

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Růžena Maroušková

Ověření potenciálu pulzní proteolýzy pro studium
konformační stability cytochromu b_5

Pulse proteolysis in evaluation of conformational stability of cytochrome b_5

Diplomová práce

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

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.4.2014

.....

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytl při vypracování této diplomové práce.

Dále děkuji Bc. Marii Kostelanské za poskytnutí preparátů cytochromu b_5 a v neposlední řadě celému kolektivu laboratoře za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Monooxygenasový systém se smíšenou funkcí hraje velkou roli při metabolismu cizorodých látek. Hlavní součástí tohoto systému je cytochrom P450, díky němuž jsou látky přicházející do našeho těla převáděny na polárnější produkty. Cytochrom b₅ (cyt b₅) je schopen modulovat funkci cytochromu P450, mechanismus této modulace však dosud nebyl zcela objasněn. Předpokládá se, že by to mohlo být zprostředkováno buď přenosem elektronů z cyt b₅, nebo i allosterickou modulací cytochromu P450 vyvolanou interakcí s cyt b₅. Cílem práce bylo nalézt a připravit vhodný analog cyt b₅, který by nebyl schopen přenosu elektronů, ale přitom by byl strukturně velmi blízký nativnímu cyt b₅. V práci byla pro sledování konformační stability cyt b₅ a jeho analogů využívána metoda pulzní proteolýzy. Tato metoda využívá štěpení proteinu proteasou v prostředí denaturačního činidla. Pro solubilní proteiny bývá jako denaturant využívána močovina a jako proteasa thermolysin. Pro membránové proteiny se jako denaturant používá spíše SDS a v tomto prostředí se jako proteasa využívá subtilisin. Cílem diplomové práce bylo pomocí této metody porovnat konformační stabilitu nativního lidského cyt b₅ obsahujícím v aktivním centru hem s apo-cyt b₅ a cyt b₅ rekonstituovaným s Mn^{III} protoporfyrinem IX (Mn^{III} PPIX), Cr^{III} protoporfyrinem IX (Cr^{III} PPIX) a Co^{III} protoporfyrinem IX (Co^{III} PPIX). V práci je také popsána příprava cyt b₅ rekonstituovaného s heminem a jeho analogy jednak metodou titrace, tak i pomocí gelové chromatografie.

Klíčová slova: elektroforéza, pulzní proteolýza, hemoproteiny.

Abstract

Mixed-function oxidases play a major role in the metabolism of xenobiotics. The main component of this system is the cytochrome P450, it oxidizes substrates coming into our body to more polar products. Another component of mixed-function system – the cytochrome b₅ (cyt b₅) is able to modulate the function of cytochrome P450, the mechanism of this modulation is yet unknown. However, it is believed that it could be mediated *via* transfer of electron or allosteric modulation of cytochrome P450 caused by interaction with cyt b₅. The aim of this thesis was to find and prepare analogs of cyt b₅, which are unable to transfer electrons to cytochrome P450 and simultaneously are structurally very similar to native cyt b₅. The conformational stability of cyt b₅ and its analogs was monitored using pulse proteolysis. This method employs proteases to cleave the evaluated protein at varying concentration of a denaturant. For soluble proteins, urea is typically used as denaturant in combination with thermolysin as protease. While for membrane proteins, sodium dodecyl sulfate (SDS) is usually used as denaturant together with subtilisin as protease. The aim of this thesis was to use these methods to compare a conformational stability of the native human cyt b₅ with apo-cyt b₅ and analogs of the cyt b₅ reconstituted with Mn^{III} protoporphyrin IX (Mn^{III} PPIX), Cr^{III} protoporphyrin IX (Cr^{III} PPIX) and Co^{III} protoporphyrin IX (Co^{III} PPIX). Reconstitution and preparation of cyt b₅ containing hemin or its analogs *via* titration and gel chromatography is also described.

Key words: electrophoresis, pulse proteolysis, hemoproteins.

(In Czech)

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	7
1. ÚVOD	10
1.1 Metabolismus xenobiotik.....	10
1.1.1 Fáze biotransformace	10
1.2 Cytochrom b₅.....	12
1.2.1 Struktura mikrosomálního cytochromu b ₅	12
1.2.2 Funkce cytochromu b ₅	15
1.3 Studium stability proteinů.....	19
1.3.1 Pulzní proteolýza	21
2. CÍLE	25
3. MATERIÁLY A METODY	26
3.1 Použitý materiál a chemikálie	26
3.2 Použité přístroje	27
3.3 Metody	28
3.3.1 Preparáty lidského cytochromu b ₅	28
3.3.2 Příprava roztoků metalo-protoporfyrinů IX	29
3.3.3 Příprava vzorků cytochromu b ₅ rekonstituovaného s metalo-protoporfyriny IX	29
3.3.4 Redukce metalo-protoporfyrinů IX a cytochromu b ₅ dithioničitanem sodným	34
3.3.5 Pulzní proteolýza	35
3.3.6 Elektroforéza SDS-PAGE.....	38
3.3.7 Kvantifikace proteinu v gelu.....	39
4. VÝSLEDKY	40
4.1 Rekonstituce apo-cyt b₅ s metalo-protoporfyriny IX.....	40
4.1.1 Titrace solubilního apo-cyt b ₅ a příprava cytochromu b ₅ rekonstituovaného s heminem a jeho analogy dle titrace	40
4.1.2 Příprava solubilního cytochromu b ₅ rekonstituovaného s heminem pomocí gelové chromatografie	41
4.1.3 Příprava solubilního cytochromu b ₅ rekonstituovaného s analogy heminu pomocí gelové chromatografie	45
4.1.4 Titrace membránové apoformy cytochromu b ₅ metalo- -protoporfyriny IX.....	48
4.1.5 Příprava membránového Fe-cyt b ₅ a Co-cyt b ₅ pomocí gelové chromatografie	49

4.1.6 Příprava membránového cytochromu b ₅ rekonstituovaného s analogy heminu pomocí titrace	52
4.1.7 Redukce metalo-protoporfyrinů IX a cytochromu b ₅ dithioničitanem sodným	55
4.2 Pulzní proteolýza a porovnání stability cyt b₅ rekonstituovaných s heminem a jeho analogy	57
4.2.1 Solubilní cytochrom b ₅ – močovina a thermolysin	57
4.2.2 Membránový cytochrom b ₅ – močovina a thermolysin	58
4.2.3 Optimalizace podmínek štěpení pomocí subtilisinu v přítomnosti SDS	60
4.2.4 Solubilní cytochrom b ₅ – SDS a subtilisin	62
4.2.5 Membránový cytochrom b ₅ – SDS a subtilisin.....	63
5. DISKUSE	65
6. ZÁVĚR.....	69
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70

Seznam použitých zkratek a symbolů

Å	angström, jednotka délky, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
apo-cyt b ₅	apofорма cytochromu b ₅
APS	persíran amonný (z angl. „ammonium persulfate“)
Arg	arginin
Asp	asparagová kyselina
A _x	absorbance při vlnové délce x nm
BIS	N,N-methylen-bisakrylamid
c	molární koncentrace
Co-cyt b ₅	holoforma cytochromu b ₅ s navázaným Co ^{III} protoporfyrinem IX
Co ^{III} PPIX	Co ^{III} protoporfyrin IX
Cr-cyt b ₅	holoforma cytochromu b ₅ s navázaným Cr ^{III} protoporfyrinem IX
Cr ^{III} PPIX	Cr ^{III} protoporfyrin IX
cyt b ₅	cytochrom b ₅
Da	dalton, jednotka molekulové hmotnosti, $1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
Fe-cyt b ₅	holoforma cytochromu b ₅ s navázaným heminem
Fe ^{III} PPIX	Fe ^{III} protoporfyrin IX (hemin)
FMN	flavinmononukleotid
His	histidin
K _d	disociační konstanta
l	optická dráha
Lys	lysin

M	mol.dm ⁻³
MFO	oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“)
Mn-cyt b ₅	holoforma cytochromu b ₅ s navázaným Mn ^{III} protoporfyrinem IX
Mn ^{III} PPIX	Mn ^{III} protoporfyrin IX
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
NMR	nukleární magnetická resonance
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Prep1	preparát solubilní apoformy cytochromu b ₅ (viz 3.3.1)
Prep2	preparát solubilní formy cytochromu b ₅ (viz 3.3.1)
Prep3	preparát membránové apoformy cytochromu b ₅ (viz 3.3.1)
Prep4	preparát membránové formy cytochromu b ₅ (viz 3.3.1)
PřF	přírodovědecká fakulta
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
Rz	poměr A _{max} /A ₂₈₀ , číslo čistoty cyt b ₅ (z něm. „reinheitszahl“)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. „sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. „sodium dodecyl sulfate polyakrylamide gel electrophoresis“)
Ser	serin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
Trp	tryptofan
UK	Univerzita Karlova v Praze
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem (z angl. „volume/volume“), objem látky v mililitrech ve 100 ml
V _e	eluční objem

Vis	viditelné záření
w/v	hmotnost/objem (z angl. „weight/volume), hmotnost látky v gramech ve 100 ml
λ	vlnová délka

1. Úvod

1.1 Metabolismus xenobiotik

Pojem xenobiotika označuje cizorodé látky, které se v těle běžně nevyskytují a pro tělo nejsou potřebné. Průmyslovou či zemědělskou činností přichází lidé stále více do kontaktu s xenobiotiky, a proto dochází ke stále rozsáhlejšímu zkoumání, jakým mechanismem prochází xenobiotika v lidském těle a jak tělo dokáže cizorodé látky eliminovat. Pro organismy je důležité, aby eliminovaly látky, které jim mohou škodit, protože vlivem vysoké koncentrace nebo dlouhého působení může dojít k takovému nezvratnému poškození, které způsobí i smrt jedince. Xenobiotika mohou do organismu vstupovat přes trávicí ústrojí, respirační systém či pokožku do krve, odkud jsou převáděny pomocí plasmatických proteinů do jednotlivých tělních buněk. Epitely, které tvoří bariéru mezi krví a tkáněmi, jsou tvořeny buňkami obsahujícími velké množství lipidů a fosfolipidů. Z tohoto plyne, že látky lipofilní povahy vstupují do organismu snadněji. Detoxikace xenobiotik probíhá většinou ve dvou fázích, během kterých se xenobiotikum stává polárnějším a také se váže na endogenní látky usnadňujících jejich odbourávání z těla [1].

1.1.1 Fáze biotransformace

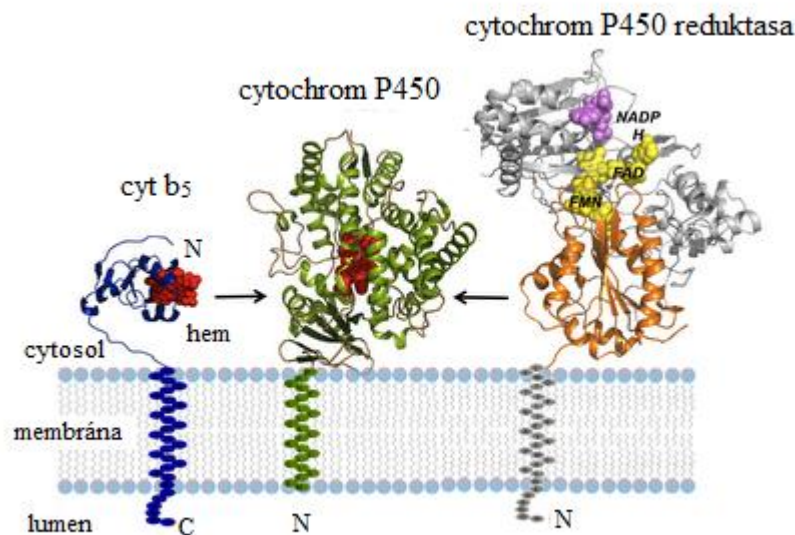
Jednotlivé organismy si vytvořily během evoluce různé mechanismy detoxikace [1]. U obratlovců probíhá detoxikace zejména v játrech, ledvinách a plicích [2]. Procesu chemické přeměny látek v organismu, zpravidla katalyzovaného enzymy a vedoucí k vytvoření látek tělu vlastních nebo produktům, které se z těla vyloučí, říkáme biotransformace. Tento proces se dělí do dvou hlavních fází.

V I. fázi biotransformace dochází k vytvoření skupin (-OH, -NH₂, -SH a jiných skupin), díky nimž se látka stává polárnější. Tyto skupiny mohou vznikat mnoha reakcemi: N- a S-oxidace, alifatická a aromatická hydroxylace, deaminace, hydrolytická reakce [1,3]. Látky se lépe vyloučí z těla, čímž se organismus brání proti bioakumulaci příslušných xenobiotik. Na druhé straně může dojít k vytvoření biologicky aktivnějších derivátů, což může mít negativní i pozitivní přínos. Z negativního hlediska se mohou tvořit látky toxické, mutagenní či karcinogenní, z pozitivního hlediska pak aktivní formy některých

léčiv. Poznání metabolismu xenobiotik u člověka umožňuje eventuálně omezovat škodlivé účinky xenobiotik na náš organismus či modulovat účinky některých léčiv. Hlavními enzymy I. fáze biotransformace jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed-function oxidases“). Jedná se o systém využívající především molekulární kyslík ke katalýze řady oxygenačních, oxidačních a redukčních reakcí. Skládá se ze tří základních složek:

1. NADPH:cytochrom P450 reduktasa – flavoproteinový enzym, slouží jako dělič elektronového páru
2. cytochrom P450 – hemthiolátový enzym
3. biologická membrána

Další součástí MFO systému mohou být fakultativně cytochrom b_5 (cyt b_5) a NADH:cytochrom b_5 reduktasa [4]. V endoplasmatickém retikulu je možno nalézt cytochrom P450 a cyt b_5 v přibližném poměru 1:1, zatímco na 1 molekulu cytochromu P450 reduktasy připadá deset až dvacet cytochromů P450 [5]. Na Obr. 1 je znázorněno srovnání velikostí a tvarů některých proteinů MFO systému.



Obr. 1: Monooxygenasový systém se smíšenou funkcí. Hlavní roli v tomto systému hraje cytochrom P450, kterému jsou předávány elektrony buď z cyt b_5 nebo cytochrom P450 reduktasy. Cyt b_5 je na rozdíl od ostatních enzymů MFO systému (cytochrom b_5 reduktasy, cytochromu P450, cytochrom P450 reduktasy) ukotven v membráně pomocí C-terminální kotvy [5–7]. Převzato z [8].

II. fáze biotransformace je zejména konjugační, při níž se látky pozměněné v I. fázi slučují s endogenními látkami za vytvoření ještě více polárnějších produktů. Mezi reakce II. fáze patří glukuronidace, sulfatace, methylace, acetylace, konjugace s glutathionem a aminokyselinami. Enzymy II. fáze biotransformace jsou především transferasy (UDP-glukuronosyltransferasa, sulfotransferasa apod.).

Hlavní pozornost je směřována zejména na enzymy I. fáze biotransformace, neboť až 70 % léčiv je metabolizováno cytochromy P450 [3,5,9].

1.2 Cytochrom b₅

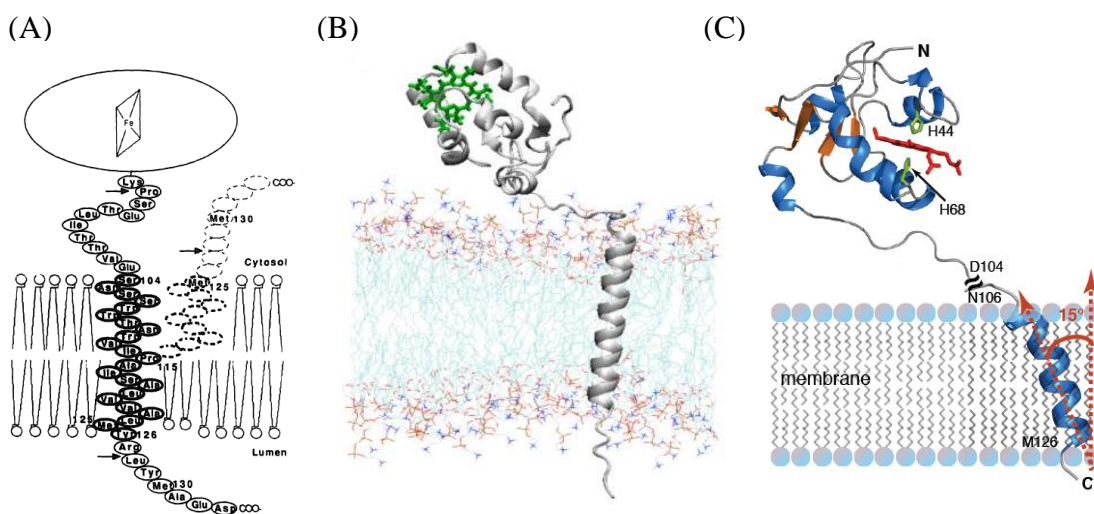
První zmínky o cyt b₅ pochází z roku 1950 [10]. Jedná se o všudypřítomný protein, který můžeme najít u rostlin, zvířat, hub i prokaryotických organismů [7]. U savců se nachází ve třech formách – mikrosomální (zanořený do membrány endoplasmatického retikula), erytrocytární a mitochondriální (zanořený do vnější membrány mitochondrií). Mikrosomální i mitochondriální cyt b₅ se skládá z 2 částí – solubilní a membránové. Erytrocytární pouze z jedné – solubilní části. Dříve se cyt b₅ izoloval z tkání, což trvalo dlouhou dobu. Heterologní exprese cyt b₅ v buňkách bakterie *Escherichia coli* ulehčila získání tohoto proteinu, a tím i studium struktury, funkcí nebo mutagenese [5]. Molekulová hmotnost proteinu z lidských jaterních mikrosomů je 15 kDa [11]. Pokud porovnáme aminokyselinovou sekvenci solubilní domény krysího mikrosomálního a mitochondriálního cyt b₅, zjistíme, že se shodují pouze z 58 %, z čehož plyne fakt, že mitochondriální a mikrosomální formy cyt b₅ jsou kódovány různými geny [12]. Porovnáme-li však solubilní část lidského mikrosomálního cyt b₅ a erytrocytární cyt b₅, můžeme si všimnout shodné sekvence mezi aminokyselinami 1 - 98 lišící se pouze v poslední aminokyselině [11]. Bylo zjištěno, že mikrosomální a erytrocytární formy pochází ze stejného genu a vznikají alternativním sestřihem. Obě formy se tvoří na volných ribosomech, přičemž mikrosomální cyt b₅ obsahuje navíc na svém konci přibližně 10 aminokyselinových zbytků předurčující umístění cyt b₅ v membráně endoplasmatického retikula [6].

1.2.1 Struktura mikrosomálního cytochromu b₅

Cyt b₅ je malý protein (31 Å x 37 Å) skládající se z šesti α -helixů a pěti struktur skládaného listu [7]. Jeho celková struktura je vyobrazena na následujícím Obr. 2.

Ligace 5. a 6. koordinační pozice hemu dvěma histidiny brání cyt b_5 přímé interakci s molekulárním kyslíkem [7]. Kation Fe^{3+} uvnitř struktury hemu se může redukovat na železnatý, avšak na strukturu proteinu nemá náboj iontu železa vliv [16].

Druhá doména je hydrofobní a je tvořena α -helixem zanořeným do membrány. Dříve byly popsány 2 hypotézy (viz Obr. 4, A), které zobrazovaly způsob umístění této domény ve fosfolipidové membráně. První model předpokládal, že membránová kotva prochází celou membránou a C-terminální konec je umístěn v lumenu endoplasmatického retikula. Druhý model naznačoval, že by mohlo docházet ke změně konformace na místě Pro115 a že C-terminální konec směřuje do cytosolu [5,16]. Podrobnější studie NMR spektroskopie prokázaly správnost prvního modelu (viz Obr. 4, B, C). Solubilní část králíčího mikrosomálního cyt b_5 (aminokyseliny 1-104) byla vyřešena pomocí NMR v kapalně fázi. Nyní je předmětem studia i membránová část (aminokyseliny 106-126) a to především pomocí NMR v pevné fázi [17]. Bylo mj. zjištěno, že membránová doména je v membráně skloněna pod úhlem 15° [18,19].



Obr. 4: Vývoj modelu umístění cyt b_5 v membráně. (A) V roce 1995 byli navrženy dva modely umístění membránové domény ve fosfolipidové membráně. C-terminální konec u prvního modelu se nachází v lumenu endoplasmatického retikula (plná čára), u druhého modelu se vyskytuje v cytosolu buňky (čárkovaně) [16]. (B) Novější studie z roku 2007 však ukázaly, že cytochrom b_5 prochází skrz celou membránu a C-terminální konec proteinu zasahuje do lumenu [17]. (C) V nedávné době pak byla zpřesněna pozice a tvar trans-membránového helixu [18].

Cytosolární a membránová doména jsou spojeny pomocí flexibilní spojky o délce 11 aminokyselin, jež je pohyblivá a umožňuje vazbu cyt b₅ s dalšími proteiny redoxního systému, zatímco cyt b₅ zůstává ukotvený v membráně [6]. V tomto úseku aminokyselin může snadno dojít k působení proteasy trypsinu a cyt b₅ může být rozdělen mezi membránovou a solubilní část [7,20]. Celková aminokyselinová sekvence lidského cyt b₅ je popsána na Obr. 5

```

      10           20           30           40           50           60
MAEQSDEAVK YTTLEEIQKH NHSKSTWLIL HHKVYDLTKF LEEHPGGEEV LREQAGGDAT
      70           80           90           100          110          120
ENFEDVGHST DAREMSKTFI IGELHPDDRP KLNKPPETLI TTIDSSSSWW TNWVIPAISA
      130
VAVALMYRLY MAED

```

Obr. 5: Aminokyselinová sekvence lidského cyt b₅. Mikrosomální (membránový) cyt b₅ se skládá ze 134 aminokyselin. Červeně je označena solubilní doména, zeleně membránová doména a modře flexibilní spojka mezi danými doménami. Erytrocytární (solubilní) cyt b₅ se od mikrosomálního cyt b₅ liší aminokyselinou v pozici 98 (místo threoninu obsahuje prolin) a aminokyseliny 99 – 134 chybí úplně [11,21].

Různými metodami lze připravit několik variant cyt b₅. Membránový cyt b₅ lze získat buď izolací z jaterních mikrosomů [22] nebo heterologní expesí v bakterii *Escherichia coli* [23]. Solubilní cyt b₅ může být připraven štěpením membránové formy trypsinem v oblasti flexibilní spojky [24], nebo heterologní expesí [6,25]. Trypsin je serinová proteasa štěpící proteiny v oblasti bazických aminokyselin argininu a lysinu [26].

Pro sledování vlastností cyt b₅ je vhodné provádět též experimenty s apoformou cyt b₅ (apo-cyt b₅). Jednou z metod pro získání apo-cyt b₅ byla extrakce hemu z cyt b₅ působením acetonu, ale tento způsob vedl k poškození části vzniklých apo-cyt b₅. Také bylo testováno odstranit hem z cyt b₅ pomocí apo-myoglobinu, který má k hemu vyšší afinitu než cyt b₅, z nativních cyt b₅ bylo možné získat 16 % apo-cyt b₅ [27]. Pro získání apo-cyt b₅ (solubilní i membránové) lze též použít heterologní expesi v bakterii *Escherichia coli* [6].

1.2.2 Funkce cytochromu b₅

Cyt b₅ může fyziologicky existovat jak v redukované, tak v oxidované formě. Cyt b₅ může být redukován cytochrom P450 reduktasou nebo cytochrom b₅ reduktasou. Pro navázání redoxních partnerů k cyt b₅ je důležitý záporný náboj obklopující oblast

hemu. Karboxylové zbytky cyt b₅ (včetně propionátového zbytku hemu) vytváří aniontový „kruh“ okolo hemu a způsobují dipólový moment, který koreluje s pozitivním dipólovým momentem redoxních partnerů. Redoxními partnery interagujícími s cyt b₅ jsou zejména cytochrom c, methemoglobin, cytochrom P450, NADPH cytochrom P450 reduktasa, NADH cytochrom b₅ reduktasa a stearyl CoA desaturasa [16].

Redukce methemoglobinu

Každý den jsou přibližně 3 % hemoglobinu oxidována na methemoglobin, při tom dochází k oxidaci Fe²⁺ na Fe³⁺ v hemové skupině molekuly. Methemoglobin pak není schopen vázat kyslík, proto je nutné udržovat hemoglobin v jeho redukovaném stavu. K tomu přispívá erytrocytární forma cyt b₅, která předává hemoglobinu elektrony získané z NADH:cytochrom b₅ reduktasy. Bylo zjištěno, že nedostatek cyt b₅ může zapříčinit fyziologickou poruchu zvanou methemoglobinémie [5,16].

