

Abstrakt

System 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 b₅ (cyt b₅). Mechanismus, jakým cyt b₅ působí, ještě nebyl zcela objasněn. Jednou z možností studia této protein-proteinové interakce je metoda kovalentního síťování. Záměnou methioninu ve struktuře cyt b₅ za jeho foto-aktivovatelný analog (foto-methionin) je možné připravit analog cyt b₅ (foto-cyt b₅), který po aktivaci UV zářením kovalentně váže cytochrom P450 v membránovém prostředí.

Tato práce se zabývá expresí a izolací rekombinantního analogu cyt b₅ 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 b₅ byl použit k fixování transientní protein-proteinové interakce s cytochromem P450 2B4 (CYP2B4). Foto-cyt b₅ byl rekonstituován v lipidovém systému s CYP2B4 a fotolyzován. Pomocí SDS elektroforézy byly identifikovány 3 vzniklé heterooligomery. Peptidové mapování ukázalo přítomnost peptidů cyt b₅ i CYP2B4 ve všech třech vzniklých heterooligomerních komplexech.

Klíčová slova:

NADPH:cytochrome P450 oxidoreduktasa, cytochrom b₅, exprese proteinu, fotosíťování