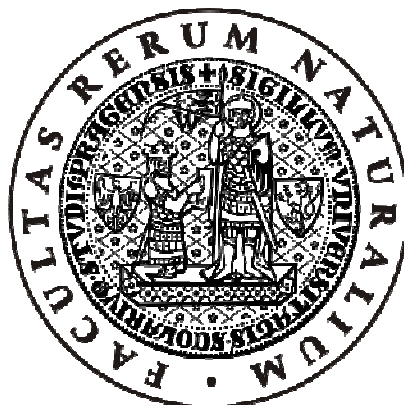


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

**HETEROLOGNÍ EXPRESE A PURIFIKACE LIDSKÉHO
CYTOCHROMU b₅**

**HETEROLOGOUS EXPRESSION AND PURIFICATION OF
HUMAN CYTOCHROME b₅**

Marie Kostelanská

Školitel: RNDr. Věra Černá, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Věry Černé, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Marie Kostelanská

Poděkování

Chtěla bych poděkovat zejména vedoucí mé práce RNDr. Věře Černé, Ph.D. za její ochotu, odborné rady a cenné připomínky, kterými významně přispěla k vypracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat za všestrannou pomoc Bc. Janu Milichovskému.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky 203/09/0812

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

ABSTRACT

The metabolism of xenobiotics and endogenous substances is mediated by a mixed function oxidase system which includes cytochrome b_5 participating in catalytic activities of CYP. The mechanism of action of the cytochrome b_5 has not been fully elucidated yet. But it is assumed that cytochrome b_5 is involved either in direct electron transfer within the mixed function oxidase system or in induction of conformational changes in CYPs. So it is important to gain the pure form of apo-cytochrome b_5 , devoid of heme, which is not capable of electron transfer and further study the effect of this form on CYP-catalyzed reactions. The obtained results can contribute to understanding the mechanism of cytochrome b_5 effects.

The transformation of bacterial cells of *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold was performed by expression vector pET22b which contained genes for microsomal and erythrocyte cytochrome b_5 .

In order to produce a high level of apoprotein form, the heterologous expression of cytochrome b_5 was induced by addition of higher amount of IPTG. Expression was performed at 37°C.

This bachelor thesis is primarily engaged in purification of both microsomal and erythrocyte form of cytochrom b_5 , especially in its apo-form. However, the productions of holo-cytochrome b_5 form always occur in a greater or lesser extent during the expression, so this was also isolated.

During isolation, holo- and apoprotein form of microsomal and erythrocyte cytochrom b_5 were divided and processed separately. Microsomal apo-cytochrome b_5 was purified by chromatography on DEAE-Sepharose and erythrocyte on DEAE-Sepharose and Sephadex G-75.

The native structure of apo-cytochrome b_5 was verified by its ability to accept the heme group in its molecule by titration with hemin.

Keywords:

cytochrome b_5 , cytochromes P450, protein expression, bacterium *E. coli*, solubilization, isolation

(In Czech)

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	9
1 ÚVOD	12
1.1 MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM	12
1.1.1 Katalytická činnost CYP	14
1.2 CYTOCHROMY P450 (CYP, EC 1.14.14.1).....	15
1.2.1 Rozšíření CYP	17
1.2.2 CYP3A4	17
1.3 CYTOCHROM b ₅	19
1.3.1 Mechanismus působení cytochromu b ₅ v monooxygenasovém systému.....	20
1.3.2 Vliv apo-cytochromu b ₅ na katalytickou činnost CYP.....	21
1.4 HETEROLOGNÍ EXPRESE.....	22
1.5 EXPRESNÍ VEKTOR pET22b	23
1.6 RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASY XhoI A NdeI.....	23
2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	25
3 MATERIÁL A METODY	26
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A MATERIÁL	26
3.1.1 Přístroje	26
3.1.2 Chemikálie a materiál	27
3.2 METODY VYUŽITÉ PŘI ŘEŠENÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	28
3.2.1 Restrikce plasmidu pET22b endonukleasami XhoI a NdeI.....	28
3.2.2 Amplifikace expresního vektoru pET22b.....	29
3.2.2.1 Příprava agarových ploten.....	29
3.2.2.2 Transformace kompetentních buněk.....	29
3.2.2.3 Inokulace bakteriálního růstového média a kultivace <i>E. coli</i> DH5α.....	30
3.2.3 Purifikace plasmidu pET22b pomocí komerčního kitu MidiPrep	30
3.2.4 Expres cytochromu b ₅ probíhající při 37°C	32
3.2.4.1 Expres cytochromu b ₅ při 27°C za přítomnosti δ-aminolevulové kyseliny....	33
3.2.5 Purifikace lidského mikrosomálního apo-cytochromu b ₅ a cytochromu b ₅	34
3.2.5.1 Ultrazvuková lýza buněk BL-21 (DE3) Gold	34
3.2.5.2 Izolace membránové frakce buněk	34
3.2.5.3 Solubilizace	35
3.2.5.4 Purifikace cytochromu b ₅ iontově výměnnou chromatografií	36
3.2.5.4.1 Příprava nosiče DEAE-Sepharosy CL-6B	36
3.2.5.4.2 Separace proteinů ionexovou chromatografií na DEAE-Sepharose.....	36
3.2.5.4.3 Ultrafiltrace roztoků cyt b ₅ a apo-cyt b ₅	37
3.2.5.4.4 Eliminace solí dialýzou.....	38
3.2.5.4.5 Eliminace detergentu Brij 35 ionexovou chromatografií	38

3.2.5.4.6	Eliminace detergentu cholátu sodného dialýzou.....	38
3.2.5.4.7	Regenerace nosiče	39
3.2.6	Izolace lidského erytrocytárního apo-cyt b ₅ a cyt b ₅	39
3.2.6.1	Ultrazvuková lýza buněk BL-21 (DE3) Gold	39
3.2.6.2	Purifikace erytrocytárního apo-cyt b ₅ a cyt b ₅ chromatografickými metodami.....	40
3.2.6.2.1	Dělení proteinů ionexovou chromatografií na nosiči DEAE-Sepharosy..	40
3.2.6.2.2	Separace proteinů gelovou filtrací na nosiči Sephadex G-75	40
3.2.7	Kvantifikační a verifikační metody.....	42
3.2.7.1	Agarosová elektroforéza.....	42
3.2.7.2	SDS elektroforéza	44
3.2.7.3	Stanovení koncentrace proteinů	46
3.2.7.4	Stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA.....	47
3.2.7.5	Titrace apo-cytochromu b ₅ chloridem heminu	47
3.2.7.6	Stanovení koncentrace apo-cyt b ₅ a cyt b ₅ z absolutních spekter.....	49
4	VÝSLEDKY	50
4.1	KONTROLNÍ ŠTĚPENÍ PLASMIDU pET22b	50
4.2	AMPLIFIKACE A IZOLACE PLASMIDU pET22b.....	51
4.3	PRŮBĚH EXPRESE CYTOCHROMU b ₅	52
4.3.1	Expresce cytochromu b ₅ probíhající při 37°C	53
4.3.2	Expresce cytochromu b ₅ při 27°C	54
4.4	PURIFIKACE MIKROSOMÁLNÍHO APO-CYT b ₅ A CYT b ₅	55
4.4.1	Izolace membránové frakce a solubilizace.....	55
4.4.2	Ionexová chromatografie na DEAE-Sepharose CL-6B	56
4.4.3	Rechromatografie apo-cytochromu b ₅ na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B	60
4.4.4	Chromatografické přečištění cytochromu b ₅ na koloně DEAE-Sepharosy	61
4.5	PURIFIKACE ERYTROCYTÁRNÍHO CYTOCHROMU b ₅	63
4.5.1	Ionexová chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B.....	63
4.5.2	Separace apo-cytochromu b ₅ na koloně Sephadexu G-75	67
4.5.3	Přečištění cytochromu b ₅ gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-75	71
4.6	SHRnutí PRŮBĚHU IZOLACE	73
4.6.1	Koncentrace proteinů v průběhu purifikace.....	75
4.7	KONCENTRACE FINÁLNÍCH PREPARÁTŮ STANOVENÁ ZE SPEKTRA.....	77
4.8	STANOVENÍ KONCENTRACE APO-CYT b ₅ PŘI TITRACI CHLORIDEM HEMINU.....	81
5	DISKUSE.....	84
6	ZÁVĚR	86
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	87

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A_x	absorbance při vlnové délce x nm
Amp	Ampicilin
apo-cyt b_5	apoforma cytochromu b_5
APS	persíran amonný (z angl. „ammonium persulfate“)
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BIS	N,N-methylen-bisakrylamid
bp	počet párů bází (z angl. „base pairs“), udává míru délky segmentu DNA
Brij 35	polyethylen glykol dodecyl ether
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. „bovine serum albumin“)
c	molární koncentrace
c_m	hmotnostní koncentrace
CYP	cytochrom P450
cyt b_5	cytochrom b_5
Da	dalton, $1 \text{ Da} = 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
DEAE-Sepharose	diethylaminoethyl-Separation Pharmacia Agarose
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
FAD	flavinadenindinukleotid
Falcon 50 ml	plastová zkumavka o objemu 50 ml
FMN	flavinmononukleotid

HAc	kyselina octová
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	kilobáze (z angl. „kilobase“), 1 kb = 1000 bp
<i>l</i>	optická dráha
LB medium	Luria Broth medium
M	mol.dm ⁻³
<i>M</i>	molekulová hmotnost
MFO	oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“)
MQ voda	deionizovaná voda
NaAc	octan sodný
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEB4	NEBuffer 4 (složení pro 1x koncentrovaný: 50 mM octan draselný, 20 mM Tris-acetát, 10 mM octan hořečnatý, 1 mM DTT, pH 7,9; 25°C) ³²
Oak Ridge	polypropylenové uzavíratelné zkumavky o objemu 28 ml určené k centrifugaci o vysokých otáčkách
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PE lahvička	polyethylenová lahvička
rpm	otáčky za minutu (z angl. „revolutions per minute“)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. „sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. „sodium dodecyl sulfate polyakrylamide gel electrophoresis“)
Sepharosa CL-6B	zesíťovaná (z angl. „cross-linked“) agarosa o koncentraci 6 % (w/v)
TAE pufr	Tris-acetát EDTA pufr

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
V_e	eluční objem
v/v	objem/objem (z angl. „volume/volume“)
w/v	hmotnost/objem (z angl. „weight/volume“)
ϵ_x	molární absorpční koeficient při vlnové délce x nm
δ -ALA	δ -aminolevulová kyselina
λ	vlnová délka

1 ÚVOD

S rozvojem civilizace se stále zvyšuje i podíl škodlivých látek v ovzduší, potravinách, pitné vodě atd. Rozvoj vědních oborů jako medicína a především farmakologie je doprovázen produkcí velkého množství léčiv, jejichž vedlejší nespecifické účinky na lidský organismus se mnohdy prokážou až příliš pozdě. Nemluvě o individualismu lidského organismu, kdy dva jedinci na podaný preparát mohou reagovat zcela odlišně.⁷⁰

Nejvíce diskutovanými systémy pro biotransformaci léčiv, endogenních látek a dalších xenobiotik jsou katalytické reakce cytochromů P450 (CYP), které spolupracují s dalšími biologickými jednotkami jako je cytochrom b₅ a jejich reduktasy. Jejich součinností dochází k biologické transformaci nepolárních látek na polárnější, čímž usnadňují jejich vyloučení z těla. Touto cestou lze předejít jejich nežádoucí akumulaci v tukových tkáních. Negativní stránkou věci zůstává fakt, že při biotransformaci mohou být substráty modifikovány i na toxické či karcinogenní produkty.^{69, 71}

To je také důvodem, proč se do popředí již dlouhá léta dostává snaha mnohých vědeckých pracovišť objasnit mechanismy biotransformace a účinku těchto látek, což by v důsledku mohlo vést k dosažení požadované účinnosti léčiva za ekonomicky efektivnějších podmínek.

1.1 Monooxygenasový systém

Tento systém je tvořen oxygenasami se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“, MFO), které se uplatňují například při oxidacích steroidů a metabolismu prostaglandinu,⁷⁶ ale především v I. fázi biotransformace xenobiotik.^{56, 74} Činnost tohoto souboru enzymů umožňuje inkorporaci jednoho atomu molekulárního kyslíku do široké škály substrátů, zatímco druhý kyslík se stává součástí molekuly vody.⁷¹ Tento děj se odehrává v aktivním centru terminální oxidasy MFO systému, kterou je CYP. Jeho reakční mechanismus je blíže popsán v kapitole 1.1.1.

Nezbytnými složkami monooxygenasového systému jsou CYP, na nichž probíhá katalytická reakce (oxidace substrátu), NADPH:CYP reduktasa (EC 1.6.2.4) jakožto dvouelektronový přenašeč a membrána příslušných organel, ve které jsou enzymy MFO systému ukotveny. Výjimku tvoří bakterie, jejichž MFO systém je solubilní v cytoplasmě

buněk. Enzymy díky správnému uchycení v membráně mohou měnit svoji konformaci a vykazovat tak mnohem vyšší aktivitu, mohou se vhodně napojit na spolupracující enzym⁶⁹ a udržet efektivní elektronový přenos². Mnohými studiemi již bylo potvrzeno, že katalytická činnost CYP může být ovlivňována i dalšími aspekty, jako je přítomnost jednoelektronového přenašeče cytochromu b_5 a jeho NADH:cytochrom b_5 reduktasy (EC 1.6.2.2) s kofaktorem FAD, jehož donorem elektronů je koenzym NADH.⁶²

Monooxygenasový systém eukaryot může být situován buď na vnější mikrosomální membráně, nebo na vnitřní mitochondriální membráně, orientovaný do matrixu. Přičemž přenos elektronu v těchto dvou prostředích na terminální oxidasu CYP probíhá přes odlišné enzymy.⁷¹

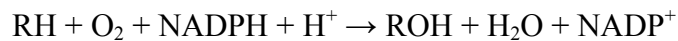
Transport elektronů v mitochondriálním MFO systému začíná přenosem z koenzymu NADPH přes flavinový enzym NADPH:adrenodoxin reduktasu s FAD kofaktorem na enzym adrenodoxin obsahující 2Fe-2S a dále na CYP. U bakterií je mechanismus obdobný s tím rozdílem, že enzymy NADH:putidaredoxin reduktasa, putidaredoxin i CYP se vyskytují volně v cytoplasmě bez ukotvení v membráně.^{57, 70, 71}

Na mikrosomálních membránách je tento elektronový transport zprostředkováván diflavinovým enzymem NADPH:CYP reduktasou, která má N-terminální hydrofobní konec zabudován v membráně.¹⁰ Tato reduktasa se kladně nabitými postranními řetězci aminokyselin FAD-vazebné domény váže na zbytek kyseliny fosforečné v NADPH v poloze 2'-adenosinové části, která má záporný náboj. To je také důvod, proč tato reduktasa nemůže být akceptorem elektronů od NADH. Přenos elektronu v rámci NADPH:CYP reduktasy z FAD na FMN, které fungují jako dělič elektronového páru,⁷¹ je poměrně rychlý, neboť je zprostředkován těsně přiléhajícími metylovými skupinami isoalloxazinových kruhů kofaktorů FAD a FMN.⁷⁶

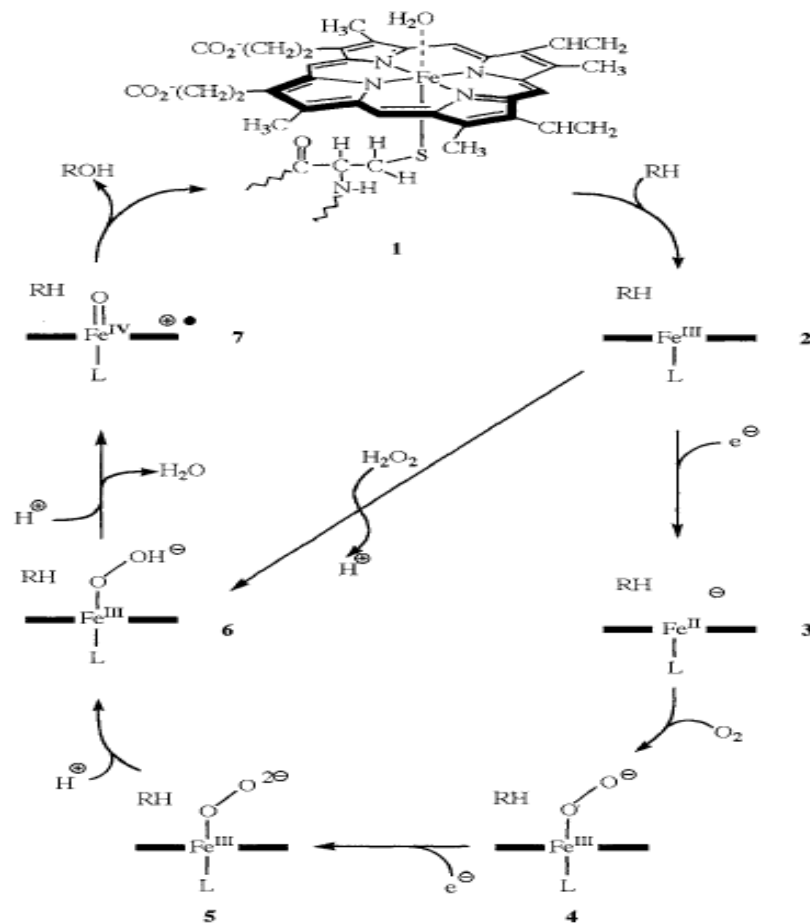
Spojení FMN-vazebné domény a CYP je zprostředkováno reakcí mezi protikladně nabitými aminokyselinovými zbytky, uplatňují se i vazby hydrofobního charakteru. FMN kofaktor NADPH:CYP reduktasy pak může předávat elektron na hem CYP, ale i na cytochrom b_5 , cytochrom c a jiné hemové oxydasy.^{10, 57, 76}

1.1.1 Katalytická činnost CYP

Činnost MFO systému lze shrnout do rovnice:⁷⁰



Enzym CYP v nativním stavu obsahuje v protoporfyrinu IX atom železa nacházející se v oxidačním stavu III a vázající molekulu vody (1). Tento komplex může být stabilizován vodíkovými můstky mezi vodíky vázané molekuly vody a dusíky protoporfyrinu IX. Pravděpodobnější je však případ, kdy vodíky směřují pryč od planární roviny protoporfyrinu IX. Atom železa s pěti valenčními elektrony umístěnými v energeticky níže položených molekulových orbitalech se nachází v nízkospinovém hexakoordinovaném stavu.⁵²



Obr. 1. Reakční cyklus CYP. Obrázek byl převzat⁵⁷ a upraven.

Po vstupu substrátu do aktivního centra a jeho vazbě na enzym dochází ke konformačním změnám a k odstoupení molekuly vody z axiálního ligandového vazebného

místa atomu železa (2), který přechází do vysokospinového pentakoordinovaného stavu.⁷¹ Při tom se na základě elektrostatických sil uplatňuje vliv cysteinu, který přitahuje (z angl. „push effect“) atom železa z roviny protoporfyrinu IX k sobě. Tím se komplex stává dobrým elektronovým akceptorem. Příjmem jednoho elektronu od NADPH:CYP reductasy dojde k redukci ferri formy na ferro formu centrálního atomu železa za současného udržení vysokospinového pentakoordinovaného stavu (3) a působení push effectu.⁵²

Tento komplex je schopen vázat jako axiální ligand molekulu kyslíku, případně oxid uhelnatý či oxid dusný.²³ Vazbou molekulárního kyslíku na atom železa dojde k jeho přechodu na nízkospinový hexakoordinovaný stav s oxidačním číslem III (4). Tento superoxidový komplex je pravděpodobně stabilizován postranními řetězci aminokyselin, může však dojít k disociaci na superoxidový anionradikál a Fe^{III}-protoporfyrin IX.⁷¹

K redukci superoxidového komplexu (4) může dojít dvěma způsoby, a to buď donací jednoho elektronu z NADPH:CYP reductasy nebo z cytochromu b₅. Produktem redukce je peroxokomplex (5) nukleofilní povahy projevující se jako silná báze, která podléhá protonaci a přechází na hydroperoxokomplex Fe^{III}-OOH (6).⁵²

Cílenou mutací u P450cam, při které byl Asp251 nahrazen Asn, bylo zjištěno, že první protonace proběhla pomaleji než v případě, kdy byl v P450cam přítomen Asp. Lze tedy předpokládat, že Asp251 může být při protonaci klíčovým donorem vodíku, který je přes molekuly vody v aktivním centru CYP přenášen až k peroxidovému aniontu komplexu (5).⁵²

Hydroperoxokomplex (6) je slabším nukleofilem,⁵² přesto jeví značnou afinitu k vodíku a dochází tak k druhé protonaci a následnému heterolytickému štěpení vazby O-O za vzniku molekuly vody a reaktivního ferrioxenového intermediátu Fe^{IV}=O (7), který je schopen inkorporovat kyslíkový atom do molekuly substrátu. Hydroxylovaný substrát opouští aktivní centrum enzymu a ten přechází do základního stavu.⁷¹

1.2 Cytochromy P450 (CYP, EC 1.14.14.1)

První zpráva o existenci tehdy zcela neznámých pigmentů schopných vázat oxid uhelnatý se objevuje v roce 1958 od Klingenberga, který jej izoloval z mikrosomů krysích jater.⁴⁶ Jejich funkce, jakožto oxygenas, byla záhy objevena Estabrookem, Cooperem,

Rosenthalem v roce 1963. A v roce 1982 se Fujii-Kuiyamaovi a kolektivu podařilo objasnit sekvenci aminokyselin kyslího eukaryotického cytochromu P450 2B1.¹²

Předpokládá se, že mikroorganismy používaly cytochromy P450 k hydroxylaci organických látek dále používaných jako energetický zdroj. V průběhu vývoje se jejich funkce výrazně rozšířily. Nyní jsou schopny metabolizovat cizorodé látky, mastné kyseliny, steroidy a další. V současnosti se často vyskytují v enzymových systémech, ve kterých spolupracují s dalšími enzymy na metabolismu substrátu. Příkladem může být spolupráce cytochrom P450 reductasy s cytochromem P450 v monooxygenasovém systému.^{70, 71}

Obecné označení cytochrom pro proteiny pochází z jejich lokalizace v buňce (z řec. „cyto“) a fotochemické vlastnosti (z řec. „chrome“). Označení P450 pochází ze spojení počátečního písmene slova pigment a vlnové délky 450 nm, při které vykazuje redukovaná forma hemu satureovaná oxidem uhelnatým absorpční maximum.

Cytochromy P450 se řadí mezi metaloproteiny, neboť prostetickou skupinou je Fe^{III}-protoporfyrin IX kovalentně vázaný na protein přes thiolátovou síru proximálního cysteinového ligandu.⁵²

Sekvence aminokyselin v oblasti místa pro vazbu hemu se i přes značnou substrátovou nespecifitu těchto enzymů vyznačuje vysokou mírou konzervovanosti, což bylo prokázáno rentgenovou krystalografií.⁵⁷

V roce 1987 byla Nebertem a kolektivem navržena změna nomenklatury cytochromů P450. V novém názvosloví je cytochromu P450 přidělena zkratka CYP a jednotlivé izoenzymy, například cytochrom P450 3A4, budou označovány zkratkou CYP, za níž bude ihned následovat označení izoenzymu, v uvedeném příkladě CYP3A4.⁵⁴

Se stále přibývajícím množstvím členů „superrodiny“ (z angl. „superfamily“) cytochromů P450 se objevila potřeba tyto cytochromy systematicky klasifikovat, a to na základě stupně homologie sekvence aminokyselin v jejich proteinové struktuře. Mají-li alespoň 40% homologii, řadí se do stejné rodiny, která je označována číslicí P450 3A4, CYP3A4. V případě více jak 60% shody v pořadí aminokyselin jsou rozděleny na podrodiny označované písmenem P450 3A4, CYP3A4. Poslední číslice P450 3A4, CYP3A4 označuje jednotlivé izoenzymy.^{56, 70}

1.2.1 Rozšíření CYP

Zástupce této superrodiny cytochromů P450 můžeme nalézt téměř ve všech formách života⁵² - zvířatech, rostlinách, houbách a v některých prokaryotických organismech. I přesto u některých bakterií, jako je *Escherichia coli*, nebyly v genomu nalezeny geny pro cytochromy P450.⁵⁶ Na druhou stranu byly objeveny u prokaryot využívajících uhlovodíky jako zdroj energie. Ty své vysoce specializované cytochromy např. P450cam využívají k hydroxylaci organických látek.^{52, 56}

Cytochromy P450 jsou pro eukaryotické buňky esenciální při biosyntetických reakcích⁵⁶ a derivatizační fázi biotransformace xenobiotik.^{70, 71} V lidském organismu již bylo objeveno 57 forem cytochromů P450 vyskytujících se převážně v játrech, gastrointestinálním traktu, ledvinách, plicích atd.^{13, 42, 70} Mezi hlavní cytochromy P450 lidských jater, které jsou schopné rozpoznat a metabolizovat xenobiotika a exogenní látky, patří CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4.⁵²

CYP jsou v eukaryotických buňkách ukotveny ve vnější membráně endoplasmatického retikula a orientovány do cytoplasmy. Inkorporace CYP do mikrosomální membrány vyžaduje přítomnost ribonukleoproteinu SRP (z angl. „signal recognition particle“), který rozeznává signální sekvenci aminokyselin na N-terminálním konci CYP. Tato sekvence je bohatá na přítomnost hydrofobních postranních řetězců aminokyselin a obsahuje také stop sekvenci ukončující vklad CYP do membrány.^{63, 64} Kdežto mitochondriální CYP, které jsou lokalizované na vnitřní membráně mitochondrií, jsou syntetizovány v cytoplasmě jako rozpustné prekursory s 20-40 aminokyselinovými zbytky⁵⁶ na N-terminálním konci, které jsou po importu prekursoru do mitochondrie odštěpeny membránovými proteasami, a enzym je inkorporován do membrány.^{55, 56} U bakterií byly CYP nalezeny v solubilní formě v cytoplasmě.⁵⁶

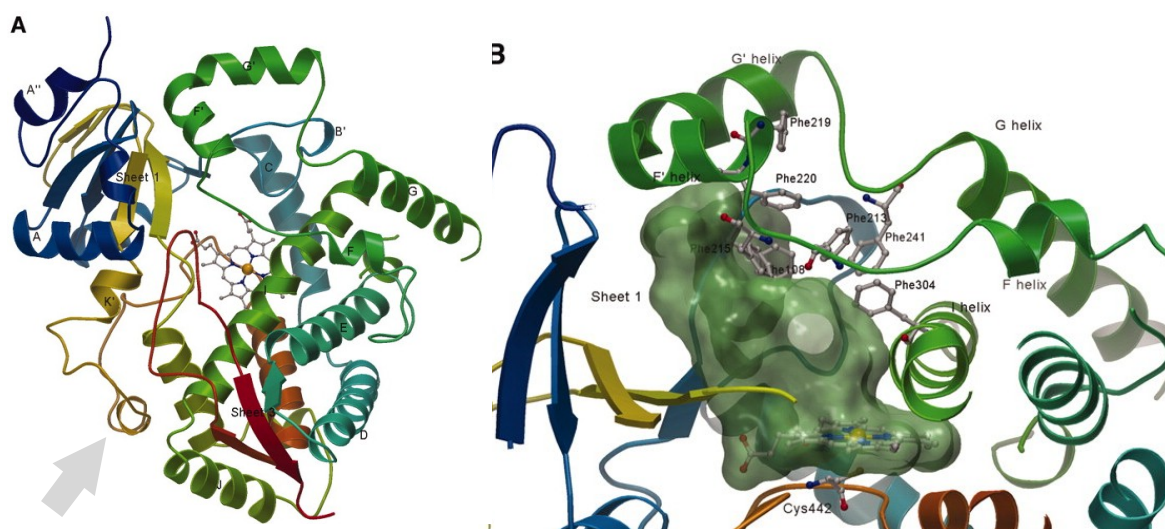
1.2.2 CYP3A4

Za hlavní centrum metabolismu xenobiotik lze považovat mikrosomy hepatocytů jater, v jejichž membránách jsou lokalizovány cytochromy P450 jako součásti monooxygenasového systému. Nejvíce zastoupeným CYP v lidských játrech a v tenkém střevě je izoenzym CYP3A4. Je doloženo, že množství CYP3A4 z celkového množství CYP v játrech se pohybuje v rozmezí 25 - 30 %.⁵⁷ CYP3A4 participuje na metabolismu

až 50 % klinicky významných léčiv.^{44, 52} Za identických podmínek se vyznačuje vyšší nebo srovnatelnou katalytickou aktivitou vůči 3A5 a výrazně vyšší vůči 3A7, které jsou taktéž přítomny v játrech.⁷⁹

Mezi substráty CYP3A4 patří léčiva, polutanty,⁵¹ dihydropyridiny⁷⁷, steroidy, jako je cholesterol metabolizovaný na 4 β -hydroxycholesterol³, a jaterní karcinogenní aflatoxin b1, jehož průběh modifikace byl sledován na rekombinantních CYP3A4.⁶⁸

V závislosti na příslušném substrátu může být katalytická činnost CYP3A4 stimulována cytochromem b₅ či nikoliv, jako je tomu v případě substrátu erytromycinu.⁶⁷ Interakce CYP3A4 s cytochromem b₅ jsou dále přiblíženy v kapitole 1.3.2.