Biosyntéza sialové kyseliny

Biosyntéza sialových kyselin probíhá také za účasti cyt b₅. Sialové kyseliny jsou N-acyl (nebo O-acyl) deriváty neuraminové kyseliny a tvoří poslední článek oligosacharidových řetězců gangliosidů a glykoproteinů, které hrají důležitou roli v určení povrchových charakteristik buňky. Sialové kyseliny jsou důležité pro interakce buňky s další buňkou, extracelulárním matrixem, bakteriemi nebo virem. Běžnou sialovou kyselinou je N-acetylneuraminová kyselina, která se může pomocí hydroxylasy přeměňovat na N-glykolylnuraminovou kyselinu. Při reakci se N-acetylneuraminová kyselina váže na cytidin-5'-monofosfát (CMP). Právě pro aktivitu hydroxylasy je přítomnost cyt b₅ zásadní [16].

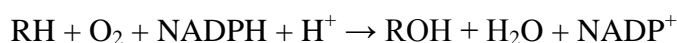
Biosyntéza lipidů

Na vzniku nenasyčených mastných kyselin vznikajících aerobní cestou se podílí cyt b₅ tak, že předává elektrony mikrosomálním desaturasám (Obr. 6). V mikrosomech savců můžeme nalézt alespoň 3 typy desaturas – Δ5, Δ6 a Δ9. Např. Δ5 desaturasa znamená, že tento enzym způsobuje tvorbu dvojně vazby mezi 5. a 6. atomem uhlíku kyseliny stearové a palmitové, počítáno od karboxylové skupiny mastných kyselin. Pro zajímavost, kyselina linolová (Δ9; Δ12) a linolenová (Δ9; Δ12; Δ15) jsou esenciální, neboť savci nedokáží tvořit dvojnou vazbu za 10. uhlíkem mastných kyselin.

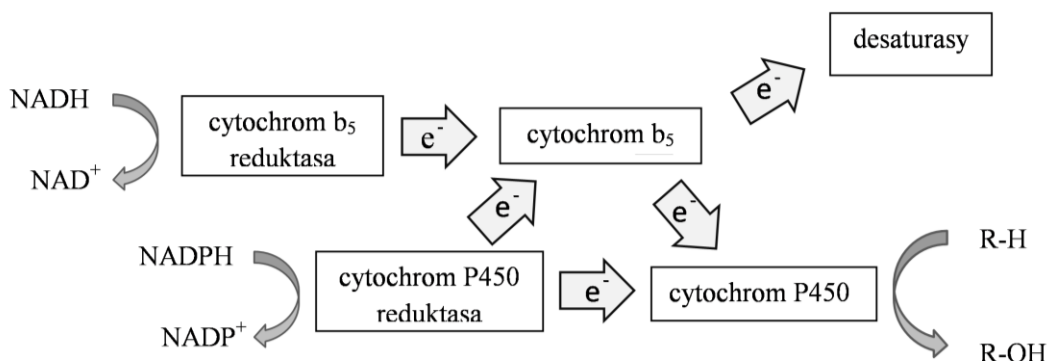
Cyt b_5 ovlivňuje syntézu dalších látek lipofilní povahy, jako jsou cholesterol z lanosterolu, plasmalogen aj. [16].

Vliv cytochromu b_5 na katalytickou činnost cytochromu P450

Existuje mnoho isoformů cytochromu P450 lišících se svou funkcí [2]. Hlavní působení cytochromu P450 je lokalizováno zejména do endoplasmatického retikula jater, kde nejčastěji katalyzuje monooxygenasovou reakci, již shrnuje následující rovnice [28]:



K aktivaci kyslíku a oxidasové aktivitě potřebují cytochromy P450 dva elektrony a dva protony [5]. Protony získává od NADPH, elektrony přijímá od cyt b_5 a cytochrom P450 reductasy. Schéma přenosu je vyobrazeno na Obr. 6. Redoxní potenciál cytochromu b_5 je poměrně nízký (20 mV), proto je tento protein schopen na cytochrom P450 efektivně přenést pouze druhý elektron [6,29]. Přenos elektronu na cytochrom P450 je rychlejší z cyt b_5 než z cytochrom P450 reductasy [14,30].



Obr. 6: Přehled interakcí mezi cytochromem b_5 , cytochromem P450 a jejich reductasami. Cytochrom P450 přijímá přes přenašeče elektrony, jejichž zdrojem je nikotinamidadenin dinukleotid (NADH) nebo nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (NADPH). Díky tomu cytochrom P450 dokáže oxidovat daný substrát (R-H). Cyt b_5 předává elektron dalším enzymům, jako jsou desaturasy mastných kyselin aj. Upraveno dle [5].

Míra a efektivnost přenosu elektronu od cyt b_5 jsou ovlivněny různými strukturálními a termodynamickými faktory, mezi něž můžeme řadit vzdálenost mezi donorem

a akceptorem elektronu, rozdíl redoxních potenciálů, prostředí, solvatační efekt a jiné [16]. Bylo zjištěno, že minimální délka flexibilní spojky cyt b₅ pro správnou vazbu cyt b₅ na cytochrom P450 je 6 - 8 aminokyselin [21].

Cyt b₅ může na stimulaci katalytické reakce cytochromu P450 působit jednak přímým přenosem elektronu z cyt b₅ na cytochrom P450, jednak prostřednictvím allosterických modulací reakcí katalyzovaných cytochromem P450 [31]. Ovlivnění allosterickými modulacemi bylo zjištěno z experimentu působení cyt b₅ na cytochrom P450, při němž byl použit cyt b₅ s Mn-protoporfyrinem IX (místo nativního heminu). Cyt b₅ obsahující ve svém protoporfyrinovém kruhu Mn^{III} není schopen elektronového přenosu, avšak vykazuje stále stimulační efekt na cytochrom P450 [32]. Cyt b₅ může mít vliv jak na množství substrátu přeměněného cytochromem P450, tak i na typ produktu vzniklého jeho přeměnou [13].

Pro funkci cytochromu P450 je důležitý membránově vázaný cyt b₅. Solubilní, proteasami štěpený cyt b₅, již na aktivitu cytochromu P450 nemá vliv [7].

Cyt b₅ mohou aktivitu cytochromů P450 stimulovat, inhibovat nebo nijak neovlivňovat. Jak působí cyt b₅ na cytochrom P450 záleží také na isoformě cytochromu P450, substrátu a experimentálních podmínkách. Např. byl studován rozdílný vliv přítomnosti cyt b₅ na biotransformaci methoxyfluranu a benzfetaminu. Zatímco benzfetamin je přítomností cyt b₅ ovlivňován minimálně, pro biotransformaci methoxyfluranu je cyt b₅ nezbytný [29].

Dále byl studován vliv cyt b₅ na metabolismus protinádorového léčiva ellipticinu. Cytochrom P450 3A4 přeměňuje ellipticin na několik metabolitů. Zatímco se zvýšeným množstvím cyt b₅ v systému s cytochromem P450 se množství detoxikačních metabolitů 7-hydroxy a 9-hydroxyellipticinu nemění, množství aktivních forem ellipticinu (13-hydroxy a 12-hydroxyellipticinu) vzrůstá. Cyt b₅ tak přispívá k tvorbě aktivních metabolitů ellipticinu, které jsou schopné tvořit kovalentní adukty s DNA [33]. Vliv cyt b₅ na metabolismus ellipticinu byl zaznamenán u nativní holoformy cyt b₅. Apoforma cyt b₅ ani Mn-cytochrom b₅ neměly na metabolismus ellipticinu žádný efekt.

In vivo byly provedeny experimenty na myších, u kterých byly odstraněny cyt b₅ ve všech tkáních. Navzdory tomu, že cyt b₅ má vliv na metabolismus hormonů a redukci methemoglobinu, byly takové myši životaschopné i plodné. U jejich potomků byla zaznamenána zvýšená exprese jaterních cytochromů P450, jak na proteinové, tak mRNA úrovni [34].

K objasnění detailnějšího mechanismu interakce cyt b_5 s cytochromem P450 je důležité zabývat se nejen nativním cyt b_5 , ale i apo-cyt b_5 . Bylo zjištěno, že některé formy cytochromu P450 jsou stimulovány apo-cyt b_5 i nativním cyt b_5 (např. cytochrom P450 2C9, 2B6, 3A5), jiné formy pouze nativním cyt b_5 (např. cytochrom P450 2E1) [35]. Byl také zkoumán stimulační vliv nativního cyt b_5 a apo-cyt b_5 při 6 β -hydroxylaci testosteronu. Obě formy cyt b_5 měly stimulační účinek na katalytickou činnost cytochromu P450 3A4, pokud byly v systému NADPH:cytochrom P450 reduktasa a cytochrom P450 3A4. Systém skládající se z NADH:cytochrom b_5 reduktasy a cytochromu P450 3A4 byl stimulován pouze nativním cyt b_5 . Apo-cyt b_5 nebyl schopen přenosu elektronu z cytochrom b_5 reduktasy [36].

1.3 Studium stability proteinů

Struktura bílkovin je určována dle čtyř úrovní – primární až kvartérní. Primární struktura vychází z uspořádání aminokyselin v řetězci a určuje základní vlastnosti bílkovin a fyziologickou funkci. Sekundární struktura je dána prostorovým uspořádáním aminokyselin, na čemž se podílí zejména vodíkové vazby. Mezi sekundární struktury patří α -helix a struktura skládaného listu. Terciární strukturou se rozumí uspořádání α -helixu nebo skládaného listu do konečného prostorového tvaru molekuly bílkoviny. Některé bílkoviny vykazují kvartérní strukturu a takové bílkoviny jsou funkční až po spojení dvou a více podjednotek. Na celkovém uspořádání bílkovin se podílí nejen vodíkové vazby, ale i jiné interakce, jako jsou hydrofobní interakce, elektrostatické síly či disulfidové vazby. Změnou vnějších podmínek může dojít k porušení jednotlivých interakcí a podle charakteru změn pak bílkoviny ztrácí svoje nativní uspořádání a může dojít k jejich denaturaci [37].

Studium odolnosti proteinů vůči různým denaturačním vlivům podává informace o stabilitě struktury proteinu, nepřímo tak i o jeho struktuře a energetice. Často je sledován vliv mutací na stabilitu proteinů, čímž se určuje role jednotlivých aminokyselin v proteinovém řetězci a její vliv na prostorové uspořádání proteinu. Mutace proteinů, které bílkovinu spíše destabilizují, často vedou ke ztrátě funkce takové bílkoviny. Navázání ligandů způsobuje změny v celkové stabilitě proteinů, a proto může být určení stability použito i pro monitorování interakce mezi ligandem a proteinem nebo dvěma proteiny.

Schopnost proteinů měnit svojí konformaci jako výsledek spojení se substrátem, kofaktorem a dalšími malými molekulami je často nezbytné pro jejich funkci. Pokud apo-cyt b_5 přijme hem, mění svojí konfiguraci a vzniká více stabilní protein [38,39]. Holoprotein cyt b_5 obsahuje také více sekundárních struktur než apo-cyt b_5 . Vazba hemu v Fe-cyt b_5 je spojena s mnoha interakcemi. Těmi mohou být van der Waalsovy síly mezi planárním porfyrinovým kruhem a postranními řetězci proteinu, elektrostatické interakce mezi propionátovými substituenty porfyrinového skeletu hemu a kladně nabitými aminokyselinovými zbytky proteinů a jiné [39].

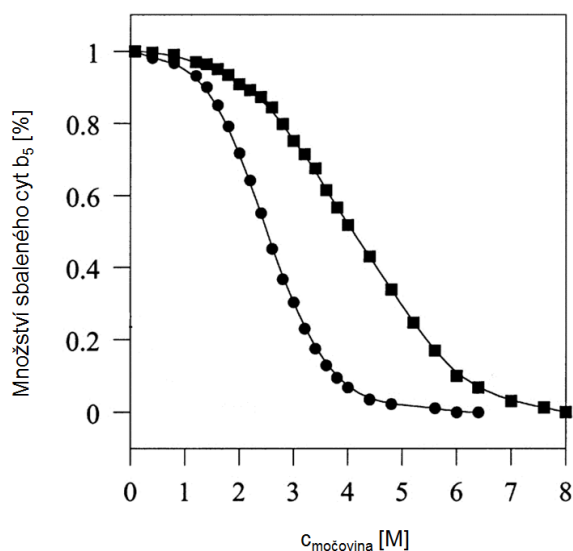
Výběr metody pro určení stability je rozhodující pro správné interpretování pozorovaných experimentů strukturních a funkčních studií proteinů [40,41]. Ke studiu stability proteinů se využívá mnoho metod, např. fluorescenční spektroskopie, cirkulární dichroismus, NMR, tepelná nebo chemická denaturace [42,43].

Chemická denaturace využívá různá denaturační činidla, jako jsou chaotropy – močovina, guanidin hydrochlorid či detergenty (např. dodecylsulfát sodný) způsobující rozvolnění struktury. Pro solubilní proteiny se běžně využívají močovina nebo guanidin hydrochlorid, pro membránové proteiny je výhodné použít dodecylsulfát sodný (SDS), protože dokáže tvořit micely i s jinými denaturanty, které bývají používány pro izolaci membránových proteinů. Močovina působí na denuraci tím, že se začleňuje do struktury vody a narušuje nekovalentní interakce proteinu. SDS se váže na protein interakcemi jednak jeho sulfátovou skupinou a kladně nabitými aminokyselinovými zbytky proteinů, jednak mezi přes alkylový řetězec SDS a hydrofobní postranní řetězce bílkovin [44]. Ačkoli membránová kotva cyt b_5 zahrnuje pouze 30 % hmotnosti cyt b_5 , váže se SDS především na tuto část proteinu (až 70 %) [17]. Je to zejména proto, že převážnou část SDS tvoří hydrofobní uhlíkový řetězec, který se proto snadněji váže na hydrofobní α -helix membránové kotvy.

Bylo prokázáno, že proteiny prošlé denurací močovinou, guanidin hydrochloridem nebo SDS, mohou být znovu sbaleny do své nativní struktury [45,46].

Stabilita cyt b_5 byla již dříve studována pomocí tepelné denaturace nebo chemické denaturace. Při porovnávání termostability savčího mitochondriálního a hovězího mikrosomálního cyt b_5 , získaných rekombinantní expresí a obsahující jen hem-vázající doménu, bylo zjištěno, že mitochondriální cyt b_5 je mnohem více termostabilní. Hodnota teploty, kdy je v roztoku množství sbaleného a nesbaleného proteinu v poměru 1:1 (obvykle značené jako T_m), byla pro hovězí mikrosomální protein stanovena na 67 °C

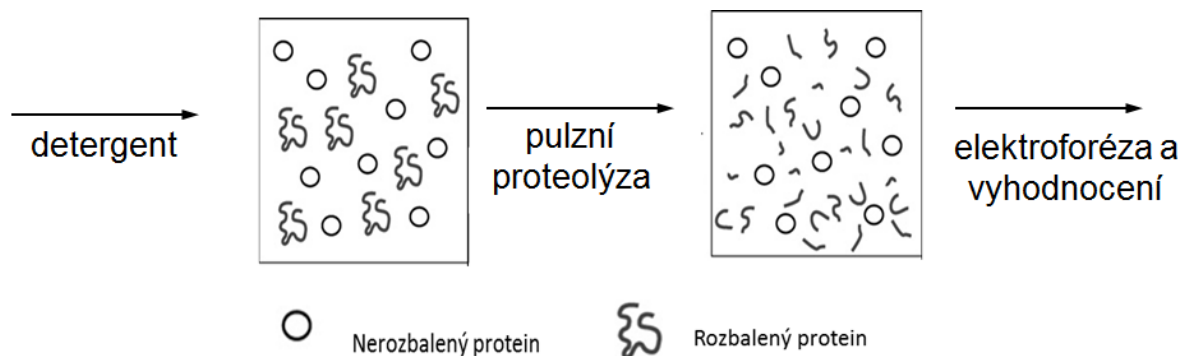
a pro krysí mitochondriální na 85 °C [38,47]. Stejně proteiny byly podrobeny i chemické denaturaci. Změny v množství sbaleného proteinu v závislosti na koncentraci proteinu byly měřeny fluorescenční spektroskopií, jejíž výsledky jsou znázorněny na Obr. 7.



Obr. 7: Křivky denaturace cyt b_5 , obsahujícího pouze solubilní doménu, v prostředí močoviny pro mikrosomální apo-cyt b_5 (čtverečky) a mitochondriální apo-cyt b_5 (kolečka). Koncentrace močoviny, při které se v roztoku nachází 50 % sbaleného a 50 % rozbaleného proteinu, byla pro mikrosomální cyt b_5 stanovena na 4,09 M, pro mitochondriální cyt b_5 na 2,52 M. Převzato z [38,47].

1.3.1 Pulzní proteolýza

Pulzní proteolýza využívá fakt, že sbalený protein je vůči proteasám více odolný, než protein rozbalený. V této metodě jsou připraveny roztoky s proteinem a různými koncentracemi denaturantů, kterým bývá močovina nebo SDS. Protein vlivem denaturantu rozvolňuje svojí strukturu. Následně po ekvilibraci roztoku je na protein působeno nadbytkem proteasy po krátký čas, kdy proteasa štěpí pouze rozbalený protein, nikoli protein sbalený. Na konci pulzu je do roztoků přidáván inhibitor proteasy, který zastavuje jejich aktivitu. Množství neštěpeného proteinu, který zbyl v roztoku, se určí pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS) [40,48]. Souhrnný postup metody pulzní proteolýzy ukazuje Obr. 8.



Obr. 8: Schéma průběhu experimentu pulzní proteolýzy. Do roztoku směsi bílkoviny se přidá detergent (SDS, močovina) způsobující rozbalení některých bílkovin, zatímco jiné zůstávají sbalené. Po ustanovení rovnováhy roztoku je na bílkoviny působeno proteasami (samotná pulzní proteolýza), kdy jsou štěpeny jen rozbalené proteiny. Působení proteasy je zastaveno inhibítorem. Následně se vzorek vyhodnotí pomocí SDS – PAGE a programu image J. Upraveno dle [40].

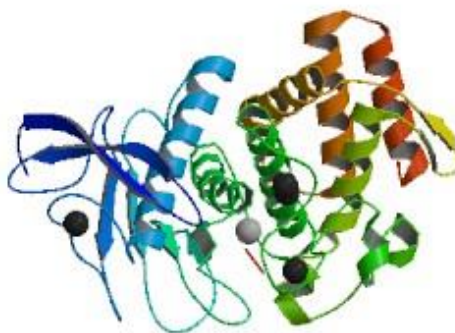
Metoda pulzní proteolýzy má řadu výhod. Na rozdíl od jiných již zavedených metod, nevyužívá drahé přístroje pro měření, např. cirkulárního dichroismu či fluorescence. Ve srovnání se standardními spektroskopickými metodami není potřeba k proměření roztoků přílišné množství proteinů; pokud je k dispozici izolovaná bílkovina, může být k experimentu využito i méně než 100 μg proteinu. Navíc pro tuto metodu není nutností mít k dispozici čistý protein, stabilita proteinu může být stanovena i v buněčném lyzátu. To je příznivé zejména u membránových proteinů, které je obtížné získat čisté. Pulzní proteolýza je vhodná k určení předběžného výsledku biofyzikálních vlastností před jejich důkladným proměřováním. Pro vazbu ligandů na protein je tato metoda vhodná zejména v případech, kdy se ligand spektrometrickými metodami špatně určuje [40,41,48].

Pro metodu pulzní proteolýzy je důležité, aby doba, po kterou působí proteasa, byla menší, než je nezbytné pro ustanovení rovnováhy sbalených a rozbalených proteinů, a aby působení proteasy bylo nespecifické [40].

Metodu pulzní proteolýzy úspěšně provedli Park a kol. pro proteiny maltosu vázající protein [49] a ribonukleasu H [50]. Jurga a Kodíček ověřili metodu pulzní proteolýzy u lidského hemoglobinu [51]. Ve své bakalářské práci jsem se věnovala pulzní proteolýze králičího cyt b_5 . Všechny experimenty s výše uvedenými bílkovinami byly prováděny v prostředí močoviny a jako proteasa byl využit thermolysin.

Thermolysin (EC 3.4.24.27) s molekulovou hmotností 34,6 kDa [52] je proteasa se širokou substrátovou specifitou, štěpící zejména peptidové vazby spojující hydrofobní

aminokyseliny. Je aktivní i v 8 M močovíně. Může být použit v poměrně velkém rozmezí pH, optimální pH ve kterém působí je pH 5 až 8, a proto může být tato proteasa použita ve velkém rozmezí pH. Thermolysin obsahuje ve své struktuře zinečnatý ion, důležitý pro enzymovou aktivitu a čtyři vápenaté ionty, které mají vliv spíše na termostabilitu enzymu. Struktura thermolysinu je na Obr. 9. Tato proteasa není vhodná pro pulzní proteolýzu s proteiny, které mají obdobnou molekulovou hmotnost jako thermolysin, jelikož při vyhodnocování elektroforézy může thermolysin zasahovat do výsledků zkoumaného proteinu. Autolytickým štěpením thermolysinu mohou vznikat malá množství fragmentů s přibližnou molekulovou hmotností 8 kDa, 24 kDa a 25 kDa [40]. Aktivita thermolysinu je zastavována pomocí ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), jelikož tato kyselina působí jako chelatační činidlo vázající na sebe vícevalentní kationty kovů.

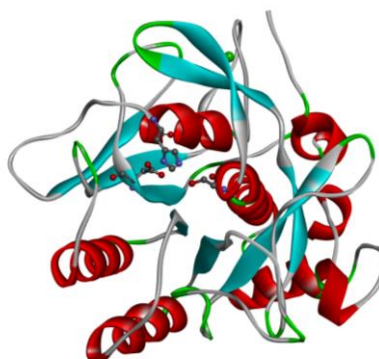


Obr. 9: Thermolysin je metalopeptidasa vázající jeden zinečnatý ion (šedá kulička) a čtyři vápenaté ionty (černá kulička) jako kofaktor. Šipky označují strukturu skládaného listu, spirály strukturu α -helixu. Převzato z [53].

V prostředí SDS ztrácí thermolysin svou aktivitu. Zřejmě proto, že dochází k precipitaci SDS a vápenatých kationtů, které jsou důležité pro funkci thermolysinu. Pro pulzní proteolýzu využívající jako detergent SDS je vhodné místo thermolysinu použít subtilisin. Takovou metodu popsali Schleich a kol. na proteinu bakteriorhodopsin [48].

Subtilisin Carlsberg (EC 3.4.21.62) má obdobně jako thermolysin širokou substrátovou specifitu. Struktura subtilysinu je na Obr. 10. Z měření cirkulárním dichroismem a dynamickým světelným rozptylem bylo zjištěno, že zvýšené množství SDS, má vliv i na snižující se aktivitu subtilysinu. Jeho snížená aktivita však není způsobena

rozvolněním jeho struktury, ale spíše snížením afinity substrátu k enzymu v prostředí micel SDS. V 1 mM roztoku SDS je aktivita subtilisinu snížena 1,5krát, zatímco v 40 mM je aktivita snížena až 244krát. Aktivita subtilisinu je zastavována fenylmethylsulfonylfluoridem (PMSF) [48,54]. PMSF působí jako inhibitor tak, že se kovalentně váže na Ser221 v aktivním centru subtilisinu [55].



Obr. 10: Subtilisin Carlsberg je serinovou proteasou. Na obrázku je vidět jeho struktura, na níž jsou zvýrazněny aminokyseliny působící v aktivním centru (Asp32, His64, Ser221). Subtilisin na sebe váže jeden vápenatý kation (zelená kulička). Upraveno dle [56].

2. Cíle

Již má bakalářská práce byla zaměřena na využití pulzní proteolýzy pro studium stability králičího cyt b₅. Ve výsledcích bylo shrnuto, že by metoda mohla být vhodná pro studium stability proteinů. Hlavním cílem diplomové práce bylo ověřit metodu pulzní proteolýzy v prostředí močoviny, jakožto metodu detekující rozdíly ve stabilitě lidského cyt b₅ a jeho derivátů připravených rekonstitucí apoformy s analogy heminu. Dalším cílem bylo prozkoumat potenciál jiné varianty metody využívající SDS jako denaturační činidlo a proteasu subtilisin. Pro tuto práci byl jako protein použit lidský cyt b₅, membránová i solubilní forma. Dílčím cílem pak bylo připravit pomocí metod titrace a gelové chromatografie vzorky cyt b₅ rekonstituovaného jak s heminem tak i jeho analogy (Mn^{III} protoporfyrin IX - Mn^{III} PPIX, Cr^{III} protoporfyrin IX - Cr^{III} PPIX, Co^{III} protoporfyrin IX - Co^{III} PPIX).

