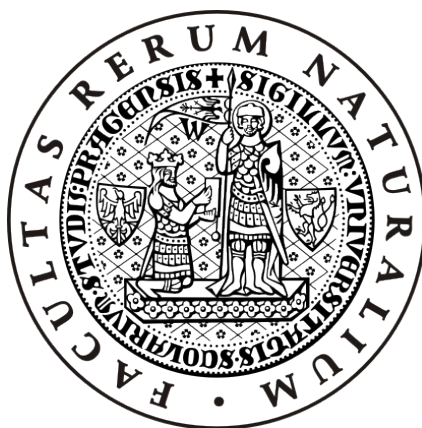


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Martin Stráňava

Heterologní exprese NADPH:cytochrom P450 reduktasy
Heterologous expression of NADPH:cytochrome P450 reductase

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Věra Černá, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 5.5.2012

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Věře Černé, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, trpělivost a všestrannou pomoc při vypracovávání diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Michaele Moserové, Ph.D. a Mgr. Kateřině Levové za cenné připomínky a pomoc při provádění experimentálních metod.

Děkuji i celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) je flavoprotein o velikosti 78 kDa, který je spolu s cytochromy P450 součástí monooxygenasového systému vázaného v membráně endoplasmatického retikula. Monooxygenasový systém se účastní metabolismu široké škály organických látek, včetně léčiv nebo různých polutantů přítomných v životním prostředí (polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy aj.). CPR funguje jako přenašeč redukčních ekvivalentů z NADPH na příslušné cytochromy P450. Pro správnou interakci s cytochromy P450 je důležitá N-terminální hydrofobní doména kotvící protein v membráně. Odstranění této domény, např. trypsinovou proteolýzou, má za následek vznik solubilní CPR (72 kDa) a ztrátu katalytické aktivity vůči cytochromu P450. V průběhu heterologní exprese v bakteriích *E. coli* je proteolyticky labilní místo CPR (Lys56 – Ile57) cílem působení intracelulárních proteas s trypsinovou aktivitou, což může negativně ovlivnit výtěžky nativního 78 kDa proteinu.

Předkládaná diplomová práce popisuje heterologní expresi, purifikaci a charakterizaci dvou forem potkaní CPR. Forma wtCPR představuje protein přirozeně se vyskytující v potkaním organismu (kmen Wistar), zatímco mCPR obsahuje aminokyselinovou substituci (K56Q) v místě proteolytické degradace. Výsledkem zmíněné substituce je proteolyticky stabilní CPR, odolná vůči působení proteas s trypsinovou aktivitou. Obě formy CPR byly exprimovány v buňkách *E. coli* BL21(DE3)RIL s využitím expresního vektoru pET22b. Rekombinantní proteiny byly purifikovány pomocí ionexové (DEAE Sepharosa) a afinitní (2'5' ADP Sepharosa) chromatografie. Enzymové aktivity wtCPR a mCPR byly ověřeny v rekonstituovaném systému s potkaním CYP1A1 při metabolismu Sudanu I jako markerového substrátu. Dále byla testována i schopnost jednotlivých forem CPR redukovat lidský cytochrom b₅.

Klíčová slova: NADPH:cytochrom P450 reduktasa, heterologní exprese, purifikace, proteolytická stabilita.

Abstract

NADPH:cytochrome P450 reductase (CPR) is a 78 kDa flavoprotein, which is together with cytochrome P450 component of monooxygenase system bound in the membrane of the endoplasmic reticulum. Monooxygenase system is involved in the metabolism of a wide range of organic substances, including drugs or various pollutants present in the environment (polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines, etc.). CPR works as a transporter of reducing equivalents from NADPH to the cytochromes P450. For proper interaction with cytochromes P450, intact N-terminal hydrophobic domain anchoring protein in the membrane is needed. Removing this domain, e.g. during trypsin proteolysis, gives rise a soluble CPR (72 kDa) and cause loss of catalytic activity towards cytochrome P450. During heterologous expression in *E. coli* proteolytically sensitive site of CPR (Lys56 - Ile57) is cleaved by intracellular trypsin-like proteases, that may negatively affect the yields of native 78 kDa protein.

This thesis describes the heterologous expression, purification and characterization of two forms of rat CPR. WtCPR is a protein naturally occurring in rats (Wistar strain), while mCPR contains one amino acid substitution (K56Q) in the site of proteolytic degradation. The result of that substitution is proteolytically stable CPR, resistant to proteases with trypsin activity. Both forms of CPR were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) RIL cells using the expression vector pET22b. Recombinant proteins were purified to homogeneity using ion exchange (DEAE Sepharose) and affinity (2'5' ADP Sepharose) chromatography. Enzyme activity of wtCPR and mCPR was verified. Rat CYP1A1 reconstituted with wtCPR and mCPR was capable to oxidize Sudan I, a marker substrate of this CYP. Furthermore, both forms of CPR were capable of reducing human cytochrome b₅.

Keywords: NADPH:cytochrome P450 reductase, heterologous expression, purification, proteolytic stability.

(In Czech)

Obsah

Seznam skratek	8
1 Úvod.....	11
1.1 Xenobiotika a jejich biotransformace.....	11
1.1.1 I. fáze biotransformace	12
1.1.2 II. fáze biotransformace.....	13
1.2 Bioaktivace a toxicita cizorodých látek.....	14
1.3 Systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí	15
1.4 Cytochromy P450.....	17
1.4.1 Struktura mikrosomálních cytochromů P450	17
1.4.2 Katalytický mechanismus cytochromů P450.....	18
1.4.3 Nomenklatura cytochromů P450.....	21
1.4.4 Funkce cytochromů P450	22
1.5 NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR)	23
1.5.1 Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....	24
1.5.2 Mechanismus přenosu elektronů NADPH:cytochrom P450 reduktasou.....	27
1.5.3 Konformační změny CPR v průběhu přenosu elektronů na cytochrom P450.....	30
1.6 Heterologní exprese.....	31
1.6.1 Heterologní exprese enzymů MFO systému.....	32
1.6.2 Heterologní exprese potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy v <i>E. coli</i>	33
2 Cíle diplomové práce.....	36
3 Materiál a přístroje	37
3.1 Použité přístroje.....	37
3.2 Použitý materiál a chemikálie	38
4 Metody.....	40
4.1 Příprava agarových ploten.....	40
4.2 Příprava kompetentních buněk.....	40
4.3 Transformace buněk <i>E. coli</i> teplotním šokem.....	41
4.4 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“	41
4.5 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „multi-cell“	41
4.6 Exprese rekombinantních forem mCPR a wtCPR	42
4.7 Izolace plasmidové DNA z buněk <i>E. coli</i>	42
4.7.1 Přečištění fenolu od oxidačních produktů	42

4.7.2	Izolace plasmidové DNA z buněk <i>E. coli</i>	43
4.8	Dvojité štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a NdeI	44
4.9	Horizontální agarosová elektroforéza	44
4.10	Určení koncentrace a čistoty plasmidové DNA	44
4.11	Izolace bakteriální membránové frakce	45
4.12	Solubilizace wtCPR a mCPR z membrán <i>E. coli</i>	45
4.13	Purifikace wtCPR.....	46
4.13.1	Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B.....	46
4.13.2	Chromatografie na koloně 2'5'ADP Sepharosy 4B	47
4.13.3	Rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B	48
4.14	Purifikace mCPR.....	49
4.14.1	Chromatografie na koloně 2'5'ADP Sepharosy 4B	49
4.15	Proteolytické štěpení mCPR a wtCPR pomocí trypsinu	50
4.16	Příprava solubilní CPR bez N-terminální domény (AK 1 – 56)	50
4.17	Elektroforéza SDS-PAGE	50
4.17.1	Příprava polyakrylamidového gelu.....	50
4.17.2	Příprava vzorků a vlastní elektroforéza.....	51
4.18	Metoda „Western blotting“	51
4.19	Imunochemická detekce potkaní CPR	52
4.20	Příprava vzorků na sekvenaci proteinů	52
4.21	Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA	53
4.22	Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči cytochromu c	53
4.23	Příprava rekonstituovaného systému CYP1A1 s CPR.....	54
4.24	Inkubace Sudanu I s rekonstituovaným systémem.....	55
4.25	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	55
4.26	Chromatografie metabolitů Sudanu I na tenké vrstvě (TLC).....	56
4.27	Redukce cytochromu b ₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou v roztoku	56
4.28	Redukce cytochromu b ₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou v prostředí liposomů	56
5	Výsledky a diskuse	58
5.1	Ověření sekvencí genů pro potkaní mCPR a wtCPR v plasmidech pET22b	58
5.2	Ověření podmínek exprese pro mCPR a wtCPR.....	60
5.3	Expresa a purifikace wtCPR.....	62
5.3.1	Expresa wtCPR, izolace membránové frakce, solubilizace.....	62
5.3.2	Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B.....	62

5.3.3	Chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy 4B	65
5.3.4	Rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B	68
5.3.5	Shrnutí purifikace wtCPR.....	70
5.4	Expres a purifikace mCPR	73
5.4.1	Expres mCPR, izolace membránové frakce, solubilizace	73
5.4.2	Chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy 4B	73
5.4.3	Shrnutí purifikace mCPR	76
5.5	Porovnání purifikace wtCPR a mCPR	78
5.6	Porovnání proteolytické stability wtCPR a mCPR.....	81
5.6.1	Porovnání proteolytické stability purifikovaných forem wtCPR a mCPR.....	81
5.6.2	Porovnání proteolytické stability forem wtCPR a mCPR vázaných v membráně	82
5.7	Ověření enzymové aktivity wtCPR a mCPR v rekonstituovaném systému s CYP1A1 při metabolismu Sudanu I	83
5.8	Redukce cytochromu b ₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou	85
5.8.1	Redukce cytochromu b ₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou v roztoku.....	85
5.8.2	Redukce cytochromu b ₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou v prostředí liposomů	86
6	Závěr.....	88
7	Seznam literatury	90

Seznam skratek

2'5' ADP-Sepharosa 4B	2',5'adenosylbisfosfát-Sepharosa 4B
AdR	adrenodoxin reduktasa
Adx	adrenodoxin
AK	aminokyselina
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
b₅	cytochrom b ₅
b₅RED	NADH:cytochrom b ₅ reduktasa
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
cytc	cytochrom c
Da	dalton
DEAE Sepharosa CL-6B	diethylaminoethyl Sepharosa CL-6B
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DTT	dithiotreitol
EDTA Na₂	disodná sůl ethylen diamintetraoctové kyseliny
E-911	2-(4-nonylphenoxy)ethanol (emulgen 911)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD/FADH[•]/FADH₂	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma) /semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN/FMNH[•]/FMNH₂	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)/semichinoidní radikál/hydrochinon
GIT	gastrointestinální trakt
HEPES	sodná sůl 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)

IgY	imunoglobulin třídy Y
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB médium	Luria Broth médium
M	mol/l
mCPR	potkaní mutantní K56Q NADPH:cytochrom P450 reduktasa
MFO	systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
MQ voda	deionizovaná voda
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MSR	reduktasa methionin synthasy
NAD⁺ (NADH)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NOS	NO synthasa
O/N kultura	bakteriální kultura ponechána narůst přes noc (over night)
OD₆₀₀	optická hustota při 600 nm
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PVDF	polyvinylidenfluorid
rabCPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa z jater králíka
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný produkt
RPM	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
štěpCPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa bez N-terminální domény (bez aminokyselin 1 – 56)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TPCK	L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl keton
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITON	t-oktylfluoxypolyetoxyethanol
U	standardní jednotka enzymové aktivity
UDP	uridindifosfát
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
wtCPR	potkaní nativní NADPH:cytochrom P450 reduktasa (wild type)

ΔA	změna absorbance
XOOH	organický peroxid

1 Úvod

Růst životní úrovně, vědecký a technologický pokrok s sebou přináší nejen pozitiva, ale i negativa. Rozmach průmyslu, dopravy, chemizace prostředí, hromadění odpadů, to vše přispívá k rostoucím nárokům na životní prostředí a především na živé organismy. Ty jsou exponovány velkému množství cizorodých látek, se kterými se dříve neselekaly. Patří sem různé průmyslové chemikálie a polutanty např. pesticidy, barviva, fenolické látky, aromatické aminy, nitrosloučeniny, polycyklické aromatické uhlovodíky. Do skupiny cizorodých látek můžeme zařadit také látky vpravované do organismu vědomě, což jsou léčiva [1]. Mnohé z výše zmíněných sloučenin patří mezi toxické látky s neblahým vlivem na živé systémy i lidskou populaci. V případě člověka si pak vybírají daň v podobě civilizačních chorob jako je rakovina, diabetes, astma aj. Možností jak se vypořádat s cizorodými látkami není mnoho. Kromě úsilí o jejich celkovou eliminaci a nalezení nových bezpečnějších sloučenin, je tady ještě snaha porozumět vzniklým problémům na základě znalosti mechanismu jejich působení. Pro poznání těchto mechanismů potřebujeme v první řadě znát a charakterizovat enzymy, které cizorodé látky metabolizují. Tyto enzymy se nazývají biotransformační a mezi nejdůležitější z nich patří cytochromy P450.

1.1 Xenobiotika a jejich biotransformace

Jako xenobiotika můžeme označit látky, které se normálně v organismu nevyskytují a ani nejsou potřebné pro jeho zdravý vývoj nebo jako zdroj energie [2]. Xenobiotika patří nejčastěji do skupiny hydrofobních (nepolárních) látek. Na jedné straně jim hydrofobicita umožňuje snadno prostupovat biologickými membránami, ale na straně druhé je překážkou při jejich eliminaci z organismu. Proto je nezbytné molekuly xenobiotik metabolizovat – biotransformovat na molekuly polárnější, snadněji vylučitelné [3].

Za biotransformaci cizorodých látek jsou považovány procesy, které vedou k jejich snadnějšímu vyloučení z organismu nebo potlačení jejich působení [1]. Podstatou biotransformace je tedy změna fyzikálně-chemických vlastností molekul xenobiotik tak, aby místo absorpce byla preferována jejich exkrece. Tuto úlohu plní v organismech právě biotransformační enzymy. Vyskytují se v říši prokaryot, eukaryot a dokonce i virů [4]. Vyznačují se širokou substrátovou specifitou, kde poměrně úzká skupina enzymů dokáže

metabolizovat velké množství substrátů. To jim umožňuje přeměňovat nejenom látky cizorodé, ale v případě eukaryotních organismů i endogenní substráty jako jsou steroidní hormony, vitamíny A a D, žlučové kyseliny aj. [5].

I když jsou biotransformačními enzymy vybaveny jak bakterie tak živočichové, nakládají s nimi rozdílně. Zatímco bakterie usilují cizorodé látky využít pro svůj prospěch jako zdroj energie nebo uhlíku, živočichové se je naopak snaží eliminovat. Pro tento účel si v evoluci vyvinuli skupiny příslušných enzymových systémů [6]. Jejich výskyt je vázán zejména na biotransformační centra, což jsou játra, plíce, ledviny nebo gastrointestinální trakt. Společně se pak účastní reakcí zabezpečujících exkreci cizorodých látek z organismu.

Tyto reakce můžeme rozdělit do dvou fází. První fáze, tzv. derivatizační, zahrnuje pochody, jejichž cílem je zvýšit polárnost parentálních molekul a zavést funkční skupiny tak, aby byly schopné reakcí v druhé fázi biotransformace. Druhou fází můžeme charakterizovat jako souhrn reakcí, při kterých dochází ke konjugaci polarizované molekuly xenobiotika s endogenními substráty. Konečným produktem těchto reakcí je metabolit mnohem lépe rozpustný ve vodě, který může být z organismu vyloučen [7,8].

1.1.1 I. fáze biotransformace

První fáze biotransformace zahrnuje reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Tyto reakce zavádí nebo demaskují funkční skupiny (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) a obvykle vedou jen k částečnému nárůstu polarizace [7]. Funkční skupiny jsou později reakčními centry v další fázi biotransformace. Nejpočetnější skupinou jsou enzymy, které katalyzují reakce oxidační. Patří sem např. oxygenasy (monooxygenasy, dioxygenasy) nebo peroxidasy.

Nejdůležitější úlohu sehrávají monooxygenasy zahrnující cytochromy P450, které jsou součástí mikrosomálního monooxygenasového systému a flavinové monooxygenasy. Ke své funkci využívají molekulu biatomického kyslíku a kofaktor schopný tento kyslík aktivovat (hem, FAD). Výsledkem reakce je inkorporace jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu, zatímco druhý je redukován na vodu [9].

Dioxygenasy pak vnášejí do molekuly substrátu oba dva atomy kyslíku. Kofaktorem mohou být hemově i nehemově vázané ionty železa [10,11].

Peroxidasy využívají pro oxidaci xenobiotik nebo endogenních látek současnou redukci peroxidu vodíku. Vyznačují se širokou substrátovou specifitou a jako prosthetická skupina se tu nachází hemově vázané železo [12].

Redukční reakce nenabývají takového významu jako reakce oxidační, ale přesto se podílí na metabolismu mnoha látek mj. nitro-aromátů, azobarviv, ketonů, disulfidů. Zástupci této skupiny enzymů jsou např. NADPH:cytochrom P450 reduktasa, DT-diaforasa, xanthinoxidasa [1].

Mezi nejvýznamnější hydrolytické enzymy patří karboxylesterasy. Štěpí již přítomné funkční skupiny (estery nebo amidy) za vzniku karboxylových kyselin a příslušných alkoholů, resp. aminů [13].

1.1.2 II. fáze biotransformace

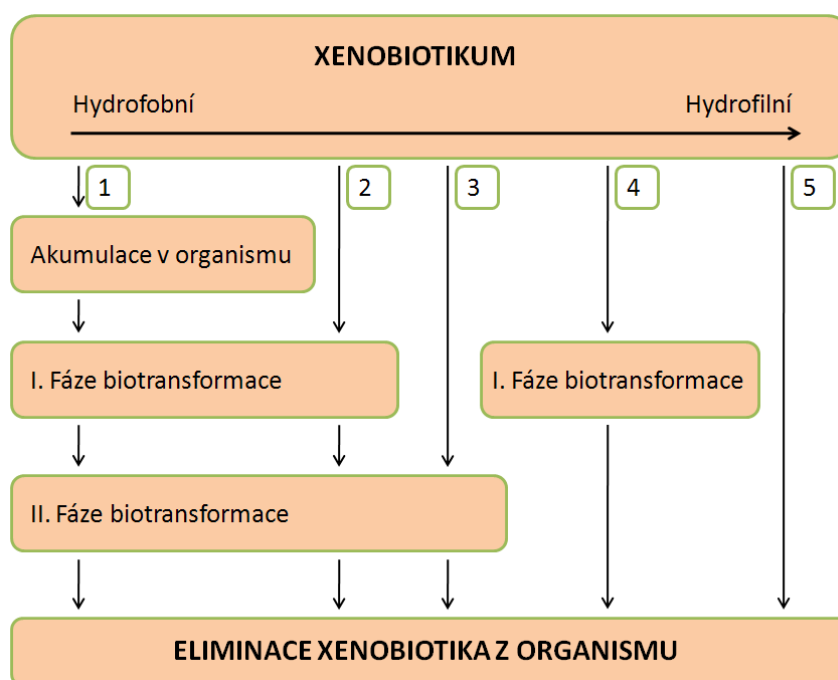
Ve druhé fázi biotransformace reaguje polární endogenní substrát s funkční skupinou xenobiotika, která je buď přítomna nebo byla zavedena v první fázi. Mezi nejdůležitější reakce patří konjugace s kyselinou glukuronovou, aktivním sulfátem, acetátem, glutathionem nebo s aminokyselinami (glycin, taurin, glutamová kyselina). Výsledkem je markantní nárůst polariry a z toho vyplývající preference eliminace z organismu [7].

Největší procento reakcí druhé fáze je katalyzováno UDP-glukuronosyltransferasou, kde donorem glukuronátu je UDP-glukuronová kyselina. Vzniklý konjugovaný metabolit může být poté vyloučen močí nebo žlučí [14]. Při vylučování žlučí mohou nastat komplikace v případě, že je metabolit dobrým substrátem β -glukuronidasy, která je hojně přítomna v mikroflóře GIT. Dochází k rozštěpení konjugátu a zpětné reabsorpci xenobiotika. Uvedený jev, označovaný jako enterohepatalní cirkulace, může vést až k vážnému poškození jater [15].

Další významnou reakcí je konjugace s glutathionem. Je katalyzována glutathion-S-transferasou a zabezpečuje detoxikaci molekul, které obsahují ve své struktuře elektrofilní centra. Ty se mohou vázat na přítomné nukleofily, což jsou proteiny nebo nukleové kyseliny a způsobit tak vážné poškození buňky nebo genetického materiálu. Glutathionové konjugáty mohou být vyloučeny v nezměněné podobě žlučí anebo ve formě merkapturových kyselin močí. Vznik merkapturových kyselin zahrnuje postupné odštěpení

γ -glutamylvého a glycylového zbytku s následnou acetylací za vzniku N-acetylcysteinového konjugátu [16].

Obecně neplatí, že všechna xenobiotika podstupují první i druhou fázi biotransformace. Jako příklad mohou sloužit známá analgetika morfin a kodein. Výsledným produktem metabolické přeměny obou látek je morfin-3-glukuronid, avšak morfin samotný nevstupuje do reakcí první fáze, ale je přímo konjugován s glukuronovou kyselinou. Kodein musí být nejprve demethylován pomocí cytochromu P450 a až pak je schopen následné konjugační reakce s kyselinou glukuronovou [17,18]. Některé hydrofilnější látky pak mohou být před vyloučením metabolizovány pouze enzymy první fáze, anebo v případě inertních hydrofobních xenobiotik může docházet i k jejich akumulaci v tukové tkáni (obr. 1).



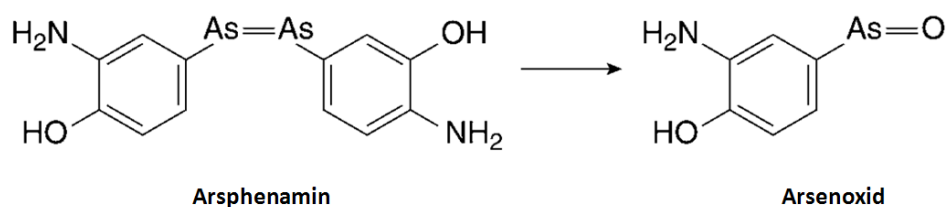
Obr. 1 Osud cizorodých látek v organismu

V závislosti na povaze a typu xenobiotika může při jeho eliminaci probíhat výlučně první fáze (4), druhá fáze (3), nebo obě (2). Některé hydrofilní látky se metabolických proměn neúčastní a mohou být vyloučeny přímo (5). Hydrofobní inertní látky mají tendenci se akumulovat v tukové tkáni a metabolizovat se velmi pomalu (1). Upraveno dle [14].

1.2 Bioaktivace a toxicita cizorodých látek

Kromě detoxikace se biotransformační enzymy podílejí i na vzniku biologicky aktivnějších derivátů. To je případ velké skupiny látek exogenního původu – léčiv. Pro

vyvolání žádaného terapeutického účinku musí být molekula léčiva ve své „aktivní formě“, čili ve stavu, ve kterém je schopna interagovat s cílovým enzymem nebo receptorem. Tato forma častokrát vzniká až v organismu z parentální molekuly léčiva. Historicky prvním široce užívaným lékem byl Salvarsan (Arsphenamin), který se používal na léčbu sifilitidy. Při testech *in vivo* byl účinný v léčbě infikovaných králíků, ale v podmínkách *in vitro* neměl na bakteriální kolonie významnější vliv [19]. Později se zjistilo, že ne Salvarsan, ale až jeho oxidační produkt, arsenoxid, je tou skutečně účinnou formou (obr. 2) [20–22]. Pro požadovaný účinek tedy muselo dojít k transformaci neaktivní prekurzorové molekuly na terapeuticky účinný metabolit. Tento děj se označuje jako bioaktivace [23]. Podobně jsou metabolizována i mnohá další léčiva např. terfenadine, klofibrát, pronotosil [24].



Obr. 2 *Tvorba arsenoxidu z arsphenaminu*

Arsenoxid vzniká v organismu jako oxidační produkt metabolismu arsphenaminu [25].

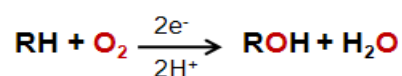
Aktivovat se však mohou i jiné cizorodé látky a to způsobem, kdy z původně netoxického xenobiotika (protoxikant, prokarcinogen) vzniká vysoce reaktivní metabolit. Ten, když není dostatečně rychle deaktivován (např. konjugačními reakcemi), se může kovalentně vázat na proteiny či DNA a vyvolat tak toxické, mutagenní nebo karcinogenní efekty. Do skupiny takto aktivovaných xenobiotik patří např. polycyklické aromatické uhlovodíky, aflatoxiny, aromatické aminy aj. [5,26].

Bioaktivace v pozitivním i negativním slova smyslu se mohou účastnit enzymy první i druhé fáze biotransformace. Z hlediska zastoupení jednotlivých enzymů a množství katalyzovaných reakcí jsou nejvýznamnější cytochromy P450, které jsou součástí systému oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí.

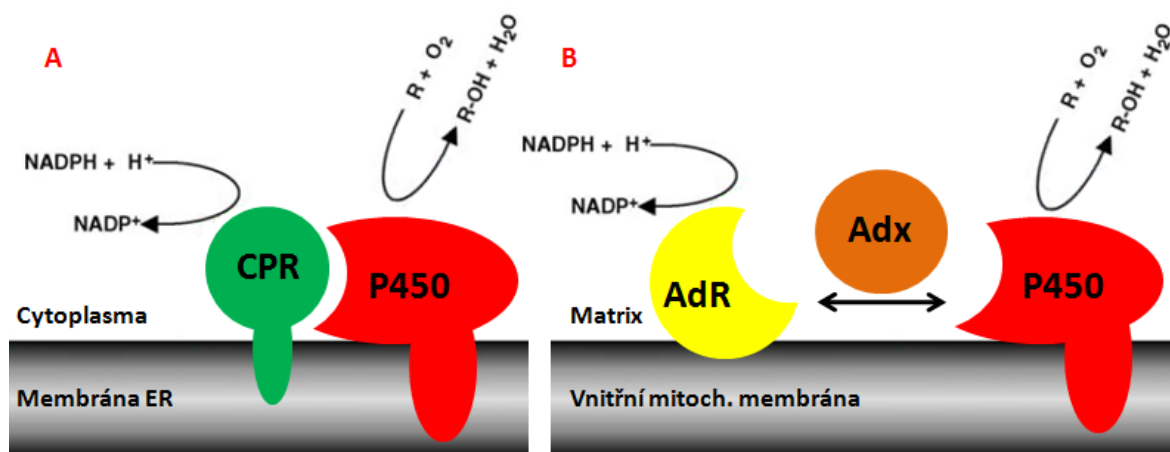
1.3 Systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí

V eukaryotické buňce jsou cytochromy P450 lokalizovány zejména na vnější straně membrány hladkého i drsného endoplasmatického retikula a na vnitřní membráně mitochondrií. Pro svou fyziologickou funkci vyžadují ještě přítomnost redoxního partnera.

V případě mitochondriálních cytochromů P450 je to FeS protein adrenodoxin, redukováný NADPH:adrenodoxin reduktasou (obr. 3B) [27]. Cytochromy vázané na endoplasmatické retikulum využívají flavinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasu (obr. 3A). Tyto složky spolu s fosfolipidovou dvouvrstvou [28] vytvářejí tzv. systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí, označovaný jako MFO systém (z angl. mixed function oxidases). Typickou reakcí katalyzovanou MFO systémem je monooxygenace, kdy s pomocí elektronů získaných z NADPH dochází k aktivaci molekuly kyslíku a následné oxygenaci substrátu (RH) za vzniku hydroxylovaného produktu (ROH). Druhý atom kyslíku je redukován na vodu [9,29]. Celou reakci můžeme znázornit následovně:



MFO systém přítomný v membráně mitochondrií metabolizuje hlavně endogenní substráty, např. steroidní látky, vitamíny, žlučové kyseliny [30]. Systém endoplasmatického retikula, též označovaný jako mikrosomální monooxygenasový systém, preferuje látky cizorodé povahy a účastní se reakcí první fáze biotransformace [31]. Mikrosomální monooxygenasový systém může využívat i další složku a to cytochrom b_5 s příslušnou NADH:cytochrom b_5 reduktasou [32].



Obr. 3 Lokalizace MFO systému v eukaryotické buňce

A Mikrosomální MFO systém je integrovaný do membrány endoplasmatického retikula a přenáší elektrony z NADPH na NADPH:cytochrom P450 reduktasu (CPR), která je zodpovědná za redukcí cytochromu P450 (P450).

B V mitochondriálním MFO systému jsou elektrony z NADPH přenášeny pomocí adrenodoxin reduktasy (AdR) na adrenodoxin (Adx), který následně redukuje cytochrom P450. Upraveno dle [33].

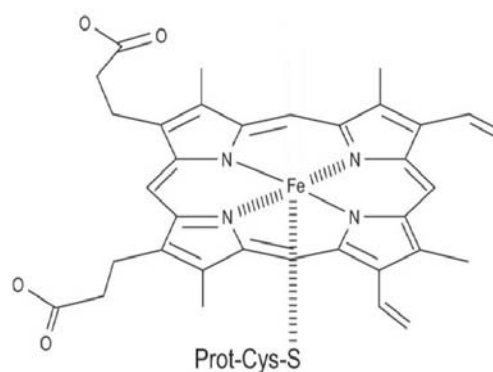
1.4 Cytochromy P450

Pojmem cytochromy P450 se označuje velká rodina hemových proteinů vyskytujících se od archaebakterií přes prokaryotické až po vyšší organismy. Nalezeny byly dokonce i u virů [4]. Jedná se o velmi staré enzymy, které se vyvíjely cestou divergentní evoluce z předchůdce, jehož stáří se odhaduje až na dvě miliardy let [34]. Vznik tzv. detoxikačních cytochromů P450 se datuje do období před 0,9 mld. let, kdy se tato skupina oddělila od cytochromů metabolizujících endogenní látky [35]. Pro následnou expanzi detoxikačních cytochromů P450 bylo charakteristické období před asi 400 miliony lety označované jako „chemická válka“ mezi rostlinnou a živočišnou říší, ve které se živočichové snažili vypořádat s přítomností rostlinných fytotoxinů v přijímané potravě [36]. V průběhu těchto period si eukaryotické organismy vytvořili širokou základnu cytochromů P450, v současnosti čítající několik tisíc členů.

Cytochromy P450 byly poprvé objeveny v roce 1958 jako mikrosomální pigmenty, které v redukované formě v komplexu s oxidem uhelnatým vykazují absorpční maximum při 450 nm [37,38]. Později byly tyto pigmenty identifikovány jako hemoproteinové enzymy [39].

1.4.1 Struktura mikrosomálních cytochromů P450

Mikrosomální cytochromy P450 jsou proteiny asociované s fosfolipidovou dvouvrstvou endoplasmatického retikula a s molekulovou hmotností kolem 50 000 Da [41,42]. Pro zakotvení v membráně jim slouží úsek N-terminální hydrofobní domény o velikosti 20 až 25 aminokyselin [36]. C-terminální hydrofilní doména je orientovaná směrem do cytosolu a je zodpovědná za katalytickou funkci enzymu. Cytochromy P450 patří mezi hemoproteiny typu b. Obsahují tedy ve své struktuře kromě apoproteinu ještě neproteinovou složku, Fe-protoporfyrin IX (hem b) [43]. Atom železa je v porfyrinovém skeletu koordinován pomocí dusíků tetrapyrrolového jádra a thiolátové síry cysteinu, která je



Obr. 4 Struktura hemu b cytochromů P450

Iont železa je ve struktuře hemu b koordinován pomocí dusíků pyrolových jader a thiolátové síry cysteinu [40].

zároveň pátým ligandem (obr. 4, str. 17). Vazba Fe-S je neobvykle silná, s velkou elektronovou hustotou na atomu železa [40]. Právě tato výjimečná vlastnost je důležitá pro katalytickou aktivitu cytochromů P450, kdy dochází k aktivaci molekuly kyslíku. Zároveň je zodpovědná za charakteristické spektrum redukováného cytochromu P450 v komplexu s oxidem uhelnatým s maximem absorpce při 450 nm. Pro uvedené vlastnosti byly cytochromy P450 v minulosti označovány jako hem-thiolátové proteiny [44]. Při poškození Fe-S vazby, např. při denaturaci proteinu, přechází cytochrom P450 v katalyticky neaktivní formu označovanou jako P420 [45].