Obr. 2. (A) Struktura CYP3A4. (B) Struktura CYP3A4 z pohledu šedé šipky na obrázku A zachycuje koordinaci protoporphyrinu IX na Cys442 a fenylalaninový shluk (z angl. „cluster“), který nebyl u jiných CYP detekován.⁸⁰

Atom železa protoporphyrinu IX v lidském CYP3A4 (obr. 2) je koordinován na thiolátové síře Cys442 a propionové skupiny interagují s postranními řetězci Arg105, Trp126, Arg130, Arg375 a Arg440. Velikost aktivního centra se odhaduje na 520 Å³, což je poměrně málo vzhledem k tomu, jak velké substráty může metabolizovat.⁸⁰ Mutagenézí cílenou na aktivní centrum bylo zjištěno, že Phe304 se podílí na substrátové specifitě CYP3A4.⁸ Leu211 se podílí na vazbě substrátu a udržování velikosti aktivního centra.¹¹ Při alaninové náhradě Leu210 a Leu211 byl prokázán vliv na regioselektivitu hydroxylace

testosteronu, zatímco u aminokyselin 212 až 216 byl tento vliv minimální. Tento fakt vypovídá o vlivu Leu210 a Leu211 na substrátovou specifitu CYP3A4.^{17, 18}

1.3 Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ je malý cylindrický protein o velikosti 16,7 kDa¹⁰, kyselé povahy, neboť jeho struktura je až z 25 % tvořena glutamátem a aspartátem, jejichž postranní řetězce jsou negativně nabitě.⁶⁵ Je tvořen šesti helixy a pěti strukturami skládaného listu.^{19, 66}

Cytochrom b₅ je membránově vázaný protein nacházející se na vnější membráně endoplasmatického retikula anebo v mitochondriích. Erytrocytární cytochrom b₅ se nachází jako solubilní protein v erythrocytech, kde se podílí na redukci methemoglobinu na hemoglobin. Při této redukci je donorem elektronu pro cyt b₅ NADH:cytochrom b₅ reduktasa.¹⁰

Obecně je cytochrom b₅ rozdělen na dvě hlavní domény. Doména hydrofilního charakteru obsahující N-terminální konec proteinu s hydrofobní oblastí pro vazbu prostetické skupiny hemu je orientována do cytoplasmy nebo do matrixu mitochondrie. Menší hydrofobní C-terminální konec je vložen do membrány.^{43, 65} Způsob, jakým je C-terminální konec uspořádán v membráně, není zatím objasněn. Byly navrženy dvě alternativy pro topologii C-terminálního konce v membráně. Jednou možností je průchod kotvy celou šířkou membrány až do lumenu retikula či jen částečné zanoření kotvy do membrány s tím, že C-terminální konec vystupuje opět do cytoplasmy.⁷⁴ Obě domény jsou propojeny krátkou sekvencí aminokyselin, od jejíž délky se odvíjí míra aktivity cytochromu b₅ s CYP. Je-li tento úsek menší než osm aminokyselin, potom cytochrom b₅ s CYP neinteraguje, zatímco s rostoucím řetězcem nad patnáct aminokyselin nejeví již zvyšující se aktivitu.^{10, 66} V tomto úseku může být cytochrom b₅ štěpen proteasami za vzniku solubilní formy, která však neovlivňuje katalytickou aktivitu CYP.⁶⁶ Pouze plně dlouhý membránově vázaný cytochrom b₅ může s CYP reagovat.¹⁰

Cytosolární doména je dále rozdělena na dvě jádra oddělená pěti β-strukturami skládaného listu. Jádro 1 je vazebným místem pro hem a je tvořeno čtyřmi šroubovicemi H2 – H5. Jádro 2 má strukturální funkci a je tvořeno šroubovicemi H1 a H6.^{6, 7}

Hem je lokalizován v hydrofobní oblasti N-terminální domény, atom železa protoporfyrinu IX je koordinován dvěma histidinovými zbytky His44 a His64.^{39, 66} Postranní

řetězce histidinů vážící se na atom železa protoporfyrinu IX jako ligandy brání reakci hemu s molekulárním kyslíkem. Cytochrom b_5 se při reakcích uplatňuje jako jednoelektronový přenašeč. Jeho donorem elektronů mohou být NADH:cytochrom b_5 reduktasa či NADPH:CYP reduktasa v monooxygenasovém systému.^{10, 65, 66}

1.3.1 Mechanismus působení cytochromu b_5 v monooxygenasovém systému

V poslední době vzrostla snaha zjistit příčiny vlivu cytochromu b_5 na metabolismus substrátu katalyzovaný CYP. Přítomnost cytochromu b_5 se může projevit stimulací nebo inhibicí katalyzované reakce či nemusí mít žádný efekt na metabolismus substrátu, záleží přitom na konkrétním izoenzymu CYP, typu substrátu a okolních podmínkách.⁵⁷

Bylo zjištěno, že cytochrom b_5 se v MFO systému vyskytuje téměř ve srovnatelném množství jako CYP, kdežto jedna molekula NADPH:CYP reduktasy musí spolupracovat s deseti až dvaceti molekulami CYP.¹⁰ Přesná funkce cytochromu b_5 však nebyla doposud zcela objasněna. Nejenom, že cytochrom b_5 moduluje katalytickou činnost CYP, ale participuje i na dalších reakcích, jako je například biosyntéza lipidů.⁷⁴

V monooxygenasovém systému může být elektron z NADPH:CYP reduktasy přenesen také na cytochrom b_5 , který je jinak akceptorem elektronu od elektronového přenašeče NADH:cytochrom b_5 reduktasy. Tato reduktasa je uchycena v membráně endoplasmatického retikula C-terminálním koncem a její kofaktor FAD může být redukován přenosem elektronu z NADH. Cytochrom b_5 v tomto systému pracuje jako donor druhého elektronu pro CYP.^{10, 66} Studie ukázaly, že krokem limitujícím rychlost metabolismu xenobiotik je druhá redukce atomu železa v protoporfyrinu IX enzymu CYP.⁶⁵

Přenos elektronu přes cytochrom b_5 při první redukci CYP je velmi pomalou reakcí neslučující se s běžnou rychlostí redukce. Proto se předpokládá, že při první redukci je donorem elektronu pro CYP výlučně NADPH:CYP reduktasa.⁶⁵

Další navrženou alternativou pro vysvětlení činnosti cyt b_5 v MFO systému je rychlý odběr jednoho elektronu z CYP po dvouelektronové donaci od NADPH:CYP reduktasy. V případě, že by cyt b_5 v takto navrženém mechanismu chyběl, by mohlo dojít k odstupu CYP od reduktasy.⁶⁶

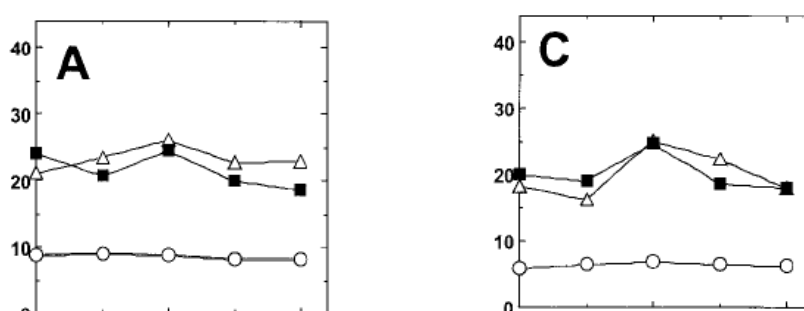
Teorie o neredoxní roli cytochromu b_5 při ovlivňování reakčního mechanismu CYP se začaly rozvíjet po experimentu, při kterém byl atom železa v protoporphyrinu IX nahrazen atomem manganu, jež není schopen elektronového transportu. Cytochrom b_5 i přes tento fakt vykazoval stimulační efekt.⁶² V dalších studiích se prokázalo, že cytochrom b_5 nevyžaduje ani přítomnost molekuly hemu. Tyto experimenty se však váží na druh substrátu a použitý izoenzym CYP.⁸⁴

1.3.2 Vliv apo-cytochromu b_5 na katalytickou činnost CYP

Pro bližší objasnění funkce cytochromu b_5 na činnost CYP byla navržena substituce tohoto proteinu jeho apoproteinovou formou, apo-cytochromem b_5 , který vzhledem k nepřítomnosti prostetické skupiny hemu není schopen přenosu elektronu.⁸³

Bylo prokázáno, že při 6β -hydroxylaci testosteronu v systému NADPH:CYP reduktasy a CYP3A4 purifikovaného z lidských jater měl apo-cyt b_5 téměř stejný stimulační účinek na katalytickou činnost CYP3A4 jako hemový cyt b_5 . Zatímco v systému složeném z NADH:cytochrom b_5 reduktasy a CYP3A4 nemohl být cyt b_5 substituován apo-cyt b_5 , protože NADH:cytochrom b_5 reduktasa nemohla transportovat elektron přímo na CYP3A4.⁸²

Obdobných výsledků bylo dosaženo i při oxidaci substrátu nifedipinu.⁸⁴ Kdežto bez přítomnosti cyt b_5 či apo-cyt b_5 byla reakce extrémně pomalá. Naproti tomu v případě substrátu ethylmorfinu nemá přítomnost cyt b_5 nebo apo-cyt b_5 na katalýzu žádný vliv.⁸²



Obr. 3. Stimulace (A) hydroxylace 6β -testosteronu a (C) oxidace nifedipinu katalyzované CYP3A4. Katalýza v přítomnosti apo-cyt b_5 (Δ), cyt b_5 (\blacksquare), bez přítomnosti apo-cyt b_5 i cyt b_5 (o).⁸²

Podle studie Guryeva a kolektivu stimuluje apo-cyt b₅ katalytickou aktivitu CYP3A4 díky přesunu hemové skupiny z CYP3A4 na apo-cytochrom b₅ za vzniku cyt b₅, který umožní elektronový přenos. Vznik hemového cyt b₅ v reakční směsi byl potvrzen iontovou chromatografií.¹⁴

Není však ověřeno, zda tento hem inkorporovaný do apo-cyt b₅ pochází opravdu z CYP3A4 nebo jde o část hemu náhodně obsaženou v reakční směsi. Yamazakiho týmu při řešení tohoto problému posloužil apomyoglobin, který má vysokou afinitu k hemu v roztoku a tedy všechny přítomný volný hem naváže do své molekuly. Bylo zjištěno, že může dojít k přenosu pouhých 3 – 5 % hemu z CYP3A4 na apo-cyt b₅. Toto množství však nemůže zajistit stimulaci aktivity CYP3A4, kterou vykazuje běžně při experimentech.⁸³

Mnohé studie potvrdily, že pro stimulaci činnosti některých CYP (CYP2A6, CYP2A8, CYP2B6, CYP2C9 atd.) s daným substrátem není nutně zapotřebí přítomnosti hemu v cyt b₅.^{49, 82, 83, 84} Funkce apo-cytochromu b₅, jež není schopen elektronového přenosu při stimulaci systému CYP a NADPH:CYP reduktasy, se tak může pravděpodobně odehrávat na úrovni konformačních změn, které by mohl uplatňovat i cyt b₅.^{49, 84}

1.4 Heterologní exprese

Vzhledem k obtížnosti sledování mnohých procesů v podmínkách *in vivo* a k nedostatku a náročnosti získání biologického materiálu z živých organismů, a to především z lidské populace, byly navrženy alternativní cesty k dosažení těchto cílů, kterou je i heterologní exprese.

Jde o metodu využívanou v buněčné biologii a biochemii ke klonování genů a produkci proteinů, které se běžně v daném hostiteli (recipientní buňce) nevyskytují. Genetický materiál nesoucí informaci o požadovaném proteinu může být do recipientní buňky vnesen ve formě rekombinantní molekuly DNA jako plasmid, což je malá dvouřetězcová molekula DNA zcela nezávislá na bakteriálním chromosomu.¹ Tato rekombinantní DNA bývá označována také jako expresní vektor určený k produkci proteinů či klonovací vektor pro amplifikaci genů.

K tomuto účelu jsou využívány heterologní expresní systémy, které mohou být bakteriálního, kvasinkového, hmyzího, savčího či jiného původu.⁵⁸ V této práci byl využit bakteriální expresní systém kmene *Escherichia coli*. Tato bakterie se běžně vyskytuje

v lidských střevech a lze ji pěstovat i v laboratorních podmínkách. Replikace DNA a dekodování genetické informace v *E. coli* probíhá stejným způsobem jako v lidských buňkách. Výhoda expresního systému *E. coli* spočívá v rychlém buněčném růstu. Při 37°C v aerobních podmínkách se během 20 – 25 min množství buněk zdvojnásobí.^{1, 58} Vyznačuje se také minimálními nároky na růstové medium a vysokým podílem exprimovaného proteinu²⁸ v krátkém časovém úseku. Je vhodný pro expresi prokaryotních genů a genů eukaryotních, které nepodléhají posttranslačním úpravám, neboť *E. coli* nejsou schopny těchto úprav. Nevýhodou je možná sekrece proteinů do inkluzních tělísek.⁵⁸

1.5 Expresní vektor pET22b

Systém pET byl navržen pro klonování a exprese rekombinantních proteinů v bakteriálním kmenu *E. coli*. Plasmid pET22b má velikost 5493 bp a k transkripci cílového genu vyžaduje přítomnost T7 RNA polymerasy, jejíž gen se na chromosomální DNA bakteriálních buněk běžně nevyskytuje. Z tohoto důvodu byl do bakteriálního chromosomu integrován lysogen bakteriofága T7 jako profág DE3, který kóduje gen pro T7 RNA polymerasu. Před tento gen byl navíc vložen *lac* promotor, který po přidavku isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) zahájí translaci genu T7 RNA polymerasy na profágu DE3 hostitelské buňky genomovou *E. coli* RNA polymerasou. Produkovaná T7 RNA polymerasa zahajuje translaci cílového genu umístěného za T7 promotorem na plasmidu pET22b. T7 RNA polymerasa je selektivní a vysoce aktivní, v průběhu několika hodin může exprimovaný protein tvořit více než 50 % všech bílkovin v buňce.⁶⁰

Ve vektoru pET22b je zabudován i gen pro β -laktamasu, která zajišťuje rezistenci buňky vůči antibiotiku ampicilinu přidávaného do kultivované kultury buněk.⁶⁰

1.6 Restrikční endonukleasy XhoI a NdeI

Pro ověření přítomnosti cílového genu, v našem případě genu pro cytochrom b_5 , v plasmidu pET22b se využívá štěpení endonukleasami a následná agarosová elektroforéza. Vzhledem k sekvenci nukleotidů ohraničujících inzerty kódující gen pro mikrosomální a erytrocytární formu cytochromu b_5 byly použity endonukleasy XhoI a NdeI. Jedná se o enzymy skupiny EC 3.1.21.4 patřící mezi restrikční endonukleasy II. typu. Tyto endonukleasy se za jistých podmínek (dostatek Mg^{2+} jako kofaktoru) vyznačují schopností

rozpoznat krátké specifické sekvence 4 – 8 nukleotidů v molekule DNA tzv. restrikční místa. V místě takovéto sekvence endonukleasa štěpí vazbu mezi fosfátem a deoxyribosou nukleotidu.

NdeI má charakteristické restrikční místo v sekvenci 5'...CA[▼]TATG...3' resp. 3'...GTAT[▼]AC...5'³³

Pro endonukleasu XhoI je typické štěpení v sekvenci 5'...C[▼]TCGAG...3' resp. 3'...GAGCT[▼]C...5'³⁴

2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cytochrom b_5 se ve spolupráci s NADH:cytochrom b_5 reduktasou či NADPH:CYP reduktasou v organismech uplatňuje jako jednoelektronový přenašeč, který je součástí monooxygenasového systému (MFO systém).⁶² Tento soubor monooxygenas se smíšenou funkcí hraje klíčovou roli při biotransformaci xenobiotik, neboť katalyzuje inkorporaci atomu kyslíku do molekuly substrátu ve formě hydroxylové skupiny a umožní tak jeho snadnější eliminaci z organismu.⁷¹ Činnost cytochromu b_5 , jakožto elektrontransferasy, může významně ovlivňovat katalytické reakce MFO, a proto je velmi důležité se jím při studiu MFO systému zabývat.

Cílem bakalářské práce byla heterologní exprese lidské mikrosomální (membránové) a erytrocytární (solubilní) formy cytochromu b_5 v bakteriálním kmenu buněk *Escherichia coli* a její optimalizace.

V další fázi vypracování bakalářské práce měly být obě formy cytochromu b_5 vhodným postupem purifikovány, a to primárně jako apoprotein (apo-cyt b_5) a posléze holoprotein (cyt b_5), který byl vedlejším produktem této práce.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje, chemikálie a materiál

3.1.1 Přístroje

Centrifugy: 5415 R (Eppendorf), Janetzki K70D (MLW), Allegro X-22R (Beckman Coulter) s výkyvným rotorem SX4250 a úhlovým rotorem F0630, minicentrifuga GmCLab (Gilson), minicentrifuga pagnet, ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter) s úhlovým rotorem Ti 70

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

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

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

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

Spektrofotometry: Diod Array 8453 (Hewlett-Packard), Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena), Spektromom 195D (MOM Budapest), Helios α (Thermo ELECTRON CORPORATION)

Ultrazvukový homogenizátor (sonikátor): SONOPULS HD 3100 - složen z generátoru GM 3100, konvertoru UW 3100, standardního rohu SH 70 G a ultrazvukové sondy TE 76 (BANDELIN)³⁰

Vodní lázně: Julabo TW2 (JULABO Labortechnik GmbH), Julabo TW8 (JULABO Labortechnik GmbH), GFL 1092 (MERCIO)

Magnetické míchačky: KMO2 basic (IKA-WERKE), HM2A (Laboratorní přístroje Praha)

Magnetická míchačka s ohřevem: Variomag Monotherm (H + P)

Třepačky: Genius 3 orbital shaker (IKA® VORTEX), MS 2 Minishaker (IKA)

pH metr: model 370 (ATI Orion)

Transiluminátor: DarkReader (Clare Chemical Research)

Drtič ledu: Solid JÉGZÚZO

Fotoaparát: PowerShot A590 IS (Canon), DMC-LS65 (Panasonic)

Sběrače frakcí: BioLogic BioFrac (BIO-RAD), model 2128 (BIO-RAD)

Peristaltická pumpa: PP 05 (Laboratorní přístroje Praha)

Kahan: Gasprofi2 SCS (VLD-TEC)

Laminární box: Biohazard Box BIO 126 (Labox)

Sonikátor: UC 005 AJ1 (Tesla)

Autokláv: Varioklav 400E, (H + P Labortechnik)

Ultrafiltrační cela: Amicon 8200 (Millipore)

Ohřívač bloků: LS1 (VLM GmbH)

Automatické pipety: BIOHIT, NichipetEX, makropipety Acura[®] 835

3.1.2 Chemikálie a materiál

Lach-ner s. r. o., Česká republika: dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydroxid draselný (KOH), glycerol bezvodý, kyselina octová 99% (HAc), chlorid draselný (KCl)

Lachema n. p. Brno, Česká republika: uhličitan sodný (Na₂CO₃), vínan draselno-sodný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃), ethanol (EtOH), pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄.5H₂O), persíran amonný (APS)

Serva Electrophoresis, Německo: N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), ampicilin (Amp), Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)

Sigma-Aldrich[®], USA: Luria Agar medium, Luria Broth medium, cholát sodný, Brij[®] 35, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), GenElute[™] Plasmid MidiPrep Kit

Sevapharma, Česká republika: hovězí sérový albumin (BSA)

Fermentas, Kanada: Lambda DNA/EcoRI + HindIII marker 3 (564 – 21226 bp),

2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb)

New England BioLabs, USA: restriční enzymy NdeI (20000 U/ml) a XhoI (20000 U/ml), pufr NEB4, BSA (100x koncentrovaný, zásobní roztok BSA o koncentraci 100 mg/ml)

Roche Applied Science, USA: inhibitory proteas cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Frontier Scientific, Inc., USA: chlorid heminu

Penta, Česká republika: hydroxid sodný (NaOH)

Top-Bio, Česká republika: DNA marker (155 – 970 bp)

Invitrogen, USA: SYBR® Safe DNA gel stain (10000x koncentrovaný)

Fluka, Švýcarsko: N,N-methylen-bisakrylamid (BIS), dodecylsulfát sodný (SDS)

Pharmacia, Švédsko: DEAE-Sepharosa CL-6B, Sephadex G-75

AppliChem, Německo: δ -aminolevulová kyselina (δ -ALA)

Stratagene, USA: bakteriální kmen *E. coli* BL-21 (DE3) Gold

Expresní plasmidy pET22b nesoucí obě formy cytochromu b₅ byly připraveny Mgr. Terezou Hálkovou v rámci její diplomové práce na katedře biochemie PřF UK.

Standard mikrosomálního cyt b₅ pro SDS-PAGE poskytla Bc. Monika Koberová a standard erytrocytárního cyt b₅ RNDr. Věra Černá, Ph.D. V obou případech se jednalo o králičí formy těchto proteinů.

3.2 Metody využité při řešení bakalářské práce

Plasmidem pET22b uváděném v následujících kapitolách je míněn plasmid, jehož součástí je gen buď pro erytrocytární cytochrom b₅ nebo mikrosomální cytochrom b₅.

3.2.1 Restrikce plasmidu pET22b endonukleasami XhoI a NdeI

Před zahájením produkce lidského cytochromu b₅ byla dvojí restrikcí plasmidu pET22b ověřena přítomnost inzertu s genem mikrosomální a solubilní formy lidského cytochromu b₅.

Podmínky pro štěpení plasmidu pomocí endonukleas XhoI a NdeI byly převzaty z aplikace Double Digest Finder³¹ společnosti New England BioLabs. Restrikce pET22b

byla provedena za následujících podmínek – bylo použito 15 µl plasmidové DNA, 1 µl XhoI, 1 µl NdeI, 2 µl pufru NEB4 (10x koncentrovaný)³², 0,2 µl BSA (100x koncentrovaný). Objem byl doplněn sterilní destilovanou vodou na 20 µl.

Štěpení plasmidů probíhalo po dobu 3 hodin při 37°C v inkubátoru (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Poté byla provedena agarosová elektroforéza pro vizuální ověření přítomnosti inzertů (viz kap. 3.2.7.1).

3.2.2 Amplifikace expresního vektoru pET22b

3.2.2.1 Příprava agarových ploten

Příprava agarových ploten probíhala v laminárním boxu (Biohazard Box BIO 126, Labox). Zásobní roztok sterilního agaru, který byl připraven z 20 g Luria Agarů rozpuštěného v 500 ml destilované vody a autoklávován 20 min při 121°C (Varioklav 400E, H + P Labortechnik), byl zkapalněn zahřáním v mikrovlnné troubě. Do zkumavky falcon o objemu 50 ml bylo odebráno potřebné množství agaru (tj. cca 10 ml agaru na jednu plotnu) a po jeho částečném zchladnutí bylo přidáno antibiotikum ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml. Promícháním se ampicilin rovnoměrně rozdělil do objemu agaru, který byl po 10 ml nalit na sterilní plastové Petriho misky a zde po úplném vychladnutí ztuhnul.