3. Materiály a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, 2-merkaptoethanol, N,N-methylen-bisakrylamid (BIS), dodecylsulfát sodný (SDS), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Frontier Scientific, Inc., USA: Mn^{III} protoporfyrin IX chlorid (Mn^{III} PPIX), Fe^{III} protoporfyrin IX chlorid (hemin, Fe^{III} PPIX), Co^{III} protoporfyrin IX chlorid (Co^{III} PPIX), Cr^{III} protoporfyrin IX chlorid (Cr^{III} PPIX)

Lachema Brno, Česká republika: Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), močovina (CO(NH₂)₂), ethanol (EtOH), persíran amonný (APS), bromfenolová modř

Lach-ner s. r. o., Česká republika: dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydroxid draselný (KOH), kyselina octová 99% (HAc), glycerol, chlorid sodný (NaCl), chlorid zinečnatý (ZnCl₂), propan-2-ol (isopropylalkohol)

Penta, Česká republika: hydroxid sodný (NaOH)

Pharmacia, Švédsko: Sephadex G-50

Serva Electrophoresis, Německo: N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)

Sigma, USA: Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIZMA, TRIS), Subtilisin A (subtilisin Carlsberg, z bakterie *Bacillus licheniformis*), Thermolysin P1512 (z bakterie *Bacillus thermoproteolyticus rokko*)

Thermo Scientific, USA: proteinové standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v prostředí SDS „broad range“

Použité preparáty apo-cytochromu b₅: K dispozici byly následující 4 preparáty lidského apo-cyt b₅ uchované při teplotě -80 °C, poskytnuté Bc. Marií Kostelanskou; všechny preparáty byly připraveny heterologní expresí v bakterii *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold:

- Preparát 1 (Prep1) , Preparát 2 (Prep2): solubilní (erytrocytární) formy
- Preparát 3 (Prep3), Preparát 4 (Prep4): membránové (mikrosomální) formy

3.2 Použité přístroje

Předvážky: EW 600-2M (Kern)

Analytické váhy: Discovery (Ohaus)

Centrifuga: MSE microCentaur (Schoeller - Sanyo)

Stolní minicentrifuga: Gilson (GmC Lab)

Spektrofotometr: Diod Array 8453 (Hewlett-Packard)

Inkubátor: Thermomixer compact (Eppendorf)

pH metr: model 370 (ATI Orion)

Magnetická míchačka: KMO2 basic (IKA)

Vortex: MS2 Minishaker (IKA)

Elektroforetická aparatura: MiniVE Vertical (Amersham Biosciences)

Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad)

Zdroj pro elektroforézu: EPS 301 Electrophoresis Power Supply (Amersham Pharmacia Biotech)

Sběrač frakcí: BioLogic BioFrac (Bio-Rad), model 2128 (Bio-Rad)

Scanner: scanjet 4370 (HP)

Další přístroje: přístroj pro produkci ultračisté vody Simplicity 185 (Millipore), sonikátor ELMasonic E30H (P-LAB), elektrický vařič (Eta), automatické pipety (BIOHIT, NichipetEX), Hamilton dávkovací stříkačky

3.3 Metody

3.3.1 Preparáty lidského cytochromu b₅

K dispozici bylo několik preparátů lidského cyt b₅, připravených heterologní expresí na katedře biochemie PřF UK dle [25] a uchovaných při -80 °C. Některé preparáty byly částečně rekonstituované s Fe^{III} PPIX – tudíž roztok obsahoval směs apo-cyt b₅ a Fe-cyt b₅, jiné obsahovaly v podstatě pouze apo-cyt b₅. Souhrn informací o jednotlivých preparátech cyt b₅ je v Tab. 1.

Tab. 1: Přehled preparátů apo-cyt b₅, které byly použity pro experimenty: Dané hodnoty vychází z bakalářské práce Bc. Marie Kostelanské [25].

	Prep1	Prep2	Prep3	Prep4
forma cyt b ₅	solubilní apo-cyt b ₅	solubilní apo-cyt b ₅ + Fe-cyt b ₅	membránový apo-cyt b ₅	membránový apo-cyt b ₅ + Fe-cyt b ₅
c _{protein} [μmol.l ⁻¹] stanovení BCA	1508	754	163	20
c _{apo-cyt b₅} [μmol.l ⁻¹] stanovení z absolutního spektra při 280 nm	1348	1210	126	85
obsah Fe-cyt b ₅ v preparátu [%]	< 1	33,8	< 1	34,0

Hodnoty koncentrace proteinů v [25] stanovené pomocí BCA byly původně uvedeny v hodnotách mg.ml⁻¹, v tabulce jsou přepočteny na μmol.l⁻¹. Pro výpočet byla pro solubilní cyt b₅ využita molekulová hmotnost 11 268 g.mol⁻¹ a pro membránový cyt b₅ 15 330 g.mol⁻¹ [11].

Prep2 a Prep4 obsahovaly z části holoformu cyt b₅, tyto preparáty byly použity pro přípravu nativního cyt b₅ (Fe-cyt b₅). Prep1 a Prep3 byly použity pro přípravu Mn-cytochromu b₅ (Mn-cyt b₅), Cr-cytochromu b₅ (Cr-cyt b₅) a Co-cytochromu b₅ (Co-cyt b₅)

3.3.2 Příprava roztoků metalo-protoporfyrinů IX

Následujícím postupem byl připraven 5 mM roztok hemin chloridu (Fe^{III} PPIX): 3,26 mg Fe^{III} PPIX bylo smícháno s 10 μl 2 M hydroxidu sodného a rozpuštěno v 1 ml 50% ethanolu. Ethanol byl přidáván po objemu 250 μl a postupně byl roztok promícháván. Pro snadnější rozpouštění bylo využito ultrazvukové lázně s horkou vodou (5 min). Dobré rozpouštění hemin chloridu v roztoku bylo ověřeno pomocí centrifugace (2 min, 13000 rpm, MSE microCentaur), po níž nedošlo k usazení žádného sedimentu.

Stejným postupem byly připraveny 5 mM roztoky analogů heminu, v závorce uvedeno množství protoporfyrinu IX přidané do 1 ml roztoku: Mn^{III} protoporfyrin IX chloridu (Mn^{III} PPIX, 3,45 mg), Co^{III} protoporfyrin IX chloridu (Co^{III} PPIX, 3,48 mg), Cr^{III} protoporfyrin IX chloridu (Cr^{III} PPIX, 3,59 mg). Roztoky metalo-protoporfyrinů IX byly uskladněny ve skleněných lahvičkách obalených alobalem při laboratorní teplotě.

Mn^{III} , Cr^{III} a Co^{III} protoporfyrin IX jsou ve vodě více rozpustné než hemin. Pro některé experimenty (viz kap. 3.3.3.5, str. 33) byl roztok místo v 50% ethanolu připravován v destilované vodě.

3.3.3 Příprava vzorků cytochromu b_5 rekonstituovaného s metalo-protoporfyryny IX

Vzorky solubilního cyt b_5 rekonstituovaného s heminem nebo s jeho analogy byly připraveny pomocí titrace nebo pomocí rekonstituce s nadbytkem kofaktoru následované odsolením pomocí gelové permeační chromatografie. Příprava vzorků se solubilním cyt b_5 je zahrnuta v kap. 3.3.3.1 a kap. 3.3.3.2 (str. 29, str. 31). Příprava membránového cyt b_5 je obsažena v kap. 3.3.3.3, kap. 3.3.3.4 a 3.3.3.5 (str. 32, 33 a 33).

3.3.3.1 Titrace apoformy cytochromu b_5 metalo-protoporfyryny IX – solubilní cytochrom b_5

Jedna molekula apo-cyt b_5 je schopna na sebe vázat 1 molekulu heminu. Fe-cyt b_5 má absorpční maximum při vlnové délce 413 nm [57]. Titrace apo-cyt b_5 se provádí v křemenné kyvetě postupným přidáváním Fe^{III} PPIX k apo-cyt b_5 . Pokud je každý následující přídavek Fe^{III} PPIX k apo-cyt b_5 měřen tak, že předchozí měření tvoří referenční vzorek (měření probíhá diferenčně), dojde v určité chvíli k vysycení proteinu a v roztoku zůstává volný hemin. Tím se absorpční maximum posune z vlnové délky

413 nm k 385 nm (absorpční maximum Fe^{III} PPIX se nachází při vlnové délce 385 nm [24]). Takové měření má výhodu toho, že jsou detekovány i poměrně malá množství heminu v přítomnosti velkého množství holofomy cyt b_5 . Tímto způsobem lze spektrofotometricky zjistit přibližnou koncentraci daných preparátů apo-cyt b_5 a také množství kofaktoru potřebného k rekonstituci apo-cyt b_5 .

Titrace apo-cyt b_5 byla sledována pomocí spektrofotometru Hewlett Packard 8453 za použití křemenné kyvety o optické dráze 1 cm. K 7,5 μl solubilního apo-cyt b_5 (Prep2) v 1,5 ml pufru 20 mM TRIS/HCl (pH 7,4) byl přidáván roztok 5 mM heminu po 0,3 μl . Mezi každým měřením se čekalo 7 minut, aby došlo k inkorporaci většiny kofaktoru. Každé spektrum bylo měřeno diferenčně. Po přidání určitého množství Fe^{III} PPIX došlo k posunu absorpčního maxima k nižším vlnovým délkám a následně byl ze spekter určen bod titrace. Dle těchto výsledků bylo k 100 μl solubilního apo-cyt b_5 přidáno ekvivalentní množství Fe^{III} PPIX. Vzniklá směs byla krátce promíchána na přístroji Vortex a ponechána 20 minut při laboratorní teplotě a 20 minut na ledě. Vzorky byly uloženy při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$

Obdobně byly provedeny titrační zkoušky apo-cyt b_5 Prep1 s dalšími analogy heminu. Jelikož byl vzat jiný preparát apo-cyt b_5 , byla provedena orientační titrace nejprve pomocí heminu, pro který se titrace provádí lépe díky viditelnějším změnám ve spektrech. K 7,5 μl apo-cyt b_5 v 1,5 ml 20 mM TRIS/HCl bylo přidáváno po 0,5 μl 5 mM heminu. Změny spekter po jednotlivých přidávcích Fe^{III} PPIX k apo-cyt b_5 lze vidět na Obr. 11 str. 41. Poté byla provedena titrace apo-cyt b_5 pomocí Mn^{III} PPIX, kde byly sledovány absorbance při vlnových délkách 470 nm a 369 nm, jakožto absorpčních maxim Mn -cyt b_5 [58]. Spektra Co^{III} PPIX a Cr^{III} PPIX a spektra Co-cyt b_5 a Cr-cyt b_5 jsou velmi podobná. Vzorky Co-cyt b_5 a Cr-cyt b_5 byly připraveny smícháním stejného poměru apo-cyt b_5 a metalo-protoporfyrinů IX jako u vytvoření vzorků Mn-cyt b_5 a Fe-cyt b_5 . Smícháním 50 μl solubilního apo-cyt b_5 (Prep1) a ekvivalentního množství Mn^{III} PPIX, Co^{III} PPIX nebo Cr^{III} PPIX byly připraveny vzorky Mn-cyt b_5 , Cr-cyt b_5 a Co-cyt b_5 .

Po smíchání apo-cyt b_5 s metalo-protoporfyriny IX byla upravena doba, po kterou byly dané látky ponechány spolu při laboratorní teplotě a na ledě, neboť každý apo-cyt b_5 vytváří komplex s metalo-protoporfyrinem IX různou rychlostí. Pro komplex s heminem byla stanovena doba 7 min, pro komplex s Mn^{III} PPIX 5 min, pro Co^{III} PPIX 10 min a s Cr^{III} PPIX až 60 min [58]. Vzorky byly uloženy při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.3.2 Vytvoření vzorků solubilního lidského cytochromu b_5 rekonstituovaného s metalo-protoporfyriny IX pomocí gelové chromatografie

Gelová permeační chromatografie je založena na pronikání analyzovaných látek do porézního materiálu s definovanou velikostí pórů. Látky o větší molekulové hmotnosti (větších rozměrů) prochází gelovou kolonou dříve než látky s nižší molekulovou hmotností. Gelová chromatografie má na rozdíl od titrace výhodu, že při ní může dojít k oddělení nízkomolekulárních látek (ethanol, EDTA, glycerol, nadbytek metalo-protoporfyrinů IX) ze vzorku. Pro tvorbu komplexů apo-cyt b_5 s metalo-protoporfyriny IX pomocí gelové chromatografie bylo využito údajů získaných při titraci, v nichž bylo zjištěno, jaké množství daného metalo-protoporfyrinu IX musí být přidáno k apo-cyt b_5 tak, aby byl jejich poměr přibližně 1:1. Byly vytvořeny dvě série pokusů pro vytvoření rekonstituovaného cyt b_5 s heminem a jeho analogy pomocí gelové chromatografie. Pro první sérii pokusů byly nanoseny na chromatografickou kolonu samotné vzorky apo-cyt b_5 rekonstituovaných metalo-protoporfyriny IX podle výsledků z titrace, pro druhou sérii pokusů bylo pro zajištění rychlého a úplného nasycení apo-cyt b_5 přidáno trojnásobné množství metalo-protoporfyrinu IX. Přebytek volného metalo-protoporfyrinu IX společně se zbytky ethanolu byl oddělen na koloně [24]. Veškerá gelová chromatografie zmiňována v této práci byla prováděna při 5 °C.

Jako gel byl použit Sephadex G-50, který se používá pro oddělování proteinů o molekulové hmotnosti 1,5 – 30 kDa. Název Sephadex pochází z anglické zkratky Separation Pharmacia Dextran, chemicky se jedná o epichlorhydrinem zesítěný dextran [59]. Nabobtnalý gel (15 ml), skladovaný v 50% roztoku ethanolu, byl před použitím 3x promyt 50 ml destilované vody. Následně byl gel 2x promyt v 20 mM TRIS/HCl pufru o pH 7,4. Sephadex G-50 byl nanesen na kolonu a promýván 100 ml téhož pufru do druhého dne. Pro zamezení kontaminace preparátů jinými metalo-protoporfyriny IX byl pro každou chromatografii použit nový gel. Výška sloupce gelového nosiče činila 10 - 13 cm, poloměr kolony 0,5 cm. Průtoková rychlost pufru kolonou byla 60 - 100 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pro první chromatografii bylo připraveno 30 μl roztoku solubilního Fe-cyt b_5 smícháním apo-cyt b_5 a Fe^{III} PPIX v poměru, jaký byl určen dle titrace (viz kap. 3.3.3.1, str. 29). Dále byl Fe-cyt b_5 naředěn 20 mM TRIS/HCl na 100 μl , nanesen pipetou na chromatografickou kolonu a roztok byl ponechán vsáknout se do gelu. Následně byl gel

převrstven 0,5 ml pufru 20 mM TRIS/HCl a po jeho vsáknutí byl nanesen další 1 ml pufru. Poté byla kolona připojena k rezervoáru s pufrům (20 mM TRIS/HCl, pH 7,4) a byla jím promývána rychlostí 70 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Jednotlivé frakce byly jímány po cca 0,5 ml do zkumavek pomocí sběrače frakcí (Bio-Rad, model 2128). Frakce byly spektrofotometricky proměřeny (absolutní spektra, slepý vzorek – 20 mM TRIS/HCl). Frakce s nejvyšší hodnotou koncentrace byly smíchány a uloženy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dále byla vyzkoušena druhá chromatografie. Byla provedena stejným postupem, jen s tím rozdílem, že nanášený vzorek obsahoval nadbytek Fe^{III} PPIX. Bylo vzato opět 30 μl připraveného Fe-cyt b_5 a do tohoto roztoku bylo přidáno ještě 6 μl 5mM Fe^{III} PPIX tak, aby byl látkový poměr mezi složkami přibližně 1:3. Pro vytvoření komplexu mezi apo-cyt b_5 a heminem byl vzorek ponechán stát 10 min při laboratorní teplotě a 10 min na ledě. Před nanášením vzorku na chromatografickou kolonu byl vzorek naředěn 20 mM pufrům TRIS/HCl na celkový objem 100 μl .

Přípravy vzorků Mn-cyt b_5 , Cr-cyt b_5 a Co-cyt b_5 probíhaly obdobným způsobem jako přípravy Fe-cyt b_5 . Pro vytvoření komplexu mezi apo-cyt b_5 a metalo-protoporfyriny IX byla opět upravena doba stání při pokojové teplotě a na ledu s ohledem na výsledky z bakalářské práce [58], aby došlo k dostatečnému vytvoření komplexu mezi apo-cyt b_5 a metalo-protoporfyriny IX.

3.3.3.3 Titrace apofomy cytochromu b_5 metalo-protoporfyriny IX – membránový lidský cytochrom b_5

Titrace membránové formy apo-cyt b_5 Prep3 nebo Prep4 byla provedena obdobným způsobem, jako byla popsána titrace solubilního apo-cyt b_5 v kap. 3.3.3.1 na str. 29. Nejprve byly titrovány Prep3 a Prep4 heminem. Titrace probíhala spektrofotometricky (Hewlett Packard 8453) v kyvetě o optické dráze 1 cm. K 50 μl membránového apo-cyt b_5 Prep4 v 1,5 ml pufru 20 mM TRIS/HCl (pH 7,4) byl po 0,3 μl přidáván 5 mM hemin. K 10 μl Prep3 byl přidáván hemin po 0,5 μl . Mezi jednotlivými přidávkami se čekalo 7 minut, při posunu absorpčního maxima ze 413 nm k nižším vlnovým délkám byla titrace ukončena a byl určen bod titrace. Průběh titrace Prep3 lze vidět na Obr. 21, str. 49. Podle výsledků z titrace bylo smícháno 200 μl apo-cyt b_5 Prep4 s ekvivalentním množstvím heminu. Dále byl tento vzorek využit i pro přípravu vzorku na gelovou chromatografii. Prep3 o objemu 200 μl byl smíchán s ekvivalentním množstvím Mn^{III} PPIX, Cr^{III} PPIX nebo Co^{III} PPIX a tyto roztoky byly využity v přípravě vzorku pomocí gelové

chromatografie nebo podrobnější titrace. Po smíchání byly roztoky ponechány přibližně stejnou dobu při laboratorní teplotě a na ledě jako u přípravy solubilního cyt b₅. Vzorky byly uchovány při -80°C.

3.3.3.4 Příprava vzorků membránového cytochromu b₅ rekonstituovaného s metalo-protoporfyriny IX pomocí gelové chromatografie

Postup provedení chromatografie (příprava kolony, nanášení vzorků, odebírání vzorků) membránového cyt b₅ bylo stejné jako u provedení chromatografie solubilního cyt b₅ (kap. 3.3.3.2 na str. 31).

Z hodnot titrace Prep4 byl k 100 µl Prep4 přidán Fe^{III} PPIX tak, aby ho ve vzorku bylo trojnásobné množství. Vzorek byl ponechán stát 10 min při laboratorní teplotě a 10 min na ledě. Poté byl tento vzorek nanesen na chromatografickou kolonu Sephadex G-50 a byla provedena chromatografie obvyklým způsobem. Výška kolony byla 13 cm, poloměr 0,5 cm, průtoková rychlost pufru 20 mM TRIS/HCl 100 µl.min⁻¹. Frakce byly spektrofotometricky proměřeny (absolutní spektra, slepý vzorek – 20mM TRIS/HCl). Frakce o nejvyšší koncentraci Fe-cyt b₅ byly smíchány a uloženy při -80 °C.

Dále byla provedena chromatografie, kde byl nanášen vzorek směsi apo-cyt b₅ (Prep3) a nadbytek Co^{III} PPIX. Podle hodnot získaných z titrace bylo smícháno 100 µl apo-cyt b₅ (Prep3) a odpovídající trojnásobné množství Co^{III} PPIX. Směs byla ponechána 20 min při laboratorní teplotě a 20 min na ledě. Poté byl daný vzorek nanesen na chromatografickou kolonu (výška 10 cm, průměr 0,5 cm, průtoková rychlost 100 µl.min⁻¹).

3.3.3.5 Příprava vzorků membránového cyt b₅ rekonstituovaného s analogy heminu

Byly porovnány vzorky rekonstituovaných cyt b₅, připravených dle titrace oproti vzorkům připravených dle chromatografie, zejména podle hodnoty Rz. Výsledky ukázaly nevhodnost chromatografie, jako způsob přípravy membránového Co-cyt b₅. Vzorky cyt b₅ rekonstituovaného s analogy heminu byly připraveny pomocí podrobnější titrace.

Ethanol vyskytující se v roztoku Fe-cyt b₅ byl odstraněn při gelové chromatografii. Cyt b₅ rekonstituované s analogy heminu také nebyly kontaminovány ethanolem, neboť k titraci byly použity vodné roztoky metalo-protoporfyrinů IX.

Z částečně titrovaného Mn-cyt b₅ byl odebrán alikvot (5 µl) do kyvety s 500 µl 20 mM TRIS/HCl. Neboť rozdíl absorpčních maxim Mn^{III} PPIX a Mn-cyt b₅ není velký (rozdíl ~ 6 nm kolem vlnové délky 470 nm), byl proveden pokus o další titraci Mn-cyt b₅

v křemenné kyvetě pomocí Fe^{III} PPIX. Dle výsledků není tento způsob titrace pro Mn-cyt b_5 vhodný. Do kyvety s 500 μl TRIS/HCl bylo opět odebráno stejné množství alikvoty částečně titrovaného Mn-cyt b_5 a k roztoku byl dále přidáván po 0,3 μl Mn^{III} PPIX. Pro vytvoření vzorku Mn-cyt b_5 bylo využito dalších vlastností, která spektra daných látek vykazují. Například poměr absorbancí absorpčních maxim volného Mn^{III} PPIX (369 nm a 464 nm) je přibližně 2:1, poměr absorbancí absorpčních maxim Mn-cyt b_5 (371 nm a 470 nm) je přibližně 1,2:1. Tak bylo k částečně titrovanému Mn-cyt b_5 přidáno takové množství Mn^{III} PPIX, aby v roztoku bylo minimální množství volného apo-cyt b_5 , ale zároveň i volného Mn^{III} PPIX.

Z částečně titrovaného Cr-cyt b_5 byl také odebrán alikvot (5 μl) do kyvety s 500 μl 20 mM TRIS/HCl. Spektra Cr^{III} PPIX a Cr-cyt b_5 jsou velmi podobná. Do kyvety bylo tedy přidáno 0,3 μl Fe^{III} PPIX a bylo změřeno spektrum, kde referenční vzorek byl částečně rekonstituovaný apo-cyt b_5 s Cr^{III} PPIX. Pro Cr-cyt b_5 byl tento způsob dodatečného titrování vhodný. Z daného spektra bylo odečteno, kolik heminu se ještě váže na apo-cyt b_5 a tudíž jaké množství Cr^{III} PPIX je ke vzorku potřeba přidat, aby byl všechn apo-cyt b_5 rekonstituovaný s Cr^{III} PPIX.

Spektra Co^{III} PPIX a Co-cyt b_5 jsou také velmi podobná, a proto byl k malému množství částečně titrovaného Co-cyt b_5 přidáván po malých objemech Fe^{III} PPIX stejným způsobem jako bylo popsáno u Cr-cyt b_5 . Ze spekter bylo opět vyhodnoceno, jaké množství Co^{III} PPIX je nutné přidat k částečně titrovanému Co-cyt b_5 .

3.3.4 Redukce metalo-protoporfyrinů IX a cytochromu b_5 dithioničitanem sodným

Do křemenné kyvety s pufr (20 mM TRIS/HCl) byl přidán Fe^{III} PPIX tak, aby jeho koncentrace byla 6,5 μM . Bylo změřeno jeho spektrum (Hewlett Packard 8453). Jako slepý vzorek byl použit výše uvedený pufr. Dále bylo do roztoku přidáno ~ 0,25 mg dithioničitanu sodného a opět bylo změřeno spektrum vzorku proti slepému vzorku.

Dále byl do křemenné kyvety s pufr 20 mM TRIS/HCl přidán roztok solubilního Fe-cyt b_5 (připraveného podle kap. 3.3.3.2), tak že jeho koncentrace v kyvetě byla 0,6 μM . Bylo změřeno spektrum vzorku oproti slepému vzorku (výše uvedený pufr). Do roztoku bylo přidáno ~ 0,25 mg dithioničitanu sodného. Bylo změřeno absolutní spektrum po přidání dithioničitanu sodného.

Tentýž experiment byl proveden i s analogy heminu a cyt b₅ rekonstituovaného s analogy heminu.

3.3.5 Pulzní proteolýza

Tato práce se zaměřuje na ověření potenciálu pulzní proteolýzy pro lidský cyt b₅ rekonstituovaný s heminem nebo jeho analogy obsahující v protoporphyrinovém kruhu Mn^{III}, Cr^{III} nebo Co^{III}. Nejprve byla zkoušena metoda využívající jako denaturant močovinu. Pulzní proteolýza byla také provedena podle již metody Schleicha a kol., kteří k určení stability membránového proteinu použili SDS (denaturant) a subtilisin (proteasa) [60].

