

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



**Studium molekulární organizace systému cytochromu P450 pomocí
fotoaktivovatelných proteinů**

**Study of molecular organization of cytochrome P450 system using
photoactivable proteins**

Diplomová práce

Bc. Jan Dědič

Školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Bc. Jan Dědič

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména svému školiteli Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. bez jehož odborného vedení a užitečných rad by tato práce nemohla vzniknout.

Dále bych velmi rád poděkoval Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za jeho rady a vedení při organické syntéze. Dále RNDr. Tomáši Ječmenovi, PhD. a RNDr. Martinu Štíchovy za provedené analýzy na hmotnostním spektrometru.

A v neposlední řadě bych rád poděkoval Mgr. Janu Milichovskému za poskytnuté plasmidy a standardy proteinů a za jeho cenné rady při objasňování metodických postupů.

Abstrakt

Systém cytochromu P450 je velmi významný z hlediska metabolismu endogenních látek a xenobiotik. Tento systém se skládá z cytochromu P450, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CPR), cytochromu b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasy (CYB5R3). Objasnění protein-proteinových interakcí mezi jeho částmi je nezbytné pro pochopení fungování celého systému. Metoda kovalentního síťování se jeví jako velmi vhodná pro studium těchto interakcí. V této práci byl použit fotoaktivovatelný analog aminokyseliny L-methioninu (L-foto-methionin) jako síťovací činidlo.

Tato práce se zabývá organickou syntézou L-foto-methionu, expresí a izolací CPR a CYB5R3 jako fotoaktivovatelných proteinů s inkorporovaným L-foto-methioninem. Pro expresi byl použit auxotrofní kmen *E.coli* B834 (DE3) a M9 miminální medium. Úspěšně byla exprimována a izolována CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem. Míra inkorporace byla ověřena hmotnostní spektrometrií. Dále byla testována schopnost síťování CYB5R3 s cytochromem b_5 .

Klíčová slova: fotolabilní aminokyseliny, exprese proteinů, syntéza

Abstract

The cytochrome P450 system plays an important role in metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. This system consists of cytochrome P450, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase (CPR), cytochrome b₅ and NADH:cytochrome b₅ reductase (CYB5R3). Explanation of protein-protein interactions among these reaction partners is essential for understanding the function of the entire system. Covalent cross-linking is a favorable method for studying these interactions. In this work a photo-activatable analogue of amino acid L-methionine (L-photo-methionine) was used as a cross-linking agent.

This work is focused on the organic synthesis of L-photo-methionine, expression and isolation of CPR and CYB5R3 as photoactivable proteins containing incorporated L-photo-methionine. Auxotrophic strain of *E.coli* B834 (DE3) and minimal media were used for the expression. CYB5R3 with incorporated L-photo-methionine was successfully expressed and isolated. The extent of L-photo-methionine incorporation was verified by mass spectrometry. Furthermore, the photo-initiated cross-linking of CYB5R3 with cytochrome b₅ was tested.

Key words: photolabile amino acid, protein expression, synthesis

[IN CZECH]

Obsah

Seznam použitých zkratek	7
1 Úvod.....	10
1.1 Systém cytochromu P450.....	10
1.2 Cytochromy P450.....	11
1.2.1 Nomenklatura cytochromů P450	12
1.2.2 Struktura cytochromu P450	12
1.2.3 Funkce cytochromů P450	13
1.2.4 Reakční cyklus cytochromu P450.....	15
1.3 NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR).....	16
1.3.1 Struktura NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy.....	17
1.3.2 Interflavinový elektronový transport	18
1.3.3 Přenos elektronu na cytochrom P450	18
1.3.4 Konformační změny v NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktase.....	19
1.4 Cytochrom b ₅	20
1.4.1 Struktura a funkce cytochromu b ₅	20
1.4.2 Vliv cytochromu b ₅ na cytochrom P450.....	21
1.5 NADH cytochrom b ₅ reduktasa	22
1.6 Interakce v systému cytochromu P450	23
1.7 Fotoaktivovatelné aminokyseliny	24
2 Cíl práce.....	25
3 Materiál a metody	26
3.1 Použité přístroje	26
3.2 Použitý materiál a chemikálie	27
3.2.1 Expresní vektory	28
3.3 Metody	33

3.3.1	Organická syntéza.....	33
3.3.2	Příprava kompetentních buněk	36
3.3.3	Příprava M9 minimálních agarových ploten	37
3.3.4	Transformace kompetentních <i>E.coli</i> teplotním šokem	37
3.3.5	Přeočkování bakteriálních buněk <i>E.coli</i> metodou „single cell“	37
3.3.6	Expres rekombinantních proteinů s inkorporovaným L-methioninem (d ₃) ..	38
3.3.7	Expres rekombinantních proteinů s inkorporovaným L-foto-methioninem ..	39
3.3.8	Izolace NADH:cytochrom b ₅ reductasy	39
3.3.9	Chromatografie na nosiči Ni-IDA	40
3.3.10	Chromatografie na nosiči Ni-NTA	41
3.3.11	Gelová chromatografie	41
3.3.12	Stanovení koncentrace NADH:cytochrom b ₅ reductasy	42
3.3.13	Stanovení aktivity NADH:cytochrom b ₅ reductasy.....	42
3.3.14	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu.....	42
4	Výsledky	45
4.1	Syntéza L-foto-methioninu	45
4.1.1	Syntéza diazirinového derivátu (2).....	45
4.1.2	Syntéza bromderivátu (3).....	46
4.1.3	Syntéza aminokyseliny s diazirinovou skupinou (4)	47
4.2	Expres proteinů s d ₃ -L-methioninem	48
4.3	Expres proteinů s L-foto-methioninem	53
4.4	Izolace proteinu s L-foto-methioninem.....	56
4.5	Stanovení koncentrace a aktivity izolovaného proteinu.....	60
4.6	Sítování proteinů	62
5	Diskuze	63
6	Závěr	66
	Seznam použité literatury	67

Seznam použitých zkratek

AMK	aminokyselina
APS	persíran amonný
Au	absorbance unit (jednotka absorbance)
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
c	molární koncentrace
CPR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
CYB5R3	NADH:cytochrom b ₅ reduktasa
cyt b₅	cytochrom b ₅
CYP	cytochrom P450
Da	dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	electrospray ionization
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
/FADH/FADH₂ /	semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
/FMNH/FMNH₂ /	semichinoidní radikál/hydrochinon
FPLC	fast protein liquid chromatography
FRET	Försterův rezonanční přenos energie

H	histidin
IPTG	isopropylthio- β -D-galaktopyranosid
LB medium	Luria Broth medium
M9 medium	minimální medium
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization – time of flight
MFO	system oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
NAD⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukováný)
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováný)
Ni-IDA	chelatační nosič (Ni vázán iminodioctovou kyselinou)
Ni-NTA	chelatační nosič (Ni vázán nitrilotrioctovou kyselinou)
NMR	nukleární magnetická resonance
OD₆₀₀	optická denzita při 600 nm
O/N	overnight kultura
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
pM	L-foto-methionin
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný produkt
RPM	revolutions per minute (otáčky za minutu)

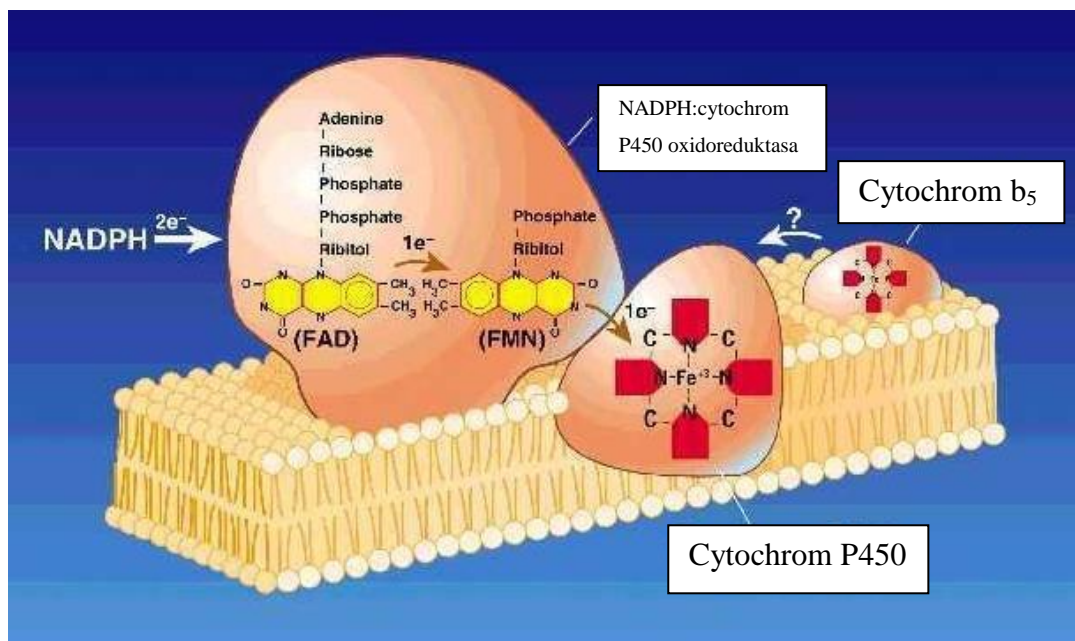
SAXS	small angle X-ray scattering (maloúhlový rozptyl rentgenového záření)
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
XOOH	peroxokyselina
ϵ	molární extinkční koeficient

1 Úvod

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, přesněji řečeno hemthiolátové enzymy, které se vyskytují jak u prokaryotických tak i eukaryotických organismů. U eukaryotických organismů jsou to proteiny membránové, které jsou schopné metabolizovat mnoho exogenních i endogenních substrátů. Jedněmi z nejzajímavějších exogenních substrátů těchto enzymů jsou xenobiotika. Xenobiotika jsou látky cizího původu, se kterými se organismus potýká prakticky celý život a jejich vliv může být jak pozitivní, tak i negativní. Patří mezi ně látky přírodního charakteru, ale také látky uměle vytvořené lidskou činností, jako jsou např. polutanty životního prostředí anebo různé druhy toxických látek. Samostatnou skupinou farmakologicky významných xenobiotik jsou léčiva¹. Právě kvůli tomu jsou tyto enzymy v posledních několika letech velmi intenzivně zkoumány.

1.1 Systém cytochromu P450

Cytochrom P450 sám o sobě v lidském organismu nemůže fungovat. Ke správnému fungování potřebuje další proteiny, které jsou součástí systému cytochromu P450. Někdy bývá označován jako tzv. MFO systém (z angl. Mixed Function Oxidase – systém oxidase se smíšenou funkcí). Tento systém se u eukaryotických organismů nachází v membráně hladkého endoplazmatického retikula. U prokaryotických organismů nelze přesně popsat systém cytochromu P450, neboť jsou tyto proteiny rozpustné a proto jejich kooperace nebude v této práci zahrnuta. Pro eukaryota je však tato kooperace nanejvýš důležitá, neboť se ukazuje, že charakter kooperace mezi jednotlivými proteiny tohoto systému může za určitých okolností určovat rychlost enzymové přeměny nebo i škálu výsledných produktů enzymové reakce². Proteiny, které tvoří tento systém, jsou NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytochrom b₅, a NADH:cytochrom b₅ reduktasa¹. Funkce celého systému je založena na předávání dvou elektronů (NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a cytochrom b₅), kdy finálním příjemcem je právě cytochrom P450. Jeho funkcí je především oxidace substrátu za spotřeby biatomické molekuly kyslíku nebo organického peroxidu¹.



Obr. 1 Hypotetické uspořádání systému cytochromu P450 – převzato a upraveno³

1.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) byly objeveny na konci 50. let M. Klingenbergem⁴, který pozoroval přítomnost jistého pigmentu v mikrosomálním systému potkana. Následně se zjistilo, že tento pigment po redukcí velmi silně váže oxid uhelnatý⁵. Tento komplex vykazoval absorpční maximum (Soretův pás) při 450 nm (odtud P450). V nadcházejících letech vedly další studie ke zjištění, že tento pigment obsahuje hem jako prostetickou skupinu a tedy že se jedná o hemoprotein⁶. Cytochrom P450 je však vzhledem k jeho vlastnostem a funkcím nesprávně označení, neboť cytochromy jsou skupina hemoproteinů, jejichž primární funkce je přenos elektronu. Tato nesrovnalost však zůstala v jeho pojmenování dodnes.

1.2.1 Nomenklatura cytochromů P450

Vzhledem k velkému počtu cytochromů P450 tvořících „superrodinu“ hemthiolátových enzymů, bylo nutné zavést jednotný systém nomenklatury⁷. V tomto systému se jednotlivé cytochromy řadí podle aminokyselinové sekvenční homologie do rodin, které mají 40 % identitu a značí se arabskými číslicemi. Poté se dělí do podrodin, které mají 55 % identitu a značí velkými tiskacími písmeny. Samotný enzym jak označen arabskými číslicemi. Například cytochrom P450 2C19 je tedy zařazen do rodiny 2 a podrodiny C s pořadovým číslem 19.

1.2.2 Struktura cytochromu P450

Jak již bylo uvedeno, eukaryotické cytochromy P450 jsou membránovými proteiny, které mají tzv. membránovou kotvu na svém N-terminálním konci a jsou ukotvené v membráně endoplasmatického retikula. Díky tomu je nelze prakticky krystalovat, přesněji řečeno lze krystalovat pouze jejich solubilní část (po odštěpení membránové kotvy). Proto je také při studiu jejich struktury vhodné využití dalších metod např.: NMR (nukleární magnetická rezonance), SAXS (small-angle X-ray scattering neboli maloúhlový rozptyl rentgenového záření) a další.

Molekulová hmotnost cytochromu P450 se pohybuje okolo 50 000 Da⁸. Za jejich katalytickou funkci je zodpovědná C-terminální doména, která směřuje ven z membrány. Nejdůležitější součástí těchto hemoproteinů je samotný hem přesněji řečeno hem typu b neboli protoporphyrin IX⁹. Ten je v enzymu vázán přes thiolátovou síru aminokyseliny cysteinu, jako pátý ligand atomu železa¹⁰. To má velký vliv na samotnou enzymovou reakci a její průběh. Z hlediska sekundární a terciární struktury si jsou cytochromy P450 podobné. Okolo hemu jsou konzervované strukturní oblasti, které se vyskytují napříč celým spektrem cytochromů P450.



Obr. 2 Struktura lidského cytochromu P450 2C19 – krystalová struktura lidského CYP 2C19, barevně jsou vyznačeny různé strukturní motivy, černou barvou uprostřed je vyznačený hem, převzato ¹¹

1.2.3 Funkce cytochromů P450

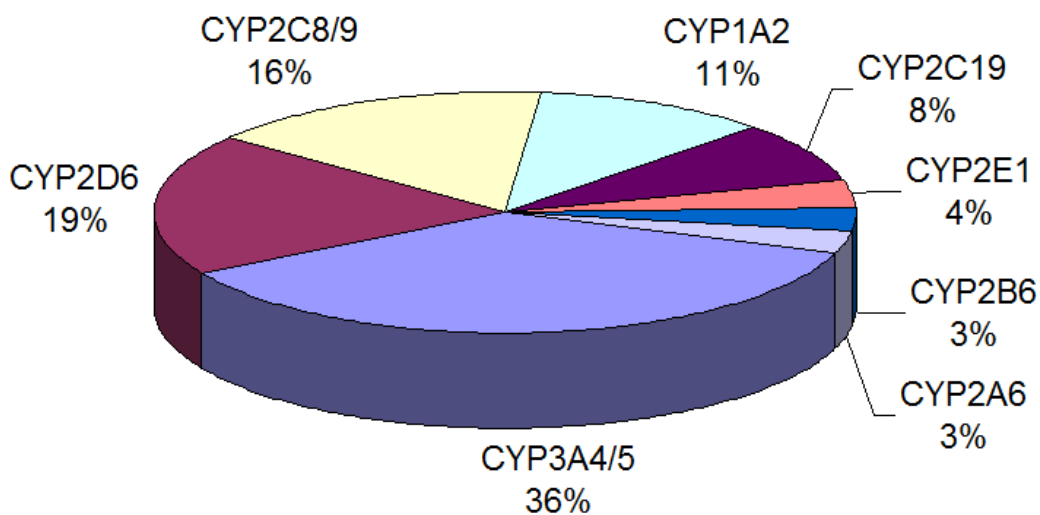
Cytochromy P450 metabolizují celou škálu látek, ať už endogenního či exogenního původu (viz Tab. 1)¹². V lidském genomu bylo objeveno 57 genů kódující aktivní isoformy těchto enzymů¹³. Velké množství zpracovávaných substrátů svědčí o jejich značné variabilitě přesněji řečeno velmi široké substrátové specifitě¹⁴. Existují také cytochromy P450, jejichž úloha v organismu není doposud známa. Vzhledem k důležitosti těchto enzymů v organismu, může mít jakékoliv poškození nebo mutace v genu až fatální vliv v podobě dědičných chorob a metabolických vad¹³.

Intenzivně zkoumány jsou cytochromy P450, které jsou schopny metabolizovat xenobiotika. U léčiv lze mluvit o jejich biotransformaci. Do této skupiny patří hlavně cytochromy P450 rodiny 1, 2 a 3. Jejich zapojení do procesu biotransformace však nemusí mít pouze pozitivní následky, neboť může docházet k aktivaci prokarcinogenů¹⁵. Mezi tyto látky můžeme zařadit např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), jejichž hlavním zástupcem je benzo[a]pyren. Hydroxylace takových substrátů vede k tvorbě reaktivních

intermediátů, které mohou poškozovat DNA. Biotransformace léčiv se majoritně účastní pouze několik isoformem cytochromu P450 (viz obr. 4).

Tab. 1 Rozdělení cytochromů P450 podle metabolizovaného substrátu – převzato¹²

Steroly	Xenobiotika	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitamíny	Neznámé substráty
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4Z1
27A1	2E1				20A1
39A1	2F1				27C1
46A1	3A4				
51A1	3A5				
	3A7				



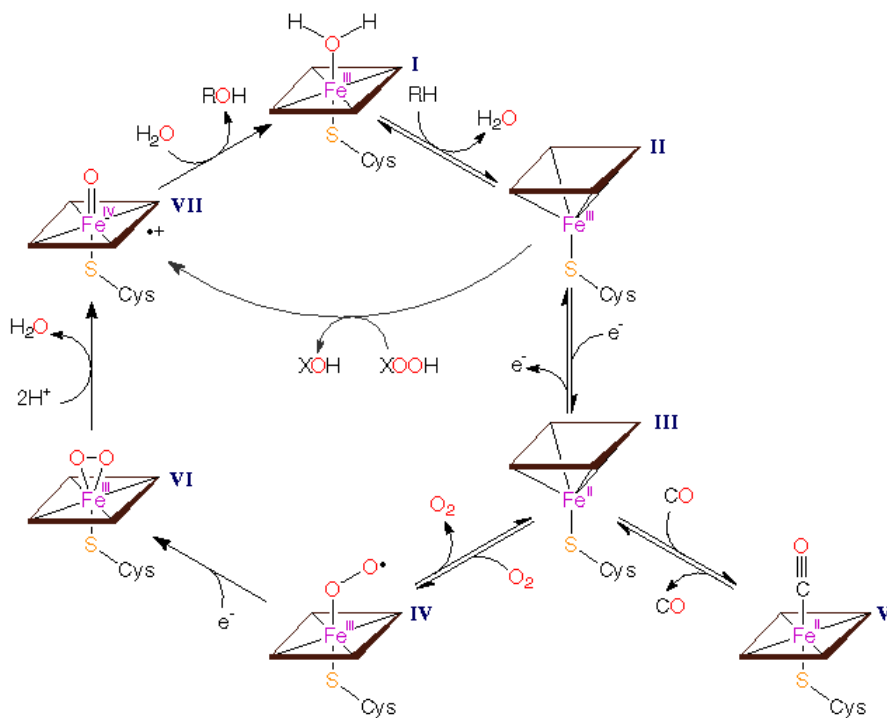
Obr. 4 Zastoupení cytochromů P450 při metabolismu léčiv - převzato¹⁶

1.2.4 Reakční cyklus cytochromu P450

Cytochromy P450 katalyzují hydroxylaci (obecně oxidaci) substrátu. Při této reakci dochází k zabudování atomu kyslíku do molekuly substrátu. Donorem kyslíku může být heterolyticky štěpený molekulární kyslík nebo organický peroxid, potom můžeme mluvit o tzv. peroxygenasové aktivitě cytochromu P450¹⁷. Druhý atom kyslíku je přeměňován na vodu.

Základem fungování tohoto cyklu je existence dvou spinových stavů atomu železa v hemu. První stav je tzv. nízkospinový (spin $1/2$), kdy je atom železa hexakoordinovaný a může tak reagovat například s molekulou vody nebo s dalšími ligandy. Druhý stav je vysokospinový (spin $5/2$), kdy je atom železa pentakoordinován a jedna pozice je přístupná. Při navázání substrátu dochází k přechodu z hexakoordinovaného stavu na pentakoordinovaný díky vytlačení molekuly vody jako šestého ligandu. Zvýšení redoxního potenciálu způsobí, že atom železa je pak redukován přenosem elektronu z NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy z Fe^{3+} na Fe^{2+} a nadále setrvává ve vysokospinovém stavu. Následně se naváže molekula kyslíku a dochází ke změně zpět na nízkospinový stav. (V této konformaci může dojít i k navázání oxidu uhelnatého, který má mnohem vyšší afinitu a celou reakci inhibuje.) Vytvořený ferri-superoxidový komplex je redukován opět NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo cytochromem b_5 . Po redukcí se heterolyticky štěpí vazba O-O, kdy jeden kyslík je stále zachycen na atomu železa a druhý atom kyslíku se redukuje až na molekulu vody. Vytržením vodíkového atomu pomocí takto vzniklého radikálu a následné rekombinaci s hydroxylovým radikálem dochází k vytvoření hydroxylovaného substrátu, který opouští aktivní centrum. Poté se systém vrací do původního hexakoordinovaného stavu¹.

