

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Cytochrom P-450: studium struktury a interakcí metodami chemické modifikace, foto-iniciovaného síťování a hmotnostní spektrometrie

RNDr. Tomáš Ječmen

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Praha, 2015

ABSTRAKT

Cytochromy P-450 (P450) jsou oxygenasy podílející se na biotransformaci široké škály endogenních a exogenních substrátů. Cytochrom b5 (cyb5) je fakultativní partner P450, který moduluje katalytické vlastnosti některých jeho isoformů. Jeho interakce s P450 2B4 byly studovány dvěma technikami sítování v „nulové vzdálenosti“ (angl. „zero-length cross-linking“): pomocí (i) chemického činidla EDC (propojuje karboxyl s aminoskupinou), nebo (ii) foto-reaktivní analog methioninu pMet (po aktivaci UV se váže na libovolnou aminokyselinu v blízkosti). Ten byl inkorporován namísto přirozené aminokyseliny do proteinové sekvence cyb5 během rekombinantní exprese v *E. coli*, v limitním médiu s přidavkem tohoto analogu. Optimalizací postupu bylo dosaženo ~20-30% nahrazení přirozené aminokyseliny.

Oběma přístupy byly získány kovalentně zesítené heterooligomery patrné na SDS-PAGE. Komplexy s nejednoznačně určenou stechiometrií byly charakterizovány pomocí 2-dimensionální SDS-PAGE a metodou celkové aminokyselinové analýzy. Poměr proteinů v P450 2B4:cyb5 komplexech byl určen jako 1:1, 1:2 a 2:1.

Jednotlivé komplexy byly proteolyticky štěpeny a zesítené peptidy byly ve vzniklé směsi identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením ve spojení s kapalinovou chromatografií. Zesítené páry aminokyselin získané chemickým sítováním byly využity při *in silico* modelování interakce mezi katalytickými doménami P450 2B4 a cyb5. Mimo to byly pomocí foto-iniciovaného sítování objeveny další interakční oblasti katalytických domén exponovaných v cytosolu, a vůbec poprvé experimentálně potvrzen kontakt hydrofobních helixů v lipidické membráně. Výsledky naznačují existenci minimálně dvou odlišných orientací proteinů ve studovaném systému.

V práci jsou ukázány výhody vyvinuté metody foto-iniciovaného sítování pro studium protein-proteinových interakcí oproti sítování chemickému.

1. ÚVOD

Strukturní biologie se zabývá prostorovým uspořádáním makromolekul ve snaze porozumět jejich fyziologické funkci a mechanismu jejich vzájemného ovlivňování ve funkčních komplexech. Dominantní metody poskytující vhled do terciární a kvartérní struktury proteinů mají svá omezení: rentgenová krystalografie se obtížně vyrovnává s vysoce flexibilními a membránovými proteiny, a modely krystalů se neshodují se strukturou v roztoku [Egli 2010]; elektronová mikroskopie poskytuje pouze struktury s nižším rozlišením, které mohou navíc obsahovat artefakty vzniklé při přípravě vzorků [Wang 2015]; nukleární magnetická resonance vyžaduje vzorky s vysokou koncentrací analytu, která může mít za následek nefyziologické interakce ovlivňující *in vivo* konformaci proteinů [Lian and Roberts 2011]. Běžně využívanou komplementární metodikou pro studium struktury proteinů a protein-proteinových interakcí je síťování s následnou identifikací zesílení pomocí hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. „mass spectrometry“).

MS je všestranná technika pro rychlou a citlivou identifikaci chemických látek na základě poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z). K jejímu rozšíření v biologické oblasti došlo objevením dvou měkkých ionizačních technik umožňujících ionizaci makromolekul bez jejich fragmentace – ionizace a desorpce laserem v přítomnosti matrice (MALDI, z angl. „matrix-assisted laser desorption/ionization“) [Tanaka *et al.* 1988] a ionizace elektrospejem (ESI, z angl. „electrospray ionization“) [Wong *et al.* 1988]. Současné MS přístroje s vysokým rozlišením dovolují separaci iontů vzájemně se lišících v řádu 0,0001 % m/z . S touto přesností lze určit molekulární složení analyzovaného iontu (např. aminokyselinové složení peptidu). Druhou možností přiřazení iontu k experimentálně získané hodnotě m/z je využití tandemové MS [Jennings 1968], která umožňuje fragmentaci analytu jednou z dostupných metod. Doplňková informace ve formě m/z fragmentačních iontů umožňuje určit

např. aminokyselinovou sekvenci peptidu a pozici modifikovaných nebo zesíťovaných aminokyselin.

V současnosti máme k dispozici širokou paletu síťovacích činidel s odlišnými vlastnostmi, které umožňují uskutečnit řadu různých experimentů [Sinz 2006]. Dva přístupy založené na síťování v „nulové vzdálenosti“, které kovalentně fixují přechodné intra- a intermolekulární interakce v maximální vzdálenosti 5 Å [Kalkhof *et al.* 2005], jsou využívány v rámci prezentované práce. První využívá karbodiimidovou chemii (např. činidlo EDC), která propojuje karboxylovou a primární aminoskupinu amidovou vazbou, a slouží k fixaci elektrostatických interakcí [Sheehan *et al.* 1961]. Druhá využívá foto-reaktivní aminokyselinový analog (např. pMet, z angl. „photo-methionine“) zavedený do sekvence proteinu [Suchanek *et al.* 2005]. Ten je aktivován UV zářením za vzniku reaktivního biradikálu s nízkou selektivitou, schopného se vázat na libovolný bočný řetězec blízké aminokyseliny, nezávisle na experimentálních podmínkách a okolním prostředí [Bayley and Knowles 1977].

Za účelem zajištění správnosti sekvence nově vznikajících proteinů je proteosyntéza vysoce regulovaný proces [Nureki *et al.* 1998]. Některé aminoacyl-tRNA synthetasy nicméně mají uvolněné vazebné místo pro aminokyselinu a umožňují konjugaci s tRNA také jejím strukturně blízkým analogům [Dezniak and Barciszewski 2001]. Postoupení methioninového kodonu (angl. „codon reassignment“) je široce využívanou technikou globálního nahrazení této aminokyseliny v sekvenci proteinu. Dochází k němu během rekombinantní exprese v médiu doplněném o požadovaný analog (např. pMet) [Hendrickson *et al.* 2004].

Proteiny studované v rámci prezentované práce jsou součástí systému oxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxygenase“), který se podílí na biosyntéze endogenních látek a metabolismu xenobiotik [Guengerich 2005]. Cytochromy P-450 (P450) slouží jako terminální oxygenasy systému při biotransformaci substrátů. Cytochrom b5 (cyb5) je fakultativní

součástí systému. Může poskytnout jeden z elektronů potřebných pro katalýzu, a moduluje katalytické vlastnosti některých P450 (např. studované isoformy 2B4) [Kotrbová *et al.* 2011]. Oba cytochromy jsou tvořeny cytosolární katalytickou doménou a hydrofobním helixem ukotvujícím je v lipidické membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrie [Bar-Nun *et al.* 1980, Omura and Morohashi 1995].

Konzervované strukturní jádro P450, jehož součástí je hemová prosthetická skupina, se nachází blízko proximální oblasti proteinu. Na jejím povrchu jsou lokalizována překrývající se vazebná místa pro redoxní partnery, kteří poskytují elektrony v průběhu P450 katalytického cyklu [Bridges *et al.* 1998]. Dynamičtější, méně konzervovaná vazebná kapsa pro substráty se nachází na opačné, distální straně proteinu [Poulos and Johnson 2005]. Funkce N-terminální membránové domény nebyla dosud plně objasněna, ale může být nezbytná pro transport hydrofobních substrátů do aktivního centra P450, nebo může zprostředkovávat správné uspořádání složek MFO systému do funkčního komplexu [Causey *et al.* 1990].

Na povrchu N-terminální domény cyb5 se nachází oblast záporně nabitých aminokyselinových zbytků, která je společně se záporně nabitými karboxylovými skupinami propionátů hemové prosthetické skupiny komplementární ke kladně nabitým aminokyselinám na kontaktním povrchu P450 2B4. C-terminální transmembránová kotva cyb5 je nezbytná pro ovlivnění katalýzy P450 [Vergères and Waskell 1995]. Obě domény jsou propojeny flexibilní spojovací doménou, která se také podílí na interakci cyb5 s P450 [Clarke *et al.* 2004].

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Vyvinutí metodologie foto-iniciovaného síťování pro určování proteinové struktury a protein-proteinových interakcí v lipidické membráně
 - a) Optimalizace inkorporace foto-reaktivního analogu methioninu (pMet) do sekvence proteinové nanosondy během její rekombinantní exprese v *E. coli*
 - b) Fixace přechodných intermolekulárních interakcí P450 2B4 a foto-reaktivního cyb5 nově vyvinutou metodou
 - c) Nalezení domnělého kontaktu obou cytochromů v membráně
- 2) Využití chemického a foto-iniciovaného síťování ve spojení s hmotnostní spektrometrií k rozšíření současných znalostí o protein-proteinových interakcích katalytických domén P450 2B4 a cyb5 exponovaných v cytosolu
- 3) Určení orientace P450 2B4 a cyb5 v rekonstituovaném systému
- 4) Stanovení stechiometrie v jednotlivých zesíťených komplexech

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

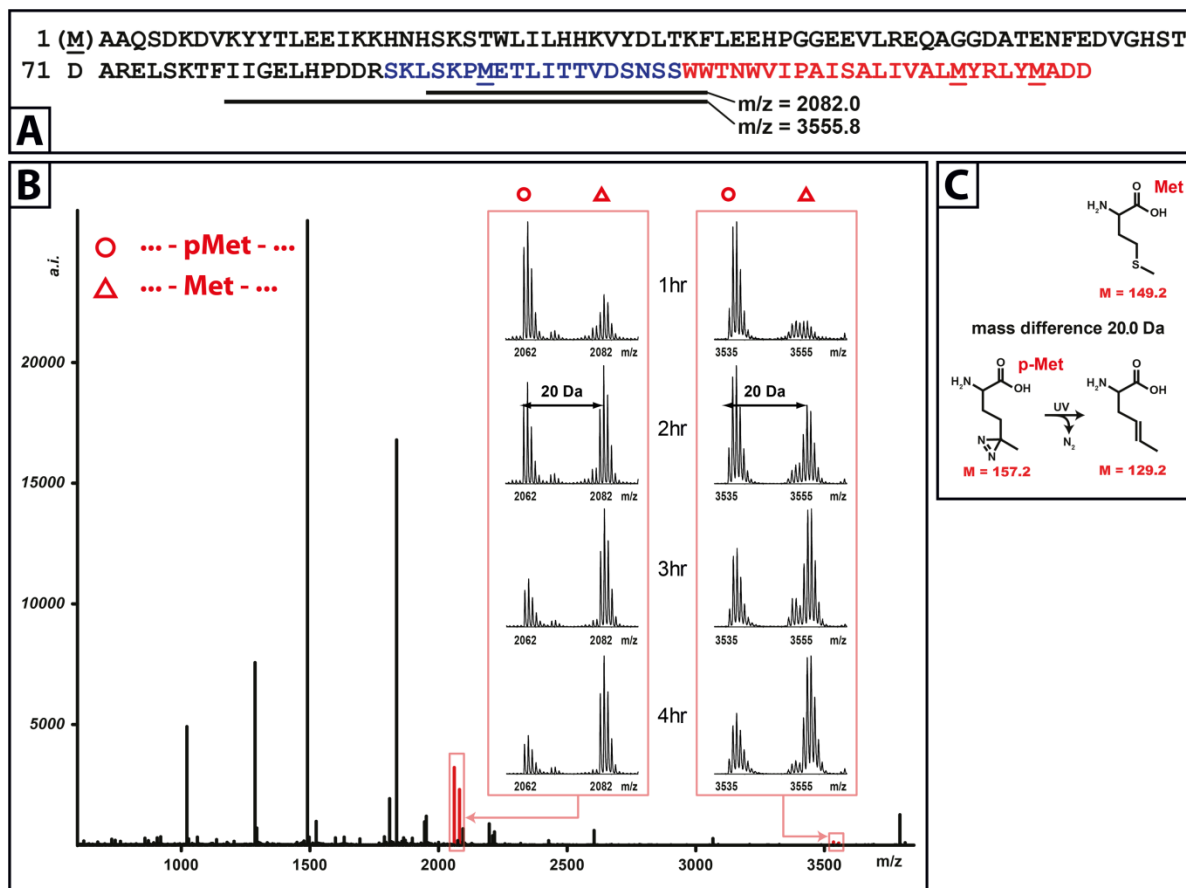
Tato práce je založena na čtyřech publikacích zabývajících se organizací proteinů systému oxygenas se smíšenou funkcí (P450 2B4 a cyb5) a hledáním jejich interakcí v cytosolu i lipidické membráně. Za účelem studia membránové topologie těchto proteinů byla vyvinuta a optimalizována metoda založená na foto-iniciovaném síťování (Publikace č. 2), a ta byla dále využita také pro zkoumání struktury a chování cytosolárních domén obou cytochromů (Publikace č. 4).

