

Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**MEMBRÁNOVÝ PROTEIN CYTOCHROM P450 2B4  
A JEHO INTERAKCE S OSTATNÍMI SLOŽKAMI  
JATERNÍHO MONOOXYGENASOVÉHO SYSTÉMU**

**Diplomová práce**



**Jana Michalová**

Školitel: RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Miroslava Šulce, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

*PRAHA 29. 8. 2006*

Podpis:

*Jana Michalová*

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Mirku Šulcovi, PhD. za odborné vedení, kolektivu laboratoře Charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR za vytvoření přátelské pracovní atmosféry a všem svým blízkým za podporu, kterou mi poskytovali.

Práce byla financována grantem GAČR 303/06/0928, díky tedy patří i Grantové agentuře České republiky.

**OBSAH**

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>5</b>
1.1. Biotransformace .....	5
1.2. Systém cytochromů P450 .....	6
1.2.1. Cytochrom P450 .....	6
1.2.2. NADPH: cytochrom P450 reduktasa.....	9
1.2.3. Mechanismus působení .....	10
1.2.4. Cytochrom b <sub>5</sub> .....	11
1.3. Hmotnostní spektrometrie .....	12
1.3.1. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF .....	13
1.3.2. Ionizace elektrosprejem.....	17
1.3.3. Biokonjugační techniky.....	18
<b>2. CÍL.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>25</b>
3.1. Materiál.....	25
3.1.1. Chemikálie.....	25
3.1.2. Použité pufrы a další roztoky .....	26
3.1.3. Příprava a čištění chromatografických nosičů.....	28
3.1.4. Přístroje.....	29
3.2. Metody.....	31
3.2.1. Analytická stanovení .....	31
3.2.2. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE).....	34
3.2.3. Izolace cytochromu P450 2B4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b <sub>5</sub> .....	35
3.2.4. Studium vlivu reakčního prostředí na aktivitu NADPH:CYP reduktasy .....	37
3.2.5. Metabolické studie interakce cytochromu P450 2B4 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou.....	37
3.2.6. Studium struktury cytochromu P450 2B4 a jeho redoxních partnerů při vzájemné interakci pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie .....	39
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>43</b>
4.1. Izolace cytochromu P450 2B4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b <sub>5</sub> .....	43
4.1.1. Izolace mikrosomální frakce .....	44
4.1.2. Solubilizace .....	44
4.1.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 1.....	45
4.1.4. Purifikace NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b <sub>5</sub> .....	47
4.1.5. Purifikace cytochromu P450 2B4.....	53
4.2. Studium vlivu reakčního prostředí na aktivitu a interakci NADPH:CYP reduktasy s cytochromem c.....	60
4.2.1. Ovlivnění aktivity NADPH:CYP reduktasy složením a pH pufru.....	60
4.2.2. Ovlivnění aktivity NADPH:CYP reduktasy iontovou silou.....	61
4.2.3. Ovlivnění aktivity NADPH:CYP reduktasy přítomností micel .....	62
4.3. Metabolické studie interakce cytochromu P450 2B4 NADPH: cytochrom P450 reduktasou.....	62

---

4.3.1. Ovlivnění interakce CYP 2B4 a NADPH:CYP reductasy složením a pH pufru .....	63
4.3.2. Stanovení optimálního molárního poměru CYP 2B4: CPR .....	64
4.4. Studium cytochromu P450 2B4 a jeho redoxních partnerů při vzájemné interakci pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie .....	65
4.4.1. Intramolekulární síťovací reakce .....	65
4.4.2. Intermolekulární síťovací reakce .....	69
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>76</b>
5.1. Izolace CYP 2B4, NADPH:CYP reductasy a cytochromu b <sub>5</sub> .....	76
5.2. Optimalizace reakčních podmínek pro chemické modifikace metabolickými studii .....	79
5.3. Studium enzymů MFO systému pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie .....	80
5.3.1. Intramolekulární síťovací reakce .....	81
5.3.2. Intermolekulární síťovací reakce .....	82
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>86</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>87</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>89</b>

## 1. ÚVOD

V poslední době dochází činností člověka ke stále většímu znečištění životního prostředí cizorodými látkami (xenobiotiky). Na živé organismy mají tyto sloučeniny většinou negativní vliv. Mezi nejobávanější z nich náleží především karcinogeny a teratogeny, např. polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly nebo sloučeniny olova a rtuti, ale také fenolické látky, nitrosloučeniny, aromatické aminy, průmyslová barviva a další. Vedle zmíněných environmentálních polutantů řadíme mezi xenobiotika i látky, které nám v jistém směru pomáhají, v jiném však mohou škodit, totiž léčiva<sup>1,2</sup>.

Působením xenobiotik bývají nejčastěji zasaženy orgány, které se účastní vstupu látek do organismu nebo jejich odbourávání, tedy plíce, ledviny a játra. Rozsah poškození závisí zejména na dvou faktorech, a sice na dávce a době expozice<sup>2</sup>.

Během evoluce se v prokaryotických i eukaryotických buňkách vyvinuly účinné odbourávací systémy, díky kterým jsou organismy schopny cizorodé látky detoxikovat a následně vyloučit, zpravidla aniž by byly jejich působením výrazně poškozeny. V některých případech však během odbourávání dochází ke zvýšení toxicity xenobiotika přeměnou na aktivní intermediát nebo metabolit, často s karcinogenními účinky<sup>3</sup>.

Hlavní složku systémů metabolizujících xenobiotika tvoří tzv. detoxikační enzymy. Struktura a funkce těchto enzymů jsou úzce propojené – strukturní uspořádání je zodpovědné za substrátovou specifitu, rozpoznání a navázání substrátu nebo za interakci s redoxními partnery<sup>4</sup>. Detailní poznání struktury může tedy pomoci objasnit mechanismus působení cizorodých látek na organismus, a na základě toho vést k predikci a následné přípravě co nejúčinnějších a nejšetrnějších léčiv.

Mezi nejčastěji používané metody studia prostorové struktury proteinů patří rentgenová krystalografie<sup>5,6</sup>, NMR technologie (z angl. Nuclear magnetic resonance – jaderná magnetická resonance), modelování založené na homologii primárních struktur<sup>4</sup> a poměrně nově také hmotnostní spektrometrie ve spojení s modifikací proteinů síťovacími činidly. Jedná se o citlivou, rychlou a ekonomicky výhodnou techniku, díky které můžeme získat detailní informace o terciární struktuře proteinu v nativní formě<sup>7</sup>.

### 1.1. Biotransformace

Metabolismus xenobiotik neboli biotransformace je proces, při kterém dochází k přeměně struktury cizorodé látky a v důsledku toho i ke změně jejich vlastností. Z původně

nepolární látky, schopné snadno procházet přes lipidovou membránu, se stává látka polární, hydrofilní, a tedy vylučitelná močí.

Pro biotransformační pochody slouží v organismu různé enzymové systémy, které se účastní buď fáze I nebo fáze II biotransformace. Fáze I zahrnuje oxidativní atak substrátu (xenobiotika) za vzniku polárnější molekuly a umožňuje tak jeho vstup do fáze II. Ve fázi II probíhá konjugace oxidovaného intermediátu s polární molekulou (UDP-glukuronát, fosfoadenosylfosfosulfát, glutathion)<sup>8</sup>, a vzniká velmi polární, snadno vylučitelný metabolit<sup>9</sup>.

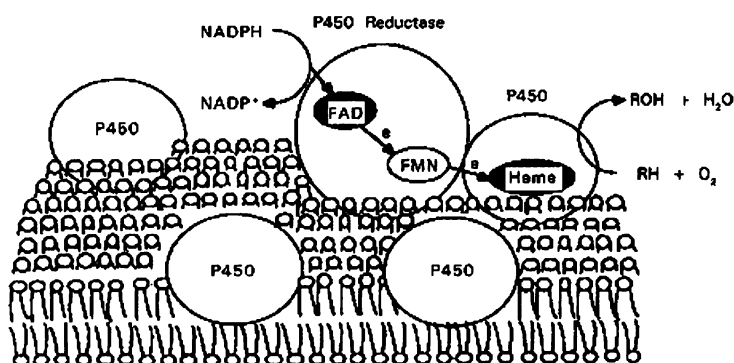
Oxidativních enzymových systémů existuje celá řada<sup>1,8</sup>, klíčovým systémem pro fázi I biotransformace xenobiotik je však systém cytochromů P450<sup>9</sup>.

## 1.2. Systém cytochromů P450

Jedná se o tzv. vícesložkový systém nespecifických oxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mixed function oxygenases), u savců situovaný na membránách endoplasmatického retikula a mitochondrií<sup>1</sup>. Oxygenasy jsou enzymy vyžadující k polarizaci substrátu přítomnost kyslíkové molekuly O<sub>2</sub>.

Na rozdíl od dioxygenas, které do molekuly substrátu inkorpo-

rují biatomickou molekulu kyslíku, MFO ji aktivují, následně štěpí dvojnou vazbu mezi atomy, jeden využívají k oxidaci substrátu a druhý redukují na vodu<sup>1</sup>. Součástí MFO systému jsou tři nezbytné složky: cytochrom P450, NADPH: cytochrom P450 reduktasa a lipidová membrána<sup>10</sup>.



Obr. 1 - Schematické uspořádání MFO systému v membráně endoplasmatického retikula (převzato z [10])

### 1.2.1. Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je membránový enzym, poprvé izolovaný v elektroforetické čistotě Klingerbergem a Garfinklem v roce 1958 a charakterizovaný jako pigment jaterních mikrosomů schopný vázat oxid uhelnatý. O čtyři roky později bylo zjištěno,

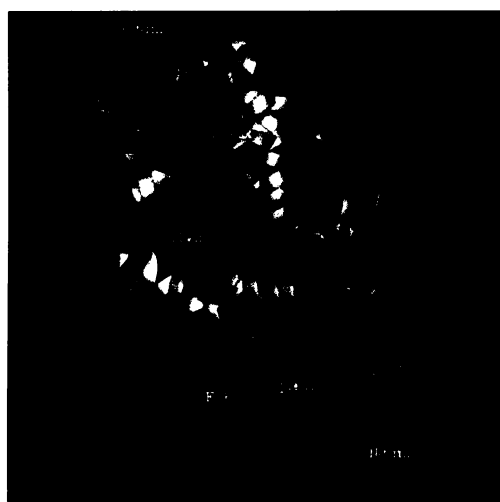
že se jedná o hemoprotein s neobvyklými spektrálními vlastnostmi. Na rozdíl od většiny ostatních hemoproteinů se jeho absorpční maximum v redukované formě s navázaným oxidem uhelnatým nachází v oblasti okolo 450 nm <sup>11</sup>.

Výjimečné spektrální (a v důsledku toho i katalytické) vlastnosti cytochromu P450 jsou dány koordinací hemového železa na thiolátovou síru sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním místě enzymu, která ho odlišuje od většiny hemoproteinů. Šestým ligandem železa je v klidovém stavu enzymu pravděpodobně molekula vody <sup>1</sup> vyměnitelná za molekulu kyslíku nebo oxidu uhelnatého <sup>12</sup>. Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule držen hydrofóbními silami a je umístěn v tzv. substrát vázající kapse <sup>12</sup>.

Cytochrom P450 má v MFO systému funkci terminální oxidasy, která zakončuje první fázi biotransformace <sup>12</sup>. Existuje celá řada isoformů cytochromu P450, které se dělí do několika rodin a podrodin na základě sekvenční homologie. Mechanismus působení všech isoformů je stejný, enzymy se však liší v substrátové specifitě a vazbě redoxního partnera <sup>4</sup>. Tyto rozdíly jsou dány odlišnostmi ve struktuře a schopnosti přizpůsobit aktivní centrum substrátu. Některé cytochromy P450 jsou velmi univerzální a katalyzují oxidaci i strukturně nepodobných substrátů, jiné slouží pouze jako vysoce specifické katalyzátory přeměny endogenních sloučenin (syntéza steroidních lipidů atd.) <sup>12</sup>.

Nicméně všechny isoformy obsahují konzervativní oblasti, které zajišťují katalytickou funkci CYP. Absolutně konzervovaný je cysteinový zbytek tvořící prostřednictvím thiolátové síry pátý ligand hemového železa <sup>4</sup>. Krystal CYP připomíná tvarem trojúhelníkový hranol, je tvořen pěti  $\beta$ -skládanými listy a třinácti  $\alpha$ -helixy, které jsou lokalizovány na opačných stranách molekuly a rozdělují ji tak na dvě odlišné domény <sup>4, 12</sup>.

Ukotvení molekuly v membráně endoplasmatického retikula resp. mitochondrií u eukaryot je patrně zajištěno hydrofóbní N-terminální kotvou (Obr. 2), prokaryotické enzymy jsou naopak rozpustné <sup>12</sup>.



**Obr. 2 - Cytochrom P450 v membráně endoplasmatického retikula (převzato z <http://home.ccr.cancer.gov/metabolism/friedman/fkfccr.htm>)**

### 1.2.1.1. Cytochrom P450 2B4

CYP 2B4 byl poprvé izolován z fenobarbitalem indukovaných králíčích jaterních mikrosomů Haugenem a Coonem jako tzv.

P-450<sub>LM2</sub><sup>13</sup>. Dalšími studiemi bylo prokázáno, že se jedná o protein s molekulovou hmotností přibližně 55 kDa<sup>14, 15</sup>, který se skládá ze 491 aminokyselinových zbytků, jejichž identita byla zjištěna sekvenováním<sup>15</sup>. Polypeptidový řetězec obsahuje 52 negativně nabitých a 58 pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků<sup>16</sup>, 11 částečně konzervovaných hydrofobních oblastí<sup>17</sup> a absolutně konzervovaný cysteinový zbytek, tvořící hemthiolátový ligand železa<sup>4</sup>. Záměna cysteinu za jinou aminokyselinu (serin, histidin) způsobuje změnu spektrálních a katalytických vlastností a úplnou ztrátu oxygenasové aktivity<sup>18, 19</sup>.



**Obr. 3 – Terciární struktura cytochromu P450 2B4 bez N-terminální hydrofobní kotvy (Gly28 – His492)**

Struktura bílkoviny byla získána z PDB databáze

([http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do;jsessionid=Z2yBXerI6-u3eEkWjmHxrg\\*\\*](http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do;jsessionid=Z2yBXerI6-u3eEkWjmHxrg**)) a upravena v programu Swiss-PdbViewer

#### 1.2.1.1.1. Terciární struktura

Charakterizace terciární struktury membránových enzymů byla, a stále je, poměrně komplikovaným úkolem, proto byl i pro CYP 2B4 nejprve zkonstruován 3D model na základě sekvenční podobnosti s několika bakteriálními cytochromy P450 již známých krystalových struktur. Studiemi na tomto modelu byly získány informace o přístupovém kanálu a vazebném místě pro substrát a o potenciálních vazebných místech pro redoxní partnery enzymu, tedy NADPH:CYP-reduktasu a cytochrom b<sub>5</sub><sup>20</sup>. V nedávné době byla získána také krystalová struktura CYP 2B4 a to jak v tzv. „otevřené“ konformaci (tedy v nepřítomnosti substrátu, Obr. 3), tak i ve vazbě se substrátem. V obou případech byl však enzym mutován v několika pozicích na N-konci a postrádal hydrofobní membránovou kotvu<sup>6, 21</sup>.

CYP 2B4 náleží k cytochromům P450 metabolizujícím léčiva a jako takový vykazuje širokou substrátovou specifitu. K této vlastnosti přispívá schopnost aktivního centra přizpůsobit se odlišným typům substrátů, na které se podílejí svým pohybem



především  $\alpha$ -helixy<sup>21</sup>. Aktivní místo bylo podrobněji identifikováno fotoafinitním značením v kombinaci s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF<sup>22</sup>.

### **1.2.2. NADPH: cytochrom P450 reduktasa**

NADPH: cytochrom P450 reduktasa (EC 1. 6. 2. 4) slouží jako elektrondonorový partner pro cytochrom P450 a pro další akceptorové molekuly, např. cytochrom c<sup>23</sup> nebo cytochrom b<sub>5</sub><sup>24</sup>. Společně s NO-sythasou jsou jedinými dvěma flavoproteiny, které obsahují prosthetické skupiny FAD i FMN. Přenos elektronů z NADPH až na cytochrom P450 je umožněn prostřednictvím kaskádového systému různých redoxních stavů flavinových kofaktorů, které mají blízké hodnoty standardních redoxních potenciálů<sup>25</sup>.

CPR o molekulové hmotnosti 77 kDa se skládá ze 679 aminokyselinových zbytků<sup>26</sup>, jejichž uspořádání rozděluje molekulu na hydrofobní N-terminální část (6 kDa), která slouží k ukotvení proteinu do lipidové membrány, a na část hydrofilní, cytosolární (71 kDa), nacházející se na C-konci. CPR zbavená hydrofobní kotvy ztrácí schopnost vázat cytochrom P450 a může redukovat pouze umělé substráty jako je cytochrom c<sup>27</sup>.

Pomocí rentgenové krystalografie rekombinantního proteinu byly potvrzeny čtyři hlavní strukturní domény hydrofilní části předpovězené na základě primární struktury a to (v pořadí od N-konce k C-konci): FMN-vazebná, spojovací, FAD-vazebná a NADPH-vazebná (Obr. 4, následující strana)<sup>28</sup>.

FMN vazebná doména se skládá z pěti paralelních  $\beta$ -skládaných listů obklopených pěti  $\alpha$ -helixy, v místě C-konce v oblasti  $\beta$ -struktur je navázán FMN. Základ FAD-vazebné domény je tvořen zploštělým  $\beta$ -barelem. Isoallooxazinový kruh FAD je vklíněn mezi FAD-vazebnou a NADPH-vazebnou doménu, zatímco zbytek molekuly se nachází v blízkosti domény spojovací. Flaviny v takovémto uspořádání mohou komunikovat prostřednictvím methylových zbytků na 7. a 8. uhlíku xylenového kruhu a přenos elektronů mezi nimi probíhá velice rychle. Doménu pro NADPH tvoří paralelně uspořádané  $\beta$ -skládané listy prokládané  $\alpha$ -helixy. Spojovací doména obsahuje pouze  $\alpha$ -helixy a napomáhá přenosu elektronů mezi flaviny<sup>28</sup>.



**Obr. 4– Terciární struktura NADPH:CYP reductasy bez N-terminální hydrofobní kotvy (Val64 – Ser678)**

Struktura bílkoviny byla získána z PDB databáze

([http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do?sessionId=Z2yBXerl6-u3eEkWjmHxrg\\*\\*](http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do?sessionId=Z2yBXerl6-u3eEkWjmHxrg**))

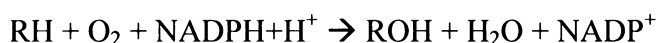
a upravena v programu Swiss-PdbViewer

Interakce CPR s cytochromem P450 a dalšími akceptory elektronů je založena na elektrostatickém párování záporně nabitých aminokyselin na povrchu reductasy (Asp, Glu) s kladně nabitými (Lys, Arg) na povrchu akceptoru a na stabilizaci komplexu hydrofobními silami mezi nepolárními aminokyselinovými zbytky (Leu, Trp, Val) <sup>29</sup>.

### **1.2.3. Mechanismus působení**

Reakce katalýzy začíná přenosem elektronů z NADPH na NADPH:CYP reductasu v systémech endoplasmatického retikula nebo na ferredoxin reductasu, nehemový enzym mitochondriálního a bakteriálního systému. Na cytochrom P450 se váže substrát, který změnou konformace vytlačí molekulu vody z pozice šestého ligandu, naruší tak rovnovážný spinový stav molekuly a umožní přenos prvního elektronu z reductasy na CYP. Poté se do pozice šestého ligandu váže molekula kyslíku a vzniká nestabilní ternární ferrisuperoxidový komplex. Elektron k jeho redukci poskytuje buď CPR nebo, v savčích mikrosomálních systémech, cytochrom b<sub>5</sub>. Nyní je vytvořena zcela aktivovaná forma CYP - dochází ke štěpení vazby v kyslíkové molekule, jeden z atomů přijímá dva protony a je redukován

na vodu, druhý tvoří s molekulou proteinu reaktivní intermediát, tzv. ferrioxenový komplex, stabilizovaný mezomerním posunem elektronu z hemthiolátové síry na kyslík. Komplex může vytrhnout ze substrátu atom vodíku za vzniku substrátového radikálu a hydroxylového radikálu vázaného na hemové železo. Rekombinací radikálů se hydroxyderivát substrátu uvolňuje z enzymu a CYP se navrácí do výchozí podoby. Sumární rovnice, která celou reakci vystihuje, může být zapsána takto (RH představuje substrát) <sup>1,12</sup>:



Molekulu kyslíku a redukční ekvivalenty mohou v reakci nahradit peroxysloučeniny <sup>12</sup>.

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

Cytochrom b<sub>5</sub> je malý hemoprotein s molekulovou hmotností okolo 16 kDa <sup>30</sup>. Vyskytuje se v buňkách živočichů, rostlin a hub vázaný na cytosolární straně membrány endoplasmatického retikula nebo mitochondrií, kde slouží jako přenašeč elektronů pro membránově vázané oxygenasy. Redukční ekvivalenty přijímá z NADH prostřednictvím svého redoxního partnera, NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy (EC 1.6.2.2.). Jeho klíčovou úlohou je desaturace mastných kyselin <sup>31</sup>, může se však účastnit také hydroxylace xenobiotik katalyzované cytochromem P450 jako donor druhého elektronu k redukcí oxyferrokomplexu CYP (Fe<sup>II</sup>O<sub>2</sub>). Reakce je umožněna blízkými hodnotami standardních redoxních potenciálů redukováného cytochromu b<sub>5</sub> (+20 mV) a CYP (Fe<sup>II</sup>O<sub>2</sub>) (+50 mV) <sup>32</sup>.

Primární struktura proteinu, tvořená 135 aminokyselinovými zbytky <sup>30</sup>, dává vzniknout dvěma rozdílným doménám (Obr. 5). Menší z nich se nachází na C-konci peptidového řetězce, je hydrofobní a slouží k vazbě molekuly do mikrosomální membrány. Větší, tvořená především hydrofilními aminokyselinovými zbytky,



**Obr. 5 – Terciární struktura cytochromu b<sub>5</sub> bez C-terminální hydrofobní kotvy (Asp1-Leu94)**

Struktura bílkoviny byla získána z PDB databáze

([http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do?jsessionId=Z2yBXerI6-u3eEkWjmHxrg\\*\\*](http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do?jsessionId=Z2yBXerI6-u3eEkWjmHxrg**)) a upravena v programu Swiss-PdbViewer

obsahuje hem a interaguje s redoxními partnery. Pátý a šestý ligand hemového železa jsou tvořeny histidinovými zbytky proteinové molekuly. Domény spojuje flexibilní peptidový řetězec o délce 15 aminokyselin, který poskytuje hemové oblasti dostatečnou pohyblivost potřebnou pro vazbu odlišných redoxních partnerů, zatímco protein zůstává stále zakotven v membráně endoplasmatického retikula<sup>33,34,35</sup>.

V případě proteolytického odštěpení membránové kotvy je solubilizovaný cytochrom  $b_5$  schopen redukovat rozpustné proteiny, např. cytochrom c, met-myoglobin nebo met-hemoglobin, ztrácí však schopnost přenosu elektronu na mikrosomální CYP. To poukazuje na nezbytnou přítomnost transmembránové domény pro správnou funkci proteinu, a tedy i pro studium v rekonstituovaném systému<sup>36</sup>.

Sekundární strukturou náleží cytochrom  $b_5$  do  $\alpha$ - $\beta$  třídy - pravidelně se střídající uspořádání  $\alpha$ -helixu a  $\beta$ -skládaného listu umožňuje sbalení do kompaktní globulární molekuly<sup>35</sup>.

### 1.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS z angl. Mass Spectrometry) je moderní analytickou metodou, která v posledních dvaceti letech zaujala pevné místo v oblasti studia proteinů, a to především díky své výjimečné citlivosti, přesnosti, a rychlosti analýzy. Umožňuje např. identifikovat proteiny o známé primární struktuře metodou peptidového mapování (peptide mass fingerprinting) – porovnáním hmotnostního spektra analyzované molekuly s proteinovými databázemi, sekvenovat proteiny pomocí techniky nazývané tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) nebo PSD (z angl. post-source decay) analýzou, a v neposlední řadě získávat informace o prostorovém uspořádání proteinů<sup>37</sup>.

Funkce každého proteinu je nerozlučně spjata s jeho terciární strukturou, proto je její detailní poznání klíčové pro pochopení mechanismu jeho účinku. V kombinaci s bio-konjugačními technikami slouží MS zejména ke zpřesňování struktur získaných homologním modelováním<sup>38</sup>.

Největší rozmach zaznamenala MS na konci 80. a začátku 90. let, po vynálezu tzv. jemných ionizačních technik MALDI (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization) a ESI (z angl. electrospray-ionization), které umožnily šetrné převedení intaktních, neutrálních molekul do plynné fáze a jejich nabití. Výhodou je také možnost kombinace s relativně levnými hmotnostními analyzátory se snadnou obsluhou a vysokou citlivostí - k analýze tak postačuje pouze pikomolové množství materiálu<sup>37</sup>.

### 1.3.1. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

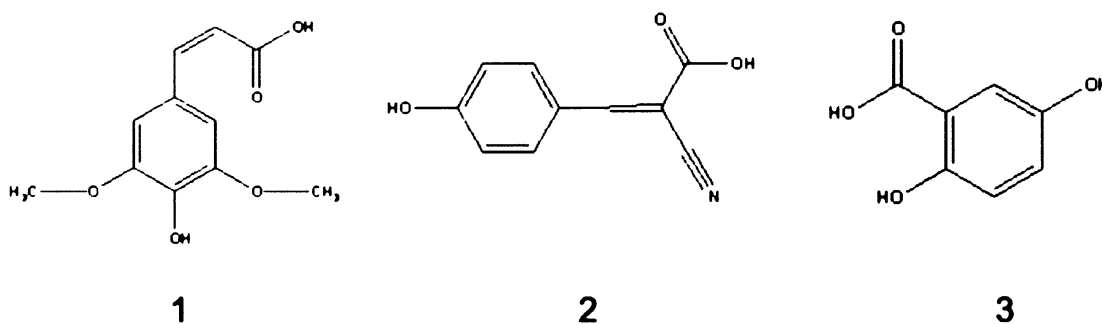
Za techniku MALDI byla udělena v roce 2002 Nobelova cena za chemii japonskému vědci Koichi Tanakovi<sup>39</sup>. Ve spojení s hmotnostním analyzátozem TOF byla tato metoda poprvé použita v roce 1988 Karasem a Hillenkampem<sup>40</sup>.

Při použití MALDI-TOF MS molekula analytu krystalizuje s vysokým molárním nadbytkem matrice, celkový objem směsi aplikované na terč činí 0,5 až 2  $\mu$ l. Matrici představuje slabá organická kyselina absorbující v oblasti vlnových délek použitého laseru (nejčastěji UV). Po dopadu laserového paprsku na směs krystalů matrice silně absorbuje záření, její molekuly se začnou vypařovat a napomáhají tak molekulám analytu v přechodu do plynné fáze (Obr. 6). Zároveň dochází k přenosu protonů z matrice na analyt a vznikají jeho jedenkrát nabitě molekuly. Volba matrice závisí na intenzitě ozáření a typu analyzovaného vzorku.



Obr. 6 – Laserová desorpce molekul analytu za asistence matrice  
Převzato z <http://biomikro.vscht.cz/maldi-man/cz/theory/basics.php>

Nejčastěji používaným laserem je  $N_2$ -laser s vlnovou délkou 337 nm. Mezi matrice absorbující v této oblasti, a tudíž rutinně využívané, náleží 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina,  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina<sup>37,41</sup>. Strukturální vzorce matric jsou uvedeny na Obr. 7.



Obr. 7 – Strukturální vzorce nejčastěji používaných matric pro MALDI-TOF MS

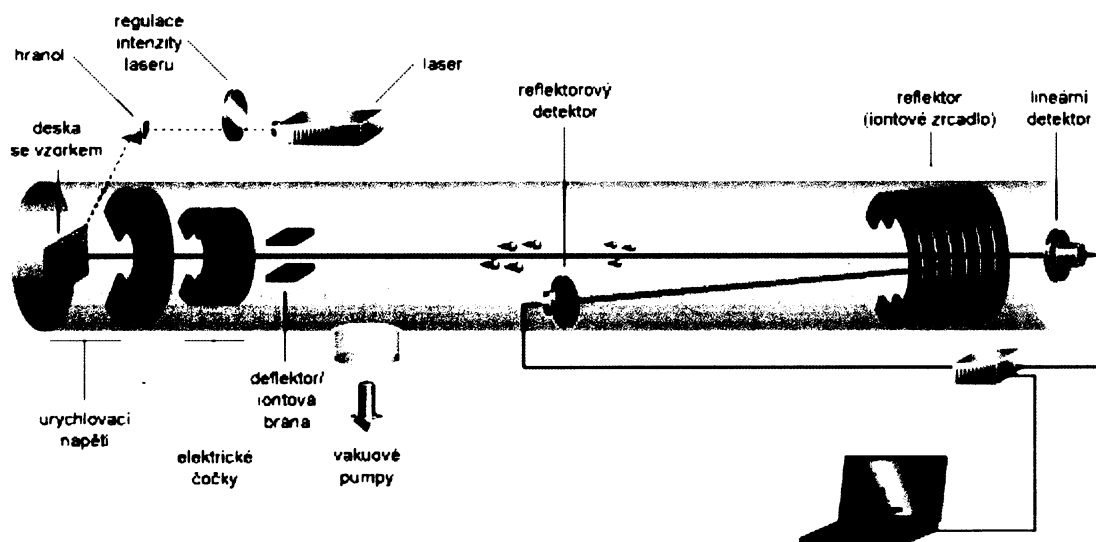
- 1 - 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina
- 2 -  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
- 3 - 2,5-dihydroxybenzoová kyselina

Molekuly analytu jsou po protonizaci urychleny silným elektrickým polem a do průletové trubice, umístěné ve vysokém vakuu, vstupují se stejnou kinetickou energií. Protože jsou všechny peptidové fragmenty protonovány pouze jedenkrát, poměr  $m/z$  každého iontu číselně odpovídá jeho skutečné molekulové hmotnosti. Na základě rovnice (1) lze tedy říci, že ionty s nižší molekulovou hmotností se pohybují rychleji a dopadnou na detektor dříve, než ionty s molekulovou hmotností vyšší.

$$E = 1/2m.v^2 \quad (1)$$

Detektor, který takto rozlišuje ionty podle doby jejich letu, se zkráceně nazývá TOF (z angl. time of flight). Ve spojení s hmotnostní spektrometrií MALDI jsou používány dva typy TOF detektorů – lineární a reflektorový. Měření v lineárním módu přesně odpovídá výše popsanému principu, jeho rozlišení se zvyšuje se vzrůstající délkou průletové trubice.

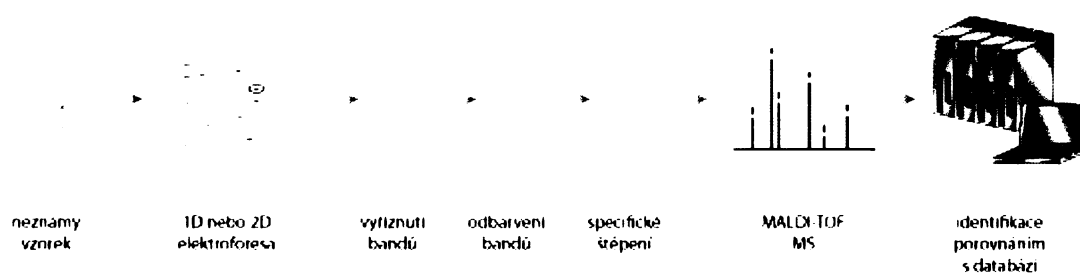
Reflektor využívá ke zvýšení přesnosti odrazu iontů od tzv. reflektoru, ve kterém se ionty zpomalují a následně odrážejí v malém úhlu k původnímu směru letu a pokračují na detektor. Čím vyšší má daný ion rychlost, tím „hlouběji“ do reflektoru pronikne a tím více se zpomalí. To má za následek odstranění rozdílů v rychlosti letu stejných izotopů a jejich citlivější rozlišení od izotopů ostatních, lišících se např. o jediný neutron. Oproti lineárnímu detektoru se však snižuje měřitelný rozsah hodnot  $m/z$  <sup>38, 41</sup>. Rozdíly v uspořádání obou typů analyzátorů jsou patrné z Obr. 8.



**Obr. 8 – TOF analyzátor v lineárním a reflektorovém uspořádání.** V lineární módu není dráha molekul analytu stáčená a ionty dopadají přímo na lineární detektor. V případě reflektoru dochází k ohybu dráhy pomocí iontového odrážače a molekuly dopadají na detektor reflektorový. Převzato z <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>

### 1.3.1.1. Identifikace proteinů pomocí peptidového mapování

Peptidové mapování (PMF z angl. peptide mass fingerprinting) je rychlou a účinnou metodou používanou k identifikaci proteinů po elektroforetické separaci<sup>42</sup>. Z gelu je vyříznut proužek proteinu a následuje štěpení sekvenčně specifickou proteasou, např. trypsinem (který poskytuje peptidy zakončené argininem nebo lysinem). Hmotnostní spektrum získané metodou MALDI – TOF MS je pro daný protein charakteristické. Porovnáním nalezených hodnot poměrů  $m/z$  s teoretickými hodnotami v databázi (např. NCBI) prostřednictvím software dostupného na internetu ProFound<sup>43</sup>, Mascot<sup>44</sup>, a další lze protein s určitou pravděpodobností identifikovat<sup>45</sup>. Postup identifikace ilustruje Obr. 9.