3.3.5.1 Pulzní proteolýza – solubilní a membránový lidský cytochrom b₅

Pro metodu pulzní proteolýzy byly použity roztoky apo-cyt b₅ a roztoky připravené vlastní rekonstitucí apo-cyt b₅: apoforma lidského solubilního cyt b₅ (Prep1), holoforma lidského solubilního cyt b₅ (rekonstituovaný Prep2 s heminem nebo rekonstituovaný Prep1 s analogy heminu připravených dle kap. 3.3.3.2 na str. 31), apoforma lidského membránového cyt b₅ (Prep3), holoforma lidského membránového cyt b₅ (rekonstituovaný Prep4 s heminem dle kap. 3.3.3.4 na str. 33 nebo rekonstituovaný Prep3 s analogy heminu připraveného dle kap. 3.3.3.5 na str. 33). Přehled roztoků cyt b₅ rekonstituovaných s heminem a jeho analogy je k nalezení v Tab. 2 na str. 47 a v Tab. 3 na str. 51.

Denaturant – močovina, proteasa - thermolysin

Pro metodu pulzní proteolýzy využívající močovinu jako denaturant byly použity následující roztoky: 100 mM TRIS/HCl o pH 7,4 sloužící jako pufr, 9,6 M močovina jako denaturant, 276 μM proteasa thermolysin, 100 mM EDTA jako inhibitor proteasy, 1 M CaCl₂, 50 mM ZnCl₂.

Thermolysin byl rozpouštěn v ředícím roztoku obsahujícím 0,01 M CaCl₂ a 2,5 M NaCl a 0,5 mM ZnCl₂. Dobré rozpuštění thermolysinu v roztoku bylo ověřeno pomocí centrifugace (2 min, 13 000 rpm, MSE microCentaur)

Byla provedena pulzní proteolýza solubilního apo-cyt b₅ a cyt b₅ rekonstituovaného s heminem a jeho analogy. Podmínky pro experiment vycházely z mé bakalářské práce. Byly připraveny 10 μM roztoky solubilních cyt b₅ (apo-cyt b₅, Fe-cyt b₅, Mn-cyt b₅, Cr-cyt b₅, Co-cyt b₅) o objemu 20 μl ve 100 mM TRIS/HCl, koncentraci močoviny 2,5 M.

Vzorky byly preinkubovány 1 h při 7 °C, 10 min při 25 °C, 400 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf). Následně bylo do roztoků přidáno 0,4 µl thermolysinu a po 60 s bylo přidáno 6,6 µl EDTA. Po přidání činidel byly roztoky zamíchány (Vortex, IKA). Vzorky byly dány na elektroforézu a vyhodnoceny pomocí programu ImageJ. Pro pulzní proteolýzu byly připravovány kontrolní vzorky lišící se tím, že neobsahovaly thermolysin a močovinu (ty byly nahrazeny odpovídajícím množstvím 100 mM TRIS/HCl). Kontrolní vzorky byly inkubovány za stejných podmínek jako vzorky ostatní.

Podmínky pro provedení pulzní proteolýzy membránového cyt b₅ byly použity stejné jako pro solubilní cyt b₅. Byly připraveny 10 µM roztoky membránového cyt b₅ (apo- i holofomy s navázaným heminem) o objemu 20 µl ve 100 mM TRIS/HCl, koncentraci močoviny 0 M až 4 M (konkrétně 0, 1, 2, 4 M). Takto připravené vzorky byly pro ustanovení rovnováhy mezi sbalenou a rozbalenou formou inkubovány 1 h při 7 °C a 10 min při 25 °C a 400 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf). Poté bylo do každého roztoku přidáno 0,4 µl thermolysinu. Reakce probíhala 60 s při 25 °C a byla zastavena přidáním 6,6 µl 100 mM EDTA.

Všechny vzorky byly smíchány s 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem, povařeny v horké vodní lázni a rozděleny nejméně mezi dva gely.

Následně byly připraveny vzorky obsahující i membránový cyt b₅ rekonstituovaný s analogy heminu. Ve 100 mM pufru TRIS/HCl byly připraveny 10 µM roztoky cyt b₅ o objemu 20 µl, koncentraci močoviny 2,5 M. Dále bylo postupováno analogicky jako u pulzní proteolýzy membránového apo-cyt b₅ a Fe-cyt b₅.

Denaturant – SDS, proteasa - subtilisin

Pro metodu pulzní proteolýzy využívající jako denaturant SDS byly použity mj. následující roztoky: 20 mM KH₂PO₄ (vodný roztok) sloužící jako pufr, 350 mM SDS (vodný roztok), 3,7 µM subtilisin (vodný roztok) jako proteasa, 100 mM PMSF (isopropylalkoholový roztok) jako inhibitor proteasy a 1mM CaCl₂.

Vodný roztok SDS (350 mM) byl připraven stálým mícháním na magnetické míchače (IKA) po dobu 20 minut. Dále byl tento roztok ředěn na nižší koncentraci. Při ředění SDS na koncentraci 200 mM byl použit pufr 20 mM KH₂PO₄. Při dalším ředění pufrem na koncentraci 20 mM dochází však k precipitaci částic, a proto byla pro další ředění použita destilovaná voda.

Jedna molekula subtilisinu na sebe váže jeden vápenatý ion. Do 200 μl 3,7 μM roztoku subtilisinu byly přidány 2 μl 1mM CaCl_2 . Dobré rozpuštění subtilisinu v roztoku bylo ověřeno pomocí centrifugace (2 min, 13 000 rpm, MSE microCentaur)

PMSF je ve vodě velmi málo stabilní, poločas rozpadu je při pH 7,5 a teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$ 55 min. Proto se rozpouští v bezvodém isopropanolu a jako takovýto roztok může být skladován přes 9 měsíců při teplotě 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Při práci s PMSF je třeba dbát zvýšené bezpečnosti, neboť se jedná o neurotoxin [61,62].

Pro metodu pulzní proteolýzy byly upravovány podmínky - teplota preinkubace vzorků s SDS, teplota samotné pulzní proteolýzy, doba trvání reakce se subtilisinem, množství přidaného SDS, proteasy či PMSF - až bylo dosaženo optimálních podmínek. Dále v textu je popsán postup již zvolených optimálních podmínek.

Byly připraveny 10 μM roztoky solubilního cyt b_5 (apo- i holoformy s navázaným heminem) ve 20 mM pufru KH_2PO_4 o objemu 25 μl , koncentraci SDS 0 mM až 2 mM (konkrétně 0; 0,5; 1,0; 2,0 mM). Takto připravené vzorky byly preinkubovány 5 min při laboratorní teplotě a 5 min při 37 $^{\circ}\text{C}$ a 400 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf) pro ustanovení rovnováhy mezi sbalenou a rozbalenou formou. Poté bylo do každého roztoku přidáno 5 μl 3,7 μM roztoku subtilisinu a promícháno. Reakce probíhala 30 s a byla zastavena přidáním 10 μl 100 mM PMSF.

Pro pulzní proteolýzu byly připravovány kontrolní vzorky o stejné koncentraci bílkoviny jako u vzorků štěpené proteasou. Místo roztoku subtilisinu a SDS bylo ke vzorkům přidáno odpovídající množství pufru 20 mM KH_2PO_4 . Kontrolní vzorky byly inkubovány za stejných podmínek jako vzorky ostatní.

Všechny vzorky po pulzní proteolýze byly ihned smíchány s 4x koncentrovaným vzorkovým puftrem, povařeny a rozděleny nejméně mezi dva gely.

Po stanovení optimálních podmínek byly dále provedeny experimenty s cyt b_5 rekonstituovaným i s analogy heminu (obsahující v protoporphyrinovém kruhu Mn^{III} , Cr^{III} nebo Co^{III}). Provedení pulzní proteolýzy bylo stejné, preinkubace cyt b_5 s SDS probíhala v 0,5 mM SDS.

Dále byla provedena pulzní proteolýza pro membránový cyt b_5 , a to stejným způsobem jako pro solubilní cyt b_5 .

3.3.6 Elektroforéza SDS-PAGE

Elektroforéza SDS-PAGE patří mezi elektromigrační separační metody, jejíž provedení vychází z Laemliho práce [63]. K rozdělení bílkovin dochází v prostředí polyakrylamidového gelu, který je vytvořen kopolymerací akrylamidu a N,N'-metylen-bisakrylamidu (BIS) zahájenou volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného (APS). Do gelu se přidává N,N,N',N'-tetramethyldiamin (TEMED) jako stabilizátor volných radikálů. Při tzv. diskontinuální elektroforéze se na aparaturu připravují 2 typy gelů. První, startovací gel, slouží pro zaostření vzorku a druhý, separační, pro vlastní rozdělení bílkovin. SDS je detergent, který se váže na bílkoviny v poměru asi 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny a mění jejich tvar do válcovité podoby. Navázaný SDS překrývá vlastní náboj bílkovin, a bílkoviny tak mají shodné poměry nábojů na jednotku hmoty a podobný tvar. Z tohoto plyne, že bílkoviny prochází separačním gelem na základě své molekulové hmotnosti, přičemž malé molekuly se pohybují ke kladné elektrodě rychleji než velké, protože snáze prochází póry gelu [37].

Do aparatury pro elektroforézu byl mezi čistá skla nanesen spodní 12% separační gel připravený smícháním 4,5 ml pufru A (0,375 TRIS/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8), 3,0 ml polymeračního roztoku A (30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru A), 7,5 μ l TEMED a 75 μ l 10% APS v uvedeném pořadí. Gel byl nanesen cca 3 cm pod horní okraj skleněných destiček, převrstven destilovanou vodou a nechán ztuhnout. Po 30 min byla vrstva vody na gelu vysušena filtračním papírem a na separační gel byl nanesen 4% zaostřovací gel připravený smícháním 2,6 ml pufru B (0,125 M TRIS/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8), 400 μ l polymeračního roztoku B (30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru B), 3 μ l TEMED a 60 μ l 10% APS. Ihned po nalití byl do separačního gelu vložen hřeben pro vytvoření jamek na aplikování vzorku a gel byl ponechán ztuhnout po dobu 30 min. Poté byl hřeben vyndán a převrstven elektrodovým pufrem o následujícím složení: 0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3.

Vzorky byly nejprve smíchány s odpovídajícím množstvím 4x koncentrovaného vzorkového pufru (0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3) a povařeny 3 minuty ve vodní lázni. Po krátkém odstředění (minicentrifuga GmCLab, Gilson) byly nanесeny do jamek na gelu mikrostříkačkou (Hamilton). Množství vzorku nanášených na gel bylo pro jednotlivé série stejné. Při použití desetijamkového hřebenu bylo na gel nanáшено 20 - 25 μ l vzorku, při použití patnáctijamkového hřebenu bylo

nanášeno 15 µl vzorku. Následně byla aparatura vložena do elektroforetické vany s elektrodovým pufrům (0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3). Při použití elektroforetické aparatury Amersham Biosciences probíhala elektroforéza vertikálně za použití konstantního napětí 80 V po dobu 30 minut (doba, po kterou vzorky prochází zaostřovacím gelem), a poté bylo napětí zvýšeno na 150 V. Při použití aparatury Bio-Rad bylo nastaveno již od začátku napětí 200 V. Elektroforéza byla ukončena tehdy, až bromfenolová modř, jež je součástí vzorkového pufru a putuje gelem nejrychleji, dosáhla $\frac{3}{4}$ délky gelu.

Gel byl následně opatrně vyjmut z elektroforetické aparatury a vložen na 60 minut do Petriho misky s barvicí lázní (25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 9,2% (v/v) kyselina octová; 46% (v/v) ethanol). Poté byl přendán do odbarvovací lázně (25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselinu octovou).

3.3.7 Kvantifikace proteinu v gelu

Po odbarvení gelu v odbarvovací lázni jsou na gelu patrné modré zóny bílkovin. Čím více bílkovin se v dané zóně vyskytuje, tím je barva intenzivnější. Bylo potřeba stanovit rozdíly intenzit jednotlivých zón v jednotlivých sloupečkách. Gel byl skenován (HP scanjet 4370) a uložen ve formátu .jpg. Pro vyhodnocení intenzity jednotlivých zón byl zvolen program ImageJ podle doporučení [41]. Není vhodné mít zóny příliš intenzivní, jelikož by mohly zapříčinit větší chybu ve vyhodnocování [64].

4. Výsledky

4.1 Rekonstituce apo-cyt b₅ s metalo-protoporfyriny IX

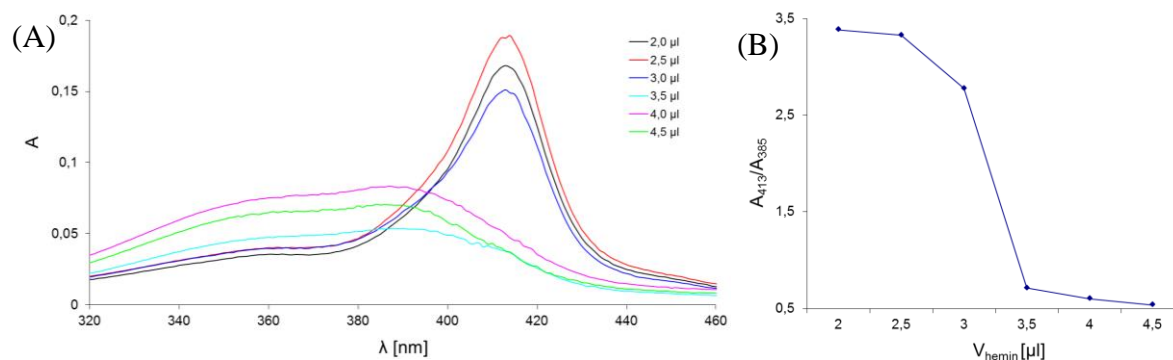
Vzorky solubilních a membránových cyt b₅ rekonstituovaných s heminem či jeho analogy byly připraveny smícháním roztoku apo-cyt b₅ a roztoku metalo-protoporfyrinů IX v takovém poměru, jaký byl určen pomocí titrace nebo přidáním nadbytku metalo-protoporfyrinu IX a jeho následným odstraněním pomocí chromatografie.

Pro přípravu apo-cyt b₅ rekonstituovaného s heminem a jeho analogy je vhodné používat čerstvé roztoky metalo-protoporfyrinů IX, neboť bylo zjištěno, že časem může docházet ke změně absorpčních maxim těchto metalo-protoporfyrinů IX. Tento fakt byl zjištěn u Co^{III} PPIX, kde se absorpční maximum již po 1 dni posunulo k nižším vlnovým délkám o 2 nm, u Cr^{III} PPIX po 14 dnech k nižším vlnovým délkám o 9 nm.

4.1.1 Titrace solubilního apo-cyt b₅ a příprava cytochromu b₅ rekonstituovaného s heminem a jeho analogy dle titrace

Do roztoku s apo-cyt b₅ Prep1 a Prep2 byl postupně přidáván roztok heminu. Po každém následujícím přidavku se čekalo 7 minut, a poté bylo diferenčně změřeno spektrum proti pufru a dále proti každému předešlému přidavku heminu. Nadbytek heminu se projevil tak, že absorpční maximum, které bylo zpočátku při 413 nm, se posouvalo ke kratší vlnové délce odpovídající volnému heminu (~ 390 nm). V roztoku, obsahujícím 7,5 μl apo-cyt b₅ Prep2 k tomu došlo po přidání 0,9 μl roztoku heminu. Bod titrace se nacházel tedy mezi 0,6 - 0,9 μl. Pro stejné množství Prep1 byl zjištěn bod titrace mezi 2,5 - 3 μl. Průběh titrace Prep1 je možné vidět na Obr. 11.

Byly připraveny vzorky solubilního cyt b₅ rekonstituovaného s heminem a jeho analogy. U těchto vzorků byla určena hodnota Rz (viz Tab. 2, str. 47)



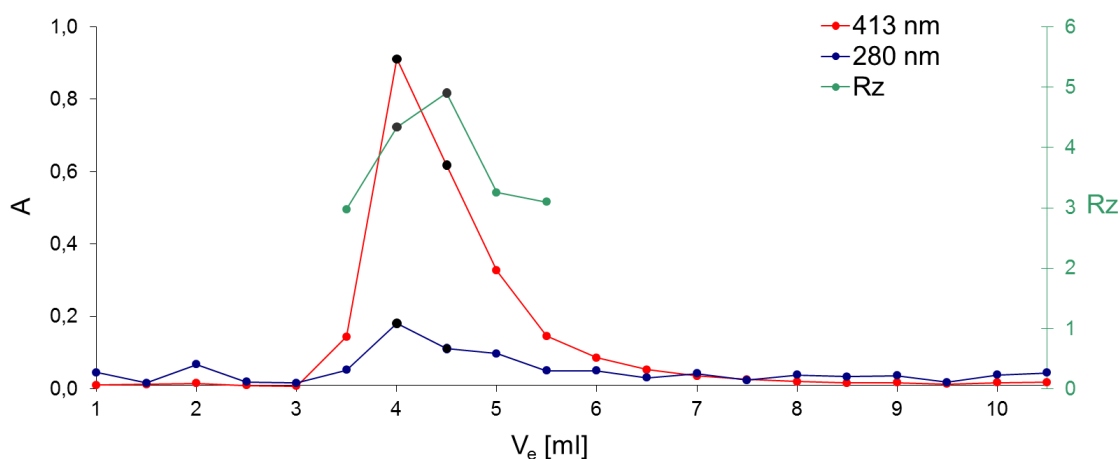
Obr. 11: Titrace solubilního apo-cyt b₅ heminem. Grafy (A) a (B) znázorňují část titrace apo-cyt b₅ heminem (Fe^{III} PPIX). Spektra odpovídají celkovému objemu 5 mM heminu přidaného k apo-cyt b₅. Měření probíhalo diferenčně. Z grafu (A) byl vytvořen graf (B), ve kterém byly dány do poměru absorbance při vlnové délce 413 nm (absorpční maximum Fe-cyt b₅) a 385 nm (absorpční maximum heminu). Z grafů lze vyčíst, že 3 µl roztoku heminu tvoří nadbytek k apo-cyt b₅ a bod titrace se nachází mezi 2,5 – 3 µl. Ředěno 150x.

4.1.2 Příprava solubilního cytochromu b₅ rekonstituovaného s heminem pomocí gelové chromatografie

Při gelové chromatografii je eluován jako první analyt s vyšší molekulovou hmotností, v našem případě jím byl rekonstituovaný cyt b₅ s vázaným heminem nebo jeho analogy a volné metalo-protoporfyriny IX byly obvykle eluovány později v objemu odpovídajícím objemu kolony nebo i větším.

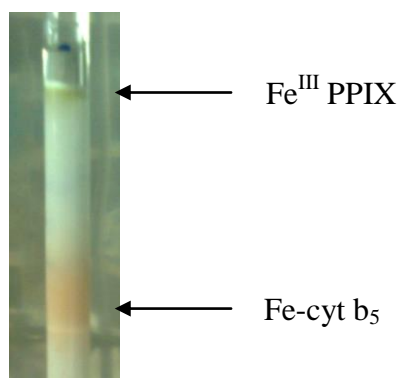
Pro první experiment byl na gelovou chromatografii nanesen vzorek Fe-cyt b₅ připraveného smícháním apo-cyt b₅ s heminem v látkovém poměru přibližně 1:1 (tedy v takovém poměru, který byl zjištěn dle titrace).

Jednotlivé frakce eluované z kolony byly proměřeny spektrofotometricky. Na následujícím Obr. 12 je možné vidět eluční profil první chromatografie. Hodnoty R_z frakcí obsahujících Fe-cyt b₅ kolísají v širokém rozmezí (3,2 – 5,0), to svědčí o tom, že protein není plně homogenní, jedná se pravděpodobně o směs apo- a holoformy. Frakce s nejvyšší koncentrací Fe-cyt b₅ v chromatografickém dělení byly tedy smíchány a znovu podrobeny titraci heminem. Bylo zjištěno, že vzorek stále váže malé množství heminu, proto byl experiment zopakován s nadbytkem heminu.



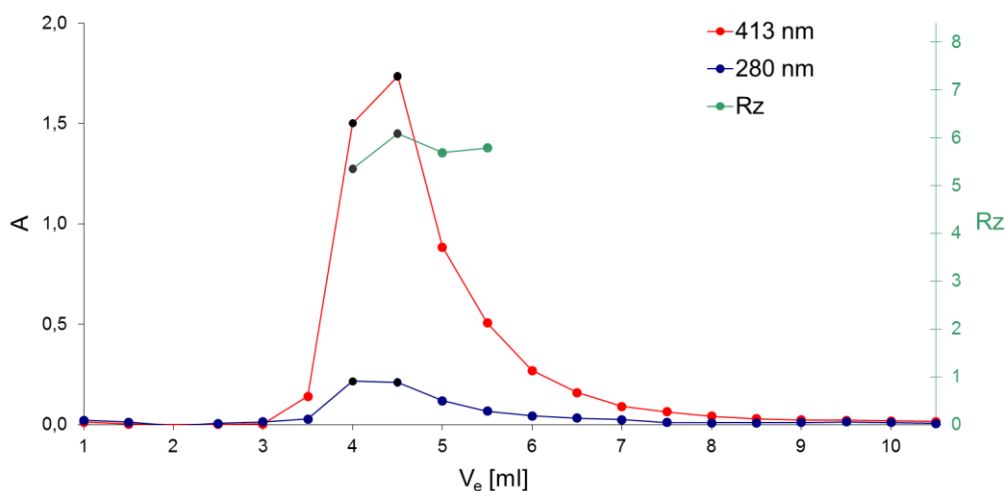
Obr. 12: Separace Fe-cyt b_5 gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G-50. U jednotlivých frakcí byly sledovány absorbance při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). V grafu jsou zaneseny též hodnoty Rz (A_{413}/A_{280} , zeleně), které slouží k hodnocení vzorku cyt b_5 . Pro další experimenty byly ponechány frakce s nejvyšší hodnotou absorbance (zvýrazněné černě).

Pro další chromatografii byl použit stejný vzorek jako u předešlé chromatografie, navíc k němu bylo přidáno trojnásobné množství heminu. Na gelové koloně se přebytek Fe^{III} PPIX oddělil od Fe-cyt b_5 . Fotografie z tohoto chromatografického dělení je možné vidět na Obr. 13.



Obr. 13: Gelová chromatografie oddělující nadbytek Fe^{III} PPIX od Fe-cyt b_5 . Jelikož se jedná o barevné látky, lze již na koloně pozorovat jejich rozdělení. Frakce Fe-cyt b_5 byly jímány do zkumavek. Část Fe^{III} PPIX se vážala na gel a byla eluována mnohem později, tyto frakce jímány nebyly.

Eluční profil frakcí vytékajících z kolony je znázorněný na Obr. 14. Hodnoty Rz u jednotlivých frakcí kolísaly již méně (5,4 – 6,1) a dosahovaly vyšších hodnot. Nejkoncentrovanější frakce byly smíchány a využity v dalších experimentech.

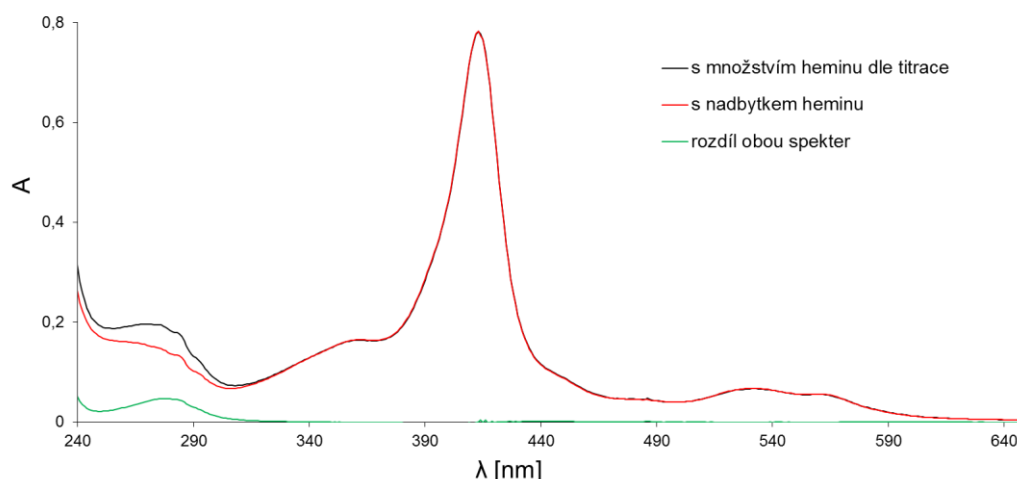


Obr. 14: Separace Fe-cyt b_5 gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G-50.

Ve srovnání s předchozí chromatografií, vzorek před nanesením na kolonu obsahoval trojnásobné množství heminu oproti apo-cyt b_5 . U jednotlivých frakcí byly sledovány absorbance při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). V grafu jsou zaneseny též hodnoty Rz (A_{413}/A_{280} , zeleně), které slouží k hodnocení vzorku cyt b_5 . Pro další experimenty byly smíchány frakce s nejvyšší hodnotou absorbance (označené černě).

Pozn.: Vzorky, které vykazovaly absorbanci vyšší než 1, byly ředěny a přepočteny na odpovídající hodnotu. Totéž platí pro ostatní grafy v této diplomové práci.