V případě, že není dostatečně rychlý transport elektronů z redoxních partnerů na cytochrom P450, dochází vzhledem k vlastnostem ferri-superoxidového komplexu k jeho destabilizaci. Vzniklý superoxidový anionradikál je následně přeměněn superoxidismutasou na peroxid vodíku¹.



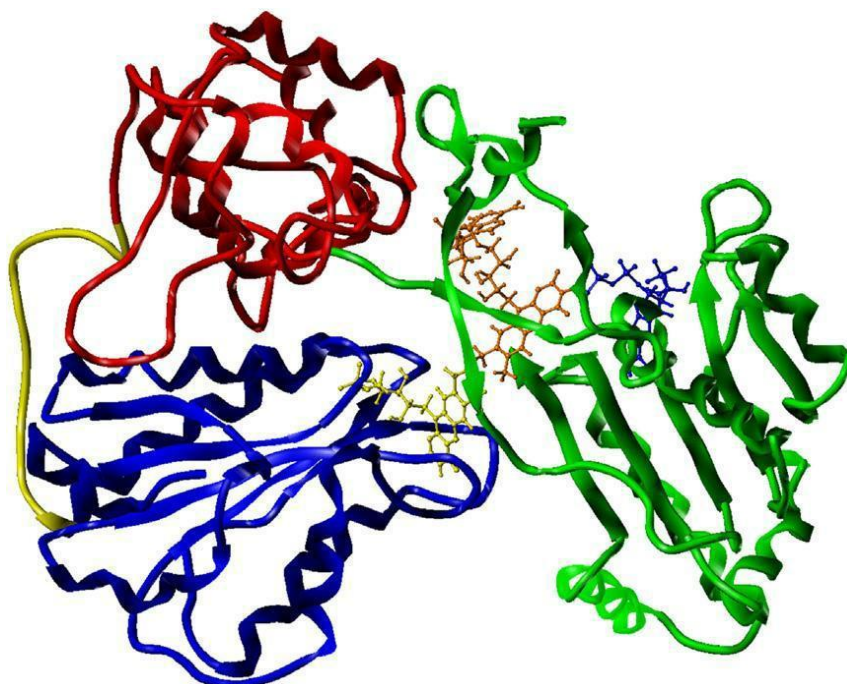
Obr. 5 Reakční cyklus cytochromu P450 - převzato ¹

1.3 NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR)

NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR) je membránový flavoprotein s molekulovou hmotností okolo 78 000 Da¹⁸. Jeho primární funkcí je přenos elektronu z NADPH na cílový protein, kterým může být nejen cytochrom P450, ale i cytochrom c^{19} , cytochrom b_5^{20} nebo hem oxygenasa²¹. V CPR se jsou přítomny obě flavinové prostetické skupiny, tedy FMN a FAD²². Díky rozdílným redoxním potenciálům mezi těmito koenzymy jsou elektrony předávány postupně, a proto CPR funguje jako tzv. dělič elektronového páru¹. Elektron tak putuje z NADPH na FAD a poté na FMN, konečným akceptorem je u cytochromu P450 atom železa v hemu²³.

1.3.1 Struktura NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

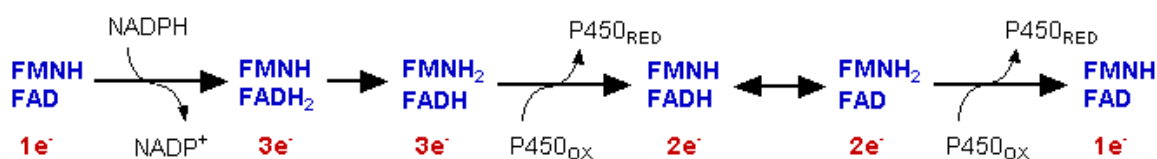
Struktura CPR je značně konzervovaná. To naznačuje, že v průběhu evoluce tento enzym plnil velmi důležitou úlohu v kooperaci dalšími reakčními partnery. CPR se skládá ze dvou funkčních domén. Jednou je hydrofilní C-terminální doména (72 kDa), která plní především katalytickou funkci²⁴ a druhou je hydrofobní N-terminální doména (6 kDa), která slouží primárně k ukotvení proteinu do membrány endoplazmatického retikula a napomáhá ke správné orientaci a funkci CPR vzhledem k celému systému cytochromu P450²⁵. Po odštěpení této domény může CPR nadále redukovat např. cytochrom c, ale cytochrom P450 v tomto stavu redukovat nelze^{26,27}. Ve struktuře CPR jsou až čtyři strukturální domény: doména vázající FMN, doména vázající FAD a NADPH a spojovací doména, která zodpovídá zejména za správnou orientaci obou koenzym vázajících domén a jejich interakci. FMN doména je propojena s celým proteinem úsekem 13 aminokyselin „hinge“²⁸.



Obr. 6 Struktura NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy – krystalová struktura potkaní CPR s odštěpenou N-terminální membránovou kotvou, doména vázající FMN (modrá), doména vázající NADPH a FAD (zelená), spojovací doména (červená), „hinge“ (žlutá), dále jsou zde znázorněny koenzymy: FAD (oranžová), NADPH (modrá) a FMN (žlutá), převzato ²⁹

1.3.2 Interflavinový elektronový transport

Přenos elektronu přes CPR je zajištěn především blízkou orientací FMN a FAD. Optimální vzdálenost obou isoalloxazinových kruhů těchto koenzymů je zhruba 4 \AA ³⁰. Z toho vyplývá, že přenos elektronu je velmi rychlý a navázání NADPH je rychlost určujícím krokem. Z NADPH pak elektrony putují ve formě hydridových aniontů na FAD. Z plně redukovaného FAD ve formě FADH₂ jsou pak elektrony přenášeny na FMN a vzniká tak FMNH₂. Transport elektronů mezi oběma koenzymy je uskutečňován díky rozdílným hodnotám redoxních potenciálů³¹.



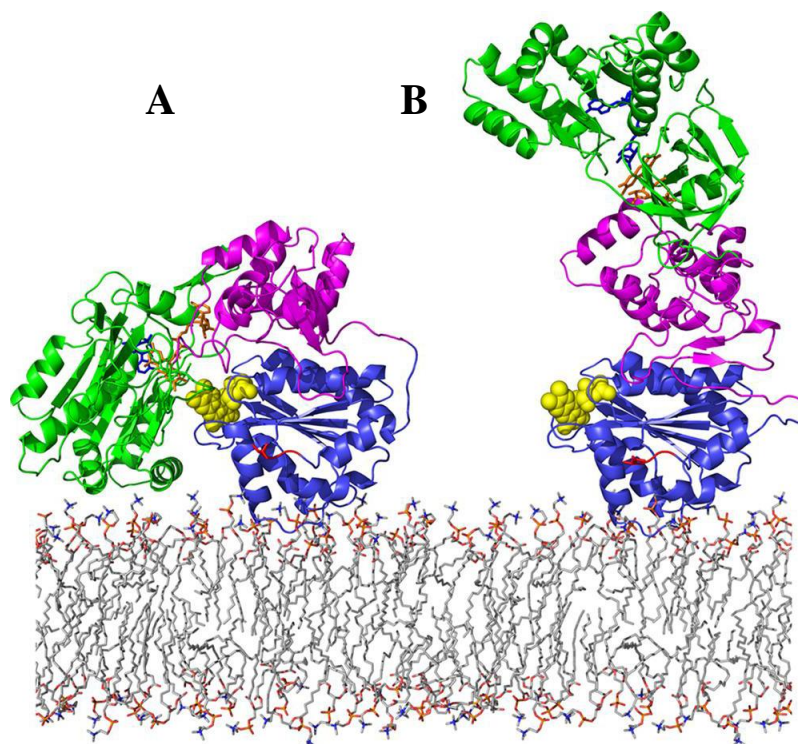
Obr. 7 Interflavinový elektronový transport - převzato³²

1.3.3 Přenos elektronu na cytochrom P450

Přenos elektronu na cytochrom P450 je zprostředkován FMN, které redukuje atom železa v hemu. CPR vytváří funkční komplex enzym – substrát s cytochromem P450 v poměru 1:1. Za fyziologických podmínek je v membráně endoplasmatického retikula nadbytek cytochromů P450 zhruba v poměru 3:1. Inducí exprese cytochromů P450 látkami typu barbiturátů dochází ke zvýšení jejich koncentrace a nárůstu poměru až na 10:1 někdy dokonce až 30:1 oproti CPR³³. CPR musí být schopná redukovat velké množství cytochromů P450 a jejich isoform. Interakční místo pro CPR se tak musí nacházet v konzervované části cytochromu P450. Podle Petersona³⁴ se okolo CPR shromažďují cytochromy P450 a dochází tak k vytváření určitých klastrů. Proces redukce je rozdělen na dvě fáze – rychlou a pomalou. V rychlé fázi jsou redukovány právě cytochromy P450 nacházejících se v klastrech (zhruba 70%). Zbylé cytochromy P450 jsou redukovány v pomalé fázi a nejsou součástí již zmíněných klastrů a k interakci s CPR dochází až posunem v membráně endoplasmatického retikula.

1.3.4 Konformační změny v NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktase

Ukazuje se, že během interflavinového elektronového transportu a následné redukce reakčního partnera dochází v CPR ke značným konformačním změnám³⁵. Z NMR a SAXS analýz je patrné, že CPR osciluje mezi dvěma konformačními stavy. První konformační stav je kompaktní a zároveň koreluje s krystalovou strukturou CPR. V tomto stavu jsou oba flavinové koenzymy právě blízko sebe a může tak dojít k interflavinovému elektronovému transportu. Druhý konformační stav je „otevřený“ a velmi pravděpodobně zprostředkovává transport elektronu z FMN na redoxního partnera. Velmi důležitý je také 13 aminokyselinový úsek, který spojuje doménu vázající FMN s celým proteinem. Mutantní CPR vytvořená bez tohoto úseku, nebyla schopna interflavinového elektronového transportu²⁸.



Obr. 8 Modely konformačních stavů CPR – A je kompaktní konformace korelující s krystalovou strukturou, B je „otevřená“ konformace, kde je velmi patrné odkryté FMN (žlutá) umožňující přenos elektronů na redoxního partnera. Dále můžeme rozlišit doménu vázající FMN (modrá), doménu vázající FAD a NADPH (zelená) a spojovací doménu (fialová), převzato a upraveno³⁵

1.4 Cytochrom b₅

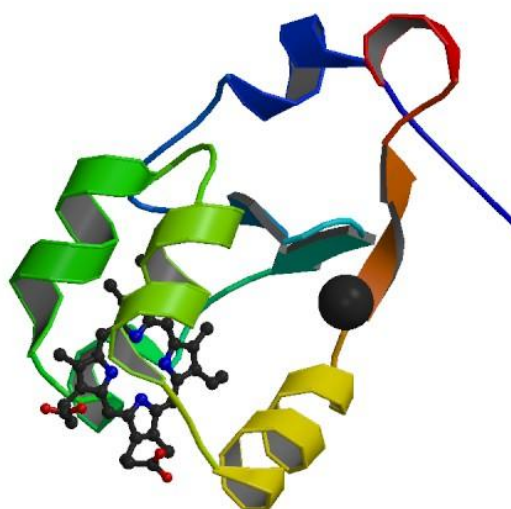
Cytochrom b₅ je dalším proteinem, který je součástí systému cytochromu P450. Je to malý integrální membránový hemoprotein s molekulovou hmotností okolo 17 000 Da schopný transportu elektronů³⁶. Nalezen byl v průběhu 50. let a původně nesl název cytochrom m³⁷. Z hlediska evoluce můžeme cytochrom b₅ nalézt jak v živočišné, tak v rostlinné říši. Cytochrom b₅ má ve své struktuře zabudovaný hem (protoporphyrin IX) stejně jako cytochrom P450. Mimo systém cytochromu P450 se cytochrom b₅ podílí na biosyntéze cholesterolu³⁸ nebo desaturaci mastných kyselin³⁹.

Ačkoliv je cytochrom b₅ membránovým proteinem jedna jeho isoforma se nachází v solubilním stavu v červených krvinkách a je schopná redukovat methemoglobin⁴⁰. Další dvě isoformy jsou kotveny v membráně endoplasmatického retikula nebo v membráně mitochondrií.

1.4.1 Struktura a funkce cytochromu b₅

Cytochrom b₅ se skládá z 6 α -helikálních struktur a 5 β -skládáných listů, které tvoří dvě domény. Hydrofilní N-terminální doména nese hem a vazebné místo potřebné pro navázání svých redoxních partnerů. Tato doména obsahuje dvě hydrofobní jádra⁴¹. Atom železa v hemu je koordinován pomocí dvou histidinů (H39 a H63) přesněji řečeno jejich imidazolových zbytků. Hydrofobní C-terminální doména slouží k především k ukotvení proteinu do membrány. Obě domény jsou propojeny krátkým 15 aminokyselinovým úsekem tzv. linkerem⁴².

Cytochrom b₅ funguje jako transportér elektronů. Jak již bylo uvedeno cytochrom b₅ se účastní mnoha dějů v organismu. V systému cytochromu P450, je schopen redukovat atom železa v hemu cytochromu P450. V této reakci však cytochrom b₅ funguje jen jako přenašeč elektronů. Tento elektron může přijmout primárně od NADH:cytochrom b₅ reduktasy⁴³ nebo také od CPR⁴⁴, a následně ho předat právě cytochromu P450. Vzhledem k rozdílným redoxním potenciálům může cytochrom P450 přijmout první elektron od CPR a druhý elektron také od CPR anebo od cytochromu b₅^{45,46}. Existují však důkazy, že za určitých podmínek může cytochrom b₅ s NADH:cytochrom b₅ reduktasou nahradit CPR jako hlavního donoru elektronů pro cytochrom P450⁴⁷.



Obr. 9 Struktura cytochromu b_5 – krystalová struktura hovězího cytochromu b_5 , přechod od N-terminální do C-terminální domény znázorněn barevným přechodem, v N-terminální doméně pak lze vidět hem, převzato⁴⁸

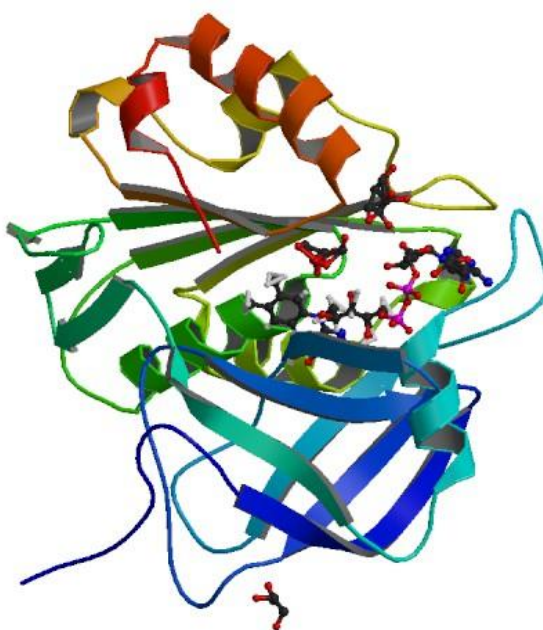
1.4.2 Vliv cytochromu b_5 na cytochrom P450

Funkční vztah mezi cytochromem b_5 a cytochromem P450 je velmi diskutován. Cytochrom b_5 totiž může reakci katalyzovanou cytochromem P450 aktivovat nebo inhibovat nebo na ní nemusí mít žádný vliv⁴⁹. Ukazuje se, že velký podíl na typu modulace má samotný substrát nebo určitý typ cytochromu P450. Cytochrom b_5 pak může za určitých okolností měnit i poměr a strukturu vznikajících metabolitů². Stále však není jasné, zda v tomto případě cytochrom b_5 funguje čistě jako přenašeč elektronů nebo jako alosterický modulátor. V tomto ohledu bylo provedeno mnoho experimentů, které podporují obě teorie^{50,51,52}. Strukturní analýzy předpokládají, že cytochrom b_5 vytváří komplex s cytochromem P450 a že základem jsou silné elektrostatické interakce mezi kladně a záporně nabitými aminokyselinovými zbytky obou proteinů⁵³.

1.5 NADH cytochrom b₅ reduktasa

NADH:cytochrom b₅ reduktasa (CYB5R3) je integrální membránový flavoprotein s molekulovou hmotností okolo 35 000 Da⁵⁴. Na rozdíl od CPR obsahuje CYB5R3 pouze jeden flavinový koenzym, a sice FAD. Jako všechny již vyjmenované proteiny, je i CYB5R3 zanořena do membrány endoplasmatického retikula. CYB5R3 je evolučně velmi starý protein a byl nalezen u mnoha eukaryotických druhů, jako jsou houby⁵⁵, rostliny⁵⁶ a samozřejmě v neposlední řadě u savců⁵⁷.

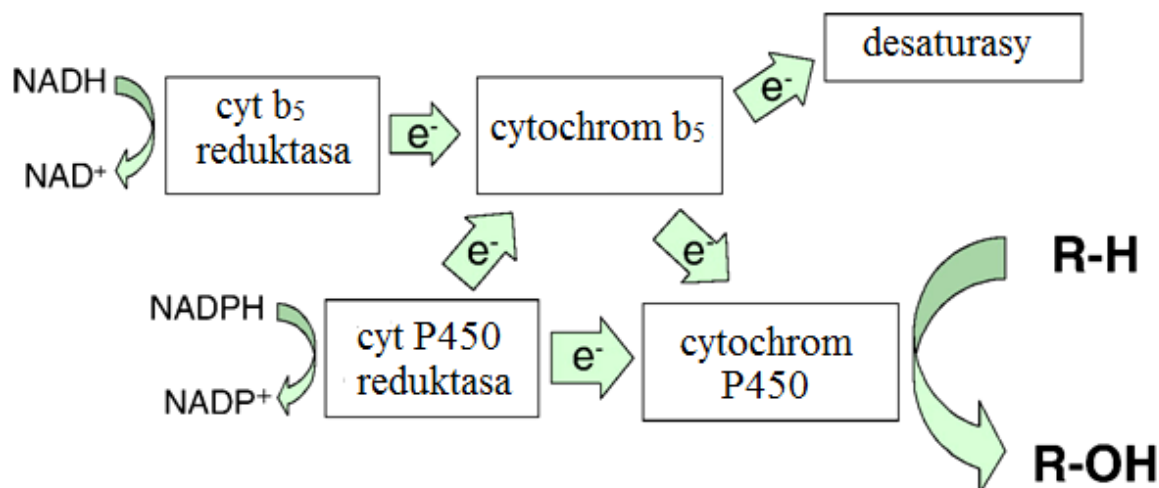
CYB5R3 je složena ze dvou domén, které jsou propojeny velmi flexibilní spojkou. Jedna doména váže FAD a druhá a váže NADH. CYB5R3 se vyskytuje ve dvou základních isoformách. Membránová isoforma obsahuje velkou katalytickou doménu s FAD a do membrány endoplazmatického retikula je kotvena úsekem o velikosti zhruba 3 000 Da⁵⁸. Tato isoforma je právě součástí elektronového transportu systému cytochromu P450. Druhá isoforma je solubilní a je o 25 aminokyselinových zbytků kratší. Lze ji nalézt v cytoplasmě nebo v červených krvinkách, kde redukuje methemoglobin⁵⁹.



Obr. 10 Struktura NADH:cytochrom b₅ reduktasy – krystalová struktura CYB5R3, přechod z N-terminální části do C-terminální části zvýrazněn barevným přechodem, převzato⁶⁰

1.6 Interakce v systému cytochromu P450

Jak již bylo uvedeno, primární funkce systému cytochromu P450 je transport elektronů z redukovaných koenzymů NADH a NADPH na hem v cytochromu P450. Na obr. 12 lze pak vidět provázanost celého systému. Vzhledem k tomu, jak je tento systém komplexní, je velmi složité i pochopení jeho fungování jako celku. Charakterizace dílčích interakcí v systému je prvním krokem k tomuto pochopení.



Obr. 11 Interakce v systému cytochromu P450 – převzato⁶¹

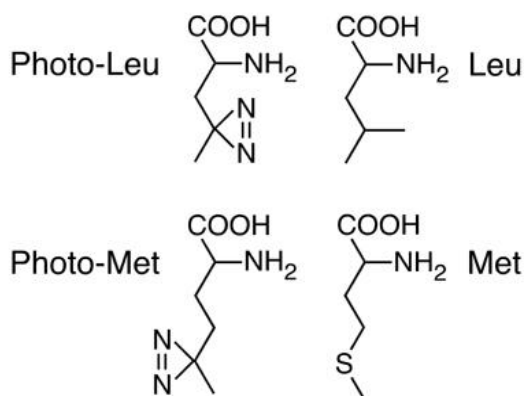
Na obr. 11 je pak jasně vidět, že konečným příjemcem elektronů v celém systému cytochromu P450 je samotný cytochrom P450. Tato práce se pak zaměřuje především na interakci CPR s cytochromem P450 a na interakci CYB5R3 s cytochromem b₅.

Metody studia protein-proteinových interakcí jsou různé a liší se od sebe náročností i specifitostí. První možností je využití určitého druhu záření. Patří sem například UV-VIS spektroskopie, NMR, SAXS, nebo FRET (Försterův rezonanční přenos energie). Dali by se sem zařadit také H/D výměny. Druhou možností je pak využití určitých chemických modifikací např. chemické síťování nebo využití tzv. místě cílené mutagenese (SDM – site directed mutagenesis). Technikou chemického síťování můžeme do jisté míry komplex proteinů zafixovat a po následném rozštěpení vhodnými proteasami vzniklé peptidy analyzovat hmotnostní spektrometrií. Tím můžeme získat informaci o struktuře interakčních ploch.

1.7 Fotoaktivovatelné aminokyseliny

Fotoaktivovatelné aminokyseliny jsou analogy klasických proteinogenních L-aminokyselin. Jsou to sloučeniny schopné tzv. foto-chemického síťování. Po inkorporaci do proteinu jsou vhodné pro zjišťování protein-proteinových interakcí, neboť dochází ke kovalentnímu zesíťování („crosslinking“) zvolených proteinových komplexů⁶². Analýza těchto komplexů, nejlépe použitím hmotnostní spektrometrie, může poskytnout cenné informace o struktuře vazebných míst nebo o poměru proteinů v daném komplexu.

