

ABSTRAKT

Systém oxygenas se smíšenou funkcí se v organismu podílí na biosyntéze endogenních a také metabolismu exogenních látek (např. léčiv nebo chemických prokarcinogenů). Substráty jsou biotransformovány terminálními oxygenasami systému – cytochromy P450 (P450). Katalytické vlastnosti některých jejich zástupců (např. studované izoformy 2B4) jsou pozměněny v přítomnosti redoxního partnera – cytochromu b₅ (cyb5). Oba cytochromy jsou ukotveny hydrofobními doménami v lipidické membráně endoplasmatického retikula, zatímco jejich katalytické domény jsou exponovány do cytosolu buňky.

K rozšíření současných znalostí o struktuře a interakcích studovaných cytochromů byly využity dva přístupy založené na kovalentním síťování aminokyselin v „nulové vzdálenosti“ (angl. „zero-length cross-linking“): (1) chemické síťování činidlem 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) propojujícím ve vodném prostředí přístupné karboxylové skupiny s primárními aminy, a (2) síťování pomocí foto-labilního analogu methioninu (pMet), který se po aktivaci UV zářením může vázat na libovolnou aminokyselinu, a to v hydrofobním i hydrofilním prostředí. pMet byl do sekvence cyb5 inkorporován namísto methioninu během rekombinantní exprese proteinu v *E. coli*, která probíhala v limitním médiu obohaceném o aminokyselinový analog. Optimalizací experimentálních podmínek bylo dosaženo přibližně 20-30% substituce přirozené aminokyseliny.

Zesítěné heteromery byly separovány na 1-dimenzionální elektroforéze, a komplexy o nejednoznačně určené stechiometrii byly charakterizovány pomocí 2-dimenzionální elektroforézy a metodou celkové aminokyselinové analýzy. Ve směsi získané proteolýzou jednotlivých oligomerů P450 2B4:cyb5 (1:1, 1:2 nebo 2:1) byly zesítěné peptidy identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením ve spojení s kapalinovou chromatografií.

Foto-síťování vůbec poprvé přímo potvrdilo interakci hydrofobních helixů cyb5 a P450 2B4 v prostředí lipidické membrány, a ukázalo také doposud nepopsané kontaktní oblasti obou proteinů v cytosolu. Další aminokyselinové páry podílející se na kontaktu katalytických domén byly zachyceny pomocí činidla EDC, a výsledky byly využity při *in silico* modelování této interakce. Presentovaná zjištění podporují obecně přijímanou topologii obou cytochromů při níž dochází k přenosu elektronu. Navíc však naznačují další možné natočení proteinů, které je pro přenos elektronu nevhodné, může však být zodpovědné za alosterickou modulaci P450 2B4. Existenci minimálně dvou orientací potvrzuje i vznik heterotrimerních komplexů se stechiometrií cytochromů 1:2 a 2:1.

Výsledky demonstrují výhody nově vyvinutého foto-iniciovaného síťování pro studium transientních protein-proteinových interakcí oproti síťování chemickému: (1) vazba pMet na jakoukoliv aminokyselinu v blízkosti (2) nezávisle na okolním prostředí (membrána, cytosol), (3) úspěšné zavedení foto-aktivovatelné aminokyseliny na požadovaná místa sekvence proteinu pomocí místně cílené mutagenese, a (4) vysoká rychlost reakce vzniklých biradikálů, které zachycují okamžité uspořádání systému, včetně více souběžně interagujících proteinů.