

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Příprava mutantních forem cytochromu b<sub>5</sub> s  
fotoreaktivními aminokyselinami a jejich síťování s  
vazebnými partnery**

**Preparation of cytochrome b<sub>5</sub> mutants containing  
photoreactive amino acids, and their crosslinking with the  
interaction partners**

Bakalářská práce

David Landl

Školitel: RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

Praha 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Ječmena, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

## **Poděkování**

V prvom rade by som rád poďakoval svojmu školiteľovi RNDr. Tomášovi Ječmenovi, Ph.D. za možnosť pracovať pod jeho vedením, trpezlivosť s častými dotazmi a pri opravovaní mojich chýb. Vždy mi ochotne pomohol a poradil, keď to bolo potrebné.

Ďalej by som chcel poďakovať Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. a Mgr. Renatě Ptáčkové Ph.D. za cenné rady, pripomienky a poskytnutie užitočných informácií. Som rád, že som mohol pracovať vo veľmi príjemnom kolektíve v ktorom humor rozhodne nechýba.

## Abstract

Cytochrome  $b_5$  is an electron transport protein of a clinically prominent mixed-function oxygenase (MFO) system. This system participates in the first stage of xenobiotic biotransformation. The hydrophilicity of xenobiotics is increased by introduction of an oxygen atom into their structure. The MFO system also activates or deactivates certain drugs and carcinogens. Cytochrome  $b_5$  affects reactions catalyzed by the terminal oxygenases of the system - cytochromes P450. Electrons are donated to cytochrome  $b_5$  by redox partners NADH:cytochrome  $b_5$  reductase and NADPH:cytochrome P450 reductase.

The aim of this work was to demonstrate capability of photo-crosslinking approach to fixate transient interactions within MFO system. Covalent complexes obtained by this technique could be further analyzed by mass spectrometry, which can provide structural information about the binding sites of the proteins.

We prepared a mutant cytochrome  $b_5$  comprising photo-reactive methionine analogue in the position 41 of the sequence. We expressed the protein employing *E. coli* B834 (DE3) auxotrophic strain in 300 ml of the limit medium supplemented with L-2-amino-5,5-azi-hexanoic acid (photo-methionine). The rate of the unnatural amino acid incorporation was determined by mass spectrometry and it was about 40 % after 16 hours of protein expression. We isolated 15.4 nmol of mutant cytochrome  $b_5$  in total and its concentration was 76.8  $\mu\text{mol/l}$ .

The photo-reactive cytochrome  $b_5$  M41 with individual redox partners was reconstituted with liposomes and activated by long-wave UV radiation.

We successfully formed cytochrome  $b_5$  – cytochrome P450 covalent complexes and thus showed photo-crosslinking capability of the isolated protein. Unfortunately no covalent complexes with NADH:cytochrome  $b_5$  and NADPH:cytochrome P450 reductases were obtained by this technique.

**Keywords:** cytochrome  $b_5$ , photoreactive amino acids, protein cross-linking, protein-protein interactions, cytochrome P450, NADH:cytochrome  $b_5$  reductase, NADPH:cytochrome P450 reductase.

In Czech

## Abstrakt

Cytochrom  $b_5$  plní funkci přenašeče elektronů v klinicky významném systému oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systému). Tento systém se podílí na zvýšení hydrofility látek v první fázi biotransformace xenobiotik a na aktivaci nebo deaktivaci některých léčiv a karcinogenů. Cytochrom  $b_5$  ovlivňuje reakce katalyzované terminálními oxygenasami systému – cytochromy P450. Donory elektronů cytochromu  $b_5$  jsou NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa a NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Cílem této práce bylo ověřit, zda je možné pomocí metody foto-chemického zesíťení fixovat transientní interakce mezi těmito proteiny. Takto získané kovalentní komplexy mohou být dále analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie a poskytují strukturní informace o vazebných místech proteinů.

Pro účely foto-síťování byl připraven mutantní cytochrom  $b_5$  obsahující v sekvenci v pozici 41 foto-aktivovatelný analog methioninu. Protein jsme exprimovali ve 300 ml limitního média, ve kterém byl methionin nahrazen L-2-amino-5,5-azi-hexanovou kyselinou (foto-methionin), a použili k tomu auxotrofní kmen bakterií *E. coli* B834(DE3). Míra inkorporace nepřirozené aminokyseliny byla po 16 h exprese stanovena pomocí hmotnostní spektrometrie na přibližně 40 %. Izolací jsme získali celkem 15,4 nmol mutantního cytochromu  $b_5$  o koncentraci 76,8  $\mu\text{mol/l}$ .

Získaný foto-reaktivní preparát byl spolu jednotlivými redoxními partnery rekonstituován s liposomy. Přítomné fotoreaktivní aminokyseliny byly aktivovány dlouhovlnným UV zářením.

Podařilo se ověřit schopnost foto-síťování foto-cytochromu  $b_5$  získáním kovalentních komplexů s cytochromem P450 2B4. Kovalentní komplexy s NADH:cytochrom  $b_5$  a NADPH:cytochrom P450 reduktasou se bohužel získat nepodařilo.

**Klíčová slova:** cytochrom  $b_5$ , fotoreaktivní aminokyseliny, síťování proteinů, protein-proteinové interakce, cytochrom P450 NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa, NADPH cytochrom P450 reduktasa.

# Obsah

1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod .....	10
2.1. Protein-proteinové interakce .....	10
2.1.1. Metody studia struktury proteinů.....	10
2.1.1.1 Rentgenová strukturní analýza .....	11
2.1.1.2 Nukleární magnetická rezonance .....	11
2.1.1.3 Chemické zesílení.....	12
2.1.1.4 Foto-chemické zesílení .....	12
2.1.1.5 Hmotnostní spektrometrie .....	14
2.1.1.6 Försterův rezonanční přenos energie .....	14
2.1.1.7 Místně-cílená mutageneze .....	14
2.2. Systém oxygenas se smíšenou funkcí .....	15
2.2.1. Cytochrom P450 .....	17
2.2.2. NADPH:cytochrom P450 reduktasa .....	19
2.2.3. Cytochrom b <sub>5</sub> .....	20
2.2.4. NADH:cyochrom b <sub>5</sub> reduktasa .....	23
2.2.5. Přenos elektronu na cytochrom P450 bez účasti NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....	24
3. Cíle práce.....	25
4. Materiál a Metody .....	26
4.1. Použitý materiál a chemikálie .....	26
4.2. Komerční roztoky.....	27
4.3. Bakteriální kmeny .....	27
4.4. Plazmidy.....	28
4.5. Proteinové preparáty .....	28
4.6. Přístrojové vybavení.....	28
4.7. Metody .....	29
4.7.1 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného .....	29
4.7.2 Vizualizace proteinů po SDS-PAGE .....	30
4.7.3 Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny.....	30
4.7.4 Stanovení koncentrace cytochromu b <sub>5</sub> M41 z absolutního spektra .....	31
4.7.5 Titrace cytochromu b <sub>5</sub> M41 heminem .....	31
4.7.6 Transformace bakterií plasmidem .....	32

4.7.7	Rekombinantní exprese proteinu .....	32
4.7.7.1	Expresa cytochromu b <sub>5</sub> M41 v LB médiu .....	32
4.7.7.2	Expresa foto-cytochromu b <sub>5</sub> M41 v limitním médiu .....	33
4.7.8	Izolace cytochromu b <sub>5</sub> .....	33
4.7.8.1	Rozbití buněk.....	34
4.7.8.2	Diferenční centrifugace a solubilizace proteinů .....	34
4.7.8.3	Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B FF .....	34
4.7.9	Rekonstituce proteinů a jejich foto-síťování.....	36
5.	Výsledky.....	38
5.1.	Růst bakterií a exprese proteinu v LB a limitním médiu .....	38
5.2.	Stanovení míry inkorporace foto-methioninu hmotnostní spektrometrií.....	39
5.3.	Izolace cytochromu b <sub>5</sub> .....	41
5.4.	Titrace heminem.....	43
5.5.	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B FF.....	46
5.6.	Titrace finálního preparátu hemin chloridem.....	48
5.7.	Shrnutí průběhu izolace.....	50
5.8.	Foto-síťování foto-cytochromu b <sub>5</sub> s redoxními partnery .....	51
6.	Diskuze .....	55
7.	Závěr.....	58
8.	Seznam použité literatury .....	59

## 1. Seznam zkratek

<i>A</i>	absorbance
Å	Ångström, jednotka délky
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
<i>c</i>	koncentrace
cb <sub>5</sub>	cytochrom b <sub>5</sub>
CBR	NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
DEAE	diethylaminoethyl
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
EBT	Eriochrome Black T
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESI	ionizace elektronovým sprejem (z angl. electrospray ionization)
FAD	flavinadenindinukleotid
fLeu	L-foto-leucin
fMet	L-foto-methionin
FMN	flavinmononukleotid
FP	finální preparát
FRET	Försterův rezonanční přenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer)
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
LB médium	Luria Broth médium
Leu	leucin
LM	limitní médium



MALDI	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
Met	methionin
MFO	systém oxygenas se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxygenase)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spektrometry)
<i>n</i>	látkové množství
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
O/N	přes noc (z angl. over night)
OD <sub>600</sub>	optická denzita při 600 nm
P450	cytochrom P450
pcb <sub>5</sub>	foto-cytochrom b <sub>5</sub>
PDB ID	proteinová databanka (z angl. protein data bank)
PPI	protein-proteinové interakce
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDM	místně cílená mutagenese (z angl. site-directed mutagenesis)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. – sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV	ultrafialové světlo (z angl. ultra-violet)
VIS	viditelné světlo (z angl. visible)
WT	přirozený typ (z angl. wild type)

## 2. Úvod

Proteiny neboli bílkoviny v organismu a vykonávají mnoho různých funkcí. Funkce proteinů vychází ze struktury a ta je dána primární sekvencí aminokyselin v řetězci. Jednou z důležitých funkcí proteinů je katalýza.

Proteiny, které urychlují přeměnu substrátu na produkty (vykazují katalytickou aktivitu), se nazývají enzymy. K vazbě a přeměně substrátu dochází v aktivním centru enzymů. To obsahuje vazebná residua zodpovědná za vazbu substrátu a katalytická residua zodpovídající za průběh katalýzy. Aktivní centrum může kromě aminokyselinových zbytků také obsahovat kofaktor.

Kofaktory jsou látky nebílkovinné povahy nezbytné pro katalytickou aktivitu enzymu. Dle typu vazby kofaktoru s enzymem se kofaktory dělí na prostetické skupiny a koenzymy. Koenzymy jsou na enzym vázány nekovalentně, mohou z enzymu disociovat. Prostetická skupina je pevně vázána v molekule enzymu. Pokud jako prostetická skupina vystupuje iont kovu, hem nebo Fe-S klastr, tak se enzym označuje jako metaloenzym.

### 2.1. Protein-proteinové interakce

Protein-proteinové interakce (PPI) jsou specifický kontakt dvou nebo více proteinů. PPI jsou uskutečňovány pomocí nevazebných interakcí, ty sestávají z přiblížení a vzájemného ovlivnění proteinů (angl. docking). PPI se rozděluje na stabilní a přechodné, a pro jejich studium existuje řada metod.

Experimentální určování přechodných interakcí mezi proteiny není jednoduché pro jejich krátký čas života a nízkou stabilitu [1]. Metody pro zkoumání struktury proteinů a jejich interakcí jsou založeny na interakci záření s hmotou (rentgenová strukturní analýza, nukleární magnetická rezonance, hmotnostní spektrometrie, fluorimetrické techniky), nebo interakci hmoty s hmotou (chemické modifikační metody (síťování) a místně-cílená mutagenese).

#### 2.1.1. Metody studia struktury proteinů

Struktura proteinů se dělí na primární, sekundární, terciární a kvarterní. Primární struktura je dána pořadím aminokyselin v peptidovém řetězci. Sekundární zahrnuje vodíkové vazby mezi blízkými zbytky aminokyselin v hlavním řetězci. Dva hlavní typy sekundární struktury jsou  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaný list. Terciární struktura popisuje celkový

prostorový tvar molekuly. Kvarterní struktura popisuje vzájemné uspořádání více polypeptidových řetězců.

Pro studium struktury proteinů se využívá více metod například rentgenová strukturní analýza, nukleární magnetická rezonance, místně-cílená mutagenese, chemické či foto-chemické zesílení a jiné. Každá metoda má výhody a nevýhody. Jednotlivé metody poskytují doplňující se strukturní informace, jejichž spojením dostáváme celkový přehled o struktuře daného proteinu.

#### **2.1.1.1 Rentgenová strukturní analýza**

Rentgenová strukturní analýza je metoda, při které je krystal proteinu ozařován rentgenovými paprsky a zaznamenává se jejich difrakce. Na základě toho je možné sestavit mapu elektronové hustoty proteinu. Do mapy elektronových hustot je možné umístit jednotlivé atomy proteinu a určit délky vazeb a úhly mezi nimi. Rozlišení atomové struktury závisí na kvalitě krystalu a flexibilitě jednotlivých částí proteinu. Rentgenová analýza je vhodná pro studium rigidních částí proteinů, protože ty tvoří uspořádané krystaly. Flexibilní úseky nevytvářejí opakující se vzor, tudíž je jejich rozlišení v modelech nižší. Pomocí rentgenové strukturní analýzy bylo experimentálně získáno nejvíce struktur proteinů.

Tato metoda poskytuje detailní informace o každém atomu v proteinu spolu s informacemi o ligandech, navázaných inhibitech, koordinovaných kovech a ostatních molekulách vázaných v krystalu. Studovaný protein musí být možné izolovat v dostatečném množství a čistotě, což limituje její využití při studiu membránových proteinů [2,3]. U získaného modelu je třeba mít na paměti, že studovaný protein může zaujímat ze fyziologických podmínek jinou strukturu než v krystalu.

#### **2.1.1.2 Nukleární magnetická rezonance**

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je metoda, která sleduje chování molekul v magnetickém poli po jejich excitaci. NMR stejně jako rentgenostrukturní analýza slouží k určení trojrozměrné struktury proteinů a nukleových kyselin s rozlišením na atomární úrovni. Měřený vzorek proteinu se oproti rentgenové strukturní analýze nachází v roztoku, ale v koncentraci, která není fyziologická (alespoň 0,5 mM). Proteiny o vyšší koncentraci poskytují lepší rozlišení [4]. Vlastnosti roztoku jako je teplota, pH a koncentrace soli je možné přizpůsobit tak, aby roztok odpovídal pro protein přirozenému prostředí.

NMR dovoluje zkoumat přirozeně nestrukturované proteiny, membránové proteiny, proteiny s vysokou molekulovou hmotností a interakce mezi proteiny nebo jinými molekulami. Pomocí NMR je dnes možné určit strukturu proteinu do hmotnosti 1 MDa [5].

#### 2.1.1.3 Chemické zesíťení

Metoda chemického zesíťení využívá chemických reakcí síťovacích činidel (angl. crossliker). Fixací protein-proteinových interakcí v proteinových komplexech kovalentními vazbami umožňuje tato metoda analýzu proteinové struktury ve fyziologických podmínkách a při nízké koncentraci proteinů. Výsledky chemického zesíťení dávají doplňující nebo ověřující informace k již existujícím strukturám.

Síťovací činidlo je malá organická molekula obsahující nejčastěji dvě reaktivní funkční skupiny reagující s některými postranními řetězci aminokyselin. Síťovací činidla se dělí na homobifunkční (mají stejné reaktivní skupiny) a heterobifunkční (mají rozdílné reaktivní skupiny). Reaktivní skupiny mohou být spojeny raménkem.

Raménko má definovanou délku (od 0 Å do více než 35 Å [6]) a slouží jako molekulární pravítko. Při síťování činidly s nulovou délkou raménka (angl. zero-length crosslinking) dochází k spojení residuí proteinů, které jsou v těsné blízkosti [7]. Kratší raménko je vhodnější pro spojení aminokyselinových residuí v krátké vzdálenosti nebo intramolekulární síťování. Delší raménko umožňuje propojení vzdálených aminokyselinových zbytků.

Reaktivní konce síťovacích činidel reagují specificky s funkčními skupinami jako je primární aminoskupina ( $-NH_2$ ), thiolová skupina ( $-SH$ ) nebo karboxylová skupina ( $-COOH$ ) [8].

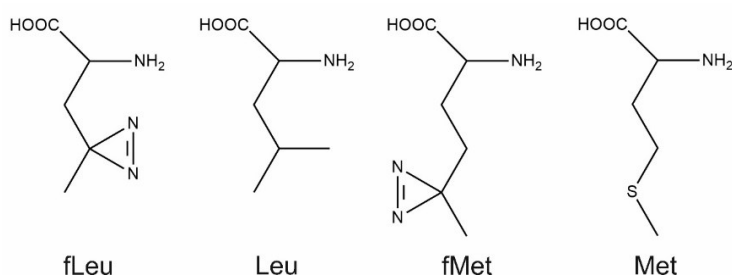
#### 2.1.1.4 Foto-chemické zesíťení

Foto-chemické zesíťení je metoda na obdobném principu jako chemické síťování, kdy síťovací činidla obsahují fotolabilní skupiny. Ty jsou za běžných podmínek inertní, jejich fotolytickou aktivací však dochází ke vzniku vysoce reaktivních a málo selektivních intermediátů s krátkou dobou života. Ty umožňují propojit i skupiny, které nelze propojit chemickými síťovacími činidly [9]. Mezi foto-aktivovatelné skupiny patří benzofenony, aryl azidy a diaziriny.

Benzofenon je aktivován světlem s vlnovou délkou 350-365 nm. Aktivací vzniká ketylový bi-radikál. Benzofenon je více selektivní a má vyšší afinitu k methioninu. Aryl azid

po ozáření světlem s vlnovou délkou 254-400 nm generuje nitrénový bi-radikál, který reaguje s C–H nebo N–H vazbami. Vznik nitrénového bi-radikálu je doprovázen odštěpením N<sub>2</sub>. Diaziriny tvoří reaktivní karbénový bi-radikál spolu s N<sub>2</sub> po ozáření světlem o vlnové délky 350 nm. Karbénový bi-radikál je vysoce reaktivní a reaguje s C–H nebo N–H vazbami za vzniku kovalentního aduktu. Doba života karbénového bi-radikálu je typicky v řádech nanosekund. Diaziriny mají vyšší foto-stabilitu než aryl azidy [10,11]. Benzofenony a diaziriny jsou aktivovány světlem jehož vlnová délka nepoškozuje primární strukturu proteinů.

Kromě použití foto-aktivovatelných činidel je možné zavést foto-aktivovatelnou skupinu přímo do proteinové sekvence, a to ve formě foto-aktivovatelné aminokyseliny během exprese. Tyto aminokyselinové analogy s diazirinovou skupinou foto-leucin (fLeu) a foto-methionin (fMet) byly představeny v roce 2005 (**Obr. 1**) [12]. Inkorporace modifikovaných aminokyselin do sekvence rekombinantního proteinu na místo methioninu nebo leucinu v bakteriích nebo savčích buňkách je možná díky nižší specifitě methionyl- a v menší míře též leucyl-RNA syntetasy. Strukturální podobnost analogu s přírodnou aminokyselinou umožňuje aktivaci foto-labilního analogu vazbou na příslušnou molekulu tRNA a začlenění do proteosyntézy.



**Obr. 1** – Struktury přírodních proteinogenních aminokyselin a jejich foto-aktivovatelných analogů.

Pokud je při studiu produktů síťování prvním krokem elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného (SDS-PAGE), dojde k separaci monomerů a oligomerů. Poté jsou jednotlivé proteiny a proteinové komplexy zvláště enzymaticky štěpeny a peptidová směs je následně analyzována hmotnostní spektroskopií. Tento postup se označuje jako „bottom up“ přístup a slouží mimo jiné k identifikaci míst zesílení [13].

### 2.1.1.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) je citlivá analytická metoda, která ionizuje vzorky, a poté je separuje podle jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) a následně je detekuje. Spotřeba vzorku při analýze MS je velmi malá. Měkké ionizační techniky MALDI a ESI umožňují ionizaci velkých molekul bez fragmentace, díky tomu lze hmotnostní spektrometrii využít také v biochemii, například na identifikaci proteinů, mutací v jejich aminokyselinové sekvenci nebo jejich kovalentních modifikací (posttranslační modifikace, chemické a foto-chemické zesítnění) [14].

