračního pufru (5 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); 0,1 mM EDTA; pH 7,5). Kolona byla považována za ekvilibrovanou, když se pH a vodivost ekvilibračního pufru přibližně rovnaly pH a vodivosti eluátu. Vzorek získaný chromatografií na Red Agarose byl nanášen na hydroxylapatit rychlostí 0,3 ml/min a byly jímány frakce o objemu 3 ml. Po nanesení vzorku byla kolona promývána 60 ml ekvilibračního pufru a CYP2B4 byl následně eluován lineárním gradientem 0 – 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2x 150 ml) v ekvilibračním pufru (rychlost eluce 0,4 ml/min). Při aplikaci gradientu byla zvýšena teplota v chladicí místnosti na 10 °C, aby nedocházelo ke krystalizaci KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> uvnitř kolony. Byly jímány frakce o objemu 3 ml a u všech frakcí byla proměřena absorbance při 417 nm. U vybraných frakcí byla provedena SDS elektroforéza, aby byla zjištěna čistota proteinu v jednotlivých frakcích. Frakce s vysokým obsahem čistého proteinu byly spojeny, zahuštěny ultrafiltrací v aparatuře Amicon (membrána PM-30, Millipore) a dialyzovány přes noc proti 2 l dialyzačního pufru 2 (5 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); pH 7,5).

Zbývající detergent (Tergitol NP-10) byl odstraněn rechromatografií na koloně hydroxylapatitu. Do kolony (1 x 15 cm) byly vneseny 3 ml nosiče a kolona byla ekvilibrována 80 ml ekvilibračního pufru 2 (5 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); pH 7,5). Ekvilibrace byla sledována pomocí pH a vodivosti pufrů. Dialyzovaný vzorek z předešlého hydroxylapatitu byl nanášen na kolonu rychlostí 0,3 ml/min a byly jímány frakce o objemu 1 – 2 ml. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 40 ml ekvilibračního pufru. Objem jímaných frakcí při promývání byl 2 ml. Navázaný CYP2B4 byl izokraticky eluován elučním puftrem (400 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% cholát sodný (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,5). Před izokratickou elucí byla opět zvýšena teplota v chladicí místnosti na 10 °C. U všech frakcí byla změřena absorbance při 417 nm na spektrofotometru Helios  $\alpha$ . Frakce s vysokým podílem CYP2B4 byly spojeny a dialyzovány přes noc proti 2 l dialyzačního pufru 3 (50 mM K/PO<sub>4</sub>; 20% glycerol (v/v); pH 7,5). Výsledný preparát byl zahuštěn ultrafiltrací (Amicon ultra 30K – NMWL 30000, Millipore) na 1,2 ml, rozdělen na alikvoty (100  $\mu\text{l}$ ), zmražen v kapalném dusíku a skladován při - 80 °C.

## 4. Výsledky

### 4.1 Optimalizace produkce cytochromu b<sub>5</sub> s inkorporovaným foto-methioninem

Na základě pilotních experimentů byly nalezeny vhodné podmínky pro pokusy s inkorporací modifikovaných aminokyselin do cyt b<sub>5</sub> [169].

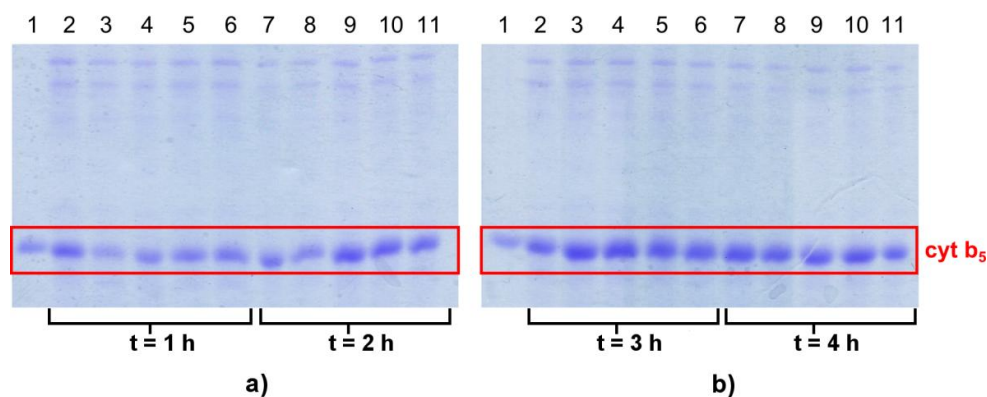
Nejdůležitější kroky exprese lze shrnout následovně. Bakterie *E.coli* BL21(DE3) Gold s plazmidem pro králičí cyt b<sub>5</sub> byly nechány růst v LB mediu při 37 °C do optické hustoty (OD<sub>600</sub>) 1. Následně byly bakterie přeneseny do DMEM-LM s d<sub>3</sub>-methyl-L-methioninem (dMet) a protein byl produkován 4 hodiny. Inkorporace deuterované aminokyseliny byla potvrzena hmotnostní spektrometrií. Ze sekvence nalezených peptidů vyplývá, že byly inkorporovány 3 dMet a záměna methioninu za dMet probíhá zcela [169].

Podmínky pro produkci cyt b<sub>5</sub> s inkorporovaným fMet bylo nutné dále optimalizovat především z pohledu koncentrace použitého fMet a doby, po kterou bude protein exprimován.

#### 4.1.1 Optimalizace koncentrace foto-methioninu v DMEM-LM mediu

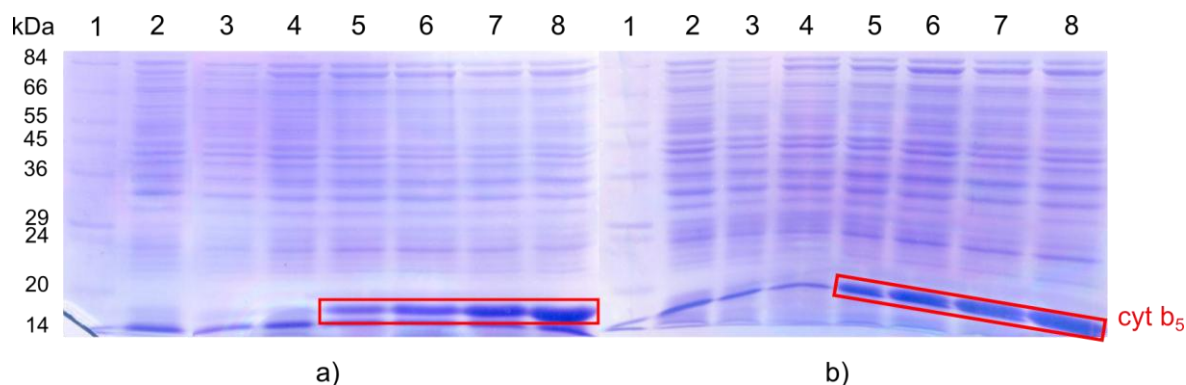
Výrobce (Thermo Scientific) této aminokyseliny uvádí jako vhodnou koncentraci 0,2 mM. Podle literárních údajů je vhodné k expresi proteinu s fMet použít koncentraci až 1,7 mM [163]. Proto byla zkoušena produkce cyt b<sub>5</sub> s různými koncentracemi fMet (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 mM). Před produkcí foto-cyt b<sub>5</sub> byly bakterie 3x promyty PBS pufrem, aby došlo k odstranění LB media, které obsahuje přirozený L-methionin. Dále byly bakterie převedeny do limitního media (DMEM-LM), které přirozený L-methionin neobsahuje, a kultivovány 20 min, aby došlo k vyčerpání zbývajícího L-methioninu. Teprve poté byl přidán fMet a zahájena produkce. Produkce byla srovnávána pomocí elektroforézy ve vzorcích odebraných po 1 až 4 hod. Všechny vzorky byly ředěny na přibližně stejný počet buněk (kap. 3.3.2.1). Z Obr. 22 (str. 61) je patrné, že se protein v přítomnosti fMet produkuje a produkce cyt b<sub>5</sub> na koncentraci fMet příliš nezávisí. Množství proteinu postupně přibývá od 1 do 4 hod, ale vzorky s různou koncentrací fMet se v příslušném čase zřetelně nelišily, a proto i minimální koncentrace fMet 0,2 mM se jeví jako dostatečná. U všech vzorků byl exprimovaný cyt b<sub>5</sub> podroben hmotnostní analýze, z níž vyplynulo, že k inkorporaci fMet za těchto podmínek nedochází a do proteinu je začleňován přirozený L-methionin. Musely být provedeny kroky pro další snížení L-methioninu v expresním systému. Pro další snížení množství L-methioninu

v systému a zvýšení inkorporace fMet byla snížena optická denzita ( $OD_{600}$ ), při které je indukována produkce foto-cyt  $b_5$  z 1 na 0,6 a k zaočkování media nebyla použita O/N kultura, ale bakterie z plotny. Tyto kroky měly snížit výskyt mrtvých buněk, z kterých mohou bakterie zpětně získávat L-methionin.



**Obr. 22 Elektroforetické porovnání produkce cyt  $b_5$  s proměnnou koncentrací fMet.** Produkce cyt  $b_5$  po 1. a 2. hod (a), po 3. a 4. hod (b). 1 – standard králičího cyt  $b_5$ ; 2 a 7 – koncentrace fMet 0,2 mM; 3 a 8 – konc. fMet 0,5; 4 a 9 – konc. fMet 1,0 mM; 5 a 10 – konc. fMet 1,5 mM; 6 a 11 – konc. fMet 2,0 mM.

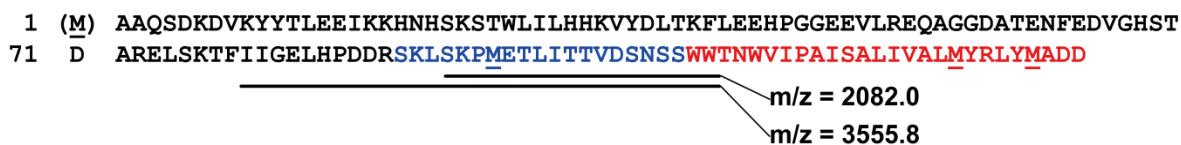
Pro další ověření inkorporace fMet byly vybrány pouze koncentrace fMet 0,5 a 2,0 mM a foto-cyt  $b_5$  byl exprimován za výše zmíněných podmínek. Opět byly odebírány vzorky po 1 hod a to po dobu 4 hod a separovány pomocí SDS elektroforézy (Obr. 23). Zóny obsahující cyt  $b_5$  byly analyzovány hmotnostní spektrometrií.



**Obr. 23 Elektroforetické rozdělení proteinů při expresi cyt  $b_5$ .** a) produkce foto-cyt  $b_5$  při koncentraci fMet 0,5 m; b) produkce foto-cyt  $b_5$  při koncentraci fMet 2,0 mM; 1 - standard molekulových hmotností (Sigma marker), 2 – růst bakterií v LB mediu, 3 – vzorek bakterií po přenosu do DMEM-LM, 4 – vzorek bakterií před indukcí IPTG, 5 až 8 – produkce po 1 až 4 hod.

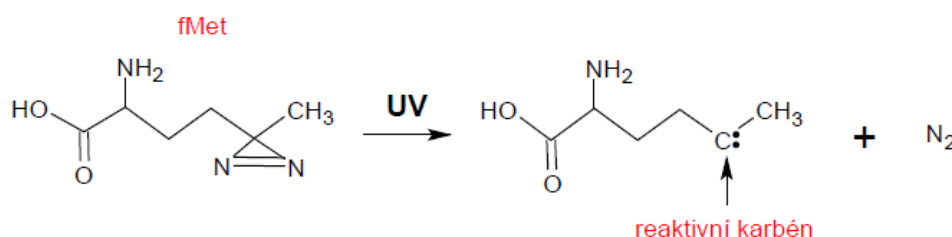
Proteiny byly proteolyticky štěpeny chymotrypsinem a vzniklé peptidy byly identifikovány technikou MALDI-TOF (provedeno Mgr. Tomášem Ječmenem). Byly

nalezeny dvě dvojice peptidů cyt b<sub>5</sub>, které obsahovaly methionin a inkorporovaný fMet (Obr. 24).

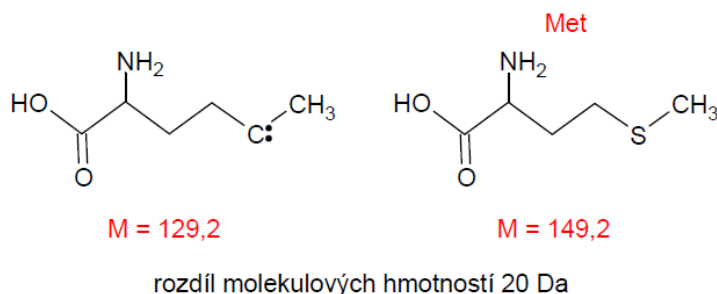


**Obr. 24 Primární sekvence králíčího cytochromu b<sub>5</sub> s vyznačenými peptidy, které byly identifikovány ve vzorku cyt b<sub>5</sub> hmotnostní spektrometrií. Černě je vyznačena katalytická doména, modře spojovací doména a červeně hydrofobní kotva proteinu. Dále jsou vyznačeny dva peptidy, které obsahují methionin a mají poměr m/z 2082.0 a 3555.8. Všechny Met v sekvenci jsou podtrženy a (M) je N-terminální Met odštěpovaný během produkce.**

Dvojice peptidů se lišila o hodnotu m/z 20 (Obr. 25), což odpovídá odštěpení molekuly N<sub>2</sub> po ionizaci (Obr. 26).