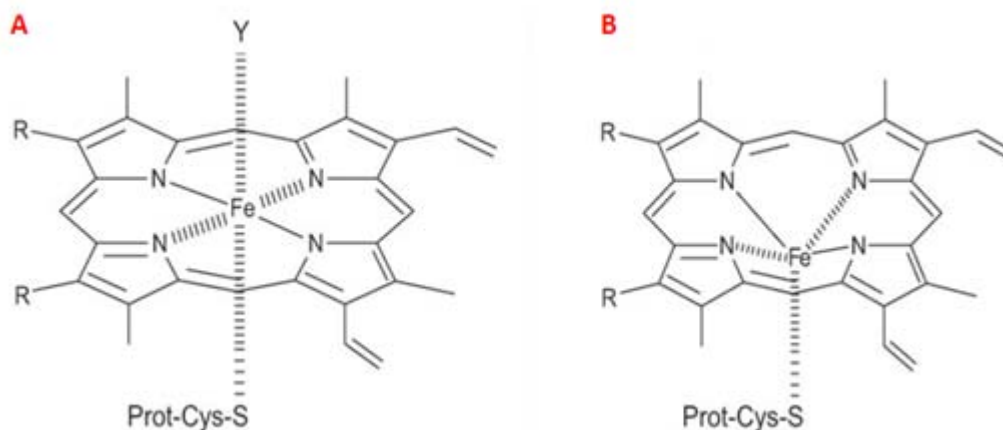
Z hlediska strukturní homologie se jedná o různorodé proteiny obsahující však relativně konzervované oblasti v okolí vazby hemu. Mezi nejvíce variabilní části patří N-terminální kotvící doména a oblasti pro rozpoznávání substrátu a jeho vazbu [46].

1.4.2 Katalytický mechanismus cytochromů P450

Cytochromy P450 katalyzují regio- a stereospecifické hydroxylace široké škály substrátů. Katalytický cyklus je díky konzervované hem-thiolátové oblasti podobný pro všechny cytochromy P450 (obr. 6, str. 21) a probíhá za spoluúčasti NADPH:cytochrom P450 reduktasy [47]. Je založen na heterolytickém štěpení molekuly kyslíku za současného vzniku hydroxylovaného substrátu a molekuly vody [9,48].

Spinové formy cytochromu P450

Atom železa porfyrinového skeletu cytochromu P450 se vyskytuje především v oxidované ferri formě (Fe^{3+}) a může existovat ve dvou stavech lišících se celkovým spinem elektronů v d-orbitalech. V nízkospinovém stavu (spin 1/2) je ion železa hexakoordinován a leží v rovině porfyrinového skeletu (obr. 5A, str. 19). V tomto stavu interaguje ještě s dalším ligandem, např. s molekulou vody, hydroxylovou nebo karboxylovou skupinou postranních řetězců aminokyselin. Vzniklý komplex vykazuje maximum absorpce přibližně od 416 do 419 nm. Ve vysokospinovém stavu (spin 5/2) je ion železa pentakoordinován, čili jedno koordinační místo je volné nebo obsazené slabým ligandem (obr. 5B, str. 19). Atom železa leží mimo rovinu porfyrinového skeletu a absorpční maximum se pohybuje od 390 do 416 nm [40].



Obr. 5 Spinové stavy Fe^{3+} atomu železa

A Nízkospinový stav (spin 1/2), ve kterém je atom železa hexakoordinován. Y označuje šestý ligand (H_2O , $-OH$ skupina aminokyseliny), absorpční maximum 416 – 419 nm, redoxní potenciál -360 až -300 mV.

B Vysokospinový stav (spin 5/2), atom železa pentakoordinován, absorpční maximum 390 – 416 nm, redoxní potenciál -170 mV [40].

Oba spinové stavy existují za klidových podmínek v rovnováze. Když se do aktivního místa naváže substrát, který není ligandem atomu železa, dochází k vytlačení šestého ligandu (nejčastěji molekuly vody) a k přechodu nízkospinového stavu na vysokospinový. Tato změna se projeví posunem absorpčního maxima ze 419 na 390 nm a nárůstem redoxního potenciálu z hodnoty přibližně -300 mV na asi -170 mV, což usnadňuje i následnou redukci [49].

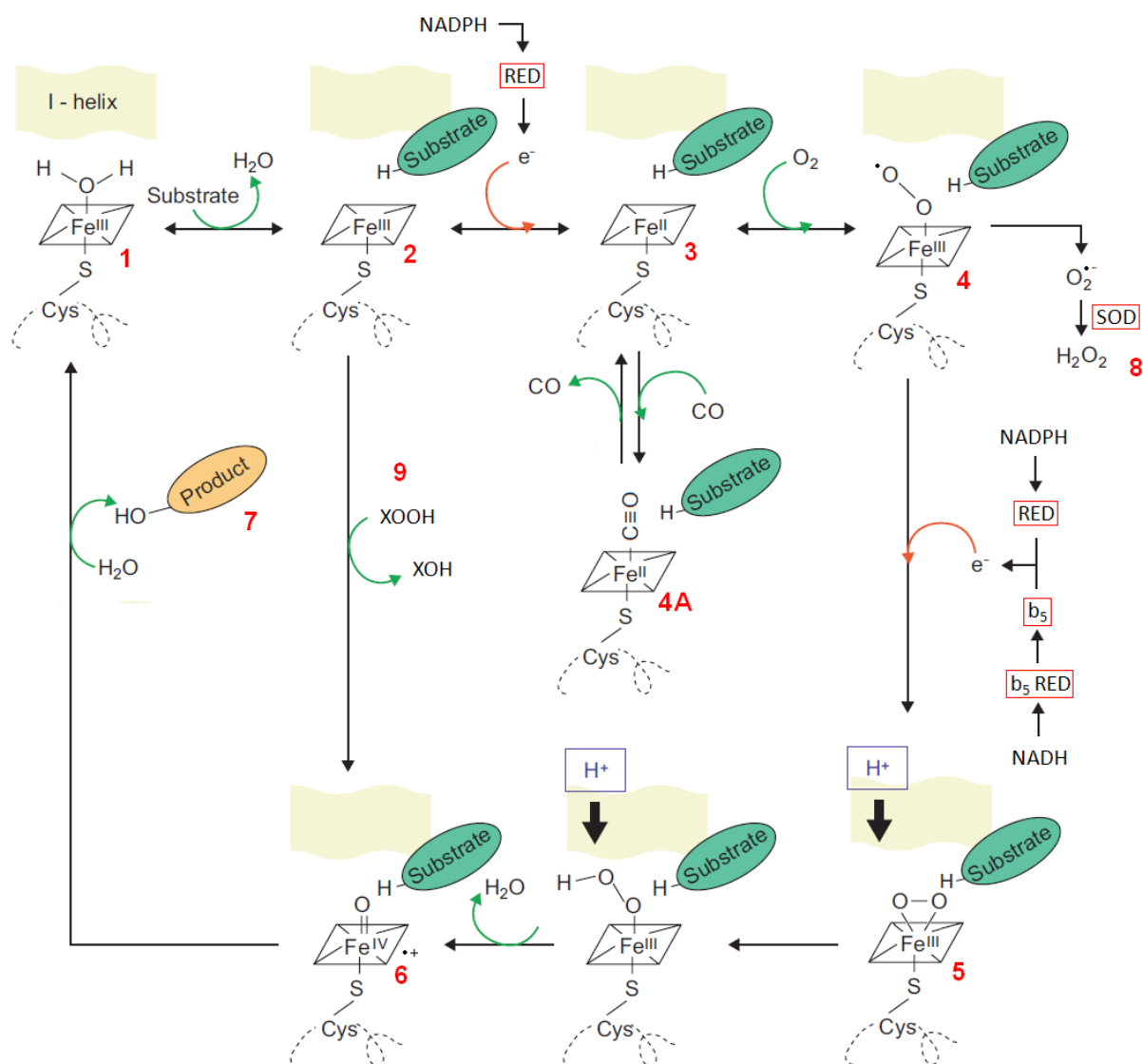
Mechanismus monooxygenace

- V klidovém stavu na začátku cyklu (obr. 6, str. 21) je atom železa ve ferri formě (Fe^{3+}) a hexakoordinován (nízkospinový stav) (1).
- V prvním kroku dochází k vazbě substrátu do aktivního místa proteinu a k vytlačení šestého ligandu, v tomto případě molekuly vody. Hexakoordinovaný atom železa přechází na pentakoordinovaný, vysokospinový stav (2).
- Nárůstem redoxního potenciálu celého komplexu a změnou konformace proteinu je umožněna redukce NADPH:cytochrom P450 reduktasou (RED) za vzniku ferro formy (Fe^{2+}) atomu železa (3). V tomto stavu se může na hem vázat molekula kyslíku nebo i jiný ligand, např. oxid uhelnatý (4A), který však reakci inhibuje.
- V případě, že se naváže molekula kyslíku, vzniká ternární ferri-superoxidový komplex a železo je opět hexakoordinované (nízkospinový stav) (4).

- Komplex je znovu redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou a dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (5). V závislosti na typu cytochromu P450 se může druhé redukce účastnit i jiný systém, kdy jsou elektrony z NADH předávány na cytochrom P450 za pomoci NADH:cytochrom b_5 reduktasy (b_5 RED) a cytochromu b_5 (b_5). Po druhé redukci je cytochrom P450 v komplexu s molekulou kyslíku plně aktivovanou formou umožňující štěpení vazby O-O.
- Z jednoho atomu kyslíku se přijetím dvou protonů vytváří molekula vody, druhý zůstává vázán na atomu železa za vzniku ferrioxenového komplexu (6). Tento kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na atom železa. Konečným krokem je rekombinace radikálů za vzniku hydroxylovaného produktu (7) a nativní formy cytochromu P450 (1) [1,46,50].

V případě, že druhý elektron není doručen dostatečně rychle, se ternární ferri-superoxidový komplex (4) rozpadá a uvolňuje se superoxidový anionradikál. Tato vlastnost se označuje jako oxidasová funkce cytochromů P450 (O_2 akceptorem elektronů) a může ji vyvolat např. substrát, který se slabě váže do aktivního místa, čímž destabilizuje ternární ferri-superoxidový komplex. Superoxidový anionradikál je následně superoxidodismutasou (SOD) přeměněn na peroxid vodíku (8) [1,40].

Pro oxygenaci mohou cytochromy P450 využívat i peroxidy nebo peroxokyseliny (9). V tomto případě je zdrojem kyslíku i elektronů samotný peroxid. Tato schopnost se označuje jako peroxygenasová aktivita cytochromů P450 [50].



Obr. 6 Mechanismus monooxygenasové reakce

RED = NADPH:cytochrom P450 reduktasa, b₅ = cytochrom b₅, b₅RED = NADH:cytochrom b₅ reduktasa, SOD = superoxididismutasa, I-helix = oblast, která se účastní přenosu protonů. Detailní popis celého cyklu je v předchozím textu. Upraveno dle [46].

1.4.3 Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy P450 společně tvoří tzv. „super-rodinu“ proteinů, ve které se řadí jednotlivé členy do rodin nebo podrodin na základě aminokyselinové sekvenční homologie [51]. Proteiny jedné rodiny mají primární strukturu identickou z více než 40%. Proteiny stejné podrodiny z více než 55%. Příslušnost k „super-rodině“ cytochromů P450 se označuje zkratkou CYP (CYtochrome P450). Rodiny jsou značeny arabskými číslicemi, podrodiny velkými písmeny a individuální enzymy opět arabským číslem. Cytochrom

P450, který má označení CYP2B4, pak patří do rodiny 2, podrodiny B a jeho vlastní označení je charakterizováno číslem 4 [52,53].

1.4.4 Funkce cytochromů P450

Cytochromy P450 se účastní mnoha metabolických a biosynthetických procesů. Lidský genom obsahuje 57 genů kódujících různé isoformy cytochromů P450. Mezi jejich substráty patří látky endogenní (mastné kyseliny, vitamíny, eikosanoidy) i exogenní (léčiva, karcinogenní a toxické látky) [54]. Rozdělení cytochromů P450 podle povahy metabolizovaného substrátu zobrazuje tab. 1.

Tab. 1 Rozdělení lidských isoform cytochromů P450 podle druhu metabolizovaného substrátu

Převzato z [54].

Steroly	Xenobiotika	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitamíny	Neznámý substrát
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

Cytochromy P450 patřící do skupiny enzymů metabolizujících endogenní látky jsou charakteristické užší substrátovou specifitou a výrazně nezasahují do metabolismu látek cizorodých [55]. Jsou vázány v mitochondriální membráně nebo v membráně ER orgánů, jako jsou ledviny, játra, kůra nadledvin, pohlavní žlázy. Účastní se metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin (CYP7A1, 7B1) [56], steroidních hormonů (CYP11A1, 17A1) [57], prostaglandinů (CYP5A1, 8A1) [58], vitamínu A (CYP26A1, 26B1) [59], vitamínu D (CYP27B1, 24A1) [60]. Mnohé z těchto enzymů jsou kritické pro udržení

homeostázy vnitřního prostředí a jejich deficience nebo změny katalytických aktivit mohou být příčinou závažných onemocnění (poruchy srážení krve, adrenální hyperplazie) [56].

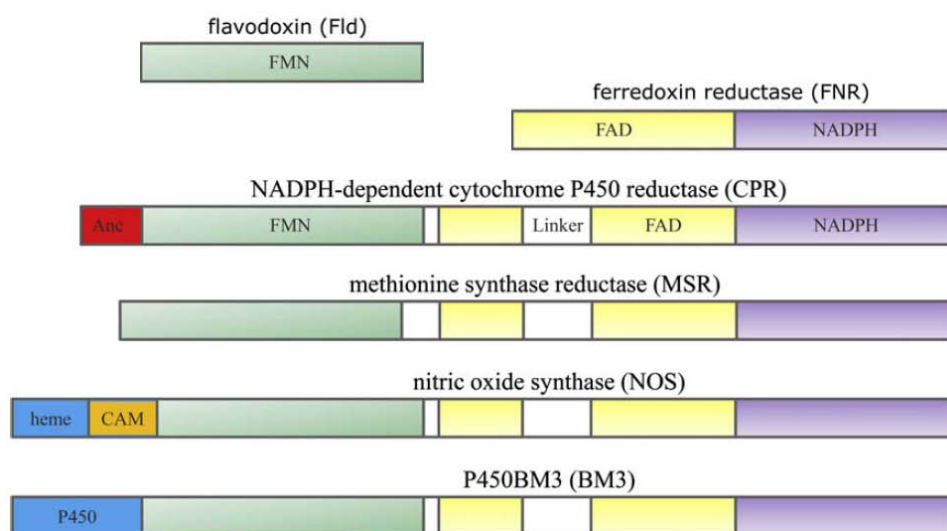
Největší pozornost je nicméně věnována cytochromům P450, které metabolizují různé cizorodé látky, environmentální chemikálie, polutanty a léčiva. Patří sem členové rodin CYP1, 2, 3 vyznačující se širokou a často se překrývající substrátovou specifitou. Účastní se eliminace převážně většiny xenobiotik z organismu, ale na druhou stranu jsou zodpovědné i za aktivaci protoxikantů a prokarcinogenů (nitrosaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky) [61]. Vyskytují se prakticky ve všech orgánech lidského těla, s nejvyšší koncentrací v játrech [62]. Jejich katalytická aktivita a zastoupení v jednotlivých tkáních není absolutní, ale závisí např. na věku, pohlaví, životosprávě, působení podávaných léčiv, přítomnosti induktorů, inhibitorů nebo na genetickém polymorfismu [31]. Genetický polymorfismus je definován jako výskyt určité varianty alely v populaci, který přesahuje 1%. V případě cytochromů P450 zahrnuje vrozené modifikace v regulační nebo kódující části genu, které mohou mít za následek změny v expresi, preferenci substrátu či katalytické aktivitě vzniklé formy cytochromu P450 [63,64]. Mezi typicky polymorfní enzymy patří CYP2D6, 2B6, 1B1, 2A6 [64]. Vzhledem k tomu, že se tyto isoformy podílí kromě různých škodlivin i na biotransformaci farmak, jsou častou příčinou velkých interindividuálních rozdílů v citlivosti na potencionálně toxické látky, resp. míře odpovědi na podávaná léčiva [65]. Na metabolismu léčiv se podílí především isoformy CYP3A4, 2D6, 2C9, 2C19 a 1A2. Společně metabolizují až 90% známých farmak [54].

1.5 NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR)

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) je 78 kDa velký protein, který byl poprvé izolován v roce 1940 z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pod jménem NADPH dependentní cytochrom c reduktasa [66]. Její role reduktasy cytochromů P450 byla objevena až později, v roce 1968 [67]. Kromě této funkce se CPR v buňce účastní i jiných fyziologických procesů jako je katabolismus hemu (redukuje hem oxygenasu) [68], desaturace a elongace mastných kyselin (redukuje cytochrom b_5) [69] nebo biosynthesa sterolů [70].

CPR patří do relativně malé rodiny diflavinových reduktas, kam řadíme např. savčí enzymy NO synthasy (NOS), reduktasu methionin synthasy (MSR) nebo bakteriální cytochrom P450 BM3. Proteiny této rodiny obsahují dvě domény samostatně vážící

flavinové kofaktory FAD a FMN, které se účastní přenosu redukčních ekvivalentů z dvouelektronového donoru NADPH na příslušné jedno-elektronové akceptory [71]. Jsou považovány za enzymy, které vznikly fúzí genů pro ferredoxin reduktasu (FAD protein) a bakteriální flavodoxin (FMN protein) [72]. Všichni členové rodiny diflavinových reduktas jsou strukturálně příbuzní, avšak každý se vyznačuje určitou odlišností. CPR je charakteristická membránovou doménou, MSR má delší interdoménový úsek a je to rozpustný protein [73]. Ke společné flavoproteinové doméně mohou být připojené i další specifické oblasti. Cytochrom P450 BM3 obsahuje cytochrom P450, NO synthasa doménu s hemem koordinovaným thiolátovou sírou a kalmodulin vážící doménu, která reguluje aktivitu tohoto proteinu (obr. 7) [74].



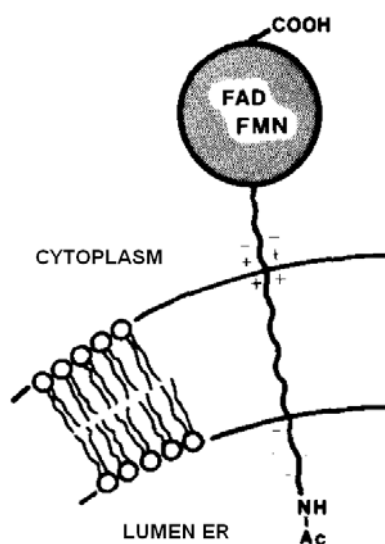
Obr. 7 Schematické znázornění struktury některých zástupců rodiny diflavinových reduktas

Diflavinové reduktasy vznikly fúzí genů pro ferredoxin reduktasu (FNR) a flavodoxin (Fld). N-konec proteinů tvoří flavodoxinová (FMN) a C-konec ferredoxinová FAD/NADPH doména. „Linker“ značí spojovací doménu odpovědnou za správné uspořádání obou flavinových domén. CPR obsahuje navíc N-koncovou hydrofobní kotvu (ANC), MSR delší interdoménovou sekvenci, BM3 cytochrom P450, NOS hem vázající doménu (heme) a kalmodulin vazebnou doménu (CAM). Upraveno dle [73].

1.5.1 Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy

CPR je v rámci fylogeneze velmi konzervovaný enzym, což poukazuje na její důležitost v průběhu evoluce. Je tvořena dvěma funkčními doménami. C-terminální katalytická doména (72 kDa), orientovaná do cytosolu, zabezpečuje vazbu kofaktorů (FAD, FMN, NADPH) a přenos elektronů na příslušný akceptorový protein [75].

N-terminální hydrofobní doména (6 kDa) slouží pro zakotvení proteinu v membráně endoplasmatického retikula a je důležitá pro interakci s cytochromem P450 [76]. N-konec zahrnuje hydrofilní (Met1 – Asp27) a hydrofobní (Met28 – Phe44) oblast, která je následována seskupením šesti nabitých aminokyselinových zbytků (Arg45 – Glu50). Hydrofilní část N-konce směřuje do lumen endoplasmatického retikula, zatímco hydrofobní α -helix se účastní interakce s membránovými fosfolipidy (obr. 8) [77,78].



Obr. 8 Znárodnění topologie CPR v membráně endoplasmatického retikula

Hydrofilní část N-konce CPR (Met1 – Asp27) směřuje do lumen endoplasmatického retikula, hydrofobní část (Met28 – Phe44) zabezpečuje interakci s membránou. C-terminální katalytická doména vážící FAD a FMN je orientovaná směrem do cytosolu [78].

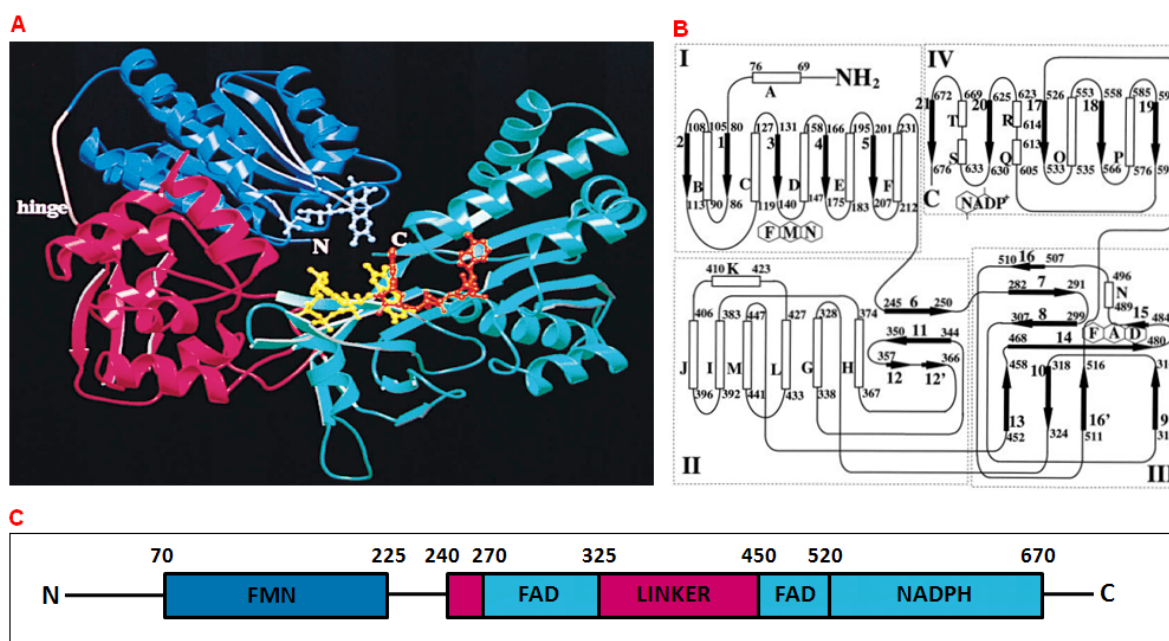
Působením některých proteolytických enzymů, jako např. trypsinu nebo steapsinu, může být membránově vázaná CPR štěpena za vzniku solubilní 72 kDa formy. Vzniklá CPR bez N-terminální domény dokáže redukovat cytochrom c, ale není schopna interagovat s cytochromem P450 při monooxygenasové reakci [78,79].

V roce 1997 uveřejnili Wang a kol. první třidimenzionální strukturu katalytické domény CPR (obr. 9, str. 26), ve které jsou patrné tři strukturální oblasti:

- FMN vazebná doména
- spojovací doména
- FAD/NADPH vazebná doména [75]

FMN vazebná doména má velikost přibližně 170 AK a je homologní k bakteriálnímu flavodoxinu. Proteinový řetězec obsahuje β - α motiv, kde se za sebou střídají α -helixy a β -skládané listy. Jádro FMN domény tvoří seskupení pěti paralelních

β -listů, kolem kterých jsou po obou stranách uspořádané příslušné α -helixy [80]. V této struktuře jsou kladné a záporné aminokyseliny rozděleny tak, že FMN doména vytváří dipól s negativním nábojem rozprostřeným v oblasti vazby FMN a elektronového akceptoru. Tato skutečnost hraje důležitou roli především v interakci CPR s cytochromy P450 [80]. Samotný isoaloxazinový kruh FMN je vázán v oblasti na C-konci β -listů pomocí tří aromatických aminokyselin Tyr140, Tyr178, Phe181 [75,81].



Obr. 9 Struktura potkaní C-terminální katalytické domény CPR

A 3D zobrazení struktury C-terminální domény CPR. FMN vazebná doména s navázaným FMN (bíle) je zobrazena tmavě modře, spojovací doména červeně, FAD a NADPH vazebná doména světle modře (FAD-žlutě, NADPH oranžově). „Hinge“ (bíle) reprezentuje vysoce flexibilní úsek mezi FMN a spojovací doménou.

B Topologie jednotlivých strukturních domén CPR zobrazující i oblasti zodpovědné za vazbu kofaktorů. α -helixy jsou reprezentovány obdélníky (značené písmeny), β -skládané listy černými šipkami (značené čísly), neuspořádané struktury plnými čarami. Menší čísla značí pořadí AK zbytků od N po C konec. I – FMN vazebná doména, II – spojovací doména, III – FAD vazebná doména, IV – NADPH vazebná doména.

C Schematická reprezentace struktury CPR v rámci polyproteinového řetězce. Čísla značí pořadí AK zbytků. Upraveno dle [75].

Spojovací doména s vysokým podílem α -helixů hraje důležitou roli ve vzájemné orientaci flavinových kofaktorů [73].

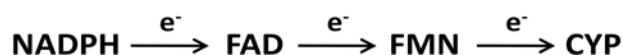
Mezi FMN a spojovací doménou se nachází 13 aminokyselin dlouhý (AK 232 – 244), vysoce flexibilní úsek (označ. „hinge“, obr. 9A). Uvedený úsek je důležitý pro mobilitu FMN vazebné domény vůči zbytku molekuly během přenosu elektronů [82].

Doména na C-konci proteinu, sekvenčně připomínající ferredoxin reduktasu, váže kofaktor FAD a zprostředkovává interakci proteinu s NADPH [75]. FAD vazebná část je tvořena seskupením antiparalelních β -listů, které vytvářejí zploštěný β -barel [83]. Kofaktor FAD je vázán pomocí peptidových fragmentů ⁴⁵⁵YYSIAS a ⁴⁷¹ICAVAV na hranici FAD a NADPH vazebné domény [75]. NADPH se váže do oblasti tvořené paralelními β -listy, kolem kterých jsou uspořádané α -helixy. Nekovalentní vazba NADPH je zabezpečena elektrostatickými interakcemi mezi záporně nabitou fosfo-AMP částí a pozitivně nabitými aminokyselinami na povrchu proteinu. Po navázání NADPH se nikotinamidový kruh nachází v blízkosti kofaktoru FAD, v oblasti vyznačující se přítomností aromatické aminokyseliny tryptofanu [71]. CPR preferuje NADPH s vysokou selektivitou (v porovnání s NADH), která je důsledkem interakce záporných nábojů 2'-fosfátové skupiny NADPH s bazickými aminokyselinami (arginin, lysin) v příslušných oblastech proteinu [83].

Celková architektura CPR dovoluje vazbu kofaktoru NADPH v blízkosti FAD a zároveň je isoaloxazinový kruh FAD v těsném kontaktu s FMN, čímž je zabezpečeny rychlý a přímý přenos elektronů z NADPH na FMN [71].

1.5.2 Mechanismus přenosu elektronů NADPH:cytochrom P450 reduktasou

Hlavní funkcí CPR je přenos redukčních ekvivalentů z dvou-elektronového donoru NADPH na jedno-elektronový akceptor za pomoci dvou flavinových kofaktorů FAD a FMN. Akceptorem elektronů je ve většině případů cytochrom P450 [71]. Dva redukční ekvivalenty z NADPH jsou transportovány ve formě hydridového iontu (H^-) na FAD. Redukovaný FAD pak přenáší jednotlivé elektrony na FMN, který následně redukuje hem příslušného cytochromu P450. Při katalytickém cyklu cytochromu P450 (viz kap. 1.4.2, str. 18) tedy CPR funguje jako dělič elektronového páru [76]. Celý proces můžeme znázornit následovně:

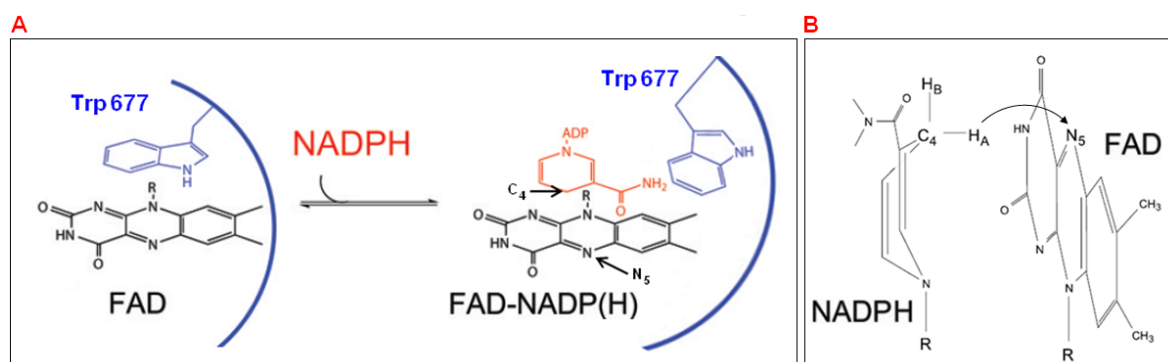


Přenos elektronů z NADPH na NADPH:cytochrom P450 reduktasu

Důležitou úlohu při vazbě NADPH a při přenosu hydridového iontu na FAD hraje aminokyselina Trp677 [84]. Trp677 je nezbytný i pro specifitu CPR vůči NADPH a následné uvolnění oxidovaného NADP^+ . Mutovaný protein, ve kterém je nahrazen Trp677

za Ala (W677A), je schopen vázat NADH s tisíckrát vyšší afinitou než původní protein. V tomto konkrétním případě navíc NADPH působí jako inhibitor mutantu W677A při NADH dependentní redukci cytochromu c. Oxidovaný kofaktor NADP^+ se uvolňuje mnohem pomaleji a zabraňuje tak vazbě NADH [85,86].