Inkorporace těchto analogů se provádí při expresi proteinu, nejlépe v auxotrofním bakteriálním kmenu, tedy kmenu, jemuž byl vyřazen gen pro syntézu jedné určité aminokyseliny. Použitím auxotrofního kmenu je zároveň snížena míra kompetice mezi analogem a klasickou aminokyselinou. Exprese proteinu probíhá nejlépe v limitním mediu, které obsahuje daný analog. Při translaci pak díky částečné „promiskuitě“ aminoacyl-tRNA-synthetasy^{63,64} dochází k záměně klasické aminokyseliny za fotoaktivovatelný analog. Asi nejspolehlivější je použití L-foto-methioninu jako analogu methioninu. Dále je používán L-foto-leucin a L-foto-isoleucin⁶⁵. U ostatních aminokyselin nastává problém s translačním aparátem, který modifikované aminokyseliny velmi špatně zabudovává. Fotoaktivovatelné aminokyseliny mají ve své struktuře diazirinový kruh, který je velmi labilní při UV záření⁶². Fotolýzou při dané vlnové délce (254 nm), dochází k rozštěpení diazirinového kruhu a uvolnění velmi reaktivního karbenu (radikál). Tento radikál reaguje prakticky se vším, co je v jeho blízkosti, tedy i s molekulou proteinu. Pokud nedojde k vytvoření kovalentní vazby, dojde k rekombinaci a jeho následné neutralizaci.



Obr. 12 Struktura fotoaktivovatelných analogů - převzato⁶⁵

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je příprava fotoaktivovatelného proteinu obsahující fotoaktivovatelnou aminokyselinu L-foto-methionin. Pro splnění tohoto cíle je třeba realizovat následující dílčí úkoly:

- Organická syntéza L-foto-methionu
- Expres potkaní NADPH: cytochrom P450 reductasy
- Expres solubilní lidské NADH: cytochrom b₅ reductasy formy 3
- Optimalizace inkorporace L-foto-methioninu do produkovaných proteinů v expresním systému
- Izolace a charakterizace obou proteinů

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Autokláv: Varioklav 400E (H+P Labortechnik)

Automatické pipety: mLINE (BIOHIT), NichipetEX, Reference 2 (Eppendorf)

Centrifugy: Centrifuge 5415 R (Eppendorf), Allegra X-22R (Beckman Coulter) výkyvný rotor SX4250, ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter) úhlový rotor Ti 70

Elektroforetické aparatura: Mini-PROTEAN Tetra cell (BIO-RAD)

FPLC systém: ÄKTAprime plus (GE Healthcare)

Inkubátory: IR 1500 Automatic CO2 Incubator (Flow Laboratories), G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Edison, N.J. USA), Multitron Pro (INFORS HT)

Laboratorní váhy: 440-35N (KERN), EW 600-2M (KERN), EK600H (A&D Instruments LTD), analytické váhy 40 SM-200A (Pesa)

pH metr: model 370 (ATI Orion)

Spektrofotometr: Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer (Agilent), DS-11 Spectrophotometer (DeNovix)

Vakuová odparka: LABOROTA 4002 (Heidolph)

Ultrazvukový homogenizátor: SONOPULS HD 3100, sonda KE76 (BANDELIN)

Zdroj pro elektroforézu: EPS 301 (Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech)

3.2 Použitý materiál a chemikálie

BIO-RAD, USA: persíran amonný,

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), 2-merkptoethanol, dodecylsíran sodný (SDS)

GE Healthcare, USA: nosič Ni-IDA, kolona Superdex™ 200 10/300 GL

Lach-ner, Česká republika: bromfenolová modř, EDTANa₂ (chelaton 3), CaCl₂, HCl, KH₂PO₄, NaOH, Na₂HPO₄ x 12H₂O, NaCl, NH₄Cl, MgSO₄, NiSO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃, glukosa, glycerol, methanol, ethanol, aceton, kyselina octová, octan sodný, chloroform, CH₂Cl₂, diethylether, jod, HBr, 25% roztok amoniaku,

Linde, Česká republika: kapalný dusík, amoniak

Loba Feinchemie, Rakousko: tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Macherey-Nagel, Německo: kolona Ni-NTA

Merck Millipore, USA: *E.coli* B834 (DE3)

P – Lab, Česká republika: imidazol, thionylchlorid

Roche, Švýcarsko: inhibitory proteas cOmplete™ Ultra Tablets, EDTA free

Serva Heidelberg, Německo: N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)

Sigma, USA: triethylamin, kyselina 4-acetylbutanová, kyselina hydroxylamin-O-sulfonová, riboflavin, NADH, L-methionin, d3-L-methionin, kanamycin sulfát, InstantBlue™, tetrachlormethan

Thermo Scientific, USA: L-foto-methionin

3.2.1 Expresní vektory

Jako expresní vektory byly použity 2 plasmidy získané od Mgr. Jana Milichovského. Gen pro CPR byl vložen do plasmidu pETOR 262. Gen pro CYB5R3 byl vložen do plasmidu pET 28a. Oba plasmidy nesou resistenci na selektivní antibiotikum kanamycin a T7 promotor. Z toho důvodu byly použity buňky B834 (DE3). Jejich mapy pak jsou znázorněny na obr. 15 a na obr. 18.

3.2.1.1 Plasmid pETOR262

Plasmid pETOR262 byl vytvořen Harlowem⁶⁶ z originálního plasmidu pOR262⁶⁷. Plasmid obsahuje „ompA leader“ s „linkerem“ mezi sekvencí proteinu a leaderu. Technicky je to modifikovaný plasmid pET29a s vloženým genem s „ompA leaderem“ pomocí restrikčních endonukelas HindIII a XbaI.

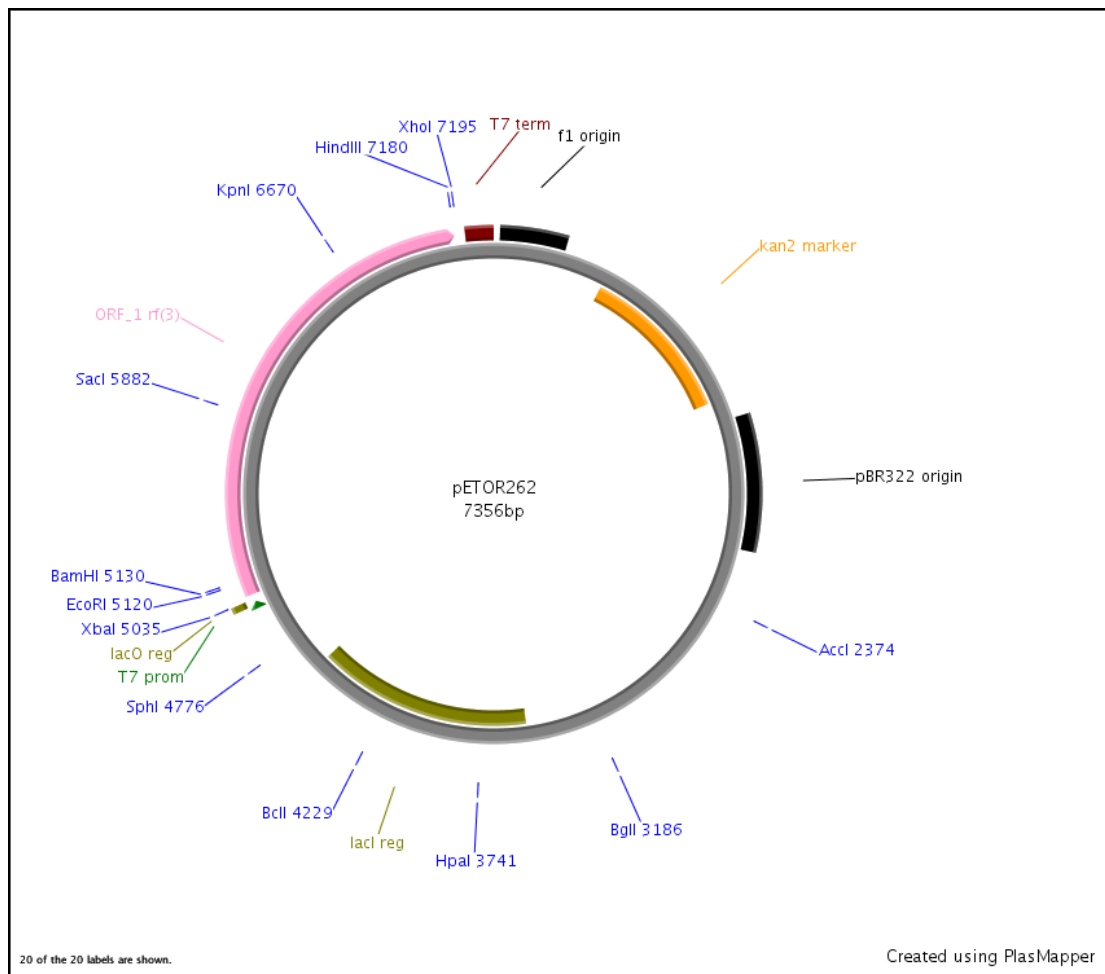
```
ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGT
AGCGCAGGCCGGAATTCCCGGGGATCCGACCAACATGGGGGACTCTCACGAA
GACACCAGTGCCACCATGCCTGAGGCCGTGGCTGAAGAAGTGTCTCTATTTCAG
CACGACGGACATGGTTCTGTTTTCTCTCATCGTGGGGGTCCTGACCTACTGGTT
CATCTTTAGAAAGAAGAAAGAAGAGATACCGGAGTTCAGCAAGATCCAAACA
ACGGCCCCACCCGTCAAAGAGAGCAGCTTCGTGGAAAAGATGAAGAAAACGG
GAAGGAACATTATCGTATTCTATGGCTCCCAGACGGGAACCGCTGAGGAGTTT
GCCAACCGGCTGTCCAAGGATGCCACCGCTACGGGATGCGGGGCATGTCCGC
AGACCCTGAAGAGTATGACTTGGCCGACCTGAGCAGCCTGCCTGAGATCGACA
AGTCCCTGGTAGTCTTCTGCATGGCCACATAACGGAGAGGGCGACCCACGGAC
AATGCGCAGGACTTCTATGACTGGCTGCAGGAGACTGACGTGGACCTCACTGG
GGTCAAGTTTGCTGTATTTGGTCTTGGGAACAAGACCTATGAGCACTTCAATGC
CATGGGCAAGTATGTGGACCAGAGGCTGGAGCAGCTTGGCGCCAGCGCATCT
TTGAGTTGGGCCTTGGTGATGATGACGGGAACCTGGAAGAGGATTTTCATCACG
TGGAGGGAGCAGTTCTGGCCAGCTGTGTGCGAGTTCTTTGGGGTAGAAGCCAC
TGGGGAGGAGTCGAGCATTTCGCCAGTATGAGCTCGTGGTCCACGAAGACATGG
ACGTAGCCAAGGTGTACACGGGTGAGATGGGCCGTCTGAAGAGCTACGAGAA
CCAGAAACCCCTTCGATGCTAAGAATCCATTCCTGGCTGCTGTCACCGCCA
ACCGGAAGCTGAACCAAGGCACTGAGCGGCATCTAATGCACCTGGAGTTGGAC
ATCTCAGACTCCAAGATCAGGTATGAATCTGGAGATCACGTGGCTGTGTACCC
AGCCAATGACTCAGCCCTGGTCAACCAGATTGGGGAGATCCTGGGAGCTGACC
TGGATGTCATCATGTCTCTAAACAATCTCGATGAGGAGTCAAACAAGAAGCAT
CCGTTCCCCTGCCCCACCACCTACCGCACGGCCCTCACCTACTACCTGGACATC
ACTAACCCGCCACGCACCAATGTGCTCTACGAACCTGGCACAGTACGCCTCAGA
GCCCTCGGAGCAGGAGCACCTGCACAAGATGGCGTCATCCTCAGGCGAGGGC
AAGGAGCTGTACCTGAGCTGGGTGGTGGAAAGCCCGGAGGCACATCCTAGCCAT
CCTCCAAGACTACCCATCACTGCGGCCACCCATCGACCACCTGTGTGAGCTGC
TGCCACGCCTGCAGGCCCGATACTACTCCATTGCCTCATCCTCCAAGGTCCACC
```

CCA ACTCCGTGCACATCTGTGCCGTGGCCGTGGAGTACGAAGCGAAGTCTGGC
CGAGTGAACAAGGGGGTGGCCACTAGCTGGCTTCGGGCCAAGGAACCAGCAG
GCGAGAATGGCGGCCGCGCCCTGGTACCCATGTTTCGTGCGCAAATCTCAGTTC
CGCTTGCCTTTCAAGTCCACCACACCTGTCATCATGGTGGGCCCCGGCACTGGG
ATTGCCCTTTTCATGGGCTTCATCCAGGAACGAGCTTGGCTTCGAGAGCAAGG
CAAGGAGGTGGGAGAGACGCTGCTATACTATGGCTGCCGGCGCTCGGATGAG
GACTATCTGTACCGTGAAGAGCTAGCCCGCTTCCACAAGGACGGTGCCCTCAC
GCAGCTTAATGTGGCCTTTTCCCGGGAGCAGGCCCAAGGTCTATGTCCAGC
ACCTTCTGAAGAGAGACAGGGAACACCTGTGGAAGCTGATCCACGAGGGCGG
TGCCACATCTATGTGTGCGGGGATGCTCGAAATATGGCCAAAGATGTGCAA
ACACATTCTATGACATTGTGGCTGAGTTCGGGCCCATGGAGCACACCCAGGCT
GTGGACTATGTTAAGAAGCTGATGACCAAGGGCCGCTACTACTAGATGTGTG
GAGCTAG

Obr. 13 Nukleotidová sekvence CPR genu - zeleně zvýrazněna sekvence „ompA leaderu“, která se štěpí a fialově sekvence „linkeru“

MKKT AIAI AVALAGFATVAQA GIPGDPTN MGDSHEDTSATMPEAVAEEVSLFSTT
DMVLFSLIVGVLT YWFIFRKKKEE IPEFSKIQT TAPPVKES SFVEKM KKTGRNIIVFY
GSQTGTAE EFANRLSK DAHRYGMRGMSADPEEYDLADLSSLPEIDKSLV VFCMAT
YGEDPTDNAQDFYDWLQETD VDLTG VKFAVFGLGNKTYEHFNAMGKYVDQRL
EQLGAQRIFELGLGDDDGNLEEDFITWREQFWPAVCEFFGVEATGEESSIRQYELV
VHEDMDVAKVYTGEMGRLKSYENQKPPFDAKNPFLAAVTANRKL NQGTERHLM
HLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNQIGEILGADLDVIMSLNNLDEESNK
KHPFPCPTTYRTALTY YLDITNPPRTNVL YELAQYASEPSEQEHLHKMASSSGEGK
ELYLSWVVEARRHILAILQDYPSLRPPIDHLCELLPRLQARYYSIASSSKVHPNSVHI
CAVAVEYEAKSGRVNKG VATSWLRAKEPAGENGGRALVPMFVRKSQFRLPFKST
TPVIMVGP GTGIAPFMGFIQERAWLREQGKEVGETLLYYGCRRSDEDYLYREELA
RFHKDGALTQLNVAFSREQAHKVYVQHLLKRDREHLWKL IHEGGAHIYVCGDAR
NMAKD VQNTFYDIVAEFGPMEHTQA VDYVKKLMTKGRYSLDVWS

Obr. 14 Aminokyselinová sekvence CPR - zeleně zvýrazněna sekvence „ompA leaderu“, která se štěpí a fialově sekvence „linkeru“



Obr. 15 Mapa plasmidu pETOR262 – modrou barvou znázorněna místa pro restriční endonukleasy, oranžovou resistance na kanamycin, růžovou ORF (open reading frame) genu pro CPR

3.2.1.2 Plasmid pET28a

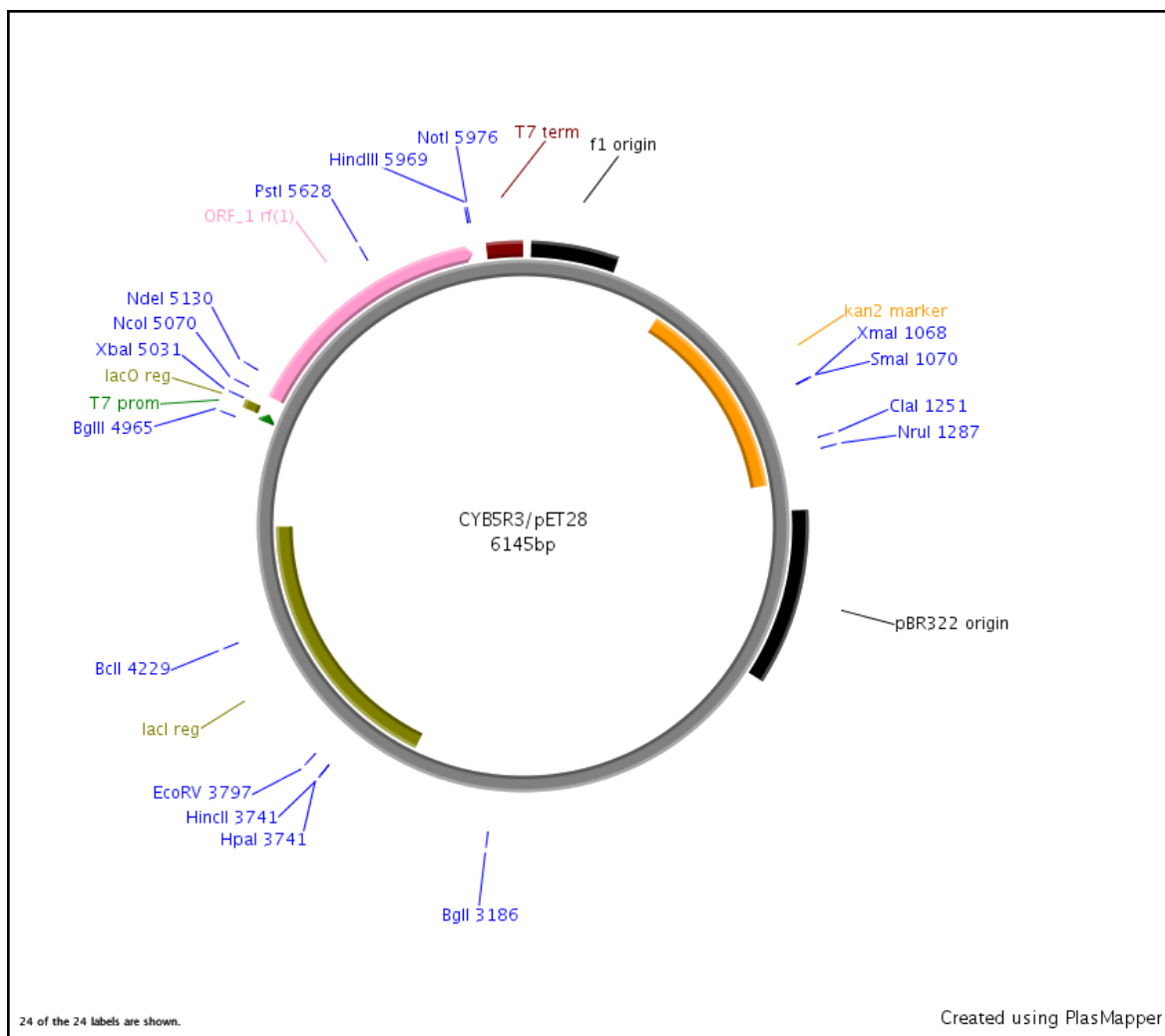
Plasmid pET28a má také kanamycinovou resistenci a nese gen pro CYB5R3.

```
ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGG
CAGCCAT ATGAAGCTGTTCCAGCGCTCCACGCCAGCCATCACCTCGAGAGCC
CGGACATCAAGTACCCGCTGCGGGCTCATCGACCGGGAGATCATCAGCCATGAC
ACCCGGCGCTTCCGCTTTGCCCTGCCGTCACCCCAGCACATCCTGGGCCTCCCT
GTCGGCCAGCACATCTACCTCTCGGCTCGAATTGATGGAAACCTGGTTCGTCCG
GCCCTATACACCCATCTCCAGCGATGATGACAAGGGCTTCGTGGACCTGGTCA
TCAAGGTTTACTTCAAGGACACCCATCCCAAGTTTCCCGCTGGAGGGAAGATG
TCTCAGTACCTGGAGAGCATGCAGATTGGAGACACCATTGAGTTCGGGGGCC
CAGTGGGCTGCTGGTCTACCAGGGCAAAGGGAAGTTCGCCATCCGACCTGACA
AAAAGTCCAACCCATCATCAGGACAGTGAAGTCTGTGGGCATGATCGCGGGA
GGGACAGGCATCACCCCGATGCTGCAGGTGATCCGCGCCATCATGAAGGACCC
TGATGACCACACTGTGTGCCACCTGCTCTTTGCCAACCAGACCGAGAAGGACA
TCCTGCTGCGACCTGAGCTGGAGGAACCTCAGGAACAAACATTCTGCACGCTTC
AAGCTCTGGTACACGCTGGACAGAGCCCCTGAAGCCTGGGACTACGGCCAGG
GCTTCGTGAATGAGGAGATGATCCGGGACCACCTTCCACCCCAGAGGAGGAG
CCGCTGGTGCTGATGTGTGGCCCCCACCCATGATCCAGTACGCCTGCCTTCCC
AACCTGGACCACGTGGGCCACCCACGGAGCGCTGCTTCGTCTTC
```

Obr. 16 Nukleotidová sekvence CYB5R3 - zeleně zvýrazněn tzv. His-tag, tedy afinitní kotva využívaná pro izolaci na chelatačním nosiči, od červeně vyznačeného ATG (L-methionin) začíná CYB5R3

```
1MGSS HHHHHHSSGLVPRGSH MKLFQRSTPAITLESPIKYPLRLIDREIISHDTRRF
RFALPSPQHILGLPVGQHIYLSARIDGNLVVRPYTPISSDDDKGFVDLVIKVFYFKDT
HPKFPAGGKMSQYLESMQIGDTIEFRGPSGLLVYQGKGKFAIRPDKKSNPIIRTVKS
VGMIAGGTGITPMLQVIRAIMKDPDDHTVCHLLFANQTEKDILLRPELEELRNKHS
ARFKLWYTLDRAPEAWDYGQGFVNEEMIRDHLPPPEEPLVLMCGPPPMIQYACL
PNLDHVGHPTECFVF298
```

Obr. 17 Aminokyselinová sekvence CYB5R3 - zeleně zvýrazněn tzv. His-tag, který se používá pro zachycení proteinu na chelatačním nosiči, sekvence CYB5R3 začíná od červeně vyznačeného L-methioninu

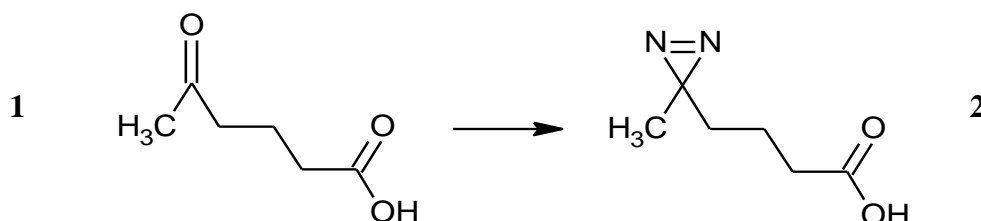


Obr. 18 Mapa plasmidu pET28 – modře vyznačeny místa pro restriční endonukleasy, oranžově kanamycinová resistance, růžově gen pro CYB5R3

3.3 Metody

3.3.1 Organická syntéza

3.3.1.1 Syntéza diazirinové skupiny



Syntéza byla provedena podle modifikovaného protokolu⁶⁸. Do 1l Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 8 g kyseliny 4-acetylbutanové jako výchozí látky. Tato látka byla rozpuštěna asi ve 450 ml methanolu a bylo přidáno asi 100 ml kapalného amoniaku. Směs byla chlazená v suchém ledu a míchána přibližně 1 hodinu. Poté bylo do směsi přidáno 12 g kyseliny hydroxylamin-O-sulfonové během 1 hodiny asi v 10 dávkách. Ve směsi se začala vytvářet sraženina síranu amonného. Směs byla míchána při pokojové teplotě asi 18 hodin, aby se odpařil přebytečný amoniak.