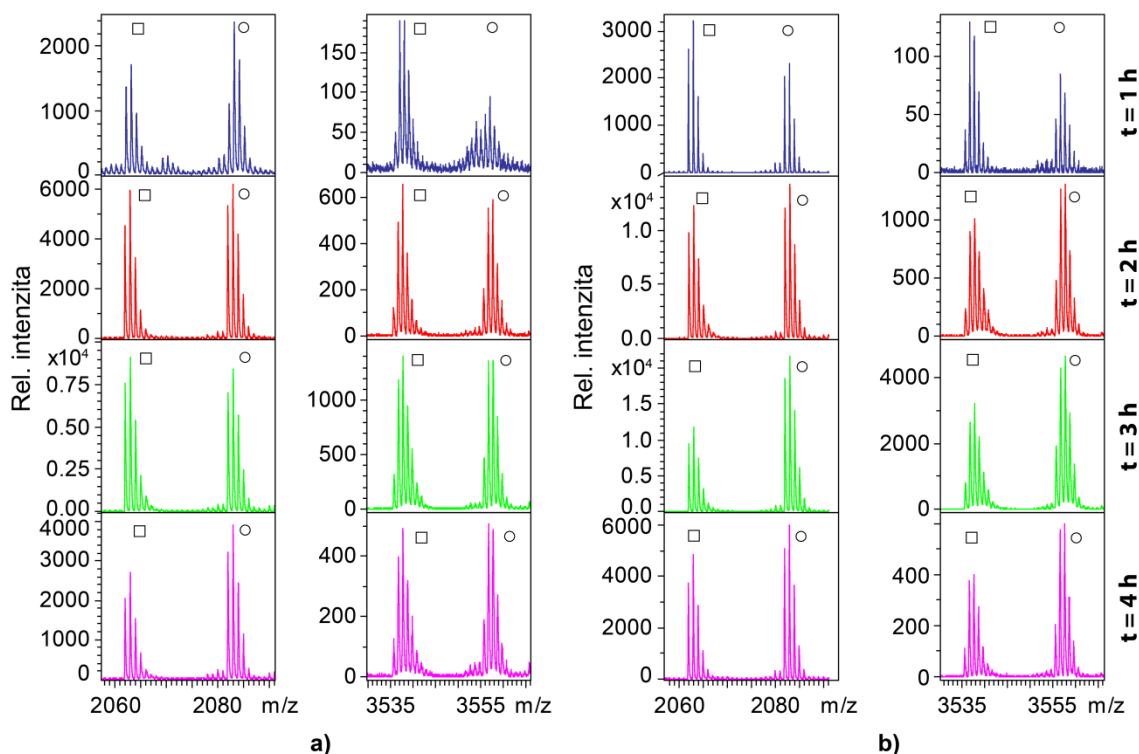
**Obr. 25 UV fotolýza diazirinového analogu methioninu (fMet), při které vzniká vysoce reaktivní karben**



**Obr. 26 Rozdíl mezi molekulovou hmotností methioninu a produktem fotolýzy fMet (reaktivní karben), který má molekulovou hmotnost o 20 Da nižší**

Srovnáním intenzit signálu peptidu s fMet a peptidu s Met lze určit relativní poměr těchto dvou peptidů v analyzované směsi (Obr. 27, str. 63). Nepatrně výhodnější poměr byl zjištěn u cyt b<sub>5</sub>, který byl produkován s koncentrací fMet 2,0 mM (1 hod produkce). Míra inkorporace fMet je nejvyšší po 1 hodině exprese a s rostoucím časem se snižuje. Snižování míry inkorporace je lépe znatelné u cyt b<sub>5</sub>, který byl produkován v mediu s koncentrací fMet 2,0 mM. Přestože byl poměr peptidu fMet/Met nepatrně vyšší

u koncentrace fMet 2,0 mM, bylo vzhledem k nákladnosti chemikálie pokračováno s koncentrací 0,5 mM.



**Obr. 27** Hmotnostní spektrum chymotryptických štěpů cyt  $b_5$ , znázorňující závislost poměru intenzit peptidů obsahujících fMet/Met na délce produkce proteinu. Peptidy obsahující fMet a Met cyt  $b_5$ , který byl produkován v mediu s  $c_{fMet} = 0,5$  mM (a) a  $c_{fMet} = 2,0$  mM (b). □ - peptid obsahující fMet a ○ - peptid obsahující Met.

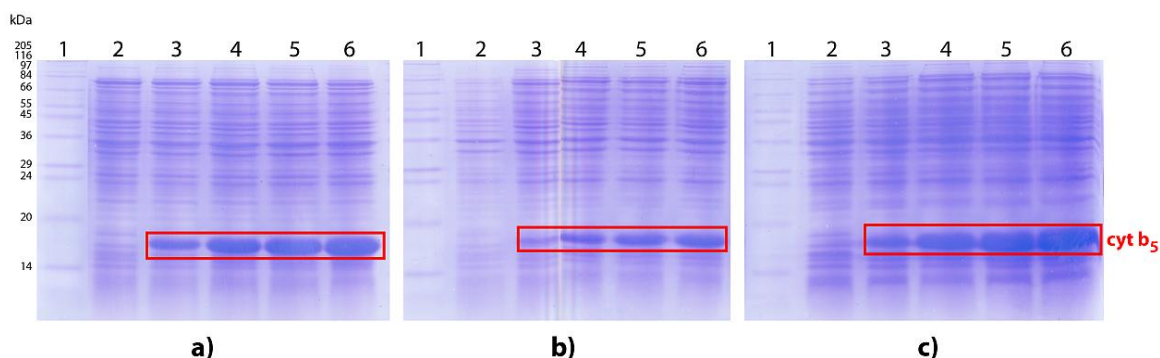
Po této optimalizaci v malých objemech byla provedena produkce cyt  $b_5$  v 500 ml media. Produkce byla ukončena po 1 hod a byl odebrán vzorek pro hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometrie u tohoto vzorku prokázala nízkou inkorporaci fMet, a proto byly podmínky produkce foto-cyt  $b_5$  dále optimalizovány.

#### 4.1.2 Optimalizace inkorporace foto-methioninu do cytochromu $b_5$

Byla provedena tři různá uspořádání kultivace bakterií a následná produkce foto-cyt  $b_5$ :

1. růst bakterií a produkce cyt  $b_5$  v DMEM-LM mediu [P1]
2. zaočkování LB media bakteriemi z plotny na optickou denzitu 0,6 při 600 nm (bez růstu bakterií), poté ihned odstranění LB media a přenesení do DMEM-LM, produkce v DMEM-LM mediu [P2]
3. růst bakterií v LB mediu, přenesení a produkce v DMEM-LM [P3]

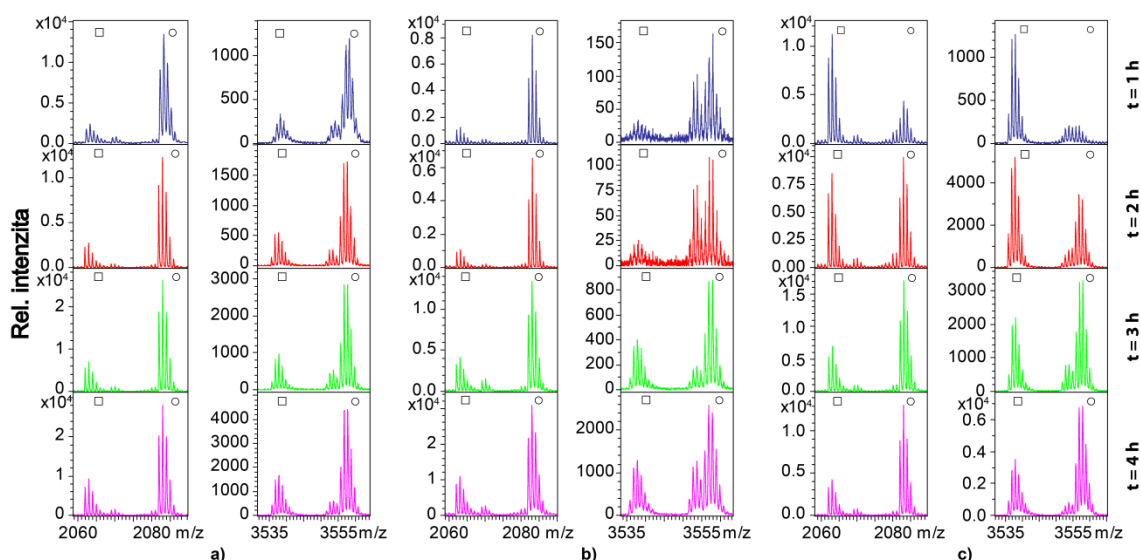
Ve všech případech byla použita koncentrace fMet 0,5 mM. Vzorky byly odebrány stejně jako při optimalizaci koncentrace fMet a byly podrobeny elektroforetické separaci (Obr. 28) a následné hmotnostní analýze.



**Obr. 28** Elektroforetická separace proteinů pro hmotnostní analýzu inkorporace fMet do cyt  $b_5$  při různém uspořádání produkce. a) růst a produkce cyt  $b_5$  v DMEM-LM mediu (P1), b) zaočkování LB media na  $OD_{600}$  0,6, okamžité převedení do DMEM-LM a produkce v DMEM-LM mediu (P2), c) růst bakterií v LB mediu, přenesení a produkce cyt  $b_5$  v DMEM-LM (P3); 1 – standard molekulových hmotností (Sigma marker), 2 – vzorek bakterií před indukcí IPTG, 3 až 6 – produkce cyt  $b_5$  v čase 1 až 4 hod.

Proteiny byly opět proteolyticky štěpeny chymotrypsinem a vzniklé peptidy byly identifikovány technikou MALDI-TOF (Obr. 29, str. 65). Byly porovnávány závislosti poměrů intenzit peptidů obsahujících fMet a Met na délce produkce proteinu. S prodlužující se dobou produkce cyt  $b_5$  se relativní množství inkorporovaného fMet snižuje. Nezávisle na použitých podmínkách se jeho zastoupení po 4 hod produkce ustaluje na 25-30%. Z Obr. 29 (str. 65) je patrné, že nejvýhodnější podmínky pro inkorporaci byly v případě P3 po 1 hod produkce - c).

Z porovnání získaných výsledků je zřejmé, že optimální podmínky pro produkci foto-cyt  $b_5$  byly dosaženy, když byl objem media 30 ml, medium bylo zaočkováno bakteriemi přímo z plotny, růst bakterií byl v LB mediu, po dosažení optické denzity při 600 nm 0,6 byly bakterie převedeny do DMEM-LM media, po 20 min byly přidány fMet ( $c_{\text{fMet}} = 0,5$  mM) a D,L-Leu ( $c_{\text{D,L-Leu}} = 1,6$  mM) a po dalších 10 min byla exprese zahájena přidáním IPTG ( $c_{\text{IPTG}} = 1$  mM). Foto-cyt  $b_5$  byl produkován při 37 °C po dobu 1 hod.



**Obr. 29** Hmotnostní spektrum chymotryptických štěpů cyt  $b_5$ , znázorňující závislost poměru intenzit peptidů obsahujících fMet/Met na délce produkce proteinu. *a)* růst bakterií a produkce cyt  $b_5$  v DMEM-LM mediu (P1), *b)* přenesení bakterií do LB media, odstranění LB media a produkce v DMEM-LM mediu (P2), *c)* růst bakterií v LB mediu, přenesení a produkce cyt  $b_5$  v DMEM-LM (P3);  $\square$  - peptid obsahující fMet a  $\circ$  - peptid obsahující Met.

## 4.2 Izolace foto-cytochromu $b_5$

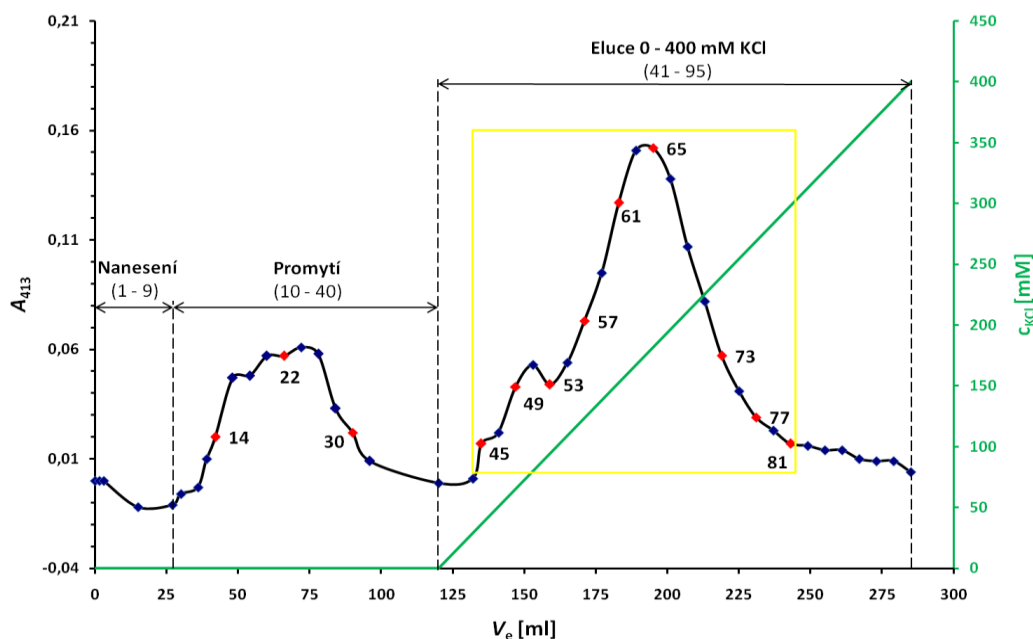
### 4.2.1 Solubilizace

Sonikací a diferenční centrifugací byla získána membránová frakce z bakterií *E. coli* BL21(DE3) Gold. Pro solubilizaci membrán bylo nutné stanovit koncentraci proteinů, aby mohly být přidány detergenty v takovém množství, aby v roztoku byl 1 mg detergentu/1 mg proteinu. Koncentrace proteinu byla stanovena metodou podle Wiechelmana a kol., která je popsána v kapitole 3.3.1.1. Z rovnice lineární regrese byla vypočtena koncentrace proteinů 0,39 mg/ml a podle této hodnoty koncentrace byly přidány detergenty a hemin. Solubilizovaný foto-cyt  $b_5$  byl od membrán oddělen ultracentrifugací a supernatant byl aplikován na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B.

### 4.2.2 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

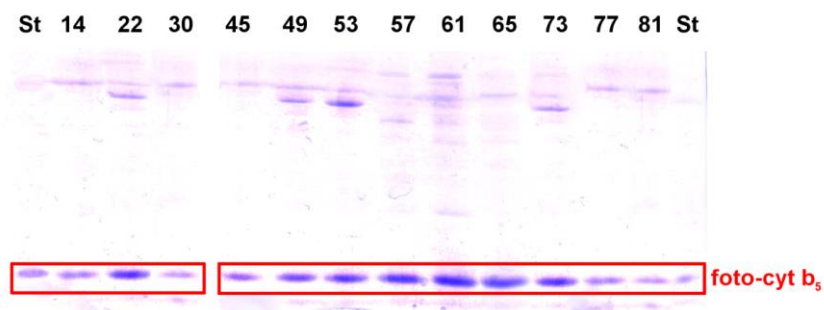
Chromatografie byla provedena podle postupu popsaného v kapitole 3.3.5.3. DEAE-Sepharosa funguje jako ionex, přesněji anex. Teoretický izoelektrický bod cyt  $b_5$  je 5,14 (dle predikce z primární sekvence cyt  $b_5$ ) [170], při pH = 7,7 je záporně nabitý a zachytí se na DEAE-Sepharose, která má kladný náboj. Proteiny, které jsou nabitě kladně, se na koloně nezachytí a dochází k jejich odstranění.

Navázaný foto-cyt  $b_5$  byl eluován lineárním gradientem 0 – 400 mM KCl. Byly jímány frakce o objemu 3 ml a byla u nich měřena absorbance Soretova pásu cyt  $b_5$  při 413 nm. Ze závislosti absorbance při 413 nm na elučním objemu byl vytvořen eluční profil (Obr. 30). Na elučním profilu jsou patrné dva „píky“, první „pík“ odpovídá frakcím jímáným při promývání kolony po nanesení vzorku. Pravděpodobně se jedná o foto-cyt  $b_5$ , který s kolonou interagoval slabě, a při promývání došlo k jeho uvolnění. Druhý „pík“ znázorňuje postupnou eluci gradientem KCl.



**Obr. 30 Průběh chromatografie na koloně DEAE-Sepharose CL6B.** Čísla udávají frakce, které byly vzaty na elektroforézu a červená čísla vyznačují intervaly frakcí, které byly spojeny.

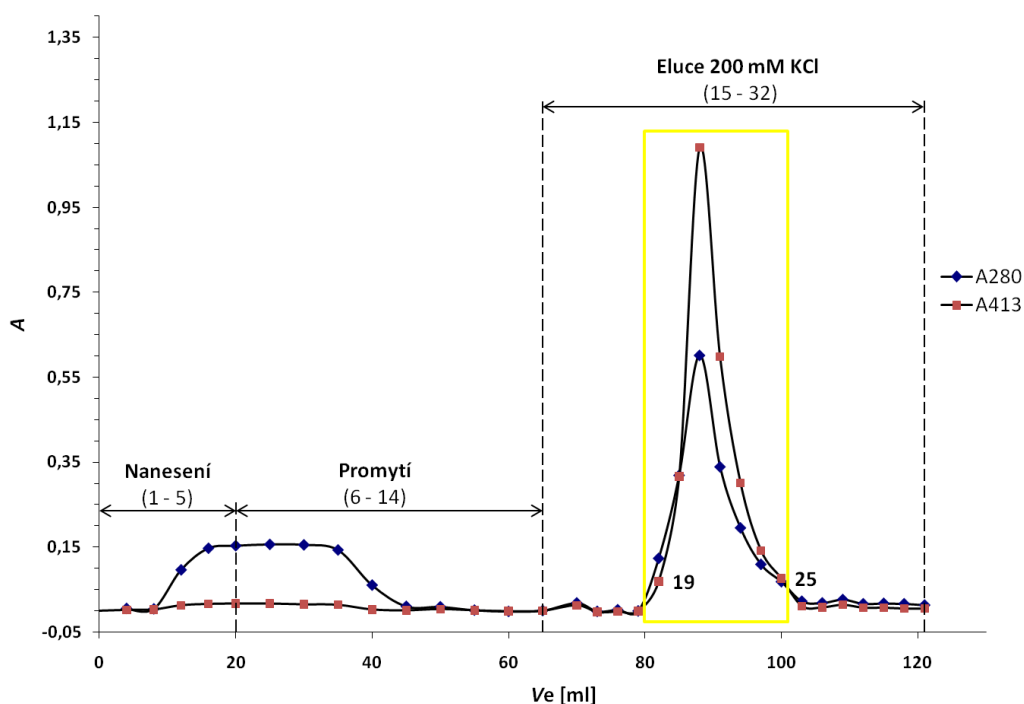
Vybrané frakce (označeny číslem) byly podrobeny SDS elektroforéze, aby byla zjištěna jejich čistota a množství foto-cyt  $b_5$  (Obr. 31).



**Obr. 31 Elektroforéza frakcí získaných při chromatografii na DEAE – Sepharose CL6B.** St – standard kraličího cyt  $b_5$ , čísla 14 až 81 označují frakcí, které byly vybrány podle elučního profilu. Vzorky byly připraveny smísením vzorku se 4x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrům v poměru 3:1. Do jamky bylo nanášeno 25  $\mu$ l vzorku.

Byly spojeny frakce 45 – 81 ( $V = 110$  ml), které obsahovaly majoritní zónu foto-cyt  $b_5$  s minimem příměsí a u kterých absorbance dosahovala minimálně 10 % z maximální hodnoty absorbance při 413 nm. Spojené frakce byly ultrafiltrací zahuštěny na 20 ml. Zahuštěný preparát byl přes noc dialyzován. Foto-cyt  $b_5$  byl přítomný i ve frakcích prvního píku, ale s těmito frakcemi dále nebylo pokračováno, protože foto-cyt  $b_5$  mohl být pravděpodobně špatně poskládaný a množství foto-cyt  $b_5$  v druhém píku bylo pro síťovací experimenty dostatečné.

K odstranění detergentu Brij 35 byla použita rechromatografie na koloně s DEAE-Sepharosou CL6B. Při nanášení preparátu byly jímány frakce o objemu 4 ml, při promývání 5 ml a při eluci 3 ml. Eluce foto-cyt  $b_5$  byla prováděná izokraticky 200 mM KCl. Ve všech frakcích byla měřena absorbance při 280 a 413 nm a z jejich závislosti na elučním objemu byl sestrojen eluční profil (Obr. 32).

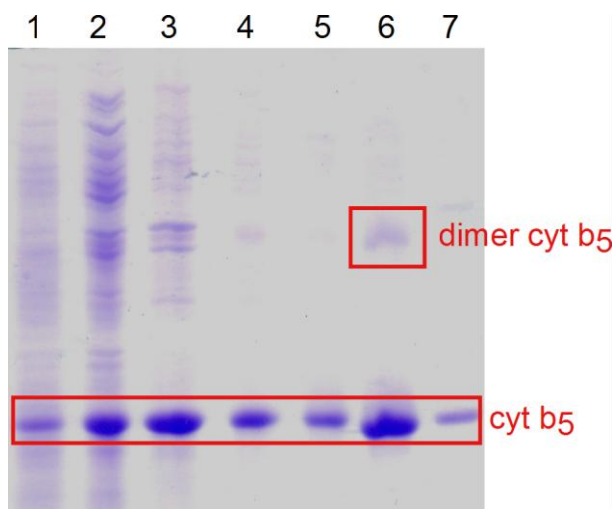


**Obr. 32** Průběh rechromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B. Úsečky vytínají úseky, které odpovídají nanesení vzorku, promytí kolony a eluci foto-cyt  $b_5$  200 mM KCl. Žlutý obdélník – spojené frakce.

Byly spojeny frakce 19 – 25, které měly hodnotu absorbance při 413 nm minimálně 6 % z maximální hodnoty vrcholu v elučním profilu. Výsledný objem spojených frakcí byl 18 ml. Následnou dialýzou byl odstraněn cholát sodný. Dialyzovaný preparát byl zahuštěn na 200  $\mu$ l.

Průběh purifikace byl sledován pomocí SDS elektroforézy (Obr. 33, str. 68). Foto-cyt  $b_5$  se oproti ostatní proteinům *E.coli* produkuje v nadbytku. Membránová frakce

v porovnání s frakcí po sonikaci obsahuje méně bakteriálních proteinů. Solubilizací se z membrán uvolnilo velmi malé množství jiných membránových proteinů a foto-cyt  $b_5$  byl už relativně homogenní po solubilizaci. Zbytek proteinů byl odstraněn chromatografií na koleně DEAE-Sepharosy. Finální preparát (dráha 6, Obr. 33) obsahoval také protein o vyšší molekulové hmotnosti. Tento protein byl identifikován už během bakalářské práce jako dimer cyt  $b_5$  [169]. Cytochromy  $b_5$  spolu mohou interagovat pomocí hydrofobních kotev a vytvářet tak dimery.

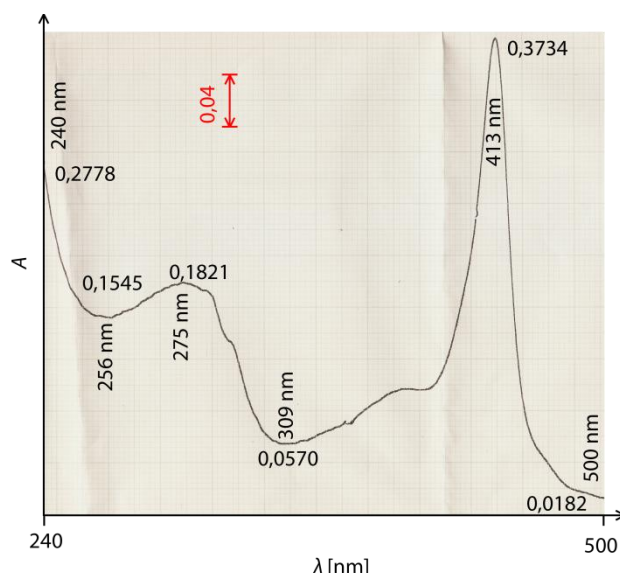


**Obr. 33 Průběh purifikace foto-cyt  $b_5$  z bakterií *E.coli* BL21(DE3) Gold.** 1 – suspenze bakterií *E.coli* před indukcí IPTG (2x zředěný), 2 – homogenát bakterií *E. coli* produkujících foto-cyt  $b_5$  (2x zředěný), 3 - supernatant po sonikaci bakterií *E.coli* (5x zřed.), 4 – membránová frakce foto- cyt  $b_5$  (5x zřed.), 5 – supernatant po solubilizaci membrán (10x zřed.), 6 – finální preparát foto-cyt  $b_5$  po chromatografii na DEAE-Sepharose (20x zřed.), 7 – standard králičího cyt  $b_5$

### 4.3 Charakterizace finálního foto-cytochromu $b_5$

#### 4.3.1 Spektrofotometrická charakterizace foto-cytochromu $b_5$

U finálního preparátu foto-cyt  $b_5$  bylo proměřeno absolutní absorpční spektrum (Obr. 34, str. 69), ve kterém se objevují dvě charakteristická maxima pro cyt  $b_5$ , při 280 nm (absorbují postranní řetězce aromatických aminokyselin apoproteinu) a maximum při 413 nm je charakteristické pro cyt  $b_5$  jako hemoprotein.



**Obr. 34 Absolutní absorpční spektrum finálního preparátu foto-cytochromu  $b_5$ . 100x zředěný vzorek, měřeno na spektrofotometru Specord M40**

#### 4.3.2 Stanovení koncentrace proteinů a foto-cytochromu $b_5$

Koncentrace proteinů ve finálním preparátu byla stanovena metodou popsanou v kapitole 3.3.1.1. a činí  $6,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Koncentrace proteinů a koncentrace foto-cyt  $b_5$  byla určena také výpočtem z absolutního absorpčního spektra finálního preparátu. Vztahy pro výpočet jsou uvedeny v kapitole 3.3.1.2. Při vlnové délce 413 nm absorbuje cyt  $b_5$ , který má navázaný hem a při vlnové délce 280 nm absorbuje cyt  $b_5$  s navázaným hemem, ale i apo-cyt  $b_5$ , který hem neobsahuje. Hodnoty koncentrací jsou uvedeny v Tab. 2.

**Tab. 2 Stanovené koncentrace foto-cyt  $b_5$  z absolutního absorpčního spektra**

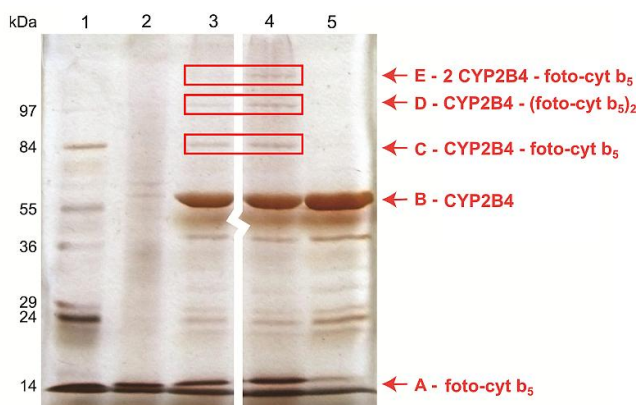
$c_{fb_5}(413)/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$c_{fb_5}(280)/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
304	425

$c_{fb_5}(413)$  – molární koncentrace foto- cyt  $b_5$  vypočtená z absorbance při 413 nm,  $c_{fb_5}(280)$  molární koncentrace foto- cyt  $b_5$  vypočtená z absorbance při 280 nm (foto-cyt  $b_5$  i apo-foto cyt  $b_5$ )

Bylo získáno 1,3 mg cyt  $b_5$  ze 180 ml bakteriální kultury, což odpovídá zisku 7,2 mg z 1l kultury. Celkový výtěžek vzhledem k membránové frakci byl 18,3 %. Specifický obsah foto-cyt  $b_5$  ve finálním preparátu byl  $46,8 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Teoretický specifický obsah pro cyt  $b_5$  je  $65 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Porovnáním obou hodnot lze říci, že přibližně 72 % foto-cyt  $b_5$  bylo ve formě holoproteinu, který obsahoval hem.

### 4.3.3 Kovalentní síťování mezi foto-cytochromem $b_5$ a cytochromem P450 2B4

Finální preparát foto-cyt  $b_5$  byl použit ke studiu protein-proteinových interakcí mezi cyt  $b_5$  a CYP2B4 pomocí kovalentního síťování. Foto-cyt  $b_5$  (2  $\mu\text{M}$ ) a CYP2B4 (2 $\mu\text{M}$ ) byly rekonstituovány v DLPC membráně (300  $\mu\text{M}$ ) a podrobeny fotolýze. Vzniklé kovalentní komplexy byly elektroforeticky separovány (Obr. 35). Ve směsi byly detekovány 3 heterooligomery (dráhy 3 a 4; zóny C, D a E), ve kterých byly hmotnostní spektrometrií identifikovány současně peptidy z cyt  $b_5$  a CYP2B4. Přítomnost těchto peptidů dokazuje, že cyt  $b_5$  a CYP2B4 spolu vytvářejí kovalentní komplexy. Podle molekulových hmotností se patrně jedná o komplexy obsahující CYP2B4 a cyt  $b_5$  v molárních poměrech 1:1, 1:2 a 2:1. Po přidání diamantanu (substrát CYP2B4) do reakční směsi došlo ke zvýšené tvorbě všech komplexů (dráha 3). Navázání substrátu do aktivního centra CYP2B4 pravděpodobně zvyšuje vazebnou afinitu CYP2B4 k cyt  $b_5$ .



