

Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

**Mapování protein-proteinových interakcí
systému cytochromu P450 metodami chemické
modifikace a hmotnostní spektrometrie**

Diplomová práce



Tomáš Ječmen

Školitel: RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Miroslava Šulce, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování:

Děkuji školiteli RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. pomoc při izolaci proteinů a za vedení, které mi bylo v mnoha ohledech velkým přínosem. Děkuji také Mgr. Kateřině Pavláskové za trpělivé seznámení mé osoby se zpracováním experimentálních dat a za všechny připomínky k této diplomové práci. Mé díky patří rovněž Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. a Mgr. Janu Zachovi za poskytnuté chemikálie, RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za teoretický i praktický úvod do metod diferenční spektrometrie a fotoafinitního značení a RNDr. Petru Novákovi, PhD. za provedení hmotnostních analýz.

Mapování protein-proteinových interakcí systému cytochromu P-450 metodami chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie

Abstrakt

Cytochromy P-450 (P450) náleží do superrodiny hemoproteinů a v organismu se podílejí na metabolismu široké škály látek, mezi které patří některá léčiva a karcinogeny. V systému oxygenas se smíšenou funkcí plní P450 funkci terminální oxygenasy. Nezbytnou součástí je také NADPH: cytochrom P450 reduktasa (CPR), která je zodpovědná za přenos dvou elektronů na P450 v průběhu jeho katalytického cyklu. Druhý elektron může místo CPR přenášet na P450 také cytochrom b_5 (cyt b_5). Pro pochopení reakčního mechanismu P450 je nezbytná znalost jeho terciární struktury. V současnosti je v naší laboratoři k dispozici homologní model cytochromu P-450 2B4 (CYP 2B4).

Presentovaná diplomová práce měla za cíl označení vazebné domény CYP 2B4 pro cyt b_5 . Ke studiu bylo použito síťovací činidlo EDC tvořící amidickou vazbu mezi aminokyselinami s opačně nabitými bočními řetězci. Pomocí hmotnostní spektrometrie se nám podařilo nalézt pět párů kovalentně propojených aminokyselin.

K ověření a ke zpřesnění modelu CYP 2B4 byla použita metoda fotoafinitního značení se sondou N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminophenylaminu. Tato sloučenina se ligandově váže na centrální atom železa hemu. Po fotoaktivaci byl pomocí MS techniky nalezen adukt argininu 197 s fotoaktivovanou sondou.

Oba presentované výsledky ukazují správnost zvolených metodických přístupů a objasňují molekulární mechanismus interakcí CYP 2B4-ligand a CYP 2B4-cyt b_5 .

Mapping of protein-protein interactions in the system of cytochrom P-450 by chemical modification and mass spectrometry

Abstract

Cytochromes P-450 (P450s) belong to haemoprotein superfamily and they are responsible for metabolism of a wide variety of compounds, among others many drugs and carcinogens. P450s serve as the terminal oxidases in the mixed function oxidase system in cooperation with a redox partner NADPH: cytochrome P450 reductase (CPR) providing input of two electrons to the reaction cycle of P450. The CPR can be substituted by other redox partner of P450, cytochrome b_5 (cyt b_5), to deliver the second electron. Three dimensional structure of P450 is required in order to fully understand its reaction mechanism. At the present time, a homology model of cytochrome P-450 2B4 (CYP 2B4) is available in our laboratory.

In this study, the mapping of interaction domain between CYP 2B4 and cyt b_5 employing a crosslinking agent EDC to form amide bonds between close complementary charged amino acid side chains was the first goal. We have identified five interacting amino acid pairs in total using mass spectrometry (MS).

The second research interest was to verify and refine the CYP 2B4 model using a photoaffinity labelling with N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminophenylamine probe. This photoreactive probe is known as CYP 2B4 ligand binding to the central iron atom of haem. After photoactivation the arginine 197 was found by MS technique as a target aminoacid residue for reactive intermediate of this probe.

Both presented results validate our methodology approaches and elucidate the molecular mechanism of CYP 2B4-ligand or CYP 2B4-cyt b_5 interaction. (In Czech)

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	6
2. ÚVOD	8
2.1. Oxygenasy se smíšenou funkcí.....	8
2.1.1. Cytochrom P450.....	9
2.1.2. NADPH: cytochrom P450 reduktasa	10
2.1.3. Cytochrom b ₅	12
2.2. Modifikace chemickými síťovacími činidly	12
2.2.1. Síťovací reakce cytochromu P450 a cytochromu b ₅	13
2.2.2. Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450.....	14
2.3. Charakterizace typu vazby substrátu do aktivního centra cytochromu P450.....	14
2.4. Hmotnostní spektrometrie.....	15
2.4.1. Měkké ionizační techniky	16
3. CÍL.....	18
4. MATERIÁL A METODY	19
4.1. Materiál.....	19
4.1.1. Darované chemikálie.....	20
4.1.2. Použité pufrы a další roztoky.....	20
4.1.3. Přístroje	23
4.2. Metody.....	24
4.2.1. Analytická stanovení.....	24
4.2.2. Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE	26
4.2.3. Izolace cytochromu P450 2B4, cytochromu b ₅ a NADPH: cytochrom P450 reduktasy	27
4.2.4. Mapování aktivního centra cytochromu P450 2B4	28
4.2.5. Studium interakce cytochromu P450 2B4 s cytochromem b ₅	31
5. VÝSLEDKY	34
5.1. Izolace cytochromu P450 2B4, cytochromu b ₅ a NADPH: cytochrom P450 reduktasy.....	34
5.1.1. Izolace mikrosomální frakce	34
5.1.2. Solubilizace	35
5.1.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5	35
5.1.4. Chromatografie na kolonách hydroxylapatitu (1) a (2), pH 7,5	38
5.1.5. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (5), pH 7,5	41
5.1.6. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (3), pH 7,5	42
5.1.7. Odstranění detergentu z preparátů cytochromu P450.....	43
5.1.8. Chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0.....	44

5.1.9.	Odstranění detergentu z preparátu NADPH: cytochrom P450 reduktasy	46
5.1.10.	Chromatografie na kolonách DEAE-Sepharosy CL-6B (2), (3) a (4), pH 8,1	47
5.1.11.	Odstranění detergentu z preparátu cytochromu b ₅	50
5.2.	Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450 2B4.....	51
5.2.1.	Purifikace a ověření čistoty fotoafinitní sondy.....	51
5.2.2.	Charakterizace interakce cytochromu P450 2B4 s fotoafinitní sondou.....	53
5.2.3.	Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450 2B4	55
5.2.4.	Chemické zesílení cytochromu P450 2B4 a cytochromu b ₅	58
6.	DISKUZE	61
6.1.	Izolace proteinů MFO systému.....	61
6.1.1.	Purifikace cytochromu P450 2B4.....	61
6.1.2.	Purifikace NADPH: cytochrom P450 reduktasy	62
6.1.3.	Purifikace cytochromu b ₅	63
6.2.	Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450 2B4.....	64
6.2.1.	Purifikace fotoafinitní sondy	64
6.2.2.	Diferenční spektrometrie.....	64
6.2.3.	Fotoafinitní značení	65
6.3.	Chemické zesílení cytochromu P450 2B4 a cytochromu b ₅	66
7.	ZÁVĚR.....	68
8.	POUŽITÁ LITERATURA	69

1. SEZNAM ZKRATEK

A_{xxx}	absorbance při vlnové délce xxx nm
a	aktivita enzymu [$\text{nmol substrátu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot (\text{mol enzymu})^{-1}$]
ACN	acetonitril
Asp	kyselina asparagová
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. bicinchoninic acid)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
c	koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
CBB	briliantová modř (z angl. Coomassie Brilliant Blue)
CCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (z angl. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
cyt b_5	cytochrom b_5
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
E-911	Emulgen E-911
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid
ϵ	molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FTICR	iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance)
Glu	kyselina glutamová
HAP	hydroxylapatit
l	optická dráha paprsku v kyvetě [cm]
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
Lys	lysin

λ	vlnová délka [nm]
MALDI-TOF	desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice – měření doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight)
MF	mikrosomální frakce
MFO	oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxygenases)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS ⁿ	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnost/náboj
n	látkové množství [mol]
NaAc	octan sodný
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	jaderná magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
P450	cytochrom P450
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
pI	izoelektrický bod
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electroforesis)
t	čas [min]
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin (z angl. tris(2-carboxyethyl)phosphine)
TFA	trifluoroctová kyselina (z angl. trifluoroacetic acid)
TOF	viz MALDI-TOF
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové spektrum (vlnění o vlnové délce kratší než 400 nm; z angl. ultraviolet)
V	objem [dm ³]
v/v	poměr objem/objem (z angl. volume/volume)
VIS	viditelné spektrum (vlnění o vlnové délce 400 – 700 nm; z angl. visible spectrum)
w/v	poměr hmotnost/objem (z angl. weight/volume)

2. ÚVOD

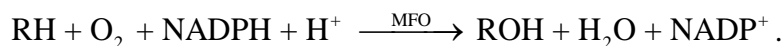
Lidskou činností se v životním prostředí zvyšuje množství látek tělu cizích (xenobiotik), které mohou vnikat do organismu a mít na něj negativní vliv. Snahou organismu je zkrácení doby působení těchto látek, na čemž se podílí řada biotransformačních enzymů s různou substrátovou specifitou. Tyto enzymy katalyzují přeměnu široké škály látek na látky polárnější, snáze z organismu vyloučitelné.

Kromě látek tělu vlastních podléhají biotransformaci také toxická a karcinogenní xenobiotika, která mohou být touto cestou aktivována a mít pro organismus nežádoucí účinky (toxicita, karcinogenita). Dalšími biotransformovanými xenobiotiky jsou léčiva, kde znalost jejich metabolismu je nezbytná pro farmaceutický průmysl. V důsledku přeměny může dojít k nechtěným efektům – inaktivaci, zvýšení toxicity, snížení aktivity či zkrácení doby působení léku – i k efektům žádaným – aktivaci původně neaktivních forem léčiv. [1] Detailní znalost struktury biotransformačních enzymů a od ní se odvíjející mechanismus účinku usnadňuje a urychluje vývoj účinných a šetrných léčiv.

Prostorovou strukturu proteinů lze v dnešní době zjišťovat několika metodami, jednou z nichž je hmotnostní spektrometrie ve spojení s modifikací proteinů chemickými činidly. Na rozdíl od ostatních metod studia prostorové struktury – NMR (jaderná magnetická rezonance, z angl. nuclear magnetic resonance), rentgenové krystalografie [2] – je možné pracovat s proteiny v nativním prostředí, např. s proteiny ukotvenými v lipidové membráně. Ve prospěch hmotnostní spektrometrie navíc hovoří vysoká citlivost a rozlišovací schopnost, rychlost a poměrně snadné vyhodnocení výsledků. [3]

2.1. Oxygenasy se smíšenou funkcí

Jedním z katalytických systémů biotransformace u vyšších organismů jsou nespecifické oxygenasy se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mixed function oxygenases), které jsou ukotvené k membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondriální membráně. V první fázi biotransformace katalyzují reakce vedoucí k hydroxylaci substrátu s jeho následnou detoxifikací. Za spotřeby 2 elektronů a 2 protonů enzymaticky štěpí molekulu kyslíku, jeden z atomů kyslíku inkorporují do molekuly xenobiotika a druhý redukuje na vodu. [2] Proces vystihuje sumární rovnice:



Do molekuly vnesený kyslík poskytuje ve druhé fázi místo pro vazbu vysoce polárních molekul (např. kyselina glukuronová, kyselina sírová), které výrazně zvýší rozpustnost hydrofobních molekul. Tyto konjugáty mohou být vyloučeny z organismu. [2,4]

Terminální oxidasou monooxygenasového systému MFO je cytochrom P450 (P450), který katalyzuje vlastní oxidaci substrátu. Pro redukci eukaryotických P450 je nezbytná interakce s reduktasou obsahující FAD a FMN prosthetickou skupinu. [5,6] Tou je NADPH: cytochrom P450 reduktasa (CPR), která zprostředkovává přenos prvního, a v případě nepřítomnosti cytochromu b₅ (cyt b₅) i druhého, elektronu na P450.

Cyt b₅ může ovlivňovat katalytické vlastnosti P450, ale není pro biotransformaci nezbytný. Jeho interakce nejsou plně objasněny, ale liší se podle izoformy P450, přítomného substrátu a experimentálních podmínek. [7,8]

Důležitou složkou katalytického systému je také fosfolipidová membrána, která poskytuje prostředí pro interakce proteinů, umožňuje jejich správnou vzájemnou orientaci a výrazně ovlivňuje enzymovou aktivitu systému. [9]

2.1.1. Cytochrom P450

V součastnosti je cytochrom P450 (P450; EC 1.14.14.1) řazen do superrodiny hemthiolátových proteinů obsahujících hem typu b. Za svůj název vděčí tomu, že byl původně považován za jaterní redoxní pigment, jehož redukovaná forma v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje charakteristické absorpční maximum Soretova pásu při vlnové délce 450 nm. [10,11] Tato odlišnost od ostatních hemoproteinů, jejichž Soretův pás se nachází v oblasti vlnových délek 380 – 420 nm, je zapříčiněna rozdílným rozložením elektronové hustoty na porfyrinovém kruhu způsobeným koordinačně-kovalentní vazbou thiolátové síry (pátý ligand) na atom železa aktivního centra. [12,13]

K oxidaci substrátu dochází na prosthetické hemové skupině ve vysoce konzervované oblasti P450 na proximální straně proteinu. Jednou ze tří zcela konzervovaných aminokyselin je cystein, který interaguje s atomem železa v aktivním centru proteinu a je nezbytný pro katalytickou funkci P450. [2,10,14]

Nejvíce variabilní oblastí proteinu je vazebná dutina pro substrát, která určuje substrátovou specifitu. Některé izoformy jsou vysoce specifické a oxidují jen několik strukturně podobných substrátů, jiné jsou univerzální a oxidují množství nejrůznějších

substrátů. [2,10] Vazebná dutina se, společně s vazebným místem pro molekulu O_2 , nachází na distální straně proteinu a zabraňuje přístupu substrátů nevhodné velikosti, tvaru a fyzikálně-chemických vlastností ke katalytickému centru. [2,15] Na proximální straně proteinů se nachází vazebné místo redoxních partnerů, které obsahuje velký počet pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků. [2,7,10] Vazebná místa CPR a cyt b_5 nejsou totožná, částečně se však překrývají. [7] Díky této skutečnosti P450 při interakci s různými partnery zaujímá různou konformaci. [2]

Výše popsaná katalytická doména se nachází na C-konci proteinu. Na N-konci eukaryotických P450 se nachází hydrofobní kotva, která spolu s částí katalytické domény slouží k uchycení enzymu do membrány. Pro studium funkce eukaryotního mikrosomálního P450 je uchycení v lipidové membráně nezbytné, ač není její význam doposud zcela objasněn. [2] Interakce membrány s P450 může napomáhat přenosu hydrofobního substrátu k aktivnímu centru enzymu. Také může P450 vhodně orientovat a usnadnit tak jeho interakci s CPR. [6]

Sekvenováním genomu byly objeveny různé izoformy P450, a to u zástupců všech říší, i v rámci jednotlivých druhů – např. u člověka jich bylo popsáno 57. [13] Isoformy jsou rozděleny do rodin a podrodin na základě minimálně 40%, resp. 55% shody aminokyselinové sekvence s ostatními zástupci. V názvu označuje příslušnost k rodině první arabská číslice, příslušnost k podrodině následující velké písmeno a vlastní enzym pak popisuje arabská číslice na konci.

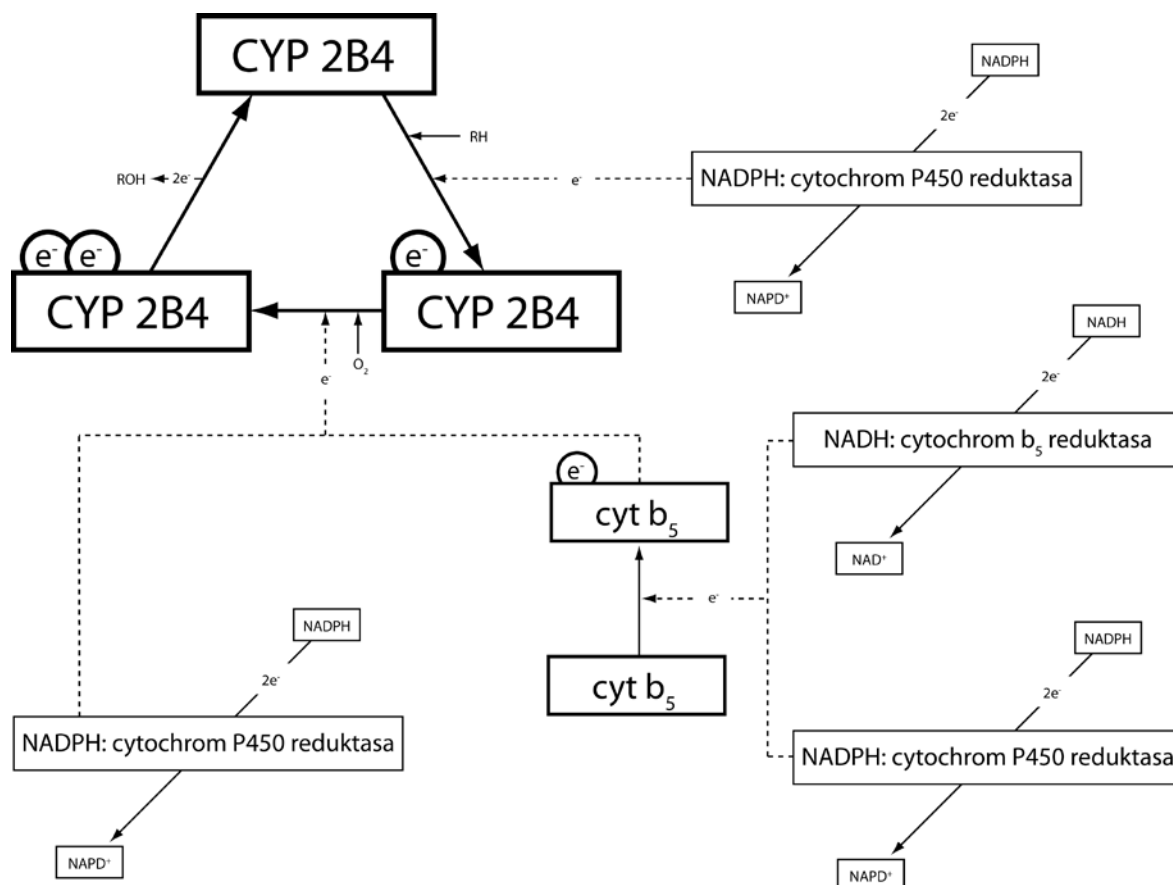
Jako modely pro zkoumání struktury a funkce P450 slouží poslední desetiletí zástupci podrodiny 2B. Projevují se u nich velké rozdíly ve funkci při malých rozdílech v sekvenci aminokyselin, což umožňuje určit, jakým způsobem aminokyselinové zbytky přispívají k substrátové specifitě P450. [16,17]

Tato práce se zaměřuje na králičí izoformu P450 2B4 (CYP 2B4). Její sekvence je tvořena 491 aminokyselinami, má molekulovou hmotnost 55,8 kDa a vyznačuje se plasticitou umožňující vázat substráty různých velikostí a tvarů. [2,16]

2.1.2. NADPH: cytochrom P450 reduktasa

Katalytický cyklus MFO systému shrnuje schéma na Obr. 1 na straně 4. V jeho průběhu dochází k přenosu elektronů z molekuly NADPH na P450. Přenost není přímý, jelikož NADPH je donorem dvou elektronů současně, zatímco P450 je schopen přijmout v jednotlivých krocích katalytického cyklu pouze jeden elektron.

Funkci děliče elektronového páru plní na membráně endoplazmatického retikula lokalizovaný flavoprotein NADPH: cytochrom P450 reduktasa (CPR; EC 1.6.2.4). [6,18]



Obr. 1: Přenos elektronu v MFO systému; podle Dürr *et al.* [2]

Strukturu eukaryotické, mikrosomální CPR lze rozdělit na dvě základní domény. První je přibližně 60 aminokyselin dlouhá hydrofobní N-koncová kotva (6 kDa) sloužící k uchycení molekuly na endoplazmatické retikulum a jaderný obal buňky. [6,19] Druhou doménou je hydrofilní C-koncová část (72 kDa) se specifickými oblastmi pro vazbu kofaktorů a interakci s partnery – P450, cyt b₅ a cytochromem c (cyt c). [2,20]

Odštěpením N-koncové hydrofobní kotvy ztrácí CPR schopnost redukovat P450, ačkoliv redukci cyt c nadále umožňuje. Metodou rentgenostrukturní analýzy byla získána struktura této rozpustné formy CPR, která ukázala existenci 3 domén. FMN-vazebná doména interaguje s P450, FAD-vazebná doména interaguje s NADPH a spojovací doména pravděpodobně zajišťuje správnou vzájemnou orientaci domén při přenosu elektronů. [6]

FAD a FMN obsahují isoalloxazinovou prosthetickou skupinu, která se může vyskytovat ve 3 formách: chinonové (oxidované), semichinonové a hydrochinonové

(redukované). Přijetí 2 elektronů od NADPH vede ke vzniku hydrochinonové formy, která může oxidací na formu semichinonovou a poté případně na formu chinonovou odevzdat 2 elektrony P450 postupně. [18]

2.1.3. Cytochrom b₅

Malý (16,7 kDa), elektrony přenášející hemoprotein cytochrom b₅ byl původně pojmenován cytochrom m, jelikož byl nalezen v mikrosomech. [21] Slouží jako donor redukčních ekvivalentů při biosyntéze lipidů a jako donor druhého elektronu v reakčním cyklu P450. [22] Donorem elektronu cyt b₅ může být NADH: cytochrom b₅ reduktasa i CPR (Obr. 1 na straně 11). [2]

Ačkoliv se různé formy cyt b₅ liší v aminokyselinové sekvenci, jsou zařazovány do jedné rodiny proteinů na základě charakteristického diferenčního UV-VIS spektra oxidované a redukované formy (maxima při vlnových délkách 426 nm a 556 nm a minimum při vlnové délce 409 nm), přítomnosti prostheticke hemové skupiny (5. a 6. ligandem jsou dva boční řetězce histidinu 44 a 68) a na základě výskytu některých katalyticky významných aminokyselin v reakčním centru. [21,23]

Cyt b₅ je tvořen dvěma doménami. Na N-konci se nachází velká katalytická doména s vazebnou oblastí bohatou na záporně nabitě aminokyselinové zbytky. Ty tvoří komplementární povrch ke kladně nabitým aminokyselinovým zbytkům vazebného místa P450. Na C-konci se nachází krátká hydrofobní kotva, která slouží k uchycení cyt b₅ v membráně endoplazmatického retikula.

Domény jsou propojeny spojovacím řetězcem, který ovlivňuje charakter interakce cyt b₅ s P450. [21,22] Povaha interakce je různá v závislosti na izoformě CYP, přítomnosti substrátu, jeho typu a experimentálních podmínkách. Může dojít ke stimulačnímu i inhibičnímu efektu.

Nízká koncentrace cyt b₅ brání vzniku vedlejších produktů katalytického cyklu a stimuluje tak katalýzu CYP 2B4, která probíhá 10 – 100 x rychleji. [2] Naopak vysoká koncentrace cyt b₅ katalýzu inhibuje kompeticí s CPR, která nemůže dodávat v katalytickém cyklu první elektron. [7]

2.2. Modifikace chemickými síťovacími činidly

Síťovací činidla obsahují reaktivní koncové skupiny, které specificky interagují s funkčními skupinami proteinů a jiných makromolekul. K určení vzdáleností mezi

prostorově blízkými aminokyselinami v proteinech se používají síťovací činidla o definované délce raménka. Pro spojování molekul bez vkládání raménka se používají tzv. síťovací činidla nulové délky. [24]

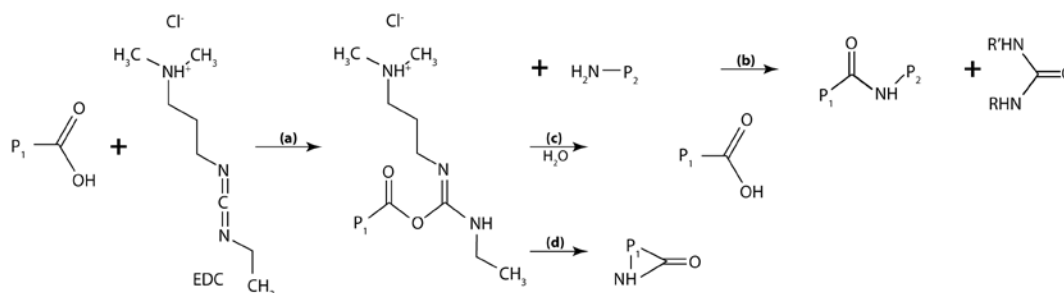
Spojením síťovacích technik s hmotnostní spektrometrií vznikla citlivá metoda sloužící k určování terciální struktury proteinů. V kombinaci s homologním modelováním umožňuje tvorbu počítačových třídimenzionálních modelů proteinových molekul. [3]

2.2.1. Síťovací reakce cytochromu P450 a cytochromu b₅

Vzájemné působení mezi P450 a CPR nebo P450 a cyt b₅ má charakter slabých vazebných interakcí a reaktanty se v reakčním komplexu vyskytují ve změněné, pravděpodobně fyziologicky klíčové, konformaci. [8,21] Pro pochopení mechanismu reakce je třeba tuto konformaci uchovat pro následné zkoumání.

Použití běžných analytických metod jako jsou elektroforéza na polyakrylamidovém gelu nebo samotná hmotnostní spektrometrie vede k disociaci reakčního komplexu. Výhodou síťovacích reakcí je tvorba kovalentních vazeb v místech původních slabých, dočasných interakcí a reakční komplex je stabilizován pro další zkoumání. [24,21,25]

Karbodiimidy, činidla s nulovou délkou raménka, tvoří při reakci novou amidovou vazbu mezi blízkým bazickým aminokyselinovým zbytkem (Lys) nebo koncovým aminem a kyselým aminokyselinovým zbytkem (Asp, Glu) nebo koncovým karboxylem. [8] K zafixování vazebné interakce mezi CYP a cyt b₅ je možné použít ve vodě rozpustné síťovací činidlo 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC). Mechanismus reakce uvedený na Obr. 2 zahrnuje aktivaci karboxylové skupiny za vzniku meziprojektu (Obr. 2a), který následně reaguje s aminoskupinou za vzniku nové intermolekulární kovalentní vazby (Obr. 2b). [24]



Obr. 2: Reakční schéma EDC; podle <http://piercenet.com> [24]

P₁, P₂ – proteiny tvořící novou kovalentní vazbu

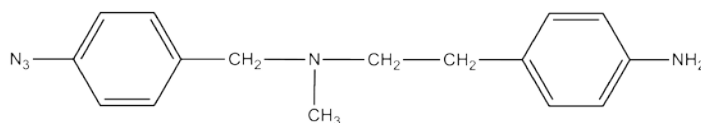
Protože meziproduct není ve vodném prostředí stabilní, nedojde-li poměrně rychle k reakci s aminoskupinou, dochází k jeho hydrolyze (Obr. 2c na straně 13). Jako vedlejší produkt může také při reakci vzniknout molekula proteinu modifikovaná nově vytvořenou intramolekulární amidickou vazbou (Obr. 2d na straně 13).

2.2.2. Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450

Strukturu proteinu získanou rentgenovou strukturní analýzou nebo *in silico* homologním modelováním je třeba ověřit některou z nepřímých metod, mezi něž patří např. spektrometrické metody, místně cílená mutagenese (angl. site-directed mutagenesis) nebo modifikace afinitními či fotoafinitními sondami. [26]

Principem fotoafinitního značení je tvorba komplexu studovaného enzymu se specificky se vážící fotoafinitní sondou obsahující fotolabilní skupinu. Typickými fotoafinitními sondami jsou derivatizované substráty či ligandy zkoumaných enzymů. Sondy nejčastěji obsahují azidovou, benzofenonovou nebo diazirinovou fotolabilní skupinu. Fotolýza UV laserem vede k tvorbě velmi reaktivního meziproductu (nejčastěji karbenového či nitrenového iontu), který kovalentně modifikuje protein. [25]

Jedním ze substrátů P450 podrodiny 2B je benzfetamin, který patří do skupiny amfetaminů. Stimuluje centrální nervový systém, zvyšuje krevní tlak a potlačuje chuť k jídlu. [27] Z benzfetaminu je odvozena heterobifunkční fotoafinitní sonda N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylamin (Obr. 3), která se aminoskupinou koordinuje na atom železa hemu v aktivním centru CYP 2B4 a azidová skupina po ozáření laserem značí aminokyselinu ve vzdálenosti přibližně 16,5 Å od centrálního atomu železa hemu. [28]



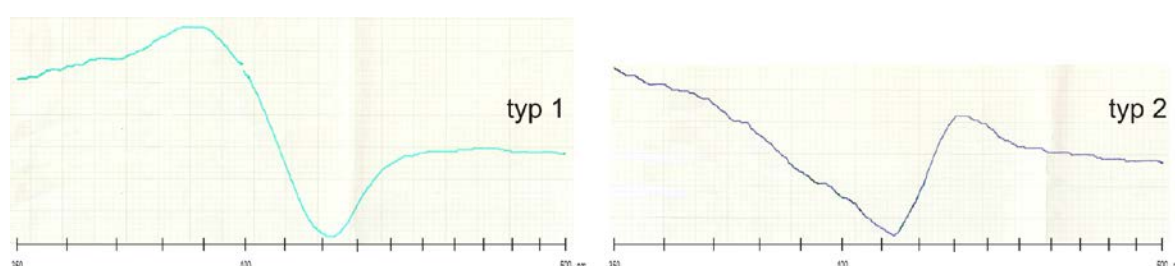
Obr. 3: Vzorec N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylaminu

2.3. Charakterizace typu vazby substrátu do aktivního centra cytochromu P450

Interakce P450 se substráty a produkty způsobuje charakteristické posuny maxim absorpčního spektra. V závislosti na způsobu vazby ligandu v aktivním centru enzymu a koordinaci hemového železa mohou být změny trojího typu. Diferenční spektrum typu I ukazuje na vysokospinový stav železa hemu, které je pentakoordinované, a vazebné místo

ligandu se nachází v proteinové části enzymu. Diferenční spektrum typu II svědčí o nízkospinovém stavu železa hemu, pro které je charakteristický hexakoordinovaný komplex. Vazebným místem ligandu je atom železa hemu, a proto se někdy tento typ spektra nazývá ligandový. Třetím typem diferenčního spektra je spektrum reversního typu. [29]

Znalost charakteristických diferenčních spekter (Obr. 4) umožňuje sledování vazby substrátu v aktivním centru enzymu. Fotoafinitní sonda N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylamin v komplexu s CYP 2B4 vykazuje ligandový typ diferenčního spektra s absorpčním maximem při vlnové délce přibližně 430 nm a širokým absorpčním minimem při vlnové délce přibližně 415 nm. [26,30]



Obr. 4: Diferenční spektrum typu I (CYP 2B4 s diamantanem) a typu II (CYP 2B4 se sondou)

2.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) je analytická metoda využívaná v mnoha vědeckých disciplínách. V biochemii je její využití rozmanité a zahrnuje, mimo jiné, zjišťování posttranslačních úprav proteinů, identifikaci mutací v aminokyselinové sekvenci, určování disulfidových vazeb a obecné stanovování čistoty vzorků.

Při MS analýze je vzorek ionizován v plynné fázi a nabitě molekuly a jejich fragmenty jsou děleny průchodem elektrickým nebo magnetickým polem na základě poměru hmotnost/náboj (m/z). U takto separovaných iontů lze velmi přesně stanovit jejich molekulovou hmotnost. [3]

Hmotnostní spektrometr má tři hlavní části – ionizační zdroj, analyzátor a detektor. V ionizačním zdroji dochází jednou z mnoha známých metod k ionizaci molekul vzorku a jejich převodu do plynné fáze. Aby nedocházelo při průchodu ionizovaných molekul systémem k interakci s molekulami vzduchu, musí být spektrometr evakuován na tlak $1,3 \cdot 10^{-2}$ - $1,3 \cdot 10^{-6}$ Pa. [31]

Analyzátor slouží k dělení a analyzování směsi iontů s různým m/z na základě jejich rozdílného chování v elektrickém nebo magnetickém poli. Stejně jako v případě ionizačních metod existuje několik analyzátorů vzájemně se lišících ve vlastnostech – principem stanovení m/z , rozsahem měřitelných m/z , přesností a rozlišením. [3,32]

Detektor, na který dopadá proud iontů, zesiluje získaný signál a předává ho datovému systému, který zaznamená získaná data jako závislost intenzity dopadajících iontů na m/z . Výsledkem je hmotnostní spektrum zobrazující m/z jednotlivých iontů a jejich relativní zastoupení.

2.4.1. Měkké ionizační techniky

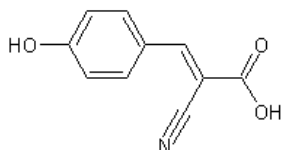
V současnosti jsou k ionizaci velkých biomolekul nejčastěji využívány tzv. měkké ionizační techniky, při jejichž použití je stupeň fragmentace analytu nízký, oproti dříve používaným technikám dodávajícím analytu nadměrné množství energie vedoucí k jeho fragmentaci. [3]

Mezi měkké ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem (angl. Electrospray Ionization, ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). Jejich vývoj vedoucí k velkému využití MS pro studium biomolekul byl v roce 2002 oceněn Nobelovou cenou. [33]

Ionizace laserem byla jako tvrdá ionizační technika používána již dříve, ale teprve v roce 1987 byla vylepšena na měkkou techniku použitím ionizace matrice spolu se vzorkem (MALDI).

Výhodou přítomnosti matrice je, že je schopna absorbovat energii laseru a přeměnit ji na excitační energii, která je přenesena na molekuly analytu. Důsledkem je jeho šetrná ionizace a převod do plynné fáze. Používaný poměr matrice a analytu je obvykle 10000:1. [3] Ionizací za přítomnosti matrice vznikají převážně jedenkrát nabitě ionty analytu. [31]

Nejčastěji používanými matricemi absorbujícími v UV oblasti používaných laserů jsou pevné organické kyseliny obsahující aromatický kruh. Nejuniverzálnější matrice k ionizaci peptidů je α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Obr. 5), která absorbuje při 337 nm, což odpovídá vlnové délce záření nejčastěji používaného N_2 -laseru. [3]



Obr. 5: Matrice α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina pro MALDI MS

Pulem laseru je analyt za přítomnosti matrice ionizován a všem iontům je dodána iontovou optikou stejná kinetická energie. Ionty poté vstupují do analyzátoru, kterým je ve spojení s MALDI ionizační technikou nejčastěji analyzátor TOF (z angl. Time of Flight). Jeho výhodou je velmi krátká doba analýzy, která umožňuje získat celé hmotnostní spektrum během jediného pulsu laseru. TOF analyzátor je také využíván pro vysokou citlivost a téměř neomezenou maximální hmotnost analyzovaných iontů.

Další ionizační technikou využívanou k charakterizaci velkých molekul je ionizace elektrosprejem (ESI). Jednou z jejích výhod je, že probíhá za atmosferického tlaku a je snadné ji spojit s kapalinovou chromatografií (LC-MS), a získat tak přímo analýzu látek separovaných na chromatografické koloně. Mezi další výhody patří tvorba mnohonásobně nabitých iontů umožňující měření ve velmi širokém rozsahu molekulových hmotností látek a možnost využití techniky i k analýze látek teplotně nestálých.

Roztok vzorku prochází kapilárou, jejíž konec je připojen k vysokému napětí (3 – 5 kV). Na hrotu kapiláry dochází ke vzniku malých, mnohonásobně nabitých kapiček, které jsou rozprášeny do prostoru. Ty se, v proudu zahřátého inertního plynu (nejčastěji N₂), začnou pohybovat směrem k opačně nabitě elektrodě, přičemž dochází k odpaření rozpouštědla a přenesení náboje na analyzované molekuly. Ionty analytu vstupují poté otvorem do evakuovaného analyzátoru. [3,31]

Analyzátorů, které je možné spojit s ionizací ESI, je více typů. MS využívající ESI ve spojení s FTICR analyzátozem (z angl. Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) patří mezi vysoce přesné metody schopné analyzovat ve velmi krátkém čase komplexní směsi látek. [34] Pro tato pozitiva je výhodné tento hmotnostní spektrometr využívat pro analýzu chemicky zesítěných či modifikovaných proteinů.

3. CÍL

Prvním cílem diplomové práce bylo purifikovat z jaterní tkáně pokusného zvířete CYP 2B4 a další složky MFO systému – CPR a cyt b₅.

Druhým cílem bylo zjištění způsobu vazby ligandu CYP 2B4 – derivátu benzfetaminu – v aktivním centru metodou diferenční spektrometrie a metodami fotoafinitního značení ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Určení interakcí CYP 2B4 a jeho aktivního centra s redoxním partnerem cyt b₅ hmotnostní spektrometrií ve spojení se síťovacími reakcemi bylo posledním cílem předkládané diplomové práce.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

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

BIO-RAD, USA: hydroxylapatit

Bruker Daltonics, SRN: α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina

Farmakon Olomouc, ČR: fenobarbital sodný

Fluka, Švýcarsko: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid (EDC), akrylamid, Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), ethylmorfolin, chloroform, jodacetamid (IAA), methanol (MeOH), N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), persíran amonný (APS), protaminsulfát, pyridin, thiosíran sodný, triethylamin (TEA), trifluoroctová kyselina (TFA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), tris(2-karboxyethyl)fosfan (TCEP), α -tokoferol (vitamin E), uhličitan sodný monohydrát

Kao Chemicals, Japonsko: Emulgen E-911

Lachema Brno, ČR: dihydrogenfosforečnan draselný, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTANa₂), dithioničitan sodný, ethanol, glycerol, hydroxid sodný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, octan sodný (NaAc), sacharosa

Linde, ČR: oxid uhelnatý, kapalný dusík, plynný dusík

Loba Feinchemie, Rakousko: L-Glutathion (red.)

Merck, SRN: acetonitril (ACN), silikagel, voda, methanol

Promega, SRN: trypsin

Roche Diagnostics, SRN: Complete Protease Inhibitor

Sevapharma, ČR: hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA: bicinchoninová kyselina (BCA), dithiotreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), cholát sodný, NADPH, standardy pro SDS-PAGE (wide range), Tergitol NP-10

4.1.1. Darované chemikálie

Fenylazid laskavě poskytnula laboratoř Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, ČR.

N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylamin byl syntetizován v rámci diplomové práce [35] a poskytnut Janem Zachem, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, ČR.

4.1.2. Použití pufrů a další roztoky

Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny

Roztok A – 0,4 % NaOH (w/v), 0,95 % NaHCO₃ (w/v), 2 % Na₂CO₃·H₂O (w/v), 0,16 % vinan sodný (w/v), pH 11,25

Roztok B – 4 % CuSO₄·5H₂O (w/v)

Pufr pro stanovení koncentrace cytochromu P450 – 100 mmol · dm⁻³ KH₂PO₄/KOH, 2 % glycerol (v/v), pH 7,5

Pufr pro stanovení koncentrace CPR – 300 mmol · dm⁻³ KH₂PO₄/KOH, 1 mmol · dm⁻³ EDTANa₂, pH 7,4

Roztoky pro SDS-PAGE

Vzorkový pufr (pětkrát koncentrovaný) – 250 mmol · dm⁻³ Tris/HCl, 500 mmol · dm⁻³ DTT, 10 % SDS (w/v), 0,5 % bromfenolová modř (w/v), 50 % glycerol (v/v)

Elektrodový pufr (pětkrát koncentrovaný) – 0,1 mol · dm⁻³ Tris/HCl, 1 mol · dm⁻³ glycin, 0,5 % SDS (w/v), pH 8,5

Separáční gel (8 %) – 2,3 ml vody, 1,3 ml 1,5 mol · dm⁻³ Tris/HCl (pH = 8,8), 1,4 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 μl 10 % SDS (w/v), 3 μl TEMED, 50 μl 10 % APS (w/v)

Separáční gel (10 %) – 1,9 ml vody, 1,3 ml 1,5 mol · dm⁻³ Tris/HCl (pH = 8,8), 1,7 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 μl 10 % SDS (w/v), 2 μl TEMED, 50 μl 10 % APS (w/v)

Separáční gel (12 %) – 1,7 ml vody, 1,3 ml 1,5 mol · dm⁻³ Tris/HCl (pH = 8,8), 2,0 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 μl 10 % SDS (w/v), 2 μl TEMED, 50 μl 10 % APS (w/v)

Zaostřovací gel (4 %) – 1,4 ml vody, 0,25 ml 1,0 mol · dm⁻³ Tris/HCl (pH = 6,8), 0,33 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 20 μl 10 % SDS (w/v), 2 μl TEMED, 20 μl 10 % APS (w/v)

Barvicí lázeň Coomassie BBR-250 – 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 45 % methanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Odbarvovací roztok – 35 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Pufry pro izolaci

Pufr PR1 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 153 mmol . dm⁻³ KCl/KOH, 10 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 0,5 mmol . dm⁻³ PMSF, 50 μmol . dm⁻³ vitamin E, pH 7,5

Pufr PR2 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 100 mmol . dm⁻³ KCl/HCl, 100 mmol . dm⁻³ Na₄P₂O₇ . 10H₂O, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, pH 7,5

Pufr PR3 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 0,25 mmol . dm⁻³ sacharosa/NaOH, 10 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 1 mmol . dm⁻³ DTT, 250 μmol . dm⁻³ vitamin E, 1 tableta proteasového Complete Inhibitoru/50 ml pufru, pH 7,5

Pufr PR4 (pufr pro solubilizaci) – 100 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 100 mmol . dm⁻³ KCl, 20 % glycerol (v/v), 1 mmol . dm⁻³ DTT, pH 7,5

Pufr PR5 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B (1) a HAP (1)) – 5 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR6 (dialyzační pufr) – 5 mmol . dm⁻³ KH₂PO₄/KOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 0,1 mmol . dm⁻³ DTT, 10 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr PR7 (promývací pufr pro HAP (1), ekvilibrační pufr pro HAP (2) a dialyzační pufr) – 5 mmol . dm⁻³ NaH₂PO₄/NaOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR8 (triethylaminový dialyzační pufr) – 25 mmol . dm⁻³ TEA/HCl, 1 mmol . dm⁻³ DTT, 20 % glycerol, pH 7,4

Pufr AP1 (cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B (1)) – 1 mol . dm⁻³ Tris/HCl, pH 7,5

Pufr AP2 (nalévací pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B (1)) – 5 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 20 % glycerol (v/v), pH 7,5

Pufr BP1 (promývací pufr pro HAP (1)) – 10 mmol . dm⁻³ NaH₂PO₄/NaOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr BP2 (promývací pufr pro HAP (1) a pufr pro gradient HAP (1)) – 25 mmol . dm⁻³ NaH₂PO₄/NaOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr BP3 (pufr pro gradient HAP (1)) – 200 mmol . dm⁻³ NaH₂PO₄/NaOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr BP4 (promývací pufr pro HAP (2)) – 25 mmol . dm⁻³ NaH₂PO₄/NaOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911, pH 7,5

Pufr BP5 (eluční pufr pro HAP (2)) – 200 mmol . dm⁻³ NaH₂PO₄/NaOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911, pH 7,5

Pufr CP1 (ekvilibrační a eluční pufr cyt b₅ pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B) – 50 mmol . dm⁻³ KH₂PO₄/KOH, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 0,1 mmol . dm⁻³ DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,2 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr CP2 (eluční pufr CPR pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B) – 50 mmol . dm⁻³ KH₂PO₄/KOH, 0,2 mol . dm⁻³ KCl, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 0,1 mmol . dm⁻³ DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), těsně před použitím 0,5 mmol . dm⁻³ NADP⁺, pH 7,5

Pufr CP3 (dializační pufr pro cyt b₅) – 10 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 0,1 mmol . dm⁻³ DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,4

Pufr DP1 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B (2)) – 3 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 0,1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), pH 8,1

Pufr DP2 (eluční pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B (2) a ekvilibrační pro DEAE-Sepharosu CL-6B (3)) – 15 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 0,1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,6 % Tergitol NP-10 (w/v), pH 8,1

Pufr DP3 (eluční pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B (3)) – 15 mmol . dm⁻³ Tris/acetát, 0,1 mmol . dm⁻³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), pH 8,1

Roztoky pro chemické modifikace a hmotnostní spektrometrii

Štěpící ethylmorfolinový pufr – 50 mmol . dm⁻³ ethylmorfolin, 10 % ACN, pH 8,1

Pyridinový pufr – 50 mmol . dm⁻³ pyridin/HCl, 150 mmol . dm⁻³ NaCl, pH 6,0

4.1.3. Přístroje

Centrifugy: Beckman Coulter Allegra X-22R, ultracentrifuga Beckman Optima LE 80K, minicentrifuga Eppendorf, Janetzki K-23, Janetzki K-24

Spektrofotometry: Specord M-40 (Carl Zeiss), HP 8453E Spectroscopy System (Hewlett Packard)

Hmotnostní spektrometry: MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics), FTICR Apex IV (Bruker Daltonics)

Ostatní: Aparatura na SDS elektroforézu (Hoeffler SE 260), fotolyzér Oriol (z komponent: zdroj Oriol 68806 basic power supply, výbojka vlnové délky 254 nm, UV zrcadlo, závěrka Oriol 71445 shutter power supply, chladič systém), homogenizátor podle Pottera a Elvehjema, kolona MicroTrap C18 (Michrom Bioresources), peristaltická pumpa (Pump PP-05), sběrače frakcí (Fraction Collector FCC-60, BioLogic BioFrac Fraction Collector), pH-metr (ATI Orion370), sonikační lázně (P-Lab, Ultrasonic compact cleaner), termostat (Eppendorf), Thermomixer Comfort (Eppendorf), ultrafiltrační cela (Amicon), vakuový rotační koncentrátor (SpeedVac DNA 110, Savant)

4.2. Metody

4.2.1. Analytická stanovení

4.2.1.1. Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny

Některé aminokyselinové zbytky redukují měďnaté ionty přidané do roztoku ve formě vinanu měďnatého na ionty měďné. Kyselina bicinchoninová (BCA) tvoří v zásaditém prostředí s měďnými ionty fialově zbarvené komplexy. Intenzitu zbarvení, která je přímo úměrná koncentraci bílkoviny, lze stanovit spektrofotometricky, měřením absorbance při 562 nm. [36]

Stanovení koncentrace proteinu probíhalo dosazením absorbance do rovnice kalibrační přímky. Kalibrace byla získána lineární regresí ze dvou paralelních měření, při nichž byl jako standard použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentracích 0,1, 0,2 a 0,5 mg · ml⁻¹.

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno těsně před samotným stanovením smísením 49 dílů roztoku A (v/v), 1 % BCA v 50 dílech (w/v) a 1 dílu roztoku B (v/v).

Do mikroskopavek dle Eppendorfa bylo pipetováno 20 µl H₂O (slepý vzorek), roztoku standardu nebo stanovovaného vzorku a bylo přidáno 980 µl činidla pro stanovení koncentrace proteinu. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 60 °C, po zchlazení centrifugovány a na spektrofotometru Specord M-40 byla měřena absorbance při 562 nm proti H₂O. Po odečtení absorbance slepého vzorku od naměřených hodnot absorbancí dvou paralelních měření byly získány hodnoty pro výpočet koncentrace.

4.2.1.2. Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentraci P450 je možno stanovit metodou diferenční spektrometrie, jelikož jeho redukovaná forma s navázaným oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum při 450 nm.

Ve zkumavce bylo 40 µl vzorku doplněno pufrem pro stanovení cytochromu P450 na objem 1,6 ml, byl přidán pevný dithioničitan sodný (přibližně 5 mg) a roztok byl promíchán. Do dvou křemenných kyvet bylo napipetováno po 0,8 ml roztoku, z nichž jeden byl sycen přibližně 45 vteřin pomalým proudem plynného oxidu uhelnatého. Následně bylo na spektrofotometru Specord M-40 proměřeno diferenční absorpční

spektrum v rozmezí vlnových délek 350 až 500 nm a koncentrace P450 byla vypočtena ze vzorce

$$c_{\text{CYP}} = (A_{450} - A_{490}) \cdot \varepsilon_{\text{CYP}}^{-1} \cdot l^{-1} \cdot \text{ředění};$$

c_{CYP} molární koncentrace P450 ($\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$),

A_{450}absorbance při 450 nm (absorpční maximum),

A_{490}absorbance při 490 nm (absorpční minimum),

ε_{CYP}molární absorpční koeficient cytochromu P450 při vlnové délce 450 nm ($0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ [11]),

l optická dráha kyvety (1 cm),

ředěníhodnota v tomto konkrétním případě je rovna 40.

4.2.1.3. Stanovení aktivity NADPH: cytochrom P450 reduktasy

Aktivitu a specifickou aktivitu CPR lze stanovit nepřímo měřením rychlosti redukce cyt c. Jeho koncentraci je možné vypočíst na základě známého molárního absorpčního koeficientu při vlnové délce 550 nm.

V kyvetě bylo smícháno 960 μl pufru pro stanovení CPR s 10 μl cyt c ($25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a byla změřena absorbance pozadí při 550 nm. Poté bylo přidáno 10 μl vzorku ředěného tak, aby směrnice byla lineární. Reakce byla startována přidávkem 20 μl $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NADPH, kyveta byla rychle zamíchána a po dobu 1 minuty byla měřena změna absorbance při 550 nm (spektrofotometr Specord M-40). Aktivita CPR byla vypočtena ze vzorce

$$a_{\text{CPR}} = \Delta A_{550 \text{ nm}} \cdot l^{-1} \cdot \varepsilon_{550 \text{ nm}}^{-1} \cdot t^{-1} [\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}];$$

specifická aktivita CPR byla vypočtena ze vzorce

$$a_{\text{sp,CPR}} = \Delta A_{550 \text{ nm}} \cdot l^{-1} \cdot \varepsilon_{550 \text{ nm}}^{-1} \cdot t^{-1} \cdot c_b^{-1} [\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}];$$

$\Delta A_{550 \text{ nm}}$ změna absorbance při 550 nm za dobu t ,

l optická dráha kyvety (1 cm),

$\varepsilon_{550 \text{ nm}}$molární absorpční koeficient při 550 nm

($\varepsilon_{550 \text{ nm}} = 21 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ [37]),

t doba měření (1 min),

c_b koncentrace bílkoviny ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

4.2.1.4. Stanovení koncentrace fotoafinitní sondy

Koncentraci N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylaminu je možno stanovit metodou UV-VIS spektrometrie, na základě známého molárního absorpčního koeficientu při vlnové délce 250 nm.

V křemenné kyvetě byl smíchán 1 ml methanolu s 20 μ l roztoku fotoafinitní sondy a proti slepému vzorku obsahujícímu methanol bylo na jednopaprskovém spektrofotometru (8453E Spectroscopy System, Hewlett Packard) změřeno absorpční spektrum v rozmezí vlnových délek 200 nm až 400 nm. Koncentrace fotoafinitní sondy byla vypočtena ze vzorce

$$c_{\text{SONDA}} = [(A_{250} - A_{350}) \cdot \epsilon_{\text{SONDA}}^{-1} \cdot l] \cdot \text{ředění};$$

c_{SONDA} molární koncentrace fotoafinitní sondy ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$),

A_{250}absorbance při 250 nm (absorpční maximum),

A_{350}absorbance při 350 nm (základní linie),

ϵ_{SONDA}molární absorpční koeficient fotoafinitní sondy při vlnové délce 250 nm ($26,4 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ [28]),

l optická dráha kyvety (1 cm)

ředěníhodnota v tomto konkrétním případě je 51.

4.2.2. Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je metoda sloužící k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti a elektroforetické pohyblivosti. Metoda byla provedena podle Laemliho [38], za použití 4 % (w/v) zaostřovacího a 8 %, 10 % nebo 12 % (w/v) separačního gelu.

Bylo smícháno 20 μ l vhodně zředěných vzorků s 5 μ l pětkrát koncentrovaného vzorkového pufru, výsledný roztok byl 5 minut povařen a po centrifugaci (minicentrifuga Eppendorf; 13500 rpm) nanesen na gel. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 80 V při průchodu zaostřovacím a 110 V při průchodu separačním gelem. Limitní hodnota proudu byla v obou případech 25 mA na sklo.

Vzorky byly barveny v barvicí lázni roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 po dobu 45 minut a odbarveny v odbarvovacím roztoku. Odbarvené gely byly uchovávány v 1 % roztoku kyseliny octové (v/v) při 4 °C.

4.2.3. Izolace cytochromu P450 2B4, cytochromu b₅ a NADPH: cytochrom P450 reduktasy

Purifikace probíhala postupně izolací mikrosomální frakce diferenční centrifugací a následným přečištěním CYP 2B4, CPR a cyt b₅ pomocí ionexové (DEAE-Sepharosa), adsorpční (hydroxylapatit) a afinitní (2',5'-ADP-Sepharosa) chromatografie.

Finální preparáty po odstranění detergentů byly zmraženy a uskladněny v malých alikvotech v kapalném dusíku.

4.2.3.1. Premedikace pokusného zvířete

Samec králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*; New Zealand White, Velaz) o hmotnosti 2,5 kg byl po dobu dvou týdnů chován v kleci při teplotě 18 – 22 °C. Byl krmen peletovou stravou a měl volný přístup k napajedlu. Od čtvrtého dne byl premedikován 0,1 % roztokem fenobarbitalu ve vodě (w/v), aby došlo k indukci CYP 2B4. Usmrcení předcházelo 18 hodin trvajícím hladověním za účelem snížení hladiny glykogenu.

4.2.3.2. Izolace mikrosomální frakce a její solubilizace

Fenobarbitalem premedikovaný králik domácí byl narkotizován oxidem uhličitým a usmrčen zlomením vazů. Mikrosomální frakce byla izolována z homogenizovaných jater diferenční centrifugací. [39]

K solubilizaci získané mikrosomální frakce byly použity detergenty cholát sodný a Emulgen E-911. Ty se vážou na hydrofobní části proteinů a udržují je v rozpustné formě. Pro zvýšení rozpustnosti CPR byl také do roztoku přidán protaminsulfát, který má vazebnou aktivitu k RNA. Aby nedocházelo k degradaci proteinů působením proteas přítomných v mikrosomální frakci, byla do roztoku přidána směs inhibitorů Complete Protease Inhibitor (Roche).

4.2.3.3. Chromatografické metody

DEAE-Sepharosa CL-6B (pH 7,5 a pH 8,1)

Anexová kolona slouží k zachycení záporně nabitých molekul. Těmi jsou látky s pI nižším než je pH kolony, tedy CPR (pI 5,38) a cyt b₅ (pI 5,16). CYP 2B4 (pI 9,01) se na koloně nezachycuje. [40] Z kolony lze zachycené látky uvolnit gradientem iontové síly.

Hydroxylapatit (pH 7,5)

Adsorpční kolona váže proteiny na základě elektrostatických interakcí a slouží k jejich vzájemnému oddělení. Navázané proteiny – včetně P450 – lze z kolony uvolnit gradientem iontové síly. Chromatografií či případnou rechromatografií dochází ke zvýšení čistoty preparátu.

Kapacita hydroxylapatitu je 40 nmol proteinu . (ml nosiče)⁻¹.

2',5'-ADP-Sepharosa 4B (pH 7,0)

Afinitní kolona silně interaguje s NADP⁺ dependentními dehydrogenasami, je tedy vhodná k zachycení CPR. Zachycené látky lze z kolony uvolnit puřem o nízké koncentraci NADP⁺.

4.2.3.4. Odstranění detergentu pomocí silikagelu

Při purifikaci použité detergenty (cholát sodný a Emulgen E-911) nejsou vhodné pro *in vitro* rekonstituované systémy, a cholát sodný pro síťovací reakce s EDC, jelikož obsahuje karboxylovou skupinu. Detergenty byly proto odstraněny pomocí adsorpce na silikagel. Optimalizace byla provedena podle disertační práce doc. P. Hodka, PhD. [41]

4.2.4. Mapování aktivního centra cytochromu P450 2B4

Pro ověření a zpřesnění modelu CYP 2B4 byla využita fotoafinitní sonda - derivát benzfetaminu obsahující fotolabilní skupinu. Nejprve byl charakterizován způsob vazby sondy metodou diferenční spektrometrie a následně byla provedena fotolýza sondy s cílem označit aminokyselinové zbytky v definované vzdálenosti od atomu železa hemu v aktivním centru. Identifikaci označených aminokyselin byla provedena pomocí MS.

4.2.4.1. Purifikace a kontrola čistoty fotoafinitní sondy

Roztok N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylaminu byl přečištěn metodou chromatografie na tenké vrstvě. Jako stacionární fáze byla použita hliněná destička pokrytá silikagelem s fluorescenčním indikátorem.

Destička byla třikrát promyta methanolem, vysušena, na pozici vzdálené 1 cm od sebe bylo nanášeno po 4 nmol fotoafinitní sondy. Použitím směsi methanolu a ethylacetátu v poměru 3:2 (v/v) jako mobilní fáze došlo ve vyvíjecí komoře k oddělení fotoafinitivní sondy od nečistot.

Na odstřížených krajních pozicích byla UV zářením o vlnové délce 254 nm vizualizována majoritní zóna a byl stanoven její retenční koeficient. Ze zbylé části destičky byl vystřížen horizontální proužek odpovídající zjištěnému retenčnímu faktoru. Proužek byl otočen do vertikální polohy a fotoafinitní sonda byla zakoncentrována na jeho horním konci, a to třikrát provedenou chromatografií zakončenou vysušením proužku proudem vzduchu. Jako mobilní fáze byl použit methanol.

Silikagel na horním konci proužku byl špachtlí seškrábán na vrstvu skelné vaty, která sloužila jako filtr. Fotoafinitní sonda z něj byla poté vymyta methanolem a byla zakoncentrována odpařením rozpouštědla proudem dusíku.

Čistota fotoafinitní sondy byla ověřena tandemovou hmotnostní spektrometrií. Experimenty MS a MSⁿ analýzy byly provedeny na hmotnostním spektrometru LCQ^{DECA} (ThermoQuest, San Jose, CA), který používá jako analyzátor iontovou past a ionizačním zdrojem je statický nanoelektrosprej. Napětí na elektrospreji bylo nastaveno na 1,2 kV a na vstupní čočce na 30 V. Teplota vyhřívané kapiláry byla 175 °C a napětí 10 V. Hmotnostní spektrum v pozitivní modu bylo měřeno v rozsahu hodnot 150-2000 *m/z*. Pro fragmentaci kolizně indukovanou disociací a následné MSⁿ experimenty byla použita kolizní energie v rozsahu 25-40 jednotek, aktivační čas 30 ms a okno pro výběr prekurzoru v rozsahu 3 hmotnostních jednotek. Manuální interpretace dat byla provedena s ohledem na popsaná fragmentační pravidla.

Vysušený preparát přečištěný chromatografií na tenké vrstvě byl rekonstituován sonikací v 50% ACN, 0,5% kyselině octové (v/v) před vlastní analýzou hmotnostní spektrometrií.

4.2.4.2. Studium interakce cytochromu P450 2B4 s fotoafinitní sondou metodou diferenční spektrometrie

Za různých experimentálních podmínek byla stanovena spektrální disociační konstanta fotoafinitní sondy. Byla charakterizována interakce sondy s purifikovaným CYP 2B4 a s fenobarbitalem indukovanou komplexní králičí mikrosomální frakcí.

Mikrosomy byly naředěny 100 mmol . dm⁻³ KH₂PO₄/KOH puforem (pH 7,4) na výslednou koncentraci 2 μmol . dm⁻³, CYP 2B4 byl naředěn 100 mmol . dm⁻³ Tris/HCl puforem (pH 7,4) na výslednou koncentraci 1 μmol . dm⁻³. Roztok byl rozdělen do 2 kyvet, po naměření základní linie bylo do vzorkové kyvety přidáváno rostoucí množství diamantanu, resp. fotoafinitní sondy, do referentní kyvety bylo přidáváno stejné množství

příslušného rozpouštědla a spektrofotometrem Specord M-40 byla měřena diferenční spektra v rozmezí vlnových délek 350 nm až 500 nm. Přidávání bylo ukončeno, jakmile přestalo docházet ke změnám diferenčního spektra.

Experimentální data koncentrační závislosti rozdílu absorbčního maxima a minima diferenčního spektra byla analyzována nelineární regresí programem Origin 8.0. Spektrální disociační konstanta byla stanovena z rovnice regresní křivky

$$\Delta A = \Delta A_{MAX} \cdot c \cdot (K_{SP} + c)^{-1};$$

ΔA rozdíl absorbčního maxima a minima,

ΔA_{MAX} maximální rozdíl absorbčního maxima a minima,

c koncentrace fotoafinitní sondy, resp. diamantanu ($\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$),

K_{SP} spektrální disociační konstanta ($\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Pro zjištění, zda se sonda váže i v přítomnosti diamantanu, bylo měření zopakováno s roztokem mikrosomů i CYP 2B4 saturovanými tímto substrátem.

4.2.4.3. Studium interakce cytochromu P450 2B4 s fotoafinitní sondou metodou fotoafinitního značení

Fotolýza byla prováděna fotolýzérem Oriol v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm naplněné methanolem, v níž byla ponořena křemenná kapilára obsahující vzorek. Vnější průměr kapiláry byl 4 mm.

Před vlastním značením byla testována funkčnost fotolýzéro spektrofotometrickým sledováním fotolýzy fenylazidu. Spektrofotometrem HP 8453E Spectroscopy System bylo v křemenné kyvetě v rozmezí vlnových délek 200 až 400 nm proměřeno absorbční spektrum roztoku fenylazidu. Měření bylo zopakováno po fotolýze roztoku trvajícím 2 a 16 sekund a byl sledován úbytek absorbčního maxima při vlnové délce 250 nm.

Dále byl zjišťován vliv přítomnosti DLPC v reakční směsi na délku fotolýzy. V křemenné kapiláře ponořené v křemenné kyvetě naplněné $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris/HCl pufrém (pH 7,2) nebo naplněné $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris/HCl pufrém (pH 7,2) s $300 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DLPC byla provedena fotolýza roztoků fotoafinitní sondy. Absorbční spektra roztoků po 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 a 32 sekundách fotolýzy byla porovnána.

Fotoafinitní značení probíhalo v $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris/HCl pufru (pH 7,2) a výsledná koncentrace CYP 2B4 v reakční směsi byla $4 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Celkem byly provedeny čtyři fotolýzy fotoafinitní sondy, a to v přítomnosti a nepřítomnosti DLPC (vzorek A a C), s kontrolami v přítomnosti diamantanu (vzorek B a D). Reakční podmínky jsou shrnuty

v Tabulce 1. Výsledné koncentrace v reakční směsi byly $25 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fotoafinitní sonda, $300 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DLPC a $6 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ diamantan.

Tabulka 1: Reakční podmínky fotoafinitního značení

	Fotoafinitní sonda	DLPC	Diamantan
Vzorek A	+	-	-
Vzorek B	+	-	+
Vzorek C	+	+	-
Vzorek D	+	+	+

+/- – přítomnost/nepřítomnost složky v reakční směsi

Po 15minutové inkubaci při laboratorní teplotě byl vzorek fotolyzován po dobu 35 sekund. Ihned po skončení fotolýzy byl k odstranění zbylých volných radikálů do roztoku přidán glutathion do výsledné koncentrace $12,5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorky byly pomocí SDS-PAGE odděleny od degradačních produktů fotolýzy a nečistot, modifikovány a analyzovány metodou MS pomocí LC-FTICR Apex IV (Bruker Daltonics) RNDr. Petrem Novákem, PhD. (Mikrobiologický ústav Akademie Věd, v.v.i., ČR).

4.2.5. Studium interakce cytochromu P450 2B4 s cytochromem b₅

4.2.5.1. Chemické zesíťení

Přenos elektronů z cyt b₅ na CYP 2B4 je doprovázen konformačními změnami interagujících partnerů. Aminokyselinové zbytky, které se při interakci přiblíží, mohou být v této poloze zafixovány kovalentní vazbou díky přidanému síťovacímu činidlu EDC. Tato nově vytvořená spojení, ať už v rámci jedné molekuly (intramolekulární) nebo mezi oběma cytochromy (intermolekulární), mohou být identifikována hmotnostní spektrometrií.

Z roztoku DLPC v chloroformu bylo odpařeno rozpouštědlo ve vakuovém rotačním koncentrátoru. Poté byl přidán pyridinový pufr (pH 6,0) a po 5 minut trvající sonikaci byly přidány preparáty purifikovaných proteinů o výsledné koncentraci $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Aby došlo k ukotvení CYP 2B4 a cyt b₅ do lipidové membrány, byl vzorek 5 minut sonikován. Nakonec bylo ke vzorku přidáno EDC o výsledné koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jako síťovací činidlo a reakční směs byla 16 hodin inkubována za laboratorní teploty. Vzorky byly separovány pomocí 10 % SDS-PAGE, barveny CBB R-250 a po odbarvení uchovány 1 % kyselině octové (v/v) při 4 °C.

Vybrané proteinové zóny obsahující intermolekulární vazby mezi CYP 2B4 a cyt b₅ byly dále modifikovány acetylací cysteinových zbytků, proteolyticky štěpeny a analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie.

4.2.5.2. Modifikace proteinů a jejich proteolýza

Z polyakrylamidových gelů byly vyříznuty vybrané proteinové zóny a nakrájeny na asi 1 mm³ kostky. Ty byly 5 minut sonikovány v 50 mmol . dm⁻³ ethylmorfolinu (pH 8,1), 50 % ACN (v/v). Po sonikaci byl supernatant odebrán a postup byl opakován, dokud nedošlo k úplnému odbarvení gelu.

Následovala redukce případných disulfidových vazeb a rozvolnění struktury proteinů modifikací cysteinových aminokyselinových zbytků. Ke vzorkům byl přidán 30 mmol . dm⁻³ TCEP (čínidlo k redukci disulfidových vazeb) ve 100 mmol . dm⁻³ ethylmorfolinovém pufru a vzorky byly 20 minut inkubovány v termostatu při teplotě 70 °C. Poté byly promyty ACN, vodou a ACN, převrstveny 30 mmol . dm⁻³ roztokem jodacetamidu (IAA; čínidlo k acetylaci cysteinových zbytků) ve 100 mmol . dm⁻³ ethylmorfolinovém pufru a 60 minut inkubovány za laboratorní teploty v temnu.

Poté byly vzorky sedmkrát promyty střídavě ACN a vodou, a v 50 % ACN (v/v) byly 5 minut sonikovány. Po odstranění supernatantu byly vzorky 10 minut sušeny ve vakuovém rotačním koncentrátoru (SpeedVac), bylo k nim přidáno 30 μl štěpícího ethylmorfolinového pufru, 1 μl roztoku trypsinu o koncentraci 3,3 ng . μl⁻¹ a byly inkubovány a protřepávány nejméně 20 hodin (37 °C, 650 rpm).

4.2.5.3. Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii

Ke vzorku byl přidán ACN a TFA do finální koncentrace v roztoku 30 % ACN, 0,1 % TFA (v/v), vzorek byl 15 minut sonikován a extrakt byl oddělen. Zbylý vzorek byl z gelu reextrahován přidáním 50 μl roztoku 50 % ACN, 0,1 % TFA (v/v). Extrakt byl po sonikaci spojen s předchozím.

Spojené extrakty byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru (SpeedVac), odparek rozpuštěn v 50 μl 0,1 % TFA (v/v) a vzorek 5 minut sonikován. Poté byl přečištěn na kolonce peptide MicroTrap C18 (Michrom Bioresources) ekvilibrované 0,1 % roztokem TFA (v/v). Kolona váže peptidy, slouží k odsolování a může být použita i k částečné separaci. [42]

Po nanesení vzorku na kolonku z ní byly 300 μl 0,1 % TFA (v/v) vymyty sole a zachycené peptidy byly uvolněny buď přímo – 80 % ACN (v/v), 0,1 % TFA (v/v) – nebo

krokovým gradientem ACN – vždy použito 100 μl 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 40 % a 80 % ACN (v/v), 0,1 % TFA (v/v) a frakce jímány do rozdílných mikrozkušavek. Vzorčky byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru (SpeedVac).

4.2.5.4. Hmotnostní spektrometrie

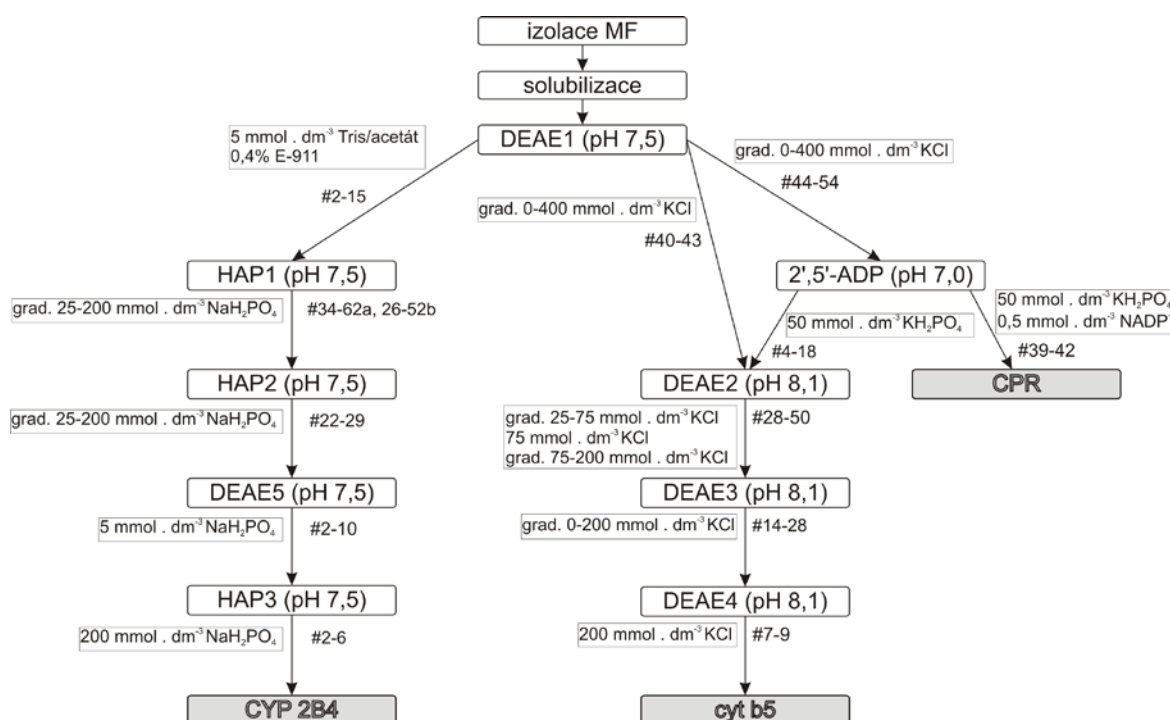
K vysušeným vzorkům bylo přidáno po 2 μl ACN, byly 20 minut sonikovány, centrifugovány na minicentrifuze Eppendorf (15 sekund, 13500 rpm), po přidavku 18 μl 0,1 % TFA (v/v) byla sonikace zopakována a 0,4 μl tohoto roztoku bylo nanášeno na terčík MALDI-TOF. Po odpaření rozpouštědla byly vzorky převrstveny 0,4 μl matrice (5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ kyseliny α -kyano-4-hydroxybenzoylové v 50 % ACN (v/v), 0,1 % TFA (v/v)) a analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics) v pozitivním reflektrotonovém modu v rozsahu hodnot m/z 700 – 4000.

Po 5 μl vzorků bylo také analyzováno pomocí LC-FTICR Apex IV (Bruker Daltonics) RNDr. Petrem Novákem, PhD. (Mikrobiologický ústav Akademie Věd, v.v.i., ČR). Získané výsledky byly s pomocí Mgr. Kateřiny Pavláskové (Mikrobiologický ústav Akademie Věd, v.v.i., ČR) vyhodnoceny použitím programů Data Analysis a LC-MS Mass Extractor.

5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace cytochromu P450 2B4, cytochromu b₅ a NADPH: cytochrom P450 reduktasy

Purifikace proteinů probíhala podle schématu na Obr. 6. Postupně došlo k izolaci jaterní mikrosomální frakce pokusného zvířete diferenční centrifugací, solubilizací a přečištění proteinů pomocí ionexové (DEAE-Sepharosa), adsorpční (hydroxylapatit) a afinitní (2',5'-ADP-Sepharosa) chromatografie a odstranění detergentu z finálního preparátu pomocí silikagelu. Celý izolační proces probíhal v chlazené místnosti při 6 °C.



Obr. 6: Schéma průběhu izolace CYP, CPR a cyt b₅

MF – mikrosomální frakce, DEAE – kolona DEAE-Sepharosa CL-6B, HAP – kolona hydroxylapatitu, 2',5'-ADP – kolona 2',5'-ADP-Sepharosa 4B, grad. – gradient

5.1.1. Izolace mikrosomální frakce

Fenobarbitalem premedikovaný králik domácí byl narkotizován a usmrcen. Jeho jaterní tkáň o hmotnosti 118 g byla opláchnuta ve 100 ml pufru PR1 a na ledu ve 350 ml pufru PR1 rozrušena homogenizátorem podle Pottera a Elvehjema.

Homogenát byl 10 minut centrifugován při 600 × g na centrifuze Janetzki K-23 (výkyvný rotor 4 × 70 ml, 2000 rpm) chlazené na 4 °C. Pro zvýšení výtěžku byl sediment rehomogenizován v pufru PR1 a za předchozích podmínek znovu centrifugován. Spojené

supernatanty po obou centrifugacích byly dále centrifugovány 20 minut při $15000 \times g$ na centrifuze Janetzki K-24 (úhlový rotor 6×35 ml, 13000 rpm) chlazené na 4°C .

Získaný supernatant byl dále centrifugován 65 minut při $105000 \times g$ na ultracentrifuze Beckman Optima LE 80K (úhlový rotor Ti45 6×60 ml, 45000 rpm) chlazené na 4°C . Supernatant byl po centrifugaci odstraněn, sediment byl rehomogenizován ve 200 ml pufru PR2 a znovu centrifugován za předchozích podmínek. Supernatant byl opět odstraněn a sediment resuspendován v 50 ml pufru PR3.

Ze zhomogenizované tkáně bylo diferenční centrifugací připraveno 62 ml finální mikrosomální frakce o koncentraci $22 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ P450 (1400 nmol) a obsahu bílkoviny $42 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Mikrosomální frakce byla před provedením solubilizace uskladněna v kapalném dusíku.

5.1.2. Solubilizace

Izolované proteiny obsahují hydrofobní oblasti sloužící k interakci s lipidovou membránou. Přidání detergentů zvýší jejich rozpustnost v polárních rozpouštědlech.

Mikrosomální frakce byla rozmrazena, naředěna pufrům PR4 na konečnou koncentraci proteinu $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a zhomogenizována. Na ledu a za stálého míchání byly k 270 ml naředěné mikrosomální frakce přidány 4 tablety Complete Protease Inhibitoru rozpuštěné v 5 ml pufru PR4, po kapkách 4 ml roztoku protaminsulfátu ($15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a pod dusíkovou atmosférou 19 ml 10 % cholátu sodného (v/v) a 19 ml 10 % Emulgenu E-911 (w/v). Nakonec byly po kapkách přidány další 4 ml roztoku protaminsulfátu.

Roztok byl ještě 20 minut míchán a poté centrifugován 60 minut při $105000 \times g$ na ultracentrifuze Beckman Optima LE 80K (úhlový rotor Ti45 6×60 ml, 45000 rpm). Supernatant o objemu 360 ml byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5, sloužící k oddělení P450 od CPR a cyt b_5 .

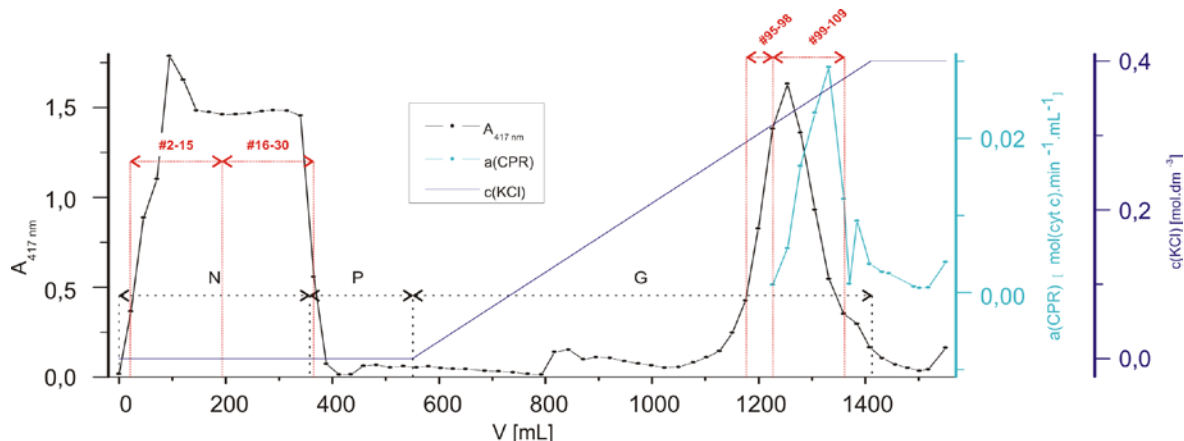
Solubilizace proteinů proběhla úspěšně. Koncentrace P450 v supernatantu po solubilizaci byla $8 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (celkově 3000 nmol CYP), došlo tedy k nárůstu jeho celkového látkového množství.

5.1.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5

Na ekvilibrovanou kolonu ($2,5 \times 30$ cm, 150 ml, pH 7,5) pufrům PR5 byl nanesen supernatant po solubilizaci a pro eluci P450 byla kolona promývána pufrům PR5 s přísadkou Emulgenu E-911 o celkové koncentraci 0,4 % (w/v). Ve sbíraných frakcích o celkovém objemu přibližně 18 ml byla měřena absorbance při 417 nm (spektrofotometr

Specord M-40, Carl Zeiss). Promývání bylo ukončeno po vymytí veškerého P450 z kolony doprovázené poklesem absorbance při 417 nm na počáteční hodnotu.

Proteiny, které na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1) zůstaly navázány (mj. CPR a cyt b₅), byly eluovány lineárním gradientem 2×400 ml $0 - 0,4$ mol \cdot dm⁻³ KCl v pufru PR5. Objem sbíraných frakcí byl asi 10 ml a byla v nich proměřována absorbance při 417 nm a aktivita CPR. Průběh chromatografie je patrný z grafu na Obr. 7.

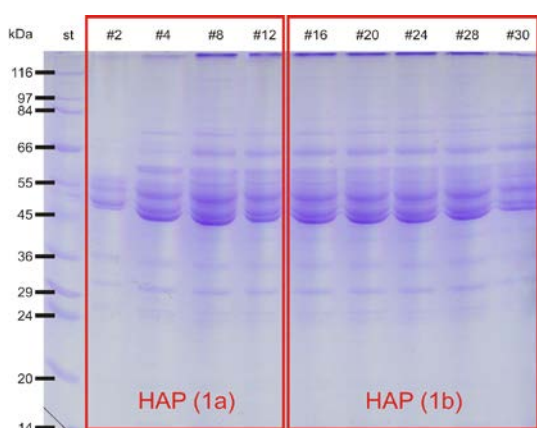


Obr. 7: Eluční profil chromatografie supernatantu po solubilizaci MF na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5

kolona $2,5 \times 30$ cm, 150 ml; ekvilibrační pufr PR5; promývací pufr PR5 s 0,4 % (w/v) Emulgenem E-911, eluce gradientem $0 - 400$ mmol \cdot dm⁻³ KCl v pufru PR5

$A_{417 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; #2-30, #95-109 – spojené frakce; $a(\text{CPR})$ – aktivita CPR; N – nanášení; P – promývání; G – gradient KCl; MF – mikrosomální frakce

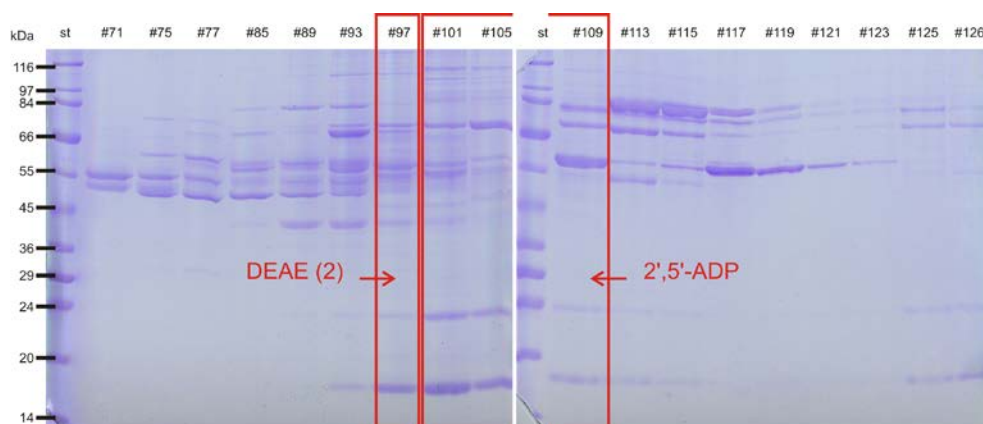
Byla provedena SDS-PAGE frakcí v oblastech maxim absorbance při 417 nm a frakcí v oblasti aktivity CPR (Obr. 8, Obr. 9 na straně 37).



Obr. 8: SDS-PAGE frakcí obsahujících P450 nezachycených na DEAE-Sepharose CL-6B (1), pH 7,5

st – Sigma marker; #2-30 – čísla frakcí; HAP (1a), HAP (1b) – frakce nanášené na kolonu hydroxylapatitu (1a), resp. (1b)

10 % PAGE, barvení: CBB R-250



Obr. 9: SDS-PAGE frakcí eluovaných z DEAE-Sepharosy CL-6B (1) gradientem KCl, pH 7,5

st – Sigma marker; #69-126 – čísla frakcí; DEAE (2), 2',5'-ADP – frakce nanášené na kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (2), resp. 2',5'-ADP-Sepharosy 4B
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Elektroforéza jednotlivých frakcí nanášecího píku ukázala přibližně stejné množství P450 a kontaminací ve frakcích 2 – 30, proto byly všechny dále purifikovány. Pro nízkou kapacitu kolon hydroxylapatitu (řádově 1000 nmol proteinu) byly spojeny frakce 2 – 15 (1200 nmol P450) a frakce 16 – 30 (1500 nmol P450). Po zahuštění na 50 ml (membrána Amicon PM-30, Millipore) byly spojené frakce při 6 °C přes noc dialyzovány proti 2 × 1000 ml pufru PR5 a naneseny na ekvilibrované kolony HAP (1a) a (1b), pH 7,5 s cílem oddělit CYP 2B4 od CYP 1A2 a dalších kontaminant.

V gradientem soli na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 eluovaných frakcích 99 – 126 byla naměřena aktivita CPR a zároveň se ve frakcích 101 – 126 nacházela zóna odpovídající její molekulové hmotnosti (78 kDa). Ve frakcích 113 – 126 byla podle SDS-PAGE přítomna také tetrahydrofolát reduktasa o molekulové hmotnosti 95 kDa (ústní sdělení školitele RNDr. Miroslava Šulce, PhD.), a to ve větším množství než CPR. Jelikož není jejich vzájemné oddělení možné na afinitní koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B [43], frakce obsahující obě reduktasy nebyly, i za cenu velké ztráty celkové aktivity CPR, dále při purifikaci využívány. Spojeny byly frakce 99 – 109 obsahující CPR, a také cyt b₅, k jehož úplnému oddělení na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1) nedošlo. K oddělení CPR od cyt b₅ a kontaminujících proteinů došlo při následné chromatografii na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B.

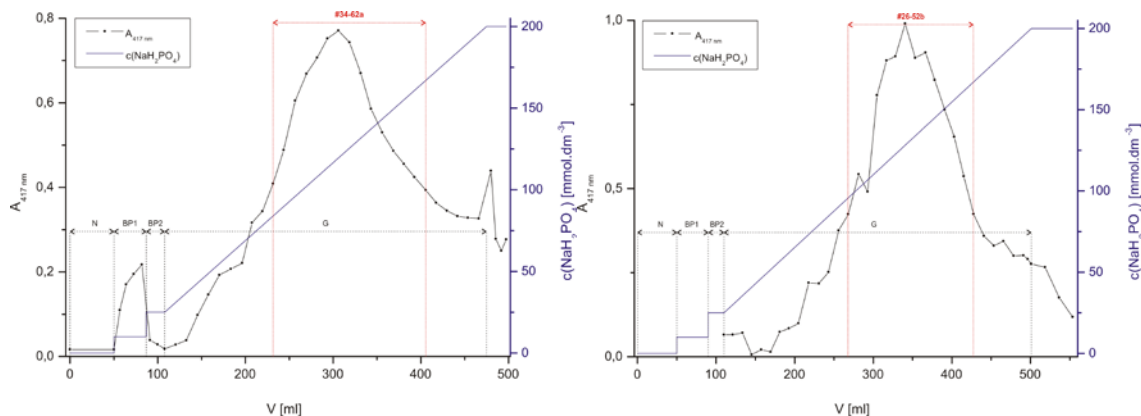
Kromě spojených frakcí CPR se podle SDS-PAGE cyt b₅ nacházel také ve frakcích 93 a 97 (zóna o molekulové hmotnosti 17 kDa). Absorbance při 417 nm u frakcí 95 – 98

přesáhla desetinu absorpčního maxima elučního píku a proto byly tyto frakce spojeny jako preparát cyt b₅ a dále purifikovány na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (2), pH 8,1.

5.1.4. Chromatografie na kolonách hydroxylapatitu (1) a (2), pH 7,5

Přečištění CYP 2B4 probíhalo na pufrém PR5 ekvilibrovaných kolonách HAP (1a) a HAP (1b) (1,8 × 15 cm, 25 ml nosiče, pH 7,5), na které byly naneseny spojené frakce 2 – 15, resp. 16 – 30 po chromatografii na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1).

Po nanesení vzorku byly kolony promyty 40 ml pufru BP1 a poté 20 ml pufru BP2. Jak je vidět z Obr. 10, mírným zvýšením iontové síly došlo k uvolnění podílu kontaminujících proteinů. Nanesený CYP byl z kolon eluován lineárním gradientem 2 × 250 ml BP2-BP3 (25 – 200 mmol · dm⁻³ NaH₂PO₄), rychlostí asi 10 ml za hodinu, byly jímány frakce o objemu 5 ml a spektrofotometricky byl při 417 nm proměřován eluční profil chromatografie (Obr. 10).

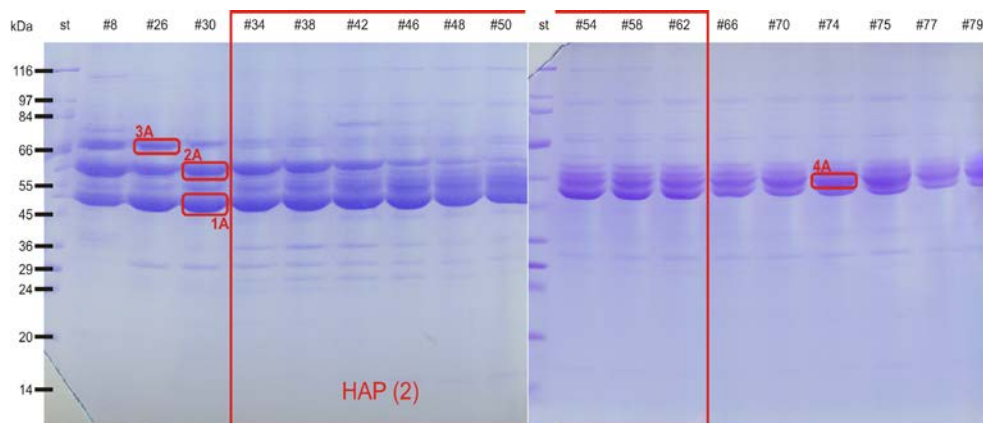


Obr. 10: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících P450 z nanášecího píku DEAE-Sepharosy CL-6B (1) na kolonách HAP (1a) (vlevo) a HAP (1b) (vpravo), pH 7,5

1,8 × 15 cm, 25 ml; ekvilibrační pufr PR5; promývací pufr BP1 a BP2; eluce gradientem 25 – 200 mmol · dm⁻³ NaH₂PO₄ (pufr BP2 – BP3)

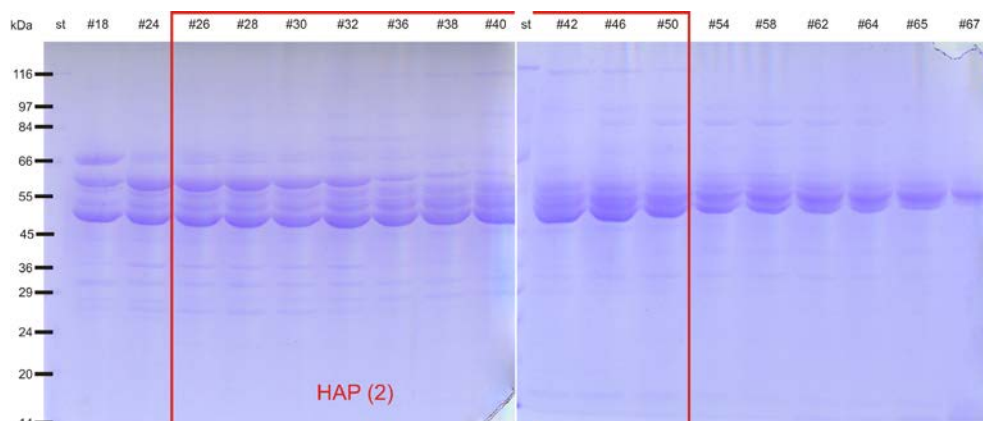
A_{417 nm} – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; #34-79a, #26-67b – spojené frakce P450 po chromatografii HAP (1); N – nanášení; BP1, BP2 – promývání pufrém BP1, resp. BP2; G – gradient NaH₂PO₄

Byla provedena SDS-PAGE (Obr. 11, Obr. 12 na straně 39) a označené zóny 1A – 4A byly analyzovány pomocí MS.



Obr. 11: SDS-PAGE frakcí obsahujících P450 eluovaných z kolony HAP (1a) gradientem NaH_2PO_4 , pH 7,5

st – Sigma marker; #8-79 – čísla frakcí; 1A-4A – zóny analyzované pomocí MS; HAP (2) – frakce nanášené na kolonu HAP (2)
10 % PAGE, barvení: CBB R-250



Obr. 12: SDS-PAGE frakcí obsahujících P450 eluovaných z kolony HAP (1b) gradientem NaH_2PO_4 , pH 7,5

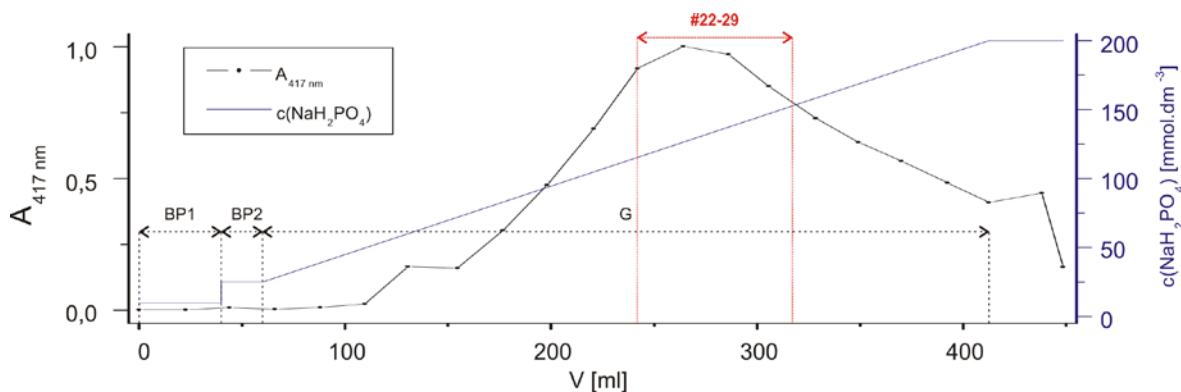
st – Sigma marker; #18-67 – čísla frakcí; HAP (2) – frakce nanášené na kolonu HAP (2)
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Hmotnostní spektrometrie určila jako majoritní proteiny CYP 2B4 (54 kDa, pI 9,4) a epoxid hydrolasu 1 (52 kDa, pI 7,3) v zóně 1A, karboxyl esterasy 1 (62 kDa, pI 6,2) v zóně 2A, sérový albumin (68 kDa, pI 5,8) v zóně 3A a CYP 1A2 (58 kDa, pI 9,5) v zóně 4A (viz Příloha 1 na straně 72).

Pro částečné odstranění sérového albuminu a karboxyl esterasy 1 z počátku eluce nebyly pro další purifikaci využity frakce eluované z kolon HAP (1), pH 7,5 dříve než frakce 34a, resp. 26b. Frakce 34 – 62a a 26 – 52b obsahovaly CYP 2B4 a byly proto spojeny a dále purifikovány. Následné frakce obsahovaly jako majoritní protein CYP 1A2 a dále proto využity nebyly.

Spojené frakce byly při 6 °C přes noc dialyzovány proti 2 × 1000 ml prufu PR7. K odstranění izoformy CYP 1A2 z preparátu došlo zopakováním chromatografie za předchozích podmínek na koloně HAP (2), pH 7,5.

Průběh chromatografie na koloně HAP (2) je patrný z grafu na Obr. 13.



Obr. 13: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících P450 z elučního píku HAP (1a) a (1b) na koloně HAP (2), pH 7,5

1,8 × 15 cm, 25 ml; ekvilibrační pufr PR5; promývací pufr BP1 a BP2; eluce gradientem 25 – 200 mmol · dm⁻³ NaH₂PO₄ (pufr BP2 – BP3)

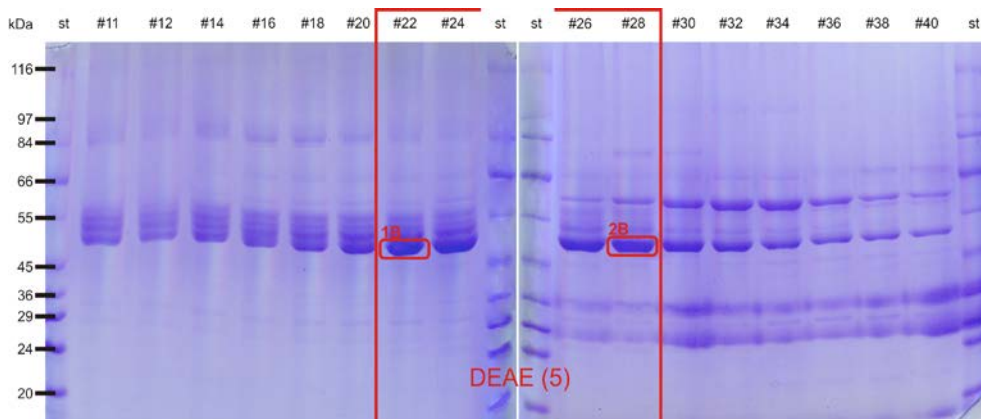
A_{417 nm} – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; #18-33 – spojené frakce chromatografie HAP (2); N – nanášení; BP1, BP2 – promývání pufr BP1, resp. BP2; G – gradient NaH₂PO₄

Provedená SDS-PAGE (Obr. 14 na straně 41) ukázala, že je podíl CYP 2B4 nejvyšší ve frakcích 22 – 28. Proto byly frakce spojeny, a to včetně frakce 29. Ta nebyla na SDS-PAGE nanášena, ale podíl CYP 2B4 v ní byl podle naměřené absorbance při 417 nm vyšší než v případě následující, nanášené frakce 30.

Před vlastním spojením frakcí byla pomocí MS provedena analýza označených zón (1B, 2B), která potvrdila, že se jedná o CYP 2B4 (viz Příloha 1 na straně 72).

Cílem chromatografie byla minimalizace obsahu CYP 1A2 v preparátu. Té bylo dosaženo, avšak cenou byla výrazná ztráta CYP 2B4, který se během chromatografie od této izoformy dostatečně neoddělil (frakce 16 – 20 na Obr. 14 na straně 41).

Spojené frakce byly při 6 °C přes noc dialyzovány proti 2 × 1000 ml prufu PR7 a za účelem oddělení zbylého sérového albuminu, karboxyl esterasy 1 a epoxid hydrolasy 1 byly nanášeny na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (5), pH 7,5. Zmíněné proteiny by vzhledem ke svým hodnotám pI měly zůstat navázány na koloně.



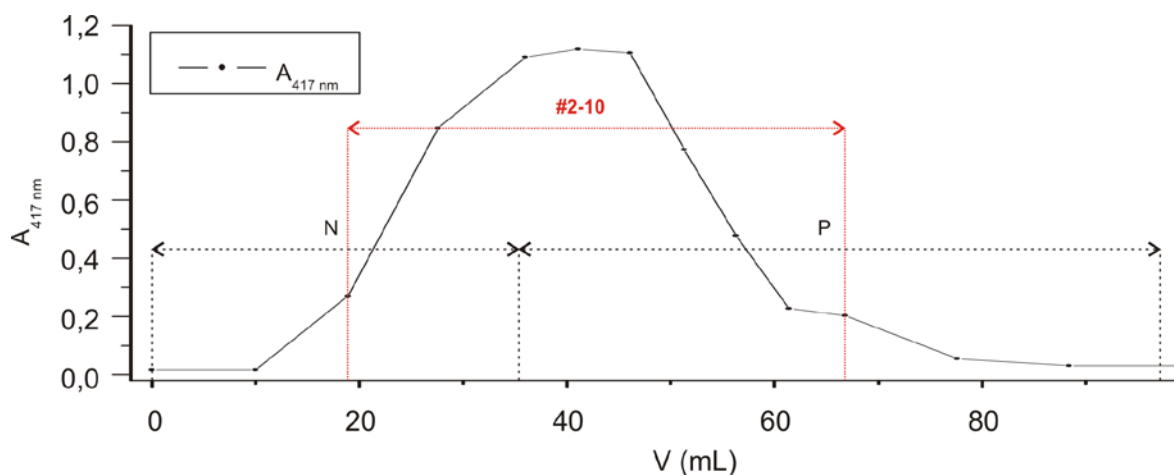
Obr. 14: SDS-PAGE frakcí obsahujících P450 eluovaných z kolony HAP (2) gradientem NaH_2PO_4 , pH 7,5

st – Sigma marker; #11-40 – čísla frakcí; 1B, 2B – zóny analyzované pomocí MS; DEAE (5) – frakce nanášené na kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (5)
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

5.1.5. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (5), pH 7,5

Na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 nedošlo, patrně z důvodu malé kapacity kolony, k úplnému oddělení epoxid hydrolasy 1, karboxyl esterasy 1 a sérového albuminu od P450. Za účelem jejich odstranění byla ionexová chromatografie zopakována.

Kolona DEAE-Sepharosy CL-6B (5) ($1,8 \times 15$ cm, 25 ml nosiče, pH 7,5) byla ekvilibrována pufrém PR7, byly na ni nanášeny spojené frakce po chromatografii na koloně HAP (2) obsahující CYP 2B4 a kolona byla promývána pufrém PR7 do poklesu absorbance při 417 nm. Průběh chromatografie je patrný z grafu na Obr. 15.

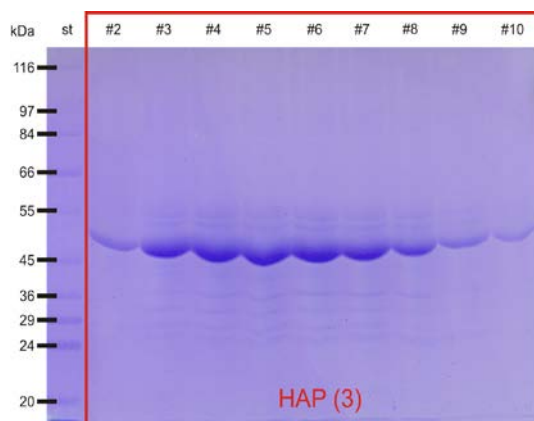


Obr. 15: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících P450 z elučního píku HAP (2) na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (5), pH 7,5

kolona $1,8 \times 15$ cm, 25 ml; ekvilibrační pufr PR7; promývací pufr PR7

$A_{417 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; #2-10 – spojené frakce; N – nanášení; P – promývání

Byla provedena SDS-PAGE frakcí z maxima absorbance při 417 nm (Obr. 16). Na koloně, podle očekávání, došlo k zachycení kontaminantů. Spojeny byly protečené frakce 2 – 10, jejichž absorbance při 417 nm dosahovala minimálně desetiny absorpčního maxima chromatografického píku. Ty byly následně zahuštěny na objem 40 ml, při 6 °C byly přes noc dialyzovány proti 2 × 1000 ml pufru PR8 a naneseny na ekvilibrovanou kolonu HAP (3), pH 7,5. Nečistoty již byly od CYP 2B4 odstraněny, chromatografie proto sloužila pouze ke snížení koncentrace detergentů v preparátu a k jeho zakoncentrování.



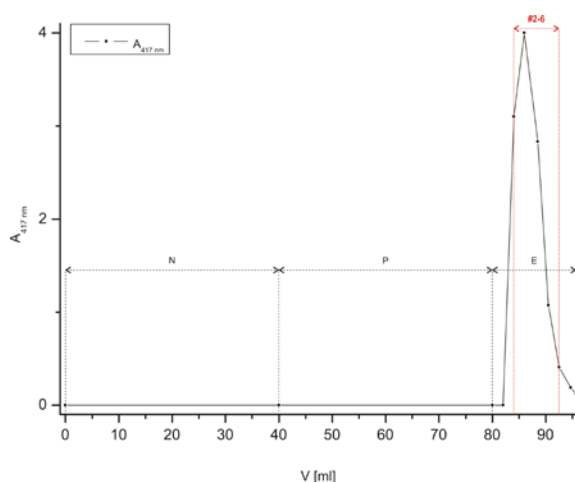
Obr. 16: SDS-PAGE frakcí obsahujících CYP 2B4 nezachycených na DEAE-Sepharose CL-6B (5), pH 7,5

st – Sigma marker; #2-10 – čísla frakcí; HAP (3) – frakce nanášené na kolonu HAP (3)
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

5.1.6. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (3), pH 7,5

Na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B přečištěný preparát CYP 2B4 byl nanesen na pufrém PR7 ekvilibrovanou kolonu HAP (3) (0,5 × 25 cm, 20 ml nosiče, pH 7,5). Kolona byla promyta pufrém BP4 a CYP 2B4 byl eluován pufrém BP5 rychlostí asi 10 ml za hodinu. Byly jímány frakce o objemu 2 ml a spektrofotometricky byl při 417 nm proměřován eluční profil chromatografie (Obr. 17 na straně 43).

Frakce 2 – 6 dosahující alespoň desetiny absorpčního maxima elučního píku byly spojeny a při 6 °C přes noc dialyzovány proti 2 × 1000 ml pufru PR8. Preparát CYP 2B4 byl chromatografií zakoncentrován na 10,5 ml, čímž v něm klesl podíl detergentů. Zbylé detergenty z něj byly odstraněny adsorbci na silikagel v posledním kroku purifikace.



Obr. 17: Eluční profil chromatografie frakcí CYP 2B4 nezachycených na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (5) na koloně HAP (3), pH 7,5

kolona $0,5 \times 25$ cm, 20 ml; ekvilibrační pufr PR7; promývací pufr PR7; eluční pufr BP5

$A_{417 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; #2-6 – spojené frakce; N – nanášení; P – promývání pufr BP4; E – eluce pufr BP5

5.1.7. Odstranění detergentu z preparátů cytochromu P450

Jako adsorbent k odstranění detergentů použitých při purifikaci CYP 2B4 sloužil silikagel. [24] V purifikovaném preparátu byla stanovena koncentrace $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ P450. Bylo odebráno 500 μl vzorku a přidán k němu silikagel o koncentraci $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ roztoku, tj. $4 \text{ mg} \cdot (\text{mg Emulgenu E-911})^{-1}$. Vzorek byl 3 hodiny promícháván při 6°C , odstředěn a v supernatantu byla stanovena koncentrace P450.

Pokud ve vzorku koncentrace P450 nepoklesla pod 80 % počáteční koncentrace, byl postup se stejným množstvím silikagelu zopakován se zbytkem preparátu a zároveň se supernatantem vzorku, ke kterému byl přidán další silikagel.

Jakmile poklesla ve vzorku koncentrace pod $8 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ P450, tj. 80 % počáteční koncentrace, pokus již nebyl opakován se zbytkem preparátu a supernatant vzorku byl přidán k preparátu.

Koncentrace detergentů ve finálním preparátu CYP 2B4 byla popsáním postupem výrazně snížena. Finální preparát byl po odstranění detergentů charakterizován metodou MS (viz Příloha 1 na straně 72) a poté uskladněn v malých alikvotech v kapalném dusíku. Po rozmrazení preparátu CYP 2B4 před použitím byla stanovena jeho koncentrace významně vyšší než jaká byla koncentrace po ukončení purifikace. Některá z průběžných stanovení tedy byla chybná. Příčinou mohlo být nedostatečné množství přidaného dithionitánu sodného, čímž došlo pouze k částečné redukci P450, nebo krátká doba sycení preparátu oxidem uhelnatým.

Celkem bylo tedy izolací získáno 12,2 ml CYP 2B4 o koncentraci 25,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což odpovídá látkovému množství 310 nmol a výtěžku izolace 22,1 %. Specifický obsah CYP 2B4 v preparátu byl 5,6 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$. Průběh purifikace CYP 2B4 je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Bilanční tabulka izolace CYP 2B4

	n [nmol]	V [ml]	c_b [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]	s.o. [$\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$]	[%]
MF	1400	62	41,7	0,5	100,0
Solubilizát	3000	360	5,6	1,5	215,8
DEAE (1)	2700	350	3,9	2,0	195,0
HAP (1)	1400	335	N	N	100,0
HAP (2)	475	86	N	N	33,9
DEAE (5)	160	57	1,0	2,75	11,3
HAP (3)	125	12,5	N	N	8,9
Finální preparát před zmražením	100	12,2	4,5	1,8	7,2
Finální preparát po rozmražení	310	12,2	4,5	5,6	22,1

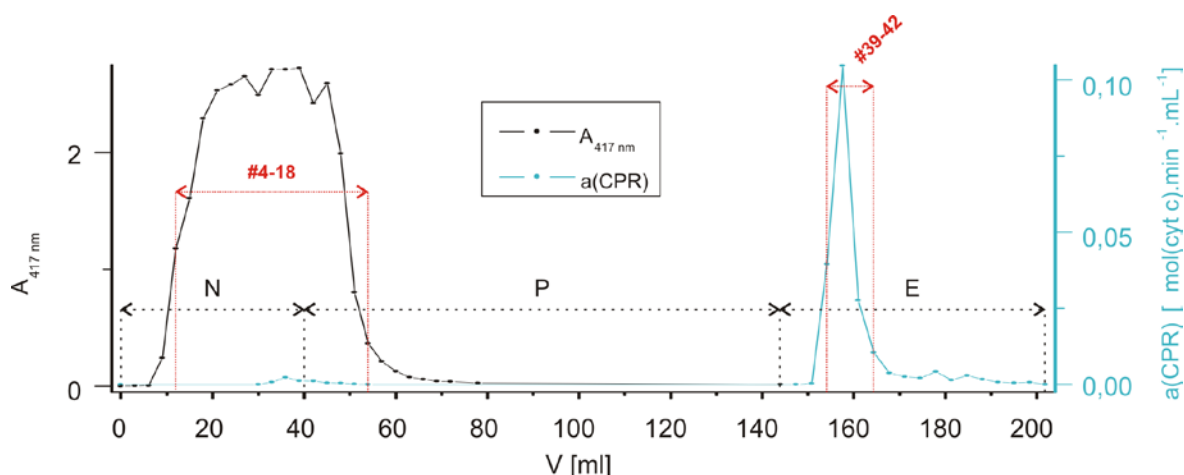
n – látkové množství; V – objem; c_b – koncentrace bílkoviny; s.o. – specifický obsah P450; [%] – procentuální výtěžek oproti mikrosomální frakci; MF – mikrosomální frakce; DEAE – frakce eluované z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B; HAP – frakce eluované z kolony hydroxylapatitu; N - nestanoveno

5.1.8. Chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0

Frakce 99 – 109 eluované lineárním gradientem KCl z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1) obsahovaly CPR společně s cyt b_5 . Spojené frakce byly zahuštěny na objem 40 ml, přes noc při teplotě 6 °C dialyzovány proti pufru PR6 a jejich pH bylo upraveno 1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 na hodnotu 7,0.

Pro oddělení cyt b_5 a kontaminantů od CPR byla provedena chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (1,4 × 6,5 cm, 10 ml nosiče, pH 7,0). Kolona byla ekvilibrována puftrem CP1 a spojené frakce na ni byly naneseny rychlostí 30 ml za hodinu.

Kontaminanty s cyt b_5 se na koloně nezachycovaly a byly z ní odmyty 100 ml pufru CP1. Poté byla z kolony eluována CPR 60 ml pufru CP2, který obsahoval 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NADP^+ . Jímány byly frakce o objemu asi 4 ml a proměřována v nich absorbance při 417 nm a aktivita CPR. Průběh chromatografie je patrný z grafu na Obr. 18 na straně 45.



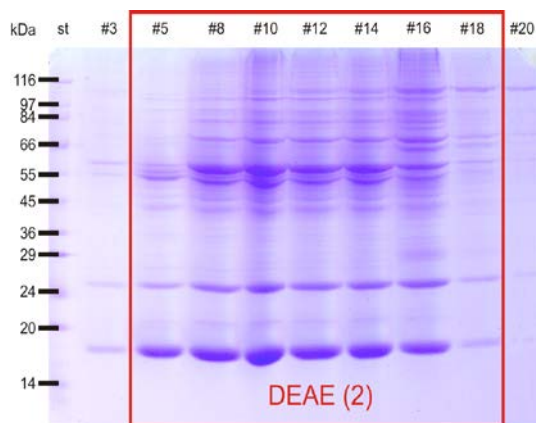
Obr. 18: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících CPR a cyt b_5 eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 gradientem KCl na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0

kolona $1,4 \times 6,5$ cm, 10 ml; ekvilibrační pufr CP1; promývání pufr CP1; eluce CPR pufr CP2
 $A_{417 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; #4-18, #39-42 – spojené frakce; N – nanášení; P –
 promývání pufr CP1; E – eluce CPR pufr CP2

Byla provedena SDS-PAGE frakcí s nejvyšší absorbcí při 417 nm (Obr. 19 na straně 46) a píků s nejvyšší aktivitou CPR (Obr. 20 na straně 46).

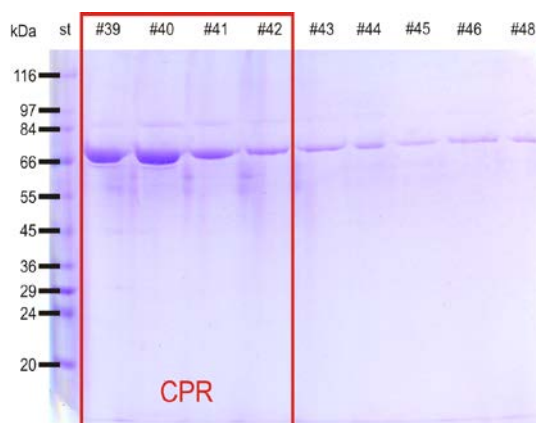
Spojeny byly frakce, jejichž aktivita CPR dosahovala alespoň desetiny maxima aktivity v elučním vrcholu, tedy frakce 39 – 42. Afinitní chromatografie zbavila preparát CPR kontaminantů a zakoncentrovala ho na objem 15 ml, čímž v něm také došlo ke snížení množství detergentu. Spojené frakce byly přes noc při 6°C dialyzovány proti 2×1000 ml pufru PR8 a z preparátu byl v posledním kroku purifikace odstraněn zbylý detergent adsorbci na silikagel.

Kontaminované frakce protečené kolonou obsahovaly podle SDS-PAGE cyt b_5 . Frakce 4 – 18 byly spojeny, jelikož jejich absorbance při 417 nm dosahovala alespoň desetiny absorbance v maximu nanášecího píku. Preparát cyt b_5 byl dále přečištěn řadou ionexových chromatografií.



Obr. 19: SDS-PAGE frakcí z 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0 s nejvyšší absorbcí při 417 nm

st – Sigma marker; #3-20 – čísla frakcí; DEAE (2) – frakce nanášené na kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (2) 12 % PAGE, barvení: CBB R-250



Obr. 20: SDS-PAGE frakcí z 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0 s nejvyšší aktivitou CPR

st – Sigma marker; #39-48 – čísla frakcí; CPR – spojené frakce obsahující CPR 8 % PAGE, barvení: CBB R-250

5.1.9. Odstranění detergentu z preparátu NADPH: cytochrom P450 reduktasy

Z purifikovaného preparátu CPR byl odstraněn detergent stejným postupem, jakým proběhlo odstranění detergentu u CYP 2B4 (kapitola 4.2.3.4 na straně 28).

V purifikovaném preparátu byla stanovena aktivita CPR $1,3 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Bylo odebráno 500 μl vzorku a k němu přidán silikagel v koncentraci $12 \text{ mg} \cdot (\text{ml roztoku})^{-1}$, tj. $4 \text{ mg} \cdot (\text{mg Emulgenu E-911})^{-1}$. Vzorek byl 3 hodiny promícháván při 6°C , odstředěn a v supernatantu byla stanovena aktivita CPR.

Jelikož ve vzorku aktivita nepoklesla pod 80 % počáteční hodnoty, byl postup zopakován se zbytkem preparátu a zároveň se supernatantem vzorku, ke kterému byl

přidán další silikagel. Nedopatřením však bylo ke zbytku preparátu přidáno desetinásobné množství silikagelu, což vedlo k poklesu aktivity CPR pod 80 % počáteční aktivity, na $0,7 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pokus již nebyl opakován a supernatant vzorku byl přidán ke zbytku preparátu.

Koncentrace detergentů ve finálním preparátu CPR byla popsáním postupem výrazně snížena. Finální preparát CPR byl po odstranění detergentů analyticky charakterizován, identifikován pomocí MS (viz Příloha 1 na straně 72) a poté v malých alikvotech uskladněn v kapalném dusíku.

Celkem bylo izolací získáno 5,4 ml CPR, jejíž aktivita byla $0,75 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá celkové aktivitě $4,0 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}$ a výtěžku izolace 1,6 %. Průběh purifikace CPR je shrnut v Tabulce 3. Udaná aktivita CPR v mikrosomální frakci a solubilizátu je dle ústního sdělení školitele RNDr. Miroslava Šulce, PhD. příliš vysoká a došlo patrně k chybnému ředění preparátu před vlastním stanovením. Z toho vyplývá, že výtěžek izolace byl vyšší, než je uvedená hodnota.

Tabulka 3: Bilanční tabulka izolace CPR

	a [$\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}$]	V [ml]	C_b [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]	s.a. [$\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	[%]
MF	257	62	41,7	0,1	100,0
Solubilizát	144	360	5,6	0,07	56,1
DEAE (1)	27,6	40	2,1	0,3	10,8
2',5'-ADP	6,9	5,5	N	N	2,7
Finální preparát	4,0	5,4	1,5	0,5	1,6

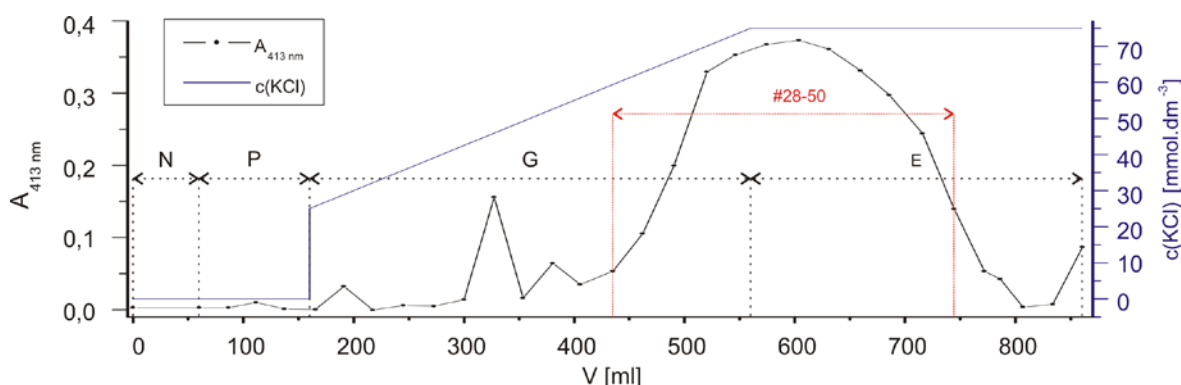
a – aktivita; V – objem; c_b – koncentrace bílkoviny; s.o. – specifická aktivita CPR; [%] – procentuální výtěžek oproti mikrosomální frakci; MF – mikrosomální frakce; DEAE (1) – frakce eluované z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1); 2',5'-ADP – frakce eluované z kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B; N – nestanoveno

5.1.10. Chromatografie na kolonách DEAE-Sepharosy CL-6B (2), (3) a (4), pH 8,1

Frakce 95 – 98 obsahující cyt b₅, které byly eluované lineárním gradientem KCl z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5, byly po spojení zahuštěny na objem 30 ml (membrána Amicon PM-30, Millipore) a přes noc při teplotě 6 °C dialyzovány proti 2 × 1000 ml pufru PR6. Frakce 4 – 18, které protekly kolonou 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0 a také obsahovaly cyt b₅, byly po spojení přes noc při 6 °C dialyzované proti

2×1000 ml pufru DP1. Oba preparáty obsahující cyt b_5 byly po spojení naneseny na pufr DP1 s 0,6 % Tergitolu NP-10 ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (2) ($2,0 \times 40$ cm, 150 ml, pH 8,1).

Kolona byla promyta 200 ml pufru DP2 a cyt b_5 z ní byl eluován gradientem 25 – 75 mmol . dm⁻³ KCl v DP2 a poté 75 mmol . dm⁻³ KCl v DP2. U frakcí o objemu asi 13 ml byla měřena absorbance při 413 nm a frakce z okolí absorpčního maxima byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 23 na straně 49). Průběh chromatografie je patrný z grafu na Obr. 21.



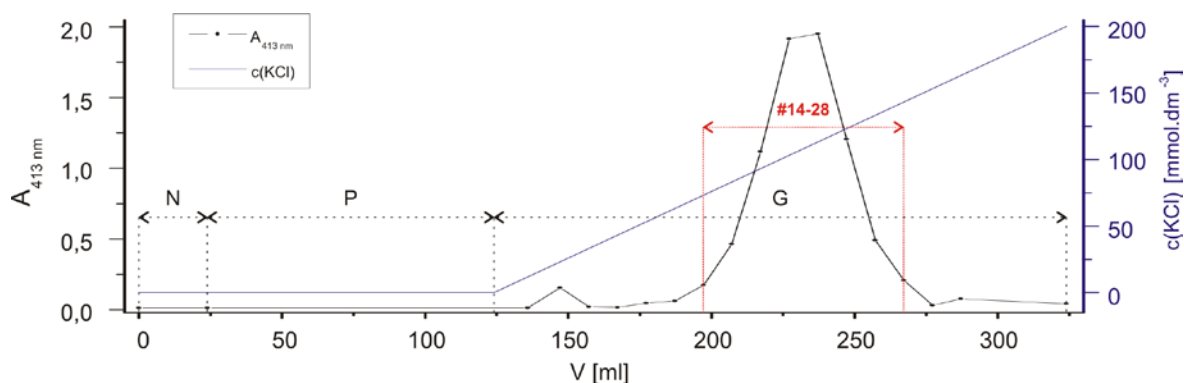
Obr. 21: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících cyt b_5 eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 gradientem KCl a nezachycených na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0 na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (2), pH 8,1

$2,0 \times 40$ cm, 150 ml; ekvilibrační pufr DP1 s 0,6 % Tergitolu NP-10 (w/v); promývací pufr DP2
 $A_{413 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 413 nm; #28 – 50 – spojené frakce; N – nanášení; P –
 promývání pufr DP2; G – gradient 25 – 75 mmol . dm⁻³ KCl v pufru DP2; E – eluce 75 mmol . dm⁻³ KCl
 v pufru DP2

Elektroforéza ukázala, že chromatografie vedla k výraznému načištění preparátu. Spojeny byly frakce 28 – 50 v nichž absorbance při 413 nm přesáhla desetinu absorpčního maxima elučního vrcholu. Následně byly zakoncentrovány na objem 24 ml a dialyzovány proti pufru DP2.

Pro další purifikaci byly spojené frakce naneseny na pufr DP2 ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (3) ($1,6 \times 12$ cm, 24 ml, pH 8,1) a ta byla promyta pufr DP3.

Cyt b_5 byl z kolony eluován gradientem 0 – 200 mmol . dm⁻³ KCl v pufru DP3. Byly jímány frakce o objemu přibližně 5 ml a spektrofotometricky byl při 413 nm proměřován eluční profil chromatografie (Obr. 22 na straně 49).

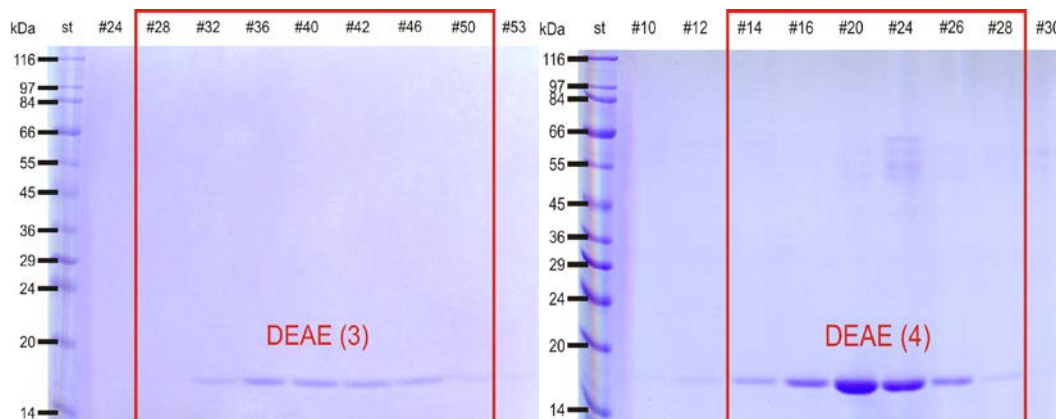


Obr. 22: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících cyt b_5 eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (2), pH 8,1 gradientem KCl na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (3), pH 8,1

1,6 × 12 cm, 24 ml; ekvilibrační pufr DP2; promývací pufr DP3; eluce gradientem 0 – 200 mmol . dm⁻³ KCl v pufru DP3

$A_{413\text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 413 nm; #14 – 28 – spojené frakce; N – nanášení; P – promývání pufr DP2; G – gradient 0 – 200 mmol . dm⁻³ KCl v pufru DP3

Byla provedena SDS-PAGE frakcí s maximální absorbancí při 413 nm (Obr. 23) a přečištěné frakce dosahující alespoň desetiny maxima elučního píku (14 – 28) byly spojeny, zakoncentrovány na objem 30 ml a přes noc při 6 °C dialyzované proti 2 × 1000 ml pufru DP2.



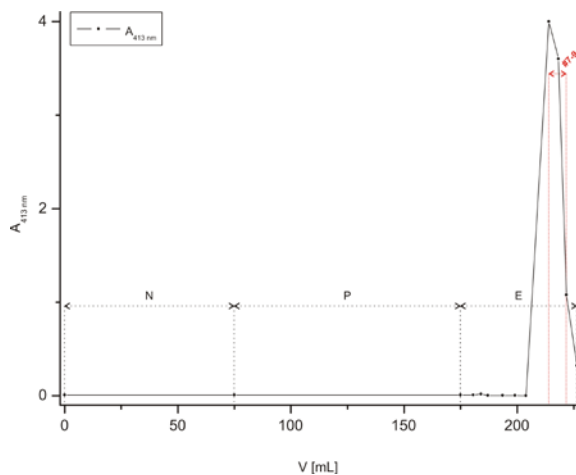
Obr. 23: SDS-PAGE frakcí obsahujících cyt b_5 po eluci z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (2), pH 8,1 (vlevo) a DEAE-Sepharosy CL-6B (3), pH 8,1 (vpravo)

st – Sigma marker; #24-53, #10-30 – čísla frakcí; DEAE (3), DEAE (4) – frakce nanášené na kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (3), resp. (4)

8 % PAGE, barvení: CBB R-250

Chromatografií došlo k odstranění většiny zbylých nečistot a poslední chromatografie sloužila již pouze k zakoncentrování preparátu cyt b_5 , což v něm vedlo také ke snížení koncentrace detergentu.

Spojené frakce obsahující cyt b_5 byly naneseny na pufrem DP2 ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B (4) ($1,6 \times 12$ cm, 24 ml, pH 8,1), ta byla promyta pufrem DP3 a cyt b_5 z ní eluován $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl v pufru DP3. Průběh chromatografie je patrný z grafu na Obr. 24. Spojeny byly frakce dosahující alespoň desetiny absorbního maxima elučního píku (7–9), ze kterých byl po dialýze proti 2×1000 ml pufru PR8 odstraněn detergent adsorbci na silikagel.



Obr. 24: Eluční profil chromatografie frakcí obsahujících cyt b_5 eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (3), pH 8,1 gradientem KCl na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (4), pH 8,1

$1,6 \times 12$ cm, 24 ml; ekvilibrační pufr DP2; promývací pufr DP3

$A_{413 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 413 nm; #7 – 9 – spojené frakce; N – nanášení; P – promývání pufru DP3; E – eluce $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl v pufru DP3

5.1.11. Odstranění detergentu z preparátu cytochromu b_5

Z purifikovaného preparátu cyt b_5 byl odstraněn detergent stejným postupem, jakým proběhlo odstranění detergentu u CYP 2B4 a CPR (kapitola 4.2.3.4 na straně 28). V průběhu metody nebyla stanovována koncentrace proteinu, ale pouze jí úměrná absorbance při 413 nm.

Z preparátu bylo odebráno 500 μl vzorku a k němu byl přidán silikagel v koncentraci $3,6 \text{ mg} \cdot (\text{ml roztoku})^{-1}$, tj. $4 \text{ mg} \cdot (\text{mg Emulgenu E-911})^{-1}$. Vzorek byl 3 hodiny promícháván při $4 \text{ }^\circ\text{C}$, odstředěn a v supernatantu byla opět změřena absorbance při 413 nm. Ve vzorku došlo k jejímu výraznému poklesu a silikagel byl po sedimentaci výrazně zabarven do červena. Došlo patrně k adsorbci většiny cyt b_5 na silikagel, a tedy k jeho znehodnocení.

Zbylý preparát byl třikrát naředěn pufrem DP3 a postup byl zopakován. Použitá koncentrace silikagelu byla $1,2 \text{ mg} \cdot (\text{ml roztoku})^{-1}$, tj. $4 \text{ mg} \cdot (\text{mg Emulgenu E-911})^{-1}$.

Absorbance při 413 nm ve druhém vzorku nepoklesla pod 80 % počáteční absorbance, proto byl postup zopakován se zbytkem preparátu a zároveň se supernatantem vzorku, ke kterému byl přidán další silikagel. Tentokrát již ve vzorku došlo k poklesu absorbance při 413 nm pod 80 % počáteční absorbance a postup se zbytkem preparátu opakován nebyl. Supernatant vzorku byl přidán ke zbytku preparátu.

Koncentrace detergentů ve finálním preparátu cyt b₅ byla popsáním způsobem výrazně snížena. Finální preparát cyt b₅ byl poté odstranění detergentů identifikován pomocí MS (viz Příloha 1 na straně 72) a poté v malých alikvotech uskladněn v kapalném dusíku.

5.2. Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450 2B4

Fotoafinitní sonda N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylamin (dále jen sonda) sloužila k určení aminokyselinového zbytku v aktivním centru izolovaného CYP 2B4, který se nachází ve vzdálenosti 16,5 Å od centrálního atomu železa hemu. [28]

Sondu bylo nejprve nutno přechistit pomocí chromatografie na tenké vrstvě a diferenční spektrometrií ověřit způsob, jakým se váže v aktivním centru CYP 2B4. Fotoafinitní značení proběhlo za různých experimentálních podmínek a vazba fotoafinitní sondy byla identifikována metodou hmotnostní spektrometrie.

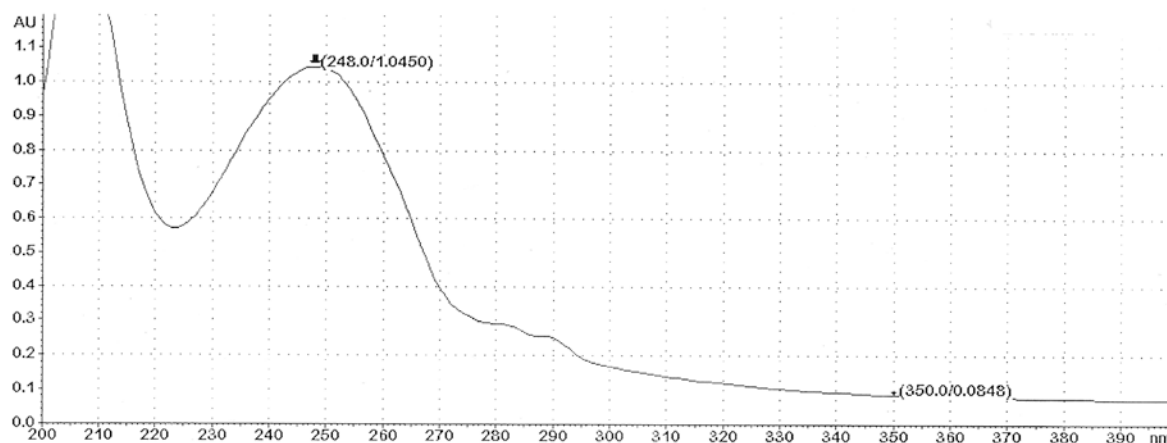
5.2.1. Purifikace a ověření čistoty fotoafinitní sondy

Zásobní roztok N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylaminu v methanolu byl delší dobu skladován v temnu, při 4 °C. Chromatografie na tenké vrstvě ukázala v zásobním roztoku sondy přítomnost nečistot. Ty byly rovněž chromatografií na tenké vrstvě odstraněny.

Na základě optimalizace byla jako mobilní fáze pro separaci zvolena směs methanolu a ethylacetátu v poměru 3:2 (v/v). Sonda měla při jejím použití retenční faktor přibližně 0,6 a chromatografií se podařilo oddělit nečistoty s vyšší i nižší chromatografickou mobilitou než byla chromatografická mobilita sondy.

Zásobní roztok sondy o objemu 260 µl byl nanesen na 18 pozic chromatografické destičky o rozměrech 10 × 20 cm. Sonda byla postupem uvedeným v kapitole 4.2.4.1 zakoncentrována na ploše destičky přibližně 1 × 0,5 cm, silikagel byl odtud seškrábán na skelnou vatu sloužící jako filtr a sonda byla ze silikagelu vymyta 2,7 ml methanolu.

Na základě naměřeného absorpčního spektra (Obr. 25) byla stanovena výsledná koncentrace sondy $36,3 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což odpovídá látkovému množství 100 nmol a výtěžku přečištění 64% . Přečištěný roztok byl odpařením rozpouštědla proudem dusíku zakonzentrován na výsledný objem $0,2 \text{ ml}$, což odpovídá výsledné koncentraci sondy $490 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

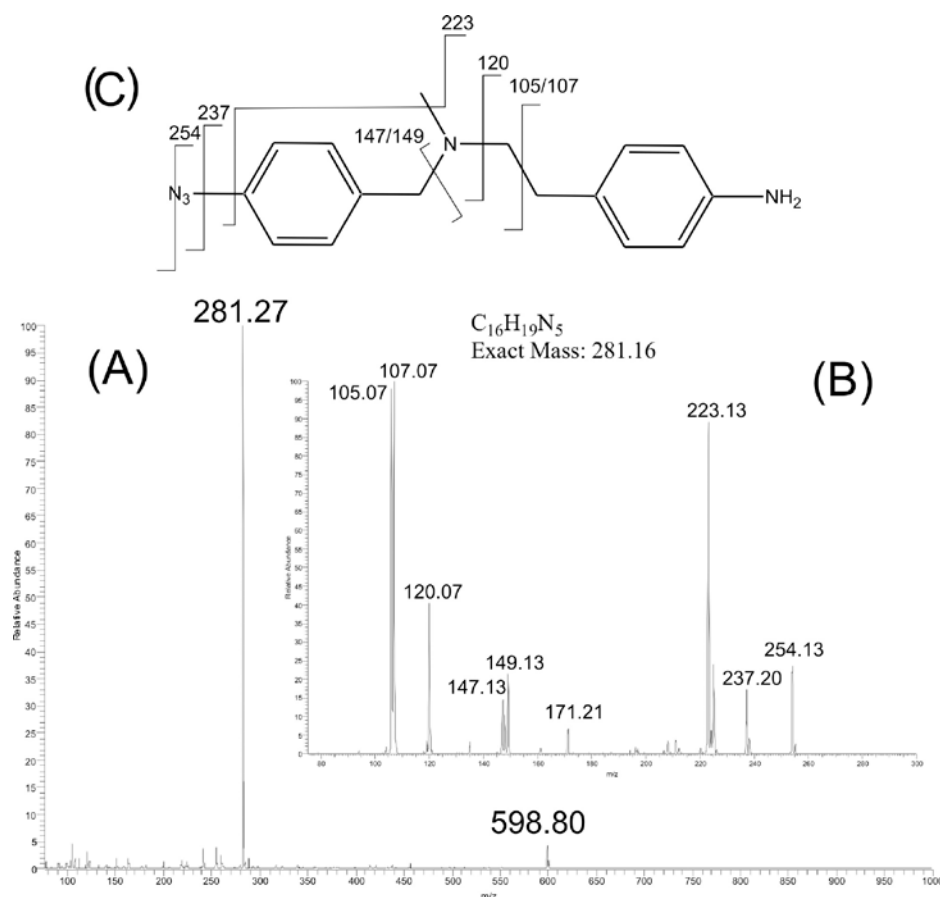


Obr. 25: Absorpční spektrum přečištěné fotoafinitní sondy

Obecná čistota sondy byla charakterizována metodou tandemové hmotnostní spektrometrie postupem uvedeným v kapitole 4.2.4.1.

Hmotnostní spektrum na Obr. 26A na straně 53 obsahuje majoritní pík m/z 281,27, který odpovídá monoisotopické hmotnosti sondy a minoritní pík m/z 598,80, který odpovídá aduktu dvou molekul sondy s molekulou vody. Spektrum neobsahuje další intenzivní signály, což vypovídá o zvýšení čistoty vzorku a potvrzuje úspěšnost předešlé purifikace.

Majoritní pík byl fragmentován (Obr. 26B na straně 53) a získané spektrum porovnáno s hodnotami m/z odpovídajícími teoretickému fragmentačnímu schématu znázorněnému na Obr. 26C na straně 53. Sonda tak byla jednoznačně identifikována.



Obr. 26: Identifikace N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylaminu metodou MS

A – hmotnostní spektrum sondy; B – fragmentační spektrum iontu $m/z = 281,27$; C – teoretické fragmentační schéma; podmínky měření uvedeny v kapitole 4.2.4.1 na straně 28

5.2.2. Charakterizace interakce cytochromu P450 2B4 s fotoafinitní sondou

Metodou diferenční spektrometrie byla postupem uvedeným v kapitole 4.2.4.2 na straně 29 charakterizována vazba fotoafinitní sondy v aktivním centru P450, a to jak u purifikovaného preparátu CYP 2B4, tak u fenobarbitalem indukované králičí mikrosomální frakce obsahující kromě CYP 2B4 také další součásti MFO systému. Vazba diamantanu a vazba sondy po předchozím navázání diamantanu byla také charakterizována, a to u purifikovaného preparátu i mikrosomální frakce.

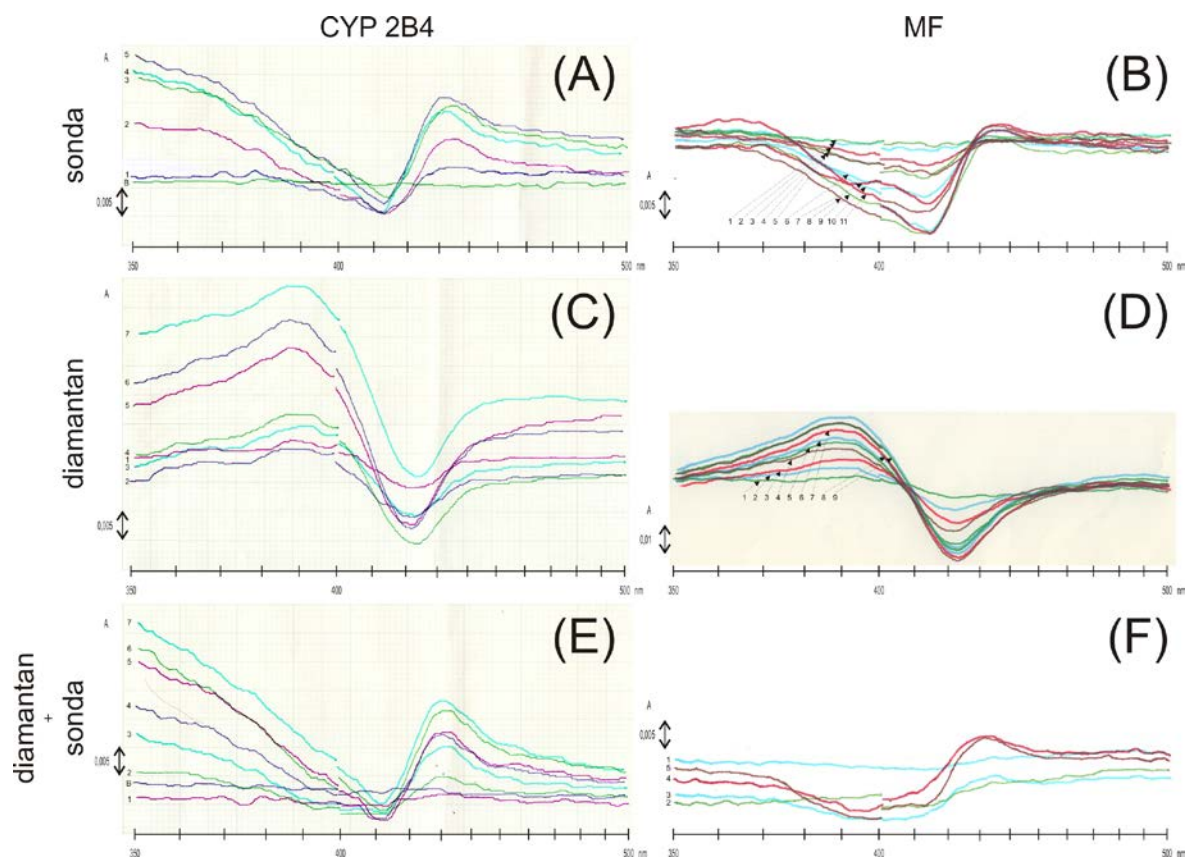
Fotoafinitní sonda tvoří s mikrosomální frakcí i purifikovaným preparátem CYP 2B4 ligandový typ diferenčního spektra (λ_{MAX} 430 – 440 nm, λ_{MIN} 410 – 420 nm; Obr. 27 (A,B) na straně 54), v aktivním centru se tedy váže na centrální atom železa hemu. Diamantan tvoří diferenční spektrum typu I (λ_{MAX} 385 – 395 nm, λ_{MIN} 420 – 430 nm; Obr. 27 (C,D) na straně 54), tedy váže se na proteinovou část aktivního centra CYP 2B4.

Fotoafinitní sonda v jeho přítomnosti tvoří stále diferenční spektrum ligandového typu (Obr. 27 (E,F)).

Nelineární regresí byly programem Origin 8.0 získány regresní rovnice ve tvaru

$$\Delta A = \Delta A_{MAX} \cdot c \cdot (K_{SP} + c)^{-1}.$$

Charakteristiky vazby fotoafinitní sondy a diamantanu jsou shrnuty v Tabulce 4.



Obr. 27: Diferenční spektrum titrace CYP 2B4 (A) a mikrosomální frakce (B) fotoafinitní sondou, titrace CYP 2B4 (C) a mikrosomální frakce (D) diamantanem a titrace CYP 2B4 (E) a mikrosomální frakce (F) fotoafinitní sondou po předchozí saturaci diamantanem

Tabulka 4: Výsledky analýzy diferenčních spekter

Vzorek	K_{SP} [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	ΔA_{MAX}	R^2
MF, titrace sondou	0,168	0,010	0,994
MF, saturace diamantanem, titrace sondou	0,790	0,009	0,820
MF, titrace diamantanem	0,150	0,023	0,658
CYP 2B4, titrace sondou	34,14	0,025	0,993
CYP 2B4, saturace diamantanem, titrace sondou	196,86	0,032	0,987
CYP 2B4, titrace diamantanem	1,84	0,041	0,961

MF – mikrosomální frakce

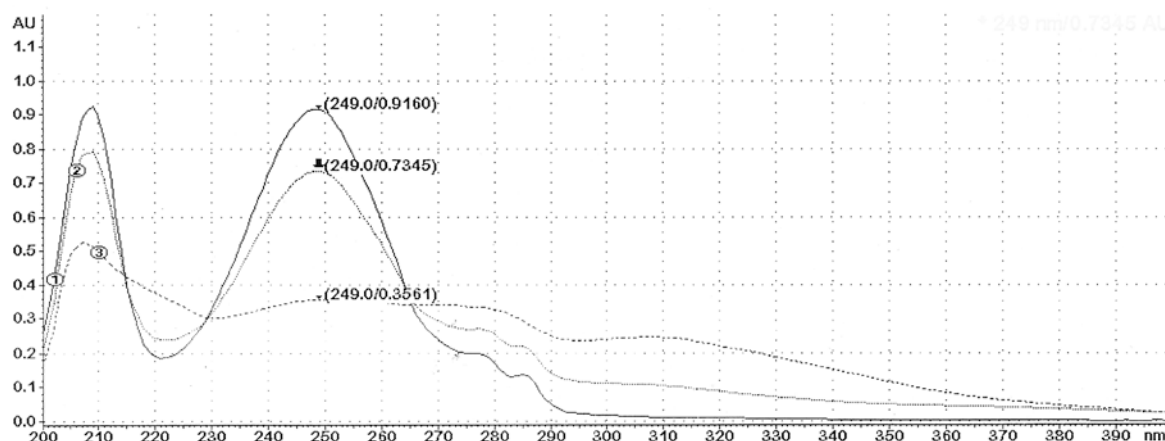
Spektrální konstanty ve vzorcích s mikrosomální frakcí jsou výrazně nižší než ve vzorcích s CYP 2B4, sonda se proto v aktivním centru mikrosomálních P450 váže při nižších koncentracích. Naopak množství sondy vázané v aktivním centru je vyšší u purifikovaného preparátu. Výsledek je v souladu s předpokladem, že mikrosomální frakce je svým složením bližší *in vivo* systém, a proto je vazba sondy do aktivního centra P450 snadnější. Stanovená koncentrace u mikrosomální frakce je celková koncentrace všech izoform P450, tedy i těch, v jejichž aktivním centru se sonda neváže. Proto je celkové navázané množství sondy u mikrosomální frakce nižší než u purifikovaného preparátu CYP 2B4.

Poměr spektrálních konstant vazby sondy v přítomnosti diamantanu a vazby sondy samotné byla u obou preparátů podobná – v případě CYP 2B4 5,8 a v případě mikrosomální frakce 4,6. Maximální rozdíl absorbancí byl u vazby sondy v přítomnosti a nepřítomnosti sondy rovněž podobný, a to v případě mikrosomální frakce i CYP 2B4. Jelikož diamantan zvýšil hodnotu K_{SP} sondy přibližně 5× v obou testovaných systémech (Tabulka 4) ovlivňuje vazbu sondy. Nicméně diamantan pravděpodobně není schopen totálně zablokovat vazbu sondy na centrální atom železa hemu.

5.2.3. Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450 2B4

Funkčnost fotolyzéry Oriol byla před fotoafinitním značením testována. Absorbční spektrum roztoku fenylazidu v methanolu (Obr. 28 na straně 56) po 0, 2 a 16 sekundách fotolýzy ukazuje úbytek absorbčního maxima při 250 nm doprovázející rozklad fotolabilní

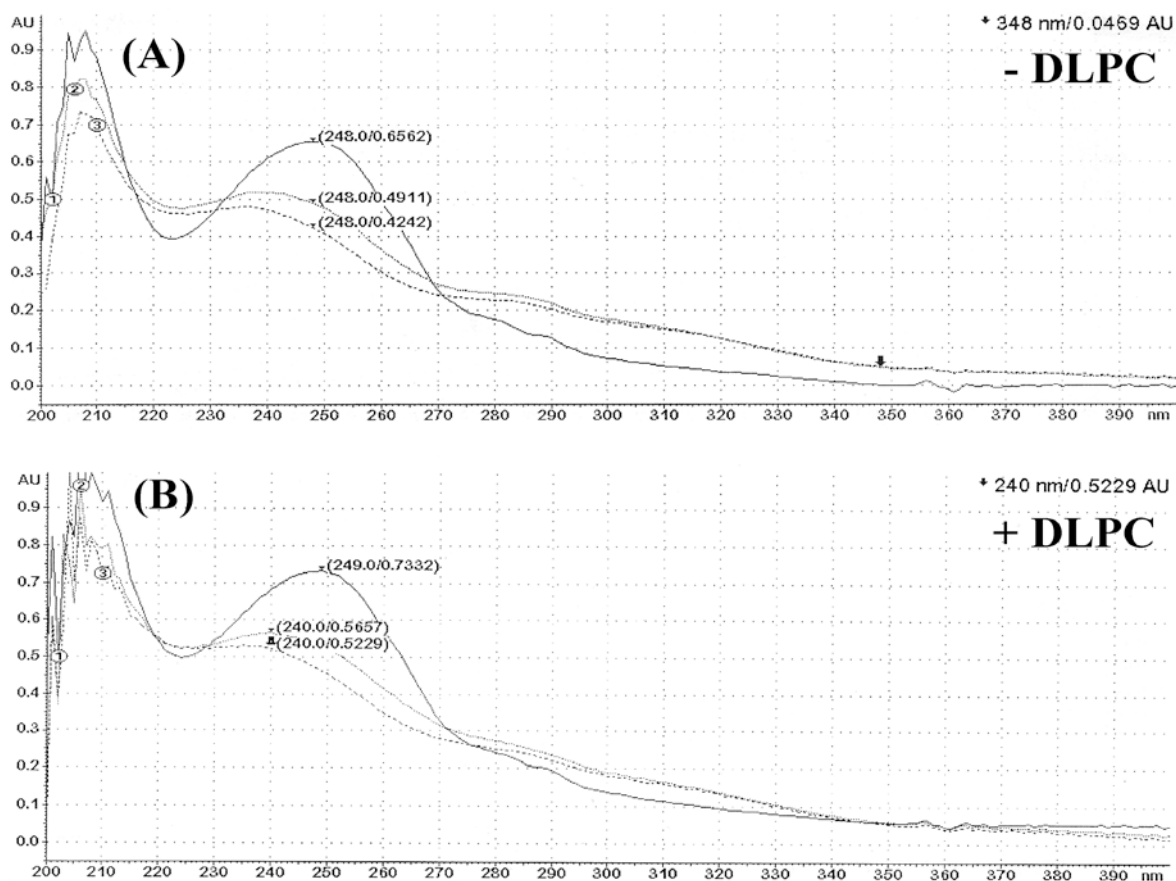
sloučeniny. Na základě tohoto výsledku bylo prokázáno, že paprsek prochází kyvetou a intenzita světla UV lampy je pro fotolýzu dostačující.



Obr. 28: Absorbční spektrum fenylazidu po 0, 2 a 16 sekundách fotolýzy

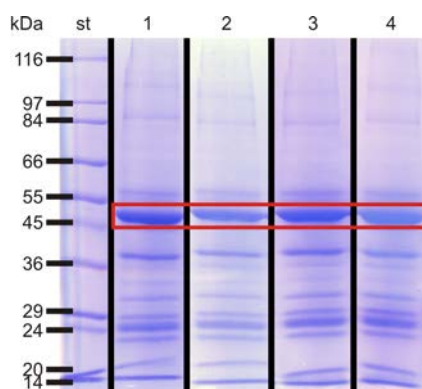
Složkou MFO systému je lipidová membrána, která je u *in vitro* experimentů nahrazována micelami tvořenými z DLPC. Postupem uvedeným v kapitole 4.2.4.3 na straně 30 bylo ověřeno, že přítomnosti této složky v reakční směsi neovlivňuje dobu potřebnou k fotolýze sondy. Absorbční spektra (Obr. 29 na straně 57) ukazují, že poločas fotolýzy se v přítomnosti a nepřítomnosti DLPC výrazně neliší (pohybuje se mezi 2 a 4 sekundami) a v obou případech je fotolýza sondy úplná po 32 sekundách.

Doba fotolýzy sondy je při fotoafinitním značení CYP 2B4 35 sekund, za nezměněných podmínek tedy může být fotoafinitně označen také CYP 2B4 ukotvený v membráně.



Obr. 29: Absorbční spektra fotoafinitní sondy po 0, 4, a 16 sekundách fotolýzy v nepřítomnosti (A) a přítomnosti (B) DLPC

Fotoafinitní značení CYP 2B4 proběhlo postupem uvedeným v kapitole 4.2.3.4 na straně 30, vzorky byly následně separovány na SDS-PAGE (Obr. 30) a označené zóny odpovídající molekulové hmotnosti CYP 2B4 byly analyzovány metodou MS (Tabulka 5 na straně 58).



Obr. 30: SDS-PAGE fotoafinitně značeného CYP 2B4

st – Sigma marker; složení reakčních směsí vzorků: 1 – CYP 2B4, sonda; 2 – CYP 2B4, sonda, diamantan; 3 – CYP 2B4, sonda, DLPC; 4 – CYP 2B4, sonda, diamantan, DLPC; označeny analyzované zóny 10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Tabulka 5: Výsledky LC-FTICR analýzy tryptických peptidů v fotoafinitně značeném CYP 2B4

	Experimentální m/z	Teoretické m/z	Chyba [ppm]	Sekvence CYP 2B4	Sekvence peptidů	Intenzita
Vzorek 1				neoznačen		
Vzorek 2	1706,922	1706,917	2,9	187-197+sonda	RFDYKDPVFLR	1,83E+06
Vzorek 3	1706,925	1706,917	4,9	187-197+sonda	RFDYKDPVFLR	2,21E+06
Vzorek 4	1706,926	1706,917	5,1	187-197+sonda	RFDYKDPVFLR	2,15E+06

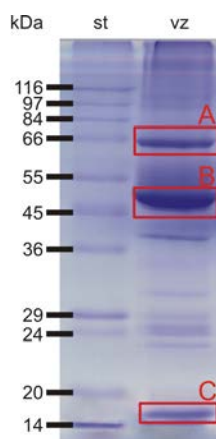
Složení reakčních směsí vzorků: Vzorek 1 – CYP 2B4, sonda; Vzorek 2 – CYP 2B4, sonda, diamantan; Vzorek 3 – CYP 2B4, sonda, DLPC; Vzorek 4 – CYP 2B4, sonda, diamantan, DLPC

Ve vzorcích 2 – 4 byl nalezen signál o nominální hmotnosti 1706 Da, který odpovídá hmotnosti peptidu 187 – 197 CYP 2B4 s navázanou sondou. Intenzity signálů se v jednotlivých vzorcích výrazně nelišily, což naznačuje, že přítomnost diamantanu v reakční směsi neměla na fotoafinitní značení vliv. Ve vzorku 1 byl rovněž nalezen fragment o nominální hmotnosti 1706 Da, ale odchylka experimentální m/z byla 11,0 ppm, což není pro identifikaci dostačující. Zjištěný výsledek bude ověřen tandemovou hmotnostní spektrometrií a *in silico* inkorporací sondy a diamantanu do modelu CYP 2B4.

5.2.4. Chemické zesíťení cytochromu P450 2B4 a cytochromu b₅

Pro studium vzájemné interakce CYP 2B4 s cyt b₅ byly oba cytochromy spojeny kovalentní vazbou pomocí síťovacího činidla EDC (viz kapitola 4.2.5.1 na straně 31). Směs zesíťovaných a nemodifikovaných proteinů byla rozdělena na 10% SDS-PAGE (Obr. 31 na straně 59), byly vyříznuty proteinové zóny odpovídající CYP 2B4, cyt b₅ a jejich kovalentnímu dimeru a vzorky byly připraveny pro MS analýzu postupem uvedeným v kapitole 4.2.5 na straně 31.

Data získaná hmotnostní analýzou spektrometrem MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics) byla porovnána s *in silico* teoretickou peptidovou mapou a bylo jednoznačně určeno proteinové složení zón na SDS-PAGE (Obr. 31 na straně 59). Zóna C obsahovala cyt b₅, zóna B CYP 2B4 a zóna A oba cytochromy zároveň.



Obr. 31: Výřez z SDS-PAGE vzorku CYP 2B4 a cyt b₅ po síťovací reakci

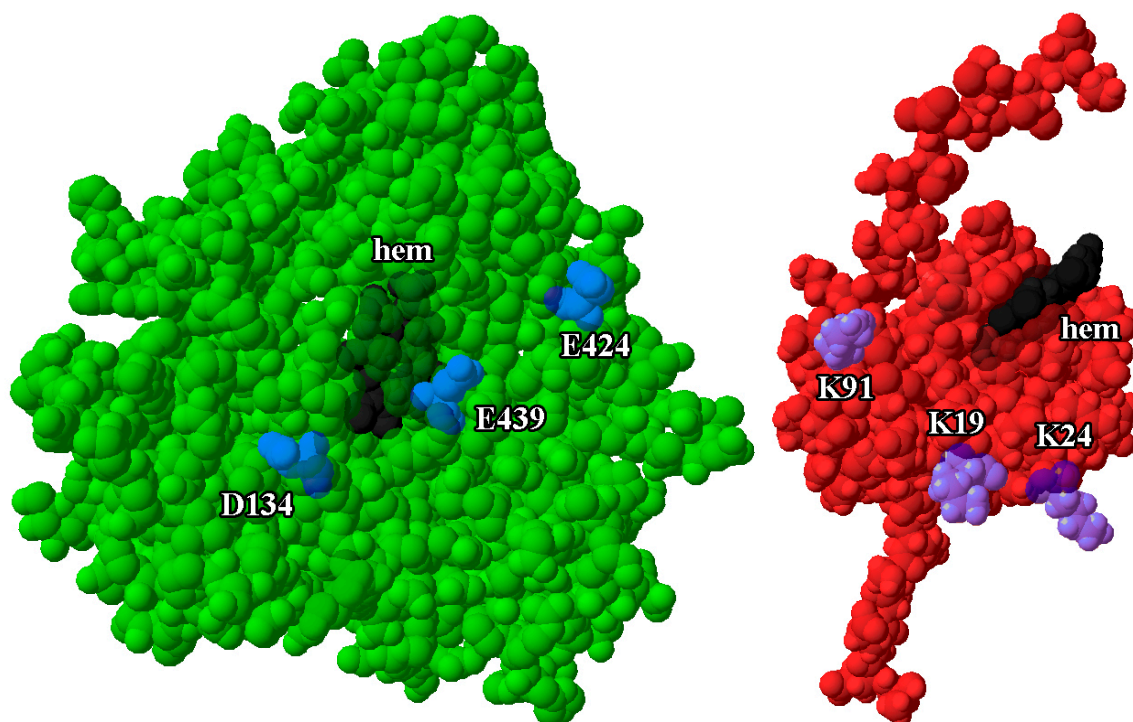
st - Sigma marker, vz – vzorek po síťovací reakci s EDC; zvýrazněny zóny s jednoznačně určeným proteinovým složením MALDI-TOF hmotnostní analýzou: A – CYP 2B4 a cyt b₅, B – CYP 2B4, C – cyt b₅

Porovnáním molekulových hmotností peptidů ve vzorku kovalentního dimeru CYP 2B4-cyt b₅ získaných hmotnostní analýzou s molekulovými hmotnostmi peptidů teoreticky vzniklých štěpením celých proteinů cyt b₅ a CYP 2B4 trypsinem byla předběžně identifikována jedna nová intramolekulární vazba CYP 2B4 mezi aminokyselinovými zbytky 49K a 474E (m/z peptidu 2070,2). Dále byl nalezen signál m/z = 1914,1, který by mohl odpovídat nové intermolekulární vazbě mezi aminokyselinovým zbytkem 192D náležícím CYP 2B4 a 19K náležícím cyt b₅. Nicméně toto zjištění nebylo potvrzeno pomocí LC-FTICR analýzy. Naopak bylo zjištěno, že dvě oblasti aminokyselin CYP 2B4 (126 – 145 a 423 – 443) se podílejí na interakci se dvěma oblastmi aminokyselin cyt b₅ (19 – 33 a 90 – 94). Identifikovány byly celkem čtyři interagující páry aminokyselinových zbytků, kterými jsou 134D-19K, 424E-24K, 424E-91K a 439E-19K, vždy v pořadí CYP 2B4-cyt b₅. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6 na straně 60 a interagující aminokyselinové zbytky ukázány na Obr. 32 na straně 60.

Tabulka 6: Výsledky LC-FTICR analýzy tryptických peptidů v kovalentně spojeném binárním komplexu CYP 2B4-cyt b₅

Experimentální m/z	Teoretické m/z	Chyba [ppm]	Sekvence CYP 2B4	Sekvence cyt b ₅	Sekvence peptidů
2657.4001	2657.3999	0.1	134-140	19-33	<u>D</u> FGMGKR- <u>K</u> HNHSKSTWLILHHK
2504.2917	2504.2878	1.6	126-140	19-24	RFSLATMR <u>D</u> FGMGKR- <u>K</u> HNHSK
3117.5886	3117.5955	2.2	423-434+ox-M	20-33	<u>N</u> EGFMPFSLGKR- HNHS <u>K</u> STWLILHHK
1785.9193	1785.9208	0.8	423-433+ox-M	90-94	<u>N</u> EGFMPFSLGK- <u>S</u> KLSK
1719.9058	1719.9076	1	435-443+CAM	19-24	ICLGE <u>G</u> IAR- <u>K</u> HNHSK

ox-M – oxidovaný methionin v sekvenci, CAM – modifikace cysteinu karbamidomethylem



Obr. 32: Model CYP 2B4 (zelený) a cyt b₅ (červený) s vyznačenými interagujícími aminokyselinami

6. DISKUZE

6.1. Izolace proteinů MFO systému

Studovaný protein CYP 2B4 byl společně s dalšími složkami MFO systému (cyt b_5 a CPR) izolován z jaterní tkáně králíka domácího. Za účelem jeho nabohacení bylo experimentální zvíře 11 dní premedikováno roztokem 0,1% fenobarbitalu (v/v) v pitné vodě.

Při purifikaci CYP 2B4 v roce 2008 [44] pocházel králík domácí z chovu činčila velká. Jeho jaterní tkáň obsahovala ve větším množství CYP 1A2. Tato izoforma má podobné fyzikální vlastnosti jako CYP 2B4, jejich oddělení je tedy obtížné. Kvůli tomu byl celkový výtěžek předchozí purifikace nižší, stejně jako i čistota preparátu.

Proto byl pro izolaci vybrán králík domácí plemene novozélandský bílý. Množství CYP 1A2 v jaterní tkáni zvířete bylo dle SDS-PAGE a MALDI-TOF analýzy proteinových zón frakcí chromatografie HAP (1) významně nižší než v předchozím případě a došlo k úspěšné purifikaci CYP 2B4.

Jaterní tkáň pokusného zvířete byla homogenizována a diferenční centrifugací byla izolována mikrosomální frakce obsahující 1400 nmol P450. K solubilizaci mikrosomální frakce byly použity detergenty protaminsulfát, Emulgen E-911 a cholát sodný. Jejich přítomnost v roztoku umožnila uvolnění P450 ukotveného v lipidové membráně do roztoku, což bylo doprovázeno nabohacením P450 na 3000 nmol.

6.1.1. Purifikace cytochromu P450 2B4

Za účelem separace P450 od CPR a cyt b_5 byla provedena chromatografie na ionexové koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5. Při tomto pH jsou CYP 2B4 (pI 9,01) a také CYP 1A2 (pI 9,40) kladně nabitý a na anexové koloně se neváží. Izoformy P450 je možné oddělit na adsorčních kolonách hydroxylapatitu.

Naopak při tomto pH záporně nabitě proteiny, kterými jsou CPR (pI 5,38) a cyt b_5 (pI 5,16), jsou na koloně zachyceny. Z kolony je možné zachycené proteiny uvolnit gradientem iontové síly.

Kolona DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 měla rovněž sloužit k oddělení P450 od některých kontaminujících proteinů, jejichž pI je nižší než pH kolony. Jelikož v preparátu CYP 2B4 byla po chromatografii na koloně HAP (1), pH 7,5 přítomnost

kontaminujících složek stále významná, byla provedena hmotnostní analýza vybraných proteinových zón SDS-PAGE, která ukázala, že na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 nedošlo k úplnému oddělení epoxid hydrolasy 1 (pI 7,31), karboxylesterasy 1 (pI 6,19) a sérového albuminu (pI 5,85). Příčinou byla patrně jejich vysoká koncentrace v mikrosomální frakci a nízká kapacita použité ionexové kolony. Výše jmenované proteiny byly od CYP 2B4 úspěšně odděleny opakovanou chromatografií na ionexové koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (5), pH 7,5. Dalším krokem byla rechromatografie na koloně HAP (2), která významně přispěla k oddělení CYP 1A2 a tedy ke zvýšení čistoty našeho preparátu.

Detergenty cholát sodný a Emulgen E-911 nejsou vhodné pro *in vitro* rekonstituované systémy a cholát sodný navíc obsahuje karboxylovou skupinou, která může reagovat se zvoleným síťovacím činidlem (EDC), a tak interferovat při síťovacích experimentech. Poslední chromatografie na koloně hydroxylapatitu (3) proto sloužila ke snížení podílu detergentů v preparátu. Zároveň při ní došlo k zakoncentrování CYP 2B4. Zbylé detergenty byly v posledním kroku purifikace odstraněny adsorbci na silikagel. Z počátku vedlo postupné odstraňování detergentů ke zvýšení koncentrace aktivního CYP 2B4, opětovným opakováním postupu však začala převažovat nežádoucí adsorbce proteinu na silikagel. Koncentrace aktivního CYP 2B4 začala klesat, a proto bylo odstraňování detergentu adsorbci na silikagel ukončeno.

6.1.2. Purifikace NADPH: cytochrom P450 reduktasy

Při eluci CPR a cyt b_5 z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 gradientem KCl nedochází k jejich úplnému rozdělení (Obr. 9 na straně 37). Naproti tomu je v tomto chromatografickém kroku třeba oddělit protein tetrahydrofolát reduktasu, i za cenu ztráty purifikované CPR. Tento kontaminující protein by následnou afinitní chromatografií již nebyl z preparátu oddělen. Pokud by bylo třeba zvýšit výtěžek CPR, je nezbytné chromatografii na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B, pH 7,5 zopakovat.

V plánovaných síťovacích experimentech mapujících vazebnou doménu CPR a cyt b_5 by tetrahydrofolát reduktasa vadila, jelikož její molekulová hmotnost přibližně odpovídá teoretické molekulové hmotnosti kovalentního komplexu CPR-cyt b_5 a na SDS-PAGE by nedošlo k jejich odlišení.

K oddělení CPR od cyt b_5 a kontaminací byla použita afinitní chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0. Kolona silně interaguje s NADP⁺ dependentními

dehydrogenasami [43], a proto se na ni CPR selektivně zachytila. Po odmytí cyt b_5 a ostatních kontaminujících proteinů byla z kolony eluována pufrém obsahujícím NADP^+ , který je ligandem CPR. K uvolnění CPR dochází díky kompetici NADP^+ s afinitními skupinami nosiče. Chromatografie byla rovněž využita ke snížení obsahu detergentů v preparátu a k jeho zakoncentrování.

Použitý afinitní nosič byl při purifikaci CPR velice efektivní. Na koloně se nezachytila a protékla společně s cyt b_5 pouze CPR o celkové aktivitě nepřesahující 0,1 % původně nanášené aktivity. Následná SDS-PAGE eluovaných frakcí (Obr. 20 na straně 46) ukázala vysokou čistotu preparátu.

Posledním krokem purifikace bylo odstranění přítomných detergentů v preparátu adsorbí na silikagel, stejně jako v případě CYP 2B4. Omylem bylo k preparátu přidáno desetinasobné množství silikagelu. Kvůli této chybě aktivita CPR výrazně poklesla, na 56 % počáteční aktivity.

Tato chyba jednoznačně ukazuje, že vhodné množství použitého silikagelu a jeho postupné přidávky jsou nezbytné a vedou k optimálnímu poměru mezi ztrátou aktivity enzymu a množstvím odstraněného detergentu z preparátu.

6.1.3. Purifikace cytochromu b_5

Spojené frakce obsahující cyt b_5 eluované lineárním gradientem KCl z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B (1), pH 7,5 a frakce protečené kolonou 2',5'-ADP-Sepharosy 4B byly purifikovány na dalších ionexových kolonách DEAE-Sepharosy CL-6B, pH 8,1. Zvolený postup ionexových chromatografií byl optimální pro získání vysoce nabohaceného proteinu cyt b_5 .

Poslední chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (4) sloužila ke snížení množství detergentu v preparátu a k zakoncentrování cyt b_5 . Stejně jako v případě CYP 2B4 a CPR bylo posledním krokem purifikace odstranění detergentu adsorbí na silikagel.

Původně červený roztok preparátu cyt b_5 se během odstraňování detergentu téměř odbarvil. Podle červeného zbarvení výsledného sedimentu došlo téměř ke kvantitativní adsorbí cyt b_5 na silikagel. Po trojnásobném zředění preparátu proběhlo již odstranění detergentu bez problémů. Z toho vyplývá, že důležité je nejen množství přidaného silikagelu v poměru k množství proteinu, jak se ukázalo při odstraňování detergentu

z preparátu CPR, ale také koncentrace proteinu v preparátu. Ta ovlivňuje nežádoucí adsorpci proteinu na silikagel.

6.2. Fotoafinitní značení aktivního centra cytochromu P450 2B4

6.2.1. Purifikace fotoafinitní sondy

Použitá fotoafinitní sonda je derivátem benzfetaminu, nejedná se o komerčně dostupnou sloučeninu a její příprava je časově náročná. Pro naše experimenty byl využit preparát sondy připravený v roce 2005, skladovaný v temnu při teplotě 4 °C. Protože sonda obsahuje fotoaktivní azidovou skupinu, která se rozkládá UV zářením, byla testována účinnost fotoafinitní sondy sledováním její fotolýzy doprovázené poklesem absorpčního maxima při 250 nm. Dále byly pomocí TLC odstraněny přítomné rozkladné produkty sondy a kontaminace. Složení mobilní fáze bylo optimalizováno tak, aby v ní měla sonda retenční faktor přibližně 0,5 a bylo možné oddělit sondu od nečistoty s vyšší i nižší chromatografickou mobilitou. Jako optimální mobilní fáze byla nalezena směs methanolu a ethylacetátu v poměru 3:2 (v/v). Přečištěním zásobního roztoku bylo získáno 100 nmol sondy s výtěžkem 64 %.

Přečištěný roztok byl analyzován tandemovou hmotnostní spektrometrií, která sondu jednoznačně identifikovala a potvrdila čistotu preparátu (Obr. 26 na straně 53).

6.2.2. Diferenční spektrometrie

Diferenční spektrometrie umožňuje sledovat, zda a jakým způsobem se látky váží v aktivním centru P450.

Touto metodou byla charakterizována vazba sondy, diamantanu a sondy v přítomnosti diamantanu v aktivním centru CYP 2B4. Sonda vykazuje ligandový typ diferenčního centra, což napovídá, že se váže na centrální atom železa v aktivním centru CYP 2B4. Diamantan je známým substrátem CYP 2B4. Poskytuje diferenční spektrum typu I a váže se v aktivním centru na proteinovou část. Bylo nezbytné zjistit, zda diamantan zabráni vazbě fotoafinitní sondy v aktivním centru CYP 2B4 a může být použit jako negativní kontrola experimentu fotoafinitního značení CYP 2B4.

Experimenty byly provedeny s mikrosomální frakcí a s purifikovaným preparátem CYP 2B4. Protože se koncentrace P450 při experimentech lišila, byly naměřené hodnoty normalizovány na množství P450. Porovnání experimentů purifikovaného preparátu

a mikrosomální frakce je problematické, jelikož koncentrace CYP 2B4 v mikrosomální frakci není známa. Je známa pouze celková koncentrace všech přítomných izoform P450.

Látky zkoumané metodou diferenční spektrometrie jsou charakterizované spektrální disociační konstantou K_{SP} a maximálním rozdílem absorbancí ΔA_{MAX} , které jsou obdobou Michaelisovy konstanty K_M , resp. maximální rychlosti reakce V_{MAX} u rovnice enzymové kinetiky. Získané výsledky byly porovnány a ukazují, že se sonda v obou zvolených experimentálních modelech chová podobně.

Experimentální data ukázala, že se fotoafinitní sonda váže v aktivním centru CYP 2B4 na centrální atom železa hemu. Dále bylo zjištěno, že se diamantan váže na proteinovou část aktivního centra CYP 2B4 a jeho přítomnost v reakční směsi nezabrání ve vazbě sondy. Nicméně jeho přítomnost zvyšuje hodnotu K_{SP} přibližně $5\times$

Výsledky experimentů s mikrosomální frakcí jsou podobné, avšak s několika rozdíly. Substráty se v aktivním centru P450 mikrosomální frakce váží při jejich nižších koncentracích, avšak jejich saturační koncentrace je nižší než v případě preparátu CYP 2B4.

Možným vysvětlením je, že se mikrosomální frakce více než purifikovaný CYP 2B4 podobá nativním podmínkám a vazba substrátů je usnadněna přítomností membrány a dalších složek mikrosomální frakce. Vyšší saturační koncentrace CYP 2B4 je pak způsobena nepřítomností izoform P450, jejichž substrátem diamantan a sonda nejsou.

6.2.3. Fotoafinitní značení

Fotoafinitní značení aktivního centra CYP 2B4 bylo provedeno fotoafinitní sondou při různém složení reakční směsi. Cílem bylo zjistit, zda CYP 2B4 zaujímá odlišnou prostorovou konformaci v přítomnosti diamantanu či DLPC a zároveň ověřit výsledky diferenční spektrometrie, že diamantan neovlivňuje vazbu sondy.

DLPC je v reakční směsi náhradou *in vivo* lipidové složky mikrosomální frakce. Spektrofotometricky nebyl nalezen jeho vliv na délku a účinnost fotolýzy fotoafinitní sondy.

Při fotolýze vznikaly velmi reaktivní radikály, které mohly označit aktivní centrum CYP 2B4. Ihned po ukončení fotolýzy byly zbylé volné radikály odstraněny přidaným glutathionem.

Naše výsledky potvrdily jednoznačně předchozí experimenty Antonovič *et al.* [28] identifikací modifikovaného Arg 197. Dále LC-MS analýza potvrdila, že přítomnost diamantanu neovlivnila intenzitu a tedy i celkové množství sondou modifikovaného

peptidu. Tyto výsledky korelují se zjištěním diferenční spektrometrie a potvrdily, že diamantan jako substrát CYP 2B4 není schopen úplně vytěsnit ligandově vázanou sondu z aktivního centra. Proto přítomnost diamantanu není nejvhodnější volbou jako negativní kontrola experimentu fotoafinitního značení se sondou. Takovým vhodným substrátem by mohl být 7-pentoxyresorufin, jehož přeměna (O-dealkylace) je použitou sondou výrazně inhibována [28].

Získané výsledky identifikace modifikovaných peptidů LC-MS analýzou bude nutné ověřit fragmentací nalezených peptidů a *in silico* inkorporací sondy a diamantanu do modelu CYP 2B4 [26].

6.3. Chemické zesíťení cytochromu P450 2B4 a cytochromu b₅

Interakce CYP 2B4 s cyt b₅ byla pro experimentální potřeby stabilizována tvorbou kovalentních vazeb v místě přiblížení nabitých aminokyselinových zbytků síťovacím činidlem EDC.

Komplex obou cytochromů byl nejprve předběžně analyzován hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF s nižším rozlišením. Analýzou byl nalezen signál, který mohl odpovídat m/z intermolekulární vazbě mezi aminokyselinovým zbytkem 192D CYP 2B4 a aminokyselinovým zbytkem 19K cyt b₅ [44].

Přesnější LC-FTICR analýza existenci této intermolekulární vazby nepotvrdila. Ukázala však dvě interakční oblasti CYP 2B4 (aminokyseliny 126 – 145 a 423 – 443), dvě interakční oblasti cyt b₅ (19 – 33 a 90 – 94) a celkem čtyři interagující páry aminokyselinových zbytků (134D-19K, 424E-24K, 424E-91K a 439E-19K, v pořadí CYP 2B4-cyt b₅).

Gao *et al.* [8] provedl obdobné zesíťení CYP 2E1 s cyt b₅ pomocí EDC, a hmotnostní analýzou identifikoval dvě interakce 428K – 53D a 434K – 56E, v pořadí CYP 2E1-cyt b₅. Davydov *et al.* [45] označil metodou sekvenčního „alignmentu“ oblast aminokyselin 121 – 145 a Chang *et al.* [46] na základě homologního modelu a Bridgesová *et al.* [47] metodou místně cílené mutagenese oblast aminokyselin 116 – 134 u CYP 2B4 jako interakční oblast s cyt b₅. Šulc *et al.* [48] vychází ze známých krystalových struktur P450 a uvádí, že arginin 133 může plnit důležitou roli při vazbě redoxních partnerů CYP 2B4. Aminokyseliny 434 – 443 jsou známy jako oblast interakce CYP 2B4 s CPR a cyt b₅ [46] a aminokyselinové zbytky 422, 433 a 434 jsou spojovány s interakcí s CPR [49,50]. Naše výsledky biokonjugačních síťovacích experimentů identifikují interakční

oblasti CYP 2B4 a redoxních partnerů. Jsou v souladu s dřívějšími zjištěními, doplňují pohled na molekulární mechanismus interakce P450-redoxní partner, a ukazují na správnost námi zvolené techniky.

7. ZÁVĚR

Podářilo se izolovat cytochrom P450 2B4 v množství 310 nmol. Zároveň byla získána NADPH: cytochrom P450 reduktasa s celkovou aktivitou $4 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}$ a cytochrom b_5 , další složky MFO systému.

Byl optimalizován postup purifikace N-(p-azidobenzyl)-N-methyl-p-aminofenylaminu a tímto postupem bylo přečiřtěno 100 nmol této fotoafinitní sondy pro použití s purifikovaným preparátem cytochromu P450 2B4.

Diferenční spektrometrie potvrdila vazbu fotoafinitní sondy na centrální atom železa hemu v aktivním centru cytochromu P450 2B4. Pro tvorbu binárního komplexu fotoafinitní sondy s tímto proteinem byla stanovena spektrální disociační konstanta $34 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V aktivním centru cytochromu P450 2B4 se podařilo fotoafinitně označit Arg 197 ve vzdálenosti $16,5 \text{ \AA}$ od centrálního atomu železa hemu.

Bylo provedeno chemické zesíťení cytochromu P450 2B4 s cytochromem b_5 a nalezeny čtyři páry interagujících aminokyselinových zbytků 134D-19K, 424E-24K, 424E-91K a 439E-19K, v pořadí CYP 2B4-cyt b_5 .

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/190105.htm>
2. Dürr, U.H.N., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 3235-3259 (2007)
3. Dass, C.: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2007)
4. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York (2002)
5. Chang, Y.T., Stiffelman, O.B., Loew, G.H.: *Biochemie* **78**, 771-779 (1996)
6. Ortiz de Montellano, P.R.: *Cytochrome P450, Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004)
7. Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 499-506 (2005)
8. Gao, Q., Doneanu, C.E., Shaffer, S.A., Adman, E.T., Goodlett, D.R., Nelson, S.D.: *J. Biol. Chem.* **281**, 20404-20417 (2006)
9. Backes, W.L., Kelley, R.W.: *Pharmacol. Ther.* **98**, 221-233 (2003)
10. Peterson, J.A., Graham, S.E.: *Structure* **6**, 1079-1085 (1998)
11. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378 (1964)
12. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737-747 (2001)
13. Bernhardt, R.: *J. Biotechnol.* **124**, 128-145 (2006)
14. Vatsis, K.P., Peng, H.M., Coon, M.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 128-38 (2005)
15. Johnson, E.F., Stout, C.D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 331-336 (2005)
16. Zhao, Y., Halpert, J.R.: *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 402-412 (2007)
17. Czekaj, P.: *Acta Biochim. Pol.* **47**, 1093-1105 (2000)
18. Iyanagi, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 520-528 (2005)
19. Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Hara, T., Noguchi, M.: *Protein Expression Purif.* **29**, 1-7 (2003)
20. Sevrinoukova, I.F., Peterson, J.A.: *Biochimie* **77**, 562-572 (1995)
21. Schenkman J.B., Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.* **97**, 139-152 (2003)
22. Vergeres, G., Waskell, L.: *Biochemie* **77**, 604-620 (1995)
23. Estabrook, R.W., Werringloer, J.: *Methods Enzymol.* **52**, 212-220 (1978)
24. <http://piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=02030312>
25. Robinette, D., Neamati, N., Tomer, K.B., Borchers, C.H.: *Expert Rev. Proteomics* **3**, 399-408 (2006)
26. Hodek, P., Sopko, B., Antonovič, L., Šulc, M., Novák, P., Strobel, H.W.: *Gen. Physiol. Biophys.* **23**, 467-488 (2004)

27. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00865>
28. Antonovič, L., Hodek, P., Smrček, S., Novák, Šulc, M., P., Strobel, H.W.: Arch. Biochem. Biophys. 370, 2008-215 (1999)
29. Narasimhulu, S., Havran, L.M., Axelsen, P.H., Winkler, J.D.: Arch. Biochem. Biophys. 353, 228-238 (1998)
30. Narasimhulu, S.: Biochim. Biophys. Acta 1770, 360-375 (2007)
31. Herbert, G.C., Johnstone, R.A.W.: Mass Spectrometry Basics. CRC Press, Boca Raton, Florida (2002)
32. Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., Jackson, G.S.: Mass Spectrom. Rev. 17, 1-35 (1998)
33. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html
34. <http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/magnetacademy/fticr/>
35. Zach, J.: Objasnění vztahu struktury a funkce systému cytochromu P450 pomocí fotolabilních sond: Diplomová práce, PřF UK, Praha, katedra biochemie (2007)
36. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: Anal Biochem. 150, 76-85 (1985)
37. Vermilion, J.L., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 253, 2694-2704 (1978)
38. Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-685 (1970)
39. Van der Hoeven, T.A., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 249, 6302-6310 (1974)
40. http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html
41. Hodek, P.: Studium aktivního centra cytochromu P-450 pomocí sloučenin diamantoidního typu: Kandidátská disertační práce, PřF UK, Praha, katedra biochemie (1992)
42. <http://www.michrom.com/LinkClick.aspx?fileticket=aTJKKWN6Doo%3d&tabid=86>
43. <http://www.ebiotrade.com/GE/AKTAclub7/1.PDFs/71709200AC.pdf>
44. Ječmen, T.: Mapování protein-proteinových interakcí (cytochrom P450 2B4 a cytochrom b₅) metodami chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie: Bakalářská práce, PřF UK, Praha, katedra biochemie (2007)
45. Daxydov, D.R., Darovsky, B.V., Dedinsky, I.R., Kanaeva, I.P., Bachmanova, G.I., Blinov, V.M. Archakov, A.I.: Arch. Biochem. Biophys. 297, 304-313 (1992)
46. Chang, Y.-T., Stiffelman, O.B., Vakser, I.A., Loew G.H., Bridges, A., Waskell, L.: Protein Eng. 10, 119-129 (1997)
47. Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.-T., Vakser, I.A., Loewi, G., Waskell, L.: J. Biol. Chem. 273, 17036-17049 (1998)
48. Šulc, M., Hudeček, J., Stiborová, M., Hodek, P.: Neuroendocrinol. Lett. 29, 722-727 (2008)
49. Shen, S., Strobel, H.W.: Arch. Biochem. Biophys. 304, 257-265 (1993)

50. Shimaza, T., Tateishi, T., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y.: J. Biol. Chem. 266, 3372-3375 (1991)

Příloha 1: Proteiny charakterizované pomocí MS metody “Peptide Mass Fingerprint” s pomocí prohledávacích programů MASCOT nebo ProFound.

Legenda: Mowse Score (Probability Based Mowse score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 61 are significant ($p < 0.05$)), ProFound Est'd Z (The estimated Z score 2.326 corresponds to 99.0 percentile in an estimated random match population). MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu>).

Protein	Označení proteinu	Název proteinu	MW (Da)	pI	Mowse score	ProFound Est'd Z	Pokrytí sekvence (%)	Přiřazené/prohledávané peptidy
1A	CP2B4_RABIT	Cytochrome P450 2B4 (Oryctolagus cuniculus)	55678	9.01	134	1.24	39	18/40
1A	HYEP_RABIT	Epoxide hydrolase 1 (Oryctolagus cuniculus)	52478	7.31	111	1.36	40	17/40
2A	EST1_RABIT	Liver carboxylesterase 1 (Oryctolagus cuniculus)	62252	6.19	133	2.41	32	13/16
3A	ALBU_RABIT	Serum albumin (Oryctolagus cuniculus)	68865	5.85	76	2.31	18	12/24
4A	CP1A2_RABIT	Cytochrome P450 21A2 (Oryctolagus cuniculus)	58297	9.40	114	2.41	22	12/17
1B	CP2B4_RABIT	Cytochrome P450 2B4 (Oryctolagus cuniculus)	55678	9.01	188	2.33	40	18/24
CYP 2B4	CP2B4_RABIT	Cytochrome P450 2B4 (Oryctolagus cuniculus)	55678	9.01	369	2.37	70	30/33
CPR	NCPR_RABIT	NADPH--cytochrome P450 reductase (Oryctolagus cuniculus)	76540	5.38	227	2.39	42	27/34
Cyt b ₅	CYB5_RABIT	Cytochrome b ₅ (Oryctolagus cuniculus)	15340	5.16	141	2.00	81	9/13