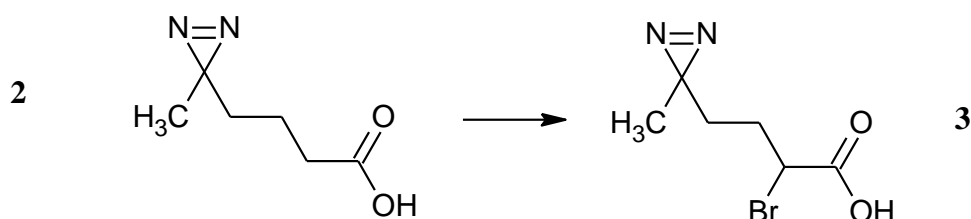
Následujícího dne byla suspenze zfiltrována přes filtrační papír (odstranění síranu amonného) do 1l varné baňky a několikrát promyta methanolem. Rozpouštědlo a přebytečný amoniak byly odpařeny na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4002). Odparek byl rozpuštěn ve 30 ml methanolu a ochlazen na 5°C na ledu. Poté bylo přidáno přibližně 12 ml triethylaminu a směs byla míchána 15 minut při pokojové teplotě. Rozpouštědlo bylo znovu odpařeno na vakuové odparce. Pokud by byl nadále přítomen amoniak, mohl by v následujícím kroku vznikat nebezpečný jododusík. Odparek byl rozpuštěn v 300 ml metanolu a ochlazen na 5°C na ledu. Do směsi bylo přidáno 60 ml triethylaminu. Následně bylo do směsi přidáváno asi 20 g jódu rychlostí 1 g/min do zabarvení směsi do červena. Směs byla asi po 40 minutách míchání zakoncentrována na vakuové odparce.

Směs byla dále extrahována v 500ml dělicí nálevce 100 ml CH₂Cl₂ a 50 ml 3% Na₂CO₃. Organická fáze byla znovu extrahována 2 x 50 ml 3% Na₂CO₃. Kombinované

vodné fáze byly extrahovány 2 x 50 ml CH₂Cl₂, a poté byly na ledu okyseleny přidáním HCl na pH < 2 a ihned extrahovány 3 x 50 ml CH₂Cl₂. Kombinovaná organická fáze byla pak promyta 100 ml vody a poté ještě 100 ml 20% NaCl. Do organické fáze byl pak přidán bezvodý MgSO₄ jako sušidlo. Směs byla ponechána sušit přes noc.

Tento olej byl extrahován v 50 ml diethyletheru a 25 ml 3% Na₂CO₃. Organická fáze byla extrahována 2 x 25 ml 3% Na₂CO₃. Kombinovaná vodná fáze byla extrahována 2 x 25 ml diethyletheru. Vodná fáze byla okyselena HCl na ledu na pH < 2 a extrahována 3 x 25 ml CH₂Cl₂. Kombinovaná organická fáze byla promyta 50 ml vody a 50 ml 20% NaCl. Do směsi byl přidán bezvodý MgSO₄ jako sušidlo. Sušení probíhalo přes noc. Poté byl produkt zfiltrován přes filtrační papír a odpařen. Bylo odebráno 20 µl do skleněné vialky jako vzorek na hmotnostní spektrometrii.

3.3.1.2 Syntéza bromderivátu s diazirinovou skupinou

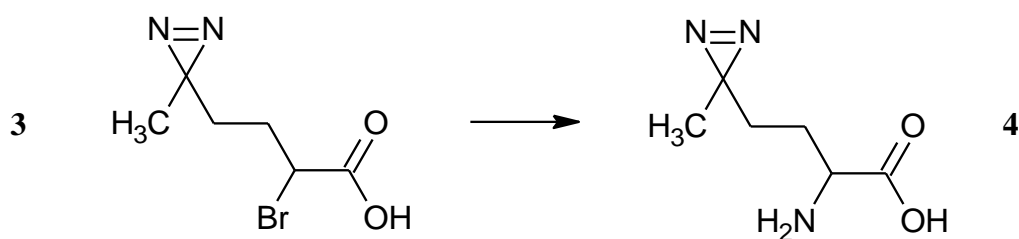


Zhruba 1 g syntetizovaného meziprojektu (**2**) bylo rozpuštěno ve 2 ml CCl₄ a přeneseno do kulaté 50ml baňky, na kterou byl připojen zpětný chladič se sušidlem. Do reakční směsi bylo přidáno 5 ml thionyl chlorid. Směs byla míchána při teplotě 65°C asi 30 minut a poté byla zchlazena na teplotu místnosti.

Následně bylo přidáno 4 g N-bromsukcinimidu, 10 ml CCl₄ a nakonec zhruba 2 kapky 48% vodného roztoku HBr. Směs byla míchána při teplotě 70°C asi 10 minut. Tím došlo k vytvoření červeno oranžové suspenze. Poté byla zvýšena teplota na 80°C a směs byla míchána další 1,5 hodiny. Směs byla přenesena do 100ml kulaté baňky a odpařena na vakuové odparce. Vzniklá suspenze byla zfiltrována přes filtrační papír a filtrát byl několikrát promyt CCl₄ a poté znovu odpařen na vakuové odparce. Byl získán hnědý olej, do kterého bylo přidáno 30 ml acetonu, a tato směs byla zchlazena na asi 10°C. Do směsi

bylo přidáváno po kapkách 40 ml 1 M NaHCO₃ po dobu 45 minut. Ta byla následně okyselena na ledu přidáním HCl na pH < 2. Vodná fáze byla extrahována 3 x 15 ml CH₂Cl₂ a kombinované organické fáze byly umyty 50 ml vody a 50 ml 20% NaCl. Do organické fáze byl přidán bezvodý MgSO₄ jako sušidlo. Poté byl produkt zfiltrován a odpařen. Bylo odebráno 20 µl do skleněné vialky jako vzorek na hmotnostní spektrometrii.

3.3.1.3 Syntéza aminokyseliny s diazirinovou skupinou



Asi 200 mg bromovaného meziproductu (**3**) bylo rozpuštěno asi v 10 ml metanolu syceného amoniakem (sycení probíhalo v suchém ledu) a přeneseno do plastové uzavíratelné lahvičky. Do směsi bylo na ledu přidáno 2 ml 29 % vodného roztoku NH₄OH. Lahvička byla umístěna do vodní lázně o teplotě 55°C na 5 dní. Po této době byla směs zchlazena na 5°C a lahvička byla ponechána otevřená do druhého dne, aby vyprchal přebytečný amoniak. Následně byla směs převedena do varné baňky a odpařena na vakuové odparce.

3.3.1.4 Spektrofotometrické stanovení diazirinové skupiny

Důkaz o přítomnosti diazirinové skupiny v organické molekule lze provádět spektrofotometricky, jako maximum okolo 360 nm. Po následné fotolýze a odštěpení diazirinové skupiny dochází k výraznému poklesu tohoto maxima.

Vzorek syntetizovaného diazirinového derivátu (**2**) byl ve skleněné kyvetě naředěn methanolem v poměru 1 : 1999 (2000x) a změřen na spektrofotometru (Cary 60). Jako slepý vzorek byl použit čistý methanol. Kyveta byla přenesena do fotolyzátoru, kde byl vzorek fotolyzován (254 nm) po dobu 10 s a poté znovu změřen. Vzorek byl ještě několikrát fotolyzován. Nejprve 20 s, 30 s a naposledy 1 minutu. Po každé fotolýze bylo proměřeno spektrum.

Pozn.: Veškeré vzorky získané při organické syntéze byly analyzovány na hmotnostním spektrometru RNDr. Martinem Štíchou (PřF UK).

3.3.2 Příprava kompetentních buněk

Roztoky a media použité při expresi

LB medium (1 l): 10 g tryptonu, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, sterilizováno v autoklávu

5X M9 soli (1 l): 85,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 2,5 g NaCl, 5 g NH_4Cl , rozděleno po 200 ml a sterilizováno v autoklávu

M9 minimální medium (1 l): 200 ml 5X M9 solí, 2 ml 1M MgSO_4 , 20 ml 20% glukosy, 0,1 ml 1M CaCl_2 , doplněno do 1 l sterilní H_2O , použité roztoky byly filtrovány přes 0,22 μm filtr

Pro přípravu kompetentních buněk byl použit postup, využívající chloridu vápenatého. Ze zmražených buněk *E.coli* B834 (DE3) bylo špachtlí odškrábnuto do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml sterilního LB media bez selekčního antibiotika. Buňky byly ponechány růst za třepání (Multitron Pro) při 37°C do optické denzity $\text{OD}_{600} = 0,4$. Poté byly buňky přeneseny do dvou 50 ml polypropylenových zkumavek (Falcon) a ponechány 10 minut v ledové tříšti. Po následné centrifugaci (Allegra X-22R, rotor SX4250, 10 minut, 3000g a 4°C) byl odlit supernatant a zkumavky nechány stát v obrácené poloze, aby se odstranily zbytky media. Každá peleta byla resuspendována ve 30 ml 100 mM CaCl_2 předem vychlazeného na 0°C. Buňky byly resuspendovány vychlazenou špičkou a ponechány na ledu dalších 5 minut. Po opětovné centrifugaci při stejných podmínkách, odlití supernatantu a stání v obrácené poloze, byla každá peleta resuspendována ve 2 ml 100 mM CaCl_2 a buňky byly ponechány asi 20 minut na ledu. Do každé zkumavky byly přidány 2 ml 50% glycerolu a 200 μl alikvoty byly přeneseny do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf a uloženy do -80°C.

3.3.3 Příprava M9 minimálních agarových ploten

Pro přípravu ploten bylo namícháno 500 ml M9 minimálního agaru. 250 ml sterilního agaru rozeřátého v mikrovlnné troubě a následně zchlazeného na zhruba 50°C bylo asepticky smícháno se 100 ml 5X M9 solí, 10 ml 20 % glukosy, 1 ml 1M MgSO₄ a 0,5 ml 100 mM CaCl₂. Směs byla doplněna do 500 ml sterilní destilovanou vodou. Požadované množství bylo pak odlito do zkumavky Falcon. Do agaru byl přidán L-methionin a antibiotikum kanamycin obojí do požadované koncentrace 50 µg/ml. Celá směs byla promíchána a nalita na plastové Petriho misky zhruba v objemu 15 ml a ponechána zatuhnout.

3.3.4 Transformace kompetentních *E.coli* teplotním šokem

Zmražené alikvoty (200 µl) kompetentních *E.coli* B834 (DE3) a příslušné vektory byly vyjmuty z -80°C a ponechány rozmraznout na ledu. Buňky byly rozděleny do dvou sterilních mikrozkuvek Eppendorf po 100 µl. Do každé mikrozkuvky bylo přidáno 0,5 µl plasmidové DNA. Směs byla jemně promíchána a ponechána stát na ledu 30 minut. Poté byly mikrozkuvky vloženy do 42°C na 45 s a znovu na led na 2-3 minuty. Do obou mikrozkuvek bylo přidáno 700 µl sterilního LB media a buňky byly třepány (G24 Environmental Incubator Shaker) 1 hodinu při 37°C a 180 RPM. Tato směs byla přenesena na M9 minimální agarové plotny a rozetřena mikrobiologickou hokejkou a nechána inkubovat v obrácené poloze při 37°C přes noc (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator).

3.3.5 Přeočkování bakteriálních buněk *E.coli* metodou „single cell“

Z M9 minimálních agarových ploten po transformaci a po inkubaci přes noc („over night“ O/N) v inkubátoru byla pomocí pinzety a párátko vypíchnuta jedna kolonie bakterií. Párátka bylo přeneseno do zkumavky Falcon s 10 ml M9 minimálního media (200 ml 5X M9 solí, 20 ml 20% glukosy, 2 ml 1M MgSO₄, 1 ml 100 mM CaCl₂, doplněno vodou na objem 1 l) s kanamycinem a L-methioninem (obojí 50 µg/ml). Takto byly připraveny vždy 2 kultury nesoucí stejný vektor. Do kontrolní O/N kultury nebyl přidán L-methionin pro ověření auxotrofního kmenu. O/N kultury byly ponechány růst s pootevřenými víčky

(zajištěné lepicí páskou) při 37°C přes noc (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator). O/N kultura byla následně použita pro expresi.

3.3.6 Expresie rekombinantních proteinů s inkorporovaným L-methioninem (d₃)

Pro ověření inkorporace odlišného typu aminokyseliny methioninu byl při kontrolní expresi použit L-methionin nesoucí na koncové methylové skupině 3 atomy deuteria (²H) dále jen d₃ L-methionin. Posun molekulové hmotnosti je pak lépe vidět ve hmotnostním spektru. Byl použit modifikovaný expresní protokol⁶⁹.

Do 1 l Erlenmeyerovy baňky s 200 ml M9 minimálního media, do kterého byly přidány riboflavin (1 µg/ml) a kanamycin s L-methioninem (obojí 50 µg/ml), bylo pipetováno 2 ml O/N kultury. Bakteriální kultury byly ponechány růst za třepání (Multitron Pro) při teplotě 37°C a při 220 RPM do optické denzity OD₆₀₀ = 0,8 – 1,0. Po následné centrifugaci (Allegra X-22R, rotor SX4250 při 3000g, 10 minut, 4°C) byly sedimentované buňky resuspendovány ve 200 ml M9 minimálního media s riboflavinem (1 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml) ovšem bez přidaného L-methioninu. Buňky takto „hladověly“ zhruba 7 hodin. Po této době byl k buňkám přidán d₃ L-methionin (50 µg/ml), teplota byla snížena na 30°C a rychlost třepání na 180 RPM. Po osmé hodině byla expresie proteinů indukována přidáním IPTG do finální koncentrace 0,5 mM. Ještě před zahájením indukce byl odebrán 1 ml buněk do mikrozkušavky jako vzorek pro ověření na elektroforéze. Produkce trvala dalších 10 hodin. Následně byl znovu odebrán 1 ml vzorku na elektroforézu.

Vzorky na elektroforézu byly centrifugovány 1 minutu při 10 000 RPM (Centrifuge 5415 R). Po odlití supernatantu byla peleta resuspendována ve 100 µl vody. Vzorky byly naředěny 3:1 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem (0,25 M Tris/Cl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkapt ethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8). Takto připravené vzorky byly uchovávány v -20°C.

3.3.7 **Expresse rekombinantních proteinů s inkorporovaným L-foto-methioninem**

Optimalizace exprese s inkorporovaným L-foto-methioninem byla provedena v 250ml Erlenmeyerových baňkách s 50 ml M9 limitního media. Vzorčky na elektroforézu byly odebírány během produkce v 1, 2, 4, 6, 8 a v 10 hodinách aby byla zjištěna časová závislost inkorporace L-foto-methioninu do exprimovaných proteinů.

Do 1 l Erlenmeyerovy baňky s 200 ml M9 minimálního media, do kterého byly přidány riboflavin (1 $\mu\text{g/ml}$) a kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$) s L-methioninem (50 $\mu\text{g/ml}$), bylo pipetováno 2 ml O/N kultury. Bakteriální kultury byly ponechány růst za třepání (Multitron Pro) při teplotě 37°C a při 220 RPM do optické denzity $\text{OD}_{600} = 0,8 - 1,0$. Po následné centrifugaci (Allegra X-22R, rotor SX4250 při 3000g, 10 minut, 4°C) byly kultury resuspendovány ve 200 ml M9 minimálního media s riboflavinem (1 $\mu\text{g/ml}$) a kanamycinem (30 $\mu\text{g/ml}$). Buňky takto „hladověly“ zhruba 7 hodin. Po této době byl k buňkám přidán L-foto-methionin (50 $\mu\text{g/ml}$), teplota byla snížena na 30°C a rychlost třepání na 180 RPM. Po osmé hodině byla exprese proteinů indukována přidáním IPTG do finální koncentrace 0,5 mM. Před zahájením indukce byl odebrán vzorek buněk (0,5 ml) do mikrozkušavky na elektroforézu. Produkce trvala dalších 10 hodin. Následně byl odebrán další vzorek buněk (0,5 ml) na elektroforézu. Vzorčky na elektroforézu byly připravovány stejně jako v předchozím případě s d_3 -L-methioninem.

3.3.8 **Izolace NADH:cytochrom b_5 reduktasy**

Pufry použité při izolaci

Pufir EQI: 100 mM KH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 6,8

Pufir WASH: 100 mM KH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH 6,8

Pufir ELUTE: 100 mM KH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 6,8

Pufir DIA: 100 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 6,8

Izolace CYB5R3 byla provedena dle protokolu navrženého Mgr. Janem Milichovským⁷⁰.

Po 10-ti hodinové expresi CYB5R3 byly buňky centrifugovány (Allegra X-22R, rotor SX4250 při 3000g, 10 minut, 4°C) ve dvou plastových 250ml kyvetách. Po odlití supernatantu byly obě pelety resuspendovány v 20 ml pufru EQI (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 6,8) a přeneseny do jedné zkumavky Falcon (50 ml). Do této směsi byl přidán lysozym do koncentrace 0,1 mg/ml. Směs byla za občasného promíchání (asi každých 5 minut) nechána 30 minut stát na ledu. Po této době bylo do směsi přidáno PMSF v methanolu (výsledná koncentrace 1 mM) jako inhibitor proteas. Při druhém pokusu byla použita směs inhibitorů v tabletě (cOmplete™ Ultra Tablets, EDTA free). Buňky byly homogenizovány na ledu tyčovým sonikátorem (SONOPULS HD 3100, sonda K76) v 8 cyklech po 40 s při výkonu 45 W. Po sonikaci byla směs centrifugována ve zkumavkách OakRidge (Allegra X-22R, rotor F0630, 20 minut při 20 000 g a 4°C). Směs může být také separována ultracentrifugací (Optima™ LE-80K, rotor Ti 70, 60 minut při 35 000 RPM a 4°C). Supernatant byl dále zpracován pomocí chelatační chromatografie.

3.3.9 Chromatografie na nosiči Ni-IDA

Zhruba 10 ml afinitního nosiče Ni-IDA bylo přeneseno do skleněné kolony (3 cm x 4 cm). Nosič byl před použitím promyt nejméně 50 ml destilované vody a poté byl „nabit“ 20 ml roztoku 200 mM NiSO₄. Dále byl nosič promyt destilovanou vodou a poté asi 50 ml pufru (20 mM octan sodný, 500 mM NaCl, pH 4) k odstranění přebytečných Ni²⁺ a znovu 50 ml vody. Nakonec byl nosič ekvilibrován 50 ml pufru EQI (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 6,8). Na kolonu byl nanesen supernatant (po centrifugaci) rychlostí 0,5 ml/min. Po nanesení supernatantu byl nosič promyt 50 ml WASH pufru (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH 6,8). Protein byl eluován puftrem ELUTE (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 6,8) a byl jímán do zkumavky Falcon. Poté byl zahuštěn v centrifugačních zkumavkách (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Ultracel-10 membrane) na objem asi 500 µl a následně přečištěn gelovou chromatografií.

Nosič byl poté vyčištěn 1 M NaOH, Ni²⁺ ionty byly vyvázány pomocí EDTA, promyt vodou a uskladněn v 20 % ethanolu.

3.3.10 Chromatografie na nosiči Ni-NTA

Při druhé izolaci CYB5R3 byl místo nosiče Ni-IDA použit přednalitý nosič Ni-NTA (5 ml) zapojený do systému FPLC (ÄKTAprime plus). Výhodou tohoto zapojení je možnost sledování průběhu chromatografie pomocí detektoru při vlnové délce 280 nm. Všechny pufry použité při této izolaci byly předem zfiltrány přes filtr ExpressTM PLUS 0,22 µm (Millipore). Nejprve byla kolona ekvilibrována pufrem EQI (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 6,8) rychlostí 2 ml/min. Poté byl nanesen supernatant z izolace přefiltrovaný injekční stříkačkou přes 0,22 µm filtr. Kolona byla nadále promývána pufrem EQI do poklesu signálu detektoru při 280 nm. Následně byla kolona promyta pufrem WASH (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol, pH 6,8). Protein byl eluován pufrem ELUTE (100 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 6,8) a zahuštěn v centrifugačních zkumavkách (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Ultracel-10 membrane) na objem 1 ml.