**Obr. 35** Elektroforetická separace produktů fotolýzy foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4. 1 – standard molekulových hmotností, 2 – foto-cyt  $b_5$  (kontrola), 3 – CYP2B4 + foto-cyt  $b_5$ , 4 – CYP2B4 + foto-cyt  $b_5$  + dimanatan, 5 – CYP2B4 (kontrola), 15% separační gel. Obrázek poskytl Mgr. Tomáše Ječmen

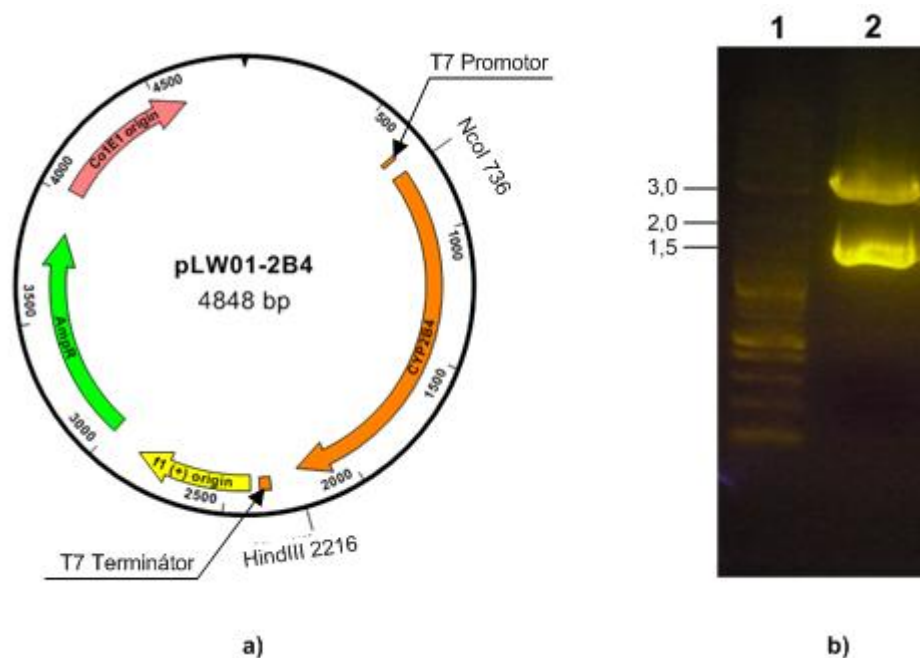
## 4.4 Příprava a izolace CYP2B4

V této části práce byla připravena a izolována další komponenta monooxygenasového systému (CYP2B4). Exprese a purifikace CYP2B4 byly provedeny jako pilotní experimenty pro budoucí přípravu foto-CYP2B4.

### 4.4.1 Amplifikace a restrikční analýza plazmidu pLW01-2B4

Plazmid pLW01-2B4 byl amplifikován v bakteriálním kmeni *E. coli* DH5 $\alpha$  a purifikován metodou popsanou v kapitole 3.3.6.2. Bylo získáno 22  $\mu\text{g}$  ( $c = 1,1 \text{ mg/ml}$ ) plazmidové DNA o dostatečné čistotě ( $A_{260}/A_{280} = 2$ ). Následně byla provedena restrikční analýza za účelem ověření, zda amplifikovaný plazmid obsahuje gen pro CYP2B4. Pro

restrikční analýzu byly vybrány restrikční endonukleasy NcoI a HindIII. NcoI štěpí těsně před začátkem genu a HindIII štěpí za genem pro CYP2B4. Po rozštěpení plazmidu vzniknou dva fragmenty DNA o velikosti cca 3,37 a 1,48 kbp (Obr. 36).

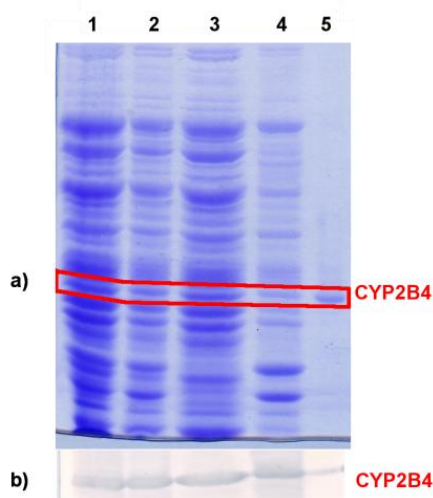


**Obr. 36 Restrikční analýza plazmidu pLW01-2B4.** a) mapa plazmidu pLW01-2B4 s vyznačenými místy štěpení endonukleas NcoI a HindIII; b) elektroforetická separace DNA fragmentů vzniklých štěpením plazmidu pLW01-2B4 endonukleasami NcoI a HindIII; 1 – DNA marker (2-Log DNA Ladder), 2 – plazmid pLW01-2B4 štěpený NcoI a HindIII

## 4.4.2 Izolace CYP2B4

### 4.4.2.1 Sonikace a solubilizace CYP2B4 z bakteriální membrány

Heterologní expresí v bakteriálním kmeni *E. coli* BL21(DE3) Gold byl exprimován králičí CYP2B4. Bakteriální buněčná stěna byla narušena lyzí pomocí lysozymu a pomalým zmrazením na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dále byly bakteriální buňky rozrušeny sonikací v přítomnosti detergentu (Tergitol NP-10), při které již docházelo k částečné solubilizaci membránových proteinů (CYP2B4). Solubilizace pokračovala přidáním dalšího detergentu (cholátu sodného). Před přidáním cholátu sodného musela být stanovena koncentrace proteinů. Koncentrace proteinů v suspenzi byla 6,2 mg/ml a suspenze byla naředěna na 6 mg/ml a byl přidán cholát sodný do výsledné koncentrace 1,5% (w/v). Po solubilizaci následovala ultracentrifugace pro oddělení nesolubilní frakce. Výsledek sonikace a solubilizace je zachycen na Obr. 37 str. 72. V supernatantu a peletě po sonikaci a částečné solubilizaci bylo přibližně stejné množství CYP2B4. Supernatant po sonikaci byl použit pro dokončení solubilizace.



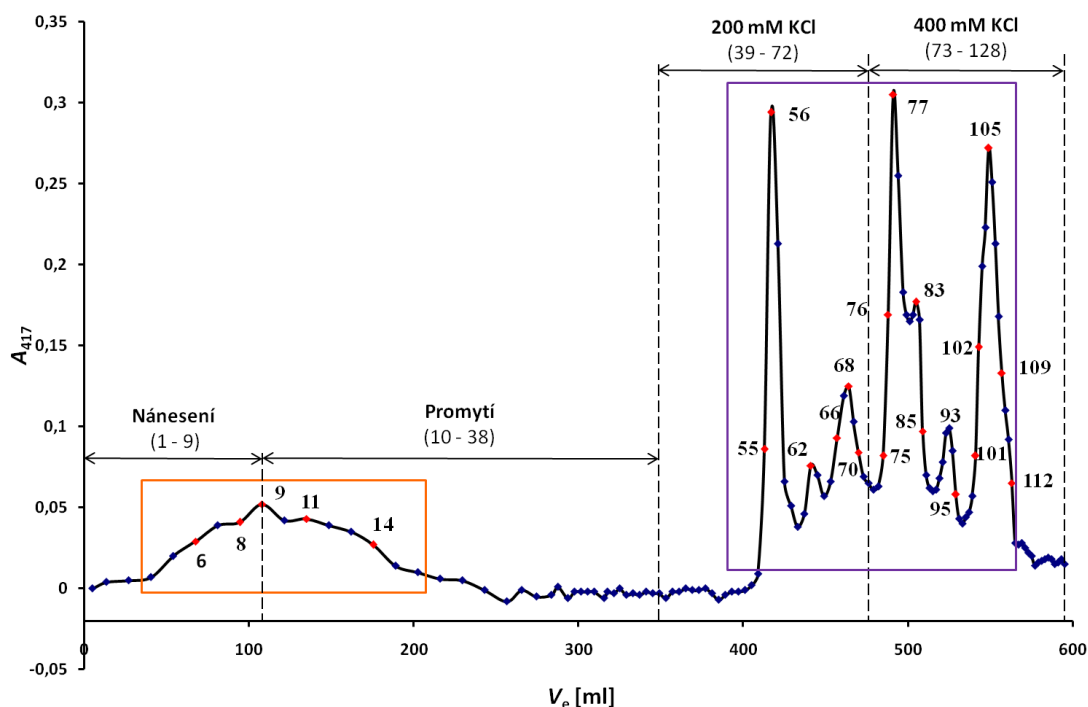
**Obr. 37** Výsledky sonikace bakteriálních buněk a solubilizace CYP2B4 z membrán. a) SDS elektroforéza, b) metoda „Western blotting“; 1 a 2 – supernatant a peleta po sonikaci buněk a částečné solubilizaci, 3 a 4 – supernatant a peleta po solubilizaci CYP2B4; 8% gel, 5 - standard králičího CYP2B4

Solubilizací byly z membrán uvolněny cca 2/3 CYP2B4 a 1/3 zůstala nesolubilizovaná. V peletě po solubilizaci je patrné značné množství nesolubilizované CYP2B4. Resolubilizace nebyla zkoušena, protože z předchozích experimentů bylo zřejmé, že je CYP2B4 také produkován do inkluzních tělísek a jejich resolubilizace by nebyla příliš úspěšná. Supernatant po sonikaci byl aplikován na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B.

#### 4.4.2.2 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

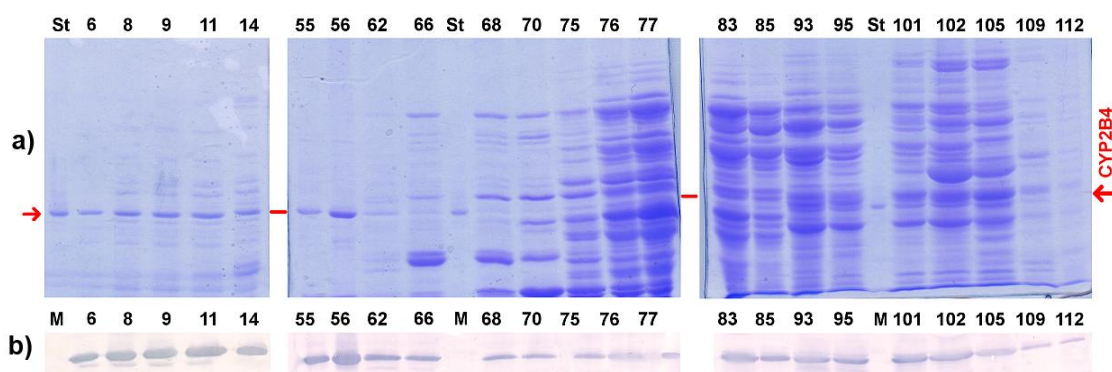
Chromatografie byla provedena podle postupu popsáného v kapitole 3.3.7.3. DEAE-Sepharosa funguje jako anex. Teoretický izoelektrický bod CYP2B4 je 9,01 [171], dle predikce ze sekvence CYP2B4). Při pH 7,7 je CYP2B4 kladně nabitý a nezachytí se na DEAE-Sepharose, která má též kladný náboj. Naopak proteiny se záporným nábojem se na koloně zachytí, čímž je docíleno jejich odstranění.

Supernatant po solubilizaci byl aplikován na kolonu DEAE-Sepharosy. Byly jímány frakce o objemu 13,5 ml. Po nanesení vzorku a promytí kolony byla kolona zbarvená, což mohlo znamenat, že na koloně zůstal navázán i CYP2B4. Proto byl pro uvolnění proteinů z kolony použit 200 mM KCl. 200 mM KCl neuvolnil z kolony všechny proteiny a byl použit pufr o vyšší iontové síle (400 mM KCl). U frakcí byla změřena absorbance při 417 nm a sestaven eluční profil (Obr. 38, str. 73).



**Obr. 38** Eluční profil chromatografie supernatantu po solubilizaci na DEAE-Sepharose CL6B. Červené body a čísla – frakce analyzované pomocí SDS elektroforézy a metody WB; oranžový a fialový obdélník – spojené frakce;  $A_{417}$  – absorbance při 417 nm

Byla provedena SDS elektroforéza a metoda „Western blotting“ (WB) u vybraných frakcí, které vykazovaly absorbanci při 417 nm (Obr. 39).



