

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



**Kooperativita složek systému cytochromů P450 a ovlivnění  
metabolismu léčiv a karcinogenů**

**Co-operativity of cytochrome P450 system and its impact  
on drug and carcinogen metabolism**

Bakalářská práce

Petr Holý

Školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne .....

.....

Petr Holý

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za vedení práce a pomoc při jejím vypracovávání.

Dále děkuji RNDr. Tomáši Ječmenovi za trpělivou pomoc při práci v laboratoři, cenné rady a provedené hmotnostní analýzy.

## Abstract

The system of mixed-function oxidases (MFO system) has a significant role in metabolism of many endogenous compounds, as well as xenobiotics (for ex. carcinogens, drugs). Membrane-bound haemoproteins called cytochromes P450 are a vital part of that system. Reactions catalyzed by cytochromes P450 are influenced by another protein of the MFO system, cytochrome b<sub>5</sub>. The mechanism of this cyt b<sub>5</sub> agency has not yet been fully described. One of methods used for study of this protein-protein interaction is covalent cross-linking. By replacing one of three methionines in the cyt b<sub>5</sub> structure by a photo-reactive analogue (photo-methionine), an analogue of cyt b<sub>5</sub> (photo-cyt b<sub>5</sub>) can be obtained. When activated by UV radiation, the protein covalently bonds cytochrome P450 in a membrane environment.

This paper focuses on expression and isolation of a recombinant cyt b<sub>5</sub> analogue with only one methionine position (96) in the protein structure and substitution by photo-methionine. Protein was purified in a yield of 6 mg from 1 liter of bacterial suspension. Analysis by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) showed methionine to have been substituted by the photo-reactive analogue in approx. 30 %. Photo-cyt b<sub>5</sub> was used to fixate transient protein-protein interactions with cytochrome P450 2B4 (CYP2B4). Photo-cyt b<sub>5</sub> was reconstituted in a lipid system with CYP2B4 and photolyzed. With SDS electrophoresis, 3 heterooligomers were found. Peptide mapping showed presence of both the peptides originating from cyt b<sub>5</sub> and CYP2B4 in all of the three complexes.

### Keywords:

NADPH:cytochrome P450 oxidoreductasa, cytochrome b<sub>5</sub>, protein expression, photocrosslinking

[IN CZECH]

## Abstrakt

Systém oxidace se smíšenou funkcí (MFO systém) hraje důležitou roli v metabolismu mnoha endogenních látek a xenobiotik (např. karcinogenů, léčiv). Membránové hemoproteiny nazývané cytochromy P450 jsou zásadní složkou tohoto systému. Reakce katalyzované cytochromy P450 jsou ovlivňovány působením jiného proteinu MFO systému, a to cytochromem b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>). Mechanismus, jakým cyt b<sub>5</sub> působí, ještě nebyl zcela objasněn. Jednou z možností studia této protein-proteinové interakce je metoda kovalentního síťování. Záměnou methioninu ve struktuře cyt b<sub>5</sub> za jeho foto-aktivovatelný analog (foto-methionin) je možné připravit analog cyt b<sub>5</sub> (foto-cyt b<sub>5</sub>), který po aktivaci UV zářením kovalentně váže cytochrom P450 v membránovém prostředí.

Tato práce se zabývá expresí a izolací rekombinantního analogu cyt b<sub>5</sub> s pouze jednou pozicí pro methionin (96) v primární struktuře proteinu a jeho substitucí za foto-methionin. Protein byl purifikován s výtěžkem 6 mg na 1 l bakteriální suspenze. Analýza hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF/TOF) ukázala, že methionin byl v sekvenci substituován foto-reaktivním analogem z asi 30 % (pokrytí sekvence 77 %). Foto-cyt b<sub>5</sub> byl použit k fixování transienční protein-proteinové interakce s cytochromem P450 2B4 (CYP2B4). Foto-cyt b<sub>5</sub> byl rekonstituován v lipidovém systému s CYP2B4 a fotolyzován. Pomocí SDS elektroforézy byly identifikovány 3 vzniklé heterooligomery. Peptidové mapování ukázalo přítomnost peptidů cyt b<sub>5</sub> i CYP2B4 ve všech třech vzniklých heterooligomerních komplexech.

### **Klíčová slova:**

NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytochrom b<sub>5</sub>, exprese proteinu, fotosíťování

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Seznam použitých zkratk</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>1. Úvod</b> .....   | <b>11</b> |
| 1.1. Systém oxygenas se smíšenou funkcí .....                                      | 11        |
| 1.1.1. Cytochromy P450.....  | 12        |
| 1.1.1.1. Struktura cytochromů P450 .....   | 12        |
| 1.1.1.2. Reakce cytochromu P450.....   | 14        |
| 1.1.1.3. Reakční cyklus cytochromu P450.....                                       | 15        |
| 1.1.2. Cytochrom b <sub>5</sub> .....  | 17        |
| 1.1.2.1. Struktura cytochromu b <sub>5</sub> .....                                 | 17        |
| 1.1.2.2. Ovlivnění cytochromu P450 cytochromem b <sub>5</sub> .....                | 19        |
| 1.2. Metody studia proteinové struktury .....                                      | 20        |
| 1.2.1. Síťovací techniky .....   | 21        |
| 1.2.1.1. Síťovací činidla .....  | 21        |
| 1.2.1.2. Síťování pomocí foto-aktivovatelných skupin.....                          | 22        |
| 1.2.2. Inkorporace foto-aktivovatelných aminokyselin do proteinové struktury ..... | 24        |
| <b>2. Cíl práce</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>3. Materiál a metody</b> .....  | <b>27</b> |
| 3.1. Materiál a chemikálie .....   | 27        |
| 3.2. Použité pufrы a jiné roztoky .....  | 28        |
| 3.3. Použité přístroje .....   | 31        |
| 3.3. Metody .....  | 31        |
| 3.3.1. Analytické metody .....   | 31        |
| 3.3.1.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.....                           | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.1.2. Stanovení koncentrace foto-cyt b <sub>5</sub> z absolutního spektra .....                      | 32        |
| 3.3.1.3. Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného..... | 33        |
| 3.3.2. Příprava rekombinantního foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....                                    | 34        |
| 3.3.2.1. Transformace bakterií .....  | 34        |
| 3.3.2.2. Kultivace bakterií a produkce foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....                             | 34        |
| 3.3.3. Izolace foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....   | 35        |
| 3.3.3.1. Izolace membránové frakce .....  | 35        |
| 3.3.3.2. Titrace heminem.....   | 36        |
| 3.3.3.3. Solubilizace foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....  | 36        |
| 3.3.3.4. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF.....   | 36        |
| 3.3.4. Fotolýza foto-cyt b <sub>5</sub> rekonstituovaném v systému s CYP2B4.....                        | 37        |
| <b>4. Výsledky .....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1. Příprava foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....  | 38        |
| 4.1.1. Kultivace bakterií .....   | 38        |
| 4.1.2. Produkce foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....  | 39        |
| 4.2. Izolace foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....   | 40        |
| 4.2.1. Izolace membránové frakce a solubilizace foto-cytochromu b <sub>5</sub> .....                    | 40        |
| 4.2.2. Titrace heminem.....   | 41        |
| 4.2.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF.....   | 43        |
| 4.2.4. Charakterizace finálního preparátu foto-cyt b <sub>5</sub> .....                                 | 48        |
| 4.3. Fotolýza v systému s CYP2B4.....   | 50        |
| <b>5. Diskuze .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>6. Shrnutí.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>Seznam použité literatury.....</b>   | <b>55</b> |

## Seznam použitých zkratek

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>AK</b>                     | aminokyselina   |
| <b>Amp</b>                    | ampicilin   |
| <b>AMP</b>                    | adenosinmonofosfát  |
| <b>ATP</b>                    | adenosintrifosfát   |
| $A_x$                         | absorbance při vlnové délce x nm                                |
| $A_{max}$                     | absorpční maximum   |
| <b>BCA</b>                    | 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina                     |
| <b>BIS</b>                    | N,N-methylen-bis-akrylamid                                      |
| <b>BSA</b>                    | hovězí sérový albumin   |
| $c$                           | molární koncentrace   |
| <b>CBB</b>                    | Coomassie Brilliant Blue  |
| <b>CPR</b>                    | NADPH:cytochrom P450 reduktasa                                  |
| <b>cyt b<sub>5</sub></b>      | cytochrom b <sub>5</sub>  |
| <b>cyt b<sub>5</sub>R</b>     | NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa                         |
| <b>CYP</b>                    | cytochrom P450  |
| <b>Da</b>                     | dalton  |
| <b>DEAE</b>                   | diethylaminoethyl   |
| <b>DSS</b>                    | disukcinimidylsüberát   |
| <b>DSG</b>                    | disukcinimidylglutarát  |
| <i>E. coli</i>                | <i>Escherichia coli</i>   |
| <b>EDC</b>                    | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid<br>hydrochlorid   |
| <b>EDTA</b>                   | ethylendiamintetraoctová kyselina                               |
| <b>FAD</b>                    | flavinadenindinukleotid   |
| <b>FADH/FADH<sub>2</sub></b>  | flavinadenindinukleotid –<br>semichinoidníradikál/hydrochinon   |
| <b>FMN</b>                    | flavinadeninmononukleotid                                       |
| <b>FMNH/FMNH<sub>2</sub></b>  | flavinadeninmononukleotid-<br>semichinoidní radikál/hydrochinon |
| <b>foto-cyt b<sub>5</sub></b> | foto-cytochrom b <sub>5</sub>                                   |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>His</b>                  | histidin  |
| <b>Ile</b>                  | isoleucin   |
| <b>IPTG</b>                 | isopropylthio- $\beta$ -D-galaktopyranosid  |
| <b><i>l</i></b>             | optická dráha   |
| <b>LB</b>                   | Luria Broth   |
| <b>Leu</b>                  | leucin  |
| <b>Lys</b>                  | lysin   |
| <b>M</b>                    | mol $\cdot$ l <sup>-1</sup>   |
| <b>MALDI-TOF</b>            | matrix assisted laser desorption-ionization - time of flight  |
| <b>Met</b>                  | methionin   |
| <b>MFO</b>                  | system oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „mixed-function oxidases“)   |
| <b><i>M<sub>r</sub></i></b> | relativní molekulová hmotnost   |
| <b>mRNA</b>                 | mediátorová ribonukleová kyselina (messenger RNA)   |
| <b>MWCO</b>                 | hodnota nejnižší molekulové hmotnosti molekul, které jsou z 90 % zachyceny membránou (z angl. „molecular weight cut-off“)                   |
| <b>NADP+</b>                | nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný   |
| <b>NADPH</b>                | nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný  |
| <b>NMR</b>                  | nukleární magnetická rezonance  |
| <b>OD<sub>600</sub></b>     | optická denzita při 600 nm  |
| <b>P450</b>                 | cytochrom P450  |
| <b>PBS</b>                  | fosfátový pufr obsahující NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , a NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (z angl. „phosphate buffered saline“) |
| <b>Phe</b>                  | fenylalanin   |
| <b>pMet</b>                 | L-2-amino-5,5'-azihexanová kyselina (L-foto-methionin)  |
| <b>RH</b>                   | substrát  |
| <b>ROH</b>                  | hydroxylovaný produkt   |
| <b>RPM</b>                  | otáčky za minutu (z angl. „revolutions per minute“)   |
| <b>SDS</b>                  | dodecylsulfát sodný (z angl. „sodium dodecylsulfate“)   |
| <b>TEMED</b>                | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin  |
| <b>Thr</b>                  | threonin  |
| <b>TRIS</b>                 | tris(hydroxymethyl)aminomethan  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>tRNA</b>     | transferová ribonukleová kyselina                  |
| <b>UV</b>       | ultrafialové záření                                |
| <b>v/v</b>      | objem/objem  |
| <b>Val</b>      | valin  |
| <b>VIS</b>      | viditelné záření                                   |
| <b>w/v</b>      | hmotnost/objem                                     |
| <b>XOOH</b>     | peroxokyselina                                     |
| $\epsilon_x$    | absorpční molární koeficient při vlnové délce x nm |
| $\lambda_{max}$ | vlnová délka absorpčního maxima                    |

# 1. Úvod

Moderní lidská společnost žije v prostředí obrovského množství xenobiotik. Xenobiotika jsou takové chemické látky, které se v daném organismu přirozeně nevyskytují, a správná funkce organismu není nijak závislá na jejich příjmu. Mezi nejčastější skupiny xenobiotik, s nimiž člověk přichází do styku, patří environmentální polutanty – především vedlejší produkty průmyslu a dopravy. Druhou velkou skupinu tvoří látky záměrně člověkem přijímané – léčiva. S neustále rostoucím počtem nových látek v prostředí stoupá i význam studia jejich vlivu na organismy, především na člověka.

Zatímco polární látky mohou být díky jejich rozpustnosti ve vodě z organismu vyloučeny bez nutnosti jejich úprav, nepolární látky zpravidla podstupují biotransformaci za účelem zvýšení polaritativy jejich molekul. Biotransformace může mít mnoho kroků a meziproduktů, v závislosti na substrátu. Může docházet například k nežádoucí aktivaci prokarcinogenu na karcinogen, ale i k žádoucí přeměně neaktivní formy léčiva na formu účinnou, čehož se využívá ve farmakologii [1, 2]. Stejně tak je možné, že je léčivo ještě před dosažením místa účinku přeměněno na neaktivní formu. Pro toxikologii a farmakologii je naprosto zásadní znalost mechanismů, kterými xenobiotika působí na živé systémy, ale také jak jsou dále přeměňována a vylučována, případně bioakumulována.

## 1.1. Systém oxygenas se smíšenou funkcí

Jedním z nejdůležitějších systémů biotransformace xenobiotik je mikrosomální systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed-function oxidases“). Tento enzymový systém je zodpovědný za přeměnu velkého množství látek cizorodých, ale i endogenních [3]. Na počtu unikátních reakcí metabolismu léčiv se podílí z až 75 % [4], podle některých zdrojů až 90 % [5, 6].

Proteiny MFO systému jsou u eukaryotních organismů ukotveny v membráně endoplazmatického retikula, v největší míře se nacházejí v jaterních buňkách. Systém tvoří cytochrom P450 (P450), cytochrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>), NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR) a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasa (cyt b<sub>5</sub>R). Cytochrom P450 je hlavní složkou provádějící biotransformaci substrátu, zatímco CPR a cyt b<sub>5</sub> představují jeho redoxní partnery. Cytochrom b<sub>5</sub> s cytochromy P450 interaguje dosud ne zcela objasněným

mechanismem. Bylo prokázáno, že přítomnost cytochromu b<sub>5</sub> může stimulovat nebo inhibovat funkci cytochromu P450, v některých případech i měnit poměr vzniklých produktů [7]. Odhalení tohoto mechanismu by znamenalo podstatný posun ve studiu MFO systému. Z tohoto důvodu je výzkum této protein-proteinové interakce velmi významný [8].

### **1.1.1. Cytochromy P450**

Skupina cytochromů P450 je superrodina enzymů čítající více než 21 000 zástupců [9]. Jedná se o hemoproteiny červené barvy („P450“ jako „pigment“), s absorpčním maximem tzv. Soretova pásu, v oblasti 380-420 nm [10]. Již při objevu prvního cytochromu P450 v roce 1958 bylo zjištěno, že tento pigment v redukovaném stavu velmi silně váže molekulu oxidu uhelnatého (podobně jako hemoglobin), což je doprovázeno posunem absorpčního maxima k 450 nm (odtud číslo v názvu) [11]. Cytochromy P450 byly nalezeny v prokaryotních i eukaryotních organismech a evolučně jsou velmi staré [12, 13, 14].

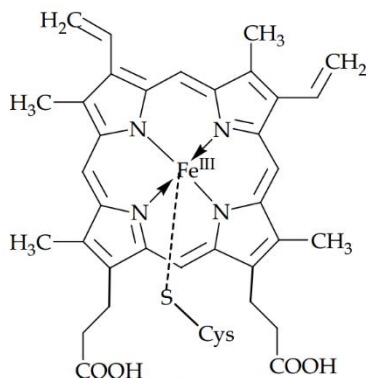
Protože cytochromů P450 byly objeveny tisíce a další se stále objevují, byla zavedena jejich systematická nomenklatura. Superrodina se dělí do rodin a podrodin v závislosti na míře sekvenční shody izoform proteinu. Pokud se aminokyselinová sekvence izoform shoduje ze 40 %, spadají do stejné rodiny. Pokud se shoduje z 55 %, náleží navíc do stejné podrodiny. Základem názvu cytochromu je zkratka „CYP“, následovaná číslem rodiny, písmenem podrodiny a číslem konkrétní izoformy, např. „CYP1A2“ [10].