Jako vhodná foto-reaktivní nanosonda pro studium membránové topologie byl zvolen cyb5 – malý membránový protein s rychlou expresí, snadnou purifikací a s celkem 3 methioniny v sekvenci (dva se nacházejí v membránové doméně, jeden v doméně spojovací). Exprese cyb5 probíhala v limitním médiu obohaceném o pMet a míra jeho inkorporace byla průběžně sledována pomocí MALDI-TOF MS (Obr. 1). Pokles v zastoupení pMet v sekvenci z ~70 % po 1 hodině exprese na ~30 % po 4 hodinách byl pravděpodobně způsoben zvyšováním koncentrace methioninu kompetujícího o aktivaci methionyl-tRNA syntetasou. Biosyntéza methioninu je zahájena přibližně 1,5 hodiny po přenesení bakteriální kultury do limitního média [Zaslaver *et al.* 2004].

Šest foto-reaktivních mutantů cyb5 – každý obsahující jedinou methioninovou pozici – bylo připraveno (i) pro snížení komplexity výsledků získaných síťováním „divokého typu“ (WT, z angl. „Wild type“) nanosondy a zjednodušení jejich interpretace (3 mutanty s pMet v membránové kotvě nebo spojovací doméně), nebo (ii) pro rozšíření současných znalostí interakcí katalytických domén cytochromů (3 mutanty s pMet vneseným do katalytické domény pomocí místně cílené mutageneze).

Reakční směs složená z P450 2B4 a foto-reaktivního cyb5 rekonstituovaných s lipidickou membránou byla fotolyzována UV zářením. Tři nově vzniklé kovalentní heterooligomerní komplexy o přibližné molekulové

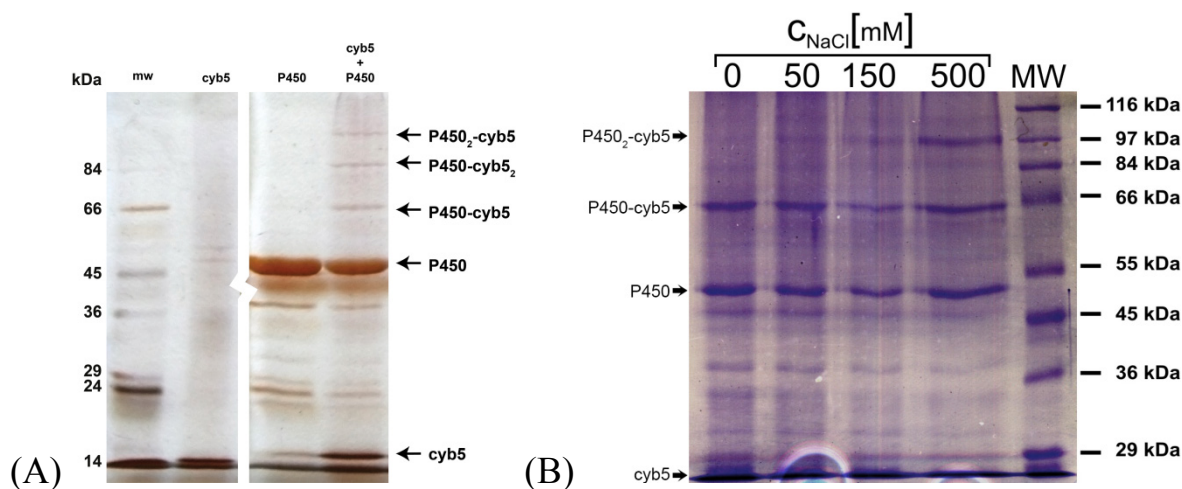
hmotnosti 70 kDa, 90 kDa a 125 kDa byly pozorovány na SDS-PAGE (Obr. 2A). Pro jednotlivé komplexy P450 2B4:cyb5 byl stanoven poměr proteinů 1:1, 1:2, resp. 2:1, a bude dále diskutován. Kontrolní fotolýza proteinů neobsahujících foto-reaktivní aminokyseliny nevedla ke spontánnímu síťování ani k jejich degradaci.



Obr. 1: Inkorporace pMet do sekvence cyb5. (A) Aminokyselinová sekvence cyb5 WT s označenými peptidy zvolenými ke sledování účinnosti inkorporace pMet; černá – cytosolární doména, modrá – flexibilní spojovací doména, červená – membránová kotva. (B) Závislost účinnosti inkorporace pMet na délce exprese nanosondy (1 – 4 hodiny); MALDI-TOF hmotnostní spektra peptidů foto-reaktivního cyb5 štěpeného chymotrypsinem, v detailu dva páry peptidů s pMet/Met v sekvenci, poměr jejich relativních intenzit vyjadřuje úspěšnost inkorporace pMet. (C) MALDI laser aktivuje diazirinovou skupinu pMet během ionizace; páry peptidů s produktem fotolýzy pMet nebo Met se v MALDI-TOF spektrech liší typicky o 20.0 Da.

Proteiny rekonstituované s lipidickou membránou byly rovněž zesítěny pomocí chemického činidla EDC (Publikace č. 1). Výsledkem byly dva heterooligomerní komplexy pozorované na SDS-PAGE (Obr. 2B). Jejich přibližné molekulové hmotnosti 70 kDa a 125 kDa odpovídají komplexům P450 2B4:cyb5 s poměrem proteinů 1:1, resp. 2:1. Tvorba komplexů nebyla narušena

zvyšující se koncentrací chloridu sodného v reakční směsi (0 - 500 milimolární), což naznačuje významný příspěvek hydrofobních interakcí na rozhraní obou proteinů.



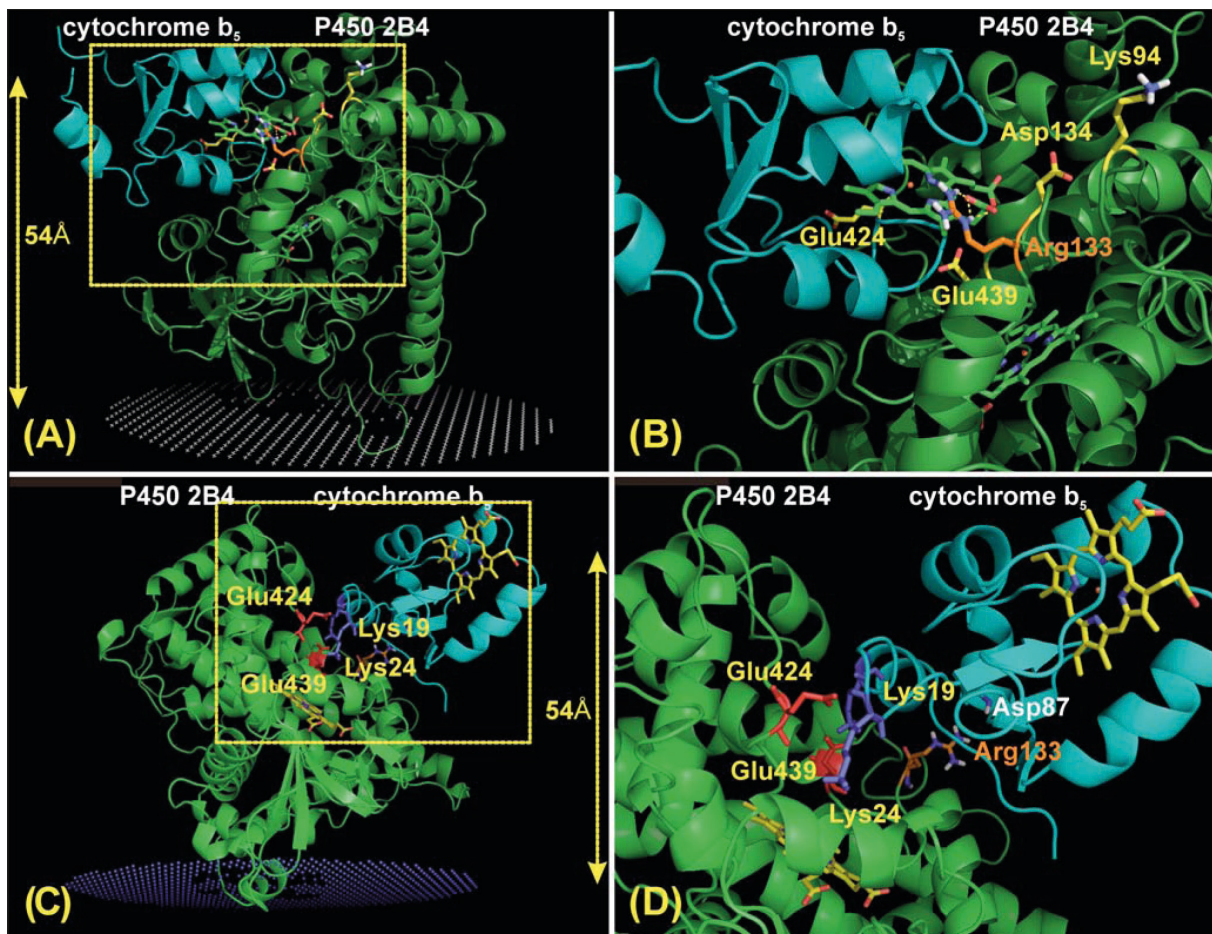
Obr. 2. 1-dimensionální elektroforetická separace (A) foto- nebo (B) chemicky zesíťených P450 2B4:cyb5 heterooligomerů. (A) 12% SDS-PAGE, barvení stříbrem; foto-reaktivní cyb5 a P450 2B4 rekonstituované s lipidickou membránou – fotolyzované odděleně (dvě prostřední dráhy) nebo dohromady (pravá dráha). (B) 8% SDS-PAGE, barvení Coomassie Brilliant Blue R-250; cyb5 a P450 2B4 rekonstituované s lipidickou membránou a zesíťené při různé koncentraci chloridu sodného (0, 50, 150 a 500 milimolární); MW – molekulový standard Sigma wide-range.