**Obr. 39** SDS elektroforéza a metoda WB frakcí z DEAE – Sepharosy CL6B. St – standard králičího CYP2B4; 6 až 112 – čísla frakcí; 6 až 14 – objem frakcí 13,5 ml; 55 až 77 - objem frakcí 4 ml; 83 až 112 - objem frakcí 3 ml; 8% gel

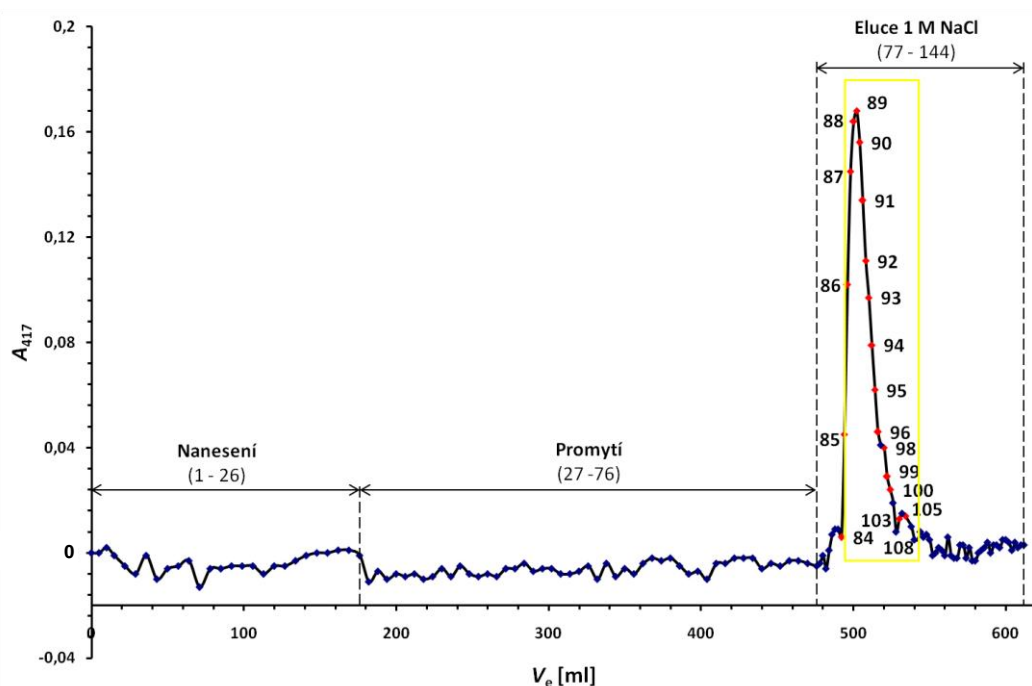
Metoda WB prokázala přítomnost CYP2B4 ve všech frakcích. Frakce 6 – 14 (nanesení a promytí) vykazovaly přibližně stejné množství CYP2B4 a relativně nízkou přítomnost kontaminant oproti ostatním frakcím. Frakce 55 – 62 obsahovaly CYP2B4 a minimum kontaminant. Ve frakcích 66 – 105 docházelo k eluci CYP2B4, ale spolu s ním docházelo k uvolňování i ostatních navázaných proteinů na koloně. CYP2B4 byl v těchto frakcích zastoupen minoritně a ostatní proteiny byly přítomny v nadbytku. V dalším

průběhu práce byly frakce rozděleny na 2 části. Byly spojeny frakce 4 – 16 ( $V = 170$  ml) a 55 – 112 ( $V = 200$  ml). Dále bylo pokračováno se spojenými frakcemi 4 – 16, protože se na koloně správně nezachytily a obsahovaly minimální množství kontaminant. V těchto frakcích bylo přítomno 30 nmol cytochromu P450 (CYP2B4). Frakce byly nanесeny na kolonu s Reactive Red 120-Agarose. Spojené frakce 55 – 112 nevykazovaly absorpční maximum při 450 nm v diferencním spektru s oxidem uhelnatým a nebylo s nimi v izolaci pokračováno.

#### 4.4.2.3 Chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose

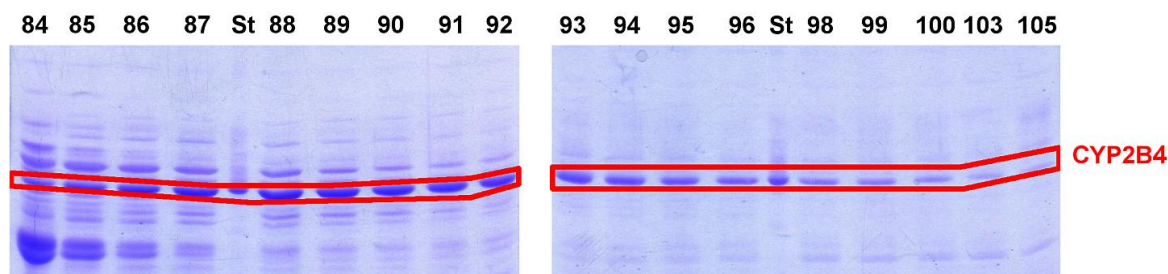
Chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose je typem afinitní chromatografie, kde je ligand (barvivo „Reactive Red“) imobilizován na agarosu. Toto barvivo nespecificky váže proteiny s vysokou afinitou.

Na kolonu byly nanесeny spojené frakce (4 – 16) z chromatografie na DEAE-Sephарose CL6B. Při nanášení vzorku došlo k zachycení proteinů na kolonu, z které byly eluovány 1 M NaCl. Při nanášení na kolonu byly jímány frakce o objemu 7 ml, při promývání o objemu 6 ml a při eluci byly jímány frakce o objemu 2 ml. U frakcí byla proměřena absorbance při 417 nm a byl sestrojen eluční profil (Obr. 40).



**Obr. 40 Průběh chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose.** Červené body a čísla – frakce vzaté na SDS elektroforézou; žlutý obdélník – spojené frakce;  $A_{417}$  – absorbance při 417 nm.

Na elučním profilu je patrný „pík“ (přibližně frakce 84 – 108), který vykazuje absorpenci při 417 nm. Čistota CYP2B4 v těchto frakcích byla zjišťována pomocí SDS elektroforézy (Obr. 41).



**Obr. 41 SDS elektroforéza vybraných frakcí z chromatografie na koloně Reactive Red 120-Agarose.** *St – standard králičího CYP2B4; 84 až 105 – čísla frakcí; objem frakcí 2 ml; 8% gel.*

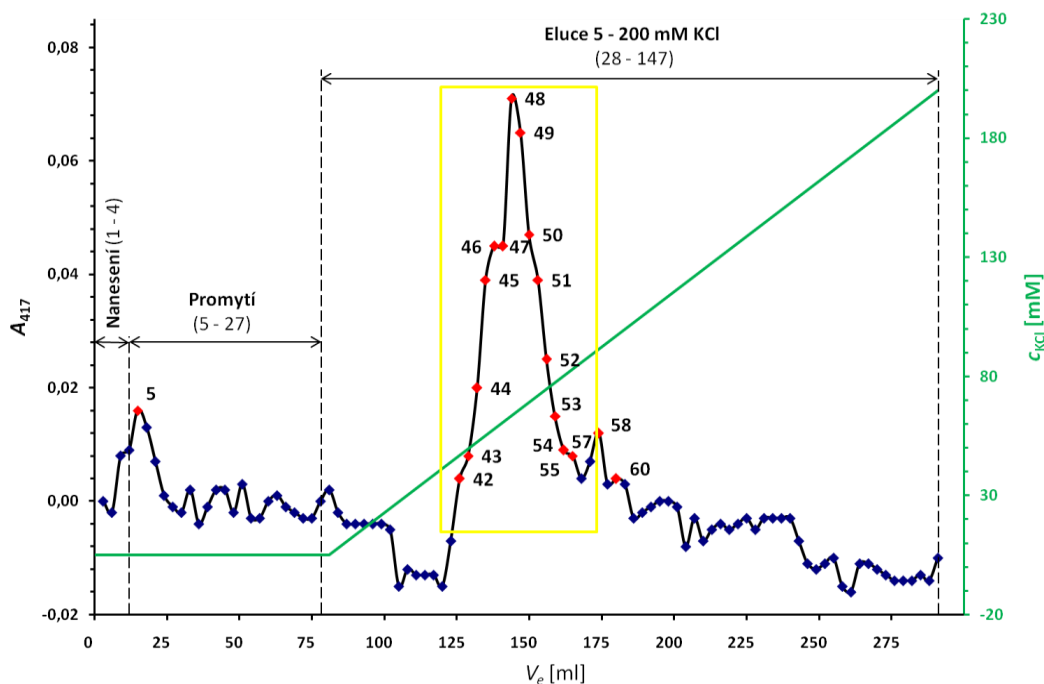
Z SDS elektroforézy je patrné, že se na začátku izokratické eluce 1 M NaCl uvolňovaly i jiné proteiny než CYP2B4 (frakce 84 – 92). Ve frakcích 93 – 105 bylo přítomno menší množství CYP2B4, ale také méně jiných proteinů (kontaminant). Chromatografií na Reactive Red 120-Agarose bylo dosaženo odstranění dalších kontaminant. Byly spojeny frakce 85 – 108 ( $V = 42$  ml). Frakce 84 obsahovala vzhledem k ostatním frakcím větší množství kontaminant a menší množství CYP2B4 a nebyla k ostatním frakcím připojena. Spojené frakce byly ultrafiltrací zahuštěny na 10 ml a dialyzovány pro snížení vysoké iontové síly v roztoku. Po dialýze byly frakce naneseny na kolonu hydroxylapatitu.

#### 4.4.2.4 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu

Hydroxylapatit je adsorbent, na který se proteiny váží sorpcí na základě elektrostatických interakcí, a je proto často užíván k jejich dělení.

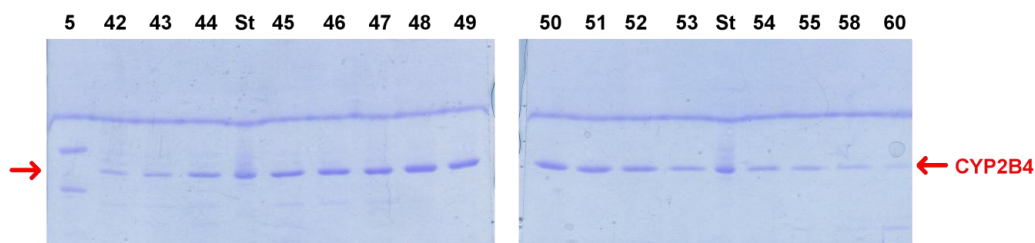
Na koloně hydroxylapatitu byla snížena koncentrace Tergitolu NP-10 (z koncentrace 0,3% (w/v) na 0,1%) a byly odstraněny proteinové kontaminanty.

Na kolonu byly naneseny spojené frakce 85 – 108 z chromatografie na koloně Red Reactive 120-Agarose. Po nanesení a zachycení proteinů na koloně následovala eluce gradientem 5 – 200 mM KCl. Po celou dobu chromatografie byly jímány frakce (3 ml). Ve frakcích byla proměřena absorpance při 417 nm a vynesena eluční profil (Obr. 42, str. 76).



**Obr. 42** Chromatografie na koloně hydroxylapatitu. červené body a čísla – frakce vzaté na SDS elektroforézu; žlutý obdélník – spojené frakce;  $A_{417}$  – absorbance při 417 nm.

Z elučního profilu byly vybrány frakce a byla u nich provedena SDS elektroforéza (Obr. 43).

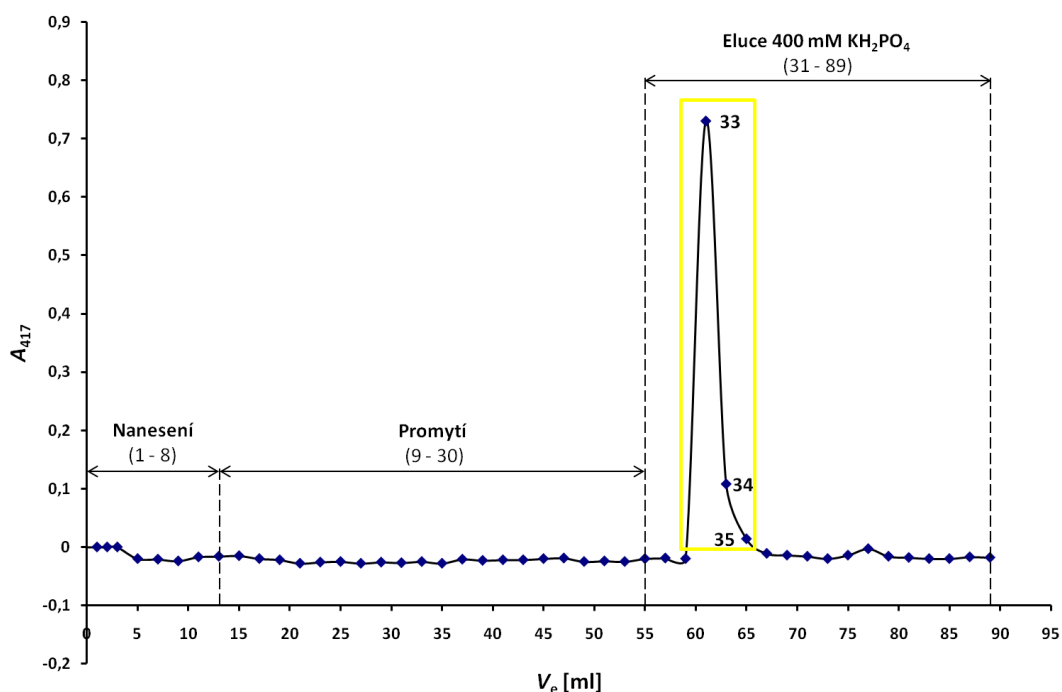


**Obr. 43** SDS elektroforéza frakcích získaných chromatografií na koloně hydroxylapatitu. St – standard králičího CYP2B4; 5 až 60 – čísla frakcí; objem frakcí 2 ml; 8% gel.

Frakce 5 zřetelně neobsahovala CYP2B4, ale spíše obsahovala jiné hemoproteiny, které absorbují při 417 nm. Tyto proteiny se na kolonu nezachytily a došlo k jejich odstranění. Souvislá zóna nad CYP2B4 je pravděpodobně způsobena kontaminantou ve vzorkovém pufru. Frakce 42 až 55 obsahovaly již téměř čistý CYP2B4. Ve frakcích 58 a 60 byl kromě CYP2B4 přítomný ještě jiný protein o nižší molekulové hmotnosti. Vzhledem k přítomnosti tohoto proteinu byly spojeny pouze frakce 42 – 57 ( $V = 40$  ml). Spojené frakce byly ultrafiltrací zahuštěny na 14 ml a dialyzovány přes noc pro odstranění solí. Chromatografií na hydroxylapatitu byl získán téměř homogenní preparát CYP2B4. Po odstranění solí byl preparát nanesen na další kolonu hydroxylapatitu.

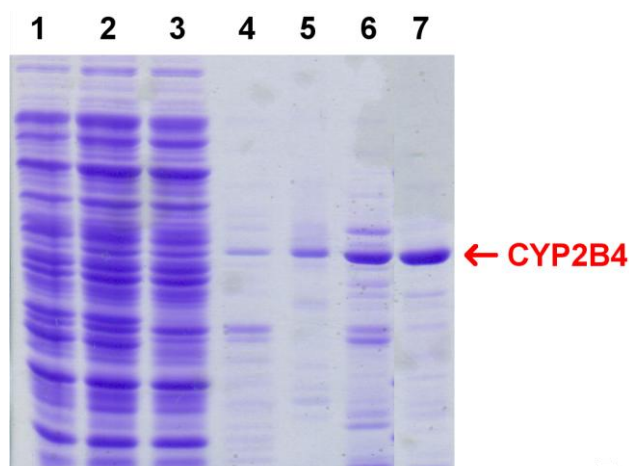
Rechromatografií na koloně hydroxylapatitu bylo odstraněno zbývající množství tergitolu NP-10 a preparát CYP2B4 byl zakoncentrován.

