

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



Bc. Petr Holý

## **Studium molekulární organizace systému cytochromu P450**

**Study of molecular organization of cytochrome P450 system**

*Diplomová práce*

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité informační zdroje a literaturu jsem řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

.....

Bc. Petr Holý

## **Poděkování**

Děkuji mému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za vedení práce a pomoc při jejím vypracování.

## Abstract

Mixed-function oxygenase system (MFO system) plays a vital role in the metabolism of a variety of both endogenous substrates and xenobiotics. This membrane system consists of cytochrome P450s, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase (POR), cytochrome b<sub>5</sub> and NADH:cytochrome b<sub>5</sub> oxidoreductase (b<sub>5</sub>R). Cytochrome P450 catalyzes a monooxygenation of a substrate, while POR and cytochrome b<sub>5</sub> represent its redox partners. Cytochrome b<sub>5</sub>, itself having a redox partner in b<sub>5</sub>R, effects the reactions catalyzed by the MFO system in various ways, through mechanisms that are not fully understood.

This paper focuses on the purification of b<sub>5</sub>R and POR from rabbit liver. The microsomal fraction obtained by differential centrifugation contained 42 mg of protein per ml.

From a portion of the microsomal fraction, b<sub>5</sub>R was obtained using chromatography on DEAE-Sepharose, CM-Sepharose and 5'-ADP agarose columns. The yield was 0,3 % of ferricyanide-reductase activity and the product contained several contaminants in the molecular weight range of 50-70 kDa. A second purification of b<sub>5</sub>R from the microsomal fraction was carried out using a column of DEAE-Sepharose directly connected to a 5'-ADP agarose column. The b<sub>5</sub>R product was purified with a yield of 10,9 % and it once again contained several contaminants in the molecular weight range of 50-70 kDa. The product was able to reduce cytochrome b<sub>5</sub> in the presence of NADH.

During both of the purification attempts, POR was also purified using chromatography on DEAE-Sepharose and 2', 5'-ADP-Sepharose columns. In the first case, POR was purified in electrophoretically pure form with the molecular weight of 78 kDa, with a yield of cytochrome c-reductase activity of 3,4 %. On second attempt, the yield was 4,7 %. In addition to POR with the molecular weight of 78 kDa, the product contained the truncated form of POR, lacking its membrane anchoring domain (72 kDa).

**Keywords:** cytochrome b<sub>5</sub> reductase, cytochrome P450 reductase, purification, rabbit  
[IN CZECH]

## Abstrakt

V metabolismu velkého množství endogenních látek i xenobiotik hraje zásadní roli systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém). Tento membránový systém je tvořen cytochromy P450, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou (CPR), cytochromem  $b_5$  a NADH:cytochrom  $b_5$  oxidoreduktasou ( $b_5R$ ). Cytochrom P450 katalyzuje monooxygenaci substrátu a CPR a cytochrom  $b_5$  představují jeho redoxní partnery. Cytochrom  $b_5$ , jehož redoxním partnerem je  $b_5R$ , ovlivňuje reakce katalyzované MFO systémem, a to ne zcela objasněným mechanismem.

Tato práce se zabývá purifikací  $b_5R$  a CPR z jater králíka domácího. Diferenční centrifugací bylo získáno 18 ml mikrosomální frakce o obsahu proteinů 42 mg/ml.

Z prvního dílu mikrosomální frakce byla pomocí chromatografie na kolonách DEAE-Sepharosy, CM-Sepharosy a 5'-ADP agarosy izolována  $b_5R$  s výtěžkem 0,3 % ferrikyanid-reduktasové aktivity a obsahující několik kontaminantů o molekulových hmotnostech 50-70 kDa. Při druhé purifikaci  $b_5R$  byla použita kombinace chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy s přímým napojením na kolonu 5'-ADP agarosy, z níž byla získána  $b_5R$  s výtěžkem 10,9 % a obsahující rovněž několik kontaminantů v intervalu molekulových hmotností 50-70 kDa. Preparát redukoval cytochrom  $b_5$  v přítomnosti NADH.

Při obou purifikacích byla rovněž získána CPR pomocí chromatografií na kolonách DEAE-Sepharosy a 2',5'-ADP-Sepharosy. V prvním případě byla získána CPR v elektroforeticky čisté formě s molekulovou hmotností 78 kDa, s výtěžkem cytochrom c-reduktasové aktivity 3,4 %. V druhém případě byl výtěžek 4,7 %, ale preparát obsahoval z části formu CPR bez membránové kotvy (72 kDa).

**Klíčová slova:** cytochrom  $b_5$  reduktasa, cytochrom P450 reduktasa, purifikace, králík

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1. Systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí .....	12
1.1.2. Cytochromy P450.....	12
1.1.2.1. Struktura cytochromů P450 .....	13
1.1.2.2. Funkce cytochromu P450 a katalytický cyklus .....	14
1.1.2.3. Interakce cytochromů P450 s jinými cytochromy P450.....	16
1.1.3. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa .....	17
1.1.3.1. Struktura a funkce NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	18
1.1.3.2. Interakce NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy s cytochromy P450 .....	19
1.1.4. Cytochrom b <sub>5</sub> .....	21
1.1.4.1. Struktura a funkce cytochromu b <sub>5</sub> .....	21
1.1.4.2. Působení cytochromu b <sub>5</sub> na funkci cytochromů P450 .....	22
1.1.5. NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasa .....	24
1.1.6.1. Struktura NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy.....	24
1.1.6.2. Mechanismus funkce NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy.....	25
1.2. Chemické síťování proteinů .....	28
1.2.1. Typy síťovacích činidel.....	28
1.2.2. Fotoaktivovatelné proteiny.....	33
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>37</b>
<b>3. Materiál a metody</b> .....	<b>38</b>
3.1. Použité přístroje.....	38
3.2. Materiál a chemikálie .....	39
3.3. Použité pufrы a jiné roztoky .....	40

3.4. Metody.....	45
3.4.1. Analytické metody .....	45
3.4.1.1. Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny.....	45
3.4.1.2. Stanovení koncentrace cytochromu P450 diferenční spektrometrií .....	45
3.4.1.3. Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	46
3.4.1.4. Stanovení aktivity NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy pomocí ferrikyanidu.....	47
3.4.1.5. Kvalitativní zjištění aktivity NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy pomocí cytochromu b <sub>5</sub> .....	48
3.4.2. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS .....	48
3.4.3. Izolace mikrosomální frakce a solubilizace .....	49
3.4.3.1. Příprava pokusného zvířete a jaterní tkáně .....	49
3.4.3.2. Izolace mikrosomální frakce.....	50
3.4.3.3. Solubilizace proteinů mikrosomální frakce .....	50
3.4.4. Chromatografické metody.....	51
3.4.4.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF .....	51
3.4.4.2. Chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF .....	51
3.4.4.3. Chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy .....	51
3.4.4.4. Chromatografie na koloně 5'- ADP agarosy .....	52
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>53</b>
4.1. Izolace mikrosomální frakce z králíčích jater.....	53
4.2. První purifikace NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	54
4.2.1. Solubilizace mikrosomální frakce.....	54
4.2.2. Purifikace NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy .....	56
4.2.2.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1) - nanášení .....	56
4.2.2.2. Chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (1) a (2).....	57

4.2.2.3. Chromatografie na koloně 5'-ADP agarosy (1) a (2) .....	60
4.2.3. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	62
4.2.3.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1) - eluce .....	62
4.2.3.2. Chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) a (2) .....	64
4.3. Druhá purifikace NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	67
4.3.1. Solubilizace mikrosomální frakce .....	68
4.3.2. Chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (3) a (4) .....	70
4.3.3. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	72
4.3.3.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (2) - nanášení .....	72
4.3.3.2. Chromatografie na koloně 5'-ADP-agarosy (3) a (4) .....	72
4.3.2. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	76
4.3.2.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (2) - eluce .....	76
4.3.2.2. Chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (3) .....	77
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>80</b>
5.1. Izolace mikrosomální frakce a solubilizace .....	80
5.2. Purifikace NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasy .....	80
5.3. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy .....	83
<b>6. Shrnutí a závěr .....</b>	<b>84</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>85</b>



## Seznam použitých zkratek

<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
$A_x$	absorbance při vlnové délce $x$ nm
$A_{max}$	absorpční maximum
<b>BCA</b>	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
<b>BIS</b>	N,N-methylen-bis-akrylamid
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
$c$	molární koncentrace
<b>CBB</b>	Coomassie Brilliant Blue
<b>CPR</b>	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
<b>cyt b5</b>	cytochrom b5
<b>b5R</b>	NADH:cytochrom b5 reduktasa
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>Da</b>	dalton
<b>DEAE</b>	diethylaminoethyl
<b>DLCP</b>	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin
<b>DMPC</b>	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
<b>DMS</b>	dimethylsuberimidát
<b>DSS</b>	disukcinimidylsuberát
<b>DSG</b>	disukcinimidylglutarát
<b>EDC</b>	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>FAD</b>	flavinadenindinukleotid
<b>FMN</b>	flavinadeninmononukleotid
<b>M</b>	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
<b>MFO</b>	system oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „mixed-function oxidases“)
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
<b>MWCO</b>	hodnota nejnižší molekulové hmotnosti molekul, které jsou z 90 % zachyceny membránou (z angl. „molecular weight cut-off“)
<b>NADP+</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný
<b>NADPH</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný

<b>NHS</b>	N-hydroxysukcinimid
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>P450</b>	cytochrom P450
<b>pBpa</b>	<i>p</i> -benzoyl-L-fenylalanin
<b>PCR</b>	polymerasová řetězová reakce (angl. „polymerase chain reaction“)
<b>RH</b>	substrát
<b>RNA Pol</b>	DNA-dependentní RNA polymerasy
<b>ROH</b>	hydroxylovaný produkt
<b>RPM</b>	otáčky za minutu (z angl. „revolutions per minute“)
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný (z angl. „sodium dodecylsulfate“)
<b>sulfo-SBED</b>	sulfosukcinimidyl-2-(6-(biotinamido)-2-( <i>p</i> -azidobenzamido)-hexanoamido)ethyl-1,3'-dithiopropionát
<b>sulfo-NHS</b>	N-hydroxysulfosukcinimid
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>v/v</b>	objem/objem
<b>VIS</b>	viditelné záření
<b>w/v</b>	hmotnost/objem

# 1. Úvod

S životem v moderní lidské společnosti je neoddělitelně spjata přijímání velkého množství cizorodých látek (xenobiotik) do organismu. Tyto látky se v organismu přirozeně nevyskytují a nejsou nezbytné pro jeho funkci. Xenobiotika lze v zásadě rozdělit na dvě skupiny – látky přijímané záměrně a látky přijímané neúmyslně. Do první skupiny patří léčiva, do druhé vedlejší produkty lidské činnosti, jako například průmyslové polutanty. Xenobiotika ovlivňují organismy rozličnými a většinou obtížně předvídatelnými způsoby a zároveň jsou často složitě přeměňována. Množství cizorodých látek a jejich chemická pestrost se neustále zvyšují a výzkum v oblastech toxikologie a xenobiochemie je dnes důležitější než kdy dříve.

Důležitým faktorem pro vyloučení látky v organismu je polarita její molekuly. Polární látka je dobře rozpustná ve vodě, tudíž je ji často možné vyloučit bez nutnosti chemické úpravy. Látky nepolární podstupují biotransformaci za účelem zvýšení polaritativy a umožnění detoxikace. Biotransformační reakce mohou mít mnoho kroků a meziproductů v závislosti na povaze substrátu. Výsledkem biotransformace nemusí být pouze detoxikace. Je například možné, aby se původně neškodná látka přeměnila na látku toxickou nebo karcinogenní. Stejně tak může být léčivo deaktivováno ještě před dosažením místa účinku. Biotransformaci je ale možné i využít k aktivaci neaktivní formy léčivé látky [1].

Mezi nejdůležitější enzymy biotransformace patří cytochromy P450. Jsou to monooxygenasy, které katalyzují inkorporaci atomu kyslíku do molekuly substrátu za vzniku hydroxylované formy. Ke své funkci potřebují dodání dvou elektronů, které je zajišťováno spoluprací s alespoň třemi dalšími enzymy [1]. Společně je tento systém označován jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí.

## 1.1. Systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí

Systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed-function oxidase“) je systém enzymů nacházející se v membráně endoplasmatického retikula (mikrosomech). Jeho součástí je velmi početná skupina cytochromů P450, flavoprotein NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR), cytochrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>) a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasa (b<sub>5</sub>R, cyt b<sub>5</sub> reduktasa).

### 1.1.2. Cytochromy P450

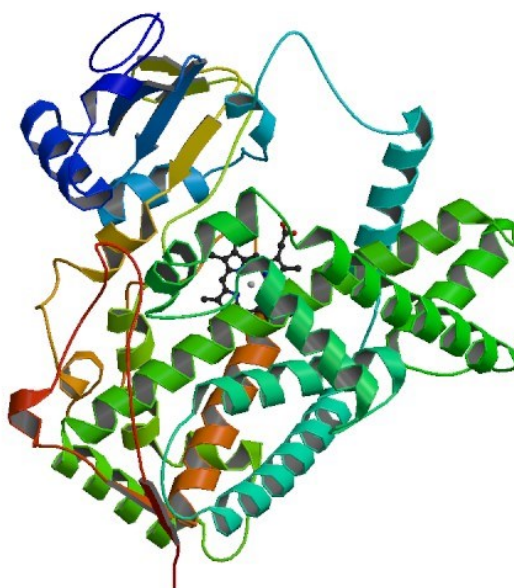
Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, jejichž charakteristickým absorpčním maximem je tzv. Soretův pás v oblasti vlnových délek 380-420 nm [2]. První cytochrom P450 byl objeven v roce 1955 [3, 4] a v roce 1958 bylo zjištěno, že tento pigment váže v redukovaném stavu molekulu oxidu uhelnatého (podobně jako hemoglobin), což způsobuje posun jeho absorpčního maxima k 450 nm [5, 6].

Cytochromy P450 představují superrodinu enzymů čítajících více než 20 000 členů [7]. Zástupci této evolučně velmi staré superrodiny se vyskytují prakticky ve všech typech organismů, ať už prokaryotických nebo eukaryotických, a počet objevených jedinců a jejich funkcí neustále roste [8]. Z tohoto důvodu byla zavedena systematická nomenklatura. Superrodina se dělí na rodiny a podrodiny. Izoformy náleží do jedné rodiny, pokud je jejich sekvenční shoda alespoň 40 %. Pokud je alespoň 55 %, spadají navíc i do jedné podrodiny. Základ názvu tvoří zkratka „CYP“, následovaná číslem rodiny, písmenem podrodiny a číslem konkrétní izoformy, např. CYP3A4 [2].

Množství substrátů, které jsou cytochromy P450 schopné přeměňovat, je obrovské. U člověka, kde bylo dosud nalezeno 57 cytochromů P450 [9], se účastní biotransformace mnoha esenciálních endogenních látek, exogenních látek přijímaných potravou a většiny léčiv [10-12]. Na metabolismu léčiv se podílí ze 75 % [1], podle některých autorů až z 90 % [13-15].

### 1.1.2.1. Struktura cytochromů P450

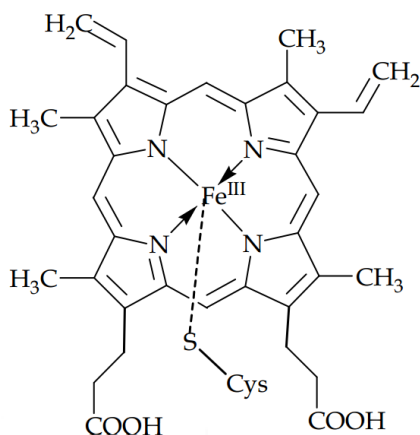
Molekulová hmotnost molekuly cytochromu P450 (dále P450) je přibližně 50 kDa. Protein je ukotven v membráně pomocí N-terminální hydrofobní domény s  $\alpha$ -helikální strukturou. Zatímco primární struktura je u zástupců z různých říší života odlišná, sekundární a terciární se podobají. Každý P450 obsahuje zpravidla 12  $\alpha$ -helixů a 4  $\beta$ -skládané listy s výjimkou bakteriálních, kterým chybí membránový  $\alpha$ -helix [16]. Na obr. 1 je příklad struktury získané rentgenovou krystalografií (králičí CYP2B4).



**Obr. 1: Struktura CYP2B4 bez membránové kotvy.** *Ve středu molekuly je patrný černě vyznačený hem. Převzato z [17].*

Na velmi konzervované proximální straně se nachází místo pro vazbu redoxních partnerů. Vazebná místa pro CPR a cyt  $b_5$  se překrývají, nejsou však identická. Bridges a kol. zmapovali vazebná místa CYP2B4 a identifikovali konkrétní aminokyseliny CYP2B4, které se podílejí na interakci s cyt  $b_5$  (R122, R126, R133, K139, K433) [18]. Do středu molekuly vede přístupový kanál pro substrát, ústící na distální straně proteinu. Na rozdíl od proximální strany je distální strana, vzhledem k značnému množství substrátů katalyzovaných P450, velmi variabilní [2]. V centru molekuly je zanořena hemová prosthetická skupina, tedy protoporfyrin IX s vázaným kationtem železa. Pro cytochromy P450 existuje i málo používaný název hemthiolátové proteiny, který ale lépe vystihuje jejich stavbu. Na rozdíl od

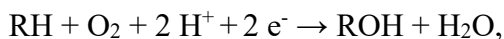
typických cytochromů, kde se prostetická skupina váže hemovým železem koordinačně-kovalentní vazbou na imidazolový zbytek histidinu, v cytochrech P450 je tato vazba vedena přes thiolátovou síru zbytku cysteinu [2] (obr. 2).



**Obr. 2: Vazba hemu na cytochrom P450.** *Koordinačně-kovalentní vazba vzniká mezi sírou cysteinu a kationtem železa na rozdíl od typických cytochromů, kde místo cysteinu figuruje histidin. Převzato z [19].*

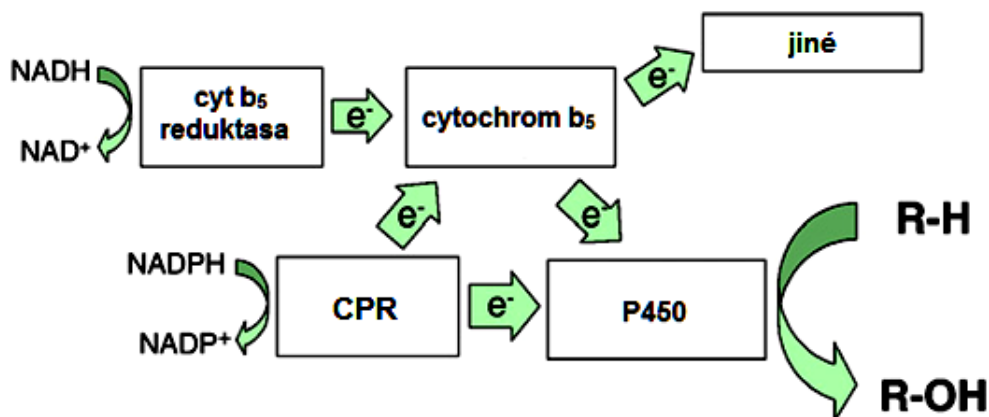
### 1.1.2.2. Funkce cytochromu P450 a katalytický cyklus

Cytochromy P450 se kromě první fáze biotransformace xenobiotik účastní také řady reakcí endogenních látek. Participují například na biosyntéze mastných kyselin, ikosanoidů, sterolů a vitamínů. Katalyzují oxidační, peroxidační i redukční reakce [16]. Typickou reakcí P450 je monooxygenace:



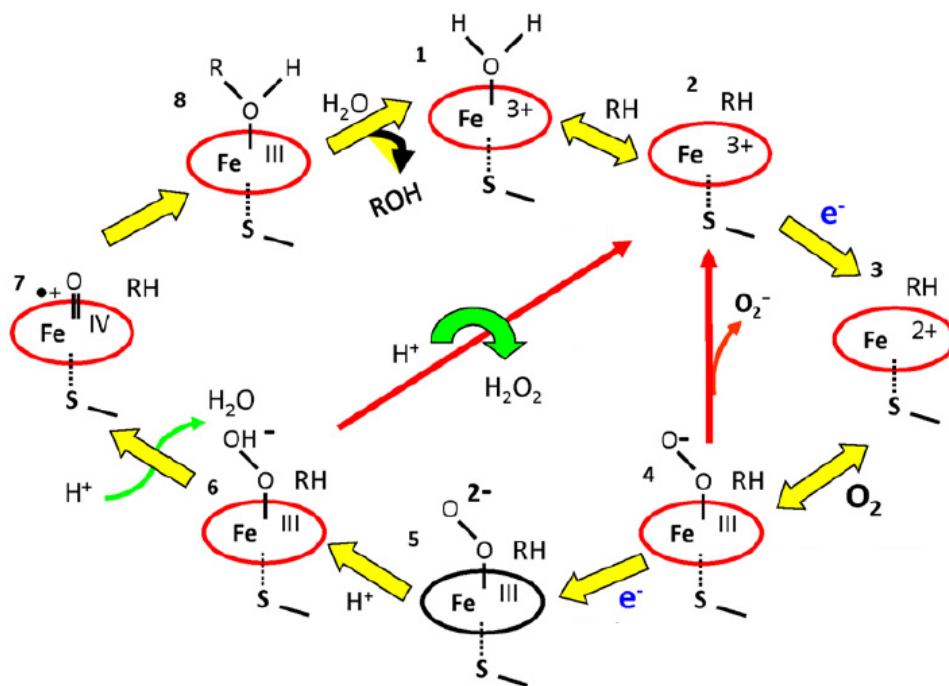
Substrát (R) získává hydroxylovou skupinu, jejíž atom pochází z molekuly kyslíku. Druhý atom kyslíku je redukován a za spotřeby dvou protonů vzniká voda. Dva elektrony potřebné pro jeho redukci nepřímo pocházejí z NADPH nebo NADH. Hlavním donorem elektronů je NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR). Ta elektrony přijímá z NADPH a díky systému dvou flavinů (FMN a FAD) je schopna je postupně předat molekule P450. Dalším možným donorem elektronů je cytochrom b<sub>5</sub>. Ten je redukován svou vlastní NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou, ale může být redukován i CPR. Společně tyto tři enzymy

tvoří elektronový transportní systém (obr. 3), kde CPR a cyt  $b_5$  zároveň pravděpodobně plní roli allosterických modulátorů aktivity cytochromu P450 [16, 20-23].



**Obr. 3:** Schéma elektronového transportu v MFO systému. Převzato z [16] a upraveno.

Oxygenace substrátu probíhá mechanismem znázorněným na obr. 4, str. 16. V klidovém stavu je ion železa hexakoordinovaný v centru porfyrinového kruhu hemu, s nábojem  $3+$  a s navázanou molekulou vody (1). Přiblížením substrátu je voda vytěsněna a železo komplexu se stává pentakoordinovaným (2). Dodáním prvního elektronu je ion železa redukován na náboj  $2+$  (3). Na ion železa se váže molekula kyslíku za vzniku velmi nestabilního komplexu superoxidového anionradikálu, železo je opět hexakoordinováno (4). V této fázi se komplex může rozpadnout (tzv. autooxidace) na superoxidový anion a hem se vrací do stavu před první redukcí (2). Cyklus pokračuje přijetím dalšího elektronu, vzniká „peroxo-P450“ ( $Fe^{3+}OO$ ) $^{2-}$  (5). Ten je protonován na ( $Fe^{3+}OOH$ ) $^-$  (6). Připojení druhého protonu má za následek spontánní heterolytické štěpení vazby kyslík-kyslík a jeden z atomů kyslíku odchází v podobě vody. Výsledkem je tzv. ferrioxenový komplex (7),  $\pi$  kationradikál, někdy nazývaný angl. „Compound I“ [24] (alternativně může vznikat peroxidu vodíku). Radikál je schopen vytrhnout vodík ze substrátu a následně substrát i vázat (8). Tento nestabilní meziprodukt se rozpadá, odchází oxygenovaný produkt a na hem se opět váže molekula vody [25, 26].



Obr. 4: Schéma katalytického cyklu P450. Převzato z [25] a upraveno.

### 1.1.2.3. Interakce cytochromů P450 s jinými cytochromy P450

Už více než dvacet let je známo, že cytochromy P450 jsou schopny interagovat mezi sebou navzájem, a to jak stejné izoformy (homomerní interakce), tak odlišné (heteromerní). Řada studií prokázala, že tvorba komplexů P450 může mít výrazný vliv na oxidaci jejich substrátů [27-33].

#### Homomerní interakce

Zásadní důkazy, že mezi stejnými izoformami cytochromů P450 dochází k přímému kontaktu, byly poskytnuty Kemperem a kol. pomocí metody FRET pro CYP2C2 a CYP2E1 [34, 35]. Jamakhandi a kol. analyzovali kinetiku CYP2E1 a vytvořili model, kdy mohou existovat komplexy binární (CYP-CPR, CYP-CYP), ternární (CYP-CYP-CPR) a kvartérní (CYP-CPR-CYP-CPR). Pouze binární komplex s CPR ale byl katalyticky aktivní [36]. Studie Reed a kol. [37] zkoumala vliv homomerní interakce na katalytickou aktivitu CYP2B4, CYP2E1 a CYP1A2. Tyto enzymy byly rekonstituovány v lipidových systémech v různých koncentracích P450 a CPR. Zatímco kinetika CYP2B4 odpovídala Michaelis-Mentenové (hyperbolická křivka), kinetika CYP2E1 a CYP1A2 nebyla Michaelis-Mentenovská a křivka míry oxidace substrátu jako funkce CYP-CPR měla charakter



sigmoidy. To naznačovalo vysokou míru kooperativity těchto izoforem. Sigmoidální závislost se změnila na hyperbolickou zvýšením iontové síly pufru, což odpovídá předpokladu, že povaha interakce je elektrostatická. Existenci CYP-CYP komplexu autoři dále potvrdili v membráně [37]. V jiné studii byla nalezena alosterická aktivace touto interakcí pro CYP3A4 [38]. Navzdory důkazům o existenci homomerních komplexů není jasné, jakou tyto komplexy hrají roli v reakcích biotransformace xenobiotik.

### **Heteromerní interakce**

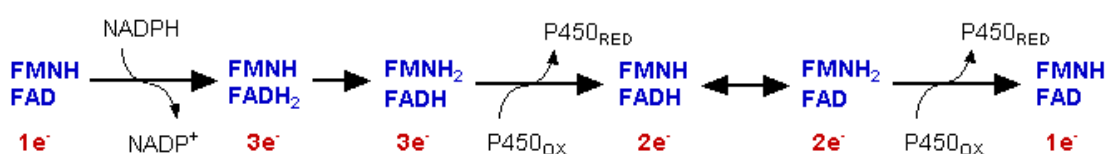
Obdobnou metodikou jako v předchozích studiích [34, 35] Kemper a kol. objevili komplexy heteromerní, a to mezi CYP2C2 a CYP2E1 [39]. V jiné studii byly sledovány enzymy v rekonstituovaných systémech obsahujících CPR, lipid, CYP1A2 a CYP2B4. Metabolismus benzfetaminu katalyzovaný CYP2B4 byl lehce stimulován přítomností CYP1A2, zatímco přeměna 7-pentoxyresorufinu byla výrazně inhibována. Inhibice byla zároveň výraznější při nižších koncentracích CPR, což pravděpodobně znamená kompetici obou izoforem P450 o CPR [30]. Alternativní hypotézu nabídli Backes a kol., kteří došli k závěru, že pravděpodobně vzniká ternární komplex CPR, CYP1A2 a CYP2B4, popřípadě i kvartérní (s dvěma CPR) [29]. Další interakce byla nalezena mezi blízce příbuznými CYP2C9 a CYP2C19, kdy přítomnost CYP2C19 stimulovala hydroxylaci diklofenaku katalyzovanou CYP2C9 [40, 41].

### **1.1.3. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa**

NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR, EC 1.6.2.4) je membránový enzym endoplasmatického retikula. Už v šedesátých letech minulého století bylo zjištěno, že je primárním donorem elektronů pro cytochromy P450 [21, 42]. Její nejčastěji používaný název „cytochrom P450 reduktasa“ je poněkud zavádějící, protože CPR dodává elektrony v mnoha dalších reakcích v organismu, katalyzovaných například hemovými oxygenasami I a II, skvalen monooxygenasou nebo některými desaturasami mastných kyselin [43-46].

### 1.1.3.1. Struktura a funkce NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

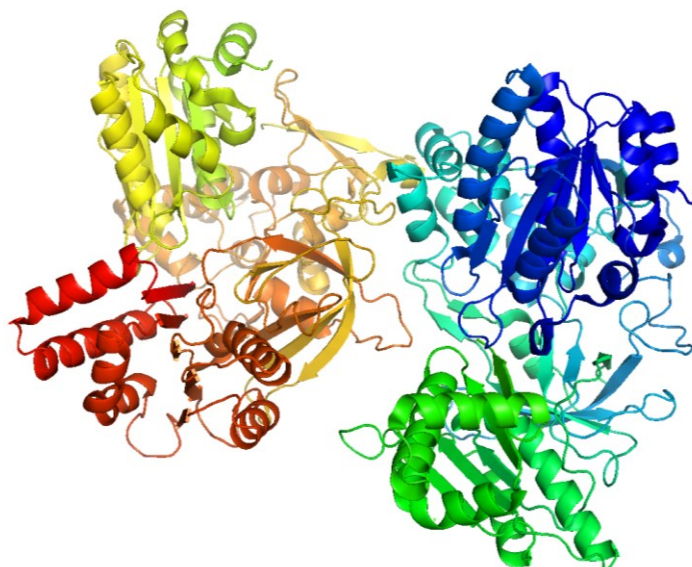
NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR) obsahuje dvě flavinové skupiny - FMN a FAD [47-50]. Díky nim je schopna sloužit jako dělič elektronového páru z NADPH a předávat elektrony po jednom v různých fázích katalytického cyklu P450, přičemž dodání druhého elektronu je považováno za krok, který limituje rychlost celé reakce [10, 51, 52] (obr. 5).



Obr. 5: Přenos elektronů v systému dvou flavinových skupin CPR.

CPR má molekulovou hmotnost 76 až 80 kDa v závislosti na post-translačních modifikacích, druhu organismu, ze kterého pochází, popřípadě na solubilizačním postupu, který byl použit během izolace [21, 50]. Kromě domén vázajících FAD, FMN a NADPH obsahuje i N-terminální hydrofobní doménu o délce 60 aminokyselin, kterou je ukotvena v membráně a která je zásadní pro správnou funkci CPR jako redoxního partnera P450 [22, 48]. Domény FMN a FAD spojuje krátká sekvence klíčová pro přiblížení obou domén tak, aby mohl proběhnout elektronový přenos [53]. Struktura NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy je uvedena na obr. 6, str. 19.

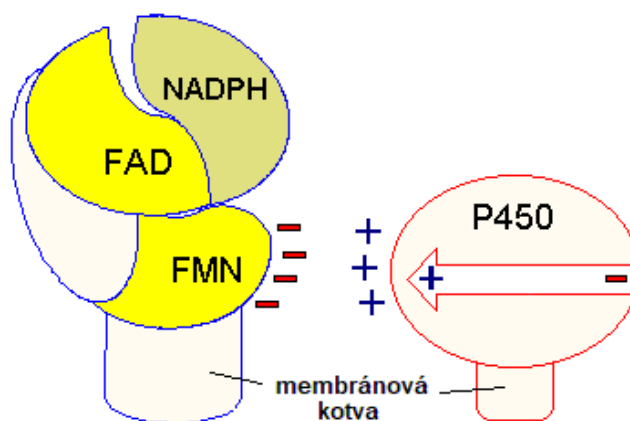
Během vazby NADPH a P450 podstupuje struktura CPR výrazné konformační změny [53-57]. Je to právě vysoká konformační pružnost proteinu, zejména v C-terminálním konci spojovací domény, která umožňuje CPR interagovat s mnoha různými izoformami cytochromů P450 i jiných proteinů [43, 55, 58-61]. Zároveň existuje možnost, že drobné konformační rozdíly regulují interakce CPR s cytochromem b<sub>5</sub>, který CPR rovněž dokáže redukovat [62, 63].



**Obr. 6: Struktura NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy.** *Data převzata z [64] a upravena v programu PyMOL 1.3*

### **1.1.3.2. Interakce NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy s cytochromy P450**

Ačkoli se v lidském genomu nachází desítky genů pro cytochromy P450 [65], gen kódující CPR je jen jeden. Obsah P450 v lidských játrech je odhadem 5- až 25-krát vyšší, než obsah CPR [66-68]. Vzhledem k tomu, že P450 a CPR spolu interagují se stechiometrií 1:1, vyvstává otázka, jakým mechanismem je zajištěn dostatečný přísun elektronů pro P450. Hlavní názorový směr předpokládá, že interakce probíhá mezi kladně nabitým povrchem na P450 v blízkosti hemu a záporně nabitými FMN a FAD/NADPH vázajícími doménami CPR. Povaha interakce je tedy primárně elektrostatická [18, 69, 70] (obr. 7, str. 20). Jiné studie ale navrhují možnost, že dominantní jsou interakce hydrofobní [71, 72]. Kromě elektronového přenosu může CPR působit na P450 allostericky a indukovat změny konformace P450, a tím modulovat rychlost elektronového přenosu [16, 22, 73-75].



**Obr. 7: Elektrostatická interakce mezi povrchy CPR a P450. Převzato z [76] a upraveno.**

I zdánlivě malé změny struktury, jako například záměna jedné aminokyseliny, mohou mít významné důsledky pro schopnost CPR efektivně předat elektron určité izoformě P450. Toto zjištění bylo učiněno při studiu genetické variace v lidském genu pro CPR a jejího efektu na aktivitu CYP1A2 [77], CYP2C19 [77], CYP2D6 [78, 79], a CYP3A4 [79, 80]. Ve studii Miller a kol. studovali efekt 35 zkoumaných mutací CPR. Většina z nich měla negativní dopad na aktivitu CYP1A2 a CYP2C19, ale několik z nich aktivitu dokonce zvýšilo, přičemž tento efekt byl specifický pro danou mutaci CPR a konkrétní izoformu P450 [77]. To by mohlo znamenat existenci unikátních interakčních míst na povrchu CPR pro jednotlivé izoformy P450. Autorům jiné studie se dále podařilo obnovit aktivitu mutantního CPR koexpresí s některými izoformami P450 v hmyzích buňkách. To by nasvědčovalo tomu, že asociace s P450 může pozměnit a stabilizovat konformaci molekuly CPR natolik, že je kompenzován efekt mutace CPR [81]. Dále byla potvrzena důležitost hydrofobní kotvy CPR pro správnou funkci, mimo jiné na experimentech s potkaní CPR bez této domény. V přítomnosti CPR bez kotvy nebyl CYP1A1 aktivní, ačkoli tato CPR ochotně redukovala cytochrom *c* i hemovou oxygenasu I [82]. Experimenty s CPR kvasinek ukázaly, že krystalizovaná, ale přesto aktivní forma, má strukturu velmi odlišnou [83] od konvenční potkaní CPR bez kotvy [47, 84].

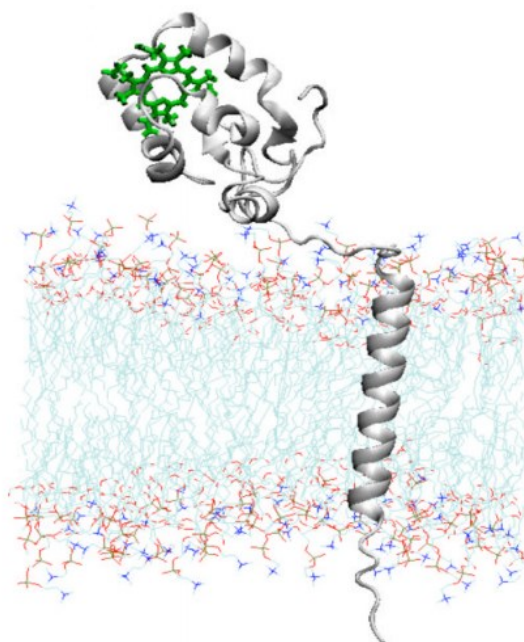
### 1.1.4. Cytochrom b<sub>5</sub>

Cytochrom b<sub>5</sub> je zpravidla integrální hemoprotein cytosolické strany membrány endoplasmatického retikula a účastní se reakcí spojených s přenosem elektronů [23, 25, 85], mimo jiné na cytochromy P450. Byl objeven v roce 1950 v larvách bource morušového [86-88]. Od té doby bylo popsáno velké množství izoform nejen u živočichů, ale také u rostlin, hub a bakterií [85]. Ačkoli většina cyt b<sub>5</sub> je vázána na membrány, existuje i v solubilní formě v cytoplazmě erytrocytů, kde katalyzuje redukci methemoglobinu [89, 90].

#### 1.1.4.1. Struktura a funkce cytochromu b<sub>5</sub>

Kromě role donoru elektronů pro cytochromy P450 se cytochrom b<sub>5</sub> primárně účastní elongace a desaturace mastných kyselin [91, 92], biosyntézy lipidů, plasmalogenů a steroidů, kde předává elektron desaturasám [85, 93, 94].

Cytochrom b<sub>5</sub> je malá (asi 17 kDa) molekula, skládající se ze tří domén a obsahující 6  $\alpha$ -helixů a 5  $\beta$ -skládaných listů. Větší, asi 100 aminokyselin dlouhá N-terminální hydrofilní doména obsahuje hemovou prosthetickou skupinu a je exponována do cytosolu. Nachází se zde jak struktury  $\beta$ -skládaného listu, tak  $\alpha$ -helixu. Menší, asi 25 aminokyselin dlouhá C-terminální hydrofobní doména struktury  $\alpha$ -helixu kotví protein v membráně. Tato doména je v membráně překvapivě velmi mobilní, což pravděpodobně zvyšuje schopnost cyt b<sub>5</sub> interagovat s mnoha různými redoxními partnery [95]. Mezi oběma doménami se nachází třetí, tzv. spojovací doména o délce 14 nebo 15 aminokyselin, která je velmi flexibilní (obr. 8, str. 22) [18, 96-99]. Tato doména poskytuje cyt b<sub>5</sub> flexibilitu potřebnou pro vazbu partnerů na hydrofilní doménu. Experimenty se zkracováním tohoto úseku bylo prokázáno, že k zachování schopnosti cyt b<sub>5</sub> se vázat na CYP2B4 je třeba délky alespoň 7 aminokyselin. Naopak prodlužování úseku nevedlo k žádné změně funkce [100].



**Obr. 8: Struktura cytochromu b<sub>5</sub> získaná pomocí NMR.** Model struktury rekonstituované ve dvojvrstvě 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu in silico. Hem vyznačen zeleně. Převzato z [98].

N-terminální hydrofilní doména váže hemovou skupinu koordinačně kovalentní vazbou na zbytky histidinu (H39 a H63) [101-106]. V nepřítomnosti hemu se tato doména stává méně stabilní a rozvolňuje se, ale po opětovné asociaci s hemem se opět sbalí [107].

#### 1.1.4.2. Působení cytochromu b<sub>5</sub> na funkci cytochromů P450

Již v 70. letech minulého století bylo prokázáno, že cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje metabolismus některých substrátů P450 [108, 109]. Odhalování mechanismu vlivu cyt b<sub>5</sub> na reakce katalyzované P450 pokračuje dodnes a bylo navrženo mnoho různých modelů. Povaha interakce cyt b<sub>5</sub> s P450, podobně jako CPR s P450, je především elektrostatická [110-112].

Novější studie přicházejí se zjištěním, že CPR není vždy zásadně nutná k funkci P450. Henderson a kol. v roce 2013 ukázali pokusy s potkany s delecí genu pro jaterní CPR, že cytochrom b<sub>5</sub> může plnit roli plnohodnotného donoru obou elektronů v katalytickém cyklu P450 [113]. Stiborová a kol. v roce 2016 tuto skutečnost prokázali s rekombinantním lidským CYP1A1 a jeho přeměnou benzo(a)pyrenu [114].

Důležitost cyt b<sub>5</sub> pro *in vivo* metabolismus léčiv a jiných xenobiotik byla potvrzena experimenty na potkanech s vyřazeným genem pro cyt b<sub>5</sub>, u kterých byl metabolismus některých látek, například trifluoromethylkumarinů, benzyloxyresorufinu, ethoxyresorufinu, methoxyresorufinu a pentoxyresorufinu, výrazně zpomalen až zastaven [115-117]. Následující studie výsledek potvrdila i pro řadu cytostatik, např. fenacetin, metoprolol nebo midazolam [118].

Efekt cyt b<sub>5</sub> je velice variabilní a závisí na konkrétní reakci, izoformě P450 a podmínkách reakce. Například CYP17A1 katalyzuje hydroxylaci steroidů, která není přítomností cyt b<sub>5</sub> ovlivněna, zatímco specifická štěpící reakce na vedlejším řetězci steroidů, přeměňující steroidy o 21 uhlících na molekuly o 19 uhlících [119], kterou rovněž katalyzuje CYP17A1, je desetkrát amplifikována [120, 121]. Postulovaných mechanismů, kterými cyt b<sub>5</sub> může stimulovat aktivitu P450, je několik. Tradiční mechanismus předpokládá přímý přenos druhého elektronu na P450 během jeho katalytického cyklu, čímž dochází k urychlení kroku, který určuje rychlost celé katalýzy. [23, 85, 108, 122]. Podle druhého mechanismu tvoří cyt b<sub>5</sub> s P450 komplex, který dokáže převzít dva elektrony během jediné interakce s CPR. Cyt b<sub>5</sub> po redukci P450 prvním elektronem tento elektron rychle odeberá a umožňuje druhou redukci P450 v rychlém sledu [123]. Třetí množností je působení cyt b<sub>5</sub> jako inhibitoru rozpojení komplexu (angl. „uncoupling“) se superoxidovým anionradikálem [124-126]. Dále bylo prokázáno, že apo-cyt b<sub>5</sub> (bez hemu) zvyšuje aktivitu některých P450, například CYP3A4, CYP2C9 nebo CYP17 [44, 127-129]. Alespoň v některých případech tedy cyt b<sub>5</sub> může ovlivňovat P450 i bez přenosu elektronu [27, 130-133], působí zřejmě jako allosterický modulátor. Navázání cytochromu b<sub>5</sub> způsobuje konformační změny v molekule P450 – v přístupovém kanálu pro substrát a v aktivním centru [10, 23, 27, 44, 134-138]. Cytochrom b<sub>5</sub> kromě stimulace může reakce také inhibovat kompeticí s CPR o vazebné místo na molekule P450, nebo nemusí mít žádný vliv [25, 115, 130, 139-143]. Pozorována byla i změna poměru produktů reakce, například při metabolismu estradiolů CYP 3A5 [140].

Potenciálně nebezpečným vlivem je zvýšení množství vznikajících kyslíkových radikálů [144], které výrazně poškozují (peroxidují) lipidové membrány [145]. V rekonstituovaných systémech s lipidem a CPR měla přítomnost cyt b<sub>5</sub> za následek vznik superoxidových a hydroxidových radikálů, což vedlo ke zlomům dvouvláknové DNA *in vitro* [146, 147]. Za pozornost stojí fakt, že k efektu nebylo třeba přítomnosti CPR, což znamená, že zásadní roli hrál cyt b<sub>5</sub>.

### 1.1.5. NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasa

NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasa (b<sub>5</sub>R, cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa, EC 1.6.2.2) je flavinový enzym patřící do podrodiny transhydrogenas. Katalyzuje jednoelektronovou redukční reakci kationu železa v hemovém kofaktoru cytochromu b<sub>5</sub> za využití NADH, přičemž zásadním funkčním prvem pro přenos elektronu je FAD.

Tento enzym existuje ve dvou formách. Dominantní isoformou je amfipatická mikrosomální varianta, vázaná na membránu. Ta obsahuje malou hydrofobní doménu (cca 3 kDa) ukotvující protein v membráně a velkou katalytickou doménu (cca 31 kDa). Druhou isoformou je rozpustný cytoplasmatický protein bez membránové části – tedy obsahující pouze katalytickou doménu s FAD. Obě varianty jsou kódovány stejným genem a jsou produkty alternativního sestřihu [148]. Amfipatická isoforma se nachází v cytoplasmatické membráně a membránách endoplasmatického retikula, mitochondrií, Golgiho aparátu, jádra, peroxisomů, sarkoplasmatického retikula a synapsí neuronů [149]. Společně s cytochromem b<sub>5</sub> se účastní např. detoxifikačních reakcí [150, 151], bioaktivace léčiv a karcinogenů [152], elongace a desaturace mastných kyselin [91, 92, 153], metabolismu cholesterolu [93, 94] a syntézy steroidů [154]. Naproti tomu solubilní forma doprovází rozpustnou formu cytochromu b<sub>5</sub> v erytrocytech savců, kde se podílí na redukci methemoglobinu na hemoglobin [155, 156], čímž je zodpovědná za regulaci hladiny methemoglobinu v těchto buňkách.

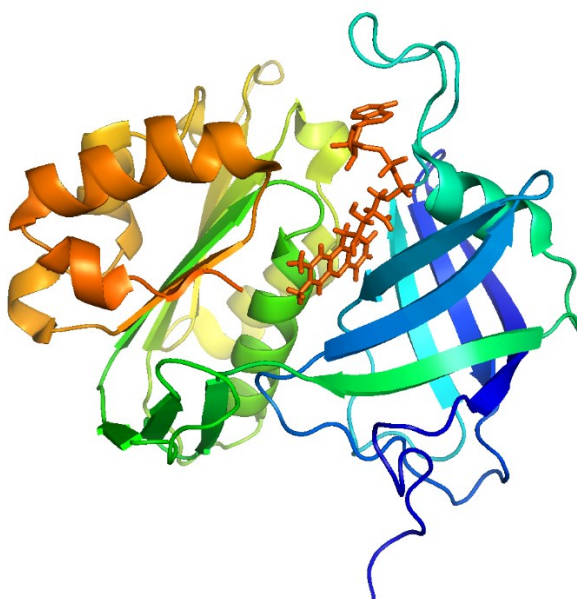
Cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa byla, obdobně jako cyt b<sub>5</sub>, nalezena ve velkém počtu eukaryotních organismů – v savcích (včetně člověka), ptácích, rybách, obojživelnících, v rostlinách a houbách, ale i v kvasinkách a prvocích [149].

#### 1.1.6.1. Struktura NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy

Trojrozměrná struktura b<sub>5</sub>R byla poprvé vyřešena v roce 1987, a to pomocí rentgenové krystalografie proteinu získaného z prasečích jater [157]. Dnes databáze proteinů PDB [158, 159] nabízí řadu strukturních modelů enzymu, a to především varianty prasečí, lidské a potkaní. Z důvodu vysoké obtížnosti krystalizace membránové formy proteinu se jedná o strukturní modely solubilní, nebo membránové formy s odebranou membránovou kotvou.



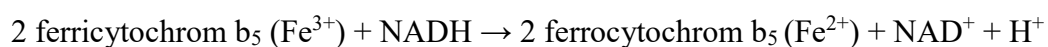
Ve struktuře b<sub>5</sub>R (obr. 9) lze rozlišit dvě domény: N-terminální doménu vázající FAD (I34 až R143) a NADH vázající doménu (K173 až F301). Mezi těmito doménami se nachází pružná spojovací doména (G144 až V172) [160, 161]. Tři antiparalelní β-skládané listy spojovací domény udržují obě funkční domény v dostatečné vzdálenosti a správné orientaci. Vzájemná orientace domén je zásadní pro správný přenos elektronu z NADH na FAD. Doména s FAD se skládá ze šesti antiparalelních β-skládaných listů a jednoho α-helixu v pořadí 5β/1α/1β. Doména vázající NADH obsahuje pět β-skládaných listů a čtyři α-helixy [162, 163].



**Obr. 9: Struktura cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy.** Oranžově vyznačena struktura FAD. Data převzata z [164] a upravena v programu PyMOL 1.3.

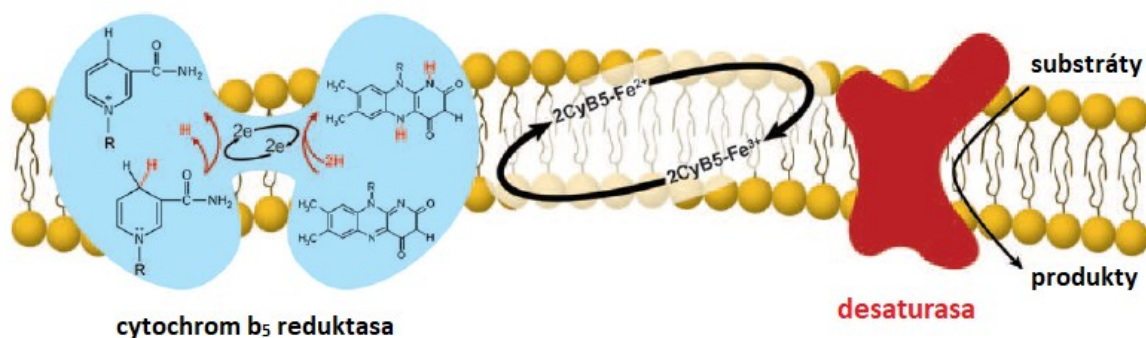
#### 1.1.6.2. Mechanismus funkce NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy

Typickou reakcí katalyzovanou NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasou *in vivo* je jednoelektronová redukce hemového železa cytochromu b<sub>5</sub> [149]. Reakci lze shrnout takto:



Kromě této typické reakce byla pro tento enzym *in vitro* pozorována katalýza redukce jiných látek, např. cytochromu c [165, 166] a jiných látek obsahujících redukovatelné železo, jako například ferrikyanidu. Dále b<sub>5</sub>R redukuje například dehydroaskorbát nebo chinony, ale nejpřirozenějším substrátem je hem cytochromu b<sub>5</sub> [149]. U b<sub>5</sub>R bylo pozorováno i využití NADPH místo NADH [167], což je ale doprovázeno výrazným snížením efektivity reakce. Reduktasa s mutací D239T může dokonce preferovat NADPH [168].

Bylo potvrzeno, že b<sub>5</sub>R tvoří komplex s cyt b<sub>5</sub> v poměru 1:1. Elektrostatické interakce mezi zbytky lysinu b<sub>5</sub>R (K42, K126, K163 a K164) a karboxylovými skupinami aminokyselin cyt b<sub>5</sub> (E47, E48, E52, E60, D64) zajišťují pevné propojení proteinů a umožňují elektronový přenos [169, 170]. Asada a kol. [171] navrhli, že na interakci se navíc podílí i R92, R143 a K295 z b<sub>5</sub>R. Elektronový přenos probíhá díky rozdílu redoxních potenciálů FAD a NAD (asi -60 mV). Tento rozdíl umožňuje přenos jednoho až dvou elektronů na elektronový akceptor po směru elektrochemického gradientu [172]. Pořadí dějů je následovné: 2 e<sup>-</sup> z NADH → b<sub>5</sub>R → FAD → redukce 2 cyt b<sub>5</sub> → přenos e<sup>-</sup> na desaturasu (obr. 10), cytochrom P450 nebo methemoglobin. Redukce FAD je limitujícím krokem pro rychlost této řetězové reakce [173].



**Obr. 10: Schéma přenosu elektronů komplexem b<sub>5</sub>R.** Na isoalloxazinový kruh FAD jsou přeneseny dva elektrony z NADH. Flavinová doména b<sub>5</sub>R projde konformační změnou, umožňující interakci s hemovou skupinou cytochromu b<sub>5</sub> (CyB5). Dva železití kationty jsou redukovány na kationty železnaté. Cytochrom b<sub>5</sub> dále pokračuje redukcí cílového proteinu, v tomto případě desaturasy. Převzato z [149] a upraveno.

Domény b<sub>5</sub>R obsahují vysoce konzervované strukturní motivy zásadní pro správnou funkci enzymu. Například motiv <sup>181</sup>GxxGxxP<sup>186</sup> vytváří v doméně vázající NADH plochou strukturu, která umožňuje dosednutí NADH ve správné orientaci [174]. Na nikotinamidovou skupinu NADH působí protein hydrofobními interakcemi, který se účastní G181 a G183. Isoalloxazinový kruh FAD je vázán dvěma vodíkovými vazbami na T185 a hydrofobními interakcemi je za účasti G182 a P186 přitahováno do dostatečné vzdálenosti k NADH [175, 176].

## 1.2. Chemické síťování proteinů

Protože mezi funkcí proteinu a jeho strukturou existuje velmi úzký vztah, je studium struktury proteinů naprosto zásadní. Nejdůležitější metodou je rentgenová krystalografie, dále pak nukleární magnetická rezonance (NMR), v posledních letech i prudce se rozvíjející kryoelektronová mikroskopie [177, 178]. Takto získané struktury ale v důsledku nedostatků těchto metod zpravidla nevyovídají spolehlivě o nativní struktuře proteinů. Strukturální data slouží jako výchozí bod pro tvorbu teoretických modelů skutečných struktur. Pro objasnění protein-proteinových interakcí je proto třeba kombinace s dalšími metodami. Užitečným doplňujícím přístupem pro studium proteinových komplexů může být mapování strukturálních interakcí kovalentním vázáním blízkých aminokyselinových zbytků, tzv. chemické síťování.

Síťování dokáže zafixovat transientní komplexy, které za normálních okolností existují jen zlomek sekundy nebo jsou za podmínek analýzy nestabilní. Díky pokrokům na poli hmotnostní spektrometrie a kryoelektronové mikroskopie došlo v posledních několika letech k výraznému nárůstu počtu studií kombinujících tyto metody [179]. Síťování dává informaci o vzdálenosti dvou proteinů nebo skupin, přičemž je možno zpravidla lokalizovat konkrétní aminokyseliny, které byly propojeny, a tak i identifikovat konkrétní domény. Tato data je dále možné použít jako parametr při zpřesňování strukturálních modelů [179].

Při síťování činidlo nejprve reaguje s vedlejší skupinou proteinu za vzniku intermediátu, který může kovalentně reagovat s druhou molekulou proteinu a vytvořit agregát, nebo reagovat intramolekulárně se sousední skupinou na tomtéž peptidovém řetězci. Při síťovacích experimentech třeba udržovat vhodnou koncentraci činidla, zpravidla v řádech mikromolů, aby se předešlo nežádoucím vedlejším reakcím. Zároveň se tak předejde nadměrnému narušení trojrozměrné struktury proteinů [180].

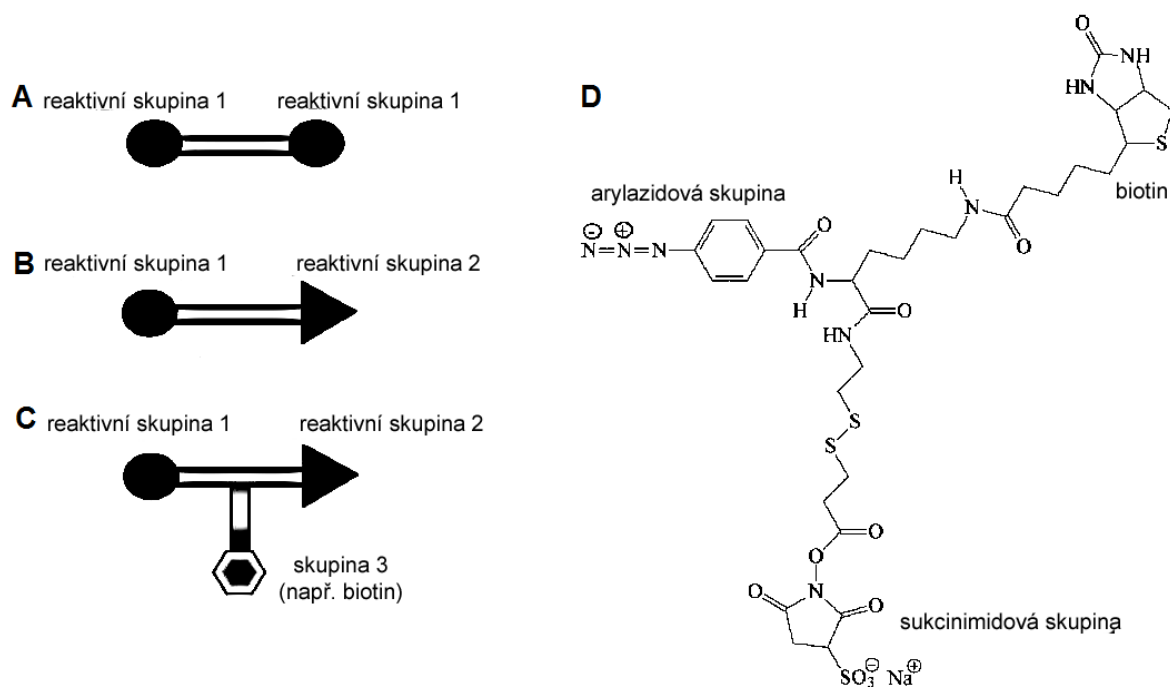
### 1.2.1. Typy síťovacích činidel

Síťovací činidla lze rozdělit na homobifunkční, heterobifunkční či trifunkční, a dále na tzv. činidla s nulovou délkou (angl. „zero-length cross-linkers“) [180]. Homobifunkční činidla obsahují dvě identické funkční skupiny, mezi nimiž se nachází část molekuly o definované délce, tzv. raménko (angl. „spacer“) (obr. 11 A, str. 29). Takové činidlo je tedy

schopno kovalentně spojit dva stejné postranní řetězce aminokyselin. Jejich hlavní nevýhodou je sklon k tvorbě velkého množství nežádoucích a nepředvídatelných vedlejších produktů [181]. Heterobifunkční činidlo obsahuje dvě různé reakční skupiny (obr. 11 B), takže je schopno propojit různý postranní řetězce.

Nejmenší síťovací činidla jsou tzv. činidla s nulovou délkou. Ta umožňují kovalentně propojit dva proteiny přímo – tedy bez vnesení propojovacího raménka.

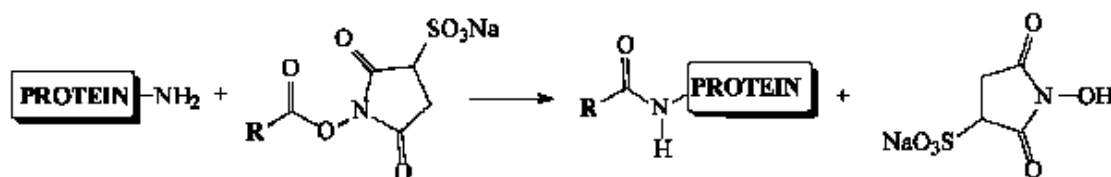
Zvláštní skupinu tvoří trifunkční činidla (obr. 11 C), obsahující kromě dvou různých reaktivních skupin (jako heterobifunkční činidla) navíc třetí, zpravidla nereaktivní, skupinu. Tato skupina je schopna se specificky vázat na jiný protein nebo např. médium pro afinitní chromatografii, čehož se využívá pro snadnou purifikaci. Příkladem takové třetí skupiny je biotin [182, 183]. Jeden ze zástupců této skupiny je sulfo-SBED (obr. 11 D), obsahující kromě azidové a sukcinimidové skupiny i biotin.



**Obr. 11: Síťovací činidla.** A - homobifunkční činidlo, B - heterobifunkční činidlo, C - trifunkční činidlo, D - trifunkční činidlo, sulfo-SBED. Převzato z [180] a upraveno.

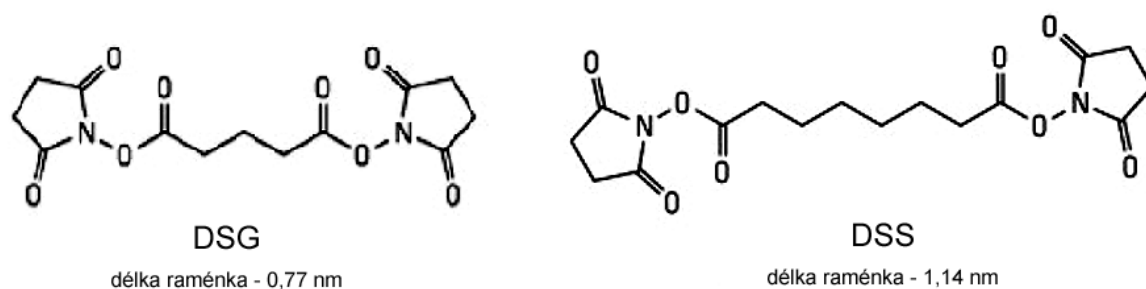
Existuje celá řada funkčních skupin, využívaných pro chemické síťování. Lze je rozdělit podle toho, se kterými skupinami na proteinu reagují. Pro vázání aminoskupin (-NH<sub>2</sub>) se využívá N-hydroxysukcinimidových esterů (NHS), někdy ve formě sulfo-NHS,

které mají vyšší rozpustnost. NHS estery tvoří stabilní amidové a imidové vazby s primárními a sekundárními aminy, například  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu (obr.12).



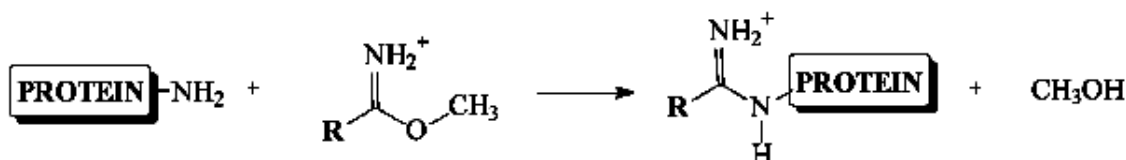
**Obr. 12: Reakční schéma sulfo-NHS esteru s aminoskupinou. Převzato z [180] a upraveno.**

Příkladem homobifunkčních NHS činidel jsou disukcinimidylglutarát (DSG) a disukcinimidylsuberát (DSS), které se liší délkou raménka (obr. 13).

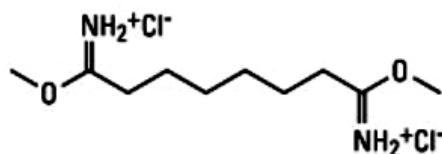


**Obr. 13: Vzorce DSG a DSS. Převzato z [184] a upraveno.**

Dalšími látkami vázajícími aminy jsou imidoestery (obr. 14). K síťování proteinů se používají už více než padesát let [185] a na rozdíl od jiných činidel jsou vysoce specifické k primárním aminům. Při fyziologickém pH jsou ale podstatně méně efektivní než NHS [186]. Příkladem je DMS (dimethylsuberimidát, obr. 15, str. 31)

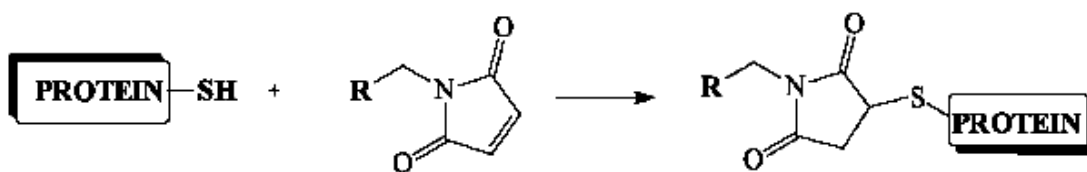


**Obr. 14: Reakční schéma imidoesteru s aminoskupinou. Převzato z [180] a upraveno.**



Obr. 15: Vzorec DMS. Převzato z [184].

Pro vazbu sulfhydrylových skupin (-SH) je využíváno maleinimidů (obr. 16). Při pH mezi 6,5 a 7,5 je reakce maleinimidu velmi specifická k sulfhydrylové skupině [187, 188], v bazičtějším prostředí ale reaguje i s aminy [189]. Při zvyšování pH zároveň dochází k hydrolyze maleinimidové skupiny a její deaktivaci vůči sulfhydrylové skupině [180]. Při síťování -SH skupin cysteinu situaci komplikuje fakt, že tyto skupiny se často účastní tvorby disulfidových můstků. Redukcí těchto můstků za účelem vytvoření propojitelných -SH skupin ale může dojít k narušení trojrozměrné struktury proteinu.



Obr. 16: Reakční schéma maleinimidu se sulfhydrylovou skupinou. Převzato z [180] a upraveno.

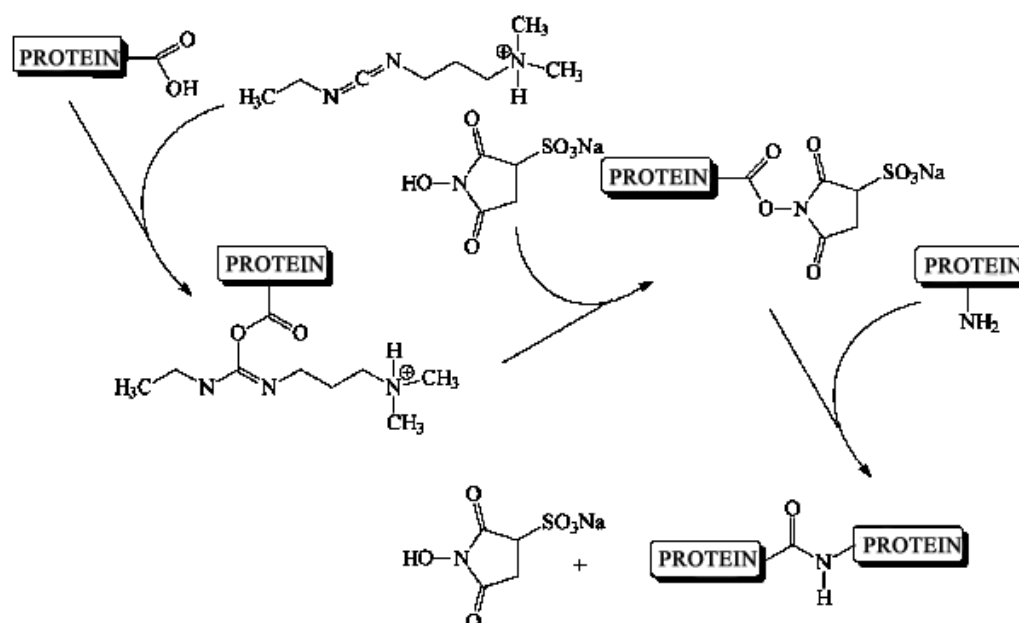
Kromě maleinimidů se k vázání sulfhydrylových skupin používají haloacetylová činidla (jodoacetyl nebo bromoacetyl, obr. 17), vytvářející v mírně bazickém prostředí thioetherové vazby, a pyridyldisulfidy (obr. 17), které tvoří snadno redukovatelné disulfidové můstky [184].



Obr. 17: Vzorce haloacetylu (jodoacetyl) a pyridyldisulfidu (pyridyldithiol).

Převzato z [184] a upraveno.

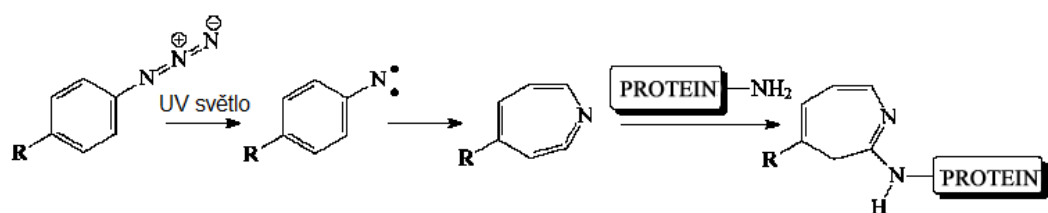
Nejběžnějším typem činidel s nulovou délkou jsou karbodiimidy, které zprostředkovávají mimo jiné tvorbu amidové vazby mezi karboxylovou a amino- skupinou [190]. Nejznámějším zástupcem je EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid). EDC je zpravidla používán v kombinaci se sulfo-NHS (N-hydroxysulfosukcinimid), který stabilizuje intermediát reakce a vede ke zvýšení výtěžku reakce (obr. 18) [191].



**Obr. 18: Reakční schéma činidla EDC v kombinaci se sulfo-NHS vedoucí k propojení proteinů. Síťování probíhá s aminoskupinami nebo karboxylovými skupinami. Převzato z [180] a upraveno.**

Zajímavým typem funkčních skupin síťovacích činidel jsou skupiny fotoreaktivní. Tyto skupiny jsou aktivovány dopadem UV záření a reagují velmi nespecificky. Je důležité, aby skupina byla za tmy stabilní, ale aby se efektivně rozpadala ve světle takové vlnové délky a intenzity, aby nedocházelo k poškození proteinu. Hojně používané jsou arylazidy. Arylazid se při fotolýze přeměňuje na velmi nestabilní nitrenový biradikál, který nespecificky napadá chemické vazby cílové molekuly (obr. 19, str. 33). Dochází například k adici na dvojnou vazbu nebo inserci do vodíkových vazeb [192]. Nevýhodou arylazidů je fakt, že jsou aktivovány krátkovlnným UV zářením (< 280 nm) [180].

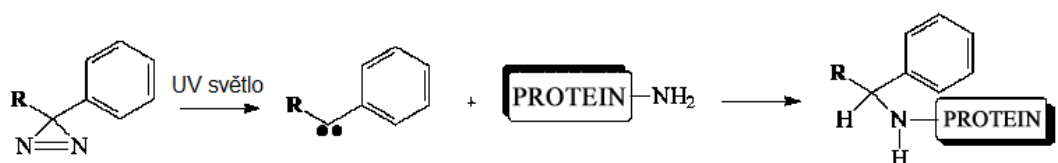




**Obr. 19: Reakční schéma fotolýzy arylazidu a vazby na aminoskupinu.**

*Převzato z [180] a upraveno.*

Diaziriny jsou relativně stabilní fotoreaktivní činidla, aktivovaná světlem vlnové délky přibližně 360 nm, a vytváří vysoce reaktivní karbenový biradikál, atakující vazby heteroatom-H nebo C-H (obr. 20). Fotolýzou ale bohužel mohou vznikat diazoizomery, silná alkylující činidla způsobující nežádoucí reakce [193].



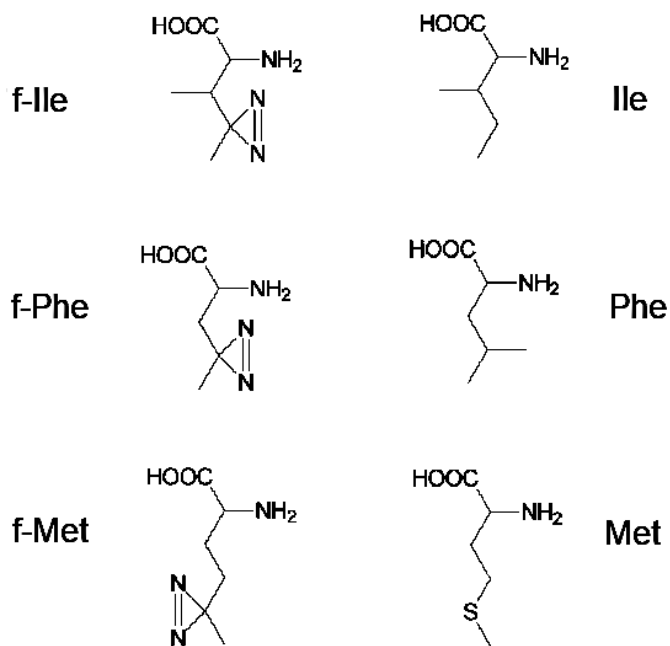
**Obr. 20: Reakční schéma fotolýzy diazirinu a vazby na aminoskupinu.** *Převzato z [180] a upraveno.*

### 1.2.2. Fotoaktivovatelné proteiny

Alternativní variantou chemického síťování je použití rekombinantních proteinů obsahujících fotoreaktivní skupinu. V takovém případě je síťovacím činidlem přímo samotný, tzv. fotoaktivovatelný, protein. Přístupy k inkorporaci fotoreaktivních skupin do proteinové struktury jsou v zásadě tři: bez modifikace translačního aparátu buňky, tzv. rozšíření jejího genetického kódu nebo bezbuněčná exprese.

První přístup využívá přirozeného translačního aparátu buňky k inkorporaci modifikované aminokyseliny do sekvence. Ačkoli tyto aminokyseliny obsahují fotoreaktivní skupinu, jsou dostatečně strukturně podobné svým přirozeným analogům, takže jsou rozeznávány přirozenými aminoacyl-tRNA-synthetasami (obr. 23, str. 35). Produkce

rekombinantního proteinu probíhá v médiu obsahujícím nepřirozenou aminokyselinu a ochuzeném o přirozenou aminokyselinu [180, 194]. Příkladem fotoreaktivních analogů proteinogenních aminokyselin jsou foto-methionin, foto-fenylalanin a foto-isoleucin (obr. 21).

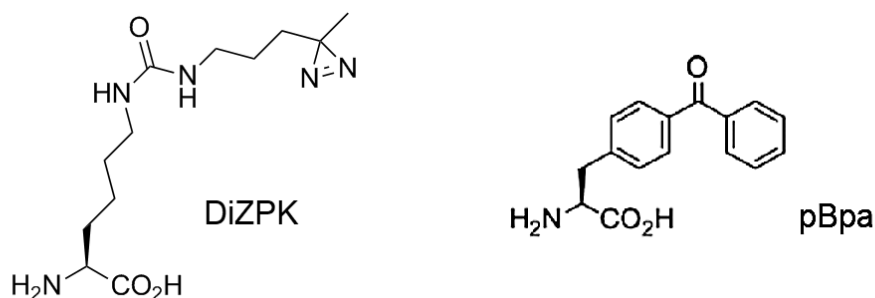


**Obr. 21: Fotoreaktivní analogy přirozených aminokyselin.**

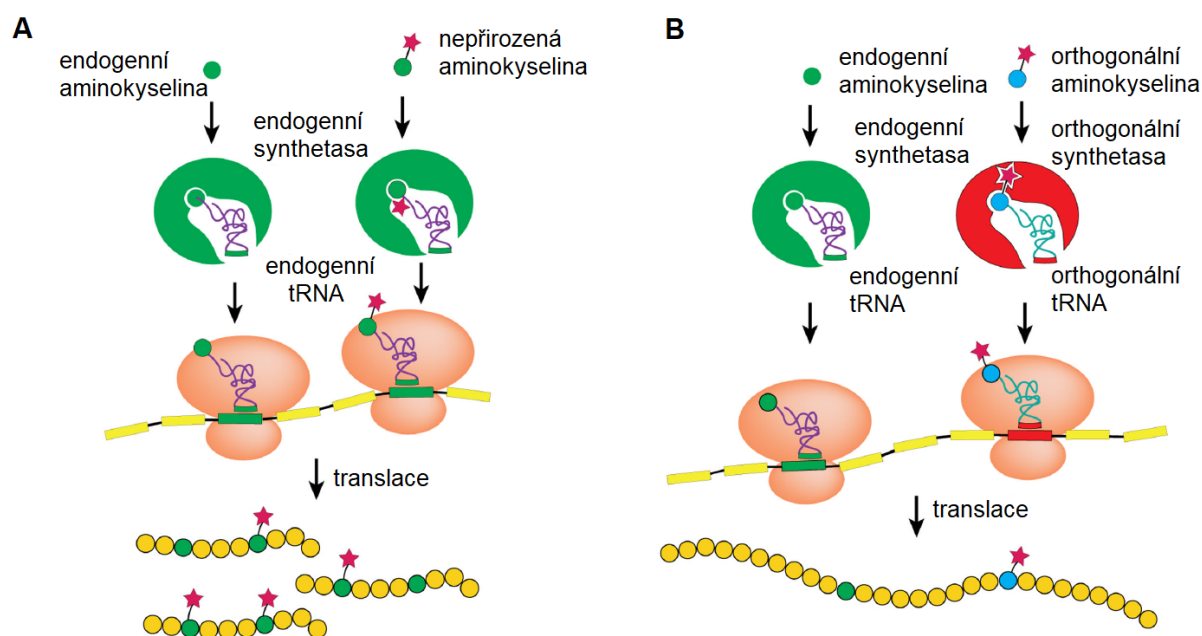
*f-Ile: foto-isoleucin, f-Phe: foto-fenylalanin, f-Met: foto-methionin*

Druhý přístup vyžaduje modifikaci genomu buňky introdukcí nových genů pro aminoacyl-tRNA-synthetasu a její tRNA, jejichž expresí získá buňka zcela nový, tzv. orthogonální pár enzymu a tRNA. Ten neinterferuje s endogenními páry, což je zajištěno výběrem zdrojového organismu, který musí být dostatečně evolučně vzdálený. Orthogonální tRNA je kódována stop-kodonem UAG, který je přidán do přesného místa v genu zkoumaného proteinu. Nová aminoacyl-tRNA-synthetasa rozeznává nepřirozenou fotoreaktivní aminokyselinu a nerozeznává žádnou přirozenou, k čemuž jsou buňky selektivně kultivovány. Produkce proteinu probíhá v médiu obsahujícím nepřirozenou aminokyselinu. Výsledkem je tedy protein s nepřirozenou aminokyselinou na přesně známém místě v sekvenci (obr.23 B, str. 35) [195-198]. Příkladem aminokyselin, které jsou

k této metodě používány, je DiZPK obsahující diazirinovou skupinu [199] a pBpa (*p*-benzoyl-L-fenylalanin), obsahující benzofenon, používaný k vazbě DNA [200] (obr. 22).



**Obr. 22: Aminokyseliny DiZPK a pBpa.** Inkorporace do proteinu probíhá pomocí exogenního páru *tRNA* synthasy a *tRNA*.



**Obr. 23: Metody inkorporace fotoreaktivních aminokyselin do proteinu.**

*A: Endogenní translační aparát začleňuje exogenní aminokyselinu do sekvence.*

*B: Geneticky kódované fotoreaktivní aminokyseliny inkorporovány pomocí orthogonálního páru aminoacyl-*tRNA*-synthetasy a *tRNA*.*

*Převzato z [201] a upraveno.*

Třetím způsobem získání mutantních proteinů je exprese *in vitro*, také nazývaná *in vitro* translace nebo bezbuněčná (angl. „cell-free“) exprese. Výhodou je její rychlost a relativní nenáročnost, protože nevyžaduje genovou transfekci, kultivaci buněk ani

komplikovanou purifikaci proteinu. Nevýhodou je nízké množství připraveného proteinu oproti expresi v buňkách [202].

Metoda bezbuněčné exprese vyžaduje nukleovou kyselinu (mRNA nebo DNA), kódující daný protein, a transkripční a translační aparát, jehož hlavní komponenty jsou získány extrakcí z buněk. Jedná se o RNA polymerasy, ribosomy, aparáty pro skládání proteinů, tRNA, enzymové kofaktory, aminokyseliny a molekuly sloužící jako zdroj energie. Všechny potřebné složky aparátu jsou získány z buněčného lyzátu. Buněčné membrány jsou odstraněny a je zachován pouze cytosol a organely. První systémy připravené za tímto účelem pocházely z prokaryotických buněk, ale dnes existují i hmyzí a savčí včetně lidských. Eukaryotní systémy poskytují oproti bakteriálním správné skládání eukaryotních proteinů a posttranslační modifikace [203-205].

Zatímco lyzáty z *E. coli* neobsahují endogenní genetickou informaci, často používané lyzáty z králičích retikulocytů nebo hmyzích buněk obsahují endogenní mRNA, které mohou být translatovány během syntézy cílového proteinu. Tyto lyzáty jsou proto předem ošetřeny směsí nukleas, aby docházelo pouze k žádoucí translaci exogenní nukleové kyseliny. Po odstranění endogenních genů a transkriptů jsou dodány inhibitory RNas, aby nedocházelo k degradaci žádoucí templátové mRNA [202, 203].

Expresní systémy jsou schopny provádět syntézu proteinu buď z DNA templátu (transkripce i translace), nebo z mRNA templátu (translace). DNA pro transkripci *in vitro* může být lineární, cirkulární plasmidová, nebo fragment z PCR (polymerasová řetězová reakce). Molekula ale musí obsahovat promotorovou sekvenci před genem, který bude transkribován. DNA-dependentní RNA polymerasy (RNA Pol) tuto sekvenci rozpoznávají a vážou se na ně, aby mohla být zahájena transkripce. Většina RNA Pol má více podjednotek a vyžaduje řadu proteinových faktorů ke správné funkci, což znesnadňuje jejich využití z důvodu složité rekonstituce systému [206]. RNA Pol bakteriofágů, například T3 a T7, jsou monomerní a nevyžadují k translaci, včetně terminace a uvolnění templátu, žádné proteinové faktory. Jsou proto vhodné pro bezbuněčnou expresi [203]. Zatímco transkripční aparát může být rekonstituován z purifikovaných molekul, translační aparát je příliš komplexní a je získáván pouze z buněčných extraktů. Za účelem zvýšení výtěžku proteinu jsou zpravidla zvnějšku přidávány aminokyseliny a molekuly dodávající energii [203].

## 2. Cíl práce

Primárním cílem práce bylo připravit postup purifikace NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy z jaterní tkáně králíka domácího kombinací chromatografických metod a enzym purifikovat.

Druhým cílem práce bylo ze stejné jaterní tkáně purifikovat NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Použité přístroje

#### **Centrifugy:**

Beckman Optima XPN-90 (Beckman Coulter), Beckman Optima LE-80K (Beckman Coulter), K-23 (Janetzki), K-24 (Janetzki), miniSpin (Eppendorf), Beckman Allegra X-22R (Beckman Coulter), Eppendorf 5415 R (Eppendorf), HERMLE Z 323 K (Hermle Labortechnik)

#### **Spektrofotometry:**

Specord 250 Plus (Analytik Jena), Agilent Cary 60 UV-Vis (Agilent), čtečky mikrodestiček Sunrise (Tecan) a Safire<sup>2</sup> (Tecan)

#### **Ostatní:**

kapalinový chromatograf ÄKTA Prime Plus se softwarem Primeview 5.31, nástavcem Superloop a adaptérovou kolonou XK16/20 (GE Healthcare); aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad); zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic (Bio-Rad); inkubátor MINI Dry Bath (Eppendorf); homogenzátory podle Pottera a Elvehjema; ultrafiltrační cely Amicon s vyměnitelnými membránami DIAFLO PM-10 a PM-30 (Millipore), filtr Millipore Express Plus 0,22 µm (Millipore), vakuová pumpa Laboport Mini (KNF), vortexy Genius 3 (IKA) a MA1 Minishaker (IKA), magnetické míchačky RH Basic 2 (IKA) a Monotherm (Variomag), pH metr HI2211 (HANNA Instruments), automatické pipety Nichipet EX (Nichiryo) a Research Plus (Eppendorf), analytické váhy Discovery (OHAUS), PESA 40SM-200A (PESA), ER-120A, (A&D Company), HM-200 (A&D Company), AEA-100G (Adam Equipment), váhy EK-600H (A&D Company), Kern 440-35N (Kern und Sohn), Kern 440-35A (Kern und Sohn), Kern EW (Kern und Sohn)

## 3.2. Materiál a chemikálie

### **BIO BASIC, Inc., USA**

Ethylendiamintetraoctová kyselina

### **BIO-RAD, USA**

Precision Plus Protein Standard DUAL Color, Precision Plus Protein Standard DUAL Xtra, Precision Plus Protein Standard Unstained

### **Farmakon Olomouc, ČR**

fenobarbital sodný

### **Fluka, Švýcarsko**

Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB); akrylamid; dodecylsulfát sodný; 2-merkptoethanol; N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS); N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED); tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris); protaminsulfát;  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E); 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)

### **GE Healthcare, Švédsko**

HiPrep DEAE 16/10 FF (Diethylaminoethyl-Sepharose), HiPrep CM 16/10 FF (Carboxymethyl-Sepharose), HiPrep SP 16/10 FF (Sulfopropyl-Sepharose), 2',5'-ADP-Sepharosa 4B

### **Lachema Brno / Lachner / Lach-Ner, Česká republika**

dihydrogenfosforečnan draselný; disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny; glycerol; glukosa; sacharosa; methanol; ethanol; kyselina octová; uhličitan sodný; hydrogenuhličitan sodný; vínan sodný; chlorid sodný; chlorid draselný; chloroform; ferrikyanid sodný; bromfenolová modř; dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného; dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného; hydroxid sodný; hydroxid draselný; peroxodisíran amonný; glycin; cholát sodný

### **Linde, Česká republika**

oxid uhelnatý, kapalný dusík, plynný dusík

### **Roche, USA**

Complete ULTRA Tablets (proteasové inhibitory)

### **Sigma-Aldrich, Inc., USA**

Brij 35; 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA); 5'-ADP agarosa

### **Sevapharma, a.s, Česká republika**

hovězí sérový albumin (BSA)

### **Thermo Fisher Scientific, USA**

Pierce BCA Protein Assay Kit

## **3.3. Použité pufrы a jiné roztoky**

### **Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu pomocí BCA**

#### Roztok A:

1 % BCA (w/v); 0,4 % NaOH (w/v); 0,95 % NaHCO<sub>3</sub> (w/v); 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O (w/v);  
0,16 % vlnan sodný (w/v); pH 11,25

#### Roztok B:

4 % CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (w/v)

### **Roztoky pro elektroforézu v prostředí SDS**

#### Pufr A:

0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8

#### Polymerační roztok:

29 % akrylamid (w/v); 1 % BIS (w/v)

#### Pufr B:

0,125 M Tris-HCl; 0,1 % SDS (w/v); 0,0006 % bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

#### Elektrodový pufr:

0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3



Vzorkový pufr (čtyřikrát koncentrovaný):

0,025 M Tris-HCl; 8 % SDS (w/v); 40 % glycerol (v/v); 20 % 2-merkптоethanol (v/v);  
0.004 % bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

Barvicí lázeň:

0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46 % ethanol (v/v);  
9,2 % kyselina octová (v/v)

Odbarvovací lázeň:

25 % ethanol (v/v); 10 % kyselina octová (v/v)

Separáčnй gel (15%):

1,1 ml vody; 1,3 ml pufru A; 2,5 ml 29 % akrylamid (w/v) s 1 % BIS (w/v);  
50  $\mu$ l 10 % SDS (w/v); 2  $\mu$ l TEMED; 50  $\mu$ l 10 % APS (w/v)

Separáčnй gel (12 %):

1,6 ml vody; 1,3 ml pufru A; 2,0 ml 29 % akrylamidu (w/v) s 1 % BIS (w/v);  
50  $\mu$ l 10 % SDS (w/v); 2  $\mu$ l TEMED; 50  $\mu$ l 10 % APS (w/v)

Separáčnй gel (10 %):

1,9 ml vody; 1,3 ml pufru A; 1,7 ml 29 % akrylamidu (w/v) s 1 % BIS (w/v);  
50  $\mu$ l 10 % SDS (w/v); 2  $\mu$ l TEMED; 50  $\mu$ l 10 % APS (w/v)

Separáčnй gel (8 %):

2,3 ml vody; 1,3 ml pufru A; 1,3 ml 29 % akrylamidu (w/v) s 1 % BIS (w/v);  
50  $\mu$ l 10 % SDS (w/v); 3  $\mu$ l TEMED; 50  $\mu$ l 10 % APS (w/v)

5 % zaostřovací gel:

1,4 ml vody; 250  $\mu$ l pufru B; 330  $\mu$ l 29 % akrylamidu (w/v) s 1 % BIS (w/v);  
20  $\mu$ l 10 % SDS (w/v); 2  $\mu$ l TEMED; 20  $\mu$ l 10 % APS (w/v)

4 % zaostřovací gel:

1,5 ml vody; 250  $\mu$ l pufru B; 267  $\mu$ l 29 % akrylamidu (w/v) s 1 % BIS (w/v);  
20  $\mu$ l 10 % SDS (w/v); 2  $\mu$ l TEMED; 20  $\mu$ l 10 % APS (w/v)

**Roztoky pro stanovení aktivity**

Pufr pro stanovení koncentrace cytochromu P450:

100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 2 % glycerol (v/v); pH 7,5

Pufr pro stanovení aktivity NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasy:

300 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM  $\text{EDTA}\text{Na}_2$ ; pH 7,4

Reakční směs pro stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy:

cyt c (0,25 mg/ml); 0,2 mM NADPH; 300 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; pH 7,4

Pufr pro stanovení aktivity NADH: cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy:

100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; pH 7,5

Reakční směs pro stanovení aktivity NADH: cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy:

0,6 mM ferrikyanid; 0,3 mM NADH; 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; pH 7,5

### **Pufry pro izolaci mikrosomální frakce**

Pufr C1 (homogenizační pufr):

153 mM KCl/KOH; 10 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,5 mM PMSF; 50 μM vitamin E (α-tokoferol); pH 7,5

Pufr C2:

100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 100 mM KCl; pH 7,5

Pufr C3:

0,25 mM sacharosa/NaOH; 10 mM EDTANa<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 250 μM vitamin E (α-tokoferol); 1 tableta proteasového Complete ULTRA Inhibitoru na 50 ml pufru; pH 7,5

### **Pufry pro solubilizaci a chromatografii**

Pufr S (solubilizační pufr):

50 mM Tris/acetát; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 1 mM DTT; pH 7,5

Pufr DEAE1-1 (ekvilibrační a promývací pufr pro DEAE-Sepharosu (1)):

5 mM Tris/acetát; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,5

Pufr DEAE1-2 (eluční pufr pro DEAE-Sepharosu (1)):

5 mM Tris/acetát; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); 400 mM KCl; pH 7,5

Pufr DEAE2-1 (ekvilibrační a promývací pufr pro DEAE-Sepharosu (2) a ekvilibrační pufr pro 5'-ADP agarosu (2)):

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,0

Pufr DEAE2-2 (eluční pufr pro DEAE-Sepharosu (2)):

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v);  
500 mM KCl; pH 7,0

Pufr CM1-1 (ekvilibrační a promývací pufr pro CM-Sepharosu (1)):

20 mM HEPES/NaOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,0

Pufr CM1-2 (eluční pufr pro CM-Sepharosu (1)):

20 mM HEPES/NaOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v);  
400 mM NaCl; pH 7,0

Pufr CM2-1 (ekvilibrační a promývací pufr pro CM-Sepharosu (2)):

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,0

Pufr CM2-2 (eluční pufr pro CM-Sepharosu (2)):

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v),  
250 mM KCl; pH 7,0

Pufr CM3-1 (ekvilibrační a promývací pufr pro CM-Sepharosu (3)):

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v);  
0,1 % Brij 35 (w/v); pH 6,8

Pufr CM3-2 (eluční pufr pro CM-Sepharosu (3)):

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v);  
0,1 % Brij 35 (w/v); 300 mM KCl; pH 6,8

Pufr CM4 (ředící pufr pro preparát nanášený na CM-Sepharosu (4)):

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); pH 6,8

Pufr A1 (ekvilibrační pufr pro 5'-ADP agarosu (1)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 mM DTT;  
0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,0

Pufr A2 (eluční pufr pro 5'-ADP agarosu (1)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v),  
1,2 mM NADH; pH 7,0

Pufr A3 (eluční pufr pro 5'-ADP agarosu (2) a (3)):

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v);  
0,1 % Brij 35 (w/v); 1,2 mM NADH; pH 7,0

Pufr A4 (promývací pufr pro 5'-ADP agarosu (4)):

30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 20 % glycerol (v/v); 0,1 mM DTT; 0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,0

Pufr E1 (ekvilibrační a promývací pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu (1) a (3)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); pH 7,0

Pufr E2 (eluční pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu (1)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % Brij 35 (w/v); 1,0 mM NADP<sup>+</sup>; pH 7,0

Pufr E3 (promývací pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu (2) a (3)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný (w/v); pH 7,0

Pufr E4 (eluční pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu (2) a (3)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný (w/v); 0,5 mM NADP<sup>+</sup>; pH 7,0

Pufr E5 (dialyzační pufr pro eluát 2',5'-ADP-Sepharosu (2) a (3)):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); pH 7,0

## 3.4. Metody

### 3.4.1. Analytické metody

#### 3.4.1.1. Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny

Princip metody spočívá v redukci měďnatých kationů na měďné peptidovými vazbami a některými postranními skupinami aminokyselin v bazickém prostředí. Měďné ionty jsou poté chelátovány 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku modrofialového komplexu, jehož absorpční maximum je při 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci měďných iontů v roztoku, a tedy i přibližné koncentraci proteinu [207, 208].

Činidlo pro stanovení bylo připraveno těsně před použitím smícháním roztoku A a roztoku B v poměru A:B = 50:1.

Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 15  $\mu$ l vzorku/standardu/vody a 120  $\mu$ l činidla. Slepý vzorek destilované vody a vzorky o neznámé koncentraci byly měřeny v triplikátech, roztoky standardu v duplikátech. Roztoky byly po lehkém protřepání inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Po 5-minutovém stání při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 562 nm (spektrofotometr Sunrise (Tecan)).

Standardem stanovení byl hovězí sérový albumin (BSA). Byla připravena ředící řada roztoků BSA o koncentracích 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Pro každý roztok byla změřena absorbance a z hodnot byla sestrojena kalibrační přímka. Dosazením hodnot  $A_{562}$  vzorků do rovnice kalibrační přímky byly vypočteny hodnoty koncentrace proteinu ve vzorcích.

#### 3.4.1.2. Stanovení koncentrace cytochromu P450 diferenční spektrometrií

Ke stanovení koncentrace cytochromu P450 byla použita metoda diferenční spektrometrie spočívající v měření absorbance redukovaného komplexu cytochromu P450 s oxidem uhelnatým v charakteristickém maximu při 450 nm [209, 210].

Vzorek byl naředěn pufrům pro stanovení cytochromu P450 na objem 2 ml a bylo přidáno asi 5 mg dithioničitanu sodného. Po důkladném promíchání byl roztok rozdělen do

dvou identických kyvet o optické dráze 1 cm. Vzorek v jedné z kyvet byl probubláván jemným proudem oxidu uhelnatého pro dobu 60 s, načež bylo na dvoupráskovém spektrofotometru Specord 250 Plus změřeno diferenční spektrum v rozsahu vlnových délek 400 - 490 nm.

Hodnota koncentrace cytochromu P450 byla získána z následujícího vztahu:

$$c_{CYP} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{CYP} \cdot l} \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}],$$

kde  $c_{CYP}$  je koncentrace cytochromu P450,  $A_x$  absorbance při vlnové délce  $x$  nm,  $\epsilon_{CYP}$  molární absorpční koeficient cytochromu P450 ( $\epsilon_{CYP} = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{dm}^3$  [209]) a  $l$  optická dráha v centimetrech.

### 3.4.1.3. Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

Aktivita CPR byla měřena jako rychlost redukce cytochromu *c*, jehož koncentraci je možno vypočítat pomocí molárního absorpčního koeficientu při vlnové délce 550 nm.

V kyvetě bylo smícháno 480  $\mu\text{l}$  pufru pro stanovení CPR s 5  $\mu\text{l}$  cytochromu *c* (25 mg/l) a 10  $\mu\text{l}$  10 mM NADPH a po protřepání byla změřena absorbance pozadí při 550 nm. Reakce byla zahájena přidávkem 5  $\mu\text{l}$  vzorku a protřepáním, načež byl registrován lineární nárůst absorbance při 550 nm (jednou za 0,5 s) po dobu 60-120 s (spektrofotometr Specord 250 Plus). Aktivita enzymu je definována jako množství cytochromu *c* přeměněného enzymem za 1 min a byla vypočtena z následujícího vzorce:

$$a_{CPR} = \Delta A_{550} \cdot l^{-1} \cdot \epsilon_{550}^{-1} \cdot t^{-1} \quad [\mu\text{mol cyt } c \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

a specifická aktivita CPR byla vypočtena ze vzorce

$$a_{CPR} = \Delta A_{550} \cdot l^{-1} \cdot \epsilon_{550}^{-1} \cdot t^{-1} \cdot c_p^{-1} \quad [\mu\text{mol cyt } c \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}],$$

kde  $\Delta A_{550}$  je změna absorbance při 550 nm za dobu  $t$  (v minutách),  $l$  je optická dráha kyvety (v centimetrech),  $\varepsilon_{550}$  je molární absorpční koeficient cytochromu  $c$  při 550 nm ( $\varepsilon_{550} = 21 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ dm}^3$  [211]) a  $c_p$  je koncentrace proteinu ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

#### 3.4.1.4. Stanovení aktivity NADH:cytochrom $b_5$ oxidoreduktasy pomocí ferrikyanidu

Aktivita  $b_5R$  byla měřena jako rychlost redukce atomu železa ferrikyanidového aniontu za spotřeby kofaktoru NADH. Tato redukce je měřitelná jako pokles absorbance při vlnové délce 420 nm [149, 212].

Do kyvety bylo odměřeno 910  $\mu\text{l}$  pufru pro stanovení aktivity  $b_5R$  a 50  $\mu\text{l}$  12 mM ferrikyanidu draselného a byla změřena absorbance pozadí. Bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  vzorku a reakce byla zahájena přidávkem 30  $\mu\text{l}$  10 mM NADH a protřepáním. Následně byl měřen lineární pokles absorbance při 420 nm (každých 0,5 s) po dobu 60-120 s (spektrofotometr Specord 250 Plus). Od hodnot rozdílu absorbance byla odečtena hodnota odpovídající přirozenému poklesu z důvodu chemické redukce ferrikyanidu NADH. Aktivita  $b_5R$  ( $a_{b_5R}$ ) byla definována jako látkové množství redukovaného ferrikyanidu za 1 min a byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$a_{b_5R} = -\Delta A_{420} \cdot l^{-1} \cdot \varepsilon_{420}^{-1} \cdot t^{-1} \quad [\mu\text{mol ferrikyanidu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

a specifická aktivita CPR byla vypočtena ze vzorce

$$a_{b_5R} = -\Delta A_{420} \cdot l^{-1} \cdot \varepsilon_{420}^{-1} \cdot t^{-1} \cdot c_p^{-1} \quad [\mu\text{mol ferrikanidu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}],$$

kde  $\Delta A_{420}$  je změna absorbance při 420 nm za dobu  $t$  (v minutách),  $l$  je optická dráha kyvety (v centimetrech),  $\varepsilon_{420}$  je molární absorpční koeficient ferrikyanidu při 420 nm ( $\varepsilon_{420} = 1,02 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ dm}^3$  [149]) a  $c_p$  je koncentrace proteinu ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

### **3.4.1.5. Kvalitativní zjištění aktivity NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy pomocí cytochromu b<sub>5</sub>**

Schopnost finálního preparátu b<sub>5</sub>R redukovat cytochrom b<sub>5</sub> byla potvrzena pomocí měření diferenčního spektra redukované a oxidované formy cytochromu b<sub>5</sub>.

Do každé ze dvou kyvet bylo odměřeno 470  $\mu$ l pufru pro stanovení aktivity b<sub>5</sub>R, 10  $\mu$ l frakce obsahující cytochrom b<sub>5</sub> (frakce č. 53 eluovaná z kolony DEAE-Sepharosy (1), kap. 4.2.2.) a 10  $\mu$ l preparátu b<sub>5</sub>R. Do referenční kyvety bylo následně přidáno 10  $\mu$ l pufru a do vzorkové kyvety bylo přidáno 10  $\mu$ l 10 mM NADH.

Kyvety byly protřepány a bylo měřeno diferenční absorpční spektrum (spektrofotometr Specord 250 Plus) obou směsí v intervalu 390-455 nm. Byl sledován vznik minima při 413 nm a maxima při 425 nm, znamenající vznik redukované formy cytochromu b<sub>5</sub>.

### **3.4.2. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS**

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (angl. zkr. SDS-PAGE) je elektromigrační metoda využívaná k separaci proteinů. Docecylsulfát je detergent, který molekuly proteinů denaturuje a udělí jim záporný náboj, a ty poté putují ke kladně nabitě anodě gelem. Mezi faktory ovlivňující rychlost pohybu molekul proteinů patří především velikost (resp. molekulová hmotnost), tvar molekul, velikost jejich náboje a intenzita elektrického pole. Větší molekuly jsou gelem více zpomalovány a dojde k rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Pro přesnější separaci menších proteinů se používá gel s vyšší koncentrací akrylamidu.

Skla pro nalévání gelu byla odmaštěna ethanolem a sevřena ve stojanu (síla gelu 1 mm). Mezi skla byla pipetována směs pro vytvoření separačního gelu o koncentraci akrylamidu 15 %, 12 %, 10 % nebo 8 %. Roztok byl pro vyrovnání hladiny a odstranění bublin převrstven destilovanou vodou a nechán polymerovat 30-60 minut. Poté byla voda odlita a gel byl dosušen filtračním papírem. Separační gel byl převrstven roztokem pro 5% nebo 4% zaostřovací gel a byl vsunut hřeben pro vytvoření deseti nebo patnácti jamek.



Gel polymeroval asi 30 minut. Skla s gelem byla vložena do aparatury, do elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr a hřeben byl vyjmut.

K vhodně naředěným vzorkům byl přidán 4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr. Vzorky byly na vortexu protřepány a inkubovány při 100 °C po dobu 5 minut. Poté byly několik sekund centrifugovány na stolní centrifuze pro odstředění vody zkondenzované na stěnách zkumavky.

Do jamek bylo nanášeno 20-25 µl vzorku (10-jamkový gel); 10-15 µl vzorku (15-jamkový gel). Do alespoň jedné z jamek byl nanesen standard molekulových hmotností v objemu 5 µl. Aparatura byla vložena do elektroforetické vany, která byla naplněna elektrodovým pufrem.

Elektroforéza probíhala při napětí 200 V do doputování čela bromfenolové modři ke konci gelu, to asi 40-80 minut, v závislosti na hustotě gelu.

Gel byl vyjmut z aparatury, zaostřovací gel byl odstraněn a separační gel byl opláchnut destilovanou vodou a ponořen do barvicí lázně, kde byl gel v třepačce barven asi 1 hodinu nebo přes noc. Poté byl gel opláchnut vodou a odbarvován v odbarvovací lázni za třepání asi dvě hodiny nebo přes noc. Odbarvovací roztok byl během odbarvování průběžně měněn.

### **3.4.3. Izolace mikrosomální frakce a solubilizace**

Veškeré izolační postupy byly prováděny v chlazené místnosti při 4 °C nebo na ledu.

#### **3.4.3.1. Příprava pokusného zvířete a jaterní tkáně**

Jedinec králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*) byl chován v kleci, krmen standardní peletovou stravou a vodou. Týden před počátkem izolace byla voda v napajedlu vyměněna za 0,1 % roztok fenobarbitalu (w/v), aby došlo k indukci CYP2B4 [213]. Pro snížení hladiny glykogenu v játrech bylo 24 hodin před usmrcením králíkovi odebráno krmivo.

Králík byl usmrcen oxidem uhličitým a zlomením vazů a byla mu odebrána játra, která byla ponořena do vychlazeného homogenizačního pufru (pufr C1), zvážena a uchovávána na ledu asi 30 minut, načež byla homogenizována (kap. 3.4.3.2.).

### 3.4.3.2. Izolace mikrosomální frakce

Játra byla nastříhána na malé kousky a homogenizována v homogenizátorech podle Pottera a Elvehjema. Homogenát byl filtrován přes třikrát přeloženou gázu.

Následovala izolace mikrosomální frakce pomocí diferenční centrifugace [213]. Homogenát byl centrifugován při 600 x g (10 min, 2000 RPM, 4 °C, Janetzki K-23, výkyvný rotor 4 x 70 ml). Supernatant byl zachován a peleta byla rehomogenizována v pufru C1 (v objemu shodném se supernatantem) a odstředěna za předešlých podmínek. Supernatanty z obou centrifugací byly spojeny a odstředěny při 15 000 x g (20 min, 13 000 RPM, 4 °C, Janetzki K-24, úhlový rotor 6 x 35 ml). Supernatant byl opatrně oddělen od sedimentu a odstředěn na ultracentrifuze Beckman Optima LE-80K nebo Beckman Optima XPN-90 (rotor 45 Ti, 45 000 RPM, 70 min, 4 °C). Výsledná peleta byla rehomogenizována v pufru C2 a odstředěna za stejných podmínek. Peleta byla rehomogenizována v pufru C3 (18 ml). Mikrosomální frakce byla zmrazena v kapalném dusíku a uchovávána v -80 °C.

### 3.4.3.3. Solubilizace proteinů mikrosomální frakce

K solubilizaci proteinů z mikrosomální membrány byla použita kombinace dvou detergentů – cholátu sodného (iontový detergent) a Brij 35 (neiontový detergent). Detergenty narušují membránu a váží se na hydrofobní části proteinů, které udržují v rozpustné formě. Aby se předešlo degradaci proteinů proteasami, byla do solubilizační směsi přidána směs inhibitorů Complete ULTRA (Roche).

Suspenze mikrosomů byla nejprve rozmrazena při 4 °C a homogenizována v pufru S, kterým byla naředěna tak, aby výsledná koncentrace proteinů v solubilizační směsi byla přibližně 6 mg/ml. Solubilizace byla prováděna v Erlenmayerově baňce na ledu, pod ochrannou atmosférou dusíku a za stálého míchání.

Nejdříve byl po kapkách přidán roztok proteasových inhibitorů Complete ULTRA (1 tableta na 50 ml) v 10 ml pufru S, poté protaminsulfát (15 mg/ml, 1,5 ml na 50 ml směsi). Následně byla přikápávána směs detergentů – 10 % cholát sodný (w/v) a 25 % Brij 35 (w/v) v takovém objemu, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace cholátu 0,4 % (w/v) a Brij 35 1,0 % (w/v). Směs byla za míchání ponechána asi 20 minut na ledu.

Následovala ultracentrifugace směsi na centrifuze Beckman Optima LE-80K nebo Beckman Optima XPN-90 (rotor 70 Ti, 55 000 RPM, 70 min, 4 °C). Supernatant byl dále separován na kolonách DEAE- nebo CM-Sepharosy (kap. 3.4.4.1 a 3.4.4.2.).

### **3.4.4. Chromatografické metody**

Všechny chromatografické kroky byly prováděny v chlazené místnosti při 4°C a všechny použité pufrы byly předem filtrovány přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm.

#### **3.4.4.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF**

Diethylaminoethyl-Sepharosa (DEAE-Sepharosa) je chromatografické médium patřící do skupiny ionexů. Jedná se o anex – je schopna vázat náporně nabitě ionty, například proteiny s pI nižším, než je pH ekvilibračního pufru kolony. Proteiny s pI přibližně stejným nebo vyšším než pH pufru se na nosiči nezachycují. Zachycené proteiny je možné uvolnit zvýšením iontové síly nebo vhodnou změnou pH, a to buď gradientově nebo v krocích.

Použitá kolona měla rozměry 16 x 100 mm (objem 20 ml).

#### **3.4.4.2. Chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF**

Carboxymethyl-Sepharosa (CM-Sepharosa) je chromatografické médium obsahující skupiny vázající kladně nabitě ionty – je to tedy katex. Váže proteiny s pI vyšším, než je pH kolony. Zachycené proteiny jsou eluovány obdobně jako u DEAE-Sepharosy, tedy gradientovou nebo krokovou změnou iontové síly nebo pH.

Použitá kolona měla rozměry 16 x 100 mm (objem 20 ml).

#### **3.4.4.3. Chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy**

Tento afinitní nosič silně interaguje s NADP+-dependentními dehydrogenasami, a je proto vhodný k zachycení CPR. Eluce je možná puftrem obsahujícím NADP<sup>+</sup> nebo NADPH.

Prášková 2',5'-ADP-Sepharosa (2,53 g) byla před použitím resuspendována v destilované vodě a ponechána bobtnat asi půl hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla promyta 4 x 120 ml destilované vody a vnesena do adaptérové kolony XK 16/20. Výsledný objem nosiče v koloně byl 7,8 ml.

#### **3.4.4.4. Chromatografie na koloně 5'- ADP agarosy**

Afinitní nosič interagující s NADH-dependentními dehydrogenasami je schopen zachytit b<sub>5</sub>R. Eluce je možná pufrém obsahujícím NADH nebo 5'-ADP nebo zvýšením iontové síly, popř. změnou pH [165, 214].

Prášková 5'-ADP agarosa (0,49 g) byla suspendována v destilované vodě a za laboratorní teploty půl hodiny nechána sedimentovat, načež byla promyta 4 x 50 ml destilované vody a vnesena do kolony o rozměru 1,5 x 8 cm. Výsledný objem nosiče v koloně byl 2,8 ml.

## 4. Výsledky

Z jater jednoho králíka domácího byla nejprve získána jaterní mikrosomální frakce diferenční centrifugací. Frakce byla rozdělena na dva díly, přičemž z každého dílu byly purifikovány NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasa a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa kombinací ionexových chromatografií na kolonách DEAE-Sepharosy a CM-Sepharosy a afinitních chromatografií na kolonách 2', 5'-ADP-Sepharosy a 5'-ADP agarosy. Schéma první purifikace je na obr. 24, str. 55 a schéma druhé purifikace na obr. 37, str. 69.

### 4.1. Izolace mikrosomální frakce z králíčích jater

Mikrosomální frakce byla získána z jedince králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*). Králík byl premedikován fenobarbitalem za účelem indukce CYP2B4, jehož izolaci tato práce nepopisuje.

Králíčí játra o hmotnosti 90 g byla homogenizována a diferenční centrifugací byla izolována mikrosomální frakce podle postupů pospaných v kap. 3.4.3.1. a 3.4.3.2.

Celkem bylo připraveno 18 ml mikrosomální frakce o koncentraci proteinů 42 mg/ml a obsahující 1350 nmol cytochromu P450. Specifická koncentrace cytochromu P450 byla rovna 1,79 nmol/mg.

## **4.2. První purifikace NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy**

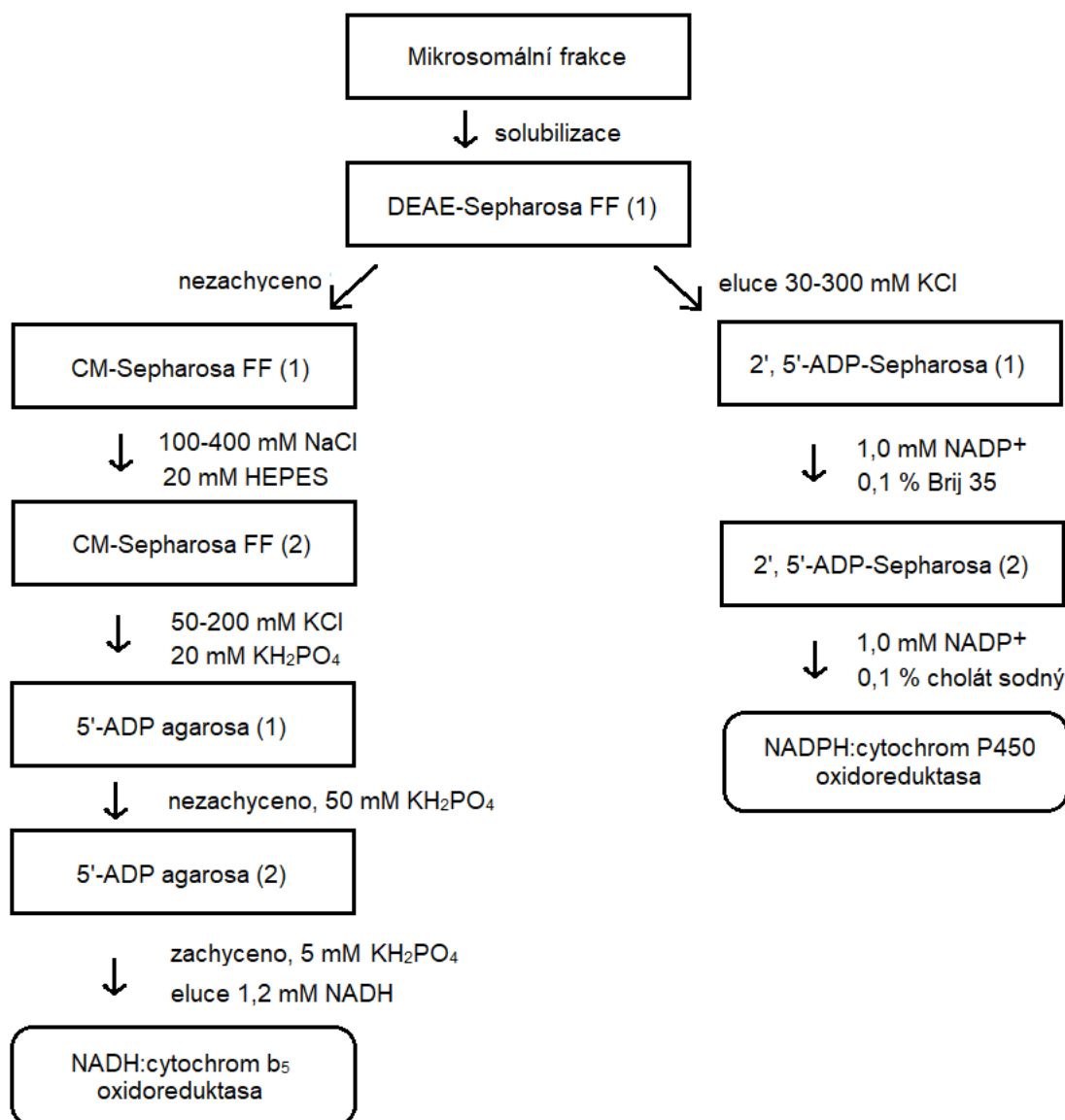
Purifikace b<sub>5</sub>R byla provedena kombinací chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF, CM-Sepharosy FF a 5'-ADP agarosy. Purifikace CPR byla po eluci z kolony DEAE-Sepharosy FF dokončena na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy. Postup je znázorněn na obr. 24.

### **4.2.1. Solubilizace mikrosomální frakce**

Z mikrosomální frakce uchované při -80°C byla odebrána asi polovina, která byla rozmrazena při 4°C na suspenzi o objemu 9,7 ml.

Suspenze byla solubilizována podle postupu popsaného v kap. 3.4.3.3. směsí cholátu sodného a Brije 35. Pro zvýšení výtěžku byla peleta po ultracentrifugaci pomocí homogenizátoru resuspendována v 10 ml směsi 5 % cholátu sodného a 5 % Brije 35. Suspenze byla naředěna pufrem S na objem 47 ml a znovu centrifugována za předchozích podmínek. Supernatanty z obou centrifugací byly spojeny a v celkovém objemu 150 ml naneseny na kolonu DEAE-Sepharosy (1), sloužící k oddělení CPR a jiných proteinů od b<sub>5</sub>R.

Úspěšnost solubilizace byla sledována jako množství cytochromu P450 v solubilizátu proti množství v resuspendované peletě po druhé ultracentrifugaci. V solubilizátu se nacházelo 830 nmol cytochromu P450 a v peletě 80 nmol, solubilizace tedy byla z 91 % úspěšná. Vzorky z obou solubilizátů přes spojení a z resuspendované pelety byly analyzovány SDS-PAGE. Elektroforeogram je na obr. 26, str. 57.



**Obr. 24:** Schéma první purifikace NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy.

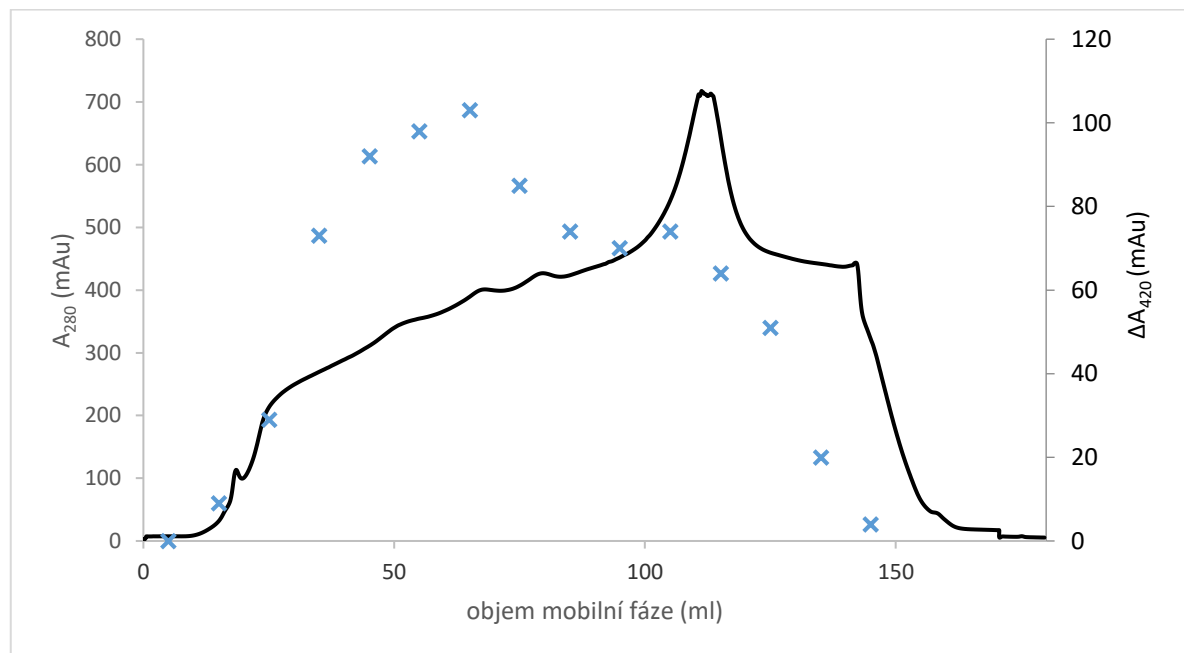
*DEAE-Sepharosa FF (1) sloužila k zachycení CPR a jiných proteinů, zatímco b<sub>5</sub>R se na koloně nezachycovala. Zachycena byla na koloně CM-Sepharosy FF (1), z níž byla eluována gradientem NaCl v HEPES pufriu. Chromatografie byla opakována s fosfátovým pufrem namísto HEPES a preparát tak byl přečištěn a zahuštěn. Na koloně 5'-ADP agarosy (1) se b<sub>5</sub>R nezachytila v 50 mM fosfátovém pufriu. Chromatografie byla opakována s 5 mM fosfátovým pufrem a b<sub>5</sub>R se podařilo zachytit.*

## 4.2.2. Purifikace NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy

### 4.2.2.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1) - nanášení

Za účelem oddělení CPR a jiných proteinů od b<sub>5</sub>R byl solubilizát nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy FF ekvilibrovanou pufrům DEAE1-1. V průběhu chromatografie byla u sbíraných frakcí měřena absorbance při 280 nm. Byly sbírány frakce o objemu 10 ml.

Ve frakcích z nanášení a ve vybraných frakcích z eluce (kap. 4.2.3.1.) byla měřena aktivita b<sub>5</sub>R pomocí ferrikyanidu. Ve všech nanášecích frakcích (č. 3-17) a v eluční frakci č. 51 byla nalezena aktivita b<sub>5</sub>R. Aktivita ve frakci č. 51 odpovídala asi 10 % maxima z nanášecího píku. Tyto frakce byly spojeny a ultrafiltrací zahuštěny na 50 ml. Tento preparát byl následně dialyzován proti 2,0 l pufru CM1-1 a nanesen na kolonu CM-Sepharosy (1), kap. 4.2.2.2. Chromatogram s vyznačenou aktivitou b<sub>5</sub>R (vyjádřenou jako rozdíl absorbance při 420 nm za 60 s) je na obr. 25. Elektroforeogram vybraných frakcí z nanášení je na obr. 26, str.57.

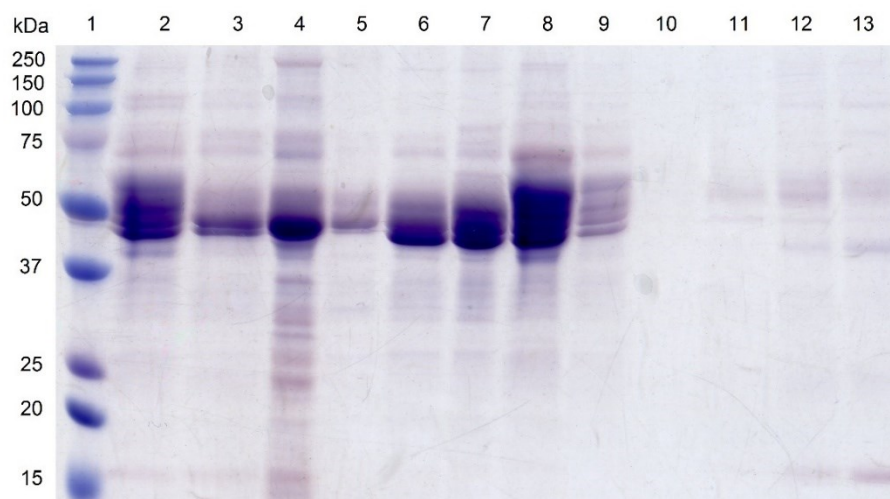


**Obr. 25: Chromatogram nanášení solubilizátu na DEAE-Sepharosu FF (1).**

*Nanášeno 150 ml solubilizátu; průtok 1,0 ml/min*

*Modře vyznačena aktivita b<sub>5</sub>R vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 420 nm za 60 s při měření aktivity pomocí ferrikyanidu; frakce č. 2-17*





**Obr. 26: Elektroforeogram vzorků z nanášení a eluce z DEAE-Sepharosy FF (1).**

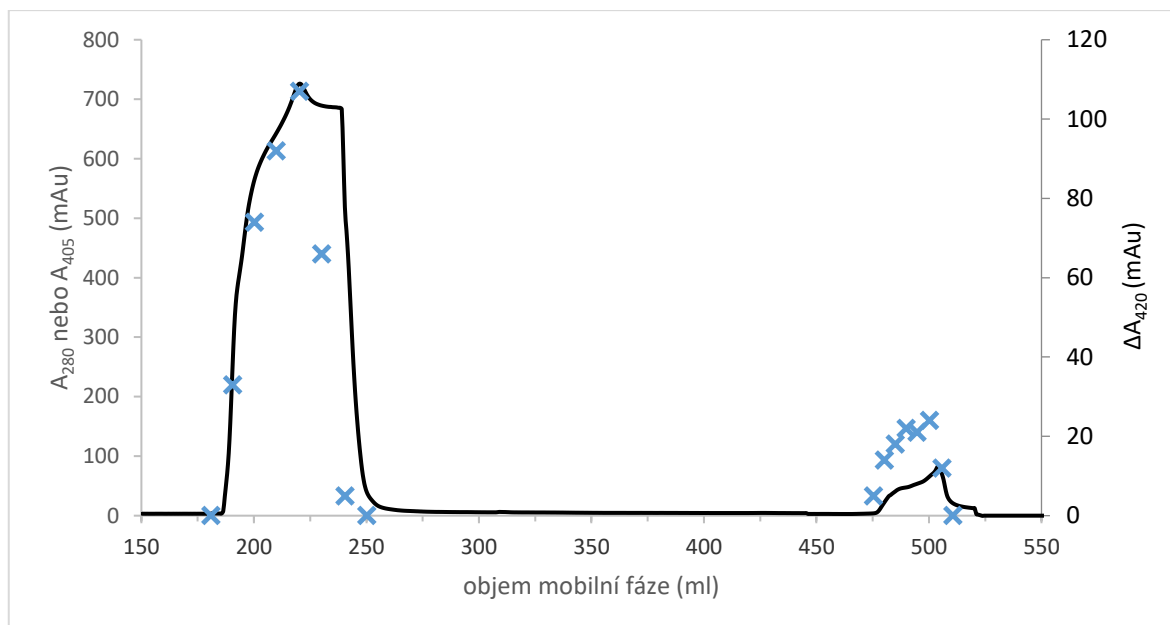
*12 % gel, 1 – standard molekulových hmotností, 2 – solubilizát po první ultracentrifugaci, 3 – solubilizát po druhé ultracentrifugaci, 4 – peleta po druhé ultracentrifugaci, 5 – frakce z nanášení č. 3, 6 – fr. 6, 7 – fr. 9, 8 – fr. 12, 9 – fr. 15, 10 – eluční frakce č. 50, 11 – fr. 51, 12 – fr. 52, 13 – fr. 53*

#### **4.2.2.2. Chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (1) a (2)**

Spojené, zahuštěné a dialyzované frakce č. 3-17 a č. 51 z kolony DEAE-Sepharosy FF (1) byly naneseny na kolonu CM-Sepharosy FF (1), ekvilibrovanou pufrém CM1-1. V průběhu chromatografie byla měřena absorbance při 280 nm (nanášení a promývání) nebo při 405 nm (eluce) a aktivita  $b_5R$  pomocí ferrikyanidu.

Kolona byla promyta ekvilibračním pufrém. Eluce z kolony probíhala gradientem 100-400 mM NaCl (pufr CM1-2). Při koncentraci NaCl přibližně 160 mM se začaly eluovat proteiny a byly sbírány frakce o objemu 5 ml. Průběh chromatografie je znázorněn na obr. 27, str. 58. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 28, str. 58).

Ve frakcích 2-7 z nanášení (6 x 10 ml) a v elučních frakcích 20-26 (7 x 5 ml) byla naměřena aktivita  $b_5R$ . V elučních frakcích 21-26 byl na elektroforeogramu nalezen protein molekulové hmotnosti odpovídající  $b_5R$  (~35 kDa), zatímco v nanášecích frakcích nikoli. Frakce vykazující aktivitu odpovídající alespoň 10 % maxima elučního píku (fr. 21-26) byly spojeny (42 ml) a dialyzovány proti 2,0 l pufru CM2-1.



**Obr. 27: Průběh chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (1).**

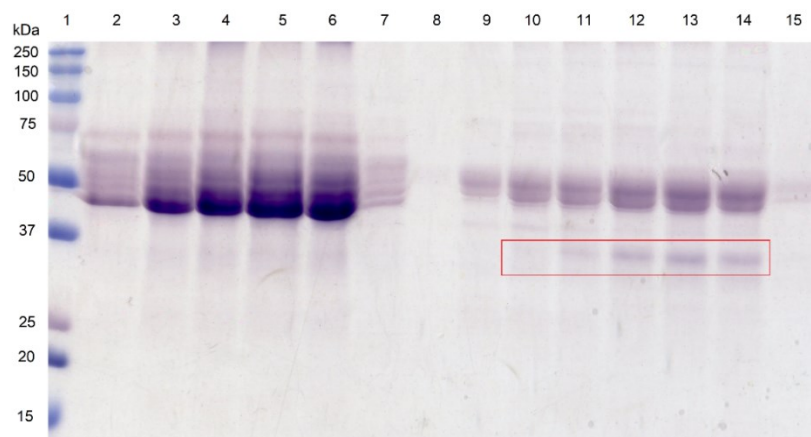
*180-250 ml - nanášení; 1,0 ml/min; frakce 1-8; absorbance při 280 nm,*

*250-475 ml - promývání; absorbance při 280 nm*

*475-525 ml - eluce; frakce 20-28 gradient 100-400 mM NaCl; absorbance při 405 nm*

*Modře vyznačena aktivita  $b_5R$  vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 420 nm*

*za 60 s při měření aktivity pomocí ferrikyanidu; frakce č. 1-8 a 21-28*



**Obr. 28: Elektroforeogram vzorků frakcí z nanášení a eluce z CM-Sepharosy FF (1).**

*12 % gel, 1 – standard molekulových hmotností, 2-7 – frakce z nanášení č. 2-7,*

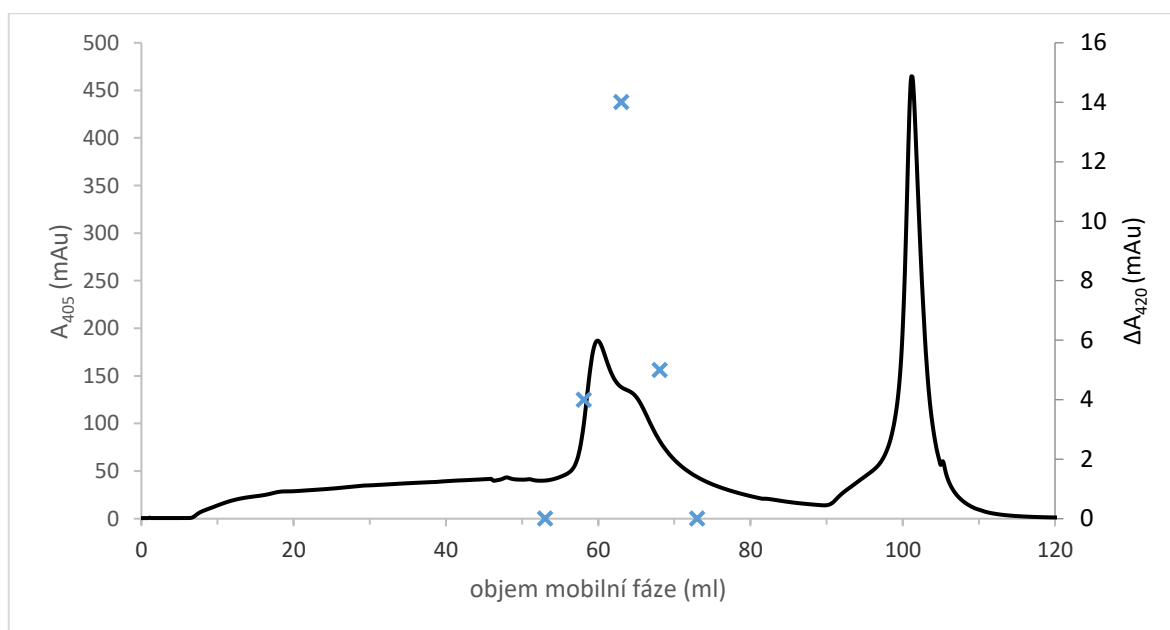
*8-15 – frakce z eluce č. 20-27;*

*Červeným rámečkem zvýrazněna zóna molekulové hmotnosti  $b_5R$*

Pro další přečištění a zahuštění preparátu byla provedena rechromatografie na koloně CM-Sepharosy (2) ekvilibrované pufrům CM2-1, obsahujícím 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$  (pH 7,0) namísto 20 mM HEPES/NaOH (pufr CM1-1, pH 7,0). Preparát o objemu 42 ml byl nanesen rychlostí 1,0 ml/min a sbírány byly frakce o objemu 5 ml. Byla měřena absorbance při 405 nm a aktivita  $b_5R$ .

Kolona byla promyta 60 ml ekvilibračního pufru. Eluce probíhala nejprve gradientem 50-200 mM KCl v pufru CM-1 o délce 82 ml, přičemž aktivita  $b_5R$  byla nalezena ve třech frakcích mezi 140 mM a 175 mM KCl. Následovalo zvýšení koncentrace KCl na 250 mM, kdy se začal eluovat protein nevykazující aktivitu  $b_5R$ . Chromatogram eluce je uveden na obr. 29.

Pomocí SDS-PAGE (elektroforeogram neuveden) byla potvrzena přítomnost proteinu s molekulovou hmotností asi 35 kDa ve třech frakcích vykazujících aktivitu  $b_5R$ , které byly spojeny (15 ml) a dialyzovány proti 1,0 l pufru A1.



**Obr. 29: Eluce z kolony CM-Sepharosy FF (2) při rechromatografii.**

**8-90 ml** - gradient 50-200 mM KCl; průtok 1,0 ml/min

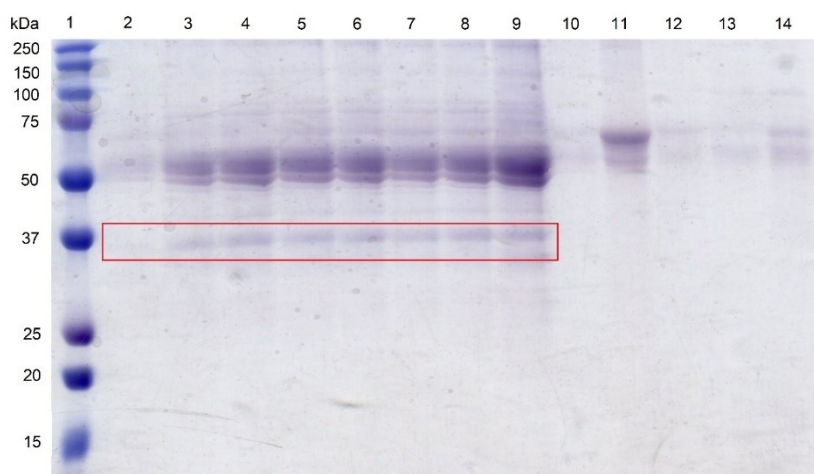
**90-120 ml** - 250 mM KCl; průtok 1,0 ml/min

Modře vyznačena aktivita  $b_5R$  vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 420 nm za 60 s při měření aktivity pomocí ferrikyanidu; aktivita nalezena ve třech frakcích (3 x 15 ml)

#### 4.2.2.3. Chromatografie na koloně 5'-ADP agarosy (1) a (2)

Frakce eluované z kolony CM-Sepharosy (2), obsahující b<sub>5</sub>R, byly po dialýze proti pufru A1 naneseny na kolonu 5'-ADP agarosy (2,8 ml) ekvilibrovanou 75 ml téhož pufru, a to rychlostí asi 0,3 ml/min. Kolona byla následně promyta 30 ml ekvilibračního pufru a byla provedena eluce 1,2 mM NADH (pufr A2) rychlostí 0,6 ml/min. V průběhu nanášení a promývání byly sbírány frakce o objemu 4 ml a během eluce frakce o objemu 2 ml. Ve frakcích byla měřena aktivita b<sub>5</sub>R pomocí ferrikyanidu.

Aktivita b<sub>5</sub>R nebyla nalezena v žádné sbírané frakci, pravděpodobně z důvodu příliš velkého naředění enzymu. Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, která ukázala protein o molekulové hmotnosti přibližně 35 kDa v nanášecích frakcích č. 1-8 (obr. 30). B<sub>5</sub>R se tedy pravděpodobně nezachytila na koloně, na rozdíl od několika jiných proteinů s molekulovou hmotností 50 až 70 kDa. Eluční pufr A2 nedopatřením obsahoval asi 50 mM KCl, kvůli němuž se proteiny pravděpodobně eluovaly.



**Obr. 30: Elektroforeogram vzorků frakcí sbíraných během chromatografie na koloně 5'-ADP agarosy (1).**

*12 % gel, 1 – standard molekulových hmotností, 2-9 – nanášecí frakce 1-8, 10 - první promývací frakce, 11-14 – eluční frakce 20-23, Červeným rámečkem zvýrazněna zóna molekulové hmotnosti b<sub>5</sub>R*

Spojené nanášecí frakce o celkovém objemu 24 ml byly dialyzovány proti 2 l pufru DEAE2-1, který obsahoval 5 mM fosfát na rozdíl od pufru AF1, který obsahoval 50 mM fosfát.

Preparát nevykazující aktivitu b<sub>5</sub>R byl nanesen rychlostí asi 0,1 ml/min na kolonu 5'-ADP agarosy, která byla předtím promyta 50 ml vody, 100 ml 1 M NaCl a ekvilibrována 150 ml pufru DEAE2-1. Při nanášení byla sbírána jedna frakce o objemu 30 ml. Kolona byla promyta 50 ml ekvilibračního pufru. Následovala eluce 1,2 mM NADH v ekvilibračním pufru (pufr A3; 0,3 ml/min), kdy byly sbírány frakce o objemu 2 ml a byla v nich měřena aktivita b<sub>5</sub>R.

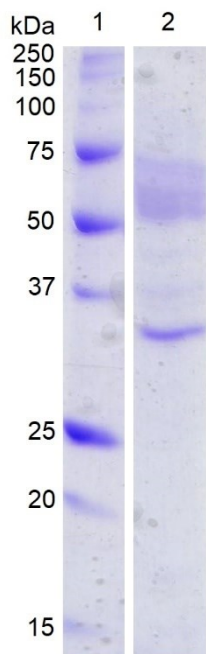
V druhé a třetí frakci z eluce (2 x 2 ml) byla naměřena aktivita a tyto frakce byly spojeny, zahuštěny ultrafiltrací na 0,5 ml a analyzovány SDS-PAGE (obr. 31, str. 62).

Elektroforéza ukázala přítomnost proteinu o molekulové hmotnosti asi 35 kDa a několik kontaminujících proteinů mezi 50 a 75 kDa. B<sub>5</sub>R se tedy nepodařilo získat v čisté formě. Od dalších chromatografických kroků bylo upuštěno z důvodu velmi aktivity enzymu, která byla 4,2 μmol ferrikyanidu/min. Průběh purifikace je shrnut v tabulce 1.

**Tab. 1: Bilanční tabulka první purifikace b<sub>5</sub>R z králičích jater**

	Objem (ml)	Koncentrace proteinů (mg/ml)	Celková aktivita enzymu (μmol/min)	Specifická aktivita enzymu (μmol/mg)	Výtěžek izolace (%)
MF	9,7	42,0	1455	3,6	100
SOL	140	2,8	1178	3,0	81,0
DEAE	160	2,0	480	1,5	33,0
CM1	42	0,05	52	24,7	3,6
CM2	20	N	38	N	2,6
5'-ADP (1)	24	N	N	N	N
5'-ADP (2)	4,0	0,15	4,2	7,0	0,3
FP	0,5	1,2	4,2	7,0	0,3

*MF* - mikrosomální frakce, *SOL* - solubilizát, *DEAE* - chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1), *CM1* - chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (1), *CM2* - chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (2), *5'-ADP (2)* - chromatografie na koloně 5'-ADP agarosy (2), *FP* - finální preparát, *N* - nestanoveno  
Výtěžek izolace vypočítán z hodnot celkové aktivity preparátu



**Obr. 31: Elektroforeogram finálního preparátu b<sub>5</sub>R z první purifikace.**

*12 % gel,*

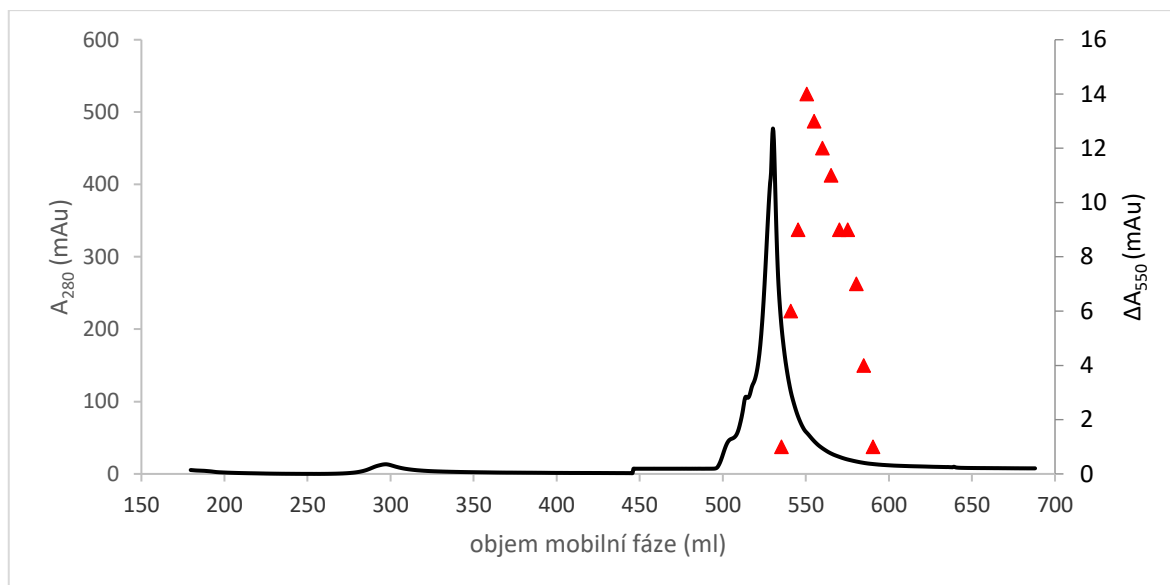
*1 – standard molekulových hmotností,*

*2 - finální preparát b<sub>5</sub>R*

### 4.2.3. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

#### 4.2.3.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1) - eluce

Po nanesení solubilizátu na kolonu byla kolona promyta 300 ml pufru DEAE1-1. Eluce CPR z kolony probíhala gradientem 30-300 mM KCl v pufru DEAE1-1 o délce 200 ml a byly sbírány frakce o objemu 5 ml. Ve frakcích z eluce byla měřena aktivita CPR pomocí cytochromu c. Eluční profil CPR je vyznačen na obr. 32, str. 63. Frakce vykazující aktivitu CPR (č. 53-64, 50 ml) byly analyzovány SDS-PAGE (obr. 33, str. 63), byly spojeny a dialyzovány proti 2 x 1,0 l pufru E1 a zamraženy při -80°C pro pozdější purifikaci CPR.

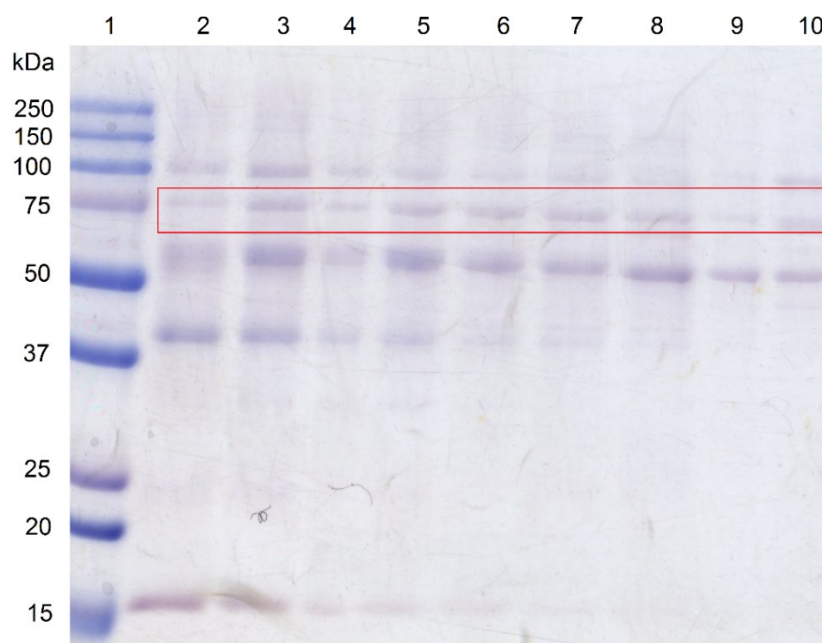


**Obr. 32: Chromatogram eluce CPR z DEAE-Sepharosy FF (1).**

*150-450 ml – promývání (2,0 ml/min),*

*450-600 ml – gradient 30-300 mM KCl (1,0 ml/min)*

*Červeně vyznačena aktivita CPR ve frakcích 53 až 64, vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 550 nm za 60 s při stanovení aktivity pomocí cytochromu c.*



**Obr. 33: Elektroforeogram frakcí z eluce z DEAE-Sepharosy FF (1).**

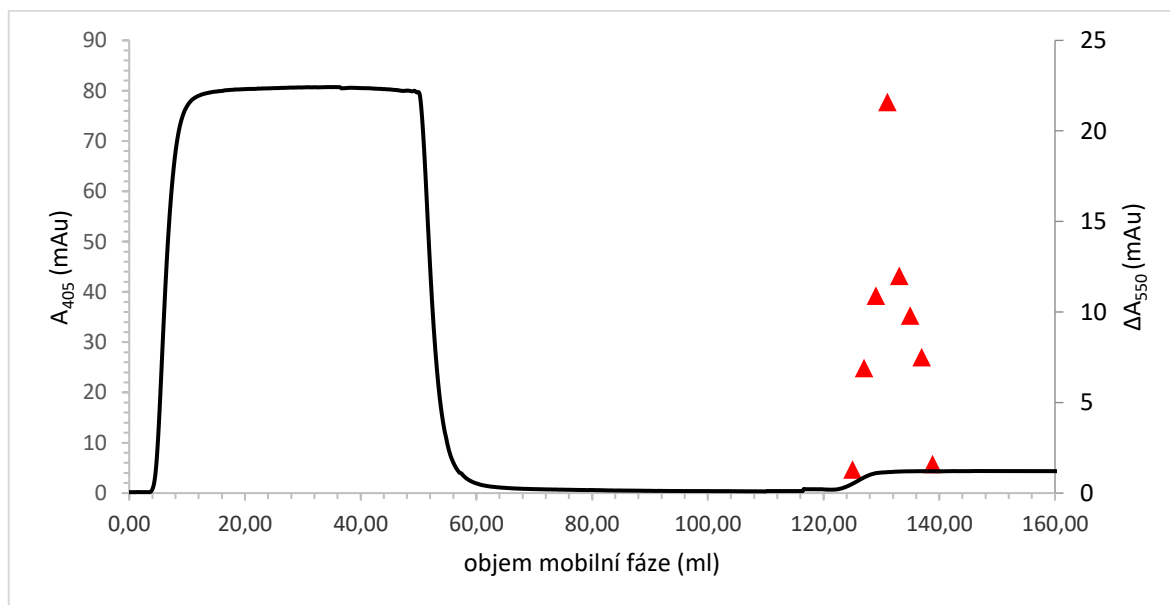
*12 % gel, 1 – standard molekulových hmotností, 2-10 – frakce 54-62 s aktivitou CPR*

*Červeným rámečkem zvýrazněna zóna molekulové hmotnosti  $b_5R$*

#### 4.2.3.2. Chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) a (2)

Celkem 50 ml preparátu (kap. 4.2.3.1.) bylo rozmrazeno a nanášeno na kolonu 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) ekvilibrovanou pufrům E1. Po nanášení byla kolona promyta ekvilibračním pufrům (frakce o objemu 10 ml) a CPR z ní byla eluována pufrům E2, obsahujícím 1,0 mM NADP<sup>+</sup>, a byly sbírány frakce o objemu 2 ml. V průběhu byla měřena absorbance při 405 nm a v každé frakci byla měřena aktivita CPR.

Aktivita CPR byla nalezena ve frakcích z eluce č. 7-14. SDS-PAGE frakcí potvrdila přítomnost a čistotu CPR v těchto frakcích (elektroforeogram neuveden). Frakce byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací z celkového objemu 16 ml na objem 6 ml. Spojené frakce před i po zahuštění byly analyzovány SDS-PAGE (obr. 35, str. 65). Průběh chromatografie je znázorněn na obr. 34.



**Obr. 34: Průběh chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1).**

*0-60 ml – nanášení (0,3 ml/min), 60-120 ml – promývání (1,5 ml/min), 120-160 ml – eluce 1,0 mM NADP<sup>+</sup> (0,3 ml/min)*

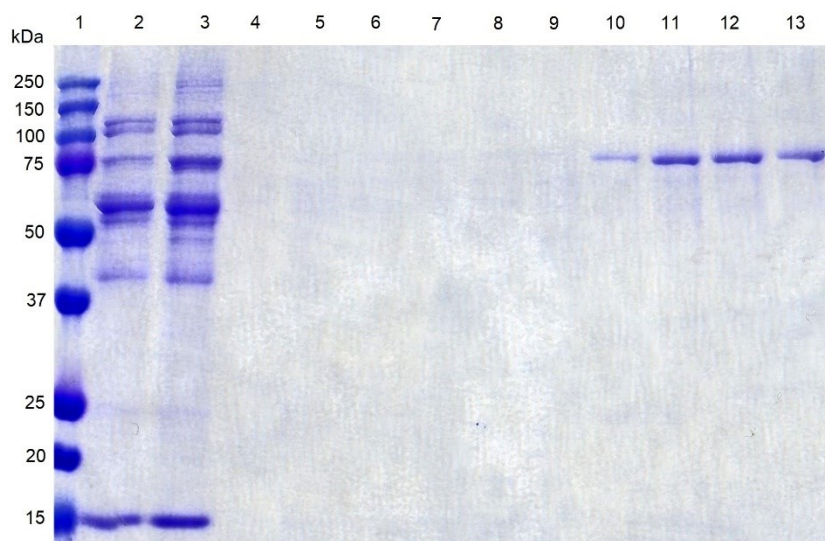
*Červeně vyznačena aktivita CPR ve frakcích z eluce 7 až 14, vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 550 nm za 60 s při stanovení aktivity pomocí cytochromu c.*



Protože získaný preparát CPR obsahoval 0,1 % detergent Brij 35, potenciálně znemožňující budoucí experimenty s rekonstitucí enzymu ve vesikulech DLPC, byla provedena rechromatografie preparátu na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (2). Cílem bylo CPR zachytit a Brij 35 vymýt z kolony pufrém, kde je 0,1 % Brij 35 nahrazen 0,1 % cholátem sodným. Cholát sodný je možné narozdíl od Brije 35 odstranit dialýzou.

Kolona byla ekvilibrována pufrém E1 a preparát o objemu 6 ml na ni byl nanesen rychlostí 0,3 ml/min. Kolona byla promyta 75 ml pufru E3, obsahujícího 0,1 % cholát sodný namísto 0,1 % Brije 35. Eluce probíhala 1,0 mM NADP<sup>+</sup> (pufr E4) a byly jímány frakce objemu 2 ml, v nichž byla měřena aktivita CPR. Aktivita byla naměřena v elučních frakcích č. 8-16, které byly v celkovém objemu 18 ml spojeny a zahuštěny ultrafiltrací na objem 1,0 ml. Finální preparát byl dialyzován proti 1,0 l pufru E5 a v 0,1 ml alikvotech uchován při -80°C.

Elektroforeogram vybraných frakcí chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) a finálního preparátu je na obr. 35, str. 66). CPR se podařilo získat v čisté formě. Bylo připraveno 1,0 ml preparátu CPR o celkové aktivitě 1,2 μmol cyt c/min. Purifikace CPR je shrnuta v tabulce 2, str. 67.



**Obr. 35: Elektroforeogram vzorků frakcí sbíraných během chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) a (2).**

*12 % gel,*

*1 – standard molekulových hmotností,*

*2 – spojené frakce proteinů nezachycených na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1),*

*3 – preparát nanášený na kolonu 2', 5'-ADP-Sepharosy (1),*

*4-9 – promývací frakce kolony 2', 5'-ADP-Sepharosy (1),*

*10 – spojené eluční frakce 7-14 z kolony 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) (16 ml)*

*11 a 12 – eluční frakce 7-14 z kolony 2', 5'-ADP-Sepharosy (1) (zahuštěné na 6 ml)*

*13 – CPR eluovaná z kolony 2', 5'-ADP-Sepharosy (2) a zahuš. na 3,5 ml (fin. preparát)*

**Tab. 2: Bilanční tabulka první purifikace CPR z králíčích jater**

Frakce	Objem (ml)	Koncentrace proteinů (mg/ml)	Celková aktivita enzymu ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Specifická aktivita enzymu ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	Výtěžek izolace (%)
MF	9,7	42,0	35,5	0,09	100
SOL	140	2,8	24,3	0,06	60
DEAE	50	0,3	6,2	0,3	15,3
2', 5'-ADP (1)	16	N	1,8	N	5,1
2', 5'-ADP (2)	18	N	N	N	N
FP	1,0	0,6	1,2	2,0	3,4

*MF* - mikrosomální frakce, *SOL* - solubilizát,

*DEAE* - chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1),

*2', 5'-ADP (1)* - chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (1),

*2', 5'-ADP (2)* - chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (2),

*FP* - finální preparát, *N* - nestanoveno

Výtěžek izolace vypočítán z hodnot celkové aktivity preparátu

### 4.3. Druhá purifikace NADH:cytochrom $b_5$ oxidoreduktasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

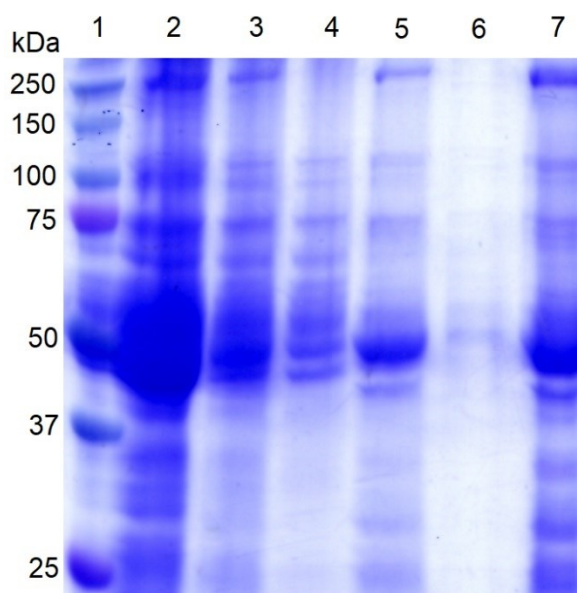
Protože aktivita a čistota NADH:cytochrom  $b_5$  oxidoreduktasy získané první purifikací (kap. 4.2.1. až 4.2.4.) nebyly uspokojivé, byla provedena druhá purifikace, a to ze zbytku mikrosomální frakce králíka (kap. 4.1.).

Cílem bylo purifikaci urychlit a zjednodušit, aby byl enzym izolován s vyšší aktivitou. Po solubilizaci byl učiněn pokus o zachycení  $b_5R$  na koloně CM-Sepharosy (3), který nebyl úspěšný, a izolace pokračovala chromatografií na koloně DEAE-Sepharosy (2) s okamžitým nanesením eluátu na kolonu 5'-ADP agarosy. Zároveň s  $b_5R$  byla opět izolována NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa. Použité postupy jsou shrnuty na obr. 37, str. 69.

### 4.3.1. Solubilizace mikrosomální frakce

Díl mikrosomální frakce o objemu 6,2 ml byl rozmražen a solubilizován postupem popsaným v kap. 3.4.3.3. a 4.2.1.. Solubilizace probíhala 25 minut a po ultracentrifugaci bylo získáno 44 ml prvotního solubilizátu. Pro zvýšení výtěžku byla peleta opět rehomogenizována v koncentrovanějším roztoku detergentů než při první solubilizaci a suspenze byla odstředěna za stejných podmínek. Supernatanty byly spojeny a bylo získáno 90 ml solubilizátu.

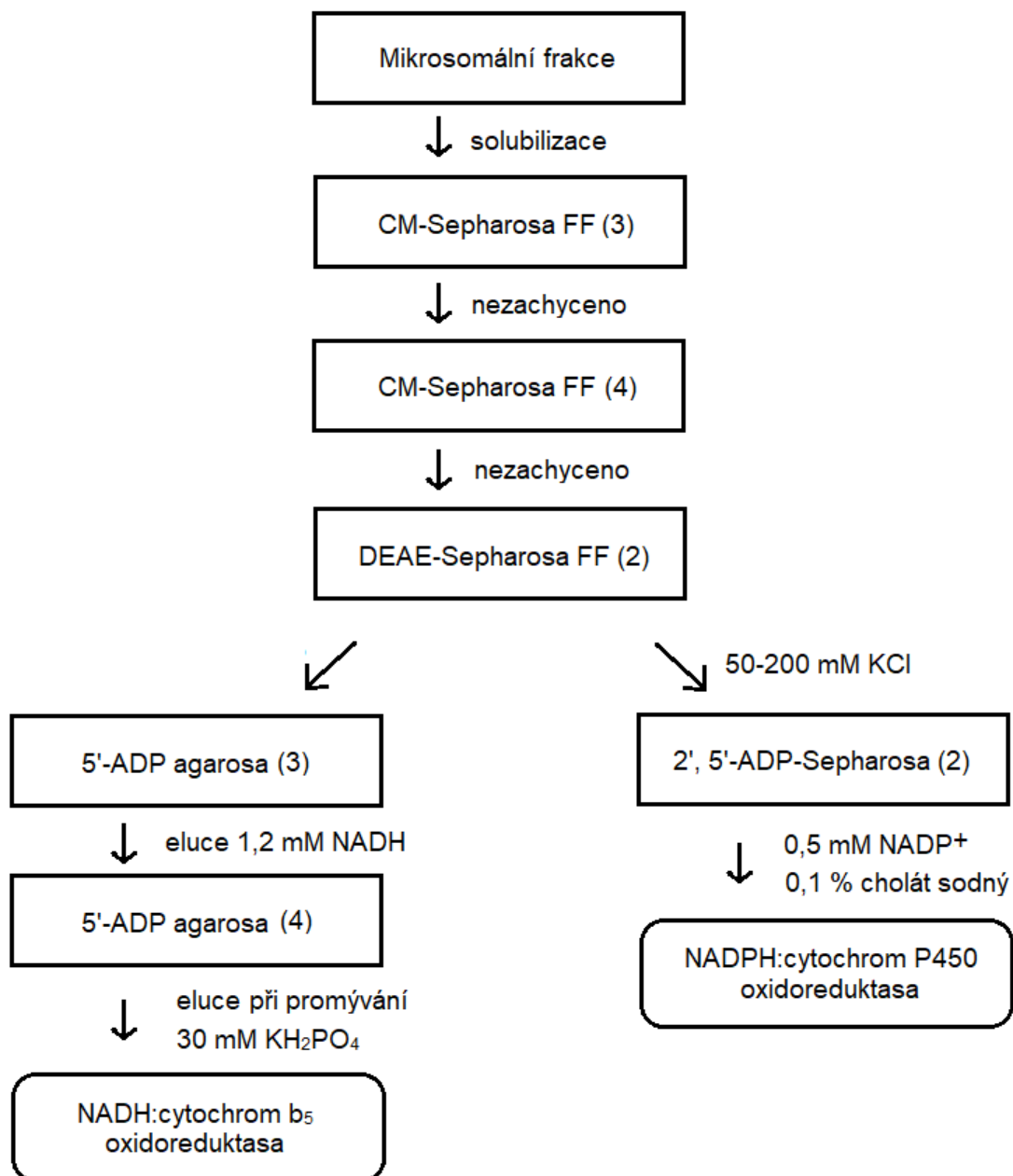
Vzorky mikrosomální frakce, solubilizátu a resuspendované pelety byly analyzovány SDS-PAGE (obr. 36).



**Obr. 36: Elektroforeogram vzorků z průběhu izolace mikrosomální frakce**

*10 % gel,*

*1 – standard molekulových hmotností, 2 – mikrosomální frakce (neředěná), 3 – solubilizát, 4 – supernatant po první ultracentrifugaci, 5 – solubilizát pelety po první ultracentrifugaci, 6 – supernatant po druhé ultracentrifugaci, 7 – resuspendovaná peleta po druhé ultracentrifugaci,*

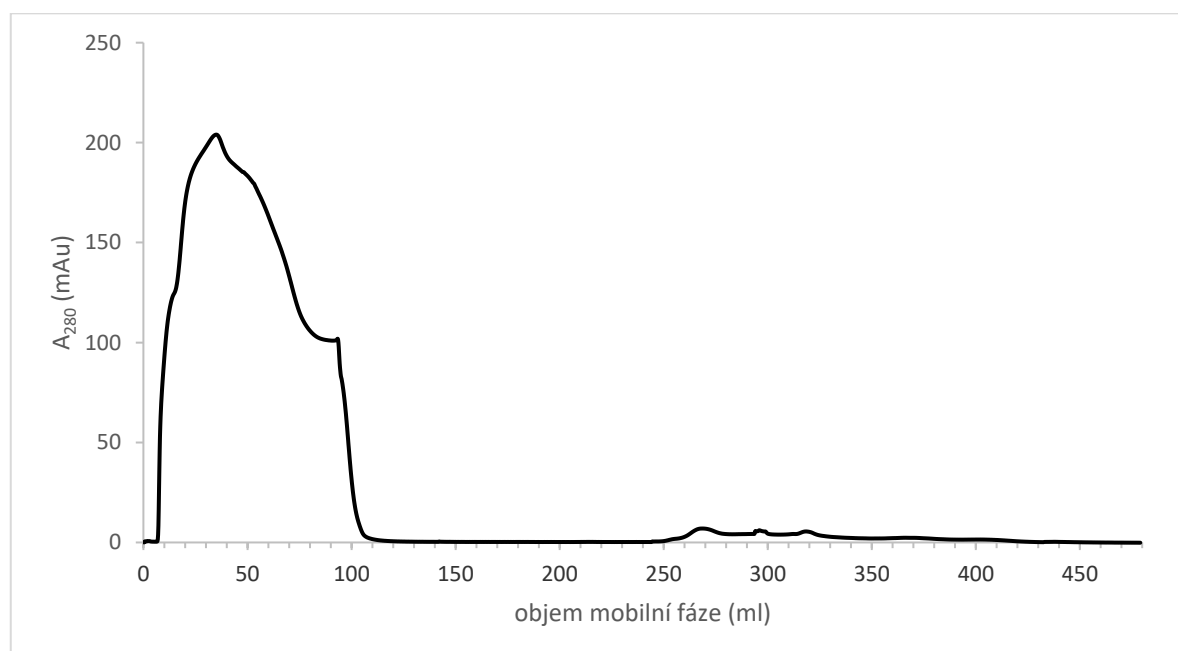


**Obr. 37: Schéma druhé purifikace NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy.** Cyt b<sub>5</sub> reduktasu se dvakrát nepodařilo zachytit na koloně CM-Sepharosy, takže bylo pokračováno zachycením CPR a jiných proteinů na koloně DEAE-Sepharosy. Cyt b<sub>5</sub> reduktasa obsahovala po eluci z kolony 5'-ADP agarosy (3) značné množství kontaminantů, takže tento krok byl opakován.

### 4.3.2. Chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (3) a (4)

Pro zachycení b<sub>5</sub>R byl solubilizát (kap. 4.3.1.) na kolonu CM-Sepharosy FF (3) ekvilibrovanou pufrém CM3-1. Byly sbírány dvě frakce nezachycených proteinů po 50 ml. Kolona byla následně promyta 110 ml ekvilibračního pufru a eluce proběhla gradientem 60-300 mM KCl (pufr CM3-2), a byly sbírány frakce o objemu 8 ml. Ve všech frakcích během chromatografie byla měřena aktivita b<sub>5</sub>R a absorbance při 280 nm.

Aktivita b<sub>5</sub>R nebyla nalezena v žádné eluční frakci, ale byla naměřena v obou frakcích z nanášení. Enzym se tedy na koloně nezachytil. Jak je patrné z chromatogramu (obr. 38), na koloně se zachytilo celkově velmi malé množství proteinů.



**Obr. 38: Průběh chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (3).**

**8-100 ml** – nanášení (0,5 až 2,0 ml/min)

**100-210 ml** – promývání (3,0 ml/min),

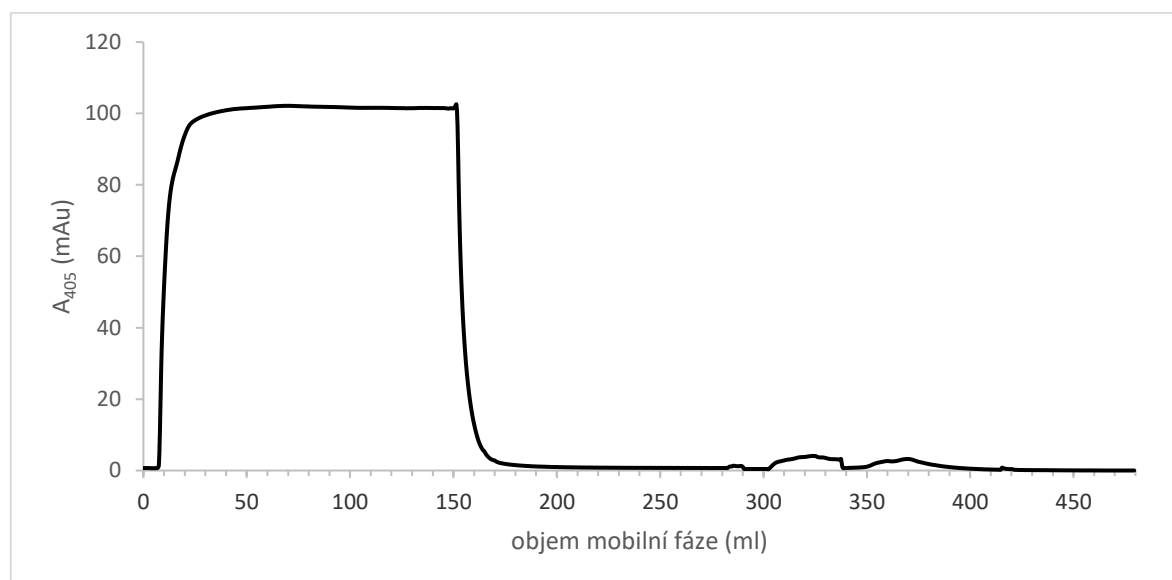
**210-410 ml** – eluce (2,0 ml/min), gradient 60-300 mM KCl

Nezachycení proteinů na koloně pravděpodobně způsobil fakt, že solubilizace byla provedena v nevhodném pufru, který obsahoval 50 mM Tris/acetát, vysoké množství detergentů a jeho pH bylo 7,5. Frakce z nanášení tedy byly spojeny a zahuštěny z objemu 100 ml na 20 ml, naředěny na objem 100 ml pufrém CM3-3, obsahujícím 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH bez detergentů, jehož pH bylo 6,8. Tento preparát byl opět zahuštěn stejným

postupem na 50 ml a naředěn pufrém CM3-3 na objem 150 ml, čímž bylo dosaženo patnáctinásobného naředění.

Preparát byl nanesen na kolonu CM-Sepharosy FF (4), ekvilibrovanou pufrém CM3-1 a byla sbírána jedna frakce (155 ml). Kolona byla promyta 100 ml pufru CM3-1 a eluce proběhla nejprve gradientem 50-100 mM KCl v 40 ml, 40 ml 100 mM KCl, a poté gradientem 100-300 mM KCl v 80 ml. Byly sbírány frakce o objemu 8 ml. Ve všech frakcích z eluce a v nanášecí frakci byla měřena aktivita  $b_5R$  a absorbance při 405 nm. Chromatogram je na obr. 39.

Aktivita  $b_5R$  byla opět naměřena pouze v nanášecí frakci, takže  $b_5R$  se opět nezachytila. Třetí pokus o zachycení na CM-Sepharose nebyl proveden a dalším krokem purifikace byla chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy (2).



**Obr. 39: Průběh chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (4).**

**8-150 ml** – nanášení (1,0 ml/min), **150-270 ml** – promývání (3,0 ml/min);

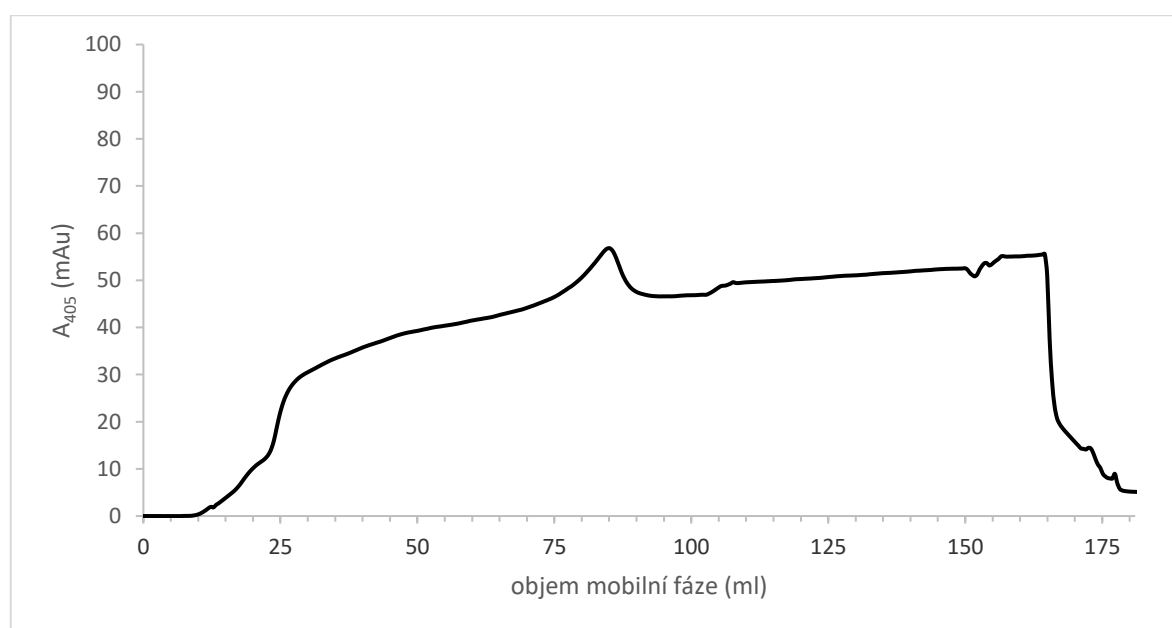
**270-310 ml** – eluce (1,0 ml/min), gradient 50-100 mM KCl, **310-350 ml** – 100 mM KCl,

**350-430 ml** – gradient 100-300 mM KCl

### 4.3.3. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

#### 4.3.3.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (2) - nanášení

Frakce proteinů nezachycených na koloně CM-Sepharosy FF (4) byla nanesena na kolonu DEAE-Sepharosy FF (2) ekvilibrované pufrém DEAE2-1. Byla měřena absorbance při 405 nm (obr. 40). Nezachycená frakce byla ihned nanášena na kolonu 5'-ADP agarosy (3) (kap. 4.3.3.2.).



**Obr. 40: Průběh nanášení na kolonu DEAE-Sepharosy FF (2)**

**8-175 ml – nanášení (0,5 ml/min)**

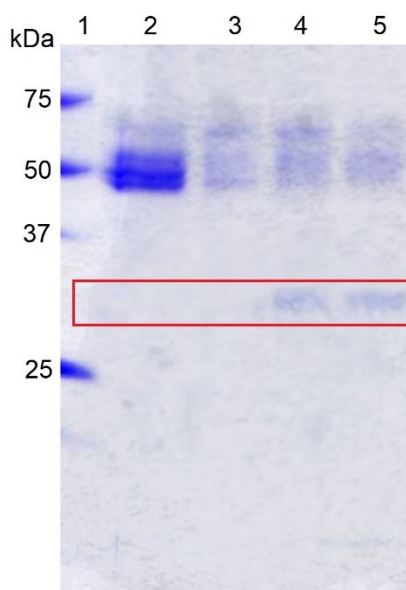
#### 4.3.3.2. Chromatografie na koloně 5'-ADP-agarosy (3) a (4)

Kolona 5'-ADP-agarosy (3) byla nejprve ekvilibrována pufrém DEAE2-1. Na kolonu byla aplikována nanášecí frakce z kolony DEAE-Sepharosy FF (2) (kap. 4.3.3.1.). Kolona byla promyta ekvilibračním pufrém (sbírány frakce o objemu 10 ml) a byla provedena eluce 1,2 mM NADH (pufr A3), při níž byly sbírány frakce o objemu 3-4 ml. Ve všech frakcích byla měřena aktivita b<sub>5</sub>R.



Aktivita  $b_5R$  byla naměřena v prvních dvou frakcích z eluce, které byly spojeny a zahuštěny z objemu 8 ml na objem 2,9 ml, načež byly dialyzovány proti 2 x 100 ml pufru DEAE2-1.

Nanášecí frakce (155 ml) a frakce vykazující aktivitu  $b_5R$  (2 x 4 ml) byly analyzovány SDS-PAGE (obr. 41). V elučních frakcích byl nalezen protein odpovídající molekulovou hmotností  $b_5R$ , ale zároveň i kontaminující proteiny v intervalu 50-70 kDa. Dialyzovaný preparát (2,9 ml) byl proto aplikován rychlostí 0,1 ml/min na pufru DEAE2-1 ekvilibrovanou kolonu 5'-ADP-agarosy (4).



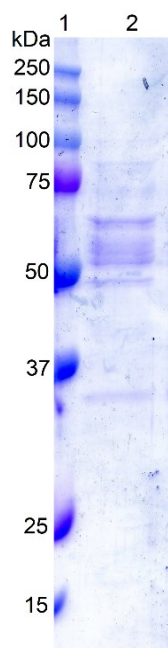
**Obr. 41: Elektroforeogram frakcí z chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (3).**

*12 % gel, 1 – standard molekulových hmotností, 2 – nanášecí frakce (155 ml), 3 – první promývací frakce (10 ml), 4 – první eluční frakce (4 ml), 5 – druhá eluční frakce (4 ml).*

*Červeným rámečkem zvýrazněna oblast molekulové hmotnosti  $b_5R$ .*

Kolona byla promyta 75 ml pufru AF4, který obsahoval 30 mM fosfát oproti 5 mM fosfátu v ekvilibračním pufru, za účelem odstranění kontaminujících proteinů. Byly sbírány frakce o objemu 10 ml. Eluce opět probíhala 1,2 mM NADH (pufr A3) a byly sbírány frakce o objemu 1,5 ml. Ve frakcích z promývání a eluce byla měřena aktivita  $b_5R$ . Ta byla nalezena pouze v první promývací frakci o objemu 10 ml. Enzym se tedy uvolnil pouze zvýšením iontové síly. Frakce byla zahuštěna na objem 1,5 ml. Finální preparát  $b_5R$  o celkové aktivitě

98  $\mu\text{mol}$  ferrikyanidu/min byl analyzován SDS-PAGE (obr. 42). Průběh purifikace je shrnut v tabulce 3.



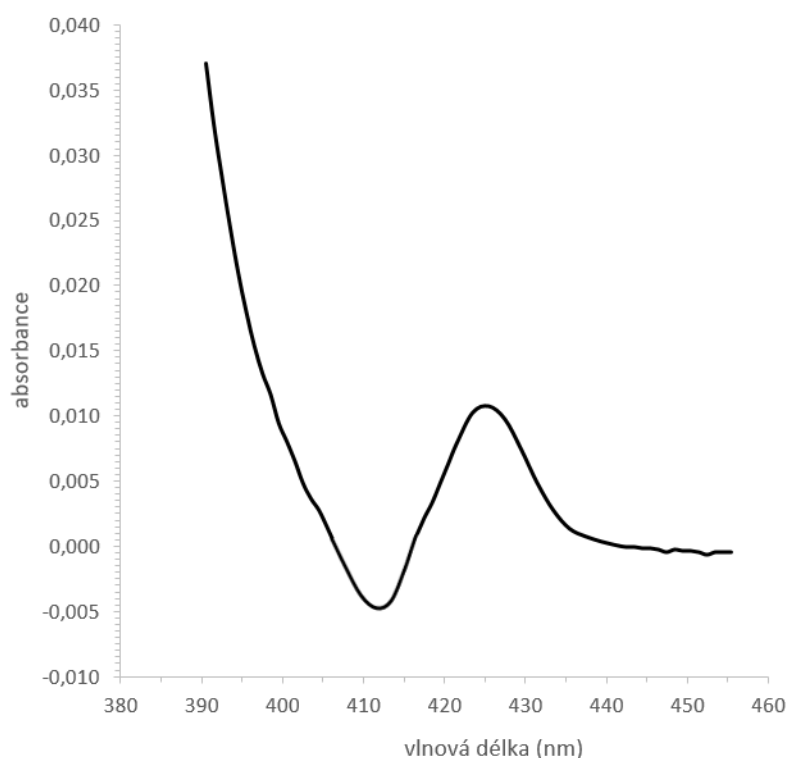
**Obr. 42: Elektroforeogram finálního preparátu  $b_5R$  z druhé purifikace. 12 % gel, 1 – standard molekulových hmotností, 2 – finální preparát 2 x ředěný,**

**Tab. 3: Bilanční tabulka druhé purifikace  $b_5R$  z králíčích jater**

Frakce	Objem (ml)	Koncentrace proteinů (mg/ml)	Celková aktivita enzymu ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Specifická aktivita enzymu ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	Výtěžek izolace (%)
MF	6,2	42,0	901	3,5	100
SOL	90	2,9	747	2,9	82,9
CM3	140	N	N	N	N
CM4	150	1,5	608	2,7	67,5
DEAE	155	N	N	N	N
5'-ADP (3)	8	0,7	161	28,8	17,9
5'-ADP (4)	10	0,5	103	20,6	11,4
FP	1,5	3,3	98	19,8	10,9

*MF* - mikrosomální frakce, *SOL* - solubilizát, *DEAE* - chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (1), *CM1* - chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (1), *CM2* - chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (2), *5'-ADP (1)* - chromatografie na koloně 5'-ADP agarosy (1), *5'-ADP (2)* - chromatografie na koloně 5'-ADP agarosy (2), *FP* - finální preparát, *N* - nestanoveno

Schopnost preparátu  $b_5R$  redukovat cytochrom  $b_5$  byla ověřena postupem popsaným v kap. 3.4.1.5., str. 48). Do dvou kyvet byl aplikován vzorek frakce eluované z kolony DEAE-Sepharosy (1) obsahující cytochrom  $b_5$  a nevykazující ferrikyanidovou aktivitu  $b_5R$ . Následně byl do obou kyvet přidán preparát  $b_5R$ . Do referenční kyvety byl přidán čistý pufr a do vzorkové kyvety roztok NADH. Po minutě bylo změřeno diferenční spektrum vzorku. Bylo pozorován vznik maxima při 225 nm a minima při 413 nm, což odpovídá přeměně oxidované formy cyt  $b_5$  na redukovanou (obr. 43).



**Obr. 43: Diferenční spektrum cytochromu  $b_5$  redukovaného  $b_5R$**

*Referenční kyveta:* 480  $\mu$ l 100 mM fosfátového pufru, pH 7,5; 10  $\mu$ l frakce cyt  $b_5$ ; 10  $\mu$ l preparátu  $b_5R$ ;

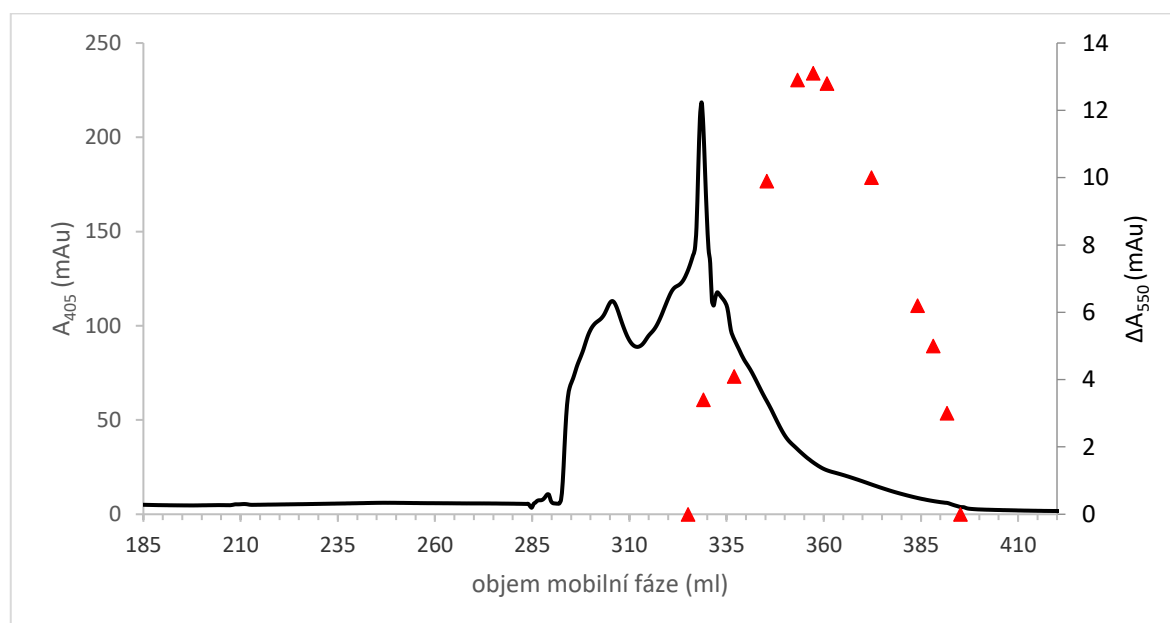
*Vzorková kyveta:* 470  $\mu$ l 100 mM fosfátového pufru, pH 7,5; 10  $\mu$ l frakce cyt  $b_5$ ; 10  $\mu$ l preparátu  $b_5R$ ; 10  $\mu$ l 10 mM NADH

*Měřeno po jedné minutě.*

## 4.3.2. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

### 4.3.2.1. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (2) - eluce

Kolona DEAE-Sepharosy (1) (kap. 4.3.3.1.) byla promyta ekvilibračním pufrem. Eluce z kolony probíhala gradientem 50-200 mM KCl v délce 46 ml, poté 10 ml 200 mM KCl a nakonec gradientem 200-500 mM KCl (50 ml). Byly sbírány frakce o objemu 4 ml. Ve frakcích byla měřena absorbance při 450 nm a aktivita CPR. Chromatogram je na obr. 44.



**Obr. 44: Průběh chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (2).**

*185-284 ml – promývání (3,0 ml/min),*

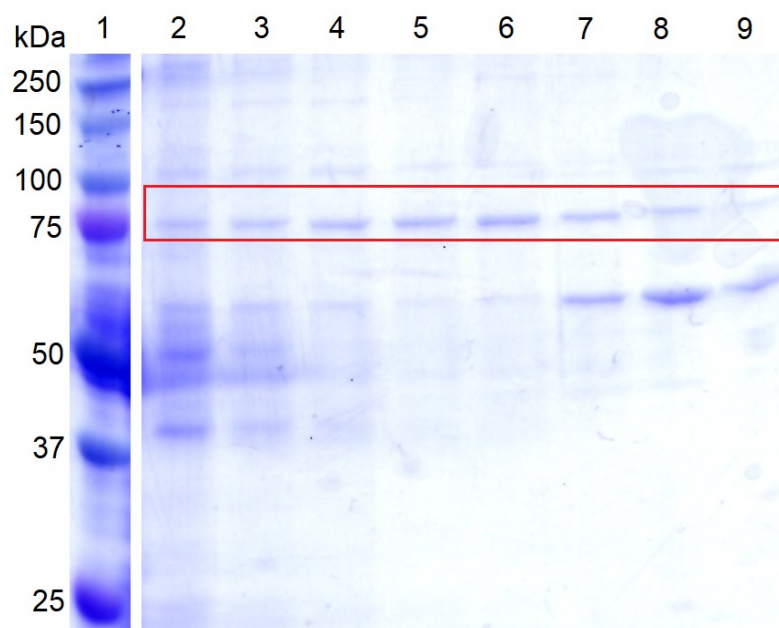
*284-330 ml – eluce (1,0 ml/min), gradient 50-200 mM KCl,*

*330-340 ml – 200 mM KCl, 340-410 ml – gradient 200-500 mM KCl*

*Červeně vyznačena aktivita CPR ve frakcích z eluce č. 9 až 27, vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 550 nm za 60 s při stanovení aktivity pomocí cytochromu c.*

Eluční frakce č. 9-27, vykazující aktivitu CPR, byly spojeny a v celkovém objemu 76 ml zamrazeny při  $-80^{\circ}\text{C}$  pro pozdější purifikaci CPR. Frakce s aktivitou CPR byly společně se vzorky mikrosomální frakce a solubilizátu analyzovány pomocí SDS-PAGE

(obr. 45). V drahách odpovídajících frakcí a aktivitou byl nalezen protein odpovídající molekulové hmotnosti CPR (~78 kDa).



**Obr. 45: Elektroforeogram elučních frakcí z kolony DEAE-Sepharosy FF (2).**

*10 % gel,*

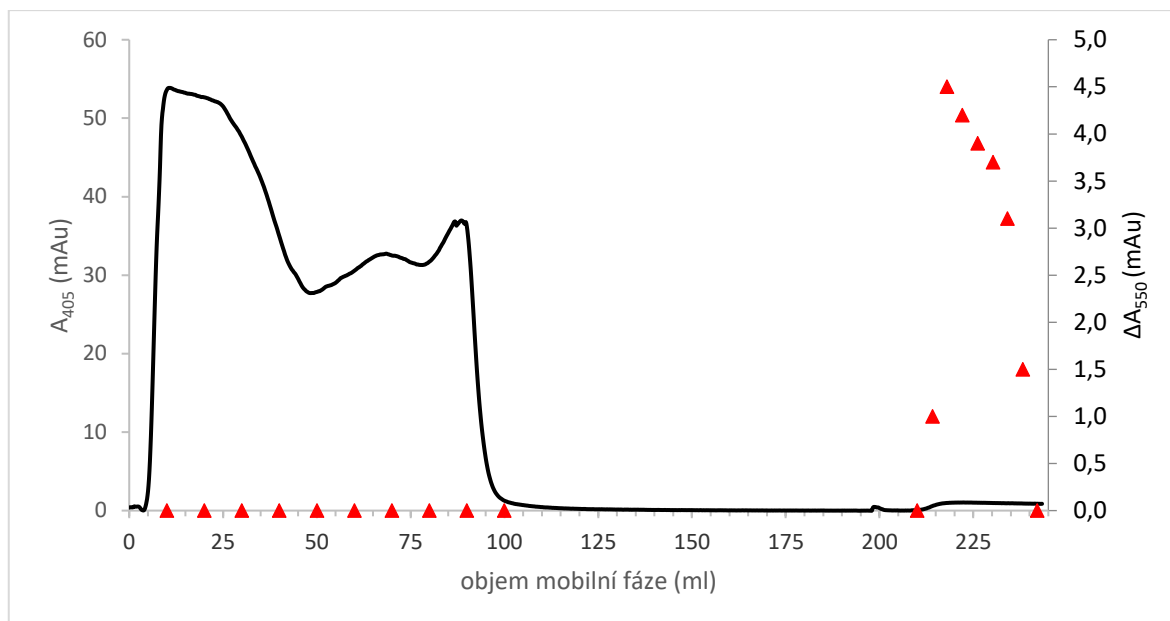
*1 – standard molekulových hmotností,*

*2-9 - eluční frakce č. 9-30 (každá třetí frakce)*

#### **4.3.2.2. Chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (3)**

Preparát eluovaný z kolony DEAE-Sepharosy (2) (kap. 4.3.2.1.) a uchovávaný při  $-80^{\circ}\text{C}$  byl rozmražen a po dialyzaci proti 2,0 l pufru E1 nanesen na kolonu 2', 5'-ADP-Sepharosy (3) ekvilibrovanou pufrům E1. Kolona byla promyta pufrům E3 obsahujícím 0,1 % cholát sodný (frakce o objemu 10 ml) a CPR z byla eluována pufrům E4, obsahujícím 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  a 0,1 % cholát sodný, a byly sbírány frakce o objemu 2 ml. V průběhu byla měřena absorbance při 405 nm a v každé frakci byla měřena aktivita CPR.

Průběh chromatografie je znázorněn na obr. 46, str. 78.

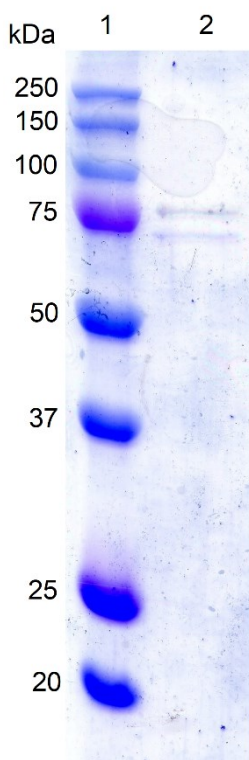


**Obr. 46: Průběh chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (3).**

*5-100 ml – nanášení (0,3-1,0 ml/min), 100-210 ml – promývání (1,5 ml/min),*

*210-230 ml – eluce 0,5 mM NADP<sup>+</sup> (0,3 ml/min)*

*Červeně vyznačena aktivita CPR ve frakcích z nanášení 1-10 a z eluce 25 až 31, vyjádřená jako hodnoty rozdílu absorbance při 550 nm za 60 s při stanovení aktivity pomocí cytochromu c.*



Aktivita CPR byla nalezena ve frakcích z eluce č. 25-31. Frakce byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací z celkového objemu 14 ml na objem 1,0 ml, kde byla naměřena celková aktivita 1,2  $\mu\text{mol}$  cyt c/min. Finální preparát byl analyzován SDS-PAGE (obr. 47). Byly nalezeny dva proteinové proužky. První (~78 kDa) odpovídá CPR a druhý (~72 kDa) formě CPR s odštěpenou membránovou kotvou. Průběh purifikace CPR je shrnut v tab. 4, str. 79.

**Obr. 47: Elektroforeogram finálního preparátu CPR**

**1** - standard molekulových hmotností

**2** - finální preparát, 5 x ředěno

**Tab. 4: Bilanční tabulka druhé purifikace CPR z králičích jater**

	Objem (ml)	Koncentrace proteinů (mg/ml)	Celková aktivita enzymu ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Specifická aktivita enzymu ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	Výtěžek izolace (%)
MF	6,2	42,0	25,6	0,1	100
SOL	90	2,9	16,9	0,06	66
CM3	140	N	12,8	N	50
CM4	150	N	11,4	N	45
DEAE2	90	0,1	2,9	0,3	11,3
2', 5'-ADP (3)	14	0,1	1,3	0,9	5,1
FP	1,0	0,5	1,2	2,4	4,7

*MF* - mikrosomální frakce, *SOL* - solubilizát,

*DEAE2* - chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy FF (2),

*CM3* - chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (3),

*CM4* - chromatografie na koloně CM-Sepharosy FF (3),

*2', 5'-ADP (3)* - chromatografie na koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy (2),

*FP* - finální preparát, *N* - nestanoveno

Výtěžek izolace vypočítán z hodnot celkové aktivity preparátu

## 5. Diskuze

### 5.1. Izolace mikrosomální frakce a solubilizace

Cílem práce bylo izolovat NADH:cytochrom  $b_5$  oxidoreduktasu ( $b_5R$ ) a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (CPR) z jaterní tkáně králíka domácího. Protože původně bylo uvažováno i o izolaci CYP2B4, králík byl za účelem jeho nabohacení premedikován 0,1 % fenobarbitalem v pitné vodě.

Jaterní tkáň pokusného zvířete byla homogenizována a diferenční centrifugací z ní byla připravena mikrosomální frakce o objemu 18 ml a obsahu proteinů 42,0 mg/ml. Tento preparát byl rozdělen na dva díly a každý z nich byl využit k izolaci  $b_5R$  a CPR.

K solubilizaci byla v obou případech použita kombinace iontového a neiontového detergentu - cholátu sodného, resp. Brijie 35. Přítomnost detergentů způsobila uvolnění proteinů z lipidových membrán. Za účelem zvýšení výtěžku byl sediment nesolubilizovaných mikrosomů rehomogenizován v roztoku o desetkrát vyšší koncentraci detergentů a solubilizáty byly spojeny. Solubilizace byla úspěšná - množství proteinů v solubilizátu bylo v prvním případě rovno 100 % množství proteinů v příslušném dílu mikrosomální frakce a v druhém případě 96 %. Aktivity  $b_5R$  a CPR klesly o 19 %, resp. 40 % při solubilizaci prvního dílu mikrosomální frakce a o 17 %, resp. 34 % při solubilizaci druhého dílu. Tento relativní rozdíl v poklesu aktivit ukazuje jinou míru citlivosti obou enzymů na přítomnost detergentů.

### 5.2. Purifikace NADH:cytochrom $b_5$ oxidoreduktasy

K purifikaci  $b_5R$  byla použita kombinace chromatografií na koloně DEAE-Sepharosy, CM-Sepharosy a 5'-ADP agarosy.

Účelem DEAE-Sepharosy bylo zachytit CPR a jiné příměsi, jejichž pI je nižší než pH ekvilibračního pufru (pI (CPR) = 5,31). Isoelektrický bod králičí  $b_5R$  je udáván v databázi UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) jako 9,02 nebo 9,46, takže při pH 7,5 nebo 7,0 by se



neměla na koloně zachycovat. Tak tomu skutečně bylo při použití této kolony v obou purifikacích. Aktivita  $b_5R$  byla naměřena pouze ve frakcích z nanášení (kap. 4.2.2.1. a 4.3.3.1.). V případě první purifikace byla aktivita nalezena i v jedné frakci z eluce (kap. 4.2.3.1.), a to těsně před elucí cytochromu  $b_5$ . Jedná se pravděpodobně o  $b_5R$ , která migruje společně s cytochromem  $b_5$ .

Druhý ionexový nosič, CM-Sepharosa, byla použita s cílem zachytit a přečistit  $b_5R$  před aplikací na afinitní kolonu 5'-ADP agarosy. Při první purifikaci byla tato kolona zařazena po DEAE-Sepharose a  $b_5R$  byla úspěšně zachycena a eluována gradientem NaCl v 20 mM HEPES pufru (pH 7,0). Při nanášení vykazovaly nezachycené frakce relativně velkou aktivitu  $b_5R$  (obr. 27, str. 58), ale SDS-PAGE ukázala protein o sledované molekulové hmotnosti (~35 kDa, obr. 28, str. 58) pouze ve frakcích z eluce. Je možné, že naměřená aktivita ve frakcích z nanášení patřila jinému enzymu než  $b_5R$ . Měření aktivity pomocí ferrikyanidu je totiž značně nespecifické (osobní sdělení školitele). Za účelem dalšího přečistění a zahuštění preparátu byla chromatografie opakována s ekvilibračním pufrům obsahujícím 20 mM  $KH_2PO_4$  namísto HEPES. Pufr byl změněn proto, aby bylo vyzkoušeno, jestli se  $b_5R$  bude zachycovat na koloně i v tomto pufru, což by umožnilo jeho použití v příštích izolacích  $b_5R$ , a tím zjednodušení a urychlení postupu. Fosfátový pufr je totiž možné použít i pro chromatografie na kolonách DEAE-Sepharosy a 5'-ADP agarosy. Na kolně se podařilo  $b_5R$  úspěšně zachytit a eluovat gradientem KCl (obr. 29, str. 59).

CM-Sepharosa byla použita rovněž při druhé purifikaci  $b_5R$ , a to jako první chromatografický krok. Toto použití je neobvyklé, podle dostupné literatury je při izolacích  $b_5R$  zpravidla prvním krokem chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy [149]. Na kolonu CM-Sepharosy byl nanesen solubilizát obsahující 50 mM Tris/acetát pufr a vysoké množství detergentů, což vysvětluje, proč se  $b_5R$  na koloně nezachytila (kap. 4.3.2.). Preparát byl 15x naředěn 5 mM fosfátovým pufrům neobsahujícím detergenty a chromatografie byla opakována. Ani v tomto případě nedošlo z neznámých důvodů k zachycení  $b_5R$ . Další chromatografie na CM-Sepharose nebyla prováděna a preparát byl podle původního plánu nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy (kap. 4.3.3.1.).

Posledním chromatografickým krokem bylo zachycení  $b_5R$  na koloně 5'-ADP agarosy. Tento nosič má vysokou afinitu k NADH-dependentním dehydrogenázám, včetně  $b_5R$ , a k její izolaci je běžně využíván [149]. Při první purifikaci se na první pokus  $b_5R$  nepodařilo na koloně zachytit, pravděpodobně z důvodu příliš velké iontové síly pufru (pufr obsahující 50 mM fosfát, kap. 4.2.3.2.). Chromatografie tedy byla opakována v pufru

obsahujícím 5 mM fosfát a zachycení proběhlo úspěšně a eluce finálního preparátu byla provedena 1,2 mM NADH (kap. 4.2.3.2.). Finální preparát byl získán s výtěžkem aktivity pouze 0,3 % z důvodu zdlouhavého a komplikovaného izolačního postupu. Elektroforéza (obr. 31, str. 62) ukázala, že finální preparát obsahoval kontaminanty o molekulových hmotnostech 50-70 kDa. Ty by bývalo bylo potenciálně možné odstranit promýváním afinitní kolony pufrů se zvýšenou iontovou silou, ale pravděpodobně by došlo i k eluci  $b_5R$ . Pro získání finálního preparátu s vyšší aktivitou byla při druhé purifikaci frakce nezachycených proteinů na koloně DEAE-Sepharosy (kap. 4.3.3.1.) nanášena přímo na kolonu 5'-ADP agarosy ekvilibrované společným pufrům obsahujícím 5 mM fosfát. Došlo k zachycení  $b_5R$  (kap. 4.3.3.2.) a po promytí ekvilibračním pufrům k její eluci 1,2 mM NADH. Elektroforéza frakcí (obr. 41, str. 73) opět ukázala několik kontaminantů o molekulových hmotnostech 50-70 kDa, ale v relativně větších množstvích vůči  $b_5R$  než při první purifikaci, která jako mezikrok využila dvě chromatografie na koloně CM-Sepharosy. Afinitní chromatografie byla opakována za stejných podmínek, ale kolona byla po zachycení  $b_5R$  promývána pufrům obsahujícím 30 mM fosfát. Zvýšení iontové síly ale vedlo k eluci  $b_5R$  během promývání. V další pokusy o přečistění preparátu nebyly podniknuty a finální preparát byl analyzován SDS-PAGE (obr. 42, str. 74), která potvrdila společnou eluci  $b_5R$  a několika kontaminantů. Protože celkově druhá purifikace trvala výrazně kratší dobu a obsahovala méně chromatografických kroků než první purifikace, výtěžek aktivity  $b_5R$  byl 10,9 % oproti 0,3 %. Schopnost preparátu redukovat cytochrom  $b_5$  byla ověřena změřením diferenčního spektra oxidované a redukované formy cytochromu  $b_5$  po přidání preparátu  $b_5R$  a NADH (obr. 43, str. 75).

Pro izolaci  $b_5R$  v čisté formě by pravděpodobně bylo třeba využít po chromatografii na koloně DEAE-Sepharosy nebo 5'-ADP agarosy další purifikační krok, např. chromatografii na hydroxylapatitu nebo gelovou permeační chromatografii. Ani jedna z těchto možností ale není použitelná pro malá množství preparátu z důvodu velkých ztrát proteinu a enzymové aktivity. Také by bylo vhodné optimalizovat podmínky pro zachycení  $b_5R$  na 5'-ADP agarose v různých pufrům s různou koncentrací tak, aby bylo možné zvýšením iontové síly odstranit pouze kontaminační proteiny a  $b_5R$  eluovat v čisté formě. Proteiny by hypoteticky bylo možné separovat postupnou elucí velmi mírným gradientem iontové síly.

### 5.3. Purifikace NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

Při obou purifikacích b<sub>5</sub>R byla zároveň purifikována i CPR, a to zachycením na koloně DEAE-Sepharosy (kap. 4.2.2.1. a 4.3.3.1.) a s následnou elucí gradientem KCl (kap. 4.2.3.1. a 4.3.3.1.). V obou případech byla CPR zachycena úspěšně a v nezachycených frakcích nebyla naměřena její aktivita. Po eluci a dialýze byly frakce obsahující CPR naneseny na kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy (kap. 4.2.3.2. a 4.3.3.2.), která má vysokou afinitu k NADPH-dependentním dehydrogenázám. Při první purifikaci byla CPR eluována 1,0 mM NADP<sup>+</sup> v pufru obsahujícím 0,1 % Brij 35. Tento detergent komplikuje možné použití pro experimenty v rekonstituovaných lipidových systémech, proto byla provedena rechromatografie za stejných podmínek, ale kolona byla promyta a eluce proběhla puftrem, kdy byl Brij 35 nahrazen 0,1 % cholátem sodným. Cholát sodný byl poté z finálního preparátu odstraněn dialýzou. Při druhé purifikaci bylo nahrazení Brije 35 cholátem sodným provedeno již při první chromatografii na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy.

Elektroforéza finálního preparátu z první purifikace (obr. 35, str. XXX) potvrdila přítomnost CPR v čisté formě, s molekulovou hmotností přibližně 78 kDa. Výtěžek izolace byl 3,4 %. Při druhé purifikaci, kde byla afinitní chromatografie použita jen jednou, byl výtěžek vyšší, a to 4,7 %. Elektroforéza finálního preparátu ale ukázala přítomnost formy CPR s odštěpenou membránovou kotvou (obr. 47, str. XXX, ~72 kDa). Tato forma je sice schopna rovněž redukovat cytochrom c, ale je nemožné ji použít pro experimenty s rekonstitucí v lipidové membráně.

## 6. Shrnutí a závěr

Z jater králíka domácího bylo získáno 18 ml mikrosomální frakce o obsahu proteinů 42 mg/ml. Z této frakce byly provedeny dva pokusy o izolaci NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy (b<sub>5</sub>R).

Při prvním pokusu byla pomocí chromatografie na kolonách DEAE-Sepharosy, CM-Sepharosy a 5'-ADP agarosy izolována s výtěžkem 0,3 % ferrikyanid-reduktasové aktivity a obsahovala několik kontaminantů o molekulových hmotnostech 50-70 kDa.

Při druhé purifikaci b<sub>5</sub>R byla použita kombinace DEAE-Sepharosy s přímým napojením na kolonu 5'-ADP agarosy, z níž byla získána b<sub>5</sub>R s výtěžkem 10,9 % a obsahovala rovněž několik kontaminantů v intervalu molekulových hmotností 50-70 kDa.

Při obou purifikacích byla rovněž získána NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR), a to chromatografií na koloně DEAE-Sepharosy s následným finálním přečištěním na afinitní koloně 2', 5'-ADP-Sepharosy. V prvním případě byla získána CPR v elektroforeticky čisté formě s molekulovou hmotností 78 kDa, s výtěžkem cytochrom c-reduktasové aktivity 3,4 %. V druhém případě byl výtěžek 4,7 %, ale preparát obsahoval z části formu CPR bez membránové kotvy.

## Seznam použité literatury

- [1] Guengerich F. P.: *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), 70-83 (2008)
- [2] Bernhardt R.: *Journal of Biotechnology*, 124(1), 128-45 (2006)
- [3] Axelrod J.: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 114(4), 430-8 (1955)
- [4] Brodie B. B., Axelrod J., Cooper J. R., Gaudette L., Ladu B. N., Mitoma C., a kol.: *Science*, 121(3147), 603-4 (1955)
- [5] Klingenberg M.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75(2), 376-86 (1958)
- [6] Garfinkel D.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77(2), 493-509 (1958)
- [7] Nelson, D. R.: *Human Genomics*, 4, 59-65 (2009)
- [8] Nelson D. R.: *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1814(1), 14-8 (2011)
- [9] Lewis D. F. V.: *Pharmacogenomics*, 5(3), 305-18 (2004)
- [10] Guengerich F. P.: *Human Cytochrome P450 Enzymes. Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, třetí edice, str. 377–463, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (2005)
- [11] Guengerich F. P., Munro A. W.: *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17065-73 (2013)
- [12] Guengerich F. P.: *Human Cytochrome P450 Enzymes. Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, čtvrtá edice, str. 523–785, Springer International Publishers, Cham, Švýcarsko. (2015)
- [13] Singh D., Kashyap A., Pandey R. V., Saini K. S.: *Drug Discovery Today*, 16(17-18), 793-9 (2011)
- [14] Ingelman-Sundberg M.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(3), 142- (2004)

- [15] Karlgren M., Oscarson M., Ingelman-Sundberg M.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(3), 142- (2004)
- [16] Durr U. H. N., Waskell L., Ramamoorthy A.: *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1768(12), 3235-59 (2007)
- [17] Scotte E., He Y. A., Wester M. R., White M. A., Chin C. C., Halper T. J. R., a kol.: : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13196-201 (2003)
- [18] Bridges A., Gruenke L., Chang Y. T., Vakser I. A., Loew G., Waskell L.: *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 17036-49(1998)
- [19] Stiborova M., Hudecek J., Paca J., Martinek V.: *Chemicke Listy*, 98(10), 876-90 (2004)
- [20] Lu A. Y. H., Junk K. W., Coon M. J.: *Federation Proceedings*, 28(2), 874- (1969)
- [21] Lu A. Y. H., Junk K. W., Coon M. J.: *Journal of Biological Chemistry*, 244(13), 3714- (1969)
- [22] Black S. D., French J. S., Williams C. H., Coon M. J.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91(4), 1528-35 (1979)
- [23] Schenkman J. B., Jansson I.: *Pharmacology & Therapeutics*, 97(2), 139-52 (2003)
- [24] Nagano S., Poulos T. L.: *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31659-63 (2005)
- [25] Im S. C., Waskell L.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(1), 144-53 (2011)
- [26] Pearl N. M., Wilcoxon J., Im S., Kunz R., Darty J., Britt R. D., a kol.: *Biochemistry*, 55(47), 6558-67 (2016)
- [27] Yamazaki H., Gillam E. M. J., Dong M. S., Johnson W. W., Guengerich F. P., Shimada T.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342(2), 329-37 (1997)
- [28] Davydov D. R.: *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(5), 543-58 (2011)
- [29] Backes W. L., Batie C. J., Cawley G. F.: *Biochemistry*, 37(37), 12852-9 (1998)

- [30] Cawley G. F., Batie C. J., Backes W. L.: *Biochemistry*, 34(4), 1244-7 (1995)
- [31] Cawley G. F., Zhang S. X., Kelley R. W., Backes W. L.: *Drug Metabolism and Disposition*, 29(12), 1529-34 (2001)
- [32] Alston K., Robinson R. C., Park S. S., Gelboin H. V., Friedman F. K.: *Journal of Biological Chemistry*, 266(2), 735-9 (1991)
- [33] Reed J. R., Connick J. P., Cheng D. M., Cawley G. F., Backes W. L.: *Biochemical Journal*, 446, 489-97 (2012)
- [34] Li B., Yau P., Kemper B.: *Proteomics*, 11(16), 3359-68 (2011)
- [35] Szczesna-Skorupa E., Mallah B., Kemper B.: *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31269-76 (2003)
- [36] Jamakhandi A. P., Kuzmic P., Sanders D. E., Miller G. P.: *Biochemistry*, 46(35), 10192-201 (2007)
- [37] Reed J. R., Backes W. L.: *Pharmacology & Therapeutics*, 133(3), 299-310 (2012)
- [38] Davydov D. R., Davydova N. Y., Sineva E. V., Kufareva I., Halpert J. R.: *Biochemical Journal*, 453, 219-30 (2013)
- [39] Ozalp C., Szczesna-Skorupa E., Kemper B.: *Drug Metabolism and Disposition*, 33(9), 1382-90 (2005)
- [40] Hazai E., Bikadi Z., Simonyi M., Kupfer D.: *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 19(4), 271-85 (2005)
- [41] Hazai E., Kupfer D.: *Drug Metabolism and Disposition*, 33(1), 157-64 (2005)
- [42] Lu A. Y. H., Coon M. J.: *Journal of Biological Chemistry*, 243(6), 1331- (1968)
- [43] Sugishima M., Sato H., Higashimoto Y., Harada J., Wada K., Fukuyama K., a kol.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2524-9 (2014)
- [44] Yamazaki H., Shimada T., Martin M. V., Guengerich F. P.: *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30885-91 (2001)
- [45] Laden B. P., Tang Y. Z., Porter T. D.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374(2), 381-8 (2000)

- [46] Laguna J. C., Nagi M. N., Cook L., Cinti D. L.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 269(1), 272-83 (1989)
- [47] Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S. S., Kim J. J. P.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8411-6 (1997)
- [48] Sevrioukova I. F., Li H. Y., Zhang H., Peterson J. A., Poulos T. L.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 1863-8 (1999)
- [49] Iyanagi T., Mason H. S.: *Biochemistry*, 12(12), 2297-308 (1973)
- [50] Yasukochi Y., Masters B. S. S.: *Journal of Biological Chemistry*, 251(17), 5337-44 (1976)
- [51] Strobel H. W., Nadler S. G., Nelson D. R.: *Drug Metabolism Reviews*, 20(2-4), 519-33 (1989)
- [52] Bhattacharyya A. K., Hurley J. K., Tollin G., Waskell L.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2), 318-24 (1994)
- [53] Djordjevic S., Roberts D. L., Wang M., Shea T., Camitta M. G. W., Masters B. S. S., a kol.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3214-8 (1995)
- [54] Roman L. J., McLain J., Masters B. S. S.: *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25700-7 (2003)
- [55] Hamdane D., Xia C. W., Im S. C., Zhang H. M., Kim J. J. P., Waskell L.: *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11374-84 (2009)
- [56] Ellis J., Gutierrez A., Barsukov I. L., Huang W. C., Grossmann J. G., Roberts G. C. K.: *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36628-37 (2009)
- [57] Jenner M., Ellis J., Huang W. C., Raven E. L., Roberts G. C. K., Oldham N. J.: *Angewandte Chemie-International Edition*, 50(36), 8291-4 (2011)
- [58] Xia C. W., Hamdane D., Shen A. L., Choi V., Kasper C. B., Pearl N. M., a kol.: *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 554-565 (2011)
- [59] Sundermann A., Oostenbrink C.: *Protein Science*, 22(9), 1183-95 (2013)



- [60] Laursen T., Singha A., Rantzau N., Tutkus M., Borch J., Hedegard P., a kol.: *Acs Chemical Biology*, 9(3), 630-4 (2014)
- [61] Vincent B., Morellet N., Fatemi F., Aigrain L., Truan G., Guittet E., a kol.: *Journal of Molecular Biology*, 420(4-5), 296-309 (2012)
- [62] Gao Q. X., Doneanu C. E., Shaffer S. A., Adman E. T., Goodlett D. R., Nelson S. D.: *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20404-17 (2006)
- [63] Zhang W., Liu Y., Yan J. Y., Cao S. N., Bai F. L., Yang Y., a kol.: *Journal of the American Chemical Society*, 136(9), 3640-6 (2014)
- [64] Xia C. W., Panda S. P., Marohnic C. C., Martasek P., Masters B. S., Kim J. J. P.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13486-91 (2011)
- [65] <http://www.drnelson.uthsc.edu/hum.html> (2. 4. 2017)
- [66] Reed J. R., Cawley G. F., Backes W. L.: *Drug Metabolism Letters*, 1(1), 6-16 (2011)
- [67] Peterson J. A., Ebel R. E., Okeeffe D. H., Matsubara T., Estabrook R. W.: *Journal of Biological Chemistry*, 251(13), 4010-6 (1976)
- [68] Estabrook R. W., Hildebrandt A. G., Baron J., Netter K. J., Leibman K.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 42(1), 132- (1971)
- [69] Shimizu T., Tateishi T., Hatano M., Fujiikuriyama Y.: *Journal of Biological Chemistry*, 266(6), 3372-5 (1991)
- [70] Shen S. J., Strobel H. W.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304(1), 257-65 (1993)
- [71] Kenaan C., Zhang H. M., Shea E. V., Hollenberg P. F.: *Biochemistry*, 50(19), 3957-67 (2011)
- [72] Voznesensky A. I., Schenkman J. B.: *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14669-76 (1992)
- [73] Estrada D. F., Laurence J. S., Scott E. E.: *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 17008-18 (2013)
- [74] Hiruma Y., Hass M. A. S., Kikui Y., Liu W. M., Olmez B., Skinner S. P., a kol.: *Journal of Molecular Biology*, 425(22), 4353-65 (2013)

- [75] Pochapsky S. S., Pochapsky T. C., Wei J. W.: *Biochemistry*, 42(19), 5649-56 (2003)
- [76] [http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/NADPH\\_Cytochrome\\_P450\\_Oxidoreductase](http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/NADPH_Cytochrome_P450_Oxidoreductase) (5. 4. 2017)
- [77] Agrawal V., Huang N., Miller W. L.: *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(7), 569-76 (2008)
- [78] Sandee D., Morrissey K., Agrawal V., Tam H. K., Kramer M. A., Tracy T. S., a kol.: *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(11), 677-86 (2010)
- [79] Sandee D., Agrawal V., Choi J. H., Morrissey K. M., Giacomini K. M., Miller W. L.: *Endocrine Reviews*, 31(3), 461-469 (2010)
- [80] Agrawal V., Choi J. H., Giacomini K. M., Miller W. L.: *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(10), 611-8 (2010)
- [81] Chen X., Pan L. Q., Naranmandura H., Zeng S., Chen S. Q.: *Plos One* 2012, 7(6), 123-131 (2012)
- [82] Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H., Hara T., Noguchi M.: *Protein Expression and Purification* , 29(1), 1-7 (2003)
- [83] Lamb D. C., Kim Y. C., Yermalitskaya L. V., Yermalitsky V. N., Lepesheva G. I., Kelly S. L., a kol.: *Structure*, 14(1), 51-61 (2006)
- [84] Hubbard P. A., Shen A. L., Paschke R., Kasper C. B., Kim J. J. P.: *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29163-70 (2001)
- [85] Vergeres G., Waskell L.: *Biochimie*, 77(7-8), 604-20 (1995)
- [86] Keilin D., Hartree E. F.: *Nature*, 164(4163), 254-8 (1949)
- [87] Sanborn R. C., Williams C. M.: *Journal of General Physiology*, 33(5), 579-88 (1950)
- [88] Pappenheimer A. M., Williams C. M.: *Journal of General Physiology*, 35(5), 727-40 (1952)
- [89] Hegesh E., Hegesh J., Kaftory A.: *New England Journal of Medicine*, 314(12), 757-61 (1986)
- [90] Douglas R. H., Hultquist D. E.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(7), 3118-22 (1978)
- [91] Keyes S. R., Cinti D. L.: *Journal of Biological Chemistry*, 255(23), 1357-64 (1980)
- [92] Keyes S. R., Cinti D. L.: *Federation Proceedings*, 39(6):1643- (1980)

- [93] Grinstead G. F., Gaylor J. L.: *Journal of Biological Chemistry*, 257(23), 3937-44 (1982)
- [94] Fukushima H., Grinstead G. F., Gaylor J. L.: *Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4822-6 (1981)
- [95] Soong R., Smith P. E. S., Xu J. D., Yamamoto K., Im S. C., Waskell L., a kol.: *Journal of the American Chemical Society*, 132(16), 5779-88 (2010)
- [96] Ozols J.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 997(1-2), 121-30 (1989)
- [97] Mulrooney S. B., Waskell L.: *Protein Expression and Purification*, 19(1), 173-8 (2000)
- [98] Durr U. H. N., Yamamoto K., Im S. C., Waskell L., Ramamoorthy A.: *Journal of the American Chemical Society*, 129(21), 6670- (2007)
- [99] Spatz L., Strittmatter P.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(5), 1042- (1971)
- [100] Clarke T. A., Im S. C., Bidwai A., Waskell L.: *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36809-18 (2004)
- [101] Wang L. J., Cowley A. B., Benson D. R.: *Protein Engineering Design & Selection*, 20(10), 511-20 (2007)
- [102] Davis R. B., Lecomte J. T. J.: *Biopolymers*, 90(4), 544-55 (2008)
- [103] Davis R. B., Lecomte J. T. J.: *Biopolymers*, 90(4), 556-66 (2008)
- [104] Falzone C. J., Mayer M. R., Whiteman E. L., Moore C. D., Lecomte J. T. J.: *Biochemistry*, 35(21), 6519-26 (1996)
- [105] Falzone C. J., Moore C. D., Mayer MR, Lecomte J. T. J.: *Biophysical Journal*, 70(2), 1478-1485 (1996)
- [106] Mukhopadhyay K., Lecomte J. T. J.: *Biochemistry*, 43(38), 12227-36 (2004)
- [107] Pfeil W.: *Protein Science*, 2(9), 1497-501 (1993)
- [108] Hildebrand T. A., Estabrook R. W.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 143(1), 66- (1971)
- [109] Correia M. A., Mannering G. J.: *Molecular Pharmacology*, 9(4), 455-69 (1973)
- [110] Ahuja S., Jahr N., Im S. C., Vivekanandan S., Popovych N., Le Clair S. V., a kol.: *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 22080-95. (2013)

- [111] Zhang H. M., Hamdane D., Im S. C., Waskell L.: *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), 5217-25 (2008)
- [112] Omata Y., Robinson R. C., Gelboin H. V., Pincus M. R., Friedman F. K.: *Febs Letters*, 346(2-3), 241-5 (1994)
- [113] Henderson C. J., McLaughlin L. A., Wolf C. R.: *Molecular Pharmacology*, 83(6), 1209-17 (2013)
- [114] Stiborova M., Indra R., Moserova M., Frei E., Schmeiser H. H., Kopka K., a kol.: *Chemical Research in Toxicology*, 29(8), 1325-34 (2016)
- [115] Finn R. D., McLaughlin L. A., Ronseaux S., Rosewell I., Houston J. B., Henderson C. J., a kol.: *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31385-93 (2008)
- [116] McLaughlin L. A., Ronseaux S., Finn R. D., Henderson C. J., Wolf C. R.: *Molecular Pharmacology*, 85(1), 186- (2014)
- [117] McLaughlin L. A., Ronseaux S., Finn R. D., Henderson C. J., Wolf C. R.: *Molecular Pharmacology*, 78(2), 269-78 (2010)
- [118] Henderson C. J., McLaughlin L. A., Finn R. D., Ronseaux S., Kapelyukh Y., Wolf C. R.: *Drug Metabolism and Disposition*, 42(1), 70-7 (2014)
- [119] Nakajin S., Hall P. F.: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 14(12), 1249-52 (1981)
- [120] Katagiri M., Suhara K., Shiroo M., Fujimura Y.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108(1), 379-84 (1982)
- [121] Onoda M., Hall P. F.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108(2), 454-60 (1982)
- [122] Guengerich F. P., Ballou D. P., Coon M. J.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70(3), 951-6 (1976)
- [123] Schenkman J. B., Voznesensky A. I., Jansson I.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 314(1), 234-41 (1994)
- [124] Schenkman J. B., Jansson I.: *Drug Metabolism Reviews*, 31(2), 351-64 (1999)
- [125] Reed J. R., Hollenberg P. F.: *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(3), 265-75 (2003)
- [126] Perre T. A., Pompon D.: *Biochemistry*, 37(33), 11412-24 (1998)

- [127] Yamazaki H., Nakamura M., Komatsu T., Ohyama K., Hatanaka N., Asahi S., a kol.: *Protein Expression and Purification*, 24(3), 329-37 (2002)
- [128] Yamazaki H., Nakano M., Imai Y., Ueng Y. F., Guengerich F. P., Shimada T.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 325(2), 174-82 (1996)
- [129] Soucy P., Luu-The V.: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80(1), 71-5 (2002)
- [130] Peng H. M., Auchus R. J.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 541, 53-60 (2014)
- [131] Yamazaki H., Johnson W. W., Ueng Y. F., Shimada T., Guengerich F. P.: *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27438-44 (1996)
- [132] Auchus R. J., Lee T. C., Miller W. L.: *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3158-65 (1998)
- [133] Lee-Robichaud P., Akhtar M. E., Wright J. N., Sheikh Q. I., Akhtar M.: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(3), 119-30 (2004)
- [134] Loughran P. A., Roman L. J., Miller R. T., Masters B. S. S.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(2), 311-21 (2001)
- [135] Zhang H. M., Myshkin E., Waskell L.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 499-506 (2005)
- [136] Kotrbova V., Aimova D., Ingr M., Borek-Dohalska L., Martinek V., Stiborova M.: *Protein Expression and Purification*, 66(2), 203-9 (2009)
- [137] Kotrbova V., Mrazova B., Moserova M., Martinek V., Hodek P., Hudecek J., a kol.: *Biochemical Pharmacology*, 82(6), 669-80 (2011)
- [138] Stiborova M., Indra R., Moserova M., Cerna V., Rupertova M., Martinek V., a kol.: *Chemical Research in Toxicology*, 25(5), 1075-85 (2012)
- [139] Shimada T., Mernaugh R. L., Guengerich F. P.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435(1), 207-16 (2005)
- [140] Lin H. L., Hollenberg P. F.: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1), 276-87 (2007)

- [141] Reed J. R., Cawley G. F., Backes W. L.: *Drug Metabolism Letters*, 1(1), 6-16 (2011)
- [142] Gruenke L. D., Konopka K., Cadieu M., Waskell L.: *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24707-18 (1995)
- [143] Morgan E. T., Coon M. J.: *Drug Metabolism and Disposition*, 12(3), 358-64 (1984)
- [144] Locuson C. W., Wienkers L. C., Jones J. P., Tracy T. S.: *Drug Metabolism and Disposition*, 35(7), 1174-81 (2007)
- [145] Dmitriev L. F.: *Journal of Alzheimers Disease*, 11(2), 183-90 (2007)
- [146] Borthiry G. R., Antholine W. E., Kalyanaraman B., Myers J. M., Myers C. R.: *Free Radical Biology and Medicine*, 42(6), 738-55 (2007)
- [147] Borthiry G. R., Antholine W. E., Myers J. M., Myers C. R.: *Chemistry & Biodiversity*, 5(8), 1545-57 (2008)
- [148] Pietrini G., Carrera P., Borgese N.: *Academy of Sciences of the United States of America*, 85(19), 7246-50 (1988)
- [149] Elahian F., Sepehrizadeh Z., Moghimi B., Mirzaei S. A.: *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(2), 134-43 (2014)
- [150] Abouraya M., Sacco J. C., Kahl B. S., Trepanier L. A.: *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71(4), 566-74 (2011)
- [151] Rhoads K., Sacco J. C., Drescher N., Wong A., Trepanier L. A.: *Toxicological Sciences*, 121(2), 245-56 (2011)
- [152] Sangeetha N., Viswanathan P., Balasubramanian T., Nalini N.: *European Journal of Pharmacology*, 674(2-3), 430-8 (2012)
- [153] Paltauf F., Prough R. A., Masters B. S. S., Johnston J. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 249(8), 2661-2 (1974)
- [154] Storbeck K. H., Swart A. C., Goosen P., Swart. P.: *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1-2), 87-99 (2013)
- [155] Hultquist D. E., Passon P. G.: *Nature-New Biology*, 229(8), 252- (1971)
- [156] Sannes L. J., Hultquist D. E.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 544(3), 547-54 (1978)
- [157] Miki K., Kaida S., Kasai N., Iyanagi T., Kobayashi K., Hayashi K.: *Journal of Biological Chemistry*, 262(24), 11801-2 (1987)
- [158] <https://www.rcsb.org/pdb>. (3. 5. 2017)

- [159] <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/> (3. 5. 2017)
- [160] Bando S., Takano T., Yubisui T., Shirabe K., Takeshita M., Nakagawa A.: *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 60,1929-34 (2004)
- [161] Kim S., Suga M., Ogasahara K., Ikegami T., Minami Y., Yubisui T., a kol.: *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 63, 274-9 (2007)
- [162] Nishida H., Inaka K., Yamanaka M., Kaida S., Kobayashi K., Miki K.: *Biochemistry*, 34(9), 2763-7 (1995)
- [163] Nishida H., Inaka K., Miki K.: *Febs Letters*, 361(1), 97-100 (1995)
- [164] Yamada M., Tamada T., Takeda K., Matsumoto F., Ohno H., Kosugi M., a kol.: *Journal of Molecular Biology*, 425(22), 4295-306 (2013)
- [165] Arinc E., Cakir D.: *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(2), 345-62 (1999)
- [166] Saido H., Watanabe F., Tamura Y., Miyatake K., Ito A., Yubisui T., a kol.: *Journal of Nutrition*, 124(7), 1037-40 (1994)
- [167] Ikegami T., Kameyama E., Yamamoto S. Y., Minami Y., Yubisui T. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(3), 783-90 (2007)
- [168] Marohnic C. C., Bewley M. C., Barber M. J.: *Biochemistry*, 42(38), 11170-82 (2003)
- [169] Kawano M., Shirabe K., Nagai T., Takeshita M.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245(3), 666-9 (1998)
- [170] Shirabe K., Nagai T., Yubisui T., Takeshita M.: *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1384(1), 16-22 (1998)
- [171] Asada T., Nagase S., Nishimoto K., Koseki S.: *Journal of Molecular Liquids*, 147(1-2), 139-44 (2009)
- [172] Iyanagi T., Watanabe S., Anan K. F.: *Biochemistry*, 23(7), 1418-25 (1984)
- [173] Kimura S., Kawamura M., Iyanagi T.: *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3580-9 (2003)
- [174] Bewley M. C., Davis C. A., Marohnic C. C., Taormina D., Barber M. J.: *Biochemistry*, 42(45), 13145-51 (2003)

- [175] Roma G. W., Crowley L. J., Davis C. A., Barber M. J.: *Biochemistry*, 44(41), 13467-76 (2005)
- [176] Asada T., Nagase S., Nishimoto K., Koseki S.: *Journal of Physical Chemistry B*, 112(18), 5718-27 (2005)
- [177] Campbell M. G., Veessler D., Cheng A. C., Potter C. S., Carragher B.: *Elife*, 4, 244-257 (2005)
- [178] Downing K. H., Nogales E.: *Methods in Enzymology*, 483, 121-42 (2010)
- [179] Leitner A., Faini M., Stengel F., Aebersold R.: *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 20-32 (2016)
- [180] Sinz A.: *Mass Spectrometry Reviews*, 25(4), 663-82 (2006)
- [181] Avrameas S.: *Immunochemistry*, 6(1), 43- (1969)
- [182] Trester-Zedlitz M., Kamada K., Burley S. K., Fenyo D., Chait B. T., Muir T. W.: *Journal of the American Chemical Society*, 125(9), 2416-25 (1969)
- [183] Fujii N., Jacobsen R. B., Wood N. L., Schoeniger J. S., Guy R. K.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(2), 427-9 (2004)
- [184] <https://www.thermofisher.com> (10. 5. 2017)
- [185] Hartman F. C., Wold F.: *Journal of the American Chemical Society*, 88(16), 3890- (1966)
- [186] Dihazi G. H., Sinz A.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(17), 2005-14 (2003)
- [187] Smyth D. G., Konigsberg W., Blumenfeld O. O.: *Biochemical Journal*, 91(3), 589- (1964)
- [188] Partis M. D., Griffiths D. G., Roberts G. C. , Beechey R. B.: *Journal of Protein Chemistry*, 2(3), 263-77. (1983)
- [189] Brewer C. F., Riehm J. P.: *Analytical Biochemistry*, 18(2), 248- (1967)
- [190] Hoare D. G., Koshland D. E.: *Journal of the American Chemical Society*, 88(9), 2057- (1966)
- [191] Staros J. V., Wright. R. W., Swingle D. M.: *Analytical Biochemistry*, 156(1), 220-2 (1986)
- [192] Gilchrist T. L., Rees C. W.: *Journal of the Chemical Society C-Organic* (13), 1763- (1969)



- [193] Brunner J.: *Annual Review of Biochemistry*, 62, 483-514 (1993)
- [194] Suchanek M., Radzikowska A., Thiele C.: *Nature Methods*, 2(4), 261-7 (2005)
- [195] Chin J. W., Martin A. B., King D. S., Wang L., Schultz P. G.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11020-4 (2002)
- [196] Chin J. W., Cropp T. A., Anderson J. C., Mukherji M., Zhang Z. W., Schultz P. G.: *Science*, 301(5635), 964-7 (2003)
- [197] Xie J. M., Schultz P. G.: *Methods*, 36(3), 227-38 (2005)
- [198] Davis L., Chin J. W.: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 168-82 (2012)
- [199] Zhang M., Lin S. X., Song X. W., Liu J., Fu Y., Ge X., a kol.: *Nature Chemical Biology*, 7(10), 671-7 (2011)
- [200] Lee H. S., Dimla R. D., Schultz P. G.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(17), 5222-4 (2009)
- [201] Pham N. D., Parker R. B., Kohler J. J.: *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(1), 90-101 (2013)
- [202] Mikami S., Kobayashi T., Masutani M., Yokoyama S., Imataka H.: *Protein Expression and Purification*, 62(2), 190-8 (2008)
- [203] <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/cell-free-protein-expression.html> (25. 7. 2017)
- [204] Hommema E., Mikami S., Maas K., Morgan A., Schofield M., Webb B., a kol.: *Glycobiology*, 19(11), 1318- (2009)
- [205] Mikami S., Kobayashi T., Yokoyama S., Imataka H.: *Journal of Biotechnology*, 127(1), 65-78 (2006)
- [206] Mikami S., Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S., Imataka H.: *Protein Expression and Purification*, 46(2), 348-57 (2006)
- [207] Wiechelmann K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: *Analytical Biochemistry*, 175(1), 231-7 (1988)

- [208] Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., a kol.: *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85 (1985)
- [209] Omura T., Sato R. CAR. B.: *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2370- (1964)
- [210] Omura T., Sato R.: *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2379- (1964)
- [211] Vermilion J. L., Coon M. J.: *Journal of Biological Chemistry*, 253(8), 2694-704 (1978)
- [212] Chakrabarti M. H., Roberts E. P. L.: *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 30(6), 817-23 (2008)
- [213] Van der Hooven T. A., Haugen D. A., Coon M. J.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60(2), 569-75 (1974)
- [214] Zhang M. L., Scott J. G.: *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 113(1), 175-83 (1996)