3.2.2.2 Transformace kompetentních buněk

Pro amplifikaci plasmidů nesoucích inzert s genem pro mikrosomální a erytrocytární formu cytochromu b₅ byly použity buňky *E. coli* DH5α. Pro heterologní expresi proteinů (cytochromů b₅) byly transformovány buňky *E. coli* BL-21 (DE3) Gold.

Kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly ponechány pomalu roztát na ledu. Ke 100 µl buněk byly přidány 2 µl plasmidu nesoucího gen pro mikrosomální formu cytochromu b₅. Směs byla krouživými pohyby jemně promíchána špičkou pipety. Následovala inkubace 30 minut na ledu. Poté byl proveden tepelný šok (z angl. „heat-shock“), který usnadňuje vstup plasmidů přes membránu buněk do cytoplasmy.⁵⁹ Při tepelném šoku byla směs buněk a plasmidů vložena do vodní lázně (Julabo

TW2, JULABO Labortechnik GmbH) o teplotě 42°C po dobu 90 sekund v případě buněk DH5α a na 27 sekund v případě buněk BL-21 (DE3) Gold. Poté byly buňky opět inkubovány 2 minuty na ledu. K buňkám byl přidán trojnásobek jejich objemu LB media, směs byla pipetou promíchána a inkubována 1 hodinu při 37°C v inkubátoru (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories). Následně byla směs v mikrozkuhavce centrifugována 30 s při 6000 rpm (5415 R, Eppendorf) a byla odstraněna část supernatantu, aby buňky po nanesení na plotny snadněji přilnuly k povrchu agaru. Pelety byly resuspendovány ve zbytku LB media a sterilní mikrobiologickou hokejkou rozetřeny na Petriho misky s tuhým médiem agarem s ampicilinem. Na miskách byly ponechány bakterie růst v inkubátoru při 37°C přes noc do vytvoření viditelných kolonií.

Vždy byl připraven i kontrolní negativní vzorek, který obsahoval 100 μl kompetentních buněk s tím rozdílem, že místo plasmidu byly přidány 2 μl sterilní vody.

Stejným postupem byly transformovány bakterie plasmidem obsahujícím inzert s genem pro erytrocytární formu cytochromu b₅.

3.2.2.3 Inokulace bakteriálního růstového média a kultivace *E. coli* DH5α

Do 100 ml sterilního LB media v 500 ml Erlenmayerově baňce byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 μg/ml. Na agarové plotně přes noc vyrostly okem patrné kolonie buněk, z nichž byla vybrána jedna vhodná kolonie, která byla pomocí sterilního párátko následujícím způsobem přeočkována do LB media s ampicilinem. Do vyžíhané pinzety bylo uchopeno párátko, jehož špičkou byla opatrně nabrána část kolonie z agarové plotny, a celé párátko bylo vhozeno do Erlenmayerovy baňky. Hrdlo i zátka baňky byly ožehnuty nad kahanem. Baňka uzavřená zátkou z buničité vaty, aby kultivace buněk probíhala v aerobním prostředí, byla umístěna přes noc do vodní třepací lázně (GFL 1092, MERCI) o teplotě 37°C a míchána rychlostí 250 rpm.

Plotny byly utěsněny parafilmem a uchovány v lednici při 4°C pro další použití.

3.2.3 Purifikace plasmidu pET22b pomocí komerčního kitu MidiPrep

Při izolaci plasmidové DNA bylo postupováno podle návodu společnosti Sigma-Aldrich® pro produkt GenElute™ Plasmid MidiPrep Kit, který byl k izolaci použit.³⁸

Z namnožených buněk o optické densitě OD_{600} blízké hodnotě 2 bylo odebráno 80 ml kultury a rozděleno do dvou zkumavek falcon o objemu 50 ml. Toto množství bylo určeno ze vztahu $80/OD_{600}$. Jelikož se jedná o plasmid s nízkým počtem kopií, bylo použito dvojnásobné množství spočtené kultury.

Buňky byly sklizeny centrifugací. Během centrifugace (Allegro X-22R, Beckman Coulter, výkyvný rotor SX4250) při 3901 xg po dobu 10 min se na dně zkumavky usadily buňky a supernatant tvořený LB médiem byl odstraněn. Zkumavky stály 2 min v převrácené poloze, aby odtekly i poslední kapky LB media ulpěné na stěnách zkumavek.

Pelety byly rozmíchány v 1,2 ml resuspendačního roztoku obsahujícího RNAsu A, 50 mM Tris-HCl a 25 mM EDTA až do vzniku homogenního roztoku, spojeny a přeneseny do centrifugačních kyvet typu Oak Ridge. Dále bylo do směsi přidáno 1,2 ml lyzačního roztoku obsahujícího SDS a NaOH umožňující otevření buněk a uvolnění cytosolu do prostředí. Roztok byl ihned 8x opatrně promíchán převrácením a po cca 4 min bylo do kyvet přidáno 1,6 ml roztoku pro neutralizaci, jehož složení výrobce neuvádí, a opětovně jemně promícháno převrácením. Zbytky buněčných membrán, proteiny, lipidy atd. byly po centrifugaci (Allegro X-22R, Beckman Coulter, úhlový rotor F0630) při 15000 xg po dobu 15 min obsaženy v peletě. Plasmidová DNA byla součástí supernatantu.

Do zkumavky o objemu 15 ml byla vložena kolona dodávaná výrobcem pro vazbu plasmidové DNA. Nosič kolony bylo nutno před použitím promýt 3 ml roztoku na přípravu kolony a tekutinu odstranit centrifugací (Allegro X-22R, Beckman Coulter, výkyvný rotor SX4250) při 3901 xg 2 min.

Supernatant obsahující plasmidovou DNA byl nanesen na kolonu umístěnou v 15 ml zkumavce a centrifugován (Allegro X-22R, Beckman Coulter, výkyvný rotor SX4250) při 3901 xg 2 min kvůli odstranění přebytečné kapaliny. Pro odstranění solí z průběhu izolace byla kolona promyta 3 ml promývacího roztoku obsahujícího NaCl a Tris-HCl, který byl před prvním použitím izolační sady smíchán s ethanolem. Roztok byl odstraněn centrifugací za výše uvedených podmínek. Abychom si byli jisti, že veškerý promývací roztok byl z kolony odstraněn, byla znovu provedena centrifugace při 3901 xg 1 min. Plasmid byl z kolony eluován 1 ml MQ sterilní vody předehřáté na 65°C v ohříváči bloků (LS1, VLM GmbH) s následnou centrifugací při 3901 xg, 5 min do nové, sterilní zkumavky. Získaný

plasmid byl alikvotován po 200 µl do mikrozkušavek a uložen v -20°C. Všechny kroky izolace probíhaly při laboratorní teplotě.

Čistota a koncentrace plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky (viz kap. 3.2.7.4).

Aby byla dokázána přítomnost plasmidů v izolovaných roztocích a především přítomnost inzertů pro gen erytrocytární a mikrosomální formy cytochromu b₅ v izolovaných plasmidech pET22b, bylo provedeno štěpení plasmidů (postup v kap. 3.2.1) a následná agarosová elektroforéza (kap. 3.2.7.1).

3.2.4 Exprese cytochromu b₅ probíhající při 37°C

Cílem takto provedené exprese byla snaha získat značný podíl apoproteinové formy cytochromu b₅.

Do čtyř sterilních Erlenmayerových baňek o objemu 2 l bylo připraveno 500 ml LB media rozpuštěním 12,5 g Luria Broth v 500 ml destilované vody. Baňky byly uzavřeny zátkami z buničité vaty, které byly překryty alobalem, a sterilizovány v autoklávu (Varioklav 400E, H + P Labortechnik) při 121°C po dobu 20 min.

K LB mediu v baňkách byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml a baňky byly na 15 min umístěny do inkubátoru (ORBI-SAFE TS NetWise, Gallenkamp) vyhřátého na 37°C, aby LB medium dosáhlo teploty, při níž bude probíhat růst buněk.

Na každou plotnu s narostlými koloniemi buněk *E. coli* BL-21 (DE3) Gold inkubovanými přes noc (viz kap. 3.2.2.2) byl přidán 1 ml LB media s Amp, jehož koncentrace v LB mediu byla 100 µg/ml. Sterilní hokejkou byly kolonie na agarové plotně převedeny do přidaného LB media a 400 µl takto vzniklé suspenze bylo použito k zaočkování přehřátého LB media s Amp v Erlenmayerových baňkách. Z jedné plotny tak byly inokulovány dvě LB media s Amp. Růst buněk probíhal v inkubátoru (ORBI-SAFE TS NetWise, Gallenkamp) při 37°C a 200 rpm. Každou hodinu byly odebírány vzorky o objemu 1 ml, u nichž byla stanovena optická denzita při 600 nm na spektrofotometru (Spekol 11, Carl Zeiss Jena). Vzorky byly měřeny v kyvetách o optické dráze 0,998 cm proti LB mediu s Amp (100 µg/ml). Tyto vzorky z průběhu kultivace buněk byly centrifugovány (5415 R, Eppendorf) 3 min při 6000 rpm. Buňky *E. coli* BL-21 (DE3) Gold

v peletě byly po odstranění supernatantu rozmíchány ve 100 μ l sterilní vody a uchovány při -20°C .

Expres cyt b_5 byla indukována přidavkem isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) při dosažení $\text{OD}_{600} \approx 1$ u buněk nesoucích gen pro mikrosomální cyt b_5 a $\text{OD}_{600} \approx 0,8$ pro erytrocytární cyt b_5 . IPTG bylo přidáno v takovém množství, aby jeho koncentrace v suspenzi inkubovaných buněk byla 0,5 mM. Expres probíhala také při 37°C .

Po 4 h od indukce byla expres ukončena, suspenze *E. coli* BL-21 (DE3) Gold rozdělena do centrifugačních kyvet a odstředěna 20 min při 3000 rpm (Janetzki K70D, MLW). Supernatant byl odstraněn a pelety byly resuspendovány v 5 ml resuspendačního pufru (10 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,7). Stejně frakce z kyvet byly spojeny, přeneseny do zkumavky falcon (50 ml) a výsledný objem byl resuspendačním pufrem upraven na 35 ml. Buňky BL-21 (DE3) Gold s exprimovaným mikrosomálním a erytrocytárním cyt b_5 byly uchovány v -20°C .

K posouzení míry produkce cytochromu b_5 byla ze vzorků odebíraných v průběhu produkce provedena SDS elektroforéza (kap. 3.2.7.2).

3.2.4.1 Expres cytochromu b_5 při 27°C za přítomnosti δ -aminolevulové kyseliny

Úkolem exprese při následujících podmínkách byla produkce většího podílu holoproteinu cytochromu b_5 pro purifikaci než při expresi v kap. 3.2.4, kde byl naopak pro purifikaci žádoucí větší podíl apoproteinu cytochromu b_5 .

Při produkci mikrosomálního a erytrocytárního cyt b_5 bylo postupováno podobně jako v předešlé kapitole 3.2.4 s tím rozdílem, že byla provedena v polovičním množství LB media (tj. 1 x 500 ml pro buňky nesoucí gen kódující mikrosomální cyt b_5 a 1 x 500 ml pro erytrocytární cyt b_5). Při $\text{OD}_{600} \approx 1$ buněk s mikrosomálním cyt b_5 a $\text{OD}_{600} \approx 0,8$ buněk s erytrocytárním cyt b_5 bylo do suspenze buněk přidáno takové množství δ -ALA, aby její výsledná koncentrace v suspenzi byla 0,5 mM. Expres cytochromů b_5 byla zahájena ihned po přidavku δ -ALA přidáním IPTG do výsledné koncentrace v suspenzi buněk 0,01 mM. Současně s přidavkem IPTG byla teplota exprese snížena na 27°C . U vzorků odebíraných v průběhu kultivace i exprese byla změřena OD_{600} a provedena SDS-PAGE.

3.2.5 Purifikace lidského mikrosomálního apo-cytochromu b₅ a cytochromu b₅

Veškeré postupy uvedené v této kapitole probíhaly v chladové místnosti při 5°C. Výjimkou byly práce vyžadující manipulaci s přístroji, jejichž přítomnost v chladové místnosti není žádoucí např. centrifugy, spektrofotometry, sonikátor, atd.

3.2.5.1 Ultrazvuková lýza buněk BL-21 (DE3) Gold

Suspenze buněk, u nichž byl cytochrom b₅ extrimován pro 37°C, byla vytažena z -20°C a ponechána rozmraznout při laboratorní teplotě. V 1,5 ml resuspendačního pufru (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,7) byla sonikací (UC 005 AJ1, Tesla) rozpuštěna jedna tableta inhibitorů proteas (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Roztok inhibitorů proteas byl přidán k rozmraženým buňkám. Buňky byly rozrušeny použitím sonikátoru (SONOPULS HD 3100, sonda TE 76 o výkonu 40 W) v 9-ti sonikačních periodách, z nichž každá trvala 2,5 min. Mezi periodami byl udržován odstup 6 min. Při sonikaci jsou buněčné stěny a membrány rozrušovány ultrazvukovými vibracemi ze sondy, která vzhledem k velkému pracovnímu výkonu generuje do okolí teplo, což by mohlo vést k denaturaci proteinů.³⁵ Z tohoto důvodu byly buňky během sonikačních period chlazeny v kádince s vodou a ledem a mezi jednotlivými periodami byly drženy v ledové tříšti.

3.2.5.2 Izolace membránové frakce buněk

Pro získání membránové frakce buněk byla použita metoda diferenciální centrifugace.

Nejprve byl buněčný lyzát centrifugován (Allegro X-22R, Beckman Coulter, výkyvný rotor SX4250) při nižších otáčkách 4500 rpm, 15 min při 4°C. Tím bylo docíleno oddělení nerozbitých buněk a jejich zbytků, které byly po centrifugaci obsaženy v peletě, od buněčného cytosolu uvolněného do roztoku při sonikaci. Součástí cytosolu byl také cyt b₅ ukotvený ve frakcích buněčné membrány.

Druhým krokem byla centrifugace při vyšších otáčkách. Supernatant rozdělený do dvou polykarbonových ultracentrifugačních kyvet (26,3 ml, 25 x 89 mm) byl odstředěn při 60000 rpm, 75 min při 4°C na ultracentrifuze (Optima™ LE-80K, Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 70). Působením tak vysoké odstředivé síly sedimentuje na dno kyvety mimo jiné i

membránová frakce s cyt b_5 . Lehčí molekuly jako jsou proteiny, lipidy, inhibitory proteas, nukleové kyseliny atd. zůstávají v supernatantu.⁷⁵

Peleta byla přenesena do 20 ml homogenizátoru a homogenizována v 25 ml resuspendačního pufru (10 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7) v chladové místnosti při 5°C. Homogenát byl uchován v -20°C ve zkumavce falcon (50 ml).

3.2.5.3 Solubilizace

Cílem solubilizace bylo uvolnit membránový protein cyt b_5 z membrán. Molekuly detergentů rozpouštějící se v lipidových membránách narušují jejich integritu a umožňují uvolnění proteinů.⁴

Ve vzorku membránové frakce byla stanovena koncentrace proteinů metodou BCA popsanou v kap. 3.2.7.3.

Membránová frakce byla naředěna resuspendačním pufrům (10 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7) tak, aby koncentrace stanovených proteinů v homogenátu byla 3 mg/ml.

Naředěný homogenát v Erlenmayerově baňce byl solubilizován přidáním směsi potřebného množství detergentů 10% (w/v) Brij 35 a 10% (w/v) cholátu sodného v poměru 1 mg každého detergentu na 1 mg proteinů. Detergenty byly přidávány po kapkách. Solubilizace byla prováděna 2 hod a po celou dobu byl solubilizát chlazen ledem za neustálého míchání na magnetické míchačce (Variomag Monotherm, H + P).

Solubilizát byl rozdělen do dvou ultracentrifugačních kyvet (26,3 ml, 25 x 89 mm), kyvety byly resuspendačním pufrům (10 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7) doplněny na maximální objem, vyváženy a odstředěny na ultracentrifuze (Optima™ LE-80K, Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 70) 75 min, při 60000 rpm a 4°C. Jak již bylo uvedeno v kap. 3.2.5.2, nesolubilizované membrány při této odstředivé síle sedimentují a uvolněné proteiny zůstávají v supernatantu.

3.2.5.4 Purifikace cytochromu b_5 iontově výměnnou chromatografií

3.2.5.4.1 PŘÍPRAVA NOSIČE DEAE-SEPHAROSY CL-6B

K purifikaci cytochromu b_5 byla využita ionexová chromatografie na nosiči DEAE-Sepharosy CL-6B. Jedná se o anex, zásaditý zesíťovaný agarosový nosič, na nějž jsou kovalentně vázány ionizovatelné skupiny diethylaminoethylu (DEAE, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)²⁷, které umožňují dělení kyselých čili negativně nabitých proteinů.⁷⁵

Asi 100 ml nosiče DEAE-Sepharosy CL-6B uskladněného v 20% (v/v) EtOH bylo připraveno k použití promytím v 3 x 300 ml destilované vody, 1 x 200 ml cyklizačního pufru (1 M KH_2PO_4 , pH 7,7) a dále ve 200 ml cyklizačního pufru, v němž byl nosič ponechán přes noc. Následovalo odmytí cyklizačního pufru 3 x 300 ml destilované vody. Před nanesením do kolony byl nosič rozmíchán ve 100 ml nalévacího pufru (20 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7). Příprava nosiče byla provedena v kádince a po usazení nosiče byla kapalina odstraňována vývěvou. Nosič byl po celou dobu přípravy uchováván v chladové místnosti při 5°C.

Asi 60 ml nosiče v nalévacím pufru bylo přeneseno do kolony (sloupec nosiče 1,8 x 22 cm) a ponecháno usadit. Před zahájením vlastní separace proteinů byla provedena ekvilibrace kolony 300 ml ekvilibračního pufru (20 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,6% (v/v) Brij 35, pH 7,7).

3.2.5.4.2 SEPARACE PROTEINŮ IONEXOVOU CHROMATOGRAFIÍ NA DEAE-SEPHAROSE

Solubilizát o objemu cca 54 ml byl nanesen na kolonu. Současně s nanášením supernatantu byly jímány frakce (sběrač frakcí BIO-RAD, model 2128) o objemu 8 ml při rychlosti průtoku 0,8 ml/min. Proteiny, jejichž výsledný náboj byl při pH 7,7 záporný tedy i cyt b_5 , se vázaly na anex kolony. Ostatní proteiny s nosičem neinteragovaly a prostupovaly plynule kolonou.

Po nanesení supernatantu byla kolona promývána ekvilibračním pufrům (20 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,6% (v/v) Brij 35, pH 7,7), dokud nebyly z kolony vymyty proteiny nevázející se na anex. Přítomnost proteinů ve vytékajících frakcích byla ověřována průběžným měřením absorbance při 280 nm (Helios α , Thermo

ELECTRON CORPORATION). Jakmile se absorbance ve frakcích při 280 nm přiblížila nulové hodnotě a dále již neklesala, byla zahájena eluce cyt b₅ lineárním gradientem iontové síly.

Při měnícím se složení elučního roztoku dochází k postupnému uvolňování proteinů z povrchu nosiče, což je způsobeno odlišnou vazebnou afinitou jednotlivých molekul proteinů k nosiči kolony.

Aparatura k eluci byla sestavena ze dvou kádinek s roztoky o složení 0 mM a 400 mM KCl v ekvilibračním pufru (20 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,6% (v/v) Brij 35, pH 7,7), každá o objemu 300 ml. Kádinky byly propojeny a kádinka o nulové počáteční koncentraci KCl byla přes peristaltickou pumpu (PP 05, Laboratorní přístroje Praha) spojena s kolonou. Během gradientové eluce byly roztoky míchány (Variomag Monotherm, H + P). Byly sbírány frakce (sběrač frakcí BIO-RAD, model 2128) o objemu 13 ml, u nichž byla proměřena absorbance (Helios α , Thermo ELECTRON CORPORATION) při 280 nm, což je vlnová délka typická pro absorbční maximum proteinů, a 413 nm, při níž vykazují absorbční maximum hemoproteiny. Na základě elučního profilu, tj. závislosti absorbance na objemu pufru prošlého kolonou, byly vybrány frakce s vysokým obsahem proteinů, u nichž byla přítomnost a čistota cyt b₅ ověřena SDS-PAGE (kap. 3.2.7.2).

3.2.5.4.3 ULTRAFILTRACE ROZTOKŮ CYT b₅ A APO-CYT b₅

Podle výsledků elektroforézy na polyakrylamidovém gelu byly vybrány frakce s dostatečnou čistotou cyt b₅. Navíc byly tyto frakce na základě rozdílných absorbancí při 413 nm rozděleny na frakce obsahující apo-cyt b₅ a cyt b₅. Frakce, které absorbovaly při 280 nm i při 413 nm, obsahovaly hem a jedná se tedy o holoprotein cyt b₅. Frakce absorbující při 280 nm, ale nikoliv při 413 nm, byly prohlášeny za frakce apo-cytochromu b₅. Frakce obsahující apo-cyt b₅ byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací (Amicon 8200, Millipore) na membránovém filtru PM 10 v dusíkové atmosféře z původních 70 ml na objem 25 ml. Stejně tak i frakce cytochromu b₅ byly spojeny a zahuštěny ze 70 ml na 25 ml. Zahuštěné roztoky apo-cyt b₅ a cyt b₅ byly v dalších krocích zpracovávány zcela odděleně.

3.2.5.4.4 ELIMINACE SOLÍ DIALÝZOU

Následně byly zahuštěné roztoky apo-cyt b₅ a cyt b₅ přes noc dialyzovány, každý proti 2 l dialyzačního pufru (15 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,3% (v/v) Brij 35, pH 7,7) za neustálého míchání (Variomag Monotherm, H + P). Při dialýze byly z roztoků z velké části odstraněny ionty soli KCl, které se ve velkém množství dostaly do roztoku při eluci gradientem. Malé ionty solí difundovaly do dialyzačního pufru přes póry polopropustné membrány dialyzačního střívka, zatímco velké makromolekuly cytochromu b₅ malými póry neprošly.

3.2.5.4.5 ELIMINACE DETERGENTU Brij 35 IONEXOVOU CHROMATOGRAFIÍ

K této ionexové chromatografii bylo přikročeno z důvodu odstranění detergentu Brij 35 z dialyzátů apo-cyt b₅ a cyt b₅. Detergent Brij 35 je neiontovým detergentem, tudíž při chromatografii nebude vykazovat afinitu vůči aniontovému nosiči DEAE-Sepharosy CL-6B a je možno jej odstranit promýváním kolony.

Dialyzáty apo-cyt b₅ a cyt b₅ byly 2x naředěny resuspendačním pufrem (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7) a pro další přečištění byly znovu nanесeny na nově připravené a pufrem (15 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,1% (v/v) cholát sodný, pH 7,7) ekvilibrované kolony s nosičem DEAE-Sepharosy CL-6B (nosič v kolonách vytvořil sloupec 1,2 x 27 cm a 1,2 x 24 cm). Ředěný dialyzát apo-cyt b₅ byl na kolonu nanášen rychlostí 0,3 ml/min a dialyzát cyt b₅ rychlostí 0,2 ml/min. Kolony byly promývány nejprve 100 ml ekvilibračního pufru (15 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,1% (v/v) cholát sodný, pH 7,7) a poté 150 ml elučního pufru (200 mM KH₂PO₄, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7) o vysoké koncentraci solí, které snížily vazebnou afinitu cytochromů k nosiči a eluovaly je izokraticky z kolon. Během celé chromatografie sběrače (sběrač frakcí BIO-RAD, model 2128) jímaly frakce o objemu cca 3 ml jak u kolony s apo-cyt b₅, tak u kolony s cyt b₅.

3.2.5.4.6 ELIMINACE DETERGENTU CHOLÁTU SODNÉHO DIALÝZOU

U frakcí z obou kolon byly na spektrofotometru (Helios α, Thermo ELECTRON CORPORATION) změřeny absorbance při vlnových délkách 280 nm a 413 nm. Byly

sestaveny eluční profily, podle nichž byly vybrány frakce obsahující apo-cyt b₅ a cyt b₅. Frakce obsahující apo-cyt b₅ byly spojeny (16 ml) a přeneseny do dialyzačního střívka. Spojené frakce byly přes noc dialyzovány proti 2 l dialyzačnímu pufru (50 mM KH₂PO₄, 20% (v/v) glycerol, pH 7,7). Stejně bylo postupováno i u frakcí obsahujících cyt b₅ (18 ml). Při této dialýze byl odstraněn detergent cholát sodný. Jedná se o iontovou sloučeninu, sůl kyseliny žlučové, která difunduje přes póry dialyzačního střívka. Oproti tomu detergent Brij 35 mající dlouhý polyoxyethylenový řetězec, který znesnadňuje průchod póry, nebylo možné dialýzou odstranit.

Dialyzáty apo-cyt b₅ a cyt b₅ byly zahuštěny na výsledný objem cca 2 ml filtrací přes membránu s molekulární selektivitou (MWCO) 10,000 vloženou ve zkumavce falcon (50 ml) na centrifuze (Allegro X-22R, Beckman Coulter, výkyvný rotor SX4250) při 4500 RPM, 4°C za 30 min. Výsledné preparáty čistého apo-cyt b₅ a cyt b₅ byly rozděleny po 200 µl alikvotech do mikrozkuvek o objemu 500 µl a uloženy do -80°C. U takto získaných finálních produktů byla stanovena koncentrace proteinů (kap. 3.2.7.3), koncentrace cytochromu b₅ (kap. 3.2.7.5, 3.2.7.6) a jejich čistota ověřena SDS elektroforézou (kap. 3.2.7.2).

3.2.5.4.7 REGENERACE NOSIČE

Nosič DEAE-Sepharosy CL-6B ze všech kolon byl regenerován promytím nosiče ve 250 ml 1 M KCl, 250 ml 0,5 M NaAc o pH 3, 250 ml 0,5 M NaOH a 250 ml destilované vody. Nosič byl dále rozmíchán v 250 ml 0,5 M NaAc, pH 3. Kyselina byla odmyta 3 x 250 ml destilované vody a poté byl nosič promyt v 2 x 250 ml 20% (v/v) EtOH. Nosič byl rozmíchán v 200 ml 20% (v/v) EtOH, přelit do PE lahvičky a skladován při teplotě 5°C.