Po obou chromatografiích byla proměřena spektra ponechaných smíchaných frakcí a tato spektra byla porovnána (Obr. 15). Z rozdílu daných spekter lze vidět nárůst absorbance při 280 nm. Tento nárůst naznačuje, že v chromatografii s nižším obsahem heminu ve vzorku je navíc apo-cyt b_5 . Lze tudíž usuzovat, že příprava Fe-cyt b_5 pomocí titrace a následného smíchání roztoku apo-cyt b_5 s odpovídajícím množstvím heminu tak, aby látkový poměr byl $\sim 1:1$, není v případě heminu ideální. Apo-cyt b_5 je plně saturován teprve nadbytkem heminu, nevázaný hemin pak lze odstranit pomocí gelové chromatografie.



Obr. 15: Rozdíl mezi frakcemi z dvou chromatografií. První frakce (černá) byla získána chromatografií dle Obr. 12, str. 42, druhá (červená) dle Obr. 14 na str. 43. Rozdíl (zelená) vykazuje absorpční maximum při 280 nm, což je známkou přítomnosti volné bílkoviny - apo-cyt b_5 - ve vzorku. Spektra byly normalizovány na stejnou hodnotu absorbance při 413 nm, aby bylo snadné je vizuálně mezi sebou porovnat

Abychom vyloučily možnost, že by došlo k částečné ztrátě hemu např. během chromatografie, byl finální preparát z druhé chromatografie opět titrován roztokem heminu (podobně jako apo-cyt b_5 v kap. 4.1.1 na str. 40). Ihned při prvním přidavku však bylo pozorováno spektrum heminu (data nejsou ukázána).

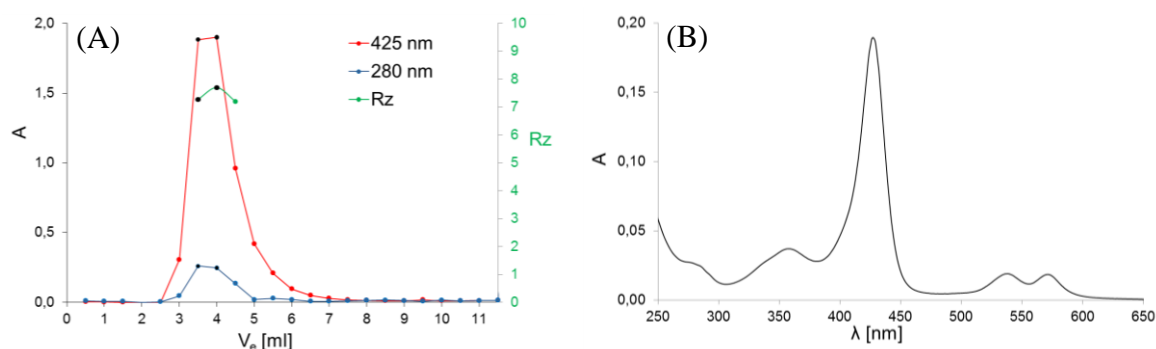
Hem je v aktivním centru cyt b_5 vázán přes molekuly histidinu. Na povrchu molekuly cyt b_5 můžeme nalézt také aminokyselinové zbytky histidinu a existuje možnost, že by se mohl hemin vázat i přes tyto zbytky mimo aktivní centrum cyt b_5 . Aby byla tato domněnka vyloučena, byla provedena zkouška, kdy k části frakce z druhé chromatografie bylo přidáno malé množství apo-cyt b_5 . Měření probíhalo spektrofotometricky a diferenčně. Kdyby bylo při chromatografii navázáno více heminu na apo-cyt b_5 , došlo by při spektrofotometrickém měření k vytvoření spektra typického pro Fe-cyt b_5 s absorpčním maximem při 413 nm. K takové změně spektra nedošlo.

Dalším ověřením správnosti metody chromatografie byl výpočet hodnoty R_z z daných spekter vzorků. R_z je zkratka z německého slova „reinheitszahl“ [65], kde reinheit znamená čistota a zahl znamená číslo. Tato hodnota se používá pro hemoproteiny a počítá se z hodnoty absorbance vlnové délky maxima ze Soretova pásu charakteristického pro každý hemoprotein v poměru s absorbcí při 280 nm. Pro Fe-cyt b_5 je hodnota R_z vyjádřena poměrem absorbcí A_{413}/A_{280} . Dle literatury je hodnota R_z pro Fe-cyt b_5 vyšší než 5,6 [66,67]. V Tab. 2 na str. 47 jsou uvedené hodnoty, které byly získané měřením

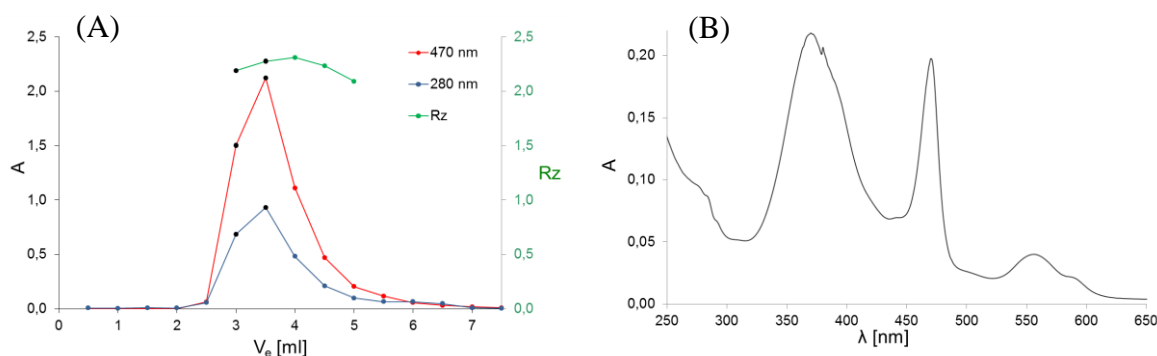
jednotlivých vzorků po chromatografii nebo vzorků připravených dle titrace. Jelikož při druhé chromatografii je hodnota R_z vyšší než při chromatografii první, lze soudit, že příprava vzorku pomocí chromatografie s nadbytkem heminu v nanášeném vzorku na kolonu je lepší.

4.1.3 Příprava solubilního cytochromu b_5 rekonstituovaného s analogy heminu pomocí gelové chromatografie

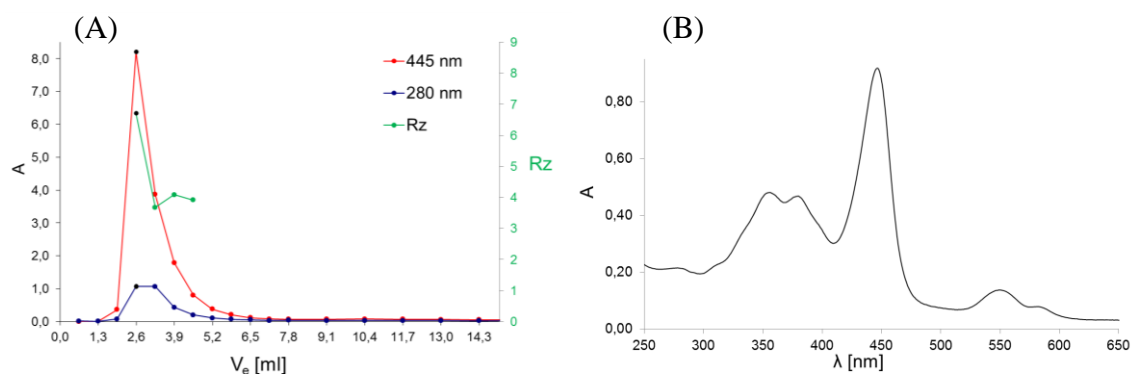
Obdobně, jako byly připraveny vzorky Fe-cyt b_5 , byly připraveny i vzorky apo-cyt b_5 rekonstituované s analogy heminu. Opět byla provedena chromatografie vzorků, které obsahovaly apo-cyt b_5 a analogy heminu (Mn^{III} PPIX, Cr^{III} PPIX, Co^{III} PPIX), jak v poměru $\sim 1:1$, tak v poměru $\sim 1:3$. Na Obr. 16, Obr. 17 a Obr. 18 jsou zobrazené eluční profily jednotlivých frakcí a spektrum vybraných frakcí po chromatografii, na kterou byl nanášen vzorek s obsahem metalo-protoporfyrinů IX $\sim 1:3$. Jelikož vzorky po chromatografii, kde na kolonu byly nanášeny analyty v poměru $\sim 1:1$, nebyly použity pro další experimenty, jejich spektra zde nejsou uvedena, pouze v Tab. 2 na str. 47 jsou zahrnuty hodnoty jejich R_z .



Obr. 16: Chromatografie pro vytvoření vzorku Co-cyt b_5 . (A) V průběhu chromatografie byla měřena absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 425 nm (červeně). Černě jsou označeny frakce, které byly použity pro experimenty pulzní proteolýzy. V grafu jsou zaneseny též hodnoty R_z (A_{425}/A_{280} , zeleně). Graf (B) představuje spektrum vzorku Co-cyt b_5 po smíchání frakcí označených černě na grafu (A), ředěno 10x.



Obr. 17: Chromatografie pro vytvoření vzorku Mn-cyt b₅. (A) V průběhu chromatografie byla měřena absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 470 nm (červeně). Černě jsou označeny frakce, které byly použity pro experimenty pulzní proteolýzy. V grafu jsou zaneseny též hodnoty Rz (A_{470}/A_{280} , zeleně). Graf (B) představuje spektrum vzorku Mn-cyt b₅ po smíchání frakcí označených černě na grafu (A), ředěno 10x.



Obr. 18: Chromatografie pro vytvoření vzorku Cr-cyt b₅. V průběhu chromatografie byla měřena absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 445 nm (červeně). Černě jsou označeny frakce, které byly použity pro experimenty pulzní proteolýzy. V grafu jsou zaneseny též hodnoty Rz (A_{445}/A_{280} , zeleně). Graf (B) představuje spektrum vzorku Cr-cyt b₅ označeného černě na grafu (A), ředěno 10x.

Protein byl eluován blízko mrtvého objemu kolony, zatímco volné metalo-protoporfyriny IX byly na koloně zadržovány a byly eluovány mnohem později. Na grafech jsou také znázorněny hodnoty Rz pro eluované cyt b₅. V případě Mn-cyt b₅ a Co-cyt b₅ hodnoty Rz u jednotlivých frakcí byly podobné (v rozmezí 0,5-1 jednotky), u Cr-cyt b₅ se však hodnoty Rz lišily až o 3 jednotky.

Předpokladem pro hodnocení čistoty preparátu pomocí hodnoty Rz je, že čím vyšší je jeho číslo, tím nižší množství apoformy je obsaženo ve vzorku cyt b₅. V Tab. 2 můžeme vidět, že hodnoty Rz jsou vyšší u vzorků po chromatografii s nadbytkem metalo-protoporfyrinu IX. Proto byly vzorky připravované pomocí chromatografie s nadbytkem metalo-protoporfyrinů IX vybrány pro další studie.

Tab. 2: Hodnoty Rz pro lidský solubilní cyt b₅ rekonstituovaný s heminem a jeho analogy.

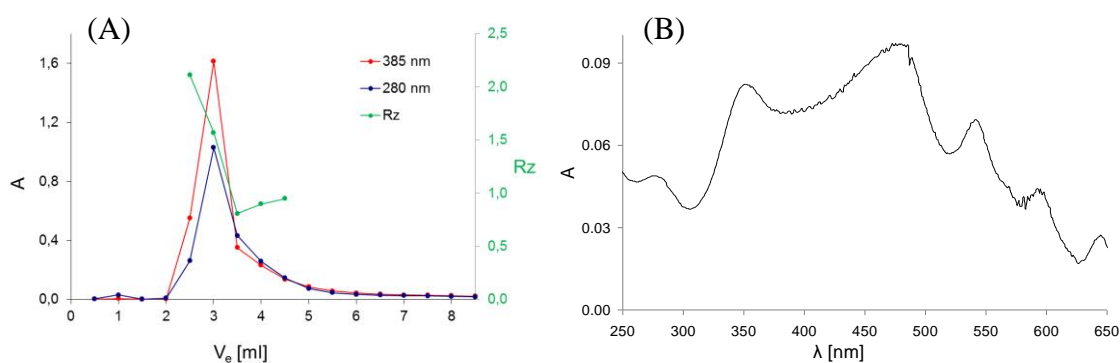
	λ_{\max} [nm]	Rz titrace ^a	Rz chromatografie 1:3 ^b	Rz chromatografie 1:1 ^c	Rz dle literatury [66,67]
Fe-cyt b ₅	413	5,32	5,89	4,36	větší než 5,6
Mn-cyt b ₅	470	2,26	2,28	2,46	-
Cr-cyt b ₅	445	4,5	6,71	6,33	-
Co-cyt b ₅	425	5,97	7,70	6,25	

^a cyt b₅ vytvořený smícháním apo-cyt b₅ a metallo-protoporfyriinů IX dle hodnot z titrace.

^b frakce z chromatografie, kde byl na kolonu nanášen vzorek s poměrem apo-cyt b₅ : Fe^{III} PPIX v poměru 1:3. Vzorky použité dále pro metodu pulzní proteolýzy.

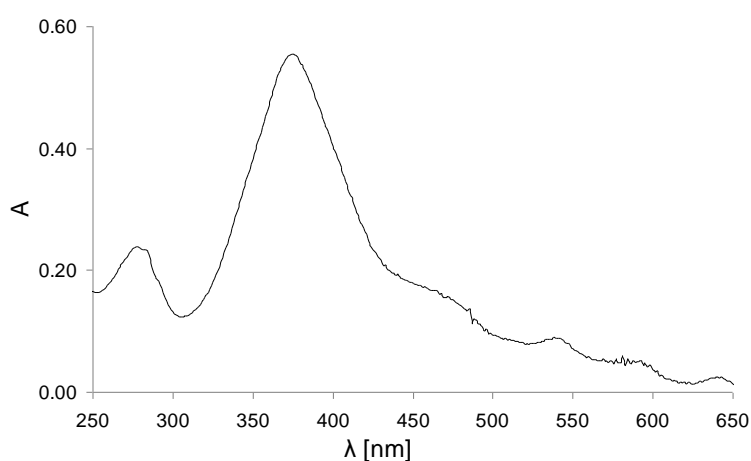
^c frakce z chromatografie - kde byl na kolonu nanášen vzorek s poměrem apo-cyt b₅: Fe^{III} PPIX takovém, jaký byl určen podle titrace

Byla provedena i chromatografie, kde se k apo-cyt b₅ přidával protoporfyrin IX (neobsahující žádný kov) v poměru 1:3. Na následujícím Obr. 19 je znázorněn eluční profil chromatografie a spektrum frakce s nejvyšší koncentrací.



Obr. 19: Eluční profil chromatografie pro vzorek cyt b₅ rekonstituovaný protoporfyrinem IX bez kovu. (A) Byla změřena spektra jednotlivých frakcí po chromatografii a hodnoty absorbance při 280 nm (modře) a 385 nm (červeně) byly dány do grafu. Dle elučního profilu vychází jako nejkoncentrovanější vzorek při elučním objemu 3 ml. (B) Dle celkového tvaru spektra (ředěno 27x) se však zdá, že došlo ke změně charakteru vzorku, neboť dané spektrum vykazuje mnohé změny oproti měření z titrace.

Hodnoty R_z ve frakcích v oblasti eluce proteinu dosti kolísaly a celkově byly poměrně nízké (1 - 2). UV-Vis spektra hlavních frakcí po chromatografii nevykazovala znaky blízké cyt b_5 s vázaným protoporfyrinem IX, které je možné vidět na Obr. 20. Zdá se tedy, že samotný protoporfyrin IX se na apoformu cyt b_5 váže slabě a dochází k jeho uvolňování již během chromatografie. Navíc dle informací v literatuře může protoporfyrin IX tvořit ve vodném prostředí při pH 8-14 dimery, při pH 3-8 dimery a oligomery [68]. Tyto oligomery pak mohou být eluovány společně s proteinovou frakcí a mohou tak zapříčinit její spektrální nehomogenitu. Z těchto důvodů nebyl tento preparát využíván k dalším studiím.

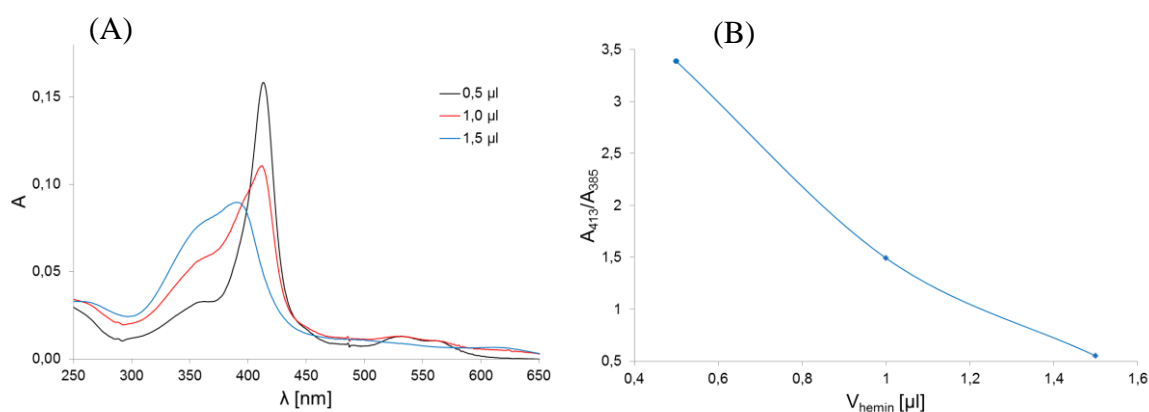


Obr. 20: Spektrum cyt b_5 rekonstituovaného s protoporfyrinem IX neobsahující kov. Tento protein byl připraven smícháním poměru apo-cyt b_5 (Prep1) a protoporfyrinu IX ve stejném poměru jako byly připraveny vzorky cyt b_5 dle titrace. Ředěno 125x.

4.1.4 Titrace membránové apoformy cytochromu b_5 metalo- -protoporfyriny IX

Pro rekonstituci membránové/mikrosomální formy cyt b_5 byly využity Prep3 a Prep4 dle Tab. 1 na str. 28. Bylo postupováno obdobně jako u přípravy roztoků solubilního cyt b_5 , kdy byla apoforma postupně titrována heminem, a spektrální změny byly sledovány diferečně, tedy po každém přidavku bylo od směsi odečteno spektrum předchozí. Bod titrace Prep4 odpovídal přidavku 0,3 – 0,6 μ l heminu, pro Prep3 odpovídal 0,5 – 1 μ l heminu. V porovnání s titrací solubilního cyt b_5 bylo množství přidaného heminu v případě

membránového cyt b_5 menší v důsledku jeho nižší koncentrace. Průběh titrace Prep3 heminem je ukázána na Obr. 21.



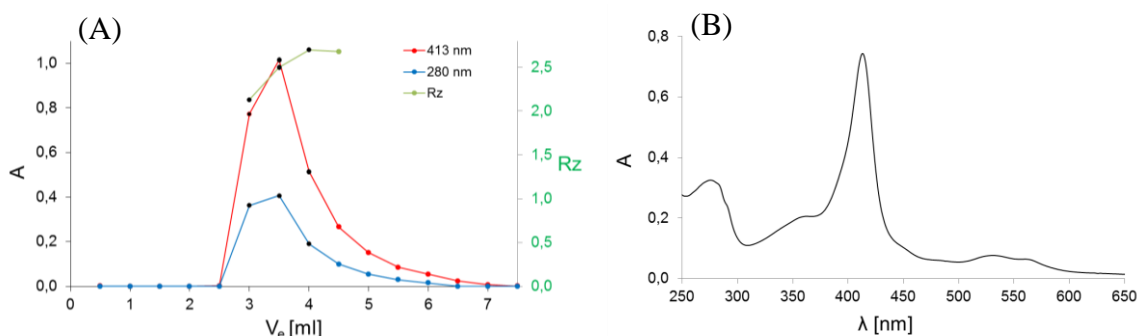
Obr. 21: Titrace membránového apo-cyt b_5 heminem. Grafy (A) znázorňuje spektra titrace 10 μl apo-cyt b_5 (Prep3) heminem. Hemin byl přidáván po 0,5 μl. Měření probíhalo diferenčně. Do grafu (B) byly vyneseny poměry absorbancí při vlnových délkách 413 nm a 385 nm. Z obou grafů je zřejmé, že hodnota titrace apo-cyt b_5 se nachází mezi 0,5 a 1,0 μl heminu.

Následně bylo přepočteno množství metalo-protoporfyrinu IX, které se musí přidat k 200 μl apo-cyt b_5 (Prep4 pro Fe-cyt b_5 nebo Prep3 pro Mn-cyt b_5 , Co-cyt b_5 a Cr-cyt b_5) tak, jak bylo určeno dle titrace. Prep4 obsahoval již z větší části holoformu Fe-cyt b_5 , proto byla použita pouze pro přípravu Fe-cyt b_5 .

4.1.5 Příprava membránového Fe-cyt b_5 a Co-cyt b_5 pomocí gelové chromatografie

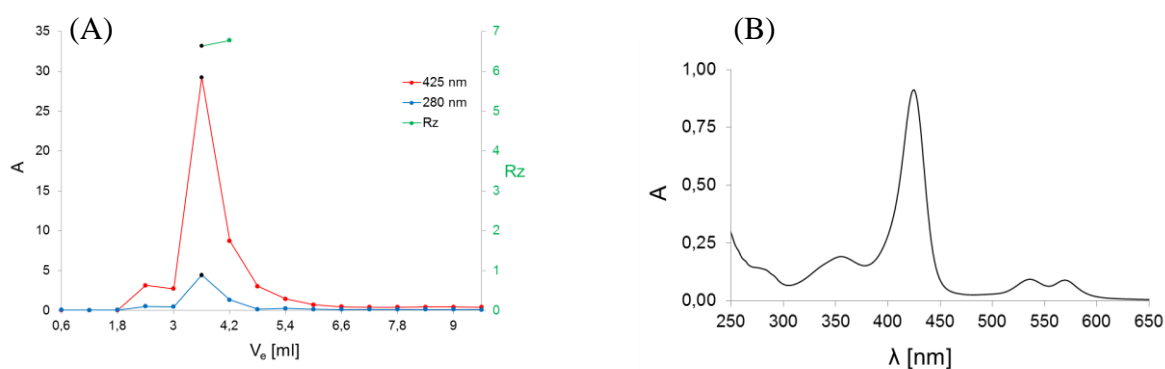
Obdobně jako byly připravovány vzorky solubilního apo-cyt b_5 rekonstituovaného s heminem a jeho analogy pomocí chromatografie, bylo plánováno připravit stejným postupem i vzorky membránového cyt b_5 .

Na chromatografickou kolonu byl nanášen vzorek obsahující Prep4 a trojnásobné množství Fe^{III} PPIX. Na následujícím grafu (Obr. 22) je znázorněn eluční profil chromatografie vzorku membránového Fe-cyt b_5 . Nadbytek Fe^{III} PPIX byl od Fe-cyt b_5 oddělen gelovou chromatografií. Fe^{III} PPIX vytékal mnohem později, proto není v grafech uveden.



Obr. 22: Eluční profil chromatografie pro přípravu vzorku Fe-cyt b₅. Na grafu (A) jsou mj. znázorněny hodnoty Rz (A_{413}/A_{280} , zeleně). Frakce o nejvyšší koncentraci (označené černě) byly smíchány, jejich spektrum bylo přeměřeno (A) a vzorky byly ponechány pro experimenty pulzní proteolýzy.

Pro přípravu membránového Co-cyt b₅ byl smíchán Prep3 s trojnásobným množstvím Co^{III} PPIX a tento vzorek byl podroben gelové chromatografii. Eluční profil frakcí membránového Co-cyt b₅ je možné vidět na Obr. 23. Na tomtéž obrázku (vlevo) je znázorněné spektrum frakce o nejvyšší koncentraci Co-cyt b₅, vytékajícím při elučním objemu kolony 3,6 ml. Následně byla ze spektra odečtena hodnota Rz (A_{425}/A_{280}). Bylo zjištěno, že tato hodnota je téměř 2,5x vyšší než pro vzorky připravené pomocí titrace. Jelikož membránová forma cyt b₅ obsahuje více aromatických aminokyselin, které absorbují při 280 nm (v membránové kotvě 3x Trp a 2x Tyr), měl by očekávaný poměr Rz pro membránový cyt b₅ být mnohem menší než poměr Rz pro solubilní cyt b₅.



Obr. 23. Eluční profil chromatografie pro přípravu vzorku Co-cyt b₅ (vlevo). Na obrázku vpravo je znázorněné spektrum frakce o elučním objemu 3,6 ml, ředěno 150x.

V tomto systému pravděpodobně dochází k nespecifické vazbě Co^{III} PPIX na membránový cyt b₅, popř. koelucí proteinu a agretátů Co^{III} PPIX.