Na kolonu hydroxylapatitu byl nanesen zakoncentrovaný preparát z předešlé kolony hydroxylapatitu ( $V = 40$  ml). Eluce zachyceného CYP2B4 byla provedena pufrům o vysoké iontové síle ( $400$  mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Během celé chromatografie byly jímány frakce ( $2$  ml) a ve všech frakcích byla proměřena absorbance při  $417$  nm. Průběh chromatografie je patrný z elučního profilu (Obr. 44). CYP2B4 byl eluován v malém počtu frakcí a pro získání většího množství CYP2B4 byly spojeny všechny frakce, které vykazovaly absorbanci při  $417$  nm (33 – 35). Výsledný preparát ( $V = 4$  ml) byl ultrafiltrací zakoncentrován na  $1,2$  ml.



**Obr. 44** Průběh rechromatografie na koloně hydroxylapatitu. žlutý obdélník – spojené frakce; 1 až 89 – čísla frakcí; objem frakcí  $2$  ml.

Průběh izolace byl sledován pomocí SDS elektroforézy (Obr. 45, str. 78). Vzorky po sonikaci a solubilizaci se od bakteriální suspenze příliš neliší a v těchto krocích k purifikaci proteinu nedochází, ale nastává uvolnění proteinu z membrány. Nejdůležitějším krokem purifikace byla chromatografie na DEAE-Sepharose CL6B, na které se zachytilo značné množství proteinů a CYP2B4 se na ní nezachytil. Na Reactive Red 120-Agarose k znatelnému odstranění ostatních proteinů nedošlo, chromatografie spíše sloužila k zakoncentrování preparátu. Po chromatografii na kolonách hydroxylapatitu byl získán téměř dostatečně čistý finální preparát.

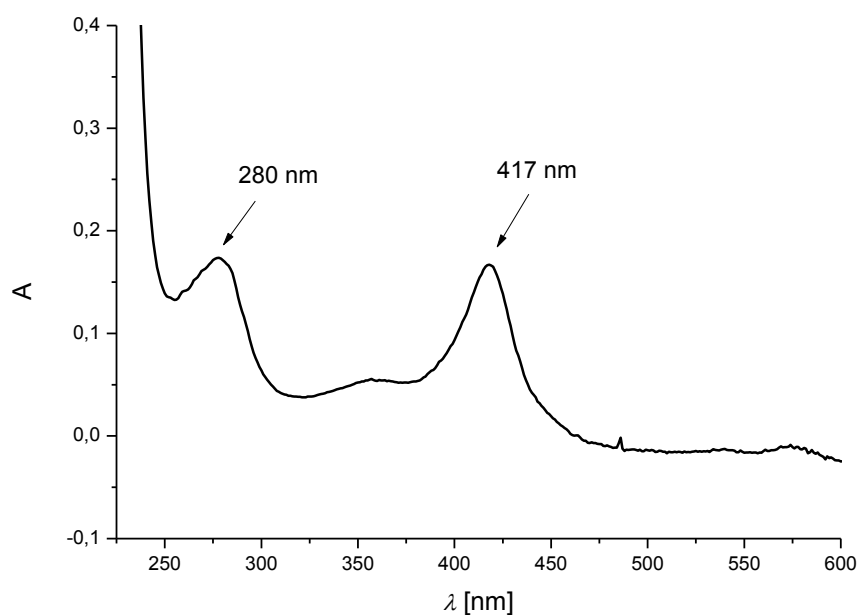


**Obr. 45 Průběh izolace CYP2B4.** 1 – bakteriální suspenze po 36 hod produkce (5 x zředěný); 2 – supernatant po sonikaci a částečné solubilizaci (2x zředěný); 3 – supernatant po solubilizaci (2x zředěný); 4 - vzorek spojených frakcí po DEAE-Sepharose (2x zředěný), 5 – standard králičího CYP2B4; 6 - finální preparát CYP2B4 (5x zředěný); standard králičího CYP2B4

## 4.5 Charakterizace finálního preparátu CYP2B4

### 4.5.1 Spektrofotometrická charakterizace CYP2B4

U finálního preparátu CYP2B4 bylo proměřeno absolutní absorpční spektrum (Obr. 46). V absorpčním spektru se objevuje charakteristické maximum při 417 nm pro CYP2B4 (charakteristický Soretův pás hemoproteinů) a charakteristické maximum při 280 nm pro aromatické postraní řetězce proteinu. Poměr absorbancí  $A_{417}/A_{280}$  ve finálním preparátu byl 0,97.

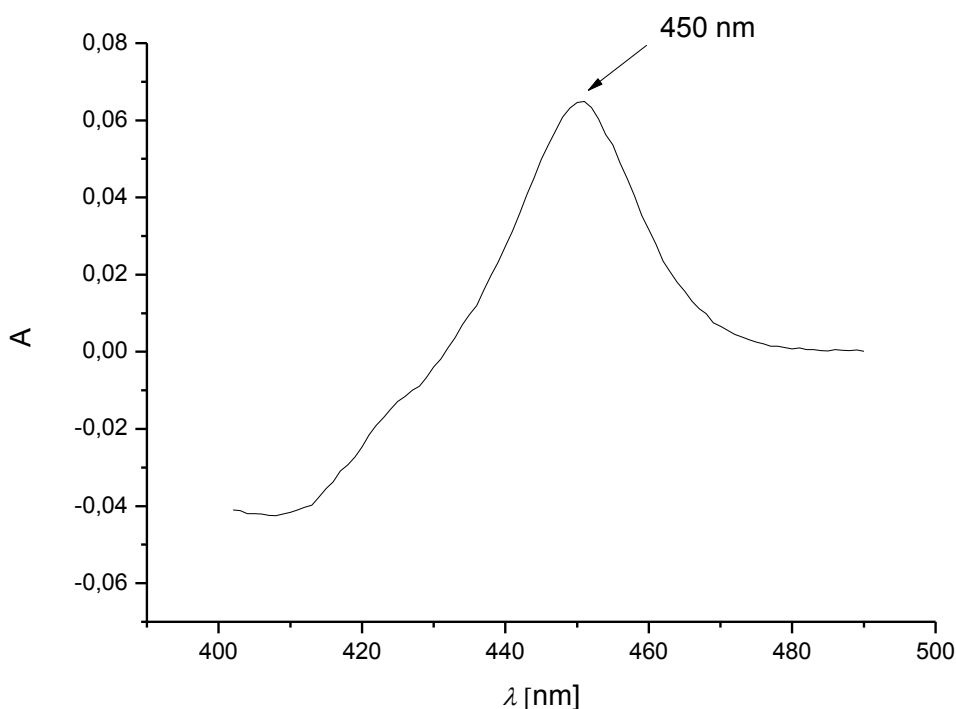


**Obr. 46 Absolutní absorpční spektrum finálního preparátu CYP2B4.** 5x zředěný preparát CYP2B4; měřeno na spektrofotometru Diod Array 8453.

#### 4.5.2 Stanovení koncentrace CYP2B4 a proteinů ve finálním preparátu

Pro stanovení koncentrace CYP2B4 byla použita metoda, která využívá charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm. Spektrum redukovaného CYP2B4 s oxidem uhelnatým bylo změřeno podle kap. 3.3.1.3. a je znázorněno na Obr. 47. Ze spektra byla pomocí absorpčního molárního koeficientu určena koncentrace CYP2B4. Koncentrace CYP2B4 byla 4,22  $\mu\text{M}$  a bylo získáno 5,1 nmol CYP2B4. Po DEAE-Sepharose bylo pokračováno s 30 nmol CYP2B4.

Ve finálním preparátu byla celková koncentrace proteinů 0,7  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (kap. 3.3.1.1.) a specifický obsah CYP2B4 byl 6,03  $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ .



**Obr. 47** Spektrum finálního preparátu CYP2B4 s oxidem uhelnatým. 6 x zředění preparát 0,1 M fosfátovým pufrem (pH 7,4), měřeno na spektrofotometru Helios  $\alpha$ .

#### 4.5.3 Aktivita CYP2B4

U finálního preparátu rekombinantního CYP2B4 byla stanovena 7-pentoxyresorufin-O-dealkylační (PROD) aktivita (kap. 3.3.1.4). Tato „markerová“ aktivita byla měřena v rekonstituovaném systému, který obsahoval uměle vytvořenou membránu (DLPC), NADPH:cytochrom P450 reduktasu a CYP2B4. Aktivita rekombinantního CYP2B4 byla porovnána s aktivitou CYP2B4 izolovaného z jater králíka, který byl

premedikován fenobarbitalem [172]. Aktivity jsou uvedeny v Tab. 3. Aktivita připraveného rekombinantního CYP2B4 byla srovnatelná s aktivitou izolovaného CYP2B4 z jater králíka.

**Tab. 3 Stanovené aktivity různých CYP2B4 v rekonstituovaném systému**

vzorek	$A_{\text{CYP}}/\text{pmol R} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{nmol CYP}^{-1}$
Re - CYP2B4	$43,4 \pm 2,4$
"WT" - CYP2B4	$44,9 \pm 2,1$

*hodnoty jsou průměry 4 měření a jsou u nich uvedeny směrodatné odchylky; Re – CYP2B4 – rekombinantní CYP2B4; “WT“ – CYP2B4 – CYP2B4 izolovaný z jater králíka (premedikovaný fenobarbitalem);  $A_{\text{CYP}}$  – aktivita CYP2B4, R - resorufin*

## 5. Diskuze

Tato práce se zabývala vypracováním metody pro přípravu rekombinantního cyt  $b_5$  s fotoaktivovatelnými aminokyselinami a jeho následným využitím pro identifikaci protein-proteinových interakcí v rámci MFO systému, konkrétněji interakcí s CYP2B4. Určení protein-proteinových interakcí v MFO systému přispěje k objasnění mechanismu, kterým cyt  $b_5$  ovlivňuje reakce katalyzované cytochromy P450 a také napomůže k vyřešení problematiky uspořádání složek systému v membráně, které doposud není známé. Současně byly učiněny první kroky k přípravě rekombinantního foto-cytochromu P450 2B4.

### 5.1 Optimalizace koncentrace a inkorporace foto-methioninu

Práce navazuje na bakalářskou práci, ve které byly provedeny prvotní pokusy o inkorporaci modifikovaných aminokyselin do cyt  $b_5$ . Výsledkem byly optimalizované podmínky pro inkorporaci deuterované aminokyseliny, které lze shrnout následovně: kultivace bakterií v LB mediu, po dosažení optické denzity ( $OD_{600}$ ) 1 převedení bakterií do DMEM limitního media bez L-methioninu a L-leucinu, po 20 min přidání  $d_3$ -methyl-L-methioninu a L-leucinu, po dalších 10 min indukce produkce IPTG a produkce proteinu po dobu 4 hod [169]. Tyto podmínky byly použity jako základ pro přípravu cyt  $b_5$  s inkorporovaným foto-methioniem. Za těchto podmínek však k inkorporaci foto-methioninu do proteinu nedocházelo a místo foto-methioninu byl do proteinu začleňován přirozený L-methionin. Pravděpodobně v expresním systému stále zůstává přítomno určité množství L-methioninu, přestože bylo jeho množství minimalizováno odstraněním LB media, použitím limitního media bez methioninu a kultivací bakterií v tomto mediu, aby došlo k vyčerpání zásob methioninu (20 min). Navíc přítomnost L-methioninu mohla být způsobena odumíráním bakterií během přechodu z exponenciální fáze růstu do stacionární fáze. K podobné situaci může dojít, když je medium zaočkováno pomocí kultury inkubované přes noc (O/N), ve které je už větší počet odumřelých buněk. Již dříve bylo experimentálně prokázáno, že přidání přirozeného methioninu rapidně snižuje inkorporaci foto-methioninu do proteinu. V nižší míře inkorporaci snižuje i L-leucin [163]. Pro snížení množství methioninu v expresním systému a zvýšení inkorporace foto-methioninu byla snížena optická denzita ( $OD_{600}$ ), při které je indukována produkce foto-cyt  $b_5$  z 1 na 0,6. Další změnou bylo to, že k zaočkování media nebyla použita O/N kultura, ale medium bylo přímo zaočkováno bakteriemi z plotny na určitou optickou denzitu. K určování

inkorporace foto-methioninu do proteinu byla použita hmotnostní spektrometrie, která sloužila k určování poměru intenzit signálů mezi peptidy s methioninem a foto-methioninem. Po úpravě podmínek bylo dosaženo nejvyšší inkorporace foto-methioninu do cyt b<sub>5</sub> při koncentraci foto-methioninu 0,5 mM a 1 hod produkce. Odhadovaná míra inkorporace byla kolem 20-30%. Dodavatel foto-methioninu uvádí, že inkorporace foto-methioninu do proteinů je 10-20% v závislosti na aminokyselinové sekvenci, délce sekvence, množství proteinu a rovnováze mezi syntézou a degradací proteinu [173]. Odlišnost míry inkorporace může také souviset s použitím jiného typu buněk. V našem případě byly použity buňky bakteriální, kdežto dosavadní výzkumy byly prováděny se savčími buňkami [163]. Naše výsledky získané aplikací optimalizovaného postupu exprese lze tedy považovat za velmi dobré.

## 5.2 Purifikace a charakterizace foto-cytochromu b<sub>5</sub>

Exprimovaný foto-cyt b<sub>5</sub> byl izolován ionexovou chromatografií. Při chromatografii na DEAE-Sepharose CL6B se podstatná část (~ 25%) solubilizovaného proteinu na koloně nezachytíla a byla odmyta promývacím puřrem. Solubilizát pravděpodobně obsahoval špatně poskládaný protein, který nebyl schopen interagovat s kolonou, nebo vysoká koncentrace detergentu mohla způsobit tvorbu micel obsahujících protein a tyto micely s kolonou neinteragovaly [78].