3.2.6 **Izolace lidského erytrocytárního apo-cyt b₅ a cyt b₅**

Izolační postupy byly prováděny v chladové místnosti při 5°C.

3.2.6.1 ***Ultrazvuková lýza buněk BL-21 (DE3) Gold***

Buňky byly lyzovány postupem uvedeným v kapitole 3.2.5.1 s tím rozdílem, že degradace buněčných stěn a membrán byla provedena v 6-ti sonikačních periodách, z nichž každá trvala 1,5 min. Nerozbité buňky byly odstraněny centrifugací (Allegro X-22R,

Beckman Coulter, výkyvný rotor SX4250) při 4500 rpm, 15 min při 4°C. Supernatant byl nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy.

3.2.6.2 *Purifikace erytrocytárního apo-cyt b₅ a cyt b₅ chromatografickými metodami*

3.2.6.2.1 DĚLENÍ PROTEINŮ IONEXOVOU CHROMATOGRAFIÍ NA NOSIČI DEAE-SEPHAROSY

Nosič kolony DEAE-Sepharosa CL-6B byl připraven promytím v roztocích o trojnásobném množství svého objemu. Byl 3x promyt v destilované vodě, 1 x v cyklizačním pufru (1 M KH₂PO₄, pH 8), opět 1x v cyklizačním pufru přes noc a 3x v destilované vodě. Připravená DEAE-Sepharosa CL-6B byla vnesena do kolony (sloupec nosiče 1,8 x 24 cm) a ekvilibrována 250 ml ekvilibračního pufru (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 8).

Supernatant o objemu 40 ml z kapitoly 3.2.6.1 byl nanesen na kolonu s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Sběrače jímaly frakce o objemu 4 ml. Další postup separace proteinů chromatografickým dělením na anexu byl totožný s postupem uvedeným v kapitole 3.2.5.4.2. Lišilo se pouze složení pufrů. V tomto případě byl použit ekvilibrační pufr o složení 10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 8 a pufr pro gradientovou eluci se složením 0 mM a 400 mM KCl v ekvilibračním pufru (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 8). Při eluci lineárním gradientem byla rychlost průtoku nastavena na 1 ml/min a byly jímány frakce o objemu 7 ml.

Dále bylo postupováno podle kapitoly 3.2.5.4.3. Frakce cytochromů b₅ byly na základě své čistoty a obsahu proteinů dle SDS-PAGE spojeny a zahuštěny. Roztok apo-cyt b₅ byl zkoncentrován z 35 ml na cca 3 ml a cyt b₅ z 56 ml na cca 1,3 ml.

3.2.6.2.2 SEPARACE PROTEINŮ GELOVOU FILTRACÍ NA NOSIČI SEPHADEX G-75

Z SDS elektroforézy provedené v kapitole 3.2.6.2.1 bylo patrné, že frakce apo-cyt b₅ i cyt b₅ jsou znečištěny proteiny o výrazně vyšší molekulové hmotnosti, než mají cytochromy b₅. Proto k další purifikaci cytochromů b₅ byla zvolena metoda, která umožní separaci molekul o výrazně se lišících molekulových hmotnostech, tedy gelová filtrace. Při gelové filtraci se menší molekuly dostávají do porézní gelové stacionární fáze a jejich

průchod je tak vůči průchodu molekul o vyšší molekulové hmotnosti, které se do pórů gelového nosiče nevejdou, mnohem pomalejší.

Sephadex G-75 je označení pro epichlorhydrinem zesíťovaný dextran,²¹ který umožňuje dělení látek o molekulových hmotnostech v rozsahu 3 – 80 kDa³⁷.

Suspenze gelu Sephadex G-75 uchovávaná v destilované vodě s azidem při 5°C byla vnesena do kolony. Po usazení gelu byla kolona promývána 100 ml ekvilibračního pufru, čímž byl z kolony eluován azid a jiné nečistoty. Kolona tak byla připravena k separaci látek.⁴⁰

Zahuštěný roztok apo-cyt b₅ nanesený pipetou na nosič kolony byl ponechán vsáknout do gelového nosiče (sloupec nosiče 1,1 x 42 cm). Gel byl převrstven 0,5 ml ekvilibračního pufru a po vsáknutí znovu 1 ml. Kolona byla připojena k rezervoáru s ekvilibračním pufrem (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 8) a byla jím promývána rychlostí 0,14 ml/min. Eluát byl jímán po cca 2,5 ml do zkumavek sběračem frakcí (sběrač frakcí BIO-RAD, model 2128). Sběrač byl umístěn v polovině výšky gelového nosiče a rezervoár v úrovni horní vrstvy nosiče, čímž bylo zabráněno deformaci nosiče hydrostatickým tlakem.^{40, 41} Ze změřené absorbance (Helios α, Thermo ELECTRON CORPORATION) při 280 nm a 413 nm frakcí eluátů a z objemu pufru prošlého kolonou byl zkonstruován eluční profil, podle nějž byly vybrány frakce k ověření čistoty apo-cyt b₅ SDS elektroforézou.

1,3 ml koncentrovaného roztoku cyt b₅ bylo purifikováno gelovou filtrací stejným postupem jako apo-cyt b₅. Na základě SDS-PAGE byly vybrány dostatečně purifikované frakce cyt b₅, spojeny a zahuštěny na membráně s molekulární selektivitou 10,000 ve zkumavce falcon (50 ml) Millipore centrifugací při 4500 rpm a 4°C na výsledný objem cca 1,8 ml. Tento koncentrát cyt b₅ byl rozdělen do mikrozkušavek po 200 μl a uchován v -80°C.

Z SDS-PAGE frakcí apo-cyt b₅ bylo patrné, že separace proteinů neproběhla ideálně. Získání purifikovaného apo-cyt b₅ bylo totiž dosaženo jen v několika frakcích. Jiné frakce obsahující apo-cyt b₅ byly výrazně znečištěny proteiny o vyšší molekulové hmotnosti. Proto byly tyto znečištěné frakce spojeny, zahuštěny ultrafiltrací z 9 ml na 600 μl a znovu purifikovány gelovou filtrací (sloupec nosiče 1,1 x 50 cm). SDS elektroforézou byla zjištěna míra čistoty nově získaných frakcí apo-cyt b₅. Čisté frakce apo-cyt b₅ byly spojeny,

zahuštěny ultrafiltrací na cca 1 ml, alikvotovány po 200 μ l a uloženy v -80°C . U takto získaných finálních produktů byla stanovena koncentrace proteinů (kap. 3.2.7.3), koncentrace cytochromu b_5 (kap. 3.2.7.5, 3.2.7.6) a jejich čistota ověřena SDS elektroforézou (kap. 3.2.7.2).

3.2.7 Kvantifikační a verifikační metody

3.2.7.1 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza patří k separačním metodám, jejichž principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny se vyznačují záporným nábojem na svých fosfátových skupinách, což umožňuje jejich pohyb v elektrickém poli směrem ke kladně nabitě elektrodě. Rychlost pohybu nukleových kyselin v gelu se označuje jako elektroforetická pohyblivost, přičemž menší molekuly mají vyšší pohyblivost, neboť snadněji a tedy i rychleji prostupují gelem. Informaci o velikosti zkoumané kyseliny lze získat porovnáním pohyblivosti této kyseliny o neznámé velikosti s pohyblivostí kyselin o známé velikosti – se standardem.⁷³

Agarosová elektroforéza byla provedena pro vizuální ověření přítomnosti inzertů v používaných plasmidech.

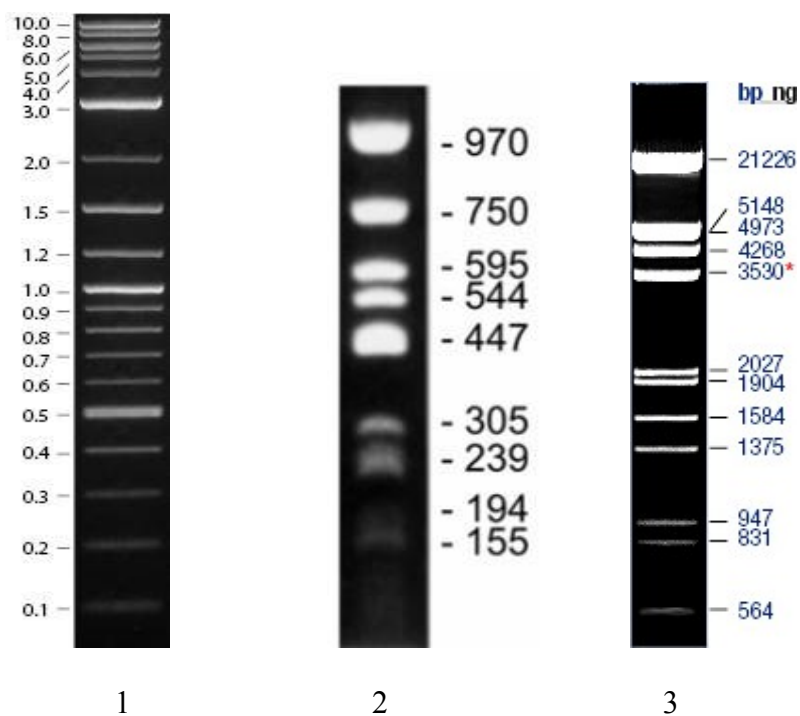
Vzhledem k předpokládané délce inzertů 431 bp¹⁵ (0,431 kb) pro mikrosomální formu a 323 bp¹⁵ (0,323 kb) pro erytrocytární formu byl připraven gel obsahující 1,5% (w/v)²⁶ agarosu ve 40 ml 1x koncentrovaného TAE pufru, který byl připraven ze zásobního roztoku 50x koncentrovaného TAE pufru (2 M Tris, 1 M HAc, 50 mM EDTA).

Suspenze 0,6 g agarosy pro menší gel či 0,9 g pro větší gel v 1x koncentrovaném TAE pufru byla zahřívána v mikrovlnné troubě za občasného míchání až do vzniku čirého roztoku. Následně byl roztok doplněn tímtež pufrem na původní objem 40 ml či 60 ml, který se během ohřevu zčásti odpařil. Po ochlazení bylo do gelu přimícháno barvivo SYBR[®] Safe DNA gel stain v poměru 1:10000, které putuje gelem proti migrujícím nukleovým kyselinám a zabudovává se do jejich struktury. Do horizontální elektroforetické vany byl nalit gel, do nějž byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek sloužících k nanesení vzorků. Po cca 30 minutách, během kterých gel ztuhl, byl hřeben vyndán. Vana s gelem byla

přenesena do elektroforetické aparatury MSMINI-10 (Horizontal Multi Sub Mini Electrophoresis) a převrstvena 1x koncentrovaným pufrem TAE.

Do jamek byly nanесeny vzorky ředěné 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem (40% (w/v) sacharosa, 0,1% (w/v) bromfenolová modř) tak, aby výsledný objem v jamce činil 25 μ l. Jako DNA standardy byly použity:

- 2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb)
- DNA marker TopBio (155 – 970 bp) o objemu 2 μ l
- Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3 (564 – 21226 bp) o objemu 3 μ l



Obr. 4. Elektroforetický profil standardů s vyznačenými velikostmi zón. (1) 2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb), (2) DNA marker TopBio (155 – 970 bp), (3) Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3 (564 – 21226 bp). Profily standardů byly převzaty z webových stránek výrobců.

Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji EPS 301 (Electrophoresis Power Supply, Biotech) o napětí nastaveném na 110 V, při kterém probíhala elektroforéza po dobu 40 minut.

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a umístěn na Blue light transiluminátor (DarkReader, Clare Chemical Research) v temné komoře, kde byl zdokumentován fotoaparátem (DMC-LS65, Panasonic).

3.2.7.2 SDS elektroforéza

Provedení elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% SDS vycházelo z postupu popsaného v práci Laemmliho.⁵⁰

Elektroforéza na gelu je metoda, při které dochází k dělení makromolekul podle jejich molekulových hmotností v elektrickém poli s jednosměrným elektrickým proudem. Velké molekuly prostupují gelem s obtížemi, proto je jejich doputovaná vzdálenost od počátku gelu menší než u malých molekul.

Při diskontinuální elektroforéze látky procházejí nejprve gelem o nižším stupni zesílení tzv. startovacím gelem se specifickým pH a obsahem glycinu. Tyto podmínky vyvolají koncentraci makromolekul ve vzorku do úzkého proužku a dávají tak makromolekulám srovnatelné podmínky (vzhledem ke vzdálenosti od počátku gelu) pro start oproti sloupečku vzorku v jamce gelu. Poté vzorek přechází do separačního gelu s vyšším stupněm zesílení, v němž dochází k separaci makromolekul.⁷⁵ Touto metodou se zvýší rozlišení mezi zónami molekul na výsledném gelu.

Gel k polyakrylamidové gelové elektroforéze (PAGE) je připravován polymerací akrylamidu s N,N'-metylen-bisakrylamidem (BIS). Polymerace je iniciována volnými radikály ($\text{SO}_4^- \bullet$), které se uvolní při rozkladu persíranu amonného (APS). Volné radikály aktivují monomery akrylamidu, které reagují s neaktivními monomery.¹⁶ Vznikají tak náhodně zesíťované polyakrylamidové řetězce. Molekulou zajišťující zesíťování je BIS. Přítomnost radikálů je stabilizována N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminem (TEMED).

Při gelové elektroforéze v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) se při zahřívání na 100°C po dobu 2 – 5 min²⁰ molekula detergentu SDS ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3^-]\text{Na}^+$)⁷⁵ naváže na protein, což způsobí jeho denaturaci přerušením nekovalentních vazeb. Vzhledem k zápornému náboji SDS je molekule proteinu udělen záporný náboj. SDS se na molekuly proteinů váže v poměru 1 molekula SDS na 2 aminokyselinové zbytky.⁷⁵ Velikost celkového záporného náboje udělená proteinu vazbou s SDS je přímoúměrná molekulové

hmotnosti proteinu. Tudíž separace proteinů při elektroforéze podle velikosti jejich náboje odpovídá separaci proteinů podle jejich molekulových hmotností. Negativně nabitě molekuly prostupují gelem k pozitivně nabitě elektrodě – anodě.

Kombinací popsaných metod elektroforézy a potřebných materiálů je diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) používaná k separaci a identifikaci proteinů v této bakalářské práci.^{22, 75}

Pro provedení vertikální SDS-PAGE byla sestavena aparatura (HoefTM miniVE vertical electrophoresis system, Amersham Biosciences) ze dvou očištěných skel, dvou plastových těsnění (z angl. „spacer“) umístěných mezi skla a držáku skel. 15% separační gel byl připraven v kádince smísením 3,5 ml pufru A (0,375 M Tris-HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8), 3,5 ml polymeračního roztoku A (30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru A), 7 μ l TEMED a 70 μ l 10% APS v uvedeném pořadí. Roztok gelu byl krouživými pohyby kádinky promíchán a pipetou nanesen do elektroforetické aparatury do výšky cca 3 cm pod horní okraj skla. Gel byl převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 min polymerovat. Po ztuhnutí gelu byla destilovaná voda odlita a oblast aparatury nad gelem byla vysušena filtračním papírem. 4% startovací gel byl připraven smísením sloučenin v následujícím pořadí: 2,6 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8), 400 μ l polymeračního roztoku B (30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru B), 3 μ l TEMED a 60 μ l 10% APS. Gel byl opět promíchán krouživými pohyby a nalit do aparatury na již ztuhlý separační gel. Ihned byl do roztoku vsunut hřeben pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků a gel byl ponechán polymerovat 30 min. Poté byl hřeben vytažen a gel převrstven elektrodoým pufrem (0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3).

Vzorky byly ředěny 4x koncentrovaným redukujícím pufrem (0,25 M Tris-HCl; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) glycerol; 20% (v/v) 2-merkaptoethanol; 0,012% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8). Byly připraveny buď v objemu 25 μ l při použití hřebene o 10 jamkách nebo 15 μ l, byl-li to hřeben o 15 jamkách. Vzorky z izolace cytochromů b_5 byly ředěny dle potřeby. Vzorky z produkce (viz kap. 3.2.4 a 3.2.4.1) byly ředěny tak, že měl-li preparát z produkce $OD_{600} \approx 1,3$ bylo ho použito 5 μ l. Množství preparátů o jiných optických denzitách při 600 nm bylo dopočítáno trojčlenkou.

Takto připravené vzorky byly povařeny 5 min ve vodní lázni, kde došlo k denuraci proteinů působením SDS na nekovalentní vazby a 2-merkapt ethanolu na disulfidové můstky. Vzorky byly centrifugovány (minicentrifuga GmCLab, Gilson) a supernatant byl nanášen do jamek startovacího gelu. Aparatura (Hoefer™ miniVE vertical electrophoresis system, Amersham Biosciences) byla vložena do elektroforetické vany s elektrodoým pufrem (0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3) a připojena ke zdroji napětí EPS 301 (Electrophoresis Power Supply, Biotech). Vzorky procházely zaostřovacím gelem při 80 V cca 30 min a poté separačním gelem při 150 V. Elektroforéza byla ukončena, jakmile bromfenolová modř, která byla součástí redukujícího pufru, doputovala ke spodnímu okraji separačního gelu.

Následně byl gel opatrně vyjmut z aparatury a přenesen na dostatečně velkou Petriho misku s barvicí lázní (25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová) na dobu 60 min. Poté byl přenesen do odbarvovací lázně (25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová).

3.2.7.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol.⁷⁸

Bylo odváženo takové množství BCA, aby její koncentrace v 50 dílech roztoku byla 1% (w/v). Toto množství bylo rozpuštěno ve 49 dílech roztoku A (0,4% (w/v) NaOH; 0,95% (w/v) NaHCO₃; 2% (w/v) Na₂CO₃; 0,16% (w/v) vlnan draselno-sodný; pH 11,25), ke kterému byl přidán 1 díl činidla B (4% (w/v) CuSO₄.5H₂O v destilované vodě).

Vzorky byly vhodně naředěny a připraveny v tripletech od každé koncentrace. Standardy o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mg/ml BSA byly připraveny od každé koncentrace 2x. Slepý vzorek byl připraven v tripletu z 20 μl destilované vody a 980 μl činidla.

Do mikrozkuhavky bylo pipetováno vždy 20 μl vzorku či standardu a přidáno 980 μl čerstvě připraveného činidla. Takto připravené roztoky byly 1 hod inkubovány při 60°C ve vodní lázni (Julabo TW8, JULABO Labortechnik GmbH). Při inkubaci byly měďnaté kationy redukovány proteiny v alkalickém prostředí za vniku iontů měďných. Interakcí měďných iontů s BCA vznikaly fialové komplexy chelátů (BCA)₂Cu⁺ s typickým

absorbčním maximem při 562 nm. Intenzita zabarvení stanovená spektrofotometricky je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Absorbance při 562 nm byla měřena (Spektromom 195D, MOM Budapest) proti slepému vzorku. Byla sestavena kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci standardů BSA. Po proměření absorbance vzorků při 562 nm byla jejich koncentrace odečtena z kalibračního grafu.

3.2.7.4 Stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA

Absorbční maximum při vlnové délce 280 nm je typické pro aromatické postranní řetězce aminokyselin tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu, které jsou zastoupeny ve většině molekul proteinů. Proto lze toto absorbční maximum považovat za absorbční maximum proteinů.⁴⁸ Při vlnové délce 260 nm mají charakteristické maximum absorbance aromatické báze nukleových kyselin. Absorbance při 320 nm je měřena kvůli odečtení signálu pozadí.

Byla proměřena absorbční spektra vzorků od 200 do 350 nm proti destilované vodě na spektrofotometru Diod Array 8453, Hewlett-Packard a odečteny hodnoty absorbance při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 320 nm. Poté byla podle následujících vztahů vypočtena:

- koncentrace plasmidové DNA²⁹ $c_{\text{DNA}} = (A_{260} - A_{280}) \cdot \text{ředění} \cdot 50 \quad [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$
- čistota plasmidové DNA³⁶ $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$

Za plasmidovou DNA o vysoké čistotě lze považovat vzorky s poměrem v rozmezí hodnot 1,7 – 2,0.

Ke spektrofotometrickému stanovení absorbance byla použita křemenná kyveta o optické dráze 1 cm, roztoky plasmidů byly 100x naředěny destilovanou vodou.

3.2.7.5 Titrace apo-cytochromu b₅ chloridem heminu

Apo-cyt b₅ je protein schopný inkorporovat do své molekuly hem jako kofaktor. Vazbou dvojmocného železa hemu mezi histidin 44 a 68³⁹ apo-cytochromu b₅ vzniká holoprotein cyt b₅. Ten se na změřeném absorbčním spektru vyznačuje díky přítomnosti hemu absorbčním maximem při vlnové délce 413 nm.

Titrace byla provedena dle metody popsané v práci Mulroonyho a kol.⁵³

Při titraci apo-cyt b₅ heminem se zvyšuje hodnota absorbance při 413 nm. Po úplné saturaci apo-cyt b₅ hemem se v roztoku začne přebytek heminu projevovat posunem absorpčního maxima ze 413 nm k vlnové délce 385 nm, při které má absorpční maximum hemin. Z objemu a koncentrace použitého roztoku heminu je možné spočítat koncentraci apo-cyt b₅ podle následujícího vztahu:

$$c_{\text{apo-cyt b}_5} = c_{\text{hemin}} \cdot V_{\text{hemin}} / V_{\text{apo-cyt b}_5}$$

kde $c_{\text{apo-cyt b}_5}$ [mM] je molární koncentrace finálního preparátu apo-cyt b₅, c_{hemin} [mM] je molární koncentrace použitého roztoku heminu, V_{hemin} [μl] je objem roztoku heminu použitého k titraci apo-cyt b₅ před posunem absorpčního maxima cyt b₅ z 413 nm, $V_{\text{apo-cyt b}_5}$ [μl] je objem finálního preparátu apo-cyt b₅ určeného k titraci.

Hmotnostní koncentrace apo-cyt b₅ byla spočítána dle vztahu:

$$c_m = c \cdot M$$

kde c_m [g.l⁻¹] je hmotnostní koncentrace finálního preparátu apo-cyt b₅, c [mol.l⁻¹] je molární koncentrace finálního preparátu apo-cyt b₅, M [g.mol⁻¹] je molekulová hmotnost apo-cyt b₅. Pro výpočet byla použita molekulová hmotnost 11268 g.mol⁻¹²⁴ pro solubilní apo-cyt b₅ a 15330 g.mol⁻¹²⁵ pro mikrosomální apo-cyt b₅.

Jako titrační činidlo byl připraven roztok heminu rozpuštěním 3,64 mg pevného chloridu heminu v 1 ml 50% (v/v) EtOH sonikací. K míchanému roztoku byly přidány 4 ml 50% (v/v) EtOH a 10 μl 2 M NaOH. Výsledný objem roztoku heminu byl upraven přilítím 50% (v/v) EtOH tak, aby koncentrace chloridu heminu v roztoku byla 1 mM.

Na spektrofotometru (Diod Array 8453, Hewlett-Packard) byla měřena spektra titrovaného vzorku v rozsahu vlnových délek 200 – 500 nm. Do křemenné kyvety s 1,5 ml 20 mM Tris, pH 8 bylo vneseno tolik apo-cyt b₅, aby jeho absorbance při 280 nm byla přibližně 0,1. Poté byl roztok titrován roztokem chloridu heminu. Mezi každým přidavkem heminu a měřením spektra bylo vyčkáno vždy po dobu sedmi minut, během níž se hem inkorporoval do molekuly apo-cyt b₅.

3.2.7.6 Stanovení koncentrace apo-cyt b_5 a cyt b_5 z absolutních spekter

Byla změřena absorpční spektra finálních produktů apo-cyt b_5 a cyt b_5 v rozsahu vlnových délek od 200 nm do 600 nm na spektrofotometru Diod Array 8453, Hewlett-Packard. Ze spekter byla odečtena hodnota absorbance při 280 nm charakterizující přítomnost proteinů tedy i apo-cyt b_5 a cyt b_5 . Absorbance při 413 nm je typická pro hemoproteiny, kterým je cyt b_5 . Snížení hodnoty A_{280} a A_{413} o hodnotu absorbance při 500 nm poslouží k eliminaci chyby v případě zákalu měřených roztoků. Koncentrace apo-cyt b_5 a cyt b_5 byla spočtena dle vztahů:

$$c_{280} = \frac{A_{280} - A_{500}}{\varepsilon_{280} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 10^6 \quad [\mu\text{mol.l}^{-1}]$$

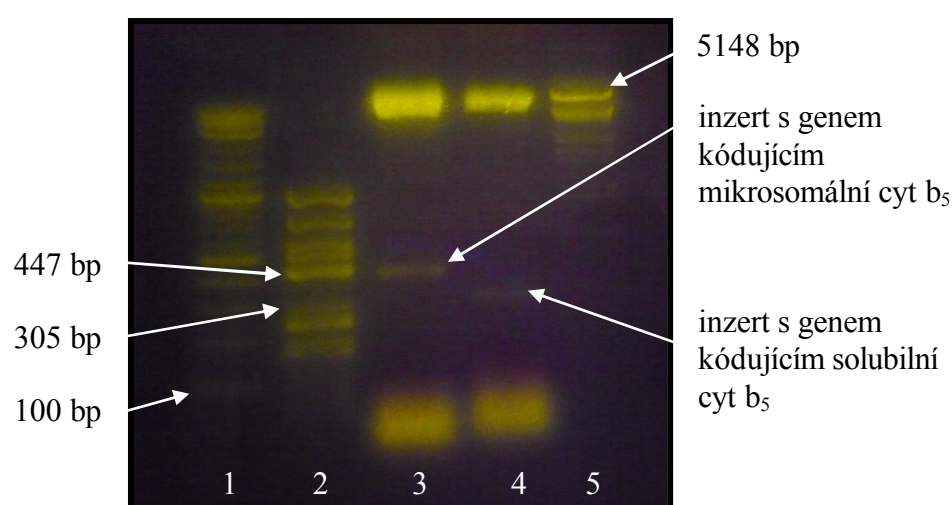
$$c_{413} = \frac{A_{413} - A_{500}}{\varepsilon_{413} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 10^6 \quad [\mu\text{mol.l}^{-1}]$$

K výpočtu byly použity molární absorpční koeficienty $\varepsilon_{280} = 9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁴, $\varepsilon_{413} = 117000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁷² pro solubilní cytochrom b_5 a $\varepsilon_{280} = 29450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁵, $\varepsilon_{413} = 117000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁷² pro mikrosomální cyt b_5 . Křemenná kyveta měla optickou dráhou $l = 1 \text{ cm}$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Kontrolní štěpení plasmidu pET22b

Pro ověření přítomnosti genu pro mikrosomální a erytrocytární cyt b_5 v používaném plasmidu pET22b bylo provedeno kontrolní štěpení plasmidu použitím endonukleas XhoI a NdeI. Tyto enzymy rozpoznají restrikční místa daná krátkou nukleotidovou sekvencí, která ohraničují inzerty s genem pro mikrosomální a erytrocytární cytochrom b_5 , a štěpením v restrikčních místech umožní uvolnění inzertů.