V Tab. 3 je uveden souhrn vzorků membránového apo-cyt b_5 rekonstituovaného s heminem a jeho analogy. Pro každý vzorek byly porovnány hodnoty Rz, vypočítané jako poměr absorbance absorpčního maxima cyt b_5 a absorbance při 280 nm. Z literatury je známá hodnota Rz pro krysí mikrosomální cyt b_5 , která má hodnotu kolem 3 [67,69].

Tab. 3: Hodnoty Rz $A_{\lambda_{\max}}/A_{280}$ pro membránový lidský cyt b_5 rekonstituovaného s heminem a jeho analogy. Mn-cyt b_5 a Cr-cyt b_5 nebyly připravovány metodou chromatografie, proto hodnoty nejsou uvedeny.

	λ_{\max} [nm]	Rz titrace ^a	Rz chromatografie 1:3 ^b	Rz dle literatury [67,69]
Fe-cyt b_5	413	2,4	2,7 ^c	~ 3
Mn-cyt b_5	470	1,1 ^c	-	-
Cr-cyt b_5	445	1,3 ^c	-	-
Co-cyt b_5	425	2,8 ^c	6,63	

^a Rz pro vzorek připravený smícháním apo-cyt b_5 v takovém poměru, jaký byl určen dle titrace

^b pro výsledné frakce z chromatografie membránového cyt b_5 rekonstituovaného s Fe^{III} PPIX nebo Co^{III} PPIX

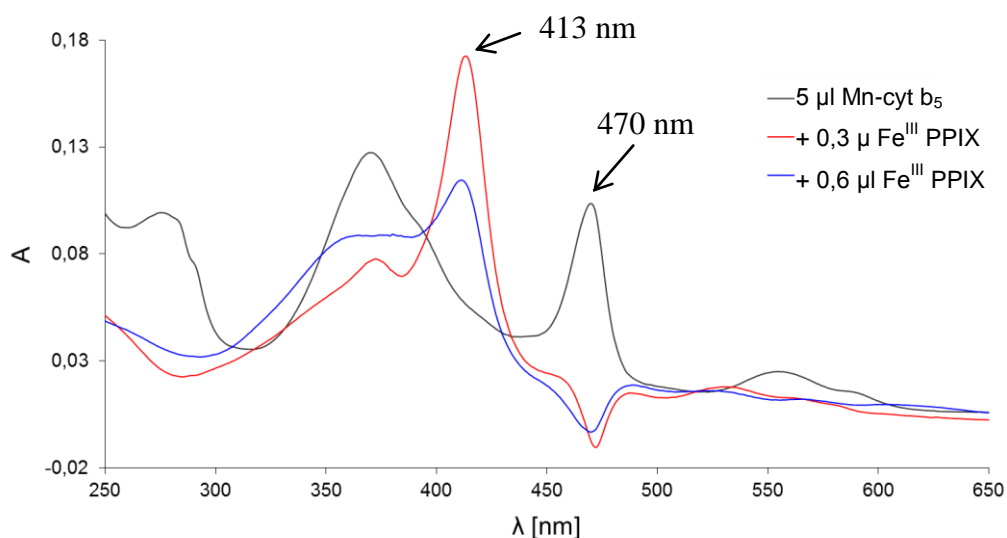
^c vzorky použité pro metodu pulzní proteolýzy

Pro Fe-cyt b_5 výsledek po chromatografii vyšel lepší, než kdyby se ke vzorku přidával Fe^{III} PPIX v poměru určeném dle titrace. Vzorek Fe-cyt b_5 pro pulzní proteolýzu byl použit vzorek připravený pomocí gelové chromatografie, během které mj. dochází k odstranění ethanolu ze vzorku. Po chromatografii s Co-cyt b_5 však výsledek uspokojivý již z výše uvedených důvodů nebyl. Proto byl pro další experimenty s pulzní proteolýzou připraven membránový Co-cyt b_5 pomocí titrace, kde byla případná přítomnost apoformy sledována pomocí titrování heminem. Také vzorky Mn-cyt b_5 a Cr-cyt b_5 byly připraveny pomocí titrace.

4.1.6 Příprava membránového cytochromu b_5 rekonstituovaného s analogy heminu pomocí titrace

Pro přípravu Co-cyt b_5 a i další analogy Mn-cyt b_5 a Cr-cyt b_5 byl zvolen postup přípravy, kdy se využívá pouze titrace, nikoli chromatografie. Jedním důvodem pro zachování metody titrace bylo podezření, že by se na jednu molekulu apo-cyt b_5 mohlo vázat více molekul i dalších analogů heminu (Mn^{III} PPIX nebo Cr^{III} PPIX). Druhým důvodem byla poměrně dobrá rozpustnost Mn^{III} PPIX, Cr^{III} PPIX a Co^{III} PPIX ve vodě na rozdíl od Fe^{III} PPIX. Ve vzorcích by tudíž neměl být obsažen ethanol.

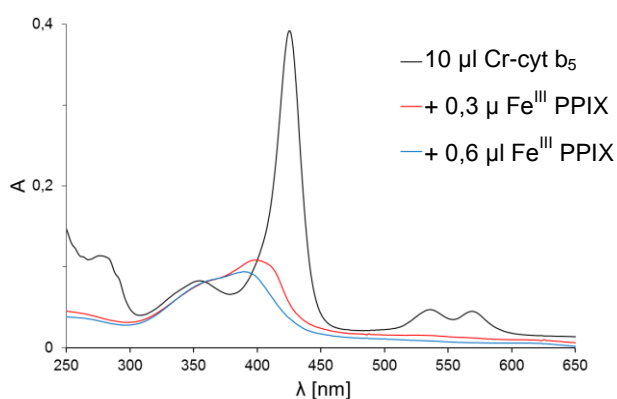
Podle titrace heminem bylo k apo-cyt b_5 přidáno ekvivalentní množství Mn^{III} PPIX. Dále bylo zkoušeno přidat k částečně rekonstituovanému Mn-cyt b_5 po malých objemech Fe^{III} PPIX, aby bylo zřetelněji vidět, jaké množství apo-cyt b_5 je stále ve vzorku. Po těchto přídavicích však bylo zjištěno, že Mn^{III} PPIX se na apo-cyt b_5 váže slabě a je v cyt b_5 ihned nahrazován Fe^{III} PPIX – ukázka spektrálních změn je uvedena na Obr. 24.



Obr. 24: Přídavek Fe^{III} PPIX k roztoku částečně titrovaného Mn-cyt b_5 . Černé spektrum je spektrum roztoku Mn-cyt b_5 . K roztoku se přidával Fe^{III} PPIX po 0,3 μ l (červené spektrum po prvním přídavku, modré po druhém přídavku) Měření spekter probíhalo diferenčně. Ihned po přidání Fe^{III} PPIX k roztoku Mn-cyt b_5 se začíná zřejmě uvolňovat Mn^{III} PPIX z aktivního centra (dochází ke snížení absorbance při ~ 471 nm) a je nahrazen Fe^{III} PPIX (dochází ke zvýšení absorbance při 413 nm).

Podle titrace částečně titrovaného Mn-cyt b_5 heminem se zdá, jakoby vzorek byl z podstatné části apoformou. To je však nepravděpodobné, jelikož preparát před vlastní titrací vykazuje absorpční maximum charakteristické pro Mn^{III} PPIX vázaný na apo-cyt b_5 , tj. při 470 nm. Volný Mn^{III} PPIX v této oblasti vykazuje maximum při 465 nm. Pravděpodobně dochází k nahrazování Mn^{III} PPIX hemem v průběhu titrace. Tato domněnka je podpořena také tím, že během titrace dochází k poklesu a posunu absorpčního pásu Mn-cyt b_5 v oblasti 470 nm, který se pak na diferenčním spektru projevuje jako negativní „peak“ v oblasti ~ 471 nm. Z vyhodnocení se ukázalo, že finální spotřeba heminu při titraci odpovídala celkovému množství apo-cyt b_5 , a tudíž že všechny Mn^{III} PPIX byl nahrazen Fe^{III} PPIX.

Pro přípravu vzorku Co-cyt b_5 i Cr-cyt b_5 bylo k apo-cyt b_5 přidáno nejprve takové množství Co^{III} PPIX (Cr^{III} PPIX), jaké bylo určeno dle titrace heminem. Poté bylo k malému množství částečně titrovaného cyt b_5 přidáno malé množství Fe^{III} PPIX (Obr. 25). Na vyhodnocení spekter diferenčním měřením můžeme vidět, že po prvním přidavku Fe^{III} PPIX ke vzorku Co-cyt b_5 se objeví spektrum směsi Fe-cyt b_5 a Fe^{III} PPIX. Po dalším přidavku je vidět spektrum čistého heminu. Z tohoto faktu plyne, že Fe^{III} PPIX není schopen uvolnit Co^{III} PPIX z vazebného místa cyt b_5 . Pouze se pravděpodobně váže na malé množství zbytkového apo-cyt b_5 . Proto bylo do vzorku částečně titrovaného Co-cyt b_5 přidáno ještě o 10 % větší množství Co^{III} PPIX. Opakovanou titrací bylo přidáním heminu k malému množství Co-cyt b_5 ověřeno, že je apo-cyt b_5 dostatečně rekonstituován s Co^{III} PPIX.



Obr. 25: Přidavek Fe^{III} PPIX k částečně titrovanému Co-cyt b_5 do bodu titrace. Do částečně titrovaného roztoku Co-cyt b_5 (černé spektrum) bylo přidáváno malé množství Fe^{III} PPIX. První přidavek (červené spektrum) ukázal, že v roztoku Co-cyt b_5 je ještě apo-cyt b_5 schopný vázat na sebe Fe^{III} PPIX. Druhý přidavek (modré spektrum) je již

spektrum čistého heminu.

Pro přípravu Cr-cyt b_5 vyšly spektra podobná. Také bylo do vzorku přidáno ještě o 10 % větší množství Cr^{III} PPIX.

Jelikož byly zjištěny změny hodnot vlnových délek absorpčních maxim roztoků metalo-protoporfyrinů IX během jejich uložení oproti údajům udávaných v bakalářské práci [58], je zde přiložena tabulka shrnující absorpční maxima daných metalo-protoporfyrinů IX a cyt b_5 rekonstituovaných s čerstvě připravenými metalo-protoporfyriny IX. Pro cyt b_5 je také možné, že byly v diplomové práci zjištěny odlišné údaje z důvodu použití lidského cyt b_5 místo králičího.

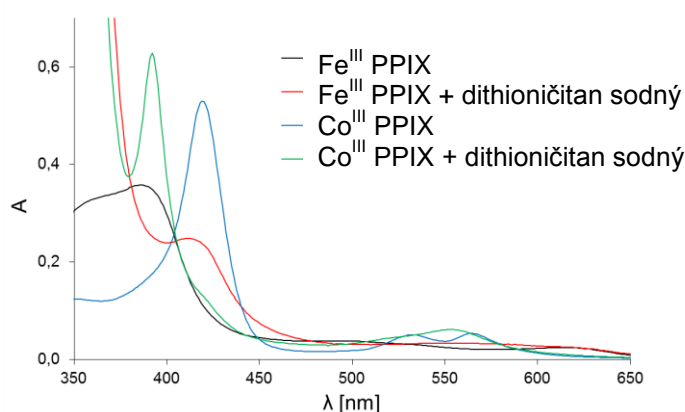
Tab. 4: Shrnutí vlnových délek absorpčních maxim pro jednotlivé metalo-protoporfyriny IX a cyt b_5 rekonstituovanými s metalo-protoporfyriny IX.

	Absorpční maximum [nm]
Fe^{III} PPIX	385
Mn^{III} PPIX	369, 465
Co^{III} PPIX	418
Cr^{III} PPIX	436

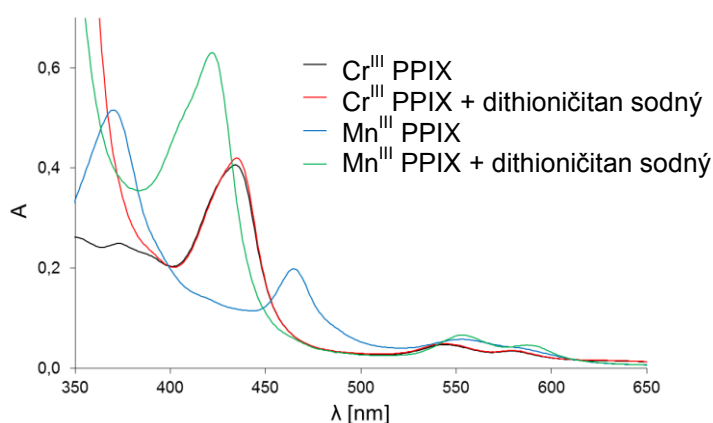
	Absorpční maximum [nm]
Fe-cyt b_5	413
Mn-cyt b_5	371, 470
Co-cyt b_5	425
Cr-cyt b_5	445

4.1.7 Redukce metalo-protoporfyriinů IX a cytochromu b₅ dithioničitanem sodným

Pro metalo-protoporfyryny IX, se kterými bylo pracováno během této diplomové práce, byl sledován vliv redukčního činidla dithioničitanu sodného na jejich spektrofotometrické chování (Obr. 26, Obr. 27). Zatímco Fe^{III} PPIX, Co^{III} PPIX, Mn^{III} PPIX byly schopné redukce, Cr^{III} PPIX redukován nebyl.

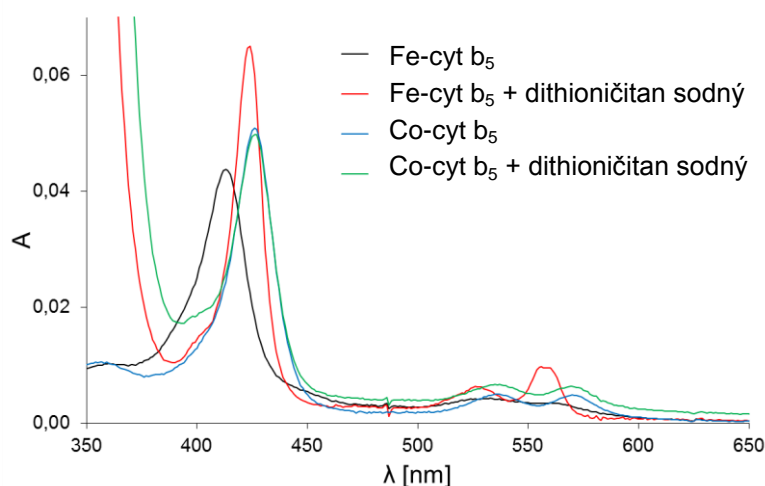


Obr. 26: Redukce Fe^{III} PPIX a Co^{III} PPIX dithioničitanem sodným. Absorpční maximum Fe^{III} PPIX se posunulo z 385 nm na 341 nm, Co^{III} PPIX z 420 nm na 392 nm. Černé a modré spektrum představuje absolutní spektrum Fe^{III} PPIX a Co^{III} PPIX, červené a zelené spektrum představuje absolutní spektrum roztoků po přidání dostatečného množství dithioničitanu sodného. Vysoké absorbance mezi 350 – 380 nm jsou způsobeny přítomností dithioničitanu sodného.

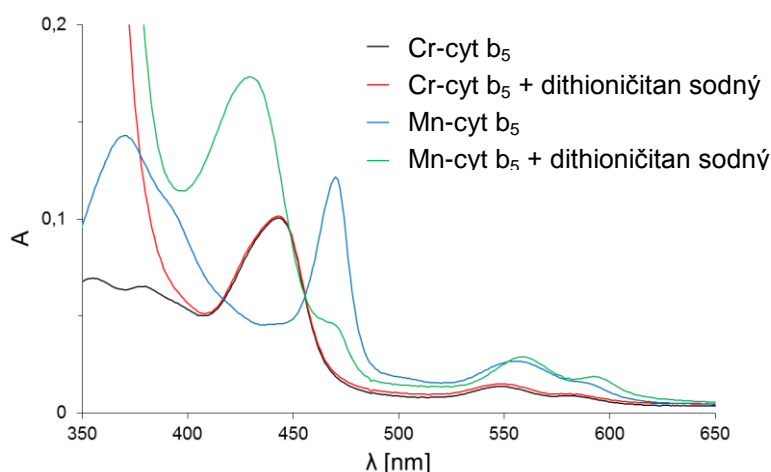


Obr. 27: Redukce Cr^{III} PPIX a Mn^{III} PPIX dithioničitanem sodným. Absorpční maximum Cr^{III} PPIX zůstalo při 436 nm, absorpční maximum Mn^{III} PPIX se posunulo ze 465 nm na 422 nm. Černé a modré spektrum představuje absolutní spektrum Cr^{III} PPIX a Mn^{III} PPIX, červené a zelené spektrum představuje absolutní spektrum roztoků po přidání dostatečného množství dithioničitanu sodného.

Dithioničitan sodný byl přidán i k cyt b_5 rekonstituovaném s heminem a jeho analogy (Obr. 28, Obr. 29). Ze spekter lze vidět, že zatímco absorpční maxim Fe-cyt b_5 a Mn-cyt b_5 se posunulo k vyšší nebo nižší vlnové délce (jsou schopné redukce), absorpční maximum Co-cyt b_5 a Cr-cyt b_5 zůstalo stejné i po přidání dithioničitanu sodného (nejsou schopné redukce).



Obr. 28: Redukce Fe-cyt b_5 a Co-cyt b_5 dithioničitanem sodným. Absorpční maximum Fe-cyt b_5 se posunulo ze 413 nm na 424 nm, absorpční maximum Co-cyt b_5 zůstalo na 425 nm. Černé a modré spektrum představuje Fe-cyt b_5 a Co-cyt b_5 , červené a zelené spektrum představuje spektrum roztoků po přidání dostatečného množství dithioničitanu sodného.



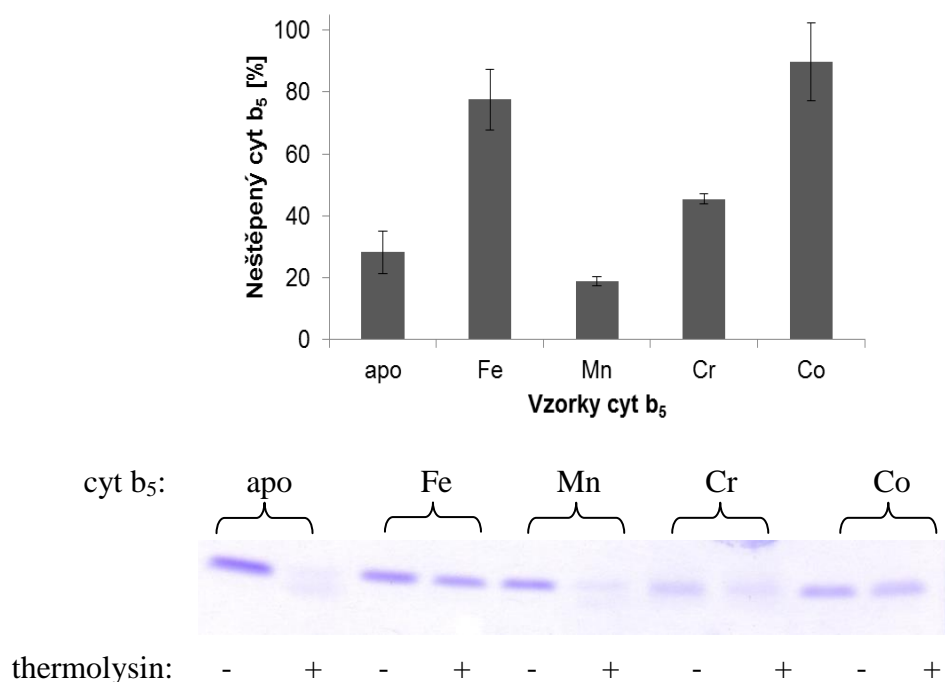
Obr. 29: Redukce Cr-cyt b_5 a Mn-cyt b_5 dithioničitanem sodným. Absorpční maximum Cr-cyt b_5 zůstalo stejné při 445 nm, absorpční maximum Mn-cyt b_5 se posunulo z 470 nm na 430 nm. Černé a modré absolutní spektrum představuje Cr-cyt b_5 a Mn-cyt b_5 , červené a zelené spektrum představuje dané protoporfyriny IX po přidání dithioničitanu sodného.

4.2 Pulzní proteolýza a porovnání stability cyt b₅ rekonstituovaných s heminem a jeho analogy

4.2.1 Solubilní cytochrom b₅ – močovina a thermolysin

Studium stability lidského cyt b₅ bylo prováděno za pomoci pulzní proteolýzy jednak v prostředí močoviny, jednak v prostředí SDS. Pro pulzní proteolýzu v prostředí močoviny byly využity podmínky optimalizované v rámci bakalářské práce pro králičí cyt b₅.

Vzorky cyt b₅ byly preinkubovány s močovinou (koncentrace 2,5 M) 1 h při 7 °C, 10 min při 25 °C. Následné působení thermolysinem bylo po 1 min zastavené pomocí EDTA. Obr. 30 shrnuje experiment srovnávající různé formy lidského solubilního cyt b₅ za použití optimalizovaných podmínek.



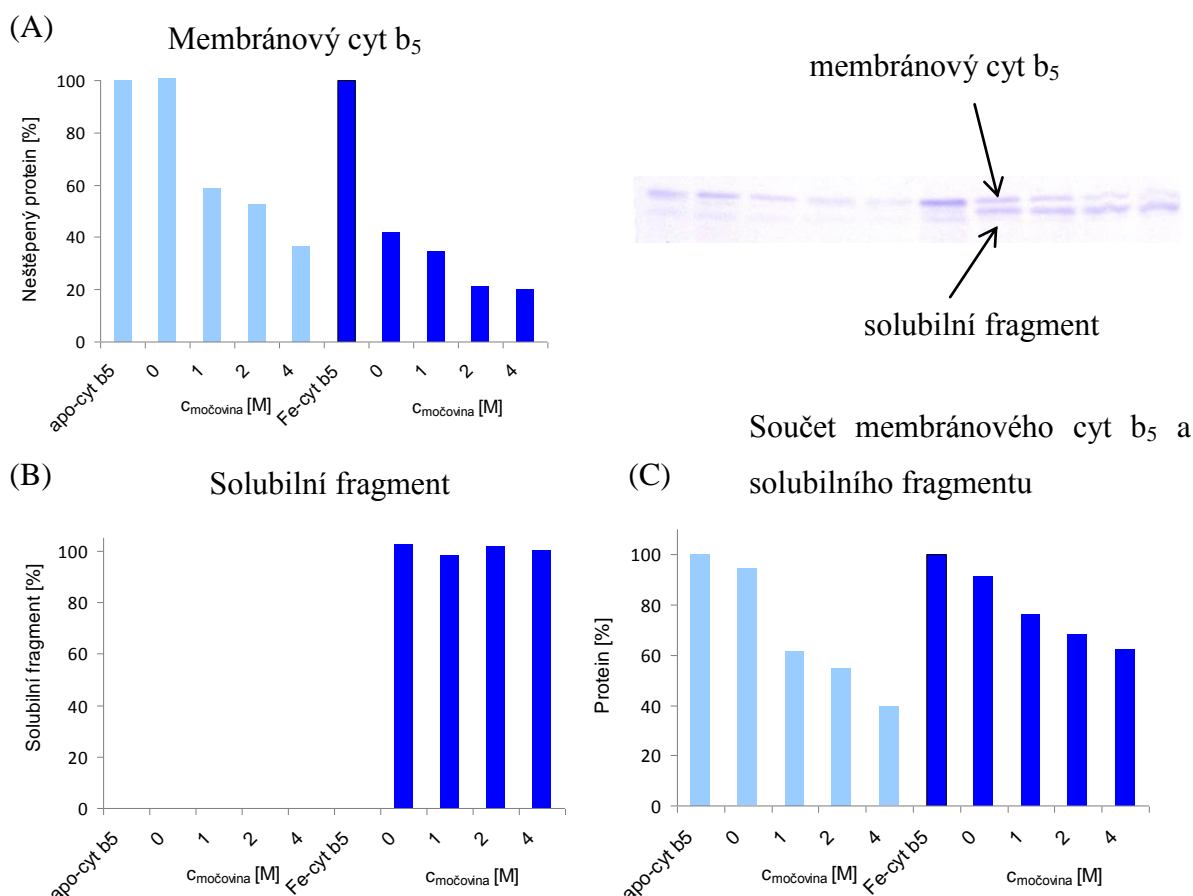
Obr. 30: Vyhodnocení pulzní proteolýzy solubilního apo-cyt b₅, Fe-cyt b₅ a jeho analogů (Mn-cyt b₅, Cr-cyt b₅ a Co-cyt b₅) v prostředí močoviny. Množství neštěpeného proteinu, které zůstalo v roztoku po pulzní proteolýze (thermolysin+), je vyhodnoceno proti kontrolním vzorkům, které nebyly podrobeny působení proteasy (thermolysin-). Směrodatná odchylka byla počítána z pěti měření. Pod grafem je výřez jednoho z elektroforetických gelů v oblasti obsahující cyt b₅.