Specifický obsah foto-cyt b<sub>5</sub> ve finálním preparátu byl 46,8 nmol · mg<sup>-1</sup>. Teoretický specifický obsah pro cyt b<sub>5</sub> je 65 nmol · mg<sup>-1</sup>. Za předpokladu, že finální preparát neobsahoval žádný jiný materiál absorbující při 280 než cyt b<sub>5</sub>, z porovnání obou hodnot vyplývá, že přibližně 72 % foto-cyt b<sub>5</sub> bylo ve formě holoproteinu s navázaným hemem. Rozhodně vhodné bylo přidání heminu při solubilizaci proteinu, které vedlo ke zvýšení množství holoproteinu ve vzorku v porovnání s izolovaným cyt b<sub>5</sub> v bakalářské práci, kdy bylo maximální množství holoproteinu pouze 7,5 % [169]. Zvýšení obsahu holoproteinu by bylo možno dále získat rekonstitucí proteinu s heminem až po purifikaci. Tato metoda byla již dříve úspěšná [78,169], ale mohly by nastat komplikace s odstraněním případného nadbytku heminu, protože hemin se nedaří odstranit dialýzou.

### 5.3 Kovalentní síťování foto-cytochromem b<sub>5</sub> a cytochromu P450 2B4

Foto- cyt b<sub>5</sub> je vhodným nástrojem pro identifikaci protein-proteinových interakcí v MFO systému. Po fotoaktivaci vzniká reaktivní karben, který reaguje s nejbližším okolím.

Purifikovaný foto-cyt b<sub>5</sub> byl použit k síťování s CYP2B4. Po fotolýze UV zářením byly na polyakrylamidovém gelu detekovány 3 zóny s vyšší molekulovou hmotností než má CYP2B4. Hmotnostní spektrometrií byly v zónách současně identifikovány peptidy z cyt b<sub>5</sub> a CYP2B4. A podle molekulové hmotnosti lze usuzovat, že CYP2B4 a cyt b<sub>5</sub> spolu vytváří komplexy v molárních poměrech 1:1, 1:2 a 2:1. Konkrétní složení bude ověřeno provedením aminokyselinové analýzy kovalentních komplexů.

Po přidání diamantanu (substrát CYP2B4) do reakční směsi došlo ke zvýšené tvorbě všech komplexů. Tento výsledek je v souladu s již publikovanými informacemi o tom, že navázání substrátu do aktivního místa CYP2B4 zvyšuje vazebnou afinitu mezi CYP2B4 a cyt b<sub>5</sub> [84].

### 5.4 Izolace cytochromu P450 2B4

Interakce v MFO systému lze studovat i použitím foto-CYP2B4. V této práci byla vyzkoušena exprese a izolace CYP2B4 a na základě těchto pokusů budou prováděny optimalizace pro inkorporaci foto-methioninu do CYP2B4.

Izolace CYP2B4 byla zahájena přípravou sféroplastů a jejich sonikací. Sonikace bakteriální buněk probíhala pod atmosférou dusíku a v přítomnosti detergentu Tergitol NP-10. Během sonikace docházelo k nezanedbatelnému pění roztoku. Pění vznikalo pravděpodobně v důsledku přítomnosti detergentu a rozpuštěných plynů v roztoku. Pění bylo částečně eliminováno sonikací ve vodní lázni.

Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy při pH 7,7 měla sloužit k odstranění záporně nabitých proteinů. Při pH 7,7 se CYP2B4 vyskytuje s převažujícím kladným nábojem a neměl by s kladně nabitou kolonou interagovat. Metoda „Western blotting“ dokazuje, že se CYP2B4 vyskytuje ve všech frakcích, které absorbují při 417 nm. Část CYP2B4 (frakce 55 – 112) se na koloně zachytila a musela být uvolněna použitím vyšší iontové síly. Frakce 55 – 112 mohly obsahovat špatně poskládaný CYP2B4, který měl pozměněné vlastnosti a s kolonou interagoval. Na začátku aplikace 200 mM KCl se uvolňoval CYP2B4 (frakce 55 - 62), který s kolonou interagoval slabě a mohl být ve funkčním stavu. Uvolňování nastávalo odhadem při koncentraci KCl 50 – 60 mM. Pro další izolace by bylo vhodné doplnit izolační postup o promývání kolony 50 – 60 mM KCl.

Poměr absorbancí  $A_{417}/A_{280}$  u finálního preparátu je 0,97. V ideálním případě, kdy veškerý protein ve vzorku je cytochrom P450 s plně inkorporovaným hemem a bez přítomnosti sloučenin (např. detergenty), které absorbují při 280 nm, by měl být poměr  $A_{417}/A_{280}$  roven 2,0 (osobní sdělení Prof. Petr Hodek). Nižší poměr  $A_{417}/A_{280}$  mohl být způsobem nedostatečným odstraněním detergentu (Tergitol NP-10 absorbuje při 280 nm) nebo tím, že se ve vzorku také vyskytuje CYP2B4 bez navázaného hemu. Z bakteriální kultury o objemu 500 ml bylo získáno 5,1 nmol CYP2B4 se specifickým obsahem  $6,03 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Teoretický specifický obsah pro CYP2B4 je  $17,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Nižší specifický obsah naznačuje, že finální preparát obsahuje CYP2B4, který nemá navázaný hem. Tento závěr vychází i z měření  $A_{417}/A_{280}$ . Možné je též, že finální preparát obsahoval příměs jiného proteinu, který však v takové míře není patrný na elektroforéze. Specifický obsah má však daleko vyšší vypovídající hodnotu o obsahu CYP2B4 s navázaným hemem, protože se jedná o poměr množství CYP2B4 stanoveného z CO spektra a koncentrace proteinů. Saribas a kol. získali ze stejného objemu bakteriální kultury 128 nmol CYP2B4 se specifickým obsahem  $17 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  [174]. Hlavní rozdíl spočívá v tom, že v jejich případě byl protein produkován 96 hod, tedy téměř 3x déle než v našem postupu. A také použili jiný postup pro uvolnění proteinu z bakteriální membrány. Postup exprese a izolace CYP2B4 bude ještě třeba optimalizovat, aby byl získán finální preparát s vyšším specifickým obsahem a ve vyšším množství.

Pro ověření funkčnosti rekombinantního CYP2B4 byla měřena 7-pentoxoresorufin-O-dealkylační aktivita. Aktivita rekombinantního CYP2B4 ve finálním preparátu byla  $43,4 \text{ pmol R} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{nmol CYP}^{-1}$  a byla porovnána s aktivitou izolovaného CYP2B4 z jater králíka, který byl premedikován fenobarbitalem. Aktivita rekombinantního CYP2B4 byla srovnatelná s aktivitou izolovaného CYP2B4 z jater králíka. Tento výsledek nasvědčuje tomu, že rekombinantní CYP2B4 se podařilo exprimovat a izolovat v nativním stavu.

Foto-cyt  $b_5$  byl úspěšně připraven a byla ověřena jeho vhodnost pro použití v síťovacích experimentech. Metoda pro přípravu foto-cyt  $b_5$  bude dále využita při přípravě další komponenty MFO systému s foto-methioninem (foto-CYP2B4).

## 6. Závěr

V práci byly optimalizovány podmínky pro inkorporaci modifikované aminokyseliny (L-foto-methioninu) do cytochromu  $b_5$ . Podmínky lze shrnout následovně:

- zaočkování LB media koloniemi z plotny (Petriho misky)
- růst bakteriálních buněk *E. coli* BL21(DE3) Gold v LB mediu
- po dosažení optické denzity při 600 nm 0,6 převedení buněk do DMEM limitního media ( $V = 30$  ml), které neobsahuje L-methionin a L-leucin
- kultivace buněk v limitním mediu 20 min k odstranění zásob L-methioninu v buňkách
- přidání L-foto-methioninu (0,5 mM) a L-leucinu (1,6 mM) do media
- po 10 min přidání  $\delta$ -aminolevulové kyseliny a indukce IPTG (1 mM)
- produkce 1 hod při 37°C

Následnou purifikací foto-cytochromu  $b_5$  bylo získáno ze 180 ml bakteriální suspenze 1,3 mg proteinu se specifickým obsahem 46,8 nmol  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>.

Fotoreaktivita foto-cytochromu  $b_5$  byla prokázána v rekonstituovaném systému s CYP2B4, který byl ozářen UV zářením. Foto-cytochrom  $b_5$  vytváří s CYP2B4 3 heterooligomery, ve kterém jsou CYP2B4 a cytochrom  $b_5$  pravděpodobně v molárním poměru 1:1, 1:2 a 2:1. Množství vzniklých heterooligomerů je zvýšeno v přítomnosti substrátu CYP2B4, diamantanu.

V této práci byla vyzkoušena exprese a izolace CYP2B4 a na základě těchto pokusů budou prováděny optimalizace pro inkorporaci foto-methioninu do CYP2B4.

CYP2B4 byl úspěšně připraven a purifikován. Z 500 ml bakteriální suspenze bylo získáno 5,1 nmol CYP2B4 se specifickým obsahem 6,03 nmol  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> a aktivitou 43,4 pmol R  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  nmol CYP<sup>-1</sup>.

## Seznam použité literatury

1. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: *Chem listy*, 94, 913-918 (2000)
2. Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Pharmacol Ther*, 97, 139-152 (2003)
3. Kotrbova, V., Mrazova, B., Moserova, M., Martinek, V., Hodek, P., Hudecek, J., Frei, E., Stiborova, M.: *Biochem Pharmacol*, 82, 669-680 (2011)
4. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca J.Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem listy*, 98, 876-890 (2004)
5. Klingenberg, M.: *Arch Biochem Biophys*, 75, 376-386 (1958)
6. Garfinkel, D.: *Arch Biochem Biophys*, 77, 493-509 (1958)
7. Omura, T., Sato, R.: *J Biol Chem*, 239, 2370-2378 (1964)
8. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei E.: *Chem listy*, 93, 229-237 (1999)
9. Ioannides, C., Lewis, D. F.: *Curr Top Med Chem*, 4, 1767-1788 (2004)
10. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W.: *Pharmacogenetics*, 6, 1-42 (1996)
11. Nebert, D. W., Nelson, D. R., Feyereisen, R.: *Xenobiotica*, 19, 1149-1160 (1989)
12. Nelson, D. R.: *Biochim Biophys Acta*, 1814, 14-18 (2011)
13. Gut, I., Soucek, P., Hodek, P.: *Prac lék*, 1, 15-20 (1992)
14. Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., et al.: *DNA*, 6, 1-11 (1987)
15. Bernhardt, R.: *J Biotechnol*, 124, 128-145 (2006)
16. Spatzenegger, M., Jaeger, W.: *Drug Metab Rev*, 27, 397-417 (1995)
17. Nebert, D. W., Russell, D. W.: *Lancet*, 360, 1155-1162 (2002)
18. Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.: *Cell Mol Life Sci*, 58, 737-747 (2001)
19. Durr, U. H., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *Biochim Biophys Acta*, 1768, 3235-3259 (2007)
20. Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., Kraut, J.: *J Biol Chem*, 260, 16122-16130 (1985)
21. Zvelebil, M. J., Wolf, C. R., Sternberg, M. J.: *Protein Eng*, 4, 271-282 (1991)
22. Szklarz, G. D., Ornstein, R. L., Halpert, J. R.: *J Biomol Struct Dyn*, 12, 61-78 (1994)
23. Poulos, T. L.: *Methods Enzymol*, 206, 11-30 (1991)
24. Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., McRee, D. E.: *Mol Cell*, 5, 121-131 (2000)
25. Yano, J. K., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *Nat Struct Mol Biol*, 12, 822-823 (2005)
26. Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J., Jhoti, H.: *Science*, 305, 683-686 (2004)
27. Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *J Biol Chem*, 279, 38091-38094 (2004)
28. Black, S. D.: *FASEB J*, 6, 680-685 (1992)
29. Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L.: *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 499-506 (2005)
30. Im, S. C., Waskell, L.: *Arch Biochem Biophys*, 507, 144-153 (2011)
31. Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y. T., Vakser, I. A., Loew, G., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 273, 17036-17049 (1998)
32. <http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html#reaction> (31.7.2012)

33. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: *Chem listy*, 95, 212-222 (2001)
34. Ryan, R., Grimm, S. W., Kedzie, K. M., Halpert, J. R., Philpot, R. M.: *Arch Biochem Biophys*, 304, 454-463 (1993)
35. Scott, E. E., He, Y. A., Wester, M. R., White, M. A., Chin, C. C., Halpert, J. R., Johnson, E. F., Stout, C. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13196-13201 (2003)
36. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3MVR> (2.8.2012)
37. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00178> (2.8.2012)
38. Spatz, L., Strittmatter, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 1042-1046 (1971)
39. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z.: *Arch Biochem*, 29, 232-233 (1950)
40. Enoch, H. G., Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 254, 8976-8981 (1979)
41. Schacter, B. A., Nelson, E. B., Marver, H. S., Masters, B. S.: *J Biol Chem*, 247, 3601-3607 (1972)
42. Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 256, 266-277 (1981)
43. Oprian, D. D., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 257, 8935-8944 (1982)
44. [http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR\\_enzymology.htm](http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm) (5.8.2012)
45. Shen, A. L., Sem, D. S., Kasper, C. B.: *J Biol Chem*, 274, 5391-5398 (1999)
46. Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., Kim, J. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8411-8416 (1997)
47. Xia, C., Hamdane, D., Shen, A. L., Choi, V., Kasper, C. B., Pearl, N. M., Zhang, H., Im, S. C., Waskell, L., Kim, J. J.: *J Biol Chem*, 286, 16246-16260 (2011)
48. Velick, S. F., Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 221, 265-275 (1956)
49. Sanborn, R. C., Williams, C. M.: *J Gen Physiol*, 33, 579-588 (1950)
50. Vergeres, G., Waskell, L.: *Biochimie*, 77, 604-620 (1995)
51. Clarke, T. A., Im, S. C., Bidwai, A., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 279, 36809-36818 (2004)
52. Slaughter, S. R., Williams, C. H., Jr., Hultquist, D. E.: *Biochim Biophys Acta*, 705, 228-237 (1982)
53. Mitoma, J., Ito, A.: *EMBO J*, 11, 4197-4203 (1992)
54. Okada, Y., Frey, A. B., Guenther, T. M., Oesch, F., Sabatini, D. D., Kreibich, G.: *Eur J Biochem*, 122, 393-402 (1982)
55. Rachubinski, R. A., Verma, D. P., Bergeron, J. J.: *J Cell Biol*, 84, 705-716 (1980)
56. Vergeres, G., Ramsden, J., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 270, 3414-3422 (1995)
57. Ogishima, T., Kinoshita, J. Y., Mitani, F., Suematsu, M., Ito, A.: *J Biol Chem*, 278, 21204-21211 (2003)
58. Hultquist, D. E., Passon, P. G.: *Nat New Biol*, 229, 252-254 (1971)
59. Lee, T. C., Baker, R. C., Stephens, N., Snyder, F.: *Biochim Biophys Acta*, 489, 25-31 (1977)
60. Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M. J., Setlow, B., Redline, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 4565-4569 (1974)
61. Paltuaf, F., Prough, R. A., Masters, B. S., Johnston, J. M.: *J Biol Chem*, 249, 2661-2662 (1974)
62. Grinstead, G. F., Gaylor, J. L.: *J Biol Chem*, 257, 13937-13944 (1982)
63. Hildebrandt, A., Estabrook, R. W.: *Arch Biochem Biophys*, 143, 66-79 (1971)
64. Iyanagi, T.: *Biochemistry*, 16, 2725-2730 (1977)
65. Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 240, 4481-4487 (1965)
66. Broyles, R. H., Strittmatter, C. F.: *Comp Biochem Physiol B*, 44, 667-676 (1973)
67. Guengerich, F. P.: *Arch Biochem Biophys*, 440, 204-211 (2005)
68. Sligar, S. G., Cinti, D. L., Gibson, G. G., Schenkman, J. B.: *Biochem Biophys Res Commun*, 90, 925-932 (1979)