Obr. 5. Kontrolní restrikce plasmidu pET22b nesoucího gen pro mikrosomální a solubilní cyt b_5 endonukleasami XhoI a NdeI. Do jednotlivých drah byl nanesen vzorek (1) 2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb), (2) DNA Marker TopBio (155 – 970 bp), (3) štěpený plasmid pET22b s genem kódujícím mikrosomální formu cyt b_5 , (4) restrikce plasmidu pET22b s genem pro erytrocytární cyt b_5 , (5) Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3 (564 – 21226 bp).

Vizualizací agarosového gelu (obr. 5) na UV-transiluminátoru lze ve 3. dráze pozorovat přítomnost genu pro mikrosomální cyt b_5 o velikosti 431 bp. Zóna ve 4. dráze odpovídá genu pro erytrocytární cyt b_5 (323 bp). Oba geny jsou vůči sobě na agarosovém gelu posunuty, což je způsobeno přítomností nukleotidové sekvence kódující membránovou

kotvu na genu mikrosomálního cyt b_5 . Gen pro mikrosomální cyt b_5 je tedy větší a prostupuje gelem pomaleji.

Při horním okraji gelu ve 3. a 4. dráze je patrná zóna s přítomností nenaštěpeného plasmidu, jejíž součástí může být i plasmid po vyštěpení inzertu, u něž byl průchod strukturou gelu stížen linearizací jeho původně oválného tvaru. Intenzita těchto zón ve 3. a 4. dráze je výrazná, což svědčí o velkém množství neštěpených plasmidů a to pravděpodobně kvůli krátké době inkubace při štěpení plasmidu endonukleasami (3 hod).

Zóny ve 3. a 4. dráze spodní části gelu jsou tvořeny fragmenty plasmidu menšími než 100 bp, které se uvolnily při štěpení plasmidu endonukleasami v nespecifických místech.

4.2 Amplifikace a izolace plasmidu pET22b

Dvě oddělené kultury *E. coli* DH5 α zaočkované plasmidy pET22b nesoucími gen kódující mikrosomální a solubilní cyt b_5 byly kultivovány přes noc ve 100 ml LB media (viz kap. 3.2.2.3). Poté byl metodou midipreparace ze suspenze izolován plasmid (viz kap. 3.2.3). Plasmid byl získán jako roztok 800 μ l MQ sterilní vody s čistotou a koncentrací uvedenou v Tabulce 1.

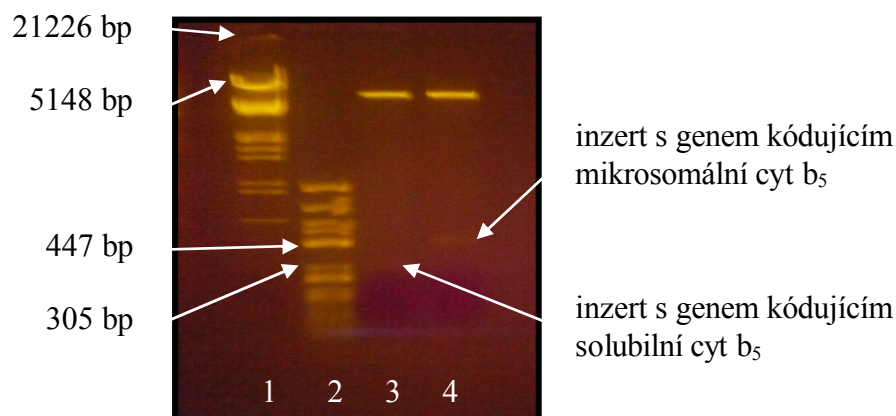
Tabulka 1. Čistota a koncentrace plasmidové DNA.

	koncentrace $c/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	čistota $(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$
plasmid s genem kódujícím mikrosomální cytochrom b_5	50	1,79
plasmid s genem kódujícím solubilní cytochrom b_5	56	1,75

Hodnoty čistoty genů spadají do rozmezí 1,7 – 2,0. Midipreparací se tedy podařilo získat dostatečně purifikovaný plasmid.

Přítomnost požadovaných genů v amplifikovaných plasmidech byla ověřena kontrolní restrikcí plasmidu pET22b endonukleasami XhoI a NdeI. K vizualizaci genů byl

použit 1,5% agarosový gel o objemu 60 ml, neboť na gelu o objemu 40 ml nebyly geny viditelné. Vyštěpené geny při průchodu větším gelem překonávají delší vzdálenost a do jejich struktury se zabudovává větší množství vizualizačního barviva SYBR[®] Safe gel stain putujícího opačným směrem. Tímto způsobem bylo docíleno zviditelnění požadovaných genů mikrosomálního a solubilního cytochromu b_5 .



Obr. 6. Štěpení amplifikovaných plasmidů pET22b pomocí XhoI a NdeI. Dráhy obsahují (1) Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3 (564 – 21226 bp), (2) DNA marker TopBio (155 - 970 bp), (3) štěpený plasmid pET22b s genem kódujícím solubilní cyt b_5 , (4) štěpený plasmid pET22b s genem mikrosomálního cyt b_5 .

Ve 3. dráze (obr. 6) je patrná přítomnost inzertu s genem kódujícím erytrocytární cyt b_5 a ve 4. dráze pro mikrosomální cyt b_5 . Zóny obou inzertů jsou velmi slabé, což je způsobeno krátkou dobou štěpení plasmidů (3 hod) a také nízkou koncentrací štěpených plasmidů ve vzorcích nanášených na gel.

Při horním okraji gelu ve 3. a 4. dráze se nacházejí neštěpené plasmidy a linearizované plasmidy vzniklé vyštěpením genu. Jejich zóny viditelnosti jsou mnohem menší ve srovnání se štěpením na obr. 5. To je způsobeno již zmíněnou nízkou koncentrací plasmidů aplikovaných do gelu.

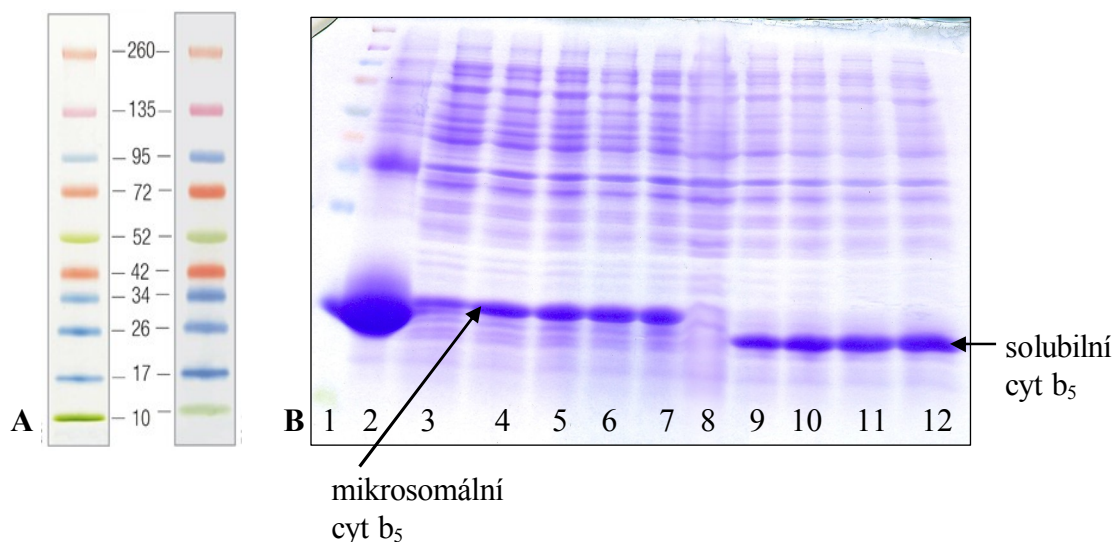
4.3 Průběh exprese cytochromu b_5

Produkce mikrosomálního i erytrocytárního cytochromu b_5 probíhala v oddělených Erlenmayerových baňkách s 500 ml LB media. U buněk *E. coli* BL-21 (DE3) Gold

kultivovaných pro produkci mikrosomální formy cyt b_5 byla exprese zahájena při dosažení $OD_{600} \approx 1$, pro erythrocytární při $OD_{600} \approx 0,8$.

4.3.1 Exprese cytochromu b_5 probíhající při 37°C

Kultivace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) Gold (viz kap. 3.2.4) i exprese cytochromu b_5 , která byla iniciována přidávkem IPTG do koncentrace 0,5 mM, probíhaly při teplotě 37°C. Během kultivace i exprese byly odebírány vzorky, u nichž byla stanovena OD_{600} . Pro ověření míry exprese mikrosomálního a erythrocytárního cyt b_5 byla z těchto vzorků provedena SDS elektroforéza. Vzorky nanášené do jamek gelu byly ředěny tak, aby množství buněk v jamkách bylo přibližně stejné (tj. při $OD_{600} \approx 1,3$ bylo použito 5 μ l buněk).



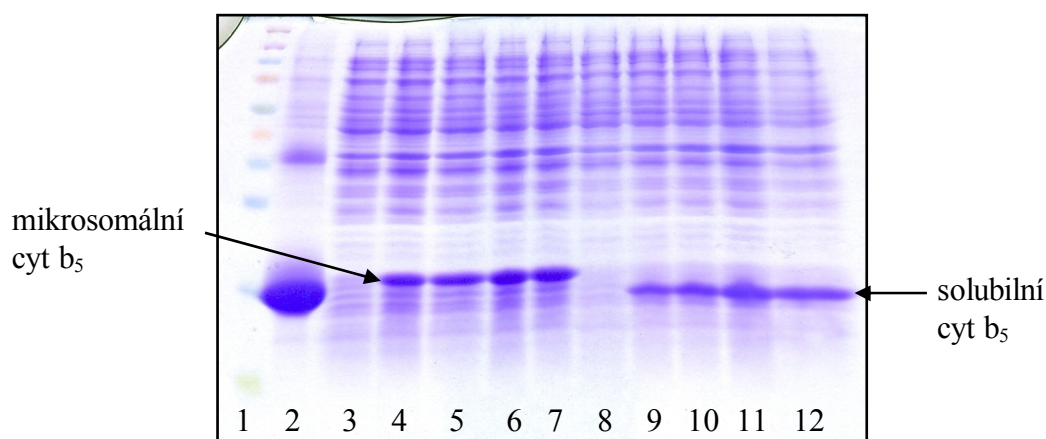
Obr. 7. (A) Elektroforetický profil standardu MultiColor Broad Range Protein Ladder, (B) míra produkce mikrosomálního a solubilního cyt b_5 v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) Gold probíhající při 37°C. (1) Standard molekulových hmotností MultiColor Broad Range Protein Ladder, (2) standard solubilního králičího cyt b_5 , (3) buňky s mikrosomální formou cyt b_5 před indukci exprese a (4) 1 hod, (5) 2 hod, (6) 3 hod, (7) 4 hod po indukci exprese. (8) Buňky se solubilní formou cyt b_5 před indukci exprese a (9) 1 hod, (10) 2 hod, (11) 3 hod, (12) 4 hod po indukci exprese.

Na obr. 7B v dráze 3 je zjevné, že buňky nesoucí gen pro mikrosomální formu cyt b_5 produkovaly malé množství cyt b_5 ještě před indukci exprese, což se při produkci u

ostatních vzorků neopakovalo (obr. 7B, dráha 8, obr. 8, dráha 3 a 8). Nabízí se tedy možnost, že mohlo dojít ke kontaminaci vzorku zbytky IPTG ulpělým na stěně baňky, ve které produkce probíhala. V dráze 3 – 7 lze pozorovat, jak se s rostoucím časem exprese zvyšovala koncentrace cyt b_5 v buňkách. Ve vyšší míře lze obdobný jev pozorovat i u buněk produkujících erytrocytární cyt b_5 . Již po jedné hodině exprese proteinu je v drahách 4 a 9 viditelné velké množství vzniklého cyt b_5 , avšak po dřívější optimalizaci bylo přistoupeno k produkci po dobu 4 hod, kde se jeví produkce jako maximální. Buňky byly poté sklizeny centrifugací, resuspendovány v pufru a uchovány při -20°C .

4.3.2 Exprese cytochromu b_5 při 27°C

Během kultivace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) Gold (viz kap. 3.2.4.1) při 37°C byly každou hodinu odebírány vzorky, u nichž byla změřena OD_{600} . Po zahájení exprese cytochromů b_5 přidávkem IPTG do koncentrace 0,01 mM, δ -ALA do výsledné koncentrace 0,5 mM a snížením teploty exprese na 27°C byly opět po hodině odebírány vzorky, z nichž byla provedena SDS-PAGE (obr. 8).



Obr. 8. Srovnání produkce mikrosomálního a solubilního cyt b_5 v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) Gold probíhající při 27°C . (1) Standard molekulových hmotností MultiColor Broad Range Protein Ladder, (2) standard solubilního králičího cyt b_5 , (3) buňky s mikrosomální formou cyt b_5 před indukcí exprese a (4) 1 hod, (5) 2 hod, (6) 3 hod, (7) 4 hod po indukcii exprese. (8) Buňky se solubilní formou cyt b_5 před indukcii exprese a (9) 1 hod, (10) 2 hod, (11) 3 hod, (12) 4 hod po indukcii exprese. Vzorky byly ředěny stejně jako v předchozí kapitole (tj. při $\text{OD}_{600} \approx 1,3$ bylo použito $5 \mu\text{l}$ buněk).

Optickým srovnáním exprese při 27°C (obr. 8, str. 54) a 37°C (obr. 7B, str. 53) lze pozorovat nižší intenzitu produkce proteinů při 27°C při stejném počtu buněk na jamku. Můžeme tedy konstatovat, že exprese probíhající při 27°C je pomalejší vůči expresi při 37°C, což bylo našim záměrem vzhledem ke snaze získat více cytochromu b₅ s inkorporovaným hemem.

4.4 Purifikace mikrosomálního apo-cyt b₅ a cyt b₅

4.4.1 Izolace membránové frakce a solubilizace

Izolace membránové frakce buněk probíhala postupem popsaným v kapitole 3.2.5.2. Koncentrace proteinů v této frakci byla stanovena metodou BCA (kap. 3.2.7.3) na 17,2 mg.ml⁻¹, celkově bylo získáno 464,4 mg proteinů (Tabulka 2, str. 75).

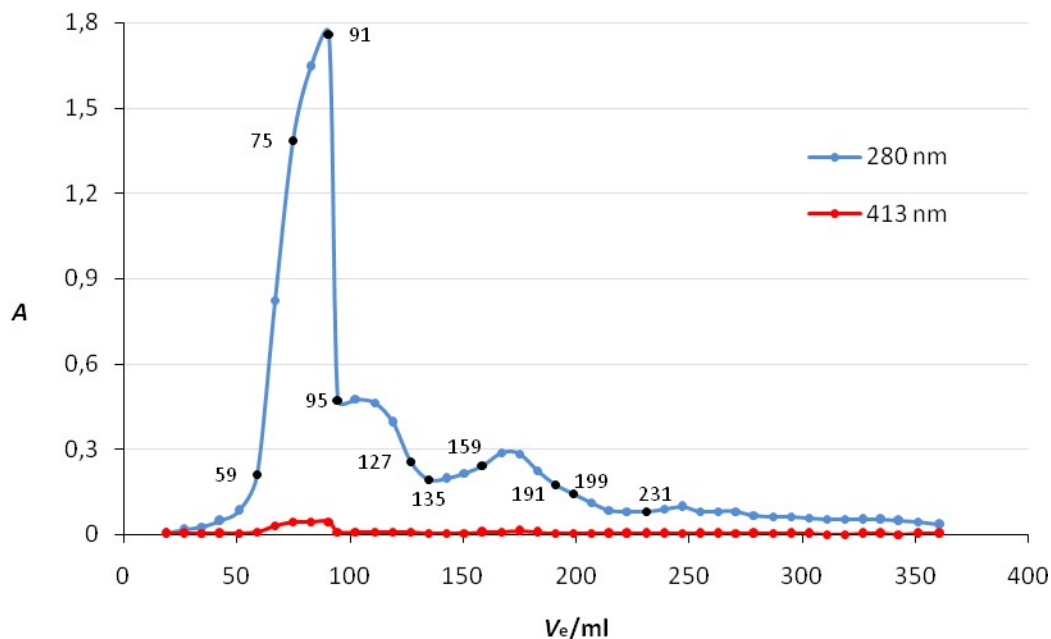
Jelikož je tato forma cyt b₅ zakotvena v membráně buněk *E. coli*, dalším nutným krokem k izolaci tohoto proteinu byla jeho solubilizace pomocí detergentů (kap. 3.2.5.3).

Solubilizací bylo získáno 54 ml supernatantu obsahujícího 113,4 mg proteinů včetně cyt b₅, což je 24,4 % proteinů původně obsažených v membránové frakci. Zbytek tvoří proteiny v peletě, které se solubilizací nepodařilo uvolnit do roztoku. Bohužel to platí i o části cyt b₅, který rovněž nebyl solubilizován (obr. 25, str. 73), pravděpodobně díky nedostatečné síle detergentů či krátkému času jejich působení.

Solubilizát byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy.

4.4.2 Ionexová chromatografie na DEAE-Sepharose CL-6B

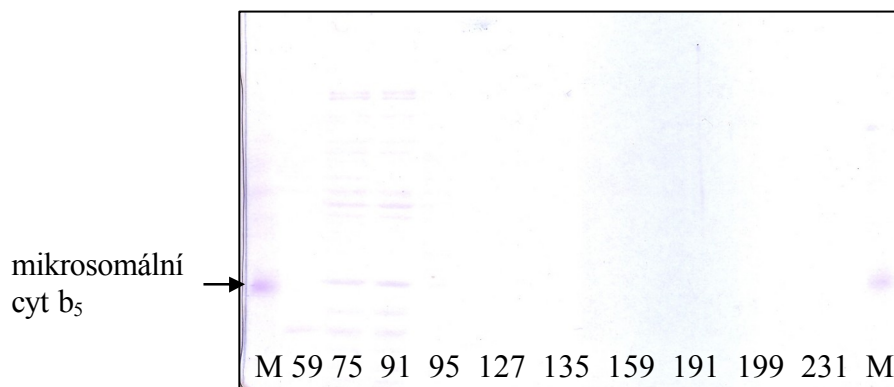
Na ekvilibrovanou kolonu s nosičem DEAE-Sepharosy byl nanesen roztok cytochromu b_5 po solubilizaci o objemu 54 ml a poté byla kolona promývána ekvilibračním pufrem do poklesu absorbance při 280 nm na téměř nulovou hodnotu.



Obr. 9. Eluční profil při nanášení mikrosomálního cyt b_5 a promývání kolony DEAE-Sepharosy CL-6B ekvilibračním pufrem. Absorbance frakcí byla měřena při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). Označené frakce (černě) byly vybrány k SDS elektroforéze. Číslo frakce odpovídalo elučnímu objemu pufru.

Eluce proteinů je na elučním profilu (obr. 9) dokumentována zvýšením absorbance při 280 nm. U frakcí 59 – 95 na elučním profilu je zřejmý velký vzrůst absorbance při 280 nm a nepatrný vzrůst při vlnové délce 413 nm. Původcem tohoto píku by mohly být proteiny uzavřené v micelách, které vznikly při překročení kritické micelární koncentrace (cmc) detergentu při solubilizaci. Neiontový detergent Brij 35 se na koloně nezachycuje, je eluován a v micelách by mohl přenášet i část proteinů.

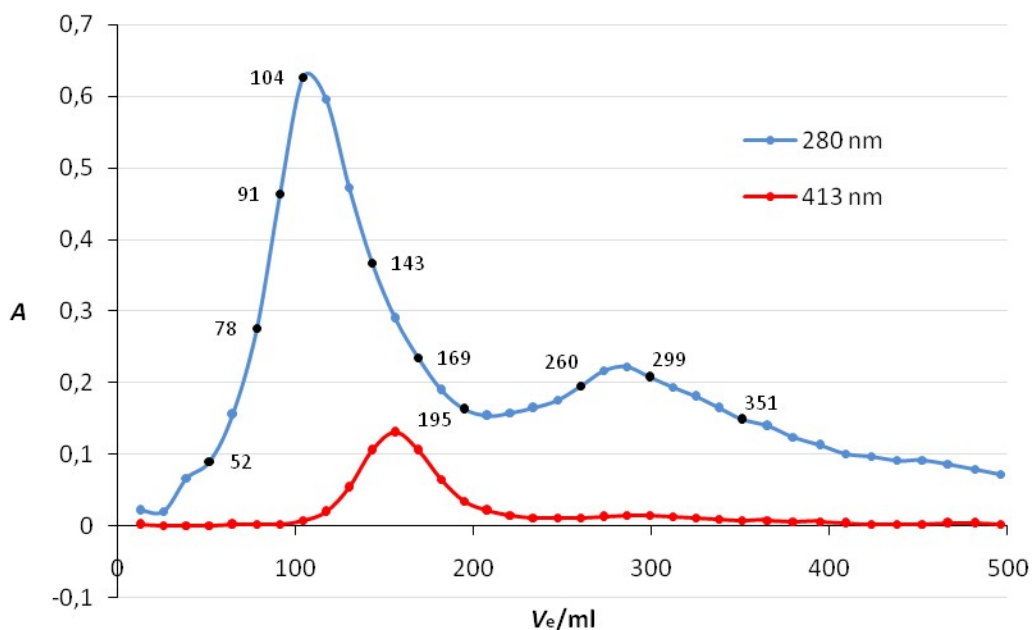
Pro ověření předpokládané přítomnosti proteinů ve frakcích se zvýšenou absorbcí při 280 nm byla provedena SDS elektroforéza, jejíž elektroforetický záznam je uveden na obr. 10.



Obr. 10. SDS elektroforéza vybraných frakcí jímáných při nanášení roztoku mikrosomálního cyt b_5 a promývání kolony DEAE-Sepharosy CL-6B. Jako standard byl použit mikrosomální králičí cyt b_5 (M). Použit byl 8% polyakrylamidový gel.

Při elektroforéze frakcí 59 – 231 na 15% polyakrylamidovém gelu zůstal gel zcela čirý bez známek přítomnosti proteinů. Vzhledem k předpokládané přítomnosti větších agregátů jako například micel nebo agregátů cyt b_5 s jinými bakteriálními proteiny byly tytéž frakce naneseny na 8% polyakrylamidový gel, tedy o větší pórovitosti (obr. 10). I přesto frakce 59, 75 a 91 vykazovaly na gelu neúměrně nízký obsah proteinů vůči změřené absorbanci při 280 nm na obr. 9, str. 56. Odezva frakcí 95 – 231 na přítomnost proteinů na gelu byla zcela negativní. Zvýšenou absorbancí těchto frakcí při 280 nm způsobila pravděpodobně přítomnost kontaminujících látek neproteinové povahy.

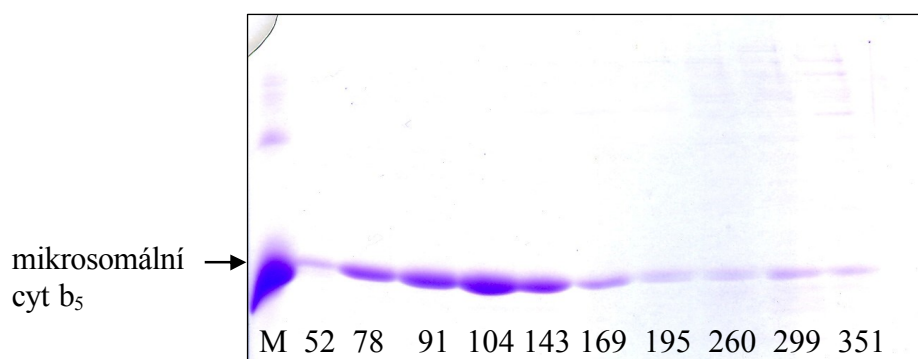
Po poklesu absorbance frakcí při 280 nm na téměř nulovou hodnotu byla zahájena eluce lineárním gradientem iontové síly 0 – 400 mM KCl v ekvilibračním pufru. Se změnou iontové síly pufru se začaly z kolony postupně uvolňovat záporně nabitě proteiny, tedy i cytochrom b_5 . Během eluce byly jímány frakce o objemu cca 13 ml.



Obr. 11. Eluce mikrosomálního apo-cyt b_5 a cyt b_5 lineárním gradientem iontové síly z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B. U jímáných frakcí byla měřena absorbance při 280 nm (modře) a při 413 nm (červeně). Zvýrazněné frakce (černě) na elučním profilu byly vybrány k SDS-PAGE. Čísla frakcí byla totožná s objemem eluovaného pufru.

Z elučního profilu (obr. 11) lze předpokládat přítomnost apo-cyt b_5 ve frakcích 52 - 104, neboť zvýšená absorbance při 280 nm a nulová absorbance při 413 nm indikuje přítomnost nehemového proteinu. Zatímco u frakcí 117 – 195 lze předpokládat přítomnost cyt b_5 , který díky hemovému kofaktoru vykazuje zvýšenou absorbanci při 413 nm.

Pro ověření přítomnosti a čistoty cytochromů b_5 v jímaných frakcích byla provedena elektroforéza (obr. 12).