Experimentální podmínky vhodné pro EDC reakci (pyridinový pufr, pH 6,0) se zcela neshodují s fyziologickými a projevují se snížením katalytické aktivity O-depentylační reakce specifické pro P450 2B4 [Parmar *et al.* 1998]. Nicméně charakteristický vliv cyb5 na aktivitu P450 2B4 (zvýšení v přítomnosti ekvimolárního množství cyb5 a snížení při jeho nadbytku) byl pozorován i za podmínek vhodných pro chemické síťování, mechanismus ovlivnění proto byl považován za nezměněný.

Pro studium komplexů P450 2B4:cyb5 byl použit tzv. přístup „bottom up“ – nejprve byly separovány pomocí SDS-PAGE, poté proteolyticky štěpeny a získané peptidy byly analyzovány pomocí MS s vysokým rozlišením napojené na kapalinovou chromatografii s obrácenou fází. Nemodifikované, modifikované a zesíťené peptidy byly identifikovány na základě jejich přesně změřených hodnot m/z (chyba měření < 0.0002 %). Intermolekulární kontakty mezi oběma cytochromy lze rozdělit do 3 skupin: (i) interakce cyb5 s proximální

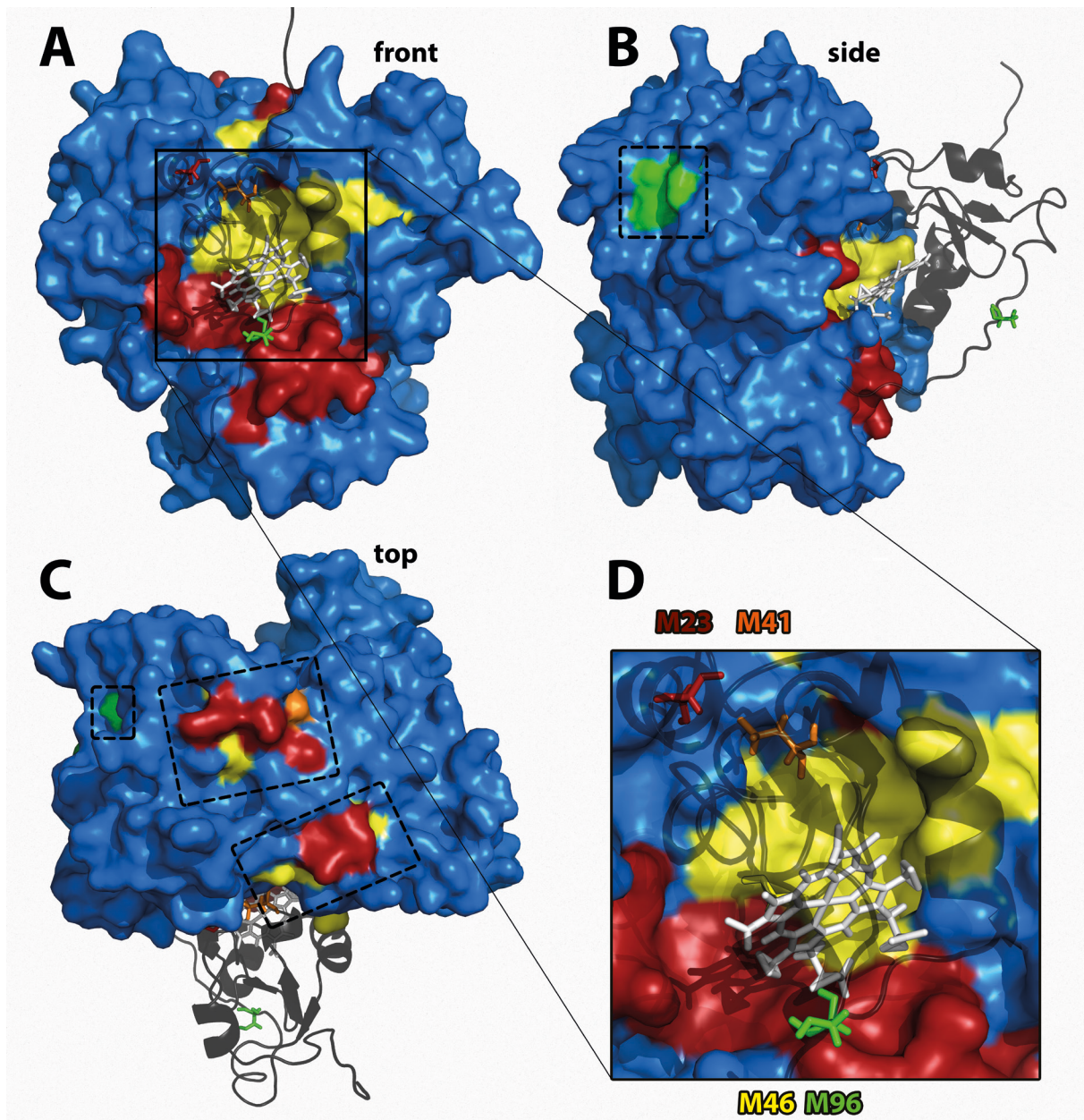
stranou P450 2B4, (ii) interakce cyb5 s distální stranou P450 2B4, a (iii) interakce mezi hydrofobními kotvami cytochromů v lipidické membráně.

Interagující aminokyselinové páry zesíťené chemicky – Asp8-Lys139, Lys19-Asp134, Lys19-Glu439, Lys24-Glu424 (v pořadí cyb5-P450 2B4) – byly vyvozeny na základě známého reakčního mechanismu činidla EDC (propojení karboxylové skupiny aspartátu, glutamátu nebo C-konce s aminoskupinou argininu, lysinu nebo N-konce) a posloužily jako omezení (angl. „constrains“) při *in silico* modelování zachycených interakcí. Dvě navržené orientace jsou znázorněny na Obr. 3.



Obr. 3. *In silico* model interakce P450 2B4:cyb5 založený na výsledcích síťování činidlem EDC. (A) a (B) ukazují orientaci proteinů vhodnou pro přenos elektronu; hemová prostetická skupina cyb5 je přikloněná k hemové prostetické skupině P450 2B4 nacházející se na jeho proximální straně. (C) a (D) ukazují cyb5 interagující s proximální stranou P450 2B4, s hemovou prostetickou skupinou odkloněnou od kontaktního povrchu cytochromů; tato interakce může být zodpovědná pouze za alosterickou modulaci katalytických vlastností P450 2B4. Zelený – P450 2B4, modrozelený – cyb5.

Nízký výtěžek foto-iniciovaného síťování neumožnil sekvenování zesíťených peptidů pomocí tandemové MS a byla tak získána pouze strukturní data s nízkým rozlišením (na peptidové namísto aminokyselinové úrovni). Tři mutantní cyb5, každý s jediným pMet zavedeným do katalytické domény, označily peptidy P450 2B4, které tvoří všeobecně uznávané vazebné místo pro redoxní partnery (Obr. 4).



Obr. 4. Vizualizace peptidů P450 2B4 označených foto-reaktivními mutanty cyb5. (A) Čelní, (B) boční a (C) horní pohled na P450 2B4 (modrý) s peptidy označenými pMet23 (červený), pMet41 (oranžový), pMet46 (žlutý) a pMet96 (zelený) nanosondy (černá, průhledná). Cyb5 je naznačen v orientaci vhodné pro přenos elektronu, (D) s hemovou prosthetickou skupinou (bílá) směřující k proximálnímu povrchu P450 2B4. Orientace cyb5 zodpovědné za značení ostatních peptidů (označeny přerušovanou čarou) neuvedeny.

Nicméně byly označeny také peptidy nacházející se na distální straně P450 2B4, což naznačuje existenci další možné orientace cyb5, která nebyla dosud ukázána.

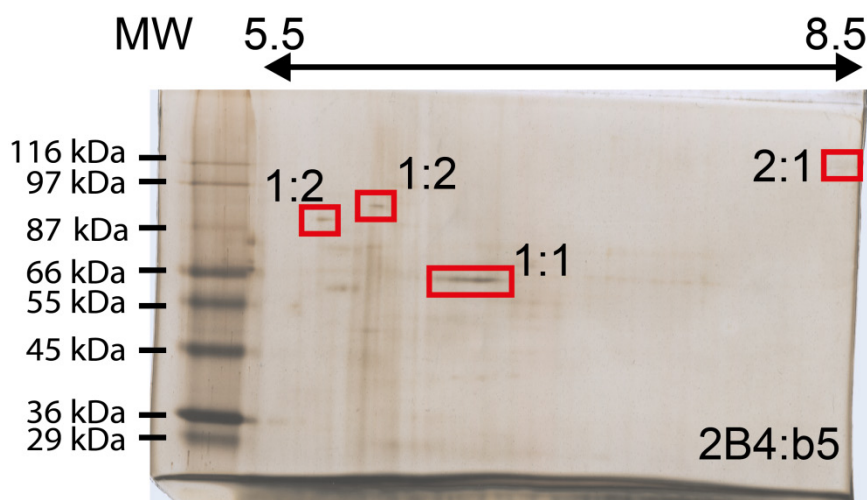
Objevené zesítní N-terminálního peptidu P450 2B4 ($_1\text{MEFSL}_5$) s pMet126 nacházejícím se v C-terminální doméně cyb5 poprvé přímo potvrzuje interakci studovaných cytochromů v prostředí lipidické membrány. Jelikož struktura hydrofobních domén obou proteinů není známá, získaný výsledek je zvláště hodnotný, a ukazuje vhodnost techniky foto-iniciovaného síťování ke studiu membránové topologie proteinů.

Analýzou fotolyzovaných mutantů cyb5 s pMet v pozicích 23, 41 nebo 46 byly ve všech třech případech identifikovány dva peptidy – $_{20}\text{HNHSK}_{24}$ a $_{40}\text{FLEEHPGGEEVLR}_{52}$ – intramolekulárně zesítně činidlem „nulové vzdálenosti“. Tento výsledek je v dobré shodě s používaným homologním modelem a potvrzuje předpokládaný dosah pMet při síťování.

Migrace zesítných oligomerů na SDS-PAGE se liší od migrace monomerních proteinů totožné molekulové hmotnosti (např. proteinových standardů), proto není určení stechiometrie zesítných komplexů pouze na základě molekulové hmotnosti odhadnuté na základě 1-dimensionální SDS-PAGE spolehlivé. Pro určení poměru proteinů ve třech kovalentních komplexech P450 2B4:cyb5 odpovídajících molekulové hmotnosti přibližně 70 kDa, 90 kDa a 125 kDa byly využity další experimentální přístupy (Publikace č. 3).

Cytochromy a jejich kovalentní komplexy se výrazně liší v hodnotě isoelektrického bodu (pI), a byly proto separovány pomocí 2-dimensionální SDS-PAGE (Obr. 5). Na základě porovnání teoretické a experimentálně zjištěné hodnoty pI byla přesvědčivě určena stechiometrie prvních dvou komplexů – 1:1 a 1:2. Na polyakrylamidovém gelu byla pozorována také skvrna odpovídající svým pI hodnotě vypočtené pro komplex 2:1, nicméně nedostatečné množství

foto-zesítného produktu neumožnilo potvrdit její proteinové složení pomocí MS.



Obr. 5. 2-dimensionální elektroforetická separace foto-zesítných P450 2B4:cyb5 heterooligomerů. 10% SDS-PAGE, rozmezí pI 5,5 – 8,5, barvení stříbrem; MW – molekulový standard Sigma wide-range, označeny komplexy o různé stechiometrii, oba monomery se nacházejí mimo použité rozmezí hodnot pI.

