

ABSTRAKT

Při metabolismu xenobiotik a endogenních látek se uplatňuje monooxygenasový systém, jehož součástí je i cytochrom b_5 participující na katalytické činnosti cytochromů P450 (CYP). Mechanismus působení cytochromu b_5 v tomto souboru enzymů však nebyl doposud zcela objasněn. Předpokládá se, že se buď přímo podílí na přenosu elektronů v rámci monooxygenasového systému, nebo může alostericky působit na konformaci CYP. Proto je důležité získat co nejčistší apoformu cytochromu b_5 , která není schopna přenosu elektronů, a dále studovat vliv této nehemové formy cytochromu b_5 na činnost CYP. Získané výsledky pak mohou přispět k poznání mechanismu působení cytochromu b_5 .

V průběhu této práce byla provedena transformace bakteriálního kmene buněk *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold expresním vektorem pET22b, který nesl geny pro mikrosomální a erytrocytární formu cytochromu b_5 .

Za účelem produkce vysokého podílu apoproteinové formy byla heterologní exprese cytochromu b_5 indukována vyšším přidavkem IPTG a byla provedena při 37°C.

Tato bakalářská práce se pak zabývá zejména purifikací jak mikrosomální, tak i erytrocytární formy cytochromu b_5 a to hlavně jeho apoformy. Jelikož však při expresi dochází vždy ve větší či menší míře i k produkci hemové formy cytochromu b_5 , byla i ta izolována.

Holo- a apoproteinová forma mikrosomálního i erytrocytárního cytochromu b_5 byla během izolace rozdělena a zpracována odděleně. K purifikaci byly využity chromatografické metody na koloně s DEAE-Sepharosou pro mikrosomální formu a DEAE-Sepharosou a Sephadexem G-75 pro erytrocytární formu.

Zachovaná nativní struktura apo-cytochromu b_5 byla ověřena jeho schopností znovu do své molekuly přijmout hem.

Klíčová slova:

cytochrom b_5 , cytochromy P450, exprese proteinů, bakterie *E. coli*, solubilizace, izolace