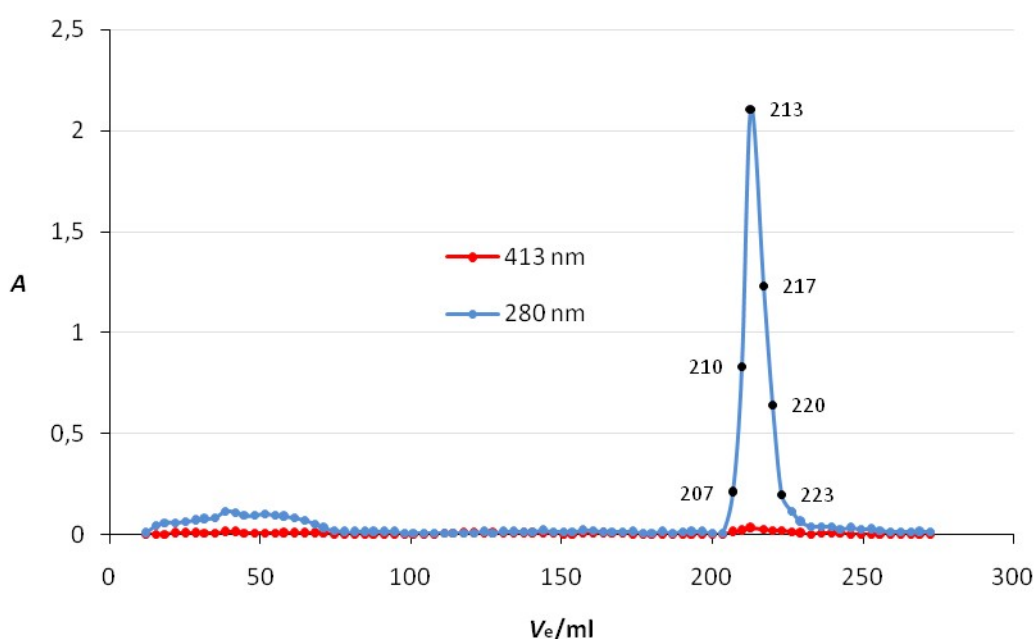
Obr. 12. Čistota mikrosomálního apo-cyt b_5 a cyt b_5 po gradientové eluci z kolony DEAE-Sepharose CL-6B. Standardem byl mikrosomální králičí cyt b_5 (M). Čísla frakcí udávala objem pufru prošlého kolonou při gradientové eluci.

Na gelu SDS elektroforézy (obr. 12) lze pozorovat, že cytochrom b_5 je opravdu obsažen ve všech testovaných frakcích. Frakce 52 – 195 vykazovaly výraznou čistotu, a proto byly použity k další purifikaci. V ostatních frakcích narůstá množství kontaminujících proteinů a klesá obsah cyt b_5 , proto s nimi nebylo dále pracováno.

Jelikož primárním cílem bakalářské práce bylo získat apo-cyt b_5 , byly frakce rozděleny na část obsahující apoprotein a část obsahující holoprotein cytochromu b_5 . Frakce s apo-cyt b_5 a cyt b_5 byly rozděleny na základě absorbance při 413 nm. Apo-cyt b_5 byl dále purifikován ze spojených dostatečně čistých frakcí 52 – 117, jejichž absorbance při 413 nm byla nulová, a cyt b_5 z frakcí 130 – 195 vykazujících vzhledem k přítomnosti hemu zvýšenou absorbanci při 413 nm.

4.4.3 Rechromatografie apo-cytochromu b_5 na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B

Spojené, zahuštěné a dialyzované frakce apo-cyt b_5 (kap. 3.2.5.4.3, 3.2.5.4.4) byly nanášeny na ekvilibrovanou kolonu, z níž byl následným promýváním ekvilibračním pufrům odstraněn detergent Brij 35. Apo-cytochrom b_5 byl eluován izokraticky, zvýšením iontové síly elučního pufru. Během eluce byly jímány frakce o objemu cca 3 ml. Změřením absorbance při 280 nm a 413 nm v eluovaných frakcích byl sestaven následující chromatogram (obr. 13).



Obr. 13. Rechromatografie mikrosomálního apo-cytochromu b_5 na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B. Přítomnost apo-cyt b_5 ve frakcích byla sledována měřením absorbance při 280 nm (modře) a přítomnost nežádoucího cyt b_5 při 413 nm (červeně). Označené frakce (černě) obsahující apo-cyt b_5 byly vybrány k ultrafiltraci.

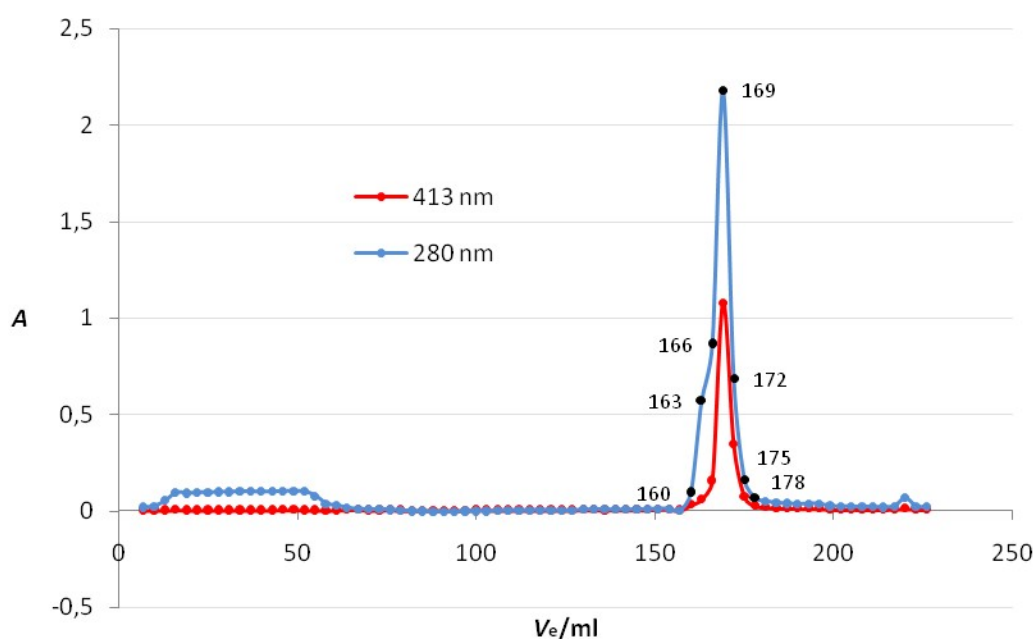
V rozmezí 20 – 70 ml pufru prošlého kolonou lze pozorovat zvýšení absorbance při 280 nm, což může být vyvoláno proteiny bazické povahy, které nebyly odstraněny při první chromatografii. U frakcí 207 – 223 je patrné mírné zvýšení absorbance při 413 nm, což

svědčí o tom, že nebyla získána 100% čistá forma apo-cyt b_5 , jejíž přítomnost je zřejmá ze zvýšené absorbance při 280 nm.

K ultrafiltraci a dialýze pro odstranění cholátu sodného byly vybrány frakce 207 – 223. Po dialýze probíhající přes noc proti 2 l dialyzačního pufru byl vzorek zahuštěn na výsledný objem 2 ml a takto získaný finální preparát byl po 200 μ l alikvotech zamražen v kapalném dusíku a následně uchováván při -80°C .

4.4.4 Chromatografické přečištění cytochromu b_5 na koloně DEAE-Sepharosy

Po nanesení dialyzovaného roztoku cyt b_5 o objemu cca 25 ml na kolonu s nosičem DEAE-Sepharosy CL-6B a promývání kolony ekvilibračním pufrům byl cyt b_5 eluován pufrům o vysoké iontové síle (kap. 3.2.5.4.5). U frakcí jímáných po 3 ml do zkumavek byla změřena absorbance při 280 nm a 413 nm a sestaven eluční profil (obr. 14).



Obr. 14. Rechromatografie mikrosomálního cytochromu b_5 na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B. Obsah cyt b_5 , jakožto hemoproteinů, ve frakcích byl sledován měřením absorbance při 413 nm (červeně) a poté jako proteinu při 280 nm (modře). Vyznačené frakce (černě) cyt b_5 byly vybrány k zahuštění. Čísla frakcí byla totožná s objemem eluovaného pufru.

Z roztoku cyt b₅ byl na této koloně promýváním ekvilibračním pufrem odstraněn neiontový detergent Brij 35. Byly vybrány frakce s vysokou absorbcí (160 – 178), které byly spojeny a podrobeny dialýze. Finální preparát mikrosomálního cytochromu b₅ vznikl zahuštěním dialyzátu na objem 2 ml a byl po malých 200 µl alikvotech uchováván při -80°C.

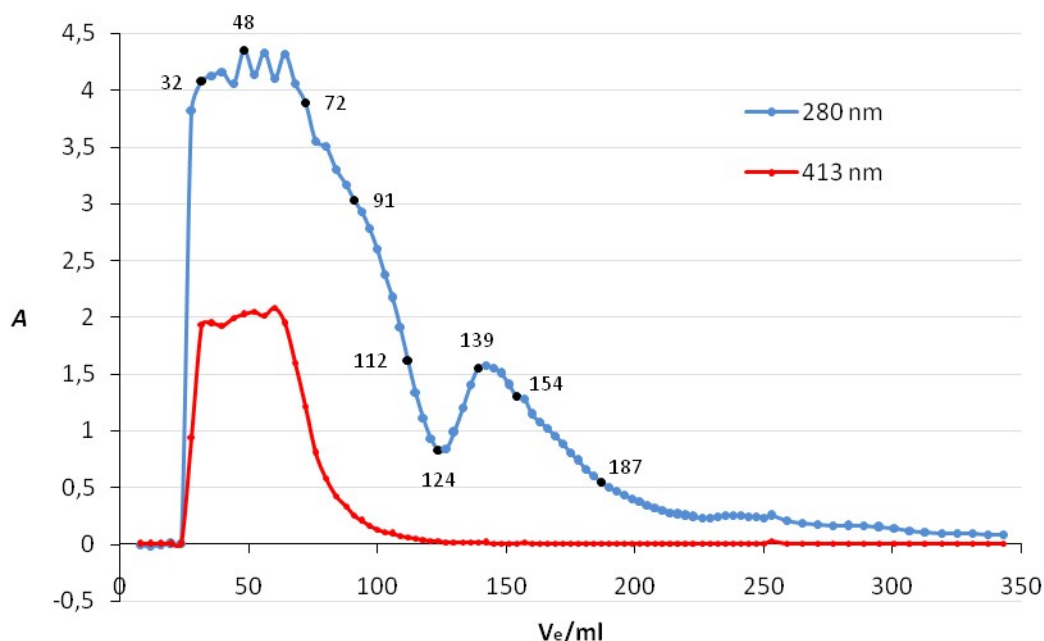
4.5 Purifikace erythrocytárního cytochromu b_5

Po expresi cyt b_5 v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) Gold v objemu 500 ml LB media s Amp byly buňky sklizeny centrifugací, resuspendovány v pufru a byla provedena jejich desintegrace postupem popsáným v kapitole 3.2.6.1, při níž bylo získáno 40 ml cytosolové frakce s obsahem proteinů 1200 mg (Tabulka 3, str. 76) stanoveným metodou BCA (kap. 3.2.7.3).

Vzhledem k tomu, že se jedná o solubilní formu cytochromu b_5 vyskytující se v cytoplasmě buněk bylo možné přímo přikročit k jeho izolaci chromatografickými metodami.

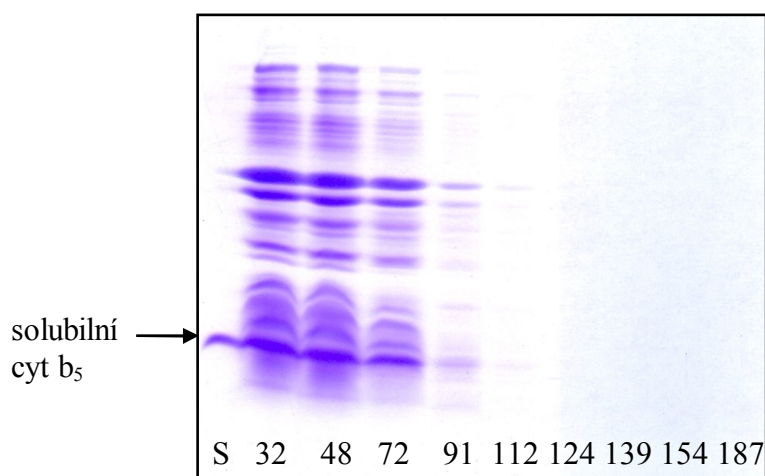
4.5.1 Ionexová chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B

Roztok cytochromu b_5 byl na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B nanesen v objemu 40 ml. Kladně nabitě a neutrální proteiny byly odstraněny promýváním kolony ekvilibračním pufrům až do poklesu absorbance při 280 nm na nulu (kap. 3.2.6.2.1).



Obr. 15. Nanášení roztoku solubilního cytochromu b_5 a promývání kolony DEAE-Sepharosy CL-6B. Byla měřena absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). U vybraných frakcí (černě) byla provedena SDS elektroforéza. Číslo frakcí byla totožná s objemem eluovaného pufru.

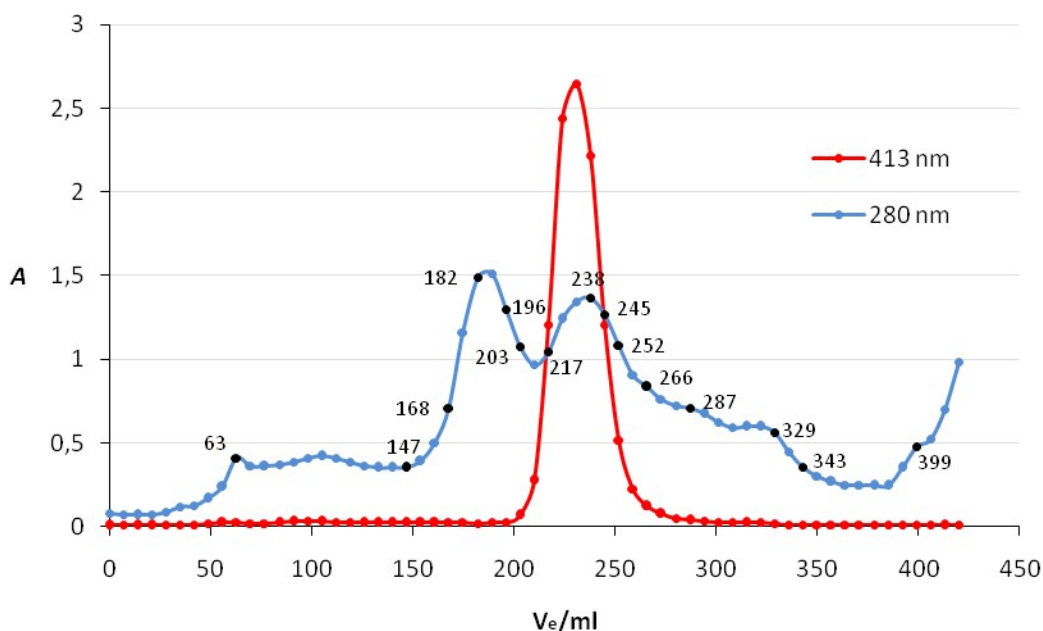
Na počátku elučního profilu cytochromu b_5 (obr. 15, str. 63), od objemu cca 20 ml do 100 ml pufru prošlého kolonou, došlo k výraznému zvýšení absorbance při 280 nm indukující eluci proteinů ve velkém množství. Současně vzrostla také absorbance frakcí při 413 nm, což značí eluci hemoproteinů, pravděpodobně cyt b_5 . K ověření této teorie byla provedena SDS elektroforéza (obr. 16). Tento jev byl pozorován i v případě purifikace solubilního králičího cytochromu b_5 .¹⁵ Není způsoben nedostatečnou kapacitou kolony, ale pravděpodobně nějakou modifikací či degradací části cytochromu b_5 v průběhu izolace.



Obr. 16. Elektroforéza frakcí jímáných při nanášení roztoku solubilního cyt b_5 na kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B a jejím promývání. Standardem byl solubilní králičí cyt b_5 (S). Čísla frakcí byla totožná s objemem eluovaného pufru.

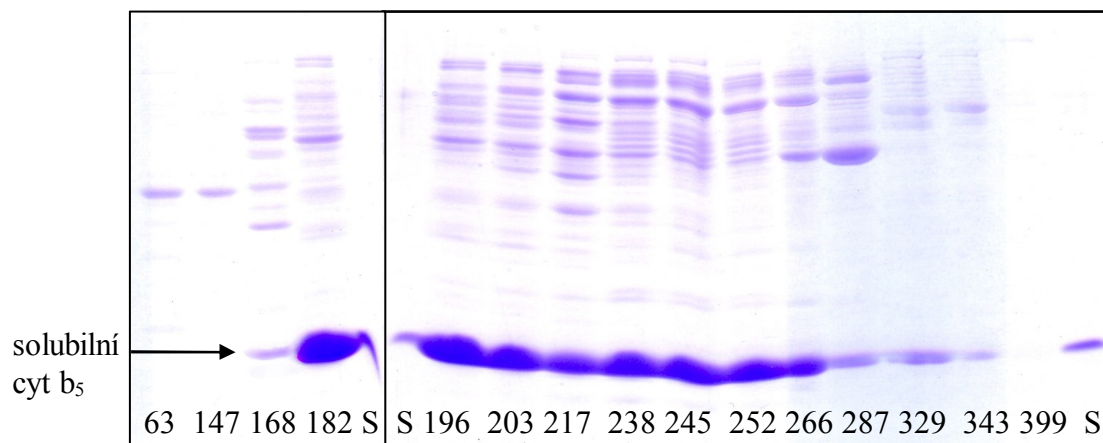
Elektroforézou bylo potvrzeno, že frakce 32 - 72 vykazující na elučním profilu (obr. 15, str. 63) vysoký vzrůst absorbance při 280 nm i 413 nm obsahovaly skutečně podstatné množství cytochromu b_5 . Naproti tomu frakce 124 – 187 neindikovaly přítomnost žádných proteinů.

Cytochrom b_5 vázaný na kladně nabitě skupiny diethylaminoethylu nosiče Sepharosy byl po poklesu absorbance na 0 při 280 nm eluován lineárním gradientem 0 – 400 mM KCl v ekvilibračním pufru. Při eluci byly jímány frakce o objemu 7 ml.



Obr. 17. Eluce solubilního apo-cyt b_5 a cyt b_5 lineárním gradientem iontové síly z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B. V průběhu eluce byla měřena absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). Zvýrazněné frakce (černě) na elučním profilu byly vybrány k SDS-PAGE. Číslo frakcí odpovídala objemu pufru prošlého kolonou.

Eluci cyt b_5 (obr. 17) indikovalo kromě zvýšení absorbance při 413 nm (frakce 217 – 245) také červené zbarvení jímáných frakcí. Naproti tomu frakce 182 - 203 obsahující apo-cyt b_5 , ale také jiné proteiny, vykazovaly slabě nažloutlé zbarvení. Z průběhu celé gradientové eluce cytochromu b_5 byly vybrány frakce k ověření přítomnosti a čistoty cytochromu b_5 SDS elektroforézou (obr. 18, str. 66).

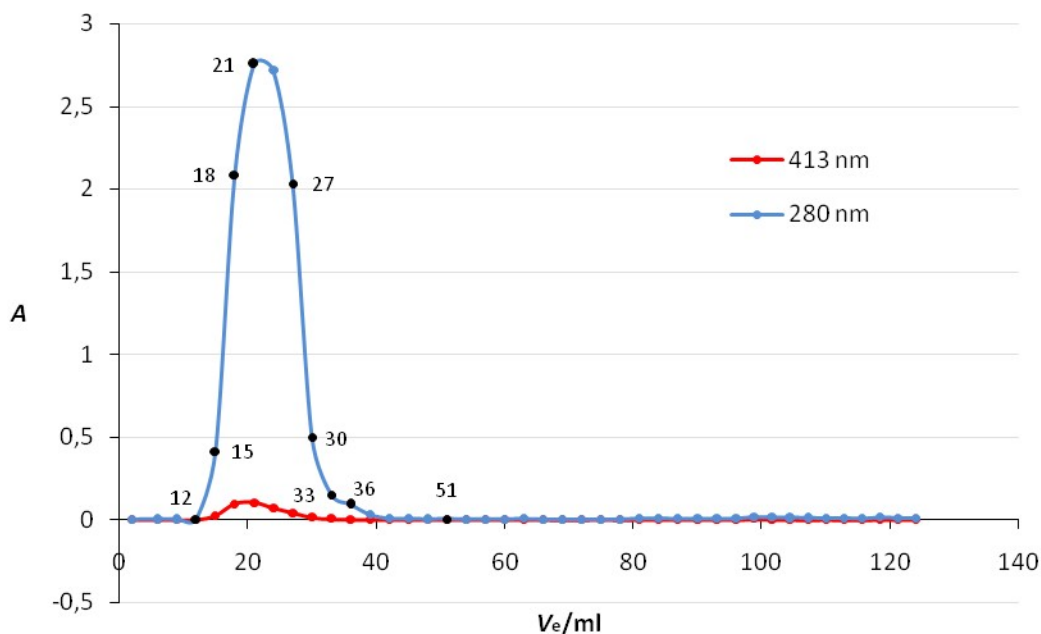


Obr. 18. Obsah proteinů ve vybraných frakcích solubilního apo-cyt b_5 a cyt b_5 po gradientové eluci z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B. Jako standard byl použit solubilní králičí cyt b_5 (S). Čísla frakcí odpovídala elučnímu objemu pufří.

Jak je z obr. 18 patrné, jsou frakce znečištěny proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než je molekulová hmotnost cytochromu b_5 . Bylo tedy, na rozdíl od mikrosomálního cytochromu b_5 , přistoupeno k dalšímu purifikačnímu kroku, kterým byla gelová filtrace. Na základě absorbance při 413 nm z elučního profilu (obr. 17) na předchozí straně byly frakce rozděleny na ty, jež obsahují výlučně apo-cyt b_5 a na ty s cyt b_5 . Frakce 168 – 203 nevykazovaly zvýšenou absorbanci při 413 nm a na polyakrylamidovém gelu (obr. 18) dokládaly přítomnost cytochromu b_5 , proto byly prohlášeny za frakce obsahující apo-cyt b_5 . Frakce 210 – 266 se zvýšenou absorbancí při 413 nm obsahovaly cyt b_5 .

4.5.2 Separace apo-cytochromu b_5 na koloně Sephadexu G-75

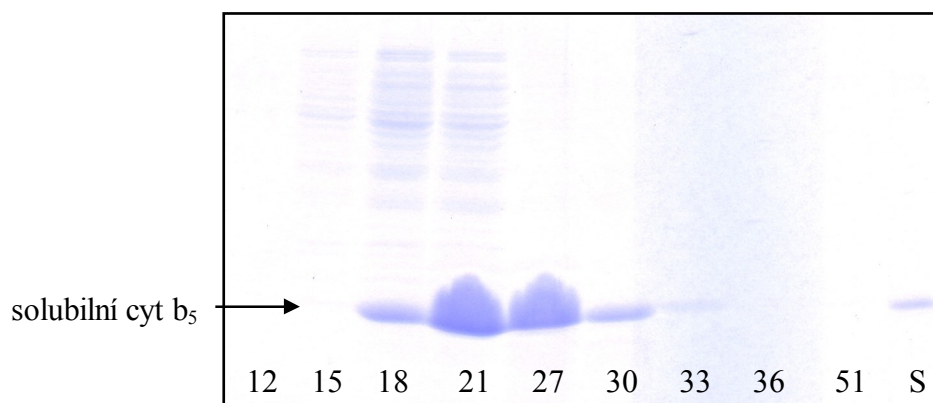
Výše zmíněné frakce 168 – 203 byly spojeny a zahuštěny na malý objem téměř 3 ml. Vzorky byly nanесeny na kolonu v co nejužší zóně a převrstveny ekvilibračním pufrem, kterým byl protein následně eluován z kolony.



Obr. 19. Separace solubilního apo-cytochromu b_5 gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-75. V průběhu chromatografie byla sledována absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). Označené frakce (černě) byly vybrány k SDS-PAGE. Číslo frakcí se shodují s objemem pufru prošlým kolonou.

Z elučního grafu (obr. 19) je zřejmé, že nedošlo k ideální separaci velkých proteinů od cytochromu b_5 a vše se vymylo jako jeden symetrický pík. Tento neúspěch mohl být zapříčiněn nanесením vzorku o velkém objemu na kolonu či deformací nosiče kolony.

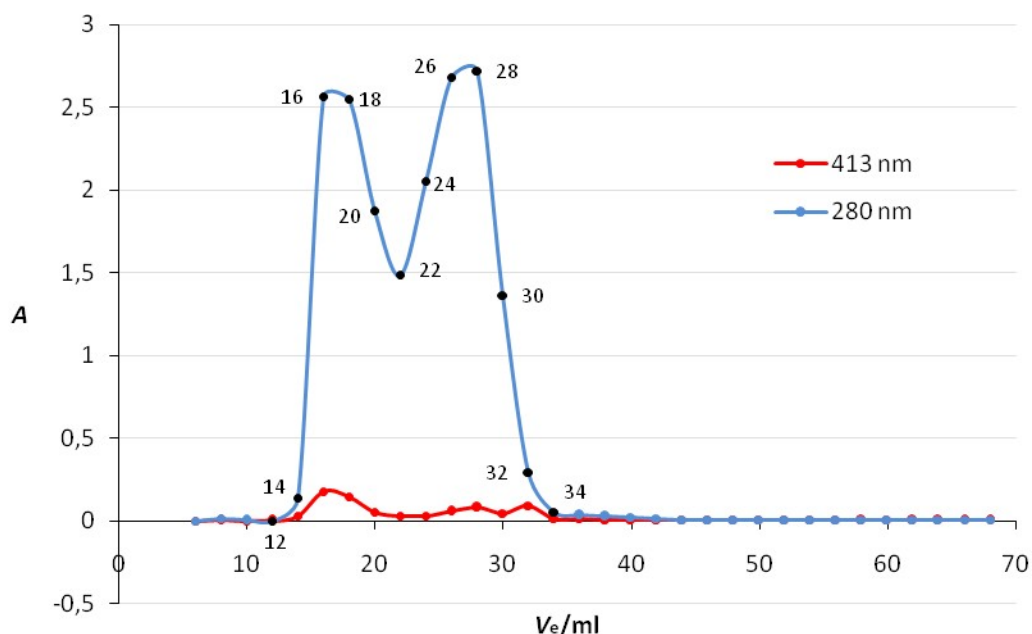
Přesto byla u jímaných frakcí ověřena míra čistoty separovaného apo-cyt b₅ SDS elektroforézou.