Studované komplexy se liší také v zastoupení jednotlivých aminokyselin. Metoda pro jejich kvantifikaci (celková aminokyselinová analýza) potvrdila dříve určenou stechiometrii komplexů – 1:1 (~70 kDa) a 1:2 (~90 kDa) – a jednoznačně rozřešila poměr proteinů v posledním z komplexů – 2:1 (~125 kDa).

Kromě poskytnutí unikátních strukturních dat demonstrovala v rámci této studie nově vyvinutá technika foto-iniciovaného síťování své výhody v porovnání s konvenčně využívaným chemickým síťováním: (i) neselektivní vazbu na libovolnou aminokyselinu, (ii) nezávislost na experimentálních podmínkách a okolním prostředí, (iii) rychlé síťování, (iv) možnost zavedení pMet na libovolné místo sekvence pomocí místně cílené mutagenese, a (v) aktivovatelnost pomocí UV záření.

4. ZÁVĚRY

- 1) Nepřirozená aminokyselina nesoucí foto-labilní funkční skupinu (pMet) byla úspěšně začleněna do sekvence proteinu.
- 2) Cyb5 s pMet v membránové a propojovací doméně byl technikou foto-iniciovaného síťování kovalentně propojen s P450 2B4. Poprvé byla přímo potvrzena interakce obou proteinů v membráně.
- 3) Nové methioninové pozice byly zavedeny do katalytické domény cyb5. Foto-iniciované síťování označilo peptidy proximálního povrchu P450 2B4 tvořící vazebné místo cyb5, a byly identifikovány další, doposud neznámé kontaktní oblasti katalytických domén studovaných cytochromů.
- 4) Chemické síťování činidlem EDC zachytilo čtyři interagující páry aminokyselin na rozhraní P450 2B4 a cyb5, na jejichž základě byl vytvořen *in silico* model interakce.
- 5) Stechiometrie proteinů v jednotlivých heterooligomerech vzniklých v důsledku foto-iniciovaného síťování (P450 2B4:cyb5 – 1:1, 1:2, a 2:1) byla určena na základě 1- a 2-dimensionální SDS-PAGE a metody celkové aminokyselinové analýzy.
- 6) Na základě prezentovaných zjištění byla naznačena existence nejméně dvou odlišných orientací P450 2B4 a cyb5.

VYBRANÉ PUBLIKACE

Publikace 1:

Šulc, M., **Ječmen, T.**, Šnajdrová, R., Novák, P., Martínek, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., 2012. Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 33(Suppl3), 41-47. IF 0.932

Publikace 2:

Koberová, M., **Ječmen, T.**, Šulc, M., Černá, V., Hudeček, J., Stiborová, M., Hodek, P., 2013. Photo-cytochrome b5 – A New Tool to Study the Cytochrome P450 Electron-transport Chain. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 125-134. IF 3.729

Publikace 3:

Ječmen, T., Ptáčková, R., Kavan, D., Černá, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M., 2014. Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in a functional membrane complex. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 35(Suppl2), 114-122. IF 0.935

Publikace 4:

Ječmen, T., Ptáčková, R., Černá, V., Dračínská, H., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M., 2015. The Photo-Initiated Cross-linking Extends Mapping of Protein-Protein Interface to the Membrane-embedded Parts: Cytochromes P450 2B4 and b5. *Methods*, probíhá revize. IF 3.221

POUŽITÁ LITERATURA

- Bar-Nun, S., Kreibich, G., Adesnik, M., Alterman, L., Negishi, M., Sabatini, D.D., 1980. Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77(2), 965-9.
- Bayley, H., Knowles, J.R., 1977. Photoaffinity labeling. *Methods Enzymol.* 46, 69-114.
- Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.T., Vakser, I.A., Loew, G., Waskell, L., 1998. Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* 273, 17036-49.
- Causey, K.M., Eyer, C.S., Backes, W.L., 1990. Dual role of phospholipid in the reconstitution of cytochrome P-450 LM2-dependent activities. *Mol. Pharmacol.* 38(1), 134-42.
- Clarke, T.A., Im, S.C., Bidwai, A., Waskell, L., 2004. The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b5 in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis. *J. Biol. Chem.* 279(35), 36809-18.
- Deniziak, M.A., Barciszewski, J., 2001. Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochim. Pol.* 48(2), 337-50.
- Egli, M., 2010. Diffraction techniques in structural biology. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* Chapter 7, Unit 7.13.
- Guengerich, F.P., 2005. Human cytochrome P450 enzymes, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Hendrickson, T.L., de Crécy-Lagard, V., Schimmel, P., 2004. Incorporation of nonnatural amino acids into proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 147-76.
- Jennings, K.R., 1968. Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1(3), 227-35.
- Kalkhof, S., Ihling, C., Mechtler, K., Sinz, A., 2005. Chemical cross-linking and high-performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein interaction analysis: application to a calmodulin/target peptide complex. *Anal. Chem.* 77(2), 495-503.
- Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M., 2011. Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem. Pharmacol.* 82(6), 669-80.
- Lian, L., Roberts, G., eds., 2011. *Protein NMR spectroscopy: practical techniques and applications.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, United Kingdom.

- Nureki, O., Vassilyev, D.G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T.L., Schimmel, P., Yokoyama, S., 1998. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* 280(5363), 578-82.
- Omura, T., Morohashi, K., 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53(1-6), 19-25.
- Parmar, D., Dhawan, A., Seth, P.K., 1998. Evidence for O-dealkylation of 7-pentoxoresorufin by cytochrome P450 2B1/2B2 isoenzymes in brain. *Mol. Cell Biochem.* 189(1-2), 201-5.
- Poulos, T.L., Johnson, E.F., 2005. Structures of cytochrome P450 enzymes, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Sheehan, J., Cruickshank, P., Boshart, G., 1961. A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. *J. Org. Chem.* 26 (7), 2525-8.
- Sinz, A., 2006. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 663-82.
- Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C., 2005. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 2(4):261-7.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T., 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* 2(8), 151-3.
- Vergères, G., Waskell, L., 1995. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* 77(7-8), 604-20.
- Wang, H., 2015. Cryo-electron microscopy for structural biology: current status and future perspectives. *Sci. China Life Sci.* 58(2), 1-7.
- Wong, S.F., Meng, C.K., Fenn, J.B., 1988. Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). *J. Phys. Chem.* 92(2), 546-50.
- Zaslaver, A., Mayo, A.E., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, H., Tsalyuk, M., Surette, M.G., Alon, U., 2004. Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat. Genet.* 36(5), 486-91.

CURRICULUM VITAE

RNDr. Tomáš Ječmen

Narozen: 21. dubna 1986, Brno, **Adresa:** Podlesí 467, 757 01-Valašské Meziříčí, Česká republika

Email: jecmen@biomed.cas.cz, **Mobilní telefon:** +420 774 916 820

LinkedIn: [cz.linkedin.com/pub/tomáš-ječmen/22/8a8/7b3/](https://www.linkedin.com/pub/tomáš-ječmen/22/8a8/7b3/)

VZDĚLÁNÍ

- 2008 Bakalářský titul z biochemie, Univerzita Karlova v Praze
- **Název projektu:** *Mapování protein-proteinových interakcí (cytochrom P-450 2B4 a cytochrom b5) metodami chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie*
- 2010 Magisterský titul z biochemie, Univerzita Karlova v Praze
- **Název projektu:** *Mapování protein-proteinových interakcí systému cytochromu P-450 metodami chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie*
- Od 2010 Doktorské studium, Univerzita Karlova v Praze
- **Název projektu:** *Cytochrom P-450: studium struktury a interakcí metodami chemické modifikace, foto-iniciovaného síťování a hmotnostní spektrometrie*
- 2013 Doktorský titul (RNDr.) z biochemie, Karlova univerzita v Praze

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

- Od 2011 Pomocný výzkumný pracovník, Laboratoř charakterizace proteinové struktury, Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR, v.v.i.
- Podporováno Grantovou agenturou ČR:** *Interakce savčího mikrosomálního cytochromu P450 s redox partnery - topologie a strukturně-funkční vztahy (P207/12/0627)*

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- 2011 – 2015 Výuka předmětu *Praktická cvičení z biochemie a biologie mikroorganismů*
- 2012 – 2014 Konzultace bakalářských projektů a praktické vedení studentů
- **Jana Štrohalmová:** *Studium klinicky relevantních protein-proteinových interakcí pomocí nových fotoaktivovaných proteinových nanosond a hmotnostní spektrometrie*
 - **Petr Holý:** *Kooperativita složek systému cytochromů P450 a ovlivnění metabolismu léčiv a karcinogenů*

ZÍSKANÉ PRAKTICKÉ ZKUŠENOSTI

- Izolace, purifikace a charakterizace membránových proteinů (rekombinantních i zvířecích)
- Inkorporace nepřirozených (foto-reaktivních) aminokyselin do proteinové sekvence
- Studium interakcí protein-ligand (foto-afinitní značení, spektroskopie)
- Studium protein-proteinových interakcí (chemické a foto-iniciované síťování, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením)
- Sekvenace proteinů (Edmanovo štěpení, tandemová hmotnostní spektrometrie)

KURZY

- Prezentační dovednosti
- Praktická rétorika
- Time management
- Umění improvizace

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Angličtina	Certificate in Advanced English - úroveň C1 (2012)
Němčina	Maturitní zkouška (2005)

ÚČAST NA MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

- 4th Congress of the European Association for Chemical and Molecular Sciences (2012, Prague, Czech Republic)
zvaná přednáška: Utilization of photoactivable nanoprobe and mass spectrometry for structural determination of cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅ interaction
- 30 th Informal Meeting on Mass Spectrometry (2012, Olomouc, Czech Republic)
plakátové sdělení: Characterization of cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅ mutual orientation by photoactivable nanoprobe and mass spectrometry
- 18th International Conference on Cytochrome P450 (2013, Seattle, Washington USA)
plakátové sdělení a zvaná přednáška: The first evidence of cytochrome P450 and cytochrome b₅ interaction within membrane
- 3rd Symposium on Structural Proteomics (2013, Prague, Czech Republic)
přednáška: Protein membrane topology studied by photoactivable nanoprobe and high resolution mass spectrometry
- 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2014, Baltimore, Maryland USA)
plakátové sdělení: Membrane interactions of cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅ studied by photoactivable protein nanoprobe and high resolution mass spectrometry

- 4 th Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2015, Hradec Králové)
plakátové sdělení: Seeking of cytochrome P450 2B4:b5 interactions both in cytosol and lipid membrane combining photo-initiated cross-linking by photo-activable amino acid and high resolution mass spectrometry (poster award)

ÚČAST NA LOKÁLNÍCH KONFERENCÍCH

- 1st Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2011, Hradec Králové)
plakátové sdělení: Searching for the cytochrome P450-cytochrome b₅ membrane domains interaction by photoaffinity labelling and mass spectrometry
- XII. Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists and Chemists (2012, Počátky u Pelhřimova)
přednáška: Characterization of mutual orientation of cytochromes P450 and b₅ utilizing photoactivable nanoprobe and mass spectrometry
- 64. Congress of Chemical Societies (2012, Olomouc)
přednáška: Utilization of photoactivable nanoprobe and mass spectrometry for studying structure and interactions of cytochromes P450 and b₅
- 2nd Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2012, Olomouc)
přednáška: Uncovering the membrane topology of cytochromes P450 and b₅ employing labelling by photoactivable nanoprobe and mass spectrometry
- XIII. Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists and Chemists (2013, Žďár nad Sázavou)
přednáška: Utilization of photoactivable nanoprobe and mass spectrometry for studying structure and interactions of cytochromes P450 and b₅
- 3rd Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2013, Hradec Králové)
plakátové sdělení: Cytochrome P450 protein-protein interactions not only within the lipid membrane environment