3.3.11 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie, na které dochází k dělení proteinů na základě jejich tvaru a velikosti, byla prováděna pomocí FPLC (fast protein liquid chromatography) systému (ÄKTAprime plus) na koloně SuperdexTM 200 10/300 GL. Kolona byla nejprve připojena k FPLC systému a následně ekvilibrována pufrem DIA (100 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 6,8) při průtoku 0,5 ml/min. Nejprve bylo na kolonu jako standard nanášeno 100 µl standardu CYB5R3 izolované Mgr. Janem Milichovským. Separace probíhala 45 minut a její průběh jsme sledovali pomocí detektoru při 280 nm. Po zjištění retenčního času bylo na kolonu nanášeno 500 µl fotoaktivovatelné CYB5R3. V oblasti retenčního času byly odebírány frakce po 0,5 ml, které byly následně analyzovány elektroforézou (SDS – PAGE).

3.3.12 Stanovení koncentrace NADH:cytochrom b₅ reduktasy

Pro stanovení koncentrace CYB5R3 může být použito UV-VIS spektroskopie, kdy se využívá absorbujícího flavinu FAD, který má maximum při 460 nm, a známého extinkčního koeficientu 10,2 mM⁻¹cm⁻¹. Nebo lze využít absorpce proteinu při 280 nm. Pro toto stanovení byl programem ProtParam⁷¹ predikován extinkční koeficient 24 410 M⁻¹cm⁻¹ a molekulová hmotnost 33 792 Da. Obojí stanovení bylo provedeno na spektrofotometru DS-11, který je schopný měřit v kapce vzorku. Nejprve bylo napipetováno 2 μl slepého vzorku (pufr nebo voda) a po očištění prostoru bylo napipetováno 2 μl vzorku.

3.3.13 Stanovení aktivity NADH:cytochrom b₅ reduktasy

Aktivita CYB5R3 lze stanovit vůči cytochromu b₅. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky (Cary 60) ve skleněné kyvetě. Do kyvety bylo napipetováno 965 μl pufru (10 mM KH₂PO₄, pH 7,4), dále 20 μl solubilního cytochromu b₅ (2 μmol/l) a 5 μl ředěné CYB5R3. Nakonec bylo do kyvety přidáno 10 μl 10 mM NADH. Byla měřena změna absorbance v čase při vlnové délce 424 nm. Molární extinkční koeficient je 124 mM⁻¹cm⁻¹. Registrovaná závislost musí být alespoň 1 minutu lineární. Pokud není, je třeba použít vyššího ředění CYB5R3. Jako standard byla použita CYB5R3 izolovaná Mgr. Janem Milichovským. Ze stejného zdroje byl získán i solubilní cytochrom b₅.

$$aktivita = \frac{\Delta A_{424} \times \text{\textit{ředění}}}{\varepsilon \times (0,005 \times c)} * 100 \quad [\mu\text{mol red. b}_5/\text{pmol CYB5R3}]$$

3.3.14 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (SDS – PAGE), je běžně používaná metoda pro separaci proteinů na základě jejich molekulových hmotností. V přítomnosti SDS proteiny získávají uniformní náboj. Polyakrylamidový gel se připravuje radikálovou polymerací akrylamidu a bisakrylamidu. Jako katalyzátor polymerace se používá persíran amonný (APS). Kvůli stabilizaci radikálů vznikajících při této reakci se do směsi přidává činidlo TEMED (tetramethylethyldiamin). Samotná elektroforéza byla prováděna dle práce provedené Laemmlim⁷².

3.3.14.1 Příprava akrylamidového gelu

Tab. 2 Složení akrylamidových gelů

gel A (spodní, separační)

složení		8%	10%	12%	15%
H ₂ O	[ml]	2,3	1,9	1,6	1,1
30% acrylamid mix	[ml]	1,3	1,7	2	2,5
1.5 M Tris (pH 8,8)	[ml]	1,3	1,3	1,3	1,3
10% SDS	[μl]	50	50	50	50
10% APS	[μl]	50	50	50	50
TEMED	[μl]	3	2	2	2

gel B (vrchní, zaostřovací)

složení		4%
H ₂ O	[ml]	1,1
30% acrylamid mix	[μl]	267
1.5 M Tris (pH 6,8)	[μl]	250
10% SDS	[μl]	20
10% APS	[μl]	20
TEMED	[μl]	2

Akrylamid mix – 29% akrylamid + 1% bisakrylamid

Všechny uvedené gely byly připraveny podle rozpisu v tabulce 2. Skla na elektroforézu (1 mm, BIO – RAD) byla umyta a odmaštěna a sesazena k sobě v držáku. Do aparatury byl nejprve nalit spodní separační gel. Při ověřování CPR byl zvolen 8% nebo 10% separační gel a při ověřování CYB5R3 byl zvolen 12% nebo 15% gel. Ihned po nalití byl gel převrstven vodou. Po ztuhnutí (polymerování) gelu byla voda odlita a gel byl vysušen kouskem filtračního papíru. Na separační gel byl nanesen zaostřovací gel. U obou proteinů byl použit vždy 4% gel. Do polymeračního roztoku byl vložen hřeben (10 jamek, 1 mm), aby došlo k vytvoření prostoru pro vzorky. Skla s gely byly vyjmuty z držáku a vloženy do speciální aparatury aby došlo k vytvoření elektrodového prostoru, do kterého byl nalit elektrodový pufr (0,025 M Tris/Cl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3).

Aparatura byla vložena do elektroforetické vany také s nalitým elektrodo­vým pu­frem. Vzorky byly do jamek opatrně nanášeny mikrostríkačkou Hamilton. Do každé jamky bylo naneseno 20 µl vzorku.

Vzorky byly připravovány ředěním 3:1 se vzorkovým reduku­jícím pu­frem (0,25 M Tris/Cl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkapt­oethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8). Podle potřeby byly vzorky ještě předtím ředěny vodou. Takto připravené vzorky byly nejprve promíchány a povařeny ve vodní lázni zhruba 5 minut. Poté byly znovu promíchány a centrifugovány. Standard molekulových hmotností (BIO – RAD), který byl použit na elektroforézu a je skladovaný v -20°C, byl pouze rozmražen, promíchán, centrifugován a ihned nanesen v objemu asi 10 µl na elektroforézu. Jako standardy byly použity CPR a CYB5R3 izolované Mgr. Janem Milichovským.

Elektroforéza probíhala při napětí 200 V zhruba 90 minut, dokud nebylo dosaženo spodní hranice skel. Po skončení byl odlit horní elektrodo­vý pu­fr a skla byla opatrně oddělena od sebe. Zaostřovací gel byl odříznut a separační gel přenesen do barvící lázně (InstantBlue™) asi na 1 hodinu. Po nabarvení byl gel přenesen do vody k odbarvení. Pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie, bylo možno následně gel skladovat ve zkumavce Falcon (50 ml) v 1% kyselině octové.

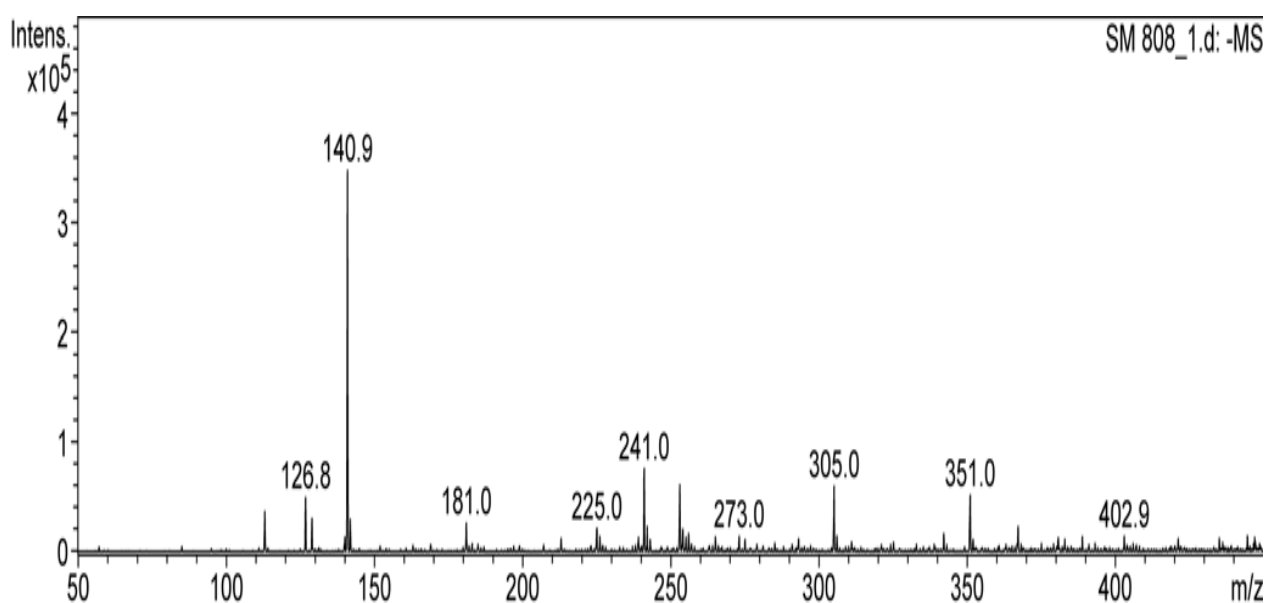
Pozn.: Analýzu všech vzorků z expresí a izolací proteinů na hmotnostním spektrometru prováděl RNDr. Tomáš Ječmen, PhD. (MBÚ AV ČR)

4 Výsledky

4.1 Syntéza L-foto-methioninu

4.1.1 Syntéza diazirinového derivátu (2)

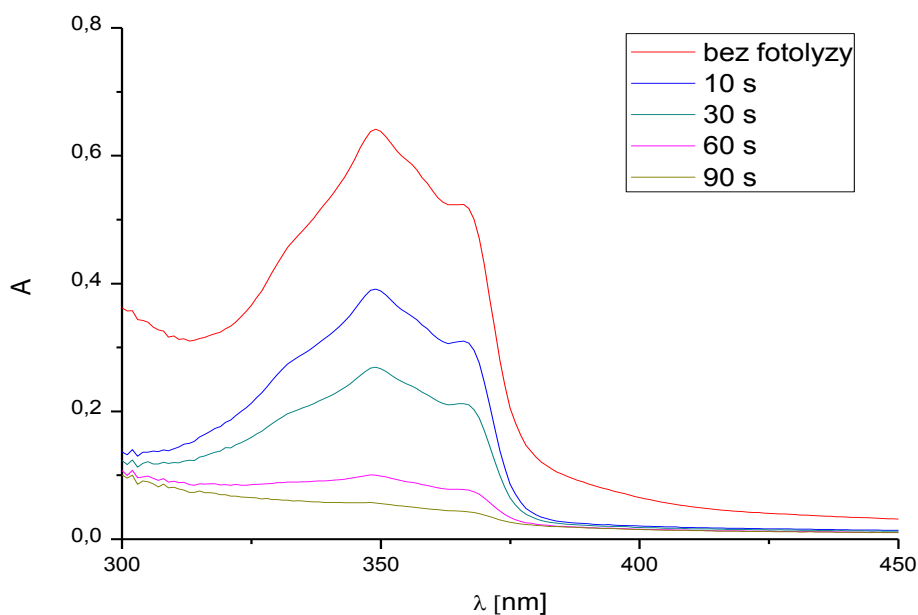
První krok zahrnoval konverzi oxo-skupiny kyseliny (1) na meziprodukt s diazirinovou skupinou (2). Výsledkem tohoto kroku byl zisk 1,53 g oranžového oleje. Vzorek syntézy byl ověřen na hmotnostním spektrometru RNDr. Martinem Štíchou.



Obr. 19 Hmotnostní spektrum reakční směsi (2) - vzorek byl měřen v negativním modu a pro ionizaci byla použita technika ESI (electrospray ionization)

Molekulová hmotnost meziproduktu (2) je **142,16**. Na obr. 19 v naměřeném spektru lze nalézt pík **140,9**. Vzhledem k použitému negativnímu modu (+1) je možno tento meziprodukt považovat za ověřený.

Přítomnost diazirinové skupiny byla ověřena také pomocí UV-VIS spektroskopie. Byla použita maskovaná křemenná semimikrokyveta s optickou dráhou 1 cm. Jako slepý roztok byl použit methanol, který byl použit i k ředění (2000x) vzorku. Vzhledem k postupnému poklesu pásu okolo 350 nm (obr. 20), došlo k rozštěpení diazirinového kruhu. Fotolýza při 254 nm ve fotolýzéro tím tuto skupinu prokázala.

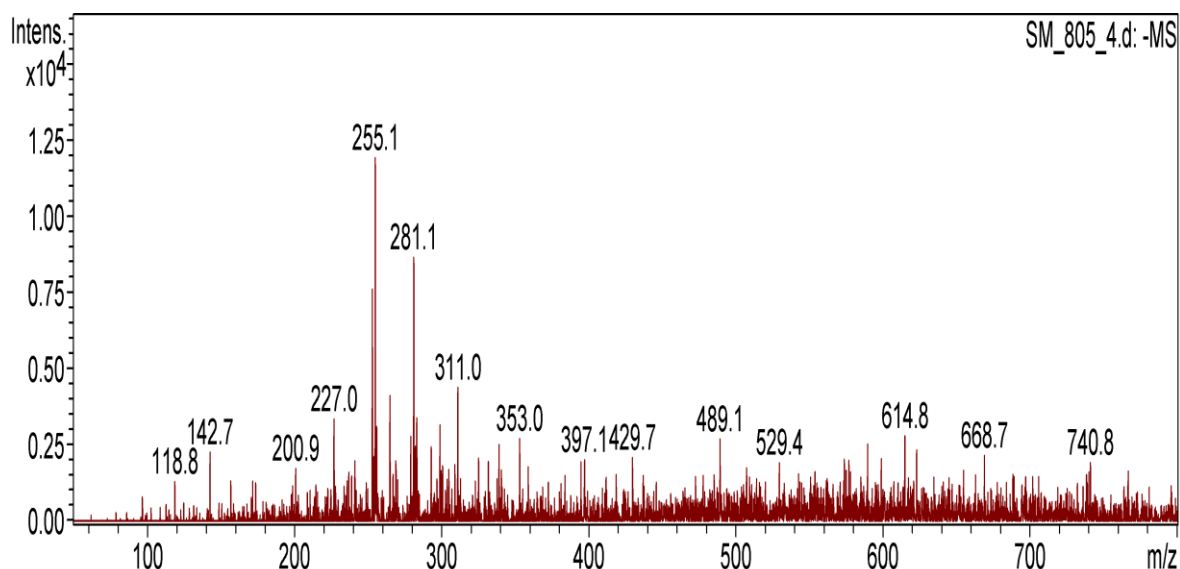


Obr. 20 UV-VIS spektrum meziprojektu (2) – jako slepý vzorek použit methanol, vzorek ředěn 2000x, použita maskovaná křemenná semimikrokyveta 1 cm

4.1.2 Syntéza bromderivátu (3)

Diazirinový meziprojekt (2) byl bez dalšího přečištění dále použit pro syntézu meziprojektu (3) bromovaného do polohy α pomocí N-bromsukcinimidu. Bylo získáno 493 mg hnědého oleje. Vzorek syntetizovaného meziprojektu (3) byl analyzován na hmotnostním spektrometru.

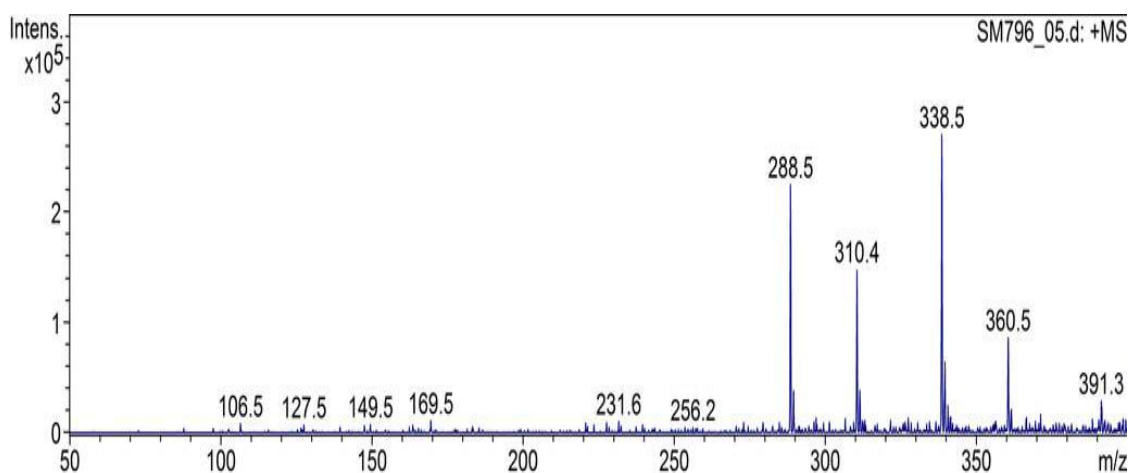
Molekulová hmotnost meziprojektu (3) je **221,05**. Ve hmotnostním spektru (obr. 21) nelze tento pík ani jeho modifikace nalézt. Nejbliže se nachází pík s hmotností **227,0**.



Obr. 21 Hmotnostní spektrum reakční směsi (3) - byl použit negativní mod a ionizační technika ESI.

4.1.3 Syntéza aminokyseliny s diazirinovou skupinou (4)

I přes nedostatečné potvrzení přítomnosti bromderivátu (3), byla provedena syntéza aminokyseliny (4) vznikající substitucí bromu za NH₂ skupinu. Bylo získáno 50 mg hnědé krystalické látky. Vzorek byl analyzován hmotnostním spektrometrem.

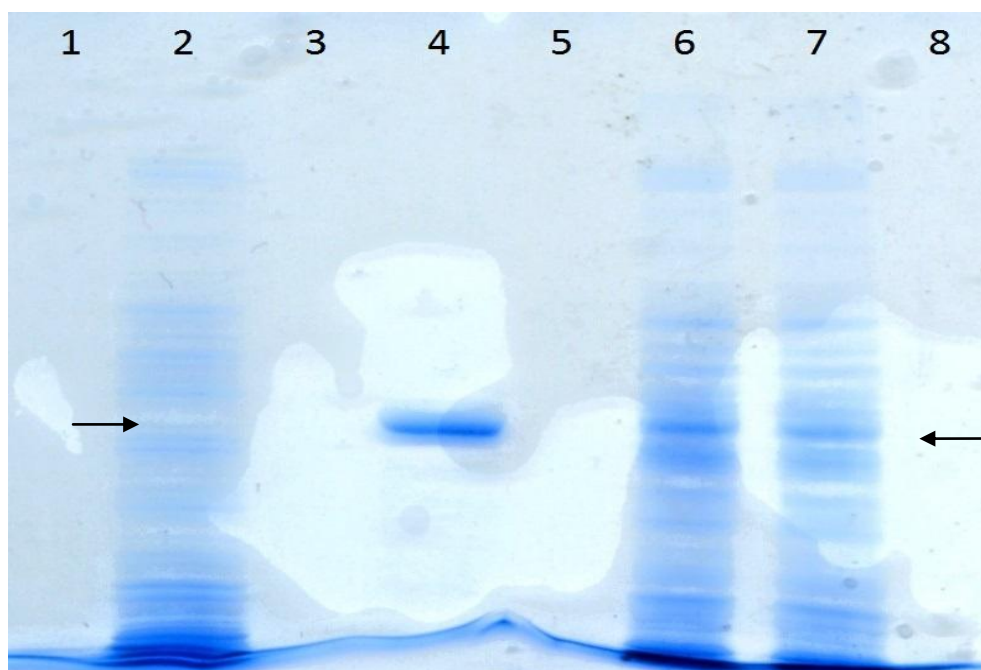


Obr. 22 Hmotnostní spektrum reakční směsi (4) - byl použit pozitivní mod a ionizace ESI

Molekulová hmotnost aminokyseliny s diazirinovou skupinou je **157,17**. Tento pík ani jeho modifikace nelze ve spektru (obr. 22) nalézt. Výrazné jsou tak pouze píky v pravé části spektra.

4.2 Exprese proteinů s d₃-L-methioninem

Jelikož je exprese s L-foto-methioninem velmi nákladná, byl pro ověření možnosti inkorporace použit deuterovaný d₃-L-methionin. Před indukcí a po 10 hodinové produkci byly odebrány vzorky na elektroforézu. Z elektroforézy (obr. 23 a 27) je patrné že exprese CPR i CYB5R3 proběhla. Z gelu byly vyříznuty pruhy se vzorky odebranými v 10 hodinách produkce odpovídající dle použitého standardu exprimovanému proteinu a ty podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru, kde byla ověřena jak aminokyselinová sekvence obou proteinů, tak i inkorporace d₃-L-methioninu. Hmotnostní spektra byla změřena technikou MALDI-TOF RNDr. Tomášem Ječmenem, PhD.