#### **1.1.1.1. Struktura cytochromů P450**

Molekulová hmotnost proteinové části cytochromu P450 se pohybuje okolo 50 000 Da [15]. Cytochromy P450 jsou ukotveny v membráně pomocí hydrofobní domény na N-terminálním konci, která je ve formě  $\alpha$ -helixu. Primární struktura P450 je sice u zástupců různých říší organismů odlišná, sekundární a terciární struktury se však podobají. Všechny P450 obsahují 12  $\alpha$ -helixů a 4 struktury  $\beta$ -skládaného listu. Na tzv. proximální straně, která je velmi konzervovaná, se nachází vazebná místa pro redoxní partnery. Vazebná místa pro CPR a cyt b<sub>5</sub> se překrývají, nejsou však identická. Ve středu molekuly je zanořena prosthetická skupina protoporfyrinu IX s vázaným kationtem železa (hem). Distální strana

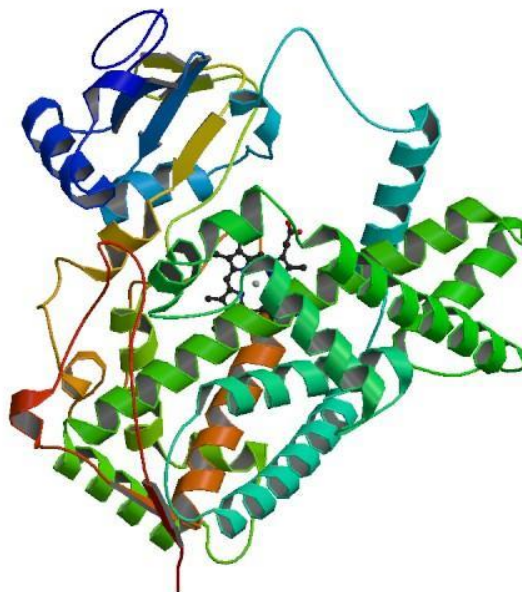
obsahuje přístupový kanál pro substrát do středu molekuly. Distální strana je z důvodu značného množství sloučenin, které P450 katalyzují, velmi variabilní [8].

Cytochromy P450 je možno správněji nazývat hemthiolátovými proteiny, což je označení lépe vystihující jejich stavbu – prosthetická skupina je vázána na proteinovou část koordinačně-kovalentní vazbou hemového železa a thiolátové síry cysteinu (Obr. 1) [8]. V typických cytochromech je hem vázán pomocí imidazolového zbytku histidinu, což činí název „cytochrom P450“ poněkud zavádějícím.



**Obr. 1: Vazba hemu na cystein cytochromu P450. Převzato z [16].**

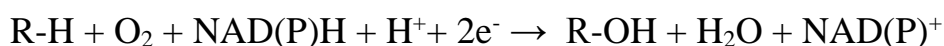
Strukturní modely jsou získávány především metodou rentgenové krystalografie. Její použití ale komplikuje fakt, že hydrofobní membránová doména výrazně ztěžuje krystalizaci P450. Většina studií proto pracuje s proteinem, z něhož je tato doména odstraněna, tedy pouze s tzv. solubilní doménou [8]. Příklad struktury cytochromu P450 (králíčí CYP2B4) vyřešené pomocí rentgenové krystalografie je uveden na Obr. 2, str. 14.



**Obr. 2: Struktura králičího mikrosomálního CYP2B4 vyřešená krystalograficky.**  
*Převzato z [17].*

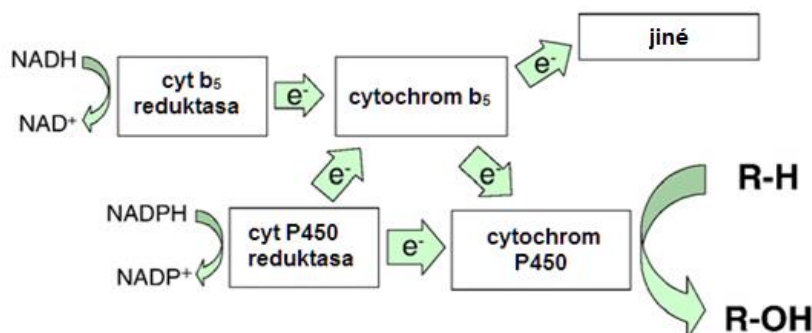
#### 1.1.1.2. Reakce cytochromu P450

Cytochromy P450 se podílí zejména na první fázi biotransformace xenobiotik, ale přeměňují i endogenní látky. Účastní se například biosyntézy mastných kyselin, ikosanoidů, sterolů a vitamínů. Katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce, které jsou součástí metabolických drah mnoha látek [8]. Typickou reakcí P450 je monooxygenace:

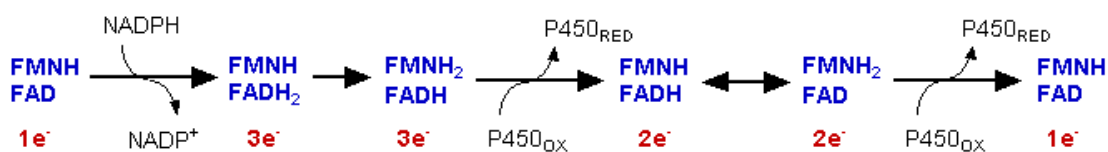


Substrát získává hydroxylovou skupinu, jejíž kyslíkový atom pochází z molekuly kyslíku. Druhý atom kyslíku se redukuje za spotřeby dvou protonů na vodu. Dva elektrony, které jsou potřeba pro jeho redukci, mohou být dodány systémem tří proteinů: NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CPR), cytochromu b<sub>5</sub> a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy [10]. Tyto tři enzymy tvoří transportní systém elektronů, potřebných pro funkci P450 (Obr. 3, str. 15). CPR slouží jako dělič elektronového páru (Obr. 4, str. 15). Je to flavoprotein obsahující koenzymy FMN i FAD. Postupným předáváním elektronů mezi NADPH, FAD a FMN je schopna dodat P450 elektrony postupně v různých fázích jeho reakčního cyklu (Obr. 5, str. 16). P450 může být redukován jak CPR, tak cyt b<sub>5</sub>. Obdobně cyt b<sub>5</sub> není

redukován pouze NADH:cyt b<sub>5</sub> reduktasou, ale i CPR. Cyt b<sub>5</sub> může elektron předávat i jiným systémům než pouze P450 (Obr. 3).



**Obr. 3: Schéma elektronového transportu v MFO systému.** Elektrony může P450 získat jak z CPR, tak z cyt b<sub>5</sub>. Cyt b<sub>5</sub> může být redukován jak cyt b<sub>5</sub>R, tak CPR. Cyt b<sub>5</sub>R ke své redukci využívá NADH, zatímco CPR využívá NADPH. Převzato z [8] a upraveno.

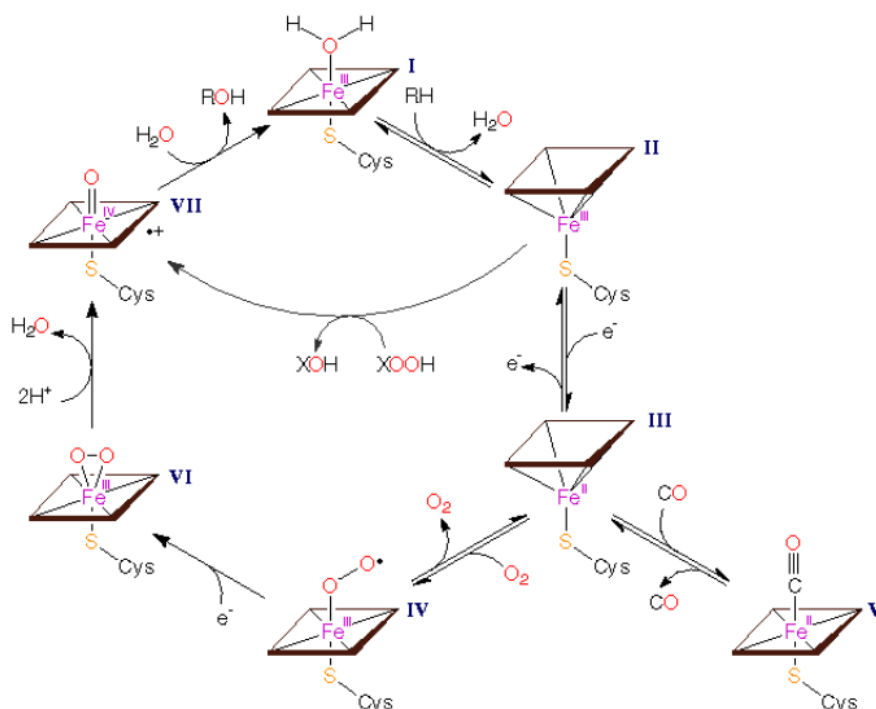


**Obr. 4: Transport elektronů z NADPH na P450 pomocí CPR.** FMN a FAD umožňují CPR plnit funkci děliče elektronového páru. Převzato z [18].

### 1.1.1.3. Reakční cyklus cytochromu P450

Oxygenace substrátu cytochromem P450 probíhá mechanismem znázorněným na Obr. 5, str. 16: **I** – V klidovém stavu se ion železa prosthetické skupiny nachází jako hexakoordinovaný v centru porfyrinového kruhu, v oxidačním stavu 3<sup>+</sup> a s navázanou vodou. **II** - Navázáním substrátu do aktivního místa P450 se voda odštěpí a ion železa se stává pentakoordinovaným. **III** – NADPH:cyt P450 oxidoreduktasa dodá iontu Fe<sup>3+</sup> elektron a zredukuje ho na Fe<sup>2+</sup>. **IV** – Na ion železa se váže molekula kyslíku za tvorby nestabilního komplexu superoxidového anionradikálu, železo je opět hexakoordinováno. Železo ve formě

$\text{Fe}^{2+}$  ale také může ochotně koordinovat například oxid uhelnatý (V). **VI** - Další elektron, tentokrát dodaný CPR nebo cyt  $b_5$ , umožní dočasné vytvoření druhé vazby kyslík-železo. **VII** – Pomocí dvou protonů je štěpena molekula kyslíku, přičemž jeden kyslíkový atom se redukuje a s protony odchází ve formě vody. Na P450 zůstává druhý atom kyslíku, který vytvoří tzv. ferrioxenový komplex. Kyslík je zde ve formě radikálu a je schopen vytrhnout vodík z molekuly substrátu, čímž se vytvoří na hemu vázaný hydroxylový radikál a zároveň radikál ze substrátu. Rekombinací radikálů vznikne hydroxylovaný produkt, který se uvolní, a na hem se opět naváže voda (I). P450 mohou jako zdroje aktivovaného kyslíku využít také peroxokyseliny nebo peroxidy, které dokáží ze struktury II vytvořit přímo komplex VII [19].



**Obr. 5: Reakční cyklus cytochromu P450.** Obsahuje i znázornění využití peroxokyseliny (XOOH) jako donoru kyslíku. Znázorňuje také možnou tvorbu komplexu s CO za posunu absorpčního maxima k 450 nm. Převzato z [20].

Donorem elektronu pro cytochrom  $b_5$  v MFO systému může být jak NADH:cytochrom  $b_5$  oxidoreduktasa [21], tak CPR [22]. Cytochrom  $b_5$  pak dokáže předat elektron cytochromu P450, ne však jeho oxidované formě ( $\text{Fe}^{3+}$ , viz Obr. 5, str. 16), ale jen jeho formě předem redukované jedním elektronem. Důvodem jsou rozdíly v redoxních potenciálech interagujících proteinů. Redukovaný cytochrom  $b_5$  má redoxní potenciál o

několik desítek mV vyšší oproti oxidované formě  $\text{Fe}^{3+}$  cytochromu P450. Redukcí  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  ale redoxní potenciál P450 stoupne dostatečně na to, aby bylo umožněno přijetí elektronu od cyt  $b_5$  [23, 24]. Druhý elektron pro P450 nemusí zákonitě pocházet z cyt  $b_5$ , velmi často je donorem opět CPR (viz Obr. 3, str. 15.)

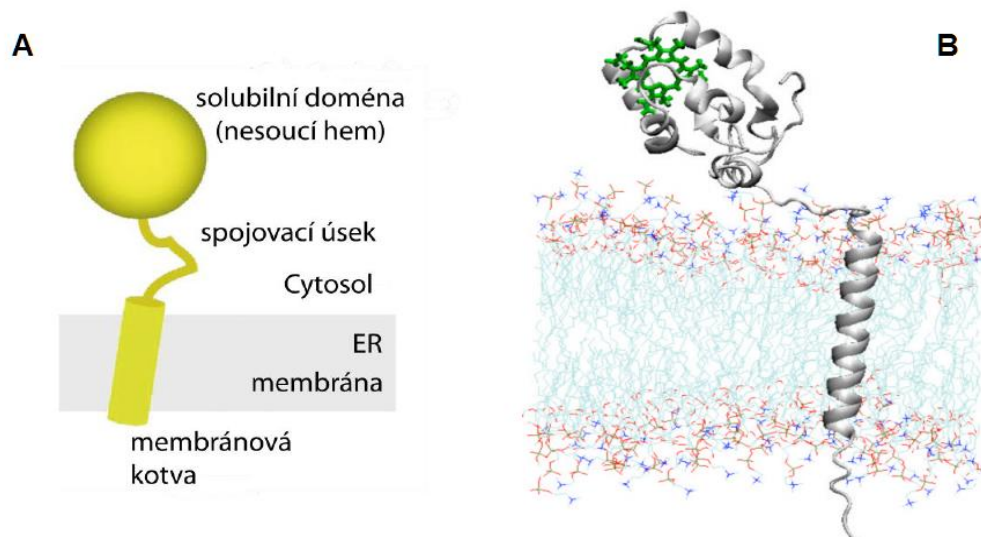
### 1.1.2. Cytochrom $b_5$

Cytochromy  $b_5$  jsou zpravidla membránové hemoproteiny endoplasmatického retikula nebo mitochondrií, podílející se zejména na interakcích, při nichž dochází k přenosu elektronů. Z evolučního hlediska patří mezi velmi staré proteiny a objeveny byly nejen u živočichů, ale také u bakterií, rostlin a hub [25]. Od jejich objevu v padesátých letech minulého století [26-28] bylo nalezeno a popsáno velké množství izoforem napříč říšemi života.

#### 1.1.2.1. Struktura cytochromu $b_5$

Cytochrom  $b_5$  může být buď membránový (mikrosomální a mitochondriální) nebo rozpustný, který se nachází v cytoplazmě erytrocytů [29]. Mikrosomální cytochrom  $b_5$  je oproti mitochondriálnímu mnohem lépe prozkoumán, co se týče struktury i funkce [25].

Proteinová část cytochromu  $b_5$  má molekulovou hmotnost asi 17 kDa [23]. Tvoří ji větší, cca 100 aminokyselin dlouhá hydrofilní N-terminální doména, exponovaná v cytosolu a obsahující hemovou prosthetickou skupinu; dále pak menší, asi 25 aminokyselin dlouhá hydrofobní C-terminální doména, kotvící protein v membráně. Obě domény propojuje úsek o délce 14 nebo 15 aminokyselin (angl. „linker“). Spojovací úsek netvoří uspořádanou sekundární strukturu a je velmi flexibilní, čímž napomáhá funkci enzymu. Pokusy s králičím cyt  $b_5$  se zkráceným úsekem ukázaly, že pro správnou funkci CYP2B4 stačí úsek o délce 7 aminokyselin. Jakékoliv další zkrácení znamenalo úplnou ztrátu funkce. Naopak prodloužení nepřineslo žádnou funkční změnu [8]. Na funkci enzymu nemělo vliv ani obrácení aminokyselinové sekvence tohoto úseku. Velká doména je tvořena jak  $\alpha$ -helixy, tak  $\beta$ -skládanými listy, zatímco malá kotvící doména je  $\alpha$ -helikální (Obr.6) [30-32].



**Obr. 6: Membránová topologie a struktura cytochromu b<sub>5</sub>.** A – Topologie. Převzato z [8] a upraveno, B – Struktura králičího cyt b<sub>5</sub> zjištěná pomocí metody NMR. Hem vyznačen zeleně. Převzato z [32] a upraveno.

V cytochromu b<sub>5</sub> se nacházejí tři methioniny – dva v kotvicí doméně a jeden ve spojovacím úseku. Čtvrtý, N-terminální methionin je odštěpován při expresi (Obr. 7, str. 19). Znalost počtu a poloh molekul methioninu je důležitá pro tuto práci, jejímž cílem je připravit cyt b<sub>5</sub>, jenž má jeden z methioninů substituován za foto-methionin.