69. Guengerich, F. P.: *Biochemistry*, 22, 2811-2820 (1983)
70. Durley, R. C., Mathews, F. S.: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 52, 65-76 (1996)
71. Wang, L., Cowley, A. B., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D. R.: *Proteins*, 67, 293-304 (2007)
72. Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., Scacchieri, S.: *Eur J Biochem*, 267, 755-766 (2000)
73. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DO9> (2.8.2012)
74. Davis, R. B., Jr., Lecomte, J. T.: *Biopolymers*, 90, 544-555 (2008)
75. Falzone, C. J., Mayer, M. R., Whiteman, E. L., Moore, C. D., Lecomte, J. T.: *Biochemistry*, 35, 6519-6526 (1996)
76. Mukhopadhyay, K., Lecomte, J. T.: *Biochemistry*, 43, 12227-12236 (2004)
77. Pfeil, W.: *Protein Sci*, 2, 1497-1501 (1993)
78. Kotrbova, V., Aimova, D., Ingr, M., Borek-Dohalska, L., Martinek, V., Stiborova, M.: *Protein Expr Purif*, 66, 203-209 (2009)
79. Canova-Davis, E., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 259, 2541-2546 (1984)
80. Zhang, H., Im, S. C., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 282, 29766-29776 (2007)
81. Zhang, H., Hamdane, D., Im, S. C., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 283, 5217-5225 (2008)
82. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F. P., Shimada, T., Nakajima, M., Yokoi, T.: *Protein Expr Purif*, 24, 329-337 (2002)
83. Guengerich, F. P., Ballou, D. P., Coon, M. J.: *Biochem Biophys Res Commun*, 70, 951-956 (1976)
84. Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Drug Metab Rev*, 31, 351-364 (1999)
85. Schenkman, J. B., Voznesensky, A. I., Jansson, I.: *Arch Biochem Biophys*, 314, 234-241 (1994)
86. Reed, J. R., Hollenberg, P. F.: *J Inorg Biochem*, 97, 265-275 (2003)
87. Yamazaki, H., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Shimada, T., Guengerich, F. P.: *J Biol Chem*, 271, 27438-27444 (1996)
88. Spatz, L., Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 248, 793-799 (1973)
89. Nishida, H., Inaka, K., Yamanaka, M., Kaida, S., Kobayashi, K., Miki, K.: *Biochemistry*, 34, 2763-2767 (1995)
90. Jamakhandi, A. P., Kuzmic, P., Sanders, D. E., Miller, G. P.: *Biochemistry*, 46, 10192-10201 (2007)
91. Gum, J. R., Strobel, H. W.: *J Biol Chem*, 254, 4177-4185 (1979)
92. Porter, T. D., Kasper, C. B.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 973-977 (1985)
93. Yabusaki, Y., Murakami, H., Ohkawa, H.: *J Biochem*, 103, 1004-1010 (1988)
94. Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Yamano, T., Ohkawa, H.: *J Biochem*, 100, 945-954 (1986)
95. Black, S. D., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 257, 5929-5938 (1982)
96. Szczesna-Skorupa, E., Kemper, B.: *J Biol Chem*, 268, 1757-1762 (1993)
97. Shimosawa, O., Sakaguchi, M., Ogawa, H., Harada, N., Mihara, K., Omura, T.: *J Biol Chem*, 268, 21399-21402 (1993)
98. Sakaguchi, M., Mihara, K., Sato, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3361-3364 (1984)
99. High, S., Andersen, S. S., Gorlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., Dobberstein, B.: *J Cell Biol*, 121, 743-750 (1993)
100. Cullin, C.: *Biochem Biophys Res Commun*, 184, 1490-1495 (1992)
101. Pernecky, S. J., Olken, N. M., Bestervelt, L. L., Coon, M. J.: *Arch Biochem Biophys*, 318, 446-456 (1995)

102. Vergeres, G., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 267, 12583-12591 (1992)
103. Ozols, J.: *Biochim Biophys Acta*, 997, 121-130 (1989)
104. Vergeres, G., Yen, T. S., Aggeler, J., Lausier, J., Waskell, L.: *J Cell Sci*, 106, 249-259 (1993)
105. Mulrooney, S. B., Meinhardt, D. R., Waskell, L.: *Biochim Biophys Acta*, 1674, 319-326 (2004)
106. Estabrook, R. W., Franklin, M. R., Cohen, B., Shigamatzu, A., Hildebrandt, A. G.: *Metabolism*, 20, 187-199 (1971)
107. Cawley, G. F., Zhang, S., Kelley, R. W., Backes, W. L.: *Drug Metab Dispos*, 29, 1529-1534 (2001)
108. Miwa, G. T., West, S. B., Huang, M. T., Lu, A. Y.: *J Biol Chem*, 254, 5695-5700 (1979)
109. Miwa, G. T., Lu, A. Y.: *Arch Biochem Biophys*, 234, 161-166 (1984)
110. Gigon, P. L., Gram, T. E., Gillette, J. R.: *Mol Pharmacol*, 5, 109-122 (1969)
111. Peterson, J. A., Ebel, R. E., O'Keeffe, D. H., Matsubara, T., Estabrook, R. W.: *J Biol Chem*, 251, 4010-4016 (1976)
112. Taniguchi, H., Imai, Y., Iyanagi, T., Sato, R.: *Biochim Biophys Acta*, 550, 341-356 (1979)
113. Taniguchi, H., Pyerin, W.: *J Cancer Res Clin Oncol*, 114, 335-340 (1988)
114. Voznesensky, A. I., Schenkman, J. B.: *J Biol Chem*, 269, 15724-15731 (1994)
115. Voznesensky, A. I., Schenkman, J. B.: *J Biol Chem*, 267, 14669-14676 (1992)
116. French, J. S., Guengerich, F. P., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 255, 4112-4119 (1980)
117. Stayton, P. S., Sligar, S. G.: *Biochemistry*, 29, 7381-7386 (1990)
118. Stayton, P. S., Poulos, T. L., Sligar, S. G.: *Biochemistry*, 28, 8201-8205 (1989)
119. Nisimoto, Y.: *J Biol Chem*, 261, 14232-14239 (1986)
120. Shen, A. L., Kasper, C. B.: *J Biol Chem*, 270, 27475-27480 (1995)
121. Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., Deisenhofer, J.: *Structure*, 3, 41-62 (1995)
122. Inano, H., Tamaoki, B.: *J Enzyme Inhib*, 1, 47-59 (1985)
123. Shen, S., Strobel, H. W.: *Arch Biochem Biophys*, 294, 83-90 (1992)
124. Shen, S., Strobel, H. W.: *Arch Biochem Biophys*, 304, 257-265 (1993)
125. Shimizu, T., Tateishi, T., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y.: *J Biol Chem*, 266, 3372-3375 (1991)
126. Hamdane, D., Xia, C., Im, S. C., Zhang, H., Kim, J. J., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 284, 11374-11384 (2009)
127. Tamburini, P. P., White, R. E., Schenkman, J. B.: *J Biol Chem*, 260, 4007-4015 (1985)
128. Tamburini, P. P., Schenkman, J. B.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 11-15 (1987)
129. Strittmatter, P., Hackett, C. S., Korza, G., Ozols, J.: *J Biol Chem*, 265, 21709-21713 (1990)
130. Shirabe, K., Nagai, T., Yubisui, T., Takeshita, M.: *Biochim Biophys Acta*, 1384, 16-22 (1998)
131. Bando, S., Takano, T., Yubisui, T., Shirabe, K., Takeshita, M., Nakagawa, A.: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 1929-1934 (2004)
132. Reed, J. R., Backes, W. L.: *Pharmacol Ther*, 133, 299-310 (2012)
133. Guengerich, F. P., Holladay, L. A.: *Biochemistry*, 18, 5442-5449 (1979)
134. Tsuprun, V. L., Myasoedova, K. N., Berndt, P., Sograf, O. N., Orlova, E. V., Chernyak, V., Archakov, A. I., Skulachev, V. P.: *FEBS Lett*, 205, 35-40 (1986)
135. Myasoedova, K. N., Berndt, P.: *FEBS Lett*, 270, 177-180 (1990)
136. Myasoedova, K. N., Tsuprun, V. L.: *FEBS Lett*, 325, 251-254 (1993)

137. Viner, R. I., Novikov, K. N., Ritov, V. B., Kagan, V. E., Alterman, M. A.: *Biochem Biophys Res Commun*, 217, 886-891 (1995)
138. Wagner, S. L., Dean, W. L., Gray, R. D.: *J Biol Chem*, 259, 2390-2395 (1984)
139. Pernecky, S. J., Larson, J. R., Philpot, R. M., Coon, M. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2651-2655 (1993)
140. Scott, E. E., Spatzenegger, M., Halpert, J. R.: *Arch Biochem Biophys*, 395, 57-68 (2001)
141. Dong, M. S., Yamazaki, H., Guo, Z., Guengerich, F. P.: *Arch Biochem Biophys*, 327, 11-19 (1996)
142. von Wachenfeldt, C., Richardson, T. H., Cosme, J., Johnson, E. F.: *Arch Biochem Biophys*, 339, 107-114 (1997)
143. Gut, J., Richter, C., Cherry, R. J., Winterhalter, K. H., Kawato, S.: *J Biol Chem*, 257, 7030-7036 (1982)
144. Kawato, S., Gut, J., Cherry, R. J., Winterhalter, K. H., Richter, C.: *J Biol Chem*, 257, 7023-7029 (1982)
145. Yamada, M., Ohta, Y., Bachmanova, G. I., Nishimoto, Y., Archakov, A. I., Kawato, S.: *Biochemistry*, 34, 10113-10119 (1995)
146. Ingelman-Sundberg, M., Glaumann, H.: *Biochim Biophys Acta*, 599, 417-435 (1980)
147. Reed, J. R., Kelley, R. W., Backes, W. L.: *Drug Metab Dispos*, 34, 660-666 (2006)
148. Reed, J. R., Brignac-Huber, L. M., Backes, W. L.: *Drug Metab Dispos*, 36, 582-588 (2008)
149. Reed, J. R., Eyer, M., Backes, W. L.: *J Biol Chem*, 285, 8942-8952 (2010)
150. Szczesna-Skorupa, E., Mallah, B., Kemper, B.: *J Biol Chem*, 278, 31269-31276 (2003)
151. Ozalp, C., Szczesna-Skorupa, E., Kemper, B.: *Drug Metab Dispos*, 33, 1382-1390 (2005)
152. Cawley, G. F., Batie, C. J., Backes, W. L.: *Biochemistry*, 34, 1244-1247 (1995)
153. Tan, Y., Patten, C. J., Smith, T., Yang, C. S.: *Arch Biochem Biophys*, 342, 82-91 (1997)
154. Backes, W. L., Batie, C. J., Cawley, G. F.: *Biochemistry*, 37, 12852-12859 (1998)
155. Yamazaki, H., Gillam, E. M., Dong, M. S., Johnson, W. W., Guengerich, F. P., Shimada, T.: *Arch Biochem Biophys*, 342, 329-337 (1997)
156. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C46E01232683> (15.8.2012)
157. Kubíčková, B., Hodek, P.: *Chem listy*, 95, 359-364 (2001)
158. Miernyk, J. A., Thelen, J. J.: *Plant J*, 53, 597-609 (2008)
159. Hendrickson, T. L., de Crecy-Lagard, V., Schimmel, P.: *Annu Rev Biochem*, 73, 147-176 (2004)
160. Kiick, K. L., Weberskirch, R., Tirrell, D. A.: *FEBS Lett*, 502, 25-30 (2001)
161. Link, A. J., Mock, M. L., Tirrell, D. A.: *Curr Opin Biotechnol*, 14, 603-609 (2003)
162. Rennert, O. M., Anker, H. S.: *Biochemistry*, 2, 471-476 (1963)
163. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C.: *Nat Methods*, 2, 261-267 (2005)
164. Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: *Anal Biochem*, 175, 231-237 (1988)
165. Strittmatter, P., Velick, S. F.: *J Biol Chem*, 221, 253-264 (1956)
166. Estabrook, R. W., Werringloer, J.: *Methods Enzymol*, 52, 212-220 (1978)
167. <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P00169@2-134@> (30.7.2012)
168. Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680-685 (1970)
169. Koberová, M.: Bakalářská práce, PřF UK, Praha (2010)

170. [http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool1?P00169@noft@average](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?P00169@noft@average)  
(30.7.2012)
171. [http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool1?P00178@noft@average](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?P00178@noft@average)  
(30.7.2012)
172. Ječmen, T.: Diplomová práce, PřF UK, Praha (2010)
173. <http://www.piercenet.com/instructions/2161984.pdf>: (15.8.2012)
174. Saribas, A. S., Gruenke, L., Waskell, L.: *Protein Expr Purif*, 21, 303-309 (2001)