Tandemová hmotnostní spektrometrie slouží k získání informací o sekvenci peptidu, umožňuje tak jeho identifikaci. Při této metodě je směs peptidů separována pomocí prvního analyzátoru a jeden peptid je vybrán a fragmentován jednou z dostupných fragmentačních technik. Vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí druhého analyzátoru a detekovány. Při fragmentaci kolizně indukovanou disociací (z angl. collision-induced dissociation) dochází primárně k praskání peptidových vazeb, sekvencí kovalentně zesítněného dipeptidu mohou být identifikovány interagující aminokyseliny [13,15].

### 2.1.1.6 Försterův rezonanční přenos energie

Försterův rezonanční přenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer, FRET) je založen na přenosu energie, ke kterému dochází při přiblížení donoru a akceptoru. Vzdálenost mezi fluorofory musí být v rozmezí 1-10 nm [16]. Na takto malé vzdálenosti je pomocí této metody možné detekovat a kvantifikovat molekulární interakce, dále je možné pozorovat změny konformace proteinu. FRET je možné použít i pro studium membrán nebo protein-proteinových interakcí.

Přirozenými fluorofory mohou být tryptofan nebo modifikovaná aminokyselina [17], které lze vnést přímo do sekvence proteinu pomocí místně-cílené mutagenese.

### 2.1.1.7 Místně-cílená mutagenese

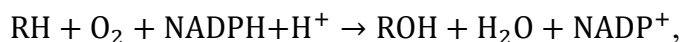
Místně-cílená mutagenese (SDM, z angl. site-directed mutagenesis, SDM) vytváří specifické změny sekvence DNA, což následně vede k záměně vybraných aminokyselin v primární sekvenci rekombinantního proteinu. Při SDM proteinů dochází ke změně, vložení nebo odstranění jednoho aminokyselinového zbytku, několika residuí nebo dokonce celých strukturních elementů. Strukturní změny v mutovaném proteinu se projevují ve změně jejich funkce, stability a aktivity. Vliv těchto změn je sledován pomocí dalších experimentálních

metod. SDM se využívá při zkoumání struktury a aktivity DNA, RNA, proteinů a také v proteinovém inženýrství [18].

K uskutečnění místně-cílené mutagenese v proteinu je nutná znalost primární sekvence DNA genu, primární struktura proteinu. Nejčastěji jsou místa pro mutaci vybírána na základě známého homologního modelu.

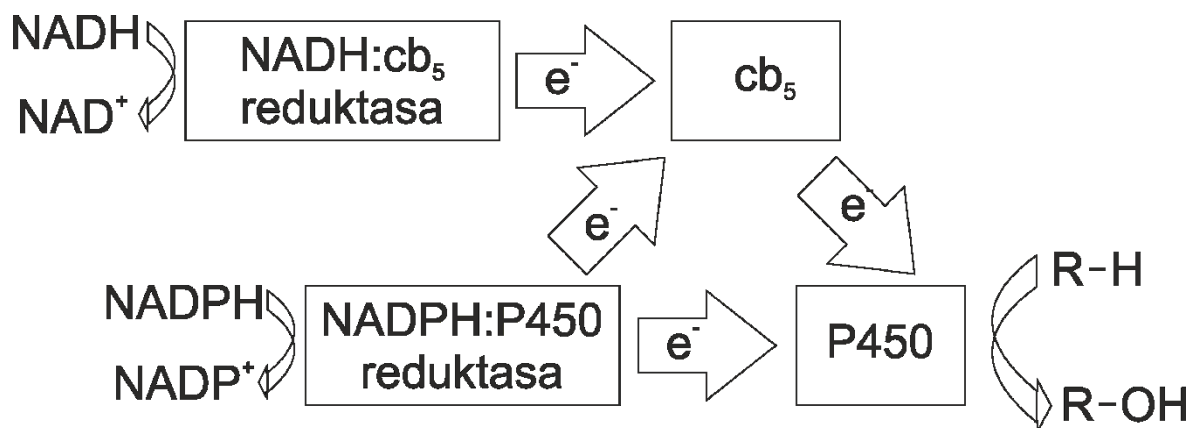
## 2.2. Systém oxygenas se smíšenou funkcí

Systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém, z angl. mixed function oxygenase) je systém enzymů, které jsou u savců vázané na cytosolové straně membrány endoplazmatického retikula nebo mitochondrií. Oxygenasy jsou enzymy katalyzující nejčastěji inkorporaci jednoho atomu kyslíku do organické molekuly a druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Průběh této reakce vyjadřuje rovnice:



kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt. Toho je využíváno při biosyntéze některých endogenních látek. Reakce je také využívána v první fázi biotransformace xenobiotik, kdy dochází ke zvýšení jejich polarit. Ve druhé fázi biotransformace dochází vnesením atomu kyslíku k dalšímu zvýšení hydrofility kovalentním připojením hydrofilní molekuly a může docházet k jejich vyloučení z organismu. V některých případech může naopak docházet uvedenou reakcí k aktivaci prekarcinogenů nebo léčiv [19].

MFO systém se skládá z lipidové membrány a dvou nezbytných proteinů: NADPH:cytochrom P450 reductasy (CPR), cytochromu P450 (P450). Volitelnou složkou MFO systému je cytochrom b<sub>5</sub> (cb<sub>5</sub>) a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasa (CBR). P450 je terminální oxygenasou MFO systému a ve svém katalytickém cyklu pro svou funkci vyžaduje postupné dodání 2 elektronů. Tyto elektrony pocházejí nejčastěji z NADH nebo NADPH. První elektron je přenášen na P450 pouze CPR a druhý může být přenesen CPR nebo cytochromem b<sub>5</sub> (**Obr. 2**, str. 16) [20].

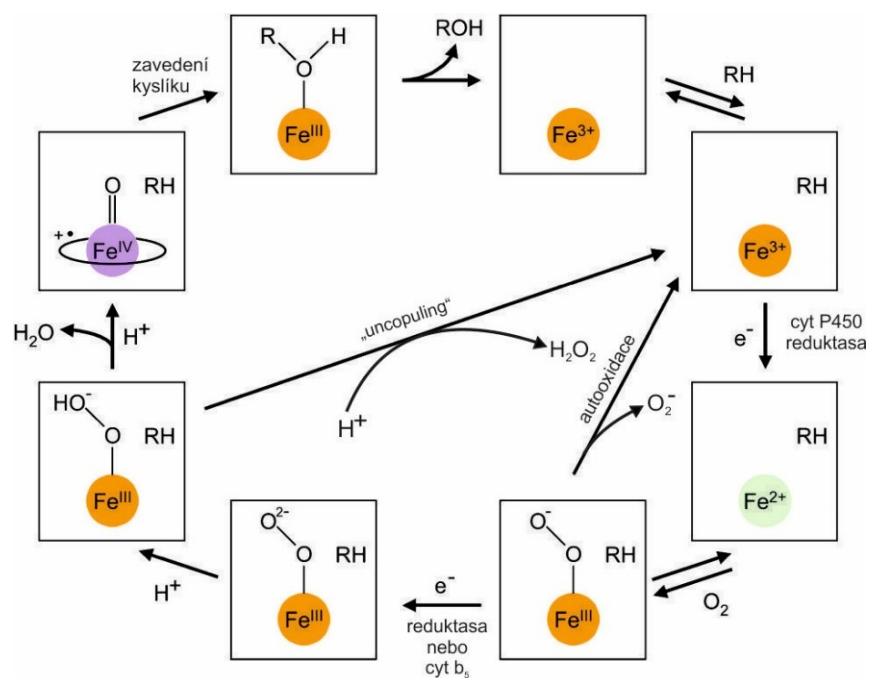


**Obr. 2** – Schematické znázornění přenosu elektronů v MFO systému. Převzato a upraveno z [20].

Reakční mechanismus P450 probíhá v několika krocích a je znázorněn na **Obr. 3**, str. 17. Nejdříve dochází k vazbě substrátu do aktivního centra P450. Dojde ke konformační změně a hemové železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) je redukováno jedním elektronem z NADPH:cytochrom P450 reduktasy na  $\text{Fe}^{2+}$ . Na takto redukované železo se váže molekula kyslíku. Vzniklý komplex není stabilní a je dále redukovan NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo cytochromem b<sub>5</sub> a vzniká peroxidový anion. Poté následuje řada dalších kroků, jejichž výsledkem je hydroxylovaný substrát a molekula vody.

Efektivita oxidace cytochromy P450 je snížena dvěma vedlejšími reakcemi, naznačenými na **Obr. 3**, str. 17. Vliv vedlejších reakcí na účinnost oxidace závisí na izoformě P450 a přeměňovaném substrátu [21]. V závislosti na izoformě a přeměňovaném substrátu může cytochrom b<sub>5</sub> katalýzu urychlovat, inhibovat nebo neovlivňovat.





**Obr. 3** –Reakční cyklus cytochromu P450 s oběma vedlejšími reakcemi. Převzato a upraveno z [20].

### 2.2.1. Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP) představují rozsáhlou skupinu proteinů vyskytujících se napříč všemi živočišnými říši. Lidský genom obsahuje asi 57 funkčních genů pro cytochromy P450 [22]. Nejvíce P450 se u člověka nachází v játrech, kde probíhá největší podíl detoxikačních procesů. Cytochromy P450 jsou významně zastoupeny také v plicích, ledvinách, mozku, nadledvinách a gastro-intestinálním traktu [23].

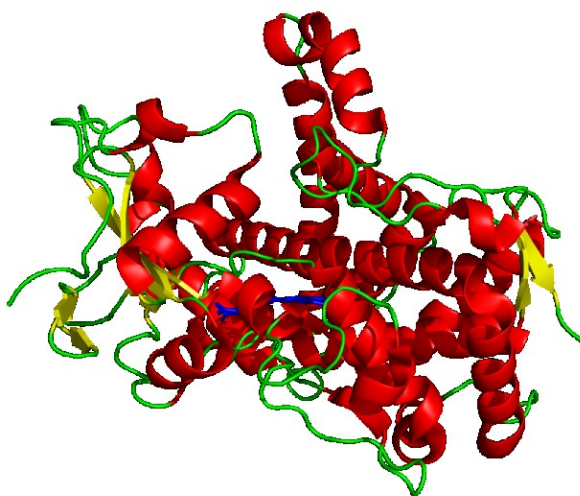
Cytochromy P450 se vyskytují v různých izoformách, které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Do rodin náleží cytochromy P450 se sekvenční homologií vyšší než 40 % a do podrodin s homologií vyšší než 55 %. V lidském organismu jsou cytochromy P450 klasifikovány do 18 rodin a 43 podrodin [24]. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány arabskou číslicí, která je psána za zkratku CYP. Za číslicí následuje velké písmeno charakterizující podrodinu a na konci je arabská číslice určující konkrétní izoformu cytochromu P450 [25]. Například CYP 2B4 patří do 2. rodiny, podrodiny B s pořadovým číslem 4.

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny tvořené 400-500 aminokyselinami s molekulovou hmotností asi 50 kDa [26]. Struktura je obvykle tvořena 12  $\alpha$ -helixy a 4-8  $\beta$ -skládanými listy. U membránových P450 je přítomen také jeden transmembránový

$\alpha$ -helix. Cytochrom P450 obsahuje vzhledem k hemové prostetické skupině dvě části, proximální a distální.

Proximální část, kde je vázána hemová prostetická skupina na 100% konzervovaný cystein, je vysoce konzervována. Na její kladně nabitý povrch se vážou redoxní partneři cytochrom  $b_5$  a NADPH:cytochrom P450 reduktasa se záporně nabitými povrchy [27]. Vazebné místo obou redoxních partnerů se překrývá, ale není totožné. Distální část P450 podílející se na vazbě kyslíku a různých substrátů je variabilní a u jednotlivých izoform se liší velikostí a flexibilitou [28].

Námi zkoumaná králičí izoforma CYP 2B4 se pro svou stabilitu a dostupnost používá jako model pro studium savčích cytochromů P450. CYP 2B4 je hemthiolátový protein vázaný v membráně endoplazmatického retikula. Skládá se z 12  $\alpha$ -helixů a 4  $\beta$ -skládaných listů, má molekulovou hmotnost 55,8 kDa [29]. Struktura CYP 2B4 (**Obr. 4**) byla získána pomocí rentgenové strukturní analýzy, tato struktura neobsahuje transmembránovou N-terminální doménu [30].

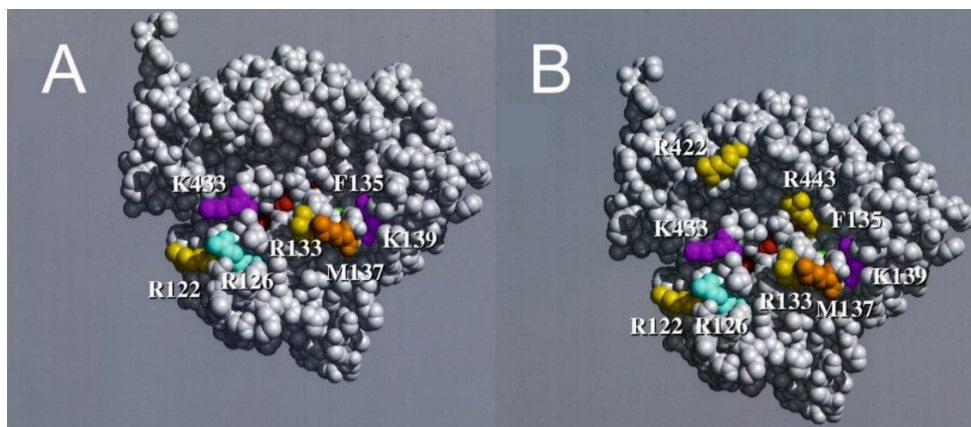


**Obr. 4** – Struktura CYP 2B4 (PDB ID 1PO5). Červeně  $\alpha$ -helixy, žlutě  $\beta$ -skládané listy, zeleně flexibilní spojovací úseky a modře hem. Převzato a upraveno z [30].

Vazebné místo CYP 2B4 pro cytochrom  $b_5$  bylo studováno místně-cílenou mutagenézí. 25 aminokyselin rozmístěných po celém povrchu CYP 2B4 bylo postupně mutováno a testováno. Z nich se R122, R126, R133, F135, M137, K139, K433 ukázaly být zapojené do vazby cytochromu  $b_5$  (**Obr. 5**, str. 19) [31,32]. Pozdější výsledky chemického

zesítnění a následné hmotnostní spektrometrie rozšířily tento seznam ještě o D123, E424 a E439 [33].

Vazebné místo na CYP 2B4 pro NADPH:cytochrom P5450 reduktasu bylo také studováno místně-cílenou mutagenézí. Na vazbě CPR na CYP 2B4 se podílejí residua R122, R126, R133, F135, M137, L139, R422, L433 a R443 (**Obr. 5**) [34].



**Obr. 5** – Vazebná místa na cytochromu P450 pro cytochrom b<sub>5</sub> (A) a NADPH:cytochrom P450 reduktasu (B). Převzato a upraveno z [34].

### 2.2.2. NADPH:cytochrom P450 reduktasa

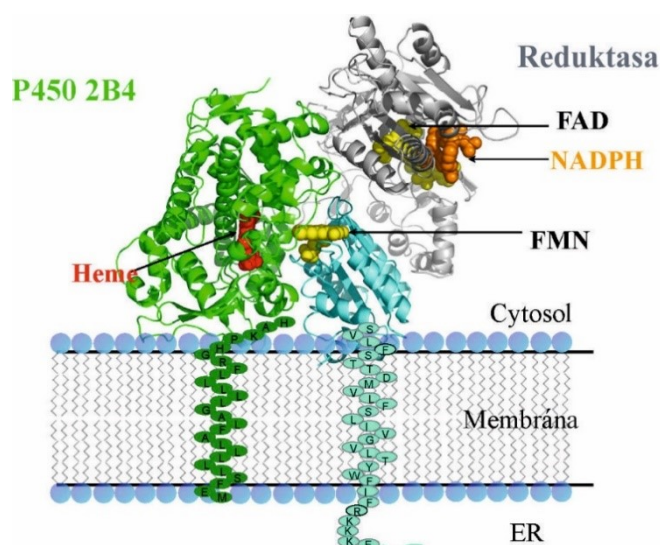
NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) je v membráně vázaný diflavinový protein. CPR katalyzuje postupný přenos dvou elektronů z NADPH na všechny mikrosomální cytochromy P450, a je také schopná přenášet elektrony na cytochrom b<sub>5</sub>. Díky flavinové skupině může fungovat jako dělič elektronového páru [35]. Přijatý elektronový pár z NADPH může CPR postupně přenést na akceptorový protein.

CPR obsahuje dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální doménu a hydrofilní C-terminální doménu. N-terminální hydrofobní doména (6 kDa) ukotvuje molekulu v membráně endoplazmatického retikula nebo jádra. C-terminální katalytická doména (72 kDa) je složená ze čtyř strukturních subdomén: FMN-vazebné, spojovací, FAD-vazebné a NADPH-vazebné.

FMN a FAD-vazebné domény jsou propojeny spojovací doménou, která zodpovídá za jejich správnou orientaci. Dva elektrony jsou nejdříve přeneseny z NADPH na FAD, a poté postupně přes FMN až na redoxního partnera. Při přenosu elektronů dochází k přiblížení FAD a FMN domén, po jejich oddálení dochází k přenosu elektronu z FMN na protein [36].

Struktura CPR byla získána pomocí rentgenostrukturní analýzy po odštěpení N-terminální hydrofobní kotvy (PDB ID 1AMO [37]). CPR bez hydrofobní kotvy ztrácí schopnost redukovat P450.

Vazebné místo pro cytochrom  $b_5$  a cytochrom P450 se nachází v blízkosti FMN vazebné domény. Při vazbě proteinů dochází k přiblížení FMN (CPR) a hemu (cytochrom  $b_5$  nebo P450 (**Obr. 6**) [37]. Kromě komplementárního párování nabitých aminokyselin při vazbě CPR s redoxními partery hrají důležitou roli i hydrofilní a hydrofobní interakce [38].



**Obr. 6** – Schematické znázornění orientace CYP 2B4 (PDB ID 1SU0) a CPR (PDB ID 3ES9) včetně ukotvení obou proteinů v lipidové membráně při interakci [32].

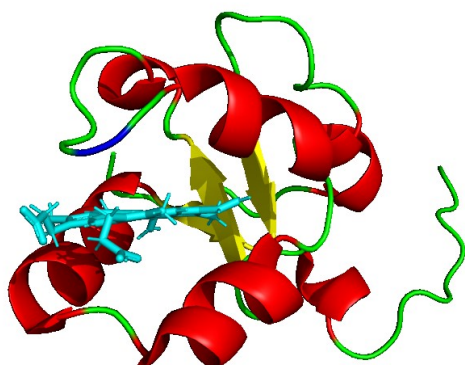
### 2.2.3. Cytochrom $b_5$

Cytochrom  $b_5$  ( $cb_5$ ) je hemoprotein, jehož hemové železo se může vyskytovat v oxidované nebo redukované formě, proto je schopen přenášet elektrony. U savců byly nalezeny dvě izoformy, membránová a rozpustná [39]. Membránová forma  $cb_5$  se může vyskytovat na cytosolové straně membrány endoplazmatického retikula nebo mitochondriální membrány, přičemž katalytická doména je orientovaná do cytosolu. Membránová izoforma  $cb_5$  se v největším zastoupení nachází v buňkách jater. Rozpustná forma postrádající transmembránový  $\alpha$ -helix se nalézá v erytrocytech, kde redukuje methemoglobin [40].

Membránová forma cytochromu  $b_5$  má molekulovou hmotnost 16,7 kDa a je složena ze 6  $\alpha$ -helixů a 5  $\beta$ -skládaných listů. Ty tvoří dvě domény – N-terminální hydrofilní doménu a C-terminální hydrofobní doménu – spojené flexibilním peptidovým řetězcem (angl.

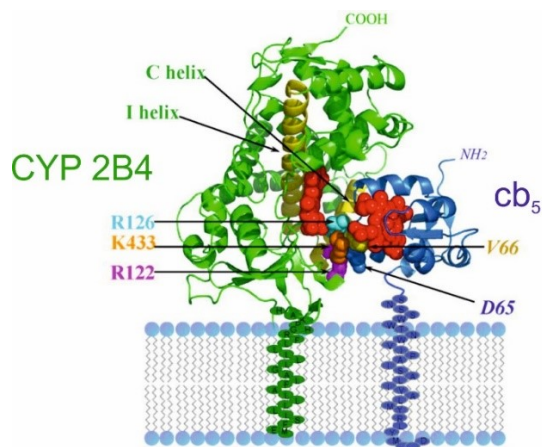
linker). Větší, N-terminální solubilní doména obsahuje hemovou prostetickou skupinu a vazné místo pro redoxní partnery. C-terminální doména je menší a ukotvuje protein v membráně [41,42].

Struktura solubilní domény cytochromu  $b_5$  byla získána pomocí NMR (**Obr. 7**) [43]. Rentgenovou krystalografií byly získány struktury cytochromu  $b_5$  s odštěpenou membránovou kotvou, jelikož přítomnost hydrofobní kotvy znemožňuje krystalizaci proteinu [44].



**Obr. 7** – NMR struktura mikrosomálního králičího cytochromu  $b_5$ , (PDB ID 1DO9). Červeně  $\alpha$ -helixy, žlutě  $\beta$ -skládané listy, zeleně flexibilní úseky, bledě modře hem, modře leucin 41. Převzato a upraveno z [43].

Vazebné místo cytochromu  $b_5$  pro cytochrom P450 (**Obr. 8**, str. 22) bylo zkoumáno metodami NMR, chemickým zesíťením, místně cílenou mutagenézí a FRET. Podle NMR se na vazbě CYP 2B4 pravděpodobně podílejí residua E48, E49, D65, V66, T70, S76, která se nacházejí na povrchu  $cb_5$  v blízkosti hemu. Dále byl zkoumán vliv residuí cytochromu  $b_5$  (E42, E43, P45, G46, E49, V50, E53, Q54, N62, D65, V66, D71, L75) na vazbu CYP 2B4 pomocí místně cílené mutagenese. Z těchto residuí jsou D65 a V66 důležité pro vazbu  $cb_5$  a CYP 2B4, zatímco residua P45, G46, E53, Q54, D71, L75 tuto vazbu neovlivňují. Mutantní cytochromy  $b_5$  E42A, E43A, E49A, V50A a N62A vykazovala mírný pokles afinity  $cb_5$  k CYP 2B4, proto tato residua hrají malou roli při protein-proteinových interakcích [45]. Metoda FRET potvrdila význam residuí E42, E48, E49, D65 na cytochromu  $b_5$  pro vazbu s CYP 17A1 [46]. Kromě aminokyselinových zbytků se na vazbě cytochromů P450 také podílí propionátové skupiny hemu [47].



**Obr. 8** – Orientace CYP 2B4 (PDB ID 1SU0) a cytochromu b<sub>5</sub> (PDB ID 1DO9) při interakci a schematické znázornění ukotvení obou proteinů v lipidové membráně. Převzato a upraveno z [32].

Vazebné místo na cytochromu b<sub>5</sub> pro NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasu je tvořeno residui, která obklopují okraj hemu cb<sub>5</sub>. Tato residua obsahují karboxylové skupiny [48]. Podle studia místně-cílené mutagenese se na vazbě CBR podílejí residua E47, E48, E52, E60, D64 a také propionátové skupiny hemu z cytochromu b<sub>5</sub> [49].

Cytochrom b<sub>5</sub> se v MFO systému podílí na metabolismu xenobiotik a také desaturaci mastných kyselin. Může přijímat elektron z NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy nebo NADPH:cytochrom P450 reduktasy, a poté ho přenášet na cytochrom P450. Jak již bylo zmíněno, cytochrom P450 vyžaduje pro funkci dva elektrony. Redoxní potenciál cytochromu b<sub>5</sub> v redukovaném stavu je +20 mV, je tedy vyšší než redoxní potenciál cytochromu P450 bez navázaného substrátu a v oxidovaném stavu Fe<sup>3+</sup> (-230 mV). Přenos elektronu by tehdy v tomto kroku katalytického cyklu P450 neměl být možný. Po navázání substrátu cytochromem P450 a redukcí NADPH:cytochrom P450 reduktasy se hemové železo P450 redukuje na Fe<sup>2+</sup> a redoxní potenciál vzroste na hodnotu +50 mV. Tento vzrůst redoxního potenciálu P450 umožňuje přenos druhého elektronu jak z CPR tak z cb<sub>5</sub> [31].

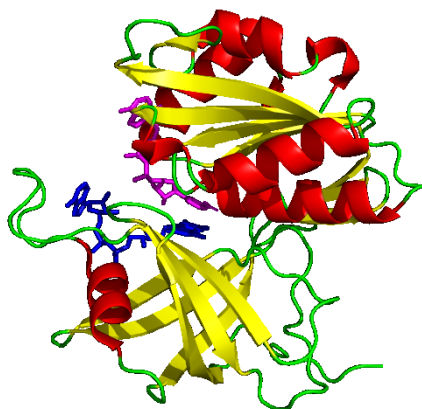
Cytochrom b<sub>5</sub> může aktivitu P450 ovlivňovat dvěma mechanismy. Prvním mechanismem je přímý přenos druhého elektronu z cytochromu b<sub>5</sub> na cytochrom P450. Přenos druhého elektronu je často označován za rychlost určující krok katalýzy cytochromem P450. Přenos elektronu z cytochromu b<sub>5</sub> bývá rychlejší než z NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Přenos druhého elektronu z cb<sub>5</sub> tak poskytuje kratší čas pro vznik intermediátů, které mohou vyústit v boční reakce katalytického cyklu [50].

Druhým mechanismem je alosterické ovlivnění P450 bez přenosu elektronů. Navázání cytochromu  $b_5$  na P450 způsobuje strukturální změny, které ovlivňují schopnost monooxygenasy podstupovat redoxní změny. Proto může katalýzu cytochromu P450 ovlivnit i apoenzymová forma  $cb_5$ , která stimuluje hydroxylaci testosteronu CYP 3A4 ve stejné míře jako jeho holoforma [51,52].

Reakce katalyzované cytochromem P450 jsou ovlivňovány také molárním poměrem cytochromu  $b_5$  a CPR. Při poměru cytochromu  $b_5$ :CPR  $< 1$  cytochrom  $b_5$  stimuluje aktivitu CYP 2B4 nezávisle na použitém substrátu a produkt reakce je tvořen deset až sto krát rychleji [53]. Při poměru cytochromu  $b_5$ :CPR  $> 1$  cytochrom  $b_5$  inhibuje aktivitu CYP 2B4. Inhibice je způsobena navázáním cytochromu  $b_5$  na CYP 2B4, který pak brání navázání CPR, což neumožňuje první redukci P450 v jeho katalytickém cyklu [54].

#### 2.2.4. NADH:cytochrom $b_5$ reduktasa

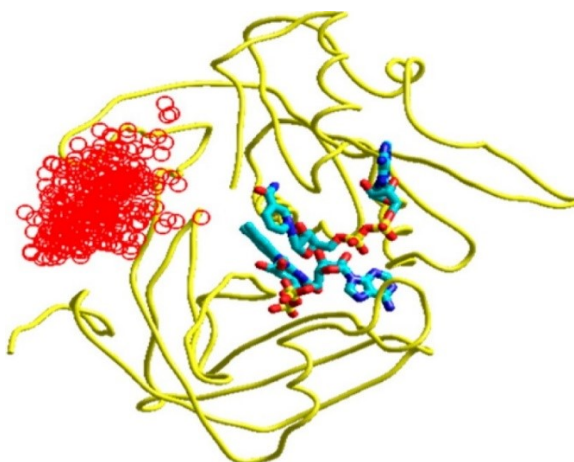
NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa (CBR) obsahuje flavinovou prostetickou skupinu. CBR přenáší v jednom cyklu dva elektrony z NADH na dvě molekuly cytochromu  $b_5$  [55]. Membránová forma CBR je lokalizována na cytosolární straně endoplazmatického retikula, zatímco solubilní forma se nachází v erytrocytech [56]. Membránová forma CBR obsahuje C-terminální hydrofobní doménu (3 kDa) vázanou v membráně a hydrofilní katalytický segment (31 kDa), který je tvořen dvěma vysoce konzervovanými subdoménami FAD- a NADH-vazebnou. Struktura CBR byla získána rentgenostrukturní analýzou (**Obr. 9**).



**Obr. 9** – Struktura prasečí CBR (PDB ID 3W2E) získaná rentgenostrukturní analýzou. Červeně  $\alpha$ -helixy, žlutě  $\beta$ -skládané listy, zeleně flexibilní úseky, FAD modře,  $NAD^+$  růžově. Převzato a upraveno z [57].

Vazebné místo pro cytochrom  $b_5$  je tvořeno lysinovými zbytky K41, K125, K162 a K163 identifikovanými pomocí SDM [49]. Pomocí místně-cílené mutagenese a

homologního modelování bylo zjištěno, že i R91 z CBR se podílí na interakcích s cytochromem  $b_5$ . Z dostupných dat byl navržen způsob navázání cytochromu  $b_5$  na CBR (**Obr. 10**) [58].



**Obr. 10** –Struktura CBR (žlutě, se zvýrazněnými kofaktory FAD a NADH) s označeným vazebným místem pro  $cb_5$  (červené kroužky) určeným pomocí tzv. „Brownian dynamics“ simulace. Převzato z [58].

#### 2.2.5. Přenos elektronu na cytochrom P450 bez účasti NADPH:cytochrom P450 reductasy

Nové studie ukázaly, že katalýza P450 může probíhat též v nepřítomnosti CPR, která byla do té doby považována za nezbytnou součást MFO. Bylo prokázáno, že systém obsahující NADH, CBR, cytochrom  $b_5$  a CYP 1A1 kryší [59] nebo lidský [60] oxiduje benzo[a]pyren *in vitro*. Také *in vivo* experiment ukázal, že při absenci CPR může cytochrom  $b_5$  a CBR dodávat elektrony na cytochrom P450 3A při katalýze midazolamu [61].



### 3. Cíle práce

Cílem práce byla příprava králičí izoformy mutantního cytochromu  $b_5$  v bakteriích *E. coli* B834(DE3), v jehož aminokyselinové sekvenci je nahrazen methionin foto-aktivovatelným analogem, využití tohoto preparátu pro studium protein-proteinových interakcí s ostatními proteiny MFO systému pomocí foto-chemického zesílení ve spojení s MS. Práci lze rozdělit na několik dílčích kroků:

1. Expres foto-cytochromu  $b_5$  ( $pcb_5$  M41) s vysokým zastoupením fMet pro foto-síťovací experimenty.
2. Expres cytochromu  $b_5$  ( $cb_5$  M41) jako kontroly pro experimenty s  $pcb_5$  M41 a pro chemické a foto-chemické síťovací experimenty v budoucnu.
3. Izolace a purifikace rekombinantně připravených  $cb_5$  M41 a  $pcb_5$  M41 využitím ionexové chromatografie.
4. Ověření schopnosti foto-síťování preparátu  $pcb_5$  M41 zopakováním dřívějšího experimentu s CYP 2B4.
5. Foto-zesílení  $pcb_5$  M41 se solubilní NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou (CBR) a membránovou NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR).

## 4. Materiál a Metody

### 4.1. Použitý materiál a chemikálie

Acetonitril LC-MS grade (Merck)

Akrylamid (Roth)

Ampicilin, sodná sůl (Roth)

Bromfenolová modř (Roth)

CaCl<sub>2</sub> (Fluka)

cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich)

Coomassie Brilliant Blue – R250 (Fluka, Sigma Aldrich)

CoSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O (Penta)

CuSO<sub>4</sub>×5 H<sub>2</sub>O (Penta)

D-(+)-glukosa (Sigma-Aldrich)

DEAE-Sepharosa CL6B FF(Sigma-Aldrich)

Dilauroylfosfatidylcholin (Sigma-Aldrich)

Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich)

Ethylmorfolin (Sigma-Aldrich)

Fenylazid (připravil doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.)

Glycerol (Lachema)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Lachema)

Hemin chlorid (Santa Cruz Biotech)

CHCl<sub>3</sub> (Chemapol)

Isopropoxy-β-D-1-thiogalaktopyranosid (Roth)

Jodacetamid (Sigma-Aldrich)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachner)

KOH (Lachema)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Fluka)

Kyselina octová (Sigma-Aldrich)

Kyselina trifluoroctová (Fluka)

Kyselina α-kyanoskořicová (Bruker Daltonics)

L- Threonin (United States of America Biochemical Corporation)

L-2-amino-5,5-azi-hexanová kyselina (Thermo Fischer Scientific)

L-Fenylalanin (Lachema)  
L-Isoleucin (Sigma-Aldrich)  
L-Leucin (United States of America Biochemical Corporation)  
L-Lysin (Sigma-Aldrich)  
L-Methionin (Sigma Aldrich, Roth)  
L-Valin (United States of America Biochemical Corporation)  
Methanol, LC-MS čistota (Merck)  
MgSO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich)  
MnCl<sub>2</sub>×4 H<sub>2</sub>O (Lachema)  
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)  
N,N-methylen-bis-akrylamid (Roth)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O (Penta)  
NaCl (Fluka)  
NH<sub>4</sub>Cl (Lachema)  
Page Ruler Broad Range Unstained protein ladder (Thermo Fischer Scientific)  
Purifikovaný agar (Oxoid)  
Tetramethylethylendiamin (Serva)  
Thiamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich)  
Tris(2-karboxyethyl)fosfin-hydrochlorid (Sigma-Aldrich)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Sigma Aldrich)  
Trypsin (Promega)  
Tryptone (Oxoid)  
Voda, LC-MS čistota (Merck)  
ZnSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O (Fluka)

#### 4.2. Komerční roztoky

BCA Kit For Protein Determination (Sigma Aldrich)

#### 4.3. Bakteriální kmeny

*Escherichia coli* B834(DE-3) (Novagen®) auxotrofní kmen se zablokovanou syntézou methioninu

#### 4.4. Plazmidy

Použitý plazmid pET-22b, označený jako cytochrom b<sub>5</sub> mutant 41 (cb<sub>5</sub> M41) byl připraven RNDr. Helenou Dračínskou Ph.D. V sekvenci tohoto plazmidu jsou přirozeně se vyskytující methioniny v pozicích 96, 126 a 131 mutovány na leucin a leucin 41 na vazebném povrchu je mutován na methionin (**Obr. 7** str. 21) [62].

#### 4.5. Proteinové preparáty

Cytochrom P450 2B4 (izolovaný z králíka,  $c = 12 \mu\text{M}$ ) poskytl RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.)

Membránová Králičí NADPH:cytochrom P450 reduktasa (izolovaná z králíka,  $c = 10 \mu\text{M}$ ) poskytl RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

Solubilní lidská NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa izoforma 2 (rekombinantní,  $c = 165 \mu\text{M}$ ) poskytl RNDr. Mgr. Jan Milichovský, Ph.D.

#### 4.6. Přístrojové vybavení

Centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Fotolyzér Oriel 60100 (100 W)

Gallenkamp Economy Incubator Size 1

Inkubátor IKA® KS4000 iControl

Inkubátor Ultimate Dry Bath Incubator

Laboratorní váhy AND ER-120A

Míchačka Variomag Mono Komet

Pipety a špičky Gilson a Pipetman

Prosvětlovací pult Hama® LP 555

Předvážky Ohaus Scout™ Pro

Sonikátor Elma® ECB

Souprava na elektroforézu Hoefer Scientific Instruments SE200

Spektrofotometr DeNovix DS-11+

Stolní minicentrifuga Eppendorf F-45-12-11

TECAN Sunrise™ ABSORBANCE MICROPLATE READER

Třepačka IKA® KS 4000 i control

Vakuový koncentrátor Labconco CentriVap®Micro IR

#### 4.7. Metody

##### 4.7.1 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) slouží k separaci proteinů a jejich kovalentních komplexů podle jejich elektroforetické mobility závislé především na délce polypeptidového řetězce, a tedy na molekulové hmotnosti [63].

##### **Roztoky pro přípravu separačního gelu:**

**8% gel:** 2,3 ml H<sub>2</sub>O; 1,3 ml 29,2% akrylamid (w/v); 0,8 % BIS (w/v);  
1,3 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,05 ml 10% SDS (w/v); 0,003 ml TEMED

**12% gel:** 1,6 ml H<sub>2</sub>O; 2,0 ml 29,2% akrylamid (w/v); 0,8 % BIS (w/v);  
1,3 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,05 ml 10% SDS (w/v); 0,002 ml TEMED

**15% gel:** 1,1 ml H<sub>2</sub>O; 2,5 ml 29,2% akrylamid (w/v); 0,8 % BIS (w/v);  
1,3 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,05 ml 10% SDS (w/v); 0,002 ml TEMED

**Roztoky pro přípravu 5% zaostřovacího gelu:** 1,4 ml H<sub>2</sub>O; 0,33 ml 29,2% akrylamid (w/v); 0,8 % BIS (w/v); 0,25 ml 1,0 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,02 ml 10% SDS (w/v); 0,004 ml TEMED

Polymerace připraveného roztoku byla iniciována těsně před nalitím přídavkem 10% persíranu amonného 0,05 ml pro separační a 0,02 ml pro zaostřovací roztok.

Skla pro nalévání gelu byla nejdříve odmaštěna pomocí ethanolu a umístěná do aparatury pro elektroforézu (Hoefer Scientific Instruments). Poté bylo mezi ně nalito 4,5 ml roztoku pro přípravu separačního gelu o příslušné koncentraci akrylamidu a ten byl opatrně převrstven vodou. Když za přibližně 15 min roztok zpolymeroval, byla voda odstraněna. Na separační gel byl nanesen roztok pro přípravu zaostřovacího gelu, do kterého byl zasunut hřeben tvořící jamky pro jednotlivé vzorky. Po polymeraci zaostřovacího roztoku byl hřeben opatrně vyjmut a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Skleněné desky byly

vloženy do elektroforetické vany (Hoefler Scientific Instruments). Spodní i horní elektroodový prostor byl poté vyplněn elektroodovým pufrem (0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3).

Ke 20  $\mu$ l vhodně naředěných vzorků bylo přidáno 5  $\mu$ l 5 $\times$  koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (10 % SDS (w/v); 20 % glycerol (v/v); 30 mM Tris-HCl; 0,25 % bromfenolová modř (w/v); 10 % 2-merkapt ethanol (v/v); pH 6,8). Poté byly vzorky 5 min vařeny a krátce centrifugovány.

Do každé jamky bylo aplikováno vždy 20  $\mu$ l vzorku. Elektroforéza probíhala při konstantním limitním proudu 20 mA v případě 1 gelu nebo v 40 mA v případě paralelní separace na 2 gelech, napětí nepřekročilo 200 V. Elektroforéza byla ukončena, když čelo s bromfenolovou modří dorazilo ke spodnímu okraji separačního gelu. Gel byl poté vyjmut a přenesen do barvicí lázně.

#### 4.7.2 Vizualizace proteinů po SDS-PAGE

Vizualizace proteinů po SDS-PAGE byla prováděna v barvicí lázni Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) (CBB); 50 % ethanol (v/v); 10 % kyselina octová (v/v)) minimálně 45 min za laboratorní teploty. Pozadí gelu bylo odbarveno roztokem 40 % ethanolu (v/v) a 10 % kyseliny octové (v/v).

Pro vizualizaci málo abundantních proteinů byl gel zcela odbarven od CBB a znovu nabarven citlivější metodou založenou na barvení stříbrem. Gel byl senzitivován 2 min v roztoku 30% ethanolu (v/v) a 0,006% Eriochrome Black T (EBT) (w/v). Následně byl gel 2 min odbarvován v 30% ethanolu (v/v) a promyt 2 $\times$  2 min destilovanou vodou. Následovalo přidání stříbrných iontů (0,25 % AgNO<sub>3</sub> (w/v); 0,037 % formaldehyd (v/v)) na dobu 5 min, gel byl znovu opláchnut 2 $\times$  20 s vodou a barven po dobu několika s až min ve vyvíjecím roztoku (2 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v); 0,04 % NaOH (w/v); 0,007 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (w/v); 0,007 % formaldehyd (v/v)). Vyvíjení barvení bylo zastaveno ponecháním gelu v 1,5% roztoku EDTA (w/v) nejméně na 10 min. Nakonec byl gel opláchnut vodou [64]. Gely byly uchovávány v lednici v 1% kyselině octové (v/v) při 4 °C.

#### 4.7.3 Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny

Koncentrace proteinů byla stanovována pomocí metody využívající bicinchoninové kyseliny (BCA). Po přidavku iontů Cu<sup>2+</sup> do roztoku proteinů dochází k jejich redukcii peptidovou vazbou na Cu<sup>1+</sup>. Ty jsou poté chelatované BCA za vzniku barevného komplexu, který je spektrofotometricky detekován [65].

Byl použit komerční Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma Aldrich). V poměru 50:1 byly smíseny roztoky bicinchoninové kyseliny (BCA solution I) a  $\text{CuSO}_4$  (BCA solution II). Toto činidlo bylo připraveno těsně použitím.

Na mikrotitrační destičku bylo vždy nanášeno 15  $\mu\text{l}$  kontroly (voda), standardu nebo vzorku, ke každému bylo přidáno 120  $\mu\text{l}$  činidla. Stanovení bylo provedeno v tripletech. Jako standard byl použit sérový hovězí albumin (BSA) o koncentracích 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml. Po přidání činidla byly vzorky inkubovány 30 min při 37 °C. Poté byla změřena absorbance při 456 nm (TECAN Sunrise™). Z naměřených hodnot standardu byla sestrojena kalibrační křivka a z regresní rovnice byla vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích.

#### 4.7.4 Stanovení koncentrace cytochromu $b_5$ M41 z absolutního spektra

Koncentrace  $b_5$  M41 byla stanovena z absolutního spektra (DeNovix DS-11+ ) na základě známého molárního absorpčního koeficientu při 413 nm ( $\epsilon_{413} = 0,117 \text{ dm}^3/\mu\text{mol cm}$  [66]) podle vzorce:

$$c = \frac{A_{413} - A_{500}}{\epsilon_{413} \cdot l} \cdot \text{ředění} \quad [\text{mol}/\text{dm}^3],$$

kde  $A_{413}$  a  $A_{500}$  je absorbance při 413 nm a 500 nm,  $\epsilon_{413}$  je molární absorpční koeficient  $b_5$  M41 při 413 nm a  $l$  je optická dráha kyvety.

#### 4.7.5 Titrace cytochromu $b_5$ M41 heminem

Titrace heminem byla nutná pro inkorporaci hemové prostetické skupiny do  $b_5$  M41. Při jeho produkci v auxotrofním kmenu bakterií nedochází k dostatečné biosyntéze hemu, vzniká proto kromě holo-cytochromu  $b_5$  také jeho apo-forma. Po přidání heminu k proteinu se hemin samovolně váže do aktivního místa cytochromu  $b_5$ .

Zásobní 1 mM hemin byl připraven přidáním 2 mg hemin chloridu do roztoku 1,55 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a 1,55 ml ethanolu, který byl do rozpuštění titrován NaOH. Průběh titrace heminem byl sledován spektrofotometricky v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 cm.

Potřebné množství heminu bylo určeno titrací 100  $\mu\text{l}$  alikvotu preparátu a přidáno ke zbytku preparátu. Alikvot byl ředěn 10 $\times$  pufrém ve kterém se preparát vyskytoval. Titrace probíhala vždy přidávkem 1  $\mu\text{l}$  0,5 mM heminu, po každém přidávku bylo změřeno absolutní spektrum proti výše zmíněnému fosfátovému pufru. Z diferenčních spekter jednotlivých přidavků byl stanoven bod ekvivalence.

#### 4.7.6 Transformace bakterií plasmidem

Vnesení plasmidové DNA do buňky (transformace) proběhla metodou tzv. teplotního šoku (angl. heat shock). Kompetentní buňky *E. coli* B834(DE3) a roztok plazmidu (pET-22b s genem kódujícím králičí cytochrom *b<sub>5</sub>* L41M) byly ponechány rozmraznout na ledu. Do mikrozkušavky bylo odebráno 50  $\mu$ l kompetentních buněk a přidáno 0,5  $\mu$ l roztoku plazmidu, do druhé mikrozkušavky bylo odebráno 50  $\mu$ l kompetentních buněk a 0,5  $\mu$ l destilované vody (kontrola). Mikrozkušavky byly inkubovány 10 min na ledu. Poté byly přeneseny do vodní lázně na 90 s o teplotě 42 °C a poté zpátky na led. Poté bylo k buňkám přidáno 0,5 ml LB média a mikrozkušavky byly inkubovány 50 min při 37 °C. Bakterie byly následně rozetřeny pomocí sterilní hokejky na LB agarové plotny s obsahem 100  $\mu$ g/ml ampicilinu. Plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

#### 4.7.7 Rekombinantní exprese proteinu

##### **Média použita při expresi:**

**LB médium (1 l):** 10 g trypton, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, sterilizováno v autoklávu

**Limitní médium M9 (1 l):** 200 ml 5 $\times$  M9 sůl (33,9g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5g/l NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>; 2,5g/l NaCl); 2 ml 1M MgSO<sub>4</sub>; 20 ml 20% glukosa; 0,1 ml 1M CaCl<sub>2</sub>; doplněno do 1 l sterilní H<sub>2</sub>O

Všechny použité roztoky byly sterilní.

##### **4.7.7.1 Exprese cytochromu *b<sub>5</sub>* M41 v LB médiu**

Jedna bakteriální kolonie z agarové plotny byla zaočkována do 40 ml LB média s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml) a kultivována přes noc (O/N kultura, z angl. over night) při 37 °C a 180 RPM. Do tří 0,5l Erlenmayerových baněk se 100 ml LB média a ampicilinem (finální koncentrace 100  $\mu$ g/ml) bylo přidáno 1 ml O/N kultury. Kultivace bakteriálních kultur probíhala při 37 °C a 180 RPM. V jednotlivých Erlenmayerových baňkách byla průběžně měřena optická denzita suspenze při 600 nm (OD<sub>600</sub>) na spektrofotometru DeNovix DS-11+Spectrophotometer v kyvetě s optickou drahou 10 mm proti deionizované vodě. Když se OD<sub>600</sub> bakteriálních kultur blížila hodnotě 0,6 byl obsah tří Erlenmayerových baněk smíchán, tím byla zajištěna stejná počáteční hodnota OD<sub>600</sub> před produkcí. Obsah byl znovu rozdělen do tří 0,5l Erlenmayerových baněk. Přídavkem isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) do finální koncentrace 1 mM byla indukována exprese proteinu. Protein byl exprimován po dobu 18 h při 37 °C, 180 RPM a



průběžně byly odebírány vzorky 500  $\mu$ l na elektroforézu a měření OD<sub>600</sub> (v časech t = 0 h, t = 2 h, t = 4 h, t = 6 h, t = 18 h).

Po 18 h jsme buněčnou suspenzi rozdělili do 6 zkumavek Falcon (50 ml) a centrifugovali je 3 min při 4000 RPM a 4 °C (Hettich Zentrifugen Universal 320 R, rotor 1620A). Pelety byly po centrifugaci spojeny a uchovány při –80 °C.

Vzorky odebírané v průběhu exprese byly odstředěny (3 min, 6000 RPM, centrifuga Eppendorf Mini Spin plus, rotor F-45-12-11), supernatant byl odebrán a peleta resuspendována v 100  $\mu$ l deionizované vody. Vzorky byly uloženy do -25 °C.

#### 4.7.7.2 *Expese foto-cytochromu b5 M41 v limitním médiu*

Pro získání foto-aktivovatelného proteinu proběhla kultivace bakterií v LB médiu a produkce proteinu v LM médiu s fMet. Postup kultivace byl stejný jako v kapitole 4.7.7.1. Po dosažení OD<sub>600</sub> přibližně 0,6 byla buněčná suspenze rozdělena do 6 zkumavek Falcon (50 ml) a centrifugována 3 min při 4000 RPM a 4 °C (Hettich Zentrifugen Universal 320 R, rotor 1620A). Supernatant byl ze zkumavek pečlivě odlit a každá peleta byla resuspendována ve 20 ml fosfátového pufru (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; pH 7,4; 6 °C). Postup centrifugace, odlití supernatantu a resuspendace ve 20 ml stejného fosfátového pufru byl opakován ještě dvakrát. Následovala poslední centrifugace, po které byla každá peleta resuspendována v 50 ml limitního média (LM) s foto-methioninem (125  $\mu$ g/ml). Buněčná suspenze byla rovnoměrně rozdělena do tří Erlenmayerových baněk, následovala inkubace po dobu 1h při 37 °C a 180 RPM. Při hodnotě OD<sub>600</sub> asi 1 byla přidávkem IPTG (finální koncentrace 1 mM) indukována exprese proteinu. Protein byl exprimován po dobu 16 h při 37 °C, 180 RPM a průběžně byly odebírány vzorky 500  $\mu$ l na elektroforézu a měření OD<sub>600</sub> (v časech t = 0 h, t = 2 h, t = 4 h, t = 6 h, t = 16 h). Tyto vzorky byly zpracovány jako v kapitole 4.7.7.1.

Po 16 h jsme buněčnou suspenzi rozdělili do 6 zkumavek Falcon (50 ml) a centrifugovali je 3 min při 4 °C a 4000 RPM (Hettich Zentrifugen Universal 320 R, rotor 1620A). Pelety byly po centrifugaci spojeny a uchovány při –80 °C.

#### 4.7.8 *Izolace cytochromu b<sub>5</sub>*

V průběhu izolace byly odebírány vzorky na SDS-PAGE a měření koncentrace proteinů pomocí BCA. Všechny kroky izolace probíhaly v chlazené místnosti při 6 °C, cb<sub>5</sub> M41 není v nepřítomnosti membrány za vyšších teplot stabilní.

#### 4.7.8.1 Rozbití buněk

Bakteriální peleta s exprimovaným proteinem byla rozmražena na ledu a poté resuspendována v 25 ml resuspendačního pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; pH 7,7). Do suspenze byla přidána tableta proteasových inhibitorů (Complete Mini, Roche, SRN). Buňky byly rozrušeny sonikací a proteiny byly uvolněny do roztoku. Sonikace probíhala v ledové lázni  $8 \times 2,5$  min sondou KE 76 (výkon 40 W). Přílišnému zahřátí preparátu jsme předcházeli 4 min přestávkami mezi jednotlivými sonikačními cykly.

#### 4.7.8.2 Diferenční centrifugace a solubilizace proteinů

Nerozbité kusy buněčné stěny bakterií byly odstraněny centrifugací po dobu 15 min při 5000 RPM a 4 °C (centrifuga HERMLE Z383K s rotorem 220.86). Supernatant byl dále ultracentrifugován po dobu 75 min při 60 000 RPM a 4 °C (ultracentrifuga Beckman LE-80K s předchlazeným úhlovým rotorem Ti 70). Supernatant obsahující především solubilní proteiny byl oddělen a peleta byla resuspendována v 20 ml pufru (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA, 20 % glycerol (v/v), pH 7,7) homogenizátorem dle Pottera a Elvehjema, do suspenze byla přidána tableta proteasových inhibitorů (dříve přidané inhibitory zůstaly v supernatantu).

V membránové frakci (resuspendovaná peleta) byla stanovena koncentrace proteinů pomocí BCA a naředěna fosfátovým pufrům (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7) na výslednou koncentraci proteinů 4 mg/ml.

Membránové proteiny byly solubilizovány přidávkem detergentů Brij 35 a cholát sodný. Ty byly přidány po kapkách za stálého míchání do výsledné koncentrace každého 1 mg detergentu/1 mg proteinu. Roztok byl míchán 2 hodiny pod dusíkovou atmosférou. Solubilizát byl titrován heminem postupem popsáním v kapitole 4.7.5.

Solubilizované proteiny byly ultracentrifugovány po dobu 75 min, při 60 000 RPM a 4 °C (ultracentrifuga Beckman LE-80K s předchlazeným úhlovým rotorem Ti 70) a supernatant nanesen na kolonu DEAE Sepharosy CL-6B FF.

#### 4.7.8.3 Chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B FF

##### **Pufry použité při chromatografii:**

**Ekvilibrační pufr 1 (EkP1):** 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % Brij 35; pH 7,7

**Eluční pufr 1 (EIP1):** 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 400 mM KCl; 1 mM EDTA; 20 % glycerol; 0,6 % Brij 35 (w/v); pH 7,7

**Dialyzační pufr 1 (DP1):** 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; 20 % glycerol; 0,3 % Brij 35 (w/v); pH 7,7

**Ekvilibrační pufr 2 (EkP2):** 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný (v/v); pH 7,7

**Eluční pufr 2 (EIP2):** 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 200 mM KCl; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný (v/v); pH 7,7

**Dialyzační pufr 2 (DP2):** 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7

První chromatografie na ionexové koloně DEAE Sepharosy CL-6B FF (DEAE1) s elucí gradientem iontové síly sloužila na purifikaci  $\text{cb}_5$  M41 ze směsi ostatních proteinů. Druhá chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B FF (DEAE 2) s izokratickou elucí byla provedena za účelem výměny detergentu Brij 35 za cholát sodný a zakoncentrování preparátu.

DEAE-Sepharosa CL-6B FF (Sigma Aldrich) o objemu asi 10 ml byla v kádince celkem 3× rozmíchána ve 300 ml destilované vody, dekantována a voda byla odebrána. Poté byl nosič rozmíchán v 200 ml cyklizačního pufru (1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ; pH 7,7) a ponechán v něm přes noc při 4 °C, aby došlo k nabití funkčních skupin nosiče. Poté byla opět rozmíchána v cyklizačním pufru a promyta destilovanou vodou 3× 300 ml. Voda byla odsáta, k nosiči bylo přidáno 100 ml pufru EkP1. Rozmíchaný nosič byl nalit do kolony, po usazení nosiče byla kolona uzavřena a ekvilibrována 300 ml ekvilibračního pufru pufru EkP1.

Solubilizovaný  $\text{cb}_5$  byl nanesen na kolonu rychlostí 1 ml/min a byly jímány 10ml frakce. Po nanesení vzorku byla kolona promyta ekvilibračním pufrem EkP1 do poklesu absorbance při 280 nm. Poté byl nanesený preparát eluován gradientem 0 – 400 mM KCl v elučním pufru EIP1.

U vybraných frakcí eluce byla změřena absorbance při 280 nm a 412 nm a byl z nich odebrán vzorek na SDS-PAGE pro ověření přítomnosti a čistoty  $\text{pcb}_5$  M41. Frakce s vyšším obsahem  $\text{pcb}_5$  M41 byly spojeny a zahuštěny. Zahušťování proběhlo na ultrafiltrační

aparatuře Amicon s membránou o mezní hodnotě propustnosti 30 kDa. Zahuštěné frakce byly dialyzovány proti 2 l dialyzačního pufru DP1 přes noc.

Nosič byl čištěn promytím 80 ml deionizované vody, 80 ml 2 M NaCl, 80 ml deionizované vody, 80 ml 1 M NaOH, 80 ml deionizované vody, 80 ml 70% ethanolu (v/v) a 50 ml deionizované vody. Nosič byl uchovávána v 20% ethanolu (v/v).

Nosič pro DEAE2 byl připraven jako v případě DEAE1, pouze ekvilibrován pufrům EkP2. Preparát po dialýze byl nanesen na kolonu rychlostí 0,6 ml/min a byly jímány frakce o různém objemu. Po nanesení preparátu byl  $pcb_5$  M41 eluován izokraticky elučním pufrům EIP2. Eluce byla ukončena po poklesu absorbce při 412 nm. Frakce s  $A_{412}$  dosahující alespoň maxima  $A_{412}$  byly spojeny a zahuštěny centrifugací při 6000 RPM a 4 °C (centrifuga HERMLE Z383K s rotorem 220.86) v centrifugačních zkumavkách s filtrem s mezní hranicí propustnosti 10 kDa (Amicon Ultra Centrifugal Filter Units) a poté byly dialyzovány proti 2 l dialyzačního pufru DP2 přes noc.

Výsledný preparát byl titrován heminem postupem popsaným v kapitole 4.7.5., zmražen v tekutém dusíku a uskladněn při -80 °C.

#### 4.7.9 Rekonstituce proteinů a jejich foto-sítování

Purifikovaný foto-cytochrom  $b_5$  ( $pcb_5$  M41) byl použit pro studium interakcí s redoxními partnery (cytochrom P450 2B4, NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa a NADPH:cytochrom P450 reduktasa) pomocí foto-chemického zesílení.

Nejdříve byly připraveny DLPC liposomy simulující přirozenou membránu rozpuštěním několik mg dilauroylfosfatidyleholinu (DLPC) v 200  $\mu$ l chloroformu, který byl následně odpařen. Na stěně mikrozkušavky tak zůstane tenký film DLPC. Do zkumavky byl přidán 1 ml pufru (100 mM  $KH_2PO_4/KOH$ ; pH 7,5) a liposomy byly vytvořeny sonikací sondou Bendelin KE 73 po dobu 2 min (4 cykly: 25 s sonikace, 5 s chlazení bez sonikace, amplituda 40 %), v ledové lázni. Zásobní roztok DLPC o koncentraci 0,6 mM byl připraven ředěním suspenze liposomů pufrům (100 mM  $KH_2PO_4/KOH$ ; pH 7,5).

K foto-aktivaci  $pcb_5$  M41 se používá fotolyzér s vysokotlakou rtuťovou výbojkou s výkonem 100 W. Za účelem potvrzení, že mezi jednotlivými experimenty nedochází ke změně intenzity emitovaného záření je po každém spuštění fotolyzéro provedena fotolýza

fenylazidu, během níž jsou v časech 0, 2 a 16 s měřena jeho absolutní spektra a z nich je určen poločas fotolýzy a je porovnán s dřívějšími hodnotami.

Před vlastní fotolýzou byly připraveny reakční směsi pcb<sub>5</sub> M41 s redoxními partnery v různých molárních poměrech s liposomy (finální koncentrace DLPC 0,15 mM) a pufrům (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; pH 7,5) v celkovém objemu 30 µl. Následovala inkubace na 1 h při 6 °C pro rekonstituci proteinů s membránou.

Reakční směs proteinů byla umístěna ve vodou chlazené křemenné kapiláře, před kterou se nacházela pyrexová kyveta odstraňující záření o vlnových délkách nižších než 300 nm. Každá reakční směs byla fotolyzována 195 s a analyzována pomocí SDS-PAGE.

## 5. Výsledky

### 5.1. Růst bakterií a exprese proteinu v LB a limitním médiu

Bakterie *E. coli* B834 (DE3) s plazmidem kódujícím králičí cytochrom b<sub>5</sub> L41M byly kultivovány v LB médiu, a to jak v případě pcb<sub>5</sub> M41, tak cb<sub>5</sub> M41. Hodnoty OD<sub>600</sub> (**Tab. 1**) ukazují, že v obou případech narůstaly bakteriální kultury stejnou rychlostí.

**Tab. 1** – Hodnoty OD<sub>600</sub> při kultivaci bakterií pro produkci cb<sub>5</sub> M41 a pcb<sub>5</sub> M41.

pcb <sub>5</sub> M41		cb <sub>5</sub> M41	
Čas (h)	OD <sub>600</sub>	Čas (h)	OD <sub>600</sub>
1	0,034	1	0,035
2,2	0,039	2,2	0,036
3,5	0,215	3,5	0,222
4,2	0,528	4,2	0,539
4,3	0,603	4,5	0,766

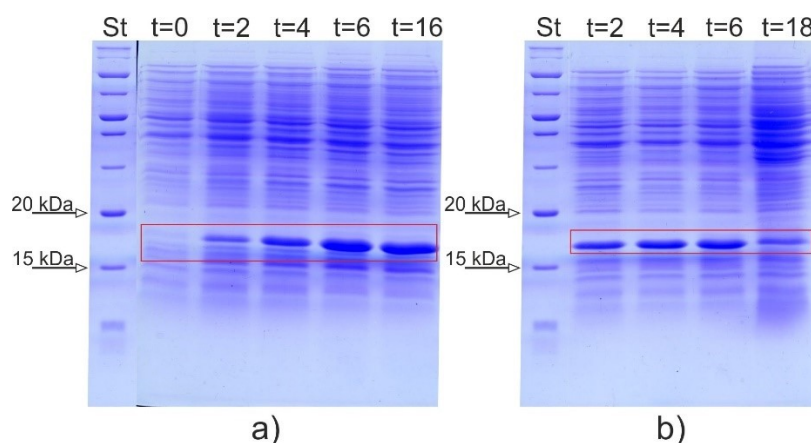
Po dosažení OD<sub>600</sub> 0,766 v LB médiu byly kultury ze tří Erlenmayerových baněk spojeny a znovu rozděleny, aby byla ve všech dosažená stejná hodnota OD<sub>600</sub> před produkcí. V tomto procesu došlo k nárůstu hodnoty OD<sub>600</sub> v bakteriální kultuře LB média, která byla poté indukována při OD<sub>600</sub> 0,947 (**Tab. 2**, str. 39). V případě pcb<sub>5</sub> M41 po dosažení OD<sub>600</sub> 0,603 následovala výměna LB média za LM a asi 1 h kultivace, při které došlo k nárůstu OD<sub>600</sub> na 0,883 při níž byla provedena indukce. Poté byly odebírány vzorky v různém čase, byla měřena jejich OD<sub>600</sub> (**Tab. 2**, str. 39) a byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (**Obr. 11**, str. 39).

Jednotlivé dráhy na **Obr. 11**, na str. 39 jsou v dobré shodě s **Tab. 2**, na str. 39. V LM v čase narůstá množství exprimovaného proteinu, zatímco množství ostatních bakteriálních proteinů se téměř nemění (**Obr. 11**, str. 39). To odpovídá i pozvolna se zvyšující OD<sub>600</sub> (**Tab. 2**, str. 39). V LB médiu v čase 2 – 6 h narůstá množství cb<sub>5</sub> M41, zatímco množství ostatních proteinů se skoro nezvyšuje. Hodnoty OD<sub>600</sub> narůstají v bohatším LB médiu rychleji než v LM. Ovšem po 18 h je patrné, že množství bakteriálních proteinů se výrazně zvýšilo v poměru k exprimovanému cb<sub>5</sub> M41, tomu odpovídá i prudký

nárůst OD<sub>600</sub>. Od určité doby se patrně vyčerpá induktor (IPTG), bakterie přestaly exprimovat cb<sub>5</sub> M41 a kultura začala znovu růst. Preparát s vysokým obsahem kontaminujících proteinů není pro izolaci optimální, lepší by bylo ukončit produkci už po 6 h.

**Tab. 2** – Hodnoty OD<sub>600</sub> při produkci pcb<sub>5</sub> M41 a cb<sub>5</sub> M41.

LM médium (pcb <sub>5</sub> M41)		LB médium (cb <sub>5</sub> M41)	
Čas (h)	OD <sub>600</sub>	Čas (h)	OD <sub>600</sub>
0	0,883	0	0,947
2	1,122	2	1,448
4	1,306	4	1,492
6	1,324	6	1,785
16	1,297	18	4,322



**Obr. 11** – 15% SDS-PAGE vzorků pcb<sub>5</sub> (a) a cb<sub>5</sub> (b) v různých časech produkce (uvedeno v hodinách). *St* – standard molekulových hmotností. Vzorek *t=18* je 5× ředěn, vzorek *t=0* (b) na gel nenanesen.

## 5.2. Stanovení míry inkorporace foto-methioninu hmotnostní spektrometrií

Proteinové zóny pcb<sub>5</sub> M41 v různých časech produkce (**Obr. 11**) byly z gelu vyříznuty, proteolyticky štěpeny a pomocí MS v nich byla stanovena míra inkorporace foto-methioninu do struktury proteinu. Analýzu provedl RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

V MALDI-TOF hmotnostním spektru byly nalezeny signály odpovídající peptidům <sup>39</sup>FfMEEHPGGEEVLR<sub>51</sub> s fMet (1509,79 *m/z*), <sup>39</sup>FMEEHHPGGEEVLR<sub>51</sub> s Met (1529,75 *m/z*) a <sup>39</sup>FoMEEHPGGEEVLR<sub>51</sub> s oxidovaným Met (1545,77 *m/z*) cytochromu b<sub>5</sub>.

Při ionizaci pcb<sub>5</sub> M41 pomocí MALDI dochází k odštěpení N<sub>2</sub> z fMet, peptid ztrácí 28 Da. Míra inkorporace foto-methioninu do struktury cytochromu b<sub>5</sub> byla vypočtena z rovnice:

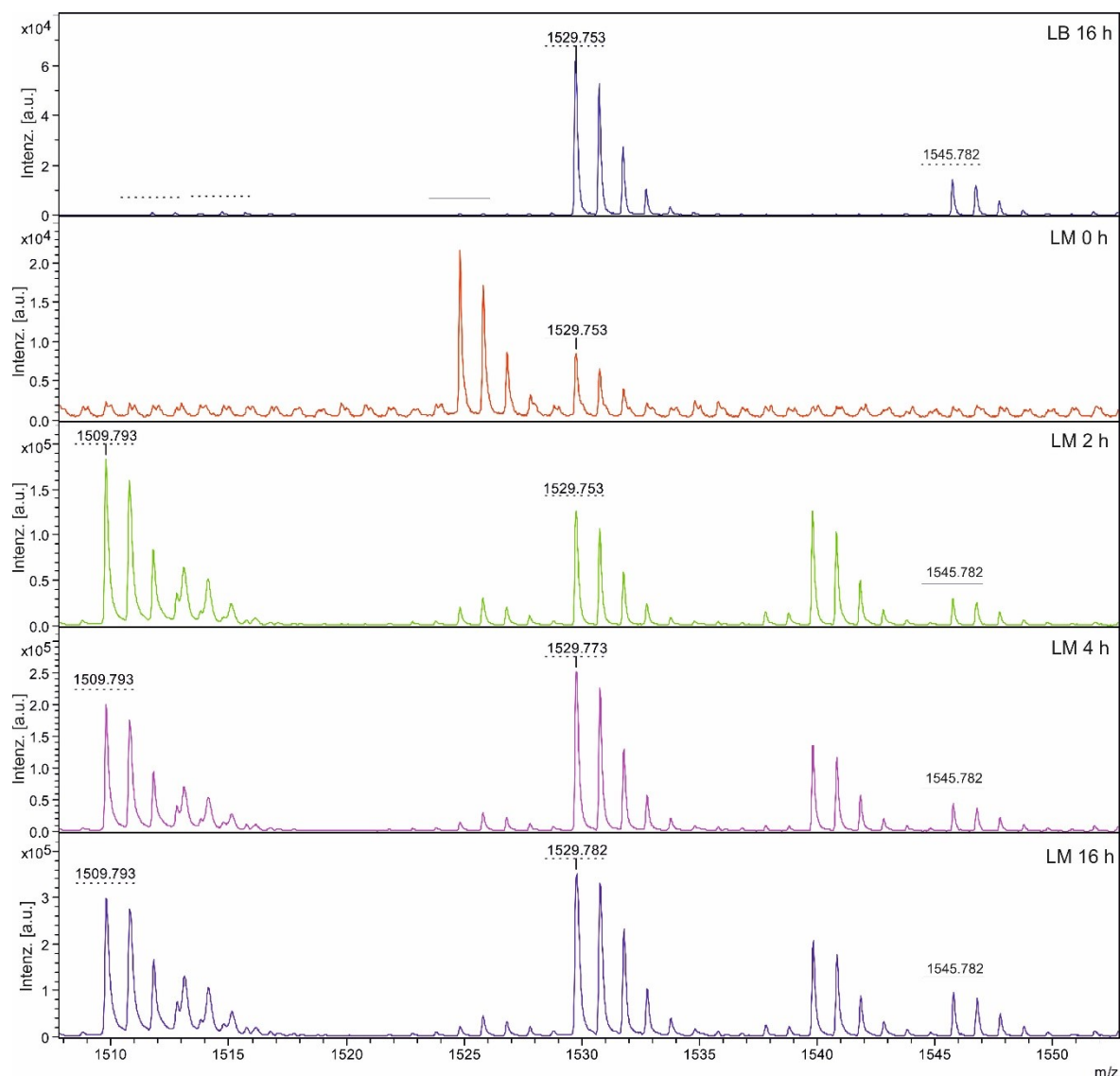
$$\frac{I_{\text{fMet}}}{I_{\text{fMet}} + I_{\text{Met}} + I_{\text{MetOX}}} = \frac{3\text{E}5}{3\text{E}5 + 3,54\text{E}5 + 0,9\text{E}5} = 0,40,$$

kde  $I_{\text{fMet}}$ ,  $I_{\text{Met}}$  a  $I_{\text{MetOX}}$  jsou intenzity monoizotopických píků peptidů 39 – 51 obsahujících fMet, Met a oxidovaný Met. Pomocí hmotnostní spektrometrie byla stanovena míra inkorporace foto-methioninu na 40 %. Průběžné hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 3**.

**Tab. 3** – Hodnoty inkorporace fMet v různých časech produkce pcb<sub>5</sub>.

Čas produkce (h)	Inkorporace fMet (%)
2	54
4	40
16	40





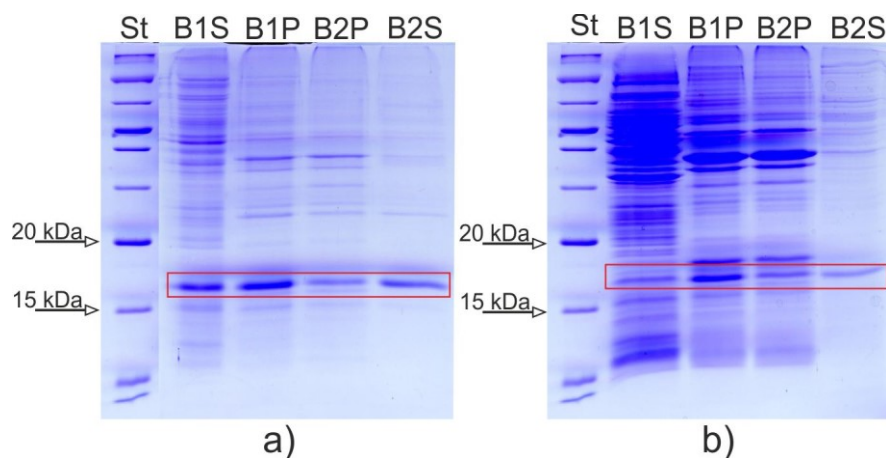
**Obr. 12** – MALDI-TOF hmotnostní spektra vzorků z LB a LM média v uvedených časech. Signály 1509,75  $m/z$ , 1529,79  $m/z$  a 1545,77  $m/z$  odpovídají peptidům 39 – 51 s fMet, Met a oxidovaný Met.

Přítomnost  $cb_5$  M41 s Met v LM v čase 0 h (**Obr. 12**) naznačuje, že v malé míře došlo k produkci  $cb_5$  M41 již před indukci. Zastoupení fMet je po 2 h produkce vyšší než Met, ale v 4 a 16 h produkce je už nižší. Nedochozí však k dalšímu poklesu inkorporace fMet pod 40 %.

### 5.3. Izolace cytochromu $b_5$

Směs bakteriálních proteinů a exprimovaného  $cb_5$  M41 byla získána rozrušením bakterií pomocí sonikace.  $Cb_5$  M41 byl z této směsi purifikován v několika krocích. Prvním byla diferenční centrifugace, při které se oddělují různé orgány při centrifugacích o zvyšujícím se  $g$ . Při první ultracentrifugaci se oddělují solubilní a membránové proteiny

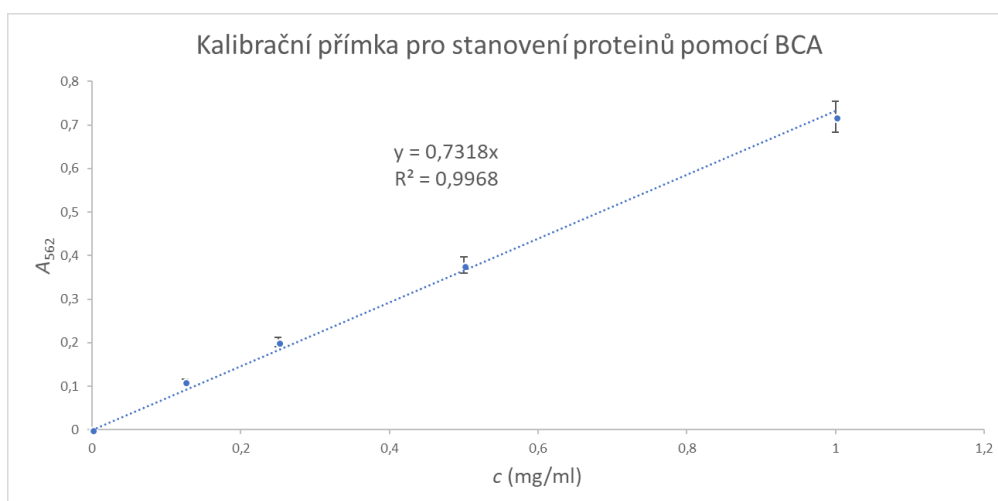
(vzorky B1S a B1P na **Obr. 13**). Druhá ultracentrifugace ukazuje úspěšnost solubilizace membránových vzorků B1P (vzorky B2S a B2P na **Obr. 13**)



**Obr. 13** – 15% SDS-PAGE rozdělení proteinů bakteriální suspenze obsahující *pcb5* M41 (a) a *cb5* M41 (b) mezi peletu (P) a supernatant (S) ultracentrifugací před (B1) a po (B2) solubilizaci proteinů. *St* – standard molekulových hmotností.

Při první ultracentrifugaci byly z preparátu odděleny solubilní proteiny, které zůstaly v supernatantu. V případě *pcb5* M41 téměř 50 % proteinu zůstalo v supernatantu, to znamenalo velké ztráty. Důvodem mohl být špatné sbalení proteinu nebo odštěpení jeho membránové kotvy bakteriálními proteasami. U *cb5* M41 ani v dřívějších experimentech nebyl tento jev pozorován.

V resuspendované peletě po první ultracentrifugaci byla určena celková koncentrace proteinů pomocí BCA, jako standard pro sestavení kalibrační křivky (**Obr. 14**) byl použit sérový albumin.



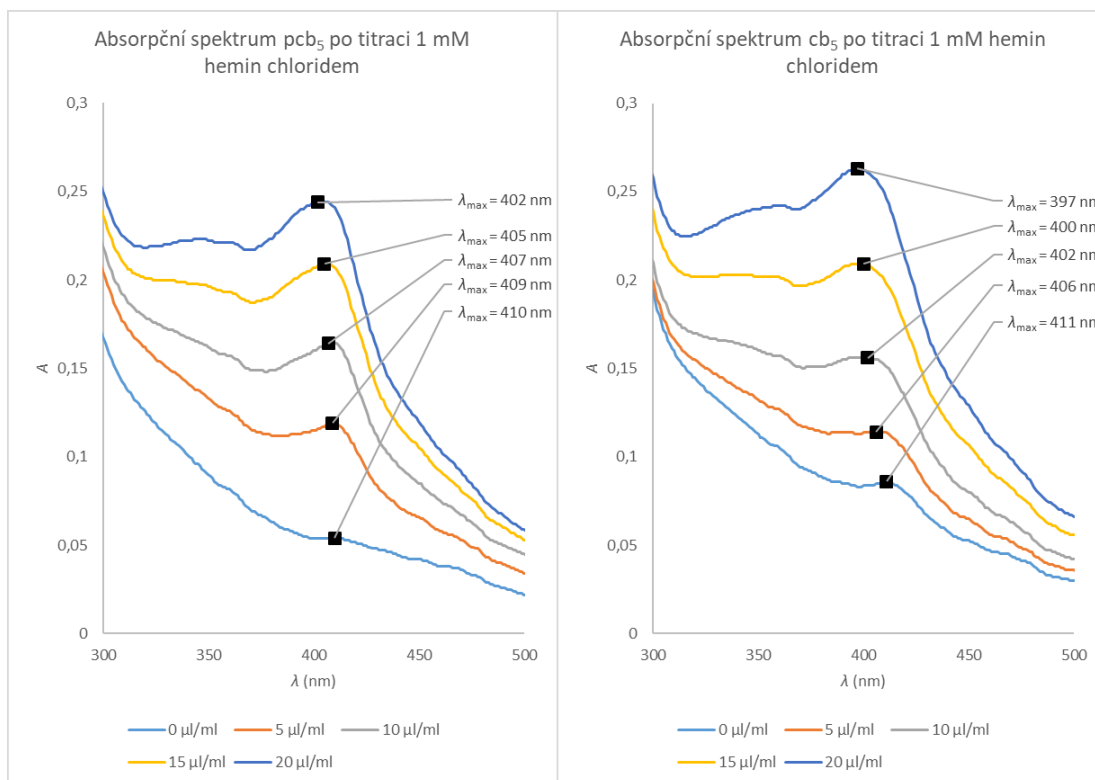
**Obr. 14** – Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů.

Pomocí BCA byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorcích po první ultracentrifugaci 5,19 mg/ml (pcb<sub>5</sub> M41) a 11,65 mg/ml (cb<sub>5</sub> M41). Preparáty byly ředěny pufrům (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH; 1 mM EDTA; pH 7,7) na koncentraci přibližně 4 mg/ml pcb<sub>5</sub> M41 1,3× a cb<sub>5</sub> M41 3×. K preparátům bylo přidáno 1,8 ml (pcb<sub>5</sub> M41) a 3,9 ml (cb<sub>5</sub> M41) roztoku detergentů (7,5% Brij 35 (w/v); 7,5% cholát sodný (v/v)), poté byly oba preparáty solubilizovány 1 h za stálého míchání. Solubilizací byl cb<sub>5</sub> M41 uvolněn z membrán do roztoku. Solubilizát byl od membránových frakcí oddělen druhou ultracentrifugací (dráhy B2P a B2S na **Obr. 13**, str. 42).

#### 5.4. Titrace heminem

Bakterie produkují protein (cb<sub>5</sub> M41) rychleji, než syntetizují hem, proto určité množství cytochromu b<sub>5</sub> se po produkci vyskytuje v apoenzymové formě, tedy neobsahuje hemovou prostetickou skupinu. Hem se proto do molekuly proteinu inkorporuje uměle přidáním roztoku heminu.

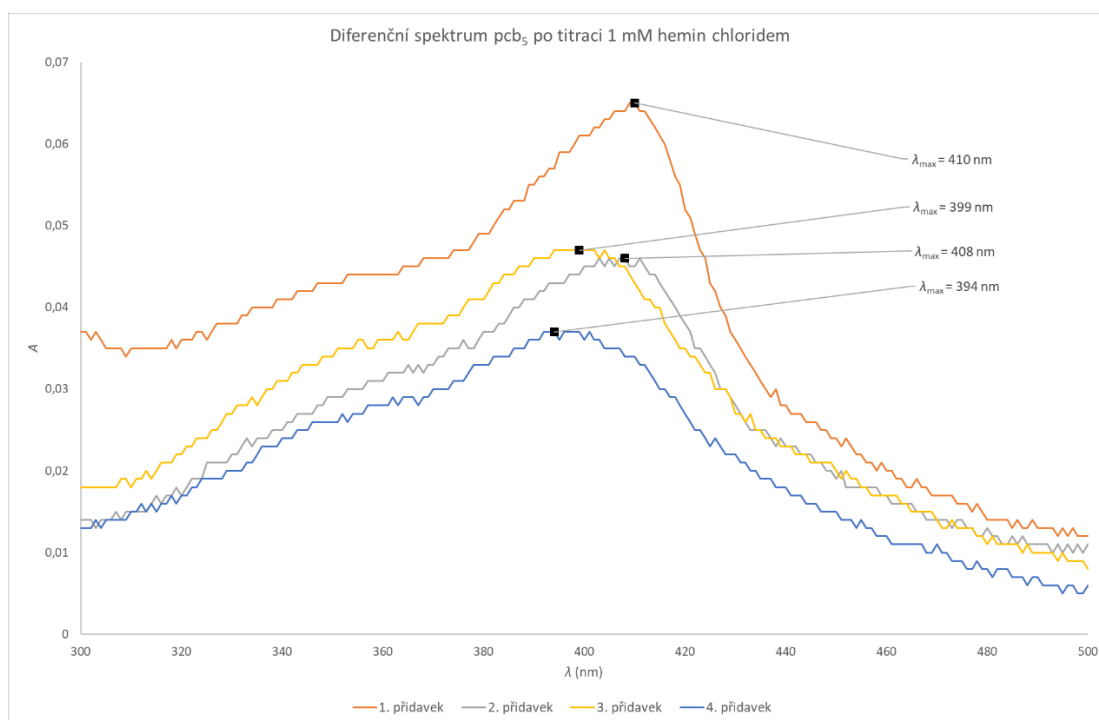
Nejprve bylo množství heminu, které je potřeba k preparátu přidat určeno, titrací 100 µl alikvoty. Pokles absorpčního maxima k nižším vlnovým délkám ukazuje na přítomnost volného heminu, který se dál neváže do aktivního centra proteinu. Množství přidaného heminu jsme považovali za vhodné, pokud jeho přídavek nezpůsobil posun absorpčního maxima v absolutním (**Obr. 15**, str. 44) ani v diferenčním (**Obr. 16 a Obr. 17**, str. 45) spektru k nižším vlnovým délkám než 405 nm. V minulých experimentech se ukázalo, že takový nadbytek heminu je možné v následujících purifikačních krocích z preparátu odstranit.



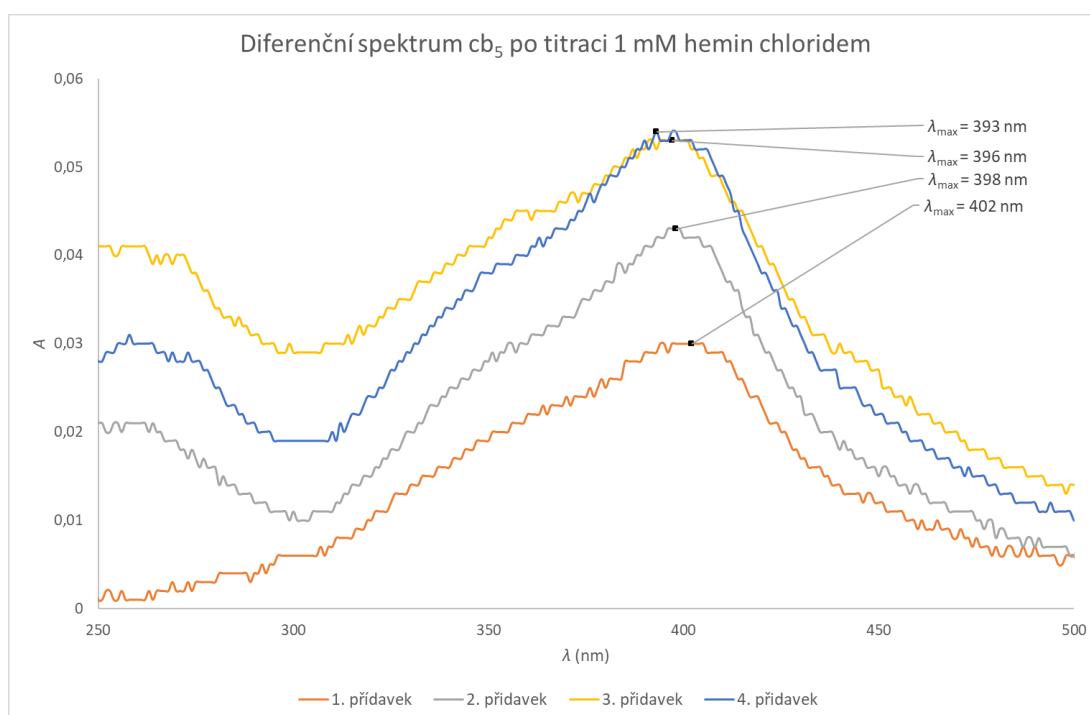
**Obr. 15** – Absolutní spektra cb<sub>5</sub> M41 a pcb<sub>5</sub> M41 s jednotlivými přidavky 1 mM heminu na ml preparátu proteinu a vyznačenými vlnovými délkami absorpčních maxim.

Diferenční spektra (**Obr. 16** a **Obr. 17**, str. 45) byla získána jako rozdílem absolutních spekter (**Obr. 15**) po přidavku heminu a před jeho přidáním.

Preparát pcb<sub>5</sub> M41 byl titrován přidavkem 10 μl 1 mM heminu/1 ml proteinu a cb<sub>5</sub> M41 15 μl 1 mM heminu/1 ml proteinu.



**Obr. 16** – Diferenční spektrum  $pcb_5$  M41 po jednotlivých přidavcích heminu s vyznačenými vlnovými délkami absorpčních maxim.



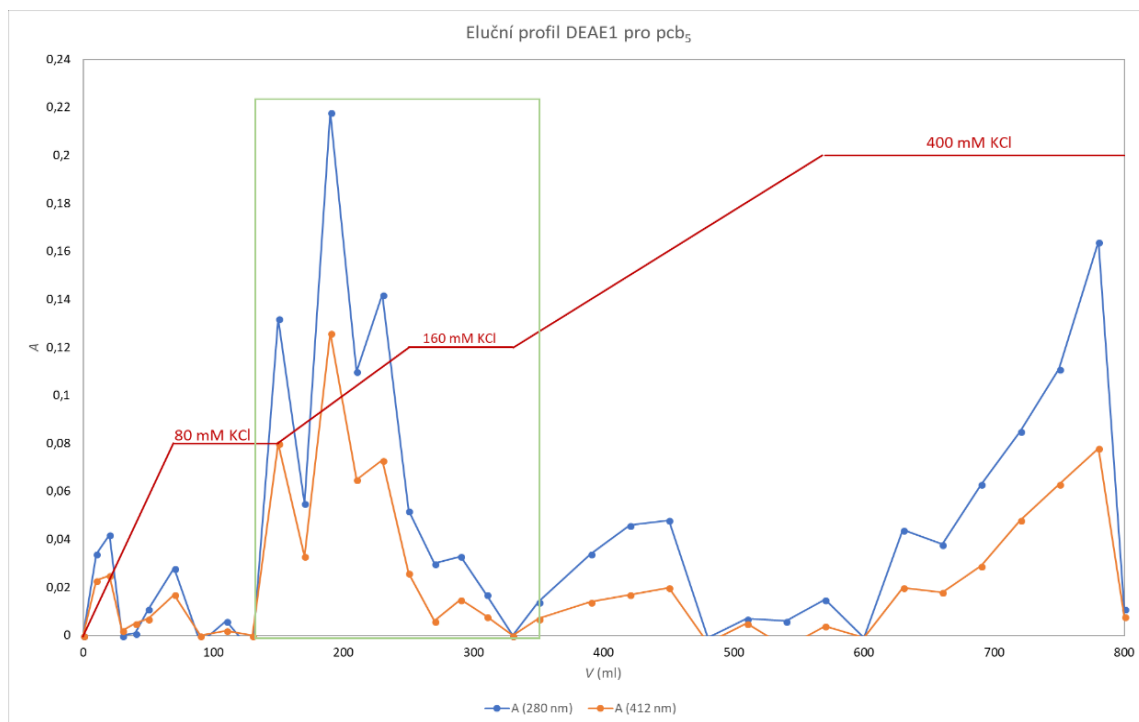
**Obr. 17** – Diferenční spektrum  $cb_5$  M41 po jednotlivých přidavcích heminu s vyznačenými vlnovými délkami absorpčních maxim.

Celkový přídavek 1 mM hemin chloridu byl určen na 0,4 ml (10  $\mu$ l 1 mM heminu/1 ml proteinu) pro pcb<sub>5</sub> M41 a na 1,2 ml (15  $\mu$ l 1 mM heminu/1 ml proteinu) pro cb<sub>5</sub> M41.

### 5.5. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B FF

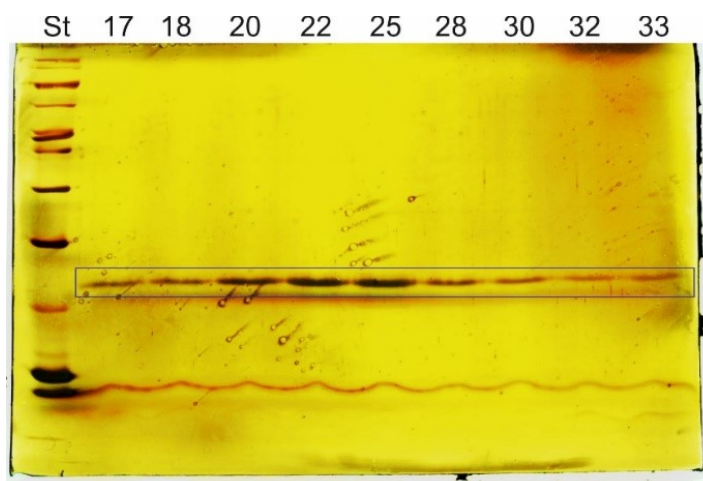
Cb<sub>5</sub> M41 i pcb<sub>5</sub> M41 byly purifikovány pomocí ionexové chromatografie na koloně DEAE Sepharosy CL-6B FF, jedná se o anex a při pH 7,7 se na ní zachycuje cytochrom b<sub>5</sub>, jehož teoretické pI je 5,14 [67]. Zatímco část kontaminujících proteinů za těchto podmínek na nosič neváže.

Pro purifikaci solubilizovaného cb<sub>5</sub> M41 byla použita stará, komerčně plněná kolona DEAE Sepharosy CL-6B FF, na kterou se preparát po nanesení ireverzibilně navázal, a tato větev experimentu byla ukončena. Pro pcb<sub>5</sub> M41 byla použita nová, ručně nalitá DEAE Sepharosa CL-6B FF, byla ekvilibrován 300 ml ekvilibračního pufru EkP1, poté na ní bylo naneseo 39,3 ml preparátu a nosič byl promyt 130 ml pufru EkP1. Eluce proteinů z kolony DEAE1 probíhala postupným zvyšováním iontové síly dokud nezačal vytékat pcb<sub>5</sub> M41 (zvýšení  $A_{412}$ ), poté eluce probíhala za konstantní koncentrace KCl v pufru (80 mM) do poklesu  $A_{412}$ . Po zvýšení iontové síly došlo zase k nárůstu  $A_{412}$ , proto opět následovala eluce s konstantní koncentrací KCl v pufru (140 mM) až do poklesu  $A_{412}$ . Po poklesu  $A_{412}$  byla zvýšená iontová síla na 400 mM KCl. Byly sbírány frakce o velikosti 10 ml. Použitý gradient a eluční profil chromatografie je na **Obr. 18**, str. 47.



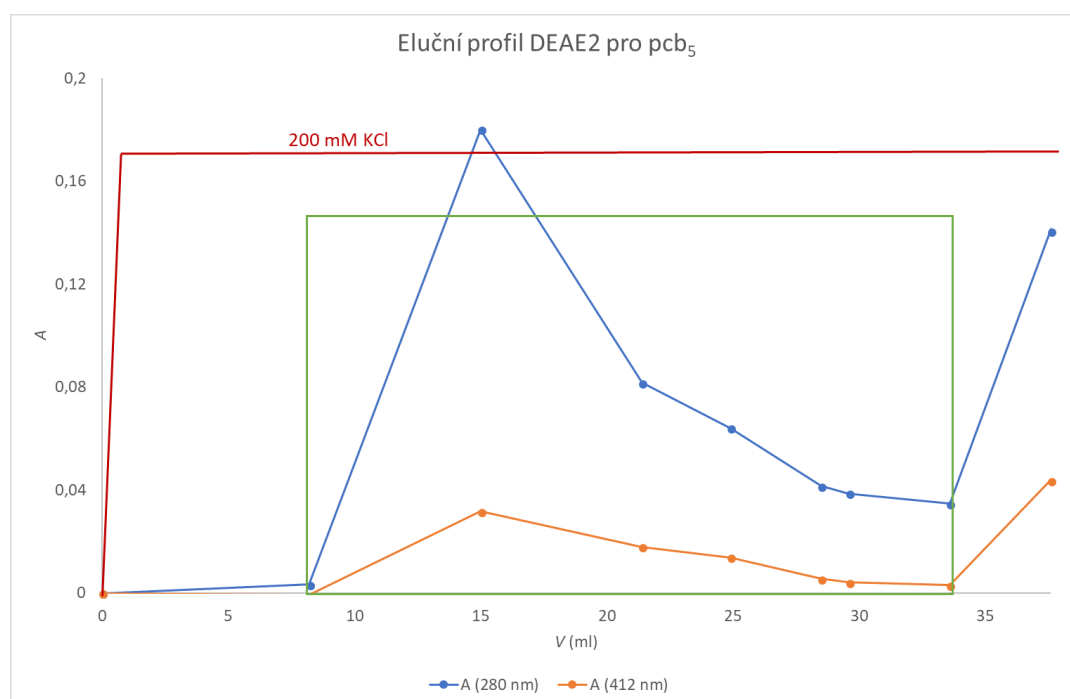
**Obr. 18** – Eluční profil chromatografie  $pcb_5$  M41 na koloně DEAE1. Červeně zvýrazněn gradient KCl a zeleně zvýrazněny spojené frakce.

Frakce s vyšší  $A_{412}$  byly dále charakterizovány pomocí SDS-PAGE (**Obr. 19**) a na jejím základě byly spojeny frakce 17 – 33 obsahující  $pcb_5$  M41 bez většího množství kontaminačních proteinů. Spojené frakce byly zahuštěny na 18 ml pomocí membrány s mezní hodnotou propustnosti 30 kDa. Dřívější zkušenosti ukázaly, že cytochrom  $b_5$  je v přítomnosti detergentu Brij 35 touto membránou zadržen.



**Obr. 19** – 15% SDS-PAGE frakcí  $pcb_5$  M41 po chromatografii DEAE1. *St* – standard molekulových hmotností, 17-33 čísla frakcí, modrý obdélník zvýrazňuje  $pcb_5$  M41.

Dialyzovaný preparát po chromatografii DEAE1 (19,6 ml) byl nanesen na kolonu DEAE2 ekvilibrovanou pufrům EkP2 obsahujícím detergent cholát sodný. Po nanesení preparátu byla kolona promyta 70 ml pufru EkP2 a  $pcb_5$  M41 byl eluován izokraticky pufrům s vysokou iontovou silou EIP2. Při chromatografii byly jímány frakce s různým objemem. Eluční profil chromatografie ukazuje **Obr. 20**. Preparát měl podle SDS-PAGE (**Obr. 19**, str. 47) dostatečnou čistotou už po předchozí chromatografii, proto analýza čistoty frakcí u této chromatografie nebyla provedena. Frakce 2 – 7 o výsledném objemu 25,4 ml byly spojeny na základě absorbance při 412 nm a zahuštěny na 200  $\mu$ l. Cholát sodný byl ze vzorku odstraněn dialýzou proti 2 l pufru DP2 neobsahujícím detergent.

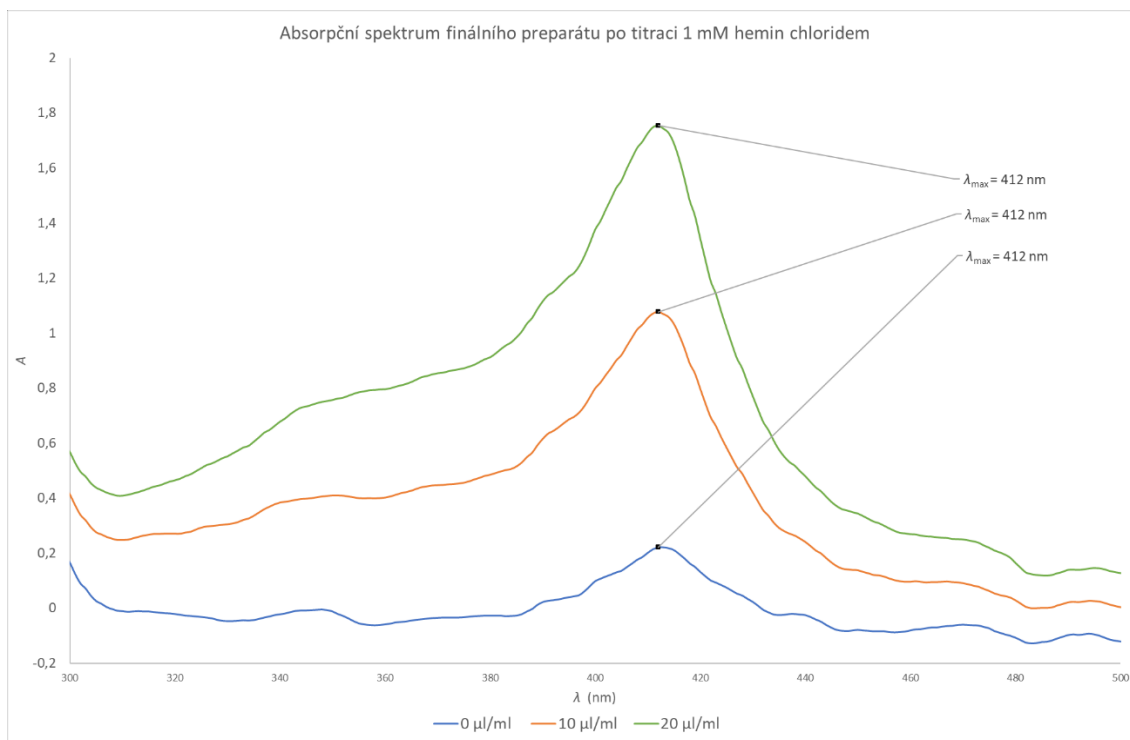


**Obr. 20** – Eluční profil chromatografie  $pcb_5$  M41 na koloně DEAE2. Červeně zvýrazněná koncentrace KCl a zeleně spojené frakce.

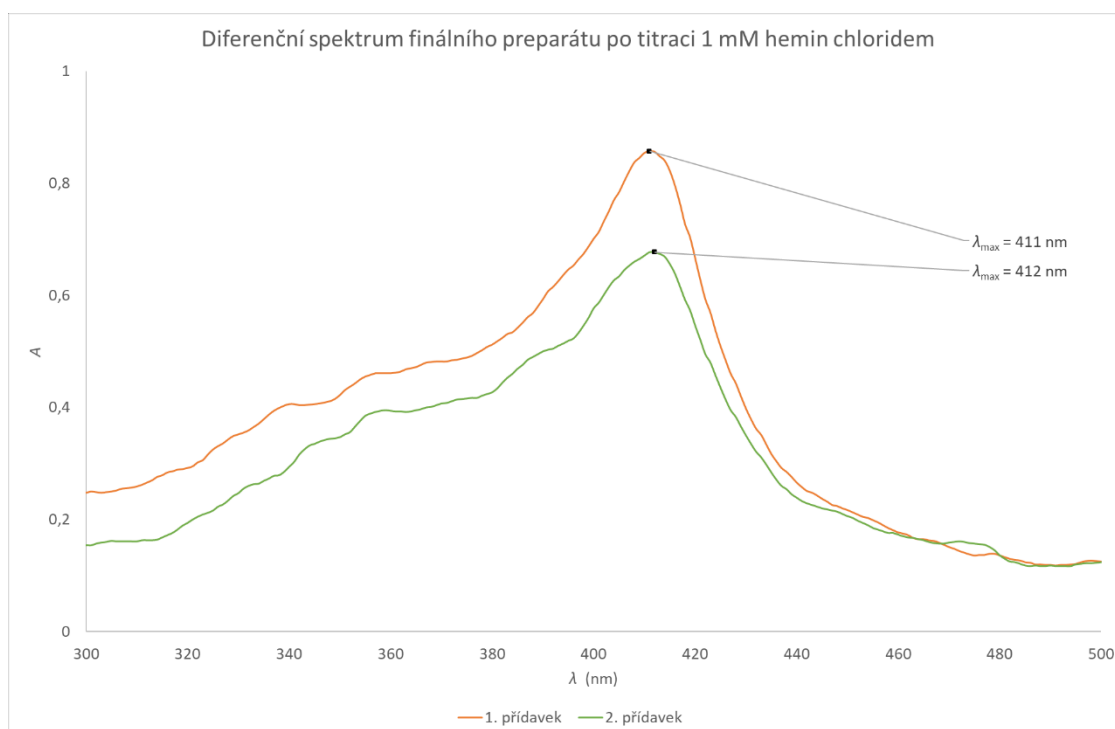
## 5.6. Titrace finálního preparátu hemin chloridem

Finální preparát byl titrován heminem pro zvýšení výtěžku holoenzymové formy  $pcb_5$  M41. Průběh titrace zobrazuje absolutní (**Obr. 21**, str. 49) a diferenční spektrum (**Obr. 22**, str. 49).





**Obr. 21** – Absolutní spektrum titrace finálního preparátu  $pcb_5$  M41 s jednotlivými přídávky 1 mM heminem na 1 ml preparátu proteinu a vyznačenými vlnovými délkami absorpčního maxima.

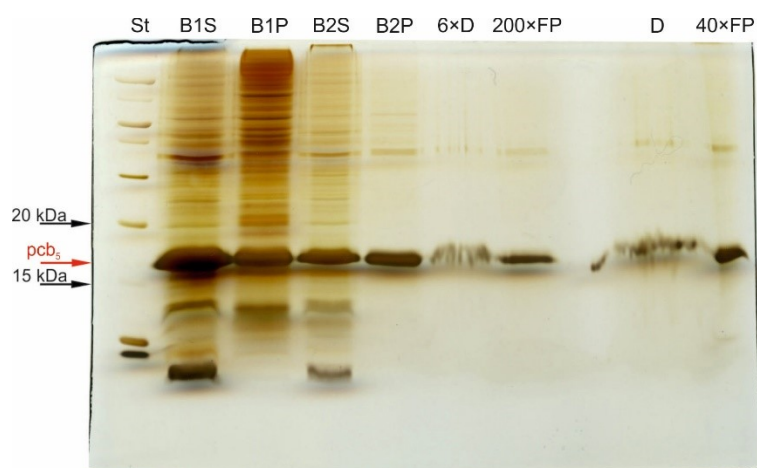


**Obr. 22** – Diferenční spektrum finálního preparátu  $pcb_5$  M41 po jednotlivých přídávkách heminu s vyznačenými vlnovými délkami absorpčního maxima.

Aby preparát neobsahoval volný hemin, byla oproti kapitole 5.4. titrace ukončena již při poklesu absorpčního maxima na 411 nm (**Obr. 22**, str. 49). Do finálního preparátu byly přidány 4  $\mu$ l 1mM hemin chloridu (20  $\mu$ l 1mM heminu/1 ml preparátu).

### 5.7. Shrnutí průběhu izolace

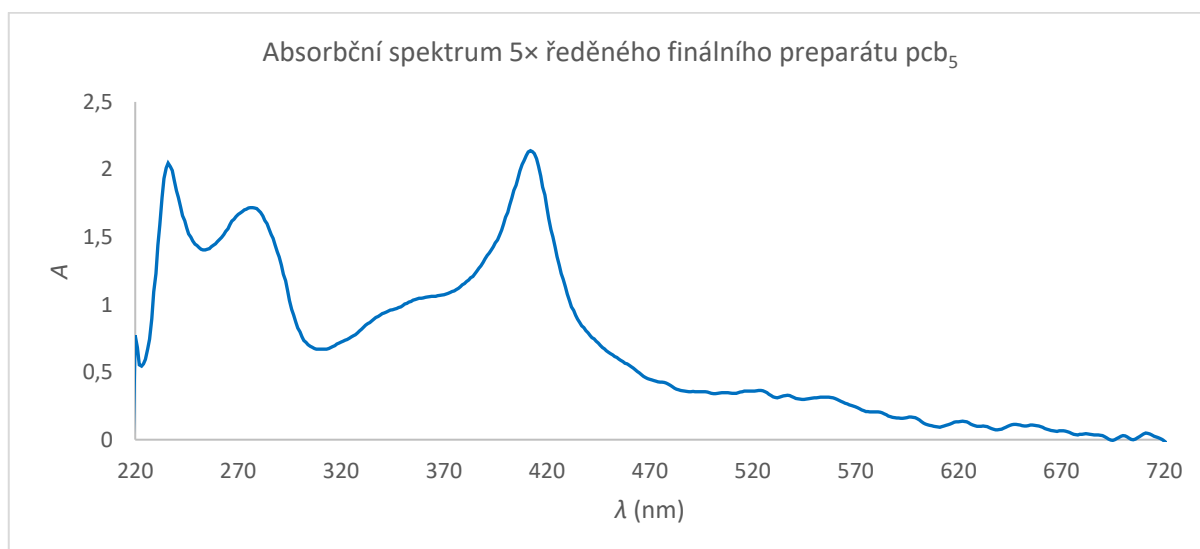
V průběhu izolace  $pcb_5$  M41 byly odebírány vzorky, a ty byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (**Obr. 23**) a byla v nich stanovena celková koncentrace proteinů pomocí BCA (**Tab. 4**, str. 51). Koncentrace finálního  $pcb_5$  M41 byla stanovena z absolutního spektra (**Obr. 24**, str. 51). V průběhu izolace dochází k poklesu celkové koncentrace proteinů v preparátu (**Tab. 4**, str. 51), které je doprovázeno významným zvýšením čistoty  $pcb_5$  M41 (**Obr. 23**).



**Obr. 23** – 15% SDS-PAGE. *St* – standard molekulových hmotností, *B1S* a *B1P* – supernatant a peleta po první ultracentrifugaci, *B2S* a *B2P* – supernatant a peleta po druhé ultracentrifugaci, *6xD* a *D* – 6 $\times$  ředěný a neředěný dialyzovaný vzorek po DEAE1, *200xFP* a *40xFP* - 200 $\times$  a 40 $\times$  ředěný finální preparát. Rozmyté zóny vzorků *D* jsou způsobeny přítomností detergentu Brij 35.

**Tab. 4** – Celková koncentrace proteinů stanovená pomocí BCA v jednotlivých krocích izolace pcb<sub>5</sub> M41.

Vzorek	Ředění	c (mg/ml)	m <sub>celk</sub>	V <sub>celk</sub>	Relativní odchylka
Peleta po 1. ultracentrifugaci	25	0,112	69,904	25	6,4%
Supernatant po 1. ultracentrifugaci	25	0,092	57,5	25	2,9%
Peleta po 2. ultracentrifugaci	25	0,106	66,521	25	1,5%
Supernatant po 2. ultracentrifugaci	25	0,098	66,2	27	12,8%
Dialyzovaný vzorek po DEAE1	10	0,109	21,303	19,6	8,3%
Finální preparát	400	0,076	6,043	0,01	1,9%



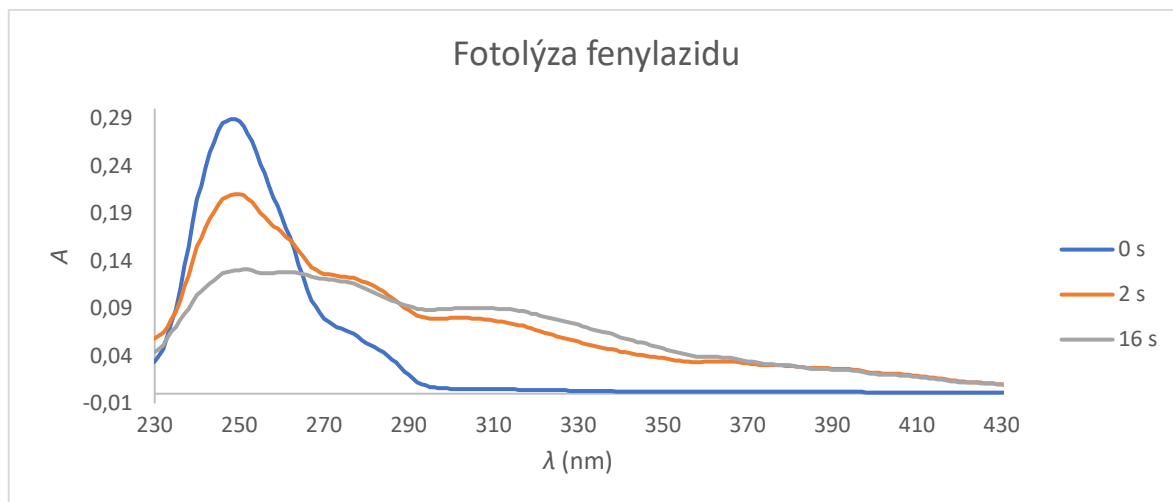
**Obr. 24** – Absolutní spektrum 5× ředěného finálního preparátu pcb<sub>5</sub> M41.

Celkem bylo izolací získáno 200  $\mu$ l finálního preparátu o koncentraci pcb<sub>5</sub> M41 76,8  $\mu$ mol/l. Z 300 ml média byl získán pcb<sub>5</sub> M41 s látkovým množstvím 15,4 nmol (51 nmol proteinu/l l kultivačního média).

#### 5.8. Foto-síťování foto-cytochromu b<sub>5</sub> s redoxními partnery

Intenzita záření vysokotlaké rtuťové výbojky fotolyzéro byla testována pomocí fotolýzy fenylazidu, jehož poločas fotolýzy byl při předchozích měřeních vždy 2 s a fotolýza byla kompletní po 16 s. Roztok fenylazidu o koncentraci 0,5 M byl fotolyzován v křemenné kapiláře propouštějící UV záření nad 200 nm po dobu 0, 2 a 16 s a byla měřena absolutní

spektra roztoku. **Obr. 25** ukazuje dvojnásobný pokles  $A_{250}$  po 16 s ozáření oproti poklesu po 2 s (vztaženo k  $A_{250}$  neozářeného vzorku).

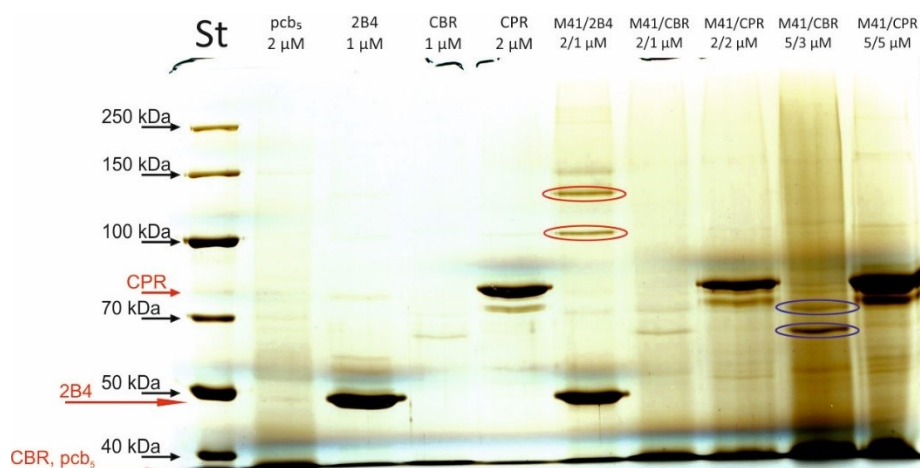


**Obr. 25** – Absorbční spektra fenylazidu fotolyzovaného uvedený čas.

Fotolýzer emituje široké spektrum vlnových délek s maximem přibližně při 250 nm. Aby při fotolýze nedošlo k poškození proteinů, byly vlnové délky nižší než 300 nm odstíněny pyrexovou kyvetou umístěnou před fotolyzovanou reakční směs. Samostatné nefotolyzované proteiny sloužily jako kontroly. Reakční směsi  $pcb_5$  M41 s reduktasami byly připraveny ve dvou různých koncentracích. Vyšší než fyziologické koncentrace proteinů byly testovány ve snaze zvýšit výtěžek případných kovalentních komplexů. Pro fotosíťování byly připraveny binární směsi proteinů o koncentracích uvedených v **Tab. 5** a rekonstituovány s DLPC (finální koncentrace 150  $\mu$ M) postupem popsáným v kapitole 4.7.9. Reakční směsi byly fotolyzovány 195 s.

**Tab. 5** – schéma složení reakčních směsí pro fotolýzu

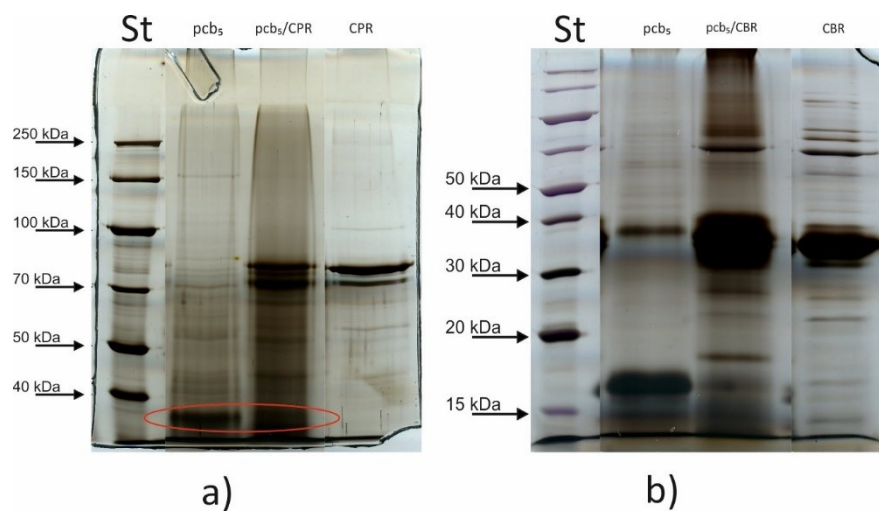
reakční směs	$pcb_5$ :CYB 2B4	$pcb_5$ :CBR	$pcb_5$ :CBR	$pcb_5$ :CPR	$pcb_5$ :CPR
molární poměr ( $\mu$ M)	2:1	2:1	5:3	2:2	5:5



**Obr. 26** – 8% SDS-PAGE studovaných proteinů a jejich binárních směsí po fotoýze. Koncentrace jednotlivých proteinů uvedeny v  $\mu\text{M}$ . *St* – standard molekulových hmotností. Produkty foto-chemického zesílení jsou zvýrazněny červeně, modře jsou zvýrazněny zóny analyzované pomocí MS.

Tvorbou kovalentních komplexů  $\text{pcb}_5$  M41 s CYP 2B4 byla prokázána jeho schopnost foto-síťování izolovaného preparátu a úspěšně tak byly zopakovány výsledky Ječmen *et al.* [68] (dráha 6, **Obr. 26**). Nepodařilo se získat produkt síťování  $\text{pcb}_5$  M41 s CPR ani při jednom molárním poměru (dráhy 7 a 9, **Obr. 26**). Dvě zóny potenciálních produktů zesílení byly detekovány s CBR (modře zvýrazněné v dráze 9 na **Obr. 26**). Analýza MS ovšem nepotvrdila že se jedná o komplexy uvedených proteinů.

Fotolýza směsí  $\text{pcb}_5$  M41 s CBR a CPR byla zopakována (koncentrace proteinů byla  $1 \mu\text{M}$ ). Při přípravě reakčních směsí na fotolyzační reakce došlo nedbalou manipulací se vzorky ke kontaminaci preparátu  $\text{pcb}_5$  M41 preparátem CBR. Vzorky byly separovány pomocí SDS-PAGE (**Obr. 27**, str. 54) o hustotě vhodnější pro nalezení produktů foto-síťování – 8% pro  $\text{pcb}_5$  M41 a CPR (molekulová hmotnost teoretického komplexu 1:1 je 94 kDa) a 15% pro  $\text{pcb}_5$  M41 a CBR (molekulová hmotnost teoretického komplexu 1:1 je 50 kDa). Bohužel lepší separace ani to nevedlo k nalezení kovalentních komplexů mezi  $\text{pcb}_5$  M41 a některou s reduktas jak ukazuje **Obr. 27**, str. 54.



**Obr. 27** – a) 8% SDS-PAGE, b) 15% SDS-PAGE, studovaných proteinů a jejich binárních směsí po fotolýze. Koncentrace proteinů je 1  $\mu$ M. *St* – standard molekulových hmotností. Červeně zvýrazněna kontaminace vzorku *pcb5* M41 vzorkem CBR.

## 6. Diskuze

V rámci této bakalářské práce byly studovány interakce mezi proteiny MFO systému metodou foto-chemického zesílení. MFO systém se podílí na aktivaci nebo deaktivaci xenobiotik, proto je cílem klinických studií. Pro pochopení jeho funkce je klíčová znalost protein-proteinových interakcí mezi jeho proteiny. Za tímto účelem jsme se v bakalářské práci rozhodli vyzkoušet metodu foto-chemického zesílení využívající proteiny s foto-aktivovatelným analogem Met v sekvenci. Ta už byla využita ke studiu struktury a PPI v případě kalmodulinu [69], proteinu 14-3-3 [70] a též MFO systému [68]. Na poslední uvedený výzkum navazuje tato práce.

V rámci Ječmen *et al.* [68] byl *pcb<sub>5</sub>* M41 již exprimován v bakteriálním kmeni *E. coli* BL-21 Gold DE3. S délkou exprese ovšem klesala míra inkorporace fMet do sekvence proteinu z důvodu, že bakterie syntetizují při nedostatku Met tuto aminokyselinu, a ta se inkorporuje do proteinu preferenčně. Je tedy nutné i za cenu nižšího výtěžku proteinu jeho expresi ukončit už po 1 – 4 h. V případě této bakalářské práce byl použit auxotrofní kmen bakterií *E. coli* B834(DE-3), který není schopný syntetizovat Met a je závislý na jeho přítomnosti či přítomnosti jeho strukturního analogu v použitém médiu. Ty tak mohou být při proteosyntéze vneseny do proteinu. Použitím tohoto kmenu je možné produkci prodloužit až na 16 h, aniž by docházelo k postupnému poklesu inkorporace fMet. V našem případě byla míra inkorporace fMet do sekvence oproti Ječmen *et al.* [68] navýšena asi o 10 %.

A. Knížek (Bakalářská práce, 2016 [72]) použitím odlišného protokolu dosáhl asi 90% inkorporace fMet v *cb<sub>5</sub>* M41, ale výtěžek purifikovaného proteinu a také jeho čistota byly výrazně nižší než v našem případě. Hlavním rozdílem byla kultivace v nižším objemu média při 30 °C. Je tedy prostor pro další optimalizaci kroku rekombinantní exprese. Nicméně jsme ukázali, že námi připravený *pcb<sub>5</sub>* M41 je možné pro úspěšné foto-síťování využít (dráha 6, **Obr. 26**, str. 53).

V porovnání s běžnou expresí proteinů je náš výtěžek *pcb<sub>5</sub>* M41 nižší. To je způsobeno relativně malým objemem bakteriální kultury (zvolen kvůli vysoké ceně fMet), ve které je protein exprimován. Ovšem i získané množství preparátu je dostačující pro použitou metodu foto-síťování v kombinaci s citlivou hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Také efektivita purifikace není v našem případě vysoká, jelikož nepoužíváme proteiny s histidinovou kotvou, jejichž izolace pomocí afinitní chromatografie je mnohem účinnější [69], a preparátem je membránový protein jejichž izolace je obecně spojena

s vysokými ztrátami. Během exprese  $pcb_5$  M41 došlo pravděpodobně do určité míry k tvorbě solubilní formy proteinu, která zůstala v supernatantu po první ultracentrifugaci (dráha 2 na **Obr. 13**, str. 42 a **Obr. 23**, str. 50) a představovala další ztrátu  $pcb_5$  M41. Tento jev nebyl pozorován u preparátu  $cb_5$  M41 (**Obr. 13**, str. 42) ani při dřívějších experimentech. Na **Obr. 13**, str. 42 je také patrná ztráta proteinu vlivem nedostatečné solubilizace. Proces solubilizace je možné optimalizovat použitím jiného detergentu, například Triton X-100 [71], změnou množství přidaného detergentu nebo podmínek solubilizace (teplota, čas).

Při rekombinantní expresi bakterie syntetizuje hem pomaleji než polypeptidový řetězec, proto je získána směs apo- a holoformy proteinu. Z tohoto důvodu byla prováděna titrace heminem, který se samovolně integruje do aktivního centra proteinu a dochází k přeměně apo- $cb_5$  M41 na holo- $cb_5$  M41. Titrace proběhla ve dvou krocích izolačního postupu. Nejprve byl preparát po solubilizaci heminem lehce přetitrován (**Obr. 16**, str. 45). Mírný přebytek heminu jde odstranit v dalších krocích, a větší zastoupení holoformy  $pcb_5$  M41 umožňuje snadnější spektrofotometrickou detekci při 412 nm. V posledním kroku izolace už bylo přidáno jen malé množství, aby finální preparát neobsahoval volný hemin (**Obr. 22**, str. 49).

Preparát byl zakoncentrován po DEAE1 a po DEAE2, v prvním případě byla použita membrána o mezní hodnotě propustnosti 30 kDa a ve druhém o 10 kDa.  $pcb_5$  M41 tvoří s detergentem Brij 35 shluky, které neprojdou membránou o mezní hodnotě propustnosti 30 kDa. S cholátem sodným  $pcb_5$  M41 shluky netvoří, a proto je potřeba použít membránu o mezní hodnotě propustnosti 10 kDa. To byl také důvod výměny detergentů při chromatografii DEAE2, protože volný Brij 35 nelze na rozdíl od cholátu sodného z roztoku odstranit dialýzou.

Při chromatografii preparátu  $cb_5$  M41 s přirozeným methioninem byla použita starší komerční kolona, po nanesení vzorku na kolonu došlo k jeho ireverzibilnímu navázání. Jelikož měl preparát  $cb_5$  M41 sloužit k experimentům nad rámec této práce, a zde je uváděn postup jeho přípravy pouze pro porovnání s průběhem exprese a purifikace  $pcb_5$  M41, nebyl celý postup po ztrátě preparátu opakován. K ireverzibilnímu navázání  $cb_5$  M41 na kolonu došlo pravděpodobně z důvodu nevhodného zacházení s chromatografickým nosičem předchozími uživateli.  $pcb_5$  M41 byl purifikován za použití nového nosiče v množství 15,4 nmol, koncentraci 76,8  $\mu\text{mol/l}$  a čistotě patrné na (**Obr. 23**, str. 50).



Pozice 41 cytochromu  $b_5$  se podle modelu PDB ID 1DO9 nachází na jeho povrchu, ve flexibilním úseku v bezprostřední blízkosti E47 a E48, která se podílejí na interakci s P450 a CBR [46, 49]. Schopnost získaného preparátu  $pcb_5$  M41 tvořit kovalentní komplexy s interakčními partnery po foto-aktivaci byla ověřena tvorbou proteinových komplexů s CYP 2B4. Dále jsme se pokusili o foto-síťování  $pcb_5$  M41 s králičí membránovou CPR a lidskou solubilní CBR. S CPR jsme fotolýzou nezískali žádné detekovatelné produkty síťování (dráha 8 a 10 na **Obr. 26**, str. 53). S lidskou CBR jsou při poměru

5  $\mu$ M  $pcb_5$  M41:3  $\mu$ M CBR patrné 2 zóny (dráha 9 na **Obr. 26**, str. 53), ty bohužel nebyly pomocí MS identifikovány jako produkty zesíťení mezi  $pcb_5$  M41 a CBR. Patrně se jedná o málo abundantní kontaminace v preparátu CBR nebo  $pcb_5$  M41, které nejsou patrné v nefotolyzovaných kontrolách nanesených na SDS-PAGE (dráhy 2 a 4 na **Obr. 26**, str. 53) v nižší koncentraci než v případě uvedené binární směsi. Lidskou solubilní CBR pro síťování s králičím  $pcb_5$  M41 jsme použili, protože se její struktura podle modelu ve vazebné oblasti neliší od té králičí, a zároveň jsme ji měli k dispozici, protože byla připravena jako součást diplomové práce J. Dědiče (Diplomová práce, 2015, [73]). Důvodem, že nedošlo k zesíťení, může být, že nebyla použita membránová forma CBR. Ukotvení obou studovaných proteinů v liposomech by zvýšilo jejich lokální koncentraci, a tím četnost jejich vzájemných interakcí, která by zvýšila pravděpodobnost, že by se tyto interakce podařilo zachytit technikou foto-síťování.

## 7. Závěr

V bakteriích *E. coli* B834(DE3) jsme v limitním médiu s obsahem fMet exprimovali *pcb<sub>5</sub>* M41. Po 16 h produkce jsme získali preparát, v němž byl Met nahrazen foto-reaktivním analogem ze 40 %.

*pcb<sub>5</sub>* M41 jsme úspěšně purifikovali a získali celkem 15,4 nmol elektroforeticky homogenního proteinu o koncentraci 76,8  $\mu\text{mol/l}$ . Celkový výtěžek byl 51 nmol proteinu/1 l kultivačního média.

Schopnost *pcb<sub>5</sub>* M41 tvořit po foto-aktivaci kovalentní komplexy jsme ověřili zesíťením s CYP 2B4. Kovalentní komplexy *pcb<sub>5</sub>* M41 s CBR nebo CPR se za obdobných podmínek foto-síťování netvoří.

## 8. Seznam použité literatury

- 1 Henzler-Wildman, K. and Kern, D. (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature* **450**, 964–972.
- 2 Ubarretxena-Belandia, I. and Stokes, D. L. (2012) Membrane protein structure determination by electron crystallography. *Current Opinion in Structural Biology* **22**, 520–528.
- 3 Pollock, N. L., Lee, S. C., Patel, J. H., Gulamhussein, A. A. and Rothnie, A. J. (2018) Structure and function of membrane proteins encapsulated in a polymer-bound lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1860**, 809–817.
- 4 Sugiki, T., Kobayashi, N. and Fujiwara, T. (2017) Modern Technologies of Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Three-dimensional Structure Determination of Proteins Open Avenues for Life Scientists. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **15**, 328–339.
- 5 Jiang, Y. and Kalodimos, C. G. (2017) NMR Studies of Large Proteins. *Journal of Molecular Biology* **429**, 2667–2676.
- 6 Hofmann, T., Fischer, A. W., Meiler, J. and Kalkhof, S. (2015) Protein structure prediction guided by crosslinking restraints – A systematic evaluation of the impact of the crosslinking spacer length. *Methods* **89**, 79–90.
- 7 Rivera-Santiago, R. F., Sriswasdi, S., Harper, S. L. and Speicher, D. W. (2015) Probing structures of large protein complexes using zero-length cross-linking. *Methods* **89**, 99–111.
- 8 Leitner, A., Faini, M., Stengel, F. and Aebersold, R. (2016) Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 20–32.
- 9 Decker, C. (1996) Photoinitiated crosslinking polymerisation. *Progress in Polymer Science* **21**, 593–650.
- 10 <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-crosslinking.html> (25.6.2018)
- 11 Murale, D. P., Hong, S. C., Haque, M. M. and Lee, J.-S. (2017) Photo-affinity labeling (PAL) in chemical proteomics: a handy tool to investigate protein-protein interactions (PPIs). *Proteome Sci* **15**.
- 12 Suchanek, M., Radzikowska, A. and Thiele, C. (2005) Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods* **2**, 261–268.
- 13 Schneider, M., Belsom, A. and Rappsilber, J. (2018) Protein Tertiary Structure by Crosslinking/Mass Spectrometry. *Trends in Biochemical Sciences*.
- 14 Serpa, J. J., Parker, C. E., Petrotchenko, E. V., Han, J., Pan, J. and Borchers, C. H. (2012) Mass Spectrometry-Based Structural Proteomics. *European Journal of Mass Spectrometry* **18**, 251–267.
- 15 Giese, S. H., Fischer, L. and Rappsilber, J. (2016) A Study into the Collision-induced Dissociation (CID) Behavior of Cross-Linked Peptides. *Mol Cell Proteomics* **15**, 1094–1104.
- 16 Sinha, C., Arora, K., Moon, C. S., Yarlagadda, S., Woodrooffe, K. and Naren, A. P. (2014) Förster Resonance Energy Transfer — An approach to visualize the spatiotemporal regulation of macromolecular complex formation and compartmentalized cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**, 3067–3072.

- 17 Ghisaidoobe, A. B. T. and Chung, S. J. (2014) Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int J Mol Sci* **15**, 22518–22538.
- 18 Cavicchioli, R., Curmi, P. M., Siddiqui, K. S. and Thomas, T. (2006) 17 Proteins from Psychrophiles. In *Methods in Microbiology*, pp 395–436, Academic Press.
- 19 Bachmann, K. (2009) Chapter 8 - Drug Metabolism. In *Pharmacology*, pp 131–173, Academic Press, San Diego.
- 20 Dürr, U. H. N., Waskell, L. and Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b5 and their reductases—Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 3235–3259.
- 21 Mak, P. J. and Denisov, I. G. (2018) Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1866**, 178–204.
- 22 Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M. G., Maltais, L. J., Wain, H. M. and Nebert, D. W. (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14**, 1–18.
- 23 Shankar, K. and Mehendale, H. M. (2014) Cytochrome P450. In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (Wexler, P., ed.), pp 1125–1127, Academic Press, Oxford.
- 24 Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. and Fei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 229–237.
- 25 Nelson, D. R. (2006) Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. In *Cytochrome P450 Protocols*, pp 1–10, Humana Press, Totowa, NJ.
- 26 Cederbaum, A. I. (2014) Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol* **4**, 60–73.
- 27 Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A. and Deisenhofer, J. (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**, 41–62.
- 28 Yadav, R., Petrunak, E. M., Estrada, D. F. and Scott, E. E. (2017) Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1. *Molecular and Cellular Endocrinology* **441**, 68–75.
- 29 Scott, E. E., White, M. A., He, Y. A., Johnson, E. F., Stout, C. D. and Halpert, J. R. (2004) Structure of Mammalian Cytochrome P450 2B4 Complexed with 4-(4-Chlorophenyl)imidazole at 1.9-Å Resolution INSIGHT INTO THE RANGE OF P450 CONFORMATIONS AND THE COORDINATION OF REDOX PARTNER BINDING. *J. Biol. Chem.* **279**, 27294–27301.
- 30 Scott, E. E., He, Y. A., Wester, M. R., White, M. A., Chin, C. C., Halpert, J. R., Johnson, E. F. and Stout, C. D. (2003) An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *PNAS* **100**, 13196–13201.
- 31 Zhang, H., Myshkin, E. and Waskell, L. (2005) Role of cytochrome b5 in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 499–506.
- 32 Im, S.-C. and Waskell, L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **507**, 144–153.
- 33 Šulc, M., Ječmen, T., Snajdrova, R., Novák, P., Martinek, V., Hodek, P., Stiborová, M. and Hudeček, J. (2012) Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: The first evidence of two mutual orientations. *Neuro endocrinology letters* **33**, 41–47.

- 34 Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y.-T., Vakser, I. A., Loew, G. and Waskell, L. (1998) Identification of the Binding Site on Cytochrome P450 2B4 for Cytochrome b 5 and Cytochrome P450 Reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 17036–17049.
- 35 Enoch, H. G. and Strittmatter, P. (1979) Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **254**, 8976–8981.
- 36 Iyanagi, T. (2005) Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 520–528.
- 37 Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S. and Kim, J.-J. P. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8411–8416.
- 38 Nisimoto, Y. and Otsuka-Murakami, H. (1988) Cytochrome b5, cytochrome c, and cytochrome P-450 interactions with NADPH-cytochrome P-450 reductase in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **27**, 5869–5876.
- 39 Abe, K., Kimura, S., Kizawa, R., Anan, F. K. and Sugita, Y. (1985) Amino acid sequences of cytochrome b5 from human, porcine, and bovine erythrocytes and comparison with liver microsomal cytochrome b5. *J Biochem* **97**, 1659–1668.
- 40 Kinoshita, A., Nakayama, Y., Kitayama, T. and Tomita, M. (2007) Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. *FEBS Journal* **274**, 1449–1458.
- 41 Hanlon, M. R., Begum, R. R., Newbold, R. J., Whitford, D. and Wallace, B. A. (2000) In vitro membrane-inserted conformation of the cytochrome b(5) tail. *Biochem J* **352**, 117–124.
- 42 Vergères, G., Ramsden, J. and Waskell, L. (1995) The Carboxyl Terminus of the Membrane-binding Domain of Cytochrome b Spans the Bilayer of the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 3414–3422.
- 43 Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. and Scacchieri, S. (2000) Solution structure of oxidized microsomal rabbit cytochrome b5. *European Journal of Biochemistry* **267**, 755–766.
- 44 Hirano, Y., Kimura, S. and Tamada, T. (2015) High-resolution crystal structures of the solubilized domain of porcine cytochrome b5. *Acta Cryst D, Acta Cryst Sect D, Acta Crystallogr D, Acta Crystallogr Sect D, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **71**, 1572–1581.
- 45 Ahuja, S., Jahr, N., Im, S.-C., Vivekanandan, S., Popovych, N., Clair, S. V. L., Huang, R., Soong, R., Xu, J., Yamamoto, K., et al. (2013) A Model of the Membrane-bound Cytochrome b5-Cytochrome P450 Complex from NMR and Mutagenesis Data. *J. Biol. Chem.* **288**, 22080–22095.
- 46 Simonov, A., Holien, J., Chun In Yeung, J., Nguyen, A., Jo Corbin, C., Zheng, J., Kuznetsov, V., J. Auchus, R., J. Conley, A., M. Bond, A., et al. (2015) Mechanistic Scrutiny Identifies a Kinetic Role for Cytochrome b5 Regulation of Human Cytochrome P450c17 (CYP17A1, P450 17A1). *PLOS ONE* **10**, e0141252.
- 47 Tamburini, P. P. and Schenkman, J. B. (1986) Mechanism of interaction between cytochromes P-450 RLM5 and b5: Evidence for an electrostatic mechanism involving cytochrome b5 heme propionate groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **245**, 512–522.
- 48 Hackett, C. S. and Strittmatter, P. (1984) Covalent cross-linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome b5 and NADH-cytochrome b5 reductase. *J. Biol. Chem.* **259**, 3275–3282.
- 49 Strittmatter, P., Kittler, J. M., Coghill, J. E. and Ozols, J. (1992) Characterization of lysyl residues of NADH-cytochrome b5 reductase implicated in charge-pairing with active-site carboxyl residues of cytochrome b5 by site-directed mutagenesis of an expression vector for the flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 2519–2523.

- 50 Schenkman, J. B. and Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology & Therapeutics* **97**, 139–152.
- 51 Reed, J. R. and Hollenberg, P. F. (2003) Examining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b5: the effect of cytochrome b5 on the interaction between cytochrome P450 2B4 and P450 reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 265–275.
- 52 Yamazaki, H., Johnson, W. W., Ueng, Y.-F., Shimada, T. and Guengerich, F. P. (1996) Lack of Electron Transfer from Cytochrome b5 in Stimulation of Catalytic Activities of Cytochrome P450 3A4 CHARACTERIZATION OF A RECONSTITUTED CYTOCHROME P450 3A4/NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE SYSTEM AND STUDIES WITH APO-CYTOCHROME b5. *J. Biol. Chem.* **271**, 27438–27444.
- 53 Hlavica, P. and Lewis, D. F. V. (2001) Allosteric phenomena in cytochrome P450-catalyzed monooxygenations. *European Journal of Biochemistry* **268**, 4817–4832.
- 54 Zhang, H., Im, S.-C. and Waskell, L. (2007) Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4. *J. Biol. Chem.* **282**, 29766–29776.
- 55 Iyanagi, T. (1977) Redox properties of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5. *Biochemistry* **16**, 2725–2730.
- 56 Tamura, M., Yubisui, T., Takeshita, M., Kawabata, S., Miyata, T. and Iwanaga, S. (1987) Structural comparison of bovine erythrocyte, brain, and liver NADH-cytochrome b5 reductase by HPLC mapping. *J Biochem* **101**, 1147–1159.
- 57 Yamada, M., Tamada, T., Takeda, K., Matsumoto, F., Ohno, H., Kosugi, M., Takaba, K., Shoyama, Y., Kimura, S., Kuroki, R., et al. (2013) Elucidations of the catalytic cycle of NADH-cytochrome b5 reductase by X-ray crystallography: new insights into regulation of efficient electron transfer. *J. Mol. Biol.* **425**, 4295–4306.
- 58 Kollipara, S., Tatireddy, S., Pathirathne, T., Rathnayake, L. K. and Northrup, S. H. (2016) Contribution of Electrostatics to the Kinetics of Electron Transfer from NADH-Cytochrome b5 Reductase to Fe(III)-Cytochrome b5. *J. Phys. Chem. B* **120**, 8193–8207.
- 59 Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H. H. and Arlt, V. M. (2016) NADPH- and NADH-dependent metabolism of and DNA adduct formation by benzo[a]pyrene catalyzed with rat hepatic microsomes and cytochrome P450 1A1. *Monatsh. Chem.* **147**, 847–855.
- 60 Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Kopka, K., Philips, D. H. and Arlt, V. M. (2016) NADH:Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 Can Act as Sole Electron Donors to Human Cytochrome P450 1A1-Mediated Oxidation and DNA Adduct Formation by Benzo[a]pyrene. *Chem Res Toxicol* **29**, 1325–1334.
- 61 Henderson, C. J., McLaughlin, L. A. and Wolf, C. R. (2013) Evidence That Cytochrome b5 and Cytochrome b5 Reductase Can Act as Sole Electron Donors to the Hepatic Cytochrome P450 System. *Mol Pharmacol* **83**, 1209–1217.
- 62 Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V. and Stiborová, M. (2009) Preparation of a biologically active apo-cytochrome b5 via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **66**, 203–209.
- 63 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 64 Chevallet, M., Diemer, H., Luche, S., Dorselaer, A. van, Rabilloud, T. and Leize-Wagner, E. (2006) Improved mass spectrometry compatibility is afforded by ammoniacal silver staining. *PROTEOMICS* **6**, 2350–2354.

- 65 Wiechelmann, K. J., Braun, R. D. and Fitzpatrick, J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* **175**, 231–237.
- 66 <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P00169@2-134@>: (4.5.2018)
- 67 Salviati, G., Salvatori, S., Betto, R. and Margreth, A. (1981) Molecular and antigenic properties of cytochrome b5 from slow-muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **197**, 515–518.
- 68 Ječmen, T., Ptáčková, R., Černá, V., Dračínská, H., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J. and Šulc, M. (2015) Photo-initiated crosslinking extends mapping of the protein–protein interface to membrane-embedded portions of cytochromes P450 2B4 and b5. *Methods* **89**, 128–137.
- 69 Piotrowski, C., Ihling, C. H. and Sinz, A. (2015) Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in *Escherichia coli* cells. *Methods* **89**, 121–127.
- 70 Ptáčková, R., Ječmen, T., Novák, P., Hudeček, J., Stiborová, M. and Šulc, M. (2014) The Application of an Emerging Technique for Protein–Protein Interaction Interface Mapping: The Combination of Photo-Initiated Cross-Linking Protein Nanoprobes with Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci* **15**, 9224–9241.
- 71 Jollie, D. R., Sligar, S. G. and Schuler, M. (1987) Purification and Characterization of Microsomal Cytochrome b5 and NADH Cytochrome b5 Reductase from *Pisum sativum*. *PLANT PHYSIOLOGY* **85**, 457–462.
- 72 KNÍŽEK, A. (Praha 2016) Expres a purifikace fotoaktivované proteinové nanosondy pro studium klinicky relevantních proteinproteinových interakcí. Bakalářská práce. Univerzita Karlova.
- 73 DĚDIČ, J. (Praha 2015) Studium molekulární organizace systému cytochromu P450 pomocí fotoaktivovatelných proteinů Diplomová práce. Univerzita Karlova.