(M)AAQSDKDVKYYTLEEIKKHNHNSKSTWLILHHKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQ  
 AGGDATENFEDVGHSTDARELSKTFIIGELHPDDR**SKLSKPM**ETLIT**VDSNSSWW**  
 TNWVIPAISALIVALMYRLYMADD

**Obr. 7: Primární struktura králičího cytochromu b<sub>5</sub>.** Podtržené jsou methioniny, černě solubilní katalytická doména, červeně spojovací úsek, modře hydrofobní kotvicí doména. Sekvence z [8].

### 1.1.2.2. Ovlivnění cytochromu P450 cytochromem b<sub>5</sub>

Cytochromy b<sub>5</sub> se podílejí na velké řadě metabolických procesů v různých typech buněk. Účastní se například zpětné redukce methemoglobinu na hemoglobin v erythrocytech [33, 34], desaturaci a elongaci mastných kyselin [35], syntézy cholesterolu [37, 38] a steroidů [39].

Interakce se systémem cytochromů P450 (resp. MFO) jsou velmi komplexní a vliv cyt b<sub>5</sub> na systém závisí na mnoha faktorech, zejména pak na formě P450 a na substrátu. Cytochrom b<sub>5</sub> může být nezbytnou složkou reakce nebo může modifikovat reakci, která by probíhala i v jeho nepřítomnosti. Vliv na reakci může být jak stimulační, tak inhibiční [7]. Například metabolismus methoxyfuranu prostřednictvím CYP2B4 vyžaduje přítomnost cyt b<sub>5</sub> [40, 41], zatímco transformace benzfetaminu CYP2B4 přítomnost cytochromu b<sub>5</sub> nevyžadovala [41], případně inhibovala [42]. Zhang [43, 44] zjistil, že cyt b<sub>5</sub> ovlivňuje funkci P450 kompeticí s CPR o vazebné místo na P450.

Možných mechanismů vlivu cytochromu b<sub>5</sub> bylo navrženo hned několik. Podle prvního mechanismu cytochrom b<sub>5</sub> rychle přenáší druhý elektron na cytochrom P450 (viz Obr. 4, str. 15) v kroku určujícím rychlost celé monooxygenasové reakce [45]. Druhý mechanismus předpokládá vytvoření komplexu cyt b<sub>5</sub>-P450 a usnadnění postupného přijetí dvou elektronů při jednom kontaktu s reduktasou, což výrazně urychlí celkovou reakci [46]. Třetí hypotéza navrhuje, že cyt b<sub>5</sub> během reakčního cyklu P450 zvyšuje stabilitu jeho superoxidové formy, která se často jinak rozpadá za uvolnění superoxidového aniontu [47, 48] (Obr. 5.: IV, str. 16). Čtvrtým mechanismem je alosterický efekt cyt b<sub>5</sub> na P450, tedy ovlivnění jeho konformace, a tak katalytických vlastností. Apoforma cyt b<sub>5</sub>, která neobsahuje prosthetickou skupinu, může v některých případech ovlivňovat P450 stejně jako holoforma. To naznačuje, že k vlivu není třeba elektronového přenosu [7, 49].

## 1.2. Metody studia proteinové struktury

Mezi strukturou a funkcí proteinu existuje úzký vztah. Od struktury se odvíjí např. rozpustnost molekuly, jaké komplexy může tvořit, jaké substráty enzym přeměňuje a jakým mechanismem.

Hlavními metodami pro studium struktury proteinů jsou rentgenová krystalografie, v menší míře pak nukleární magnetická rezonance (NMR). Pro rentgenovou krystalografii je vzorek třeba krystalizovat, čímž protein může změnit svou nativní konformaci. U membránových proteinů je navíc krystalizace obtížná až nemožná kvůli dlouhým hydrofobním úsekům, které jsou za nativních podmínek v kontaktu s membránou. V její nepřítomnosti mají tyto úseky tendenci se v důsledku hydrofobního efektu shlukovat. Vznikají nepravidelné agregáty molekul proteinů, znemožňující jejich krystalizaci [50]. Většinou se tento problém obchází odštěpením kotvy peptidasou, nebo expresí o kotvu zkráceného proteinu, a následně krystalizací pouze solubilní domény [8]. Získané modely poté plně nevypovídají o nativní struktuře proteinů. Veřejná internetová databáze publikovaných proteinových struktur získaných rentgenovou krystalografií, resp. NMR, Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>), přesto představuje užitečný zdroj informací pro studium proteinové struktury P450.

Dalšími běžně používanými metodami jsou například UV/VIS spektrofotometrie, fluorescenční techniky a elektronová mikroskopie. Při metodě cílené mutagenese (angl. „site-directed mutagenesis“, SDM) je vytvořena DNA s mutací v určitém genu, která je poté naklonována a použita pro přípravu proteinu. Dále se používají techniky chemické modifikace proteinů (chemické síťování, viz 1.2.1). Počítačové modelování molekul a simulace interakcí, tzv. *in silico* techniky, představují užitečný doplňkový nástroj. Jejich výhodou je relativní časová a materiálová nenáročnost, nevýhodou pak určitá nepřesnost v simulaci reálných struktur. Přesnost lze navýšit prodloužením výpočetních časů, které se ale neustále snižují v důsledku rostoucího výpočetního výkonu počítačů. Simulovaná data je ale vždy třeba ověřit experimentálně [51].

### 1.2.1. Síťovací techniky

Chemické síťování označuje skupinu metod, které umožňují vytvoření kovalentní vazby mezi dvěma nebo více makromolekulami, ale také v rámci jedné molekuly. Tato technika, někdy nazývaná „biokonjugace“, pokud váže biomolekuly, nabízí zajímavý způsob studia interakcí proteinů v jejich nativních stavech. Dokáže zafixovat proteinové komplexy, které za normálních okolností existují pouhý okamžik nebo jsou za podmínek analýzy nestabilní a rozpadají se. Poté je možné proteiny štěpit peptidasami a analýzou zesíťovaných peptidů hmotnostní spektrometrií lze zjistit, které aminokyseliny se účastní interakce [52, 53].

#### 1.2.1.1. Síťovací činidla

Síťovací činidla se rozdělují na homobifunkční a heterobifunkční. Homobifunkční činidla obsahují dvě identické reaktivní skupiny, zatímco heterobifunkční skupiny rozdílné [52].

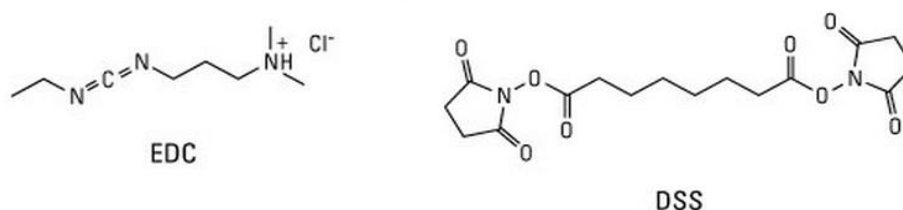
Díky reaktivním skupinám jsou síťovací činidla schopna se vázat na funkční skupiny proteinů nebo jiných biomolekul a spojovat je kovalentními vazbami. Speciálním typem těchto činidel jsou foto-aktivovatelná (foto-reaktivní) činidla, která obsahují fotolabilní skupiny, za nativních podmínek inertní, ale rozpadající se po ozáření UV zářením. Tato činidla jsou, na rozdíl od typických chemických síťovacích činidel, výrazně reaktivnější a méně selektivní vůči cílovým skupinám [52, 53].

Na proteinech můžeme najít v zásadě čtyři funkční skupiny, které jsou cílem síťovacích činidel. Jedná se o primární aminoskupiny ( $-NH_2$ ), karboxylové ( $-COOH$ ), karbonylové ( $-CHO$  u glykoproteinů), hydroxylové ( $-OH$ ) a sulfhydrylové skupiny ( $-SH$ ). Pro každou skupinu existuje několik specifických činidel [53].

Při výběru vhodného činidla musíme brát v úvahu zejména tyto skutečnosti: reaktivita činidla (aby nezreagovalo dříve, než je třeba), délka spojovací molekuly (pro stabilitu a tvar výsledného komplexu), vliv na biomolekuly (např. míra denaturace proteinů) a v neposlední řadě selektivitu pro vazný cíl [53, 54].

Síťovací činidlo může propojit funkční skupiny proteinu bez toho, aby jeho část zůstala jako spojovací prvek, tzv. činidlo bez raménka. Příkladem takového činidla je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidhydrochlorid (EDC, Obr. 8, str. 22), který

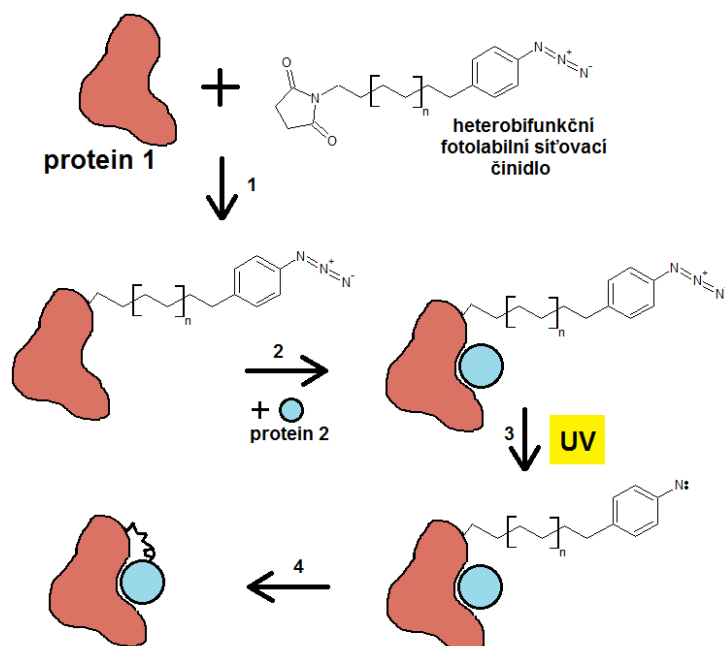
spojuje karboxylovou skupinu a primární aminoskupinu za tvorby amidové vazby. Výběrem síťovacího činidla o určité délce určíme délku tzv. raménka, tj. úseku molekuly, který pak spojuje dvě aminokyseliny. Pomocí experimentů, kdy jsou spojovány dva proteiny činidly s různou délkou raménka, je možno měřit vzdálenost, na kterou se konkrétní dvě místa proteinů dokáží přiblížit. Příklady činidel s rozdílnou délkou raménka jsou disukcinimidylsüberát (DSS, obr. 8) a disukcinimidylglutarát (DSG), spojující dvě aminoskupiny [53, 54].



**Obr. 8:** Síťovací činidla EDC a DSS. Převzato z [53] a upraveno.

### 1.2.1.2. Síťování pomocí foto-aktivovatelných skupin

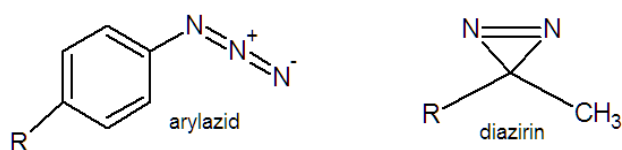
Pokud neznáme konkrétní skupiny na proteinu, které chceme atakovat, je výhodné použít foto-aktivovatelných činidel s nízkou selektivitou [53, 54]. Je možná kombinace dvou efektů, kdy se použije heterobifunkční činidlo, které se specificky naváže na jeden z proteinů, a poté se ozářením aktivuje jeho druhá, fotolabilní skupina, která naváže druhý protein (Obr. 9, str. 23).



**Obr. 9: Příklad použití heterobifunkčního činidla s jednou fotolabilní skupinou.**

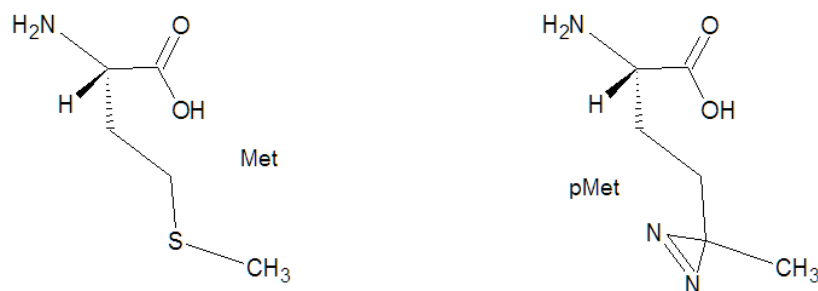
1 - maleinimidová skupina síťovacího činidla specificky naváže postranní skupinu prvního proteinu (sulfhydrylovou). 2 – je přidán druhý protein, interagující s prvním proteinem. 3 - ozářením UV světlem je zapříčiněn rozpad azidové skupiny za tvorby nitrenu (radikálu). 4 – radikál nespecificky naváže druhý protein [55].

Pro foto-síťování je podstatné, aby činidlo nevyžadovalo k aktivaci takovou vlnovou délku nebo intenzitu záření, které by poškozovaly biomolekuly [54]. Nejpoužívanějšími fotolabilními činidly jsou diaziriny a arylazidy [53] (Obr. 10). Jejich ozářením ( $\lambda \approx 350$  nm pro diaziriny) dojde k rozpadu labilní skupiny za uvolnění molekuly dusíku a nitrenového (arylazid), resp. karbeniového bi-radikálu (diazirin), které rychle napadají struktury v nejbližším okolí.



**Obr. 10: Obecné vzorce arylazidu a diaziru.**

Speciálním případem foto-aktivovatelných činidel bez raménka jsou analoga aminokyselin obsahující fotolabilní skupinu, které jsou inkorporovány do sekvence proteinu. Může se jednat například o L-foto-methionin (pMet), který se od L-methioninu (Met) odlišuje přítomností diazirinového kruhu namísto atomu síry (Obr. 11). Jiným příkladem je L-foto-leucin, kde je diazirinovým kruhem nahrazen methyl v pozici 4 [56].

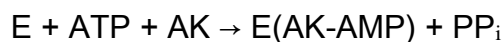


**Obr. 11: Strukturní vzorce L-methioninu (Met) a L-foto-methioninu (pMet)**

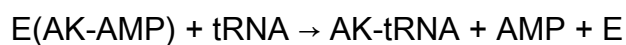
### 1.2.2. Inkorporace foto-aktivovatelných aminokyselin do proteinové struktury

Pro získání proteinů obsahujících foto-aktivovatelné skupiny (aminokyseliny) je třeba proteiny připravit ve vhodných expresních systémech, z nichž nejjednoduššími jsou bakterie.

Klíčovými enzymy proteosyntézy jsou aminoacyl-tRNA syntetasy (E), které jsou zodpovědné za připojení správné aminokyseliny na transferovou RNA (tRNA). Tato reakce sestává ze dvou kroků. Nejdříve je aminokyselina (AK) aktivována pomocí ATP za tvorby komplexu E s aminoacyladenylátem (AK-AMP) a anorganického difosfátu (PP<sub>i</sub>):



Následuje připojení tRNA a rozpad komplexu za vzniku aminoacyl-tRNA (AK-tRNA):



Speciální struktura tRNA v AK-tRNA následně zprostředkovává začlenění aminokyseliny do sekvence vznikajícího proteinu - obsahuje antikodonový triplet bazí, komplementární k tripletovému kodonu na mRNA [57]. Aminoacyl-tRNA synthetasy jsou velmi striktní, co se týče výběru správné aminokyseliny, a neumožňují připojení jiné.

První metoda, jak obejít proteosyntetický aparát a vnést analog do sekvence, obnáší vpravení heterologního páru synthetasy a tRNA do expresního organismu, kde funguje jako pár navíc k běžným 20 homologním sadám, tzv. orthogonálně. Nová synthetasa nevyužívá původní tRNA a nová tRNA není substrátem původních synthetas. V organismu je tak 21 specifických synthetasa-tRNA párů, z nichž jedenadvacátý lze dále modifikovat, aby začleňoval novou aminokyselinu [57].

Druhým přístupem je modifikace translačního aparátu. Například zkrácením genu pro tRNA a transkripcí *in vitro* byla připravena tRNA, které chyběl 3'-terminální adenosin. Pomocí RNA ligasy byl poté připojen na tRNA aminoacyladenylát obsahující nepřírozenou aminokyselinu [57, 58].

Jinou možností je štěpení proteinu za Met pomocí bromkyanu (CNBr) za tvorby reaktivního laktonu, na který je možné napojit syntetický peptid s požadovanou modifikací [57]. Dále můžeme protein posttranslačně modifikovat, zejména na cysteinech se sulfhydrylovými skupinami, které reagují se specifickými činidly s řadou navázaných substituentů. Tím můžeme v podstatě měnit sekvenci proteinu až po jeho purifikaci [57, 59]. Možnosti metody využívající posstranlační modifikaci je možné rozšířit kombinací s cílenou mutagenezí [60]. Nevýhodou použití CNBr a posttranslačních modifikací je ztráta nativního stavu proteinu.

Jiná metoda využívá relativně nižší specifity konkrétních aminoacyl-tRNA synthetas, jejichž prostřednictvím lze původní aminokyselinu nahradit velmi podobným analogem. Například Met-tRNA synthetasa *E. coli* dokáže zpracovávat foto-methionin namísto methioninu. Při translaci ale dochází ke kompetici přirozené aminokyseliny a jejího analogu a výtěžek proteinu s analogem je proto velice nízký až nulový. Zvýšení míry inkorporace analogu lze dosáhnout zvýšením koncentrace analogu a zároveň snížením koncentrace přirozené aminokyseliny. Toho dosáhneme expresí v limitním médiu, kde je daná aminokyselina nahrazena svým analogem. K dalšímu zefektivnění dojde použitím speciálních auxotrofních bakterií jako expresních systémů. Takové bakterie nedokážou syntetizovat konkrétní aminokyselinu (je pro ně esenciální), takže jediným jejím zdrojem je médium.

## 2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo zaprvé připravit analog cytochromu  $b_5$  s jedinou pozicí pro methionin (96) a během rekombinantní exprese proteinu do této pozice zavést foto-reaktivní methioninový analog (foto-methionin).

Zadruhé bylo cílem protein izolovat a kovalentně fixovat jeho transientní protein-proteinové interakce s CYP2B4 v rekonstituovaném systému.

## **3. Materiál a metody**

### **3.1. Materiál a chemikálie**

**Amersham Pharmacia Biotech / GE Healthcare, Švédsko:**

DEAE-Sepharosa CL-6B FF

**Fluka, Švýcarsko:**

akrylamid; dodecylsulfát sodný (SDS, z angl. „sodium dodecylsulfate“); 2-merkptoethanol; N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS); tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

**Lachema Brno / Lachner / Lach-Ner, Česká republika:**

dihydrogenfosforečnan draselný, disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny; glycerol; glukosa; methanol; ethanol; kyselina octová; uhličitan sodný; hydrogenuhlíčan sodný; vlnan sodný; pentahydrát síranu měďnatého; chlorid draselný; chlorid amonný; síran hořečnatý; pentahydrát thiosíranu sodného; octan sodný; bromfenolová modř; dodekahydráthydrogenfosforečnanu sodného; dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného; hydroxid sodný; hydroxid draselný; chlorid sodný; peroxodisíran amonný; formaldehyd; dusičnan stříbrný

**Linde, Česká republika:**

dusík (g)

**Roche Diagnostic, USA:**

Complete mini protease inhibitor

**Serva, Německo:**

Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED); ampicilin

**Sevapharma, a.s, Česká republika:**

hovězí sérový albumin (BSA, z angl. „bovine serum albumine“)

**Sigma-Aldrich, Inc., USA:**

Luria Broth (LB); Luria agar; isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid (IPTG); Brij 35; 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA); cholát sodný; 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DLPC); hemin chlorid; SigmaMarker™ Wide

**Thermo Scientific Pierce, USA:**

Microplate BCA™ Protein Assay Kit; L-2-amino-5,5'-azihexanová kyselina (L-foto-methionin)

**Další materiál:**

- plazmid pET-22b s modifikovaným králičím genem pro cyt  $b_5$  (mutace M126L a M131L) byl poskytnut RNDr. H. Dračínskou, Ph. D.
- preparát CYP2B4 byl poskytnut Doc. RNDr. M. Šulcem, Ph.D.
- **Stratagene, USA:** bakteriální kmen *E. coli* BL-21 (DE3) Gold

## 3.2. Použité pufrы a jiné roztoky

**Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu pomocí BCA**

Roztok A - 1 % BCA (w/v), 0,4 % NaOH (w/v); 0,95 % NaHCO<sub>3</sub> (w/v); 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O (w/v); 0,16 % vínan sodný (w/v); pH 11,25

Roztok B - 4 % CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (w/v)

**Roztoky pro elektroforézu v prostředí SDS**Pufr A:

0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8

Polymerační roztok A:

30 % akrylamid (w/v); 0,8 % BIS (w/v) v pufru A

Pufr B:

0,125 M Tris-HCl; 0,1 % SDS (w/v); 0,0006 % bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

Polymerační roztok B:

30% akrylamid (w/v); 0,8 % BIS (w/v) v pufru B

Elektrodový pufr:

0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3

Vzorkový pufr:

0,025 M Tris-HCl; 8 % SDS (w/v); 40 % glycerol (v/v); 20% 2-merkptoethanol (v/v); 0.004% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

Barvicí lázeň CBB:

0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46 % ethanol (v/v); 9,2 % kyselina octová (v/v)

Odbarvovací lázeň:

25 % ethanol (v/v); 10 % kyselina octová (v/v)

Separáčn  gel (15%):

3,5 ml pufru A; 3,5 ml polymeračn ho roztoku A; 7 µl TEMED; 70 µl 10 % peroxidisíranu amonného

Separáční gel (8 %):

3,5 ml pufru A; 1,9 ml polymeračn ho roztoku A; 1,6 ml vody; 7 µl TEMED; 70 µl 10 % peroxidisíranu amonného

3% zaostřovací gel:

2,7 ml pufru B; 300 µl polymeračn ho roztoku B; 3 µl TEMED; 60 µl 10 % peroxidisíranu amonného

**Roztoky pro barvení elektroforetického gelu střibrem**

Fixační roztok FR:

50 % methanol (v/v); 12 % kyselina octov  (v/v); 25 µl 37 % formaldehydu (v/v) na 50 ml roztoku přidáno těsně p řed použitím

Inkubační roztok IR:

0,002 % AgNO<sub>3</sub>; 37,5 µl 37 % formaldehydu (v/v) na 50 ml roztoku přidáno těsně p řed použitím

Vyvolávací roztok VR:

0,06 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v); 25 µl 37 % formaldehydu (v/v) na 50 ml roztoku přidáno těsně p řed použitím; 100 µl 0,002 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (w/v) na 50 ml roztoku přidáno těsně p řed použitím

## **Limitní médium M9**

### Roztok M9A:

Připraven rozpuštěním 3,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 g NaCl a 0,6 g NH<sub>4</sub>Cl v 540 ml destilované vody a autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut

### Roztok M9B:

1 mM MgSO<sub>4</sub> autoklávován při 121 °C po dobu 20 minut

### Roztok M9C:

Připraven rozpuštěním 0,4 g glukózy v 10 ml destilované vody a sterilizován filtrací pomocí Millipore Express Plus™ 0,22 µm

### Roztok M9D:

Připraven rozpuštěním 5,7 mg thiaminu v 1,14 ml destilované vody a sterilizován filtrací pomocí Millipore Express Plus™ 0,22 µm

### Roztok M9E:

Připraven rozmícháním L-Lys (60 mg); L-Phe (60 mg); L-Thr (60 mg); L-Ile (30 mg); L-Leu (30 mg) a L-Val (30 mg) v 100 ml sterilní vody

## **Roztoky pro chromatografii na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF**

### Ekvilibrační pufr EkP1:

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH, 1 mM EDTA, 20 % glycerol (v/v); 0,6 % Brij 35 (w/v); pH 7,7

### Eluční pufr EIP1:

400 mM KCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % Brij 35 (w/v); pH 7,7

### Dialyzační pufr DP1:

15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,3 % Brij 35 (w/v); pH 7,7

### Ekvilibrační pufr EkP2:

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH, 1 mM EDTA, 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný (w/v); pH 7,7

### Eluční pufr EIP2:

200 mM KCl, 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný (w/v); pH 7,7

### Dialyzační pufr DP2:

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7

### 3.3. Použité přístroje

#### Centrifugy:

Beckman Allegra X-22R (Beckman Coulter), Beckman Optima LE-80K (Beckman Coulter), stolní minicentrifuga miniSpin (Eppendorf)

#### Spektrofotometry:

Specord M-40 (Carl Zeiss), Agilent Cary 60 (Agilent), Spekol 11 (Carl Zeiss), čtečky mikrodestiček Sunrise<sup>TM</sup> (Tecan) a safire<sup>2</sup> (Tecan)

#### Ostatní:

kapalinový chromatograf ÄKTA Prime plus se sběračem frakcí a zapisovačem CR-200 (Beckman); fotolýzér Oriol (z komponent: zdroj Oriol 68806 basic power supply, 100 W výbojka s emisním maximem vlnové délky 254 nm, UV zrcadlo, závěrka Oriol 71445 shutter, chladič systém); orbitální třepačka Big Bill (Thermolyne); aparatura pro elektroforézu MiniVE Vertical (Amersham Biosciences); zdroj pro elektroforézu EPS 301 Electrophoresis Power Supply (Amersham Pharmacia Biotech); homogenizátor podle Pottera a Elvehjema; filtrační zkumavky Amicon s vyměnitelnými membránami s MWCO 10 000 a MWCO 30 000 (Millipore), filtr Millipore Express Plus<sup>TM</sup> 0,22 μm (Millipore); pH metr HI2211 (HANNA Instruments), ultrazvuková sonda Sonoplus (sondy KE76 a MS73, Bandelin), autokláv Varioklav 400E (H+P Labortechnik), lázeň Eppendorf Thermomixer Comfort,

### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Analytické metody

##### 3.3.1.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Ve vzorcích z průběhu izolace byl stanovován obsah proteinů metodou BCA. Její princip spočívá v redukcí měďnatých kationů na měďné peptidovými vazbami a některými postranními skupinami aminokyselin v bazickém prostředí. Měďné ionty jsou poté chelátovány 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku modrofialového komplexu, jehož absorpční maximum je při 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci měďných iontů v roztoku, a tedy i přibližné koncentraci proteinu [61, 62].

Jako standard sloužil hovězí sérový albumin (BSA). Byla připravena ředící řada roztoků BSA o koncentracích 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg · ml<sup>-1</sup>. Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační přímka.

Činidlo pro stanovení bylo připraveno těsně před použitím smícháním roztoku A a roztoku B v poměru A:B = 50:1.

Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 15 µl vzorku/standardu/vody a 120 µl činidla. Slepý vzorek destilované vody a vzorky o neznámé koncentraci byly v triplikátech, roztoky standardu v duplikátech. Roztoky byly po lehkém protřepání zakryté inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Po 5 minutovém stání při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 562 nm. Dosazením hodnot A<sub>562</sub> do rovnice kalibrační přímky byly vypočteny hodnoty koncentrace proteinu ve vzorcích.

### 3.3.1.2. Stanovení koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub> z absolutního spektra

Z absolutního absorpčního spektra finálního preparátu byla stanovena koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub>. Spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 260-500 nm. Foto-cyt b<sub>5</sub> i apo-foto-cyt b<sub>5</sub> vykazují absorpční maximum při 280 nm v důsledku přítomnosti aromatických zbytků aminokyselin. Pouze holoforma foto-cyt b<sub>5</sub> však díky vázanému hemu vykazuje absorpční maximum při 413 nm. S použitím molárních absorpčních koeficientů ε<sub>280</sub> = 29 450 dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [63] a ε<sub>413</sub> = 117 000 dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [64] byla vypočtena molární koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub>, resp. holoformy foto-cyt b<sub>5</sub> pomocí následujících vzorců:

$$c_{280} = \frac{A_{280} - A_{308}}{\varepsilon_{280} \cdot l} \cdot \text{ředění} \quad [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

$$c_{413} = \frac{A_{413} - A_{498}}{\varepsilon_{413} \cdot l} \cdot \text{ředění}, \quad [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

kde  $c_{280}$  a  $c_{413}$  jsou molární koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub>, resp. holoformy foto-cyt b<sub>5</sub>;  $A_x$  absorbance při vlnové délce  $x$  nm,  $\varepsilon_x$  molární absorpční koeficient pro vlnovou délku  $x$  nm [dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>] a  $l$  je optická dráha [cm].

### 3.3.1.3. Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného

Pro separaci proteinů ve vzorcích z průběhu izolace byl použit 15 % separační gel a barvení proběhlo v barvicí lázni CBB.

Pro separaci proteinových komplexů foto-cyt b<sub>5</sub> s CYP2B4 byl použit 8 % separační gel a barvení stříbrem.

Mezi skla aparatury pro elektroforézu (10 x 10 cm) byl nanesen roztok pro přípravu 15 % nebo 8 % separačního gelu. Roztok byl převrstven destilovanou vodou, která byla po ztuhnutí gelu odlita. Na vrch gelového sloupce byl nalit 3 % zaostřovací gel, načež byl vložen 10-ti jamkový hřeben. Ten byl po ztuhnutí vyjmut. Aparatura byla umístěna do elektroforetické vany a horní a spodní elektrodový prostor byly vyplněny elektrodovým pufrem.

Vzorky (každý 15  $\mu$ l) byly smíchány každý s 5  $\mu$ l vzorkového pufru a vařeny po dobu 5 minut ve vodní lázni. Po krátké centrifugaci na stolní centrifuze byly vzorky přeneseny do jamek zaostřovacího gelu v objemech 20  $\mu$ l na jamku.

Elektroforéza probíhala při napětí 180 V a byla ukončena, když čelo bromfenolové modři dorazilo ke spodnímu konci gelu. Zaostřovací gel byl poté odstraněn.

V případě barvení CBB byl separační gel přenesen do barvicí lázně CBB na zhruba 1 hod, načež byl odbarvován v odbarvovací lázni asi 12 hodin.

Barvení stříbrem bylo použito pro detekci heterologimerních komplexů cyt-b<sub>5</sub>-CYP2B4 kvůli vysoké citlivosti této metody. Proces se skládal z pěti hlavních kroků: fixace, zvýšení citlivosti, inkubace stříbrem, vyvolávání a zastavení reakce. Separační gel byl nejprve přenesen do fixačního roztoku FR (připraveného těsně před použitím) na 1 hodinu. Poté byl gel třikrát promyt 50 % ethanolem (v/v) po dobu 5 minut. Pro zvýšení citlivosti detekce byl gel na 1 minutu naložen do lázně obsahující 0,002 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (w/v), připravené těsně před použitím. Gel byl třikrát promyt vodou po dobu 20 s. Následně byl gel na 20 minut přenesen do inkubačního roztoku IR (připraveného těsně před použitím), načež byl dvakrát promyt vodou po dobu 20 s. Vyvolávání probíhalo ve vyvolávacím roztoku VR (připraveného těsně před použitím) po dobu 10 minut. Gel byl opět promyt dvakrát vodou po dobu 20 s. Reakce byla zastavena naložením gelu do 1,5% EDTANa<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (w/v) na dobu 10 minut. Gel byl nakonec třikrát promyt vodou po dobu 5 minut.

### **3.3.2. Příprava rekombinantního foto-cytochromu $b_5$**

#### **3.3.2.1. Transformace bakterií**

Sterilní LB agar byl rozpuštěn zahříváním na vodní lázni a ponechán chladnout. Poté, co jeho teplota klesla pod 60 °C, byl přidán ampicilin (Amp) v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 100 µg/ml. Po promíchání bylo do sterilních plastových Petriho misek nalito asi 15 ml agaru. Misky přikryté víčkem byly ponechány ztuhnout při laboratorní teplotě.

Bakterie byly transformovány metodou teplotního šoku, při níž byla narušena buněčná membrána a do cytoplazmy pronikl plazmid. Suspenze kompetentních buněk *E. coli* BL21 Gold byla rozmrazena a držena na ledu. Polovina suspenze byla pipetována do sterilní mikrozkušavky. Do původní mikrozkušavky bylo přidáno 1 µl sterilní vody, do druhé 1 µl plasmidu pET-22b s modifikovaným králičím genem pro cyt  $b_5$  (dvě bodové mutace M126L a M131L). Bakterie s destilovanou vodou sloužily jako kontrolní vzorek. Obě suspenze byly inkubovány 10 minut na ledu. Poté byly bakterie inkubovány při teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a ihned umístěny na 15 minut na led. Do každé zkumavky bylo poté přidáno 1 ml sterilního LB média a bakterie byly inkubovány při 37 °C po 60 minut, třepány při 200 RPM. Buňky byly poté centrifugovány po dobu 2 minut při 12000 RPM (Eppendorf miniSpin, poloměr rotoru 4,8 cm), bylo odebráno 950 µl supernatantu, peleta byla resuspendována a rovnoměrně nanášena na agarové plotny. Po vsáknutí bakteriální suspenze byly plotny inkubovány v obrácené poloze přes noc při teplotě 37 °C.

Z jedné z narostlých bakteriálních kolonií na plotně bylo sterilní špičkou pipety odebráno malé množství bakterií, načech byla špička vhozena do zkumavky Falcon (50 ml) s asi 4 ml LB média s Amp o koncentraci 100 µg/ml. Bakterie byly aerobně kultivovány v orbitální třepačce přes noc při 37 °C a 200 RPM.

#### **3.3.2.2. Kultivace bakterií a produkce foto-cytochromu $b_5$**

Smícháním 540 ml roztoku M9A, 0,6 ml roztoku M9B, 6 ml roztoku M9C, 60 µl roztoku M9D a 60 ml roztoku M9E bylo připraveno sterilní limitní médium M9 s přidávanými

aminokyselinami. Výsledné složení média bylo následující:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6 g · l<sup>-1</sup>);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g · l<sup>-1</sup>); NaCl (0,5 g · l<sup>-1</sup>);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g · l<sup>-1</sup>); 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , L-Lys (60 mg · l<sup>-1</sup>); L-Phe (60 mg · l<sup>-1</sup>); L-Thr (60 mg · l<sup>-1</sup>); L-Ile (30 mg · l<sup>-1</sup>); L-Leu (30 mg · l<sup>-1</sup>); L-Val (30 mg · l<sup>-1</sup>); 0,00005 % thiamin (w/v) ; pH 7,4.

Do Erlenmayerovy baňky (500 ml) s 250 ml LB média s Amp o koncentraci 100 µg/ml bylo přidáno 2,5 ml bakteriální kultury a suspenze byla inkubována v orbitální třepačce při 37 °C a 200 RPM. Po dosažení  $\text{OD}_{600} = 0,6$  byla rozdělena do 6 zkumavek Falcon (50 ml) a odstředěna (5 min, 4 °C, 4500 RPM, centrifuga Beckman Allegra X-22R, rotor 4250). LB médium bylo odlito a pelety byly resuspendovány každá v 15 ml PBS pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; pH 7,7). Centrifugace byla za stejných podmínek dvakrát opakována, poprvé byly pelety resuspendovány v PBS, podruhé každá v 33 ml sterilního M9 limitního média s Amp (100 µg/ml) a 0,425 mM foto-methioninem. Bakterie byly před zahájením produkce foto-cyt b<sub>5</sub> ponechány inkubovat 15 minut při 37 °C, 200 RPM.

Produkce foto-cyt b<sub>5</sub> byla indukována přidáním isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosidu (IPTG) do výsledné koncentrace 1 mM a probíhala 70 minut při 37 °C a 200 RPM. Ze suspenze před indukcí a po produkci byl odebrán 900 µl vzorek, který byl odstředěn (5 min, 4500 RPM, 4 °C, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250) a peleta byla resuspendována každá v 100 µl vody. Tyto vzorky byly použity pro sledování produkce proteinu pomocí elektroforézy.

Po skončení produkce proteinu byla změřena optická denzita a kultury byly centrifugovány (5 min, 4500 RPM, 4 °C, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250), limitní médium bylo odlito a pelety byly spojeny a resuspendovány 25 ml PBS pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; pH 7,7). Suspenze byla uchovávána při -80 °C.

### **3.3.3. Izolace foto-cytochromu b<sub>5</sub>**

#### **3.3.3.1. Izolace membránové frakce**

Suspenze (kap. 3.3.2.2.) o objemu 25 ml byla ponechána rozmrznout, přičemž do ní byla přidána jedna tableta proteasových inhibitorů (Complete mini Protease Inhibitor). Následovala sonikace bakterií (8 cyklů po 150 sekundách s 30-sekundovými přestávkami, 40 W, sonda KE76). Po celou dobu byla zkumavka chlazená v ledové lázni. Nerozrušené

buňky a jejich zbytky byly odstraněny centrifugací (15 min, 4500 RPM, 4 °C, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250).

Supernatant byl přelit do kyvety pro ultracentrifugaci a byl odstředěn (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, Beckman LE-80K, rotor Ti 70). Supernatant byl odlit a peleta byla resuspendována v 25 ml PBS pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7).

### **3.3.3.2. Titrace heminem**

Membránová frakce (kap. 3.3.3.1.) byla titrována heminem za účelem zvýšení relativního obsahu holofomy foto-cyt  $b_5$ . Bylo měřeno absorpční spektrum (350-500 nm) proti pufru titrovaném stejným množstvím heminu, a sledován nárůst rozdílu  $A_{413} - A_{500}$  značící vázání heminu do aktivního centra proteinu. Zároveň bylo měřeno absolutní absorpční spektrum (proti prázdné kyvetě), a byl sledován posun  $A_{max}$  k nižším hodnotám. Titrace byla ukončena v okamžiku, kdy již nedocházelo k nárůstu  $A_{413} - A_{500}$ .

### **3.3.3.3. Solubilizace foto-cytochromu $b_5$**

Všechny následující úkony byly prováděny v chlazené místnosti při 6 °C. Membránová frakce byla přelita do Erlenmayerovy baňky (100 ml) a byla přidána tableta proteasových inhibitorů Complete mini. V ledové lázni, v dusíkové atmosféře a za stálého míchání byla přikapávána rychlostí asi 1 kapka za 3 sekundy směs 30 % Brij 35 (w/v) a 10 % cholátu sodného (w/v) v množství 1 mg každého z detergentů na 1 mg proteinu. Za stálého míchání byl roztok inkubován na ledu po dobu 2 hodin. Následovala centrifugace (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, Beckman LE-80K, rotor Ti 70), supernatant byl nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B FF.

### **3.3.3.4. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF**

Chromatografie probíhala v chlazené místnosti při 6 °C a po celou dobu byla měřena  $A_{405}$ . Přístroj FPLC ÄKTA Prime plus byl nejdříve programem „system wash“ vmyt vodou pro odstranění ethanolu, kterým je systém vyplněn při uskladnění. Následně byla zapojena kolona DEAE-Sepharosy CL6B FF o objemu 20 ml, která byla vmyta destilovanou vodou

(2 ml/min, 1,5 x objem kolony). Tak byl odstraněn 20 % ethanol (v/v) sloužící k uchování nosiče. Následně byla kolona ekvilibrována pufrém EkP1 (4 ml · min<sup>-1</sup>, 5 x objem kolony). Na kolonu byl nanesen preparát (1 ml · min<sup>-1</sup>). Kolona byla promyta pufrém EkP1 (4 ml · min<sup>-1</sup>, 5 x objem kolony). Následovala eluce části nečistot gradientem 0-80 mM KCl (0-20 % pufru EIP1, 4 ml · min<sup>-1</sup>). Poté byl eluován foto-cyt b<sub>5</sub> izokraticky 80 mM KCl (20 % pufru EIP1, 4 ml · min<sup>-1</sup>). Eluce probíhala do úplného poklesu A<sub>405</sub>. Byly sbírány frakce o objemu 10 ml. Frakce, jejichž A<sub>405</sub> dosahovala alespoň 10 % maximální A<sub>405</sub>, byly spojeny a zahuštěny filtrací pomocí centrifugace (50 min, 4 °C, 4500 RPM, Beckman Allegra X-22R , rotor 4250, membrána s MWCO 30 000). Membrána s MWCO 30 000 byla použita i přes to, že cyt b<sub>5</sub> má molekulovou hmotnost 15,3 kDa [63]. Na membráně s nižší MWCO se protein nepodařilo zahustit. Preparát byl dialyzován v 2 l pufru DP1 po dobu 1 dne a za stálého míchání. Zbylé proteiny zachycené na nosiči byly eluovány 400 mM KCl (100 % pufru EIP1, 4 ml · min<sup>-1</sup>). Před zahájením další chromatografie byla kolona promyta 1 M NaCl (5 x objem kolony) a destilovanou vodou (5 x objem kolony).

Pro odstranění detergentu Brij 35 a nahrazení cholátem byla obdobně provedena rechromatografie pomocí pufrů obsahujících cholát sodný (EkP2, EIP2). Eluce byla prováděna izokraticky 200 mM KCl. Byly sbírány frakce o objemu 4 ml. K následné dialýze byl použit pufr DP2. Vybrané frakce (alespoň 10 % maxima A<sub>405</sub>) byly spojeny, zahuštěny pomocí aparatury Amicon (50 min, 4 °C, 4500 RPM, Beckman Allegra X-22R , rotor 4250, membrána s MWCO 10 000) a zamrazeny při -80 °C. Kolona byla opět promyta 1 M NaCl (5 x objem kolony) a destilovanou vodou (5 x objem kolony).

### **3.3.4. Fotolýza foto-cyt b<sub>5</sub> rekonstituovaném v systému s CYP2B4**

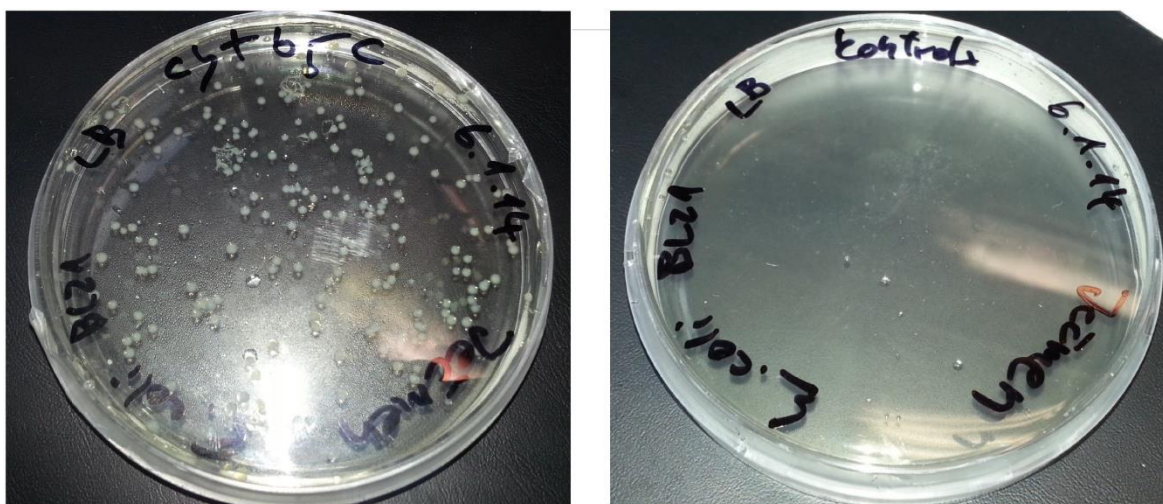
DLPC byl rozpuštěn v chloroformu, načež byl chloroform ponechán odpařen za tvorby tenkého filmu DLPC na stěnách zkumavky. Film byl resuspendován v PBS pufru (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; pH 7,7) a v ledové lázni sonikován (6 cyklů po 25 sekundách s 5-sekundovými přestávkami, amplituda 40 %, sonda MS73). Dále byly přidány oba enzymy tak, aby výsledná koncentrace CYP2B4 byla 1 μM a foto-cyt b<sub>5</sub> 1 μM, popř. 5 μM (300 μM DLPC). Směs byla v chlazené křemenné kyvetě (30 μl) ozařována po dobu 3 minut a 15 sekund UV zářením výbojky (100 W, emisní maximum při 254 nm). Pro odstínění vlnových délek menších než 300 nm (pro ochranu proteinu) byla před křemennou kyvetu předsazena kyveta z borosilikátového skla (Pyrex).

## 4. Výsledky

### 4.1. Příprava foto-cytochromu b<sub>5</sub>

#### 4.1.1. Kultivace bakterií

Kompetentní bakterie *E. coli* BL21(DE3) Gold byly transformovány plasmidem pET-22b s modifikovaným králičím genem pro cyt b<sub>5</sub> (mutace M126L a M131L, poskytnut RNDr. H. Dračínskou, Ph.D.) metodou teplotního šoku a byly kultivovány na plotnách LB agaru s Amp (100 µg/ml) přes noc při 37 °C (kap. 3.3.2.1). Na obr. 12 jsou Petriho misky - transformovaných bakterií (desítky kolonií) a kontrolní (žádné kolonie), kam byly naneseny netransformované bakterie.



**Obr. 12: Petriho misky po kultivaci bakterií *E. coli*.** Vlevo – miska transformovaných bakterií. Vpravo – miska netransformovaných bakterií

Bakterie jedné z kolonií transformovaných bakterií byly přeneseny do 4 ml LB média o koncentraci Amp 100 µg/ml a kultivovány 12 hodin při 37 °C. Optická denzita (absorbance při 600 nm) této suspenze OD<sub>600</sub> byla 0,981. Z této kultury bylo 2,5 ml přidáno do 250 ml LB média (Amp 100 µg/ml) a směs byla inkubována při 37 °C. Nárůst bakterií byl sledován průběžným měřením OD<sub>600</sub> 1 ml vzorků. Po 3 hodinách, kdy hodnota OD<sub>600</sub> překročila 0,6 (viz Tab. 1, str. 39), byla kultivace ukončena.

**Tab. 1: Hodnoty absorbance při 600 nm (OD<sub>600</sub>) suspenze bakterií v závislosti na uplynulém čase kultivace**

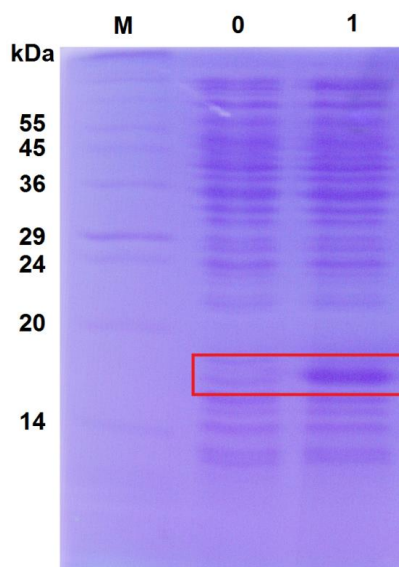
| čas kultivace     | 0 hod | 1 hod | 2 hod | 3 hod |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| OD <sub>600</sub> | 0,098 | 0,113 | 0,223 | 0,605 |

#### 4.1.2. Produkce foto-cytochromu b<sub>5</sub>

Kultura (kap. 4.1.1.) byla rozdělena do šesti zkumavek Falcon. Bakterie byly 2 x odstředěny (5 min, 4 °C, 4500 RPM, centrifuga Beckman Allegra X-22R, rotor 4250) a pelety následně resuspendovány každá v 15 ml PBS (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; pH 7,7). Po třetí centrifugaci za stejných podmínek byly pelety resuspendovány v M9 limitním médiu s Amp (100 µg/ml) a 0,425 mM foto-methioninem. Po 15-minutové inkubaci při 37 °C byla indukována produkce proteinu přidáním IPTG (výsl. konc. 1 mM). Produkce probíhala 70 minut při 37 °C. Hodnota OD<sub>600</sub> před indukcí a po ukončení exprese proteinu činila 0,552; resp. 0,601.

Úspěšnost produkce byla ukázána pomocí elektroforézy v prostředí SDS (Obr. 13, str. 40) vzorků obou suspenzí (900 µl suspenze odstředěno a resuspendováno v 100 µl vody, z toho 15 µl nanášeno na gel s 5 µl vzorkového pufru). Na gelu je patrná přítomnost foto-cyt b<sub>5</sub> ve vzorku po produkci oproti vzorku před produkcí.

Kultury byly centrifugovány (5 min, 4 °C, 4500 RPM, centrifuga Beckman Allegra X-22R, rotor 4250) a pelety byly spojeny, resuspendovány v 25 ml PBS a zamraženy při -80 °C.



**Obr. 13: Elektroforetická separace bakteriální suspenze před a po produkci foto-cyt  $b_5$ .** 15 % polyakrylamidový gel v prostředí SDS. Nanášené vzorky: po 20  $\mu\text{l}$ , 6,75x koncentrované. Označení drah: M - proteinový standard molekulárních hmotností, 0 - bakteriální suspenze před indukcí foto-cyt  $b_5$ , 1 - bakteriální suspenze po 70 min produkci foto-cyt  $b_5$ .

## 4.2. Izolace foto-cytochromu $b_5$

### 4.2.1. Izolace membránové frakce a solubilizace foto-cytochromu $b_5$

Byla izolována membránová frakce bakterií *E. coli* BL21(DE3) Gold obsahující foto-cytochrom  $b_5$ . Prvním krokem byla mechanické rozbití buněk sonikací v přítomnosti proteasových inhibitorů. Jejich účelem bylo zabránit proteolýze izolovaného proteinu. Centrifugací (15 min, 4500 RPM, 4 °C, Beckman Allegra X-22R, rotor 4250) byly odstraněny zbytky buněk a buňky nerozrušené (peleta). Supernatant byl podroben ultracentrifugací (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, Beckman LE-80K, rotor Ti 70), čímž byla získána peleta membránové frakce a volné proteiny zůstaly v supernatantu. Peleta byla převedena do 25 ml PBS.

Pomocí metody BCA (kap. 3.3.1.1) byla v preparátu stanovena koncentrace proteinu 0,19  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Byla přidána další tableta proteasových inhibitorů pro ochranu proteinu odděleného od membrány, jelikož dříve přidané inhibitory byly odstraněny se supernatantem po ultracentrifugaci. Do roztoku membránové frakce poté bylo přikápano pod dusíkovou

atmosférou odpovídající množství detergentu. Zde pravděpodobně došlo k chybě a bylo přidáno mnohem větší množství detergentu (pravděpodobně 1000 x), což mělo za následek chyby v analýze pomocí SDS elektroforézy a stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (Obr. 18, str. 46 a Tab. 4, str. 47). Solubilizovaný foto-cyt b<sub>5</sub> byl ultracentrifugací (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, Beckman LE-80K, rotor Ti 70) oddělen od zbytků membrán (peleta) a supernatant o objemu 75 ml byl nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B FF.

#### **4.2.2. Titrace heminem**

Při měření absorpčního spektra membránové frakce byl naměřen nízký pík při 413 nm, což naznačovalo nízký obsah holofomy foto-cyt b<sub>5</sub> (Obr. 14, str. 43). Za předpokladu, že většina foto-cyt b<sub>5</sub> se nacházela v apoformě, byla membránová frakce titrována heminem s cílem zvýšit obsah holofomy foto-cyt b<sub>5</sub>. Za účelem odhadu množství heminu, které je třeba přidat k 25 ml roztoku, byl nejprve titrován její 600 µl vzorek. Bylo měřeno absorpční spektrum (350-500 nm) s postupnými přídávky 1 mM heminu proti PBS pufru titrovanému stejným množstvím heminu (Obr. 14, str. 43). Byl sledován nárůst maxima absorbance při 413 nm vůči minimu při 500 nm. Relativní růst A<sub>413</sub> značí zvyšování inkorporace heminu do aktivního centra proteinu. Titrace byla ukončena při zastavení růstu po celkovém přídávku 13 µl 1 mM heminu do vzorku. Volný hemin má absorpční maximum při 385 nm. V okamžiku, kdy se hemin přestal inkorporovat do proteinu, rostla absorbance při této vlnové délce. Tento rozdíl byl patrný v absolutním spektru, protože v tomto případě nebyly hodnoty absorbance heminu ze spektra odečítány. Přítomnost volného heminu se projevila posunem absorpčního maxima ze 413 nm k nižším hodnotám. Všechny měřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 2, str. 42.

**Tab. 2: Závislost relativní velikosti  $A_{413}$  a hodnoty absorpčního maxima na celkovém přídávku heminu**

|  |       |       |       |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Celkový přídavek 1 mM heminu ( $\mu\text{l}$ )                                     | 0     | 5     | 7     | 9     | 13    | 15    |
| Přídavek heminu vztažený na objem roztoku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) | 0     | 8,3   | 11,7  | 15,0  | 21,7  | 25,0  |
| $A_{413} - A_{500}$  | 0,21  | 0,33  | 0,39  | 0,41  | 0,46  | 0,46  |
| $\lambda_{\text{max}}$ (nm)  | 409,0 | 412,4 | 412,4 | 412,4 | 410,3 | 410,3 |

*Přídavky do 600  $\mu\text{l}$  membránové frakce.  $\lambda_{\text{max}}$  – vlnová délka v maximu absorpce,  $A_{413}$  - absorpce při 413 nm,  $A_{500}$  – absorpce při 500 nm*

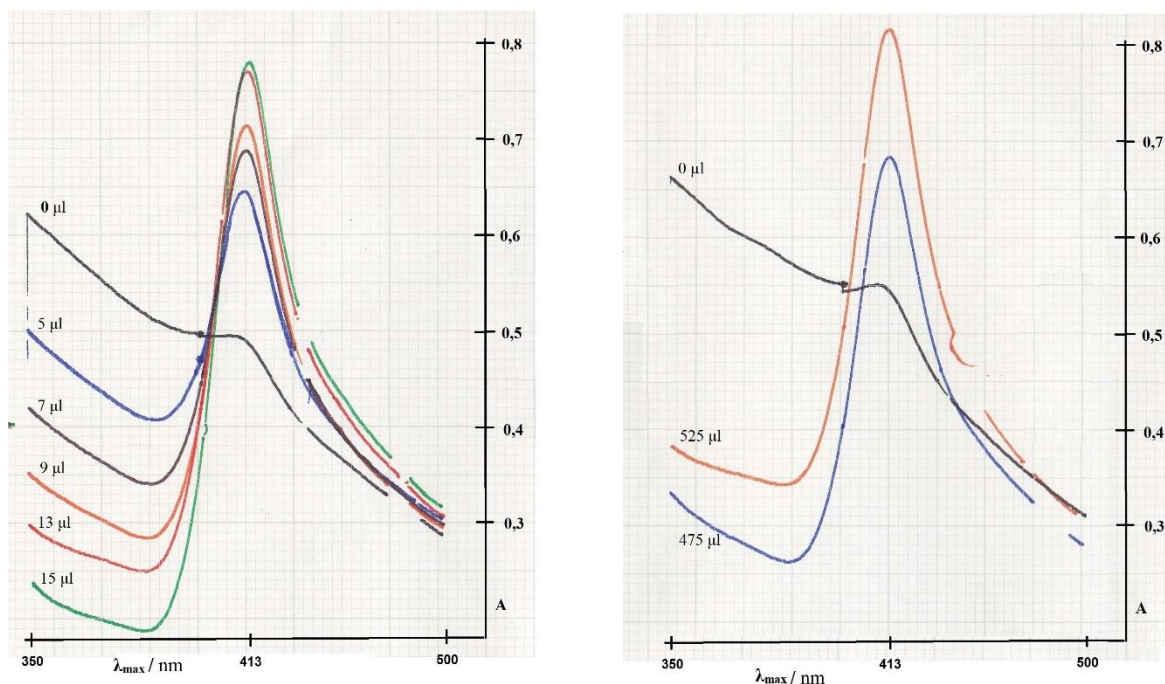
Dále byla titrována i membránová frakce v celém objemu (Tab. 3; Obr. 14, str. 43). Do 25 ml roztoku bylo celkově přidáno 525  $\mu\text{l}$  1 mM heminu.

**Tab. 3: Závislost relativní velikosti  $A_{413}$  a hodnoty absorpčního maxima na celkovém přídávku heminu**

|   |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|
| Celkový přídavek 1 mM heminu ( $\mu\text{l}$ )  | 0     | 475   | 525   |
| Přídavek 1 mM heminu vztažený na objem roztoku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) | 0     | 19,0  | 21,0  |
| $A_{413} - A_{500}$   | 0,24  | 0,40  | 0,51  |
| $\lambda_{\text{max}}$ (nm)   | 411,7 | 411,0 | 410,3 |

*Přídavky do 25 ml membránové frakce.  $\lambda_{\text{max}}$  – vlnová délka v maximu absorpce,  $A_{413}$  - absorpce při 413 nm,  $A_{500}$  – absorpce při 500 nm*

Porovnáním titrace 600  $\mu\text{l}$  vzorku a 25 ml roztoku membránové frakce je patrné, že u velkého objemu roztoku lze dosáhnout vyšší míry integrace heminu než u vzorku, a to s relativně menším přídávkem heminu. Zatímco pro 600  $\mu\text{l}$  vzorek se růst  $A_{413} - A_{500}$  zastavil na hodnotě 0,46 při přídávku 21,7  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , pro 25 ml roztok byla hodnota  $A_{413} - A_{500}$  0,51 při přídávku 21,0  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .



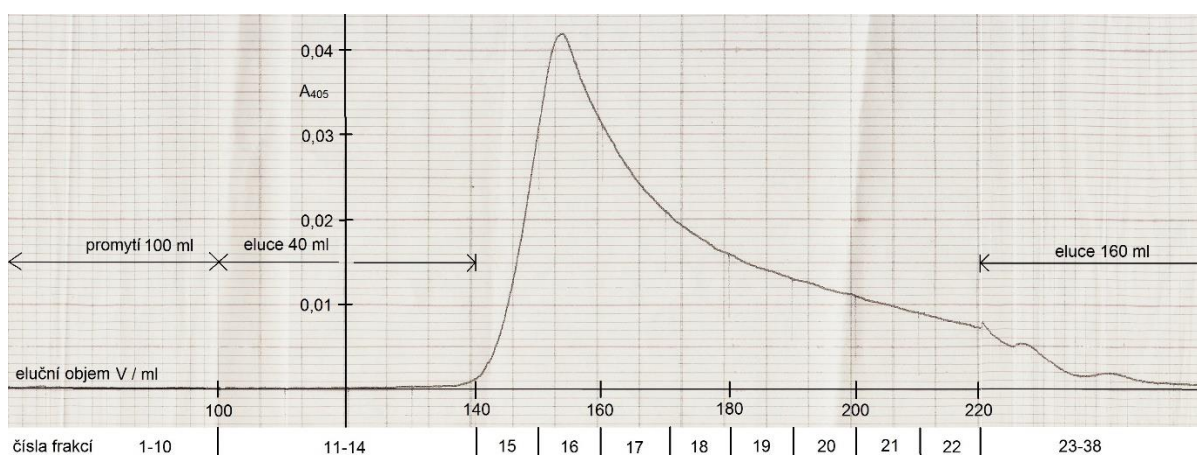
**Obr. 14: Závislost absorbance membránové frakce na celkovém přídávku 1 mM heminu.** Vlevo - 600 µl vzorek membránové frakce. Vpravo - 25 ml membránové frakce. Přídávky 1 mM heminu vyznačeny v obrázku.

#### 4.2.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF

DEAE-Sepharosa je anex, čili je schopna vyměňovat záporně nabitě ionty díky párování s kladně nabitými skupinami. Dle predikce z primární sekvence je teoretický izoelektrický bod cyt  $b_5$  (pI) roven 5,14 [63]. Při pH ekvilibračního pufru 7,7 tudíž protein nese záporný náboj a je schopen se zachytit na kladně nabitém anexu. Všechny proteiny, které jsou při tomto pH nabitě kladně nebo jsou neutrální, kolonou procházejí. Při chromatografii byla měřena absorbance při 405 nm.

Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF (6 °C, kap. 3.3.3.4.) byla prováděna celkem dvakrát. První chromatografie byla provedena za účelem izolace foto-cyt  $b_5$ . Na kolonu bylo nanášeno 75 ml roztoku. Po promytí kolony 100 ml ekvilibračního pufru byly zachycené proteinové nečistoty odplaveny gradientem 0-80 mM KCl (40 ml). Foto-cyt  $b_5$  byl eluován izokraticky 80 mM KCl a byly jímány frakce o objemu 10 ml. Absorbance v maximu dosahovala hodnoty 0,042 a na základě elučních profilů byly spojeny frakce 15-22 (Obr. 16, str. 45) v celkovém objemu 80 ml. Frakce byly zvoleny tak, aby jejich  $A_{405}$  dosahovala alespoň 10 % maxima při 405 nm. Spojené frakce byly zahuštěny

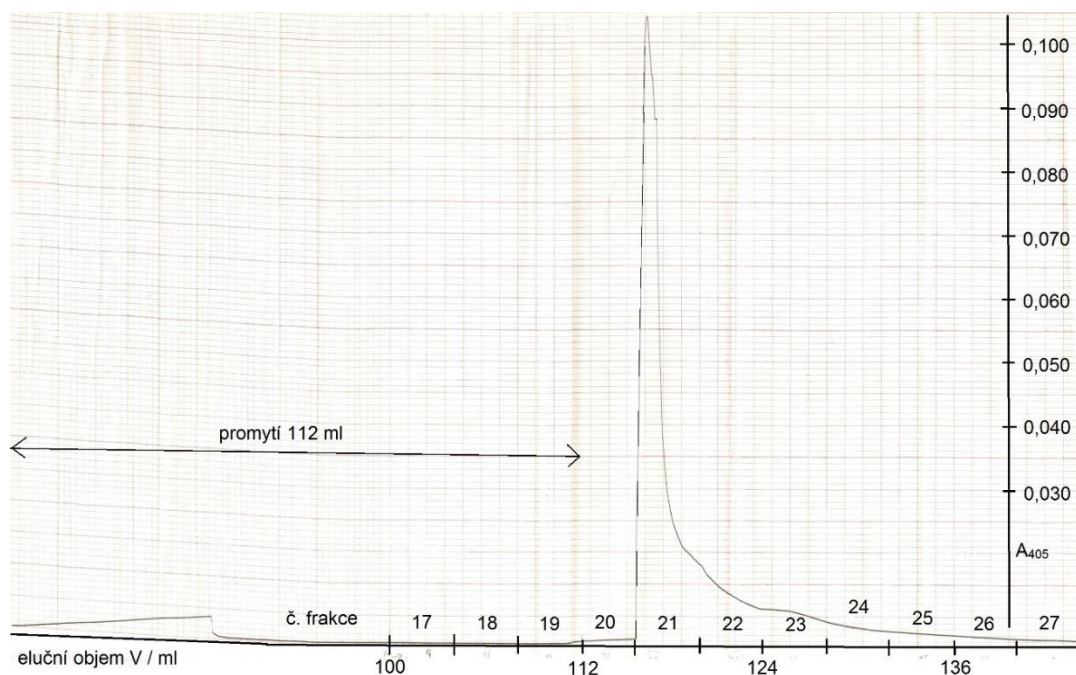
filtrací (50 min, 4 °C, 4500 RPM, Beckman Allegra X-22R , rotor 4250, membrána s MWCO 30 000) na objem 3,5 ml. Membrána s MWCO 30 000 byla použita proto, že na membráně s MWCO 10 000 zahušťování neprobíhalo. Kombinace Brij 35 a glycerolu pravděpodobně způsobila společně s proteiny ucpání membrány. Pro odstranění nízkomolekulárních iontů byla po chromatografii provedena dialýza po dobu 1 dne při 6 °C proti pufru obsahujícím Brij 35. Kolona byla promyta 1 M NaCl a destilovanou vodou.



**Obr. 15: Eluční profil foto-cyt bs při první chromatografii:** Čísla na vodorovné ose označují sbírané frakce o objemu 10 ml. Frakci č. 11 předcházelo promytí kolony 100 ml ekvilibračního pufru. Frakce 11-14: podíl elučního pufru 0 → 20 % (výsl. 0-80 mM KCl). Frakce 15-22: podíl elučního pufru = 20 % (výsl. 80 mM KCl). Tyto frakce sloužily k zisku foto-cyt bs. Frakce 23-38: podíl elučního pufru 100 % (400 mM KCl).

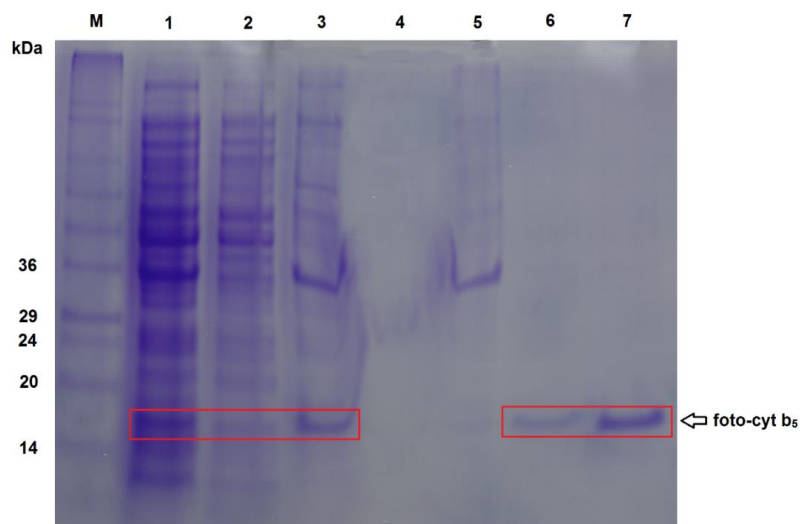
S cílem oddělit od preparátu detergent Brij 35, nahradit ho cholátem sodným a preparát zahustit, byla provedena rechromatografie na stejné koloně. Cholát sodný je jako Brij 35 detergentem. Přítomnost detergentu v proteinovém preparátu je nutná, aby protein nezačal agregovat. Na rozdíl od Brij 35 je ale cholát možné odstranit dialýzou. Při rechromatografii byla eluce prováděna izokraticky 200 mM KCl za účelem rychlého vyplavení proteinu do co nejmenšího objemu eluátu. Byly sbírány frakce o objemu 4 ml. Maximální hodnota  $A_{405}$  dosáhla 0,105 a byly spojeny dvě frakce, jejichž  $A_{405}$  dosáhla alespoň 10 % maxima (frakce 21 a 22) o celkovém objemu 8 ml. (Obr. 16, str. 45). Frakce byly zahuštěny filtrací na objem 0,5 ml. Pro odstranění nízkomolekulárních iontů a cholátu

sodného byla po chromatografii provedena dialýza po dobu 1 dne při 6 °C proti pufru neobsahujícímu detergenty.



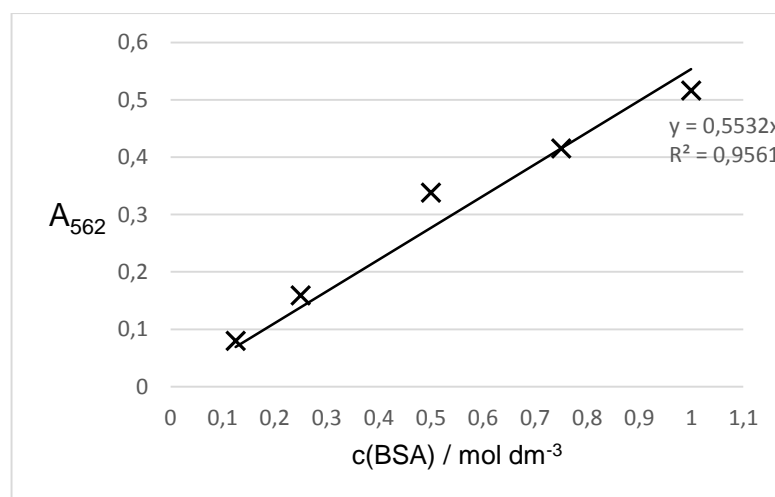
**Obr. 16: Eluční profil foto-cyt b<sub>5</sub> při rechromatografii.** Eluce izokraticky 200 mM KCl počínaje frakcí 21 ( $V = 112$  ml). Sbírané frakce o objemu 4 ml. Pro izolaci foto-cyt b<sub>5</sub> byly spojeny frakce 21 a 22.

Obrázek 17 (str. 46) shrnuje průběh izolace foto-cyt b<sub>5</sub>. Velká část proteinů v bakteriální suspenzi po sonikaci byla odstraněna se supernatantem první ultracentrifugace. V peletě je patrná přítomnost zejména foto-cyt b<sub>5</sub> (15 kDa) a proteinu o molekulové hmotnosti 36 kDa. V supernatantu druhé centrifugace měl být pozorovatelný solubilizovaný foto-cyt b<sub>5</sub>, ale dráha je zcela rozmyta. To bylo způsobeno nadbytkem detergentů Brij 35 a cholátu sodného, kterých bylo chybně přidáno pravděpodobně 1000 x více během solubilizace než bylo zamýšleno. S peletou obsahující membrány byl odstraněn protein s molekulovou hmotností 36 kDa a malé množství mnoha proteinů o různých molekulových hmotnostech. Celkově největší množství proteinů bylo odstraněno odstředováním, v dráze eluátu první chromatografie je již patrná pouze jedna zóna, a to foto-cytochromu b<sub>5</sub>.



**Obr. 17: Elektroforetická separace vzorků z průběhu izolace foto-cyt  $b_5$ .** 15 % polyakrylamidový gel. Označení drah: M – proteinový standard, 1 – bakteriální suspenze bezprostředně po sonikaci, 2 – supernatant po první ultracentrifugaci, 3 – membránová frakce, 4 – supernatant po druhé ultracentrifugaci (před chromatografií), 5 – peleta po druhé ultracentrifugaci, 6 – preparát po první chromatografii (rel. ředění 10 x), 7 – finální preparát

Pro vzorky odebírané v průběhu izolace byla stanovena koncentrace proteinů metodou BCA (kap. 3.3.1.1.). Kalibrační přímka pro toho stanovení je uvedena na Obr. 18. Hodnoty molárních koncentrací získaných touto metodou jsou uvedeny v Tab. 4, str. 47.



**Obr. 18: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů metodou BCA ve vzorcích z průběhu izolace.** Použity standardy BSA o konc. 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg · ml<sup>-1</sup>.

**Tab. 4 – Množství proteinů během jednotlivých fází izolace foto-cyt bs**

| č. | Zdroj vzorku  | $c_p$ (mg · ml <sup>-1</sup> ) | V (ml) | $m_p$ (mg) | %     |
|----|---|--------------------------------|--------|------------|-------|
| 1  | Bakteriální suspenze po sonikaci                      | 2,1 ± 0,17                     | 25     | 53 ± 4,3   | 100   |
| 2  | Supernatant po první ultracentrifugaci                | 1,4 ± 0,11                     | 25     | 35 ± 2,8   | 66    |
| 3  | Peleta po první ultracentrifugaci (membránová frakce) | 0,6 ± 0,017                    | 25     | 15 ± 0,43  | 28    |
| 4  | Supernatant po druhé ultracentrifugaci                | 0,7 ± 0,030                    | 75     | 53 ± 2,3   | (100) |
| 5  | Peleta po druhé ultracentrifugaci                     | 0,4 ± 0,036                    | 25     | 10 ± 0,9   | 19    |
| 6  | Roztok po první chromatografii                        | 2,5 ± 0,54                     | 3,5    | 8,8 ± 1,9  | 17    |
| 7  | Finální preparát foto-cyt bs                          | 3,0 ± 0,21                     | 0,5    | 1,5 ± 0,11 | 2,8   |

$c_p$  – molární koncentrace proteinu,  $V$  – objem suspenze,  $m_p$  – celková hmotnost proteinu, [%] – výtěžek proteinu vzhledem k bakteriální suspenzi

Během ultracentrifugace sonikované bakteriální suspenze byly odstraněny asi dvě třetiny všech proteinů. Přibližně třetina (15 mg) byla zachována v peletě (membránová frakce). Po solubilizaci byla provedena druhá ultracentrifugace. Více jak polovina proteinů (10 mg) byla odstraněna s peletou. Hodnota koncentrace proteinů v supernatantu je výrazně nadhodnocená, pravděpodobně v důsledku vysokého nadbytku detergentů ve vzorku, které měly interferovat se stanovením. Součet hmotností proteinů z pelety po druhé ultracentrifugaci (10 mg) a po první chromatografii (8,8 mg) je vyšší, než hmotnost proteinů v peletě po první ultracentrifugaci (15 mg). Na nepřesnosti stanovení se mohlo podílet několik faktorů. Kromě nepřesnosti samotné metody (standard BSA obecně reprezentuje proteiny jen přibližně) mohla mít vliv přítomnost detergentu ve vzorku po první chromatografii. Vyloučit nelze chybu pipetování.

Za předpokladu, že hodnota pro tento vzorek nebyla výrazně zkreslena, ztráta proteinů během druhé chromatografie byla asi 83%. Tato hodnota je ale pravděpodobně výrazně nadhodnocená, protože během nanášení proteinu na kolonu ani při promývání nebylo pozorováno výrazné protékání proteinu kolonou. Množství proteinů uvolněných do nesbíraných frakcí 23-27 taktéž nebylo velké (Obr. 14, str. 45). Na ztrátách se mohlo podílet zahušťování frakcí po první chromatografii, které bylo provedeno na membráně s MWCO 30 000.

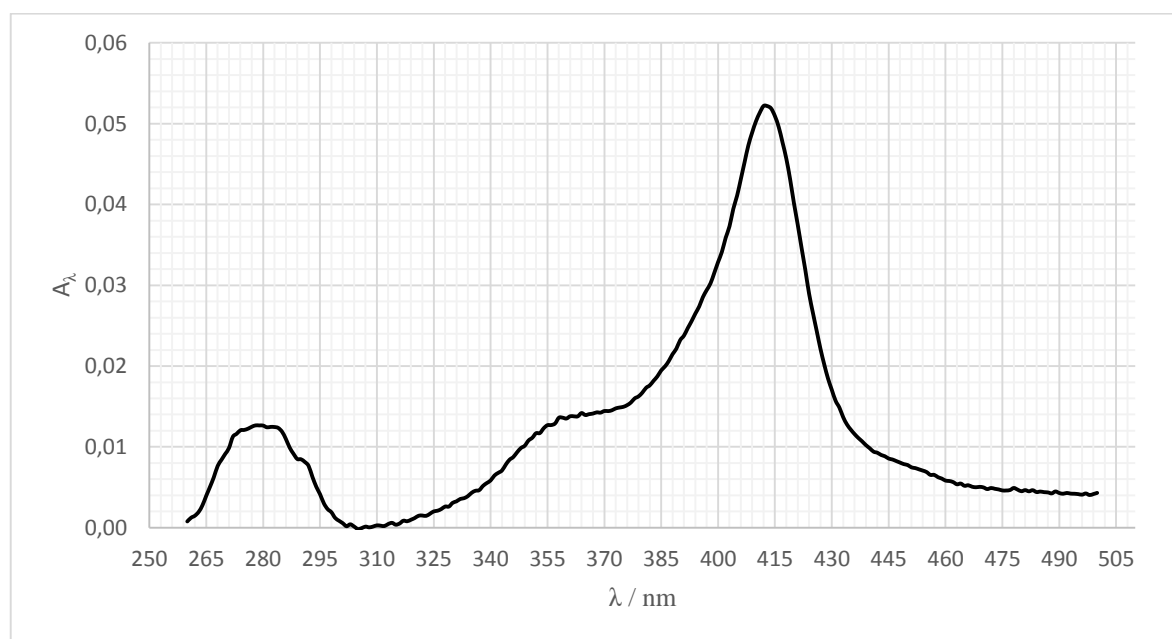
#### 4.2.4. Charakterizace finálního preparátu foto-cyt b<sub>5</sub>

Čistota finálního preparátu byla ověřena elektroforézou v 15 % polyakrylamidovém gelu (Obr. 17, str. 46).

Pro finální preparát byla stanovena koncentrace proteinů metodou BCA (kap. 3.3.1.1) o hodnotě  $3,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Kalibrační přímka pro stanovení je uvedena na Obr. 18, str. 47.

Celkem bylo z 250 ml bakteriální kultury získáno 1,5 mg proteinu - výtěžek z jednoho litru by tak činil 6,0 mg. Výtěžek vůči membránové frakci činil 10 %.

Dále bylo proměřeno absolutní absorpční spektrum finálního preparátu v 260-500 nm (Obr. 19). Na křivce jsou patrná dvě maxima. Maximum při 280 nm je způsobeno absorpcí aromatickými postranními řetězci aminokyselin apoproteinu i holoproteinu, zatímco maximum při 413 nm je charakteristické pouze pro holoformu hemoproteinu.



**Obr. 19:** Absolutní absorpční spektrum finálního preparátu foto-cyt<sub>5</sub>. 120 x ředěný vzorek, spektrofotometr Agilent Cary 60.

Podle metody popsané v kap. 3.3.1.2 byla z absolutního spektra vypočtena molární koncentrace holoformy foto-cyt<sub>5</sub> a molární koncentrace apofomy + holoformy foto-cyt b<sub>5</sub>, které jsou uvedeny v Tab. 5.

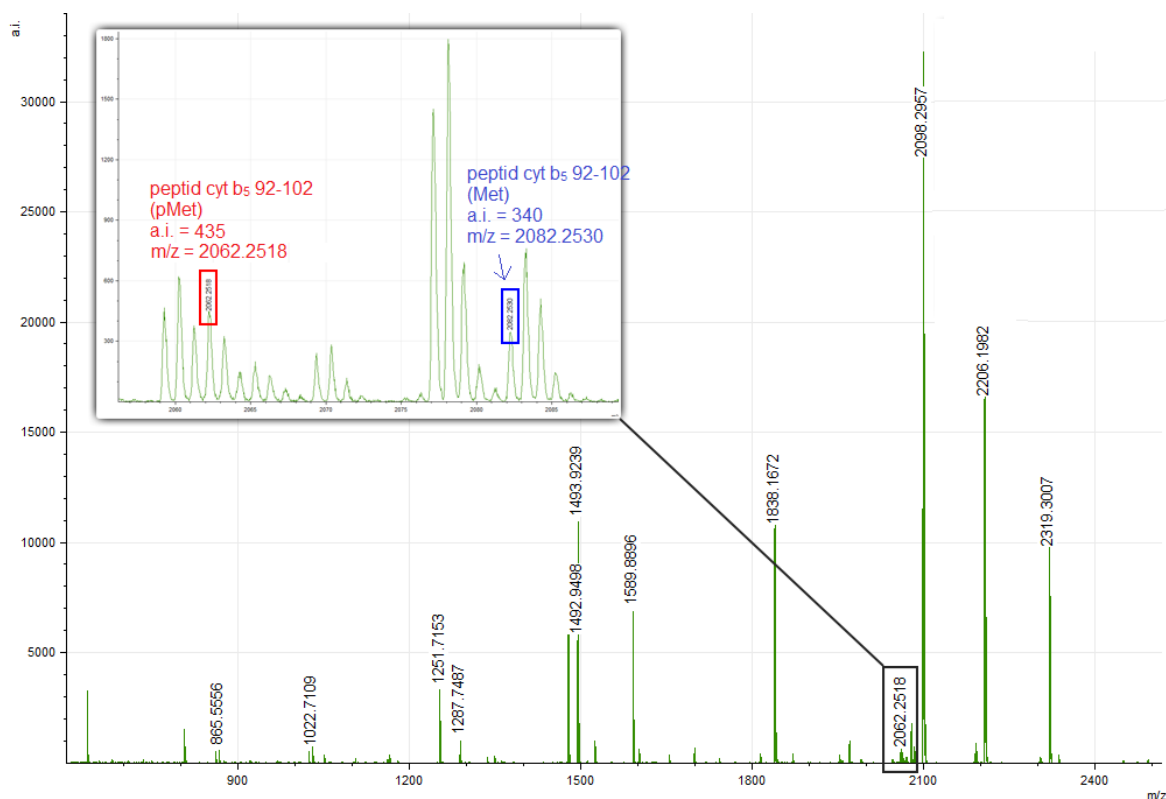
**Tab. 5: Stanovené koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub> z absolutního absorpčního spektra:**

| $c_{\text{holo}}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ] | $c$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ] |
|--|--|
| 49,4   | 51,3   |

$c_{\text{holo}}$  – molární koncentrace holoformy foto-cyt b<sub>5</sub> vypočtená z absorpance při 413 nm,  
 $c$  – molární koncentrace foto-cyt b<sub>5</sub> (holoformy i apoformy) vypočtená z absorpance při 280 nm.

Specifický obsah holo-foto-cyt b<sub>5</sub> činil 16,5 nmol · mg<sup>-1</sup> a specifický obsah foto-cyt b<sub>5</sub> byl 17,1 nmol · mg<sup>-1</sup>. Z toho vyplývá 96 % podíl holoformy foto-cyt b<sub>5</sub>.

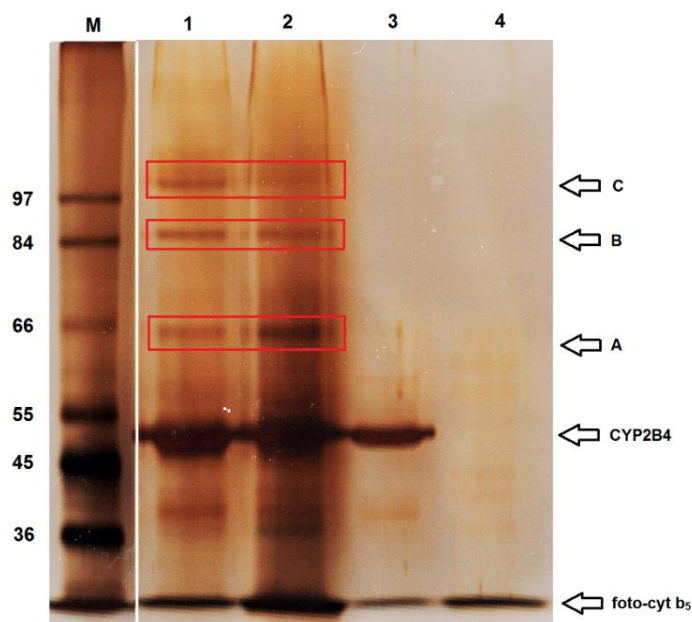
Analýza finálního preparátu foto-cyt b<sub>5</sub> hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF) byla provedena konzultantem práce RNDr. Tomášem Ječmenem. Hmotnostní spektrum chymotryptických peptidů finálního preparátu cyt b<sub>5</sub> je ukázáno na Obr. 20, str. 50. Pokrytí sekvence proteinu je 77 % a methionin je v ní substituován foto-reaktivním analogem z asi 30 %.