Z daného grafu je zřejmé, že nejvíce byla štěpena apoforma cyt b₅ a v rámci chyby měření podobně i Mn-cyt b₅. Malé množství Mn-cyt b₅ ve vzorku po štěpení je v souladu

se skutečností, že Mn^{III} PPIX má sníženou afinitu k apo-cyt b_5 ($K_d \sim 15$ nM), potvrzuje to přítomnost podstatného množství apo-cyt b_5 ve vzorku [70]. Fe-cyt b_5 a Co-cyt b_5 byly podle výsledků nejstabilnější vůči působení thermolysinem. Množství neštěpeného Fe-cyt b_5 ve vzorku po pulzní proteolýze (~ 80 %) odpovídá výsledku ukázaným na Obr. 7 na str. 21.

4.2.2 Membránový cytochrom b_5 – močovina a thermolysin

Pro membránový cyt b_5 byly vyzkoušeny stejné podmínky jako pro solubilní cyt b_5 . Nejprve byl proveden pokus pouze pro apo-cyt b_5 a Fe-cyt b_5 (Obr. 31) preinkubovaných v roztocích s rostoucí koncentrací močoviny.

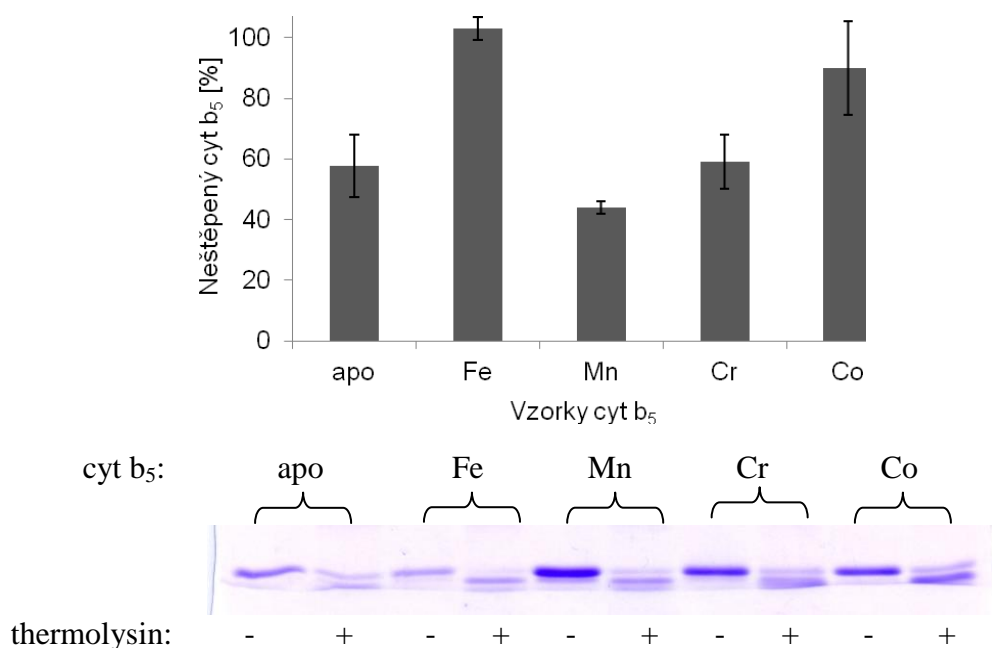


Obr. 31: Pulzní proteolýza v prostředí močoviny pro membránový apo-cyt b_5 (světle modrá) a Fe-cyt b_5 (tmavě modrá) v prostředí močoviny. První sloupec označuje kontrolu (v tomto případě bylo ke kontrolnímu vzorku přidáno dané množství EDTA a poté i thermolysin). Následující sloupce naznačují množství cyt b_5 zbylého po pulzní proteolýze ve vzorcích, které byly inkubovány v takové koncentraci močoviny naznačené pod příslušným sloupcem. Graf (A) ukazuje vyhodnocení zón příslušejících membránovému cyt b_5 , graf (B) vyhodnocení zón solubilního fragmentu a graf (C) součet těchto zón. Přiložený výřez z elektroforetického gelu obsahuje vzorky cyt b_5 v pořadí

stejném, jako je uvedeno v grafu. Vyhodnocení představuje průměr ze dvou měření.

Na elektroforetickém snímku je možné vidět, že se membránový cyt b_5 štěpí a dochází ke vzniku další zóny na gelu, odpovídající fragmentu, jehož podstatnou část tvoří solubilní doména cyt b_5 (dále v textu solubilní fragment). Solubilní fragment apo-cyt b_5 je velmi rychle štěpen, na elektroforetickém gelu nebyl možný detekce. Množství solubilního fragmentu Fe-cyt b_5 zůstává stejné (graf B na Obr. 31), což může být pouze zdánlivé, protože se solubilní fragment tvoří štěpením membránového cyt b_5 a zároveň je štěpen thermolysinem. Již kontrolní vzorky cyt b_5 byly kontaminovány nečistotami.

Pulzní proteolýza pro membránový apo-cyt b_5 a rekonstituovaný apo-cyt b_5 s Fe^{III} PPIX či jeho analogy byla provedena za stejných podmínek jako předchozí provedení. Koncentrace močoviny ve vzorcích byla 2,5 M. Na Obr. 32 je možné si povšimnout, že tendence množství neštěpeného cyt b_5 ve vzorcích po pulzní proteolýze je velmi podobná jako u solubilního cyt b_5 . Opět ve vzorku zůstává nejméně apo-cyt b_5 a Mn-cyt b_5 . Nejvyšší stabilitu vypovídá Fe-cyt b_5 , stabilita Co-cyt b_5 trochu nižší nebo alespoň v rámci chyby srovnatelná.

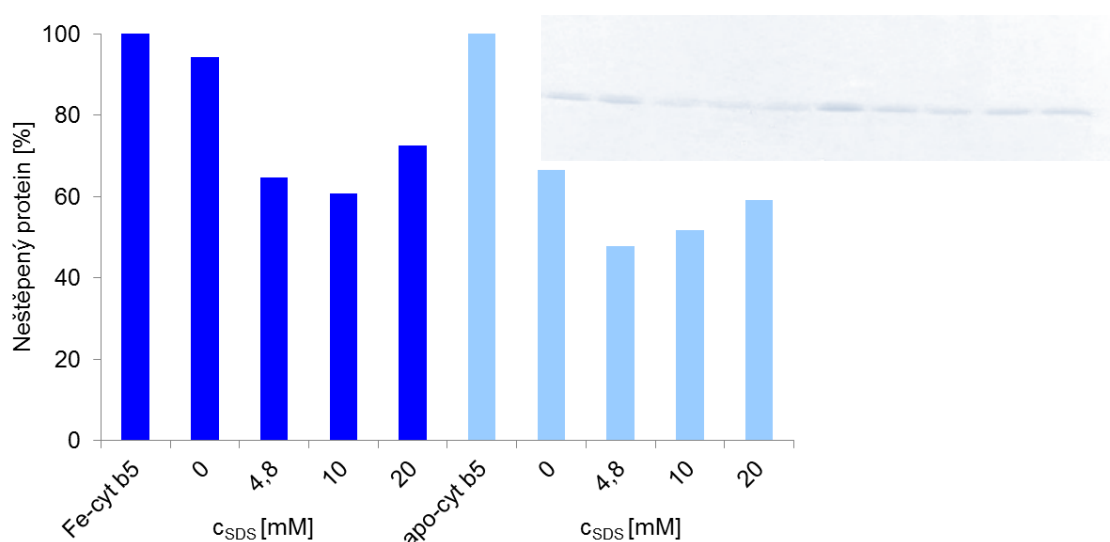


Obr. 32: Pulzní proteolýza membránového cyt b_5 a jeho analogů v prostředí 2,5 M močoviny. Podmínky zůstávají stejné jako u předešlého grafu či z Obr. 30. Směrodatná odchylka vychází ze 4 měření. Na elektroforetickém gelu je vidět, že se vzorek v jednotlivých sloupečkách dělí na několik zón (odpovídající neštěpenému membránovému cyt b_5 a solubilnímu fragmentu cyt b_5). Jelikož jednotlivé zóny nešly od sebe graficky oddělit, byly vyhodnoceny jako jejich součet.

4.2.3 Optimalizace podmínek štěpení pomocí subtilisinu v přítomnosti SDS

Byla provedena optimalizace podmínek pro pulzní proteolýzu využívající SDS jako denaturant vycházející z práce Schlebacha a kol. [60]. Celkem bylo testováno 5 různých kombinací podmínek v širším rozsahu koncentrací SDS, s různým množstvím proteasy nebo například proměnlivou délkou pulzu. V práci je uvedeno pouze několik vyzkoušených podmínek vedoucích k optimalizaci metody pulzní proteolýzy.

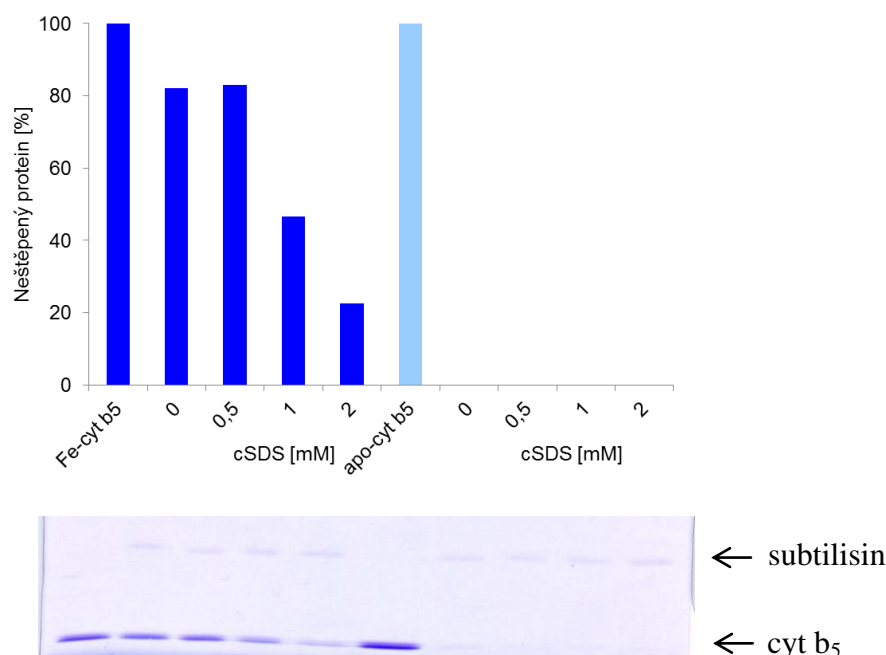
Vzorky cyt b₅ byly inkubovány s SDS 5 min při laboratorní teplotě a 5 min při 37 °C. Poté byly do roztoku přidány 2 μl subtilisinu. Z daných výsledků je vidět, že apo-cyt b₅ je oproti holoformě Fe-cyt b₅ méně stabilní a podléhá více štěpení subtilisinem. Nicméně bylo zjištěno, že použitá koncentrace SDS byla příliš vysoká, neboť při koncentraci nad 4,8 mM SDS dochází ke zvyšování přítomnosti neštěpeného cyt b₅ ve vzorku. Tento výsledek je znázorněn na Obr. 33.



Obr. 33: Vyhodnocení prvotního pokusu pulzní proteolýzy s SDS jako denaturačním činidlem. Reakce se subtilisinem (2 μl) probíhala 30 s při 37 °C. Tmavě modré sloupečky znázorňují množství neštěpeného Fe-cyt b₅ (v procentech) zbylého po štěpení subtilisinem v takové koncentraci SDS, která je napsaná pod daným sloupečkem. Světle modré sloupečky znázorňují množství neštěpeného apo-cyt b₅. Jako kontrola (Fe-cyt b₅, apo-cyt b₅) byl použit vzorek neobsahující ani SDS ani subtilisin. Na obrázku je výřez z elektroforetického gelu obsahující vzorky ve stejném pořadí, jak ukazuje graf.

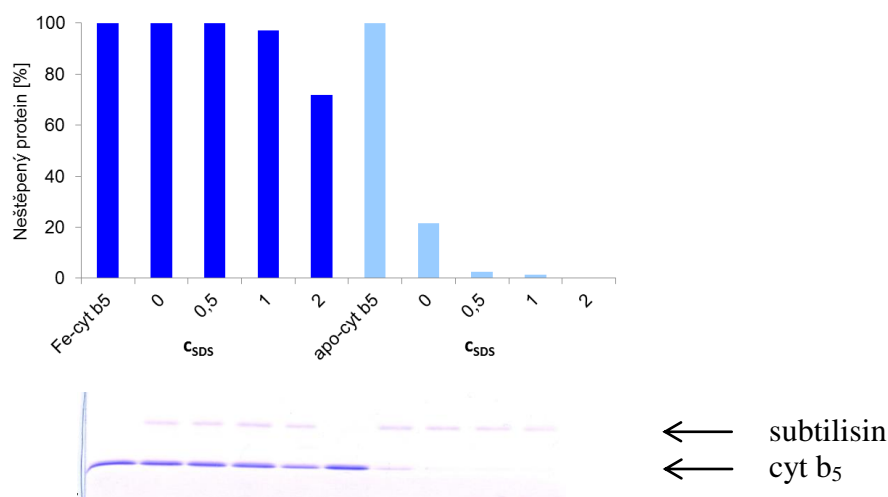
Dále byl proveden stejný experiment, rozdíl byl jen v tom, že byl použit 2,5násobek původního subtilisinu (5 μl). Experiment měl stejné výsledky.

Pro další pokus byly pozměněny hodnoty koncentrace SDS tak, aby v roztocích byla maximálně 2 mM. Navíc byla prodloužena doba pulzu na 60 s. Množství subtilisinu bylo 2,5násobné oproti Obr. 33. Teplotní podmínky experimentu byly zachovány. Z grafu (Obr. 34) je možno vidět klesající tendenci v množství neštěpeného Fe-cyt b₅ s rostoucí koncentrací SDS ve vzorku. Ve vzorku s apo-cyt b₅ však nezůstal po působení proteasy žádný neštěpený protein.



Obr. 34: Vyhodnocení pulzní proteolýzy, při které reakce s thermolysinem probíhala 60 s. Holoforma vykazuje očekávaný pokles v zastoupení neštěpeného proteinu, apoforma však nevykazuje žádný zbývající neštěpený protein ve vzorku. V horní části gelu je možno vidět zóny příslušící protease subtilisinu. Vzorky na elektroforetickém gelu i grafu jsou uspořádány ve stejném pořadí. Jako kontrola (Fe-cyt b₅, apo-cyt b₅) byl použit vzorek neobsahující ani SDS ani subtilisin.

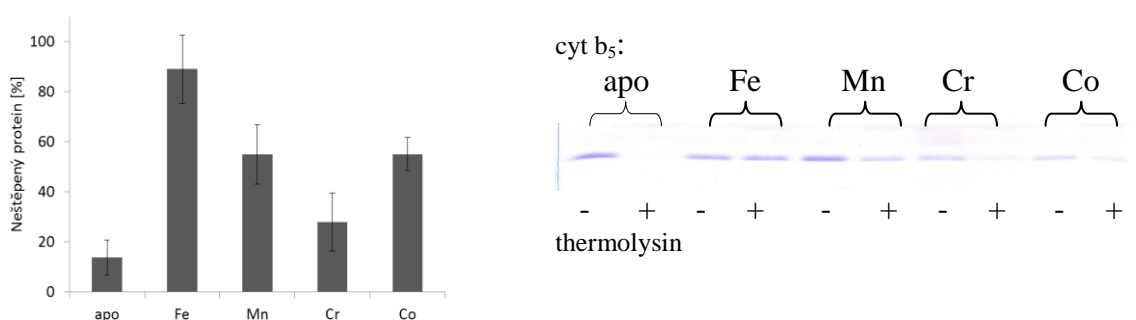
Další experiment byl proto proveden s kratší dobou pulzu (30 s). Z grafu (Obr. 35) je vidět, že ke štěpení apo-cyt b₅ dochází i bez působení SDS, zatímco ke štěpení Fe-cyt b₅ dochází spíše až při vyšších koncentracích SDS. Tímto byly nalezeny optimální podmínky pro pulzní proteolýzu pomocí SDS.



Obr. 35: Optimalizované podmínky pro pulzní proteolýzu v prostředí SDS. Vzorky byly inkubovány 5 min při laboratorní teplotě a 5 min při 37 °C a poté probíhalo štěpení thermolysinem pro dobu 30 s. U apoformy i holoformy je vidět snižující se množství neštěpeného proteinu se vzrůstající koncentrací SDS ve vzorku. Na obrázku je také výřez gelu obsahující vzorky ve stejném pořadí, jak je uvedeno v grafu.

4.2.4 Solubilní cytochrom b₅ – SDS a subtilisin

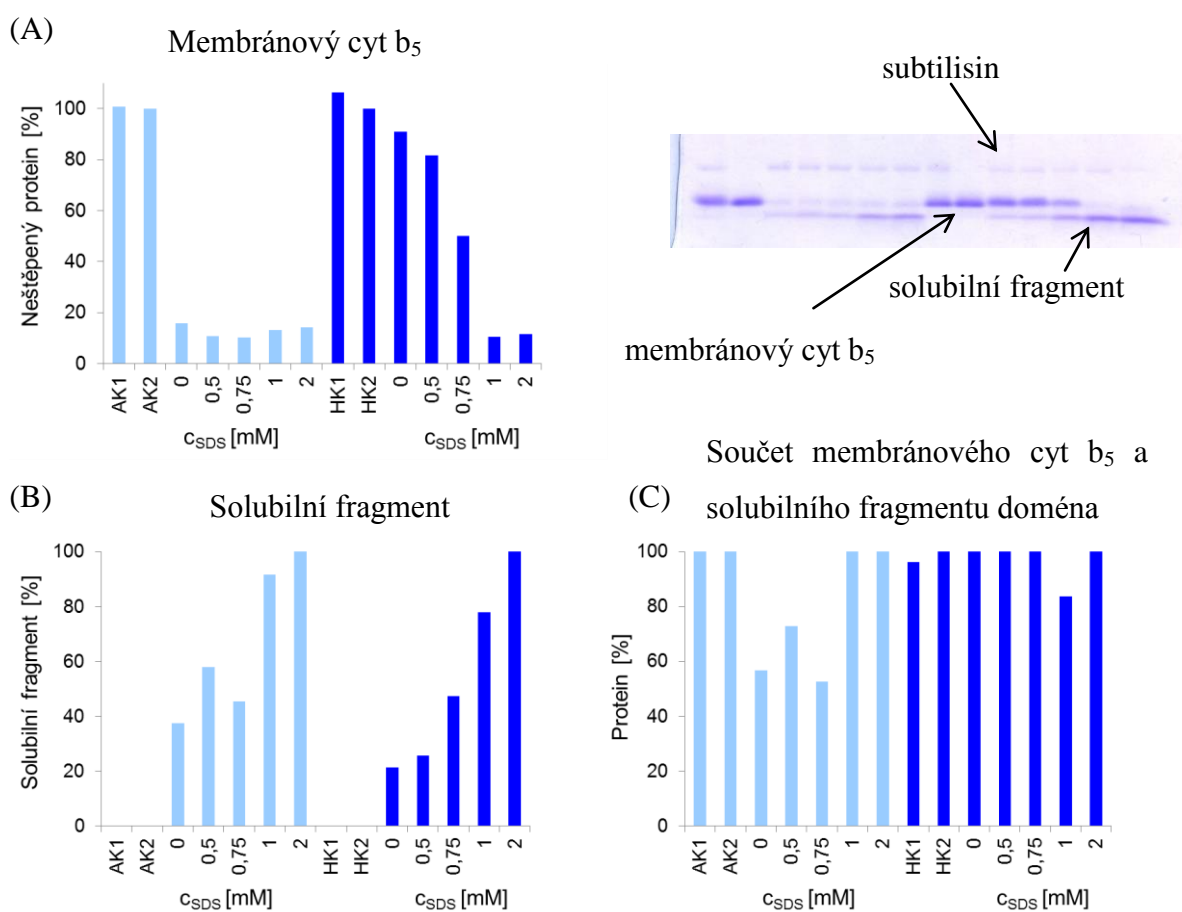
Za daných optimalizovaných podmínek byla provedena pulzní proteolýza pro cyt b₅ rekonstituovaného analogy heminu. Pro experiment byla vybrána pouze jedna hodnota koncentrace SDS pro rozvolnění proteinu. Byla vybrána taková koncentrace, kdy byl rozdíl v množství neštěpeného proteinu Fe-cyt b₅ vůči apo-cyt b₅ největší, a to 0,5 mM SDS. Z Obr. 36 je zřejmé, že k největšímu štěpení dochází u apoformy cyt b₅ a nejmenšímu u Fe-cyt b₅. Mn-cyt b₅ a Co-cyt b₅ vykazují obdobnou stabilitu v prostředí SDS.



Obr. 36: Vyhodnocení pulzní proteolýzy solubilního apo-cyt b₅, Fe-cyt b₅ a jeho analogů (Mn-cyt b₅, Cr-cyt b₅ a Co-cyt b₅) v prostředí 0,5 mM SDS. Na grafu je znázorněna směrodatná odchylka vyjadřující rozptyl z celkem sedmi měření. Na obrázku je též výřez jednoho z elektroforetických gelů.

4.2.5 Membránový cytochrom b_5 – SDS a subtilisin

Obdobně jako byla zkoumána stabilita solubilního cyt b_5 , byly provedeny i experimenty pro membránový cyt b_5 . Byly využity optimalizované podmínky solubilního cyt b_5 (viz Obr. 35), nejprve pouze s nativní formou Fe-cyt b_5 a apo-cyt b_5 , poté s jejich analogy. Vzorky byly preinkubovány v roztoku s SDS 10 min při 7 °C a 5 min při 37 °C. Poté následovala reakce se subtilisinem zastavená po 30 s PMSF. Na elektroforetickém gelu (Obr. 37) je možné vidět tři zóny bílkovin ve většině sloupečků. Nejvýše je subtilisin, poté neštěpený cyt b_5 (membránový cyt b_5) a dole je štěpený cyt b_5 (solubilní fragment).

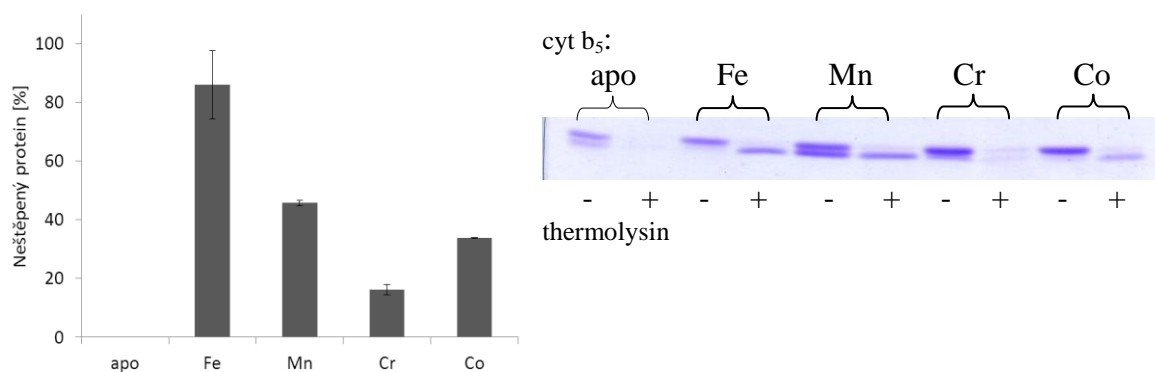


Obr. 37: Pulzní proteolýza membránového apo-cyt b_5 (světle modrá) a Fe-cyt b_5 (tmavě modrá) v prostředí SDS. Podmínky byly vzaty stejné, jako byly optimalizovány u solubilního cyt b_5 (viz Obr. 35, str. 62). Většina sloupečků na elektroforetickém gelu obsahuje 3 zóny – od shora thermolysin, neštěpený cyt b_5 , štěpený cyt b_5 . Graf (A) představuje vyhodnocení zóny neštěpeného cyt b_5 (membránový cyt b_5), kde je jako 100% hodnota vzata kontrola, na kterou nebylo působeno proteasou. Graf (B) je vyhodnocení pro štěpený cyt b_5 (solubilní fragment), kde je jako 100% hodnota vzat vzorek o nejvyšší koncentraci SDS. AK1, HK1 - subtilisin byl přidán po PMSF, AK2, HK2 – vzorek obsahující pouze cyt b_5 , A značí apo-cyt b_5 , H značí Fe-cyt b_5 . Vzorky byly preinkubovány v koncentraci SDS, která je zaznamenána pod daným sloupečkem v grafu.

Byly vyhodnoceny zóny pro membránový cyt b_5 štěpený a neštěpený, tato dvě vyhodnocení je možné vidět na Obr. 37 A a B. Následně byly sečteny hodnoty zón pro neštěpený a štěpený cyt b_5 pro jednotlivé sloupečky, daný součet činil u apo-cyt b_5 55 až 100 %, u Fe-cyt b_5 95 až 100 % (Obr. 37 C).