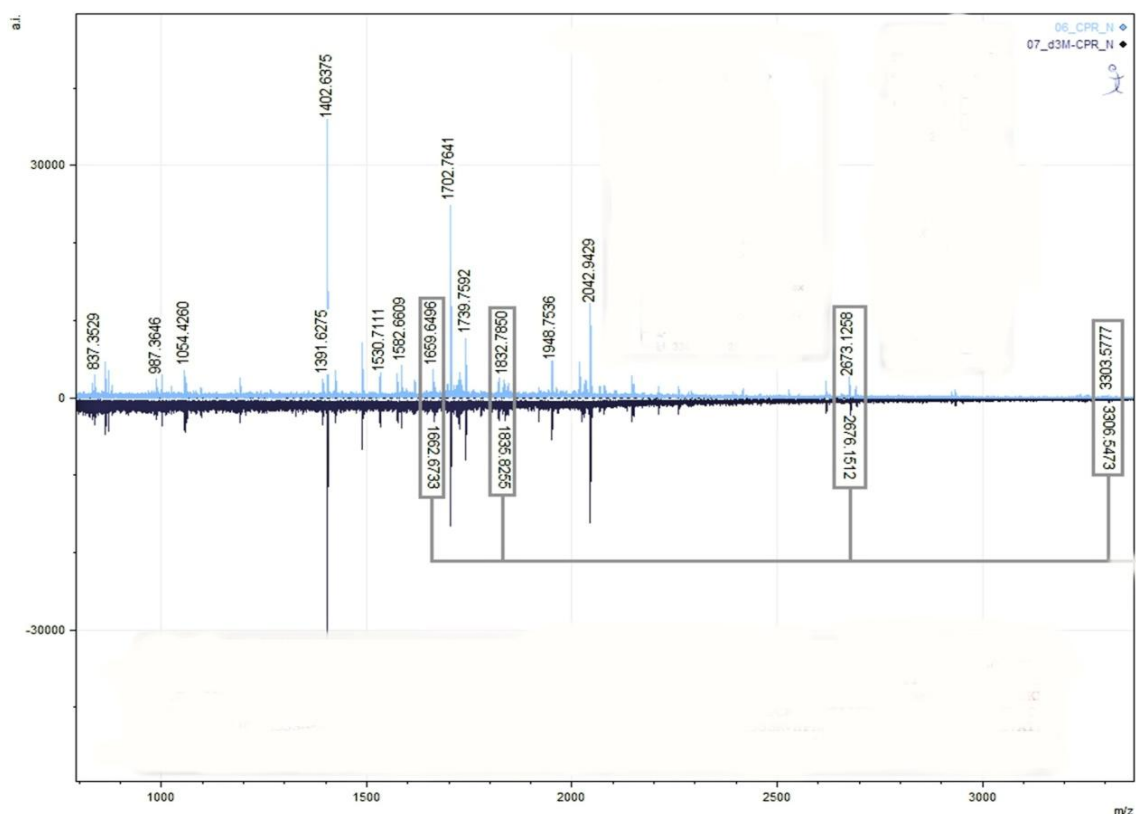


Obr. 23 Elektroforeogram CPR s d₃-L-methioninem – použit 8% gel, 2 - bakteriální suspenze odebraná před indukcí IPTG, 4 - standard CPR, 6,7 - bakteriální suspenze odebraná 10 h po indukcii, šipky znázorňují pozici exprimované CPR

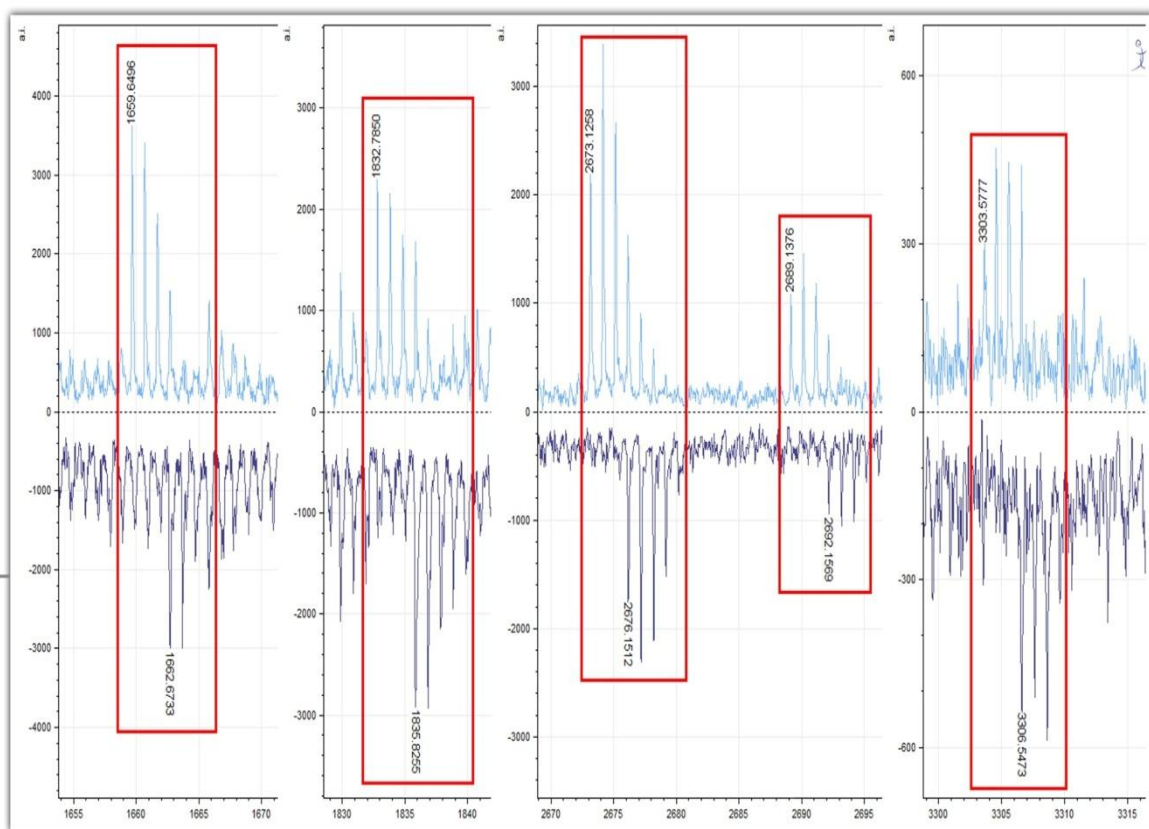
Na obrázku 23 lze zřetelně vidět, že před indukcí IPTG nebyla v bakterii přítomna CPR. Po deseti hodinách lze pozorovat exprimovanou CPR.

¹GIPGDPTNMGDSHEDTSATMPEAVAAEEVSLFSTTDMVLFSLIVGVLTYYWFIFRKK
 KEEIPEFSKIQTAPPVKESSFVEKMKKTGRNIIVFYGSQTGTAEFANRLSKDAHR
 YGMRGMSADPEEYDLADLSSLPEIDKSLVFCMATYGEGDPTDNAQDFYDWLQE
 TDVDLTGVKFAVFGLGNKTYEHFNAMGKYVDQRLEQLGAQRIFELGLGDDDGNL
 EEDFITWREQFWPAVCEFFGV¹EATGEESSIRQYELVVHEDMDVAKVYTGEMGRL
 KSYENQKPPFDAKNPFLAAVTANRKLNQGTERHLMHLELDISDSKIRYESGDHVA
 VYPANDSALVNQIGEILGADLDVIMSLNNLDEESNKKHPFPCPTTYRTALTYL²DI
 TNPPRTNVL³YELAQYASEPSEQEHLHKMASSSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQD
 YPSLRPPIDHLCCELLPRLQARYYSIASSSKVHPNSVHICAVAVEYEAKSGRVNKGV
 ATSWLRAKEPAGENGGRALVPMFVRKSQFRLPFKSTTPVIMVGPGTGIAPFMGFIQ
 ERAWLREQKEVGETLLYGCRRSDEDYLYREELARFHKDGALTQLNVAFSREQ
 AHKVYVQHLLKRDREHLWKLIEGGAHYVCGDARNMAKD⁴VQNTFYDIVAEFGP
 MEHTQAVDYVKKLMTKGRYSLDVWS⁶⁸⁶

Obr. 24 Sekvence CPR - CPR byla štěpená Asp-N; červenou barvou znázorněny peptidy, analyzované hmotnostní spektrometrií; pokrytí sekvence - 199/686 AMK z toho 3/19 Met

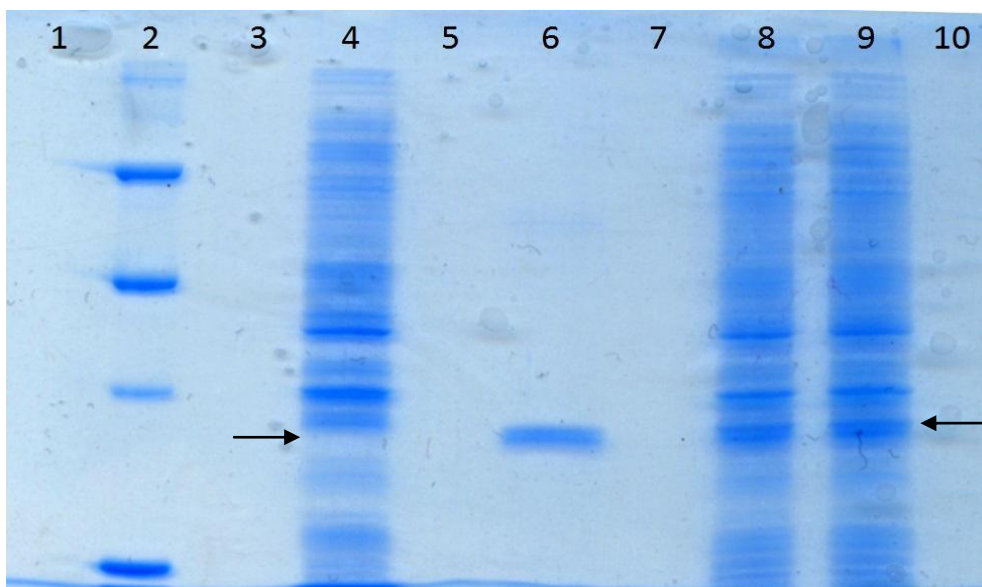


Obr. 25 Hmotnostní spektrum CPR – světle modrou je spektrum CPR, tmavě modrou je spektrum d₃-CPR, signály odpovídají Asp-N štěpům, orámované signály odpovídají peptidům s L-methioninem (horní část) respektive s d₃-L-methioninem (dolní část)



Obr. 26 Detail hmotnostního spektra CPR – zvýrazněné peptidy odpovídají orámovaným peptidům z předchozího spektra na obr. 25, v horní části (světle modrá) CPR neznačená, v dolní části (tmavě modrá) CPR s inkorporovaným d_3 -L-methioninem

Na obr. 25 a 26 lze vidět hmotnostní spektra jak neznačené CPR, tak i CPR s inkorporovaným d_3 -L-methioninem. Zejména v detailu na obr. 26 lze v dolní části spektra pozorovat viditelný posun molekulové hmotnosti peptidu o 3 Da u CPR s inkorporovaným d_3 -L-methioninem. Inkorporace d_3 -L-methioninu byla tak potvrzena.

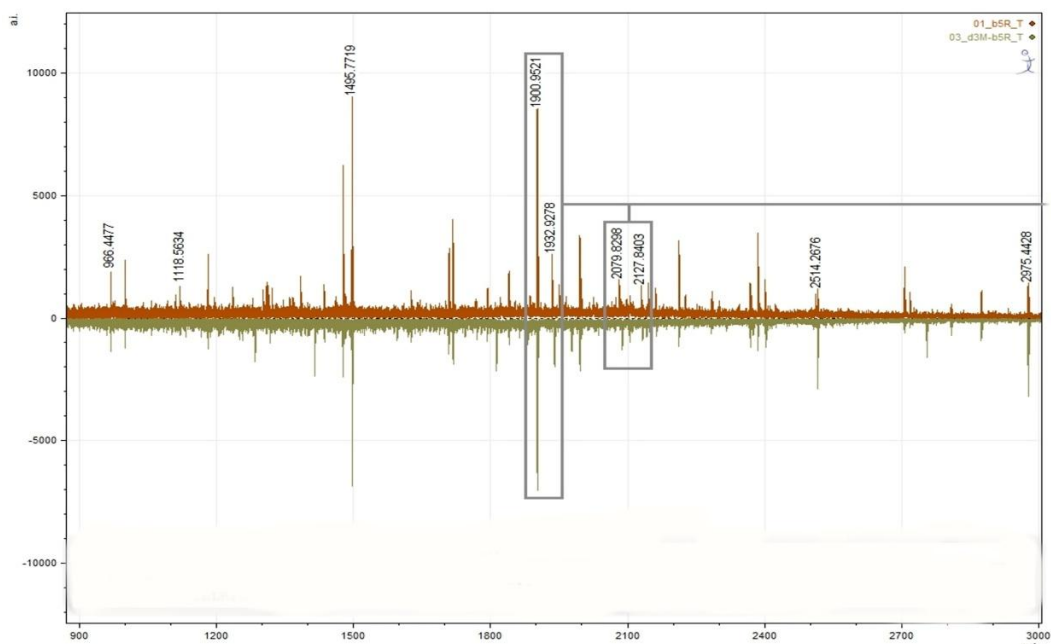


Obr. 27 Elektroforeogram CYB5R3 s d₃-L-methioninem – použit 12% gel, 2 - standard molekulových hmotností, 4 - bakteriální suspenze odebraná před indukcí IPTG, 6 - standard CYB5R3, 8,9 - bakteriální suspenze odebraná 10 h po indukcii, šipky znázorňují pozici exprimované CYB5R3

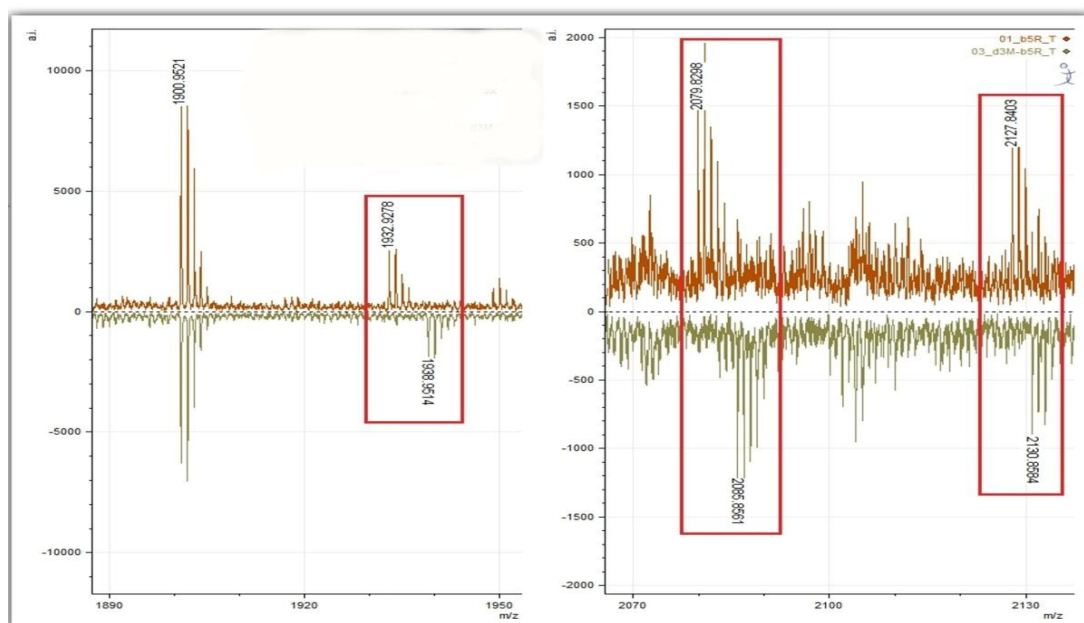
Na obr. 27 lze pozorovat, že před indukcí IPTG exprimovaný protein ve směsi není. V čase 10 h je zřetelný pruh v oblasti exprimovaného proteinu.

¹MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKLFQRSTPAITLES¹PDIKYPLRLIDREIISHDTRRF
 RFALPSPQHILGLPVGQHIYLSARIDGNLVVRPYTPISSDDDKGFVDLVIK²VYFKDT
 HPKFPAGGK³MSQYLESM⁴QIGDTIEFRGPSGLLVYQGKGKFAIRPDKKSNIIRTVKS
 VGM⁵IAGGTGITPML⁶QVIRAIMKDPDDHTVCHLLFANQTEKDILLRPELEELRNKHS
 ARFKLWYTLDRAPEAWDYGQGFVNEEM⁷IRDHLPPPEEEPLVLMCGPPPMIQYACL
 PNLDHVGHPTERCFVF²⁹⁸

Obr. 28 Sekvence CYB5R3 - CYB5R3 byla štěpená trypsinem; červenou barvou znázorněny peptidy, analyzované hmotnostní spektrometrií; pokrytí sekvence - 155/298 AMK z toho 5/10 Met



Obr. 29 Hmotnostní spektrum CYB5R3 – oranžovou barvou je spektrum neznačené CYB5R3, zelenou barvou je spektrum CYB5R3 s inkorporovaným d_3 -L-methioninem, označené signály patří peptidům vzniklých štěpením proteinu trypsinem, orámované peptidy obsahují L-methionin respektive d_3 -L-methionin

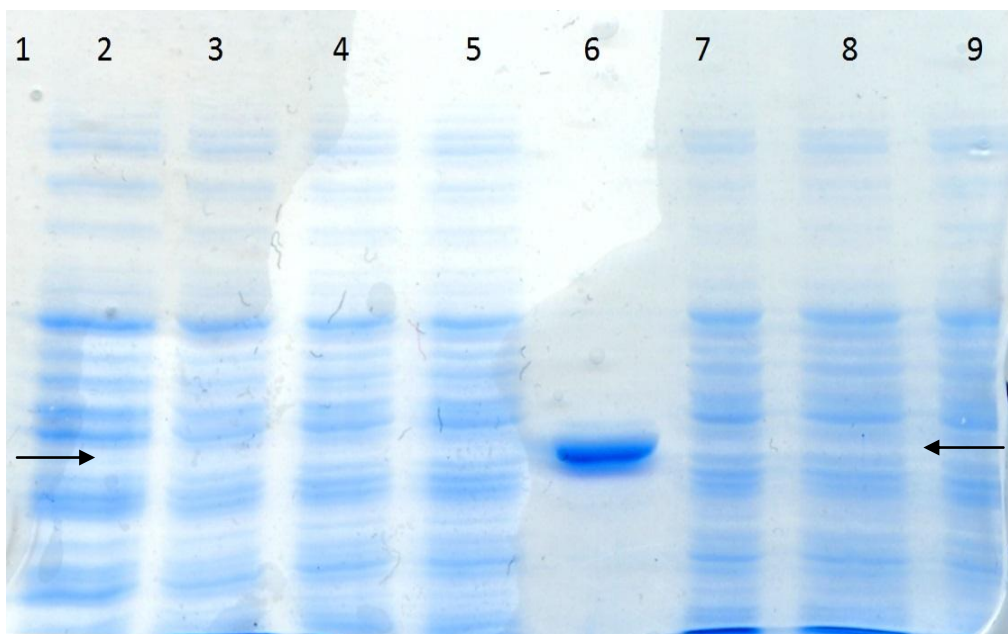


Obr. 30 Detailní spektrum CYB5R3 – detailní pohled na orámované peptidy obsahující L-methionin (horní část - oranžová) respektive d_3 -L-methionin (dolní část - zelená)

Z porovnání horní a dolní části spektra je patrné, že došlo k inkorporaci d_3 -L-methioninu do proteinu. Na obr. 30 lze v dolní části spektra pozorovat viditelný posun v molekulové hmotnosti o 3 resp. o 6 Da (podle počtu methioninů).

4.3 Expres proteinů s L-foto-methioninem

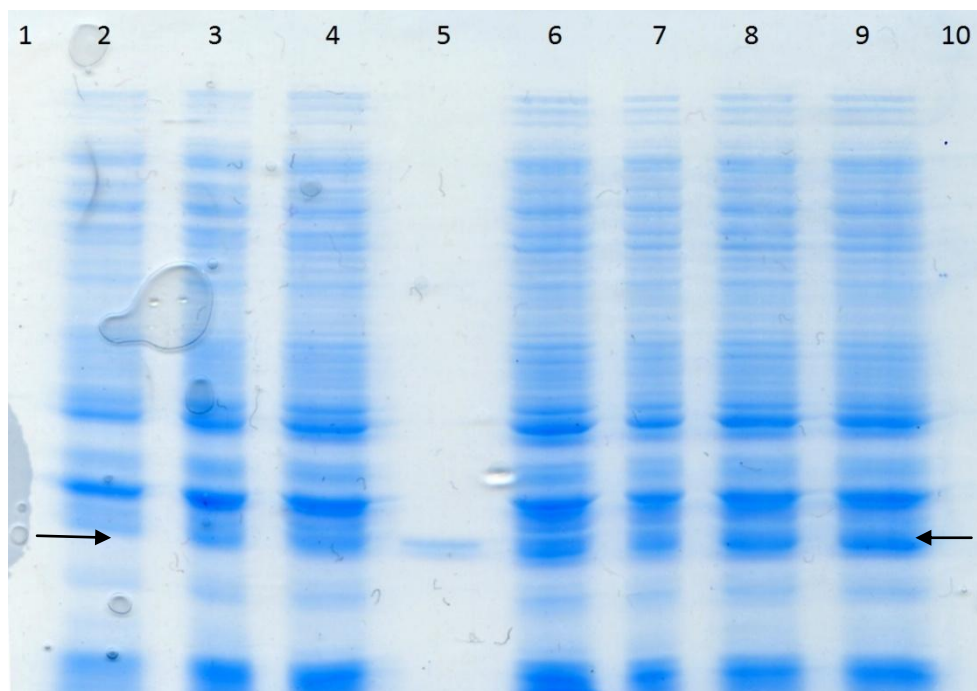
Expres proteinů (CPR a CYB5R3) s inkorporovaným L-foto-methioninem byla provedena za stejných podmínek jako expres s d_3 -L-methioninem. Před indukcí IPTG byl do M9 minimálního média přidán L-foto-methionin v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Nejprve byla provedena pokusná expres v 50 ml M9 minimálního media (250ml Erlenmeyerovy baňky) a byly odebírány vzorky bakteriální suspenze na elektroforézu po dvou hodinách. Konec exprese byl vždy po 10 hodinách.



Obr. 31 Elektroforeogram CPR s inkorporovaným L-foto-methioninem – použit 8% gel, 2 – 0 h, 3 – 1 h, 4 – 2 h, 5 – 4 h, 7 – 6 h, 8 – 8 h, 9 – 10 h po indukcí IPTG, 6 - standard CPR, šipky označují hypotetickou pozici exprimované CPR

Vzhledem k absenci exprimované CPR s inkorporovaným L-foto-methioninem (obr. 31), nebyla dále prováděna analýza na hmotnostním spektrometru ani expres ve větším množství M9 minimálního media.