**Obr. 20: MALDI-TOF hmotnostní spektrum chymotrypsinem štěpeného finálního preparátu foto-cyt b<sub>5</sub>. Matrice - dihydroxybenzoová kyselina; označené experimentální hodnoty hmotnosti ku náboji (experim. m/z) odpovídají peptidům cyt b<sub>5</sub>; a.i. - absolutní intenzita. V detailu označeny signály peptidu s pMet (červený) a Met (modrý) v pozici 96; Obrázek poskytnut RNDr. Tomášem Ječmenem.**

### 4.3. Fotolýza v systému s CYP2B4

Finální preparát foto-cyt b<sub>5</sub> byl použit ke studiu protein-proteinových interakcí s CYP2B4 technikou kovalentního síťování. Směsi CYP2B4 s foto-cyt b<sub>5</sub> v molárním poměru 1:1 a 1:5 byly po rekonstituci v membráně DLPC fotolyzovány zářením UV výbojky (3:15 min, 100 W, emisní maximum při 254 nm). Vzniklé komplexy byly elektroforeticky separovány (Obr. 21, str. 51). Byly identifikovány 3 kovalentní heterooligomerní komplexy (A, B, C) pro oba molární poměry CYP2B4 a foto-cyt b<sub>5</sub>.



**Obr. 21: Elektroforetická separace produktů fotolýzy foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4.** 8 % polyakrylamidový separační gel, barvení stříbrem.  
*M* - proteinový standard molekulových hmotností, 1 - foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4 v molárním poměru 1:1, 2 - foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4 v molárním poměru 5:1, 3 - CYP2B4 (kontrola), 4 - foto-cyt  $b_5$  (kontrola).

Komplex A je soudě podle molekulové hmotnosti dimerem foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4. Obdobně komplexy B a C patrně jsou foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4 v molárním poměru 2:1, resp. 1:2.

Analýza vzniklých heterooligomerů hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF) byla provedena konzultantem práce RNDr. Tomášem Ječmenem. Peptidové mapování ukázalo přítomnost peptidů cyt  $b_5$  i CYP2B4 ve všech třech heterooligomerních komplexech vzniklých fotolýzou rekonstituovaného systému.

## 5. Diskuze

K přípravě analogu cytochromu  $b_5$  s fotolabilní skupinou byla použita heterologní exprese v bakteriích *E. coli* BL21(DE3). Inkorporace methioninového analogu (foto-methioninu) je možná díky relativně nižší selektivitě Met-tRNA syntetasy. Pro zamezení kompetice methioninu s foto-methioninem byla exprese prováděna v limitním médiu M9 neobsahujícím methionin. K jisté kompetici ale pravděpodobně docházelo, jelikož bakterie dokážou syntetizovat methionin vlastní. Tomu by bylo možné zabránit použitím auxotrofních bakterií, které by methionin nebyly schopny vyrábět. Cílem bylo připravit foto-cyt  $b_5$  s právě jedním ze tří methioninů v sekvenci (pozice 96) nahrazeným foto-methioninem. Bakterie byly proto transformovány plasmidem pET-22b s modifikovaným králičím genem pro cyt  $b_5$ , kde byly kodony pro ostatní dva methioniny nahrazeny kodony pro leuciny (mutace M126L a M131L). Produkce foto-cyt  $b_5$  probíhala podle podmínek optimalizovaných pro produkci foto-reaktivních analogů cyt  $b_5$  [65, 66, 67]. Bakterie byly aerobně kultivovány při 37 °C v 250 ml LB média do dosažení  $OD_{600} \approx 0,6$ . Při kultivaci k vyšším hodnotám  $OD_{600}$  by mohlo docházet k vyčerpání aminokyselin a ke snížení následné produkce. Produkce v M9 limitním médiu obsahujícího navíc foto-methionin byla indukována IPTG o výsl. konc. 1 mM a byla ukončena po 70 minutách. Hmotnostní analýzou finálního preparátu foto-cyt  $b_5$  a porovnáním intenzit signálů peptidů obsahujících methionin nebo foto-methionin byla zjištěna substituce methioninu foto-methioniem z asi 30 %. Srovnatelného výsledku již bylo při přípravě foto-cyt  $b_5$  dříve dosaženo [66]. Jedná se poměrně vysokou míru inkorporace, protože dodavatel foto-methioninu uvádí, že míra inkorporace foto-methioninu do proteinu je zpravidla 10-20 % [68].

Při přípravě detergentů pro solubilizaci proteinu pravděpodobně došlo k chybě a bylo přidáno extrémně nadbytečné množství detergentu Brij 35 a cholátu sodného. To bylo příčinou rozmytí vzorku solubilizátu v dráze při SDS elektroforéze (dráha 4, Obr. 18, str. 46). Vysoké množství detergentu mělo pravděpodobně i vliv na hodnotu koncentrace proteinů, stanovenou metodou BCA (Tab. 4, str. 47). Hodnota koncentrace několiknásobně převyšovala předpoklad. Přebytný detergent by bylo možné odstranit například vysrážením proteinu v acetonu [68]. V průběhu izolace byl detergent nakonec odstraněn díky

rechromatografii na koloně DEAE-Sepharosy CL6B FF, kde byl Brij 35 nahrazen cholátem sodným. Cholát byl odstraněn dialýzou.

Za předpokladu, že ve finálním preparátu nebyla žádná jiná látka absorbující při 280 nm než foto-cyt  $b_5$ , byl specifický obsah holo-foto-cyt  $b_5$   $16,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  a specifický obsah foto-cyt  $b_5$   $17,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Z toho vyplývá 96 % podíl holoformy foto-cyt  $b_5$ . Titrace heminem tedy byla velmi úspěšná. V jiné práci [66] bylo podobným postupem dosaženo míry inkorporace hemu do aktivního centra proteinu 72 %. V případě, že hemin nebyl k proteinu (cyt  $b_5$ ) přidán [69], byl poměr holoformy pouze 7,5 %. Vysoký obsah apoformy exprimovaného cyt  $b_5$  může být způsoben vysokou rychlostí exprese, kdy dochází ke kompetici o aminokyseliny mezi biosyntesou hemu a proteosyntesou [70].

Z gelu elektroforézy komplexů vzniklých po fotolýze rekonstituovaného systému foto-cyt  $b_5$  s CYP2B4 je patrné, že bez ohledu na to, jestli byl molární poměr foto-cyt  $b_5$  ku CYP2B4 5:1 nebo 1:1, v obou případech vznikly tři komplexy molárních poměrů 1:1, 2:1 a 1:2. Tento výsledek je v souladu s výsledky práce, která hodnotila foto-reaktivitu foto-cyt  $b_5$  s náhodně substituovaným methioninem rovněž v systému s CYP2B4 [65].

Bylo dokázáno, že lze připravit analog cytochromu  $b_5$  s právě jednou pozicí pro methionin (96) a během exprese proteinu zavést do této pozice foto-methionin. Optimalizované metody pro produkci a izolaci proteinu fungují podobně jako pro foto-cyt  $b_5$ , kde nebyl substituován methionin foto-reaktivním analogem jen v jedné konkrétní pozici. Titrací heminem po solubilizaci lze získat holo-formu foto-cyt  $b_5$  s 96 % podílem. Fotolýza s CYP2B4 rovněž poskytuje analogické výsledky.

## 6. Shrnutí

V práci byl připraven a izolován analog cytochromu  $b_5$  (foto-cyt  $b_5$ ), v němž byl methionin (Met) v pozici 96 nahrazen foto-reaktivním analogem (pMet). Expresa proběhla v bakteriích *E. coli* BL21(DE3) Gold transformovaných plasmidem modifikovaným tak, aby dva ze tří Met (kromě Met96) v proteinu byly nahrazeny leucinem. Produkce proteinu probíhala 70 min v limitním médiu M9 neobsahujícím Met. Purifikací bylo získáno 1,5 mg proteinu z 250 ml bakteriální suspenze se specifickým obsahem holofomy foto-cyt  $b_5$   $16,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  a 96 % poměrem vůči apoformě. Hmotnostní analýzou foto-cyt  $b_5$  bylo určeno, že methionin byl v sekvenci substituován foto-reaktivním analogem z asi 30 % (pokrytí sekvence 77 %).

Foto-reaktivita foto-cyt  $b_5$  byla prokázána v rekonstituovaném systému s CYP2B4, který byl ozářen UV zářením. Byly nalezeny 3 heterooligomery o molekulárních hmotnostech odpovídající poměrům foto-cyt  $b_5$  a CYP2B4 v komplexech 1:1, 1:2 a 2:1. Peptidové mapování ukázalo přítomnost peptidů cyt  $b_5$  i CYP2B4 ve všech třech vzniklých heterooligomerních komplexech.

## Seznam použité literatury

- [1] Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M.: *Biochem. Pharmacol.*, 82, 669-680 (2011)
- [2] Ioannides, C., Lewis, D. F.: *Curr. Top. Med. Chem.*, 4, 1767-1788 (2004)
- [3] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. listy*, 94, 229-237 (1999)
- [4] Guengerich, P.: *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 70-83 (2008)
- [5] Singh, D., Kashyap, A., Pandey, R. V., Saini, K. S.: *Drug. Discov. Today*, 16, 793-799 (2011)
- [6] Ingelman-Sundberg, M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207, 52-56 (2005)
- [7] Shenkman, J. B., Jansson I.: *Pharmacol. Ther.*, 97, 139-152 (2003)
- [8] Dürr, U. H., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 3235-3259 (2007)
- [9] <http://drnelson.uthsc.edu/P450.statsfile.html> (15. 4. 2014)
- [10] Bernhardt, R.: *J. Biotechnol.*, 124, 128-145 (2006)
- [11] Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 376-386 (1958)
- [12] Lamb, D. C., Lei, L., Warrilow, A.G., Lepesheva, G.I., Mullins, J.G., Waterman, M.R., Kelly, S. L.: *J. Virol.*, 83 (16), 8266-8269 (2009)
- [13] Nelson, D. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1814, 14-18 (2011)
- [14] Nelson, D. R.: The Cytochrome P450 Homepage-Human Genomics 4, 59-65 (2009) - <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> (15.3.2014)
- [15] Scott, E. E., He, Y. A., Wester, M. R., White, M. A., Chin, C. C., Halpert, J. R., Johnson, E. F., Stout, C. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (23), 13196-13201 (2003)
- [16] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. listy*, 98, 876-890 (2004)
- [17] Hu B., Sun C., Xu S., Zhou W.: Synthesis of Metallo-Deuteroporphyrin Derivatives and the Study of Their Biomimetic Catalytic Properties, InTech, Nanjing (2011)
- [18] [http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR\\_enzymology.htm](http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm) (12. 4. 2014)
- [19] Sato, R., Omura, T.: *Cytochrome P-450* - Academic Press, New York (1978)
- [20] <http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html#reaction> (26. 12. 2013)
- [21] Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.*, 240, 4481-4487 (1965)

- [22] Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 440, 204-211 (2005)
- [23] Velick, S. F., Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.*, 221, 265-275 (1956)
- [24] Sligar, S. G., Cinti, D. L., Gibson, G. G., Schenkman, J. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 925-932 (1979)
- [25] Vergeres, G., Waskell, L.: *Biochimie*, 77, 604-620 (1995)
- [26] Keilin, D., Hartree, E. F., *Nature*, 164, 254-259 (1949)
- [27] Sanborn, R. C., Williams, C. M., *J. Gen. Physiol.*, 33, 579-588, (1950)
- [28] Pappenheimer A. M. Jr., Williams, C. M.: *J. Gen. Physiol.*, 35, 727-740, (1952)
- [29] Douglas, R. H., Hultquist, D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 3118-3122 (1978)
- [30] Ozols, J.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 997 (1-2), 121-130 (1989)
- [31] Mulrooney, S. B., Waskell, L., *Protein Exprim. Purif.*, 19 (1), 173-178 (2000)
- [32] Dürr, U. H., Yamamoto, K., Im, S. C., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (21), 6670-6671 (2007)
- [33] Hultquist, D. E., Passon, P. G., *Nature*, 229, 252-254, (1971)
- [34] Sannes L. J., Hultquist D.E., *Biochim. Et Biophys. Acta*, 544, 547-554, (1978)
- [35] Keyes, S. R., Cinti, D.L., *J. Biol. Chem.*, 255, 11357-11364, (1980)
- [36] Paltuaf, F., Prough, R. A., Masters, B. S., Johnston, J. M.: *J. Biol. Chem.*, 249, 2661-2662 (1974)
- [37] Grinstead, G. F., Gaylor, J. L.: *J. Biol. Chem.*, 257, 13937-13944 (1982)
- [38] Fukushima, H., Grinstead, G. F., Gaylor, J. L., *J. Biol. Chem.*, 256, 4822-4826, (1981)
- [39] Storbeck, K. H., Swart, A. C., Goosen, P., Swart, P., *Mol. Cell Endocrinol.*, 371(1-2), 87-99 (2013)
- [40] Canova-Davis, E., Waskell, L.: *J. Biol. Chem.*, 259, 2541-2546 (1984)
- [41] Canova-Davis, E., Chiang, J. Y. L., Waskell, L. A., *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1907-1912 (1985)
- [42] Morgan, E. T., Coon, M. J.: *Drug Metab. Dispos.*, 12, 358-364 (1984)
- [43] Zhang, H., Im, S. C., Waskell, L.: *J. Biol. Chem.*, 282, 29766-29776 (2007)
- [44] Zhang, H., Im, S. C., Waskell, L.: *J. Biol. Chem.*, 282, 29766-29776 (2007)
- [45] Bonfils, C., Balny, C., Maurel, P.: *J. Biol. Chem.*, 256, 9457-9465 (1981)
- [46] Schenkman, J. B., Voznesensky, A. I., Jansson, I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 314, 234-241 (1994)

- [47] Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Drug Metab. Rev.*, 31, 351-364 (1999)
- [48] Perret, A., Pompon, D.: *Biochemistry*, 37, 11412-11424 (1998)
- [49] Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N, Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F. P., Shimada, T., Nakajimam, M., Yokoim, T. R.: *Protein Expr. Purif.*, 24 (3), 329-337 (2002)
- [50] Caffrey, M.: *J. Struct. Biol.*, 142 (1), 108-132 (2003)
- [51] Nelson, Cox – Lehninger Principles of Biochemistry 5th ed., W. H. Freeman and Co., New York (2008)
- [52] Zhang, W. H., Otting, G., Jackson, C. J.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23 (4), 581-587, (2013)
- [53] <http://www.piercenet.com/method/chemistry-crosslinking>  
- web firmy Thermo Scientific (24. 3. 2014)
- [54] Kubíčková, B., Hodek, P.: *Chem. listy*, 95, 359-364 (2001)
- [55] Miernyk, J. A., Thelen, J. J.: *Plant J.*, 53(4), 597-609 (2008)
- [56] <http://www.piercenet.com/product/photoreactive-amino-acids>  
- web firmy ThermoScientific (24. 3. 2014)
- [57] Hendrickson, T. L., de Crécy-Lagard, V., Schimmel, P.: *Annu. Rev. Biochem*, 73, 147–176 (2004)
- [58] Hecht, S. M., Alford, B. L., Kuroda, Y., Kitano, S.: *J. Biol. Chem.*, 253, 4517-4520 (1978)
- [59] Kenyon, G. L., Bruice, T. W.: *Methods Enzymol.* 47, 407-430 (1977)
- [60] Wynn R., Richards, F. M.: *Protein Sci.*, 2, 395–403 (1993)
- [61] 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)
- [62] Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: *Anal. Biochem.*, 175, 231-237 (1988)
- [63] <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P00169@2-134@>  
(20. 3. 2015)
- [64] Estabrook, R. W., Werringloer, J.: *Methods Enzymol.*, 52, 212-220 (1978)
- [65] Koberová, M.: Diplomová práce, katedra biochemie, PŘF UK, Praha, 2012
- [66] Koberova, M., Jecmen, T., Sulc, M., Cerna, V., Kizek, R., Hudecek, J., Stiborova, M., Hodek, P.: *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8, 125-134 (2013)

- [67] [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0011609\\_LPhotoLeucine\\_LPhotoMethionine\\_UG.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0011609_LPhotoLeucine_LPhotoMethionine_UG.pdf) (20. 5. 2015)
- [68] Crowell, A. M. J., Wall, M. J., Doucette, A. A.: *Anal. Chim. Acta*, 796, 48-54 (2013)
- [69] Koberová, M.: Bakalářská práce, katedra biochemie, PřF UK, Praha, 2010
- [70] Jung, Y., Kwak, J., Lee, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 187-191 (2001)