Ve stavu, kdy není NADPH navázán na protein, se indolový kruh Trp677 nachází v těsné blízkosti kofaktoru FAD a stericky stíní jeho isoaloxazinový kruh. Vazba NADPH indukuje v molekule CPR konformační změny mající za následek odstoupení indolového kruhu Trp677 a ustavení vhodného vzájemného uspořádání NADPH a FAD (obr. 10A) [48]. Na tomto procesu se podílejí i další aminokyseliny např. Ser457, Cys630, Asp675. Ser457 a Asp675 se účastní interakce s nikotinamidovou skupinou NADPH a spoluzodpovídají za její správnou orientaci. Cys630 podporuje hydridový transfer stabilizací karbokationtu vzniklého po odštěpení H^- . Hydridový ion je pak přenášen z C4 uhlíku NADPH na N5 dusík isoaloxazinového kruhu za vzniku FADH_2 (obr. 10B). Vzdálenost mezi C4 a N5 atomy je přibližně 3.5Å a umožňuje přímý přenos H^- , který není zprostředkován žádnou aminokyselinou [87].



Obr. 10 Přenos elektronů z NADPH na FAD

A Před navázáním NADPH se indolový kruh Trp677 nachází v těsné blízkosti kofaktoru FAD a stericky stíní jeho isoaloxazinový kruh. Vazba NADPH způsobí v molekule CPR konformační změny, mající za následek odstoupení indolového kruhu a ustavení vhodného vzájemného uspořádání NADPH a FAD.

B Detailní pohled na vzájemnou orientaci NADPH a FAD při přenosu elektronů. Hydridový ion je přenášen z C4 uhlíku nikotinamidového kruhu NADPH (vaničková konformace) na N5 dusík FAD. Upraveno dle [71,88].

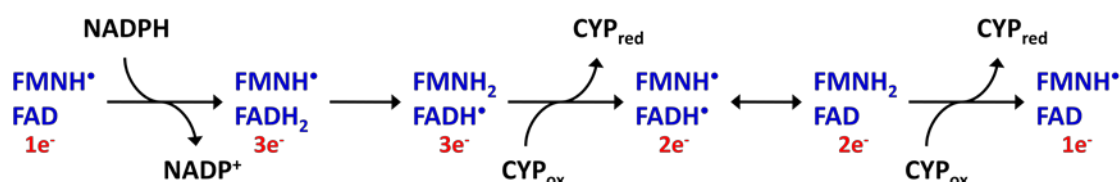
Přenos elektronů mezi FAD a FMN

Plně oxidovaná CPR (FAD/FMN) se po přijetí dvou elektronů od NADPH nachází ve stavu s redukováným FADH_2 (hydrochinon) a oxidovaným FMN (FADH_2/FMN). Z FADH_2 jsou postupně přenášeny elektrony na FMN za vzniku přechodné disemichinoidní

formy CPR ($\text{FADH}^\bullet/\text{FMNH}^\bullet$) a následně formy s redukováným FMNH_2 (FAD/FMNH_2). Není-li přítomen elektronový akceptor, může se enzym dostat po vazbě druhé molekuly NADPH a přenosu elektronů až do stavu s oběma redukovánými kofaktory $\text{FADH}_2/\text{FMNH}_2$ [89,90].

Přenos elektronů mezi flavinovými prosthetickými skupinami probíhá na základě rozdílných hodnot jejich redoxních potenciálů. Hnací silou je relativně vysoký redoxní potenciál páru $\text{FMN}/\text{FMNH}^\bullet$, který má hodnotu -66 mV (lidská CPR) [91,92].

Za fyziologických podmínek se savčí CPR vyskytuje ve formě tzv. „stabilního semichinonu“ ($\text{FAD}/\text{FMNH}^\bullet$) [76,93]. Po jeho redukci pomocí NADPH vzniká $3e^-$ forma $\text{FADH}_2/\text{FMNH}^\bullet$. Za jednoelektronovou redukci akceptoru (cytochromu P450) je pak zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH_2 (obr. 11) [92].



Obr. 11 Elektronový přenos mezi flaviny

Před redukcí se CPR nachází ve formě tzv. „stabilního semichinonu“ ($\text{FAD}/\text{FMNH}^\bullet$). Elektrony z NADPH jsou přenášeny na FAD za vzniku stavu $\text{FADH}_2/\text{FMNH}^\bullet$. Za redukci cytochromu P450 (CYP) je zodpovědný hydrochinon FMNH_2 . Upraveno dle [94].

Přenos elektronů na cytochrom P450

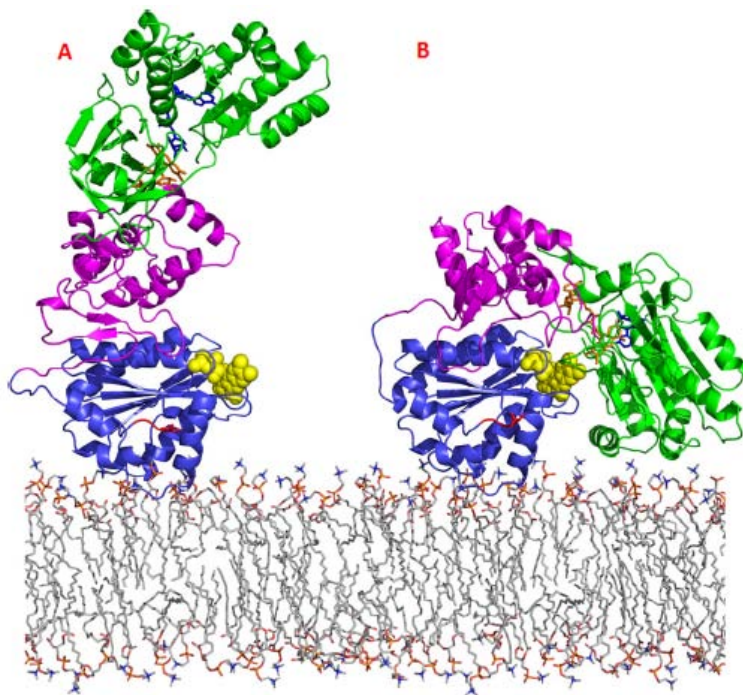
Ačkoli CPR vytváří s cytochromem P450 funkční komplex 1:1, v membránách mikrosomů je poměr cytochromů P450 a reduktasy 10:1 až 20:1 [95,96]. CPR musí tedy být schopna redukovat velký nadbytek a navíc i různé isoformy cytochromů P450. Aby takovýto systém pracoval efektivně, je potřeba, aby docházelo k rychlým asociacím a disociacím komplexů $\text{CYP}:\text{CPR}$ [97]. Jejich vzájemnou vazbu mohou dále ovlivňovat různé charakteristiky jako např. isoforma cytochromu P450, navázaný substrát nebo iontová síla roztoku [98,99].

Interakce mezi CPR a cytochromy P450 je založena v první řadě na elektrostatickém působení mezi záporně nabitou oblastí FMN vazebné domény a kladně nabitým povrchem cytochromu P450 [100,101]. FMN vazebná doména obsahuje dva klastry negativně nabitých aminokyselinových zbytků (Glu, Asp), které se významně podílejí na interakci s cytochromem P450. Záměna aminokyselin v těchto oblastech CPR

má výrazný vliv na intenzitu monooxygenasové reakce [80]. Pozitivně nabitě bazické aminokyseliny cytochromu P450 se nacházejí v místě, kde je hem vázán v blízkosti povrchu proteinu a účastní se interakcí s kyselými zbytky FMN domény [102]. Kromě elektrostatického působení sehrávají důležitou roli i hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (Val, Trp, Leu) v oblasti vzájemné vazby, nebo membránových domén obou enzymů [75,103]. Samotné elektrony pak přecházejí na hem cytochromu P450 z pyrimidinové strany isoaloxazinového kruhu FMN, která se nachází v blízkosti povrchu enzymu a je tak snadno přístupná [75].

1.5.3 Konformační změny CPR v průběhu přenosu elektronů na cytochrom P450

Krystalová struktura CPR, kterou publikovali Wang a kol. (obr. 9A, str. 26), je optimální pro FAD – FMN elektronový transfer, ale není kompatibilní s přenosem elektronů na cytochrom P450 [104]. V průběhu elektronového transferu CPR podstupuje velké strukturní změny a nachází se v rovnováze mezi dvěma konformačními stavy [105]. Tato rovnováha je závislá na redoxním stavu CPR a vazbě NADPH nebo NADP^+ . Vazbou kofaktoru NADPH dochází k preferenčnímu vzniku tzv. „kompaktního“ stavu (obr. 12B, str. 31), ve kterém mají oba flavinové kofaktory vhodnou vzájemnou orientaci a může dojít k interflavinovému přenosu elektronů. Vazba NADPH nebo NADP^+ zároveň urychluje redukci obou flavinů [106]. CPR v „otevřeném“ konformačním stavu (obr. 12A, str. 31) je schopna interagovat s cytochromem P450 a přenášet redukční ekvivalenty z FMN na hemovou prosthetickou skupinu [48]. Přejít CPR z kompaktního do otevřeného stavu je indukován redukcí flavinových kofaktorů [90]. Pro vzájemný pohyb obou flavinových domén je kritický vysoce flexibilní úsek (AK 232 – 244, obr. 9A, str. 26, označ. „hinge“), který propojuje FMN vazebnou doménu se zbytkem proteinu. Delece aminokyselin v této oblasti vede k výrazným strukturním změnám a vzniklý mutovaný protein není schopen interflavinového přenosu [82].



Obr. 12 Konformační stavy CPR v průběhu přenosu elektronů

A „Otevřený“ konformační stav s vhodně exponovaným kofaktorem FMN pro přenos elektronů na cytochrom P450.

B „Kompaktní“ konformační stav kompatibilní s interflavinovým transferem elektronů. FMN vazebná doména je zobrazena modře, spojovací doména fialově, FAD/NADPH doména zeleně. Kofaktory: FMN – žlutě, FAD – oranžově, NADPH – modře [105].

1.6 Heterologní exprese

Katalytická všestrannost a substrátová různorodost předurčují cytochromy P450 pro jejich využití v různých oblastech medicíny, toxikologie nebo farmaceutického průmyslu. Vzhledem k tomu, že se tyto enzymy podílí na biotransformaci mnohých xenobiotik, mají důležité postavení v toxikologickém výzkumu a při vývoji či testování nových léčiv [107]. Farmako-toxikologické vlastnosti xenobiotik se primárně ověřují *in vivo* na zvířatech nebo v *in vitro* systémech, sestávajících ze živočišných tkání (jaterní preparáty) nebo izolovaných enzymů. Výhodou *in vitro* analýz je jejich velká robustnost, ekonomická efektivnost a odpadají i etické problémy spojené s testy na živých zvířatech.

Vhodným zdrojem biologického materiálu pro *in vitro* experimenty jsou v současnosti rekombinantní proteiny získávané heterologní expresí v hostitelských buňkách. Metody molekulární biologie umožňují zaklonovat gen pro žádaný protein do vhodného expresního vektoru a následně jej produkovat v příslušných buněčných systémech. Jako expresní systémy lze využít bakterie, kvasinky, hmyzí či savčí buňky nebo transgenní rostliny [108,109].

1.6.1 Heterologní exprese enzymů MFO systému

Cytochromy P450 byly úspěšně exprimovány v bakteriích (*E. coli*) [110], kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*) [111], hmyzích i savčích buňkách [112–114]. Porovnání jednotlivých systémů zobrazuje tab. 2.

Tab. 2 Porovnání expresních systémů pro cytochromy P450.
Upraveno dle [115]

Charakteristiky	Expresní systém			
	Bakterie (<i>E.coli</i>)	Kvasinky	Hmyzí buňky	Savčí buňky
Kultivační čas	Hodiny až dny	Dni až týden	Dni až týden	Týdny
Stupeň exprese	Vysoký	Střední	Vysoký	Nízký až střední
Technické požadavky pro expresi	Nízké	Nízké	Střední	Vysoké
Finanční požadavky	Nízké	Nízké	Vysoké	Vysoké
Požadavek pro přidání ALA (δ -aminolevulová kyselina)	Ano	Ne	Většinou ano	Ne
Endogenní monooxygenasový systém	Ne	Ano	Ano	Ano
Požadavek na ko-expresi CPR s CYP	Ano	Ano	Ano	Většinou ne
Modifikace N-konce proteinu	Většinou potřebná	Není potřebná	Není potřebná	Není potřebná
Post-translační modifikace	Ne	Ano	Ano	Ano

Mezi výhody exprese v kvasinkách patří jednoduchá manipulace, časová a ekonomická nenáročnost a nízká konstitutivní produkce endogenních cytochromů P450 [116]. Dostatečného výtěžku stabilního enzymu lze dosáhnout bez potřeby modifikace N-konce [108]. Cytochromy P450, produkované v hmyzích buňkách infikovaných bakulovirem, se vyznačují velkým zastoupením enzymu v miligramu proteinů a vysokou katalytickou aktivitou na jednotku cytochromů P450. Na druhé straně je tento systém náročný na optimalizaci a přípravu bakulovirového expresního vektoru [117]. Savčí buňky poskytují nižší výtěžky nativního proteinu, ale většinou není potřebná ko-exprese s CPR. Nevýhodou je pracnost a finanční náročnost celého procesu [118]. Bakteriální expresní systémy (*E. coli*) jsou široce používány z důvodu celkové nenáročnosti a nízké ceny. Vysoké výtěžky aktivního proteinu lze dosáhnout v relativně krátkém čase, je však

většinou potřebná úprava N-terminální části aminokyselinové sekvence [119]. K dispozici je i široká škála expresních vektorů s různě silnými promotory (pCW, pET) [117]. Navíc *E. coli* neobsahuje endogenní cytochromy P450 [120]. Častým problémem je však přítomnost špatně sbalených rekombinantních proteinů v inkluzních tělískách. Tyto komplikace lze vyřešit ko-expresí s molekulárními chaperony (GroEL, Hsp40, Hsp70), které pomáhají sbalení exprimovaných proteinů [121] nebo snížením teploty exprese [122].

Pro potřeby *in vitro* experimentů musí být rekombinantní cytochromy P450 po izolaci z membrán rekonstituovány se svým redoxním partnerem (CPR, někdy i cytochrom b_5). Často se využívá i postupů, kdy jsou cytochromy P450 ko-exprimovány spolu s CPR. V tomto případě má optimální funkci již membránová frakce a není tedy potřebná izolace jednotlivých složek [123]. Ko-expresi CYP-CPR lze realizovat čtyřmi způsoby:

- exprese CYP-CPR jako jednoho fuzního proteinu [124]
- exprese CYP, CPR jako samostatných proteinů s použitím bi-cistronického expresního vektoru [125,126]
- exprese s použitím plasmidu obsahujícího dva nezávislé promotory pro každý gen [127]
- exprese s využitím samostatných nezávislých plasmidů pro každý protein [128]

Uvedenými postupy se podařilo ko-exprimovat lidskou CPR s různými isoformami lidských cytochromů P450, např. 1A1, 1A2, 2C9, 2D6, 3A4 [119]. Často se využívá i exprese potkaní CPR s lidskými cytochromy P450 [129,130].

1.6.2 Heterologní exprese potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy v *E. coli*

Ve funkci CPR, jako donora elektronů pro cytochromy P450, prakticky neexistují mezidruhové rozdíly. Znamená to, že CPR izolovaná z jater potkana je schopna přenášet elektrony i na lidské formy cytochromů P450 nebo na cytochrom b_5 [123]. Lidská a potkaní CPR jsou homologní z přibližně 94% a liší se především v N-terminální hydrofobní doméně [131].

První úspěšnou heterologní expresí potkaní CPR uskutečnili Porter a kol. v roce 1987. Pro produkci CPR byl použit expresní vektor pCQV2 nesoucí promotor z bakteriofágu λ a gen *cI857* pro represorový protein, který umožňuje teplotně dependentní indukci exprese. Konstruktem s kódující sekvencí pro CPR (pCQOR) byly transformovány

různé kmeny *E. coli*, mezi jinými i kmen C-1A poskytující za daných podmínek nejvyšší stupeň exprese. Zastoupení CPR v buněčných lyzátech bylo přibližně 0,1% z celkového množství proteinů. Purifikovaný enzym redukoval cytochrom c rychlostí $35 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů. Pro srovnání, CPR z jater potkana vykazovala aktivitu $50 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů. CYP1A1 v rekonstituovaném systému spolu s rekombinantní CPR přeměňoval benzo(a)pyren s poloviční rychlostí v porovnání s CPR z jater potkana. Uvedený výsledek byl způsoben vysokým zastoupením štěpené solubilní CPR (cca 90% z celkového množství CPR), která není schopná, na rozdíl od nativní membránové formy, interakce s cytochromy P450. Solubilní forma CPR vzniká působením proteolytických enzymů s trypsinovou aktivitou, které jsou přítomné v cytoplasmě bakterií [132]. Proteolyticky labilní místo se nachází mezi aminokyselinami Lys56 – Ile57 a výraznou měrou se podílí na nízkých výtěžcích nativního proteinu [78].

Problém proteolytické degradace vyřešili Shen a kol. zaklonováním genu pro potkaní CPR do expresně-sekrečního vektoru pIN-III-ompA3. Tento plasmid nese silný *lpp* promotor a DNA sekvenci kódující signální peptid (spOmpA) proteinu OmpA, který směřuje exprimovaný protein do periplasmatického prostoru. Vzniklý prekurzorový protein spOmpA-CPR je transportován přes cytoplasmatickou membránu do periplasmatického prostoru a štěpen peptidasou za vzniku nativní CPR, která zůstává vázána v membráně. Takto získaný protein byl schopný katalyzovat redukci cytochromu c rychlostí $51 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů, což je hodnota téměř identická s CPR izolovanou z jater potkana ($53 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů) [133].

Pro produkci velkého množství solubilní formy CPR, postrádající 57 aminokyselin N-konce, použili Hayashi se spolupracovníky expresní systém založený na vektoru pBace a buňkách *E. coli* HB101. cDNA potkaní CPR byla klonována do plasmidu pBace a obsahovala kódující sekvenci 172 – 2037 pro aminokyseliny Gln58 – Ser678. Odstraněním N-terminální hydrofobní domény byl dosažen vysoký stupeň exprese, kdy z jednoho litru média bylo možné po purifikaci získat až 47 mg CPR (standardně lze dosáhnout výtěžku kolem 5 mg/l). Ani při takto velké produkci nebyla pozorována inkluzní tělíska, která jsou normálně přítomna v bakteriích po expresi nativní CPR. Získaný flavoprotein je vhodný pro strukturní a interakční studie CPR se solubilními redoxními partnery (cytochrom c, solubilní forma hem oxygenasy [134]), ale nevhodný pro studium interakcí s cytochromy P450 [135].

Proteolyticky labilní místo Lys56 – Ile57 dělá z CPR v průběhu exprese, purifikace nebo dlouhodobého skladování velice nestabilní protein, což je i příčinou neúspěšných pokusů o studium struktury či funkce nativního proteinu [78]. V roce 2005 byly publikovány výsledky práce Boniny a kol., kde je popsána příprava mutantní formy CPR s nahrazeným Lys56 za Gln (K56Q). Oproti původnímu proteinu je K56Q CPR výrazným způsobem stabilizována vůči proteolýze a současně si zachovává charakteristické katalytické i spektrální vlastnosti [77].

Přípravou potkaní mutantní (K56Q) a nativní formy (wt) CPR se zabývá i předkládaná diplomová práce. Oba proteiny byly exprimovány pomocí vektoru pET22b v buňkách *E. coli* BL21(DE3)RIL. Plasmid pET22b obsahuje T7 promotor pro RNA polymerasu bakteriofága T7 (T7 RNA polymerasa), která je velmi specifická, tudíž nerozeznává jiné bakteriální promotory. Gen pro T7 RNA polymerasu je integrován do genomu bakterie jako lysogen bakteriofága λ -DE3 (odtud označení v názvu bakterií) a nachází se pod kontrolou *lacUV5* promotoru. Ten je za nepřítomnosti induktoru inhibován *lac* represorem (produkt genu *lacI*). Po indukci exprese (IPTG) dochází pomocí RNA polymerasy *E. coli* k přepisu genu pro T7 RNA polymerasu a následné translaci. Vzniklá T7 RNA polymerasa nasedá na T7 promotor plasmidu pET22b a přepisuje gen pro cílový protein [136,137].

2 Cíle diplomové práce

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je spolu s cytochromy P450 a cytochromem b_5 součástí mikrosomálního monooxygenasového systému metabolizujícího cizorodé látky, jehož studiu se na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty UK věnuje značná pozornost. Předkládaná diplomová práce navazuje na práci Mgr. Rolanda Kubíka [138] a zabývá se heterologní expresí, purifikací a charakterizací potkaní mutantní (mCPR – mutace K56Q) a nativní formy (wtCPR) NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Mutace K56Q byla zavedena do genu pro CPR z důvodu větší proteolytické stability finálního enzymu a vyšších výtěžků nativního proteinu v průběhu exprese a purifikace [77]. Pro splnění zadání diplomové práce byly stanoveny následující cíle:

- Ověřit správnost sekvencí genů pro potkaní mCPR a wtCPR v expresních plasmidech pET22b a otestovat podmínky exprese v bakteriích *E. coli* BL21(DE3)RIL navržené Mgr. Rolandem Kubíkem [138].
- Purifikovat jednotlivé rekombinantní formy potkaní CPR (mCPR, wtCPR) pomocí ionexové (DEAE Sepharosa) a afinitní (2´5´ ADP Sepharosa) chromatografie.
- Porovnat proteolytickou stabilitu purifikovaných proteinů mCPR a wtCPR v systému s trypsinem.
- Charakterizovat enzymové aktivity mCPR a wtCPR vůči cytochromu c, cytochromu b_5 a v rekonstituovaném systému s CYP1A1 při metabolismu Sudanu I.

3 Materiál a přístroje

3.1 Použité přístroje

Aparatura pro „Western blotting“: Fastblot B43 (Biometra)

Autokláv: Varioklav 400E (H+P Labortechnik)

Automatické pipety: mLINE (BIOHIT), NichipetEX

Centrifugy: Centrifuge 5415 R (Eppendorf), Janetzki K70 (MLW), Allegra X-22R (Beckman Coulter) výkyvný rotor SX4250, ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter) úhlový rotor Ti 70, minicentrifuga GmCLab (Gilson), Spectrafuge™ Mini (Labnet), T-52.2 (MLW)

Elektroforetické aparatury: Hoefer™ miniVE vertical electrophoresis system (Amersham Biosciences), MSMINI-10 Horizontal Multi Sub Mini (Uvitec)

Inkubátory: IR 1500 Automatic CO₂ Incubator (Flow Laboratories), ORBI-SAFE TS NetWise (Gallenkamp), G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Edison, N.J. USA)

Laboratorní váhy: 440-35N (KERN), EW 600-2M (KERN), EK600H (A&D Instruments LTD), analytické váhy 40 SM-200A (Pesa)

Laminární box: Biohazard Box BIO 126 (Labox)

Peristaltická pumpa: PP 05 (Laboratorní přístroje Praha)

pH metr: model 370 (ATI Orion)

Sběrač frakcí: MODEL 2128, stojany Rack 1, Rack 2 (BIO-RAD)

Spektrofotometry: Diod Array 8453 (Hewlett Packard), Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena), Sunrise Absorbance Reader (TECAN), NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare)

Systém HPLC: Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, termobox pro kolonu COLUMN OVEN LCO 101, Degasys DG-1210 Dionex, kolona Nucleosil 250/4 100-5 C18 (Macherey-Nagel), program CHROMELEON™ 6.01

Transiluminátor: Dark Reader (Clare Chemical Research)

Třepačka: OS2 Basic (IKA)

Ultrafiltrace: Amicon 8200, membrána PM-30, Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Ultracel-30 membrane (Millipore)

Ultrazvuková lázeň: Elmasonic S-30/H (Elma)

Ultrazvukový homogenizátor: SONOPULS HD 3100, sonda KE76 (BANDELIN)

Vakuová odparka: DNA Speed Vac DNA 110 (Savant)

Vodní lázně: Julabo TW2 a Julabo TW8 (JULABO Labortechnik GmbH)

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

3.2 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie použité při experimentech pocházejí z následujících zdrojů:

Fermentas, Kanada: Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (564 – 21226 bp), hmotnostní standard pro SDS elektroforézu PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, protaminsulfát, methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), 2-merkптоethanol, dodecylsírán sodný (SDS),

Invitrogen, USA: SYBR Safe™ DNA Gel Stain

Kao Corp., Japonsko: 2-(4-nonylphenoxy)ethanol – emulgen 911 (E-911)

Lachema Brno, Česká republika: bromfenolová modř, CuSO₄.5H₂O, MgCl₂, EDTANa₂ (chelaton 3), CaCl₂, HCl, KCl, KH₂PO₄, KOH, NaOH, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, 8-hydroxychinolin, methanol, ethanol, glycerol, kyselina octová, octan sodný, vinan sodný (tartarát sodný), ethylacetát, chloroform, persírán amonný, isopropanol, fenol, isoamylalkohol, diethyléter, hexan

Linde, Česká republika: dusík (g), kapalný dusík

Loba Feinchemie, Rakousko: glutathion, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

New England BioLabs, USA: restriční enzymy NdeI (20000 U/ml), XhoI (20000 U/ml), pufr NEB4, BSA

Pharmacia, Švédsko: DEAE Sepharosa CL-6B, 2'5' ADP Sepharosa 4B

Reanal Budapešť, Maďarsko: glycin, glukosa-6-fosfát

Roche, Švýcarsko: inhibitory proteas cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Serva Heidelberg, Německo: Coomassie Brilliant Blue R-250, N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, Triton X-100, ampicilin, isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)

Sigma, USA: 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), dithiothreitol (DTT), sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS), cholát sodný, králičí protilátka značená alkalickou fosfátasou, nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP⁺), cytochrom c, flavinmononukleotid (FMN), riboflavin, LB (Luria Broth) médium, Luria Agar, trypsin (TPCK), sójový trypsinový inhibitor

The British Drug Houses, Velká Británie: 1-fenylazo-2-naftol (Sudan I)

Thermo Scientific, USA: hovězí sérový albumin (BSA)

Expresní plasmidy pET22b nesoucí geny pro potkaní mCPR a wtCPR byly připraveny Mgr. Rolandem Kubíkem v rámci diplomové práce na katedře biochemie PřF UK. Buňky *E. coli* BL21(DE3)RIL a DH5 α poskytli prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc., DSc. a RNDr. Marek Ingr, Ph.D. Primární slepičí protilátka proti králičí CPR byla izolována prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc. Izolovanou králičí CPR a potkaní CYP1A1 poskytly RNDr. Věra Černá, Ph.D. a RNDr. Dagmar Svášková, Ph.D. Rekombinantní lidský cytochrom b₅ poskytla Bc. Marie Kostelanská.

4 Metody

Veškerý materiál a roztoky použité při práci s bakteriálními kulturami (špičky, mikrozkušavky, zkumavky Falcon, MQ voda, 50% glycerol atd.) byly předem sterilizovány v autoklávu (Varioklav 400E) při 121 °C po dobu 20 minut. Manipulace byly prováděny v laminárním boxu (BIO 126).

4.1 Příprava agarových ploten

Sterilní LB-agar (40 g/l H₂O) byl rozeřán v mikrovlnné troubě a potřebné množství odlito do zkumavky Falcon (50 ml). Po zchladnutí, těsně před nalitím tekutého agaru na plotnu, byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml. Směs byla jemně promíchána a do plastové Petriho misky bylo nalito přibližně 10 ml. Agar byl ponechán ztuhnout na vodorovném stole.

4.2 Příprava kompetentních buněk

Při přípravě kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3)RIL byla použita metoda využívající chlorid vápenatý [139]. Všechny centrifugační kroky byly prováděny na přístroji Allegra X-22R, s rotorem SX4250.

Ze zmražených zásobních buněk *E. coli* BL21(DE3)RIL bylo do mikrozkušavky špachtlí odškrábnuto patřičné množství a ponecháno roztát. 2 x 50 ml sterilního LB média (25 g/l H₂O) bez ampicilinu v Erlenmayerových baňkách bylo inokulováno 20 µl buněk a ponecháno růst v orbitální třepačce (G24 Environmental incubator shaker) při teplotě 37 °C, 220 RPM do optické density OD₆₀₀ = 0,3 – 0,5. Buněčné kultury byly přeneseny do zkumavek Falcon (50 ml) a uloženy do ledu na 10 minut. Po centrifugaci 10 minut, 4000 RPM, 4 °C, bylo médium odlito a zkumavky ponechány 1 minutu na buničině v obrácené poloze pro odstranění zbytků média. Pelety byly resuspendovány v 10 ml vychlazeného sterilního roztoku 100 mM CaCl₂ a znovu uloženy do ledu na 10 minut. Následovala centrifugace 10 minut, 4000 RPM, 4 °C. Supernatant byl odlit a zkumavky ponechány 1 minutu na buničině v obrácené poloze. Pelety byly resuspendovány v 2 ml vychlazeného roztoku 100 mM CaCl₂ a ponechány na ledu 1 hodinu. Pak byly do každé

zkumavky přidány 2 ml 50% glycerolu, 200 μ l alikvoty přeneseny do mikrozkuavek a skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Transformace buněk *E. coli* teplotním šokem

Kompetentní buňky *E. coli* (200 μ l) a příslušné vektory byly vyjmuty z mrazáku a ponechány rozmrazit na ledu. Buňky byly rozděleny do dvou nových mikrozkuavek po 100 μ l. Do jedné mikrozkuavky bylo přidáno 3 μ l (~ 150 ng) plasmidové DNA, do druhé 3 μ l MQ vody (kontrolní vzorek). Mikrozkuavky byly jemně promíchány a ponechány na ledu 30 minut. Teplotní šok byl proveden ponořením mikrozkuavek na 90 sekund do vodní lázně (Julabo TW2) s teplotou $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následným ochlazením na ledu po dobu 1 minuty. Do obou mikrozkuavek bylo dále přidáno trojnásobné množství (300 μ l) LB média (25 g/l H_2O) a buňky byly ponechány v inkubátoru (IR 1500 Automatic CO_2 incubator) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Buněčné suspenze pak byly nanесeny na agarové plotny s ampicilinem (100 $\mu\text{g/ml}$), rozetřeny sterilními kuličkami nebo mikrobiologickou hokejkou a inkubovány přes noc v obrácené poloze při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IR 1500 Automatic CO_2 incubator).

4.4 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“

Z narostlých kultur na agarové plotně po transformaci a O/N inkubaci byla pomocí vyžíhané pinzety a sterilního párátko vypíchnuta jedna kolonie buněk a párátko bylo vloženo do zkumavky Falcon (50 ml) s 10 ml LB média (25 g/l H_2O) s ampicilinem (100 $\mu\text{g/ml}$). Zkumavka s povoleným víčkem byla inkubována v orbitální třepačce (G24 Environmental incubator shaker) přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 RPM. O/N kultura byla použita pro izolaci plasmidové DNA nebo byly 200 μ l alikvoty uchovány pro budoucí použití v 15% glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „multi-cell“

Na agarové plotny s narostlou kulturou po transformaci a O/N inkubaci bylo pipetováno 1000 μ l LB média (25 g/l H_2O) a sterilní hokejkou rozetřeno po celém povrchu agarové plotny. Pipetou bylo odebráno 100 μ l buněčné suspenze a tímto objemem inokulováno 500 ml LB média (25 g/l H_2O) s ampicilinem (100 $\mu\text{g/ml}$).

4.6 Exprese rekombinantních forem mCPR a wtCPR

Pro účely purifikace byly jednotlivé formy CPR exprimovány v buňkách *E. coli* BL21(DE3)RIL obsahujících příslušný expresní plasmid. Exprese probíhala v Erlenmayerových láhvích (2 L) v 4 x 500 ml LB média (25 g/l H₂O) s ampicilinem (100 µg/ml). Každá láhev se sterilním LB médiem byla zaočkována 100 µl buněčné suspenze (viz kap. 4.5, str. 41) a kultury ponechány růst v orbitální třepačce (ORBI-SAFE TS NetWise) při 37 °C, 200 RPM do optické hustoty OD₆₀₀ = 0,9. K těmto buňkám byl přidán riboflavin do výsledné koncentrace 1 µg/ml a exprese proteinu byla indukována pomocí IPTG (1 mM finální koncentrace). Produkce příslušné formy CPR probíhala při 27 °C, 200 RPM po dobu 40 hodin. Během produkce byla průběžně sledována optická hustota buněk a odebírány 500 µl vzorky, které byly následně centrifugovány 2 minuty při 7000 RPM a 25 °C (Centrifuge 5415 R). Supernatant byl odlit a peleta resuspendována v 100 µl 1x koncentrovaného vzorkového pufru na elektroforézu (4x koncentrovaný zásobní roztok: 0,25 M Tris/Cl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkptoethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8). Připravené vzorky byly skladovány při -20 °C.