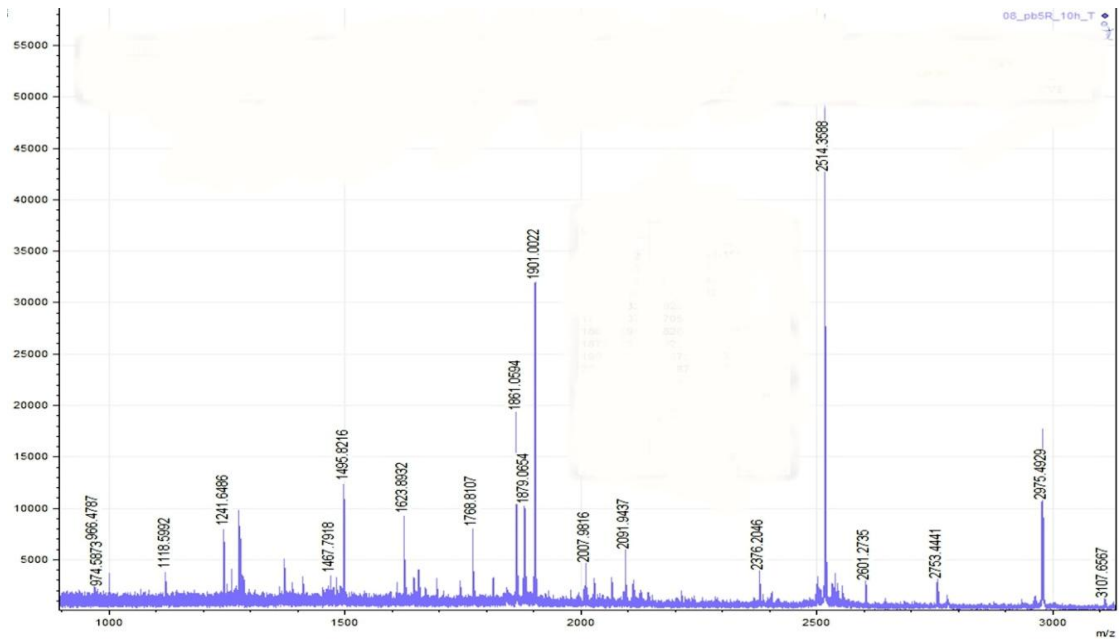
Na obr. 32 lze pozorovat rostoucí množství CYB5R3 v čase. Zóna s předpokládaným proteinem byla v čase 10 hodin vyříznuta z gelu a analyzována na hmotnostním spektrometru metodou MALDI-TOF RNDr. Tomášem Ječmenem PhD.



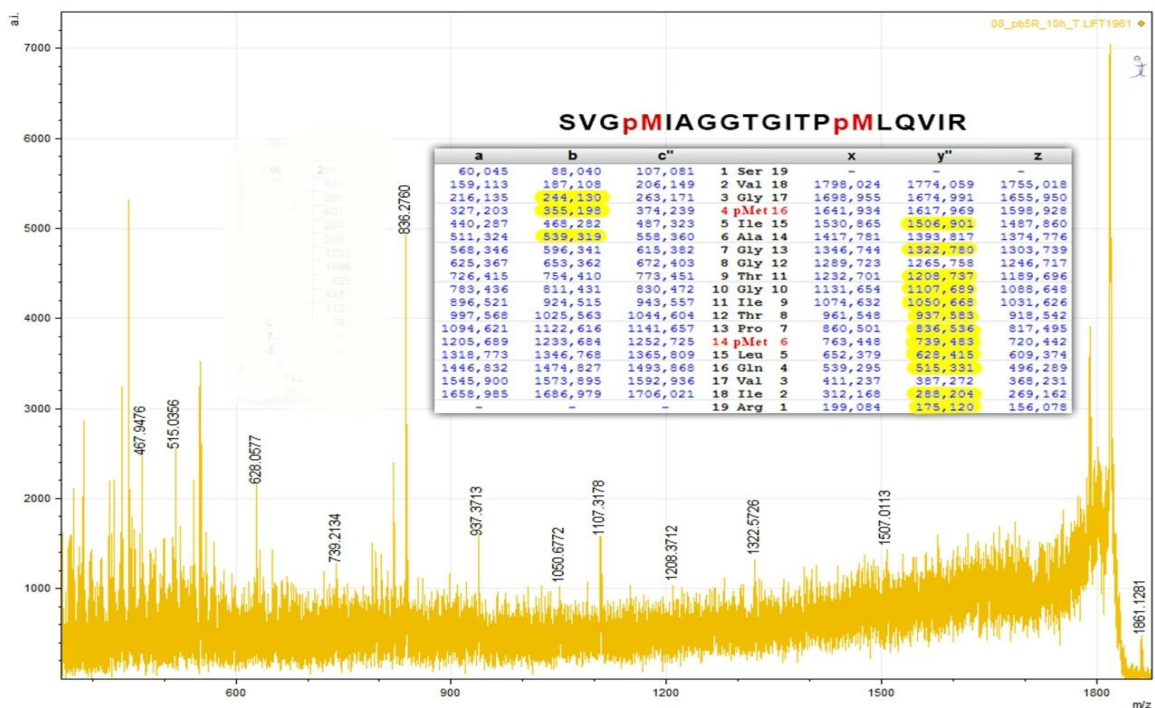
Obr. 32 Elektroforeogram CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem – použitý 12% gel 2 – 0 h, 3 – 1 h, 4 – 2 h, 6 – 4 h, 7 – 6 h, 8 – 8 h, 9 – 10 h po indukci IPTG, 5 – standard CYB5R3, šipky označují pozici exprimované CYB5R3

¹MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMKLFRSTPAITLESPIKYPLRLIDREIISHDTRRF
 RFALPSPQHILGLPVGQHIYLSARIDGNLVVRPYTPISSDDDKGFVDLVIK VYFKDT
 HPKFPAGGKMSQYLEMQIGDTIEFRGPSGLLVYQGKGKFAIRPDKKSNPIIRTVKS
 VGMIAGGTGITPMLQVIRAIMKDPDDHTVCHLLFANQTEKDILLRPELEELRNKHS
 ARFKLWYTLDRAPEAWDYGGQGFVNEEMIRDHLPPPEEEPLVLMMCGPPPMIQYAC
 LPNLDHVGHPTEPCFVF²⁹⁸

Obr. 33 Sekvence CYB5R3 - štěpená trypsinem; červenou barvou označené peptidy, analyzované hmotnostní spektrometrií; pokrytí sekvence 191/298 AMK z toho 6/10 Met



Obr. 34 Hmotnostní spektrum CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem – signály odpovídají peptidům vzniklých štěpením trypsinem

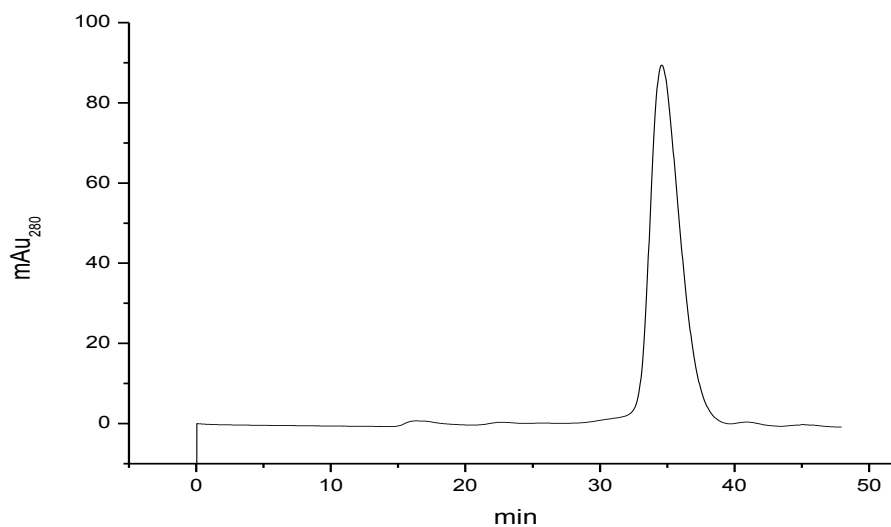


Obr. 35 – Detail hmotnostního spektra CYB5R3 - pro potvrzení identity alespoň jednoho z peptidů (m/z 1861.08) s L-foto-methioninem (pM) (171-189) byla provedena jeho fragmentace; v tabulce jsou uvedené teoretické fragmenty, které mohou vzniknout; vyznačeny jsou signály, na jejichž základě, byla potvrzena inkorporace pM v peptidu

4.4 Izolace proteinu s L-foto-methioninem

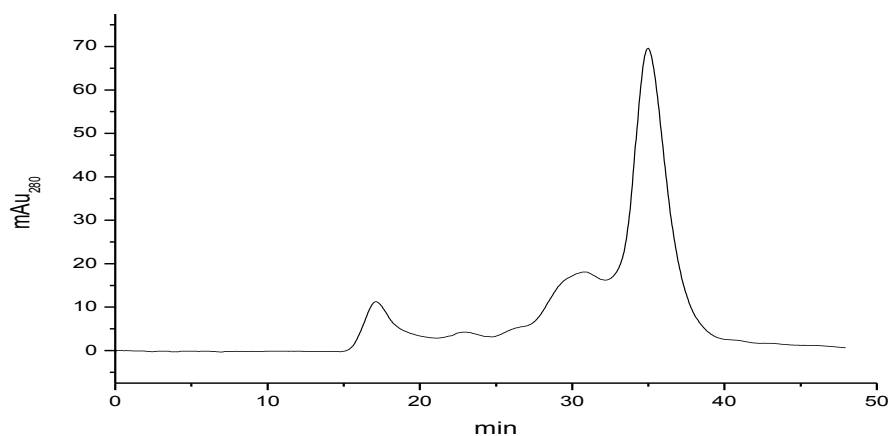
Pro izolaci byla CYB5R3 exprimovaná v 400 ml M9 minimálního média ve dvou 11 Erlenmeyerových baňkách. Produkce trvala 10 hodin. Poté byly buňky centrifugovány a dále zpracovávány podle protokolu.

Při první izolaci byl použit nosič Ni-IDA bez zapojení do FPLC systému. Vzorek byl zahuštěn na 500 μ l a následně přečištěn gelovou chromatografií (FPLC).



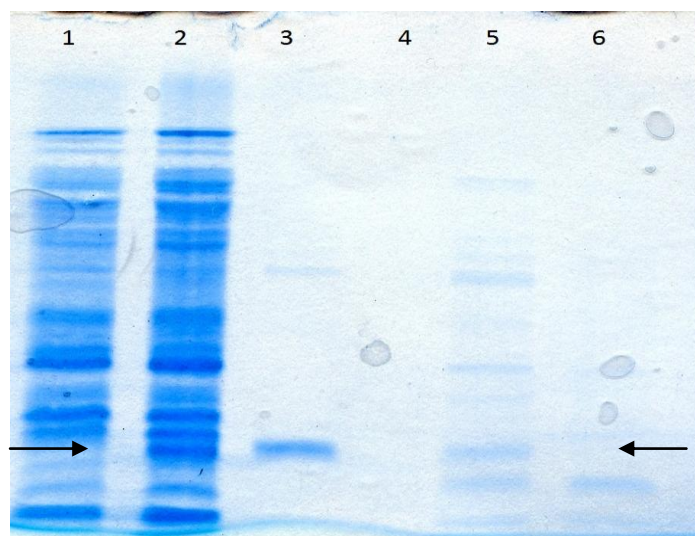
Obr. 36 Chromatogram standardu CYB5R3 – při gelové chromatografii na koloně SuperdexTM 200 10/300 GL použit standard CYB5R3, aplikováno 100 μ l vzorku, průtok 0,5 ml/min, měřen signál detektoru při 280 nm

Pro zjištění retenčního času při gelové chromatografii byl použit standard CYB5R3.



Obr. 37 Chromatogram vzorku CYB5R3 – gelová chromatografie vzorku CYB5R3 po první izolaci na nosiči Ni-IDA, použita kolona SuperdexTM 200 10/300 GL, aplikováno 500 μ l vzorku, průtok 0,5 ml/min, měřen signál detektoru při 280 nm

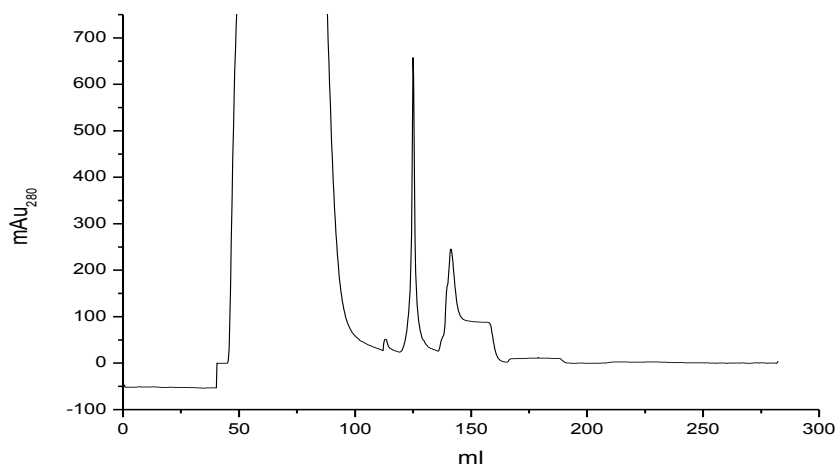
Jímané frakce mezi 32. a 40. minutou byly spojeny, zahuštěny a analyzovány na elektroforéze.



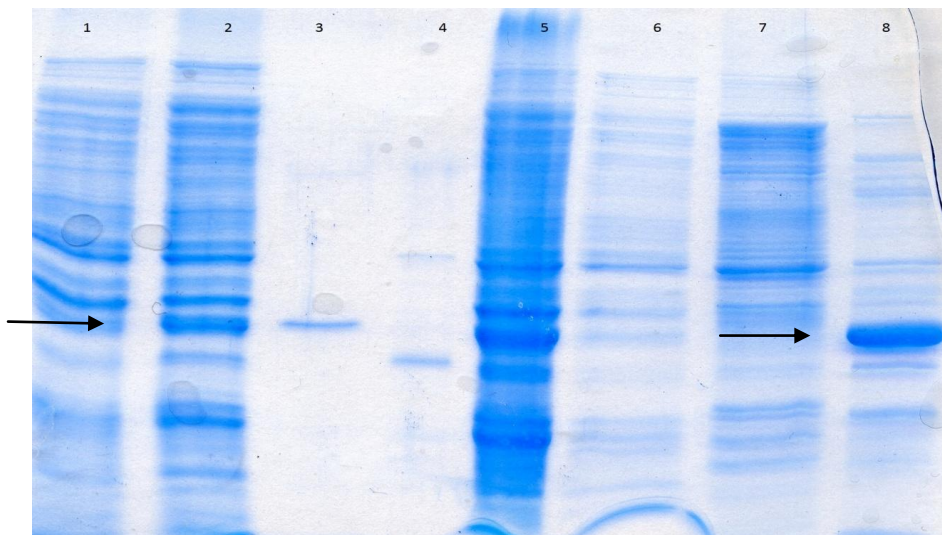
Obr. 38 Elektroforeogram vzorku CYB5R3 po první izolaci – použit 12% gel, 1 – bakteriální suspenze před indukcí IPTG, 2 – bakteriální suspenze 10 h po indukci, 3 – standard CYB5R3, 5 – vzorek před gelovou chromatografií, 6 – vzorek po gelové chromatografii, šipky znázorňují pozici CYB5R3

Z obr. 38 je patrné, že protein po gelové chromatografii nelze nalézt. Hmotnostní spektrometrie odhalila štěpení na C-terminálním konci.

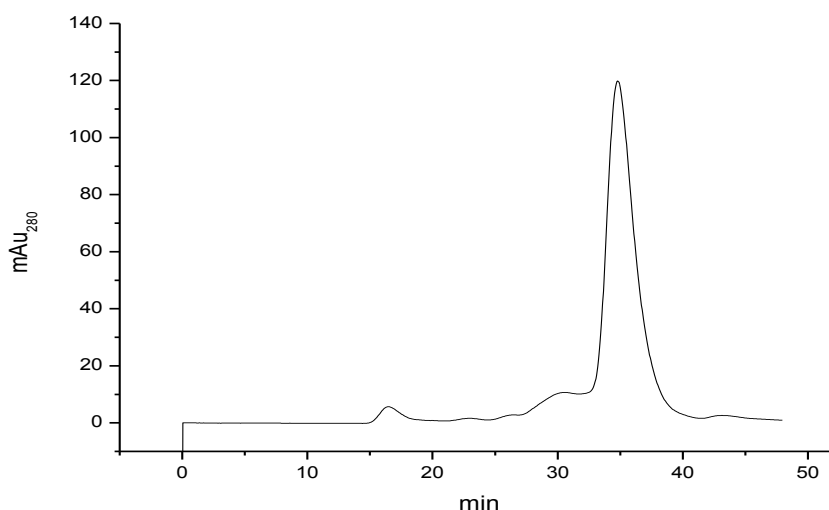
Při druhé izolaci byl použit nosič Ni-NTA zapojený do systému FPLC. Během chelatační chromatografie byly odebírány vzorky na elektroforézu. Eluát byl zahuštěn na 1 ml. Vzorek 500 μ l byl přečištěn gelovou chromatografií.



Obr. 39 Chromatogram izolace CYB5R3 – použit nosič Ni-NTA, 50 – 100 ml – nanášení vzorku (EQI), 100 – 130 ml – promývací fáze (WASH), 130 – 160 ml eluce (ELUTE)

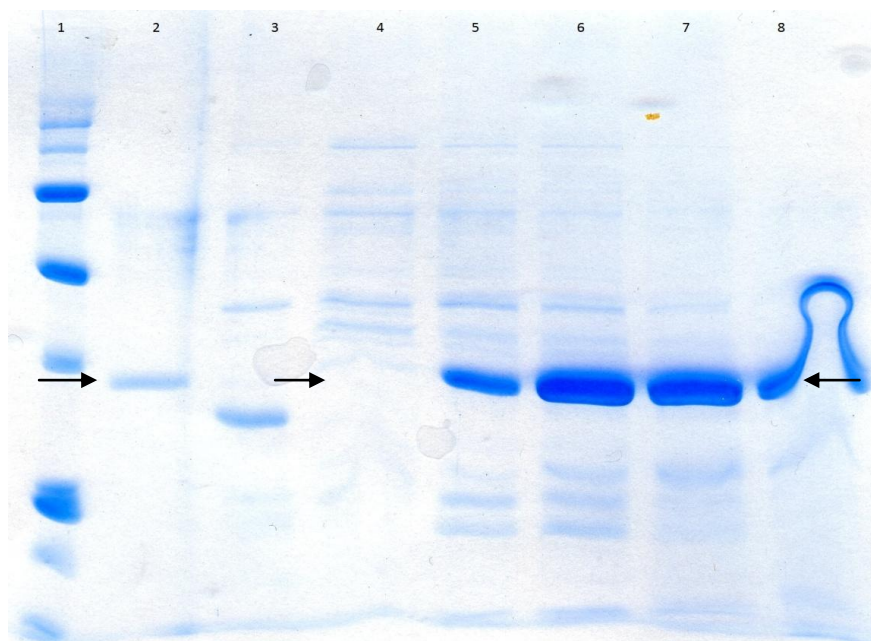


Obr. 40 Elektroforeogram vzorků z izolace CYB5R3 – izolace na koloně Ni-NTA, použit 15% gel, 1 – bakteriální suspenze před indukcí IPTG, 2 – bakteriální suspenze 10 h po indukcí, 3 – standard CYB5R3, 4 – štěpená CYB5R3, 5 – vzorek pelety po sonikaci a centrifugaci, 6 – nanášení na nosič, 7 – promývací fáze, 8 – eluát po zahuštění, šipky označují pozici CYB5R3



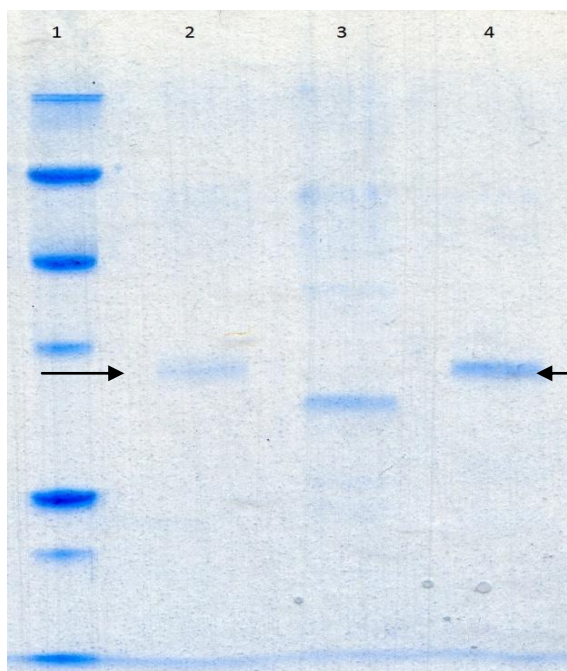
Obr. 41 Chromatogram vzorku CYB5R3 – přečištění gelovou chromatografií, vzorek CYB5R3 po druhé izolaci na nosiči Ni-NTA, použita kolona Superdex™ 200 10/300 GL, aplikováno 500 μ l vzorku, průtok 0,5 ml/min, měřen signál detektoru při 280 nm

Zhruba od 32. do 40. minuty byly odebírány frakce po 0,5 ml do mikrozku mávek Eppendorf. Jednotlivé frakce byly následně analyzovány na elektroforéze.



