

Abstrakt

Cytochrom b_5 plní funkci přenašeče elektronů v klinicky významném systému oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systému). Tento systém se podílí na zvýšení hydrofility látek v první fázi biotransformace xenobiotik a na aktivaci nebo deaktivaci některých léčiv a karcinogenů. Cytochrom b_5 ovlivňuje reakce katalyzované terminálními oxygenasami systému – cytochromy P450. Donory elektronů cytochromu b_5 jsou NADH:cytochrom b_5 reduktasa a NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Cílem této práce bylo ověřit, zda je možné pomocí metody foto-chemického zesíťování fixovat transientní interakce mezi těmito proteiny. Takto získané kovalentní komplexy mohou být dále analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie a poskytují strukturní informace o vazebných místech proteinů.

Pro účely foto-síťování byl připraven mutantní cytochrom b_5 obsahující v sekvenci v pozici 41 foto-aktivovatelný analog methioninu. Protein jsme exprimovali ve 300 ml limitního média, ve kterém byl methionin nahrazen L-2-amino-5,5-azi-hexanovou kyselinou (foto-methionin), a použili k tomu auxotrofní kmen bakterií *E. coli* B834(DE3). Míra inkorporace nepřirozené aminokyseliny byla po 16 h exprese stanovena pomocí hmotnostní spektrometrie na přibližně 40 %. Izolaci jsme získali celkem 15,4 nmol mutantního cytochromu b_5 o koncentraci 76,8 $\mu\text{mol/l}$.

Získaný foto-reaktivní preparát byl spolu jednotlivými redoxními partnery rekonstituován s liposomy. Přítomné fotoreaktivní aminokyseliny byly aktivovány dlouhovlnným UV zářením.

Podařilo se ověřit schopnost foto-síťování foto-cytochromu b_5 získáním kovalentních komplexů s cytochromem P450 2B4. Kovalentní komplexy s NADH:cytochrom b_5 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou se bohužel získat nepodařilo.

Klíčová slova: cytochrom b_5 , fotoreaktivní aminokyseliny, síťování proteinů, protein-proteinové interakce, cytochrom P450 NADH:cytochrom b_5 reduktasa, NADPH cytochrom P450 reduktasa.