4.7 Izolace plasmidové DNA z buněk *E.coli*

Plasmidová DNA z bakterií byla izolována s využitím alkalické lýze buněk a následné fenol-chloroformové extrakce nukleových kyselin.

4.7.1 Přečištění fenolu od oxidačních produktů

Krystalický fenol (cca 20 ml) byl odebrán do zkumavky Falcon (50 ml), rozpuštěn v horké lázni (70 °C), smíchán s 8-hydroxychinolinem (výsledná koncentrace 0,1 % (w/v)) a se stejným objemem 1 M Tris/Cl pufru (pH 8). Směs byla protřepávána 10 – 15 minut a po ustálení byla odebrána vrchní vodná fáze. Pro dostatečnou čistotu fenolu bylo potřeba proces vytřepávání zopakovat. Fenol byl uskladněn ve směsi s chloroformem a isoamylalkoholem (fenol:chloroform:isoamylalkohol = 25:24:1) v tmavé láhvi při 4 °C a s hladinou 1 M Tris/Cl pufru nad roztokem fenolu.

4.7.2 Izolace plasmidové DNA z buněk *E. coli*

Všechny centrifugační kroky probíhaly na centrifuze 5415 R, při 12700 RPM (15000 g) a 4 °C.

10 ml O/N kultury buněk *E. coli* DH5 α transformovaných příslušným plasmidem bylo centrifugováno 5 minut při 4500 RPM a 4 °C (Allegra X-22R). Po odlití supernatantu byla zkumavka Falcon ponechána 1 minutu na buničině v obrácené poloze. Peleta byla resuspendována ve 200 μ l vychlazeného GTE pufru (50 mM glukosa; 25 mM Tris/Cl; 10 mM EDTANa₂; pH 7,5), přenesena do 1,5 ml mikrozkuavky a ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 300 μ l čerstvě připraveného lyzačního roztoku (4,3 ml H₂O; 200 μ l 5 M NaOH; 500 μ l 10% SDS), obsah mikrozkuavky byl promíchán převrácením (5 – 6 krát) a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. K směsi pak bylo přidáno 200 μ l vychlazeného roztoku K-Ac (15 ml 5 M octan draselný; 3 ml kyselina octová (99 %); doplněno vodou do 25 ml), obsah byl promícháván převrácením po dobu 10 sekund a 10 minut chlazen v ledu. Směs byla centrifugována 10 minut a supernatant (cca 600 μ l) byl přenesen do nové 1,5 ml mikrozkuavky. K supernatantu byl přidán stejný objem (600 μ l) roztoku fenol-chloroformu (fenol:chloroform:isoamylalkohol = 25:24:1), celá směs byla pořádně protřepávána 10 sekund a centrifugována 5 minut. Vrchní vodná fáze (cca 500 μ l) byla přenesena do nové mikrozkuavky a byl k ní přidán stejný objem isopropanolu (500 μ l). Po silném protřepání (10 sekund) byla směs ponechána 10 minut na ledu a centrifugována 10 minut. Supernatant byl odlit a peleta opatrně promyta 500 μ l ledového (-20 °C) 75% ethanolu. Ethanol byl opatrně odebrán pomocí pipety a peleta usušena (5 – 10 minut) ve vakuové odparce (DNA Speed Vac DNA 110). Následně byla peleta resuspendována ve 100 μ l TE pufru (10 mM Tris/Cl; 1 mM EDTANa₂; pH 8) a byly přidány 2 μ l RNasy A (1 mg/ml v H₂O). Směs byla ponechána 30 minut při 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ incubator). Poté bylo přidáno 60 μ l roztoku PEG (2,5 M NaCl; 20% polyethylenglykol 6000 nebo 8000) a mikrozkuavka byla uložena do ledu na přibližně 3 hodiny. Po 15 minutové centrifugaci byl odlit supernatant a peleta opatrně promyta 200 μ l ledového (-20 °C) 75% ethanolu. Ethanol byl opatrně odebrán pomocí pipety a peleta usušena ve vakuové odparce (DNA Speed Vac DNA 110). Finální peleta byla rozpuštěna v 20 μ l TE pufru (10 mM Tris/Cl; 1 mM EDTANa₂; pH 8) nebo MQ vody (vzorky pro sekvenaci) a skladována při -20 °C.

4.8 Dvojité štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a NdeI

Reakční směs byla pipetována do 200 µl mikrozkušavky a obsahovala následující složky:

- 5 – 7 µl plasmidové DNA (cca 0,2 – 0,4 µg DNA)
- 1 µl XhoI
- 1 µl NdeI
- 2 µl pufru NEB4 (10x koncentrovaný)
- 2 µl BSA (10x koncentrovaný)
- Sterilní H₂O do celkového objemu 20 µl

Reakce probíhala 4 hodiny při 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ incubator). Vzorky pak byly po smíchání se vzorkovým pufrům (40% sacharosa (w/v); 0,1% bromfenolová modř (w/v)) využity pro horizontální agarosovou elektroforézu.

4.9 Horizontální agarosová elektroforéza

Byl připraven 1% (w/v) roztok agarosy ve 40 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (0,04 M Tris/acetát; 1 mM EDTANa₂; pH 8,2). Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarosy. Po ochlazení na přibližně 40 – 50 °C byly do roztoku přidány 4 µl barviva SYBR SafeTM DNA gel Stain (10000x koncentrované), roztok byl promíchán a nalit do elektroforetické vaničky s hřebenem. Po ztuhnutí agarosy byl hřeben vyjmut a vanička s gelem byla přenesena do elektroforetické aparatury (MSMINI-10 Multi Sub Mini) naplněné 1x koncentrovaným TAE pufrům. Do jamek byly aplikovány vzorky DNA smíchané s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrům (40% sacharosa (w/v); 0,1% bromfenolová modř (w/v)) v množství maximálně 25 µl na jamku. Elektroforéza probíhala 30 minut při napětí 110 V (zdroj EPS 301). DNA byla vizualizována v tmavé místnosti pomocí transiluminátoru (Dark Reader).

4.10 Určení koncentrace a čistoty plasmidové DNA

Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla stanovována spektrofotometrem NanoVue Plus při vlnových délkách 230, 260, 280, 320 nm, optické dráze 0,2 mm a s použitím MQ vody jako slepého vzorku. 2 µl vzorku byly aplikovány na „kříž“ spektrofotometru a koncentrace DNA byla určena ze vztahu $A_{260} - A_{320} = 1 \leftrightarrow c = 50$

µg/ml. Pro účely sekvenace je potřeba, aby se čistota DNA, tedy poměry A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} blížily co nejvíce hodnotě 1,8 [140].

4.11 Izolace bakteriální membránové frakce

Po expresi příslušného proteinu byly buněčné kultury centrifugovány ve dvou kyvetách o objemu 1100 ml 20 minut při 3000 RPM a 4 °C (Janetzki K70). Po odlití supernatantů byly pelety promyty ve 25 ml pufru (50 mM KH_2PO_4 ; 134 mM KCl; pH 7,4), přeneseny do dvou zkumavek Falcon (50 ml) a centrifugovány 20 minut při 4500 RPM a 4 °C (Allegra X-22R). Supernatanty byly znovu odlity a každá peleta resuspendována v 25 ml draselno-fosfátového pufru (100 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM DTT; 20% glycerol (v/v); pH 7,6), ve kterém byla sonikací rozpuštěna tableta proteasových inhibitorů (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Dezintegrace buněk byla provedena s použitím ultrazvukového homogenizátoru (Sonopuls HD 3100) se sondou KE76 a probíhala 15 x 1 minutu (50% výkon) za stálého chlazení v ledu. Po homogenizaci byl roztok centrifugován 15 minut při 4500 RPM a 4 °C (Allegra X-22R). Supernatanty byly dále centrifugovány 70 minut při 60000 RPM a 4 °C (Optima™ LE-80K, rotor Ti 70). Pelety po ultracentrifugaci (membránová frakce) byly spojeny a homogenizovány ve 20 ml příslušného pufru (viz kap. 4.12).

4.12 Solubilizace wtCPR a mCPR z membrán *E. coli*

Pelety (membránová frakce) s wtCPR po ultracentrifugaci byly spojeny a opětovně homogenizovány (Sonopuls HD 3100, sonda KE76, 50% výkon) 5 x 1 minutu v 20 ml solubilizačního pufru (10 mM Tris/Cl; 1 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20% glycerol (v/v); pH 7,4) za stálého chlazení v ledové lázni. Pelety s mCPR byly homogenizovány stejným postupem ale v draselno-fosfátovém pufru (20 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20% glycerol (v/v); pH 7,6). Celá směs pak byla ředěna solubilizačním (wtCPR) nebo draselno-fosfátovým (mCPR) pufrem na výslednou koncentraci proteinů 4 mg/ml. Získaná suspenze byla míchána při 4 °C v Erlenmayerově baňce na ledu pod atmosférou dusíku a po kapkách k ní byl přidáván rychlostí 1 kapka/3s roztok obsahující tabletu proteasových inhibitorů (cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; 1 tableta na 50 ml roztoku), 15 mg/ml protaminsulfát, 10% cholát sodný (w/v) a

10% E-911 (w/v) do výsledné koncentrace odpovídající 0,375 mg/ml protaminsulfátu, 1 mg cholátu sodného/mg proteinů a 1,25 mg E-911/mg proteinů v konečném objemu. Tato směs byla míchána za uvedených podmínek 60 minut a centrifugována 70 minut při 60000 RPM a 4 °C (Optima™ LE-80K, rotor Ti 70). Supernatant byl následně aplikován na ekvilibrovanou kolonu DEAE Sepharosy CL-6B (wtCPR) nebo na kolonu 2'5' ADP Sepharosy 4B (mCPR).

4.13 Purifikace wtCPR

WtCPR byla purifikována s využitím tří chromatografických kroků. První přečištění probíhalo na koloně DEAE Sepharosy CL-6B, následně na afinitní koloně 2'5'ADP Sepharosy 4B. Finální přečištění bylo provedeno opět na koloně DEAE Sepharosy CL-6B. Izolace probíhala v chlazené místnosti při 5 °C a všechny použité roztoky a nástroje byly předem vychlazeny.

4.13.1 Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B

Potřebné množství (cca 70 ml) DEAE Sepharosy, uchovávané v 20% ethanolu, bylo před použitím promyto 3 x 250 ml destilované vody (při míchání se nedotýkat skleněnou tyčinkou stěn ani dna kádinky), rozmícháno v 250 ml cyklizačního pufru (1 M KH_2PO_4 ; pH 7,4) a ponecháno přes noc při 4 °C. Druhý den byl nosič opět promyt 3 x 250 ml destilované vody a rozmíchán v adekvátním objemu pufru pro nalévání kolony (10 mM KH_2PO_4 ; 20% glycerol (v/v); pH 7,4) tak, aby celkový objem nepřevyšoval objem kolony. Po zamíchání byla kolona nalita v zastaveném toku a s hladinou pufru na dně kolony (před nalitím bylo potřeba odplynit fritu proudem pufru). Po sednutí nosiče (cca 5 hodin) byla hladina pufru ponechána klesnout cca 2 cm nad povrch nosiče a kolona byla promyta 400 ml ekvilibračního pufru (10 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,1% E-911 (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,4). Po ekvilibraci byla ověřena vodivost a pH pufru před a po vytečení z kolony. Pokud se hodnoty nelišily, byla kolona připravena k použití.

Na ekvilibrovanou kolonu (2,5 x 20 cm) byl aplikován supernatant po solubilizaci rychlostí 1 ml/min a byly jímány frakce po 10 ml (BIO-RAD MODEL 2128, Rack 2). Po aplikaci supernatantu byla kolona promyta 250 ml ekvilibračního pufru. Pro eluci wtCPR byl použit lineární gradient 2 x 250 ml 0 – 0,5 M KCl v ekvilibračním pufru. Eluce wtCPR

byla sledována stanovením cytochrom c reduktasové aktivity (viz kap. 4.22, str. 53) v jednotlivých frakcích. Podle reduktasové aktivity a SDS elektroforézy byly spojeny frakce obsahující wtCPR, zahuštěny na přibližně 30 ml (cela Amicon 8200, membrána PM-30) a dialyzovány přes noc proti 2000 ml dialyzačního pufru (10 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,1% E-911 (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,0). V dialyzované frakci bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 roztokem 1 M KH_2PO_4 a frakce byla nanesena na ekvilibrovanou kolonu 2'5' ADP Sepharosy 4B.

Nosič byl regenerován postupným promýváním 250 ml 1 M KCl, 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 250 ml destilované vody, 250 ml 0,5 M NaOH, 250 ml destilované vody, 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 3 x 250 ml destilované vody a 2 x 250 ml 20 % čistého ethanolu. Nakonec byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20% ethanolu a uchován při 4 °C.

4.13.2 Chromatografie na koloně 2'5'ADP Sepharosy 4B

2'5' ADP Sepharosa (7 ml) ve 20% ethanolu byla před použitím promyta 2 x 25 ml destilované vody (při míchání se nedotýkat skleněnou tyčinkou stěn ani dna kádinky), rozmíchána v 5 ml destilované vody a nalita do chromatografické kolony (1,2 x 10 cm) v zastaveném toku s hladinou vody na dně kolony (před nalitím bylo potřeba odplynit fritu proudem destilované vody). Po sedimentaci nosiče (cca 3 hod) byla hladina ponechána klesnout 1 cm nad povrch nosiče a kolona byla promývána 25 ml destilované vody, poté 50 ml ekvilibračního pufru (50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,5% cholát sodný (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,0).

Na ekvilibrovanou kolonu 2'5' ADP Sepharosy byly naneseny zahuštěné frakce z DEAE Sepharosy obsahující wtCPR rychlostí 0,5 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml ekvilibračního pufru. Z nanášení vzorku a promývání kolony byly jímány frakce po 4 ml (BIO-RAD MODEL 2128, Rack 1). Pro eluci wtCPR bylo použito 100 ml elučního pufru (0,5 mM NADP^+ ; 0,2 M KCl; 50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,5% cholát sodný (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,0). Během eluce byly sbírány frakce po 2 ml. Podle reduktasové aktivity (viz kap. 4.22, str. 53) a SDS elektroforézy byly spojeny frakce s wtCPR a zahuštěny na objem 25 ml (cela Amicon 8200, membrána PM-30). K zahuštěné frakci byl přidán FMN do výsledné koncentrace 50 μM a frakce byla dialyzována 12 hodin proti 4000 ml pufru (50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM

EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20% glycerol (v/v); pH 7,5). Dialyzovaná frakce byla zahuštěna pomocí ultracentrifugační zkumavky (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Ultracel-30 membrane) na centrifuze Allegra X-22R (3000 RPM a 4 °C) na objem 3 ml a aplikována na kolonu DEAE Sepharosy.

Po použití byl nosič čištěn promýváním v 25 ml 0,5 M Tris/Cl + 0,5 M NaCl, pH 8,5; 25 ml destilované vody; 25 ml 0,5 M octan sodný + 0,5 M NaCl, pH 4,5; 25 ml destilované vody. Celý postup byl zopakován ještě jednou a pak byl nosič promyt v 25 ml destilované vody, 2 x 25 ml 20% ethanolu. Nakonec byl rozmíchán v 10 ml 20% ethanolu a uchováván při 4 °C.

4.13.3 Rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B

Pro finální dočištění byla znovu použita chromatografie na koloně DEAE Sepharosy. Příprava, ekvilibrace a regenerace nosiče byly identické jako v prvním případě (viz kap. 4.13.1, str. 46), ale místo 0,1% detergentu E-911 byl všude použit 0,5% cholát sodný.

Na ekvilibrovanou kolonu (2,5 x 20 cm) byla aplikována zahuštěná frakce z 2'5'ADP Sepharosy rychlostí 0,5 ml/min. Po aplikaci vzorku byla kolona promývána 150 ml ekvilibračního pufru a pak 150 ml 150 mM KCl v ekvilibračním pufru (průtok 1 ml/min). Byly jímány frakce o objemu 10 ml (BIO-RAD MODEL 2128, Rack 2). Pro eluci wtCPR byl použit lineární gradient 2 x 200 ml 0,15 – 0,5 M KCl v ekvilibračním pufru. Jímané frakce měly objem 4 ml (BIO-RAD MODEL 2128, Rack 1). Eluce wtCPR byla sledována stanovením reduktasové aktivity (viz kap. 4.22, str. 53) v jednotlivých frakcích. Podle reduktasové aktivity a SDS elektroforézy byly spojeny frakce obsahující wtCPR a zahuštěny na přibližně 30 ml (cela Amicon 8200, membrána PM-30). Do zahuštěných frakcí byl přidán FMN do výsledné koncentrace 50 µM a byly dialyzovány 12 hodin proti 4000 ml dialyzačního pufru (50 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20% glycerol (v/v); pH 7,5). Dialyzované frakce byly zahuštěny pomocí ultracentrifugační zkumavky (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Ultracel-30 membrane) na centrifuze Allegra X-22R (3000 RPM a 4 °C) na objem přibližně 2 ml, 50 µl alikvoty byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

4.14 Purifikace mCPR

Pro purifikaci mCPR byl zvolen mírně modifikovaný postup Huanga [131] s využitím jednoho chromatografického kroku na koloně 2'5' ADP Sepharosy 4B. Izolace probíhala v chlazené místnosti při 5 °C a všechny použité roztoky a nástroje byly předem vychlazeny.

4.14.1 Chromatografie na koloně 2'5'ADP Sepharosy 4B

Příprava kolony a regenerace nosiče byly identické jako v předchozím případě při purifikaci wtCPR (viz kap. 4.13.2, str. 47).

2'5' ADP Sepharosa (7 ml) byla promyta 25 ml destilované vody a 50 ml ekvilibračního pufru (50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,5% cholát sodný (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,6). Na ekvilibrovanou kolonu byl nanesen supernatant po solubilizaci rychlostí 0,5 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 60 ml ekvilibračního pufru, 60 ml 1,5 mM adenosinu v ekvilibračním pufru, 60 ml 200 mM KCl v ekvilibračním pufru a opět 25 ml ekvilibračního pufru. Z nanášení supernatantu a promývání kolony byly jímány frakce po 4 ml (BIO-RAD MODEL 2128, Rack 1). Pro eluci mCPR byl použit lineární gradient 2 x 60 ml 0 – 1 mM NADP^+ v ekvilibračním pufru. Po gradientové eluci byla kolona ještě promyta 50 ml pufru s KCl a NADP^+ (200 mM KCl; 2 mM NADP^+ ; 50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,5% cholát sodný (w/v); 20% glycerol (v/v); pH 7,6). Během eluce byly sbírány frakce po 2 ml. Podle reduktasové aktivity (viz kap. 4.22, str. 53) a SDS elektroforézy byly spojeny frakce s mCPR a zahuštěny na objem 30 ml (cela Amicon 8200, membrána PM-30). K zahuštěné frakci byl přidán FMN do výsledné koncentrace 50 μM a frakce byla dialyzována 12 hodin proti 4000 ml pufru (50 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 20% glycerol (v/v); pH 7,5). Dialyzovaná frakce byla zahuštěna pomocí ultracentrifugační zkumavky (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Ultracel-30 membrane) na centrifuze Allegra X-22R (3000 RPM a 4 °C) na objem 3 ml, 50 μl alikvoty byly zamraženy v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

4.15 Proteolytické štěpení mCPR a wtCPR pomocí trypsinu

Purifikovaná CPR (výsledná koncentrace proteinů 85 µg/ml) nebo membránová frakce s CPR (výsledná koncentrace proteinů 2500 µg/ml) byla inkubována 3 minuty při 37 °C a 400 RPM (Thermomixer compact) s takovým množstvím 50 mM Tris/Cl pufru (pH 7,5), aby po přidání roztoku trypsinu byl výsledný objem 500 µl. Po inkubaci byl přidán trypsin (TPCK) v poměru protein (µg):trypsin (µg) = 200:1 (purifikovaná CPR) nebo 100:1 (membránová frakce). 40 µl alikvoty byly v časech 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 minut přeneseny do mikrozkušavky s 10 µl sójového trypsinového inhibitoru (trypsin (µg):inhibitor (µg) = 1:4). K těmto vzorkům byl přidán 4x koncentrovaný vzorkový redukující pufr a provedena SDS elektroforéza.

4.16 Příprava solubilní CPR bez N-terminální domény (AK 1 – 56)

Do roztoku purifikované wtCPR byl přidán trypsin (TPCK) v poměru wtCPR:trypsin = 5:1. Směs byla inkubována 30 minut při 37 °C a 400 RPM (Thermomixer compact) a pak k ní byl přidán sójový trypsinový inhibitor v poměru trypsin:inhibitor = 1:4. Úplnost proteolýzy byla ověřena pomocí SDS elektroforézy. Solubilní CPR byla skladována při -80 °C.

4.17 Elektroforéza SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforéza v přítomnosti SDS slouží k dělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. SDS se váže na polypeptidové řetězce proteinů (1,4 g SDS/g proteinů) a uděluje jim uniformní záporný náboj [141]. Polyakrylamidový gel vzniká kopolymerací akrylamidu a síťovacího činidla BIS. Polymerace je iniciována radikály vznikajícími z persíranu amonného v přítomnosti TEMEDu, který slouží jako stabilizátor vzniklých radikálů. Tato metoda byla prováděna dle práce Laemmliho [142].

4.17.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Mezi čistá a odmaštěná skla v elektroforetické aparatuře (miniVE Vertical) byl nalit 10% nebo 8% separační gel následujícího složení: (10% gel) 5 ml pufru A (0,375 M Tris/Cl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8), 2,5 ml polymeračního roztoku A (30% akrylamid (w/v);

0,8% BIS (w/v) v pufru A), 7,5 μ l TEMED a 75 μ l persíranu amonného (100 mg/ml), (8% gel) 5,5 ml pufru A, 2 ml polymeračního roztoku A, 7,5 μ l TEMED a 75 μ l persíranu amonného. Ihned po nalití byl gel převrstven destilovanou vodou. Po polymeraci (30 min) byla voda odlita, povrch gelu vysušen filtračním papírem a gel převrstven 4% zaostřovacím gelem připraveným z 2,6 ml pufru B (0,125 M Tris/Cl; 0,1% SDS (w/v); pH 6,8), 400 μ l polymeračního roztoku B (30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru B), 3 μ l TEMED a 60 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Po převrstvení byl do gelu zasunut hřeben pro vytvoření jamek k aplikaci vzorků. Po polymeraci (30 minut) byl hřeben z gelu vyjmut, desky s gelem umístěny do elektroforetické vany a horní i dolní elektrodový prostor vyplněn elektrodovým pufrem (0,025 M Tris/Cl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3).

4.17.2 Příprava vzorků a vlastní elektroforéza

Vzorky byly ředěny v poměru 3:1 4x koncentrovaným vzorkovým redukujícím pufrem (0,25 M Tris/Cl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkptoethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8) a vařeny 5 minut ve vodní lázni. Do jamek, zalitých elektrodovým pufrem, bylo pomocí mikrostříkačky Hamilton aplikováno 5 – 20 μ l vzorku.

Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání prvních 30 minut při napětí 80 V a poté při napětí 150 V, dokud čelo obsahující bromfenolovou modř nedosáhlo spodního okraje gelu.

Separční gel byl oddělen od zaostřovacího a přenesen na 1 hodinu do barvicí lázně (25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)). Po obarvení byl gel odbarvován přes noc v odbarvovací lázni (25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)).

4.18 Metoda „Western blotting“

Polyakrylamidový gel určený pro přenos proteinů na PVDF membránu byl po elektroforéze umístěn na 20 minut do přenosového pufru (0,025 M Tris/Cl; 0,192 M glycin; pH 8,3) s přidavkem methanolu (10% (v/v) výsledná koncentrace). Podle velikosti gelu bylo vystříhnuto 6 ks chromatografického papíru (Whatman), tři z nich byly umístěny do elektropřenosového aparátu (Fastblot B43) a navlhčeny přenosovým pufrem. Na papíry

byla položena PVDF membrána, předtím smáčena v methanolu (10 s), destilované vodě (3 minuty) a v přenosovém pufru (5 minut). Následující vrstvu tvořil polyakrylamidový gel, který byl převrstven zbylými třemi kusy navlhčeného chromatografického papíru. Elektropřenos byl prováděn 50 minut při proudu 4 mA/cm² gelu.

4.19 Imunochemická detekce potkaní CPR

PVDF membrána byla přes noc inkubována při 4 °C v blokovacím roztoku (5% odtučněné sušené mléko v pufru PBS-Triton X-100 (1.8 mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,134 M NaCl; 0,3% TRITON X-100 (w/v); pH 7,2). Poté byla membrána inkubována dvě hodiny se specifickou primární protilátkou (slepičí IgY proti králičí CPR) v blokovacím roztoku o výsledné koncentraci 30 µg/ml. Nenaázaná primární protilátka byla odmyt a několikanásobným promytím membrány v blokovacím roztoku (5 x 3 minuty). Poté byla inkubována jednu hodinu v 10 ml blokovacího roztoku s přidavkem 7µl sekundární protilátky značené alkalickou fosfatasou (králičí IgG proti slepičí IgY). Po inkubaci byla membrána propláchnuta 5 x 3 minuty v blokovacím roztoku, 2 x 5 minut v 0,3% TRITONU v PBS a nakonec 5 minut ve vodě. Celý postup byl prováděn při laboratorní teplotě a za stálého míchání.

CPR byla detekována za použití substrátu pro alkalickou fosfatasu BCIP/NBT (tableta rozpuštěna v 10 ml destilované vody). Reakce byla zastavena přibližně po dvou minutách vložením membrány do destilované vody.

4.20 Příprava vzorků na sekvenaci proteinů

Ze vzorků určených na proteinovou sekvenaci byla provedena SDS elektroforéza (kap. 4.17, str. 50) následovaná přenosem proteinů na PVDF membránu (kap. 4.18, str. 51). Přenosový pufr ve všech fázích obsahoval navíc 0,1 mM DTT. Po přenosu proteinů byla membrána promyta 10 minut na třepačce v MQ vodě a barvena 1 minutu v barvicí lázni (25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)). Odbarvování probíhalo ve směsi methanol, voda a kyselina octová v poměru 50:40:10 po dobu 5 minut. Membrána byla ještě promývána 15 minut v MQ vodě a nakonec vysušena mezi listy filtračního papíru.

4.21 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA

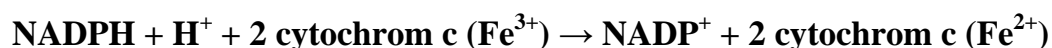
Při stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA se využívá tvorby fialově zbarveného komplexu vznikajících měďných iontů (Cu^+) s BCA v alkalickém prostředí. Měďné ionty vznikají z iontů měďnatých redukcí peptidovou vazbou a funkčními skupinami některých přítomných aminokyselin (Cys, Trp, Tyr). Intenzita zabarvení se následně určuje spektrofotometricky při 562 nm a je přímo úměrná koncentraci proteinů v roztoku [143].

Činidlo pro stanovení proteinů bylo připraveno rozpuštěním BCA v 50 dílech roztoku A (0,4% NaOH (w/v); 0,95% NaHCO_3 (w/v); 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (w/v); 0,16% tartát sodný (w/v); pH 11,25) a jednom dílu roztoku B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (w/v)) tak, aby výsledná koncentrace BCA byla 1 %. Roztok B byl přidán do roztoku A až po úplném rozpuštění BCA. Činidlo bylo připraveno těsně před stanovením.

Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno po 9 μl standardů nebo vhodně zředěných stanovovaných vzorků a 260 μl připraveného činidla. Jako standard pro kalibraci byl použit roztok BSA o koncentracích 2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml. Slepé vzorky obsahovali místo roztoku proteinů 9 μl destilované vody. Po inkubaci při teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO_2 incubator) po dobu 30 minut a zchladnutí byly změřeny absorbance standardů a vzorků při 562 nm na čtečce mikrotitračních destiček (Sunrise Absorbance Reader). Naměřená data byla vyhodnocena v programu Kim32 [144].

4.22 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči cytochromu c

Aktivita CPR byla určena spektrofotometricky metodou, která je založena na měření kinetiky redukce cytochromu c, kde zdrojem redukčních ekvivalentů je NADPH. Přírůstek množství redukovaného cytochromu c se určuje při vlnové délce 550 nm [145]. Celou reakci můžeme zapsat následovně:



Do skleněné kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno 970 μl draselno-fosfátového pufru (300 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; pH 7,5), 10 μl cytochromu c (zásobní roztok 25 mg/ml) a 10 μl vhodně zředěného vzorku obsahujícího CPR. Směs byla zamíchána a použita jako slepý vzorek pro měření při 550 nm (spektrofotometr Hewlett Packard 8453). Po přidavku 10 μl 10 mM NADPH byla směs rychle zamíchána ponorným míchadlem a ihned měřen nárůst absorbance při 550 nm po dobu 60 sekund (podmínkou správného vyhodnocení je lineární nárůst absorbance). Aktivita CPR pak byla vypočtena ze vztahu:

$$a_{CPR} = \frac{\Delta A_{550}}{\Delta t \cdot l \cdot \epsilon_{cytc}} \cdot \text{\textit{ředění}} \quad [\mu\text{mol}_{cytc} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

a_{CPR} aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy [$\mu\text{mol}_{cytc} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$]

ϵ_{cytc} molární absorpční koeficient cytochromu c (21,01 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$)

Δt čas měření (1 min)

l optická délka (1 cm)

ΔA_{550} rozdíl absorbancí $A_{t=60} - A_{t=0}$ [146]

4.23 Příprava rekonstituovaného systému CYP1A1 s CPR

Pro správnou funkci izolovaného cytochromu P450 je potřeba vytvořit rekonstituovaný systém s CPR a DLPC, který vytváří liposomy a simuluje tak prostředí membrány endoplasmatického retikula.

Ve skleněných zkumavkách s kónickým dnem bylo odpařeno pomocí dusíku 10 μl roztoku DLPC (5 mg/ml v chloroformu) tak, aby se na stěnách zkumavky vytvořila vrstvička tohoto lipidu. Do zkumavek pak bylo pipetováno 5 μl pufru HEPES s detergentem CHAPS (0,5 mg/ml CHAPS v 500 mM HEPES v H_2O), 5 μl glutathionu (30 mM) a takové množství vody, aby po přidavku 50 pmol CYP1A1 a 50 $\mu\text{mol}_{cytc} \cdot \text{min}^{-1}$ CPR byl výsledný objem roztoku 50 μl . Po přidání vody byla směs sonikována 2 x 3 minuty v ultrazvukové lázni (Elmasonic S-30/H) pro vytvoření liposomů (po prvních 3 minutách byla směs ponechána ochladnout). Následně byly přidány příslušné objemy CYP1A1, CPR a směs byla ponechána při laboratorní teplotě 10 minut míchat na třepačce (OS2 Basic). Rekonstituované systémy byly připraveny pro každý typ CPR v „dubletech“ a použity pro inkubace se Sudanem I.

4.24 Inkubace Sudanu I s rekonstituovaným systémem

Pro určení aktivity jednotlivých forem CPR v rekonstituovaném systému byl zvolen Sudan I, který je „markerovým“ substrátem CYP1A1 [147].

K 50 μ l rekonstituovaného systému bylo přidáno 395 μ l 100 mM pufru KH_2PO_4 (pH 7,4) a 5 μ l 5 mM Sudanu I (výsledná koncentrace 50 μ M). Zkumavky byly inkubovány 10 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C (Julabo TW8). Reakce byla startována přidávkem 50 μ l NADPH generujícího systému (výsledná koncentrace: 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa), přičemž do kontrolního vzorku bylo přidáno místo NADPH generujícího systému 50 μ l destilované vody. Inkubace pak probíhala v otevřených zkumavkách 30 minut při 37 °C a 220 RPM (G24 Environmental incubator shaker). Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu v pořadí, v jakém byl přidáván NADPH generující systém. Jednotlivé vzorky s přidáním ethylacetátem byly extrahovány intenzivním třepáním 1 minutu na vortexu a pro lepší oddělení obou fází centrifugovány 5 minut při 3000 RPM (MLW T-52.2). Horní organická fáze byla odebrána do 1,5 ml mikrozkušavky. Celá extrakce pak byla zopakována ještě jednou. Vzorky byly odpařeny dosucha pomocí vakuové odparky (DNA Speed Vac DNA 110) a rozpuštěny v 30 μ l methanolu (v případě použití vzorků pro TLC chromatografii byly tyto rozpuštěny v 10 μ l methanolu).

4.25 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metabolity Sudanu I (6-hydroxy-Sudan I; 4'-hydroxy-Sudan I; 4'6-dihydroxy-Sudan I) vzniklé v inkubační směsi, byly rozděleny a stanoveny pomocí systému pro HPLC (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S) a programu CHROMELEON™ 6.01. Sudan I a jeho metabolity byly detekovány při vlnové délce 480 nm. Jejich množství bylo kvantifikováno podle kalibrační křivky získané za použití syntetických standardů metabolitů Sudanu I [148].

Podmínky HPLC byly následující:

- mobilní fáze 85% methanol (v/v); 15% 100 mM NH_4HCO_3 (v/v); pH 8,5 (předem odplyněna v ultrazvukové lázni)
- průtok mobilní fáze 0,7 ml/min
- izokratická eluce metabolitů mobilní fází

- kolona NUCLEOSIL 250/4 100-5 C18
- objem vzorku aplikovaného na kolonu 20 μl
- čas analýzy 20 minut
- teplota 35 °C
- detekce Sudanu I a jeho metabolitů při 480 nm

4.26 Chromatografie metabolitů Sudanu I na tenké vrstvě (TLC)

Na komerční tenkou vrstvu Silufol (silikagel na hliníkové folii) o rozměru 10 x 15 cm byly aplikovány extrahované vzorky (10 μl) z inkubace rekonstituovaného systému se Sudanem I. Do skleněné chromatografické vany s víčkem byla nalita mobilní fáze (diethyléter:hexan = 3:1) a po stěnách vany rozloženy filtrační papíry pro nasycení vzduchu parami mobilní fáze. Do takto připravené vany pak byla vložena folie Silufol s nanesenými vzorky. Chromatografie byla ukončena v momentě, kdy mobilní fáze doputovala na okraj folie.

4.27 Redukce cytochromu b_5 NADPH:cytochrom P450 reduktasou v roztoku

Do 1 ml skleněné kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno takové množství pufru (300 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; pH 7,5) aby po přidání 150 $\mu\text{mol}_{\text{cytc.}}\text{min}^{-1}$ CPR, 0,8 nmol membránové nebo 5,5 nmol solubilní formy cytochromu b_5 (koncentrace cytochromu b_5 určena z absorbance při 413 nm) a NADPH byl výsledný objem roztoku 700 μl . Po přidání CPR a cytochromu b_5 bylo proměřeno spektrum oxidovaného cytochromu b_5 . Jako slepý vzorek byl použitý výše uvedený pufr. Redukce byla startována přidávkem 10 μl 10 mM NADPH a po 5 minutách bylo změřeno spektrum redukovaného cytochromu b_5 .

4.28 Redukce cytochromu b_5 NADPH:cytochrom P450 reduktasou v prostředí liposomů

Příprava rekonstituovaného systému probíhala podle kap. 4.23 (str. 54) s tím rozdílem, že bylo použito 20 μl roztoku DLPC, 10 μl pufru HEPES s detergentem CHAPS,

10 μl glutathionu a 30 μl vody. Po sonikaci 2 x 3min bylo přidáno 150 $\mu\text{mol}_{\text{cytc.}}\text{min}^{-1}$ CPR, 0,8 nmol membránové nebo 2,75 nmol solubilní formy cytochromu b_5 . Tato směs byla ponechána 10 minut míchat na třepačce a nakonec k ní bylo pipetováno takové množství pufru, aby po přidání 10 μl NADPH byl výsledný objem 400 μl . Směs byla převedena do 0,5 ml skleněné kyvety (optická dráha 1 cm) a byl změřen slepý vzorek. Redukce byla startována přidáním 10 μl 10 mM NADPH a po 5 minutách bylo změřeno spektrum redukovaného cytochromu b_5 .

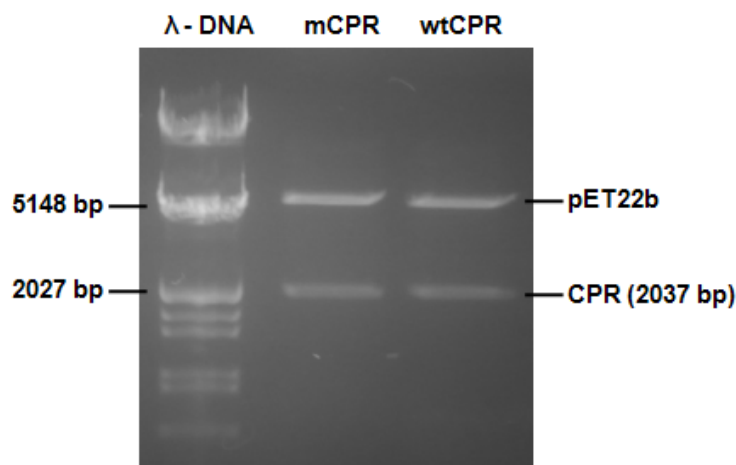
5 Výsledky a diskuse

Expresní plasmidy pET22b s geny pro potkaní mCPR a wtCPR byly vytvořeny Mgr. Rolandem Kubíkem v rámci diplomové práce na katedře biochemie PřF UK [138]. cDNA, která sloužila jako základ pro obě formy CPR, byla připravena reverzní transkripcí mRNA izolované z jater potkana (*Rattus norvegicus*, kmen Wistar). Gen pro mCPR (mutace K56Q) byl vytvořen pomocí PCR a specifických primerů nesoucích požadovanou mutaci. Sekvenací klonovacího plasmidu pUC19-mCPR byly v genu *mCPR* kromě očekávané mutace v poloze 166 (A→C), která je zodpovědná za aminokyselinovou substituci K56Q, odhaleny ještě dvě další, v polohách 571 (A→C) a 764 (T→C). Poslední dvě zmíněné mutace obsahuje i gen *wtCPR*, což znamená, že byly přítomny již v izolované potkaní mRNA. V případě 571 (A→C) se jedná o tzv. „tichou“ mutaci nezpůsobující změnu v aminokyselinové sekvenci CPR. Avšak mutace 764 (T→C) se projeví záměnou Val za Ala (V255A). Val255 je součástí neuspořádané struktury v oblasti spojovací domény (viz obr. 9B, str. 26) a jeho substituce by tedy neměla mít podstatný vliv na celkovou strukturu nebo funkci CPR. Navíc Val i Ala mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti a patří do stejné skupiny aminokyselin s nepolárním postranním řetězcem. Obě uvedené mutace (571 (A→C), 764 (T→C)) popsali ve své publikaci i Porter se spolupracovníky [149]. Vyskytují se jen u potkana *Rattus norvegicus* z kmene Wistar, který byl použit i v našem případě pro izolaci mRNA. Sekvence je přístupná na stránkách EBI (European Bioinformatics Institute) pod označením AAA41683 [150]. Pro porovnávání jednotlivých genů se však používá konsensuální sekvence P00388 [151,152], získaná z potkaního kmene Sprague Dawley [152], což je tedy i příčinou vzniklých sekvenčních rozdílů.

5.1 Ověření sekvencí genů pro potkaní mCPR a wtCPR v plasmidech pET22b

Pro ověření sekvencí genů jednotlivých forem CPR bylo nejdříve potřeba příslušné plasmidy amplifikovat v buňkách *E. coli* DH5 α a následně izolovat. Plasmidová DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí z 10 ml O/N kultury buněk *E. coli* DH5 α (kap. 4.7, str. 42). Izolací bylo získáno 20 μ l jednotlivých plasmidů o koncentracích 404 μ g. ml^{-1}

(pET22b-mCPR) a $434 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (pET22b-wtCPR). Pro ověření přítomnosti genu v izolovaných plasmidech bylo provedeno kontrolní štěpení pomocí restričních endonukleas XhoI a NdeI (kap. 4.8, str. 44). Výsledky restrikce 0,4 μg plasmidové DNA zobrazuje záznam agarosové elektroforézy na obr. 13.



Obr. 13 Kontrolní štěpení plasmidů pET22b-mCPR a pET22b-wtCPR pomocí restričních endonukleas XhoI a NdeI

Pro štěpení bylo použito 0,4 μg plasmidové DNA, 1% gel pro agarosovou elektroforézu, standard (λ -DNA) – Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (564 – 21226 bp)

Na záznamu agarosového gelu (obr. 13) lze pozorovat v drahách mCPR a wtCPR přítomnost příslušných genů o velikostech 2037 bp. Proužky o velikosti přibližně 5000 bp odpovídají štěpeným plasmidům pET22b. Ověřené plasmidy byly následně použity pro sekvenaci.

Na sekvenční analýzu bylo odesláno 800 ng DNA z každého expresního plasmidu (pET22b-wtCPR ($A_{260}/A_{280} = 1,98$), pET22b-mCPR ($A_{260}/A_{280} = 2,00$)). Analýza byla provedena střediskem sekvenace DNA PŘF UK [140] v jednom směru s použitím primeru „T7promoter“, který nasedá na sekvenci T7 promotoru. Vzhledem k tomu, že správnost sekvence již byla potvrzena sekvenací genů mCPR a wtCPR v klonovacích plasmidech pUC19 [138], pro ověření přítomnosti požadované mutace tedy nebylo potřeba sekvenovat příslušné geny v obou směrech. Výsledky byly porovnány s konsenzuální sekvencí pro potkaní CPR [152] v programu Clustal W (obr. 14, str. 60) [153].

Vzájemné porovnání (obr. 14, str. 60) ukazuje, že gen mCPR opravdu nese tři mutace v polohách 166 (A→C), 571 (A→C) a 764 (T→C). Očekávaná mutace v poloze 166 (A→C) se projeví aminokyselinovou substitucí K56Q. Gen wtCPR obsahuje dvě

mutace v polohách 571 (A→C) a 764 (T→C). Mutace 764 (T→C) se pak projeví záměnou Val za Ala (V255A).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

CPR      ATGGGGGACTCTCACGAAGACACCAGTGCCACCATGCCTGAGGCCGTGGCTGAAGAAGTG  60
wtCPR    ATGGGGGACTCTCACGAAGACACCAGTGCCACCATGCCTGAGGCCGTGGCTGAAGAAGTG  60
mCPR     ATGGGGGACTCTCACGAAGACACCAGTGCCACCATGCCTGAGGCCGTGGCTGAAGAAGTG  60
*****

CPR      TCTCTATTACGACGACGACATGGTTCTGTTTTCTCTCATCGTGGGGTCTCGACCTAC  120
wtCPR    TCTCTATTACGACGACGACATGGTTCTGTTTTCTCTCATCGTGGGGTCTCGACCTAC  120
mCPR     TCTCTATTACGACGACGACATGGTTCTGTTTTCTCTCATCGTGGGGTCTCGACCTAC  120
*****

CPR      TGGTTCATCTTTAGAAAAGAAAAGAGATACCGGAGTTCAGCCAGATCCAAACAACG  180
wtCPR    TGGTTCATCTTTAGAAAAGAAAAGAGATACCGGAGTTCAGCCAGATCCAAACAACG  180
mCPR     TGGTTCATCTTTAGAAAAGAAAAGAGATACCGGAGTTCAGCCAGATCCAAACAACG  180
*****
                               166

CPR      GCCCCACCCGTCAAAAGAGACAGCTTCGTGGAAAAGATGAAGAAAACGGGAAGGAACATT  240
wtCPR    GCCCCACCCGTCAAAAGAGACAGCTTCGTGGAAAAGATGAAGAAAACGGGAAGGAACATT  240
mCPR     GCCCCACCCGTCAAAAGAGACAGCTTCGTGGAAAAGATGAAGAAAACGGGAAGGAACATT  240
*****

CPR      ATCGTATTCTATGGCTCCAGACGGGAACCGCTGAGGAGTTTGCCAAACCGGCTGTCCAAG  300
wtCPR    ATCGTATTCTATGGCTCCAGACGGGAACCGCTGAGGAGTTTGCCAAACCGGCTGTCCAAG  300
mCPR     ATCGTATTCTATGGCTCCAGACGGGAACCGCTGAGGAGTTTGCCAAACCGGCTGTCCAAG  300
*****

CPR      GATGCCACCAGCTACGGGATGCGGGGCATGTCCGACAGCCCTGAAGAGATGACTTGGCC  360
wtCPR    GATGCCACCAGCTACGGGATGCGGGGCATGTCCGACAGCCCTGAAGAGATGACTTGGCC  360
mCPR     GATGCCACCAGCTACGGGATGCGGGGCATGTCCGACAGCCCTGAAGAGATGACTTGGCC  360
*****

CPR      GACCTGAGCAGCCTGCCTGAGATCGACAAGTCCCTGGTAGTCTTCTGCATGGCCACATAC  420
wtCPR    GACCTGAGCAGCCTGCCTGAGATCGACAAGTCCCTGGTAGTCTTCTGCATGGCCACATAC  420
mCPR     GACCTGAGCAGCCTGCCTGAGATCGACAAGTCCCTGGTAGTCTTCTGCATGGCCACATAC  420
*****

CPR      GGAGAGGGCGACCCACGGACAATGCGCGAGGACTTCTATGACTGGCTGCAGGAGACTGAC  480
wtCPR    GGAGAGGGCGACCCACGGACAATGCGCGAGGACTTCTATGACTGGCTGCAGGAGACTGAC  480
mCPR     GGAGAGGGCGACCCACGGACAATGCGCGAGGACTTCTATGACTGGCTGCAGGAGACTGAC  480
*****

CPR      GTGGACCTCACTGGGGTCAAGTTTGTGTATTTGGTCTTGGGAACAAGACCTATGAGCAC  540
wtCPR    GTGGACCTCACTGGGGTCAAGTTTGTGTATTTGGTCTTGGGAACAAGACCTATGAGCAC  540
mCPR     GTGGACCTCACTGGGGTCAAGTTTGTGTATTTGGTCTTGGGAACAAGACCTATGAGCAC  540
*****

CPR      TTCAATGCCATGGCAAGTATGTGGACCAAGGCTGGAGCAGCTTGGCGCCACGCCATC  600
wtCPR    TTCAATGCCATGGCAAGTATGTGGACCAAGGCTGGAGCAGCTTGGCGCCACGCCATC  600
mCPR     TTCAATGCCATGGCAAGTATGTGGACCAAGGCTGGAGCAGCTTGGCGCCACGCCATC  600
*****
                               571

CPR      TTTGAGTTGGGCTTGGTATGATGACGGGAACCTTGGAAAGAGATTTCATCAGTGGAGG  660
wtCPR    TTTGAGTTGGGCTTGGTATGATGACGGGAACCTTGGAAAGAGATTTCATCAGTGGAGG  660
mCPR     TTTGAGTTGGGCTTGGTATGATGACGGGAACCTTGGAAAGAGATTTCATCAGTGGAGG  660
*****

CPR      GAGCAGTTCGGCCAGCTGTGTGCGAGTCTTTGGGGTAGAAGCCACTGGGGAGGAGTCG  720
wtCPR    GAGCAGTTCGGCCAGCTGTGTGCGAGTCTTTGGGGTAGAAGCCACTGGGGAGGAGTCG  720
mCPR     GAGCAGTTCGGCCAGCTGTGTGCGAGTCTTTGGGGTAGAAGCCACTGGGGAGGAGTCG  720
*****

CPR      AGCATTCCGCCAGTATGAGCTCGTGGTCCAGGAACATGGACCTAGCCAAGGTGTACAG  780
wtCPR    AGCATTCCGCCAGTATGAGCTCGTGGTCCAGGAACATGGACCTAGCCAAGGTGTACAG  780
mCPR     AGCATTCCGCCAGTATGAGCTCGTGGTCCAGGAACATGGACCTAGCCAAGGTGTACAG  780
*****
                               764

```

Obr. 14 Porovnání výsledků sekvenace s konsenzuální sekvencí pro CPR

mCPR obsahuje v porovnání s konsenzuální sekvencí pro CPR [152] tři mutace v polohách 166 (A→C), 571 (A→C) a 764 (T→C). wtCPR se liší v polohách 571 (A→C) a 764 (T→C). Mutace 166 a 764 se projeví v záměně aminokyselin K56Q, resp. V255A. Na obrázku je zobrazeno jen 780 kódujících nukleotidů z celkového počtu 2037, odlišnosti od konsenzuální sekvence jsou zvýrazněny červenými obdélníky. Porovnání bylo provedeno v programu Clustal W [153].

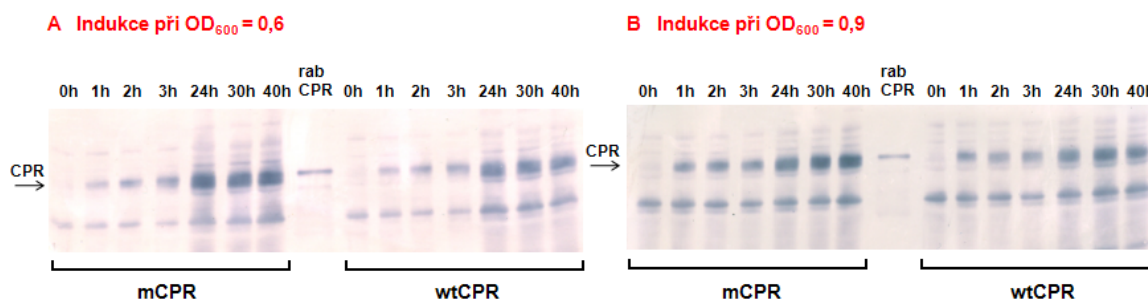
5.2 Ověření podmínek exprese pro mCPR a wtCPR

Před velkoobjemovou produkcí CPR bylo potřeba ověřit, zda expresní podmínky navržené Mgr. Rolandem Kubíkem (pro 100 ml LB média) [138] jsou vhodné a reprodukovatelné i v našem experimentu. Pokusní exprese probíhaly v objemech 20 ml LB média (25 g/l) a jednotlivé podmínky shrnuje tabulka 3.

Tab. 3 Navržené a testované podmínky pro expresi mCPR a wtCPR

Expresní podmínky	Navržené expresní podmínky	Testované expresní podmínky	
Kmen <i>E. coli</i>	BL21(DE3)RIL	BL21(DE3)RIL	BL21(DE3)RIL
Koncentrace ampicilinu	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Indukce exprese při OD ₆₀₀	0,6	0,6	0,9
Výsledná koncentrace riboflavinu	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Výsledná koncentrace IPTG	1 mM	1 mM	1 mM
Doba exprese	40 hod	40 hod	40 hod
Teplota exprese	27 °C	27 °C	27 °C

Kromě navržených expresních podmínek byl dále testován vliv vyšší optické hustoty buněk ($OD_{600} = 0,9$) v momentě indukce na expresi CPR. Testování uvedené podmínky vychází z předpokladu, že při vyšší optické hustotě buněk je přítomno větší množství membrán, což by mohlo mít v případě CPR, jakožto membránového proteinu, pozitivní vliv na jeho inkorporaci. Vzhledem k tomu, že produkce CPR nebyla nijak zvlášť výrazná a z SDS elektroforézy se nedala vhodně kvantifikovat, pro sledování stupně exprese byla zvolena imunochemická detekce CPR pomocí protilátek (viz kap. 4.19, str. 52). Na obr. 15A a 15B je zobrazen průběh exprese mCPR a wtCPR při jednotlivých testovaných podmínkách.



Obr. 15 Průběh exprese mCPR a wtCPR při jednotlivých testovaných podmínkách (imunochemická detekce CPR na PVDF membráně)

A Průběh produkce mCPR a wtCPR při navržených expresních podmínkách (viz tab. 3).

B Průběh produkce mCPR a wtCPR za podmínek, kdy indukce exprese byla provedena při $OD_{600} = 0,9$. Ostatní navržené podmínky byly zachovány (viz tab. 3).

Při elektroforéze byl použit 10% separační gel a jako standard CPR izolovaná z jater králíka (rabCPR). Čísla nad obrázky představují čas od indukce exprese.

Z obr. 15 je patrné, že exprese probíhala v dostatečné míře za obou uvedených podmínek a s přibývajícím časem rostlo i zastoupení CPR. Dále bylo možné pozorovat

v obou případech větší množství mCPR na konci exprese (40 hod) v porovnání s wtCPR, což mohlo být způsobeno právě vyšší proteolytickou stabilitou formy mCPR. Jediný rozdíl byl zaznamenán na konci exprese. Bakteriální kultury indukované při $OD_{600} = 0,6$ měly na konci produkce $OD_{600} = 1,6$ a kultury indukované při $OD_{600} = 0,9$ měly na konci $OD_{600} = 1,1$. Když ale porovnáme množství např. mCPR na obr. 15A a 15B v čase 40 hod, vidíme, že jsou přibližně stejná. To znamená, že v případě indukce při vyšší optické hustotě probíhala exprese účinněji a zastoupení CPR v celkovém množství buněčných proteinů je vyšší (větší množství mCPR v menším počtu buněk). Pro velkoobjemovou produkci CPR byla tedy zvolena varianta s indukcí exprese při $OD_{600} = 0,9$. Uvedené podmínky byly před samotnou produkcí ještě ověřeny kontrolní expresí v 500 ml LB média (výsledky neuvedeny).

5.3 Exprese a purifikace wtCPR

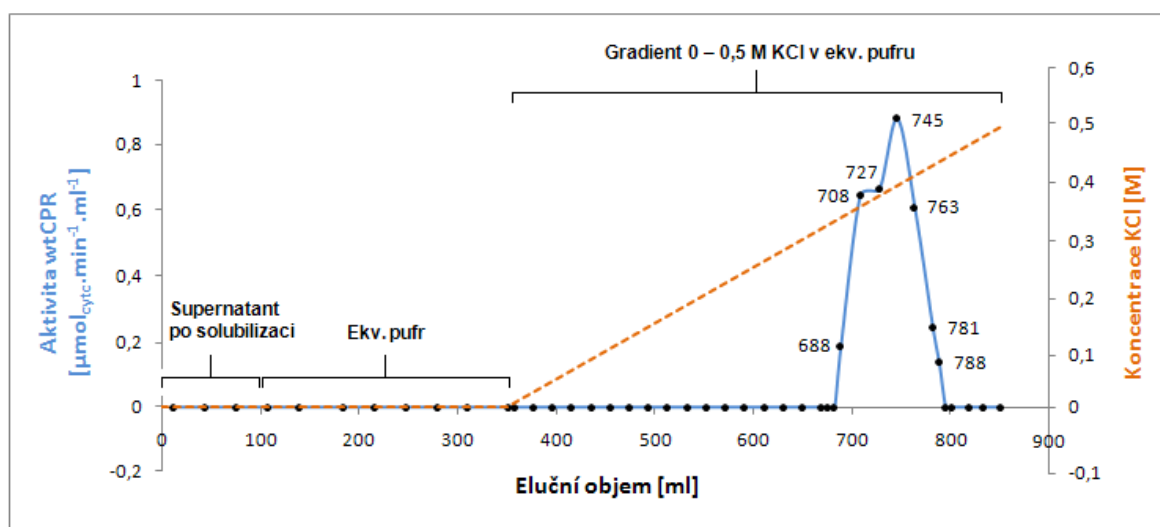
5.3.1 Exprese wtCPR, izolace membránové frakce, solubilizace

Expresa wtCPR probíhala v 4 x 500 ml LB média dle postupu v kap. 4.6 (str. 42) v buňkách *E. coli* BL21(DE3)RIL. Po 40 hodinách od indukce exprese byly buněčné kultury sklizeny a dezintegrovány ultrazvukovým homogenizátorem. Buněčný homogenát o objemu 54 ml vykazoval reduktasovou aktivitu $567 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$. Izolace membránové frakce probíhala dle návodu v kap. 4.11 (str. 45). Získané membrány (peleta po ultracentrifugaci) s inkorporovanou wtCPR byly homogenizovány v solubilizačním pufru. Výsledný objem membránové frakce byl 21 ml a aktivita roztoku byla $174 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$, což odpovídá výtěžku 31 %. Forma wtCPR byla z membránové frakce, naředěné na koncentraci proteinů 4 mg/ml, solubilizována (kap. 4.12, str. 45) pomocí detergentů (cholát sodný, E-911). Získaný supernatant po solubilizaci (96 ml) obsahoval $164 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$ reduktasové aktivity (výtěžek 29 %).

5.3.2 Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B

Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy probíhala podle návodu v kap. 4.13.1 (str. 46). Na ekvilibrovanou kolonu DEAE Sepharosy byl aplikován supernatant po solubilizaci rychlostí 1 ml/min (sbírané frakce 10 ml). Za daných podmínek (pH 7,4) je

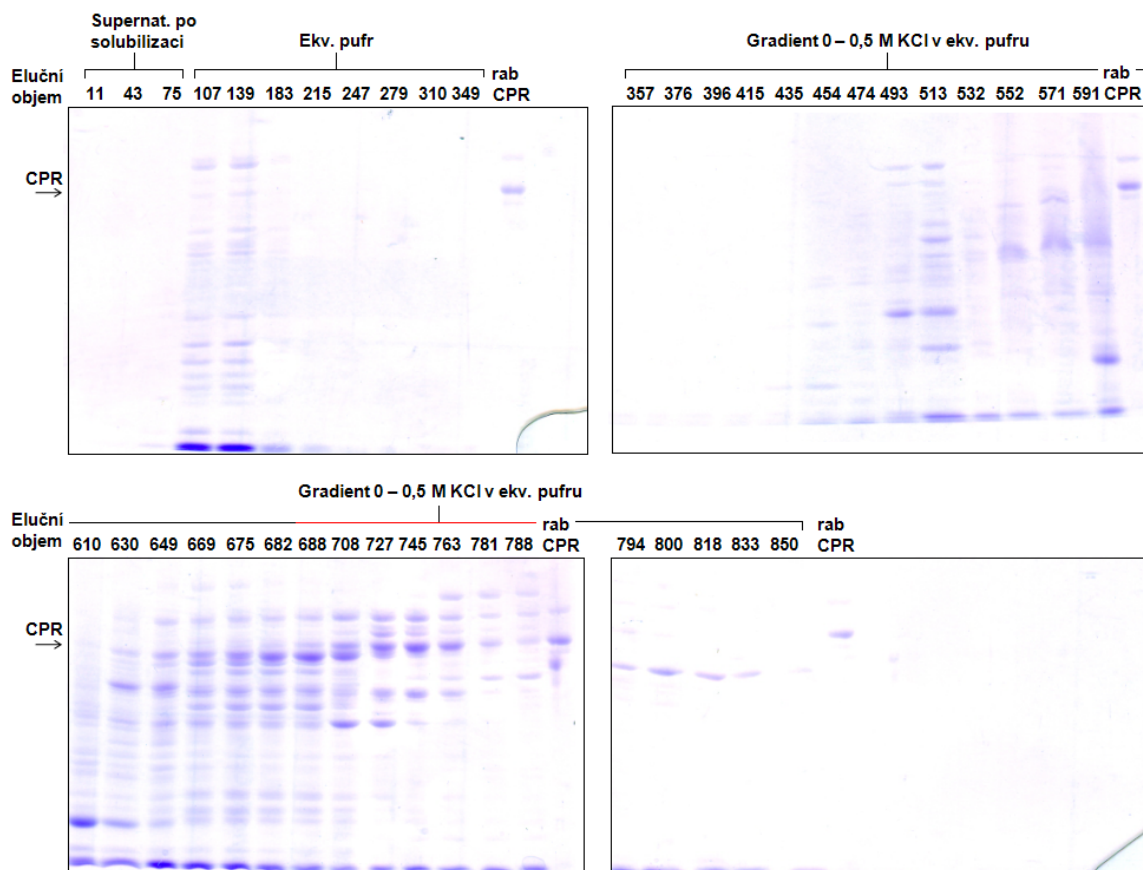
CPR nabitá záporně (teoretické $pI_{CPR}=5,30$ [154]) a váže se tudíž na kladně nabitý nosič. Pro následující eluci wtCPR byl použit gradient iontové síly 0 – 0,5 M KCl. Sbírané frakce během eluce měly objem přibližně 7 ml. Průběh chromatografie byl sledován měřením enzymové aktivity wtCPR v jednotlivých frakcích a je zobrazen na obr. 16. Během chromatografie nebylo možné sledovat eluci proteinů při 280 nm, protože v této oblasti silně absorbuje i použitý detergent E-911 [155] a výrazně tak zkresluje naměřené hodnoty. Přítomnost CPR lze sledovat i spektrofotometricky při 456 nm, kdy je množství CPR určováno z obsahu flavinů (extinkční koeficient $21,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [132]. Uvedená spektrofotometrická metoda je však relativně málo citlivá a proto bylo upřednostněno stanovování enzymové aktivity CPR v jednotlivých frakcích.



Obr. 16 Průběh chromatografie na koloně DEAE Sepharosy (wtCPR)

Průběh chromatografie byl sledován stanovováním enzymové aktivity wtCPR v jednotlivých frakcích a je znázorněn modrou křivkou. Černé tečky značí vzorky, které byly použity při SDS elektroforéze. Čísla u frakcí reprezentují příslušný eluční objem (jen u vzorků s reduktašovou aktivitou). Křivka oranžové barvy představuje koncentraci KCl. V grafu jsou uvedeny i použité roztoky v jednotlivých fázích chromatografie (přesné složení v kap. 4.13.1, str. 46).

Z chromatogramu na obr. 16 je patrné, že se wtCPR vázala na nosič a nebyla eluována při nanášení supernatantu po solubilizaci ani během promývání kolony ekvilibračním pufrům. K eluci wtCPR docházelo až při vyšší iontové síle (cca 0,4 M KCl) v rozmezí elučních objemů 688 – 788 ml, s maximem aktivity při 745 ml. Z jednotlivých frakcí získaných v průběhu chromatografie byla provedena SDS elektroforéza (obr. 17, str. 64).



Obr. 17 SDS elektroforéza frakcí z průběhu chromatografie na koloně DEAE Sepharosy (wtCPR)

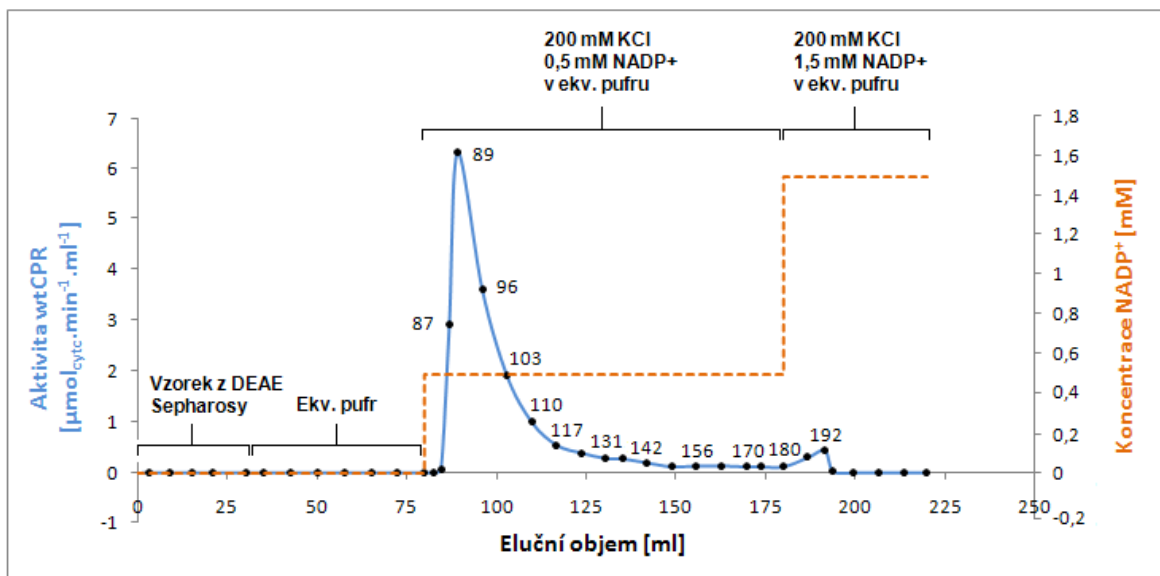
Čísla vyjadřují příslušné eluční objemy frakcí v průběhu chromatografie. Nad čísla jsou rámečky vyznačeny fáze chromatografie i s příslušnými použitými roztoky. Červená čára značí frakce obsahující wtCPR (eluční objemy 688 – 788), které byly spojeny a použity při další práci. Pro elektroforézu byl použit 10% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR).

SDS elektroforéza z průběhu chromatografie na DEAE Sepharose (obr. 17) ukazuje, že wtCPR byla eluována ve frakcích odpovídajících elučním objemům 688 – 788 ml, což odpovídá i výsledkům z měření enzymových aktivit. Zmíněné frakce byly spojeny, zahuštěny na objem 30 ml a dialyzovány 12 hodin proti 2000 ml dialyzačního pufru. Reduktasová aktivita ve vzorku po dialýze byla $138 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$ (výtěžek 24 %). Jelikož je z SDS elektroforézy patrné, že frakce obsahující wtCPR jsou do značné míry kontaminované dalšími proteiny, byla v další fázi purifikace použita chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy.

5.3.3 Chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy 4B

Afinitní chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy probíhala podle návodu v kap. 4.13.2 (str. 47). 2'5' ADP, který je pomocí 1,6-diaminohexanu navázán na molekuly Sepharosy, je analogem NADP^+ a specificky váže NADP^+ dependentní enzymy (neváže NAD^+ dependentní enzymy) [156]. Jelikož tyto proteiny mají vůči NADP^+ vyšší afinitu než vůči 2'5' ADP, pro jejich vyvázání z nosiče a následnou eluci se využívá pufr s přídavkem NADP^+ nebo někdy i s přídavkem 2' AMP [131,157] (2'-AMP – kompetitivní inhibitor CPR [158]). Při purifikaci CPR slouží tento chromatografický krok i k odstranění neiontového detergentu E-911 ze vzorku a k jeho nahrazení cholátem sodným.

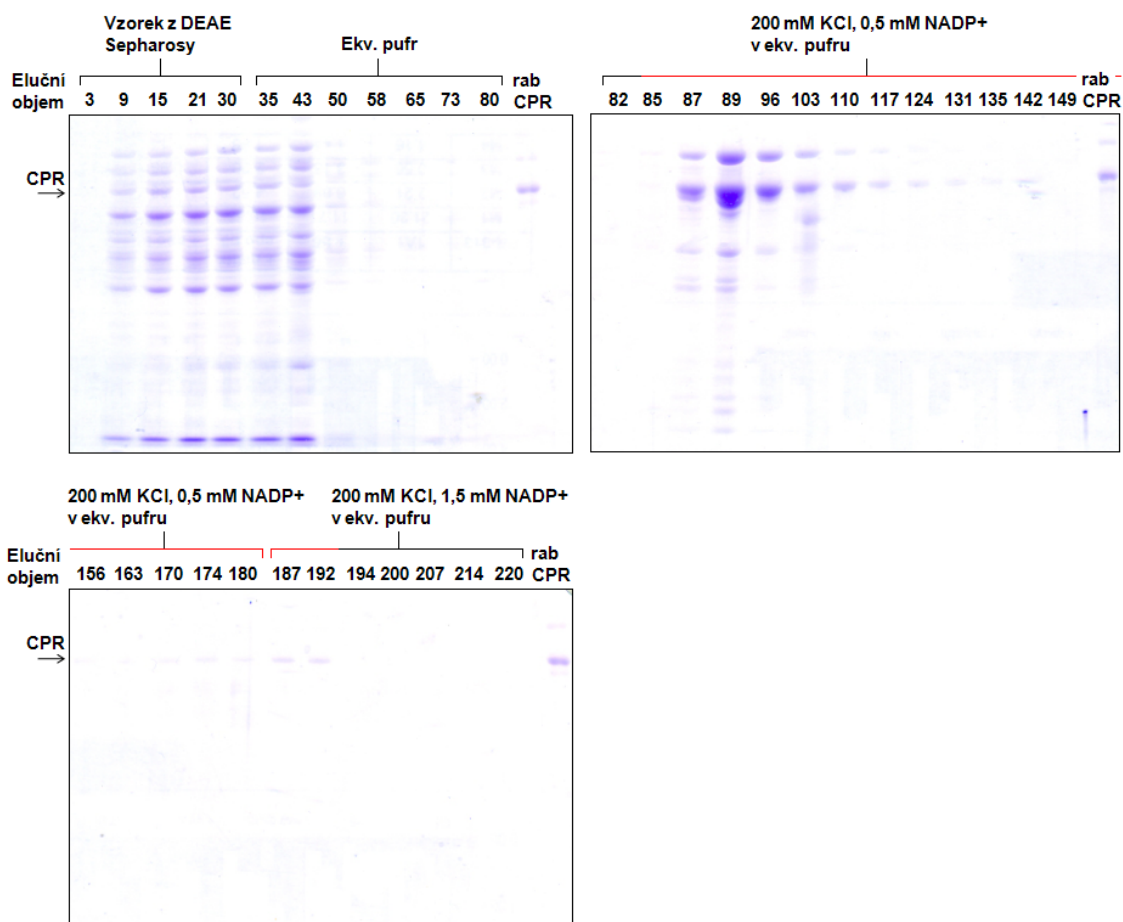
Dialyzovaná frakce (30 ml) po DEAE Sepharose, obsahující wtCPR, byla po úpravě pH na hodnotu 7,0 nanesena na kolonu 2'5' ADP Sepharosy rychlostí 0,5 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml ekvilibračního pufru a zároveň byly sbírány frakce po 2 – 3 ml. Pro uvolnění wtCPR z kolony byl použit eluční pufr s vyšší iontovou silou (200 mM KCl) a 0,5 mM NADP^+ . I po ukončení eluce však stále přetrvávala reduktasová aktivita v příslušných frakcích a proto byla kolona ještě promyta 40 ml pufru s 1,5 mM koncentrací NADP^+ a 200 mM KCl. Celý průběh chromatografie zobrazuje obr. 18 (str. 66).



Obr. 18 Průběh chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy (wtCPR)

Průběh chromatografie byl sledován stanovováním enzymové aktivity wtCPR v jednotlivých frakcích a je znázorněn modrou křivkou. Černé tečky značí vzorky, které byly použity při SDS elektroforéze. Čísla u vybraných frakcí s reduktašovou aktivitou reprezentují příslušný eluční objem. Křivka oranžové barvy představuje koncentraci NADP^+ . V grafu jsou uvedeny i použité roztoky v jednotlivých fázích chromatografie (přesné složení v kap. 4.13.2, str. 47).

Z obr. 18 je zřejmé, že wtCPR byla eluována už krátce po aplikaci pufru s $0,5 \text{ mM NADP}^+$ ve frakcích odpovídajících objemům 87 – 192 ml, s maximem aktivity při 89 ml. Po strmém nárůstu aktivity docházelo k jejímu pozvolnému poklesu na minimální hodnoty. Zbytek wtCPR se podařilo z kolony vymýt pomocí pufru s $1,5 \text{ mM NADP}^+$ a 200 mM KCl . Pro ověření čistoty wtCPR v jednotlivých frakcích byla provedena SDS elektroforéza (obr. 19, str. 67).



Obr. 19 SDS elektroforéza frakcí z průběhu chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy (wtCPR)

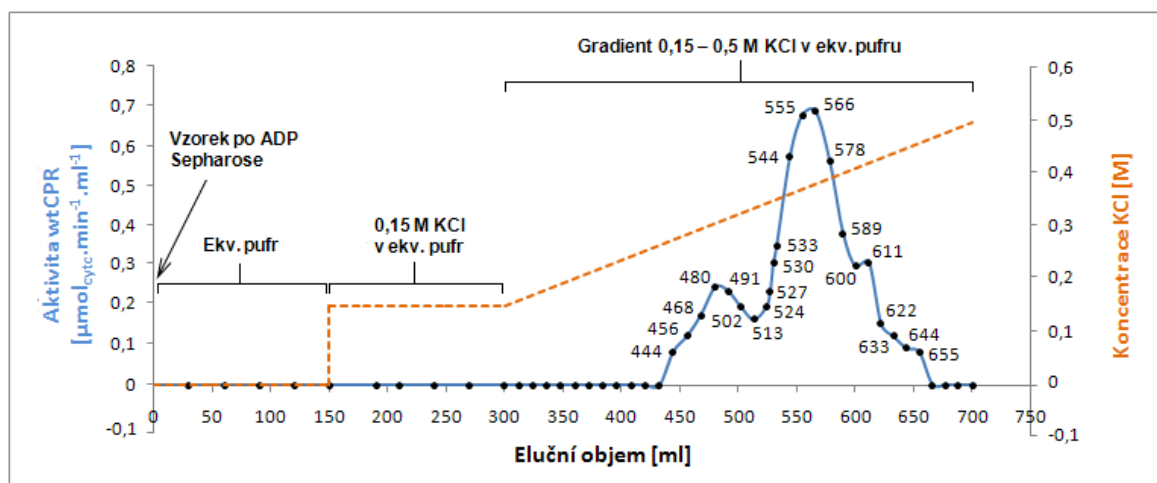
Čísla vyjadřují příslušné eluční objemy frakcí v průběhu chromatografie. Nad čísla jsou rámečky vyznačeny fáze chromatografie i s příslušnými použitými roztoky. Červená čára značí frakce obsahující wtCPR (eluční objemy 85 – 192), které byly spojeny a použity při další práci. Pro elektroforézu byl použit 10% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR).

Na obrázku z SDS elektroforézy lze pozorovat, že velká část balastních proteinů byla odstraněna už během nanášení vzorku a promývání kolony. Došlo tedy k výraznému načištění wtCPR, ale stále byly přítomné i jiné proteinové kontaminanty. Z SDS elektroforézy frakcí odpovídajících elučním objemům 87 nebo 89 ml je vidět, že těsně pod zónou kde se nachází wtCPR se vyskytuje i jiný, vysoce zastoupený protein. V tomto případě by se mohlo jednat o CPR štěpenou v proteolyticky senzitivním místě (Lys56 – Ile57). Podle SDS elektroforézy a enzymových aktivit byly spojeny frakce odpovídající elučním objemům 85 – 192 ml. Po zahuštění na 25 ml byl vzorek dialyzován 12 hodin proti 4000 ml dialyzačního pufru a poté byl zahuštěn na objem 2,9 ml. Zahuštěná frakce vykazovala aktivitu $103 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$, což představuje výtěžek 18 %. Vzhledem

k přítomnosti balastních proteinů bylo zvoleno ještě finální přečištění na koloně DEAE Sepharosy.

5.3.4 Rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B

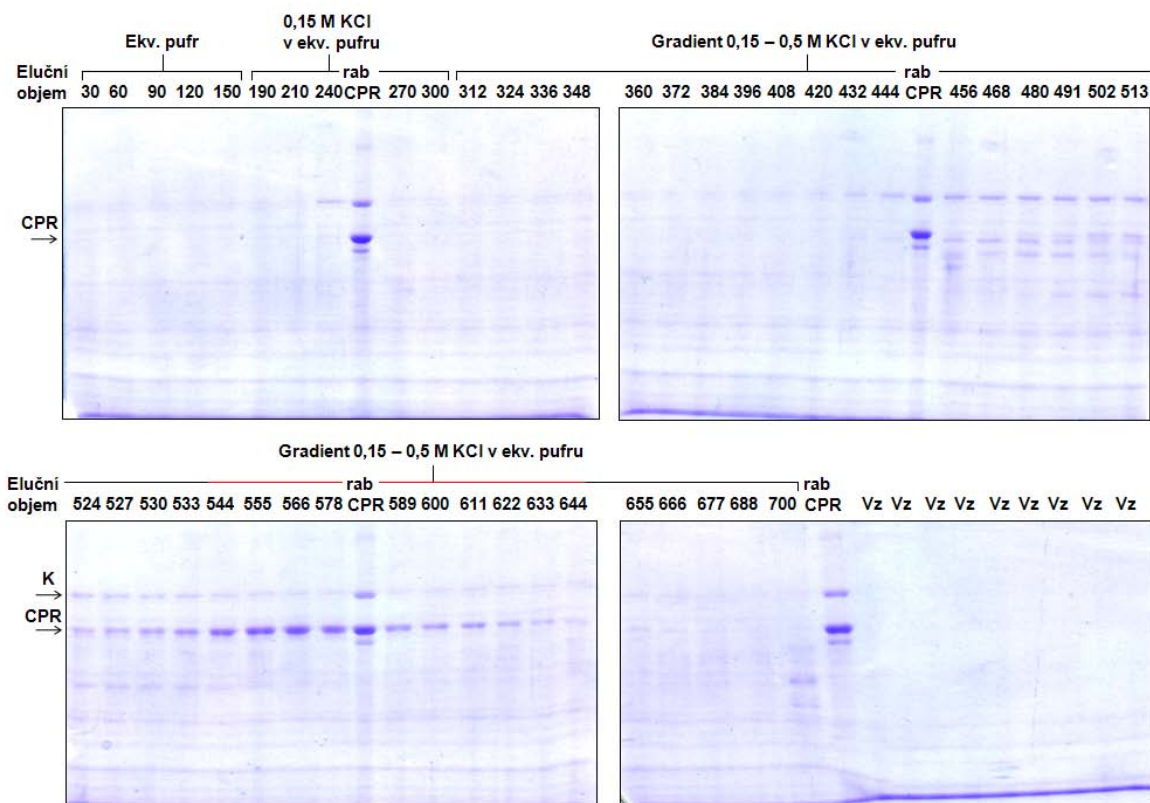
Na ekvilibrovanou kolonu DEAE Sepharosy byl nanesen zahuštěný vzorek po 2'5' ADP Sepharose (cca 3 ml), promyt 150 ml ekvilibračního pufru a 150 ml 0,15 M KCl v ekvilibračním pufru. Zvýšenou iontovou silou by mělo dojít k vyplavení části kontaminujících proteinů přítomných ve vzorku. Pro eluci wtCPR byl použit lineární gradient 0,15 – 0,5 M KCl v ekvilibračním pufru. Z promývání kolony a eluce wtCPR byly sbírány frakce o objemu 10, resp. 3 – 4 ml. Průběh chromatografie znázorňuje obr. 20.



Obr. 20 Průběh rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy (wtCPR)

Průběh chromatografie byl sledován stanovováním enzymové aktivity wtCPR v jednotlivých frakcích a je znázorněn modrou křivkou. Černé tečky značí vzorky, které byly použity při SDS elektroforéze. Čísla u frakcí reprezentují příslušný eluční objem (jen u vzorků s reduktašovou aktivitou). Křivka oranžové barvy představuje koncentraci KCl. Nanesení vzorku z ADP Sepharosy (3 ml) je označeno šipkou. V grafu jsou uvedeny i použité roztoky v jednotlivých fázích chromatografie (přesné složení v kap. 4.13.3, str. 48).

Na chromatogramu (obr. 20) je možné pozorovat, že wtCPR byla eluována z kolony ve frakcích odpovídajících elučním objemům 444 – 655 ml, s maximy aktivit při 480 a 566 ml. Dvě maxima reduktašových aktivit v průběhu gradientu by mohly poukazovat na jemnou odlišnost wtCPR v příslušných stádiích eluce. Z jednotlivých frakcí z průběhu chromatografie byla dále provedena SDS elektroforéza (obr. 21, str. 69).



Obr. 21 SDS elektroforéza frakcí z průběhu rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy (wtCPR)

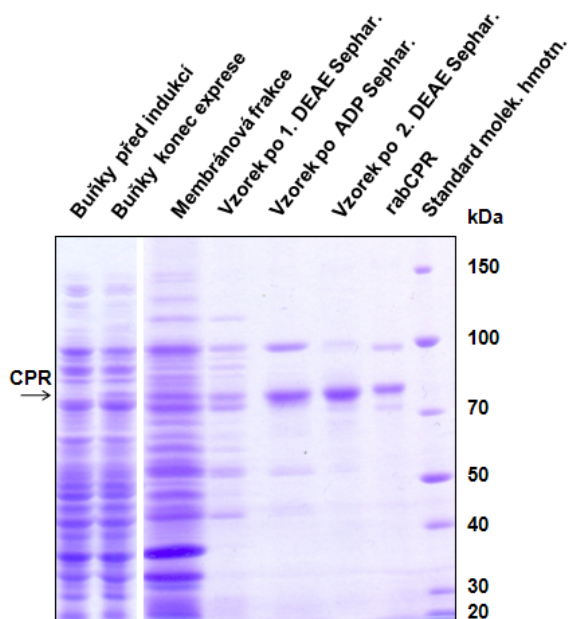
Čísla vyjadřují příslušné eluční objemy frakcí v průběhu chromatografie. Nad čísla jsou rámečky vyznačeny fáze chromatografie i s příslušnými použitými roztoky. Červená čára značí frakce obsahující wtCPR (eluční objemy 544 – 644 ml), které byly spojeny a použity při další práci. Vz = vzorkový redukcující pufr pro elektroforézu, K = nejvíc zastoupený kontaminantní protein. Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR).

I když měření enzymové aktivity ukázalo, že wtCPR byla přítomna již od elučního objemu 444 ml, na SDS elektroforéze je patrná až od 480 ml. Puftrem s vyšší iontovou silou (0,15 M KCl) se nepodařilo odstranit významnější podíl balastních proteinů, ty byly eluovány až v průběhu gradientu v rozmezí 360 – 513 ml (iontová síla 0,2 – 0,32 M KCl). V následujících frakcích již bylo eluováno i větší množství wtCPR. Přetrvávala však přítomnost kontaminanty s vyšší molekulovou hmotností (označ. K na obr. 21), která přibližně odpovídá i proteinu ve vzorku standardu CPR. Určité množství této kontaminanty se podařilo odstranit ve frakcích 360 – 513 ml. I když uvedené frakce vykazovaly reduktasovou aktivitu, kvůli jejich značnému znečištění nebyly použity při další práci. Relativně nejčistější byly frakce odpovídající elučním objemům 544 – 644 ml, které byly spojeny, zahuštěny na objem 30 ml a spolu s přidáním FMN (150 μ l) dialyzovány 12 hodin proti 4000 ml pufru. Dialyzovaný vzorek byl zahuštěn na 1,8 ml, zamražen v 50 μ l

aliquotech v tekutém dusíku a skladován při -80°C . Aktivita finálního preparátu byla $23 \mu\text{mol}_{\text{cyt.c.}}\cdot\text{min}^{-1}$, což představuje výtěžek 4 %.

5.3.5 Shrnutí purifikace wtCPR

Za účelem vzájemného porovnání obsahu a čistoty wtCPR v jednotlivých fázích exprese a purifikace byla provedena SDS elektroforéza, která je zobrazena na obr. 22.



Obr. 22 SDS elektroforéza frakcí z průběhu exprese a purifikace wtCPR

Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR). Detailnější popis obrázku v textu.

Na obr. 22 lze pozorovat, že buňky na konci exprese (po 40 hodinách od indukce) obsahovaly v porovnání s buňkami před indukcí znatelný nárůst wtCPR. Další důležitou podmínkou pro získání nativního proteinu a následnou purifikaci, je jeho přítomnost v bakteriálních membránách. Záznam z SDS elektroforézy (membránová frakce) potvrzuje, že wtCPR byla úspěšně inkorporována do membrán a mohla tedy být solubilizována pomocí detergentů. Solubilizací a následnou chromatografií na DEAE Sepharose se podařilo oddělit značnou část proteinů (Vzorek po 1. DEAE Sephar.), ovšem podle očekávání, největší načištění proběhlo na afinitní koloně 2'5' ADP Sepharosy. I po tomto chromatografickém kroku však přetrvávaly ve vzorku proteinové kontaminanty (Vzorek po ADP Sephar.). Jelikož 2'5' ADP Sepharosa neváže pouze CPR, ale také jiné proteiny využívající jako kofaktor NADP^+ , mohou se tyto vázat na kolonu a následně se eluovat spolu s CPR. Další příčinou může být i nespecifická vazba některých proteinů na

nosič. Nejvíce zastoupenou kontaminantou po ADP Sepharose byl protein o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa. Ten se podařilo částečně odstranit opětovným přečištěním na koloně DEAE Sepharosy (Vzorek po 2. DEAE Sephar.). Spolu s uvedeným proteinem se povedlo do určité míry oddělit i kontaminanty s nižší molekulovou hmotností. Během purifikace byly měřeny i příslušné charakteristiky jednotlivých preparátů (enzymová aktivita, koncentrace proteinů), které shrnuje tab. 4.

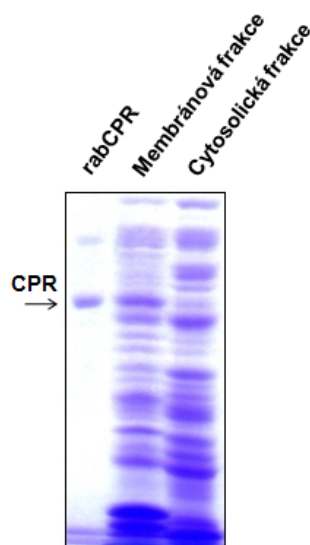
Tab. 4 Celkový průběh purifikace wtCPR

	Objem [ml]	Koncentrace proteinů [mg.ml ⁻¹]	Aktivita [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min ⁻¹ .ml ⁻¹]	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	Celková aktivita v objemu [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min ⁻¹]	Výtěžek
Buněčný homogenát	54	24,3	10,5	0,4	567	100 %
Membránová frakce	21	16,8	8,3	0,5	174	31 %
Supernatant po solubilizaci	96	1,13	1,7	1,5	164	29 %
Vzorek po 1. DEAE Sephar.	30	1,2	4,6	3,8	138	24 %
Vzorek po ADP Sephar.	2,9	2,3	35,3	15,3	103	18 %
Vzorek po 2. DEAE Sephar.	1,8	0,8	12,7	16,5	23	4 %

Čistota jednotlivých preparátů obsahujících wtCPR je charakterizována hodnotou specifické aktivity ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), čili aktivity ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) vztažené na koncentraci proteinů v daném vzorku. Z tab. 4 můžeme vidět, že hodnota této charakteristiky rostla po každém purifikačním kroku z hodnoty 0,4 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ v buněčném homogenátu až po 16,5 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ve finálním preparátu (faktor načištění – 41). Největší načištění proběhlo podle očekávání na koloně 2'5' ADP Sepharosy, kdy se specifická aktivita zvýšila z 3,8 na 15,3 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Při finálním pročištění na koloně DEAE Sepharosy byl zaznamenán nárůst specifické aktivity jen o 8 % (z 15,3 na 16,5 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Hodnota celkové aktivity představuje výtěžek izolace, to znamená množství funkční wtCPR (schopné redukovat cytochrom c) v příslušném objemu vzorku. V případě buněčného homogenátu (vzorek po ultrazvukové lýzi buněk) můžeme tuto hodnotu

považovat i za stupeň exprese dané formy CPR. Její klesající hodnota v průběhu izolace představuje ztráty wtCPR v jednotlivých krocích purifikace nebo postupnou denuraci funkčního proteinu. Z tab. 4 (str. 71) je vidět, že výrazné jsou především ztráty při izolaci membránové frakce nebo při rechromatografii na koloně DEAE Sepharosy. V prvním zmíněném případě bylo „ztraceno“ až 69 % ($393 \mu\text{mol}_{\text{cyt.c}} \cdot \text{min}^{-1}$) wtCPR schopné redukovat cytochrom c. Do zmíněných 69 % patří především ty formy wtCPR, které buď nebyly vůbec inkorporovány do membrány, nebo ty, které byly inkorporovány do membrány, ale následně štěpeny proteolytickými enzymy za vzniku solubilní formy wtCPR [132]. Obě formy jsou schopné redukovat cytochrom c a výrazně tak přispívaly k celkové aktivitě buněčného homogenátu. Jejich oddělení v cytosolické frakci ($386 \mu\text{mol}_{\text{cyt.c}} \cdot \text{min}^{-1}$) v průběhu izolace membrán se podílelo z 98 % na uvedené ztrátě. I když cytosolická frakce obsahovala velkou část (68 %) celkové reduktasové aktivity přítomné v buněčném homogenátu, z obr. 23 (str. 73) je patrné, že zastoupení proteinu o molekulové hmotnosti odpovídající standardu (rabCPR) je minimální. To znamená, že zmíněná vysoká aktivita cytosolické frakce byla způsobena především proteolytickými štěpy o nižší molekulové hmotnosti a ne nativní 78 kDa formou. V případě rechromatografie na koloně DEAE Sepharosy byla preferována vyšší čistota wtCPR před celkovým výtěžkem a proto do finálního preparátu nebyly zahrnuty frakce obsahující větší množství kontaminujících proteinů. V případě, že mírné zastoupení kontaminujících proteinů nevedí při dalších prováděných studiích, lze tento purifikační krok vynechat. Oba uvedené případy spoluzodpovídaly za ztrátu 83 % celkové reduktasové aktivity. Za zmínku stojí i relativně vysoká účinnost solubilizace, kdy bylo získáno až 94 % wtCPR přítomné v bakteriálních membránách. Celkově se tedy z původního množství aktivní wtCPR ($567 \mu\text{mol}_{\text{cyt.c}} \cdot \text{min}^{-1}$) podařilo získat $23 \mu\text{mol}_{\text{cyt.c}} \cdot \text{min}^{-1}$ o specifické aktivitě $16,5 \mu\text{mol}_{\text{cyt.c}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, což představuje výtěžek 4 %.



Obr. 23 SDS elektroforéza membránové a cytosolické frakce z purifikace wtCPR
 Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR). Detailnější popis obrázku v předchozím textu.

5.4 Exprese a purifikace mCPR

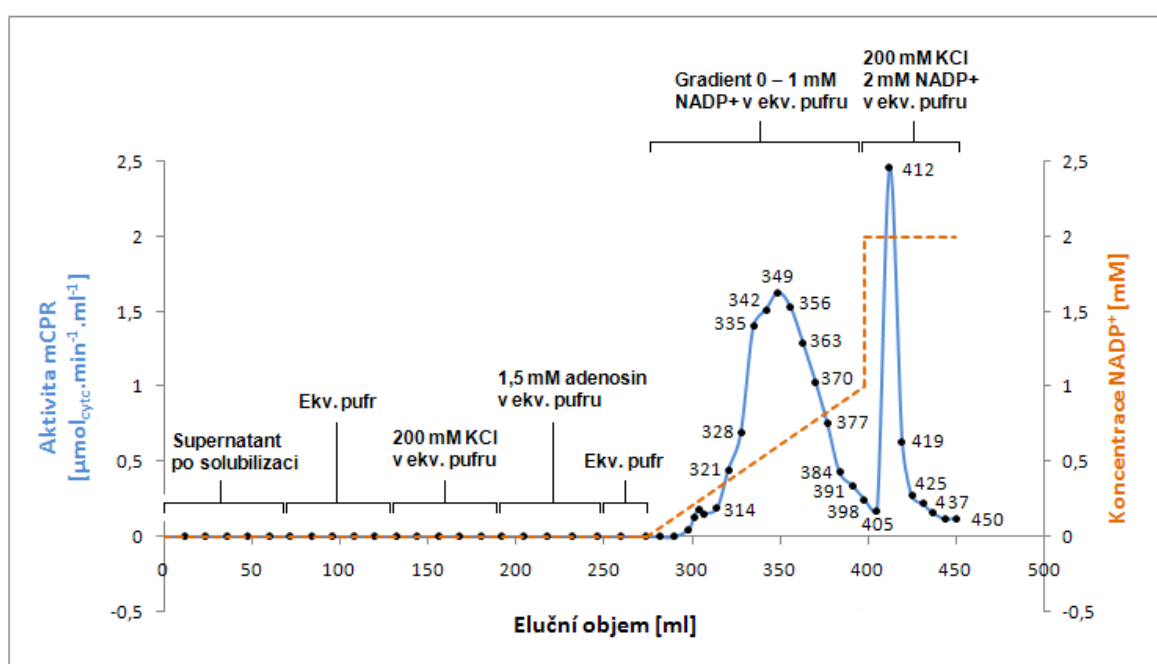
5.4.1 Exprese mCPR, izolace membránové frakce, solubilizace

Expresa mCPR probíhala v 4 x 500 ml LB média dle postupu v kap. 4.6 (str. 42) v buňkách *E. coli* BL21(DE3)RIL. Po 40 hodinách od indukce exprese byly buněčné kultury sklizeny a dezintegrovány ultrazvukovým homogenizátorem. Buněčný homogenát o objemu 54 ml vykazoval reduktasovou aktivitu $625 \mu\text{mol}_{\text{cyt.}}\cdot\text{min}^{-1}$. Izolace membránové frakce probíhala dle návodu v kap. 4.11 (str. 45). Získané membrány (peleta po ultracentrifugaci) s inkorporovanou mCPR byly homogenizovány v příslušném pufru. Výsledný objem membránové frakce byl 21 ml a aktivita tohoto roztoku byla $187 \mu\text{mol}_{\text{cyt.}}\cdot\text{min}^{-1}$, což odpovídá výtěžku 30 %. Forma mCPR byla solubilizována (kap. 4.12, str. 45) z membrán pomocí detergentů (cholát sodný, E-911). Supernatant po solubilizaci (78 ml) obsahoval $179 \mu\text{mol}_{\text{cyt.}}\cdot\text{min}^{-1}$ reduktasové aktivity (výtěžek 29 %).

5.4.2 Chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy 4B

Vzhledem k časové náročnosti předchozí izolace wtCPR a nízkým výtěžkům byl pro purifikaci mCPR zvolen mírně modifikovaný postup Huanga [131] s využitím jednoho chromatografického kroku na afinitní koloně 2'5' ADP Sepharosy (kap. 4.14.1, str. 49).

Supernatant po solubilizaci (78 ml) byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu 2'5' ADP Sepharosy rychlostí 0,5 ml/min a postupně promýván ekvilibračním pufrům, pufrům se zvýšenou iontovou silou (200 mM KCl v ekv. pufru), pufrům s 1,5 mM adenosinem a nakonec opět ekvilibračním pufrům. Pufr se zvýšenou iontovou silou nebo s přidáním adenosinem by měly pomoci při eluci proteinů nespecificky navázaných na kolonu. Z nanášení supernatantu a promývání kolony byly sbírány frakce po 4 – 5 ml. Pro eluci mCPR byl použit lineární gradient 0 – 1 mM NADP⁺ v ekvilibračním pufru. Na závěr byla kolona ještě promyta pufrům s 200 mM KCl a 2 mM NADP⁺ (sbírány frakce po 2 – 3 ml). Průběh chromatografie je zobrazen na obr. 24.

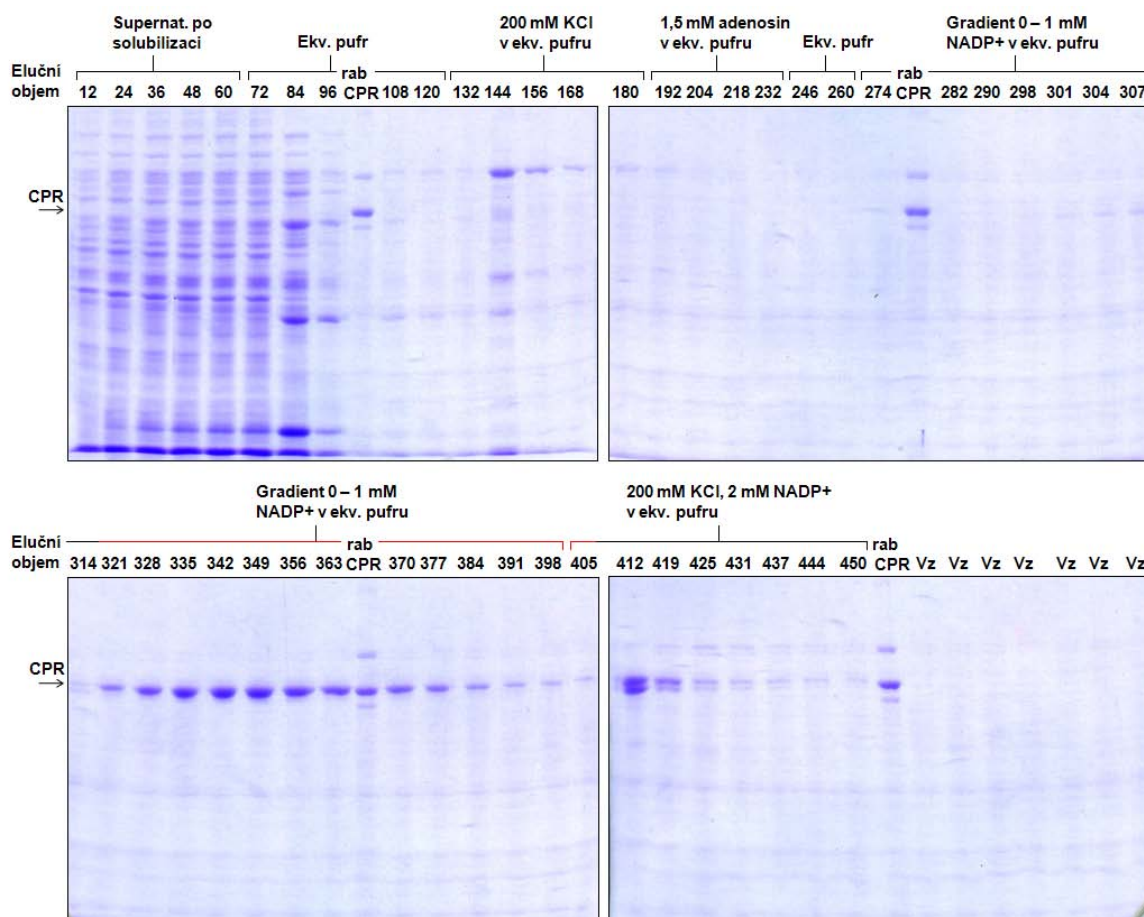


Obr. 24 Průběh chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy (mCPR)

Průběh chromatografie byl sledován stanovováním enzymové aktivity mCPR v jednotlivých frakcích a je znázorněn modrou křivkou. Černé tečky značí vzorky, které byly použity při SDS elektroforéze. Číslo u vybraných frakcí s reduktasovou aktivitou reprezentují příslušný eluční objem. Křivka oranžové barvy představuje koncentraci NADP⁺. V grafu jsou uvedeny i použité roztoky v jednotlivých fázích chromatografie (přesné složení v kap. 4.14.1, str. 49).

Z obr. 24 je vidět, že během nanášení supernatantu po solubilizaci a promývání kolony nedocházelo k uvolňování mCPR, ale všechna se vážala na nosič. K eluci mCPR docházelo v rozmezí elučních objemů 298 – 450 ml, s maximy aktivit při 349 a 412 ml. Maximum při 412 ml bylo způsobeno aplikací pufru se zvýšenou iontovou silou (200 mM KCl) a také s vyšší koncentrací NADP⁺ (2 mM), což vedlo ke skokové eluci reduktasové

aktivity navázané na nosič. Uvedená skutečnost zároveň poukazuje na odlišnost mCPR eluované při maximech 349 a 412 ml. Pro ověření čistoty mCPR v jednotlivých frakcích z průběhu chromatografie byla provedena elektroforéza (obr. 25).



Obr. 25 SDS elektroforéza frakcí z průběhu chromatografie na koloně 2'5' ADP Sepharosy (mCPR)

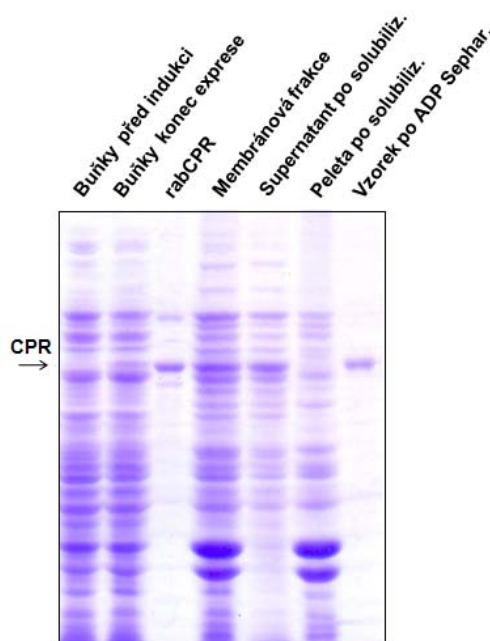
Čísla vyjadřují jednotlivé eluční objemy frakcí v průběhu chromatografie. Nad čísla jsou rámečky vyznačeny fáze chromatografie i s příslušnými použitými roztoky. Červená čára značí frakce obsahující mCPR (eluční objemy 321 – 405 ml), které byly spojeny a použity při další práci. Vz = vzorkový redukující pufr pro elektroforézu. Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR).

Z obr. 25 je patrné, že během nanášení supernatantu po solubilizaci a promývání kolony byla oddělena velká část balastních proteinů. Formu mCPR lze pozorovat ve frakcích odpovídajících objemům 307 – 450 ml. Frakce 412 – 450 ml sice obsahovaly značné množství reduktasové aktivity, ale byly znečištěny proteinem o nižší molekulové hmotnosti než samotná mCPR. Vzhledem k vysoké aktivitě těchto frakcí může zmíněný protein představovat proteolyticky pozměněnou mCPR. S největší pravděpodobností se však nejedná o 72 kDa formu štěpenou v proteolyticky labilním místě (Lys56 – Ile57),

protože jak se ukázalo později, během trypsinové proteolýzy, tato forma CPR putuje na SDS elektroforéze o něco níže (viz kap. 5.6, str. 81). Nejčistější protein byl eluován v rozmezí objemů 321 – 405 ml, tedy v průběhu lineárního gradientu 0 – 1 mM NADP⁺. I tady se ale zdá, že jsou ve vzorcích minoritně přítomné jiné balastní proteiny. Stejně proteiny jsou však vidět i v částech gelu, které obsahovaly jen čistý vzorkový redukující pufr pro SDS elektroforézu (označ. Vz, obr. 25, str. 75). To znamená, že uvedené znečištění bylo způsobeno právě použitým vzorkovým pufrem. Při použití jiného vzorkového pufru pro SDS elektroforézu již nebyly uvedené nečistoty pozorovány (viz např. kap. 5.5, obr. 27, str. 78). Spojené frakce odpovídající elučním objemům 321 – 405 ml byly zahuštěny na objem 35 ml a po přidání FMN dialyzovány 12 hodin proti 4000 ml pufru. Vzorek byl zahuštěn na objem 3 ml, 50 μ l alikvoty byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C. Finální vzorek obsahoval 57 μ mol_{cyt.c.}min⁻¹ reduktasové aktivity, což představuje výtěžek 9 %.

5.4.3 Shrnutí purifikace mCPR

Pro vizualizaci průběhu exprese a purifikace mCPR byla provedena SDS elektroforéza (obr. 26), ze které lze porovnat čistotu a zastoupení mCPR v jednotlivých fázích izolace.



Obr. 26 SDS elektroforéza frakcí z průběhu exprese a purifikace mCPR

Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR). Detailnější popis v textu.

Podobně jako v případě wtCPR, i tady lze pozorovat znatelný nárůst mCPR v buněčných kulturách na konci exprese a také její přítomnost v bakteriálních membránách (membránová frakce). Obr. 26 (str. 76) dokumentuje i vysokou účinnost solubilizace, kdy prakticky všechna mCPR byla z membrán solubilizována pomocí detergentů, což dokazuje její vysoké zastoupení v supernatantu po solubilizaci a naopak, téměř nepřítomnost v peletě. Zároveň se solubilizací podařilo oddělit i značnou část balastních proteinů. Forma mCPR byla purifikována jedním chromatografickým krokem na koloně 2'5'ADP Sepharosy, kterým se podařilo získat elektroforeticky téměř čistý protein. Z SDS elektroforézy lze odhadnout čistotu proteinu na 95 %. Průběh purifikace byl sledován měřením enzymové aktivity mCPR a stanovením koncentrace proteinů. Příslušné hodnoty jsou shrnuty v tab. 5.

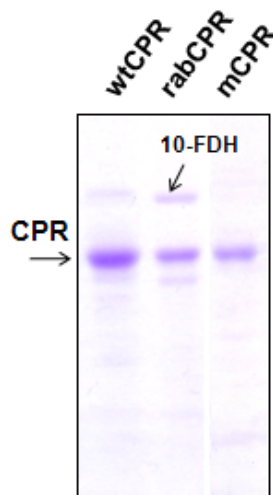
Tab. 5 Celkový průběh purifikace mCPR

	Objem [ml]	Koncentrace proteinů [mg.ml ⁻¹]	Aktivita [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min ⁻¹ .ml ⁻¹]	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	Celková aktivita v objemu [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min ⁻¹]	Výtěžek
Buněčný homogenát	54	22,8	11,6	0,51	625	100 %
Membránová frakce	21	10,9	8,9	0,82	187	30 %
Supernatant po solubilizaci	78	1,12	2,3	2,1	179	29 %
Vzorek po ADP Sephars.	3	0,91	19,1	21,0	57	9 %

Specifická aktivita, charakterizující čistotu mCPR, během purifikace vzrostla z hodnoty 0,51 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min⁻¹.mg⁻¹ v buněčném homogenátu až na 21,0 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min⁻¹.mg⁻¹ ve finálním preparátu (faktor načištění – 42). Z původního množství 625 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min⁻¹ mCPR se podařilo získat 57 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min⁻¹ o specifické aktivitě 21 $\mu\text{mol}_{\text{cytc}}$.min⁻¹.mg⁻¹, což představuje výtěžek 9 %. Při purifikaci byl preferován zisk co možná nejčistější a především nativní formy CPR před celkovým výtěžkem. Jednotlivé kroky a příčiny největších ztrát v průběhu izolace jsou totožné s wtCPR a byly diskutovány výše v kapitole 5.3.5 (str. 70).

5.5 Porovnání purifikace wtCPR a mCPR

Čistota jednotlivých finálních preparátů a vybrané charakteristiky z purifikace wtCPR a mCPR jsou porovnány na obr. 27 a v tab. 6 (str. 79).



Obr. 27 Porovnání čistoty purifikovaných forem wtCPR a mCPR

Čistota purifikovaných proteinů wtCPR a mCPR byla porovnána se standardem izolované králičí reduktasy (rabCPR). 10-FDH = 10-formyltetrahydrofolát dehydrogenasa. Detailnější popis v textu.

Porovnání jednotlivých finálních preparátů na obr. 27 ukazuje, že čistota mCPR je vyšší než je tomu u wtCPR. Ve vzorku mCPR je přítomno jen velmi malé množství kontaminant s nižší molekulovou hmotností a jedná se tedy o elektroforeticky téměř čistý protein. Preparát wtCPR obsahuje jednu výraznější kontaminantu (100 kDa, viz i obr. 22, str. 70), která má podobnou molekulovou hmotnost jako protein ve vzorku standardu (rabCPR). Zmíněná kontaminanta ve standardu byla charakterizována hmotnostní spektrometrií jako 10-formyltetrahydrofolát dehydrogenasa [159]. Jedná se o protein využívající ke své funkci kofaktor NADP^+ , což znamená, že se stejně jako rabCPR váže na nosič 2'5' ADP Sepharosy a v průběhu eluce vytékají z kolony společně. Zmíněný protein se však nevyskytuje v prokaryotických organismech [160], z čehož vyplývá, že kontaminanta o vyšší molekulové hmotnosti ve vzorku wtCPR nepředstavuje 10-formyltetrahydrofolát dehydrogenasu nebo její jinak pozměněnou formu. Pravděpodobně i z tohoto důvodu se dotyčnou kontaminantu v preparátu mCPR podařilo eluovat z kolony 2'5' ADP Sepharosy pomocí pufru s vyšší iontovou silou (viz obr. 25, str. 75).

Tab. 6 Vybrané charakteristiky z průběhu purifikace wtCPR a mCPR

	wtCPR		mCPR	
	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	Celková aktivita v objemu [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$]	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	Celková aktivita v objemu [$\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$]
Buněčný homogenát	0,4	567	0,51	625
Membránová frakce	0,5	174	0,82	187
Supernatant po solubilizaci	1,5	164	2,1	179
Vzorek po 1. DEAE Sephar.	3,8	138	----	----
Vzorek po ADP Sephar.	15,3	103	21,0	57
Vzorek po 2. DEAE Sephar.	16,5	23	----	----

Pro porovnání finálních preparátů byly zvoleny vybrané charakteristiky jako specifická ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) a celková aktivita ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$). Z tab. 6 je vidět, že celková aktivita přítomná v buněčných homogenátech je prakticky stejná v obou případech. To znamená, že vnesená mutace K56Q neměla výraznější vliv na celkový stupeň exprese mutované formy v porovnání s wtCPR. Ani při izolaci membránové frakce se neukázaly výraznější rozdíly mezi jednotlivými formami, i když bylo předpokládáno, že forma mCPR by měla mít, vzhledem ke zmíněné mutaci a tedy vyšší odolnosti vůči proteolytickému odštěpení z membrány, větší zastoupení v membránách. V obou případech bylo inkorporováno do membrán přibližně 30 % z aktivity přítomné v buněčném homogenátu. To znamená, že zastoupení CPR v bakteriální membráně nezáleží na její proteolytické stabilitě, ale pravděpodobně na schopnosti bakterií inkorporovat exprimovaný protein do membrány. Uvedenou skutečnost potvrzují i vysoké enzymové aktivity cytosolických frakcí, které poukazují na značné zastoupení CPR, která nebyla inkorporována do membrány nebo z ní byla proteolyticky odštěpena (viz kap. 5.3.5, str. 70).

Forma wtCPR byla purifikována pomocí tří chromatografických kroků na DEAE, 2'5' ADP a opět na DEAE Sepharose podle návodu standardně používaného v laboratoři

pro purifikaci CPR z jaterních mikrosomů pokusných zvířat. Z počtu použitých kroků a časové náročnosti celého procesu vyplývají i větší ztráty aktivního proteinu a tedy nižší celkový výtěžek v porovnání s mCPR. Ani po třech purifikačních krocích se nepodařilo získat stejně čistý protein jako v případě mCPR, která byla pročištěna jen na koloně 2'5' ADP Sepharosy podle modifikovaného návodu Huanga [131]. Je to dáno především odlišnostmi v postupu, kdy mCPR byla eluována gradientem NADP^+ (bez zvýšené iontové síly), v průběhu kterého se uvolnila z nosiče jen mCPR (viz obr. 25, str. 75) a ostatní proteiny zůstaly vázané na koloně. Během chromatografie wtCPR na koloně 2'5'ADP Sepharosy byla použita izokratická eluce pomocí pufru s NADP^+ a zároveň se zvýšenou iontovou silou, což způsobilo eluci prakticky všech proteinů navázaných na kolonu a tedy i přítomné znečištění.

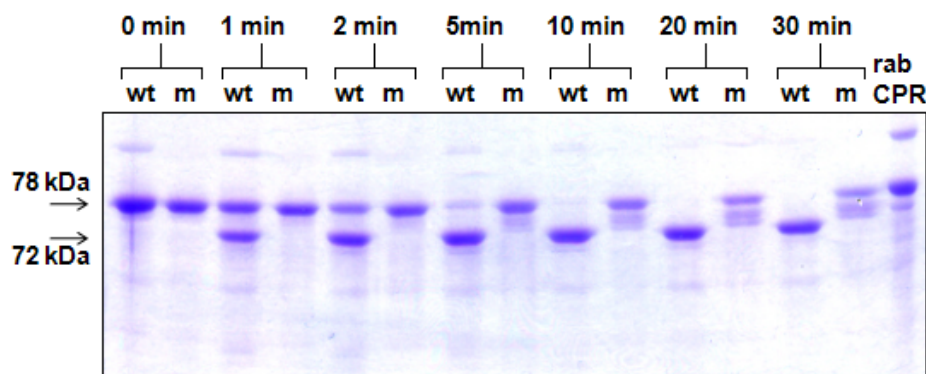
Další charakteristikou, ve které se lišily finální preparáty, byla specifická aktivita. Její vyšší hodnota v případě mCPR ($21,0 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) v porovnání s wtCPR dokazuje, že záměna aminokyseliny K56Q nemá pozorovatelný vliv na reduktasovou aktivitu vůči cytochromu c. Nižší hodnota specifické aktivity u wtCPR ($16,5 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) byla způsobena jednak nižší čistotou finálního preparátu a pravděpodobně i vyšším zastoupením neaktivní denaturované formy, na jejíž množství mohla mít vliv právě celková délka purifikace. Ztrátu aktivity CPR během purifikace může zapříčinit i uvolnění kofaktoru FMN, který je vázán mnohem slaběji než FAD [76]. Následným přidáním čistého FMN do roztoku s CPR lze její aktivitu opět obnovit. V našem případě přidání FMN k jednotlivým preparátům (mCPR nebo wtCPR) před finální dialýzou nezpůsobilo prakticky žádný nárůst reduktasové aktivity (výsledky neuvedeny), což může znamenat, že v průběhu purifikace buď nedošlo k výraznému uvolnění FMN z CPR nebo byla ztráta aktivity způsobena jinou příčinou, např. nevratným poškozením enzymu.

Použití jednoho purifikačního kroku na koloně 2'5' ADP Sepharosy v případě mCPR bylo zvoleno z důvodu předcházející zdlouhavé izolace wtCPR. Z výsledků uvedených výše vyplývá, že se tento postup osvědčil z hlediska čistoty finálního preparátu mCPR, menší časové náročnosti celého procesu, vyšších výtěžků reduktasové aktivity a také nižšího zastoupení denaturovaného proteinu (vyšší specifické aktivity).

5.6 Porovnání proteolytické stability wtCPR a mCPR

5.6.1 Porovnání proteolytické stability purifikovaných forem wtCPR a mCPR

Proteolýza wtCPR a mCPR probíhala za podmínek popsanych v kap. 4.15 (str. 50). Po přidání trypsinu k purifikovaným proteinům byly v časech 0, 1, 2, 5, 10, 20 a 30 minut odebírány vzorky (proteolýza zastavena trypsinovým inhibitorem), z kterých byla následně provedena elektroforéza zobrazena na obr. 28.



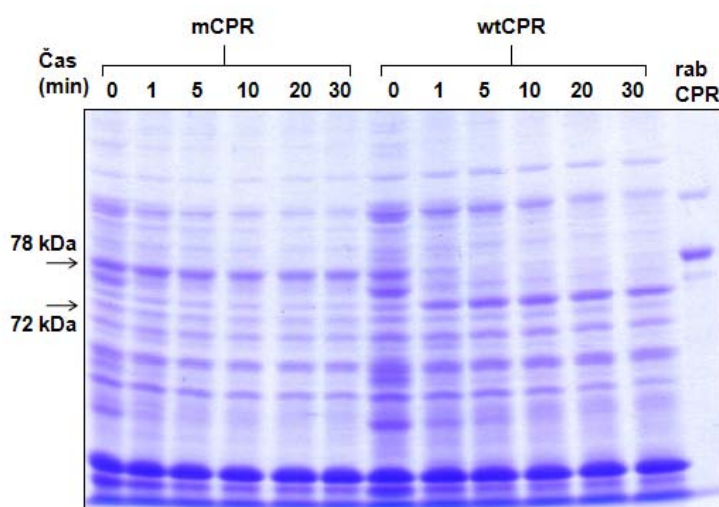
Obr. 28 SDS elektroforéza z proteolytického štěpení wtCPR a mCPR trypsinem
 Vzorky pro SDS elektroforézu byly odebírány v časech vyznačených nad obrázkem. wt = wtCPR, m = mCPR. Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR).

V případě wtCPR můžeme na obr. 28 pozorovat přírůstek štěpené (72 kDa) formy v čase. Už po jedné minutě je patrné výrazné zastoupení 72 kDa formy a v desáté minutě je už prakticky všechna wtCPR proteolyticky degradována. Ověření aminokyselinové sekvence pomocí proteinové sekvenace ukázalo, že se skutečně jedná o formu 72 kDa, čili štěpenou v proteolyticky labilním místě Lys56 – Ile57 (sekvence ⁵⁷IQTTAP...). Tento experiment dále potvrdil stabilitu mCPR vůči degradaci trypsinem, kdy přítomnost proteolytických produktů byla výrazněji přítomna až v desáté minutě a ani na konci experimentu nebyla mCPR zcela degradována. 72 kDa forma v tomto případě nebyla vůbec pozorována, což dokazuje nepřítomnost proteolyticky senzitivního místa pro trypsin a zároveň i úspěšnou substituci aminokyseliny Lys56. U mCPR lze pozorovat v třicáté minutě dva proteolytické produkty o nižší molekulové hmotnosti než mCPR. Ty se vzhledem k jejich nízkému zastoupení a nedostatečnému rozdělení na SDS elektroforéze nepodařilo sekvenovat. Pravděpodobně se jedná o produkty vzniklé trypsinovou

proteolýzou v další přítomné oblasti ⁴⁵RKKK, která představuje klastr pozitivně nabitých aminokyselin, patrně nesoucích informaci o topologii CPR v membráně [77,161]. Tato oblast je v případě CPR solubilizované z membrány lépe dostupná pro proteolytické štěpení trypsinem [77].

5.6.2 Porovnání proteolytické stability forem wtCPR a mCPR vázaných v membráně

Pro pochopení toho jak membrána ovlivňuje stabilitu jednotlivých forem CPR (wtCPR, mCPR) v průběhu trypsinové proteolýzy byl proveden experiment podobný jako v předcházejícím případě (kap. 5.6.1, str. 81, metoda popsána v kap. 4.15, str. 50). Pro štěpení však byly použity membránové frakce získané v průběhu purifikace wtCPR nebo mCPR. Vzorky pro elektroforézu byly odebírány v časech 0, 1, 5, 10, 20 a 30 minut od přidání trypsinu. Výsledky proteolýzy zobrazuje obr. 29.



Obr. 29 SDS elektroforéza z proteolytického štěpení forem wtCPR a mCPR vázaných v membráně

Vzorky pro SDS elektroforézu byly odebírány v časech vyznačených nad obrázkem. Pro elektroforézu byl použit 8% polyakrylamidový gel a jako standard CPR z jater králíka (rabCPR). Detailnější popis v textu.

Výsledky experimentu (obr. 29) ukazují, že membránová wtCPR je v průběhu proteolýzy výrazným způsobem degradována za vzniku 72 kDa formy. Už po první minutě je štěpena téměř všechna wtCPR přítomná v membráně. V případě mCPR nebyl pozorován prakticky žádný pokles 78 kDa formy v čase, což dokazuje absolutní stabilitu mCPR vázané v membráně vůči působení trypsinu. Proteolytické štěpy přítomné na konci

proteolýzy (30 min) u purifikované mCPR (obr. 28, str. 81) v tomto případě nebyly zaznamenány. Uvedená skutečnost odpovídá předpokladu, že se druhá proteolyticky senzitivní oblast ⁴⁵RKKK nachází v těsné blízkosti povrchu membrány a je tak pro trypsin mnohem hůře dostupná.

5.7 Ověření enzymové aktivity wtCPR a mCPR v rekonstituovaném systému s CYP1A1 při metabolismu Sudanu I

Příprava rekonstituovaného systému purifikovaných forem wtCPR a mCPR s rekombinantním potkaním CYP1A1 byla provedena dle návodu v kap. 4.23 (str. 54). V tab. 7 jsou uvedeny příslušné objemy a výsledné koncentrace jednotlivých složek.

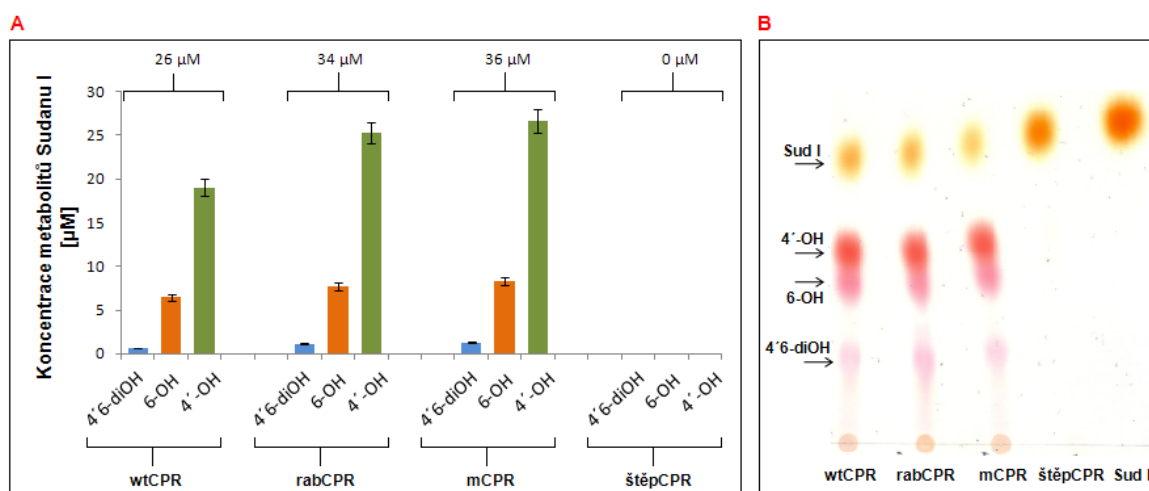
Tab. 7 Příprava rekonstituovaného systému CPR s CYP1A1
Pro přípravu rekonstituovaného systému byla použita rekombinantní potkaní CYP1A1 o koncentraci 12,4 μM a různé formy CPR.

	DLPC [μl]	HEPES/ CHAPS [μl]	Glutathion [μl]	H ₂ O [μl]	CYP1A1 [μl]	CPR [μl]	Výsl. objem
Zásobní roztok	5 mg/ml	500 mM	30 mM	----	12,4 μM	A ^{1*}	----
Výsledná koncentr.	1 mg/ml	50 mM	3 mM	----	50 pmol	50 A ^{2*}	----
wtCPR	10,0	5,0	5,0	32,0	4,0	4,0	50 μl
mCPR	10,0	5,0	5,0	33,4	4,0	2,6	50 μl
rabCPR	10,0	5,0	5,0	33,0	4,0	3,0	50 μl
štěpCPR	10,0	5,0	5,0	30,5	4,0	5,5	50 μl

^{1*}A – Hodnoty aktivit jednotlivých preparátů CPR ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$): wtCPR – 12,7; mCPR – 19,1; štěpCPR – 9,1; rabCPR – 16,5. Forma bez N-terminální domény (štěpCPR) byla připravena podle návodu v kap. 4.16 (str. 50)

^{2*}A – hodnota aktivity CPR v $\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$

Inkubace Sudanu I s rekonstituovanými systémy byla provedena ve dvou paralelních vzorcích podle návodu v kap. 4.24 (str. 55). Výsledné koncentrace metabolitů Sudanu I (6-hydroxy-Sudan I; 4'-hydroxy-Sudan I; 4'6-dihydroxy-Sudan I) v inkubačních směsích byly stanoveny pomocí systému pro HPLC s využitím programu CHROMELEON™ 6.01 nebo byly vzorky použity pro chromatografii na tenké vrstvě (obr. 30B). Sudan I a jeho metabolity byly detekovány při vlnové délce 480 nm a jejich koncentrace v reakční směsi byla kvantifikována podle kalibrační křivky získané za použití syntetických standardů metabolitů Sudanu I [148]. Výsledky stanovení zobrazuje obr. 30A.



Obr. 30 Výsledky inkubace Sudanu I s rekonstituovaným systémem CPR – CYP1A1

A Stanovení metabolitů Sudanu I pomocí systému pro HPLC. Čísla nad příslušnými grafy jsou součtem koncentrací jednotlivých metabolitů (6-hydroxy-Sudan I; 4'-hydroxy-Sudan I; 4'6-dihydroxy-Sudan I) v inkubačních směsích. Hodnoty v grafu představují průměr dvou nezávislých měření.

B Chromatografie na tenké vrstvě vzorků z inkubace Sudanu I s rekonstituovaným systémem CPR – CYP1A1.

Forma bez N-terminální domény (štěpCPR) byla připravena podle návodu v kap. 4.16 (str. 50).

Z přítomnosti jednotlivých metabolitů Sudanu I v inkubačních směsích (obr. 30A) vyplývá, že jak wtCPR, tak i mCPR jsou schopny interakce a přenosu elektronů na CYP1A1 v průběhu monooxygenasové reakce. Z celkového množství vzniklých metabolitů můžeme soudit, že forma mCPR vykazuje téměř stejné katalytické vlastnosti jako CPR izolovaná z jater králíka (mCPR – 36 μM, rabCPR – 34 μM). To znamená, že substituce aminokyseliny Lys56 nemá ani v tomto případě pozorovatelný vliv na katalytickou funkci CPR. Inkubační směsi obsahující wtCPR, vykazovaly o něco nižší výslednou koncentraci metabolitů Sudanu I (26 μM). Vzhledem k tomu, že CPR má

odlišná vazebná místa pro cytochrom P450 a cytochrom c (částečně se ale překrývají) [162], může být uvedená skutečnost způsobena i určitým zastoupením formy wtCPR s poškozeným vazebným místem pro cytochrom P450 (poškození v průběhu purifikace). Zmíněná forma dokáže přenášet elektrony na cytochrom c, ale není schopna redukovat cytochrom P450, což se následně projeví na nižším obsahu metabolitů. Přítomnost metabolitů v inkubačních směsích, které obsahovaly CPR bez N-terminální domény (štěpCPR), nebyla pozorována, což dokazuje důležitost této domény při interakci s cytochromy P450 v prostředí fosfolipidové dvouvrstvy [163].

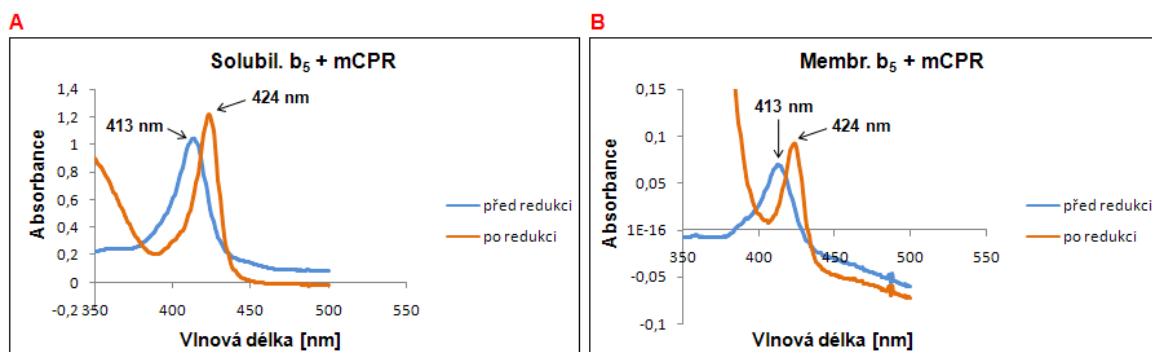
Chromatografie na tenké vrstvě byla použita jako rychlá metoda pro orientační stanovení metabolitů Sudanu I a pro ověření katalytické funkce purifikovaných forem wtCPR a mCPR. Záznam z chromatografie na obr. 30B (str. 84) dokazuje přítomnost tří metabolitů Sudanu I vzniklých v inkubačních směsích. Na obrázku je možné vidět, že stejně jako v případě HPLC, i tady je metabolitem s největším zastoupením 4'-hydroxy-Sudan I, následovaný 6-hydroxy-Sudanem I a v nejnižší koncentraci je přítomen 4'6-dihydroxy-Sudan I. V průběhu inkubace Sudanu I s potkaním CYP1A1 vzniká ve velmi malém množství ještě metabolit 3'4'-dihydroxy-Sudan I [148], ten však v našem případě nebyl detekován ani při HPLC ani při TLC.

5.8 Redukce cytochromu b₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou

V tomto experimentu byla ověřena schopnost jednotlivých purifikovaných forem CPR (wtCPR, mCPR) redukovat rekombinantní lidský cytochrom b₅ (solubilní erytrocytární nebo mikrosomální membránovou formu) v roztoku nebo v přítomnosti fosfolipidové dvouvrstvy (liposomů).

5.8.1 Redukce cytochromu b₅ NADPH:cytochrom P450 reduktasou v roztoku

Redukce probíhala v pufru se zvýšenou iontovou silou (0,3 M KH₂PO₄; pH 7,5) podle návodu v kap. 4.27 (str. 56). Po přidání příslušných objemů reduktasy a cytochromu b₅ byla redukce startována přidávkem NADPH. Vybraná spektra jsou znázorněna na obr. 31 (str. 86). Tab. 8 (str. 86) shrnuje výsledky redukce.



Obr. 31 Redukce solubilní a membránové formy cytochromu b_5 v roztoku

A Spektra oxidovaného a redukovaného stavu solubilní erytrocytární formy lidského cytochromu b_5

B Spektra oxidovaného a redukovaného stavu membránové mikrosomální formy lidského cytochromu b_5

Čísla 413 a 424 nm reprezentují absorpční maximum pro oxidovaný, resp. redukovaný stav cytochromu b_5 .

Tab. 8 Redukce cytochromu b_5 různými formami CPR v roztoku

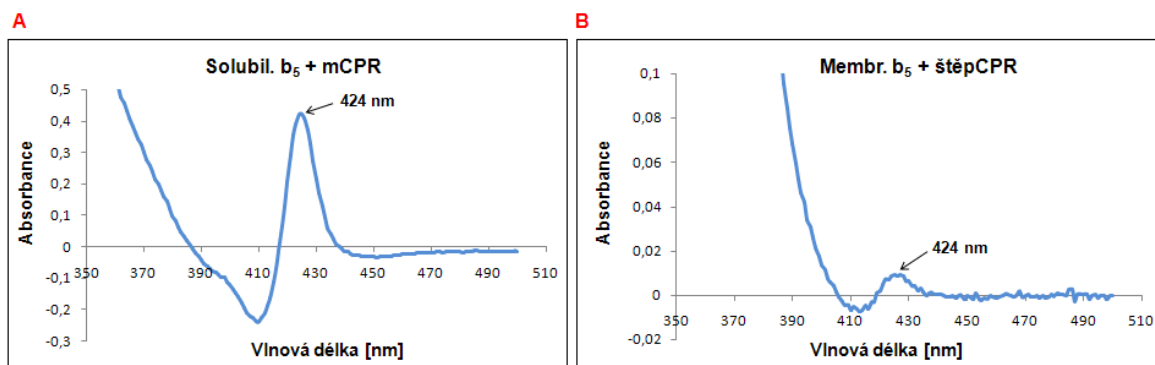
	Schopnost redukovat solubilní formu cytochromu b_5	Schopnost redukovat membránovou formu cytochromu b_5
mCPR	Ano	Ano
wtCPR	Ano	Ano
štěpCPR	Ano	Ano

Z tab. 8 je patrné, že všechny formy CPR (wtCPR, mCPR, štěpCPR) byly schopné v roztoku redukovat solubilní i membránovou formu cytochromu b_5 . Situace je podobná redukci cytochromu c, kdy jsou oba reakční partneři přítomní v roztoku a mohou se vhodně orientovat pro následnou interakci a přenos elektronů. Na obr. 31 jsou zobrazena vybraná spektra z redukce (solubilní a membránová forma s mCPR). Oxidovaný stav cytochromu b_5 vykazuje absorpční maximum při 413 nm, zatímco stav redukovaný při 424 nm [32]. Použitý preparát s membránovým cytochromem b_5 byl méně koncentrovaný a proto nemohlo být dosaženo absorbance jako v případě solubilní formy.

5.8.2 Redukce cytochromu b_5 NADPH:cytochrom P450 reduktasou v prostředí liposomů

Redukce v prostředí liposomů probíhala podle návodu v kap. 4.28 (str. 56). Po přidání reduktasy a cytochromu b_5 byly vzorky 10 minut třepány na míchače pro

správnou inkorporaci membránových proteinů. Následně byl přidán pufr (0,3 M KH_2PO_4 ; pH 7,5) a proměřen slepý vzorek. Redukce byla startována přidávkem NADPH. Vybraná diferenční spektra jsou znázorněna na obr. 32. Tab. 9 shrnuje výsledky redukce.



Obr. 32 Diferenční spektra (redukováný mínus oxidovaný cytochrom b_5) solubilní a membránové formy cytochromu b_5 (redukce v prostředí liposomů)

A Diferenční spektrum solubilní erytrocytární formy lidského cytochromu b_5

B Diferenční spektrum membránové mikrosomální formy lidského cytochromu b_5 (s formou CPR bez N-terminální domény)

Číslo 424 nm reprezentuje absorpční maximum pro redukováný stav cytochromu b_5 .

Tab. 9 Redukce cytochromu b_5 různými formami CPR v prostředí liposomů

	Schopnost redukovat solubilní formu cytochromu b_5	Schopnost redukovat membránovou formu cytochromu b_5
mCPR	Ano	Ano
wtCPR	Ano	Ano
štěpCPR	Ano	Ne

Obr. 32 představuje diferenční spektrum cytochromu b_5 s absorpčním maximem při 424 nm a poklesem absorpce při 409 nm. Diferenční měření, kdy byl jako slepý vzorek použitý rekonstituovaný systém, bylo provedeno z důvodu vysoké absorpce liposomů v měřené oblasti spektra. I v tomto případě wtCPR a mCPR redukovaly obě formy cytochromu b_5 . CPR bez N-terminální domény (štěpCPR) nebyla schopna redukovat cytochrom b_5 inkorporovaný v membráně, což je i ve shodě s dříve publikovanými výsledky [164]. Jednou z příčin může být právě nedostupnost interakčního místa cytochromu b_5 vázaného v membráně pro solubilní CPR. Nízké hodnoty absorpce při 424 nm (obr. 31B – jen 10 % v porovnání se systémem obsahujícím mCPR) mohly být způsobeny redukcí cytochromu b_5 neinkorporovaného do membrány.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na heterologní expresi, purifikaci a charakterizaci dvou forem potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy (wtCPR, mCPR). Forma wtCPR představuje přirozeně se vyskytující protein v potkaním kmenu Wistar, do genu pro formu mCPR byla zavedena bodová mutace v poloze 166 (A→C), která je zodpovědná za aminokyselinovou substituci K56Q. Lys56 je místem proteolytické degradace CPR, z čehož vyplývá, že mCPR reprezentuje formu odolnou vůči proteasám s trypsinovou aktivitou. Výsledky diplomové práce lze shrnout následovně:

- V expresních vektorech pET22b, připravených Mgr. Rolandem Kubíkem [138], byla kontrolní restrikcí pomocí endonukleas ověřena přítomnost genů pro wtCPR a mCPR. Následnou sekvenční analýzou byla potvrzena i existence mutace 166 (A→C) v plasmidu pET22b-mCPR. Velkoobjemovou produkcí v buňkách *E. coli* BL21(DE3)RIL se podařilo exprimovat membránově vázané formy wtCPR a mCPR v dostatečném množství pro následnou purifikaci.
- Jednotlivé rekombinantní formy potkaní CPR (mCPR, wtCPR) byly úspěšně purifikovány v dostatečné elektroforetické čistotě. Forma wtCPR byla purifikována pomocí tří chromatografických kroků na kolonách DEAE Sepharosy, 2'5' ADP Sepharosy a finální pročištění bylo provedeno opět na koloně DEAE Sepharosy. Izolací bylo získáno $23 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$ reduktasové aktivity, což představuje výtěžek 4 %. Finální preparát vykazoval specifickou aktivitu $16,5 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Forma mCPR byla purifikována za použití jednoho chromatografického kroku na koloně 2'5' ADP Sepharosy s výtěžkem 9 %, což odpovídá $57 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$ reduktasové aktivity. Specifická aktivita finálního preparátu mCPR byla $21,0 \mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Zavedení mutace K56Q (mCPR) nemělo, v porovnání s wtCPR, výraznější vliv na stupeň exprese, ani na zastoupení proteinu v bakteriální membráně.
- Byla studována stabilita purifikovaných proteinů wtCPR a mCPR a proteinů vázaných v membráně (membránové frakce wtCPR a mCPR) v průběhu proteolytického štěpení trypsinem. Uvedenými experimenty byla v obou případech potvrzena stabilita mCPR

vůči trypsinové proteolýze. Na rozdíl od wtCPR, mCPR po štěpení nevykazovala přítomnost solubilní 72 kDa formy, což dokazuje i úspěšnost substituce lysinu v poloze 56.

- Enzymové aktivity mCPR a wtCPR byly charakterizovány v rekonstituovaném systému s CYP1A1 při metabolismu Sudanu I. Inkubační směsi obsahující rekonstituovaný systém s mCPR vykazovaly o něco vyšší koncentrace přítomných metabolitů Sudanu I (36 μ M) v porovnání se systémy obsahujícími wtCPR (26 μ M). Spektrofotometrickým měřením byla v rekonstituovaném systému ověřena i schopnost wtCPR a mCPR přenášet redukční ekvivalenty na solubilní nebo membránovou formu lidského cytochromu b₅.

7 Seznam literatury

1. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J.Jr., Martínek, V., Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* **98**, 876–90.
2. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy* **94**, 913–18.
3. Okey, A.B., Roberts, E.A., Harper, P.A., Denison, M.S. (1986) Induction of drug-metabolizing enzymes: mechanisms and consequences. *Clin. Biochem.* **19**, 132–41.
4. Lamb, D.C., Lei, L., Warrilow, A.G.S., Lepesheva, G.I., Mullins, J.G.L., Waterman, M.R., Kelly, S.L. (2009) The first virally encoded cytochrome p450. *J. Virol.* **83**, 8266–69.
5. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229–37.
6. Jakoby, W.B., Ziegler, D.M. (1990) The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* **265**, 20715–18.
7. Kalgutkar, A.S., Gardner, I., Obach, R.S., Shaffer, C.L., Callegari, E., Henne, K.R., Mutlib, A.E., Dalvie, D.K., Lee, J.S., Nakai, Y., O'Donnell, J.P., Boer, J., Harriman, S.P. (2005) A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **6**, 161–25.
8. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy* **95**, 212–22.
9. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 330–44.
10. Nolan, L.C., O'Connor, K.E. (2008) Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1879–91.
11. Burton, S.G. (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* **21**, 543–49.
12. Stiborová, M., Mikšanová, M., Martínek, V., Frei, E. (2000) Heme Peroxidases: Structure, Function, Mechanism and Involvement in Activation of Carcinogens. A Review. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **65**, 297–325.
13. Satoh, T., Hosokawa, M. (1998) The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 257–88.
14. de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S., van den Anker, J.N. (1999) Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin. Pharmacokinet.* **36**, 439–52.
15. Williams, R.T., Millburn, P., Smith, R.L. (1965) The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **123**, 110–24.

16. Hinchman, C.A., Matsumoto, H., Simmons, T.W., Ballatori, N. (1991) Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.* **266**, 22179–85.
17. Armstrong, S.C., Cozza, K.L. (2003) Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, part I. *Psychosomatics* **44**, 167–71.
18. Armstrong, S.C., Cozza, K.L. (2003) Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, Part II. *Psychosomatics* **44**, 515–20.
19. Ehrlich, P., Hata, S., Newbold, A., Felkin, R.W. (1911) *The experimental chemotherapy of spirilloses: (syphilis, relapsing fever, spirillosis of fowls, framboesia)* (Rebman, New York).
20. Murphy, P.J. (2008) The development of drug metabolism research as expressed in the publications of ASPET: part 1, 1909-1958. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1–5.
21. Voegtlin, C., Smith, H.W. (1920) Quantitative studies in chemotherapy III. The oxidation of arsphenamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **16**, 199–217.
22. Orr, H. (1935) The reactions attending intravenous use of arsphenamines. *Can. Med. Assoc. J.* **32**, 19–23.
23. Albert, A. (1958) Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **182**, 421–22.
24. Testa, B. (2004) Prodrug research: futile or fertile? *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2097–106.
25. Pearson, P.G., Wienkers, L.C. ed. (2008) *Handbook of Drug Metabolism, Second Edition* (Informa Healthcare). 2. Vyd.
26. Gram, T.E. (1997) Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol. Rev.* **49**, 297–341.
27. Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. (1966) Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 660–73.
28. Strobel, H.W., Lu, A.Y., Heidema, J., Coon, M.J. (1970) Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **245**, 4851–54.
29. Hamdane, D., Zhang, H., Hollenberg, P. (2008) Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosyn. Res.* **98**, 657–66.
30. Omura, T., Morohashi, K. (1995) Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 19–25.
31. Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 1093–108.

32. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Borek-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**, 203–9.
33. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**, 128–45.
34. Nebert, D.W., Nelson, D.R., Feyereisen, R. (1989) Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* **19**, 1149–60.
35. Nelson, D.R., Strobel, H.W. (1987) Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 572–93.
36. Danielson, P.B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* **3**, 561–97.
37. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376–86.
38. Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 493–509.
39. Omura, T., Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–78.
40. Testa, B., Krämer, S.D. (2007) The biochemistry of drug metabolism-an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chem. Biodivers.* **4**, 257–405.
41. Sakaguchi, M., Mihara, K., Sato, R. (1984) Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3361–64.
42. Murakami, K., Mihara, K., Omura, T. (1994) The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *J. Biochem.* **116**, 164–75.
43. Oprea, T.I., Hummer, G., García, A.E. (1997) Identification of a Functional Water Channel in Cytochrome P450 Enzymes. *PNAS* **94**, 2133–38.
44. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737–47.
45. Omura, T., Sato, R. (1967) v *Oxidation and Phosphorylation* (Academic Press), s 556–61.
46. Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**, REVIEWS3003.
47. Guengerich, F.P., MacDonald, T.L. (1990) Mechanisms of Cytochrome P-450 Catalysis. *FASEB J.* **4**, 2453–59.
48. Laursen, T., Jensen, K., Møller, B.L. (2011) Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 132–38.
49. Sligar, S.G. (1976) Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry* **15**, 5399–406.

50. Hrycay, E.G., Bandiera, S.M. (2012) The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* PMID: 22266245.
51. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**, 1–51.
52. Coon, M.J., Ding, X.X., Pernecky, S.J., Vaz, A.D. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6**, 669–73.
53. Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**, 1–11.
54. Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70–83.
55. Lewis, D.F.V. (2004) 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* **5**, 305–18.
56. Nebert, D.W., Russell, D.W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**, 1155–62.
57. Waxman, D.J., Lapenson, D.P., Aoyama, T., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., Korzekwa, K. (1991) Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 160–66.
58. Ullrich, V. (2003) Thoughts on thiolate tethering. Tribute and thanks to a teacher. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 45–51.
59. Thatcher, J.E., Isoherranen, N. (2009) The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **5**, 875–86.
60. Prosser, D.E., Jones, G. (2004) Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 664–73.
61. Guengerich, F.P. (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **21**, 345–51.
62. Porter, T.D., Coon, M.J. (1991) Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469–72.
63. Montellano, P.R.O. de ed. (2004) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Springer). 3. Vyd.
64. Ingelman-Sundberg, M., Sim, S.C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* **116**, 496–526.
65. Meyer, U.A. (2004) Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 669–76.
66. Haas, E., Horecker, B.L., Hogness, T.R. (1940) The enzymatic reduction of cytochrome c. Cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* **136**, 747–74.

67. Lu, A.Y., Coon, M.J. (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **243**, 1331–32.
68. Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S., Masters, B.S. (1972) Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J. Biol. Chem.* **247**, 3601–7.
69. Enoch, H.G., Strittmatter, P. (1979) Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **254**, 8976–81.
70. Laden, B.P., Tang, Y., Porter, T.D. (2000) Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **374**, 381–88.
71. Murataliev, M.B., Feyereisen, R., Walker, F.A. (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 1–26.
72. Porter, T.D., Kasper, C.B. (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* **25**, 1682–87.
73. Jensen, K., Møller, B.L. (2010) Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* **71**, 132–41.
74. Mowat, C.G., Gazur, B., Campbell, L.P., Chapman, S.K. (2010) Flavin-containing heme enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **493**, 37–52.
75. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S., Kim, J.J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8411–16.
76. Vermilion, J.L., Coon, M.J. (1978) Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J. Biol. Chem.* **253**, 2694–704.
77. Bonina, T.A., Gilep, A.A., Estabrook, R.W., Usanov, S.A. (2005) Engineering of proteolytically stable NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry Mosc.* **70**, 357–65.
78. Black, S.D., Coon, M.J. (1982) Structural features of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Hydrophobic domain, hydrophilic domain, and connecting region. *J. Biol. Chem.* **257**, 5929–38.
79. Vermilion, J.L., Coon, M.J. (1978) Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8812–19.
80. Zhao, Q., Modi, S., Smith, G., Paine, M., McDonagh, P.D., Wolf, C.R., Tew, D., Lian, L.Y., Roberts, G.C., Driessen, H.P. (1999) Crystal structure of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 Å resolution. *Protein Sci.* **8**, 298–306.
81. Barsukov, I., Modi, S., Lian, L.Y., Sze, K.H., Paine, M.J., Wolf, C.R., Roberts, G.C. (1997) ¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR resonance assignment, secondary structure and global fold of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase. *J. Biomol. NMR* **10**, 63–75.

82. Hamdane, D., Xia, C., Im, S.C., Zhang, H., Kim, J.J.P., Waskell, L. (2009) Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **284**, 11374–84.
83. Karplus, P.A., Daniels, M.J., Herriott, J.R. (1991) Atomic structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* **251**, 60–66.
84. Shen, A.L., Kasper, C.B. (2000) Differential contributions of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase FAD binding site residues to flavin binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 41087–91.
85. Döhr, O., Paine, M.J., Friedberg, T., Roberts, G.C., Wolf, C.R. (2001) Engineering of a functional human NADH-dependent cytochrome P450 system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 81–86.
86. Gutierrez, A., Doehr, O., Paine, M., Wolf, C.R., Scrutton, N.S., Roberts, G.C. (2000) Trp-676 facilitates nicotinamide coenzyme exchange in the reductive half-reaction of human cytochrome P450 reductase: properties of the soluble W676H and W676A mutant reductases. *Biochemistry* **39**, 15990–99.
87. Hubbard, P.A., Shen, A.L., Paschke, R., Kasper, C.B., Kim, J.J. (2001) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hydride and electron transfer. *J. Biol. Chem.* **276**, 29163–70.
88. Meints, C.E., Gustafsson, F.S., Scrutton, N.S., Wolthers, K.R. (2011) Tryptophan 697 modulates hydride and interflavin electron transfer in human methionine synthase reductase. *Biochemistry* **50**, 11131–42.
89. Brenner, S., Hay, S., Munro, A.W., Scrutton, N.S. (2008) Inter-flavin electron transfer in cytochrome P450 reductase - effects of solvent and pH identify hidden complexity in mechanism. *FEBS J.* **275**, 4540–57.
90. Pudney, C.R., Khara, B., Johannissen, L.O., Scrutton, N.S. (2011) Coupled motions direct electrons along human microsomal P450 Chains. *PLoS Biol.* **9**, e1001222.
91. Murataliev, M.B., Klein, M., Fulco, A., Feyereisen, R. (1997) Functional interactions in cytochrome P450BM3: flavin semiquinone intermediates, role of NADP(H), and mechanism of electron transfer by the flavoprotein domain. *Biochemistry* **36**, 8401–12.
92. Munro, A.W., Noble, M.A., Robledo, L., Daff, S.N., Chapman, S.K. (2001) Determination of the redox properties of human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* **40**, 1956–63.
93. Yasukochi, Y., Peterson, J.A., Masters, B.S. (1979) NADPH-cytochrome c (P-450) reductase. Spectrophotometric and stopped flow kinetic studies on the formation of reduced flavoprotein intermediates. *J. Biol. Chem.* **254**, 7097–104.
94. Cytochrome P450 reductase URL: http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm [Přístup únor 19, 2012].
95. Miwa, G.T., West, S.B., Huang, M.T., Lu, A.Y. (1979) Studies on the association of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome c reductase during catalysis in a reconstituted hydroxylating system. *J. Biol. Chem.* **254**, 5695–700.

96. Estabrook, R.W., Franklin, M.R., Cohen, B., Shigamatzu, A., Hildebrandt, A.G. (1971) Biochemical and genetic factors influencing drug metabolism. Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control. *Metab. Clin. Exp.* **20**, 187–99.
97. Backes, W.L., Kelley, R.W. (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol. Ther.* **98**, 221–33.
98. Voznesensky, A.I., Schenkman, J.B. (1992) The cytochrome P450 2B4-NADPH cytochrome P450 reductase electron transfer complex is not formed by charge-pairing. *J. Biol. Chem.* **267**, 14669–76.
99. French, J.S., Guengerich, F.P., Coon, M.J. (1980) Interactions of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, phospholipid, and substrate in the reconstituted liver microsomal enzyme system. *J. Biol. Chem.* **255**, 4112–19.
100. Tamburini, P.P., Schenkman, J.B. (1986) Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and its redox partners. *Mol. Pharmacol.* **30**, 178–85.
101. Shimizu, T., Tateishi, T., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y. (1991) Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450d by site-directed mutagenesis. Interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* **266**, 3372–75.
102. Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.T., Vakser, I.A., Loew, G., Waskell, L. (1998) Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 17036–49.
103. Kanaan, C., Zhang, H., Shea, E.V., Hollenberg, P.F. (2011) Uncovering the role of hydrophobic residues in cytochrome P450-cytochrome P450 reductase interactions. *Biochemistry* **50**, 3957–67.
104. Im, S.C., Waskell, L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5). *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 144–53.
105. Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I.L., Huang, W.C., Grossmann, J.G., Roberts, G.C.K. (2009) Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J. Biol. Chem.* **284**, 36628–37.
106. Gutierrez, A., Paine, M., Wolf, C.R., Scrutton, N.S., Roberts, G.C.K. (2002) Relaxation kinetics of cytochrome P450 reductase: internal electron transfer is limited by conformational change and regulated by coenzyme binding. *Biochemistry* **41**, 4626–37.
107. Kumar, S. (2010) Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **6**, 115–31.
108. Crespi, C.L., Miller, V.P. (1999) The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes-state of the art and prospects for the future. *Pharmacol. Ther.* **84**, 121–31.
109. Bak, S., Olsen, C.E., Halkier, B.A., Møller, B.L. (2000) Transgenic tobacco and Arabidopsis plants expressing the two multifunctional sorghum cytochrome P450

- enzymes, CYP79A1 and CYP71E1, are cyanogenic and accumulate metabolites derived from intermediates in Dhurrin biosynthesis. *Plant Physiol.* **123**, 1437–48.
110. Gillam, E.M., Baba, T., Kim, B.R., Ohmori, S., Guengerich, F.P. (1993) Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 123–31.
111. Bligh, H.F., Wolf, C.R., Smith, G., Beggs, J.D. (1992) Production of cytochrome P450 reductase yeast-rat hybrid proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **110**, 33–39.
112. Ding, S., Yao, D., Burchell, B., Wolf, C.R., Friedberg, T. (1997) High levels of recombinant CYP3A4 expression in Chinese hamster ovary cells are modulated by coexpressed human P450 reductase and hemin supplementation. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 403–10.
113. Zuber, M.X., Simpson, E.R., Waterman, M.R. (1986) Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science* **234**, 1258–61.
114. Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P.S., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. (1990) Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4790–93.
115. Yun, C.H., Yim, S.K., Kim, D.H., Ahn, T. (2006) Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*. *Curr. Drug Metab.* **7**, 411–29.
116. Masimirembwa, C.M., Otter, C., Berg, M., Jönsson, M., Leidvik, B., Jonsson, E., Johansson, T., Bäckman, A., Edlund, A., Andersson, T.B. (1999) Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 1117–22.
117. Friedberg, T., Wolf, C.R. (1996) Recombinant DNA technology as an investigative tool in drug metabolism research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **22**, 187–213.
118. Gonzalez, F.J., Korzekwa, K.R. (1995) Cytochromes P450 expression systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 369–90.
119. Iwata, H., Fujita, K., Kushida, H., Suzuki, A., Konno, Y., Nakamura, K., Fujino, A., Kamataki, T. (1998) High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli*. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1315–25.
120. Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–62.
121. Inoue, E., Takahashi, Y., Imai, Y., Kamataki, T. (2000) Development of bacterial expression system with high yield of CYP3A7, a human fetus-specific form of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 623–27.
122. Gillam, E.M. (1998) Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**, 877–86.

123. Fujita, K.I., Kamataki, T. (2002) Genetically engineered bacterial cells co-expressing human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase: prediction of metabolism and toxicity of drugs in humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **17**, 1–22.
124. Fisher, C.W., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., Waterman, M.R., Estabrook, R.W. (1992) High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*. *FASEB J.* **6**, 759–64.
125. Dong, J., Porter, T.D. (1996) Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 254–59.
126. Parikh, A., Gillam, E.M., Guengerich, F.P. (1997) Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nat. Biotechnol.* **15**, 784–88.
127. Blake, J.A., Pritchard, M., Ding, S., Smith, G.C., Burchell, B., Wolf, C.R., Friedberg, T. (1996) Coexpression of a human P450 (CYP3A4) and P450 reductase generates a highly functional monooxygenase system in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **397**, 210–14.
128. Pritchard, M.P., Glancey, M.J., Blake, J.A., Gilham, D.E., Burchell, B., Wolf, C.R., Friedberg, T. (1998) Functional co-expression of CYP2D6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* **8**, 33–42.
129. Chun, Y.J., Shimada, T., Guengerich, F.P. (1996) Construction of a human cytochrome P450 1A1: rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein cDNA and expression in *Escherichia coli*, purification, and catalytic properties of the enzyme in bacterial cells and after purification. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 48–58.
130. Parikh, A., Guengerich, F.P. (1997) Expression, purification, and characterization of a catalytically active human cytochrome P450 1A2:rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Protein Expr. Purif.* **9**, 346–54.
131. Huang, N., Pandey, A.V., Agrawal, V., Reardon, W., Lapunzina, P.D., Mowat, D., Jabs, E.W., Van Vliet, G., Sack, J., Flück, C.E., Miller, W.L. (2005) Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 729–49.
132. Porter, T.D., Wilson, T.E., Kasper, C.B. (1987) Expression of a functional 78,000 dalton mammalian flavoprotein, NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase, in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 353–67.
133. Shen, A.L., Porter, T.D., Wilson, T.E., Kasper, C.B. (1989) Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **264**, 7584–89.
134. Hidaka, T., Omata, Y., Noguchi, M. (1996) Cloning and expression of cDNA for soluble form of rat heme oxygenase-1. *Kurume Med. J.* **43**, 313–24.
135. Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Hara, T., Noguchi, M. (2003) Purification and characterization of a soluble form of rat liver NADPH-cytochrome P-450 reductase highly expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **29**, 1–7.
136. Pan, S.H., Malcolm, B.A. (2000) Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *BioTechniques* **29**, 1234–38.
137. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30.

138. Kubík, R. (2009) Preparation of Recombinant NADPH:Cytochrome P450 Reductase (Diplomová práce, Katedra biochemie, PřFUK, Praha).
139. Cohen, S.N., Chang, A.C., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2110–14.
140. Laboratoř sekvenace DNA URL: <http://web.natur.cuni.cz/~seqlab/> [Přístup únor 10, 2012].
141. Reynolds, J.A., Tanford, C. (1970) Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 1002–7.
142. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–85.
143. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231–37.
144. Kim URL: <http://www.ok.cz/dkitt/> [Přístup březem 15, 2012].
145. Masters, B.S., Kamin, H., Gibson, Q.H., Williams, C.H., Jr (1965) Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* **240**, 921–31.
146. Guengerich, F.P., Martin, M.V., Sohl, C.D., Cheng, Q. (2009) Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat. Protoc.* **4**, 1245–51.
147. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P. (2005) Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett.* **220**, 145–54.
148. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678–84.
149. Porter, T.D., Beck, T.W., Kasper, C.B. (1990) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene organization correlates with structural domains of the protein. *Biochemistry* **29**, 9814–18.
150. European Bioinformatics Institute URL: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AAA41683> [Přístup duben 2, 2012].
151. UniProt URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00388> [Přístup duben 2, 2012].
152. Porter, T.D., Kasper, C.B. (1985) Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 973–77.
153. European Bioinformatics Institute URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> [Přístup duben 5, 2012].
154. ExPASy URL: http://web.expasy.org/compute_pi/ [Přístup duben 10, 2012].

155. Hashizume, T., Mise, M., Matsumoto, S., Terauchi, Y., Fujii, T., Imaoka, S., Funae, Y., Kamataki, T., Miyazaki, H. (2001) A novel cytochrome P450 enzyme responsible for the metabolism of ebastine in monkey small intestine. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 798–805.
156. Brodelius, P., Larsson, P.O., Mosbach, K. (1974) The synthesis of three AMP-analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* **47**, 81–89.
157. Yasukochi, Y., Masters, B.S. (1976) Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **251**, 5337–44.
158. Phillips, A.H., Langdon, R.G. (1962) Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **237**, 2652–60.
159. Kotrbová, V. (2005) Identifikace mikrosomálních cytochromů P450 jater potkana a králíka oxidujících ellipticin (Diplomová práce, Katedra biochemie, PŘFUK, Praha).
160. Krupenko, S.A. (2009) FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **178**, 84–93.
161. Gafvelin, G., Sakaguchi, M., Andersson, H., von Heijne, G. (1997) Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 6119–27.
162. Shen, A.L., Kasper, C.B. (1995) Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **270**, 27475–80.
163. Gum, J.R., Strobel, H.W. (1981) Isolation of the membrane-binding peptide of NADPH-cytochrome P-450 reductase. Characterization of the peptide and its role in the interaction of reductase with cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **256**, 7478–86.
164. Prough, R.A., Masters, B.S. (1974) The mechanism of cytochrome b₅ reduction by NADPH-cytochrome c reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 263–67.