Obr. 42 Elektroforeogram CYB5R3 – přečištění gelovou chromatografií; použit 15% gel; 1 – standard mol. hmotností; 2 – standard CYB5R3; 3 – štěpená CYB5R3; 4 – frakce 1; 5 – frakce 2; 6 – frakce 3; 7 – frakce 4; 8 – frakce 5; šipky znázorňují pozici CYB5R3

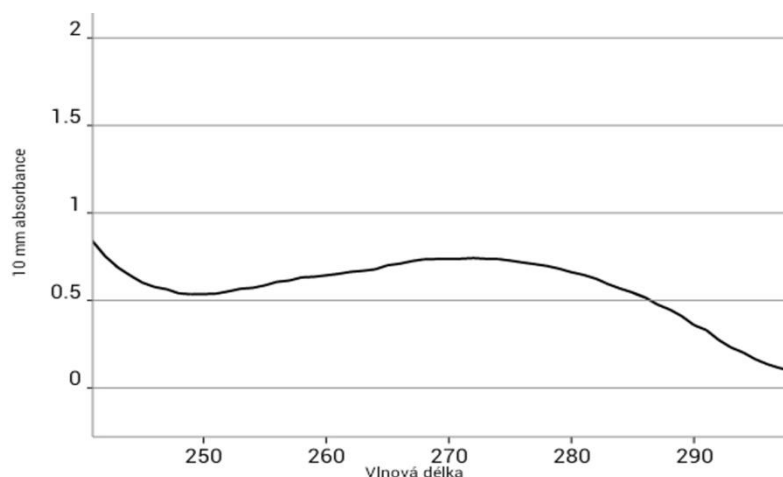
Na obr. 42 lze vidět protein po gelové chromatografii. Štěpená CYB5R3 se nenacházela ani v jedné frakci. Po analýze byly frakce spojeny, zahuštěny a finální produkt byl znovu analyzován na elektroforéze.



Obr. 43 Elektroforeogram finální izolované CYB5R3 – použit 15% gel, 1 – standard mol. hmotností, 2 – standard CYB5R3, 3 – štěpená CYB5R3, 4 – finální izolovaná CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem, šipky znázorňují pozici CYB5R3

4.5 Stanovení koncentrace a aktivity izolovaného proteinu

Koncentrace CYB5R3 byla stanovena UV-VIS spektroskopií pomocí absorpce proteinu při 280 nm s pomocí predikovaného molárního extinkčního koeficientu $24\,410\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a molekulové hmotnosti 33 792 Da. Absorpce FAD při 460 nm nebyla využita, neboť byl signál velmi slabý.



Obr. 44 Stanovení koncentrace CYB5R3 – spektrum CYB5R3 měřené v kapce vzorku, jako slepý vzorek použita voda

Koncentrace CYB5R3 byla stanovena (obr. 44) na 0,92 mg/ml, v přepočtu tedy na **27,23 μ M**.

Tab. 3 Stanovení aktivity CYB5R3

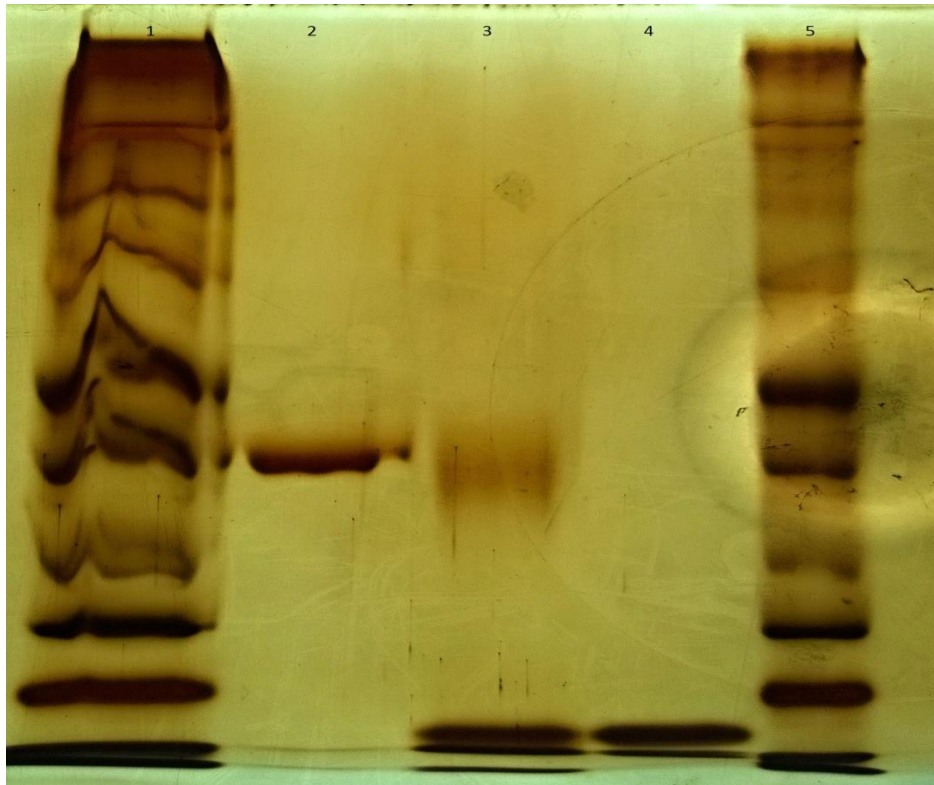
	měření	$\Delta A_{424}/\text{min}$	Aktivita [$\mu\text{mol red. b}_5/\text{pmol CYB5R3}$]	průměr
sol cyt b₅ + CYB5R3	1	0,0127	232,8	216,3
	2	0,0109	199,8	
sol cyt b₅ + CYB5R3 pM	1	0,0132	1,449	1,279
	2	0,0101	1,109	

Sol cyt b₅ – solubilní cytochrom b₅, CYB5R3 – standard o koncentraci 303 μ M (ředěná 15000x), CYB5R3 pM - s inkorporovaným L-foto-methioninem o koncentraci 27,23 μ M (ředěná 1000x)

Aktivita standardu CYB5R3 byla stanovena na $216,3 \pm 23,3$ $\mu\text{mol red. b}_5/\text{pmol CYB5R3}$. Aktivita izolované CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem stanovena na $1,3 \pm 0,2$ $\mu\text{mol red. b}_5/\text{pmol CYB5R3}$. Rozdíl aktivit je zhruba 200násobný.

4.6 Síťování proteinů

Po izolaci a stanovení aktivity CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem byl proveden pokus o zesíťení s cytochromem b_5 . Pokus provedl RNDr. Tomáš Ječmen, PhD. Vzorek byl analyzován na elektroforéze.



Obr. 45 Elektroforeogram vzorku po fotolýze – použit 10 % gel, 1,5 – standard molekulových hmotností, 2 – CYB5R3 s inkorporovaným pM, 3 – cytochrom b_5 + CYB5R3 s pM, 4 – cytochrom b_5

Na obr. 45 lze pozorovat, že v dráze 3 není zřejmě žádná zóna v oblasti vyšších molekulových hmotností odpovídajících kovalentnímu spojení CYB5R3 a cytochromu b_5 .

5 Diskuze

Tato práce byla zaměřena na syntézu L-foto-methioninu jako fotolabilního analogu aminokyseliny L-methioninu. Dále byla zaměřena na inkorporaci tohoto analogu do proteinů CPR a CYB5R3 pomocí exprese v minimálním mediu a v auxotrofních buňkách. Takto připravené proteiny by měly posloužit jako nástroj při určování protein-proteinových interakcí v systému cytochromu P450.

Výsledky syntézy L-foto-methioninu jsou jasné. Lze říci, že se podařilo připravit z výchozí oxokyseliny (**1**) kyselinu s funkčním diazirinovým kruhem (**2**) jehož přítomnost byla potvrzena pomocí UV-VIS spektroskopie. Další kroky syntézy tedy bromace a následná aminace se nepodařily dle popsaného postupu zreprodukovat. Ukazuje se, že zřejmě kritickým krokem je právě zmíněná bromace diazirinového meziprojektu (**2**) do α polohy. Asi největším problémem, s kterým jsme se potýkali, bylo patrně velké množství nečistot, které mohly ovlivnit průběh reakce, tak i následnou analýzu. Veškeré snahy o přečištění produktů byly ale neúspěšné. Další příčinou neúspěchu mohl být fakt, že modifikovaný protokol⁶⁸ nemusí být pro syntézu L-foto-methioninu vhodný. Je možné, že vhodnou úpravou daného protokolu např. změnou rozpouštědla nebo úpravou reakčních podmínek bychom mohli dojít k pozitivním výsledkům. Existují však i jiné protokoly popisující syntézu L-foto-methioninu, které využívají zcela odlišný reakční mechanismus a také chráněných (Boc nebo Fmoc) sloučenin^{73,74}. Tyto protokoly však nebyly použity, neboť námi zvolený protokol⁶⁸ nejlépe navazoval na původní postupy^{65,75}.

Pro ověření možnosti inkorporace modifikované aminokyseliny auxotrofních kmenem *E.coli* B834 (DE3) byl použit d_3 -L-methionin. Expresa podle námi zvoleného protokolu⁷¹ proběhla velmi dobře a z výsledků je patrné, že byly oba proteiny (CPR i CYB5R3) dobře produkovány a že inkorporace d_3 -L-methioninu byla 100 %, což potvrdila analýza na hmotnostním spektrometru. Vzhledem k použití právě auxotrofního kmenu nebyl použit expresní protokol aplikovaný v předchozí práci⁷⁶. Jeho nevýhodou byla nízká míra inkorporace L-foto-methioninu, vzhledem ke kompetici s L-methioninem.

Expresa CYB5R3 v přítomnosti L-foto-methioninu proběhla dobře a jeho inkorporace byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie. U tohoto proteinu by však optimalizace expresního protokolu mohla vést k vyšším výtěžkům.

Odlišné výsledky však přinesla exprese CPR, kdy byl inkorporován L-foto-methioninu. Podle elektroforetické analýzy se CPR neprodukovala. Příčin může být celá řada a zcela určitě se bude jednat o kombinaci mnoha faktorů. Jedním faktorem může být molekulová hmotnost CPR, která je okolo 78 000 Da. Je zřejmé, že takto velký protein se bude produkovat pomaleji a obtížněji než CYB5R3, jejíž molekulová hmotnost se pohybuje okolo 34 000 Da. Dalším faktorem je zcela určitě použití L-foto-methioninu, neboť pro bakterii je to velmi neobvyklá sloučenina a je možné, že její translační aparát tuto inkorporaci nezvládl, neboť v CPR lze nalézt více L-methioninů než v CYB5R3. Lze však předpokládat, že úpravou podmínek expresního protokolu (např. zkrácení doby „hladovění“, použití jiné koncentrace IPTG nebo prodloužení doby produkce) by bylo možné i tento protein s inkorporovaným L-foto-methioninem získat.

CYB5R3 byla produkována ve 400 ml minimálního media a byla dále izolována podle protokolu navrženého Mgr. Janem Milichovským⁷⁰. Při první izolaci, kdy byl použit nosič Ni-IDA a následně gelová chromatografie, bylo dosaženo nevhodného výsledku, protože došlo ke štěpení CYB5R3 na C-terminálním konci. Přesné místo štěpení však není známo. Příčina štěpení je také neznámá. Štěpení však mohlo být zapříčiněno tím, že při prvním pokusu o izolaci bylo použito při sonikaci jako inhibitor proteas pouze PMSF, na rozdíl od druhého pokusu, kdy byla použita směs inhibitorů. Na druhou stranu při izolaci neznačené CYB5R3 nebyly žádné štěpné produkty pozorovány. V tom případě je otázkou zda-li není problém v samotné expresi proteinu v daném kmenu bakterií nebo v použitém M9 minimálním mediu. Proto také tento protokol vyžaduje další optimalizaci. Dalším faktorem mohla být nedostatečná izolace na nosiči Ni-IDA nebo nesprávné odebrání frakcí při gelové chromatografii.

Při druhém pokusu o izolaci byl použit nosič Ni-NTA zapojený do systému FPLC a následné přečištění na gelové chromatografii. Tento nosič byl použit zejména proto, že kolona Ni-IDA nebyla k dispozici pro zapojení do systému FPLC, a také díky vyšší rychlosti a efektivitě izolace. Při tomto pokusu bylo již dosaženo kýženého výsledku v podobě neštěpené CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem. Z výsledku je však patrné, že štěpená forma se vyskytovala v průběhu celé izolace a k jejímu odstranění došlo až při přečištění na gelové chromatografii. Ukázalo se také, že část proteinu zřejmě zůstala v peletě buněk po sonikaci a centrifugaci. Pro dosažení vyššího výtěžku by bylo vhodné tento krok ještě upravit (např. prodloužením doby sonikace nebo zvýšeným počtem cyklů).

Je zřejmé, že použití nosiče Ni-NTA zapojeného do systému FPLC je mnohem efektivnějším a zároveň specifitějším řešením než použití nosiče Ni-IDA. Koncentrace finální CYB5R3 byla 0,92 mg/ml tedy 27,23 μ M. Toto číslo však může být zavádějící, neboť i ve finálním preparátu mohou být zbytky cizích proteinů, které nebylo možné oddělit na gelové chromatografii. Efektivnější purifikace tohoto proteinu bude dalším předmětem zkoumání.

Pro stanovení aktivity CYB5R3 bylo využito lidského solubního cytochromu b_5 . Z výsledků je patrné, že CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methionienm má mnohem nižší aktivitu (až 200x) než CYB5R3 izolovaná Mgr. Janem Milichovským. Příčinou může být přítomnost L-foto-methioninu, který může tento protein nějakým způsobem strukturně pozměňovat a tím negativně ovlivnit inkorporaci FAD, který je pro tuto reakci nezbytný.

Pokus o zesítní cytochromu b_5 s CYB5R3 neposkytl uspokojivé výsledky. Je nanejvýš pravděpodobné, že ke „crosslinku“ vůbec nedošlo. Ukazuje se však, že mohlo dojít pouze k internímu zesítní v molekule CYB5R3. Příčinou může být nízká koncentrace izolované CYB5R3 nebo špatná orientace obou proteinů. V další práci bude proto věnována pozornost studiu interakci CYB5R3 a cytochromu b_5 .

6 Závěr

Tato práce se zaměřovala na syntézu L-foto-metioninu a jeho inkorporaci do proteinů CPR a CYB5R3 s využitím exprese v auxotrofního kmenu *E.coli* B834 (DE3) a minimálním mediu. Výsledky této práce lze shrnout takto:

- Podařilo se připravit funkční diazirinový meziprodukt (2), který byl ověřen hmotnostní spektrometrií a UV-VIS spektroskopii.
- Další kroky organické syntézy (produkty 3 a 4) se nepodařily zreprodukovat.
- Byla ověřena možnost inkorporace auxotrofních buněk s využitím d_3 -L-methioninu. CPR i CYB5R3 se produkovaly dobře a míra inkorporace byla 100 %.
- Nepodařilo se exprimovat CPR s inkorporovaným L-foto-methioninem.
- Expres a následná izolace CYB5R3 s inkorporovaným L-foto-methioninem se zdařila. Byl získán protein o koncentraci 27,23 μ M a aktivitou $1,3 \pm 0,2$ μ mol red. b_5 /pmol CYB5R3. Inkorporace L-foto-methioninu byla ověřena hmotnostní spektrometrií a její míra byla 100 %.
- Pokus o zesítnění cytochromu b_5 a CYB5R3 neposkytl kovalentní heterodimer.

Seznam použité literatury

1. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J.Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. listy* 98, 876–890 (2004)
2. Kotrbova, V., Mrazova, B., Moserova, M., Martinek, V., Hodek, P., Hudecek, J., Frei, E., Stiborova, M.: *Biochem. Pharmacol.* 82, 669-680 (2011)
3. Stiborová, M.: Biochemie II, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie
4. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386 (1958)
5. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958)
6. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 (1964)
7. Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W.: *DNA* 6, 1-11 (1987)
8. Sakaguchi, M., Mihara, K., Sato, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3361–3364 (1984)
9. Oprea, T.I., Hummer, G., García, A.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2133–2138 (1997)
10. Testa, B., Krämer, S.D.: *Chem. Biodivers.* 4, 257–405 (2007)
11. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4GQS> (28. 7. 2015)
12. Guengerich, F.P.: *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70–83 (2008)
13. Nebert, D. W., Russell, D. W.: *Lancet*, 360, 1155-1162 (2002)
14. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei E.: *Chem. listy* 93, 229-237 (1999)
15. Ioannides, C., Lewis, D. F.: *Curr Top Med Chem*, 4, 1767-1788 (2004)
16. http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Proportion_of_drugs_metabolized_by_different_CYPs.png (30. 7. 2015)
17. Hrycay, E.G., Bandiera, S.M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 522, 71-89 (2012)
18. Phillips, A. H., Langdon, R. G.: *J. Biol. Chem.* 237, 2652–2660 (1962)
19. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z.: *Arch. Biochem.* 29, 232-233 (1950)
20. Enoch, H. G., Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.* 254, 8976-8981 (1979)
21. Schacter, B. A., Nelson, E. B., Marver, H. S., Masters, B. S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601-3607 (1972)
22. Porter, T. D., Kasper, C. B.: *Biochemistry* 25, 1682–1687 (1986)

23. Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 256, 266-277 (1981)
24. Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., Kim, J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8411–8416 (1997)
25. Vermilion, J. L., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 253, 2694–2704 (1978)
26. Black, S. D., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 257, 5929–5938 (1982)
27. Vermilion, J. L., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 253, 8812–8819 (1978)
28. Hamdane, D., Xia, C., Im, S. C., Zhang, H., Kim, J. J. P., Waskell, L.: *J. Biol. Chem.* 284, 11374–11384 (2009)
29. Laursen, T., Jensen, K., Møller, B. L.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1814, 132–138 (2011)
30. Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., Kim, J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411-8416 (1997)
31. Hubbard, P. A., Shen, A. L., Paschke, R., Kasper, C. B., Kim, J. J.: *J. Biol. Chem.* 276, 29163–29170 (2001)
32. http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm (25. 7. 2015)
33. Estabrook, R. W., Franklin, M. R., Cohen, B., Shigamatzu, A., Hildebrandt, A. G.: *Metabolism* 20, 187-199 (1971)
34. Peterson, J. A., Ebel, R. E., O'Keeffe, D. H., Matsubara, T., Estabrook, R. W.: *J. Biol. Chem.* 251, 4010-4016 (1976)
35. Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I. L., Huang, W. C., Grossmann, J. G., Roberts, G. C. K.: *J. Biol. Chem.* 284, 36628–36637 (2009)
36. Velick, S. F., Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.* 221, 265-275 (1956)
37. Strittmatter, C. F., Ball, E. G.: *J. Cell. Comp. Physiol.* 43, 57–78 (1954)
38. Vergères, G., Waskell, L.: *Biochimie* 77, 604-620 (1995)
39. Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M. J., Setlow, B., Redline, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4565-4569 (1974)
40. Douglas, R. H., Hultquist, D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3118–3122 (1978)
41. Wang, L., Cowley, A. B., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D. R.: *Proteins*, 67, 293-304 (2007)
42. Durr, U. H., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1768, 3235-3259 (2007)
43. Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.* 240, 4481-4487 (1965)

44. Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 204-211 (2005)
45. Guengerich, F. P.: *Biochemistry* 22, 2811-2820 (1983)
46. Sligar, S. G., Cinti, D. L., Gibson, G. G., Schenkman, J. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 925-932 (1979)
47. Henderson, C. J., McLaughlin, L. A., Wolf, C. R.: *Mol. Pharmacol.* 83, 1209–1217 (2013)
48. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4HIN> (1. 8. 2015)
49. Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152 (2003)
50. Yamazaki, H., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Shimada, T., Guengerich, F. P.: *J. Biol. Chem.* 271, 27438-27444 (1996)
51. Schenkman, J. B., Voznesensky, A. I., Jansson, I.: *Arch. Biochem. Biophys.* 314, 234-241 (1994)
52. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F. P., Shimada, T., Nakajima, M., Yokoi, T.: *Protein Expr. Purif.* 24, 329-337 (2002)
53. Ahuja, S., Jahr, N., Im, S. C., Vivekanandan, S., Popovych, N., Le Clair, S. V., Huang, R., Soong, R., Xu, J., Yamamoto, K., Nanga, R. P., Bridges, A., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *J. Biol. Chem.* 288, 22080–22095 (2013)
54. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00387> (8. 8. 2015)
55. Csukai, M., Murray, M., Orr, E.: *FEBS J.* 219, 441–448 (1994)
56. Fukuchi-Mizutani, M., Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Ohta, D.: *Plant Physiology*, 119, 353–362 (1999)
57. Tomatsu, S., Kobayashi, Y., Fukumaki, Y., Yubisui, T., Orii, T., Sakaki, Y.: *Gene* 80, 353–361 (1989)
58. Spatz, L., Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.* 248, 793-799 (1973)
59. Hultquist, D.E., Passon, P.G.: *Nature New Biology* 229, 252–254 (1971)
60. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3W5H> (2. 8. 2015)
61. Dědič J.: Bakalářská práce, PřF UK, Praha (2013)
62. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-crosslinking.html#/legacy=www.piercenet.com> (3. 8. 2015)
63. Kiick, K. L., Weberskirch, R., Tirrell, D. A.: *FEBS Lett.* 502, 25-30 (2001)

64. Link, A. J., Mock, M. L., Tirrell, D. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 603-609 (2003)
65. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C.: *Nat. Methods* 2, 261-267 (2005)
66. Harlow, G. R., Halpert, J. R.: *J. Biol. Chem.* 272, 5396-5402 (1997)
67. Shen, A. L., Porter, T. D., Wilson, T. E., Kasper, C. B.: *J. Biol. Chem.* 264, 7584-7589 (1989)
68. Ikeda, Y., Behrman, E. J.: *Synthetic Commun.* 38, 2276-2284 (2008)
69. https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/seleno/ (5. 8. 2015)
70. Milichovský, J.: osobní sdělení (2015)
71. <http://web.expasy.org/protparam/> (6. 8. 2015)
72. Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680-685 (1970)
73. Durek, T., Zhang, J., He, C., Kent, S. B. H.: *Organic Lett.* 9, 5497-5500 (2007)
74. Vila-Perello, M., Pratt, M. R., Tulin, F., Muir, T. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8068-8069 (2007)
75. Church, R. F. R., Weiss, M. J.: *J. Org. Chem.* 35, 2465-71 (1970)
76. Koberová, M.: Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2012)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka