

Abstrakt

Monooxygenasový systém se smíšenou funkcí hraje velkou roli při metabolismu cizorodých látek. Hlavní součástí tohoto systému je cytochrom P450, díky němuž jsou látky přicházející do našeho těla převáděny na polárnější produkty. Cytochrom b_5 (cyt b_5) je schopen modulovat funkci cytochromu P450, mechanismus této modulace však dosud nebyl zcela objasněn. Předpokládá se, že by to mohlo být zprostředkováno buď přenosem elektronů z cyt b_5 , nebo i allosterickou modulací cytochromu P450 vyvolanou interakcí s cyt b_5 . Cílem práce bylo nalézt a připravit vhodný analog cyt b_5 , který by nebyl schopen přenosu elektronů, ale přitom by byl strukturně velmi blízký nativnímu cyt b_5 . V práci byla pro sledování konformační stability cyt b_5 a jeho analogů využívána metoda pulzní proteolýzy. Tato metoda využívá štěpení proteinu proteasou v prostředí denaturačního činidla. Pro solubilní proteiny bývá jako denaturant využívána močovina a jako proteasa thermolysin. Pro membránové proteiny se jako denaturant používá spíše SDS a v tomto prostředí se jako proteasa využívá subtilisin. Cílem diplomové práce bylo pomocí této metody porovnat konformační stabilitu nativního lidského cyt b_5 obsahujícím v aktivním centru hem s apo-cyt b_5 a cyt b_5 rekonstituovaným s Mn^{III} protoporfyrinem IX (Mn^{III} PPIX), Cr^{III} protoporfyrinem IX (Cr^{III} PPIX) a Co^{III} protoporfyrinem IX (Co^{III} PPIX). V práci je také popsána příprava cyt b_5 rekonstituovaného s heminem a jeho analogy jednak metodou titrace, tak i pomocí gelové chromatografie.

Klíčová slova: elektroforéza, pulzní proteolýza, hemoproteiny.