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

1. Hodek P, Sulc M, Pavlaskova K, **Jecmen T**, Martinek V, Hudecek J, Stiborova M: **Close look at cytochrome P450-b5 catalytic complex**. In *17th International Conference on Cytochrome P450 - Biochemistry, Biophysics and Structure*. Manchester (UK), Medimond, **2011**. p. 17-20.
2. Haladova K, Mrazek H, **Jecmen T**, Halada P, Man P, Novak P, Chmelik J, Obsil T, Sulc M: **The combination of hydrogen/deuterium exchange or chemical cross-linking techniques with mass spectrometry: Mapping of human 14-3-3f homodimer interface**. *J Struct Biol.*, 179(1):10-7 (**2012**). IF 3.406 (2011)
3. Sulc M, **Jecmen T**, Snajdrova R, Novak P, Martinek V, Hodek P, Stiborova M, Hudecek J: **Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations**. *Neuro Endocrinol Lett.*, 33(Suppl3):41-47 (**2012**). IF 1.296 (2011)
4. Koberova M, **Jecmen T**, Sulc M, Cerna V, Hudecek J, Stiborova M, Hodek P: **Photo-cytochrome b5 – A New Tool to Study the Cytochrome P450 Electron-transport Chain**. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8:125-134 (**2013**). IF 3.729 (2011)
5. Linhartova M, Bucinska L, Halada P, Jecmen T, Setlik J, Komenda J, Sobotka R: **Accumulation of the Type IV prepilin triggers degradation of SecY and YidC and inhibits synthesis of Photosystem II proteins in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803**. *Mol Microbiol.* 93(6):1207-23 (**2014**). IF 5.026
6. Ptáčková R, **Ječmen T**, Novák P, Hudeček J, Stiborová M, Šulc M: **The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with mass spectrometry**. *Int J Mol Sci.*, 15(6):9224-41 (**2014**). IF 2.339
7. **Ječmen T**, Ptáčková R, Kavan D, Černá V, Hodek P, Stiborová M, Hudeček J, Šulc M: **Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in a functional membrane complex**. *Neuro Endocrinol Lett.*, 35(Suppl2):114-122 (2014). IF 0.935
8. **Ječmen T**, Ptáčková R, Černá V, Dračínská H, Hodek P, Stiborová M, Hudeček J, Šulc M: **The Photo-Initiated Cross-linking Extends Mapping of Protein-Protein Interface to the Membrane-embedded Parts: Cytochromes P450 2B4 and b5**. *Methods*, probíhá revize (2015). IF 3.221

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Education program: Biochemistry

PhD Thesis Summary



Cytochrome P-450: Study of structure and interactions using chemical modification, photo-initiated cross-linking and mass spectrometry

RNDr. Tomáš Ječmen

Supervisor: Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Prague, 2015

ABSTRACT

Cytochromes P-450 (P450) are oxygenases, which biotransform a wide range of endogenous and exogenous substrates. The interactions of P450 2B4 isoform with the facultative redox partner cytochrome b5 (cyb5), which alters its catalytic properties, were explored by two zero-length cross-linkers: (i) chemical agent EDC (interlinks carboxylate and amine group) or (ii) pMet – a photo-reactive methionine analog (binds to any residue after UV-irradiation). It was incorporated to methionine sites of cyb5 during recombinant expression in *E. coli*, which was carried out in limit medium supplemented with this amino acid analog. Optimization of experimental conditions led to ~20–30% substitution of the natural amino acid.

Both chemical and photo-initiated cross-linking approaches resulted in covalent heterooligomeric complexes visible on SDS-PAGE. For the assemblies of uncertain stoichiometry, 2-dimensional electrophoresis and total amino acid analysis were employed to determine P450 2B4:cyb5 ratios (1:1, 1:2, 2:1).

Individual complexes were proteolytically digested and the cross-links were identified in the resulting peptide mixture by high resolution mass spectrometry coupled to liquid chromatography. The amino acid pairs cross-linked by EDC agent served as a basis for *in silico* modeling of P450 2B4 and cyb5 catalytic domain interactions. Besides, photo-initiated cross-linking directly identified the contact of their hydrophobic helices in the lipid membrane environment for the first time, and also revealed additional interaction regions in cytosol. The results suggest the existence of at least two mutual orientations of studied proteins.

The advantages of novel photo-induced cross-linking in comparison to conventional chemical cross-linking for transient protein-protein interactions determination were demonstrated.

1. INTRODUCTION

Structural biology looks into the spatial arrangement of macromolecules in an effort to understand their physiological role and the way they influence each other in the functional complexes. The prevailing methods providing insight into the tertiary and quaternary structure of proteins have each its inherent limitations: X-ray crystallography has difficulties with highly flexible and membrane proteins, and the crystal models are inconsistent with the structures in solution [Egli 2010]; electron microscopy provides only near-atomic resolution structures, which can contain artifacts resulting from sample preparation procedures [Wang 2015]; nuclear magnetic resonance requires highly concentrated samples, in which non-physiological interactions can occur and alter *in vivo* protein conformation [Lian and Roberts 2011]. Frequently utilized complementary methodology for protein structure and protein-protein interactions determination is cross-linking followed by highly accurate mass spectrometric (MS) analysis.

MS is a versatile technique for fast and sensitive identification of chemical species according to their mass-to-charge (m/z) ratio. It expanded to the biological field after the discovery of two soft ionization techniques capable of ionization of macromolecules without distinct fragmentation – matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) [Tanaka *et al.* 1988] and electrospray ionization (ESI) [Wong *et al.* 1988]. Contemporary high resolution MS instruments allow separation of ions differing in m/z in the ppm range. With this accuracy even the molecular composition of an ion (e.g. amino acid composition of the peptide) can be deduced. The second possibility to assign the ion is tandem MS [Jennings 1968]. It allows fragmentation of analytes by one of available methods and gathers additional information about fragment ions (e.g. peptide sequence and position of its modifications or cross-linked site).

The variety of available cross-linking agents possessing diverse features offers the possibility to perform a broad range of experiments [Sinz 2006]. Two zero-length cross-linking strategies, which covalently fixate transient intra- and intermolecular interactions within 5 Å distance [Kalkhof *et al.* 2005], are of a special interest. The first – carbodiimide chemistry (e.g. EDC agent) – couples carboxylate and amine group by amide bond, and is used for covalent fixation of electrostatic interactions [Sheehan *et al.* 1961]. The second utilizes photo-reactive amino acid analog (e.g. pMet) within the protein sequence [Suchanek *et al.* 2005]. Its activation by UV-irradiation leads to highly reactive biradical with low selectivity, which binds to any side chain in its close proximity regardless of experimental conditions and surrounding environment [Bayley and Knowles 1977].

To safeguard protein sequence fidelity, the protein synthesis is highly regulated process [Nureki *et al.* 1998]. However, certain aminoacyl-tRNA synthetases have more relaxed amino acid binding site and allows structurally closely related analogs to conjugate with tRNA [Dezniak and Barciszewski 2001]. The reassignment of methionine codon is widely used approach to replace this residue in the protein sequence globally. It is achieved during the recombinant expression in the limit medium supplemented with the desired analog (e.g. pMet) [Hendrickson *et al.* 2004].

The proteins studied within the presented thesis belong to the mixed function oxygenase (MFO) system, which participates in biosynthesis of endogenous substances and metabolism of xenobiotics [Guengerich 2005]. Cytochromes P450 (P450) serve as terminal oxygenases responsible for substrate biotransformation. Cytochrome b5 (cyb5) is a facultative component of the system, which can provide P450 one of the electrons necessary for catalysis, and modulates catalytic properties of certain P450s (e.g. studied isoform 2B4) [Kotrbová *et al.* 2011]. Both cytochromes consist of a cytosol exposed catalytic domain and a hydrophobic helix anchoring them to the lipid membrane of

endoplasmic reticulum or mitochondria [Bar-Nun *et al.* 1980, Omura and Morohashi 1995].

The conserved structural core of P450 containing heme prosthetic group is localized close to the proximal surface of the protein, where overlapping binding sites for the redox partners providing electrons in P450 catalytic cycle are situated [Bridges *et al.* 1998]. The more dynamic, and less conserved substrate binding cavity is localized on the opposite, distal side of the protein [Poulos and Johnson 2005]. The role of the N-terminal membrane domain has not been fully explained yet, but it could be necessary for delivering hydrophobic substrates to the active site of P450, or can arrange the correct assembly of MFO system components into the functional complex [Causey *et al.* 1990].

The N-terminal domain of cyb5 includes a surface patch composed of negatively charged amino acids, which are, together with the negatively charged heme propionate carboxyles, complementary to the positively charged residues of P450 interface. The C-terminal transmembrane anchor is essential for cyb5 ability to affect P450 catalysis [Vergères and Waskell 1995]. Both domains are connected by the flexible linker that also participates in the interaction between cyb5 and P450 [Clarke *et al.* 2004].

2. AIMS OF THE STUDY

- 1) Development of novel photo-initiated cross-linking methodology for membrane protein structure and protein-protein interactions determination
 - a) Optimization of photo-reactive methionine analog (pMet) incorporation into cyb5 protein nanoprobe sequence during recombinant expression in *E. coli*
 - b) Covalent fixation of transient intermolecular interactions of P450 2B4 and photo-reactive cyb5 utilizing photo-initiated cross-linking technique
 - c) Detection of presumed membrane contact of both cytochromes
- 2) Application of chemical and photo-initiated cross-linking techniques in combination with mass spectrometry to extend the present knowledge of protein-protein interactions between catalytic domains of cytochromes P450 2B4 and cyb5 exposed to cytosol
- 3) Determination of mutual orientation(s) of P450 2B4 and cyb5 in reconstituted system
- 4) Assessment of protein stoichiometry in individual cross-linked species

3. RESULTS AND DISCUSSION

This thesis is based on four publications, which deal with the organization of mixed function oxygenase system proteins (P450 2B4 and cyb5) and search for their interactions, both in cytosol and in lipid membrane.

The novel photo-initiated cross-linking methodology was established and optimized initially to probe the membrane topology of studied proteins (see Publication 2), and subsequently employed also to examine the structure and behavior of their cytosolar domains (see Publication 4).

Cyb5 – a small membrane protein with rapid expression, undemanding purification, and total of 3 methionines (two in the membrane domain, one in the flexible linker chain) – was chosen as a suitable photo-reactive nanoprobe for studying membrane topology of the cytochromes. The rate of pMet insertion during the nanoprobe expression in the limit medium supplemented with photo-reactive amino acid was monitored by MALDI-TOF MS (Figure 1), and exhibited decreasing tendencies from ~70 % (1 hour) to ~30 % (4 hours). The likely cause is the increased competition of methionine, biosynthesis of which starts about 1.5 hours after the culture transfer to the limit media [Zaslaver *et al.* 2004], for the activation by methionyl-tRNA synthetase.

Six photo-reactive cyb5 mutants, each containing single methionine in the sequence, were prepared either to provide less complex cross-linking results compared to those obtained with the wild type (WT) nanoprobe (the mutants with pMet in the membrane anchor and the flexible linker) or to extend the contemporary knowledge of the catalytic domain interactions (the mutants with pMet introduced into the catalytic domain by site directed mutagenesis).

