

Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

**Mapování protein-proteinových interakcí
(cytochrom P450 2B4 a cytochrom b5) metodami
chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie**

Bakalářská práce



Tomáš Ječmen

Praha 2008



UNIVERZITA KARLOVA v Praze

Přírodovědecká fakulta

Oborová knihovna chemie

Albertov 6, 128 43 Praha 2

IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208

UK 22

stud.
pr. č. 91b/08 (biochemie)

Opravný list

k bakalářské práci „Mapování protein-proteinových interakcí (cytochrom P450 2B4 a cytochrom b5) metodami chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie“ vypracované Tomášem Ječmenem

Na straně 6 v 6. odstavci kovalentní vazbou **opraveno na** koordinačně kovalentní vazbou.

Na straně 20 ve 2. odstavci podle Laemliho **opraveno na** podle Laemmliho [30].

Na straně 23 v 5. odstavci excitační vlnová délka: 550 **opraveno na** excitační vlnová délka: 550 nm; a emisní vlnová délka: 585 **opraveno na** emisní vlnová délka: 585 nm.

Na straně 25 ve 3. odstavci ve vakuovém extraktoru **opraveno na** ve vakuovém koncentrátoru.

Na straně 30 ve 3. odstavci spojené frakce 35a – 59a, následně 49a – 59a **opraveno na** spojené frakce 35a – 48a, následně 49a – 59a.

Na straně 42 Dass, C: Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, Wiley, 2007 **opraveno na** Dass, C: Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, Wiley, New Jersey (2007).

Na straně 42 Berg, JM, Tymoczko, JL, Stryer, L: Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 2002 **opraveno na** Berg, JM, Tymoczko, JL, Stryer, L: Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York (2002).

Na straně 42 Gao, Q, Doneanu, CE, Shaffer, SA, Adman, ET, Goodlett, DR, Nelson, SD: J. Biol. Chem., 281, 20404 (2006) **opraveno na** Gao, Q, Doneanu, CE, Shaffer, SA, Adman, ET, Goodlett, DR, Nelson, SD: J. Biol. Chem., 281, 20404-20417 (2006).

Na straně 42 Peterson, JA, Graham, SE: Current Biology Publications, 6, 1079–1085 (1998) **opraveno na** Peterson, JA, Graham, SE: Structure, 6, 1079–1085 (1998).

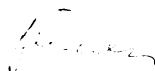
Na straně 42 Herbert, GC, Johnstone, RAW: Mass Spectrometry Basics, CRC Press, 2002 **opraveno na** Herbert, GC, Johnstone, RAW: Mass Spectrometry Basics, CRC Press, Boca Raton, New York (2002).

Na straně 42 Marshall, AG, Hendrickson, CL, Jackson, GS: Mass Spectrometry Reviews, 17, 1–35 (1998) **opraveno na** Marshall, AG, Hendrickson, CL, Jackson, GS: Mass Spectrom. Rev., 17, 1–35 (1998).

Na konec seznamu na straně 42 přidáno 30. Laemmli, UK: Nature, 227, 680-685 (1970).

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Miroslava Šulce, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum: Praha, 6. 6. 2008

Podpis: 

Poděkování:

Mé díky patří školiteli RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. za jeho vedení. Jeho přispěním byly minimalizovány následky mých chyb a omylů, ač míra poučení se z těchto událostí zůstala v plném rozsahu zachována. Rovněž patří mé díky Mgr. Kateřině Pešlové za nespočet drobností rozličného charakteru usnadňujících práci a šetřících čas a za to, že byla vždy ve správný čas na správném místě se správnou připomínkou.

Dále bych chtěl poděkovat Grantové agentuře České Republiky za finanční podporu projektu číslo 303/06/0928.

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1. Oxygenasy se smíšenou funkcí	5
1.1.1. Cytochrom P450	6
1.1.2. <i>NADPH: cytochrom P450 reduktasa</i>	8
1.1.3. Cytochrom b ₅	8
1.2. Síťovací reakce cytochromu P450 a cytochromu b ₅ chemickými činidly	10
1.3. Hmotnostní spektrometrie	11
1.3.1. MALDI-TOF	12
2. CÍL	14
3. MATERIÁL A METODY	15
3.1. Materiál	15
3.1.1. Chemikálie	15
3.1.2. Použité pufrы a další roztoky	16
3.1.3. Přístroje.....	18
3.2. Metody	19
3.2.1. Analytická stanovení.....	19
3.2.1.1. Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny	19
3.2.1.2. Stanovení koncentrace cytochromu P450	19
3.2.2. Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE.....	20
3.2.3. Izolace cytochromu P450 2B4	20
3.2.3.1. Premedikace pokusného zvířete.....	21
3.2.3.2. Izolace mikrosomální frakce a její solubilizace	21
3.2.3.3. Chromatografické metody.....	22
3.2.3.3.1. DEAE-Sepharosa CL6B (pH 7,5)	22
3.2.3.3.2. Hydroxylapatit (pH 7,5)	22
3.2.3.4. Odstranění detergentu pomocí silikagelu.....	22
3.2.4. Vliv experimentálních podmínek na interakci cytochromu P450 2B4 s cytochromem b ₅	23
3.2.4.1. Příprava vzorků a fluorimetrické měření.....	23
3.2.5. Studium interakce cytochromu P450 2B4 s cytochromem b ₅	24
3.2.5.1. Síťovací reakce	24
3.2.5.2. Modifikace proteinů a jejich štěpení proteasou.....	24
3.2.5.3. Příprava vzorků pro MALDI-TOF MS	25
4. VÝSLEDKY	26
4.1. Izolace cytochromu P450 2B4.....	26

4.1.1.	Izolace mikrosomální frakce.....	26
4.1.2.	Solubilizace.....	26
4.1.3.	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (1).....	27
4.1.4.	Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (1a).....	28
4.1.5.	Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (1b).....	30
4.1.6.	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (2).....	30
4.1.7.	Dokončení purifikace.....	31
4.2.	Kinetické studie.....	32
4.3.	Síťovací reakce.....	33
4.4.	Interakce cytochromů P450 2B4 a b5 studovaná hmotnostní spektrometrií	33
5.	DISKUZE.....	35
6.	ZÁVĚR	39
7.	SEZNAM ZKRATEK	40
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	42

1. ÚVOD

Působením člověka se v životním prostředí zvyšuje množství látek, které nejsou organismu vlastní (xenobiotika). Tyto látky vnikají do organismu a mohou na něj mít negativní vliv – kancerogeny, teratogeny a mutageny. Snahou organismu je jejich rychlé vyloučení, aby svými negativními účinky působily co nejkratší dobu (biotransformovat je). Znalost metabolismu xenobiotik je nezbytná také pro farmaceutický průmysl, jelikož ani léčiva nejsou látkami tělu vlastními a rovněž podléhají biotransformaci. V jejím důsledku může dojít k nechtěným efektům – inaktivaci, zvýšení toxicity, snížení aktivity či zkrácení doby působení léku – i k efektům žádaným – aktivaci původně neaktivních forem léčiv [1]. Detailní znalost struktury biotransformačních enzymů a od ní se odvíjející jejich mechanismus účinku usnadňuje a urychluje vývoj účinných a šetrných léčiv.

Prostorovou strukturu proteinů lze v dnešní době zjišťovat několika metodami, jednou z nichž je hmotnostní spektrometrie ve spojení s modifikací proteinů chemickými činidly. Na rozdíl od ostatních metod studia prostorové struktury – NMR (jaderná magnetická rezonance, z angl. nuclear magnetic resonance), rentgenové krystalografie [2] – je možné pracovat s proteiny v nativním prostředí, např. s proteiny ukotvenými v lipidové membráně. Ve prospěch hmotnostní spektrometrie navíc hovoří vysoká citlivost a rozlišovací schopnost, rychlost a poměrně snadné vyhodnocení výsledků [3].

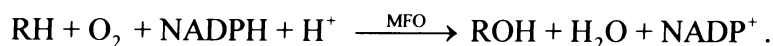
K modifikaci proteinů se používají síťovací činidla sloužící k určování vzdáleností mezi jednotlivými funkčními skupinami (síťovací činidla s definovanou délkou raménka) a k určování vazebných míst spojením enzymu např. se substrátem, koenzymem, či interagujícím proteinovým partnerem kovalentní vazbou (síťovací činidla nulové délky) [4].

1.1. Oxygenasy se smíšenou funkcí

Biotransformace je proces, při kterém jsou látky v živých organismech přeměňovány za katalytického působení enzymů. Důsledkem změny struktury dojde také ke změně chemických vlastností xenobiotika.

Jedním z katalytických systémů biotransformace jsou k membráně endoplasmatického retikula ukotvené nescifické oxygenasy se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mixed function oxygenases), které katalyzují reakce vedoucí k hydroxylaci substrátu. Ta je důležitá při syntéze látek nezbytných pro funkci organismu (např. syntéza

cholesterolu, aromatických aminokyselin) a při detoxifikaci xenobiotik. Monooxygenasy, za spotřeby 2 elektronů a 2 protonů, enzymaticky štěpí molekulu kyslíku, jeden z atomů kyslíku inkorporují do molekuly xenobiotika a druhý redukují na vodu [2]. Proces vystihuje sumární rovnice:



Do molekuly vnesený kyslík v první fázi biotransformace poskytuje ve druhé fázi místo pro vazbu vysoce polárních molekul (např. kyselina glukuronová, kyselina sírová), které výrazně zvýší rozpustnost hydrofobních molekul a ty poté mohou být vyloučeny z organismu [2,5].

Hlavní složkou tohoto monooxygenasového systému je cytochrom P450 (CYP), který jako terminální oxidasa MFO systému katalyzuje vlastní oxidaci substrátu. Další složkou MFO je NADPH: cytochrom P450 reduktasa (CPR), která zprostředkovává přenos prvního, a v případě nepřítomnosti cytochromu b5 (cyt b5) i druhého, elektronu na CYP.

Cyt b5 není tedy pro biotransformaci nezbytný. Jeho interakce nejsou plně objasněny, ale liší se podle izoformy CYP, přítomného substrátu a experimentálních podmínek a také ovlivňují katalytické vlastnosti CYP. Způsob interakce cyt b5 s CYP je možné studovat pomocí hmotnostní spektrometrie [6,7].

Důležitou složkou katalytického systému je také fosfolipidová membrána, která poskytuje prostředí pro interakce proteinů a výrazně ovlivňuje enzymovou aktivitu systému [8].

1.1.1. Cytochrom P450

Původně byl cytochrom P450 (CYP) považován za pigment – např. u jater, kde se vyskytuje ve velkém množství, a způsobuje růžové zbarvení [9]. Jedná se o hemoprotein, jehož CO komplex s redukovanou formou poskytuje absorpčním maximum při vlnové délce 450 nm. Příčinou této spektrální odlišnosti od ostatních hemoproteinů je rozdílné rozložení elektronové hustoty na porfyrinovém kruhu způsobené kovalentní vazbou thiolátové síry (pátý ligand) na atom železa aktivního centra [10].

Sekvenováním genomu byly objeveny různé formy CYP u zástupců všech říší [10]. Různé formy CYP lze také nalézt v rámci jednoho druhu – např. u člověka jich bylo popsáno 57. Všechny izoformy oxidují substráty, ne všechny se však účastní metabolismu xenobiotik – např. u člověka jen asi čtvrtina. Isoformy se vzájemně liší substrátovou specifitou [2].