**Obr. 9 – Schéma identifikace proteinů pomocí peptidového mapování**

Převzato z [http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)

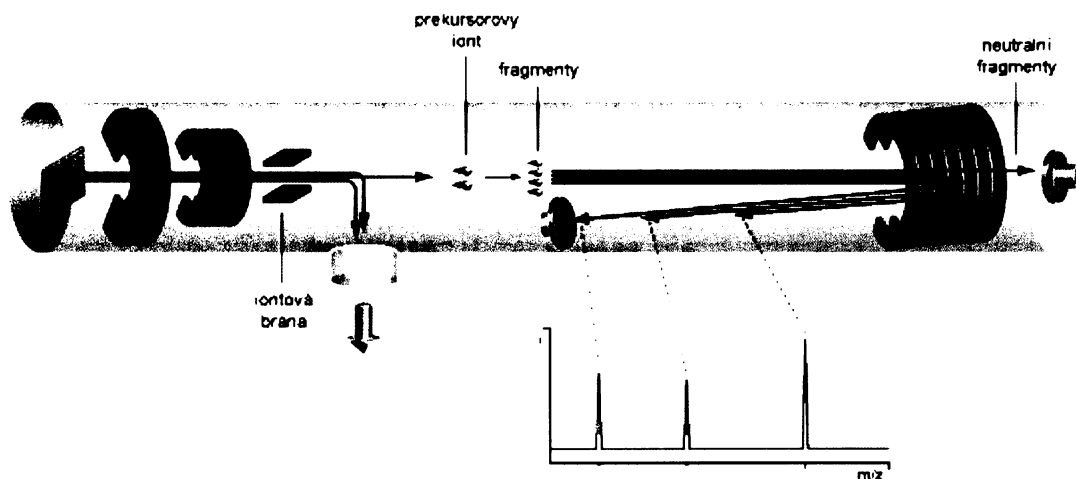
Výše popsaný postup se také nazývá „bottom-up“ přístup, tedy tzv. zdola nahoru - od separovaného a fragmentovaného proteinu k identifikaci. Alternativní metodou, jejíž rozsah je však omezen na proteiny nízkých molekulových hmotností (do 70 kDa), je tzv. „top-down“ (shora dolů). Spočívá v identifikaci celé modifikované molekuly, která je od nemodifikovaných forem proteinu separována přímo v hmotnostním spektrometru (nejčastěji ESI-FTICR z angl. Electrospray ionization – Fourier transform ion cyclotron resonance). Následuje fragmentace elektronovým záchytem (ECD z angl. Electron capture dissociation) a analýza vzniklých peptidů<sup>46</sup>.

### 4.5.1.2. Sekvence proteinů PSD analýzou

Pokud protein nelze jednoznačně identifikovat metodou PMF, je třeba analýzu upřesnit určením jeho aminokyselinové sekvence. To umožňuje technika MALDI Post-Source Decay (PSD, rozpad za iontovým zdrojem) MS. Jejím základem je štěpení metastabilních iontů, tedy takových, u kterých nedochází k fragmentaci ve zdroji iontů, ale až během letu k detektoru. Ionty prekursoru vybraného pro PSD analýzu jsou nejprve separovány od ostatních peptidů pomocí iontové brány (deflektoru) a dostávají se do letové trubi-

ce, kde následuje rozklad za vzniku fragmentů původních iontů. Všechny fragmenty mají stejnou rychlost jako prekurzor, ale získávají pouze část jeho kinetické energie, která je určena poměrem  $m/z$  vzniklého iontu k  $m/z$  prekurzoru<sup>37, 45, 47</sup>.

V lineárním TOF analyzátoru nedochází k rozlišení na základě kinetických energií, všechny ionty dopadají na detektor díky své shodné rychlosti společně a jeví se jako nezaostřený pík odpovídající jediné hodnotě  $m/z$ . PSD spektra jsou tudíž viditelná pouze v refletronovém módu – ionty s nižší kinetickou energií než je energie prekurzoru nepronikají do iontového odrážače tak hluboko jako prekurzor a doba jejich letu se v porovnání s dobou letu prekurzoru zkracuje. Ionty s nejnižší kinetickou energií (tedy i s nejnižší hodnotou poměru  $m/z$ ) dopadají na detektor jako první, následovány stále „těžšími“ fragmenty a nakonec také iontem prekurzoru<sup>37, 45</sup>. Uspořádání analyzátoru pro detekci PSD iontů je znázorněno na Obr. 10.



Obr. 10 – Uspořádání refletronového analyzátoru TOF pro MALDI Post-Source Decay MS  
Převzato z <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/sequencing.php>

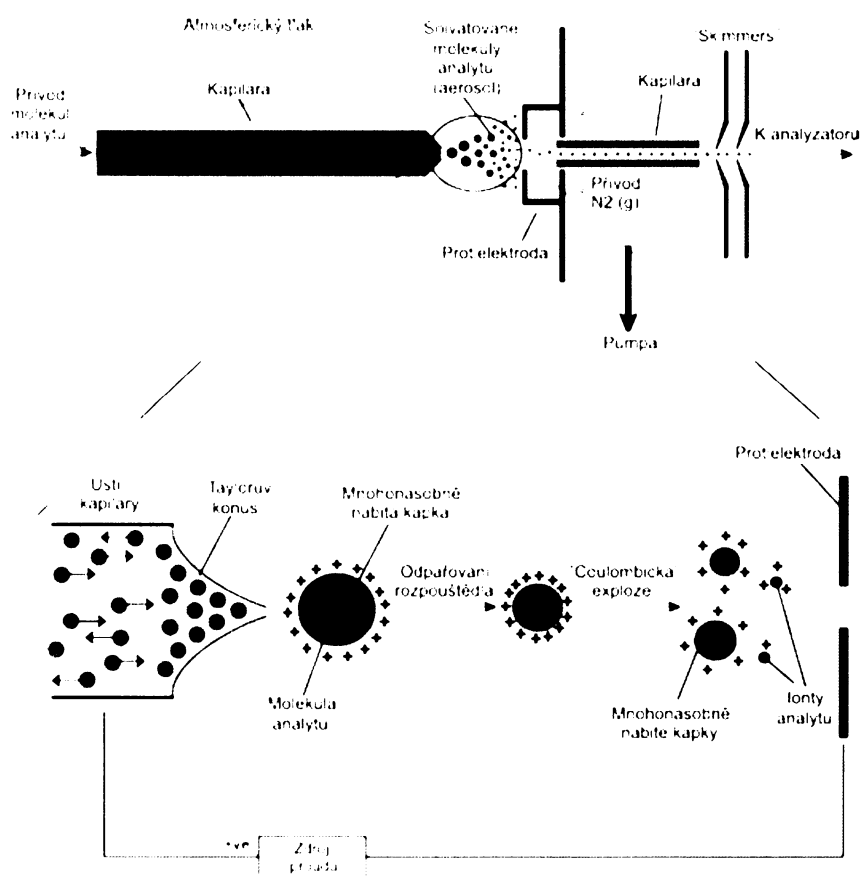
Získané PSD spektrum obsahuje signály iontů N-koncové části (ionty *a*, *b*, *c*) a C-koncové části (ionty *x*, *y*, *z*) analyzovaného peptidu, často je tedy komplikované a obtížně interpretovatelné. Existují však techniky, které tyto problémy překonávají, např. sulfonace N-koncových aminokyselin, která přispívá k výraznému zvýšení fragmentace a produkci téměř výhradně *b* a *y* fragmentových iontů, vznikajících rozštěpením peptidové vazby. Párováním těchto iontů lze získat kompletní informaci o primární struktuře peptidu<sup>45</sup>.



### 1.3.2. Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI z angl. electrospray ionization) byla poprvé popsána Johnem Fennem a spol.<sup>48</sup> na konci 80. let minulého století a oceněna Nobelovou cenou za chemii v roce 2002<sup>39</sup>. Stejně jako MALDI znamenala ESI pro hmotnostní analýzu makromolekul (zvláště proteinů a peptidů) velký pokrok. Jelikož ESI poskytuje spektra především mnohonásobně nabitých iontů, umožňuje tak měřit větší rozsah molekulových hmotností než MALDI.

Princip ionizace je následující: Roztok analytu je přiváděn do rozprašovací kapiláry, kde dochází k rozpadu sloupce kapaliny na jemný aerosol. Kapénky aerosolu se díky vysokému napětí mnohonásobně nabíjejí. Po vstupu do vyhřívané kapiláry dochází k desolvataci analytu a k jeho ionizaci přijímáním protonů od odpařujícího se rozpouštědla. Povrch kapének se postupně zmenšuje a hustota náboje na něm stoupá dokud nepřekoná síly držící kapku pohromadě. Pak dochází k emisi iontů z povrchu kapky a ionty vstupují přes tzv. „skimmers“ do kvadrupólového nebo tripl-kvadrupólového hmotnostního analyzátoru umístěného ve vysokém vakuu (Obr. 11)<sup>37</sup>.



Obr. 11 – Schematické znázornění ionizace molekul analytu elektrosprejem  
Převzato z <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>

### 1.3.2.1. Analýza peptidů a proteinů

Spektra proteinů získaná pomocí ESI MS vykazují charakteristické série vícenásobně nabitých iontů, přičemž platí, že na každých přibližně 1000 Da je iont jednou protonován. Poměr  $m/z$  je tedy několikanásobně nižší než molekulová hmotnost (MW z angl. molecular weight) iontu, což umožňuje naměřit i spektra proteinů o vysokých MW v rozsahu  $m/z$  800 – 3000. Protože každý pík poskytuje nezávislou informaci o MW proteinu, ze série iontů z jediného experimentu může být získána její přesná hodnota.

U peptidů je maximální počet nábojů shodný s počtem aminokyselinových postranních řetězců schopných vázat proton (Arg, His, Lys a N-koncová aminokyselina). Např. u tryptických štěpů bývají taková místa zpravidla dvě, dominantní ionty ve spektru jsou tedy dvakrát nabitě. S velikostí fragmentu se zvyšuje i počet nábojů a také zastoupení příslušných iontů ve spektru<sup>37</sup>.

### 1.3.2.2. LC-ESI MS a tandemová hmotnostní analýza

Ionizace za atmosférického tlaku umožňuje přímé propojení hmotnostního spektrometru s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a on-line detekci separovaných proteinů nebo peptidů (LC-ESI MS).

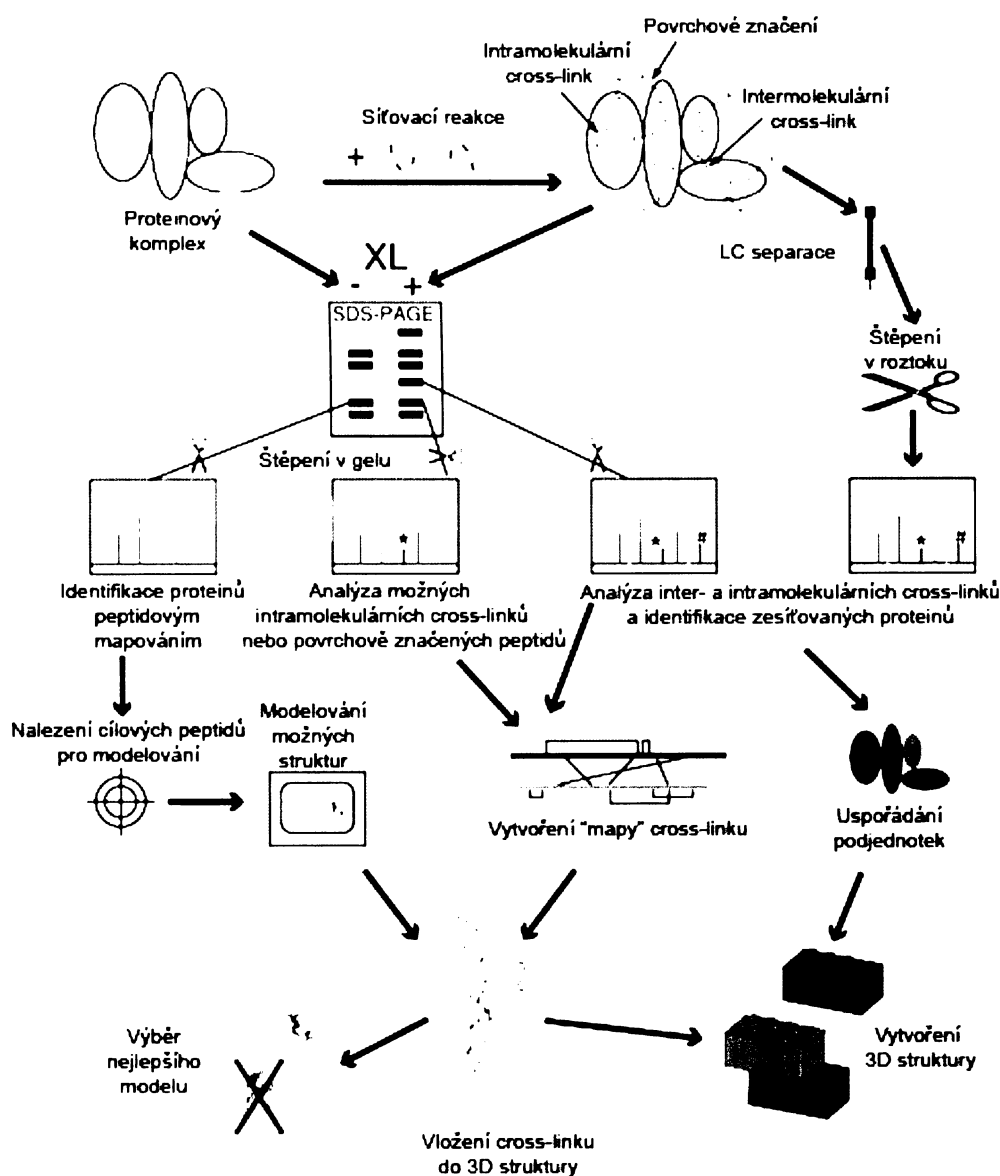
Tandemová hmotnostní analýza (MS/MS) spočívá v oddělení vybraného prekurzoru od ostatních iontů produkovaných ve zdroji pomocí hmotnostního filtru (kvadrupólu). Následuje fragmentace prekurzoru srážkami s inertním plynem (dusík, argon, helium) v kvadrupólové kolizní cele a separace vyprodukovaných iontů na základě jejich  $m/z$ . Výsledkem je hmotnostní spektrum prekurzoru, které umožňuje získat informace o jeho aminokyselinové sekvenci<sup>37</sup>.

### 1.3.3. Biokonjugační techniky

Biokonjugační nebo také síťovací techniky představují ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou výhodnou metodu ke studiu prostorové struktury proteinů a proteinových komplexů, stejně jako dalších biomakromolekul (nukleové kyseliny,...). Jejimi hlavními přednostmi jsou nízké nároky na množství materiálu a jeho čistotu, rychlost analýzy a vysoká citlivost<sup>49, 50</sup>.

Principem biokonjugačních reakcí je vytvoření kovalentního propojení (angl. cross-linking) v rámci jedné molekuly (intramolekulární cross-linking) nebo mezi dvěma odliš-

nými molekulami (intermolekulární cross-linking) prostřednictvím síťovacího činidla. Produkty reakce jsou po separaci podrobeny štěpení enzymem s vysokou specificitou a následně hmotnostně spektrometrické analýze. Výsledkem může být nalezení místa zesíťení, které definuje vzdálenost uvnitř molekuly nebo mezi molekulovými povrchy, a tím upřesňuje terciární strukturu proteinu, případně způsob, jakým spolu dané proteiny interagují<sup>49, 50</sup>. Jeden konkrétní přístup je zobrazen schématem na Obr. 12.



Obr. 12– Schéma postupu vymodelování terciární struktury proteinu na základě síťovací reakce  
Převzato z [50]

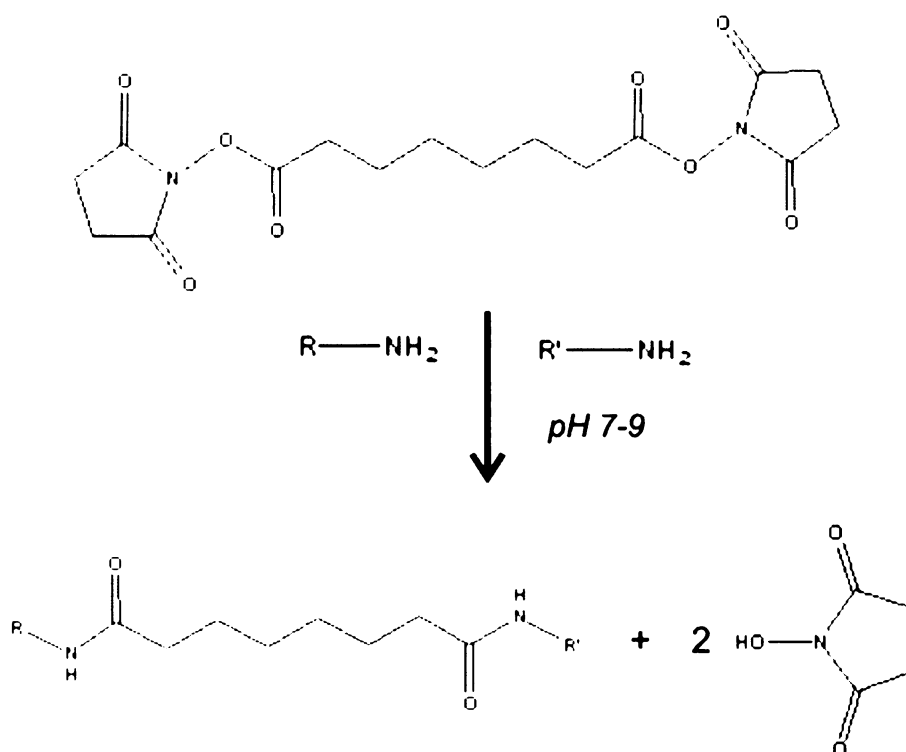
### 1.3.3.1. Síťovací činidla

K vytvoření kovalentních propojení v molekulách analytu jsou využívány běžné organické reakce, zprostředkovatelné řadou komerčně dostupných síťovacích činidel (cross-linkerů)<sup>51</sup>. Činidla můžeme rozdělit podle jejich reaktivity na aminoreaktivní, zahrnující např. hojně používané N-hydroxysukcinimidestery, které v proteinech vytvářejí stabilní amidové nebo sekundární aminové vazby, a karbodiimidy, neboli činidla nulové vzdálenosti, které zprostředkovávají vznik amidové vazby mezi aminem a karboxylem nebo aminem a fosfátem. Z hlediska struktury dělíme činidla na homobifunkční a heterobifunkční<sup>49, 52</sup>. V následujících kapitolách je popsáno působení homobifunkčních činidel a činidel nulové vzdálenosti, která byla používána v této práci.

#### 1.3.3.1.1. Homobifunkční síťovací činidla

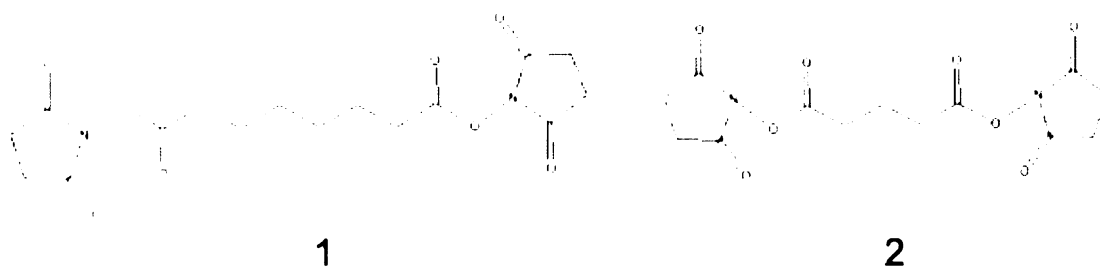
Homobifunkční činidla obsahují dvě, případně tři stejné funkční skupiny, zpravidla umístěné na obou koncích symetrického uhlíkatého řetězce o definované délce. Jejich působením vznikají mezi identickými skupinami určitých aminokyselinových zbytků raménka, která odpovídají maximální možné vzdálenosti mezi propojenými atomy. Nevýhodou, kterou lze částečně eliminovat použitím dvoukrokových reakčních protokolů<sup>52</sup>, je náhodná tvorba vysokomolekulárních produktů.

Mezi nejčastěji používaná homobifunkční činidla náleží N-hydroxysukcinimidestery (NHS-estery), vykazující vysokou reaktivitu vůči nukleofilním aminoskupinám lysinu, se kterými reagují za vzniku acylovaného produktu a uvolnění NHS skupin (Obr. 13, následující strana). Vedle aminů mohou atakovat také hydroxy- a sulfoxy- skupiny dalších postranních řetězců nebo imidazolové dusíky histidinu, produkty těchto reakcí jsou však nestabilní a ve vodném prostředí hydrolyzují.



Obr. 13 – Mechanismus síťovací reakce zprostředkované NHS-esterem (DSS)

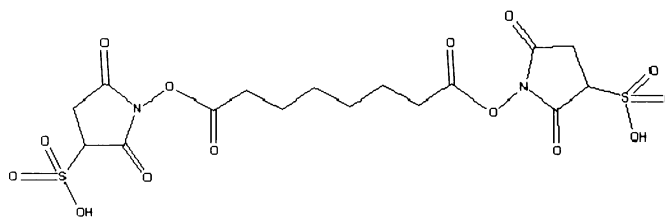
Nevýhodou NHS esterů je velmi nízká rozpustnost ve vodě, zpravidla se uchovávají ve vysoké koncentraci v organickém rozpouštědle (DMF, DMSO) a zásobní roztok v pufru vhodném pro reakci se připravuje ředěním až těsně před použitím. Optimální pH pro průběh reakce se pohybuje v rozmezí 7 až 9. Typickými zástupci skupiny NHS-esterů jsou disukcinimidsuberát (DSS) a disukcinimidglutarát (DSG) o délce ramének 11,4 Å resp. 7,7 Å (Obr. 14).



Obr. 14 – Strukturní vzorce nejčastěji používaných homobifunkčních síťovacích činidel

1 - disukcinimidsuberát, 2 - disukcinimidglutarát

Analogy NHS-esterů, které je možno rozpouštět ve vodných roztocích, jsou sulfo-NHS-estery (Obr. 15). Tato činidla však narozdíl od NHS-esterů nejsou schopna působit v lipidové membráně<sup>49,50,52</sup>.

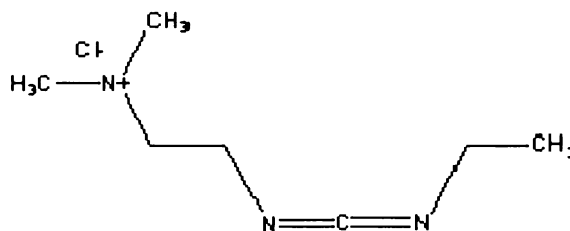


Obr. 15 – Struktura sulfo-NHS-esteru BS3 (bis(sulfosukcinimidyl)suberát)

### 1.3.3.1.2. Činidla nulové vzdálenosti

Tato činidla pouze zprostředkují vznik kovalentní vazby mezi aminokyselinovými zbytky jednoho nebo dvou různých proteinových řetězců a odstupují z reakce bez vložení raménka.

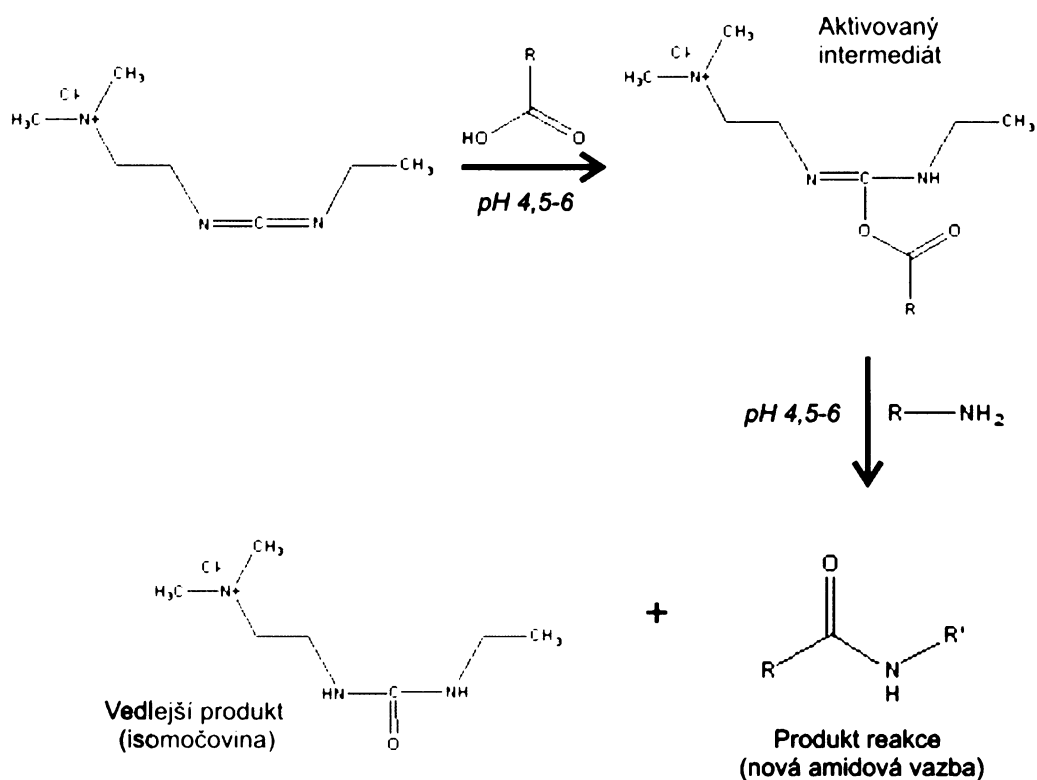
K vytvoření amidové příp. fosfoamidové vazby v proteinech se využívají především karbodiimidy, z nichž nejpopulárnějším činidlem je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid (EDC) (Obr. 16). EDC je rozpustné ve



Obr. 16 – Struktura heterobifunkčního činidla „nulové vzdálenosti“, EDC

vodných roztocích, bohužel se však ve vodě hydrolyzuje a ztrácí tak funkčnost. Proto je nutné rozpouštět jej těsně před použitím.

Mechanismus reakce, která optimálně probíhá za pH 4,5 až 6, je zřejmý z Obr. 17 (následující strana). EDC nejprve reaguje s karboxyskupinou aspartátu nebo glutamátu za vzniku aktivovaného intermediátu (*o*-acylisomočoviny), který se následně spojuje s aminoskupinou a vytváří stabilní amidovou vazbu. Vedlejším produktem reakce je iso-močovina.



Obr. 17 – Mechanismus tvorby amidové vazby zprostředkované karbodiimidem (EDC)

Aktivovaný intermediát je nestabilní a ve vodných roztocích snadno hydrolyzuje, což může mít dopad na efektivitu reakce. K roztoku se proto v některých případech přidává sulfo-NHS ester, který se na meziprodukt váže, znesnadňuje hydrolyzu a zvyšuje tak pravděpodobnost úspěšného vytvoření amidové vazby<sup>49,52</sup>.

## 2. CÍL

Systém cytochromů P450 je hlavním enzymovým aparátem účastnícím se biotransformace xenobiotik ve většině organismů. Vedle metabolických studií, které se zabývají osudem cizorodých látek *in vivo*, je nutné detailně poznat také vlastnosti a strukturu samotných biotransformačních enzymů. Získané znalosti pak nacházejí uplatnění především v oblasti vývoje léčiv při hledání co nejefektivnějších účinných látek.

Cílem této diplomové práce bylo získat izolaci z modelového organismu enzymové preparáty CYP 2B4, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub> v elektroforetické čistotě, ověřit funkčnost MFO systému v různém reakčním prostředí, nalézt vhodné podmínky pro studium prostorové struktury membránových enzymů pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie a případně s pomocí těchto technik strukturní poznatky rozšířit.

Ze superrodiny cytochromů P450 byla ke studiu vybrána králičí isoforma CYP 2B4 spolu s jejími redoxními partnery. Jedná se o analog lidské isoformy CYP 2B6, účastnící se metabolismu řady léčiv. Důvodem pro volbu CYP 2B4 byla také jeho snadná indukovanost a předechozí zkušenosti školitele diplomové práce s jeho izolací.

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s biokonjugačními technikami byla zvolena jako alternativní metoda studia struktury proteinů pro svou vysokou citlivost, rychlost analýzy a nenáročnost na množství analytu. Informace získané s její pomocí mohou navíc doplnit či zpřesnit znalosti struktury poskytnuté jinými metodami.



### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Materiál**

##### **3.1.1. Chemikálie**

**BIO-RAD, USA:** hydroxylapatit

**Farmakon Olomouc, ČR:** fenobarbital sodný

**Fluka, Švýcarsko:** 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid (EDC), akrylamid, Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), cytochrom c, dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), dusičnan stříbrný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTANa<sub>2</sub>), formaldehyd (37 % sol.), chloroform, methanol (MeOH), merkaptoethanol, N, N - methylen-bis-akrylamid (BIS), N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED), persíran amonný (APS), thiosíran sodný, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris),  $\alpha$  - tokoferol (vitamin E), triethylamin (99,5 %), uhličitan sodný monohydrát

**Lachema Brno, ČR:** diamantan, dihydrogenuhlíčan draselný, dihydrogenuhlíčan sodný, ethanol, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTANa<sub>2</sub>), dithioničitan sodný, glycerol, hexakvanoželezitan draselný, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, octan sodný, sacharosa

**Linde, ČR:** oxid uhelnatý, kapalný dusík, plynný dusík

**Merck, SRN:** acetonitril (ACN), chloroform, destilovaná voda pro chromatografii - Lichrosolv

**Pharmacia, Švýcarsko:** 2', 5'-ADP-Sepharosa, CM-Sepharosa

**Promega, SRN:** trypsin

**Reanal, Maďarsko:** glukosa-6-fosfát

**Roche Diagnostics, SRN:** Complete Protease Inhibitor (inhibitor proteas)

**Serva Heidelberg, SRN:** glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

**Sevapharma, ČR:** hovězí sérový albumin (BSA)

**Sigma, USA:**  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CCA), bicinchoninová kyselina (BCA), DEAE-Sepharosa CL6B, dimethylsulfoxid (DMSO), dithiotreitol (DTT), ethylamin, fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), flavinmononukleotid (FMN), cholát sodný, NADPH, standardy pro SDS-PAGE (wide-range), Tergitol NP-10, triethylamin (99 %)

**Dar:** enzymové preparáty (cytochrom P450 2B4 a NADPH:CYP reduktasa) – RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

### **3.1.2. Použité pufrы a další roztoky**

#### **Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu pomocí bicincholinové kyseliny**

Roztok A - 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 % tartarát sodný (w/v), pH 11,25

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

**Pufr pro stanovení koncentrace cytochromu P450** - 0,1 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 % glycerol (v/v), pH 7,4

**Pufr pro stanovení aktivity NADPH:CYP-reduktasy** - 300 mmol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, pH 7,4

#### **Roztoky pro SDS-PAGE**

Vzorkový pufr (pětkrát koncentrovaný) – 250 mmol/dm<sup>3</sup> Tris, pH 6,8, 500 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 10 % SDS (w/v), 0,5 % bromfenolová modř (w/v), 50 % glycerol (v/v)

Elektrodový pufr (pětkrát koncentrovaný) – 0,1 mol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 1 mol/dm<sup>3</sup> glycin, 0,5 % SDS, pH 8,3

Pufr pro separační gel: 1,5 mol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, pH 8,8

Pufr pro zaostřovací gel: 1,0 mol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, pH 6,8

29,5 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS (w/v); 10 % dodecylsulfát sodný (w/v); 10 % persíran amonný (w/v)

#### **Roztoky pro izolaci**

Pufr PR1 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) - 0,153 mol/dm<sup>3</sup> KCl, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 0,5 mol/dm<sup>3</sup> PMSF, 50 mmol/dm<sup>3</sup> vit. E, pH 7,5

Pufr PR2 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) - 0,1 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>P<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 0,1 mol/dm<sup>3</sup> KCl, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, pH 7,5

Pufr PR3 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) - 0,25 mol/dm<sup>3</sup> sacharosa, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 0,25 mmol/dm<sup>3</sup> vit. E, 1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 1 tableta proteasového Complete Inhibitoru na 50 ml roztoku, pH 7,5

Pufr PR4 (pufr pro solubilizaci) - 0,1 mol/dm<sup>3</sup> Tris/acetát, 0,1 mol/dm<sup>3</sup> KCl, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 20 % glycerol (v/v), pH 7,5

Pufr PR5 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 1, HAP 1a, HAP1b): 5 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/acetát, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR6 (promývací pufr pro HAP 1a, ekvilibrační pufr pro HAP2a/b) - 5 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR7A (eluční pufr pro gradient HAP1a, promývací pufr pro HAP1b, HAP2b) –

10 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % E-911 (w/v), pH 7,5)

Pufr PR7B (promývací pufr pro HAP 2a, HAP1b) - 25 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR7C (promývací a eluční pufr pro HAP 2a, promývací pufr pro HAP1b, pufr pro gradient HAP1b) - 50 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR8A (pufr pro gradient HAP1a) - 100 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR8B (pufr pro gradient HAP1b) - 200 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR8C (pufr pro gradient HAP1a, HAP 2a) - 300 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,3 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr P<sub>CPR1</sub> (pufr pro dialýzu CPR před nanesením na 2', 5' - ADP-Sepharosu 4B) - 5 mmol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 10 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr P<sub>CPR2</sub> (ekvilibrační pufr pro 2', 5' - ADP-Sepharosu 4B) - 50 mmol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,2 % E-911, pH 7,0

Pufr P<sub>CPR3</sub> (eluční pufr pro 2', 5' - ADP-Sepharosu 4B) - (50 mmol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 mol/dm<sup>3</sup> KCl, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,2 % E-911, 0,5 mmol/dm<sup>3</sup> NADP<sup>+</sup>, pH 7,5

Pufr bP1 (pufr pro dialýzu cytochromu b<sub>5</sub> před nanesením na DEAE-Sepharosu CL1B 2) - 10 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,5 % E-911 (w/v), pH 7,4

Pufr bP2 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 2) - 3 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,6 % Tergitol NP-10 (w/v), pH 7,7

Pufr bP3 (promývací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 2, ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 3) - 15 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,6 % Tergitol NP-10 (w/v), pH 7,7

Pufr bP4 (promývací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 3) - 15 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,7

Pufr bP5 (eluční pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 3) - 15 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), 0,2 mol/dm<sup>3</sup> KCl, pH 7,7

TEA pufr (pufr pro dialýzu finálních enzymových preparátů) - 25 mmol/dm<sup>3</sup> triethylamin, 20 % glycerol (v/v), 1 mmol/dm<sup>3</sup> DTT, pH 7,4

### **Roztoky pro metabolické studie**

NADPH regenerační systém - 10 U/ml glukosa-6-dehydrogenasa, 12,5 mmol/dm<sup>3</sup> NADPH, 100 mmol/dm<sup>3</sup> glukosa-6-fosfát

Fosfátový pufr P6 - 0,3 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, pH 6,0

Fosfátový pufr P7,4 - 0,3 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, pH 7,4

Fosfátový pufr P8 - 0,3 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, pH 8,0

Triethylaminový pufr TEA7,4 - 50 mmol/dm<sup>3</sup> triethylamin/CO<sub>2</sub>, pH 7,4

Pyridinový pufr Pyr6 - 50 mmol/dm<sup>3</sup> pyridin/Cl, pH 6,0

### **Roztoky pro chemické modifikace a hmotnostní spektrometrii**

Štěpící ethylmorfolinový pufr - 50 mmol/dm<sup>3</sup> ethylmorfolin, pH 8,1, 10 % ACN, 4 μg/ml trypsin

Triethylaminový pufr TEA7,4, Pyridinový pufr Pyr6 (viz Roztoky pro metabolické studie)

### **3.1.3. Příprava a čištění chromatografických nosičů**

#### **DEAE-Sepharosa CL6B**

Nosič (150 ml ve 20 % ethanolu (v/v)) byl před použitím třikrát promyt 350 ml H<sub>2</sub>O, následně rozmíchán ve 200 ml cyklizačního pufru (1 mol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) a ponechán tak přes noc při 4°C. Druhý den byl opět třikrát promyt 350 ml H<sub>2</sub>O a jedenkrát 350 ml pufru pro nalévání kolony (10 mmol/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 % glycerol (v/v), pH 7,4). Po nalití kolony (v zastaveném toku), sedimentaci nosiče a poklesu hladiny pufru 2-3 cm nad jeho povrch byla kolona uzavřena a promyta 1000 ml ekvilibračního pufru.

Po použití kolony byl nosič postupně promyt: 250 ml 1 mol/dm<sup>3</sup> KCl, 250 ml 1 mol/dm<sup>3</sup> octanu sodného, pH 3,0, 250 ml H<sub>2</sub>O, 250 ml 0,5 mol/dm<sup>3</sup> NaOH, 250 ml H<sub>2</sub>O, 250 ml 1 mol/dm<sup>3</sup> octanu sodného, pH 3,0, třikrát 250 ml H<sub>2</sub>O a dvakrát 250 ml 20 % EtOH (v/v). Nosič byl rozmíchán ve 200 ml 20 % ethanolu (v/v), přelit do polyethylenové lahvičky a uchováván při 4°C.

Cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 1: 1 mol/dm<sup>3</sup> Tris/acetát, pH 7,5

Nalévací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 1: 5 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/acetát, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), pH 7,5

Cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 2: 1 mol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, pH 7,7

Nalévací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 2: 3 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), pH 7,7

Cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 3: 1 mol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, pH 7,7

Nalévací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B 3: 15 mmol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTANa<sub>2</sub>, 20 % glycerol (v/v), pH 7,7

### **2',5'-ADP-Sepharosa**

Nosič (10 ml suspenze ve 20 % ethanolu (v/v)) byl dvakrát promyt 25 ml H<sub>2</sub>O, rozmíchán v 10 ml H<sub>2</sub>O, a kolona byla nalita v zastaveném toku. Po sedimentaci nosiče a poklesu hladiny pufru 1 cm nad jeho povrch byla kolona uzavřena a promyta 25 ml H<sub>2</sub>O a poté 50 ml ekvilibračního pufru.

Po použití kolony byl nosič v odměrném válci dvakrát promyt: 25 ml regeneračního pufru (0,5 mol/dm<sup>3</sup> Tris/Cl, 0,5 mol/dm<sup>3</sup> NaCl, pH 8,5), 25 ml H<sub>2</sub>O, 25 ml octanového pufru (0,5 mol/dm<sup>3</sup> NaAc, 0,5 mol/dm<sup>3</sup> NaCl, pH 4,5), 25 ml H<sub>2</sub>O. Poté byl promyt ještě jedenkrát 25 ml H<sub>2</sub>O a dvakrát 25 ml 20 % EtOH (v/v), rozmíchán ve 10 ml 20 % ethanolu (v/v), přelit do polyethylenové lahvičky a uchováván při 4°C.

### **Hydroxylapatit**

Nosič byl připraven pro chromatografii podle návodu uvedeného ve firemních prospektech (BIO-RAD, USA). Pevný hydroxylapatit byl navážen v potřebném množství (1 g na ~2,5 ml výsledné suspenze) a ponechán několik hodin v H<sub>2</sub>O. Po rozmíchání v destilované vodě byla kolona nalita v zastaveném toku, po sedimentaci nosiče a poklesu hladiny 1 cm nad jeho povrch byla kolona promyta příslušným ekvilibračním pufrem.

#### **3.1.4. Přístroje**

**Centrifugy:** T52.2, K-23 a K-24 (Janetzki, SRN) ultracentrifuga L07 (Beckman, USA), minicentrifuga Kentaur (Schoeler), minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf)

**Spektrofotometry:** Specord M42, Specord M40 a MOM (Carl Zeiss, Jena, SRN), Hewlett packard E8453 (Hewlett Pacard, USA)

**Hmotnostní spektrometr** MALDI-TOF Biflex II, Bruker Daltonics

**Ostatní:** Aparatura na SDS elektroforézu (Hofer SE 260), homogenizátor podle Pottera a Elvehjema, peristaltická pumpa (Pump PP-05, Laboratorní přístroje Praha), sběrače frakcí (Fraction Collector FCC-60, Laboratorní přístroje Praha), BioLogic BioFrac Fraction Collector (BIO-RAD), pH-metr (ATI Orion370), sonikační lázně (P-Lab; Ultrasonic compact cleaner, Teson1, Tesla), termostat (Eppendorf), Thermomixer Comfort (Eppendorf), ultra-filtrační cely (Amicon), vakuový rotační koncentrátor (SpeedVac DNA 110, Savant)

## **3.2. Metody**

### **3.2.1. Analytická stanovení**

#### **3.2.1.1. Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny**

Metoda je založena na tvorbě fialově zbarveného komplexu měďných iontů s bicinchoninovou kyselinou v alkalickém prostředí. Do reakce vstupují měďnaté ionty ve formě vinanového komplexu, které jsou funkčními skupinami některých přítomných aminokyselin redukovány na ionty měďné. Ty pak mohou interagovat s BCA a intenzita vzniklého zbarvení stanovená spektrofotometricky, měřením absorbance vzorku při vlnové délce 562 nm, je přímo úměrná koncentraci proteinu<sup>53</sup>.

Koncentrace byla počítána dosazením hodnoty absorbance vzorku do rovnice kalibrační přímky získané lineární regresí. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) v koncentraci 0,1, 0,2, a 0,4 mg/ml. Stanovení byla prováděna ve dvou paralelních měřeních.

Činidlo pro stanovení bylo připraveno smíšením 49 dílů roztoku A (v/v), 1 % BCA v 50 dílech (w/v) a 1 dílu roztoku B (v/v).

Do vyžíhaných centrifugačních zkumavek bylo pipetováno 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (blank), roztoku standardu nebo stanovovaného vzorku. Po doplnění 980  $\mu$ l činidla byly vzorky inkubovány 30 minut při 60°C a 5 minut centrifugovány na centrifuze Janetzki T52.2 (křížový rotor, 4 x 4 zkumavky, 4000 RPM). Po zchlazení byla měřena absorbance vzorků při 562 nm proti H<sub>2</sub>O (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Z naměřených hodnot absorbancí byly po odečtení blanku získány hodnoty pro výpočet koncentrace.

#### **3.2.1.2. Stanovení koncentrace cytochromu P450**

Cytochrom P450 vykazuje v redukované formě s navázaným oxidem uhelnatým absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Metodou diferenční spektroskopie lze tedy zjistit jeho koncentraci ve vzorku<sup>54</sup>.

Vzorek byl naředěn do 2 ml pufru pro stanovení cytochromu P450, následně byl přidán pevný dithioničitan sodný a výsledný roztok byl promíchán. Do dvou křemenných kyvet s víčky bylo napipetováno po 1 ml roztoku. Roztok ve vzorkové kyvetě byl 40 vteřin sycen proudem bublin oxidu uhelnatého, poté bylo proměřeno jeho absorpční

spektrum od 400 do 500 nm proti roztoku bez syčení oxidem uhelnatým ve srovnávací kyvetě (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -SCAN, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena podle vzorce:

$$c_{CYP} = [(A_{max} - A_{min})/\epsilon_{CYP}].\text{ředění } [\mu\text{mol}/\text{dm}^3]$$

$c_{CYP}$  ..... molární koncentrace CYP [ $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ]

$A_{max}$  ..... maximum absorbance (odpovídá absorbanci při 450 nm)

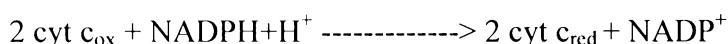
$A_{min}$  ..... minimum absorbance (odpovídá absorbanci při 490 až 500 nm)

$\epsilon_{CYP}$  ..... molární absorpční koeficient cytochromu P450 ( $0,091 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ )

### 3.2.1.3. Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy

NADPH:CYP reductasa může redukovat cytochrom c podle reakce:

NADPH:CYP reductasa



Aktivita enzymu se stanovuje spektrofotometricky ze závislosti změny absorbance roztoku na čase<sup>55</sup>.

Vzorek byl do kyvety naředěn puřem pro stanovení reductasy, bylo k němu přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku cytochromu c (25 mg/ml), a reakce byla odstartována přidavkem 10  $\mu\text{l}$  25  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  NADPH. Lineární změna absorbance byla měřena při vlnové délce 550 nm (spektrofotometr Specord M42, režim TIME, 1 ml křemenná kyveta o optické dráze 1 cm). Aktivita reductasy byla vypočtena podle vzorce:

$$a_{CPR} = [(A_{550(60)} - A_{550(0)})/\Delta t \cdot l \cdot \epsilon_{cytc}].\text{ředění } [\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

$a_{CPR}$  ..... aktivita NADPH:CYP reductasy [ $\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

$A_{550(60)}$  ..... absorbance při 550 nm v čase  $t = 60 \text{ s}$

$A_{550(0)}$  ..... absorbance při 550 nm v čase  $t = 0 \text{ s}$

$\epsilon_{cytc}$  ..... molární absorpční koeficient cytochromu c ( $21 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ )

$\Delta t$  ..... doba reakce (1 min)

$l$  ..... délka kyvety (1 cm)



### 3.2.1.4. Stanovení koncentrace NADPH:cytochrom P450 reduktasy

NADPH:CYP reduktasa vykazuje díky flavinovým koenzymům absorpční maximum při vlnové délce 455 nm. Na základě toho lze koncentraci enzymu stanovit spektrofotometricky<sup>56</sup>.

Spektrum neředěného vzorku bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 400 - 600 nm proti referenčnímu roztoku dialyzačního pufru (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -SCAN, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Koncentrace NADPH:CYP reduktasy byla vypočtena podle vzorce:

$$c_{\text{CPR}} = (A_{\text{max}} - A_{\text{min}}) / \epsilon_{\text{CPR}} \cdot l \text{ [}\mu\text{mol/dm}^3\text{]}$$

$c_{\text{CPR}}$  ..... molární koncentrace reduktasy [ $\mu\text{mol/dm}^3$ ]  
 $A_{\text{max}}$  ..... maximum absorbance (455 nm)  
 $A_{\text{min}}$  ..... minimum absorbance (550 nm)  
 $\epsilon_{\text{CPR}}$  ..... molární absorpční koeficient NADPH:CYP reduktasy  
 ..... (21,2  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ )  
 $l$  ..... délka kyvety (1 cm)

### 3.2.1.5. Stanovení koncentrace cytochromu $b_5$

Cytochrom  $b_5$  je hemoprotein vykazující absorpční maximum při vlnové délce 415 nm<sup>57</sup>. Jeho koncentraci lze tedy určit spektrofotometricky.

Absorpční spektrum v rozsahu 350 – 500 nm bylo měřeno proti filtrátu získaného zahuštěním finálního preparátu cytochromu  $b_5$  (spektrofotometr Hewlett Packard E8453, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Koncentrace cytochromu  $b_5$  byla vypočtena podle vzorce:

$$c_{\text{cyt}b_5} = (A_{\text{max}} - A_{\text{min}}) / (\epsilon_{\text{cyt}b_5} \cdot l) \cdot \text{ředění} \text{ [}\mu\text{mol/dm}^3\text{]}$$

$c_{\text{cyt}b_5}$  ..... molární koncentrace cytochromu  $b_5$  [ $\mu\text{mol/dm}^3$ ]  
 $A_{\text{max}}$  ..... maximum absorbance (415 nm)  
 $A_{\text{min}}$  ..... minimum absorbance (500 nm)  
 $\epsilon_{\text{cyt}b_5}$  ..... molární absorpční koeficient cytochromu  $b_5$  (171  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ )  
 $l$  ..... délka kyvety (1 cm)

### **3.2.2. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE)**

SDS elektroforéza byla prováděna podle Laemmliho <sup>58</sup>. Metoda je založena na dělení proteinů v polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti a elektroforetické pohyblivosti. Detergent dodecylsulfát sodný (SDS) slouží k denaturaci a k obalení proteinových molekul, čímž jim uděluje uniformní záporný náboj.

Před aplikací na gel byl ke vhodně zředěným vzorkům o objemu 20  $\mu$ l přidán vzorkový pufr, vzorky byly 5 min vařeny ve vodní lázni a poté 15 s centrifugovány (minicentrifuga Eppendorf, 13400 RPM). Po zchladnutí byly vzorky nanесeny na gel, nanáška představovala 20  $\mu$ l na jamku.

Pro separaci proteinů byl používán 4 % zaostřovací gel a 10 % (příp. 8 % či 12 %) separační polyakrylamidový gel o tloušťce 1 mm (gely byly připraveny podle Sambrooka a kol. <sup>59</sup>). Elektroforéza probíhala při nastavení napětí 80 V na průchod proteinů zaostřovacím gelem a 150 V na průchod proteinů separačním gelem. Gely byly barveny stříbrem nebo brilantovou modří Coomassie a uchovávány v 1 % kyselině octové při 4°C, případně vysušeny mezi dvěma celofánovými fóliemi.

#### *Detekce proteinů brilantovou modří Coomassie:*

Gel byl na 45 min ponořen do barvicí lázně (0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 46 % ethanol (v/v), 9,2 % kyselina octová (v/v)), a následně odbarven roztokem 35 % ethanolu a 10 % kyseliny octové (H<sub>2</sub>O:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:CH<sub>3</sub>COOH – 55:35:10 (v/v/v)).

#### *Detekce proteinů stříbrnými ionty*

Po skončení separačního procesu byl gel nejprve na 30 minut inkubován ve fixačním roztoku (H<sub>2</sub>O:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:CH<sub>3</sub>COOH – 55:35:10 (v/v/v)), dále 60 min promýván vodou. Poté byl na 2 minuty ponořen do senzitivizačního roztoku 0,02 % thiosíranu sodného (w/v), promýván dvakrát 1 minutu vodou a 30 minut inkubován v 0,1 % roztoku dusičnanu stříbrného (w/v). Opět dvakrát 1 minutu promýván vodou a ponořen do vyvolávacího roztoku 2 % uhličitanu sodného (w/v) s 0,04 % roztokem formalinu (v/v) na 5-7 minut. Po optimálním zviditelnění proužků byla reakce zastavena stopovacím roztokem 1,5 % ethylenamintetraoctové kyseliny (w/v) a gely byly uchovávány v 1 % roztoku kyseliny octové (v/v) při 4°C.

### **3.2.3. Izolace cytochromu P450 2B4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>**

Izolace cytochromu P450 2B4 a NADPH:CYP reduktasy byla prováděna modifikovaným postupem podle disertační práce M. Šulce<sup>60</sup>, izolace cytochromu b<sub>5</sub> modifikovaným postupem podle diplomové práce K. Janouchové<sup>61</sup>. Následuje stručný popis použitých metod, detailní postup je pro přehlednost popsán v kapitole Výsledky (str. 43).

#### **3.2.3.1. Premedikace pokusného zvířete**

Pokusné zvíře králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*), samec o hmotnosti 2,7 kg, bylo chováno po dobu dvou týdnů za konstantní teploty v plechové kleci, krmeno peletovou stravou VELAZ a po celou dobu mu byl umožněn přístup k napajedlu *ad libidum*. Od čtvrtého dne bylo premedikováno 0,1 % roztokem fenobarbitalu ve vodě (w/v), aby došlo k indukci CYP 2B4. Před usmrcením 18 hodin hladovělo pro snížení hladiny glykogenu v játrech.

#### **3.2.3.2. Izolace mikrosomální frakce**

Pokusné zvíře bylo narkotizováno oxidem uhličitým a usmrceno následným zlomením vazy. Ze získaných jater byla metodou diferenční centrifugace izolována mikrosomální frakce, která byla dále využita k purifikaci membránových proteinů CYP 2B4, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub> (detailní postup viz kap. 4.1.1.).

#### **3.2.3.3. Solubilizace**

Mikrosomální frakce byla solubilizována pomocí směsi iontového detergentu cholátu sodného a neiontového detergentu emulgenu E-911 v poměru 1:1 (w/w). Detergenty slouží k rozrušení lipidové dvojvrstvy a navázáním na membránovou část enzymu blokují hydrofobní interakce a udržují tak protein v rozpustné formě. Do roztoku byl dále přidán protaminsulfát, který napomáhá solubilizaci CPR, a *Complete Inhibitor*, bránící degradaci proteinů proteasami (detailní postup viz kap. 4.1.2.).

#### **3.2.3.4. Chromatografické metody**

K purifikaci jednotlivých enzymů byla použita řada chromatografických metod, jejichž podrobný popis je uveden v kap. 4.1. Průběh každé chromatografie byl sledován spektrofotometricky, měřením absorbance jednotlivých frakcí při vlnové délce 417 nm

(v případě CYP a CPR) nebo 413 nm (v případě cytochromu  $b_5$ ), a stanovením cytochrom c-reduktasové aktivity při purifikaci CPR. Čistota frakcí vykazujících nejvyšší absorpční příp. aktivitu CPR byla kontrolována pomocí SDS-elektroforézy. Nejčistší frakce byly následně spojeny, zahuštěny, zbaveny solí pomocí dialýzy a podrobeny dalšímu purifikačnímu kroku.

K separaci proteinů obsažených v solubilizátu byla použita ionexová chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B ekvilibrované na pH 7,5. CYP 2B4 se za tohoto pH na kolonu neváže a oddělí se tak od CPR a cytochromu  $b_5$ , které jsou eluovány gradientem iontové síly.

CYP 2B4 získaný z frakcí promývacího píku DEAE-Sepharosy CL6B byl dále purifikován pomocí adsorbční chromatografie na koloně hydroxylapatitu ekvilibrované na pH 7,5. Tento nosič specificky váže hemoproteiny a umožňuje tak jejich oddělení od většiny proteinových kontaminantů. Navázaný CYP je z kolony uvolněn gradientem iontové síly. Pro zvýšení čistoty preparátu byl tento krok použit dvakrát po sobě.

NADPH:CYP reduktasa byla po separaci na koloně DEAE-Sepharosy CL6B oddělena od ostatních proteinů, včetně cytochromu  $b_5$ , pomocí afinitního nosiče 2', 5' – ADP-Sepharosy 4B ekvilibrovaného na pH 7,0. Nosič obsahuje navázaný ADP, na který se CPR specificky váže. Po promytí pufrům s pH 7,5 je reduktasa eluována isokratickým zvýšením iontové síly a přidavkem  $\text{NADP}^+$ , které nahradí ADP v molekule CPR a znemožní vazbu proteinu na nosič.

K purifikaci cytochromu  $b_5$  byl použit mírný gradient iontové síly na koloně DEAE-Sepharosy CL6B ekvilibrované na pH 7,7. Stejný nosič byl také použit k převedení proteinu do pufru s nižším obsahem detergentu, eluce cytochromu  $b_5$  byla v tomto případě provedena isokratickým zvýšením iontové síly.

### **3.2.3.5. Odstranění detergentu pomocí silikagelu**

Z enzymových preparátů byl odstraněn detergent postupem podle Anzenbachera a kol.<sup>62</sup> - k preparátu bylo přidáno takové množství silikagelu, aby jeho koncentrace odpovídala 4 mg na 1 mg detergentu. Koncentrace detergentu byla odhadnuta na základě jeho obsahu v posledním elučním pufru. Vzorky byly po dobu 3 hodin míchány otáčením za teploty 6°C, a poté centrifugovány 2 x 5 min na minicentrifuze Schoeler (úhlový rotor 12 x 2 ml, 13000 RPM) pro odstranění silikagelu. Supernatanty byly v malých alikvotech (~400  $\mu\text{l}$ ) zmrazeny ve směsi suchého ledu s ethanolem a uchovávány v -80°C.

### **3.2.4. Studium vlivu reakčního prostředí na aktivitu NADPH:CYP reduktasy**

Podle postupu popsaného v kap. 3.2.1.3 byla stanovena aktivita NADPH:CYP reduktasy ve fosfátových pufrch P6 a P7,4, v pyridinovém pufru Pyr6 a v triethylaminovém pufru TEA7,4 (složení viz kap. 3.1.2.). Vedle vlivu složení pufrů a pH byla sledována změna aktivity v prostředí s různou iontovou silou a v přítomnosti membrány.

V obecně používaném fyziologickém roztoku je koncentrace iontů solí přibližně 150 mmol/dm<sup>3</sup>, proto byl studován vliv iontové síly na aktivitu reduktasy. Ke studiu byl použit pufr P7,4, který obsahoval NaCl o finální koncentraci 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 a 1,5 mol/dm<sup>3</sup>. Pro každou koncentraci byla provedena dvě paralelní stanovení.

Protože NADPH:CYP reduktasa je membránovým enzymem, bylo zjišťováno jaký vliv na aktivitu má přítomnost rekonstituované membrány (micel). Micely byly připraveny odpařením chloroformu z potřebného množství zásobního roztoku DLPC, naředěním DLPC pufrém na koncentraci 150 mmol/dm<sup>3</sup> a pětiminutovou sonikací v ultrazvukové lázni. Do roztoku byl zředěn preparát reduktasy na výslednou koncentraci 0,06 mmol/dm<sup>3</sup> a následovala sonikace 3 min pro ukotvení reduktasy v membráně. Po preinkubaci (3 min, 21°C) byla spektrofotometricky stanovena aktivita CPR. V P7,4, Pyr6 a TEA7,4 byla provedena vždy tři paralelní stanovení.

### **3.2.5. Metabolické studie interakce cytochromu P450 2B4 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou**

7-pentoxyresorufin je specifickým substrátem CYP 2B4 přeměňovaným na resorufin O-dealkylační reakcí<sup>63</sup>. Vznikající resorufin vykazuje fluorescenci, která je přímo úměrná jeho molární koncentraci. Fluorimetrickou detekcí lze proto stanovit aktivitu CYP 2B4 výpočtem podle vzorce:

$$a_{2B4} = c_{res}/(\Delta t \cdot n_{2B4}) \text{ [nmol resorufinu/min}^{-1} \cdot (1 \text{ nmol CYP})^{-1}]$$

$a_{2B4}$  .....aktivita cytochromu P450 2B4 [nmol<sub>res</sub>/min<sup>-1</sup>.(1 nmol CYP)<sup>-1</sup>]

$c_{res}$  .....molární koncentrace resorufinu ve vzorku (μmol/dm<sup>3</sup>)

$\Delta t$ .....doba reakce (1 min)

$n_{2B4}$ .....látkové množství CYP 2B4 v celkovém reakčním objemu (nmol)

Experimenty byly prováděny v rekonstituovaném systému ve fosfátových pufrch P8, P7,4 a P6, v pyridinovém pufru Pyr6 a v triethylaminovém pufru TEA7,4 pro porovnání aktivity CYP 2B4 v prostředí s různým pH a v odlišných typech pufrů.

V pufru P7,4 pufrch bylo provedeno optimalizační měření s různými koncentracemi 7-pentoxyresorufinu ve vzorcích. Vybraná koncentrace 7-PR byla pak použita ke zjištění optimálního reakčního poměru CYP 2B4:CPR v prostředí pufru P7,4 a TEA7,4 a ke stanovení aktivity v odlišných typech pufrů.

### **3.2.5.1. Příprava vzorků**

Micely byly připraveny podle postupu uvedeného v kap. 3.2.4. Ředěním zásobního roztoku 7-pentoxyresorufinu do pufru P7,4 byla vytvořena koncentrační řada (2, 5, 10, 20, 50 a 100  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ), pro každou koncentraci byly připraveny dva paralelní vzorky. Rekonstituovaný systém byl vytvořen přidáním ekvimolárního množství CYP 2B4 a CPR a sonikací 5 min v ultrazvukové lázni pro ukotvení proteinů v membráně. Finální koncentrace obou proteinů odpovídala 0,3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , celkový reakční objem se rovnal 200  $\mu\text{l}$ .

Standardy o objemu 80  $\mu\text{l}$  obsahovaly resorufin v příslušném pufru o koncentracích 0,042, 0,104 a 0,208  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ .

Vzorky byly 3 minuty inkubovány při 37°C, poté byla odstartována enzymatická reakce přidáním 20  $\mu\text{l}$  NADPH regeneračního systému, která probíhala 10 minut při 37°C. Reakce byla zastavena přidáním 400  $\mu\text{l}$  methanolu za vzniku sraženiny. Methanol byl přidán i ke standardům, celkový objem vzorků tedy činil 600  $\mu\text{l}$ , standardů 480  $\mu\text{l}$ . Vzorky i standardy byly 10 minut centrifugovány na centrifuze Janetzki T52.2 (křížový rotor, 4 x 4 zkumavky, 4000 RPM).

Stejný postup byl použit pro měření aktivity systému v různých typech pufrů a pro stanovení optimálního molárního poměru proteinů, v druhém případě se pouze měnila koncentrace CPR tak, aby poměr CYP 2B4:CPR byl 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 nebo 1:5.

### **3.2.5.2. Fluorimetrické měření**

Po centrifugaci bylo 200  $\mu\text{l}$  supernatantu z každého vzorku napipetováno do fluorescenční destičky, ve které byla změřena fluorescence resorufinu (fluorimetr Spectrofluorimeter LS55,  $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$ , štěrbin: SLIT 15,  $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$ , štěrbin: SLIT 10).

Ze známých koncentrací standardů a hodnot jejich fluorescence byla vytvořena kalibrační přímka a získána rovnice regrese. Byla vypočtena koncentrace resorufinu vzniklého ve vzorcích a spočítána aktivita CYP 2B4.

### **3.2.6. Studium struktury cytochromu P450 2B4 a jeho redoxních partnerů při vzájemné interakci pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie**

Tvorba intramolekulárních kovalentních propojení v molekule CYP 2B4 či cytochromu  $b_5$  a intermolekulárních kovalentních vazeb mezi CYP 2B4 a jeho redoxními partnery, vzniklých působením síťovacích činidel, byla sledována pomocí SDS-elektroforézy příp. MALDI-TOF MS analýzou.

#### **3.2.6.1. Intramolekulární síťovací reakce**

K vytvoření intramolekulárních kovalentních můstků v molekule CYP 2B4 a cytochromu  $b_5$  byla používána homobifunkční síťovací činidla disukcinimidsuberát (DSS) a disukcinimidglutarát (DSG), zásobní roztoky činidel byly připravovány a uchovávány v dimethylsulfoxidu (DMSO), těsně před použitím byly ředěny na potřebnou koncentraci v pufru TEA7,4.

Nejprve byla zjišťována optimální koncentrace činidel, při které nevzniká nadbytek vysokomolekulárních forem proteinu, a to za přítomnosti i absence substrátu CYP 2B4 diamantanu. Experimenty byly prováděny v přítomnosti membrány (DLPC) v pufru TEA7,4, celkový reakční objem činil 20  $\mu\text{l}$ . Monomery proteinu separované SDS elektroforézou byly využity k měření hmotnostních spekter.

Micely byly připravovány postupem uvedeným v kap. 3.2.4., v případě vzorků obsahujících diamantan byl potřebný objem zásobního roztoku diamantanu v chloroformu přidáván společně s DLPC tak, aby se finální koncentrace diamantanu rovnala 1  $\mu\text{l}/\text{dm}^3$ . Po vytvoření micel byl do vzorku přidán CYP 2B4, nebo cytochrom  $b_5$ , jejichž finální koncentrace odpovídala 1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , a roztok byl 5 minut sonikován pro ukotvení proteinů do membrány. Nakonec bylo přidáno síťovací činidlo do požadované koncentrace, hodnoty koncentrací jsou uvedeny v popiscích jednotlivých elektroforeogramů v kap. 4 (Výsledky).

Vzorky byly inkubovány 1 hod za laboratorní teploty, poté byla reakce zastavena přidáním ethylaminu do koncentrace 5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , a následovala separace pomocí SDS-PAGE. Po separaci byly proteiny detekovány stříbrem a gely byly uchovávány v 1 % kyselině octové při 4°C.

### 3.2.6.2. Intermolekulární síťovací reakce

K rozšíření znalostí o oblasti interakce cytochromu P450 2B4, NADPH: CYP reductasy a cytochromu  $b_5$ , bylo používáno síťovací činidlo 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid (EDC), propojující primární amin lysinu či argininu s karboxylem kyseliny asparagové, glutamové nebo C-koncem.

Při optimalizaci podmínek byla zjišťována nejvhodnější koncentrace síťovacího činidla, vliv iontové síly, vliv přítomnosti organického rozpouštědla a působení substrátu CYP 2B4 (diamantan) a CPR (NADPH) na tvorbu vysokomolekulárních forem proteinů.

#### Odstranění detergentu z enzymových preparátů

Cholát sodný, detergent používaný při izolaci membránových enzymů, obsahuje ve své struktuře karboxylovou skupinu, která je atakována činidlem EDC na úkor karboxylů z aspartátových a glutamátových aminokyselinových zbytků obsažených v proteinech. Proto je třeba jej z preparátů před použitím co nejúčinněji odstranit.

K odstranění detergentu bylo použito dvou způsobů – převedení proteinů do pufru Pyr6 na membráně Microcon YM10 a příp. také adsorpcí na silikagel.

#### *Adsorpce na silikagel*

K roztoku proteinu bylo přidáno takové množství silikagelu, aby jeho poměr k obsaženému detergentu odpovídal 4:1 (w/w). Množství detergentu bylo odhadnuto z jeho obsahu v posledním elučním pufru použitého při purifikaci daného proteinu. Roztok byl ponechán 2 hod při 4°C a každých 10 min promíchán otáčením. Poté byl centrifugován 2 x 5 min na minicentrifuze Eppendorf (úhlový rotor 12 x 2 ml, 13400 RPM) a výsledný supernatant byl přečištěn na membráně Microcon YM10 (viz níže).

#### *Přečištění na membráně Microcon YM10*

Premixy proteinů připravené v rekonstituovaném systému byly promyty 2 x 100  $\mu$ l pufru Pyr6 na membráně Microcon YM10 (centrifugace na minicentrifuze Eppendorf (25 min, úhlový rotor 12 x 2 ml, 13400 RPM)) a poté naředěny stejným puftrem na požadovanou koncentraci. Roztoky takto zbavené detergentu byly použity pro experiment.

#### *Příprava vzorků*

Experimenty byly prováděny v rekonstituovaném systému v pyridinovém pufru Pyr6. Objem vzorku vždy činil 20  $\mu$ l.

Rekonstituovaný systém byl vytvořen přidáním proteinů k micelám připraveným podle postupu popsaného v kap. 3.2.4. a sonikací 5 min v ultrazvukové lázni. Finální koncentrace CPR a CYP 2B4 činila 1 až 2  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>, koncentrace cytochromu  $b_5$  8  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>.



Po vytvoření rekonstituovaného systému bylo přidáno síťovací činidlo EDC do požadované koncentrace, hodnoty koncentrací jsou uvedeny v popiscích příslušných elektroforeogramů v kap. 4. (Výsledky).

Vzorky byly s činidlem EDC inkubovány minimálně 16 hodin za laboratorní teploty a následně separovány pomocí SDS-PAGE. Gely byly barveny stříbrem a uchovávány v 1 % kyselině octové při 4°C.

### **3.2.6.3. Příprava vzorků pro MALDI-TOF MS, měření hmotnostních spekter**

Po separaci proteinů SDS-elektroforézou byly vybrané proteinové proužky vyříznuty skalpelem a nakrájeny na kostky o velikosti ~1 mm. Gel byl odbarven opakovaným promýváním v roztoku 15 mmol/dm<sup>3</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a 50 mmol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Po úplném odbarvení byly kousky gelu propláchnuty 5 x 100 µl H<sub>2</sub>O, 1 x až 2 x promyty směsí 100 µl 50 % acetonitrilu (ACN) (v/v) a 100 µl 100 mmol/dm<sup>3</sup> ethylmorfolinu, pH 8,1. Dále byly 3 x střídavě promyty 100 µl H<sub>2</sub>O a 100 µl ACN, ve kterých byly vždy 5 min sonikovány a následovala sonikace 5min ve směsi 100 µl H<sub>2</sub>O a 100 µl ACN.

Po odstranění supernatantu byl gel sušen 10 min ve SpeedVacu, poté k němu bylo přidáno 30 µl štěpícího pufru s 4 mg/ml trypsinu a následovala inkubace 20 hod (37°C, 650 RPM). Po inkubaci byl vzorek centrifugován (minicentrifuga Eppendorf, 15 s, 13400 RPM) a byl k němu přidán ACN do finální koncentrace 30 % (v/v). Po sonikaci (20 min, 21°C) byl 1 µl supernatantu nanesen na terčík MALDI-TOF a po odpaření pufru převrstven 1 µl matrice. Jako matrice byl používán roztok α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (ACN:H<sub>2</sub>O:nasycený methanolvý extrakt CCA v poměru 1:1:1 (v/v/v)). Po krystalizaci matrice byl terčík vložen do hmotnostního spektrometru (MALDI-TOF Biflex II, Bruker Daltonics) a v reflexním módu MALDI-TOF byla změřena spektra nanesených peptidových směsí.

### **3.2.6.4. Identifikace proteinů a zesíťných aminokyselinových zbytků**

Získaná hmotnostní spektra byla zpracována programem FlexAnalysis (Bruker), hodnoty m/z majoritních píků byly z programu exportovány a pomocí software dostupného na internetu ([ProFound](#), [Mascot](#)) porovnány s hodnotami m/z všech proteinů zahrnutých v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information), které odpovídaly zadaným parametrům. Prohledávání bylo omezeno na savčí proteiny o předpokládané molekulové hmotnosti proteinu ± 10 kDa a v rozsahu pI 3 - 11. Byla zadána příslušná proteasa

(trypsin), možná oxidace methioninu a povoleno maximálně jedno vynechané štěpící místo a tolerance chyby  $m/z$  peptidu 0,2 – 0,3 Da (Obr. 18). Po vyhodnocení byl analyzovaný protein identifikován jako ten s nejvyšší shodou  $m/z$ .

Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

### ProFound - Peptide Mapping [Short Form]

General	Digestion
<b>Sample ID</b> 1SRef	<b>Allow maximum</b> 1 missed cleavages
<b>Database</b> NCBI nr (2001/08/14)	<b>Enzyme</b> Trypsin
<b>Taxonomic Category</b> ... Mammalia	For user-defined cleavage, please click <a href="#">here</a> .
<b>Search for</b> single protein only	<b>Modifications</b>
<b>Protein Mass</b> 40 - 60 kDa	<b>Complete Modification(s)</b> 4-vinyl-pyridine (Cys) Acrylamide (Cys) Iodoacetamide (Cys) Iodoacetic acid (Cys) Performic acid (Cys+O3)
<b>Protein pI</b> 3 - 11	<b>Partial Modification</b> <input checked="" type="checkbox"/> Methionine oxidation
<b>Report Top</b> 10 Candidates	For more partial modifications, please click <a href="#">here</a> .
<b>Questions?</b> Please write to <a href="#">ProFound</a>	
<b>What's new</b> <a href="#">about ProFound?</a>	
Masses	
<b>Average Masses:</b>	<b>Monoisotopic Masses:</b>
	567.0
	586.6
	628.3
	644.2
	650.3
	666.3
<b>Mass tolerance for average data:</b> +/- 1	<b>Mass tolerance for monoisotopic data:</b> +/- 0.2
<b>Tolerance unit:</b> <input checked="" type="radio"/> Da <input type="radio"/> % <input type="radio"/> ppm	<b>Charge state:</b> <input type="radio"/> M <input checked="" type="radio"/> MH+
<input type="button" value="Identify Protein"/> <input type="button" value="Extra Settings"/> <input type="button" value="Example"/> <input type="button" value="Reset Form"/>	

Obr. 18 – Nastavení software ProFound pro identifikaci proteinu na základě hodnot  $m/z$

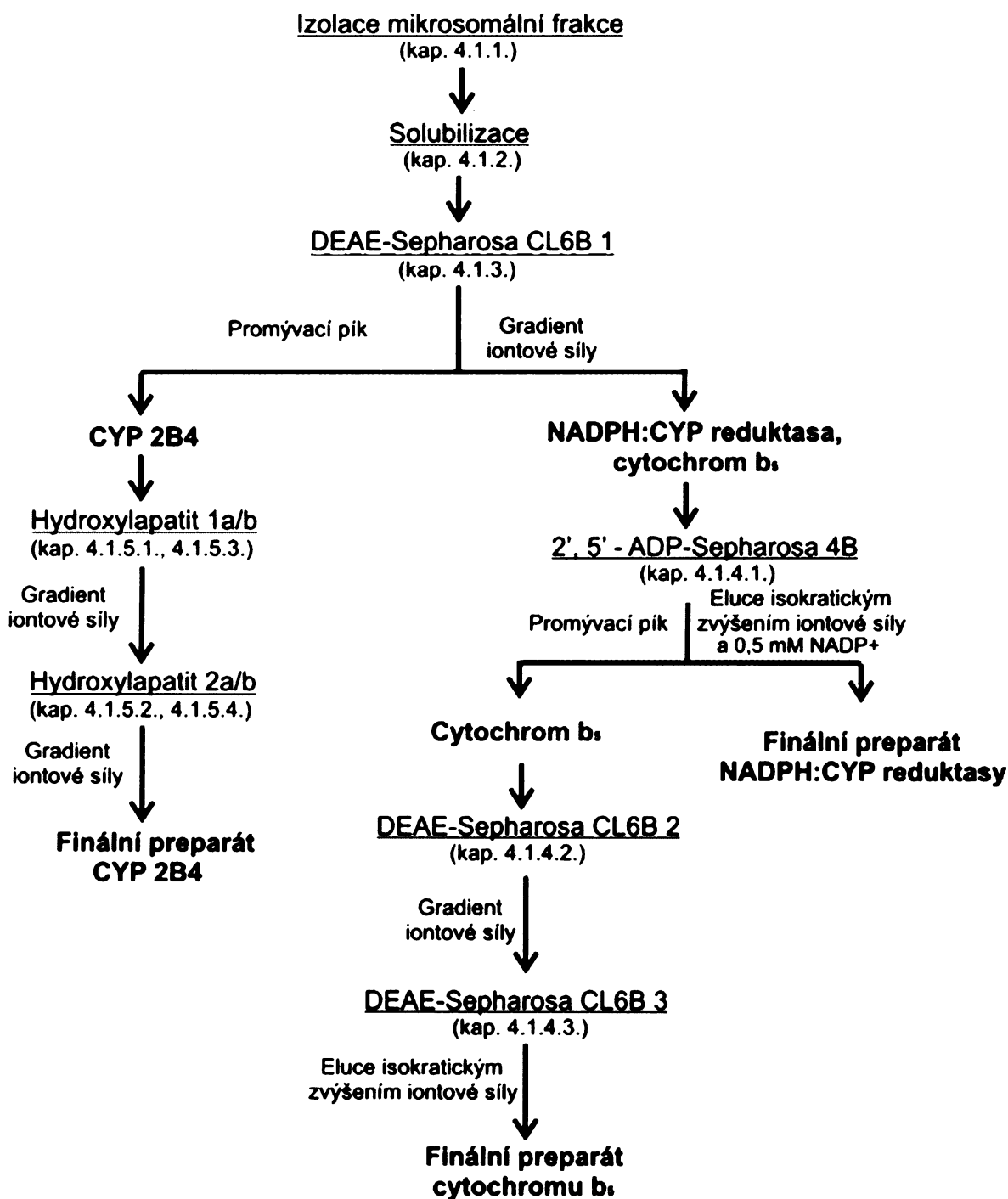
V případě použití modifikačních činidel následuje ruční přiřazení monoizotopických hmotností k jednotlivým peptidům dle generované teoretické peptidové mapy. Hodnoty, které zůstanou nepřirazené mohou náležet peptidu vzniklému prostřednictvím síťovacího činidla. Jejich přítomnost ve spektru za daných podmínek je třeba ověřit a v případě pozitivního výsledku se dalším postupem (LC-MS/MS analýza) pokusit nalézt místo vazby.

Obdobným způsobem se postupuje také při analýze směsi proteinů (např. studium interakce).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Izolace cytochromu P450 2B4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>

Izolaci a postupnou purifikaci enzymů MFO systému znázorňuje schéma na Obr. 19. Jednotlivé separační kroky jsou detailně popsány v následujících kapitolách.



Obr. 19 – Schéma izolace králičího CYP 2B4, NADPH:CYP-reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>

#### **4.1.1. Izolace mikrosomální frakce**

Játra získaná z modelového organismu králíka domácího, premedikovaného fenobarbitalem, byla vložena do 150 ml předem zváženého ledově vychlazeného pufru PR1, a z nárůstu hmotnosti byla diferenčně určena jejich hmotnost (120 g). Další postup byl prováděn v chlazené místnosti (6°C) a na ledu.

Játra byla nastříhána a promyta puftrem PR1. Ve 300 ml PR1 byla nastříhaná játra postupně homogenizována v homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema. Získaný homogenát byl filtrován přes složenou gázu a 10 min centrifugován při 600 x g na centrifuze Janetzki K-23 (výkyvný rotor 4 x 70 ml, 2000 RPM). Sediment byl rehomogenizován v 80 ml pufru PR1. Homogenát byl opět filtrován přes gázu a centrifugován na centrifuze Janetzki K-23 za výše uvedených podmínek.

Spojené supernatanty byly centrifugovány 20 min při 15000 x g na centrifuze Janetzki K-24 (úhlový rotor 6 x 35 ml, 13000 RPM). Výsledný supernatant byl centrifugován 60 min při 105000 x g na ultracentrifuze Beckman L07 (úhlový rotor Ti70, 8 x 25 ml, 37000 RPM). Supernatant obsahující cytosolární enzymy byl odstraněn a sediment byl resuspendován v homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema ve 170 ml pufru PR2.

Resuspendovaná peleta byla znovu 60 min centrifugována při 105000 x g na ultracentrifuze Beckman L07 (úhlový rotor Ti70, 8 x 25 ml, 37000 RPM), supernatant byl odstraněn, a sediment resuspendován v 50 ml pufru PR3. Finální mikrosomální frakce o objemu 57 ml byla zmrazena ve směsi suchého ledu s ethanolem a poté uchována v -80°C.

Koncentrace cytochromu P450 v mikrosomální frakci činila 150  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , což odpovídá celkovému látkovému množství 8500 nmol. Aktivita reduktasy měla hodnotu 6,87  $\mu\text{mol cytc. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ , v celém objemu 385  $\mu\text{mol cytc. min}^{-1}$ . Obsah bílkoviny stanovený metodou BCA byl 40 mg/ml.

#### **4.1.2. Solubilizace**

Mikrosomální frakce byla rozmrazena a rehomogenizována v pufru PR4, kterým byla následně naředěna na objem 228 ml, koncentrace proteinu tedy odpovídala 10 mg/ml. Roztok byl míchán na ledu pod atmosférou dusíku, a postupně k němu bylo přidáno: 3,42 ml zásobního roztoku protaminsulfátu (25 mg/ml), 4 tablety inhibitoru proteas (Complete Inhibitor), 22,8 ml 10 % cholátu sodného a 22,8 ml 10 % emulgenu E-911. Detergenty byly přikapávány rychlostí 1 kapka/3 sec, jejich finální koncentrace v solubilizátu odpo-

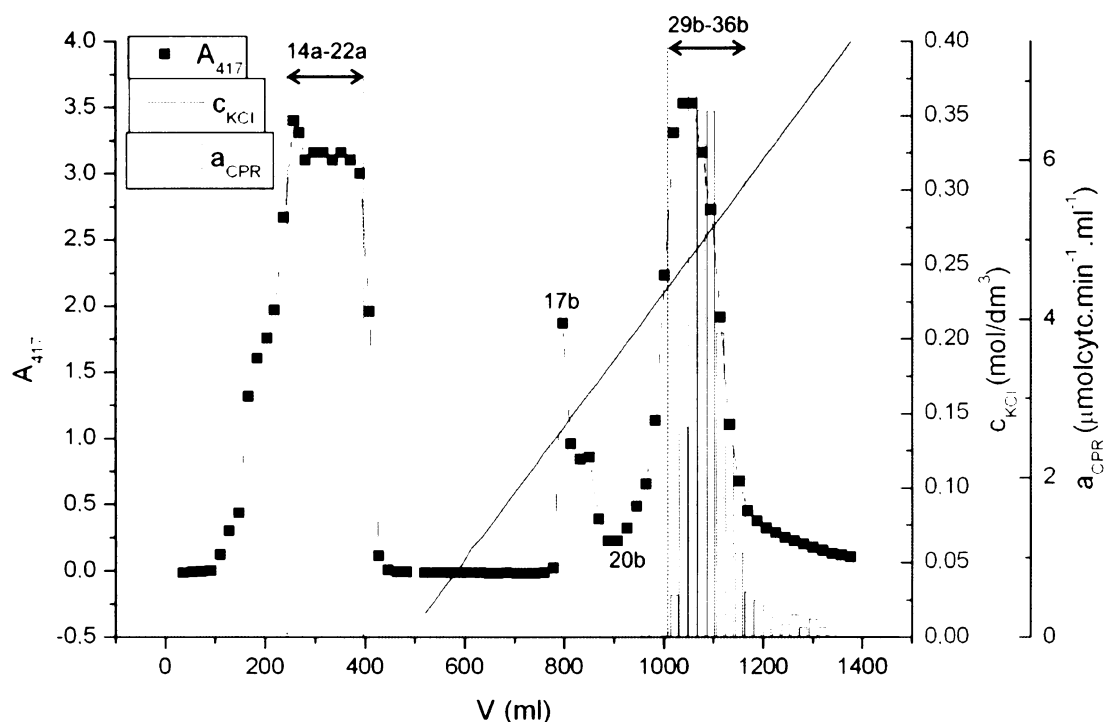
vídala 1 mg detergentu na 1 mg proteinu. Po přidání všech látek byl roztok ještě 20 min míchán pod atmosférou dusíku.

Solubilizát byl centrifugován 65 min při 105000 x g na ultracentrifuze Beckman L07 (úhlový rotor Ti70, 8 x 25 ml, 37000 RPM). Supernatant, získaný ultracentrifugací solubilizátu o objemu 272 ml, obsahoval cytochrom P450 o koncentraci 34  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , tedy přibližně 9000 nmol CYP. Aktivita NADPH:CYP reductasy byla 1,4  $\mu\text{mol cytc.}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ , celkově 380,8  $\mu\text{mol cytc.}\cdot\text{min}^{-1}$ . Supernatant solubilizátu byl nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (kap. 4.1.3.).

#### **4.1.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 1**

Na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (2,5 x 30 cm, 150 ml nosiče) ekvilibrovanou pufrům PR5 byl pomocí peristaltické pumpy rychlostí 1 ml/min nanesen supernatant solubilizátu. Kolona byla promyta 500 ml pufru PR5 s přidavkem emulgenu E-911 takovým, aby jeho finální koncentrace činila 0,4 % (w/v).

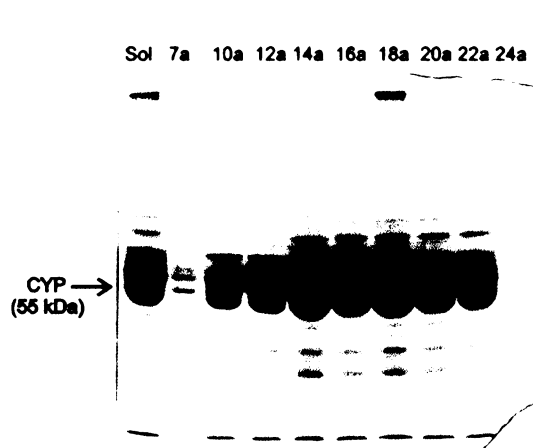
Při nanášení a promývání kolonou protékala směs záporně nabitých proteinů, která obsahovala i CYP 2B4. V jímaných frakcích o objemu ~18 ml byla měřena  $A_{417}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Po jejím poklesu na nulovou hodnotu byly navázané proteiny včetně NADPH:CYP reductasy a cytochromu  $b_5$  eluovány lineárním gradientem 2 x 400 ml 0 – 0,4 mol/dm<sup>3</sup> KCl v pufru PR5. Během eluce byly sbírány frakce o objemu ~18 ml, ve kterých byla sledována aktivita reductasy a  $A_{413}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Průběh chromatografie je patrný z grafu (Obr. 20, následující strana).



Obr. 20 – Chromatografie mikrosomálních proteinů na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

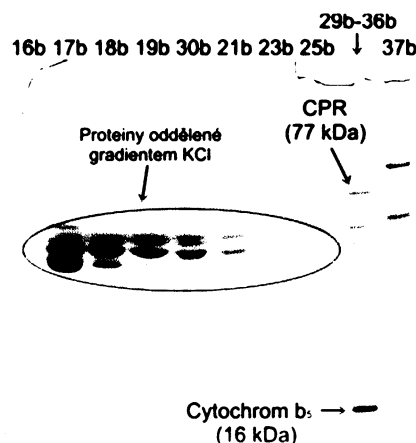
Čistota frakcí z okolí maxima  $A_{417}$  byla kontrolována SDS-elektroforézou (Obr. 21, následující strana), na jejímž základě byly spojeny frakce 14a až 22a nanášecího píku, které byly zahuštěny na membráně Amicon PM30 na objem 30 ml. Zahuštěné frakce byly dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru PR5. Po stanovení CYP ( $c = 120 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ,  $n = 3600 \text{ nmol}$ ) byl dialyzát rozdělen a nanesen na po částech na dvě kolony hydroxylapatitu 1a a 1b (kap. 4.1.5.1., 4.1.5.3.).

Z gradientu KCl byly spojeny frakce 29b až 36b, které vykazovaly minimálně 10 % maxima aktivity NADPH:CYP reductasy. Tyto frakce byly zahuštěny na membráně Amicon PM30 na 34 ml. Poté byly dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru  $P_{\text{CPR}1}$ . Dialyzát o objemu 45 ml byl po stanovení aktivity CPR ( $a_{\text{CPR}} = 11,2 \mu\text{mol cytc} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ , celk.  $a_{\text{CPR}} = 338 \mu\text{mol} \cdot \text{cytc} \cdot \text{min}^{-1}$ ) a po úpravě pH pomocí  $1 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ KH}_2\text{PO}_4$  na hodnotu 7,0 nanesen na ekvilibrovanou kolonu 2', 5' -ADP-Sepharosy 4B (kap. 4.1.4.1.). Z SDS elektroforézy (Obr. 22, následující strana) je patrné, že gradientem iontové síly byly odděleny proteiny obsažené ve frakcích 16b-25b a že spojené frakce 29b-36b obsahovaly vedle CPR také cytochrom  $b_5$ , který byl oddělen dalším postupem.



**Obr. 21– SDS-PAGE frakcí nanášecího píku DEAE-Sepharosy CL6B**

Sol - supernatant solubilizátu nanášený na kolonu  
7a-24a - čísla frakcí  
šipka označuje proteinové proužky odpovídající molekulové hmotnosti okolo 55 kDa, mezi které se řadí i CYP 2B4 10 % PAGE, barvení: CBB R-250



**Obr. 22– SDS-PAGE frakcí gradientu DEAE-Sepharosy CL6B**

16b – 37b – čísla frakcí  
29b-36b – spojené frakce s nejvyšší aktivitou CPR  
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

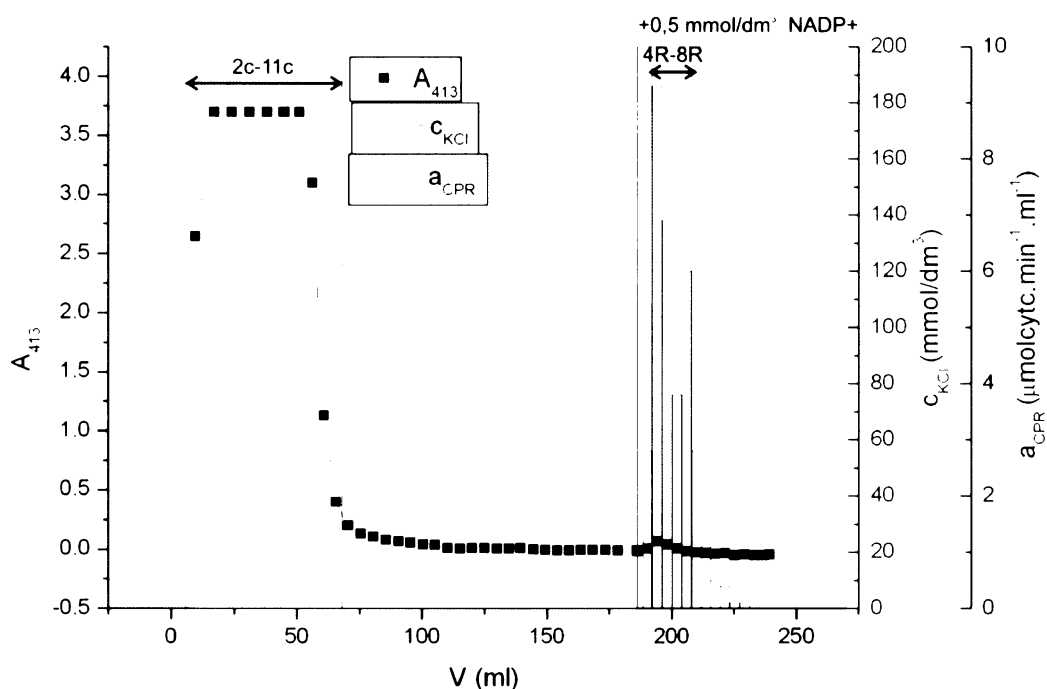
#### **4.1.4. Purifikace NADPH:CYP reduktasy a cytochtomu $b_5$**

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

NADPH:CYP reduktasa byla od ostatních proteinů získaných z gradientu DEAE-Sepharosy CL6B 1 (kap. 4.1.3.) oddělena na afinitním nosiči 2', 5' – ADP-Sepharosy.

Na kolonu o rozměrech 1 x 7 cm (5,5 ml nosiče) ekvilibrovanou pufrém  $P_{CPR2}$  byly naneseny spojené a dialyzované frakce elučního píku DEAE-Sepharosy CL6B 1 obsahující CPR a cytochrom  $b_5$ .

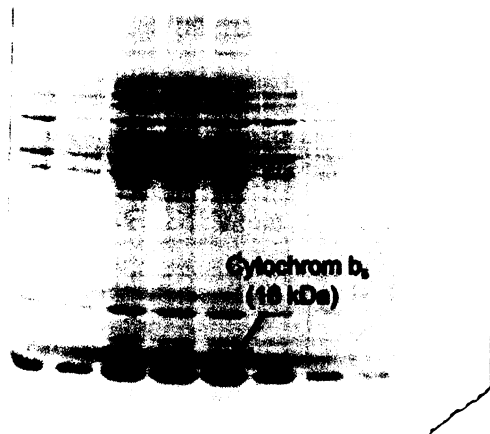
Kolona byla promyta ~180 ml pufru  $P_{CPR2}$ , během promývání byly sbírány frakce o objemu ~5 ml, ve kterých byla měřena  $A_{413}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). V těchto frakcích byl vedle ostatních proteinů neinteragujících s nosičem obsažen i cytochrom  $b_5$ , což se projevilo výrazným zvýšením  $A_{413}$ , jak je patrné z grafu na Obr. 23 (následující strana).



Obr. 23 – Chromatografie cytochromu  $b_5$  a CPR na koloně 2', 5' – ADP-Sepharosy 4B

Přítomnost cytochromu  $b_5$  byla posléze kontrolována SDS-elektroforézou (Obr. 24), nejvíce jej bylo obsaženo ve frakcích 2c až 11c, které byly spojeny, zahuštěny na membráně Amicon PM30 na objem 23 ml a dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru bP1. Preparát byl dále purifikován na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2 (kap. 4.1.4.2.).

13 2c 4c 6c 7c 10c 11c 12c 15c 17c



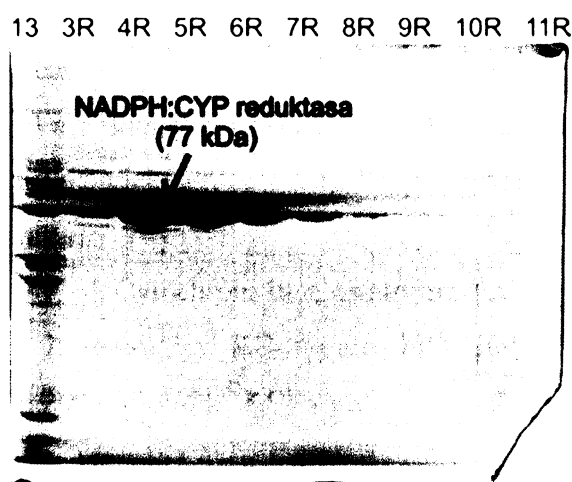
Obr. 24 – SDS-PAGE frakcí nanášecího piku 2', 5' – ADP-Sepharosy 4B

13 – spojené frakce z gradientu DEAE-Seph. nanášené na kolonu  
2c – 17c – čísla frakcí  
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Po poklesu  $A_{413}$  na nulovou hodnotu byla NADPH:CYP reduktasa eluována z kolony pufrém  $P_{CPR3}$ , obsahujícím  $0,2 \text{ mol/dm}^3$  KCl a  $0,5 \text{ mmol/dm}^3$   $\text{NADP}^+$ . V jímaných frak-



cích o objemu ~4ml byla sledována aktivita reduktasy a  $A_{417}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm), (Obr. 23, str. 48). Na základě naměřených aktivit CPR ve frakcích elučního píku a SDS elektroforézy (Obr. 25) byly spojeny frakce 4R až 8R s nejvyšším obsahem CPR. Spojené frakce byly zahuštěny na membráně Amicon PM30 na objem 3,6 ml a dialyzovány přes noc proti 2000 ml TEA pufru. Po dialýze byla stanovena aktivita CPR ( $a_{\text{CPR}} = 28 \mu\text{mol cytc. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a také její koncentrace ( $c_{\text{CPR}} = 10,7 \mu\text{mol/dm}^3$ ). V dalším kroku byl z preparátu odstraněn detergent adsorpcí na silikagel postupem popsáným v kap. 3.2.3.5. Finální preparát byl v malých alikvotech (~400  $\mu\text{l}$ ) zmrazen ve směsi suchého ledu s ethanolem a uchováván v  $-80^\circ\text{C}$ .



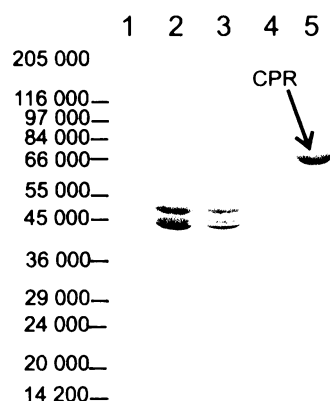
Obr. 25 – SDS-PAGE frakcí elučního píku 2', 5' – ADP-Sepharosy 4B  
13 – spojené frakce nanášené na kolonu  
3R-11R – čísla frakcí  
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Izolací byl získán preparát CPR s celkovou aktivitou  $67 \mu\text{mol cytc. min}^{-1}$ . Postupná purifikace je patrná z Tab. 1 a z SDS elektroforézy (Obr. 26, následující strana).

Tab. 1 – Bilanční tabulka izolace NADPH:CYP reduktasy

vzorek	V (ml)	$c_p$ (mg/ml)	$a_{\text{CPR}}$ ( $\mu\text{mol cytc. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	specif. $a_{\text{CPR}}$ ( $\mu\text{mol cytc. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	celk. $a_{\text{CPR}}$ ( $\mu\text{mol cytc. min}^{-1}$ )	výtěžek (%)	$C_{\text{CPR}}$ ( $\mu\text{mol/dm}^3$ )
MS frakce	57	40	6,87	0,172	392	100	N
solubilizát	272	14,1	1,4	0,099	388	99	N
DEAE-Seph.	34	9	11,2	1,24	338	86	N
2',5'-ADP-Seph.	2,4	3,3	28	8,48	67,2	17	10,7

**Legenda:** V – objem (ml);  $c_p$  – koncentrace proteinu (mg/ml),  $a_{\text{CPR}}$  – aktivita reduktasy ( $\mu\text{mol cytc. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), specif.  $a_{\text{CPR}}$  – specifická aktivita reduktasy ( $\mu\text{mol cytc. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), celk.  $a_{\text{CPR}}$  – celková aktivita reduktasy ( $\mu\text{mol cytc. min}^{-1}$ ), N-nestavená hodnota

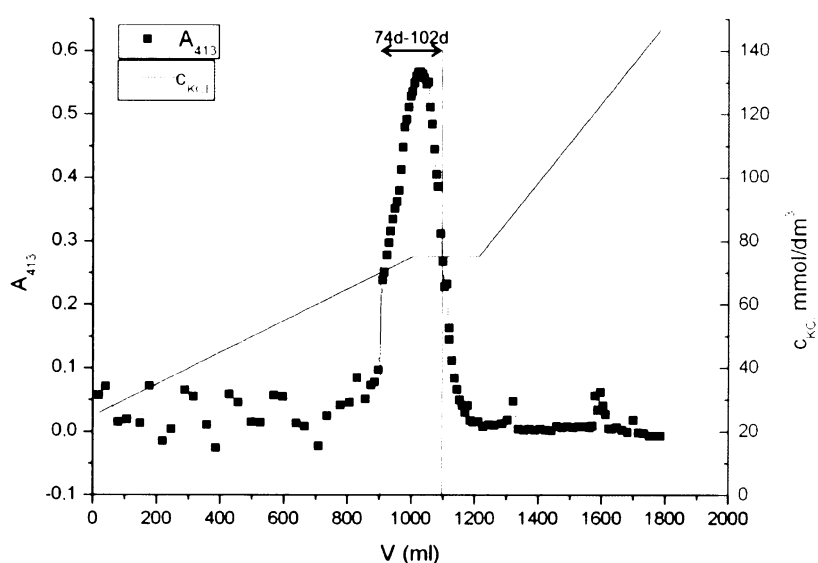


**Obr. 26 - SDS-PAGE vzorků jednotlivých fází purifikace NADPH:CYP reduktasy**  
 1 – standard (Wide range, Sigma)  
 2 – mikrosomální frakce  
 3 – solubilizát  
 4 – DEAE-Sepharosa – gradient (frakce 29b-36b)  
 5 – 2',5'-ADP-Sepharosa – CPR (frakce 4R-8R)  
 10 % PAGE, barvení: CBB R-250

#### 4.1.4.2. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2

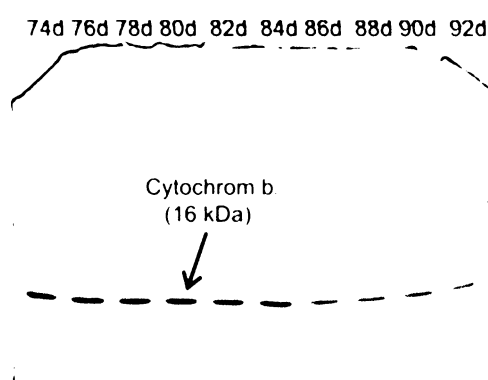
Spojené a dialyzované frakce cytochromu  $b_5$  z nanášecího píku 2', 5' – ADP-Sepharosy 4B (kap. 4.1.4.1.) byly naneseny na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (2,5 x 30 cm, 150 ml nosiče) ekvilibrovanou pufrům bP2. Kolona byla promyta ~500 ml pufru bP3 a v jímaných frakcích byla sledována  $A_{413}$  (spektrofotometr MOM, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Při promývání byly vymyty proteiny, které se nevázaly na kolonu.

Cytochrom  $b_5$  a ostatní navázané proteiny byly eluovány gradientem 2 x 500 ml 25–75 mmol/dm<sup>3</sup> KCl v pufru bP3, 300 ml 75 mmol/dm<sup>3</sup> KCl v pufru bP3, a 2 x 500 ml 75–200 mmol/dm<sup>3</sup> KCl v pufru bP3, jak znázorňuje graf na Obr. 27. V získaných frakcích byla sledována  $A_{413}$ .

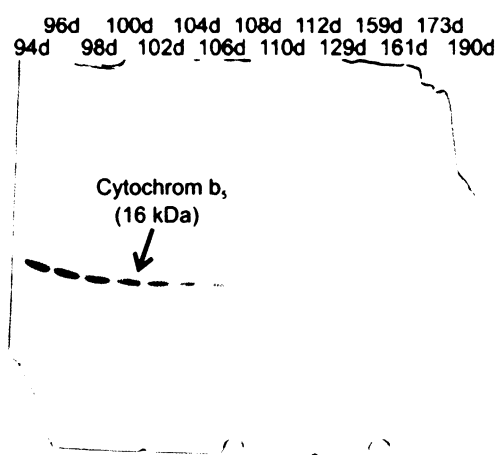


**Obr. 27 – Chromatografie cytochromu  $b_5$  na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2**

Čistota frakcí s nejvyššími hodnotami absorpance byla ověřena pomocí SDS-PAGE (Obr. 28, Obr. 29, uvedeny jsou pouze výsledky elektroforéz frakcí obsahujících cytochrom  $b_5$ ). Jak je vidět, cytochrom  $b_5$  se dobře oddělil od ostatních proteinů. Proužek proteinu v horní části gelu, který je přítomen ve všech vzorcích v téměř neměnném množství, pravděpodobně náleží dimerní formě cytochromu  $b_5$ , jistotu by poskytla MALDI-TOF MS analýza. Frakce 74d až 102d byly spojeny, zahuštěny na membráně Amicon PM5 na 12 ml a dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru bP3. Dialyzát byl nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B 3 (kap. 4.1.4.3.)



**Obr. 28 – SDS-PAGE frakcí gradientu DEAE-Sepharosy CL6B 2**  
74d-92d – čísla frakcí  
12 % PAGE, barvení: CBB R-250

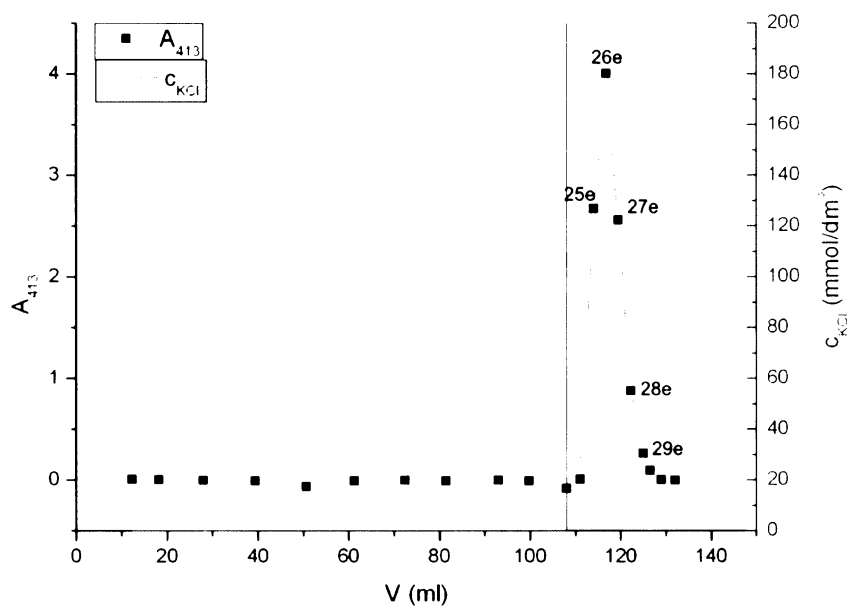


**Obr. 29– SDS-PAGE frakcí gradientu DEAE-Sepharosy CL6B 2**  
94d-190d – čísla frakcí  
12 % PAGE, barvení: CBB R-250

#### 4.1.4.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 3

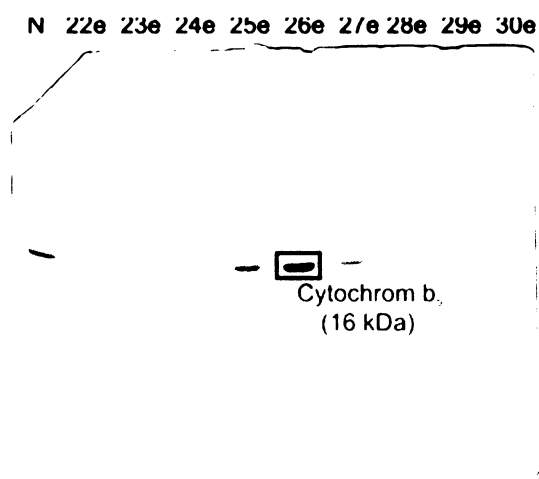
K převedení cytochromu  $b_5$  do pufru s nižším obsahem detergentu byla použita chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 3. Na kolonu o rozměrech 1,6 x 12 cm (24 ml nosiče), ekvilibrovanou pufrům bP3, byly nanесeny spojené, zahuštěné a dialyzované frakce gradientu DEAE-Sepharosy CL6B 2 (kap. 4.1.4.2.). Kolona byla promyta 100 ml pufru bP4, v jímaných frakcích byla měřena  $A_{413}$  (spektrofotometr Specord M40, 1ml křemenné květy o optické dráze 1 cm).

Navázaný cytochrom  $b_5$  byl z nosiče eluován isokratickým zvýšením iontové síly pomocí pufru bP5, který obsahoval  $0,2 \text{ mol/dm}^3$  KCl (Obr. 30, následující strana). V jímaných frakcích o objemu  $\sim 3$  ml byla nadále sledována  $A_{413}$ .



Obr. 30 – Chromatografie cytochromu  $b_5$  na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 3

Čistota proteinu ve frakcích s nejvyššími hodnotami absorbance byla ověřena SDS-elektroforézou (Obr. 31). Frakce 25e až 29e byly spojeny a dialyzovány přes noc proti 2000 ml TEA pufru. Dialyzát byl zahuštěn na membráně Amicon PM10 na objem 3,5 ml. Ze zahuštěného preparátu byl odstraněn detergent pomocí silikagelu postupem popsaným v kap. 3.2.3.5.). Finální preparát byl v malých alikvotech ( $\sim 400 \mu\text{l}$ ) zmrazen v kapalném dusíku a uskladněn v  $-80^\circ\text{C}$



Obr. 31 – SDS-PAGE frakcí elučního píku DEAE-Sepharosy CL6B 3

N – spojené frakce nanášené na kolonu  
22e -30e – čísla frakcí  
označený proteinový proužek byl identifikován pomocí MALDI-TOF MS  
12 % PAGE, barvení: CBB R-250

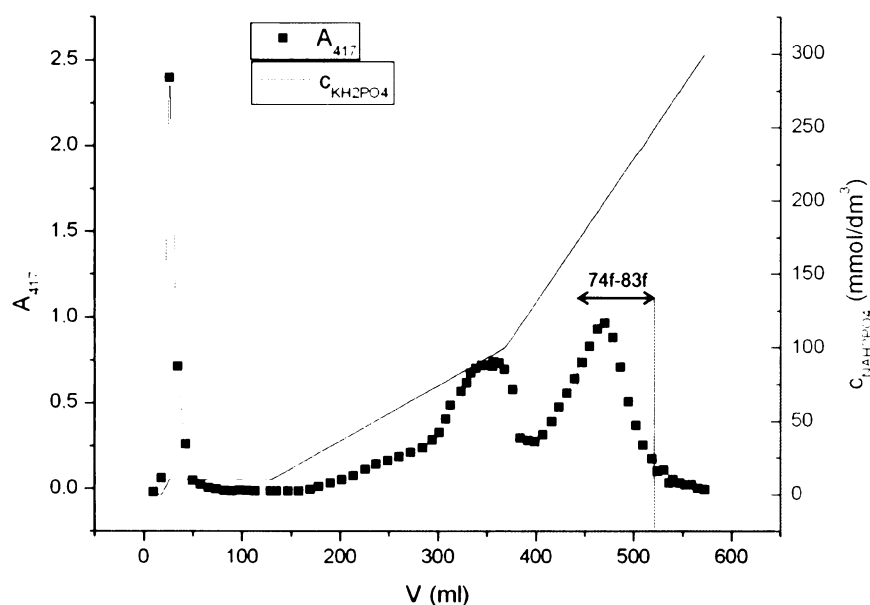
Finální koncentrace cytochromu  $b_5$  činila podle spektrofotometrického stanovení  $40 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , celkově bylo získáno 130 nmol elektroforeticky čistého preparátu. Koncent-

race proteinu stanovená metodou BCA se rovnala 1,79 mg/ml. Produkt byl identifikován metodou MALDI-TOF MS (viz Příloha 1).

#### 4.1.5. Purifikace cytochromu P450 2B4

##### 4.1.5.1. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu 1a (HAP 1a)

Na kolonu HAP 1a (1,8 x 15 cm, 25 ml nosiče) ekvilibrovanou pufrům PR5 byla nanesena rychlostí 12 ml/hod polovina spojených, zahuštěných a dialyzovaných frakcí promývacího píku DEAE-Sepharosy 1 obsahujících CYP 2B4 (kap. 4.1.3.). Po nanesení byla kolona promyta ~130 ml pufru PR6, v jímaných frakcích byla měřena  $A_{417}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Z elučního profilu HAP1a (Obr.32) je patrné, že se část CYP na nosič nenavázala a byla jímana již ve frakcích nanášecího píku. Tento jev byl zřejmě způsobený omezenou kapacitou nosiče.

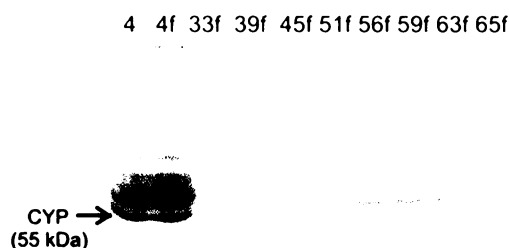


Obr.32 – Chromatografie cytochromu P450 na koloně hydroxylapatitu 1a

Navázaný CYP byl z nosiče eluován lineárním gradientem 2 x 150 ml pufrů PR7A-PR8A (10-100 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), a poté lineárním gradientem 2 x 100 ml pufrů PR8A-PR8C (100-300 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Ve frakcích o objemu 5-6 ml, jímaných v průběhu gradientu, byla sledována  $A_{417}$ , obsah proteinu byl ve frakcích vykazujících nejvyšší absorbanci zjišťován pomocí SDS-PAGE (Obr. 33, Obr. 34, následující strana).

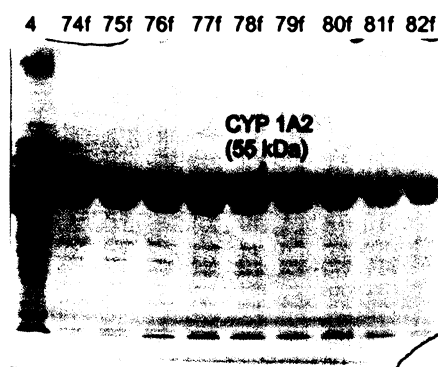
Jak je vidět na získaných gelech, nejvíce načištěný CYP byl obsažen ve frakcích 74f až 82f elučního píku. Tyto frakce byly spojeny, zahuštěny na membráně Amicon PM30 na objem 13,2 ml, dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru PR6 a naneseny na kolonu hydroxylapatitu 2a (kap. 4.1.5.2.). Koncentrace CYP ve spojených frakcích činila  $22,5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , což odpovídalo látkovému množství 270 nmol.

Na základě chromatogramu a výsledků SDS-elektroforéz bylo předpokládáno, že v prvním elučním píku byly pozvolnějším gradientem uvolněny kontaminující proteiny a částečně také CYP 2B4, a následným strmým gradientem většina navázaného CYP 2B4. Bohužel, pozdější identifikací pomocí MALDI-MS (viz Příloha 1) bylo zjištěno, že se jedná o isoformu 1A2, jejíž přítomnost nebyla po premedikaci fenobarbitalem očekávána. CYP 2B4 se tedy patrně nacházel pouze v kontaminovaných frakcích prvního elučního maxima (Obr. 33).



**Obr. 33 – SDS-PAGE frakcí gradientu HAP 1a**

4 – spojené frakce nanášené na kolonu  
4f – 65f – čísla frakcí  
šipka označuje proteinové proužky odpovídající molekulové hmotnosti okolo 55 kDa, mezi které se řadí i CYP 2B4  
10 % PAGE, barvení: CBB R-250



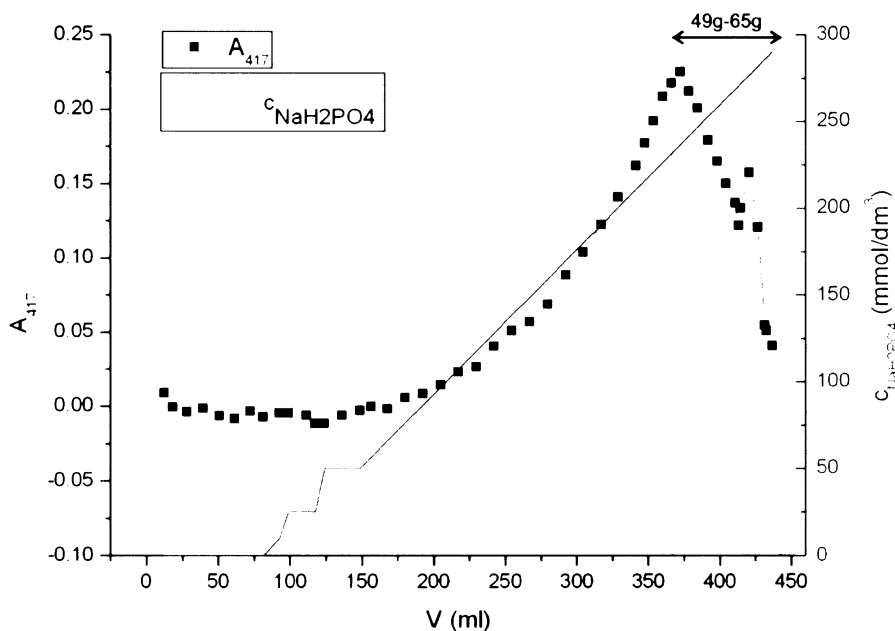
**Obr. 34 - SDS-PAGE frakcí gradientu HAP 1a**

4 – spojené frakce nanášené na kolonu  
74f – 82f – čísla frakcí  
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

#### 4.1.5.2. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu 2a (HAP 2a)

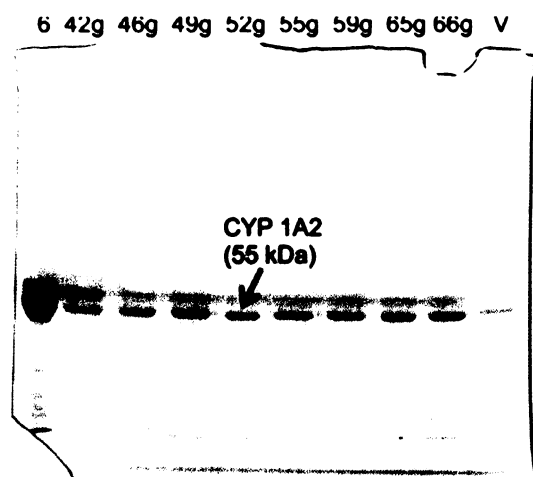
Po purifikaci pomocí HAP1a byl preparát CYP přečištěn na další koloně hydroxylapatitu. Na kolonu o rozměrech 1 x 10 cm (8 ml nosiče), ekvilibrovanou puftrem PR6, byly rychlostí 12 ml/hod naneseny spojené, zahuštěné a dialyzované frakce z gradientu HAP 1a (kap. 4.1.5.1.). Kolona byla promyta puftrem se stoupající iontovou silou: 20 ml pufru PR7A, 20 ml pufru PR 7B a 30 ml pufru PR7C (složení viz kap. 3.1.2.). Za daných podmínek se z kolony neuvolnily žádné hemoproteiny.

Navázaný CYP byl eluován gradientem 2 x 150 ml pufrů PR7C-PR8C ( $50\text{-}300\text{ mmol/dm}^3\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ), ve sbíraných frakcích o objemu  $\sim 6\text{ ml}$  byla sledována  $A_{417}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Eluční profil, poukazující na částečnou separaci proteinů, je patrný z grafu na Obr. 35.



Obr. 35 - Chromatografie cytochromu P450 na koloně hydroxylapatitu 2a

Čistota frakcí elučního píku vykazujících nejvyšší hodnoty  $A_{417}$  byla ověřena SDS-elektroforézou (Obr. 36, následující strana), na jejímž základě byly spojeny frakce 49g až 65g. Spojené frakce byly zahuštěny a dialyzovány přes noc proti 2000 ml TEA pufru. Zahuštění a dialýze byla podrobena také frakce označená na elektroforéze „V“, která musela být z nosiče uvolněna vsádkově pomocí pufru PR8 poté, co v koloně po eluci 365-tého ml došlo ke krystalizaci dihydrofosforečnanu sodného.



Obr. 36 - SDS-PAGE frakcí gradientu HAP 2a

6 – spojené frakce nanášené na kolonu

42g – 66g – čísla frakcí

V – vsádkově oddělená frakce

10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Finální preparát vsádkově odděleného CYP o objemu 1,75 ml a finální preparát získaný spojením frakcí 49g-62g o objemu 5 ml byly v malých alikvotech (~400  $\mu$ l) zmrazeny ve směsi suchého ledu s ethanolem a uchovávány v  $-80^{\circ}\text{C}$ . Celkem bylo získáno 45 nmol CYP 1A2 o koncentraci  $7,4 \text{ mmol/dm}^3$ . Celková bilance izolace CYP 1A2 je shrnuta v Tab. 2, postupná purifikace je zaznamenána i na elektroforeogramu (Obr. 41, str. 59)

Tab. 2 – Bilanční tabulka izolace CYP 1A2 (výsledky analytických stanovení, prováděných ve vzorcích po každém purifikačním kroku)

vzorek	V (ml)	$c_p$ (mg/ml)	$c_{\text{CYP}}$ ( $\mu\text{mol/dm}^3$ )	$n_{\text{CYP}}$ (nmol)	spec.obsah CYP (nmol/mg)	výtěžek (%)
MS frakce	57	40	151,4	8600	3,8	100
solubilizát	272	14,1	34	9000	2,4	105
DEAE-Seph.	30	31,2	120	3600	3,8	42
HAP1a	12	4,7	22,5	270	4,8	3,1
HAP2a	6,2	2,4	7,4	45	3,1	0,52

**Legenda:** V - objem (ml);  $c_p$  - koncentrace proteinu (mg/ml),  $c_{\text{CYP}}$  - molární koncentrace CYP ( $\mu\text{mol/dm}^3$ ),  $n_{\text{CYP}}$  - celkový obsah CYP (nmol), spec.obsah CYP – specifický obsah CYP (nmol/mg)

#### 4.1.5.3. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu 1b (HAP 1b)

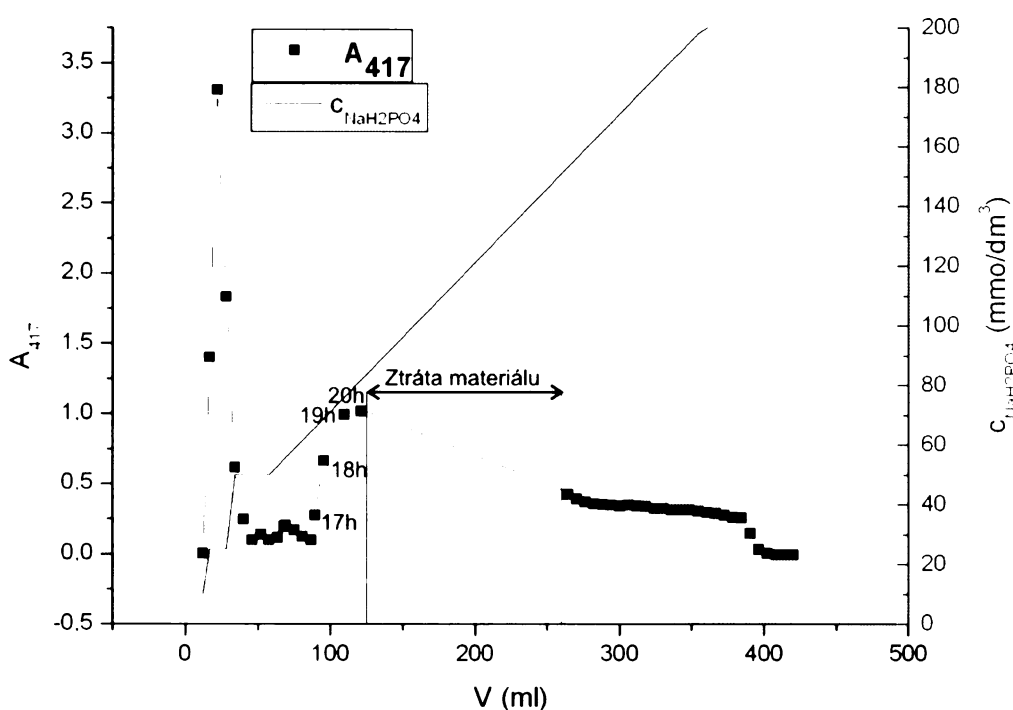
Na kolonu HAP 1b (1,8 x 15 cm, 40 ml nosiče), ekvilibrovanou pufrém PR5, byla nanášena druhá polovina spojených, zahuštěných a dialyzovaných frakcí (obsahujících CYP) z promývacího píku DEAE-Sepharosy CL6B 1 (kap. 4.1.3.) rychlostí 12 ml/hod. Poté byla kolona stejnou rychlostí postupně promyta pufrými se stoupající iontovou silou: 12 ml pufru PR7A, 15 ml pufru PR7B a 20 ml pufru PR7C (složení viz kap. 3.1.2.).



V jímaných frakcích byla sledována  $A_{417}$  (spektrofotometr Specord M42, režim  $\lambda$ -STAT, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm).

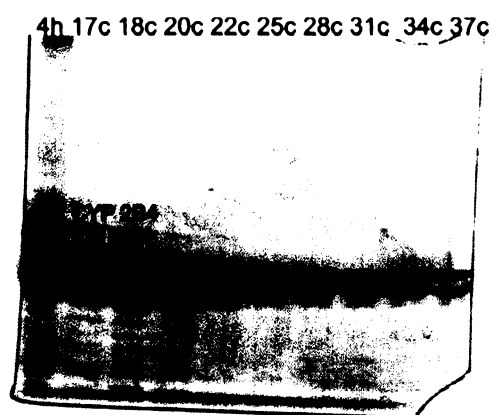
CYP 2B4 navázaný na koloně byl eluován lineárním gradientem 2 x 150 ml pufrů PR7C-PR8B ( $50\text{-}200 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ), počáteční koncentrace fosfátu a strmost gradientu byly zvoleny vyšší než pro HAP1a, protože při použití mírného gradientu byly proteiny eluovány velmi zvolna (Obr.32, str. 52).

Kvůli zastavení sběrače frakcí během noci došlo ke ztrátě asi 130 ml materiálu (Obr.37). Bohužel srovnání s výsledky chromatografie HAP1a a následná MALDI-TOF analýza (viz Příloha 1) naznačuje, že právě tyto frakce pravděpodobně obsahovaly eluční vrchol CYP 2B4.



Obr.37 - Chromatografie cytochromu P450 na koloně hydroxylapatitu 1b

Ve sbíraných frakcích o objemu  $\sim 6$  ml byla sledována  $A_{417}$ . Čistota frakcí s nejvyššími absorbancemi byla kontrolována na SDS-PAGE (Obr. 38, následující strana). Podle výsledků elektroforézy byly spojeny frakce 17h až 20h, nabohacené CYP 2B4, které byly zahuštěny na membráně Amicon PM30 a dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru PR6. Dialyzát o výsledném objemu 10,5 ml byl nanesen na kolonu hydroxylapatitu 2b (kap. 4.1.5.4.).

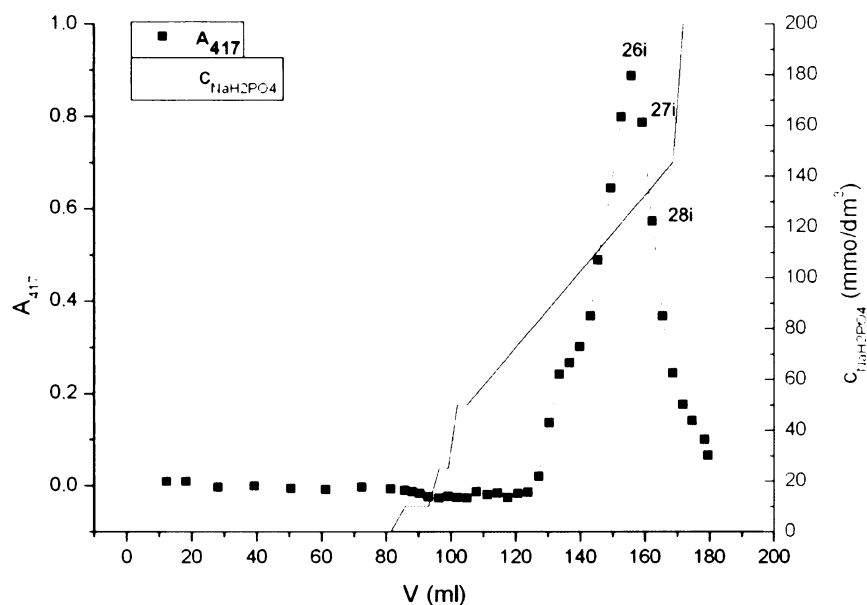


Obr. 38 - SDS-PAGE frakcí gradientu HAP 1b  
4h – 37h – čísla frakcí  
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

#### 4.1.5.4. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu 2b (HAP 2b)

Na kolonu HAP 2b (1 x 10 cm, 8 ml nosiče), ekvilibrovanou pufrům PR6, byly rychlostí 4 ml/hod naneseny dialyzované frakce elučního píku HAP 1b. Kolona byla promyta pufrů se stoupající iontovou silou: 10 ml PR7A, 20 ml PR7B a 5 ml PR7C (složení viz kap. 3.1.2.).

Po promytí byl z kolony lineárním gradientem 2 x 50 ml pufrů PR7C-PR8B (50-200 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eluován navázaný cytochrom P450. V jímáných frakcích o objemu ~3 ml byla měřena A<sub>417</sub> (spektrofotometr Specord M42, režim λ-STAT, 1ml křemenné květy o optické dráze 1 cm) (Obr. 39).



Obr. 39 - Chromatografie cytochromu P450 na koloně hydroxylapatitu 2b

Čistota frakcí s nejvyššími hodnotami absorbance byla zjišťována pomocí SDS-PAGE (Obr. 40). Na základě elektroforézy byly spojeny frakce 26i až 28i nabohacené cytochromem P450, které byly zahuštěny na membráně Amicon PM30 na 8,6 ml, dialyzovány přes noc proti 2000 ml TEA pufru a zahuštěny na membráně Amicon PM30 na objem 1,25 ml.

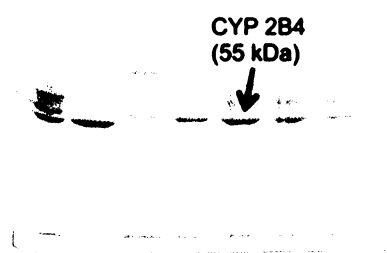
31 18i 22i 24i 26i 27i 28i 29i 30i 32i

Obr. 40 - SDS-PAGE frakcí gradientu HAP2b

31 – spojené frakce nanášené na kolonu

18i–32i – čísla frakcí

10 % PAGE, barvení: CBB R-250

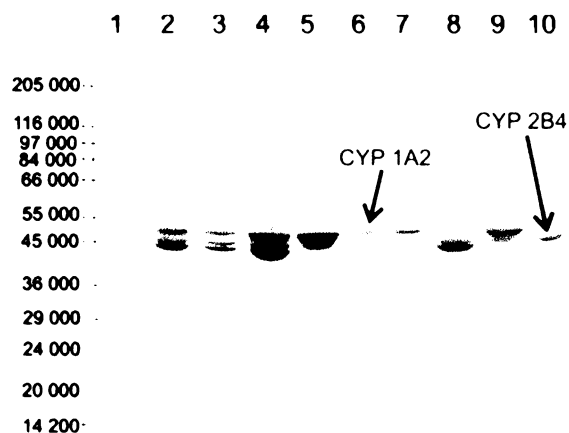


Finální preparát, obsahující 30 nmol enzymu o koncentraci  $26,8 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , byl v malých alikvotech ( $\sim 400 \mu\text{l}$ ) zmrazen ve směsi suchého ledu s ethanolem a uskladněn v  $-80^\circ\text{C}$ . Identifikaci pomocí MALDI-TOF MS (viz Příloha 1) bylo prokázáno, že se jedná o isoformu 2B4. Celková bilance izolace CYP 2B4 je shrnuta v Tab. 3. Postupná purifikace je také patrná z gelu získaného separací vzorků pomocí SDS-PAGE (Obr. 41, následující strana).

Tab. 3 – Bilanční tabulka izolace CYP 2B4 (výsledky analytických stanovení, prováděných ve vzorcích po každém purifikačním kroku)

vzorek	V (ml)	$c_p$ (mg/ml)	$c_{\text{CYP}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ )	$n_{\text{CYP}}$ (nmol)	spec.obsah CYP (nmol/mg)	výtěžek (%)
MS frakce	57	40	151,4	8600	3,8	100
solubilizát	272	14,1	34	9000	2,4	105
DEAE-Seph.	30	31,2	120	3600	3,8	42
HAP1b	10,5	5,84	18,8	198	3,2	2,3
HAP2b	1,25	6,85	26,8	33,5	3,9	0,4

Legenda: V – objem (ml);  $c_p$  – koncentrace proteinu (mg/ml);  $c_{\text{CYP}}$  – molární koncentrace CYP ( $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ );  $n_{\text{CYP}}$  – celkový obsah CYP (nmol); spec.obsah CYP – specifický obsah CYP (nmol/mg)



**Obr. 41 – SDS-PAGE vzorků jednotlivých kroků purifikace CYP 1A2 a CYP 2B4**

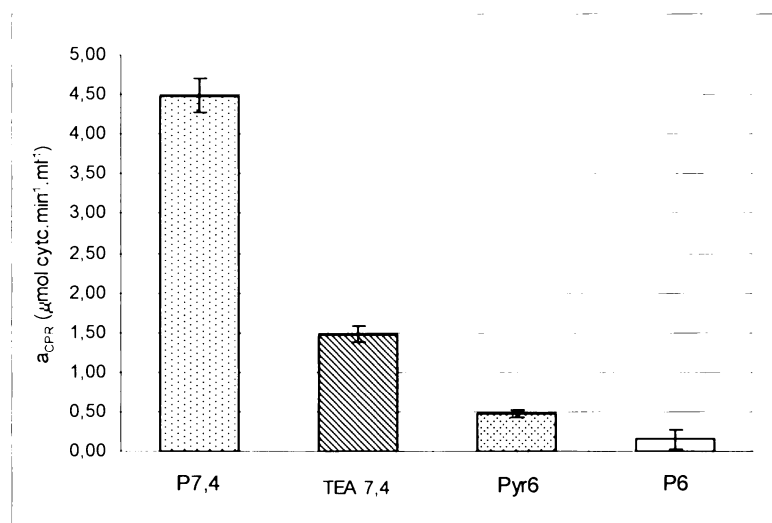
- 1 – standard (Wide range, Sigma)
  - 2 – mikrosomální frakce
  - 3 – solubilizát
  - 4 – DEAE-Sepharosa CL6B (frakce 14a-22a)
  - 5 – HAP 1a (frakce 74f-83f)
  - 6 – HAP 2a (frakce 49g-65g) – CYP 1A2
  - 7 – HAP 2a (frakce „V“) – CYP 1A2
  - 8 – HAP 1b (frakce 17h-20h)
  - 9 – HAP 1b (frakce 25h-34h)
  - 10 – HAP2b (frakce 26i-28i) – CYP 2B4
- 10 % PAGE, barvení: CBB R-250

## 4.2. Studium vlivu reakčního prostředí na aktivitu a interakci NADPH:CYP reductasy s cytochromem c

### 4.2.1. Ovlivnění aktivity NADPH:CYP reductasy složením a pH pufru

Protože jedním z cílů práce bylo studium interakce NADPH:CYP reductasy s CYP 2B4 pomocí síťovacích činidel, bylo nejprve studováno ovlivnění aktivity CPR v modelové reakci s cytochromem c pufrů a pH, které jsou kompatibilní s používanými síťovacími činidly a aktivitou studovaných enzymů.

Změny v aktivitě NADPH:CYP reductasy v jednotlivých pufrách, fosfátovém P7,4 (pH 7,4) a P6 (pH 6,0), triethylaminovém TEA7,4 (pH 7,4) a pyridinovém Pyr6 (pH 6,0) jsou patrné z grafu (Obr. 42). Hodnoty aktivit byly stanoveny vždy ze tří paralelních měření.



**Obr. 42 – Aktivita NADPH:CYP reductasy v závislosti na složení a pH pufru**

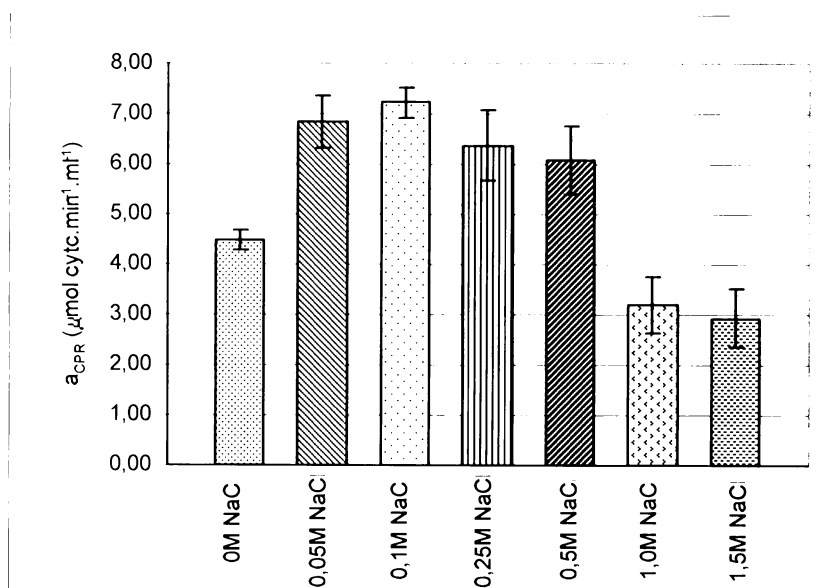
Nejvyšší aktivita byla naměřena v pufru P7,4, který se pro prováděné stanovení obvykle používá. V pufrch s hodnotou pH sníženou na 6,0 (P6 a Pyr6), došlo ve srovnání s P7,4 k výraznému poklesu aktivity CPR (viz Obr. 42). Protože pH prostředí ovlivňuje nabití aminokyselinových zbytků, můžeme na základě tohoto výsledku předpokládat, že při reakci hrají důležitou roli iontové interakce mezi proteiny.

Na aktivitě se negativně projevila také změna typu pufru (viz Obr. 42), složky triethylaminového i pyridinového pufru zřejmě nespécificky ovlivňují interakci redoxních partnerů.

#### **4.2.2. Ovlivnění aktivity NADPH:CYP reduktasy iontovou silou**

Jelikož vliv iontové síly na interakci studovaných proteinů je znám<sup>16</sup>, bylo třeba optimalizovat podmínky pro rekonstituovaný systém testováním různých koncentrací soli.

Stanovení aktivity bylo prováděno ve fosfátovém pufru P7,4 (pH 7,4), výsledky uvedené v grafu (Obr. 43) jsou průměrem třech paralelních měření.



**Obr. 43 – Aktivita NADPH:CYP reduktasy v závislosti na molární koncentraci NaCl**

Aktivita CPR roste do koncentrace NaCl 0,1 mol/dm<sup>3</sup>, přítomnost soli pravděpodobně lépe simuluje prostředí, ve kterém se enzym nachází *in vivo*. Při dalším zvyšování koncentrace NaCl dochází k poklesu aktivity, zřejmě potlačením iontové interakce CPR s reakčním partnerem, což je ve shodě s výsledky předchozí kapitoly (4.2.1.).

### 4.2.3. Ovlivnění aktivity NADPH:CYP reduktasy přítomností micel

Přestože je cytochrom c rozpustným proteinem a sledovaná NADPH:cytochrom c reduktasová aktivita může probíhat v roztoku, byl studován vliv přítomnosti membrány na aktivitu NADPH:CYP reduktasy jako membránového enzymu v různých typech pufrů.

Stanovení aktivity reduktasy ukotvené v membráně bylo provedeno v pufrch P7,4, TEA7,4 a Pyr6. Výsledné hodnoty uvedené v tabulce (Tab. 4) jsou průměrem třech paralelních měření.

Tab. 4 - Srovnání aktivity reduktasy v roztoku a v přítomnosti membrány

Pufr	$a_{CPR}$ ( $\mu\text{mol cytc}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	
	$a_{CPR}$ v roztoku	$a_{CPR}$ v přítomnosti membrány
P7,4	$4,49 \pm 0,21$	$6,96 \pm 0,59$
TEA7,4	$1,48 \pm 0,10$	$2,83 \pm 0,49$
Pyr6	$0,47 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,11$

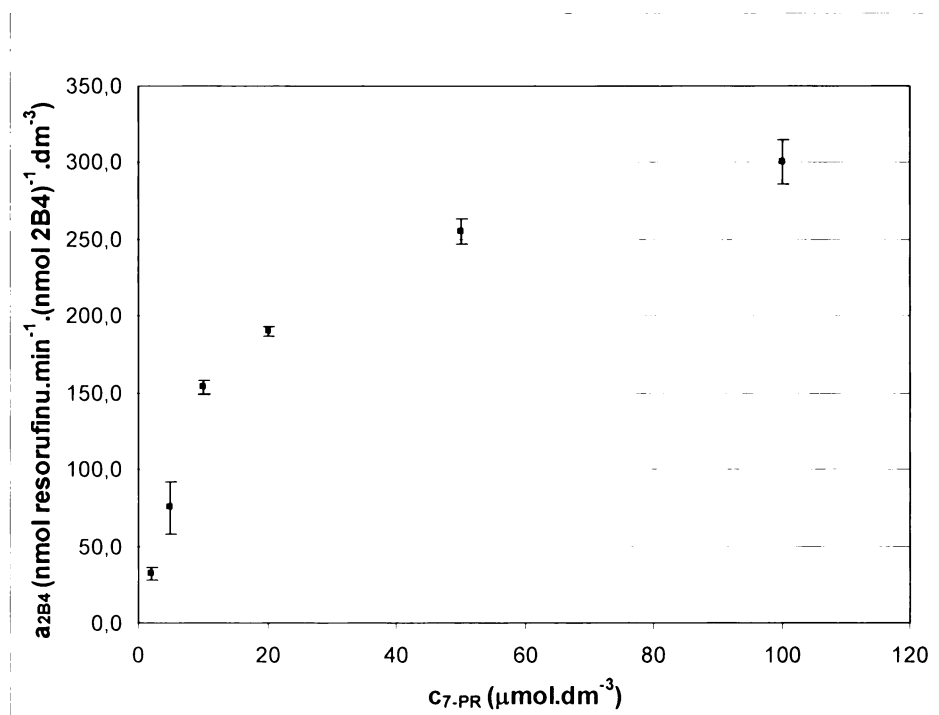
V pufru P7,4 byl zaznamenán 35 %, v pufru TEA 7,4 téměř 50 % nárůst aktivity CPR v přítomnosti membrány ve srovnání s hodnotami aktivit stanovenými v roztoku, což je v souladu se strukturou proteinu, která zahrnuje membránovou doménu, důležitou ke správné orientaci a interakci reakčních partnerů. Prostředí membrány navíc může částečně eliminovat negativní vliv triethylaminového pufru na aktivitu reduktasy.

Jak již je uvedeno v kap. 4.2.1., v pufrch s pH 6,0 aktivita CPR výrazně klesá a s ohledem na vysokou chybu měření, kterou je zatížen výsledek měření v pufru Pyr6 v přítomnosti membrány, nelze její pozitivní nebo negativní vliv prokazatelně potvrdit.

### 4.3. Metabolické studie interakce cytochromu P450 2B4 NADPH:cytochrom P450 reduktasou

Protože hlavním záměrem této práce bylo studovat pomocí biokonjugačních technik interakci CYP 2B4 s NADPH:CYP reduktasou, bylo třeba zjistit jaký vliv mají vytipované pufrы na aktivitu těchto enzymů v rekonstituovaném systému. Aktivita byla stanovována fluorimetrickým měřením.

Nejprve byla optimalizována koncentrace 7-pentoxyresorufinu v reakční směsi. Měření bylo prováděno ve fosfátovém pufru P7,4 (pH 7,4). Jak je vidět z grafu (Obr. 44, následující strana), se stoupající koncentrací substrátu se aktivita systému zvyšuje.



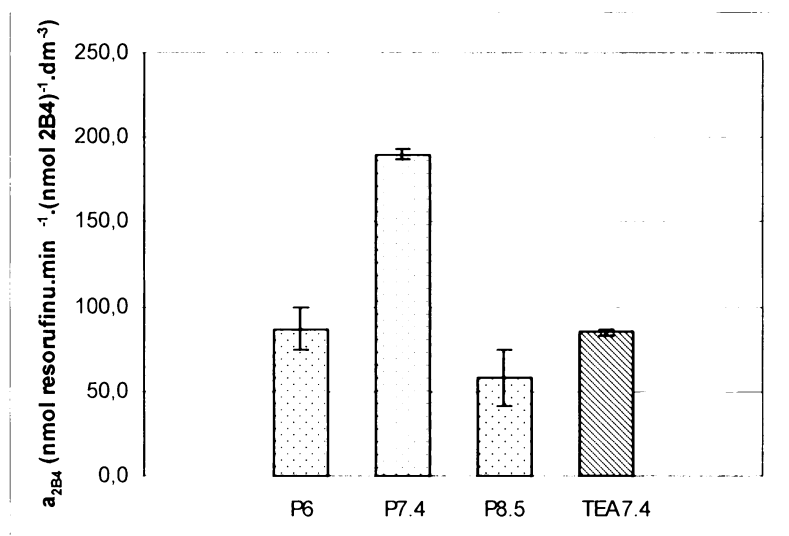
Obr. 44 - Aktivita CYP 2B4 v závislosti na koncentraci 7-pentoxyresorufinu

Pro další experimenty byla používána koncentrace 7-pentoxyresorufinu  $20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$  (označená v grafu červenou barvou), při které je měření zatíženo nejmenší chybou a závislost aktivity na koncentraci je ještě téměř lineární.

#### **4.3.1. Ovlivnění interakce CYP 2B4 a NADPH:CYP reductasy složením a pH pufru**

Při konstantním molárním poměru CYP 2B4 : NADPH:CYP reductasa : 7-pentoxyresorufin: DLPC – 1:1:17:500 byla fluorimetricky stanovena aktivita CYP 2B4 ve fosfátových pufrách P7,4 (pH 7,4), P6 (pH 6,0) a P8,5 (pH 8,5) a v triethylaminovém pufru TEA7,4 (pH 7,4). Pro stanovení v pyridinovém pufru Pyr6 (pH 6,0) se nepodařilo získat smysluplné hodnoty, výsledky měření byly patrně ovlivněny interferencí pyridinu.

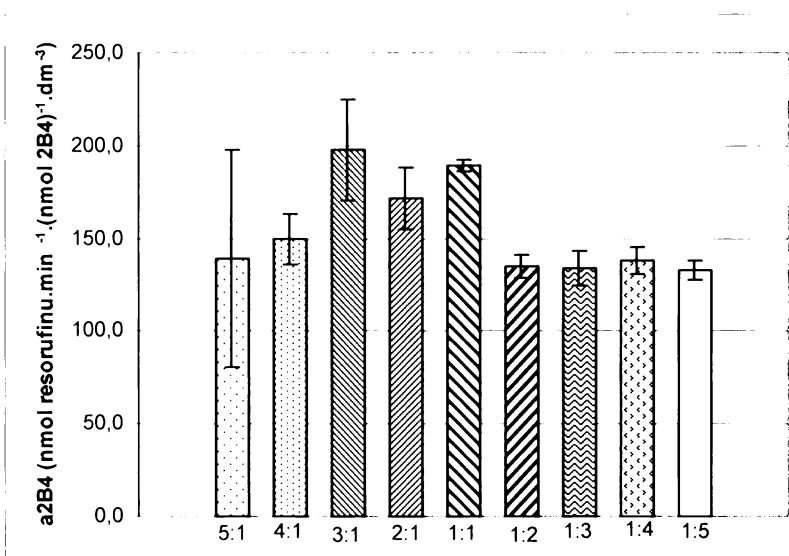
Výsledky vynesené do grafu (Obr. 45, následující strana) jsou průměrem třech paralelních měření. Je zřejmé, že enzymy nejlépe interagují v prostředí fosfátového pufru P7,4. Jeho pH odpovídá fyziologické hodnotě, která je zřejmě shodná s pH – optimem probíhající reakce, jak ilustruje pokles hodnot aktivity při vyšší i nižší hodnotě pH. V pufru TEA dochází také k poklesu, který je ve shodě s poklesem cytochrom c – reductasové aktivity CPR v tomto pufru.



Obr. 45 – Aktivita CYP 2B4 v závislosti na pH a na složení pufru (tečkování značí pufrы identického složení, červená barva pufrы shodného pH)

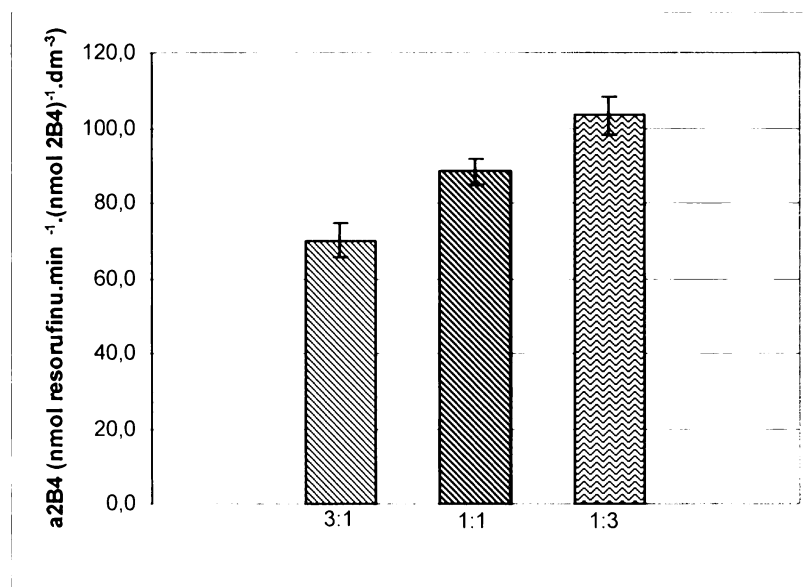
#### 4.3.2. Stanovení optimálního molárního poměru CYP 2B4: NADPH CYP reduktasa

Stanovení byla provedena ve fosfátovém pufru P7,4 a v triethylaminovém pufru TEA7,4. Získané výsledky vynesené v grafech jsou průměrem třech měření. V pufru P7,4 se jako nejefektivnější jeví poměry 1:1 až 3:1, poměr 2:1 a 3:1 jsou však zatíženy vysokou hodnotou směrodatné odchylky, která se překrývá s hodnotou stanovenou pro poměr 1:1 (Obr. 46). V pufru TEA7,4 byla nejvyšší hodnota aktivity získána pro poměr 1:3 (Obr. 47, následující strana). Pro další experimenty byl používán molární poměr 1:1 (červené sloupce v grafech), který byl pro oba pufrы shledán dostačujícím.



Obr. 46 - Aktivita CYP 2B4 v závislosti na molárním poměru CYP:CPR v pufru P7,4





Obr. 47 - Aktivita CYP 2B4 v závislosti na molárním poměru CYP:CPR v pufru TEA7,4

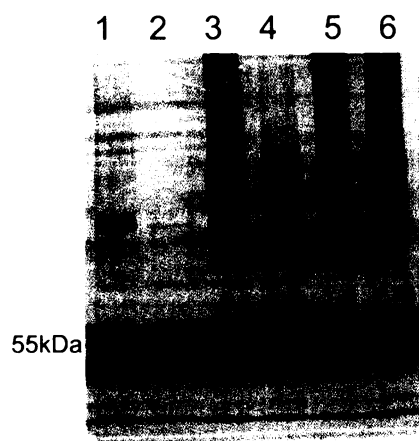
#### 4.4. Studium cytochromu P450 2B4 a jeho redoxních partnerů při vzájemné interakci pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie

##### 4.4.1. Intramolekulární síťovací reakce

Pro studium 3D struktury jednotlivých proteinů byla použita činidla DSS a DSG. Byly optimalizovány podmínky koncentrace obou použitých činidel, aby bylo získáno potenciálně co největší množství intramolekulárních můstků a zároveň aby co nejméně vznikaly intermolekulárně propojené vysokomolekulární formy.

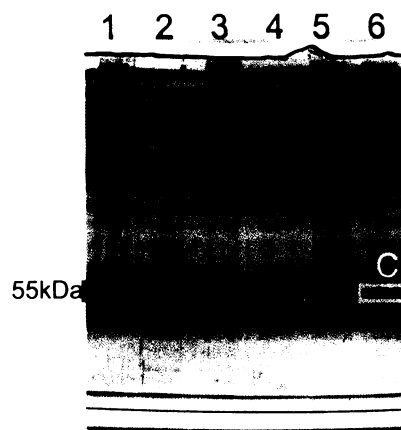
##### 4.4.1.1. Intramolekulární síťovací reakce v molekule cytochromu P450 2B4

Při optimalizaci byly pro každé z činidel vyzkoušeny koncentrace 1, 5 a 20  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , které odpovídají ekvimolárnímu množství, pětinašobku, a dvacetinašobku koncentrace proteinu. Pro každou z koncentrací byl také testován vliv přítomnosti substrátu CYP 2B4 diamantanu v poměru k proteinu 1:1. Experimenty byly prováděny v přítomnosti membrány (DLPC). Výsledky jsou patrné z SDS-elektroforéz uvedených na Obr. 48 a Obr. 49 na následující straně.



**Obr. 48 – SDS-PAGE optimalizace podmínek intramolekulární síťovací reakce CYP 2B4 s použitím síťovacího činidla DSS**

1 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DSS  
 2 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DIA, 1  $\mu$ M DSS  
 3 - 1  $\mu$ M 2B4, 5  $\mu$ M DSS  
 4 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DIA, 5  $\mu$ M DSS  
 5 - 1  $\mu$ M 2B4, 20  $\mu$ M DSS  
 6 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DIA, 20  $\mu$ M DSS  
 10 % PAGE, detekce stříbrem

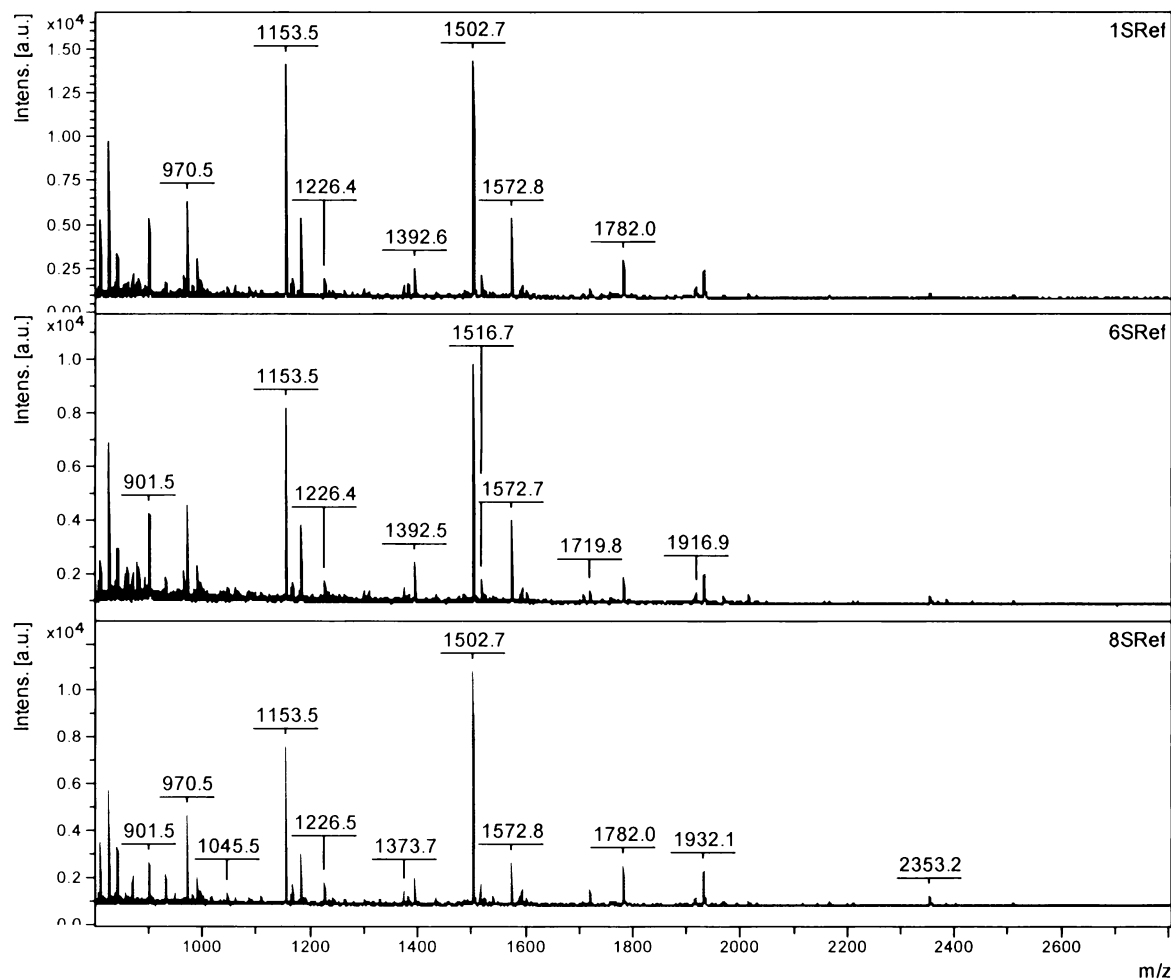


**Obr. 49 - SDS-PAGE optimalizace podmínek intramolekulární síťovací reakce CYP 2B4 s použitím síťovacího činidla DSG**

1 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DSG  
 2 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DIA, 1  $\mu$ M DSG  
 3 - 1  $\mu$ M 2B4, 5  $\mu$ M DSG  
 4 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DIA, 5  $\mu$ M DSG  
 5 - 1  $\mu$ M 2B4, 20  $\mu$ M DSG  
 6 - 1  $\mu$ M 2B4, 1  $\mu$ M DIA, 20  $\mu$ M DSG  
 10 % PAGE, detekce stříbrem

Při použití DSS i DSG je vidět podobný trend – s koncentrací činidla narůstá také intenzita proteinových proužků v horních částech gelů, které odpovídají nežádoucím vysokomolekulárním formám proteinu. Ve všech pozicích však najdeme i výrazný proužek monomeru. Přítomnost diamantanu ve vzorcích s koncentracemi činidel 1 a 5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  tvorbu těchto forem výrazně potlačuje (dráhy 2, 4 a 6), protože navázání diamantanu do vazebného místa CYP 2B4 nejspíše ovlivňuje 3D strukturu proteinu a výrazně snižuje vzájemnou interakci jednotlivých molekul CYP. Od koncentrace činidel 5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  (dráha 3, 4, 5 a 6) je patrná tvorba druhé monomerní formy CYP 2B4, vykazující vyšší elektroforetickou pohyblivost a zdánlivě nižší molekulovou hmotnost, která naznačuje pravděpodobný vznik intramolekulárních můstků.

Proužky proteinů byly z gelů vyříznuty (pro přehlednost jsou v Obr. 49 označeny pouze vzorky, jejichž hmotnostní spektra jsou uvedena níže) a byla získána hmotnostní spektra monomerů CYP 2B4 (Obr. 50, následující strana).



**Obr. 50 – Hmotnostní spektra CYP 2B4**

1SRef – hmotnostní spektrum vzorku A (CYP 2B4, 1  $\mu$ M DSG),

6SRef – hmotnostní spektrum vzorku B (CYP 2B4, 10  $\mu$ M DSG)

8SRef – hmotnostní spektrum vzorku C (CYP 2B4, 10  $\mu$ M DSG, 1  $\mu$ M DIA)

štěpeno trypsinem v gelu, měřeno v reflektornovém módu, MALDI-TOF Biflex II, Bruker Daltonics

Porovnáním hodnot  $m/z$  ze získaných spekter s databází NCBI (postup viz kap. 3.2.6.4.) byl CYP 2B4 identifikován ve všech zkoumaných vzorcích. Pokrytí sekvence pro vzorek A činí 30 % a je vyznačeno na Obr. 51 na následující straně. Toto pokrytí je pravděpodobně příliš nízké, abychom mohli zachytit vzniklý intramolekulární můstek. Navíc ve vyříznutých proteinových proužcích zřejmě nebyl dostatek materiálu pro proteasové štěpení. Proto bude třeba daný experiment opakovat s větším množstvím materiálu a použitím LC-MS/MS, která může nejen zvýšit pokrytí studovaného proteinu, ale i pravděpodobnost záchytu intramolekulárního můstku.

```

1  MEFSLLLLLL FLAGLLLLLF RGHPKAHGRL PPGPSPLPVL GNLLQMDRKG LLRSFLRLRE
61 KYGDVFTVYL GSRPVVVLG TDAIREALVD QAEAFSGR GK IAVVDPIFOG YGVIFANGER
121 WRALRRFSLA TMRDFGMGKR SVEERIQEEA RCLVEELRKS KGALLDNTLL FHSITSNIIC
181 SIVFGKRFDY KDPVFLRLLD LFFQSFSLIS SFSSQVFELF PGFLKHFPGT HRQIYRNLQE
241 INTFIGQSVE KHRATLDPSN PRDFIDVYLL RMEKDKSDPS SEFHQNLIL TVLSLFFAGT
301 ETTSTTLRYG FLIMLKYPHV TERVQKEIEQ VIGSHRPPAL DDRAKMPYTD AVIHEIQLG
361 DLIPFGVPHT VTKDTQFRGY VIPKNTEVFP VLSSALHDPR YFETPNTEFNP GHFLDANGAL
421 KRNEGFMPFS LGKRICLGE G IARTEFLFF TTILQNFSA SPVPPEDIDL TPRESGVGNV
481 PPSYQIRFLA R

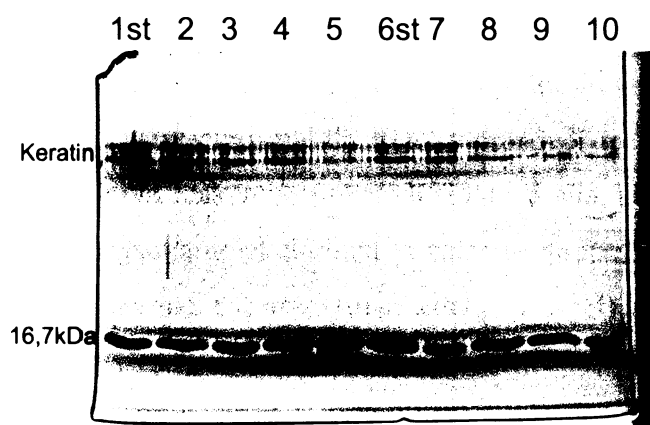
```

Obr. 51 – Pokrytí sekvence CYP 2B4 získané na základě spektra 1SRef (viz Obr. 50), identifikované peptidy jsou označeny červeně

#### 4.4.1.2. Intramolekulární síťovací reakce v molekule cytochromu b<sub>5</sub>

Cytochrom b<sub>5</sub> je alternativním redoxním partnerem cytochromu P450, což nás vedlo k pokusu o intramolekulární zesíťování také v jeho struktuře. Mimoto se jedná o protein nízké molekulové hmotnosti (16 kDa), u kterého by k identifikaci vzniklých intramolekulárních můstků, a tedy i ke zpřesnění jeho terciární struktury, bylo možno využít „top-down MS“ přístup (viz kap. 1.3.1.1.).

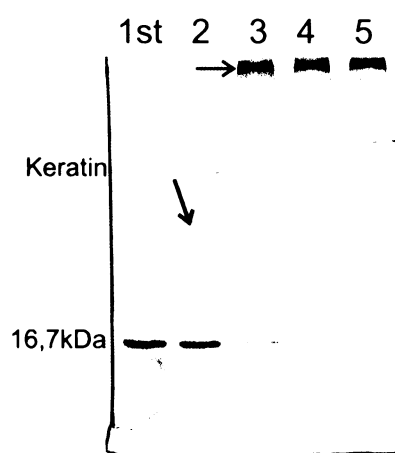
Intramolekulární zesíťování cytochromu b<sub>5</sub> bylo vytvářeno pomocí činidel DSS, DSG a EDC, všechny experimenty byly prováděny v přítomnosti membrány (0,15 mmol/dm<sup>3</sup> DLPC) a s koncentrací cytochromu b<sub>5</sub> 1 μmol/dm<sup>3</sup>. Pro optimalizaci podmínek reakce s činidly DSS a DSG byly použity koncentrace činidel 1, 5, 10 a 20 μmol/dm<sup>3</sup>. Z SDS elektroforózy (Obr. 52) je zřejmé, že ani u jednoho z použitých sukcinimidových činidel (DSS - dráha 1 až 5, DSG - dráha 6 až 10) nedochází při žádné koncentraci k tvorbě vysokomolekulárních forem proteinu. Proužky proteinů v horní části gelů náleží lidskému keratinu, kterým byly vzorky pravděpodobně kontaminovány z některé složky vzorkového pufru.



Obr. 52 – SDS-PAGE optimalizace podmínek intramolekulární síťovací reakce cytochromu b<sub>5</sub> s použitím síťovacích činidel DSS a DSG

1 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, standard  
2 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 1 μM DSS  
3 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 5 μM DSS  
4 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 10 μM DSS  
5 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 20 μM DSS  
6 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, standard  
7 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 1 μM DSG  
8 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 5 μM DSG  
9 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 10 μM DSG  
10 – 1 μM cyt<sub>b5</sub>, 20 μM DSG  
11 – 12 % PAGE, detekce stříbrem

Experiment s použitím EDC byl optimalizován pomocí koncentrací činidla 0,01, 0,02, 0,05 a 1,0 mg/ml, které odpovídají molárním koncentracím 52, 104, 260 a 520  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ . Na gelu je se stoupající koncentrací činidla patrný kvantitativní nárůst proteinových proužků odpovídajících vysokomolekulárním formám a zároveň úbytek formy monomeru (Obr. 53). Dimerní forma proteinu v dráze č. 2 může vznikat na základě nespécifické interakce jednotlivých molekul proteinu. Tvorba agregátů většího počtu molekul, které vznikají působením vysokého nadbytku činidla (dráha 3, 4, 5) je však nežádoucí a koncentrace EDC 0,02 – 0,1 mg/ml jsou tedy nevhodné.



**Obr. 53 - SDS-PAGE optimalizace podmínek intramolekulární síťovací reakce cytochromu  $b_5$  s použitím síťovacího činidla EDC**

1 - 1  $\mu\text{M}$  cytb5, standard  
 2 - 1  $\mu\text{M}$  cytb5, 0,01 mg/ml EDC  
 3 - 1  $\mu\text{M}$  cytb5, 0,02mg/ml EDC  
 4 - 1  $\mu\text{M}$  cytb5, 0,05 mg/ml EDC  
 5 - 1  $\mu\text{M}$  cytb5, 0, 1 mg/ml EDC  
 10 % PAGE, detekce stříbrem  
 Černá šipka značí dimer, červená nežádoucí vysokomolekulární formy proteinu vzniklé působením EDC  
 V horní části gelu je patrná kontaminace keratinem

Zdánlivý nesoulad výsledků tvorby dimerních příp. vícemerních forem cytochromu  $b_5$  s použitým karbodiimidem či sukcinimidem lze vysvětlit několikanásobně vyšší molární koncentrací EDC oproti DSS a DSG a rozdílným pH a typem pufru použitým pro síťovací reakci. Nadto oba typy činidel reagují s odlišnými aminokyselinovými zbytky, při tvorbě dimerů a vícemerů tedy záleží také na orientaci proteinu v membráně.

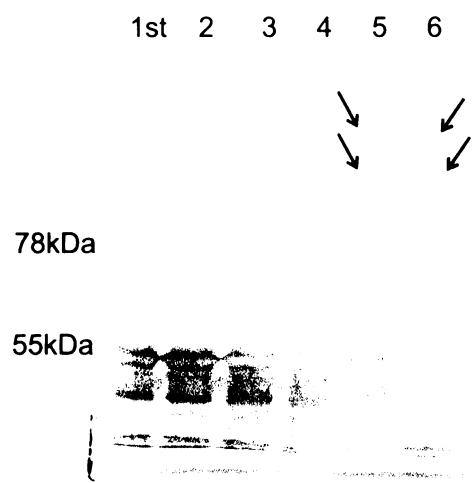
#### **4.4.2. Intermolekulární síťovací reakce**

Studium vzájemných interakcí jednotlivých složek MFO systému bylo prováděno pomocí síťovacího činidla EDC v prostředí membrány (0,15  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  DLPC). Kromě studia vlivu reakčního prostředí (iontová síla, přítomnost organického rozpouštědla) byla tvorba vysokomolekulárních kovalentně propojených produktů sledována také v přítomnosti či absenci substrátů (diamantan, NADPH) a kooperujících proteinů (cytochrom  $b_5$ ).

Po inkubaci s EDC byly vzorky separovány SDS elektroforézou a na základě výsledných elektroforeogramů byly optimalizovány podmínky pro „bottom-up MS“ analýzu zesílených proteinů.

#### 4.4.1.1. Intermolekulární síťovací reakce mezi cytochromem P450 2B4 a NADPH:CYP reductasou

Podmínky reakce byly optimalizovány použitím EDC v koncentraci 0,005, 0,01, 0,02, 0,5 a 1,0 mg/ml (26, 52, 104, 260, 520  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ), koncentrace CYP 2B4 a CPR ve vzorcích činila 2  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ . Jak je vidět z SDS-elektroforézy, vysokomolekulární formy proteinů vznikají pouze u vzorků s dvěma nejvyššími koncentracemi činidla (Obr. 54, dráha 5 a 6), ale i v tomto případě je výtěžek reakce nízký.



**Obr. 54 - SDS-PAGE optimalizace podmínek intermolekulární síťovací reakce CYP 2B4 a CPR s použitím síťovacího činidla EDC**

1 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, standard  
 2 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 0,005 mg/ml EDC  
 3 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 0,01 mg/ml EDC  
 4 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 0,02 mg/ml EDC  
 5 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 0,05 mg/ml EDC  
 6 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 0,1 mg/ml EDC

Proteiny přečištěny na membráně Microcon YM10

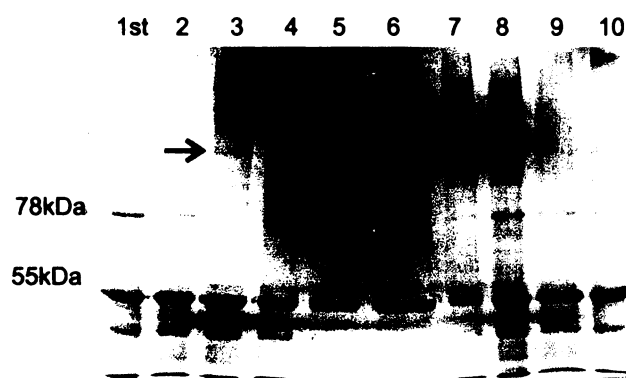
10% PAGE, detekce stříbrem

Šipky označují žádoucí vysokomolekulární formy proteinu vzniklé působením EDC

Protože při metabolických studiích bylo prokázáno, že na aktivitu enzymů působí iontová síla, pro koncentraci EDC 0,1 mg/ml (520  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ) bylo testováno ovlivnění tvorby vysokomolekulárních forem v přítomnosti 0,05 – 1,0 mol/dm<sup>3</sup> NaCl. Dále byla testována také přítomnost acetonitrilu (1 – 10 % (v/v)), který ovlivňuje polaritu roztoku.

NaCl má na interakci znatelný pozitivní vliv již v koncentraci 0,05 mol/dm<sup>3</sup> (Obr. 55, následující strana, dráha 3), další zvyšování koncentrace (dráha 4 až 6) k tvorbě vyšších forem nepřispívá, což je ve shodě s výsledky stanovení NADPH:cytochrom c reductasové aktivity CPR (viz kap.3.2.4.). U koncentrace 2 % ACN (v/v) (Obr. 55, následující strana, dráha 8) je zřejmý příznivý vliv na tvorbu vysokomolekulárních produktů, který s vyšší

koncentrací ACN postupně mizí (dráhy 9 a 10). Z tohoto výsledku plyne, že na interakci proteinů se vedle iontových sil podílejí také síly hydrofobní.



**Obr. 55 - SDS-PAGE optimalizace podmínek intermolekulární síťovací reakce CYP 2B4 a CPR s použitím síťovacího činidla EDC v přítomnosti NaCl/ACN**

1 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, standard  
 2 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 0,1 mg/ml EDC  
 3 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 0,1 mg/ml EDC, 0,05 M NaCl  
 4 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 0,1 mg/ml EDC, 0,1 M NaCl  
 5 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 0,1 mg/ml EDC, 0,5 M NaCl  
 6 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 0,1 mg/ml EDC, 1 M NaCl  
 7 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 1 % ACN (v/v)  
 8 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 2 % ACN (v/v)  
 9 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 5 % ACN (v/v)  
 10 - 2  $\mu$ M 2B4, 2  $\mu$ M CPR, 10 % ACN (v/v)

Proteiny přečištěny na membráně Microcon YM10

10 % PAGE, detekce stříbrem

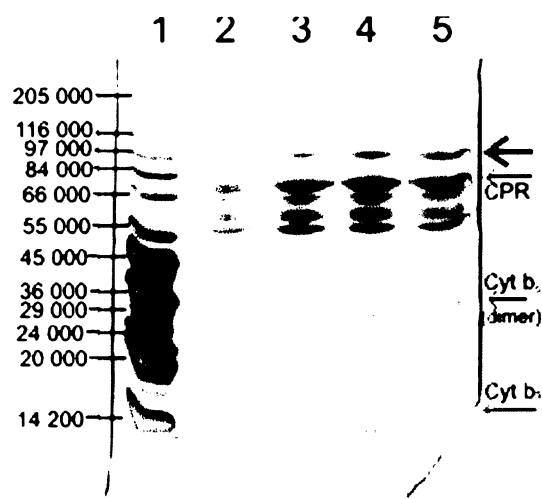
Šipka označuje žádoucí vysokomolekulární formy proteinu vzniklé působením EDC

Na základě výsledků byla pro další experimenty zvolena koncentrace NaCl 150 mol/dm<sup>3</sup>, shodná s běžně používaným fyziologickým roztokem,.

#### 4.4.1.2. Intermolekulární síťovací reakce mezi cytochromem b<sub>5</sub> a NADPH:CYP reduktasou

Protože přítomnost/absence cytochromu b<sub>5</sub> má výrazný vliv na působení MFO systému <sup>64</sup>, byla studována interakce cytochromu b<sub>5</sub> s jeho jednotlivými proteiny. Prvním z nich byla NADPH:CYP reduktasa.

Při optimalizaci síťovací reakce bylo přidáváno činidlo EDC v koncentracích 0,02; 0,03 a 0,04 mg/ml (104, 156, 208  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>), ve vzorcích byla přítomna CPR v koncentraci 2  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup> a cytochrom b<sub>5</sub> v koncentraci 8  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>. Tvorba vysokomolekulárního produktu v oblasti okolo 97 kDa (hmotnostně odpovídá heterodimeru CPR a cyt b<sub>5</sub>) byla zaznamenána již u nejnižší použité koncentrace EDC (Obr. 56, následující strana, heterodimer vznikající v drahách 3 až 5 je označen šipkou). Přímou úměrou koncentraci činidla se zastoupení heterodimeru zvyšuje. Pravděpodobně došlo také k zesílení molekul cytochromu b<sub>5</sub>, kterému odpovídají proteinové proužky v oblasti nad 29 kDa (Obr. 56, následující strana, dráha 3 až 5).



**Obr. 56 - SDS-PAGE optimalizace podmínek intermolekulární síťovací reakce cytochromu  $b_5$  a CPR s použitím síťovacího činidla EDC**  
 1 – standard (wide range, Sigma)  
 2 – 8  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, standard  
 3 – 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  CPR, 0,02 mg/ml EDC  
 4 – 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  CPR, 0,03 mg/ml EDC  
 5 – 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  CPR, 0,04 mg/ml EDC  
 150 mM NaCl, 10 % PAGE, detekce stříbrem  
 Červená šipka označuje žádoucí vysokomolekulární produkty vzniklé působením EDC

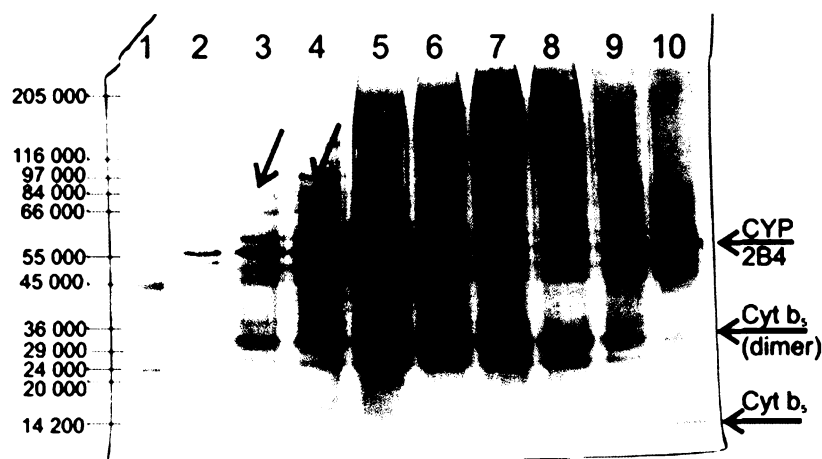
Nejvíce žádaného heterodimerního produktu bylo získáno reakcí v prostředí 0,04 mg/ml činidla, proto byla tato koncentrace určena jako optimální pro další experimenty.

#### 4.4.1.3. Intermolekulární síťovací reakce mezi cytochromem P450 2B4 a cytochromem $b_5$

Druhým proteinem MFO systému, jehož interakce s cytochromem  $b_5$  byla studována, byl CYP 2B4.

Při optimalizaci podmínek byly použity koncentrace síťovacího činidla EDC 0,01, 0,02; 0,03 a 0,04 mg/ml (104, 156, 208  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ). Vzorky obsahovaly 2  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  CYP 2B4 a 8  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  cytochrom  $b_5$ . Pro každou koncentraci byly připraveny vzorky s a bez přídavku 1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  substrátu CYP 2B4 diamantanu. Jak je vidět z obrázku výsledného gelu (Obr. 57, následující strana), k tvorbě vysokomolekulárních forem (označených v obrázku šipkami) dochází již při nejnižší koncentraci činidla. Ve vyšších koncentracích nadbytek činidla přispívá k nadměrnému zesílení, jehož produkty nemohly být v gelu kvůli své velikosti odděleny, poukazuje však na ně výrazně zvýšené pozadí gelu v drahách 5 až 10. Vliv přítomnosti diamantanu není v tomto případě prokazatelný.





**Obr. 57 – SDS-PAGE optimalizace podmínek intermolekulární síťovací reakce CYP 2B4 a cytochromu  $b_5$  s použitím síťovacího činidla EDC**

1 - standard (wide range, Sigma)  
 2 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , standard  
 3 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 0,01 mg/ml EDC  
 4 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 1  $\mu$ M DIA, 0,01 mg/ml EDC  
 5 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 0,02 mg/ml EDC  
 6 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 1  $\mu$ M DIA, 0,02 mg/ml EDC  
 7 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 0,03 mg/ml EDC  
 8 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 1  $\mu$ M DIA, 0,03 mg/ml EDC  
 9 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 0,04 mg/ml EDC  
 10 - 2  $\mu$ M 2B4, 8  $\mu$ M cyt  $b_5$ , 1  $\mu$ M DIA, 0,04 mg/ml EDC  
 CYP 2B4 přečištěn na membráně Microcon YM10  
 150 mM NaCl, 10 % PAGE, detekce stříbrem  
 Červené šipky označují žádoucí vysokomolekulární formy proteinu vzniklé působením EDC

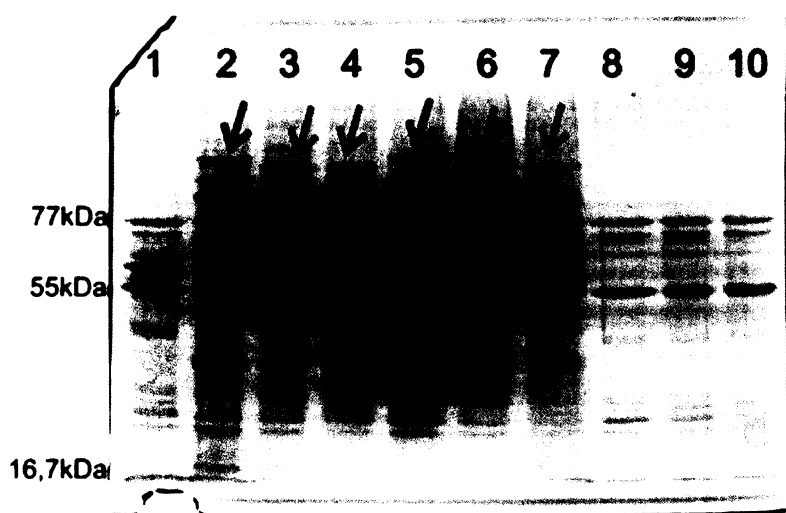
#### 4.4.1.4. Intermolekulární síťovací reakce mezi cytochromem P450 2B4, NADPH:CYP reduktasou a cytochromem $b_5$ , vliv přítomnosti/absence NADPH

Jelikož výtěžek intermolekulární síťovací reakce CYP 2B4 a NADPH:CYP reduktasy byl i při vysoké koncentraci činidla EDC 0,1 mg/ml, která odpovídá  $520 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , velmi nízký (kap. 4.4.1.1., Obr. 54, str. 70), ale výsledky reakcí NADPH:CYP reduktasy s cytochromem  $b_5$  (kap. 4.4.1.2., Obr. 56, str. 72), a CYP 2B4 s cytochromem  $b_5$  (kap. 4.1.1.3., Obr. 57, str. 73) vedly k tvorbě vysokomolekulárních produktů již při desetkrát nižší koncentraci činidla, byl studován vliv přítomnosti cytochromu  $b_5$  na systém CYP 2B4 – CPR.

Působení cytochromu  $b_5$ , bylo testováno ve vzorcích obsahujících pouze výše jmenované enzymy, dále v přítomnosti substrátu CYP 2B4 diamatananu, který vazbou na protein pravděpodobně mění jeho konformaci (viz kap.4.4.1.1.) a také v přítomnosti koenzymu CPR – NADPH. Tento koenzym obsahuje ve své struktuře aminoskupinu, která v případě síťovací reakce zprostředkované EDC může reakci inhibovat kompeticí s aminoskupinami peptidového řetězce <sup>65</sup>, nicméně jsme bylo rozhodnuto ověřit jeho vliv na interakci enzymů

MFO systému s předpokladem snížení aktuální koncentrace NADPH v roztoku vazbou do aktivního centra CPR.

Pro experiment byla použita stejná koncentrace síťovacího činidla EDC pro všechny vzorky, a sice 0,01 mg/ml, která byla vybrána na základě předchozích optimalizačních pokusů (kap. 4.4.1.3.). Proteiny byly použity v koncentracích: CYP 2B4 a CPR 2  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  a cytochrom  $b_5$  8  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , diamantan v koncentraci 1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  a NADPH 2 a 5  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ .



**Obr. 58 - SDS-PAGE intermolekulární síťovací reakce CYP 2B4, CPR a cytochromu  $b_5$  s použitím síťovacího činidla EDC**

1 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  DIA, standard  
 2 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  DIA, EDC 0,01 mg/ml  
 3 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  DIA, EDC 0,01 mg/ml, 2 mM NADPH  
 4 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , 1  $\mu\text{M}$  DIA, EDC 0,01 mg/ml, 5 mM NADPH  
 5 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , EDC 0,01 mg/ml  
 6 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , EDC 0,01 mg/ml, 2 mM NADPH  
 7 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 8  $\mu\text{M}$  cyt  $b_5$ , EDC 0,01 mg/ml, 5 mM NADPH  
 8 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 1  $\mu\text{M}$  DIA, EDC 0,01 mg/ml  
 9 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 1  $\mu\text{M}$  DIA, EDC 0,01 mg/ml, 2 mM NADPH  
 10 - 2  $\mu\text{M}$  2B4, 2  $\mu\text{M}$  CPR, 1  $\mu\text{M}$  DIA, EDC 0,01 mg/ml, 5 mM NADPH  
 CYP 2B4 a CPR přečištěny na membráně Microcon YM10

150 mM NaCl, 10 % PAGE, detekce stříbrem

Černé šipky označují žádoucí vysokomolekulární formy proteinu vzniklé působením EDC ve vzorcích bez NADPH, červené s NADPH

Jak je vidět, ve vzorcích s přítomným NADPH (dráha 3, 4, 6, 7) dochází ke kvalitativním i kvantitativním změnám ve složení vysokomolekulárních forem proteinu. Navíc při koncentraci NADPH 2  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  (dráha 3 a 6) nebyl pozorován inhibiční vliv aminoskupiny koenzymu na síťovací reakci. Naopak při vyšší koncentraci NADPH (5  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ) v drahách 4 a 8 je inhibice patrná z úbytku vysokomolekulární formy.

Přítomnost diamantanu (dráha 1 až 4) nemá na tvorbu vícemerných forem vliv, dochází však k eliminaci pozadí gelu, patrně potlačením nescifické interakce, což je ve shodě s výsledkem uvedeným v kap 4.4.1.1. V drahách 8, 9 a 10 vidíme vzorky, ve kterých se síťovací reakce neúčastnil cytochrom  $b_5$ . V těchto vzorcích, obsahujících pouze CYP 2B4 a CPR k tvorbě vysokomolekulárních produktů nedochází, a to ani v přítomnosti substrátu CYP (diamantanu), ani v přítomnosti koenzymu CPR (NADPH) (Obr. 58). Na interakci proteinů MFO systému má tedy přítomnost cytochromu  $b_5$  prokazatelný vliv.

## 5. DISKUZE

Jaterní systém monooxygenas se smíšenou funkcí je intenzivně studován již téměř pět desetiletí. Během této doby bylo získáno mnoho poznatků o struktuře a funkci jednotlivých složek systému<sup>29, 66, 67</sup>, byla objasněna jeho úloha v biotransformaci exogenních i endogenních látek<sup>68</sup>, a vyřešen reakční mechanismus<sup>69</sup>.

V současné době se v popředí zájmu nachází studium mechanismu aktivace karcinogenů<sup>70, 71, 72</sup>, metabolismu léčiv<sup>73, 74</sup>, a v neposlední řadě zkoumání terciární struktury a protein-proteinové interakce redoxních partnerů<sup>20, 75, 76</sup>, která byla také předmětem této práce. Na rozdíl od ostatních studií, které většinou využívají rekombinantních proteinů, bylo pracováno s nativními enzymy získanými izolací z modelových organismů a studovanými v rekonstituovaném in vitro systému.

### 5.1. Izolace CYP 2B4, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>

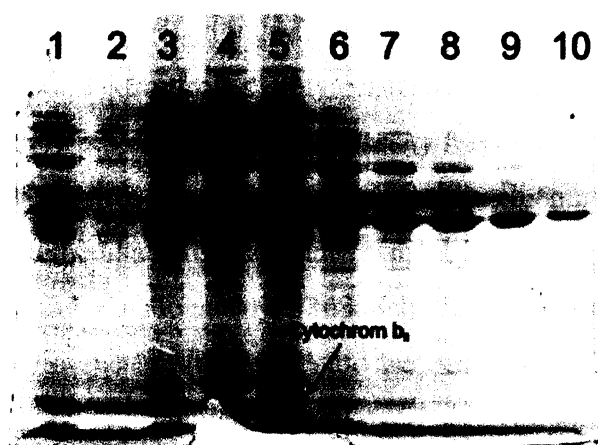
Izolací fenobarbitalem indukované mikrosomální frakce z modelového organismu králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*) bylo získáno téměř 9000 nmol cytochromu P450. Později bylo zjištěno, že na vysokém obsahu CYP měla více než 50 % podíl isoforma 1A2, která se ve fenobarbitalových mikrosomech obvykle vyskytuje pouze minoritně. K její indukci tedy zřejmě došlo ještě před započítím premedikace fenobarbitalem, tedy během předešlého chovu.

Mikrosomální frakce byla úspěšně solubilizována a solubilizované proteiny byly následně odděleny na koloně DEAE-Sepharosy CL6B. Přestože pH v koloně dosahovalo po promytí 1 dm<sup>3</sup> ekvilibračního pufru hodnoty 6,5 namísto požadované hodnoty 7,5, separace probíhala podle předpokladů vycházejících z hodnot isoelektrických bodů jednotlivých enzymů, vypočtených na základě primární struktury programem ProtParam tool<sup>30</sup> – CYP 2B4 (pI<sub>teor</sub> = 9,01) byl eluován během promývání (stejně tak i CYP 1A2 (pI<sub>teor</sub> = 9,41)), k uvolnění NADPH:CYP reduktasy (pI<sub>teor</sub> = 5,38) a cytochromu b<sub>5</sub> (pI<sub>teor</sub> = 5,16) byl použit gradient iontové síly (Obr. 20. str. 46).

**Purifikací na koloně 2', 5' – ADP-Sepharosy 4B byl získán téměř elektroforeticky homogenní preparát CPR, kontaminovaný enzymem o molekulové hmotnosti při-**

bližně 100 kDa. Pravděpodobně se jedná o methylen:tetrahydrofolát-dehydrogenasu (EC 1.5.1.5.)<sup>77</sup>, kterou se nepodařilo separovat předchozí chromatografií na DEAE-Sepharose CL6B. K eliminaci kontaminace by bylo vhodné snížit objem sbíraných frakcí a dosáhnout tak jemnější separace.

Ve snaze oddělit cytochrom  $b_5$  od proteinů vyšších molekulových hmotností byla provedena chromatografie vzorku na koloně Sephadexu G100. Po kontrole čistoty vzorku SDS-elektroforézou (Obr. 59) byl tento krok shledán zbytečným, neboť došlo pouze k velmi omezené separaci.



Obr. 59 – SDS-PAGE frakcí Sephadexu G100

1 – nanášený vzorek

2 – 10 – postupně jímané frakce

10 % PAGE, barvení: CBB R-250

Příčinou je zřejmě nespecifická interakce cytochromu  $b_5$  s většími proteiny (např. cytochromy P450) obsaženými ve vzorku, kterou se nepodařilo potlačit ani přidávkem KCl o koncentraci  $0,2 \text{ mol/dm}^3$  v promývacím pufru. Uvedenému předpokladu odpovídá i skutečnost, že při ultrafiltraci preparátu na membráně Amicon PM30 nedošlo ke ztrátám cyt  $b_5$ , přestože se jedná o protein molekulové hmotnosti 16 kDa.

**Cytochrom  $b_5$  byl úspěšně purifikován na koloně DEAE-Sepharosy CL6B** (eluční profil - Obr. 27, str. 50, SDS-PAGE - Obr. 28, Obr. 29, str. 51) modifikací postupu uvedeného v práci Kateřiny Janouchové<sup>61</sup>. Autorka používala k eluci navázaných proteinů gradient  $0-75 \text{ mmol/dm}^3 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ , fosfátový pufr však nevyhovuje hmotnostně spektrometrickým experimentům, proto byl  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nahrazen gradientem KCl v  $15 \text{ mmol/dm}^3$  Tris/Cl pufru. Protože iontové síly  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a KCl se ve stejných koncentracích liší,  $0-75 \text{ mmol/dm}^3$  KCl ke kompletní eluci cytochromu  $b_5$  nepostačoval, a koncentrace KCl byla postupně zvyšována až do  $200 \text{ mmol/dm}^3$ .

Vzorek cytochromu P450 byl po separaci na ionexu rozdělen na dvě části, které byly naneseny na kolony hydroxylapatitu (HAP1a a HAP1b). Protože kapacita nosiče je omezená a obsah CYP ve vzorcích ji zřejmě přesahoval, v obou případech došlo k uvolnění části CYP během nanášení. Příslušné frakce nanášecího píku byly spojeny a znovu naneseny na kolonu HAP (výsledky nejsou publikovány), chromatografií se však nepodařilo získat preparát CYP v uspokojivé čistotě a množství.

Z chromatogramu **HAP1a** (Obr.32, str. 53) je patrný průběh gradientové eluce. Na základě předchozí práce<sup>56</sup> byl nejprve použit gradient 2 x 150 ml 10-100 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kterým se však nepodařilo uvolnit z kolony všechen navázaný CYP. Proto následovalo použití gradientu 2 x 150 ml 100-300 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, který již k eluci postačoval. Jak je v grafu vidět, použitím těchto gradientů došlo ke vzniku dvou elučních píků. Po kontrole čistoty příslušných frakcí SDS-elektroforézou (Obr. 33, Obr. 34, str. 54) byly pro další purifikaci vybrány frakce s vyšším obsahem CYP, ve kterých byl CYP zároveň nejlépe načištěn (frakce druhého elučního maxima). Protože dominantní isoformou po premedikaci fenobarbitalem má být CYP 2B4, předpokládali jsme, že je obsažen právě v těchto nabohacených frakcích. Pozdější identifikací metodou peptidového mapování však bylo zjištěno, že se jedná o isoformu 1A2, CYP 2B4 se tedy pravděpodobně nacházel ve frakcích prvního píku. Pro ověření identity proteinů je proto nezbytně nutné bezprostředně po SDS-PAGE použít k identifikaci separovaných proteinů specifickou metodu (peptidové mapování či Western blot).

Předpoklad eluce CYP 2B4 na začátku gradientu potvrzují i výsledky separace na koloně **HAP1b** (Obr.37, str. 57). V průběhu této chromatografie bohužel došlo ke ztrátě materiálu způsobené zastavením sběrače frakcí během noci, a proto eluční profil není úplný, nicméně frakce nasbírané na počátku gradientu (které byly dále purifikovány) byly identifikovány pomocí peptidového mapování jako CYP 2B4. Eluce by tedy patrně měla podobný průběh jako u HAP1a. Protože u HAP1a začalo k uvolňování CYP z nosiče docházet až při koncentraci NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> přibližně 50 mmol/dm<sup>3</sup>, byla v případě HAP1b kolona promyta nejprve skokově 25 mmol/dm<sup>3</sup> a 50 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pro uvolnění nečistot a poté následovalo použití gradientu 2 x 150 ml 50-300 mmol/dm<sup>3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Vzhledem k nedostatečné čistotě získaných frakcí HAP1a i HAP1b by k lepší separaci nepochybně přispělo použití mírnějšího průběhu gradientu, proti kterému na druhou stranu hovoří zvýšení elučního objemu a jemu úměrné prodloužení chromatografického procesu, které by mělo za následek vyšší ztráty aktivní formy CYP.**

Spojené frakce HAP1a byly dále purifikovány na koloně **HAP 2a**. Pro eluci byl na základě výše uvedených důvodů použit gradient  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50-300 mmol/dm<sup>3</sup>, eluce CYP se projevila výrazným absorpčním maximem (Obr. 35, str. 55). Na koloně **HAP2b** byly separovány frakce získané z HAP 1b. Rozsah koncentračního gradientu byl oproti rozsahu použitému pro HAP2a snížen na 50-200 mmol/dm<sup>3</sup>  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , jelikož při chromatografii na HAP2a došlo při dobíhání gradientu ke krystalizaci již téměř 300 mmol/dm<sup>3</sup>  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v nosiči. Krystalizaci můžeme předejít také filtrací pufru před použitím a zvýšením teploty v chlazené místnosti přibližně na 8°C.

**Z kolon HAP2a a HAP2b byly získány dva finální preparáty, CYP 1A2 a CYP 2B4, jejichž elektroforetická čistota není dostačující pro síťovací studie, avšak postačuje pro studie metabolické, proto byly tyto preparáty charakterizovány analytickými stanoveními.**

## **5.2. Optimalizace reakčních podmínek pro chemické modifikace metabolickými studii**

Použití biokonjugačních technik ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou MALDI-TOF je omezeno řadou různých faktorů – je nutné dodržet optimální pH síťovacího činidla, vyvarovat se přítomnosti látek interagujících s činidlem (např. v případě EDC látky obsahující ve struktuře aminoskupiny a/nebo karboxyskupiny) a použití pufrů nekompatibilních s hmotnostní analýzou (např. fosfátové pufrů) <sup>46</sup>. Na základě těchto požadků byly vybrány dva typy pufrů: 50 mmol/dm<sup>3</sup> triethylamin/CO<sub>2</sub> (pH 7,4) jako reakční prostředí pro působení síťovacích činidel DSS a DSG, jejichž optimální pH leží mezi hodnotami 7,0 a 9,0, a 50 mmol/dm<sup>3</sup> pyridin/Cl (pH 6,0) pro reakci zprostředkovanou činidlem nulové vzdálenosti EDC, které působí nejúčinněji v pH 4,5 až 6,0 <sup>52</sup>. Na druhé straně musí být samozřejmě použité podmínky v souladu s biologickou aktivitou studovaných proteinů, potažmo s jejich 3D strukturou. Proto byl vliv pufrů na aktivitu NADPH:CYP reductasy a na působení MFO systému testován metabolickými studii (kap. 4.2., kap. 4.3.).

Jak demonstruje graf na Obr. 42 (str. 60), při **stanovení NADPH:cytochrom c reductasové aktivity CPR** se lépe osvědčil pufr triethylaminový, v pyridinovém byla aktivita CPR výrazně potlačena. Získané hodnoty byly porovnávány s aktivitou reductasy v 50 mmol/dm<sup>3</sup> fosfátovém pufru (pH 7,4), který nejlépe simuluje prostředí v buňce. Na snížení aktivity v obou testovaných pufrech nese patrně vinu jednak změna pH, při kte-

ré se mění náboj proteinů, což ovlivňuje jejich iontovou interakci, jednak typ pufru, který může svým složením narušovat nebo inhibovat reakci.

Ve fosfátovém a triethylaminovém pufru se **na aktivitě CPR příznivě projevila přítomnost rekonstituované membrány** (Tab. 4, str. 62). Komunikace mezi redoxními partnery je zřejmě usnadněna ukotvením CPR do membrány, podél níž se cytochrom c může pohybovat prostřednictvím polárních interakcí, jako je tomu při jeho účasti v elektronovém transportu respiračního řetězce<sup>78</sup>. V pyridinovém pufru se trend nepotvrdil, avšak chyba stanovení je natolik velká, že získanou hodnotu nelze považovat za relevantní.

**V rekonstituovaném systému CYP 2B4:CPR:DLPC** bylo v případě triethylaminového pufru dosaženo obdobných výsledků jako při stanovení cytochrom c reduktasové aktivity (Obr. 45, str. 64). Pro stanovení v pyridinovém pufru se nepodařilo získat smysluplné hodnoty. Ve fosfátovém a triethylaminovém pufru byl zjišťován také optimální molární poměr CYP 2B4:CPR (Obr. 46, str. 64, Obr. 47, str. 65). Nejvyšší hodnoty aktivity byly získány pro poměry 3:1 až 1:3. Protože žádná z maximálních hodnot příliš nepřevyšovala aktivitu stanovenou pro poměr 1:1, bylo rozhodnuto k dalším experimentům používat ekvimolární množství proteinů.

NADPH:cytochrom c reduktasová aktivita CPR byla sledována také v prostředí s různou koncentrací soli, tedy v závislosti na iontové síle roztoku (Obr. 43, str. 61). **Optimalizací byla získána koncentrace NaCl 150 mmol/dm<sup>3</sup> s nejvyšší aktivitou systému.** Vliv iontové síly se potvrdil také při použití síťovacích reakcí (Obr. 55, str. 71) – již v prostředí 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaCl dochází ke stimulaci tvorby vysokomolekulárních forem proteinů v důsledku ovlivnění protein-proteinové interakce. Tyto výsledky korespondují s prací Voznesenskyho a Schenkmana<sup>16</sup>, kteří na základě kinetických měření zjistili, **že interakce CPR s CYP 2B4 je inhibována působením elektrostatických sil (repulzí nábojů), které jsou v prostředí zvýšené iontové síly potlačeny.**

### 5.3. Studium enzymů MFO systému pomocí chemických modifikací a hmotnostní spektrometrie

Vybrané proteiny – cytochrom P450 2B4, NADPH: cytochrom P450 – reduktasa a cytochrom b<sub>5</sub> – byly zkoumány pomocí biokonjugačních technik (kap.4.4.), které slouží ke studiu terciární struktury molekul pomocí intramolekulárních můstků či k identifikaci



míst zesílení po vytvoření intermolekulárních vazeb. Jejich použití není ve studiu MFO systému novinkou – pomocí intramolekulárního zesíťování byl např. sledován vliv mikrookolí na terciární strukturu CYP 2B4<sup>79</sup>, tvorba heterodimerů (CYP-cyt b<sub>5</sub>, CPR-cyt b<sub>5</sub>, CYP:CPR) pomocí EDC je popisována v práci Tamburiniho a kol.<sup>80</sup> Janssonová a Schenkman, identifikovali metodou Western blot heterodimery CYP 1A2, příp. CYP 2B4 s cytochromem b<sub>5</sub>, získané taktéž inkubací s EDC<sup>81</sup>. Jako nejvýhodnější se pro identifikaci vysokomolekulárních produktů síťovací reakce jeví spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou, které navíc umožňuje přesně určit místo zesílení a tím se ve studiu 3D struktury makromolekul stává stále více populární<sup>38</sup>.

Protože izolací se nepodařilo získat elektroforeticky homogenní CYP 2B4, preparát tohoto proteinu byl pro studie darován školitelem diplomové práce. Pro některé experimenty byl použit také darovaný preparát NADPH:CYP reductasy.

### **5.3.1. Intramolekulární síťovací reakce**

Intramolekulárními síťovacími studii byly zkoumány enzymy cytochrom P450 2B4 a cytochrom b<sub>5</sub>. Pro **CYP 2B4** byla použita homobifunkční činidla DSS a DSG. V případě obou činidel se na výsledných gelech objevují proužky monomeru se zdánlivě nižší molekulovou hmotností než náleží nemodifikovanému CYP 2B4 (Obr. 48, Obr. 49, str. 66). Příčinou je pravděpodobně intramolekulární zesílení proteinu, které brání úplnému rozbalení molekuly při denaturaci, v důsledku čehož dochází ke změně elektroforetické pohyblivosti proteinu. Výše popsané studie byly provedeny v přítomnosti i v absenci substrátu CYP 2B4, diamantanu. **Přítomnost diamantanu se projevila omezenou tvorbou nežádoucích vícemerů a kvantitativním nárůstem modifikovaného monomeru.** Podobný efekt byl publikován ve výše zmíněné práci Janssonové a Schenkmana – benzfetamin jakožto substrát CYP 2B4 omezoval nespecifickou interakci CYP a cytochromu b<sub>5</sub> a měl pozitivní vliv na tvorbu heterodimeru<sup>81</sup>. Vysvětlením by mohla být změna konformace CYP 2B4, která ve vazbě se substrátem přechází z otevřené na uzavřenou. Následkem toho patrně dochází k přemístění některých reaktivních skupin z povrchu proteinu do hůře dostupných poloh, ve kterých se nemohou účastnit nespecifických interakcí s okolními molekulami a můžeme tudíž očekávat přednostní tvorbu intramolekulárních můstků.

Pro **cytochrom b<sub>5</sub>** byla k zesíťování použita N-hydroxysukcinimidová činidla DSS a DSG a zároveň byl proveden experiment také s použitím karbodiimidu EDC.

Jak je vidět z elektroforeogramu (Obr. 52, str. 68), během působení činidla DSS ani DSG nedochází u žádné z testovaných koncentrací k tvorbě vícemerních forem proteinu. **Reakce by proto mohla být v budoucnu využita pro přípravu vzorků k „top-down MS“ analýze a identifikaci intramolekulárně propojených aminokyselinových zbytků pomocí FT-ICR MS.**

V případě použití EDC dochází se zvyšující se koncentrací činidla k tvorbě nejprve dimeru cytochromu  $b_5$  a následně také k vytváření vícemerních forem (Obr. 53, str. 69). Rozdíl oproti výsledku získanému experimentem se sukcinidy (viz výše) může být způsoben použitím odlišných typů pufrů a pH, umístěním aminokyselinových zbytků účastnících se příslušných síťovacích reakcí v závislosti na orientaci proteinu v membráně, a především několikanásobně vyšší koncentrací EDC (52 až 520 mmol/dm<sup>3</sup>) ve srovnání s použitými koncentracemi DSS a DSG (1 až 20 mmol/dm<sup>3</sup>). Ke zvýšení vypovídající hodnoty je v budoucnu plánováno opakování experimentu s nižšími koncentracemi EDC.

### **5.3.2. Intermolekulární síťovací reakce**

Realizace navržených síťovacích reakcí k tvorbě kovalentní vazby mezi cytochromem P450 a NADPH:CYP reduktasou prostřednictvím činidla EDC byla komplikována zejména dvěma faktory – potlačením interakce proteinů v pyridinovém pufru, které bylo prokázáno také metabolickými studii (kap.5.2.), a přítomností iontového detergentu cholátu sodného v některých proteinových preparátech. Cholát, jakožto látka iontového charakteru, může interferovat při hmotnostní analýze MALDI-TOF<sup>46</sup>, především však obsahuje ve své struktuře karboxylovou skupinu, se kterou EDC reaguje, a tak se snižuje jeho koncentrace v roztoku. Proto bylo třeba detergent před experimenty ze vzorků odstraňovat.

Pouhá centrifugace vzorků obsahujících proteiny ukotvené v micelách (DLPC) s následným odstraněním supernatantu a rozpuštěním micel ve vhodném pufru k odstranění detergentu nestačila, proto byly vytipovány a testovány další dvě metody.

První z nich je převod proteinů do pyridinového pufru opakovanou filtrací na membráně Microcon YM10 působením odstředivé síly. Póry membrány propouštějí látky do molekulové hmotnosti 10 kDa, proto malá molekula cholátu sodného ( $M_r = 430$ ) membránou projde a detergent se tak oddělí od bílkovin, které zůstanou v retenátu a mohou být naředěny na potřebnou koncentraci. Ukázalo se, že membránu je vhodné používat opako-

vaně, protože po několikerém použití je jejich povrch již vysycen proteinem a snižují se ztráty proteinu způsobené nespecifickou adsorpcí na membránu.

Druhý způsob byl inspirován prací Anzenbachera a kol.<sup>62</sup> Jedná se o adsorpci detergentu na silikagel s následným odstraněním silikagelu z roztoku proteinu centrifugací. Nevýhodou této alternativy je v porovnání s filtrací vyšší časová náročnost a nebezpečí ztráty proteinu vysrážením na přebytečném silikagelu. Metoda je vhodnější pro odstanění detergentu bezprostředně po izolaci enzymu (jak byla používána právě Anzenbacherem a spolupracovníky), kdy můžeme snáze určit obsah detergentu a lépe odhadnout potřebné množství silikagelu. Proto jsme tuto metodu použili právě při odstranění detergentu z námi purifikovaných preparátů. K odstranění detergentu ze vzorků před použitím síťovacího činidla byla používána metoda filtrace.

Pro systém **CYP 2B4 – NADPH:CYP reductasa** byla provedena řada optimalizací, z nichž jsou v této práci publikovány pouze ty, které poskytovaly uspokojivé výsledky. Byla testována koncentrace EDC v reakční směsi, kdy teprve při použití vysokého nadbytku činidla (250-ti násobek koncentrace proteinů) docházelo k tvorbě vícemerních forem, avšak pouze omezeně (Obr. 54, str. 70). Dále, na základě výsledků metabolických studií, kterými bylo prokázáno, že v pyridinovém pufru, pH 6,0 je potlačena aktivita CPR (kap. 5.2.), byl experiment proveden ve fosfátových pufrech pH 6,0; 7,0 a 7,5, vznik vysokomolekulárních forem proteinu však nebyl pozorován ani u nich. Stejně tak se výtěžek reakce nepodařilo zvýšit ani přidáváním EDC v časové závislosti. **Pozitivní vliv na reakci měl 2 % (v/v) přídavek organického rozpouštědla acetonitrilu, který zřejmě optimálně ovlivnil hydrofobní interakci proteinů (Obr. 55, str. 71), a také zvýšení iontové síly (Obr. 55, str. 71), jež snižuje repulzi nábojů mezi reakčními partnery, jak je již popsáno výše (kap. 5.2.).**

Protože NADPH:CYP reductasa je schopna redukovat vedle CYP a cytochromu c také cytochrom  $b_5$ <sup>82</sup>, a cytochrom  $b_5$  se může účastnit reakčního mechanismu MFO systému jako donor druhého elektronu<sup>32</sup>, byla prostřednictvím EDC zkoumána interakce CYP 2B4 a NADPH:CYP reductasy s tímto hemoproteinem.

Pro reakci **CPR – cytochrom  $b_5$**  byly použity koncentrace činidla 0,02, 0,03 a 0,04 mg/ml. Již při použití nejnižší jmenované koncentrace se na elektroforeogramu (Obr. 56, str. 72) objevuje **proteinový proužek s relativní molekulovou hmotností odpovídá-**

**jší heterodimeru CPR a cytochromu b<sub>5</sub>, který se zvyšující se koncentrací EDC roste.** V dolní části gelu se zároveň objevují proužky, které patrně náležejí dimeru cytochromu b<sub>5</sub>. Tento homodimer však vzniká spontánně i bez působení činidla. Důvodem je zřejmě použitá koncentrace cytochromu b<sub>5</sub> (8 μmol/dm<sup>3</sup>, poměr vůči CPR 8:1), která zvyšuje pravděpodobnost vzájemného přiblížení molekul během inkubace.

Vzniklý heterodimer CPR – cytochrom b<sub>5</sub> se bohužel svou pozicí v gelu překrývá s kontaminantou CPR methylen:tetrahydrofolát-dehydrogenasou, proto jej nelze analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. V budoucnu je proto plánováno provedení popsané reakce s nově izolovanou nekontaminovanou CPR, které povede k MS identifikaci místa interakce proteinů.

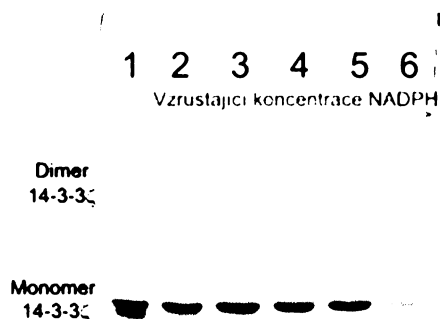
Druhým systémem, ve kterém bylo síťovací činidlo EDC úspěšně uplatněno, byl komplex **CYP 2B4-cytochrom b<sub>5</sub>**. Protože cytochrom b<sub>5</sub> při katalýze předává elektron přímo CYP musí docházet k těsné interakci těchto dvou proteinů. Např. Gao a kol. již našli místo amidové vazby vytvořené prostřednictvím EDC mezi cytochromem b<sub>5</sub> a CYP 2E1<sup>83</sup>. V této práci se podařilo **pomocí SDS-elektroforézy prokázat tvorbu heterodimeru mezi CYP 2B4 a cytochromem b<sub>5</sub>**, mimoto však dochází ke vzniku vícemerů vlivem nespecifických interakcí, což výtěžek reakce snižuje. V budoucnu se počítá s použitím vysoce purifikovaných proteinových preparátů a s MS analýzou vysokomolekulárních produktů.

Jelikož **cytochrom b<sub>5</sub>** značně ovlivňuje působení MFO systému, a v této práci byla potvrzena jeho interakce s CYP 2B4 i CPR (viz výše), byl sledován také jeho **vliv na intermolekulární síťovací reakci v systému CYP – CPR**. Experimentem bylo prokázáno, že přítomnost tohoto proteinu je pro úspěšný průběh reakce velmi důležitá. Jak je vidět z výsledku SDS-PAGE, **vysokomolekulární formy proteinů vznikají pouze ve vzorcích, ve kterých se cytochrom b<sub>5</sub> nachází (Obr. 58, str.74, dráha 2-7).**

Při reakci byla zkoumána také přítomnost substrátu CYP 2B4 diamantanu a redoxního partnera CPR NADPH. V případě diamantanu byl potvrzen výsledek získaný při intramolekulárních síťovacích studiích CYP 2B4 (kap. 5.3.1.), tedy že diamantan potlačuje nespecifickou interakci mezi proteinovými molekulami (Obr. 58, str.74, dráha 2-4).

NADPH byl do reakce přidán jako další složka MFO systému, abychom zjistili, zda jeho přítomnost bude mít na síťovací reakci prokazatelný vliv. Struktura koenzymu obsahuje primární amin, který v průběhu reakce s EDC kompetuje s aminy aminokyselinových

zbytků. Jeho interferenční vliv byl prokázán omezením tvorby dimerních forem proteinu 14-3-3 $\zeta$ , který s NADPH neinteraguje (Obr. 60)<sup>65</sup>, proto byly pro MFO systém vybrány nejnižší testované koncentrace, 2 a 5 mmol/dm<sup>3</sup>.



**Obr. 60 – Působení NADPH na intermolekulární síťovací reakci proteinu 14-3-3 $\zeta$**

1 - 5  $\mu$ M 14-3-3 $\zeta$ , 0,4 mg/ml EDC  
 2 - 5  $\mu$ M 14-3-3 $\zeta$ , 0,4 mg/ml EDC, 1 mM NADPH  
 3 - 5  $\mu$ M 14-3-3 $\zeta$ , 0,4 mg/ml EDC, 2 mM NADPH  
 4 - 5  $\mu$ M 14-3-3 $\zeta$ , 0,4 mg/ml EDC, 5 mM NADPH  
 5 - 5  $\mu$ M 14-3-3 $\zeta$ , 0,4 mg/ml EDC, 10 mM NADPH  
 6 - 5  $\mu$ M 14-3-3 $\zeta$ , 0,4 mg/ml EDC, 20 mM NADPH  
 12 % PAGE, barvení CBB R250

**Přidání NADPH k systému CYP 2B4-CPR-cytochrom b<sub>5</sub> se projevilo kvantitativní i kvalitativní změnou vysokomolekulárních produktů na polyakrylamidovém gelu** (Obr. 58, str.74, dráha 3, 4, 5, 6). Amidová vazba mezi proteiny tedy pravděpodobně vzniká spojením jiných aminokyselinových zbytků než při absenci koenzymu. Inhibiční vliv, kterým NADPH působil při síťovací reakci 14-3-3 $\zeta$ , je v MFO systému pozorovatelný pouze u vyšší použité koncentrace. Koenzym NADPH nejspíše interaguje s CPR, čímž dochází ke snížení jeho aktuální koncentrace v roztoku, a díky tomu k snížení nežádoucí reakce s činidlem.

V systému CYP 2B4-CPR bez cytochromu b<sub>5</sub> nedochází k tvorbě žádných vícemerních produktů síťovací reakce (Obr. 58, str.74, dráha 8, 9, 10), a jejich tvorbu pozitivně neovlivňuje ani NADPH. **Pouze současná přítomnost cytochromu b<sub>5</sub> a NADPH se tedy jeví jako nezbytnou pro úspěšné použití biokonjugačních technik a hmotnostní spektrometrie ke studiu MFO systému.**

## 6. ZÁVĚR

- Izolací z jater pokusného zvířete králíka domácího premedikovaného fenobarbitalem byly získány enzymové preparáty CYP 2B4, CYP 1A2, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>. U preparátů NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub> bylo dosaženo dostatečné elektroforetické homogenity pro použití biokonjugačních technik. Ostatní preparáty byly ponechány k metabolickým studiím pro optimalizaci podmínek síťovacích reakcí.
- Na základě výsledků jednotlivých separačních kroků byly navrženy změny v izolačním postupu.
- Spektrofotometrickým měřením cytochrom c-reduktasové aktivity NADPH:CYP reduktasy byly testovány pufrы vhodné pro hmotnostně spektrometrickou analýzu. Byl sledován vliv pH, typu pufru a iontové síly na enzymatickou aktivitu (interakci proteinů).
- Pomocí specifické O-dealkylace 7-pentoxyresorufinu cytochromem P450 2B4 a fluorimetrickou detekcí produktu byla testována aktivita MFO systému v prostředí s různým pH a ve vytipovaných pufrách kompatibilních se síťovacími činidly. Byl nalezen optimální poměr CYP 2B4:CPR, dále používaný pro studium proteinů pomocí chemických modifikací.
- Na základě SDS-elektroforézy byly optimalizovány podmínky intramolekulární síťovací reakce CYP 2B4 a cytochromu b<sub>5</sub> s použitím modifikačních činidel DSS a DSG; v případě cytochromu b<sub>5</sub> také s použitím činidla EDC. V případě CYP 2B4 bylo pozorováno potlačení nespecifických interakcí v přítomnosti substrátu CYP 2B4 diamantanu.
- SDS-elektroforézou byla prokázána tvorba vysokomolekulárních produktů síťovací reakce zprostředkované síťovacím činidlem nulové vzdálenosti (EDC) pro systémy CPR-cytochrom b<sub>5</sub>, CYP 2B4-cytochrom b<sub>5</sub> a CYP 2B4-CPR-cytochrom b<sub>5</sub>. V posledním jmenovaném bylo pozorováno snížení nespecifických interakcí v přítomnosti substrátu CYP 2B4 diamantanu a vznik produktů specifické molekulové hmotnosti v přítomnosti substrátu CPR NADPH. Naproti tomu v systému CYP 2B4-CPR docházelo k vytváření vysokomolekulárních forem pouze omezeně a nepodařilo se jej stimulovat ani působením NADPH, čímž byl jednoznačně prokázán vliv cytochromu b<sub>5</sub> na interakci CYP 2B4 a NADPH:CYP reduktasy.

## 7. SEZNAM ZKRATEK

7-PR	7-pentoxyresorufin
A	absorbance
$A_{xyz}$	absorbance při vlnové délce XYZ nm
a	aktivita enzymu
ACN	acetonitril
ADP	adenosyldifosfát
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. bicinchoninic acid)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
c	koncentrace (blíže specifikovaná v textu)
CBB	briliantová modř (z angl. Coomassie Brilliant Blue)
CCA	$\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
CM	karboxymethyl
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
cyt $b_5$	cytochrom $b_5$
cyt c	cytochrom c
Da	dalton, jednotka molekulové hmotnosti
DEAE	diethylaminoethyl
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DMF	dimethylfluorid
DMSO	dimethylsulfoxid
DSG	disukcinimidglutarát
DSS	disukcinimidsuberát
DTT	dithiotreitol
E	kinetická energie (J)
E-911	emulgen-911
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid
EtOH	denaturovaný ethanol
$\epsilon$	molární absorpční koeficient ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FT-ICR	iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier transformation – ion cyclotron resonance)
g	hmotnostní zrychlení ( $\text{s}^{-1}$ )
Glc-6-DHD	glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
Glc-6-P	glukosa-6-fosfát
Glu	kyselina glutamová
HAP	hydroxylapatit
HOAc	kyselina octová
l	délka kyvety
Leu	leucin
Lys	lysin
$\lambda$	vlnová délka (nm)
m	hmotnost

---

M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
MALDI-TOF	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice-měření doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption ionization – time of flight)
MFO	oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxygenases)
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnost/náboj
n	látkové množství (mol)
NaAc	octan sodný)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCBI	z angl. National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid (z angl. phenylmethanesulfonyl-fluorid)
RPM	otáčky za minutu (z angl. rotates per minutes)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu (z angl. sodium dodecylsulfate polyakrylamide gel electroforesis)
t	čas
TOF	viz MALDI-TOF
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	tryptofan
UDP	uridyldifosfát
v	rychlost
V	objem ( $\text{dm}^3$ )
Vit. E	vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)
v/v	poměr objem/objem
Val	valin
w/v	poměr hmotnost/objem



**8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. Stiborová, M, Hudeček, J, Páca, J, jr., Martínek, V., Páca, J: Chem.listy, 98, 876-890 (2004)
2. Melenová, I, Demnerová, K: Chem. listy, 98, 908-915 (2004)
3. Arlt, WM, Stiborova, M, Hewer, A, Schneider, HH, Phillips, DH: Cancer. Res., 63, 2752-2761 (2003)
4. Peterson JA, Graham, SE: Structure, 6, 1079-1085 (1998)
5. Sevrioukova, IF, Zhang, H, Peterson, JA, Poulos, TL: Prot. Natl. Acad. Sci., 96, 1863-1868 (1999)
- 6 Scott, EE, White MA, He, YA, Johnson EF, Stout, D, Halpert, JR: J. Biol. Chem., 279, 27294-27301 (2004)
7. Young, MM, Tang, N, Hempel, JC, Oshiro, CM, Taylor, EW, Kuntz, ID, Gibson, BW, Dollinger, G: Prot. Natl. Acad. Sci., 97, 5802-5806 (2000)
8. Jakoby WB, Ziegler DM: J.Biol.Chem., 265, 20715-20718 (1990)
9. Smith, DA, Ackland, MJ, Jones, BC: Drug.Disc.Today, 2, 406-414 (1997)
10. Ohkawa, H, Imaishi, H, Shiota, N, Yamada, T, Inui, H, Ohkawa H: Plant Biotechnology 15: 173-176 (1998)
11. Omura, T, Sato, R: J.Biol.Chem., 239, 2379-2385 (1964)
12. Porter, TD, Coon MJ: J.Biol.Chem., 266, 13469-13472 (1991)
13. Coon, MJ, van der Hoeven, TA, Kaschnitz, RM, Strobel, HW: Ann. N.Y. Acad. Sci., 212, 44-457 (1973)
14. Heinemann, FS, Ozols, J: J.Biol.Chem, 258, 4195-4201 (1983)
15. Tarr, GE, Black, SD, Fujita, VS, Coon, MJ: Proc. Natl. Acad. Sci, 80, 6552-6556 (1983)
16. Voznesensky, AI, Schenkman, JB: J.Biol.Chem., 269, 15724-15731 (1994)
17. Nelson,DR, Strobel, HW: J.Biol.Chem., 263, 6038-6050 (1988)
18. Vastis, KP, Peng MH, Coon, MJ: J.Inorg.Biochem., 91, 542-553 (2002)
19. Vastis, KP, Peng MH, Coon, MJ: Arch. Bioch.Bioph., 434, 128-138 (2005)
20. Chang, YT, Stiffelaman, O B, Vakser IA, Loew GL, Bridges, A, Waskell L: Prot. Eng., 10, 119-129 (1997)
21. Scott, EE, He, YA, Wester, MR, White, MA, Chin, ChC, Halpert, JR, Johnson EF, Stout CD:, Proc. Natl. Acad. Sci., 100, 13196-13201 (2003)
22. Hodek, P, Sopko, B, Antonovič, L, Šulc, M, Novák, P, Strobel, HW: Gen. Physiol. Biophys., 23, 467-488 (2004)
23. Horecker, BL: J. Biol. Chem., 183, 593-605 (1950)
24. Epoch, HG, Strittmatter, P: J. Biol. Chem., 254, 8976-8981 (1979)
25. Vermilion, JL, Coon, MJ: 253, J. Biol. Chem., 8812-8819 (1978)
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=127965>
27. Black, SD, Coon, MJ: J. Biol. Chem., 257, 5929-5938 (1982)
28. Wang, M, Roberts, DL, Paschke, R, Shea, TM, Masters, BSS, Kim, JP: Prot. Nat. Acad. Sci., 94, 8411-8416 (1997)
29. <http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm>
30. <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>
31. Oshino, N, Omak, Y, Sato, R.: J. Biochem. (Tokyo), 69, 155-67 (1971)
32. Hildebrandt, A, Estabrook, RW: Arch. Biochem. Biophys., 143, 66-70 (1971)
33. Vergeres, G, Ramsden, J, Waskell, L: J. Biol. Chem., 270, 3414-3422, (1995)
34. Clarke, TA, Im, SCh, Bidwai, A, Waskell, L: J. Biol. Chem., 279, 36809-36818 (2004)
35. <http://metallo.scripps.edu/promise/CYTB5.html#PDB>

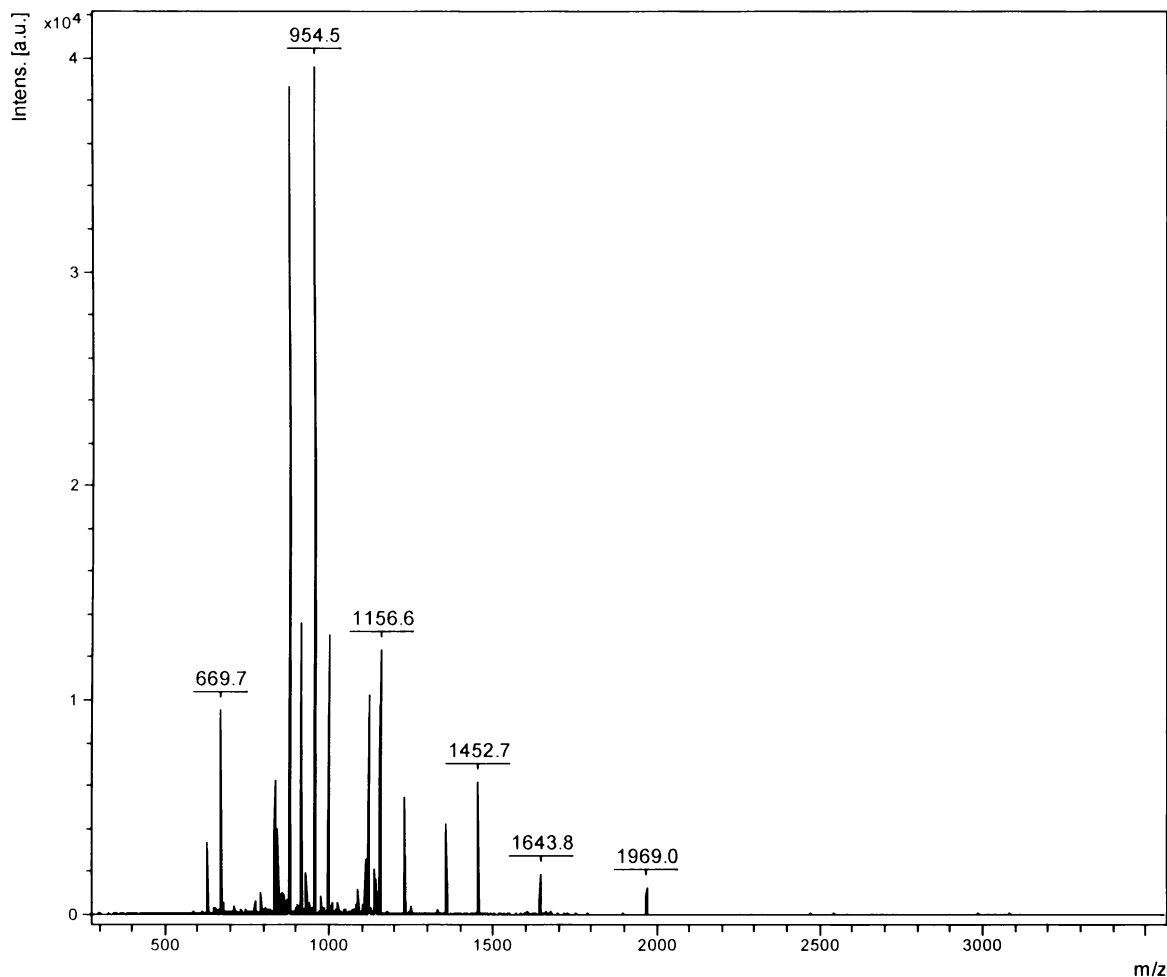
36. Vergeres, G, Waskell, L: *Biochemie*, 77, 604-620 (1995)
37. *Current Protocols in Protein Science* (1996) by John Wiley & Sons, Inc., contributed by David W. Speicher
38. Back, JW, de Jong, L, Muijsers, AO, de Koster, CG: *J.Mol.Biol.*, 331, 303-313 (2003)
39. <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2002/index.html>
40. Karas, M, Hillenkamp, F: *Anal. Chem.*, 60, 2301-2303 (1988)
41. Kadlčík, V, Kodíček, M, Hassmann, M: *Chem. Listy*, 96, 618-623 (2002)
42. Henzel, WJ, Watanabe C, Stults, JT: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 931-942 (2003)
43. <http://www.unb.br/cbsp/paginiciais/profound.htm>
44. <http://www.matrixscience.com/cgi/searchform.pl?FOR-MVER=2&SEARCH=PMF>
45. Lenčo, J, Stulík, J: *Chem. Listy*, 98, 264-267 (2004)
46. Sinz, A: *J. Mass Spectrom.*, 25, 662-682 (2006)
47. Šedo, O, Havel, J: *Chem. Listy*, 97, 109-113 (2003)
48. Fenn, JB, Mann, M, Meng, CK, Wong, SF, Whitehouse, CM: *Mass Spectrom. Rev.*, 9, 37-70 (1990)
49. Sinz, A: *J. Mass Spectrom.*, 38, 1225-1237 (2003)
50. Back, JW, de Jong, L, Muisers, AO, de Koster, ChG: *J. Mol. Biol.*, 303-313 (2003)
51. <http://www.piercenet.com>
52. Hermanson, GT (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois): *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996
53. Wiechelman, KJ, Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: *Anal. Biochem.*, 175, 231-237 (1988)
54. Omura, T, Sato, R: *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378 (1964)
55. Sottocasa, GL, Kuylenstierna, B, Ernster, L, Bergstrand, A: *J. Cell Biol.*, 32, 415-438 (1967)
56. Vermilion, JL, Coon, MJ: *J. Biol. Chem.*, 253, 2694-2704 (1978)
57. Hagihara, B, Sato, N, Yamanaka, T: „*The enzymes 9*“ (Ed. Boyer, P. D.), Academic Press, New York, 549-593 (1975)
58. Laemmli, UK: *Nature*, 227, 680-685 (1970)
59. Sambrook, J, Russell, DW: *Molecular Cloning*, vol. 3 (2001), Cold Harbor Laboratory Press, NY, USA
60. Šulc, M: *Disertační práce*, PřF UK, Praha (2002)
61. Janouchová, K: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2005)
62. Anzenbacher, P, Šípal, Z, Hodek, P: *Biomed. Biochim. Acta*, 43, 1343-1349 (1984)
63. Burke, MD, Thompson, S, Elcombe, CR, Halpert, J, Haparanta, T, Mayer, RT: *Biochem. Pharmacol.*, 34, 3337-3345 (1985)
64. Shenkman JB, Jansson, I: *Pharmacol. Ther.*, 97, 132-152 (2003)
65. Pešlová, K: *ústní sdělení*
66. Estabrook, RW: *FASEB J.*, 10, 202-204 (1996)
67. Estabrook, RW: *Drug. Metab. Dispos.*, 31, 1461-1473 (2003)
68. Sakaki, T, Inouye, K: *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 583-590 (2000)
69. Gray, RD: *J. Biol. Chem.*, 257, 1086-1094 (1982)
70. Shimada, T, Guengerich, FP: *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 288-294 (2006)
71. Danko, IM, Chaschin, NA: *Exp. Oncol.*, 27, 248-256 (2005)
72. Akkilla, E, Ovrubo, S, Botnen, IV, Otter, C, Ingelman-Sudberg, M: *Cancer Res.*, 65, 5105-5111 (2005)
73. Aimová, D, Stiborová, M: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc, Czech Repub.*, 149, 437-440 (2005)
74. Madeira, M, Levin, M, Chany, TKH, Mirfazaelian, A, Bellward, GD: *Drug. Metab. Dispos.*, 32, 460-467 (2004)

75. Mestres, J: *Proteins*, 58, 596-609 (2005)
76. Poulos, TL: *Prot. Natl. Acad. Sci*, 100, 13121-13122 (2003)
77. Kotrbová, V: *Diplomová práce*, PŘF UK, Praha (2005)
78. Voet D, Voet JG: *Biochemie*, Victoria, Praha 1995
79. Uvarov, VYu, Tretiakov, VE, Leshchenko, AV, Rukavishnikov, IG, Dzhuzenova, CS, Tretiakova, LZ, Archakov, AI: *Eur. J. Biochem.*, 181, 391-396 (1989)
80. Tamburini, PP, MacFarquahar, S, Schenkman, JB: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 134(2), 519-526 (1986)
81. Jansson, I, Schenkman, JB: *Arch. Biochem. Biophys.*, 235, 265-269 (1996)
82. Enoch, HG, Strirmatter, P: *J. Biol. Chem.*, 254, 8976-8971, 1979
83. Gao Q, Doneanu CE, Shaffer SA, Adman ET, Goodlett DR, Nelson, SD: *J. Biol. Chem.*, 281 (29), 20404-20417 (2006)

## PŘÍLOHA 1 - Identifikace produktů izolace

### 1. Identifikace preparátu CYP získaného purifikací na koloně hydroxylapatitu

Preparát, jehož hmotnostní spektrum je znázorněno na Obr. P1 byl porovnáním hodnot m/z s databází NCBI identifikován jako CYP 1A2 (Obr. P2).



Obr. P1 – Hmotnostní spektrum CYP 1A2

## ProFound - Search Result Summary

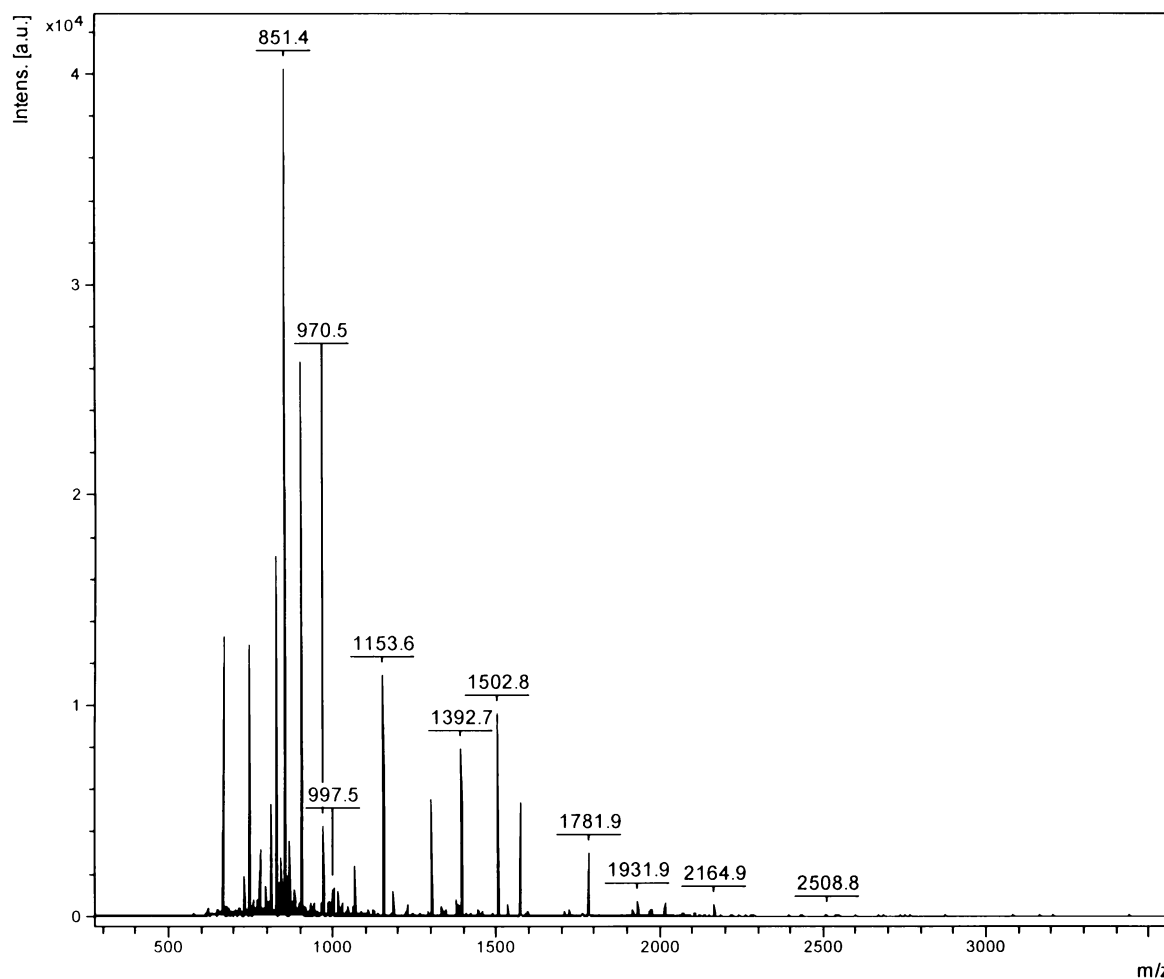
Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search B948E1D2-01D4-3ABABD22 [260658 sequences searched]										
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)				%	pI	kDa	@
+1	1.0e+000	<u>1.96</u>	T gi 117147 sp P00187 CP12_RABIT Cytochrome P450 1A2 (CYPIA2) (P450 isozyme 4) (P450-PM4) (P450 LM4)				<u>27</u>	9.7	58.32	@

Obr. P2 – Identifikace proteinu pomocí programu ProFound

## 2. Identifikace preparátu CYP získaného purifikací na koloně hydroxylapatitu 2b

Preparát, jehož hmotnostní spektrum je znázorněno na Obr. P3 byl porovnáním hodnot  $m/z$  s databází NCBI identifikován jako CYP 2B4 Obr. P4.



Obr. P3 - Hmotnostní spektrum CYP 2B4

## ProFound - Search Result Summary

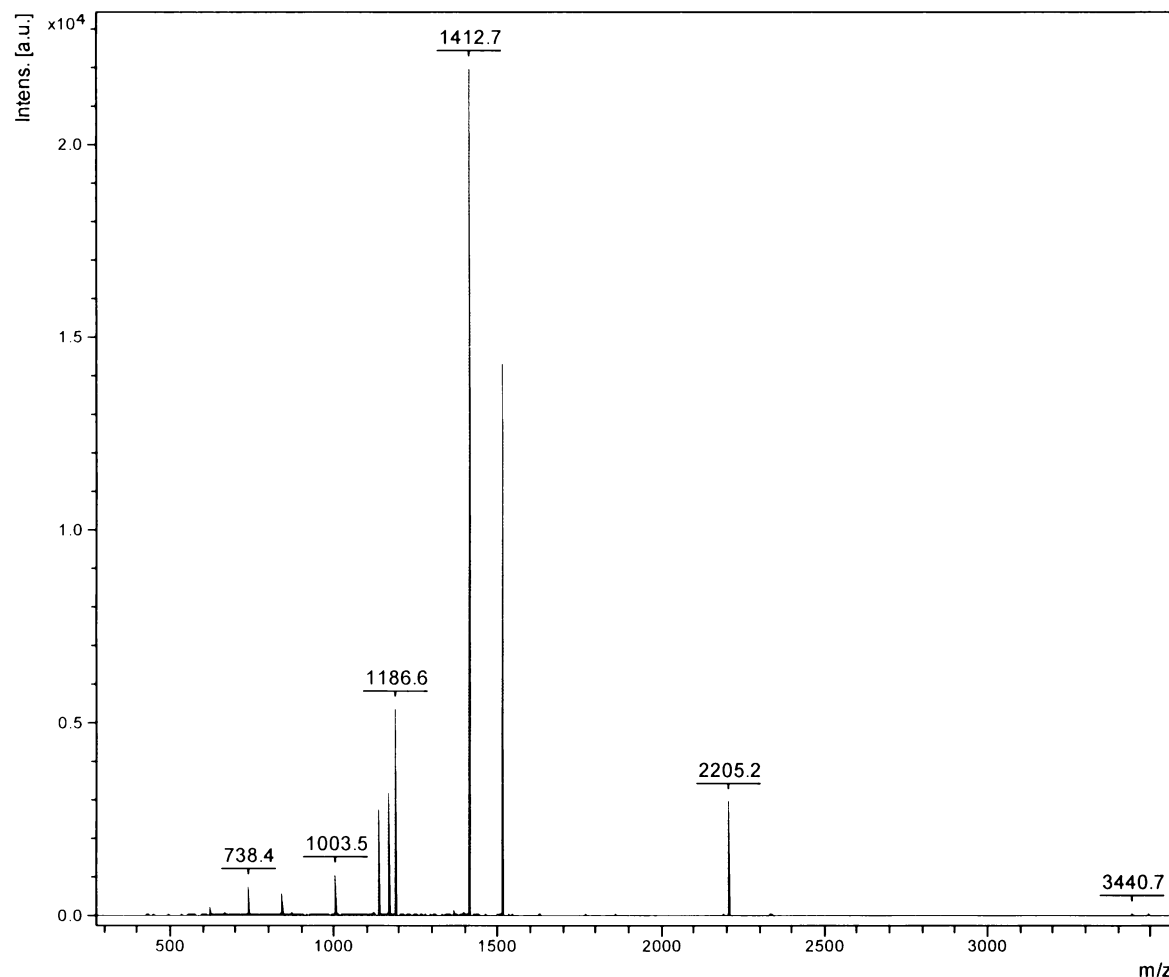
Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search B723159B-0424-386ABAD2 [260662 sequences searched]							
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	@
+1	1.0e+000	2.24	T <a href="#">gi 320075 pir S31277</a> cytochrome P450 2B4-B1 - rabbit	27	9.1	55.67	@

Obr. P4 - Identifikace proteinu pomocí programu ProFound

### 3. Identifikace preparátu cytochromu b<sub>5</sub> získaného purifikací na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 3

Preparát, jehož hmotnostní spektrum je znázorněno na Obr. P5 byl porovnáním hodnot m/z s databází NCBI identifikován jako cytochrom b<sub>5</sub> Obr. P6.



Obr. P5 - Hmotnostní spektrum cytochromu b<sub>5</sub>

## ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search B9B4E109-0168-3B26BD8E [260664 sequences searched]							
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	®
+1	1.0e+000	1.62	<a href="#">T gi 48976129 ref NP_001001770.1 </a> cytochrome b-5 [Sus scrofa]	44	5.0	15.29	®

Obr. P6 - Identifikace proteinu pomocí programu ProFound

Pozn.: Nízká hodnota Est'd Z, která odpovídá identifikaci proteinu s 90 % pravděpodobností je zapříčiněna nízkou molekulovou hmotností cytochromu b<sub>5</sub> a tudíž malým počtem peptidů, které vznikají proteolytickým štěpením