The reaction mixture containing reconstituted P450 2B4 and a photo-reactive nanoprobe was photolyzed by UV radiation. Three newly formed heterooligomeric covalent complexes with approximate molecular weights 70 kDa, 90 kDa and 125 kDa were detected on SDS-PAGE (Figure 2A). The

P450 2B4:cyb5 ratio of the individual complexes was determined as 1:1, 1:2 and 2:1, and will be discussed in detail further below. The proteins lacking photo-reactive amino acids were shown neither to cross-link spontaneously nor are degraded under the UV-irradiation conditions.

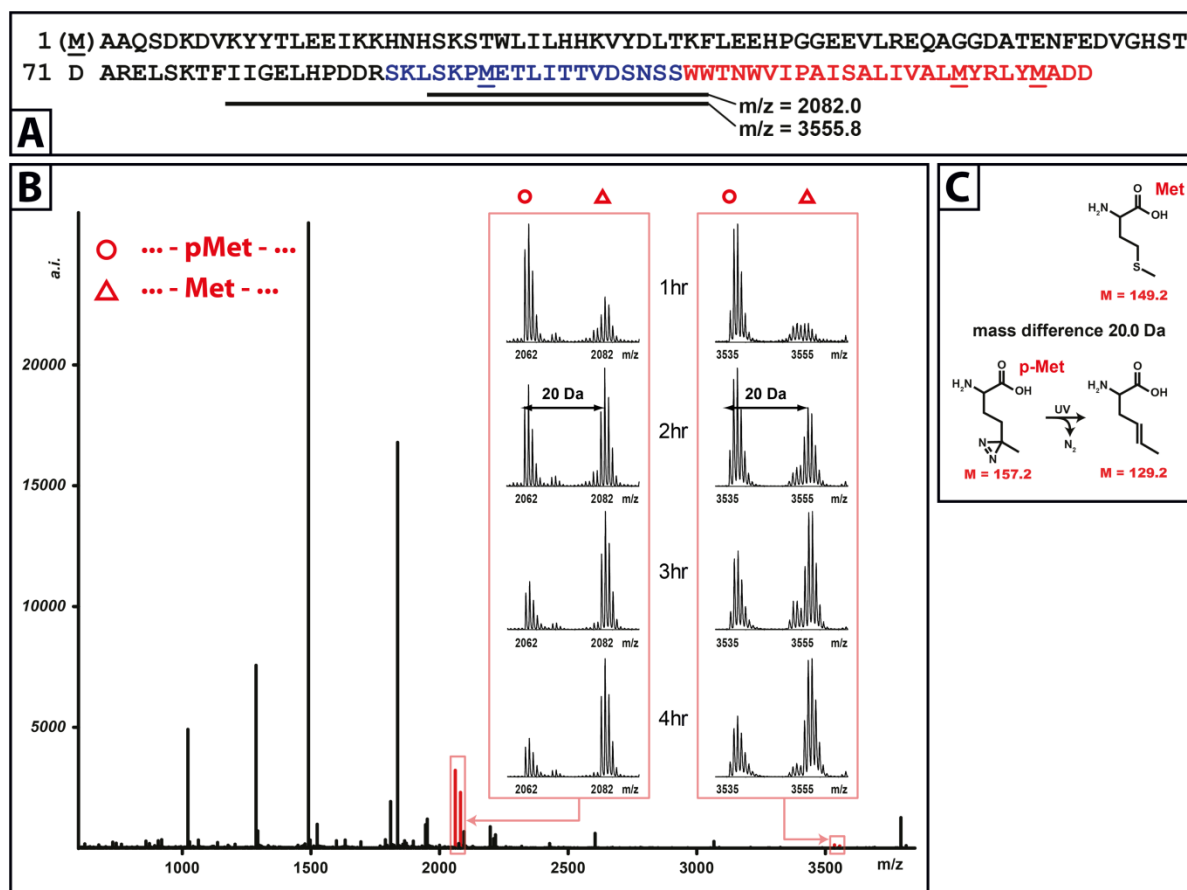


Figure 1: Incorporation of pMet into the cyb5 sequence. (A) The amino acid sequence of cyb5 WT with marked peptides selected for monitoring of pMet incorporation efficiency; black – cytosolic domain, blue – flexible linker, red – membrane anchor. (B) The time-dependence of pMet incorporation efficiency during the nanoprobe expression; MALDI-TOF mass spectra of photo-reactive cyb5 chymotryptic digest, in detail two peptide pairs with pMet/Met in the sequence, the ratio of their relative intensities expresses the pMet incorporation success rate. (C) MALDI laser activates pMet during the peptide ionization; the peptide pairs with either pMet photolytic product or Met typically differ by 20.0 Da in MALDI-TOF spectra.

The reconstituted proteins were also cross-linked chemically by EDC agent (see Publication 1), which resulted in two heterooligomeric complexes detected on SDS-PAGE (Figure 2B). The approximate molecular weights 70 kDa and 125 kDa of P450 2B4:cyb5 assemblies roughly correspond with 1:1 and 2:1 protein ratios, respectively. The various concentration of sodium chloride (0 - 500 millimolar) did not disturb the formation of complexes, which

indicates significant contribution of non-electrostatic interactions at the contact surface.

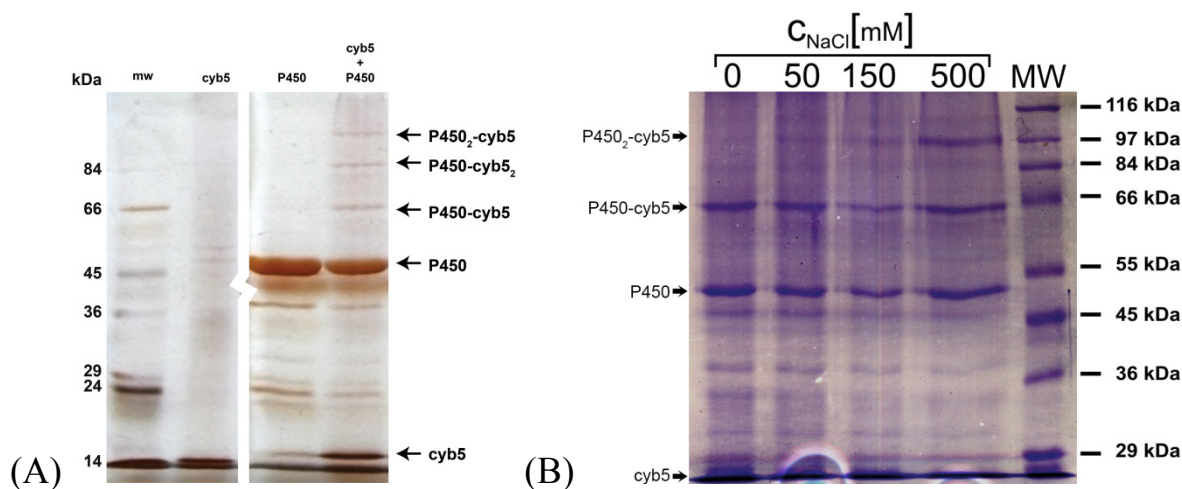


Figure 2. 1-dimensional electrophoretic separation of (A) photo- or (B) chemically cross-linked P450 2B4:cyb5 heterooligomers. (A) 12% SDS-PAGE, silver staining; reconstituted photo-reactive cyb5 and P450 2B4 photolyzed separately (two middle lanes) and together (right lane) (B) 8% SDS-PAGE, Coomassie Brilliant Blue R-250 staining; reconstituted cyb5 and P450 2B4 cross-linked under different sodium salt concentrations (0, 50, 150 and 500 millimolar); MW – Sigma wide-range molecular weight standards.

The only near-physiological conditions inherent to the EDC chemistry (pyridine buffer, pH 6.0) were shown to decrease catalytic activity of the P450 2B4 specific O-depentylation reaction [Parmar *et al.* 1998]. However, no change in the characteristic influence of cyb5 on P450 2B4 (the increased activity in the presence of cyb5 in equimolar amount and the decreased activity in its excess) was observed, thus the mechanism of interaction was considered unaltered under the cross-linking compatible conditions.

The “bottom up” approach was used for studying of P450 2B4:cyb5 complexes – they were separated on SDS-PAGE, proteolytically digested and the resulting peptide mixtures were analyzed by high resolution MS coupled to reverse phase liquid chromatography. The unmodified, modified and cross-linked peptides were identified according to the accurately determined mass (error below 2 ppm). The intermolecular contacts of both cytochromes fall into three groups: (i) interactions of catalytic domains at the P450 2B4 proximal side, (ii) interactions of catalytic domains at the P450 2B4 distal side, and (iii) interactions between the hydrophobic anchors in the lipid membrane.

The chemically coupled interacting amino acid pairs – Asp8-Lys139, Lys19-Asp134, Lys19-Glu439, Lys24-Glu424 (in order cyb5-P450 2B4) – were deduced according to the known reaction mechanism of EDC agent (cross-linking of carboxylate group of aspartate, glutamate or C-terminus with amine group of arginine, lysine or N-terminus), and served as a constraints for *in silico* modeling of the interaction. Two proposed protein orientations are shown in Figure 3.

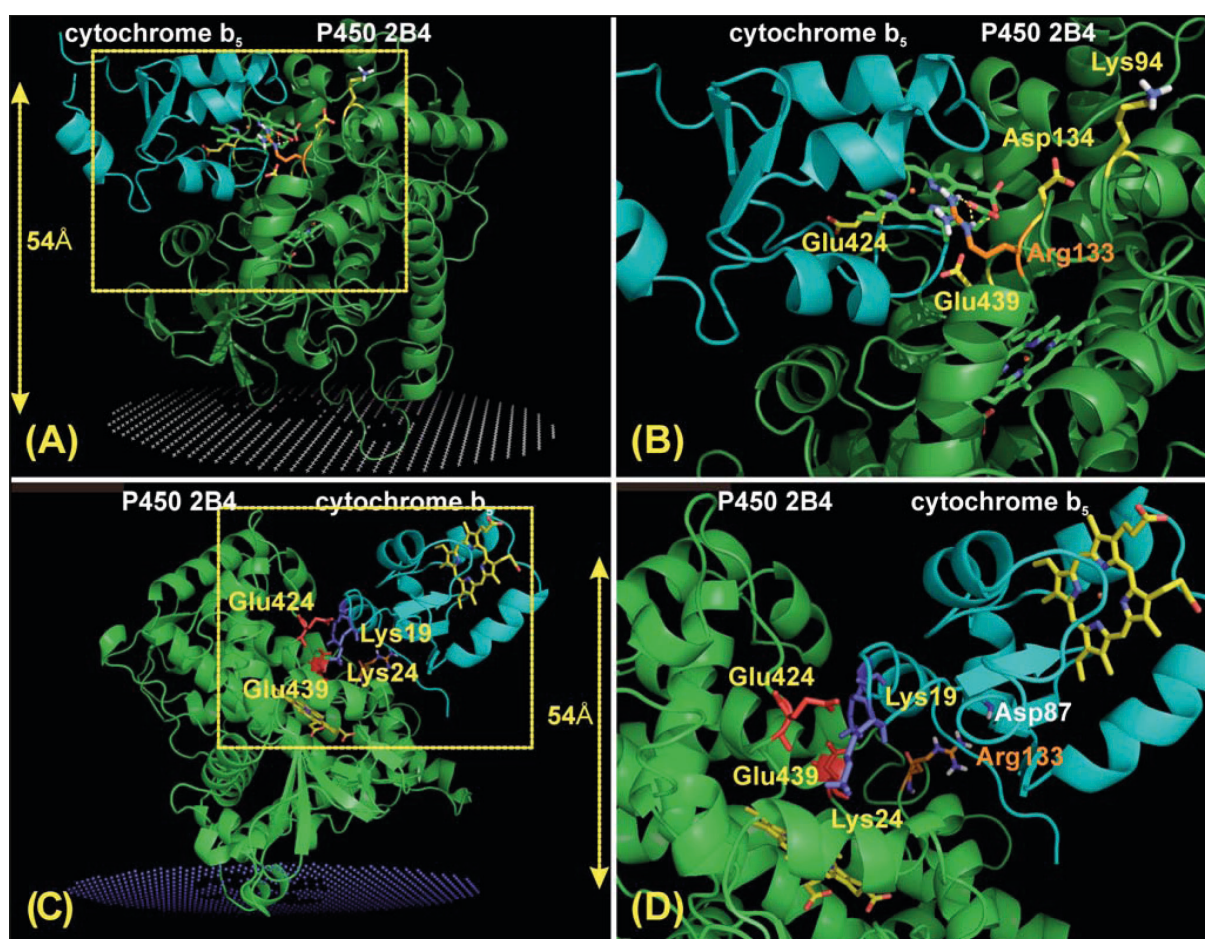


Figure 3. The homology model of P450 2B4:cyb5 interaction based on EDC cross-linking data. (A) and (B) show the protein orientation suitable for electron transfer; the cyb5 heme prosthetic group is directed towards the heme prosthetic group of P450 2B4 localized close to its proximal surface. (C) and (D) show cyb5 interacting with the proximal surface of P450 2B4, but with heme prosthetic group oriented out of this surface; the interaction may result only in allosteric modulation of P450 2B4 metabolic activity. Green – P450 2B4, cyan – cyb5.

The yield of photo-initiated cross-linking was not sufficient to allow peptide sequencing by tandem MS, and only low structural data (on peptide instead of residue level) were obtained. Three cyb5 single methionine mutants

with a pMet introduced to the catalytic domain labeled P450 2B4 peptides that constitute the generally accepted binding site for the redox partners. However, also the peptides localized on the P450 2B4 distal side were labeled (Figure 4), which suggests another cyb5 orientation never presented before.

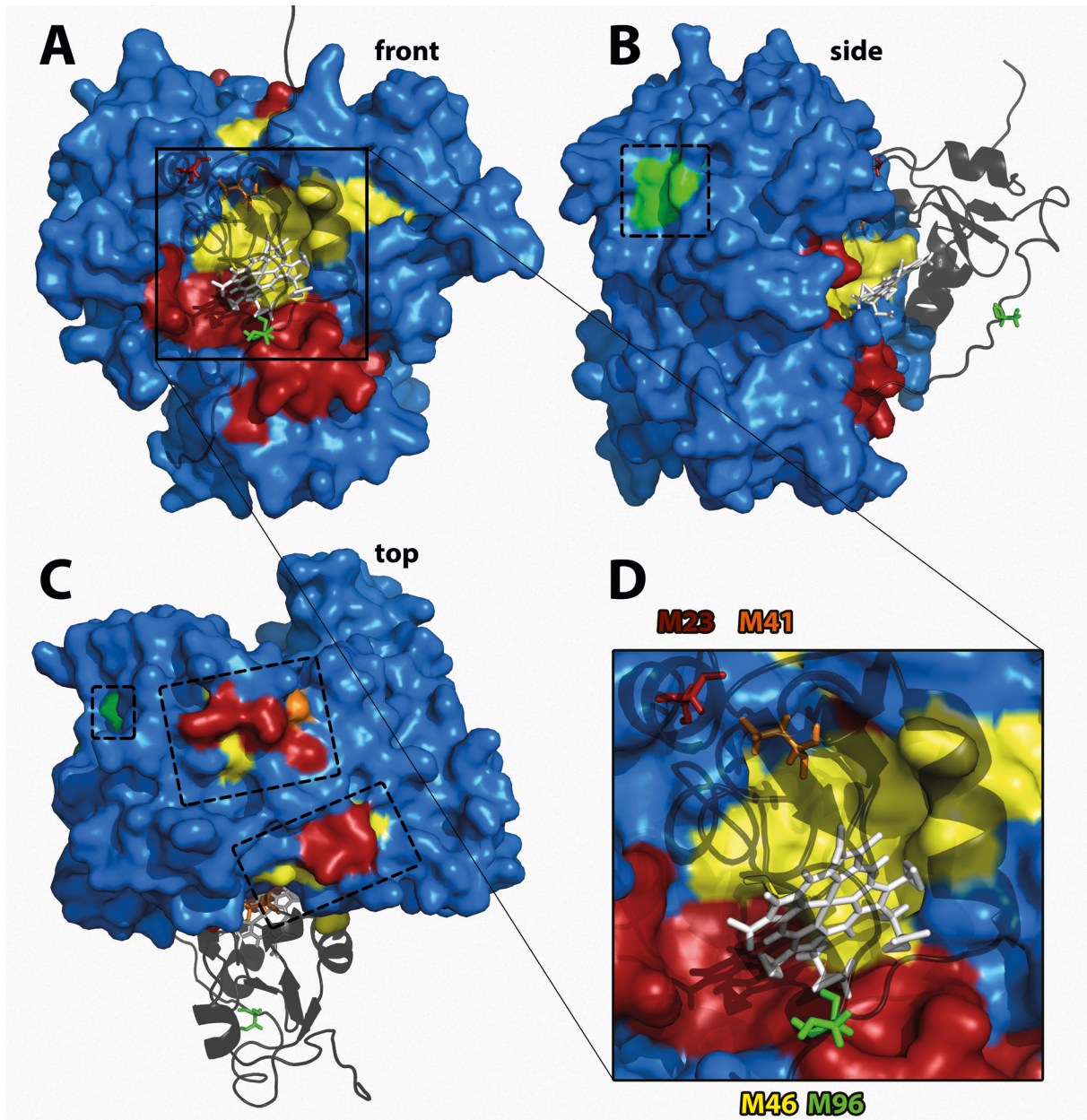


Figure 4. Visualization of P450 2B4 peptides photo-labeled by photo-reactive cyb5mutants. (A) Front, (B) side and (C) top view of P450 2B4 (blue) with peptides photo-labeled by pMet23 (red), pMet41 (orange), pMet46 (yellow) and pMet96 (green) of cyb5. Cyt5 (black, semitransparent) oriented suitably for electron transfer, (D) with the heme prosthetic group (white) directed toward the proximal surface of P450 2B4. Other cyb5 orientations responsible for photo-labeling of peptides marked with dashed line not shown.

The detection of P450 2B4 N-terminal peptide (1)MEFSL(5) contact with pMet126 localized at the cyb5 C-terminus was of a great significance. It directly

confirms the interaction of the cytochromes in membrane environment for the first time. The finding is especially valuable as the hydrophobic domain structures of both proteins are missing in the models.

The monomers of photo-activated cyb5 mutants were also analyzed for intramolecular contacts and two peptides – (40)FLEEHPGGEEVLR(52) and (20)HNHSK(24) – were shown to be within the range of pMet zero-length cross-linker, which is in a good agreement with the homology model.

The molar ratios of the proteins in the photo-cross-linked covalent complexes that represent a snapshot of the studied system contribute substantially to the understanding of its organization and functioning. The regular migration of proteins can be altered for cross-linked species on SDS-PAGE, and thus other methodological approaches were employed to solve the stoichiometry of three covalent P450 2B4:cyb5 complexes with approximate molecular weights 70 kDa, 90 kDa, and 125 kDa (see Publication 3).

The cytochromes and their covalent complexes were separated on 2-dimensional SDS-PAGE (Figure 5), as they differ dramatically in pI. The P450 2B4:cyb5 complexes with protein ratios 1:1 and 1:2 were determined.

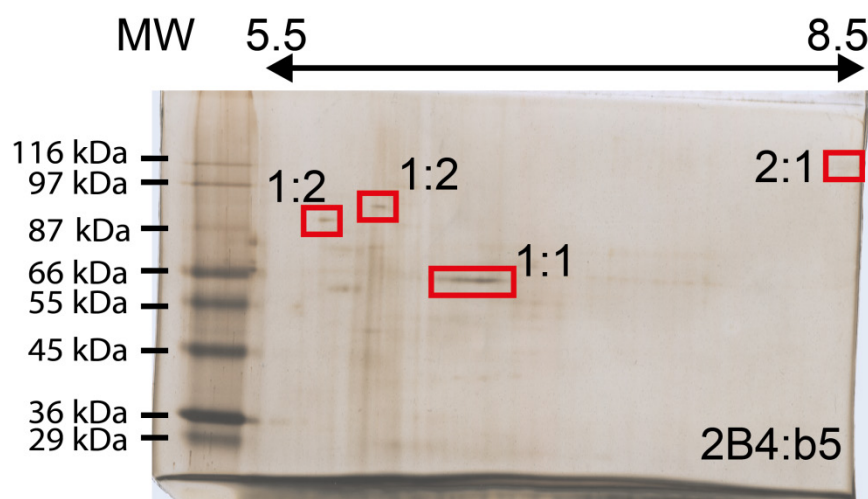


Figure 5. 2-dimensional electrophoretic separation of photo-cross-linked P450 2B4:cyb5 heterooligomers. 10% SDS-PAGE, pI range 5.5 – 8.5, silver staining; MW – Sigma wide-range molecular weight standards, the complexes with different stoichiometry are labeled, both monomers are missing (out of used pI range).

The spot corresponding to the calculated values for the 2:1 protein assembly was observed; however the amount of the photo-cross-linked species

was not sufficient for verification of its protein composition by MS. As the individual complexes differ also in amino acid composition, the method for total amino acid determination finally validated the proposed stoichiometry of the complexes – 1:1 (~70 kDa) and 1:2 (~90 kDa) – and unambiguously resolved the protein ratio of the last assembly – 2:1 (~125 kDa).

In addition to providing unique structural information, the advantages of the newly developed photo-initiated cross-linking technique compared to conventional chemical cross-linking approach was also manifested within this study: (i) nonselective binding, (ii) independence on experimental conditions and surrounding environment, (iii) rapid cross-linking, (iv) introducibility to the specific locations by site directed mutagenesis, and (v) activation by UV.

4. CONCLUSIONS

- 1) An uncanonical amino acid bearing photo-labile functional group (pMet) was successfully incorporated into the protein sequence.
- 2) Cyb5 with pMet in the membrane and linker domains was covalently interlinked with P450 2B4 by photo-initiated cross-linking methodology. The interaction of both proteins in membrane was confirmed for the first time.
- 3) New methionine sites were introduced into the catalytic domain of cyb5. The peptides on P450 2B4 proximal surface known to form cyb5 binding site were photo-labeled by the photo-reactive cyb5 mutants. Yet unexplored contact regions were also identified by photo-initiated cross-linking technique.
- 4) Chemical cross-linking employing EDC agent fixated four interacting amino acid pairs at the P450 2B4-cyb5 interface. The acquired data served as a basis for *in silico* modeling of the interaction.
- 5) The protein stoichiometry of individual photo-cross-linked heteromeric complexes (P450 2B4:cyb5 – 1:1, 1:2, and 2:1) were deduced making use of 1- and 2-dimensional SDS-PAGE and total amino acid analysis methodology.
- 6) At least two distinct mutual orientations of studied proteins were proposed taking all presented findings into consideration.