Pro rodinu cytochromů P450 jsou charakteristické vysoce konzervované oblasti, mezi které patří prostetická hemová skupina na proximální straně proteinu, na které dochází k oxidaci substrátu [2]. Naprosto konzervované jsou však pouze 3 aminokyseliny, jednou z nichž je cystein 436 [11], jehož thiolátová síra tvoří pátý ligand atomu železa v aktivním centru proteinu [9]

Nejvíce variabilní oblastí proteinu je vazebná dutina pro substrát [9], která určuje substrátovou specifitu. Některé izoformy jsou vysoce specifické a oxidují jen několik strukturně podobných substrátů, jiné jsou univerzální a oxidují množství nejrůznějších substrátů [2]. Vazebná dutina se, společně s vazebným místem pro molekulu O₂, nachází na distální straně proteinu a zabraňuje přístupu substrátů nevhodné velikosti, tvaru a fyzikálně-chemických vlastností ke katalytickému centru [2,12]. Další variabilní oblastí je oblast obsahující velký počet pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků na proximální straně proteinu sloužící jako vazebné místo redoxních partnerů [2,6,9]. Vazebná místa CPR a cyt b5 nejsou totožná, částečně se však překrývají [6]. Díky této skutečnosti CYP zaujímá různou konformaci při interakci s různými partnery [2].

Katalytická hydrofilní C-koncová doména eukaryotických CYP je spojena s N-koncovou hydrofobní kotvou sloužící k uchycení enzymu do membrány endoplazmatického retikula. Pro studium funkce eukaryotního mikrosomálního CYP je uchycení v lipidové membráně nezbytné, ač není její význam doposud objasněn [2]. U prokaryotických CYP se tato hydrofobní kotva nevyskytuje [12].

Na základě podobnosti aminokyselinové sekvence se dělí izoformy CYP do rodin. Poslední desetiletí slouží jako model pro zkoumání CYP zástupci rodiny 2B. Projevují se u nich velké rozdíly ve funkci při malých rozdílech v sekvenci aminokyselin, což umožňuje určit, jakým způsobem aminokyselinové zbytky přispívají k substrátové specifitě CYP [13]. U hlodavců jsou CYP rodiny 2B spojeny s tvorbou toxických látek obsahujících reaktivní kyslík. V případě lidské izoformy CYP 2B6 je však tvorba karcinogenů a cytotoxických látek minimální [14].

Králičí CYP 2B4 (EC 1.14.14.1) patří do třídy II (angl. Class II P450s) a její sekvence, která je tvořena 491 aminokyselinami se více než ze 75 % shoduje s ostatními CYP rodiny 2B [15], do níž patří například také lidská izoforma 2B6 [14]. Má molekulovou hmotnost 55,8 kDa [2] a vyznačuje se plasticitou umožňující vázat substráty různých velikostí a tvarů [13].

1.1.2. NADPH: cytochrom P450 reduktasa

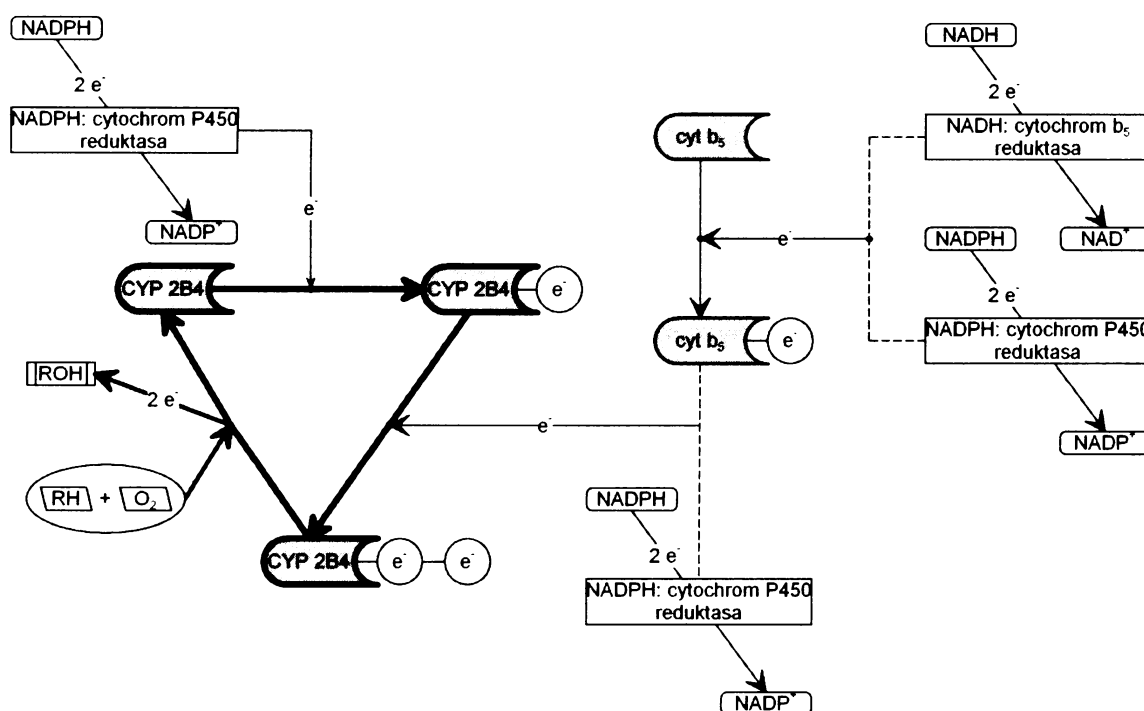
NADPH: cytochrom P450 reduktasa (CPR; EC 1.6.2.4) je flavoprotein FAD/FMN rodiny (obsahuje FAD a FMN prosthetickou skupinu) přenášející elektrony z NADPH na hemoproteiny. Jeho jediná forma zodpovídá za přenos elektronů na různé izoformy CYP [16].

Strukturu eukaryotické, mikrosomální CPR lze rozdělit na dvě základní domény – hydrofobní N-koncovou kotvu (6 kDa) sloužící k uchycení molekuly na endoplazmatické retikulum a jaderný obal buňky a hydrofilní C-koncovou část (72 kDa) se specifickými oblastmi pro vazbu kofaktorů a cytochromu c (cyt c), CYP a cyt b5 [2,17]. K přenosu elektronů na cyt c dostačuje C-koncová doména s odštěpenou N-koncovou hydrofobní kotvou (tCPR, zkrácená CPR, z angl. truncated CPR), která je snadno rozpustná v polárních rozpouštědlech. V této formě je možné získat krystal pro stanovení struktury metodou rentgenové krystalografie. Pro interakci s CYP je však hydrofobní N-koncová kotva nezbytná a přenos elektronu bez ní neprobíhá [18].

Přímý přenos elektronů z NADPH na CYP není možný. NADPH je donorem 2 elektronů současně, CYP však najednou dokáže přijmout pouze 1 elektron. Prosthetické skupiny CPR (FAD a FMN) obsahují isoalloxazinovou prosthetickou skupinu, která se může vyskytovat ve 3 formách: chinonové (oxidované), semichinonové a hydrochinonové (redukované). Redukce chinonové formy přijetím 2 elektronů od NADPH vede ke vzniku hydrochinonové formy, která může oxidací na formu semichinonovou a poté případně na chinonovou odevzdat elektrony CYP postupně [16]. Cyt b5 může být rovněž CPR redukován, a druhý elektron může přecházet na CYP právě přes něj [2].

1.1.3. Cytochrom b5

Malý (16,7 kDa), elektrony přenášející protein cyt b5 byl původně pojmenován cytochrom m, jelikož byl nalezen v mikrosomech [19]. Slouží jako donor redukčních ekvivalentů při biosyntéze lipidů a jako donor druhého elektronu v reakčním cyklu CYP [20]. Donorem elektronu cyt b5 může být NADH: cytochrom b5 reduktasa i CPR [2]. Všechny přenosy elektronů a protein-proteinové interakce v MFO systému shrnuje schéma na Obr. 1.



Obr. 1: Přenos elektronu v MFO systému; podle [2]

Ačkoliv se různé formy cyt b₅ liší v aminokyselinové sekvenci, jsou zařazovány do jedné rodiny proteinů na základě charakteristického UV-VIS spektra, přítomnosti prosthetické hemové skupiny (5. a 6. ligandem jsou dva boční řetězce histidinu 44 a 68) a na základě výskytu některých katalyticky významných aminokyselin v reakčním centru [19].

Strukturu cyt b₅ tvoří 6 α helixů a 5 β skládaných listů a tvoří dvě domény – velkou hydrofilní katalytickou doménu na N-konci a krátkou hydrofobní kotvu uchycující protein k membráně endoplazmatického retikula na C-konci [19,20]. Domény jsou propojeny spojovacím řetězcem, který ovlivňuje charakter interakce cyt b₅ s CYP.

Cyt b₅ interaguje záporně nabitými aminokyselinovými zbytky vazebného místa, které jsou komplementární ke kladně nabitému vazebnému povrchu CYP [20]. Interakce cyt b₅ závisí na izoformě CYP, přítomnosti substrátu, jeho typu a experimentálních podmínkách. Může dojít ke stimulačnímu i inhibičnímu efektu. Při nízkých koncentracích cyt b₅ je katalýza CYP 2B4 stimulována (probíhá 10 – 100 x rychleji) a cyt b₅ brání vzniku vedlejších produktů katalytického cyklu [2]. Při vysokých koncentracích cyt b₅ však dochází ke kompetici s CPR, která nemůže dodávat první elektron na počátku katalytického cyklu [6].

1.2. Síťovací reakce cytochromu P450 a cytochromu b5 chemickými činidly

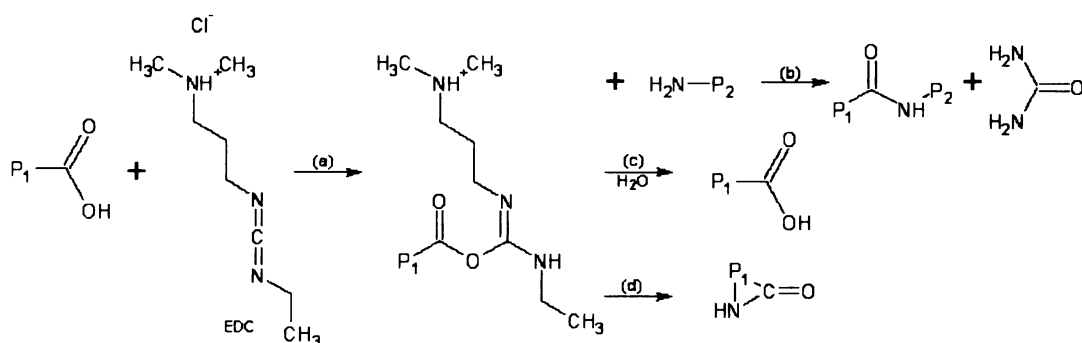
Při interakci CYP s CPR nebo s cyt b5 přirozeně vznikají mezi reagujícími molekulami slabé vazebné interakce a reaktanty se v reakčním komplexu vyskytují ve změněné konformaci, což je pravděpodobně fyziologicky důležité [7,19]. Pro pochopení mechanismu reakce je třeba tuto konformaci uchovat pro následné zkoumání. Toho lze dosáhnout použitím síťovacích (angl. crosslinking) reakcí [19]. Jedná se o tvorbu kovalentních vazeb v místech původních slabších, dočasných interakcí [4].

Síťovací činidla (angl. crosslinkers) obsahují reaktivní koncové skupiny, které specificky reagují s funkčními skupinami proteinů a jiných makromolekul. K určení vzdáleností mezi prostorově blízkými aminokyselinami se používají síťovací činidla o definované délce raménka (angl. arm). Pro spojování molekul bez vkládání raménka se používají síťovací činidla nulové délky, např. karbodiimidy [4].

Vazebná interakce mezi CYP a cyt b5 je elektrostatického charakteru, pro síťovací reakci je tedy vhodné použít ve vodě rozpustné síťovací činidlo, které je schopné tyto elektrostatické interakce fixovat [7]. V našem případě byl použit 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC).