Obr. 20. Míra čistoty frakcí apo-cyt b₅ po gelové filtraci na koloně Sephadexu G-75. Standardem byl solubilní králičí cyt b₅ (S). Číslo frakcí odpovídalo objemu pufru prošlého kolonou při jejím promývání. Vzorky byly kvůli vysoké koncentraci proteinu 3x naředěny destilovanou vodou.

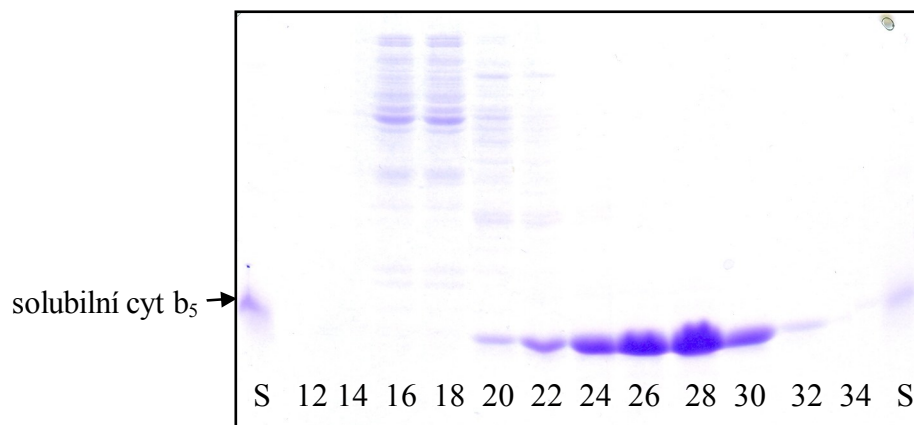
Apo-cyt b₅ by měl být eluován samostatně bez příměsí jiných větších proteinů. Elektroforéza (obr. 20) frakcí 18 a 21 však potvrzuje neúspěšnou separaci proteinů podle jejich velikosti. Proto byly frakce 18 - 24 znovu zahuštěny na co nejmenší objem cca 600 µl, který je vhodnější k nanesení na gelovou chromatografii a pipetou naneseny na nově připravenou kolonu Sephadexu G-75.

Frakce 27 – 33, které se jeví jako elektroforeticky homogenní, byly uchovány a následně připojeny k frakcím, které byly kvůli přítomnosti kontaminujících proteinů opětovně podrobeny gelové filtraci.



Obr. 21. Rechromatografie solubilního apo-cytochromu b_5 na koloně Sephadexu G-75. V průběhu chromatografie byla měřena absorbance frakcí při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). Zvýrazněné frakce byly vybrány k elektroforéze. Čísla frakcí se shodují s objemem pufru prošlým kolonou.

Separace proteinů při druhé gelové chromatografii byla taktéž sledována měřením absorbance jednotlivých frakcí při 280 nm, což je v závislosti na objemu pufru proteklého kolonou vyneseno do chromatogramu (obr. 21). Jak je z obrázku vidět, po rechromatografii na nově připravené gelové koloně již došlo k částečnému oddělení velkých proteinů od apo-cyt b_5 . První pík s elučním maximem kolem 17 ml ukazuje eluci proteinů s velkou molekulovou hmotností a druhý pík eluci apo-cyt b_5 , který byl při průchodu kolonou zpomalován gelovou maticí. Toto tvrzení bylo ověřeno provedením SDS-PAGE na následující straně (obr. 22).

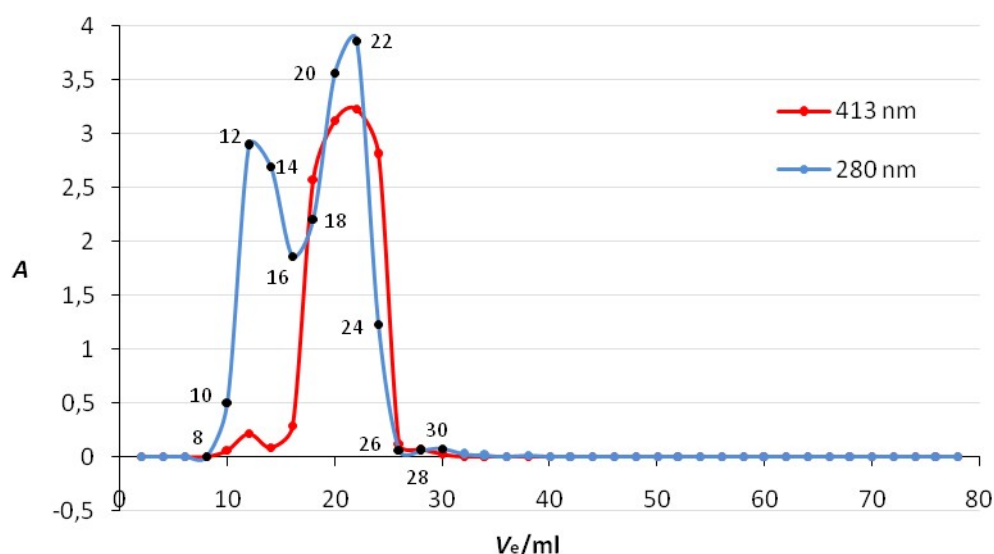


Obr. 22. Čistota frakcí apo-cyt b_5 po druhé gelové filtraci na koloně Sephadexu G-75. Jako standard byl použit solubilní králičí cyt b_5 (S). Číslo frakcí udáváva objem pufru prošlý kolonou při jejím promývání. Vzorke byly kvůli vysoké koncentraci proteinu ředěny 12x.

Jako frakce s vysokou čistotou apo-cyt b_5 se na polyakrylamidovém gelu (obr. 22) jeví frakce 24 – 34. Není zde pozorován žádný jiný protein. Tyto frakce byly spojeny a zahuštěny na finální produkt solubilního lidského apo-cyt b_5 o objemu 1 ml, který byl uchováván v malých alikvotech při -80°C .

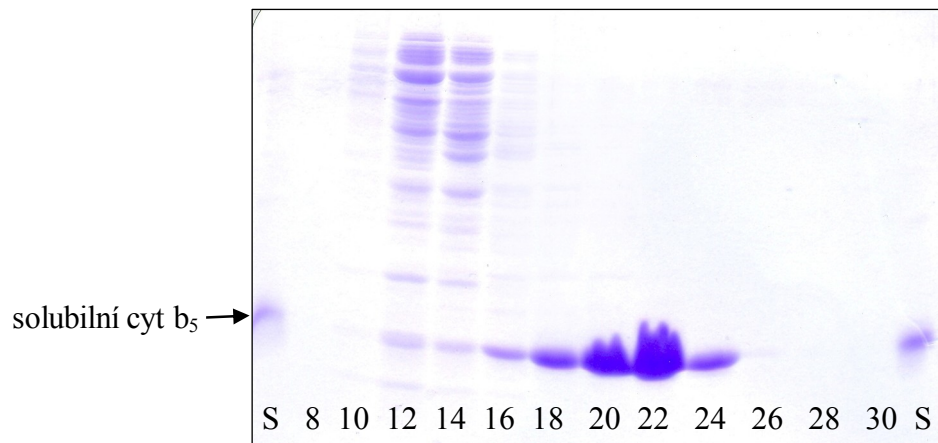
4.5.3 Přečištění cytochromu b_5 gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-75

Purifikace solubilního cytochromu b_5 probíhala obdobně jako u jeho apoformy (kap. 3.2.6.2.2). Tentokrát se i díky menšímu objemu (1,3 ml) nanášeného vzorku podařilo separovat cyt b_5 od velkých proteinů v rámci jedné gelové filtrace, jejíž průběh je znázorněn na obr. 23.



Obr. 23. *Separace solubilního cytochromu b_5 gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-75.* U jímáných frakcí byla sledována absorbance při 280 nm (modře) a 413 nm (červeně). Označené frakce (černě) byly vybrány k SDS-PAGE. Čísla frakcí se shodují s objemem pufru prošlým kolonou.

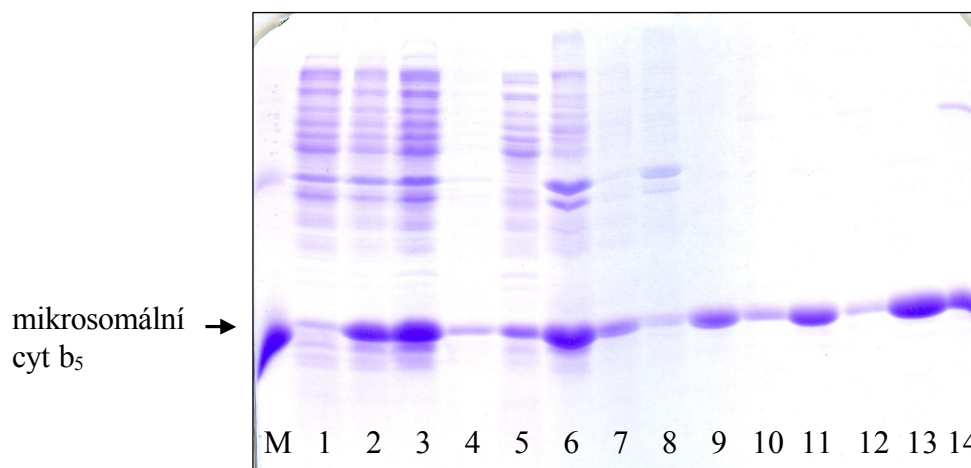
Separace probíhala velmi podobně jako v případě apo-cyt b_5 . Rovněž se podařilo získat frakce nevykazující dle SDS elektroforézy kontaminaci jinými proteiny (obr. 24, str. 72). Tyto frakce 18 - 24 byly spojeny a zahuštny na finální produkt o objemu cca 1,8 ml, který byl po 200 μ l alikvotech uchováván při -80°C .



Obr. 24. Míra čistoty frakcí cyt b_5 po gelové filtraci na koloně Sephadexu G-75. Standardem byl solubilní králičí cyt b_5 (S). Číslo frakcí odpovídalo objemu pufru prošlého kolonou. Vzorky byly vzhledem k vysoké koncentraci ředěny 10x.

4.6 Shrnutí průběhu izolace

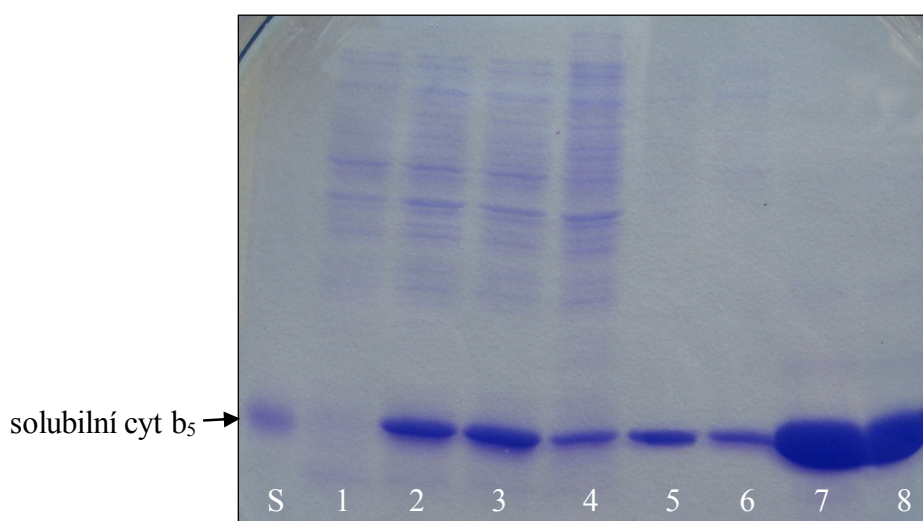
V průběhu purifikačního procesu mikrosomálního i solubilního lidského apo-cyt b_5 a cyt b_5 byly odebrány vzorky, které byly podrobeny SDS elektroforéze (obr. 25 a 26). Jejich vizualizací na 15% polyakrylamidovém gelu byl porovnán obsah a čistota cytochromů b_5 v jednotlivých krocích purifikace.



Obr. 25. Elektroforéza z průběhu izolace mikrosomálního apo-cyt b_5 a cyt b_5 . (1) Buňky *E. coli* BL-21 (DE3) Gold před indukcí exprese cytochromu b_5 , (2) buňky BL-21 (DE3) Gold po ukončení exprese cytochromu b_5 , (3) supernatant po desintegraci buněk sonikací, (4) resuspendované pelety po sonikaci buněk, (5) supernatant po sedimentaci membránové frakce buněk, (6) homogenizované pelety membránové frakce buněk, (7) supernatant po solubilizaci, (8) homogenizované pelety po solubilizaci, (9 a 10) apo-cyt b_5 a cyt b_5 po ionexové chromatografii a dialýze, (11 a 12) apo-cyt b_5 a cyt b_5 po eliminaci detergentu cholátu sodného, (13 a 14) finální preparát apo-cyt b_5 a cyt b_5 . Vzorky z izolace byly ředěny 7x. Vzorky z produkce byly ředěny tak, že při $OD_{600} \approx 1,3$ bylo použito 5 μ l buněk. Standardem byl mikrosomální králičí cyt b_5 (M).

Na elektroforetickém gelu (obr. 25) lze pozorovat postupné načišťování izolovaného cytochromu b_5 , ale i jeho ztráty v různých fázích purifikačního postupu. K nim došlo např. po sonikaci, kdy určitá část cytochromu b_5 zbyla v membránách nerozbitých buněk (dráha 4). Jistý podíl cytochromu b_5 byl ztracen při izolaci membránové frakce (dráha 5), neboť nedošlo k jeho sedimentaci. V tomto případě se mohlo jednat o cytochrom b_5 , jehož

transmembránová kotva mohla být během purifikačního procesu proteolyticky odštěpena bakteriálními enzymy, které nebyly dostatečně inhibovány. K dalšímu úbytku došlo při solubilizaci, kdy část cytochromů b_5 zůstala ukotvena ve frakcích buněčných membrán (dráha 8) a byla tedy odstraněna ultracentrifugací. Nakonec byl získán elektroforeticky čistý apo-cyt b_5 . Cyt b_5 je mírně kontaminován proteinem o vyšší molekulové hmotnosti. Mohlo by se jednat také o agregát cyt b_5 ve formě multimeru, což bylo již dříve pozorováno a dimer byl identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie.⁴⁷



Obr. 26. Elektroforéza z průběhu izolace solubilního apo-cyt b_5 a cyt b_5 . (1) Buňky *E. coli* BL-21 (DE3) Gold před indukcí exprese cytochromu b_5 , (2) buňky BL-21 (DE3) Gold po ukončení exprese cytochromu b_5 , (3) supernatant po lýzi buněk sonikací (10x řed.), (4) resuspendovaná peleta po sonikaci buněk (3x řed.), (5 a 6) apo-cyt b_5 a cyt b_5 po separaci proteinů na DEAE-Sepharose CL-6B (10x řed.), (7 a 8) finální preparát apo-cyt b_5 a cyt b_5 (10x řed). Standardem byl solubilní králičí cyt b_5 (S). Vzorčky z produkce byly ředěny tak, že při $OD_{600} \approx 1,3$ bylo použito 5 μ l buněk.

Ke ztrátě podílu solubilního cytochromu b_5 došlo v tomto případě zejména při lýzi buněk (obr. 26, dráha 4). Jelikož je solubilní cytochrom b_5 produkován do cytosolu buňky, nemohl se dostat z nerozbitých buněk do okolního prostředí, z něhož byl dále izolován.

4.6.1 Koncentrace proteinů v průběhu purifikace

Jelikož cytochrom b_5 nevykazuje žádné enzymové funkce, na jejichž základě by mohl být sledován průběh purifikace a postupné zvyšování jeho specifického obsahu, byl stanovován pouze obsah proteinů v jednotlivých fázích izolace. Množství proteinů v průběhu purifikace mikrosomálního (Tabulka 2) a solubilního (Tabulka 3, str. 76) lidského apo-cyt b_5 a cyt b_5 bylo stanoveno použitím BCA (kapitola 3.2.7.3). Vzorky byly ředěny na základě výsledků SDS elektroforézy z průběhu izolace (obr. 25, str. 73 a obr. 26, str. 74).

Tabulka 2. Koncentrace proteinů v průběhu izolace mikrosomálního cytochromu b_5 .

Množství proteinů v(e):	$c_m/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	V/ml	m/mg
supernatantu po desintegraci buněk	21,4	35	749,0
roztoku homogenizované membránové frakce	17,2	27	464,4
supernatantu po solubilizace	2,1	54	113,4
roztoku apo-cyt b_5 po chromatografii na DEAE-Sepharose CL-6B	1,9	25	47,5
roztoku cyt b_5 po chromatografii na DEAE-Sepharose CL-6B	0,8	25	20,0
roztoku apo-cyt b_5 po eliminaci cholátu sodného dialýzou	1,0	16	16,0
roztoku cyt b_5 po eliminaci cholátu sodného dialýzou	0,3	18	5,4
finálním preparátu apo-cyt b_5	2,5	2	5,0
finálním preparátu cyt b_5	0,3	2	0,6

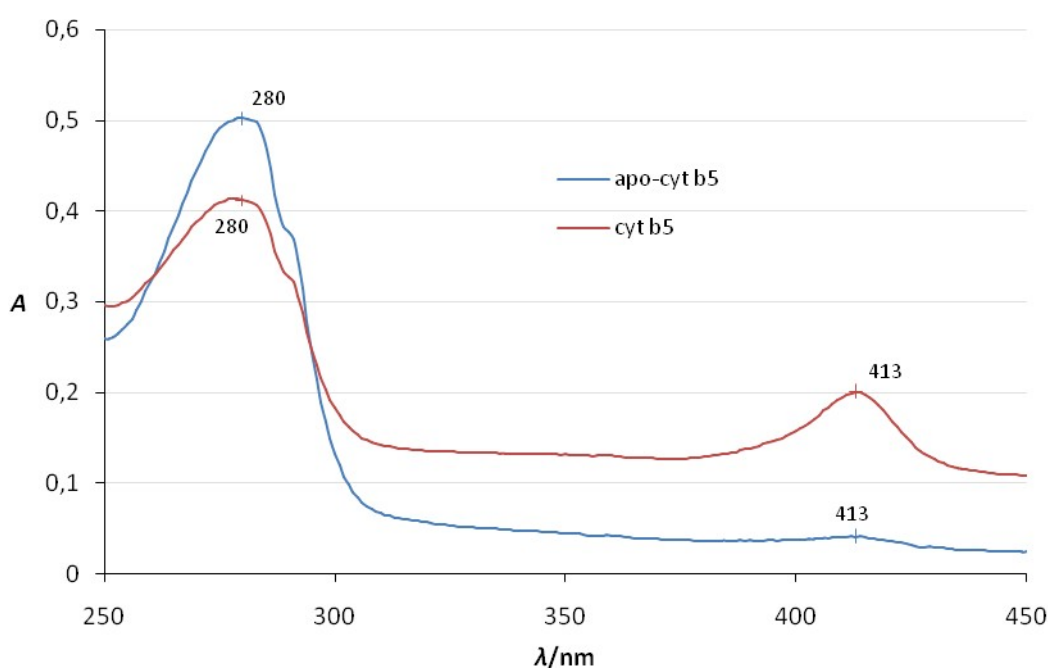
Tabulka 3. Koncentrace proteinů v průběhu izolace solubilního cytochromu b_5 .

Obsah proteinů v(e):	$c_m/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	V/ml	m/mg
supernatantu po desintegraci buněk	30,0	40	1200
roztoku apo-cyt b_5 po chromatografii na DEAE-Sepharose CL-6B	15,7	35	549,5
roztoku cyt b_5 po chromatografii na DEAE-Sepharose CL-6B	8,7	56	487,2
finálním preparátu apo-cyt b_5	17,0	1	17,0
finálním preparátu cyt b_5	8,5	1,8	15,3

V tabulkách 2 a 3 je uvedena koncentrace proteinů (c_m) vztažená na jeden mililitr roztoku. Dále objem roztoků (V), z něhož byly odebrány vzorky pro stanovení obsahu proteinů, a celkové množství proteinů (m) v jednotlivých purifikačních krocích.

4.7 Koncentrace finálních preparátů stanovená ze spektra

Postupem popsaným v kapitole 3.2.7.6 byla změřena spektra finálních produktů apo-cytochromu b_5 a cytochromu b_5 . Absorbční maximum při 280 nm je důsledkem přítomnosti apo-cyt b_5 a cyt b_5 či jiných nežádoucích proteinů, jejichž výraznou účast na absorbanci lze však vyloučit na základě výsledků SDS elektroforézy (obr. 25, dráha 13, str. 73 a obr. 26, dráha 7, str 74). Absorbčním maximem při 413 nm se projevují proteiny s vázaným hemem – holoprotein cyt b_5 .



Obr. 27. *Spektrum finálních produktů mikrosomálního apo-cyt b_5 (modře) a cyt b_5 (červeně). Pro větší detailnost byl rozsah měřených vlnových délek zúžen na 250 – 450 nm. Roztoky preparátů byly ředěny 8x.*

Zvýšená hodnota absorbance na spektru mikrosomálního apo-cyt b_5 při 413 nm (obr. 27) svědčí o kontaminaci purifikovaného preparátu apo-cyt b_5 jistým mizivým množstvím cyt b_5 . Tento fakt bylo možno předpokládat již na základě zvýšené absorbance při 413 nm na elučním profilu apo-cytochromu b_5 (obr. 13, str. 60) při odstraňování

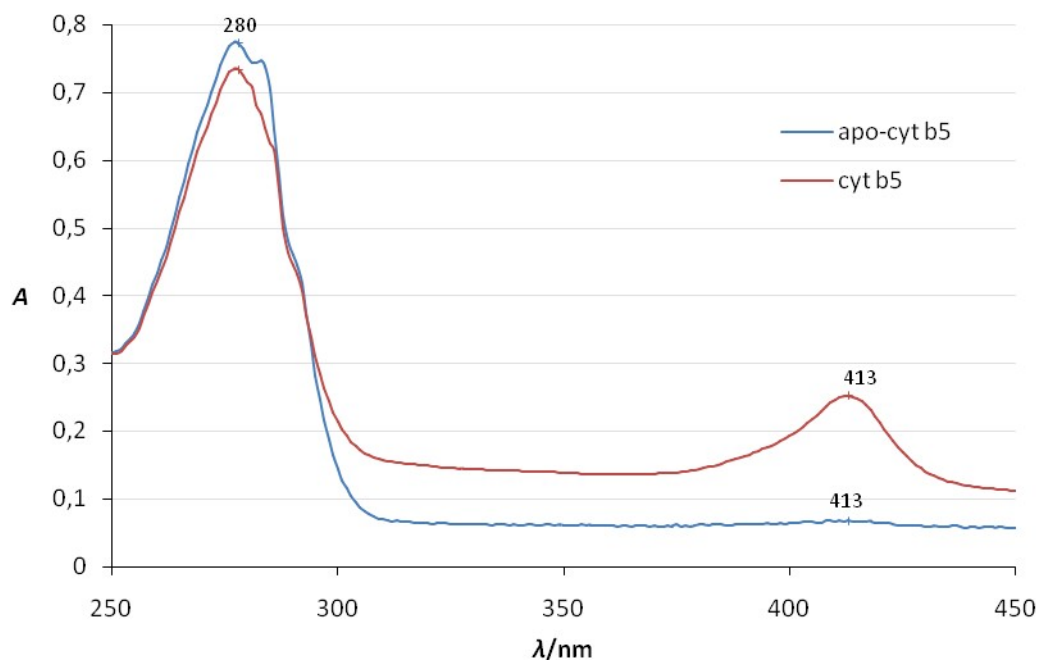
detergentu Brij 35. Z výše uvedeného spektra je však možné odhadnout, že čistota apo-formy je více než 95%.

Ze známých hodnot absorbancí při 280 nm odečtených ze spektra (obr. 27) na předchozí stránce byla spočtena koncentrace apo-cyt b_5 a cyt b_5 uvedená v tabulce 4.

Tabulka 4. Koncentrace mikrosomálního cytochromu b_5 stanovená z absolutního spektra (při 280 nm).

	$c_m/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$c/\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
apo-cyt b_5	1,9	126
cyt b_5	1,3	85

Stejným postupem byla změřena i absolutní spektra finálních preparátů solubilního apo-cytochromu b_5 a cytochromu b_5 . Rovněž ze spektra solubilního apo-cyt b_5 (obr. 28) je patrné, že kontaminace hemovou formou cytochromu b_5 je zanedbatelná.



Obr. 28. Absorbční spektrum finálních preparátů solubilního apo-cyt b_5 (modře) a cyt b_5 (červeně). Pro větší detailnost byl rozsah měřených vlnových délek zúžen na 250 – 450 nm. Roztoky preparátů byly ředěny 20x.

Z hodnot absorbací při 280 nm odečtených z absorbčních spekter na obr. 28 na předchozí stránce byla spočtena koncentrace obou forem solubilního cytochromu b_5 uvedená v tabulce 5.

Tabulka 5. Koncentrace solubilního cyt b_5 stanovená z absolutního spektra (při 280 nm).

	$c_m/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$c/\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
apo-cyt b_5	15,6	1384
cyt b_5	13,6	1209,6

Hodnoty koncentrací stanovených pro cyt b_5 z absolutního spektra a pomocí BCA se liší. K absorbanci při 280 nm totiž přispívá i absorbance hemové skupiny, která tak vypočtenou koncentraci proteinu zvyšuje.

V případě izolovaných cytochromů s označením cyt b_5 se jedná jen o částečně nahemované formy, jejichž kontaminující látkou je příměs apo-cyt b_5 . To potvrdila také orientační titrace heminem, při které byl mikrosomální cytochrom b_5 schopen přijmout 4,5 μl 1 mM heminu, což odpovídá 66% obsahu apoformy ve finálním preparátu mikrosomálního cytochromu b_5 . Solubilní cyt b_5 inkorporoval 8 μl 1 mM heminu, což je 66,2% přítomnost apoformy ve finálním preparátu. Zcela saturovaná forma cytochromu b_5 , která obsahuje ekvivalentní množství hemu na jednotku proteinu, by totiž měla vykazovat mnohem vyšší absorbční maximum při 413 nm než při 280 nm, což je v rozporu se získanými výsledky na obr. 27, str. 77 pro mikrosomální a obr. 28, str. 78 pro solubilní cyt b_5 . Poměr A_{413}/A_{280} u čistého erytrocytárního cytochromu b_5 se pohybuje kolem 6,⁹ u mikrosomálního cytochromu b_5 je pak tento poměr zhruba o polovinu nižší⁵ díky jeho vyšší absorbanci při 280 nm, která je způsobena přítomností membránové kotvy v proteinu, ve které se nachází řada aromatických aminokyselin. Tyto preparáty však nebyly další analýze zatím podrobeny, protože cílem bylo získat a charakterizovat především apo-formy cytochromu b_5 .

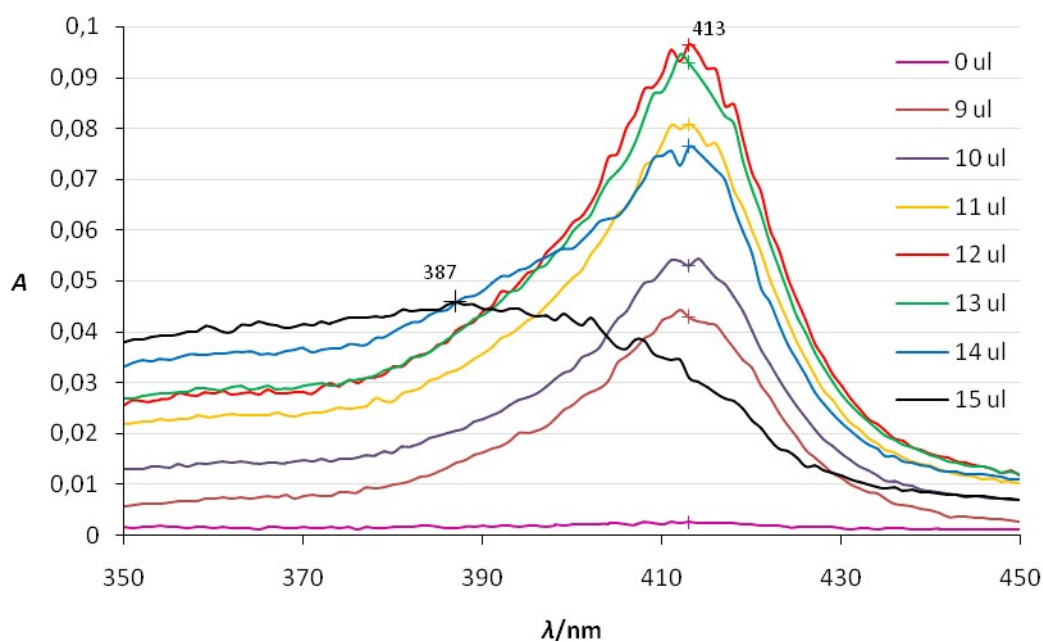
Z absorpčního spektra mikrosomálního (obr. 27, str. 77) a solubilního cyt b_5 (obr. 28, str. 78) byly dále odečteny hodnoty absorbance při 413 nm, z nichž byla spočtena koncentrace cytochromu b_5 (Tabulka 6) dle kapitoly 3.2.7.6.

Tabulka 6. Koncentrace izoforem cyt b_5 stanovená z absolutních spekter (při 413 nm).

	$c_m/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$c/\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
mikrosomální cyt b_5	0,1	6,9
solubilní cyt b_5	0,3	23,9

4.8 Stanovení koncentrace apo-cyt b_5 při titraci chloridem heminu

Apoprotein cytochromu b_5 byl titrován roztokem 1 mM chloridu heminu postupem uvedeným v kapitole 3.2.7.5.

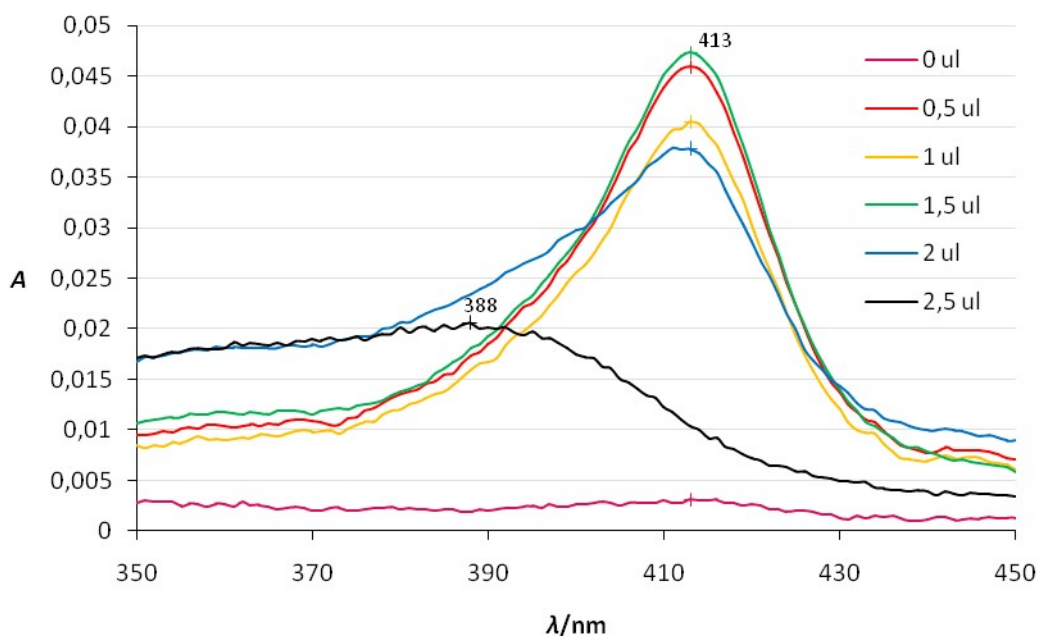


Obr. 29. Titrace solubilního apo-cytochromu b_5 . Na grafu jsou znázorněny spektra titrace odpovídající celkovému množství heminu přidaného do roztoku (9, 10, 11, 12, 13, 14 μ l) a klíčový posun absorpčního maxima z vlnové délky 413 nm (15 μ l). Roztok apo-cyt b_5 byl titrován přidávkem 1 μ l 1mM heminu.

Absorbční spektrum s nulovým přidávkem heminu (obr. 29, 0 μ l) charakterizuje roztok apo-cyt b_5 , který byl následně titrován.

K úplnému natitrování solubilního apo-cyt b_5 bylo zapotřebí 13 - 14 μ l 1 mM roztoku chloridu heminu. Při dalším přidávkem 1 μ l heminu došlo k posunu absorpčního maxima na vlnovou délku 387 nm, což indikuje přítomnost volného hemu v roztoku a nasycení apo-cyt b_5 hemem.

Před zahájením titrace mikrosomálního apo-cytochromu b_5 bylo změřeno absorpční spektrum roztoku mikrosomálního apo-cyt b_5 (obr. 30, 0 μl). Ten byl následně titrován 0,5 μl alikvóty heminu až do posunu absorpčního maxima na 388 nm, kterému odpovídala spotřeba 1,5 - 2 μl titračního činidla.



Obr. 30. Titrace mikrosomálního apo-cytochromu b_5 . Spektra odpovídají celkovému objemu 1 mM heminu přidaného do měřeného roztoku. Apo-cyt b_5 byl titrován přidávkem vždy 0,5 μl heminu.

Mírný přebytek neinkorporovaného hemu v titrovaném roztoku lze pozorovat již na modré linii (obr. 29, 14 μl , str. 81 a obr. 30, 2 μl) nespecifickým zvýšením absorbance v rozmezí vlnových délek 350 - 410 nm vůči ostatním absorpčním spektrům.

Ze známého objemu spotřebovaného titračního činidla byla spočtena hmotností a molární koncentrate lidského apo-cytochromu b₅ ve finálních preparátech (Tabulka 7).

Tabulka 7. Koncentrace apo-cyt b₅ určená ze spotřeby titračního činidla.

	$c_m/\text{mg.ml}^{-1}$	$c/\mu\text{mol.l}^{-1}$
mikrosomální apo-cyt b ₅	2,0	133
solubilní apo-cyt b ₅	15,8	1400

V průběhu titrace obě apoformy cytochromu b₅ inkorporovaly molekulu hemu, což bylo potvrzeno zvýšenou absorbcí na spektru v oblasti 413 nm, které je typické pro hemový cyt b₅. Tento fakt svědčí o tom, že apo-cyt b₅ byl purifikován jako nativní protein bez zjevného poškození a ztráty biologické aktivity.

Pro stanovení koncentrace apo-cyt b₅ byly použity různé metody. Získané koncentrace jsou vždy uváděny pro obě izoformy cytochromu b₅ v závorce. Jedná se o titraci heminem (2,0 mg.ml⁻¹ mikrosomální, 15,8 mg.ml⁻¹ solubilní), stanovení pomocí metody s BCA (2,5 mg.ml⁻¹ mikrosomální, 17,0 mg.ml⁻¹ solubilní) a výpočet koncentrací z absolutního spektra (1,9 mg.ml⁻¹ mikrosomální, 15,6 mg.ml⁻¹ solubilní). Použitím různých metod bylo dosaženo srovnatelných hodnot výsledných koncentrací preparátů mikrosomálního a solubilního apo-cyt b₅. Přičemž nejméně spolehlivou metodou je BCA, neboť k sestavení kalibrační křivky, z níž se odečítají posléze koncentrace apo-cyt b₅ či cyt b₅, se používají standardy sérového hovězího albuminu, tedy odlišného proteinu.

5 DISKUSE

Z koncentrace výsledných preparátů cyt b₅ a apo-cyt b₅ je zjevné, že při expresi probíhající při 37°C a vyššího přídavku IPTG bez δ-ALA produkce apo-cytochromu b₅ převýšila produkci cytochromu b₅ v případě mikrosomálního a byla srovnatelná u solubilního cyt b₅. Proto při snaze o produkci holoproteinové formy cytochromu b₅ bývají voleny odlišné podmínky exprese. Snížené množství přidaného IPTG by mohlo vést ke snížené produkci T7 RNA polymerasy buněčnou RNA polymerasou, která vyžaduje interakci *lac* promotoru s IPTG pro svou činnost. Nízká koncentrace T7 RNA polymerasy by v důsledku mohla snížit intenzitu translace genu pro cyt b₅.⁴⁵

Inkorporaci hemu do cytochromu b₅ lze také ovlivnit změnou teploty exprese v určitém rozsahu. Exprese probíhající při 27°C vede ke zvýšení inkorporace hemu oproti 37°C, ale při dalším snížení teploty dochází k výraznému poklesu exprese holoproteinové formy.⁴⁷

Přídavkem δ-ALA do kultury kultivovaných buněk, by mohla být podpořena rychlejší syntéza hemu pro následnou inkorporaci do apoproteinu, čímž by mohlo dojít ke zvýšení produkce holoproteinové formy. Dle Woodarda je syntéza hemu iniciována zpětnou vazbou při syntéze apoproteinu.⁸¹ Intenzivní exprese však byla doprovázena úbytkem hemu, pravděpodobně vyvolaným pomalou aktivací syntézy hemu či vyšší afinitou aminokyselin k biosyntéze apoproteinu než hemu.⁴⁵

V průběhu izolace se ukázalo, že solubilní forma cytochromu b₅ samovolně přijímá více hemu i bez přídavku δ-ALA ve srovnání s mikrosomální formou. To lze pozorovat na obr. 11, str. 58 a obr. 17, str. 65. Frakce solubilního cytochromu vykazují vyšší absorbanci při 413 nm oproti 280 nm, zatímco u mikrosomální formy je tomu naopak. Tento jev by mohl být pravděpodobně vysvětlen vlivem membrány na konformaci mikrosomálního cytochromu b₅, v jehož důsledku je cytochrom b₅ hůře přístupný pro prostetickou skupinu a hem se zřejmě obtížněji inkorporoval oproti solubilní formě.

Apoproteinová forma vykazuje vzhledem k nepřítomnosti hemu ztrátu části sekundární a terciální struktury oproti holoproteinu.⁶ Tato ztráta je doprovázena neuspořádaností v oblasti jádra 1 v podobě neuspořádaného řetězce o 42 aminokyseliných zbytcích, přičemž struktura jádra 2 se zachovává. Vazbou hemu se obnoví hydrofobní

charakter jádra 1 tvořený 4 šroubovicemi (H2, H3, H4, H5) obklopujícími hem.⁷ Pravděpodobně z důvodu této neuspořádané struktury je apo-cytochrom b₅ náchylnější k denaturaci vyvolané tepelnými⁶¹ nebo chemickými změnami⁷.

6 ZÁVĚR

Výsledky získané v rámci bakalářské práce lze shrnout následovně:

Byl amplifikován plasmid s inzerty obsahujícími geny pro mikrosomální a erytrocytární formu cytochromu b_5 a to v dostatečné čistotě a koncentraci. Tyto plasmidy byly vloženy do buněk *E. coli* BL-21 (DE3) Gold určených pro expresi cytochromů b_5 .

Byla provedena exprese cytochromů b_5 při 37°C za účelem získání vysokého podílu apoformy cytochromu b_5 . Sekundárně byla provedena také exprese při 27°C s přidavkem δ -ALA pro expresi holoproteinové formy cytochromu b_5 , ta však již nebyla v rámci bakalářské práce izolována.

Mikrosomální apo-cytochrom b_5 byl získán v několika krokovém purifikačním procesu založeném na izolaci membránové frakce a chromatografickém dělení proteinů na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B. Bylo získáno celkem 3,8 mg elektroforeticky homogenního proteinu. Preparát nevykazuje významnou kontaminaci hemovou prostetickou skupinou. Jako vedlejší produkt byla totožným postupem izolována hemová forma tohoto cytochromu b_5 a to s výtěžkem 2,6 mg. Nejedná se však o plně hemovaný preparát.

Solubilní apo-cyt b_5 byl purifikován chromatografickým dělením na kolonách DEAE-Sepharosy CL-6B a Sephadexu G-75. Tuto formu se podařilo izolovat v množství 15,6 mg a rovněž ve vysoké elektroforetické čistotě bez kontaminace nejenom jinými proteiny, ale ani hemem. Hemová forma cytochromu b_5 byla purifikována stejným postupem ve výtěžku 13,6 mg a neobsahovala ekvivalentní množství hemu vůči proteinu.

Titrací mikrosomálního i erytrocytárního apo-cyt b_5 heminem bylo potvrzeno zachování jejich biologické aktivity ve schopnosti vázat hem.

Výsledky bakalářské práce tedy plně splnily cíle, které byly jejím úkolem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, Espero Publishing, Ústí nad Labem, kap. 8 - 9, (2000)
2. Bayburt T.H., Sligar S.G.: Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks, *Biophysics*, 99(10), 6725-6730, (2002)
3. Bodin K., Bretillon L., Aden Y., Bertilsson L., Broome U., Einarsson., Diczfalusy U.: Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4 β -hydroxycholesterol in humans: Evidence for involvement of cytochrome p450 3A4, *J. Biol. Chem.*, 276(42), 38685-38689, (2001)
4. Buxbaum E.: *Biophysical chemistry of proteins: An introduction to laboratory methods*, kap. 15.3.1, Springer, New York (2010). Dostupné na http://books.google.cz/books?id=gqK_S5_7rrAC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
5. Carlsen J., Christiansen K., Jensen H.M.: Rat hepatic microsomal cytochrome b5. A simple large-scale purification procedure and antibody production by antigen-containing liposomes, *Biochem J.*, 256(3), 1051-1054, (1988)
6. Cowley A.B., Rivera M., Benson D.R.: Stabilizing roles of residual structure in empty heme binding pockets and unfolded states of microsomal and mitochondrial apocytochrome b5, *Protein Sci.*, 13(9), 2316-2329, (2004)
7. Davis R.D. Jr., Lecomte J.T.J.: Structural propensities in the heme binding region of apocytochrome b5. I.Free peptides., *Biopolymers*, 90(4), 544-555, (2008)
8. Domanski L.T., He Y-A., Harlow R.G., Halpert R.J.: Dual role of human cytochrome P450 3A4 residue Phe-304 in substrate specificity and cooperativity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293(2), 585-591, (2000)
9. Douglas R.H., Hultquist D.E.: Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b5 are identical to segments of microsomal cytochrome b5, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(7), 3118-3122, (1978)
10. Durr U.H.N., Waskell L., Ramamoorthy A.: The cytochromes P450 and b5 and their reductases-promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(12), 3235-3259, (2007)
11. Fowler M.F., Taylor M.J., Friedberg T., Wolf R.C., Riley J.R.: CYP3A4 active site volume modification by mutagenesis of leucine 211, *Drug Metab. Dispos.*, 30(4), 452-456, (2002)
12. Fujii-Kuriyama Y., Mizukami Y., Kawajiri K., Sogawa K., Muramatsu M.: Primary structure of a cytochrome P-450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79(9), 2793-2797, (1982)

13. Guengerich F.P.: Cytochrome p450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity, *AAPS J.*, **8(1)**, 101-111, (2006)
14. Guryev O.L., Gilep A.A., Usanov S.A., Estabrook R.W.: Interaction of apocytochrome b5 with cytochromes P4503A4 and P45017A: Relevance of heme transfer reactions, *Biochemistry*, **40(16)**, 5018 – 5031, (2001),
15. Hálková T.: Příprava rekombinantního lidského cytochromu b₅, Diplomová práce, PřF UK Praha, katedra biochemie, (2010)
16. Hames B. D.: Gel electrophoresis of proteins: A practical approach, 3. vydání, kap. 3., Oxford University Press, Oxford (1998)
17. Harlow R.G., Halpert R.J.: Alanine-scanning mutagenesis of a putative substrate recognition site in human cytochrome P450 3A4, *J. Biol. Chem.*, **272(9)**, 5396-5402, (1997)
18. Harlow R.G., Halpert R.J.: Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: Construction and characterization of a site-directed mutant that display hyperbolic steroid hydroxylation kinetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95(12)**, 6636-6641, (1998)
19. Hlavica P., Lewis D.F.: Allosteric phenomena in cytochrome P450-catalyzed monooxygenations, *Eur. J. Biochem.*, **268(18)**, 4817-4832, (2001)
20. Holme J. D., Peck H.: Analytical biochemistry, 3. vydání, kapitola 11.3.2, Longman, London (1998)
21. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf (cit. 31.8.2011)
22. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_proteinelectrophoresis.pdf (cit. 31.8.2011)
23. http://metallo.scripps.edu/promise/HAEM_THIOLATE.html#PROMISE (cit. 31.8.2011)
24. <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam?P00167-2> (cit. 31.8.2011)
25. <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P00167@2-134@> (cit. 31.8.2011)
26. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2121D.pdf (cit. 31.8.2011)
27. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/\\$file/11000421AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/$file/11000421AA.pdf) (cit. 31.8.2011)
28. http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~inoue-tken/ja/staffs/matsumura/BL21competent_man.pdf (cit. 31.8.2011)
29. http://www.iechs.org/staff/Andrews/files/BTEC%202010/CHAPTER_4_-_Analysis_of_Plasmid_Using_Spectro_and_Electrophoresis.pdf (cit. 31.8.2011)
30. <http://www.monmouthscientific.co.uk/uploads/pages/files/SONOPULS%20Ultrasonic%20Liquid%20Processors.pdf> (cit. 31.8.2011)
31. <http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp> (cit. 31.8.2011)
32. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productB7004.asp> (cit. 31.8.2011)
33. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0111.asp> (cit. 31.8.2011)
34. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productr0146.asp> (cit. 31.8.2011)

35. <http://www.opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpsonication101.htm> (cit. 31.8.2011)
36. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/dna-purification/> (cit. 31.8.2011)
37. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONC_AT_PNO|BRAND_KEY&N4=G75120|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC (cit. 31.8.2011)
38. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/pld140bul.Par.0001.File.tmp/pld140bul.pdf> (cit. 31.8.2011)
39. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00167> (cit. 31.8.2011)
40. <http://www.youtube.com/watch?v=6RjZfXz4NO8&feature=related> (cit. 31.8.2011)
41. http://www.youtube.com/watch?v=u_AKDas-Nb8 (cit. 31.8.2011)
42. Ingelman-Sundberg M.: The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207(2), 52 – 56, (2005)
43. Ito A., Mitoma J.: The carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b5 are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum, *EMBO J.*, 11(11), 4197-4203, (1992)
44. Jeon S., Kim K.H., Yun C.H., Hong B.W., Chang Y.s., Han H.S., Yoon Y.S., Choi W.B., Kim S., Lee A.Y.: An NH2-terminal truncated cytochrome P450 CYP3A4 showing catalytic activity is present in the cytoplasm of human liver cells, *Exp. Mol. Med.*, 40(2), 254 – 260, (2008)
45. Jung Y., Kwak J., Lee Y.: High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55(2), 187-191, (2001)
46. Klingenberg M.: Pigments of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 75(2), 376 – 386, (1958)
47. Koberová Monika: Studium inkorporace modifikovaných aminokyselin do cytochromu b5, Bakalářská práce, PřF UK Praha, katedra biochemie, (2010)
48. Kolektiv: Biochemie – základní kurz, skriptum PřF UK Praha, (1995)
49. Kotrbová V., Aimová D., Ingr M., Bořek-Dohalská L., Martínek V., Stiborová M.: Preparation of a biologically active apo-cytochrome b5 *via* heterologous expression in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, 66(2), 203-209, (2009)
50. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), 680 – 685, (1970)
51. Li A. P., Kaminski D. L., Rasmussen A.: Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4, *Toxicology*, 104(1-3), 1 – 8, (1995)
52. Meunier B., de Visser S.P., Shaik S.: Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes, *Chem. Rev.*, 104(9), 3947 – 3980, (2004)
53. Mulrooney S.B., Waskell L.: High-level expression in *Escherichia coli* and purification of membrane-bound form of cytochrome b(5), *Protein Expr. Purif.*, 19(1), 173-178, (2000)
54. 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., Phillips I.R., Sato R.,

- Waterman M.R.: The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature, *DNA*, 6(1), 1-11, (1987)
55. Ogishima T., Okada Y., Omura T.: Import and processing of the precursor of cytochrome P-450(SCC) by bovine adrenal cortex mitochondria, *J. Biochem.*, 98(3), 781-791, (1985)
56. Omura T.: Forty years of cytochrome P450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266(3), 690 – 698, (1999)
57. Ortiz de Montellano P. R.: Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry. 3. vydání, kap.1, 4 a 9, Plenum Press, New York, (2004)
58. Palackého Univerzita v Olomouci, katedra biochemie, učební materiál dostupný na <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/8.pdf> (cit. 31.8.2011)
59. Panja S., Aich P., Jana B., Basu T.: How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*?, *Mol. Membr. Biol.*, 25(5), 411 – 422, (2008)
60. pET system manual, Novagen, 10. vydání, (2002)
61. Pfeil W.: Thermodynamics of apocytochrome b5 unfolding, *Protein Sci.*, 2(9), 1497-1501, (1993)
62. Porter T.D: The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 16(6), 311-316, (2002)
63. Sakaguchi M., Mihara K., Sato R.: A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence, *EMBO J.*, 6(8), 2425-2431, (1987)
64. Sakaguchi M., Mihara K., Sato R.: Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(11), 3361-3364, (1984)
65. Schenkman J.B., Jansson I.: Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5, *Drug Metab. Rev.*, 31(2), 351-364, (1999)
66. Schenkman J.B., Jansson I.: The many roles of cytochrome b5, *Pharmacol. Ther.*, 97(2), 139-152, (2003)
67. Shet S.M., Fisher W.Ch., Holmans L.P., Estabrook W.R.: Human cytochrome P450 3A4: enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24), 11748-11752, (1993)
68. Shimada T., Guengerich F.P.: Evidence for cytochrome P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(2), 462-465, (1989)
69. Stiborová M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, Otevřená věda, Praha, 6-9, (2005)
70. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem. Listy*, 93, 229 – 237, (1999)

71. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem. Listy*, 98, 876 – 890, (2004)
72. Strittmatter P., Velick. S.F.: The isolation and properties of microsomal cytochrome, *J. Biol. Chem.*, 221(1), 253-264, (1956)
73. Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J.: Metody molekulární biologie, str. 13-14, Masarykova univerzita v Brně, Brno, (2005)
74. Vergéres G., Waskell L.: Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology, *Biochimie*, 77(7-8), 604-620, (1995)
75. Voet D., Voet J.G.: Biochemie, kap. 5, Victoria Publishing, Praha (1995)
76. Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S.S., Kim J-J.: Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(16), 8411-8416, (1997)
77. Waxman D.J., Attisano C., Guengerich F.P., Lapenson D.P.: Human liver microsomal steroid metabolism: Identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450, *Arch. Biochem. Biophys.*, 263(2), 424-436, (1988)
78. Wiechelman K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation, *Anal. Biochem.*, 175(1), 231 – 237, (1988)
79. William A.J., Ring J.B., Cantrell E.V., Jones R.D., Eckstein J., Ruterbories K., Hamman A.M., Hall D.S., Wrighton A.S.: Comparative metabolite capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7, *Drug Metab. Dispos.*, 30(8), 883-891, (2002)
80. Williams A.P., Cosme J., Vinkovic M.D., Ward A., Angove C.H., Day J.P., Vonnrhein C., Ticke J.I., Jhoti H.: Crystal structure of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone, *Science*, 305(5684), 683-686, (2004)
81. Woodard S.I., Dailey H.A.: Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 316(1), 110-115, (1995)
82. Yamazaki H., Johnson W.W., Ueng Y.F., Shimada T., Guengerich F.P.: Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b5, *J. Biol. Chem.*, 271(44), 27438 – 27444, (1996)
83. Yamazaki H., Shimada T., Martin M.V., Guengerich F.P.: Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: Evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase, *J. Biol. Chem.*, 276(33), 30885 – 30891, (2001)
84. Yamazaki J., Nakamura M., Komatsu T., Ohyama K., Hatanaka N., Asahi S., Shimada N., Guengerich F.P., Shimada T., Nakajima M., Yokoi T.: Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, 24(3), 329 – 337, (2002)