SELECTED PUBLICATIONS

Publication 1:

Šulc, M., **Ječmen, T.**, Šnajdrová, R., Novák, P., Martínek, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., 2012. Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 33(Suppl3), 41-47. IF 0.932

Publication 2:

Koberová, M., **Ječmen, T.**, Šulc, M., Černá, V., Hudeček, J., Stiborová, M., Hodek, P., 2013. Photo-cytochrome b5 – A New Tool to Study the Cytochrome P450 Electron-transport Chain. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 125-134. IF 3.729

Publication 3:

Ječmen, T., Ptáčková, R., Kavan, D., Černá, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M., 2014. Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in a functional membrane complex. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 35(Suppl2), 114-122. IF 0.935

Publication 4:

Ječmen, T., Ptáčková, R., Černá, V., Dračínská, H., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M., 2015. The Photo-Initiated Cross-linking Extends Mapping of Protein-Protein Interface to the Membrane-embedded Parts: Cytochromes P450 2B4 and b5. *Methods*, under revision. IF 3.221

REFERENCES

- Bar-Nun, S., Kreibich, G., Adesnik, M., Alterman, L., Negishi, M., Sabatini, D.D., 1980. Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77(2), 965-9.
- Bayley, H., Knowles, J.R., 1977. Photoaffinity labeling. *Methods Enzymol.* 46, 69-114.
- Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.T., Vakser, I.A., Loew, G., Waskell, L., 1998. Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* 273, 17036-49.
- Causey, K.M., Eyer, C.S., Backes, W.L., 1990. Dual role of phospholipid in the reconstitution of cytochrome P-450 LM2-dependent activities. *Mol. Pharmacol.* 38(1), 134-42.
- Clarke, T.A., Im, S.C., Bidwai, A., Waskell, L., 2004. The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b5 in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis. *J. Biol. Chem.* 279(35), 36809-18.
- Deniziak, M.A., Barciszewski, J., 2001. Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochim. Pol.* 48(2), 337-50.
- Egli, M., 2010. Diffraction techniques in structural biology. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* Chapter 7, Unit 7.13.
- Guengerich, F.P., 2005. Human cytochrome P450 enzymes, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Hendrickson, T.L., de Crécy-Lagard, V., Schimmel, P., 2004. Incorporation of nonnatural amino acids into proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 147-76.
- Jennings, K.R., 1968. Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1(3), 227-35.
- Kalkhof, S., Ihling, C., Mechtler, K., Sinz, A., 2005. Chemical cross-linking and high-performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein interaction analysis: application to a calmodulin/target peptide complex. *Anal. Chem.* 77(2), 495-503.
- Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M., 2011. Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem. Pharmacol.* 82(6), 669-80.
- Lian, L., Roberts, G., eds., 2011. *Protein NMR spectroscopy: practical techniques and applications.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, United Kingdom.

- Nureki, O., Vassilyev, D.G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T.L., Schimmel, P., Yokoyama, S., 1998. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* 280(5363), 578-82.
- Omura, T., Morohashi, K., 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53(1-6), 19-25.
- Parmar, D., Dhawan, A., Seth, P.K., 1998. Evidence for O-dealkylation of 7-pentoxoresorufin by cytochrome P450 2B1/2B2 isoenzymes in brain. *Mol. Cell Biochem.* 189(1-2), 201-5.
- Poulos, T.L., Johnson, E.F., 2005. Structures of cytochrome P450 enzymes, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Sheehan, J., Cruickshank, P., Boshart, G., 1961. A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. *J. Org. Chem.* 26 (7), 2525-8.
- Sinz, A., 2006. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 663-82.
- Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C., 2005. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 2(4):261-7.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T., 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* 2(8), 151-3.
- Vergères, G., Waskell, L., 1995. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* 77(7-8), 604-20.
- Wang, H., 2015. Cryo-electron microscopy for structural biology: current status and future perspectives. *Sci. China Life Sci.* 58(2), 1-7.
- Wong, S.F., Meng, C.K., Fenn, J.B., 1988. Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). *J. Phys. Chem.* 92(2), 546-50.
- Zaslaver, A., Mayo, A.E., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, H., Tsalyuk, M., Surette, M.G., Alon, U., 2004. Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat. Genet.* 36(5), 486-91.

CURRICULUM VITAE

RNDr. Tomáš Ječmen

Born: 21st April 1986, Brno, **Address:** Podlesi 467, 757 01-Valasske Mezirici, Czech Republic

Email: jecmen@biomed.cas.cz, **Cellphone:** +420 774 916 820

LinkedIn: [cz.linkedin.com/pub/tomáš-ječmen/22/8a8/7b3/](https://www.linkedin.com/pub/tomáš-ječmen/22/8a8/7b3/)

EDUCATION

- 2008 Bachelor's degree in Biochemistry, Charles University in Prague
- **Project topic:** *Mapping of protein-protein interactions (cytochrom P-450 2B4 and cytochrom b5) by chemical modification and mass spectrometry*
- 2010 Master's degree in Biochemistry, Charles University in Prague
- **Project topic:** *Protein-protein interaction mapping of cytochrome P-450 by methods using chemical modification and mass spectrometry*
- Since 2010 Doctoral studies, Charles University in Prague
- **Project topic:** *Cytochrome P-450: Study of structure and interactions using chemical modification, photoaffinity labelling and mass spectrometry*
- 2013 RNDr. degree in Biochemistry, Charles University in Prague

EMPLOYMENT

- Since 2011 Researcher, Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic
- Supported by Czech Science Foundation:** *Mammal microsomal cytochrome P450 interaction with redox partners – topology and structure-function relationships (P207/12/0627)*

TEACHING EXPERIENCE

- 2011 – 2015 Tutoring at *Practical Course in Biochemistry and Biology of Microorganisms*
- 2012 – 2014 Undergraduate students advising during their bachelor projects
- **Jana Štrohalmová:** *Structure and interaction of human structural proteins of tooth using in vivo photoaffinity labelling in combination with nano-probes and mass spectrometry*
 - **Petr Holý:** *Co-operativity of cytochrome P450 system and its impact on drug and carcinogen metabolism*

GAINED PRACTICAL SKILLS

- Membrane protein isolation, purification and characterization (both recombinant and of animal origin)
- Unnatural (photo-reactive) amino acid incorporation into protein sequence
- Protein-ligand interactions (photoaffinity labelling, spectroscopy)
- Protein-protein interactions (chemical crosslinking, photo-initiated cross-linking, liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry)
- Protein sequencing (Edman degradation, tandem mass spectrometry)

COURSES

- Presentation Skills
- Practical Rhetoric
- Time Management
- Art of Improvisation

LANGUAGE KNOWLEDGE

- English Certificate in Advanced English – Level C1 (2012)
German Leaving exam (2005)

ATTENDED INTERNATIONAL CONFERENCES

- 4th Congress of the European Association for Chemical and Molecular Sciences (2012, Prague, Czech Republic)
called talk: Utilization of photoactivable nanoprobe and mass spectrometry for structural determination of cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅ interaction
- 30 th Informal Meeting on Mass Spectrometry (2012, Olomouc, Czech Republic)
poster: Characterization of cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅ mutual orientation by photoactivable nanoprobe and mass spectrometry
- 18th International Conference on Cytochrome P450 (2013, Seattle, Washington USA)
poster and called talk: The first evidence of cytochrome P450 and cytochrome b₅ interaction within membrane
- 3rd Symposium on Structural Proteomics (2013, Prague, Czech Republic)
talk: Protein membrane topology studied by photoactivable nanoprobe and high resolution mass spectrometry

- 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2014, Baltimore, Maryland USA)
poster: Membrane interactions of cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 studied by photoactivable protein nanoprobe and high resolution mass spectrometry
- 4th Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2015, Hradec Králové)
poster: Seeking of cytochrome P450 2B4:b5 interactions both in cytosol and lipid membrane combining photo-initiated cross-linking by photo-activable amino acid and high resolution mass spectrometry (poster award)

ATTENDED LOCAL CONFERENCES

- 1st Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2011, Hradec Králové)
poster: Searching for the cytochrome P450-cytochrome b₅ membrane domains interaction by photoaffinity labelling and mass spectrometry
- XII. Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists and Chemists (2012, Počátky u Pelhřimova)
talk: Characterization of mutual orientation of cytochromes P450 and b₅ utilizing photoactivable nanoprobe and mass spectrometry
- 64. Congress of Chemical Societies (2012, Olomouc)
talk: Utilization of photoactivable nanoprobe and mass spectrometry for studying structure and interactions of cytochromes P450 and b₅
- 2nd Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2012, Olomouc)
talk: Uncovering the membrane topology of cytochromes P450 and b₅ employing labelling by photoactivable nanoprobe and mass spectrometry
- XIII. Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists and Chemists (2013, Žďár nad Sázavou)
talk: Utilization of photoactivable nanoprobe and mass spectrometry for studying structure and interactions of cytochromes P450 and b₅
- 3rd Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry (2013, Hradec Králové)
poster: Cytochrome P450 protein-protein interactions not only within the lipid membrane environment

PUBLICATIONS

1. Hodek P, Sulc M, Pavlaskova K, **Jecmen T**, Martinek V, Hudecek J, Stiborova M: **Close look at cytochrome P450-b5 catalytic complex**. In *17th International Conference on Cytochrome P450 - Biochemistry, Biophysics and Structure*. Manchester (UK), Medimond, **2011**. p. 17-20.
2. Haladova K, Mrazek H, **Jecmen T**, Halada P, Man P, Novak P, Chmelik J, Obsil T, Sulc M: **The combination of hydrogen/deuterium exchange or chemical cross-linking techniques with mass spectrometry: Mapping of human 14-3-3f homodimer interface**. *J Struct Biol.*, 179(1):10-7 (**2012**). IF 3.406 (2011)
3. Sulc M, **Jecmen T**, Snajdrova R, Novak P, Martinek V, Hodek P, Stiborova M, Hudecek J: **Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations**. *Neuro Endocrinol Lett.*, 33(Suppl3):41-47 (**2012**). IF 1.296 (2011)
4. Koberova M, **Jecmen T**, Sulc M, Cerna V, Hudecek J, Stiborova M, Hodek P: **Photo-cytochrome b5 – A New Tool to Study the Cytochrome P450 Electron-transport Chain**. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8:125-134 (**2013**). IF 3.729 (2011)
5. Linhartova M, Bucinska L, Halada P, Jecmen T, Setlik J, Komenda J, Sobotka R: **Accumulation of the Type IV prepilin triggers degradation of SecY and YidC and inhibits synthesis of Photosystem II proteins in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803**. *Mol Microbiol.* 93(6):1207-23 (**2014**). IF 5.026
6. Ptáčková R, **Ječmen T**, Novák P, Hudeček J, Stiborová M, Šulc M: **The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with mass spectrometry**. *Int J Mol Sci.*, 15(6):9224-41 (**2014**). IF 2.339
7. **Ječmen T**, Ptáčková R, Kavan D, Černá V, Hodek P, Stiborová M, Hudeček J, Šulc M: **Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in a functional membrane complex**. *Neuro Endocrinol Lett.*, 35(Suppl2):114-122 (2014). IF 0.935
8. **Ječmen T**, Ptáčková R, Černá V, Dračínská H, Hodek P, Stiborová M, Hudeček J, Šulc M: **The Photo-Initiated Cross-linking Extends Mapping of Protein-Protein Interface to the Membrane-embedded Parts: Cytochromes P450 2B4 and b5**. *Methods*, v tisku (2015). IF 3.221