Karbodiimidy při reakci tvoří amidovou vazbu mezi blízkým bazickým (Lys) aminokyselinovým zbytkem nebo koncovým aminem a kyselým (Asp, Glu) aminokyselinovým zbytkem nebo koncovým karboxylem [7]. EDC aktivuje karboxylovou skupinu, čímž vznikne meziproduct (Obr. 2a), který následně reaguje s aminoskupinou (nebo hydrazidem) za vzniku nové kovalentní vazby bez vloženého raménka (Obr. 2b) [4].

Protože meziproduct není ve vodném prostředí stabilní, nedojde-li k reakci s aminoskupinou, dochází k jeho hydrolýze (Obr. 2c). Jako vedlejší produkt může také při reakci vzniknout molekula proteinu s nově vytvořenou intramolekulární amidickou vazbou (Obr. 2d).



Obr. 2: Reakční schéma EDC; podle [4]

P1, P2 – proteiny tvořící novou kovalentní vazbu

Spojením síťovacích technik s hmotnostní spektrometrií vznikla citlivá metoda MS3D sloužící k určování terciální struktury proteinů porovnáním hmotnostních spekter proteinů po modifikační reakci síťovacím činidlem nebo bez ní. Výstupy metody mohou být využity k tvorbě počítačových třidimenzionálních modelů molekul [3].

1.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) je analytická metoda využívaná v mnoha vědeckých disciplínách. Rovněž její využití v biochemii je rozmanité a zahrnuje, mimo jiné, zjišťování posttranslačních úprav aminokyselin, nalézání mutací v aminokyselinové sekvenci, určování disulfidových vazeb a stanovování čistoty vzorků. Využívá se také k určování struktury proteinů.

Při MS je vzorek ionizován a nabitě molekuly a jejich fragmenty jsou děleny průchodem elektrickým nebo magnetickým polem na základě poměru hmotnost/náboj (m/z). U takto separovaných iontů lze velmi přesně stanovit jejich molekulovou hmotnost [3].

Hmotnostní spektrometr má tři hlavní součásti – ionizační zdroj, analyzátor a detektor. Ty jsou pomocí vakuových pump evakuovány na tlak $1,3 \cdot 10^{-2}$ - $1,3 \cdot 10^{-6}$ Pa, aby nedocházelo při průchodu vzorku systémem k interakci s molekulami vzduchu [21].

V ionizačním zdroji dochází jednou z mnoha známých metod k ionizaci molekul vzorku a jejich převodu do plynné fáze. Mezi nejčastěji používané metody ionizace velkých biomolekul patří ionizace elektrosprejem (angl. Electrospray Ionization, ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI).

Analyzátor slouží k dělení a analyzování směsi iontů s různým m/z na základě jejich rozdílného chování v elektrickém nebo magnetickém poli. Stejně jako v případě ionizačních metod existuje několik analyzátorů vzájemně se lišících ve vlastnostech – rozsahem měřitelných m/z , principem měření m/z , přesností a rozlišením. Pro svou jednoduchost je hojně využíván TOF (z angl. Time of Flight) analyzátor [3], pro své vysoké rozlišení pak FT-ICR (z angl. Fourier-Transform Ion Cyklotron Resonance) analyzátor [22].

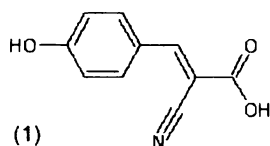
Detektor, na který dopadá proud iontů, zesiluje získaný signál a předává ho datovému systému (angl. Data System), který zaznamená získaná data jako závislost intenzity dopadajících iontů na m/z . Výsledkem je hmotnostní spektrum zobrazující m/z jednotlivých iontů a jejich relativní zastoupení.

1.3.1. MALDI-TOF

Ionizace laserem za přítomnosti matrice je metoda, která vznikla poměrně nedávno – v roce 1987 –, a její velký význam potvrzuje udělení Nobelovy ceny Koichimu Tanakovi za její vývoj [23]. Již dříve se používala ionizace laserem, bez použití matrice však bylo obtížné regulovat dodanou energii a docházelo k nadměrné termální degradaci analytu [3]. Až použití matrice umožnilo zařazení tohoto typu ionizace mezi měkké ionizační techniky, tj. techniky, při kterých je stupeň fragmentace analytu nízký.

Matrice je v nadbytku (asi 10000:1) smíchána se vzorkem [3] a slouží k absorpci energie laseru a její přeměnu na energii excitační, která je přenesena na molekuly analytu a slouží k jeho ionizaci a převodu do plynné fáze. Vznikají převážně jedenkrát nabitě ionty analytu [21].

Nejčastěji používanými matricemi absorbujícími v UV oblasti jsou pevné organické kyseliny obsahující aromatický kruh, který absorbuje v této oblasti vlnových délek. Mezi nejuniverzálnější matrice k ionizaci peptidů patří α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CCA; Obr. 3), která absorbuje při 337 nm, což odpovídá vlnové délce záření nejčastěji používaného N_2 -laseru [3].



Obr. 3: Matrice α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CCA) pro MALDI-TOF MS

Puls laseru ionizuje molekuly v ionizační komoře, kde je všem iontům udělena stejná kinetická energii

$$E_k = \frac{1}{2}mv^2$$

a ty vstupují do analyzátoru TOF. Jedná se principiálně o jednoduché zařízení – v případě lineárního analyzátoru dlouhou evakuovanou trubicí zakončenou detektorem –, ve které dochází k dělení na základě rozdílné rychlosti iontů – molekuly s vyšším m/z se pohybují trubicí pomaleji než molekuly s nižším m/z . Měřením množství iontů a jejich času dopadu na detektor obdržíme časové spektrum, které lze kalibrací převést na spektrum hmotnostní.

Výhodami TOF analyzátoru jsou vysoká citlivost, téměř neomezená maximální hmotnost analyzovaných iontů a velmi krátká doba analýzy, kdy lze během jediného pulsu laseru získat celé hmotnostní spektrum. Spojení metody MALDI s TOF analyzátozem je pro své vlastnosti velmi často využíváno, zvláště pro studium makromolekul v proteomice.

2. CÍL

Cílem této bakalářské práce byla purifikace CYP 2B4 a studium jeho interakce s cyt b5 za různých experimentálních podmínek. Na základě optimalizace podmínek pro provedení síťovací reakce byl výsledný produkt analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie.

Získané výsledky poslouží ke studiu prostorové struktury cytochromů a jejich vzájemné interakce, ke které dochází v oxidačních reakcích MFO systému a podílí se tak na biotransformaci xenobiotik v organismu.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

BIO-RAD, USA: hydroxylapatit

Farmakon Olomouc, ČR: fenobarbital sodný

Fluka, Švýcarsko: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid (EDC), akrylamid, Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), emulgen (E-911), ethylmorfolin, chloroform, jodacetamid (IAA), methanol (MeOH), N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), persíran amonný (APS), protaminsulfát, pyridin, thiosíran sodný, trifluoroctová kyselina (TFA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), tris(2-karboxyethyl)fosfan (TCEP), α -tokoferol (vitamin E), uhličitan sodný monohdrát

Lachema Brno, ČR: dihydrogenfosforečnan draselný, disodná sůl kyseliny ethyldiamintetraoctové (EDTANa₂), dithioničitan sodný, ethanol, glycerol, hydroxid sodný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, octan sodný, sacharosa

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

Merck, SRN: acetonitril (ACN), silikagel (SiO₂), voda

Promega, SRN: trypsin

Roche Diagnostics, SRN: Complete Protease Inhibitor

Sevapharma, ČR: glukosa-6-dehydrogenasa, hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA: α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CCA), bicinchoninová kyselina (BCA), DEAE-Sepharosa CL6B, dithiotreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), glukosa-6-fosfát, cholát sodný, NADPH, standardy pro SDS-PAGE (wide range), Tergitol NP-10, triethylamin (TEA)

Dar: enzymové preparáty (cytochrom P450 2B4, NADPH: cytochrom P450 reduktasa a cytochrom b5) – RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

3.1.2. Použité pufrы a další roztoky

Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny

Roztok A – 0,4 % NaOH (w/v), 0,95 % NaHCO₃ (w/v), 2 % Na₂CO₃·H₂O (w/v), 0,16 % tartarát sodný (w/v), pH 11,25

Roztok B – 4 % CuSO₄·5H₂O (w/v)

Pufr pro stanovení koncentrace cytochromu P450 – 0,1 mol/dm³ KH₂PO₄, 2 % glycerol (v/v), pH 7,5

Roztoky pro SDS-PAGE

Vzorkový pufr (pětkrát koncentrovaný) – 250 mmol/dm³ Tris, 500 mmol/dm³ DTT, 10 % SDS (w/v), 0,5 % bromfenolová modř (w/v), 50 % glycerol

Elektrodový pufr (pětkrát koncentrovaný) – 0,1 mol/dm³ Tris/Cl, 1 mol/dm³ glycin, 0,5 % SDS, pH 8,5

Separáčnй gel (10 %; 5 ml/sklo) – 1,9 ml vody, 1,3 ml 1,5 mol/dm³ Tris (pH = 8,8), 1,7 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 50 µl 10 % APS (w/v)

Zaostřovací vrchnй gel (4 %; 2 ml/sklo) – 1,4 ml vody, 0,25 ml 1,0 mol/dm³ Tris (pH = 6,8), 0,33 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 20 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 20 µl 10 % APS (w/v)

Barvicí lázeň Coomassie BBR-250 – 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 45 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

odbarvovací roztok – 25 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Pufrы pro izolaci

Pufr PR1 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 153 mmol/dm³ KCl, 10 mmol/dm³ EDTANa₂, 0,5 mmol/dm³ PMSF, 50 µmol/dm³ vitamin E, pH 7,5

Pufr PR2 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 100 mmol/dm³ Na₂P₄O₇·10H₂O, 100 mmol/dm³ KCl, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, pH 7,5

Pufr PR3 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 0,25 mmol/dm³ sacharosa, 10 mmol/dm³ EDTANa₂, 1 mmol/dm³ DTT, 250 µmol/dm³ vitamin E, 1 tableta proteasového Complete Inhibitoru/50 ml pufru, pH 7,5

Pufr PR4 (pufr pro solubilizaci) – 100 mmol/dm³ Tris/acetát, 100 mmol/dm³ KCl, 20 % glycerol (v/v), 1 mmol/dm³ DTT, pH 7,5

Pufr AP1 (cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B (1)) – 1 mol/dm³ Tris, pH 7,5

Pufr AP2 (nalévací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B (1)) – 5 mmol/dm³ Tris/acetát, 20 % glycerol (v/v), pH 7,5

Pufr PR5 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B (1) a HAP (1)) – 5 mmol/dm³ Tris/acetát, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR7 (promývací pufr pro HAP (1), ekvilibrační pufr pro HAP (2) a dialyzační pufr) – 5 mmol/dm³ NaH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v), pH 7,5

Pufr BP1 (promývací pufr pro HAP (1)) – 10 mmol/dm³ NaH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,3 mmol/dm³ E-911, pH 7,5

Pufr BP2 (promývací pufr pro HAP (1) a pufr pro gradient HAP (1)) – 25 mmol/dm³ NaH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,3 mmol/dm³ E-911, pH 7,5

Pufr BP3 (pufr pro gradient HAP (1)) – 200 mmol/dm³ NaH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,3 mmol/dm³ E-911, pH 7,5

Pufr BP4 (promývací pufr pro HAP (2)) – 25 mmol/dm³ NaH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 mmol/dm³ E-911, pH 7,5

Pufr BP5 (eluční pufr pro HAP (2)) – 200 mmol/dm³ NaH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 mmol/dm³ E-911, pH 7,5

Pufr PR8 (triethylaminový dialyzační pufr) – 25 mmol/dm³ TEA, 1 mmol/dm³ DTT, 20 % glycerol, pH 7,4

Roztoky pro metabolické studie

NADPH regenerační systém – 10 U/ml glukosa-6-dehydrogenasa, 12,5 mmol/dm³ NADPH, 100 mmol/dm³ glukosa-6-fosfát

Fosfátový pufr P6 – 0,3 mol/dm³ KH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, pH 6,0

Fosfátový pufr P7,4 – 0,3 mol/dm³ KH₂PO₄, 1 mmol/dm³ EDTANa₂, pH 7,4

Roztoky pro chemické modifikace a hmotnostní spektrometrii

Štěpící ethylmorfolinový pufr – 50 mmol/dm³ ethylmorfolin, 10 % ACN, pH 8,1

Pyridinový pufr Pyr6 – 50 mmol/dm³ pyridin/Cl, 150 mmol/dm³ NaCl, pH 6,0

3.1.3. Přístroje

Centrifugy: ultracentrifuga Beckman Optima LE 80K, minicentrifuga Eppendorf, Janetzki K-23, Janetzki K-24

Spektrofotometry: Specord M-40

Hmotnostní spektrometry: MALDI-TOF Biflex II (Bruker Daltonics)

Ostatní: Aparatura na SDS elektroforézu (Hoeffler SE 260), fluorimetr (PerkinElmer LS 55), homogenizátor podle Pottera a Elvehjema, peristaltická pumpa (Pump PP-05), sběrače frakcí (Fraction Collector FCC-60, BioLogic BioFrac Fraction Collector), pH-metr (ATI Orion370), sonikační lázně (P-Lab, Ultrasonic compact cleaner), termostat (Eppendorf), Thermomixer Comfort (Eppendorf), ultrafiltrační cela (Amicon), vakuový rotační koncentrátor (SpeedVac DNA 110)

3.2. Metody

3.2.1. Analytická stanovení

3.2.1.1. Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny

Některé aminokyselinové zbytky redukují měďnaté ionty přidané do roztoku ve formě vínanu měďnatého na ionty měďné. Kyselina bicinchoninová (BCA) tvoří v zásaditém prostředí s měďnými ionty fialově zbarvené komplexy. Intenzitu zbarvení, která je přímo úměrná koncentraci bílkoviny, lze stanovit spektrofotometricky, měřením absorbance při 562 nm.

Stanovení koncentrace proteinu probíhalo dosazením absorbance do rovnice kalibrační přímky. Kalibrace byla získána lineární regresí ze dvou paralelních měření, při nichž byl jako standard použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentracích 0,1, 0,2 a 0,4 mg/ml.

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

Do vyžíhaných zkumavek bylo pipetováno 20 μ l H₂O (slepý vzorek), roztoku standardu nebo stanovovaného vzorku a bylo přidáno 980 μ l činidla pro stanovení koncentrace proteinu. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 60 °C, po zchladnutí centrifugovány a byla měřena absorbance při 562 nm proti H₂O na spektrofotometru Specord M-40. Z naměřených hodnot absorbcí dvou paralelních měření byly po odečtení slepého vzorku získány hodnoty pro výpočet koncentrace.

3.2.1.2. Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentraci CYP je možno stanovit metodou diferenční spektroskopie, jelikož jeho redukovaná forma s navázaným oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum při 450 nm.

Ve zkumavce bylo 50 μ l vzorku doplněno pufrům pro stanovení cytochromu P450 na objem 2 ml, byl přidán pevný dithioničitan sodný (přibližně 5 mg) a roztok byl promíchán. Do dvou křemenných kyvet bylo napipetováno po 1 ml roztoku, z nichž jeden byl poté asi 45 vteřin sycen pomalým proudem plynného oxidu uhelnatého. Následně bylo

proměřeno diferenční absorpční spektrum v rozsahu 350 – 500 nm na spektrofotometru Specord M-40. Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze vzorce

$$c_{\text{CYP}} = [(A_{450} - A_{490}) / \epsilon_{\text{CYP}}] \cdot \text{ředění} [\mu\text{mol}/\text{dm}^3];$$

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

A_{450}absorbance při 450 nm (absorpční maximum),

A_{490}absorbance při 490 nm (absorpční minimum),

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

ředěníhodnota v tomto konkrétním případě je 40.

3.2.2. Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE

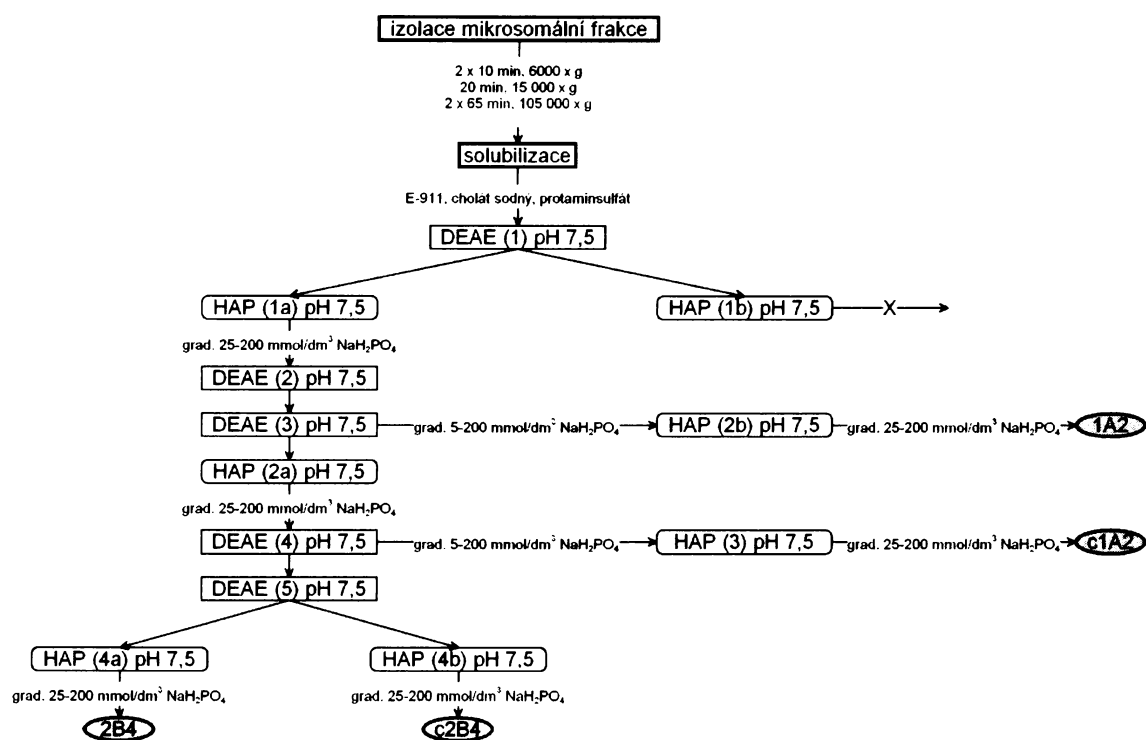
Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je metoda sloužící k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti a elektroforetické pohyblivosti. Metoda byla provedena podle Laemliho, za použití 4 % (w/v) zaostřovacího a 10 % (w/v) separačního gelu.

Bylo smícháno 20 μl vhodně zředěných vzorků s 5 μl pětkrát koncentrovaného vzorkového pufru, výsledný roztok byl 5 minut povařen a po centrifugaci (minicentrifuga Eppendorf; 13500 rpm) nanesen na gel, kdy nanáška činila 20 μl na jamku. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 80 V při průchodu zaostřovacím a 140 V při průchodu separačním gelem. Limitní hodnota proudu byla v obou případech 50 mA.

Vzorky byly barveny v barvicí lázni Coomassie Brilliant Blue R-250 po dobu 45 minut a odbarveny v odbarvovací lázni. Odbarvené gely byly uchovávány v lednici v 1 % roztoku (v/v) kyseliny octové.

3.2.3. Izolace cytochromu P450 2B4

Izolace CYP probíhala podle schématu na Obr. 4 – postupně diferenční centrifugace pro izolaci mikrosomální frakce a poté přečištění a izolace CYP 2B4 pomocí ionexové (DEAE-Sepharosa) a adsorpční (HAP) chromatografie.



Obr. 4: Schéma průběhu izolace CYP

DEAE – kolona DEAE-Sepharosy CL6B, HAP – kolona hydroxylapatitu, grad. – uvolňování CYP z kolony koncentračním gradientem NaH_2PO_4 , 2B4, 1A2 – finální preparát CYP 2B4, resp. 1A2, c2B4, c1A2 – finální preparát cCYP 2B4, resp. 1A2, X – izolace nepokračovala

3.2.3.1. Premedikace pokusného zvířete

Samec králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*) o hmotnosti 2 – 2,5 kg byl po dobu dvou týdnů chován v kleci při teplotě 18 – 22 °C. Byl krmen peletovou stravou a měl volný přístup k napajedlu. Od čtvrtého dne byl premedikován 0,1 % roztokem fenobarbitalu ve vodě (w/v), aby došlo k indukci CYP 2B4. Usmrcení předcházelo 18 hodin trvajícím hladověním za účelem snížení hladiny glykogenu.

3.2.3.2. Izolace mikrosomální frakce a její solubilizace

Fenobarbitalem premedikovaný králík domácí byl narkotizován oxidem uhličitým a usmrcen zlomením vazů. Z vyjmutých a homogenizovaných jater byla izolována mikrosomální frakce diferenční centrifugací.

K solubilizaci získané mikrosomální frakce byly použity detergenty cholát sodný a emulgen E-911. Ty se vážou na hydrofobní části proteinů a udržují je v rozpustné formě. Pro zvýšení rozpustnosti CPR, která byla izolována jinou skupinou, byl také do roztoku přidán protaminsulfát, který má vazebnou aktivitu k RNA. Aby nedocházelo k degradaci

proteinů působením proteas přítomných v mikrosomální frakci, byla do roztoku přidána směs inhibitorů Complete inhibitor (Roche).

3.2.3.3. Chromatografické metody

3.2.3.3.1. DEAE-Sepharosa CL6B (pH 7,5)

Anexová kolona slouží k zachycení záporně nabitých látek, kterými jsou při pH 7,5 CPR, cyt b5, zatímco kladně nabitě a nenabitě látky, mezi které patří CYP, zadrženy nejsou.

Chromatografický nosič lze použít opakovaně. Při regeneraci je ho třeba vyčistit a odsolit promytím 250 ml 1 mol/dm³ KCl a třikrát opakovaným promytím 250 ml vody. Po rozmíchání v pufru DP1 a znovunahnutí na kolonu je nosič třeba ekvilibrovat příslušným puftrem.

3.2.3.3.2. Hydroxylapatit (pH 7,5)

Adsorpční kolona váže na základě elektrostatických interakcí proteiny a slouží k jejich oddělení. Navázané proteiny – včetně CYP – lze z kolony uvolnit gradientem iontové síly. Chromatografií či případnou rechromatografií může dojít ke zvýšení čistoty preparátu.

Kapacita hydroxylapatitu je 40 nmol proteinů/ml nosiče, a po použití nebyl čištěn a opakovaně používán.

3.2.3.4. Odstranění detergentu pomocí silikagelu

Při purifikaci použité detergenty (cholát sodný a emulgen E-911) nejsou vhodné pro *in vitro* rekonstituované systémy, a cholát sodný pro MS3D experimenty, jelikož interferuje při síťovací reakci. Byly proto odstraněny pomocí adsorpce na silikagel. Optimalizace byla, upraveným postupem, provedena podle disertační práce doc. P. Hodka, PhD. [24].

Finální preparát maximálně přečištěný od detergentu byl zmražen v malých alikvotech v kapalném dusíku a uskladněn při -80 °C.

3.2.4. Vliv experimentálních podmínek na interakci cytochromu P450 2B4 s cytochromem b5

CYP 2B4 přeměňuje svůj specifický substrát 7-pentoxyresorufin na resorufin. Resorufin je růžové fluorescenční barvivo [25] a jeho množství je možné stanovit fluorimetricky. Kinetické studie slouží ke stanovení rychlosti probíhající O-dealkylační reakce [26]. To umožňuje stanovit aktivitu CYP 2B4, která se vypočítá dosazením do vzorce

$$a_{2B4} = c_{RES} / (\Delta t \cdot n_{2B4});$$

a_{2B4} aktivita CYP 2B4 [$\text{nmol resorufinu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot (\text{mol CYP})^{-1}$],

c_{RES} koncentrace resorufinu ve vzorku [$\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$],

Δt doba reakce [min],

n_{2B4} látkové množství CYP 2B4 [mol].

Koncentrace vznikajícího resorufinu byla vypočtena z kalibrační přímky získané lineární regresí. Pro kalibraci byly použity roztoky resorufinu v koncentračním rozsahu 0, 0,04, 0,1, 0,2 a 0,4 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Nejprve byla stanovena koncentrace 7-pentoxyresorufinu pro rekonstituovaný systém bez cyt b5 (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ CYP 2B4, 2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ CPR, 300 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ DLPC a pufr P7,4), která byla v dalším experimentu využita pro optimalizaci poměru a studium vlivu cyt b5. Testované koncentrace 7-pentoxyresorufinu byly 0, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,04 a 0,07 mmol/dm^3 .

Vzájemné poměry CYP 2B4, CPR a cyt b5 v této reakční směsi v přítomnosti a nepřítomnosti DLPC membrány byly 1:1:1, 1:1:2 a 1:1:4.

3.2.4.1. Příprava vzorků a fluorimetrické měření

V mikrozkuvkách byl z potřebného množství zásobního roztoku DLPC o koncentraci 15 mmol/dm^3 odpařen chloroform, přidáno 200 μl pufru, 7-pentoxyresorufin a případně i patřičné množství cyt b5. Roztok byl 15 minut sonikován, do roztoku byl přidán CYP 2B4 a CPR a následovalo dalších 5 minut sonikace. Vzorky byly naneseny ve třech paralelních měřeních, po 150 μl , na fluorimetrickou destičku. Po proměření fluorescence slepých vzorků (PerkinElmer LS 55; excitační vlnová délka: 550, SLIT: 15, emisní vlnová délka: 585, SLIT: 10, readtime: 5s) bylo ke vzorkům přidáno 25 μl NADPH generačního systému a byla měřena časová závislost koncentrace vzniklého resorufinu.

3.2.5. Studium interakce cytochromu P450 2B4 s cytochromem b₅

Při vzájemné interakci obou cytochromů neprobíhá pouze samotné předání elektronu, ale dochází i ke změnám ve struktuře. Aminokyselinové zbytky, které se při interakci přiblíží, zůstávají v této poloze zafixovány kovalentní vazbou díky přidanému síťovacímu činidlu EDC, a tato spojení, ať už v rámci jedné molekuly (intramolekulární) nebo mezi oběma cytochromy (intermolekulární), mohou být identifikována hmotnostní spektrometrií.

3.2.5.1. Síťovací reakce

Z roztoku DLPC v chloroformu bylo odpařeno rozpouštědlo ve vakuovém rotačním koncentrátoru. Poté byl přidán pufr Pyr6 a po sonikaci (5 minut) byly přidány CYP 2B4 a cyt b₅, oba o finální koncentraci 2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Vzorek byl 5 minut sonikován, aby došlo k ukotvení CYP a cyt b₅ do lipidové membrány, bylo k němu přidáno EDC o finální koncentraci 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ jako síťovací činidlo a reakční směs byla inkubována 16 hodin za laboratorní teploty. Vzorky byly separovány pomocí 10 % SDS-PAGE, obarveny CBB R-250 a po odbarvení uchovány 1 % kyselině octové (v/v) při 4 °C.

3.2.5.2. Modifikace proteinů a jejich štěpení proteasou

Z polyakrylamidových gelů byly vyříznuty vybrané proteinové proužky, které byly skalpelem nakrájeny na 1 mm kostičky. Do úplného odbarvení gelu byl opakován postup sestávající z přidání 100 μl 100 mmol/dm^3 ethylmorfolinu (pH 8,1) a 100 μl ACN, pětiminutové sonikace a odstranění supernatantu.

Následovala modifikace cysteinových aminokyselinových zbytků, aby došlo k rozrušení případných disulfidových vazeb a rozvolnění struktury proteinů. Ke vzorkům bylo přidáno 30 μl 30 mmol/dm^3 TCEP (činidlo k redukci disulfidových vazeb) ve 100 mmol/dm^3 ethylmorfolinu a byly 20 minut inkubovány v termostatu při teplotě 70 °C. Poté byly promyty ACN, vodou a ACN, převrstveny 30 mmol/dm^3 roztokem jodacetamidu (IAA; činidlo k modifikaci cysteinových zbytků) ve 100 mmol/dm^3 ethylmorfolinu a 60 minut inkubovány za laboratorní teploty v temnu.

Poté byly vzorky sedmkrát promyty střídavě 100 μl ACN a 100 μl vody a nakonec ještě 100 μl ACN, bylo přidáno 100 μl ACN a 100 μl vody a byly 5 minut sonikovány. Po odstranění supernatantu byly sušeny 10 minut ve vakuovém rotačním koncentrátoru, bylo k nim přidáno 30 μl štěpícího ethylmorfolinového pufru, 1 μl roztoku trypsinu

o koncentraci 3,3 ng/μl a byly inkubovány a protřepávány nejméně 20 hodin (37 °C, 650 rpm).

3.2.5.3. Příprava vzorků pro MALDI-TOF MS

Ke vzorku byl přidán ACN a TFA do finální koncentrace v roztoku 30 % ACN s 0,1 % TFA (v/v), byl sonikován 15 minut a extrakt byl oddělen. Zbýlý vzorek byl z gelu reextrahován přidáním 50 μl roztoku 50 % ACN s 0,1 % TFA. Extrakt byl po sonikaci oddělen.

Spojené extrakty byly vysušeny ve vakuovém extraktoru (SpeedVac) a odparek byl rozpuštěn v 50 μl 0,1 % TFA. Po sonikaci byl vzorek přečištěn na kolonce peptide MicroTrap C18 ekvilibrované 0,1 % roztokem TFA (v/v), která váže peptidy, slouží k odsolování a může být použita i k částečné separaci [27].

Po nanesení vzorku byla kolonka promyta 300 μl 0,1 % TFA (v/v) a zachycené peptidy z ní byly uvolněny krokovým gradientem ACN. Bylo použito vždy 100 μl 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 40 % a 80 % ACN (v/v) v 0,1 % (v/v) TFA a frakce byly jímány do rozdílných mikrozkušavek.

Vzorky byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru (SpeedVac), bylo k nim přidáno 20 μl 40 % ACN s 0,1 % TFA, byly 20 minut sonikovány, 15 sekund centrifugovány na minicentrifuze Eppendorf (13500 rpm) a 1 μl byl nanesen na terčík MALDI-TOF. Po odpaření rozpouštědla byly vzorky převrstveny 1 μl matrice (nasycený roztok kyseliny α-kyano-4-hydroxybenzoové kyseliny – CCA – v poměru 1:2 s roztokem 50 % ACN a 0,1 % TFA) a analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF Biflex II (Bruker Daltonics).

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolace cytochromu P450 2B4

Izolace CYP 2B4 probíhala podle schématu na Obr. 4 na straně 21 – postupně diferenční centrifugace pro izolaci mikrosomální frakce a poté přečištění a izolace CYP 2B4 pomocí ionexové (DEAE-Sepharosa) a adsorpční (HAP) chromatografie.

4.1.1. Izolace mikrosomální frakce

Purifikační kroky probíhaly v chlazené místnosti při 6 °C. Jaterní tkáň pokusného zvířete o hmotnosti 94 g byla opláchnuta v pufru PR1 a zhomogenizována. Homogenát byl 10 minut centrifugován při 600 × g na centrifuze Janetzki K-23 (výkyvný rotor 4 × 70 ml, 2000 rpm). Sediment byl rehomogenizován v pufru PR1 a znovu centrifugován za stejných podmínek.

Supernatant byl poté centrifugován 20 minut při 15000 × g na centrifuze Janetzki K-24 (úhlový rotor 6 × 35 ml, 13000 rpm). Získaný supernatant byl dále centrifugován 65 minut při 105000 × g na ultracentrifuze Beckman Optima LE 80K. Sediment byl rehomogenizován v pufru PR2, peleta byla znovu centrifugována za předchozích podmínek, supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v pufru PR3.

Látkové množství CYP v 50 ml finální mikrosomální frakce o koncentraci 62 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ bylo 3100 nmol a obsah bílkoviny 30 mg/ml. Mikrosomální frakce byla uskladněna při -80 °C.

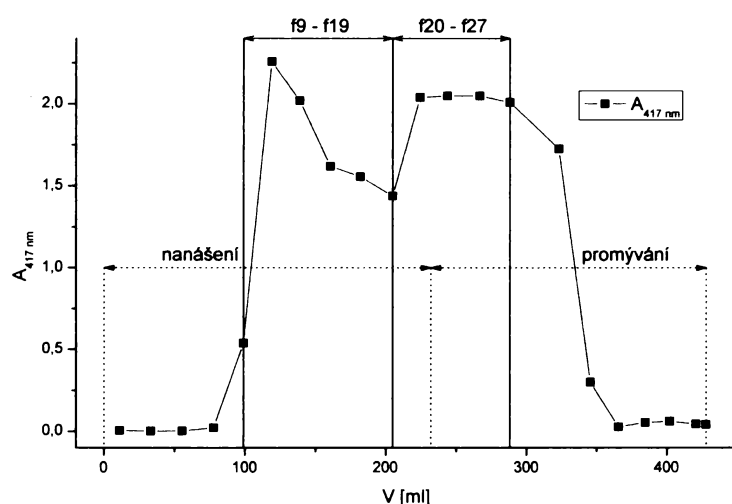
4.1.2. Solubilizace

Mikrosomální frakce byla rozmrazena, naředěna puftrem PR4 na konečnou koncentraci 6 mg proteinu/ml a zhomogenizována. Na ledu a za stálého míchání byly k 210 ml naředěné mikrosomální frakce přidány 4 tablety Complete inhibitoru rozpuštěné ve 2 ml pufru PR4, po kapkách 6 ml protaminsulfátu (15 mg/ml) a pod dusíkovou atmosférou 16 ml 10 % cholátu sodného (v/v) a 16 ml 10 % emulgenu E-911 (w/v).

Roztok byl na ledu 20 minut míchán a poté centrifugován 60 minut při 105000 × g na ultracentrifuze Beckman Optima LE 80K (úhlový rotor Ti45 6 × 60 ml, 37000 rpm). Supernatant o objemu 250 ml a koncentraci 18 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ CYP (celkově 4500 nmol CYP) byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (1) (pH 7,5).

4.1.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (1)

Na ekvilibrovanou kolonu ($2,5 \times 30$ cm, 150 ml, pH 7,5) pufrem PR5 byl nanesen supernatant po solubilizaci (250 ml) a kolona byla promývána pufrem PR5 s přidavkem emulgenu E-911 (celková koncentrace 0,4 % (w/v)). Byly sbírány frakce o objemu asi 18 ml (frakce odpovídající 20 minutám) a byla proměřována jejich absorbance při 417 nm (spektrofotometr Specord M-40). Promývání bylo ukončeno při poklesu absorbance na původní hodnotu. Průběh chromatografie je patrný z grafu (Obr. 5).

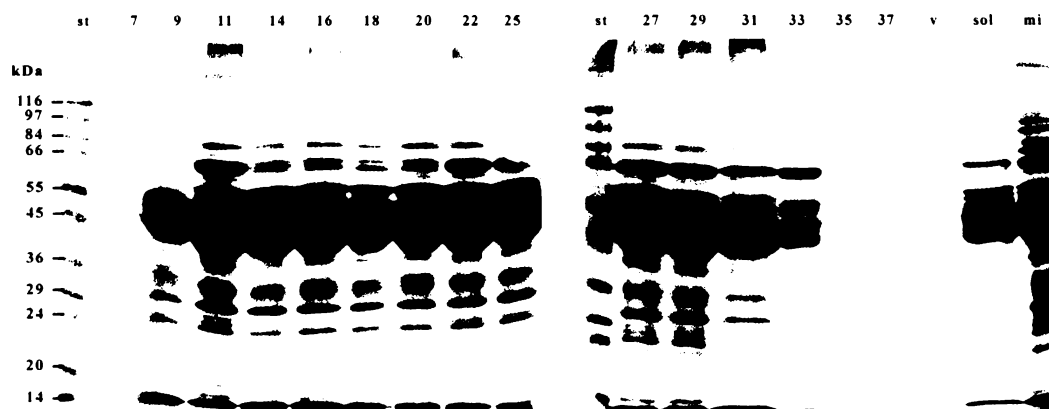


Obr. 5: Eluční profil chromatografie DEAE-Sepharosy CL6B (1)

kolona $2,5 \times 30$ cm, 150 ml; ekvilibrační pufr PR5, promývací pufr PR5 s přidavkem emulgenu E-911 do celkové koncentrace 0,4 % (w/v); nanášen supernatant po solubilizaci mikrosomální frakce
 $A_{417 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; f9-f19, f20-f27 – spojené frakce

Byla provedena SDS-PAGE z oblasti hlavního nanášecího vrcholu (Obr. 6). Jelikož kapacita následující kolony hydroxyapatitu je asi 40 nmol CYP/ml nosiče, bylo nutno rozdělit frakce obsahující CYP z vrcholu elučního profilu na dvě 25 ml kolony.

Spojené frakce 9 – 19 obsahující 1200 nmol CYP, resp. 20 – 27 obsahující 1200 nmol CYP byly po zahuštění na 35 ml, resp. 25 ml (membrána Amicon PM-30, Millipore) a dialýze proti pufru PR5 přes noc nanášeny na kolonu HAP (1a), resp. HAP (1b).



Obr. 6: SDS-PAGE frakcí z DEAE-Sepharosy CL6B (1)

st – Sigma marker; 7-37 – čísla frakcí (11-31 2x ředěno); v – voda místo vzorku, sol – solubilizát (5x ředěno); mi – mikrosomální frakce (20x ředěno)
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

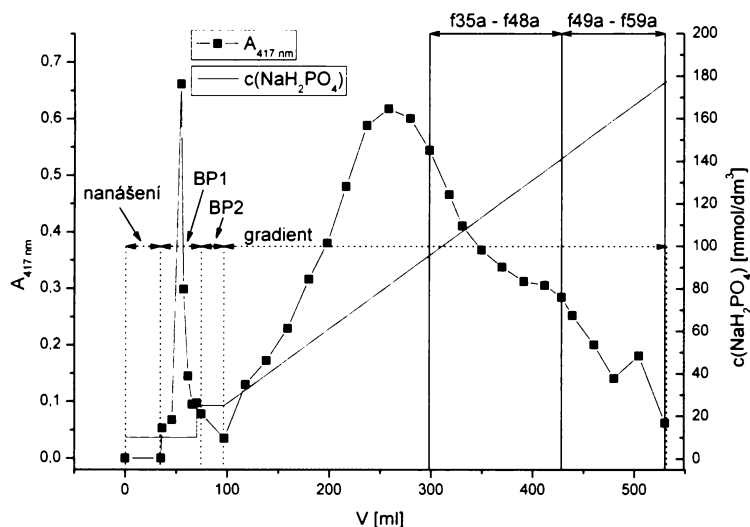
Na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (1) zůstaly navázány některé další proteiny (mj. CPR, cyt b5), které byly eluovány lineárním gradientem 2×400 ml $0-0,4$ mol/dm³ KCl v pufru PR5. Po vymytí proteinů byl nosič přečištěn (viz Metody na straně 22) a připraven pro další použití. Po poslední chromatografii byl nosič po důkladném přečištění a odsolení (viz Metody strana 22) uchován ve 20 % ethanolu při 4 °C.

4.1.4. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (1a)

Na pufru PR5 ekvilibrovanou kolonu ($1,8 \times 15$ cm, 25 ml nosiče, pH 7,5) byly nanášeny zahuštěné a zdialyzované frakce 9 – 19 z DEAE-Sepharosy CL6B (1) a byly jímány frakce o objemu 8 ml a proměřována v nich absorbance při 417 nm.

Po nanesení vzorku byla kolona promyta 40 ml pufru BP1 a poté 20 ml pufru BP2. Nanášený CYP byl z kolony eluován lineárním gradientem 2×250 ml BP2-BP3 ($25 - 200$ mmol/dm³ NaH₂PO₄), rychlostí asi 10 ml/hodina byly jímány frakce o objemu 5 ml a proměřován eluční profil při vlnové délce 417 nm.

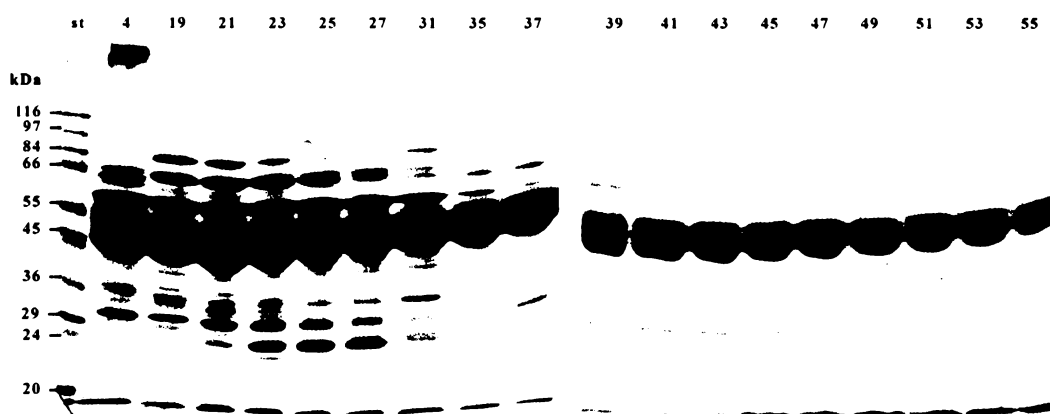
Průběh chromatografie je patrný z grafu (Obr. 7). Patrně kvůli malé kapacitě kolony nedošlo k navázání části CYP, který byl jímán již ve frakcích při promývání kolony pufru BP1.



Obr. 7: Eluční profil chromatografie HAP (1a)

1,8 × 15 cm, 25 ml; ekvilibrační pufr PR5, promývací pufr BP1 (10 mmol/dm^3 NaH_2PO_4), BP2 (25 mmol/dm^3 NaH_2PO_4); nanašeny frakce f9-f19 po chromatografii na DEAE-Sepharose CL6B (1) $A_{417 \text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; f35a-f48a, f49a-f59a – spojené frakce

Byla provedena SDS-elektroforéza (Obr. 8), která ukázala velkou kontaminaci CYP 2B4 jinými proteiny. Byly spojeny frakce 35a – 48a, které byly jinými proteiny kontaminované méně, a frakce 49a – 59a, které obsahovaly ve větším množství pravděpodobně izoformu 1A2. Spojené frakce byly zahuštěny (membrána Amicon PM-30, Millipore) a dialyzovány proti pufru PR7. Jako další krok izolace bylo zvoleno opakování chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (2) (1,8 × 15 cm, 25 ml nosiče) v pufru s finální koncentrací detergentu 0,1 % (w/v).



Obr. 8: SDS-PAGE frakcí HAP (1a)

st – Sigma marker; 4-55 – čísla frakcí
10 % PAGE, barvení: CBB R-250

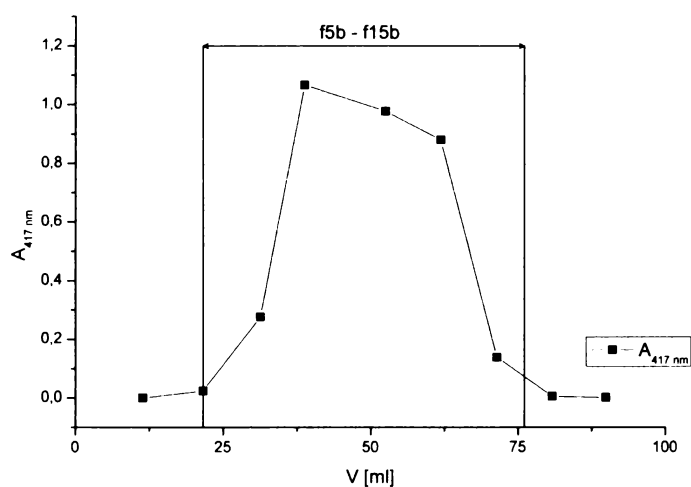
4.1.5. Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (1b)

Na pufru PR5 ekvilibrovanou kolonu ($1,8 \times 15$ cm, 25 ml nosiče, pH 7,5) byly naneseny zahuštěné a zdialyzované frakce 20 – 27 z DEAE-Sepharosy CL6B (1) a byly jímány frakce o objemu 8 ml.

Po promytí kolony 40 ml pufru BP1 byla kolona promyta 20 ml pufru BP2 a započalo eluování CYP lineárním gradientem 2×250 ml BP2-BP3 ($25 - 200$ mmol/dm³ NaH₂PO₄) rychlostí asi 15 ml/hodina. Bohužel došlo ke znehodnocení navázaného CYP zapříčiněnému vyschnutím kolony během eluce lineárním gradientem poté, co vypadla hadička z roztoku, a proto byla tato větev purifikace ukončena.

4.1.6. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (2)

Na pufru PR5 ekvilibrovanou kolonu ($1,8 \times 15$ cm, 25 ml nosiče, 7,5) byly nejprve naneseny spojené frakce 35a – 59a, následně 49a – 59a a kolona byla promývána pufru PR7. Vlivem nízké kapacity kolony nedošlo k oddělení izoformy CYP 2B4 a 1A2. Průběh chromatografie je patrný z grafu (Obr. 9).



Obr. 9: Eluční profil chromatografie DEAE-Sepharosy CL6B (2)

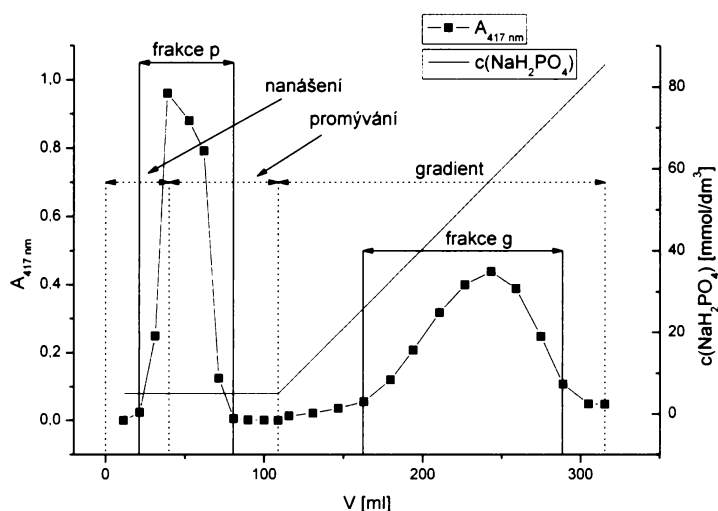
kolona $1,8 \times 15$ cm, 25 ml; ekvilibrační pufr PR5, promývací pufr PR5; nanášeny frakce 35a-59a po chromatografii na koloně HAP (1a)

A_{417 nm} – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; f5b-f15b – spojené frakce

Proto byla chromatografie zopakována na koloně o objemu 150 ml. Další kroky purifikace byly provedeny školitelem RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD. v mé nepřítomnosti.

4.1.7. Dokončení purifikace

Byla provedena chromatografie spojených frakcí f5b – f15b na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (3) (2,5 × 30 cm, 150 ml). K ekvilibraci i promývání byl použit pufr PR7. Průběh chromatografie je patrný z grafu (Obr. 10).



Obr. 10: Eluční profil chromatografie DEAE-Sepharosy CL6B (3)

kolona 2,5 × 30 cm, 150 ml; ekvilibrační pufr PR5, promývací pufr PR5, lineární gradient 2 × 250 ml PR5-BP3 (5 – 200 mmol/dm³ NaH₂PO₄); nanášený frakce f5b-f15b po chromatografii DEAE-Sepharosy CL6B (2)

A_{417 nm} – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm; frakce p, frakce g – spojené frakce

Na základě SDS-PAGE byly určeny frakce obsahující CYP 2B4 (frakce p), které byly naneseny na kolonu HAP (2a) (1,8 × 15 cm, 25 ml nosiče, pH 7,5), z ní byly lineárním gradientem 2 × 150 ml PR7-BP3 (5 – 200 mmol/dm³ NaH₂PO₄) uvolněny a poté naneseny na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (4).

Látky zachycené na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (3) byly eluovány lineárním gradientem 2 × 250 ml PR7-BP3 (5 – 200 mmol/dm³ NaH₂PO₄). Chromatografií spojených frakcí g na koloně HAP (2b) (1,8 × 15 cm, 25 ml nosiče, pH 7,5) došlo k odstranění detergentu a po zahuštění na výsledný objem 1,8 ml byl získán finální CYP 1A2. Jeho koncentrace byla 65 μmol/dm³, což odpovídá látkovému množství 117 nmol.

Po ekvilibraci, nanesení i promývání pufr PR7 na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (4) (2,5 × 30 cm, 150 ml) byly na základě SDS-PAGE určeny frakce, které byly naneseny na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (5).

Látky zachycené na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (4) byly eluovány lineárním gradientem 2 × 250 ml PR7-BP3 (5 – 200 mmol/dm³ NaH₂PO₄). Chromatografií na koloně

HAP (3b) ($1,8 \times 15$ cm, 25 ml nosiče, pH 7,5), odstraněním detergentu a zahuštěním na výsledný objem 0,9 ml byl získán finální kontaminovaný CYP 1A2 (cCYP 1A2). Jeho koncentrace byla $94 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, což odpovídá látkovému množství 85 nmol.

Na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (5) ($1,8 \times 15$ cm, 25 ml nosiče) byla provedena chromatografie pro získání CYP 2B4. K ekvilibraci i promývání byl použit pufr PR7. Na základě SDS-PAGE byly určeny frakce obsahující CYP 2B4, resp. kontaminovaný CYP 2B4 (cCYP), a ty byly naneseny na kolonu HAP (4a), resp. HAP (4b). Po odstraněním detergentu a zahuštěním na výsledný objem 1,8 ml resp. 0,9 ml byl získán finální CYP 2B4 resp. cCYP 2B4. Koncentrace CYP 2B4 byla $36 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, což odpovídá látkovému množství 65 nmol, a cCYP 2B4 $20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, což odpovídá látkovému množství 18 nmol.

Tab. 1: Bilanční tabulka izolace CYP 2B4

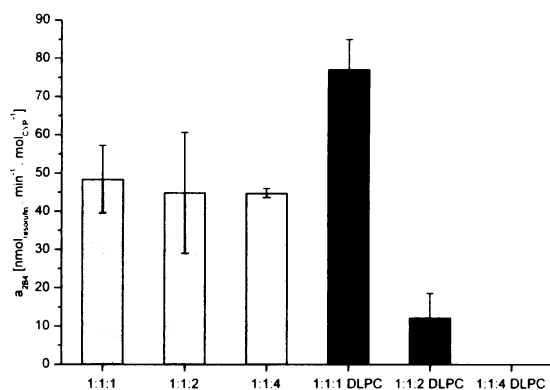
	celkem	
	n [nmol]	[%]
MS frakce	3100	100,0
solubilizát	4500	145,2
DEAE (1)	2400	77,4
HAP (1a)	870	28,1
DEAE (2)	460	14,8
DEAE (3)	440	14,2
CYP 2B4	65	2,1

n – látkové množství; [%] – procentuální výtěžek oproti mikrosomální frakci, MS frakce – mikrosomální frakce, DEAE (x) – frakce eluované z kolony DEAE-Sepharosy CL6B (x), HAP (1a) – frakce eluované z kolony hydroxylapatitu (1a), CYP 2B4 – finální preparát CYP 2B4

4.2. Kinetické studie

Kinetickými studiemi se 7-pentoxyresorufinem a CYP 2B4 byla určena, a pro další experimenty využívána, koncentrace $0,03 \text{ mol}/\text{dm}^3$ 7-pentoxyresorufinu. Pro porovnání měření za různých experimentálních podmínek byly využity hodnoty aktivit po 10 minutách od započetí reakce přidáním NADPH-regeneračního systému.

Přeměna 7-pentoxyresorufinu na resorufin v rekonstituovaném systému bez přítomnosti DLPC při poměru 1:1:1 až 1:1:4 (CYP:CPR:cyt b5) nevykazovala signifikantní změny. Pokud byl experiment proveden v přítomnosti DLPC, byly zjištěny signifikantní změny v aktivitě v závislosti na poměru CYP:CPR:cyt b5. Dle předpokladu, přítomnost DLPC zvýšila přeměnu 7-pentoxyresorufinu. Při poměru 1:1:1 v přítomnosti DLPC byla aktivita CYP 2B4 oproti nepřítomnosti DLPC téměř dvojnásobná, při poměrech 1:1:2 a 1:1:4 došlo naopak ke snížení aktivity CYP přítomností DLPC (viz graf na Obr. 11).



Obr. 11: Vliv poměru cyp b5, CYP 2B4 a CPR a přítomnosti DLPC membrány na aktivitu CYP 2B4

1:1:1 – 1:1:4 – poměr CYP 2B4:CPR:cyt b5, DLPC – přítomnost DLPC membrány, a_{2B4} – aktivita CYP 2B4

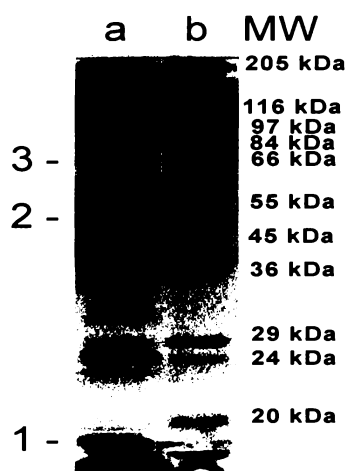
4.3. Síťovací reakce

Síťovací činidlo EDC není stabilní ve vodném a zásaditém prostředí. Proto probíhaly síťovací reakce v kyselém prostředí v pyridinovém pufru Pyr6.

Z 1,2 μ l 15 mol/dm³ roztoku DLPC v chloroformu bylo odpařeno rozpouštědlo, ke kterému bylo na základě výsledků kinetických studií přidáno 12 μ l 20 μ mol/dm³ cyt b5, 4,3 μ l 56 μ mol/dm³ CYP 2B4 a 86 μ l pufru Pyr6. Roztok byl 5 minut sonikován, poté byl po 18 μ l rozdělen do 6 mikrozkuvek, do každé byly přidány 2 μ l EDC (0,4 mg/ml) ke spuštění síťovací reakce. Reakční směs byla inkubována 16 hodin za laboratorní teploty.

4.4. Interakce cytochromů P450 2B4 a b5 studovaná hmotnostní spektrometrií

Byly připraveny vzorky pro MS podle návodu v kapitole 3.2.5.3 na straně 25 z elektroforeticky rozdělených proteinů po síťovací reakci. Data získaná hmotnostní analýzou spektrometrem MALDI-TOF Biflex II (Bruker Daltonics) byla porovnána s *in silico* teoretickou peptidovou mapou a bylo jednoznačně určeno proteinové složení proužků na SDS-PAGE (Obr. 12) – proužek 1 obsahoval cyt b5, proužek 2 CYP 2B4 a proužek 3 oba cytochromy zároveň.



Obr. 12: Výřez z SDS-PAGE vzorku po síťovací reakci

Dráha (a) obsahuje vzorek po síťovací reakci s EDC, dráha (b) molekulový standard. Zvýrazněny proužky s jednoznačně určeným proteinovým složením MALDI-TOF hmotnostní analýzou: proužek 1 – cyt b5, proužek 2 – CYP 2B4, proužek 3 – cyt b5 a CYP 2B4

Porovnáním molekulových hmotností získaných hmotnostní analýzou s molekulovými hmotnostmi peptidů teoreticky vzniklých štěpením cyt b5 a CYP 2B4 trypsinem byla předběžně identifikována jedna nová intramolekulární vazba CYP 2B4 mezi aminokyselinovými zbytky 49K a 474E (m/z peptidu 2070,2) a jedna nová intermolekulární vazba mezi aminokyselinovým zbytkem 192D náležícím CYP 2B4 a 18K náležícím cyt b5 (m/z peptidu 1914,1).

5. DISKUZE

Králík domácí byl po dobu dvou týdnů chován v kleci při teplotě 18 – 22 °C a krmen peletovou stravou. Byl mu umožněn přístup k napajedlu a 11 dnů před usmrčením byl premedikován 0,1 % roztokem fenobarbitalu (v/v) za účelem indukce CYP 2B4. Tento postup premedikace je většinou dostatečný k významné indukci CYP 2B4. Bohužel kromě CYP 2B4 byl pozorován také vysoký obsah CYP 1A2, který významnou měrou znesnadnil purifikaci. Přítomnost CYP 1A2 byla pravděpodobně způsobena složením stravy či podmínkami chovu během předešlého života.

Izolací mikrosomální frakce z jater pokusného zvířete bylo získáno asi 3100 nmol aktivní formy CYP. Při solubilizaci byl k mikrosomální frakci přidán Complete inhibitor sloužící ke zpomalení štěpení proteinů proteasami a detergenty protaminsulfát, Emulgen E-911 a cholát sodný k uvolnění CYP ukotveného v lipidové membráně do roztoku, čímž došlo k nabohacení CYP na 4500 nmol (145,2 %). K úspěšné solubilizaci došlo díky vhodně zvolené koncentraci protein (6 mg/ml), vhodného poměru protein:detergent (1 mg detergentu na 1 mg proteinu) a poměru iontový detergent:neionogenní detergent (1:1).

Ultracentrifugace poté z roztoku oddělila lipidovou složku. Při odlévání supernatantu obsahujícího CYP z kyvety se neopatrnou manipulací dostala část lipidové složky zpět do roztoku. Její znovuoddělení bylo provedeno centrifugací 20 minut při 15000 × g na centrifuze Janetzki K-24 (úhlový rotor 6 × 35 ml, 13000 rpm).

Roztok po solubilizaci byl za účelem separace CYP od CPR a cyt b5 nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (1) ekvilibrovanou pufrem PR5. Změřené pH roztoku PR5 při ekvibraci bylo 7,5, ale pH rozoku vytékajícího z kolony kolísalo v rozmezí 5,1 – 6,1. Kolona nebyla patrně dostatečně ekvilibrovaná. Přesto došlo k načištění a předseparaci CYP 2B4, jelikož jeho teoretický izoelektrický bod je 9,01 [28] a při pH 7,5, při kterém chromatografie probíhala, se na nosič DEAE-Sepharosy neváže. CPR a cyt b5 zachycené v koloně z ní byly eluovány lineárním gradientem KCl a dále izolovány jinou skupinou.

Ve frakcích eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL6B (1) bylo stanoveno celkové látkové množství 2400 nmol CYP. Kapacita hydroxylapatitu je přibližně 40 nmol CYP/ml nosiče, proto byly spojené frakce nanášeny na dvě 25 ml kolony – hydroxylapatit (1a) a hydroxylapatit (1b). Větší objemy nosiče hydroxylapatitu nelze použít, jelikož je velice jemný a při průchodu roztoku má velký odpor, který nelze překonat ani použitím peristaltické pumpy. Maximální průtok roztoku kolonou je asi

15 ml/hod. Kapacita nosiče nebyla v případě kolony hydroxylapatitu (1a) dostatečná, část CYP se na ní nenavázala a byla jímána již ve frakcích nanášecího píku. (viz Obr. 7 na straně 29)

Spojené frakce nanášené na kolonu hydroxylapatitu (1b) obsahovaly 1200 nmol CYP. Při eluování CYP lineárním gradientem NaH_2PO_4 došlo důsledkem vypadnutí hadičky z kádinky s promývacím roztokem k vyschnutí kolony. Pokusili jsme se o záchranu CYP vsádkovou elucí $25 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ s $400 \text{ mmol/dm}^3 \text{ KCl}$ a dialýzou roztoku proti pufru PR7. Získaný roztok CYP byl nanesen na novou kolonu hydroxylapatitu a chromatografie byla zopakována dle návodu. Získali jsme 400 nmol CYP, který byl příliš kontaminovaný a proto byla tato větev izolace ukončena a CYP nebyl dále používán.

Podle SDS-PAGE (Obr. 8 na straně 29) došlo na koloně hydroxylapatitu (1a) k částečnému oddělení přítomných proteinů, jelikož však toto oddělení nebylo ideální, byla místo chromatografie na další koloně hydroxylapatitu uvedené v návodu zopakována chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (2). Pro vysokou míru kontaminace jinými proteiny na ni nebyly nanášeny spojené frakce z okolí vrcholu elučního píku nýbrž méně kontaminované frakce s nižší absorbancí.

Při chromatografii nedošlo k oddělení jednotlivých izoforem CYP vzhledem k nízké kapacitě kolony. Proto byla chromatografie zopakována na větší, 150 ml koloně DEAE-Sepharosy CL6B (3) a při koncentraci Emulgenu E-911 0,1 %. V tomto uspořádání dochází k částečnému nabohacování obou izoforem (CYP 2B4 a CYP 1A2), i když jejich vzájemné oddělení nebylo úplné. Abychom získali finální preparát o dostatečné čistotě pro síťovací reakce, použili jsme postupně rechromatografie na hydroxylapatitových a DEAE-Sepharosových kolonách za popsaných podmínek.

Tímto postupem se podařilo izolovat CYP 2B4 s výtěžkem 65 nmol (2,1 %) z počátečních 3100 nmol všech izoforem CYP přítomným v mikrosomální frakci. Kromě CYP 2B4 byl purifikací také získán CYP 1A2 (celkově o látkovém množství 117 nmol). Jelikož dělení na kolonách DEAE-Sepharosy neprobíhalo dostatečně účinně, tak rovněž dvě nedostatečně oddělené směsi obou izoforem cCYP 2B4 a cCYP 1A2.

Ideálního dělení ionexovou chromatografií by bylo dosaženo při pH rovném izoelektrickému bodu jedné z izoforem, tj. při pH 9,01, izoelektrickém bodu CYP 2B4 [28], nebo při pH 9,41, izoelektrickém bodu CYP 1A2 [29]. Daná izoforma není při tomto

pH vůbec zachycována a vytéká z kolony první. Dosažení těchto pH je však problematické.

Částečného dělení obou izoform je možné dosáhnout změnou koncentrace detergentu. Při nižších koncentracích (0,1 % E-911) dochází především k eluci CYP 2B4, při vyšších koncentracích (0,4 % E-911) k eluci obou izoform CYP. Zlepšení dělení izoform 2B4 a 1A2 by mohlo být také dosaženo použitím větší kolony DEAE-Sepharosy CL6B či jiné geometrie kolony.

Účinnějšího dělení lze dosáhnout také změnou chromatografického nosiče. Vhodnější by byl kationtový iontoměnič (například CM-Sepharosa), jelikož pH při chromatografii je nižší než je izoelektrický bod obou izoform CYP, nesou tedy kladný náboj a nejsou zachycovány na aniontovém iontoměniči.

Kinetické studie aktivity CYP 2B4 byly přínosné pro volbu vhodných podmínek pro následné síťovací reakce. Na jejich základě byl stanoven předpokládaný poměr cytochromů CYP 2B4 a cyt b5 v reakční směsi. Kromě toho byl potvrzen inhibiční vliv vyšší koncentrace cyt b5, který soutěží s NADPH:CYP reduktasou o vazebné místo na povrchu CYP, a tak neprobíhá přenos prvního elektronu reakčního cyklu CYP. V budoucnu je možné optimalizovat také vliv koncentrace dalších složek reakční směsi, vliv reakčního prostředí a dalších reakčních podmínek.

Výsledky fluorimetrických měření na destičce bez vzorku se drobně lišily jak v čase, tak mezi různými měřicími pozicemi, což ukazuje na nepřesnost použitého přístroje PerkinElmer LS 55, se kterou je třeba při interpretaci výsledků počítat. Přesné měření doby reakce mezi manuálním přidáním NADPH-regeneračního systému jako donoru elektronů reakce a vložením vzorků do přístroje rovněž nebylo možné, není tedy vhodné porovnávat výsledky mezi více měřeními.

Fluorescence vzorku obsahujícího CYP 2B4, CPR a cyt b5 v poměru 1:1:4 v přítomnosti DLPC byla po přidání NADPH-regeneračního systému nižší než před jeho přidáním, což početně vede k záporné aktivitě. K poklesu došlo pravděpodobně vinou špatného měření přístroje a dá se očekávat, že skutečná aktivita byla buď nulová nebo velice nízká.

Obdržené výsledky z MALDI-TOF jsou pouze předběžné, jelikož je nutné je ještě ověřit další hmotnostně-spektrometrickou metodou – MS/MS umožňující fragmentaci vybraného prekurzoru, která poskytne sekvenční informaci, nebo určení poměru m/z s vysokou přesností metodou FT-ICR.

V roce 2006 publikovali Q. Gao *et al.* [16] podobný postup k charakterizaci interakce CYP 2E1 s cyt b5 pomocí síťovací reakce a hmotnostní analýzy. Uvádějí vznik dvou intermolekulárních vazeb mezi oběma proteiny, ty se však neshodují s námi zjištěnou intermolekulární vazbou mezi CYP 2B4 a cyt b5. Vazebná místa CYP 2B4 a CYP 2E1 se buď vzájemně liší, nebo dochází k vazbě cyt b5 na dvě rozdílná místa (jedno zodpovědné za přenos elektronu a druhé s dosud neznámou funkcí).

Síťovací reakce a následné určení vzniklých vazeb mezi proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla úspěšná experimentální metoda a bylo by možné ji využít ke zkoumání možných změn struktury či interakce v přítomnosti substrátu CYP 2B4 – diamantanu. Zopakováním síťovací reakce purifikovaného CYP 1A2 s cyt b5 by umožnilo srovnání vazebných míst obou izoform.

6. ZÁVĚR

Podařilo se izolovat a purifikovat cytochrom P450 2B4 v množství 65 nmol. Zároveň byla získána i čistá forma cytochromu P450 1A2 (117 nmol).

Optimalizačními pokusy byl ověřen pozitivní vliv cytochromu b5 na aktivitu cytochromu P450 2B4 a pro síťovací reakci byl nalezen jejich nejvhodnější poměr, tj. 1:1.

Za optimalizovaných podmínek úspěšně proběhla síťovací reakce a hmotnostní spektrometrií byla potvrzena sekvence obou proteinů. Předběžně byly rovněž určeny dvě kovalentní vazby vytvořené síťovacím činidlem – intramolekulární mezi aminokyselinovými zbytky 49K a 474E cytochromu P450 2B4 a intermolekulární mezi aminokyselinovými zbytky 192D cytochromu P450 2B4 a 18K cytochromu b5.

7. SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
a	aktivita enzymu [$\text{nmol substrátu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot (\text{mol enzymu})^{-1}$]
ACN	acetonitril
APS	persíran amonný
Asp	kyselina asparagová
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. bicinchoninic acid)
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
c	koncentrace [mol / dm^3]
CBB	briliantová modř (z angl. Coomassie Brilliant Blue)
CCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (z angl. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)
cCYP	kontaminovaný cytochrom P450
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
cyt b5	cytochrom b5
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
E-911	emulgen-911
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid hydrochlorid
EDTANa ₂	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
ϵ	molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FT-ICR	iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier transformation – ion cyclotron resonance)

Glu	kyselina glutamová
HAP	hydroxylapatit
l	optická dráha paprsku v kyvetě
Lys	lysin
λ	vlnová délka (nm)
MALDI-TOF	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice – měření doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight)
MFO	oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxygenases)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
m/z	poměr hmotnost/náboj
n	látkové množství (mol)
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NMR	jaderná magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
rpm	otáčky za minutu (z angl. rotates per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu (z angl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
t	čas (min)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TOF	viz MALDI-TOF
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové spektrum (vlnění o vlnové délce kratší než 400 nm; z angl. ultraviolet)
V	objem (dm ³)
v/v	poměr objem/objem
VIS	viditelné spektrum (vlnění o vlnové délce 400 – 700 nm; z angl. visible spectrum)
w/v	poměr hmotnost/objem

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/190105.htm>
2. Dürr, UHN, Waskell, L, Ramamoorthy, A: *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 3235–3259 (2007)
3. Dass, C: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley, 2007
4. <http://piercenet.com>
5. Berg, JM, Tymoczko, JL, Stryer, L: *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, 2002
6. Zhang, H, Myshkin, E, Waskell, L: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 499–506 (2005)
7. Gao, Q, Doneanu, CE, Shaffer, SA, Adman, ET, Goodlett, DR, Nelson, SD: *J. Biol. Chem.*, **281**, 20404 (2006)
8. Backes, WL, Kelley, RW: *Pharmacol. Ther.*, **98**, 221–233 (2003)
9. Peterson, JA, Graham, SE: *Current Biology Publications*, **6**, 1079–1085 (1998)
10. Bernhardt, R: *J. Biotechnol.*, **124**, 128–145 (2006)
11. Vatsis, KP, Peng, HM, Coon, MJ: *Arch. Biochem. Biophys.*, **434**, 128–38 (2005)
12. Johnson, EF, Stout, CD: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 331–336 (2005)
13. Zhao, Y, Halpert, JR: *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 402–412 (2007)
14. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR008068>
15. Chang, YT, Stiffelman, OB, Loew, GH: *Biochimie*, **78**, 771–779 (1996)
16. Iyanagi, T: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 520–528 (2005)
17. Sevrioukova, IF, Peterson, JA: *Biochimie*, **77**, 562–572 (1995)
18. Hayashi, S, Omata, Y, Sakamoto, H, Hara, T, Noguchi, M: *Protein Expression Purif.*, **29**, 1–7 (2003)
19. Schenkman JB, Jansson, I: *Pharmacol. Ther.*, **97**, 139–152 (2003)
20. Vergeres, G, Waskell, L: *Biochimie*, **77**, 604–620 (1995)
21. Herbert, GC, Johnstone, RAW: *Mass Spectrometry Basics*, CRC Press, 2002
22. Marshall, AG, Hendrickson, CL, Jackson, GS: *Mass Spectrometry Reviews*, **17**, 1–35 (1998)
23. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html
24. Hodek, P: *Disertační práce, PřF UK, Praha* (1992)
25. <http://www.biology-online.org/dictionary/Resorufin>
26. Parmar, D, Dhawan, A, Seth, PK: *Mol. Cell. Biochem.*, **189**, 201–205 (1998)
27. http://www.michrom.com/catalog/product_info.php?cPath=23_44&products_id=52
28. http://www.expasy.org/cgi-bin/pi_tool1?P00178@1-491@average
29. http://www.expasy.org/cgi-bin/pi_tool1?P00187@2-516@average

SYSNO	
CENA	