Souběžně byla u tohoto pokusu provedena zkouška, zda inaktivace proteinu pomocí PMSF je dostatečná. Výsledek ukázal, že stejné množství proteinu je jak ve vzorku bez přídavku subtilisinu či PMSF (AK2 a HK2 na Obr. 37), tak i vzorku, který obsahoval PMSF již před přídavkem subtilisinu (AK1 a AK2 na Obr. 37).

Pro provedení pulzní proteolýzy s cyt b_5 rekonstituovanými s analogy heminu (obsahující Mn^{III} , Cr^{III} a Co^{III}) byla stejně jako v případě solubilní cyt b_5 zvolena 0,5 mM koncentrace SDS. Výsledky na Obr. 38 poukazují na vysoké množství neštěpeného Fe-cyt b_5 po pulzní proteolýze. Oproti tomu po pulzní proteolýze analogů Fe-cyt b_5 zbylo ve vzorku méně než 50 % neštěpeného proteinu.



Obr. 38: Vyhodnocení pulzní proteolýzy solubilního apo-cyt b_5 , Fe-cyt b_5 a jeho analogů (Mn-cyt b_5 , Cr-cyt b_5 a Co-cyt b_5) v prostředí 0,5 mM SDS. Výsledky ukazují průměr ze dvou měření. Na obrázku je též výřez jednoho z elektroforetických gelů.

5. Diskuse

Tato diplomová práce se zabývala metodou pulzní proteolýzy, kterou popsali zejména Park a kol. a Schleich a kol., jako metodu sledující účinnost štěpení proteinu proteasou za krátký časový úsek v závislosti na koncentraci denaturantu. Toho může být dále využito ke studování stability proteinů či vazbu ligandů. Studium stability proteinů je důležité z několika důvodů. Jednak se tím získávají informace o termodynamice sbalování proteinů, jednak například přispívá k vývoji nových proteinů „*de novo*“ s požadovanými vlastnostmi. To vše může získat uplatnění při porozumění příčin některých onemocnění nebo vývoji biotechnologických procesů [41,48,71].

Na metabolismu cizorodých látek v lidském organismu se z velké části podílí MFO systém a tato práce se zaměřuje na jeden z jeho proteinů. Cyt b_5 může svým působením na cytochrom P450 ovlivňovat rychlost i směr metabolismu zprostředkovaného těmito enzymy. Jelikož však stále není přesně znám mechanismus působení cyt b_5 na cytochrom P450, je důležité dále zkoumat souvislost mezi těmito dvěma proteiny. Jedním z předpokládaných ovlivnění cytochromu P450 je jeho allosterickou modulací přes interakce s cyt b_5 . K dalším experimentům by bylo potřeba připravit vhodný analog nativního cyt b_5 , který by nebyl schopný přenosu elektronů na cytochrom P450, avšak byl podobný jak z hlediska struktury, tak z hlediska stability.

Práce navazuje na bakalářskou práci, ve které byly uskutečněny prvotní pokusy o provedení dané metody dosud nezavedené v laboratoři na katedře Biochemie PřF UK. V bakalářské práci byl zkoumán králičí solubilní cyt b_5 , ve své diplomové práci jsem se zaměřila na příbuzný lidský cyt b_5 . Bylo potřeba ověřit stabilitu solubilního lidského Fe-cyt b_5 a porovnat ji s jeho analogy nejprve za využití močoviny jako denaturačního činidla. Dále byl jako denaturační činidlo otestován SDS. Tato práce také přispívá k další charakteristice metalo-protoporfyrinů IX a rekonstituovaných apo-cyt b_5 s heminem a jeho analogy. V práci byla mj. vylepšena metoda pro titraci apo-cyt b_5 metalo-protoporfyriny IX a nově byla popsána příprava cyt b_5 rekonstituovaného s danými metalo-protoporfyriny IX pomocí gelové chromatografie.

Při přípravě roztoků metalo-protoporfyrinů IX bylo zjištěno, že dochází ke změnám charakteristiky jejich spekter, zejména k posunu vlnových délek absorpčních maxim. I přesto, že byla snaha o uchování roztoků metalo-protoporfyrinů IX ve skleněných

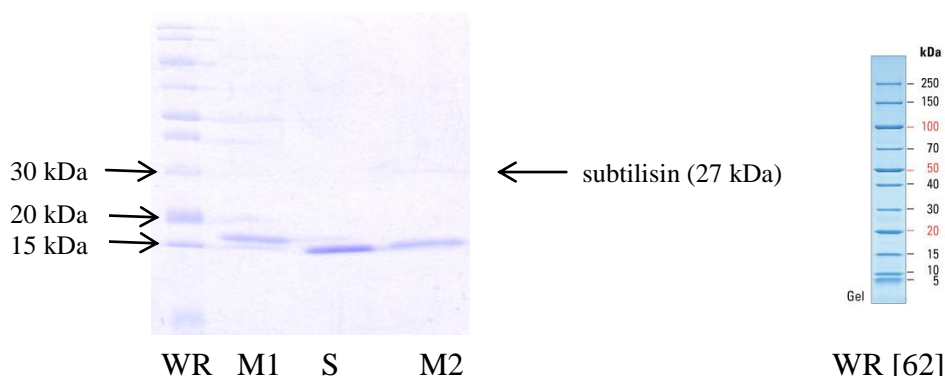
lahvičkách obalených alobalem a řádně uzavřených, mohla být způsobena jejich postupnou degradací při delší expozici roztoků metalo-protoporfyrinů IX vzdušnému kyslíku. Proto je vhodné pracovat s čerstvě připravenými roztoky.

Pro přípravu solubilního cyt b_5 s obsahem Fe^{III} , Mn^{III} , Cr^{III} , Co^{III} byla využita metoda gelové chromatografie. Podobná metoda přípravy rekonstituovaných apo-cyt b_5 s Fe^{III} PPIX a některými dalšími analogy hemu byla použita již dříve [24]. Oproti přímé titraci poskytuje metoda gelové chromatografie některé výhody. Ke vzorku, nanášeném na kolonu, se k apo-cyt b_5 přidávalo trojnásobné množství daného metalo-protoporfyrinu IX. Ten se díky nadbytku mohl na apo-cyt b_5 vázat rychleji než při přidání ekvimolárního množství metalo-protoporfyrinu IX. Nadbytek metalo-protoporfyrinu IX byl pak na koloně odstraněn a zároveň došlo k odstranění zbytků nízkomolekulárních nečistot včetně ethanolu zaneseného z přidávaného v roztoku heminu. Zajímavé bylo, že nenávané metalo-protoporfyriny IX se nespecificky vázaly na kolonu. Mezi přípravou jednotlivých analogů Fe-cyt b_5 bylo potřeba vyměnit gel za čistý. Ačkoli se pro solubilní cyt b_5 zdála chromatografie jako vhodná metoda pro přípravu membránového cyt b_5 rekonstituovaného s analogy heminu, bylo zjištěno, že už tomu tak vždy není. Membránový Fe-cyt b_5 a Co-cyt b_5 byly připraveny jak metodou titrace, tak metodou chromatografie. V případě Fe-cyt b_5 se chromatografie ukázala jako vhodná. Avšak při porovnání hodnot R_z pro Co-cyt b_5 připraveného pomocí titrace a pomocí chromatografie bylo zjištěno, že hodnota R_z je u tohoto preparátu příliš velká. Pravděpodobně zde dochází k nespecifické vazbě Co^{III} PPIX na apo-cyt b_5 , popř. koeluci proteinu a agregátů Co^{III} PPIX. Vzorky Mn-cyt b_5 , Cr-cyt b_5 a Co-cyt b_5 byly proto připravovány podrobnou titrací. Naštěstí jsou tyto analogy heminu rozpustné i ve vodě, tudíž ve vzorcích cyt b_5 není obsažen přebytečný ethanol, který by mohl ovlivňovat výsledky pulzní proteolýzy popřípadě pozdější enzymové studie s cytochromy P450.

Podmínky pro pulzní proteolýzu s thermolysinem byly shodné jako v mé bakalářské práci, kde byly optimalizovány pro králičí cyt b_5 . Pokud porovnáme výsledky pulzní proteolýzy králičího a lidského Fe-cyt b_5 s apo-cyt b_5 , Mn-cyt b_5 , Cr-cyt b_5 a Co-cyt b_5 (solubilní formy), můžeme si povšimnout určitých rozdílů v jejich stabilitě. Fe-cyt b_5 a Co-cyt b_5 vykazovaly podobnou stabilitu. Avšak lidský Cr-cyt b_5 byl méně stabilní než králičí Cr-cyt b_5 . Největší rozdíl vykazuje Mn-cyt b_5 , kde lidská forma je mnohem méně stabilní než králičí.

Porovnáme-li tendence stability u solubilního a membránového lidského cyt b_5 určené pomocí thermolysinu lze konstatovat, že odhlédneme-li od odštěpování membránové kotvy, jsou výsledku velmi podobné (Obr. 30 a Obr. 32). Odštěpení membránové kotvy u membránové formy je velmi rychlé a nezávislé na typu porfyrinového analogu. Zajímavý je však náznak vyšší odolnosti membránové domény vůči štěpení u apoformy, mohlo by to například souviset s odlišnými vzájemnými interakcemi mezi solubilní a membránovou doménou u holo a apo-formy.

Pro některé membránové proteiny byla metoda pulzní proteolýzy popsána Schlebachem a kol., kteří použili pro denuraci proteinu SDS a subtilisin. Tato metoda byla v této diplomové práci vyzkoušena a optimalizována pro membránový i solubilní lidský cyt b_5 . Bylo zjištěno, že při provedení pulzní proteolýzy v prostředí 5 – 10 mM SDS dochází ke snižování aktivity subtilisinu. Tento jev může být způsoben tím, že kritická micelizační koncentrace SDS je přibližně 7 mM a nad touto koncentrací dochází k denuraci samotného subtilisinu [44]. Výsledky porovnání jednotlivých analogů cyt b_5 jsou obdobné jako u pulzní proteolýzy s močovinou. Lze říci, že stabilita apo-cyt b_5 a Fe-cyt b_5 je srovnatelná u obou provedení. Avšak lidský solubilní Cr-cyt b_5 podléhal menšímu štěpení thermolysinem než Mn-cyt b_5 , u provedení se subtilisinem podléhal solubilní Cr-cyt b_5 většímu štěpení než Mn-cyt b_5 . Pro subtilisin byla provedena kontrola, zda sledovaná zóna štěpené bílkoviny odpovídá solubilnímu cyt b_5 . Byly porovnány zóny neštěpeného membránového a solubilního cyt b_5 a štěpeného membránového cyt b_5 při koncentraci 0,5 mM SDS. Výsledek ukázal, že štěpený cyt b_5 se v elektroforetickém gelu vyskytuje mezi solubilním a membránovým cyt b_5 (Obr. 39). Subtilisin štěpí v oblasti nejvíce náchylné pro štěpení - flexibilní spojka - ale zřejmě blíže k membránové kotvě.



Obr. 39: Umístění štěpeného membránového cyt b_5 (M2) na elektroforetickém gelu. WR označuje standard pro elektroforézu od firmy Thermo Scientific (vpravo srovnání se zdrojovými daty [62]), M1 – membránový cyt b_5 , S – solubilní cyt b_5 , M2 – membránový cyt b_5 podroben štěpení subtilisinem v prostředí 0,5 mM SDS.

Při provedení pulzní proteolýzy se subtilisinem vykazoval membránový cyt b_5 o trochu nižší stabilitu oproti solubilnímu cyt b_5 . Účinnější štěpení subtilisinem mohlo být v tomto případě zapříčiněno přítomností zbytků detergentů v preparátu membránové formy, které svou přítomností mohly potencovat působení SDS.

Při porovnání výsledků stability všech cyt b_5 , se jako nejstabilnější forma ukázala nativní forma cyt b_5 a nejméně stabilní byl apo-cyt b_5 . Stabilita apo-cyt b_5 je v souladu s Obr. 2 na str. 13, kde je patrné, že polypeptidový řetězec apo-cyt b_5 je celkově rozvolněný a obsahuje podstatně méně α -helixu. Při porovnávání analogů Fe-cyt b_5 pomocí metody pulzní proteolýzy v prostředí močoviny vykazuje nejvyšší stabilitu Co-cyt b_5 , a to jak solubilní tak i membránová forma. Proto se z těchto výsledků zdá, že by mohl být při dalších experimentech vhodný analog jako náhrada za hem v molekule cyt b_5 .

Byla také porovnána redukovatelnost Co-cyt b_5 a Fe-cyt b_5 . Zatímco oba volné metalo protoporfyriny IX byly ve vodném roztoku redukovatelné dithioničitanem sodným. V případě jejich komplexu s cyt b_5 tomu bylo jinak. Potvrdilo se, že Fe-cyt b_5 je redukovatelný dithioničitanem, avšak Co-cyt b_5 již redukovatelný nebyl. Přestože redukce NADPH:cytochrom P450 reduktasou, zatím sledována nebyla, je pravděpodobné, že Co-cyt b_5 jejím prostřednictvím také redukován nebude a je tudíž vhodným kandidátem na navazující studie.

6. Závěr

Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

- Byly vypracovány a srovnány metody příprav cyt b_5 rekonstituovaných s Fe^{III} PPIX, Mn^{III} PPIX, Cr^{III} PPIX a Co^{III} PPIX.
- Byla provedena metoda pulzní proteolýzy v prostředí močoviny pro lidský cyt b_5 rekonstituovaný s heminem a jeho analogy. Při porovnání výsledků pro solubilní i membránovou formu bylo zjištěno, že vzájemný poměr stability rekonstituovaných cyt b_5 je pro jednotlivé analogy velmi podobný. Přítomnost membránové části nemá na konformační stabilitu hem-vázající domény podstatný vliv. Nejvyšší stabilitu má Fe-cyt b_5 z jeho analogů pak Co-cyt b_5 . Mn-cyt b_5 má velmi nízkou stabilitu, srovnatelnou s apoformou cyt b_5 .
- Byla optimalizována metoda pulzní proteolýzy využívající SDS jako denaturant pro lidský solubilní i membránový cyt b_5 .
- Byla porovnána stabilita apo-cyt b_5 s cyt b_5 rekonstituovaného s heminem a jeho analogy pomocí metody pulzní proteolýzy také jiného denaturačního činidla a jiné proteasy. A to opět jak pro solubilní, tak i membránový cyt b_5 . Solubilní i membránový cyt b_5 rekonstituovaný s heminem a jeho analogy opět vykazovaly podobné výsledky. Při použití tohoto systému vykazovaly všechny analogy nižší stabilizační vliv na cyt b_5 . Přičemž nejnižší míru stability měl Cr-cyt b_5 .
- Připravený analog Co-cyt b_5 se na rozdíl od samotného Co^{III} PPIX neredukuje. Co-cyt b_5 je tedy vhodným kandidátem ke studiu mechanismu působení cyt b_5 na proteiny MFO systému, především na cytochromy P450.

Seznam použité literatury

1. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy* **94**, 913–918.
2. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737–747.
3. Jancová, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **154**, 103–116.
4. Stiborová, M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. *Sborník z 1. multioborového semináře „Otevřená věda“, Praha*, 6–9.
5. Dürr, U. H. N., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b₅ and their reductases - promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 3235–3259.
6. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M. (2009) Preparation of a biologically active apo-cytochrome b₅ via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **66**, 203–209.
7. Schenkman, J. B., Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b₅. *Pharmacol. Ther.* **97**, 139–152.
8. <http://rams.biop.lsa.umich.edu/research/membrane-proteins> [cit. 2.12.2013].
9. Omiecinski, C. J., Vanden Heuvel, J. P. V., Perdew, G. H., Peters, J. M. (2011) Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* **120**, 49–75.
10. Sanborn, R. C., Williams, C. M. (1950) The cytochrome system in the cecropia silkworm, with special reference to the properties of a new component. *J. Gen. Physiol.* **33**, 579–588.
11. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00167> [cit. 14.4.2014].
12. Lederer, F., Ghir, R., Guiard, B., Cortial, S., Ito, A. (1983) Two homologous cytochromes b₅ in a single cell. *Eur. J. Biochem.* **132**, 95–102.
13. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M. (2011) Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochemical Pharmacology* **82** (6), 669–680.

14. Schenkman, J. B., Jansson, I. (1999) Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b₅. *Drug Metabolism Reviews* **31**, 351–364.
15. Aono, T., Sakamoto, Y., Miura, M., Takeuchi, F., Hori, H., Tsubaki, M. (2010) Direct electrochemical analyses of human cytochromes b₅ with a mutated heme pocket showed a good correlation between their midpoint and half wave potentials. *J. Biomed. Sci.* **17**, 15 str.
16. Vergéres, G., Waskell, L. (1995) Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77**, 604–620.
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2564813/figure/F1/> [cit. 14.4.2014].
18. Ahuja, S., Jahr, N., Im, S. C., Vivekanandan, S., Popovych, N., Clair, S. V. L., Huang, R., Soong, R., Xu, J., Yamamoto, K., Nanga, R. P., Bridges, A., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2013) A model of the membrane-bound cytochrome b₅-cytochrome P450 complex from NMR and mutagenesis data. *J. Biol. Chem.*, 22080–22095.
19. Pandey, M. K., Vivekanandan, S., Ahuja, S., Huang, R., Im, S. C., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2013) Cytochrome-P450–Cytochrome-b₅ Interaction in a Membrane Environment Changes ¹⁵N Chemical Shift Anisotropy Tensors. *J. Phys. Chem.B* **117**, 13851–13860.
20. Robinson, N. C., Tanford, C. (1975) The binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b₅. *Biochemistry* **14**, 369–378.
21. Clarke, T. A., Im, S. C., Bidwai, A., Waskell, L. (2004) The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b₅ in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 36809–36818.
22. Spatz, L., Strittmatter, P. (1971) A Form of Cytochrome b₅ That Contains an Additional Hydrophobic Sequence of 40 Amino Acid Residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **68**, 1042–1046.
23. Chudaev, M. V., Usanov, S. A. (1997) Expression of functionally active cytochrome b₅ in Escherichia coli: isolation, purification, and use of the immobilized recombinant heme protein for affinity chromatography of electron-transfer proteins. *Biochemistry Mosc.* **62**, 401–411.
24. Ozols, J., Strittmatter, P. (1964) The Interaction of Porphyrins and Metalloporphyrins with Apocytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **239**, 1018–1023.
25. Kostelanská, M. (2011) Heterologní exprese a purifikace lidského cytochromu b₅. *Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie*, 92str.

26. <http://archive.today/yIPb> [cit. 14.4.2014].
27. Mrázová, B., Martínek, V., Martínková, M., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M. (2009) Preparation of apo-cytochrome b₅ utilizing heme transfer to apo-myoglobin. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **30**, 72–79.
28. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229–237.
29. Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L. (2005) Role of cytochrome b₅ in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 499–506.
30. Hildebrandt, A., Estabrook, R. W. (1971) Evidence for the participation of cytochrome b₅ in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **143**, 66–79.
31. Tamburini, P. P., White, R. E., Schenkman, J. B. (1985) Chemical characterization of protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **260**, 4007–4015.
32. Porter, T. D. (2002) The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 311–316.
33. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Černá, V., Rupertová, M., Martínek, V., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E. (2012) Cytochrome b₅ increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N,O-acetyltransferases. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1075–1085.
34. McLaughlin, L. A., Ronseaux, S., Finn, R. D., Henderson, C. J., Roland Wolf, C. (2010) Deletion of microsomal cytochrome b₅ profoundly affects hepatic and extrahepatic drug metabolism. *Mol. Pharmacol.* **78**, 269–278.
35. Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M. V., Guengerich, F. P. (2001) Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b₅: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b₅ or heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* **276**, 30885–30891.
36. Yamazaki, H., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Shimada, T., Guengerich, F. P. (1996) Lack of electron transfer from cytochrome b₅ in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **271**, 27438–27444.
37. Voet, D., Voetová, J. G (český překlad, Kotyk A. a kol.) (1995) Biochemie, *Victoria Publishing, Praha*, 1362 str.

38. Cowley, A. B., Rivera, M., Benson, D. R. (2004) Stabilizing roles of residual structure in the empty heme binding pockets and unfolded states of microsomal and mitochondrial apocytochrome b₅. *Protein Sci.* **13**, 2316–2329.
39. Mukhopadhyay, K., Lecomte, J. T. J. (2004) A relationship between heme binding and protein stability in cytochrome b₅. *Biochemistry* **43**, 12227–12236.
40. Park, C., Marqusee, S. (2006) Quantitative determination of protein stability and ligand binding by pulse proteolysis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 20**, Unit 20.11.
41. Park, C., Marqusee, S. (2005) Pulse proteolysis: A simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nat. Meth.* **2**, 207–212.
42. Van Mierlo, C. P., Steensma, E. (2000) Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *J. Biotechnol.* **79**, 281–298.
43. Magliery, T. J., Lavinder, J. J., Sullivan, B. J. (2011) Protein stability by number: high-throughput and statistical approaches to one of protein science's most difficult problems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 443–451.
44. Otzen, D. E. (2002) Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. *Biophys. J.* **83**, 2219–2230.
45. Renthal, R. (2006) An Unfolding Story of Helical Transmembrane Proteins. *Biochemistry* **45**, 14559–14566.
46. Lau, F. W., Bowie, J.U. (1997) A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry* **36**, 5884–5892.
47. Wang, L., Cowley, A. B., Benson, D.R. (2007) Enhancing the thermal stability of mitochondrial cytochrome b₅ by introducing a structural motif characteristic of the less stable microsomal isoform. *Protein Eng. Des. Sel.* **20**, 511–520.
48. Schleich, J. P., Kim, M. S., Joh, N. H., Bowie, J. U., Park, C. (2011) Probing membrane protein unfolding with pulse proteolysis. *J. Mol. Biol.* **406**, 545–551.
49. Na, Y.-R., Park, C. (2009) Investigating protein unfolding kinetics by pulse proteolysis. *Protein Sci.* **18**, 268–276.
50. Park, C., Marqusee, S. (2004) Probing the high energy states in proteins by proteolysis. *J. Mol. Biol.* **343**, 1467–1476.
51. Jurga, V., Kodíček, M. (2010) Limitovaná a pulzní proteolýza lidského hemoglobinu. *Chem. Listy* **104**, 232–235.
52. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t7902pis.pdf [cit. 20.12.2013].
53. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1KEI> [cit. 13.1.2014].

-
54. Shaw, A. K., Pal, S. K. (2007) Activity of Subtilisin Carlsberg in macromolecular crowding. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **86**, 199–206.
55. Chu, N. M., Chao, Y., Bi, R. C. (1995) The 2 Å crystal structure of subtilisin E with PMSF inhibitor. *Protein Eng.* **8**, 211–215.
56. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1SBC> [cit. 20.12.2013].
57. Davies, D. M., Lawther, J. M. (1988) Interaction of cytochrome b₅ with surfactant vesicles. *Biochem. J.* **251**, 391–396.
58. Maroušková, R. (2011) Vliv analogu hemu na strukturu a konformační stabilitu cytochromu b₅. *Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie*, 52 str.
59. https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc18102218_20131003233140.pdf [cit. 12.11.2013].
60. Schleich, J. P., Cao, Z., Bowie, J. U., Park, C. (2012) Revisiting the folding kinetics of bacteriorhodopsin. *Protein Sci.* **21**, 97–106.
61. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p7626pis.pdf [cit. 20.12.2013].
62. <http://iti.stanford.edu/himc/documents/ProteaseInhibitionGuide.pdf> [cit. 14.1.2014].
63. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
64. <http://imagej.nih.gov/ij/> [cit. 14.4.2014].
65. Ihara, M., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. (2000) Functions of fluctuation in the heme-binding loops of cytochrome b₅ revealed in the process of heme incorporation. *Biochemistry* **39**, 5961–5970.
66. Liang, Z. X., Jiang, M., Ning, Q., Hoffman, B. M. (2002) Dynamic docking and electron transfer between myoglobin and cytochrome b(5). *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 580–588.
67. Douglas, R. H., Hultquist, D. E. (1978) Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b₅ are identical to segments of microsomal cytochrome b₅. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 3118–3122.
68. Scolaro, L. M., Castriciano, M., Romeo, A., Patané, S., Cefali, E., Allegrini, M. (2002) Aggregation Behavior of Protoporphyrin IX in Aqueous Solutions: Clear Evidence of Vesicle Formation. *J. Phys. Chem. B* **106**, 2453–2459.
69. Carlsen, J., Christiansen, K., Jensen, H. M. (1988) Rat hepatic microsomal cytochrome b₅. A simple large-scale purification procedure and antibody production by antigen-containing liposomes. *Biochem. J.* **256**, 1051–1054.

70. Gruenke, L. D., Sun, J., Loehr, T. M., Waskell, L. (1997) Resonance Raman spectral properties and stability of manganese protoporphyrin IX cytochrome b₅. *Biochemistry* **36**, 7114–7125.
71. Yon, J. M. (2001) Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**, 419–435.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka