

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



VYUŽITÍ APO-MYOGLOBINU A JEHO MUTANTU H64Y/V68F K PŘÍPRAVĚ APO-FOREM HEMOPROTEINŮ

UTILISATION OF APO-MYOGLOBIN AND ITS H64Y/V68F
MUTANT FOR PREPARATION OF APO-HEMOPROTEINS

Diplomová práce

studijního programu klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Bc. Michaela Marešová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Václava Martínka, Ph.D. a RNDr. Markéty Martínkové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2.5.2009

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svým školitelům, RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. a RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D., za kvalitní vedení, zájem, rady a čas, který mi po celou dobu řešení diplomové práce věnovali.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Barboře Mrázové za všestrannou pomoc, rady a přátelský přístup při práci v laboratoři.

Tato diplomová práce vznikla na katedře biochemie PřF UK v Praze za podpory výzkumného záměru MSM0021620808 a grantů Grantové agentury České republiky 303/09/0472 a 203/09/0812.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	6
1 ÚVOD	9
1.1 HEMOPROTEINY.....	10
1.1.1 Hem	10
1.1.2 Myoglobin.....	11
1.1.2.1 Myoglobin H64Y/V68F.....	14
1.1.3 Cytochromy P450.....	16
1.1.4 Cytochrom b ₅	18
1.2 EXPRESE REKOMBINANTNÍHO MYOGLOBINU H64Y/V68F.....	21
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	23
3 MATERIÁL A METODY	24
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	24
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	25
3.3 METODY	27
3.3.1 Stanovení koncentrace proteinu pomocí BCA	27
3.3.2 SDS-elektroforéza.....	27
3.3.3 Příprava mutantního myoglobinu H64Y/V68F (vorvaň) rekombinantní expresí.....	29
3.3.3.1 Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> plazmidem pUC19/SwMb_H64Y/V68F	29
3.3.3.2 Kultivace <i>E. coli</i>	30
3.3.3.3 Amplifikace plazmidu pUC19/SwMb_H64Y/V68F v <i>E. coli</i> DH5a.....	31
3.3.3.4 Purifikace plazmidu pUC19/SwMb_H64Y/V68F	31
3.3.3.5 Expresce vorvaního myoglobinu H64Y/V68F	32
3.3.3.6 Sklizení buněk <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	32
3.3.4 Izolace a purifikace myoglobinu H64Y/V68F.....	33
3.3.4.1 Dezintegrace buněk	33
3.3.4.2 Vysolení 60% a 100% (NH ₄) ₂ SO ₄	33
3.3.4.3 Dialýza.....	34
3.3.4.4 Iontově výměnná chromatografie (CM-Sepharosa CL-6B)	34
3.3.5 Odstranění hemu z myoglobinu H64Y/V68F	35
3.3.6 Charakteristika (apo-)myoglobinu H64Y/V68F a jiných hemových sloučenin.....	36
3.3.6.1 Absorpční spektrum heminu, (apo-)myoglobinu H64Y/V68F a cytochromu b ₅	36
3.3.6.2 Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu, myoglobinu H64Y/V68F a cytochromu b ₅	37
3.3.6.3 Titrace apo-myoglobinu H64Y/V68F heminem, vliv pH	38
3.3.6.4 Extrakce hemu z cytochromu b ₅ pomocí apo-myoglobinu H64Y/V68F.....	39
3.3.7 Gel pro přípravu apo-forem hemoproteinů afinitní chromatografií.....	39
3.3.7.1 Příprava gelu s navázaným apo-myoglobinem nebo apo-myoglobinem H64Y/V68F	39

3.3.7.2	Stanovení kapacity gelu s navázaným apo-myoglobinem a apo-myoglobinem H64Y/V68F ...	41
3.3.7.3	Příprava apo-cytochromu b ₅ pomocí gelu s navázaným apo-myoglobinem H64Y/V68F.....	41
4	VÝSLEDKY	43
4.1	PŘÍPRAVA VORVANÍHO MYOGLOBINU H64Y/V68F REKOMBINANTNÍ EXPRESÍ.....	43
4.2	IZOLACE A PURIFIKACE MYOGLOBINU H64Y/V68F.....	45
4.2.1	<i>Purifikace myoglobinu H64Y/V68F (metoda „single-cell“, pomalý gradient)</i>	<i>46</i>
4.2.2	<i>Purifikace myoglobinu H64Y/V68F (metoda „multi-cell“)</i>	<i>47</i>
4.2.3	<i>Purifikace myoglobinu H64Y/V68F (metoda „single-cell“, rychlý gradient)</i>	<i>49</i>
4.2.4	<i>Charakterizace finálních vzorků myoglobinu H64Y/V68F</i>	<i>51</i>
4.3	PŘÍPRAVA APO-FORMY MYOGLOBINU H64Y/V68F.....	52
4.4	CHARAKTERISTIKA (APO-)MYOGLOBINU H64Y/V68F A JINÝCH HEMOVÝCH SLOUČENIN	54
4.4.1	<i>Absorpční spektra jednotlivých sloučenin</i>	<i>54</i>
4.4.2	<i>Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu, myoglobinu H64Y/V68F a cytochromu b₅....</i>	<i>56</i>
4.4.2.1	<i>Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu H64Y/V68F</i>	<i>56</i>
4.4.2.2	<i>Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu.....</i>	<i>58</i>
4.4.2.3	<i>Vliv pH na disociaci hemu z cytochromu b₅.....</i>	<i>60</i>
4.4.3	<i>Titrace apo-myoglobinu H64Y/V68F heminem</i>	<i>61</i>
4.4.4	<i>Příprava apo-formy cytochromu b₅ pomocí apo-myoglobinu (H64Y/V68F).....</i>	<i>63</i>
4.5	GEL PRO PŘÍPRAVU APO-FORMY HEMOPROTEINŮ AFINITNÍ CHROMATOGRÁFIÍ.....	66
4.5.1	<i>Příprava gelů určených k přípravě apo-hemoproteinů</i>	<i>66</i>
4.5.2	<i>Kapacita gelů určených k přípravě apo-hemoproteinů</i>	<i>67</i>
4.5.3	<i>Využití vybraných gelů k přípravě apo-cytochromu b₅.....</i>	<i>68</i>
5	DISKUZE	71
6	SHRNUTÍ A ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ΔA_x	změna absorbance při vlnové délce x nm
A	absorbance
AP	apo-protein
apo-b₅	apo-cytochrom b ₅
apo-myo	apo-myoglobin
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
b₅	cytochrom b ₅
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
c	koncentrace
CM-Sepharosa	karboxymethyl-Sepharosa
cyt b₅	cytochrom b ₅
Da	dalton
dH₂O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA Na₂	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
elfo	elektroforéza
ER	endoplasmatické retikulum
H	hem
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
<i>k_H</i>	rychlostní konstanta disociace holoproteinu

k_H	rychlostní konstanta asociace s hemem
K_H	rovnovážná konstanta vazby hemu
l	litr
Lit.	literatura
M	mol/l
mA	miliampér
Mb	myoglobin
MC	„multi-cell“
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitr
Mr	relativní molekulová hmotnost
MWCO	„molecular weight cut-off“
myo	myoglobin
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
nm	nanometr
Obr.	obrázek
OD	optická denzita
P	holoprotein
p.a.	pro analýzu
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
pI	isoelektrický bod
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PřF	Přírodovědecká fakulta

RH	substrát
RNAsa	ribonukleasa
ROH	produkt reakce, hydroxylovaný substrát
rpm	počet otáček za minutu
s	sekunda
SC	„single-cell“
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-elfo	elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SwMb	„Sperm whale myoglobin“ - vorvaní myoglobin
t	čas
Tab.	tabulka
TE	Tris/EDTA Na ₂
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
UK	Univerzita Karlova
USA	Spojené státy americké
V	volt
v/v	„volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml
w/v	„weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml roztoku
δ-ALA	kyselina δ-aminolevulová
λ	vlnová délka
μg	mikrogram
μl	mikrolitr
μM	mikromol/l

1 ÚVOD

Každý organismus schopný samostatného života je složen z buněk. Buňka (anglicky *cell*), dostala název z latinského *cellula* – malý pokoj. Jméno jí dal anglický přírodovědec Robert Hooke roku 1665, když při svých pozorováních přirovnal korkové buňky k pokojíčkům, ve kterých žijí mniši.

Od té doby se poznatky o organismech a jejich buňkách díky nejmodernějším vědeckým postupům mnohonásobně zvětšily, přesto ale nejsme schopni s jistotou určit, odhalit a pochopit všechny děje v buňce probíhající.

Rozlišujeme organismy jednobuněčné (například bakterie) a mnohobuněčné (člověk). Člověk má odhadem až 10^{14} vysoce specializovaných buněk [1]. Buňky mohou být prokaryotické nebo eukaryotické, liší se svým vnitřním uspořádáním a evoluční vyspělostí. Eukaryotická buňka je složitější než buňka prokaryotická a tvoří základ mezibuněčné spolupráce mezi jednotlivými specializovanými částmi organismu.

Lidský organismus se v průběhu života setkává se spoustou látek jemu cizích, cizorodých (xenobiotik). Ty se dostávají do organismu záměrně nebo mimovolně a v naprosté většině případů podléhají různým metabolickým přeměnám (biotransformacím). Člověk má vyvinut účinný enzymový systém, kterým se snaží cizorodé látky z organismu vyloučit. V první fázi biotransformace xenobiotik se uplatňuje především systém monooxygenas se smíšenou funkcí, jehož důležitou součástí je i cytochrom P450. Dalšími enzymy podílejícími se na přeměně cizorodých látek jsou například hemové peroxidasy [2]. Cytochrom P450 i hemové peroxidasy patří do velké skupiny složených proteinů, jejichž prostetickou skupinu tvoří hem – hemoproteinů. Hemoproteiny jsou širokou skupinou látek, které mají pro organismus nepostradatelný význam.

Následující práce je věnována jednomu z hemoproteinů, myoglobinu a jeho mutantní formě, které je možné využít při studiu a přípravě podobných hemových sloučenin.

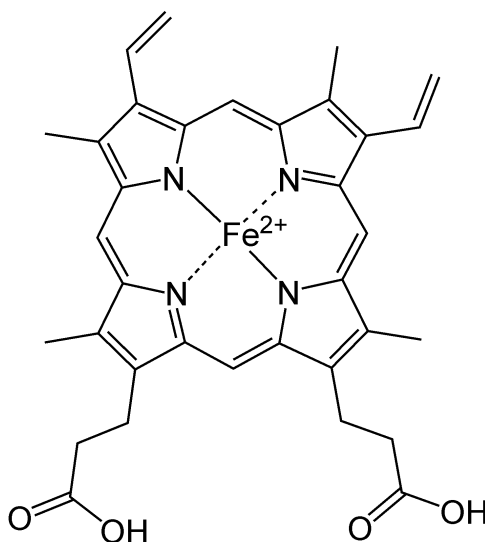
1.1 HEMOPROTEINY

Hemoproteiny jsou složené bílkoviny, které obsahují hem jako prostetickou skupinu. Mezi nejvýznamnější zástupce hemoproteinů patří přenašeče kyslíku (myoglobin, hemoglobin), cytochromy a, b, c a hemové enzymy (např. cytochromy P450, katalasy a peroxidasy) [3].

1.1.1 Hem

Hem (**Obr. 1**) je sloučenina strukturně odvozená od tetrapyrolu porfinu. Čtyři pyrolová jádra spojená methinovými můstky mohou být substituovaná, vznikají tak porfyriny různého typu. Základem hemu je protoporfyrin IX, kdy je v polohách 1,3,5,8 navázán methyl, v polohách 2,4 vinyl a v polohách 6,7 propionyl (číslování dle Hanse Fischera). Uprostřed je koordinačně kovalentní vazbou navázán ion železa, hem je ferroprotoporfyrin IX [4]. Trojrozměrná struktura hemu je znázorněna na **obrázku 2**.

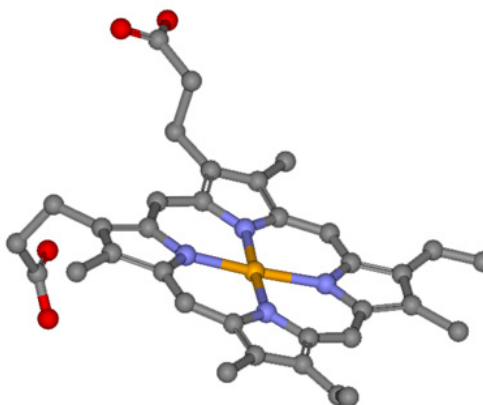
Železo se v hemu může vyskytovat buď ve formě Fe^{2+} (v myoglobinu a hemoglobinu, reverzibilně váže molekulu O_2) nebo ve formě Fe^{3+} (v cytochromech, při přenosu elektronu dochází k reverzibilní změně Fe^{3+} na Fe^{2+}). Volný hem se vyskytuje v oxidované formě Fe^{3+} (hemin, hematin, ferrihem) a není schopen vázat kyslík O_2 [5].



Obr. 1 – struktura hemu (převzato z [6]).

Biosyntéza hemu probíhá v mitochondriích a cytosolu, výchozími látkami jsou sukcinyl-koenzym A (meziprodukt citrátového cyklu) a aminokyselina glycin.

V mitochondriích dochází ke spojení těchto molekul za účasti enzymu aminolevulát synthasy a za vzniku kyseliny δ -aminolevulové (δ -ALA). Syntéza hemu pokračuje v cytosolu, kde vzniká porfyrinový kruh. Jednotlivými meziprodukty jsou například porfobilinogen, uroporfyrinogen a koproporfyrinogen. Konečnou fází biosyntézy hemu je zabudování železa do protoporfyrinu IX v mitochondrii, tento proces katalyzuje enzym ferrochelatasa [7]. Syntéza hemu probíhá převážně v erythroidních buňkách a také v játrech [4].



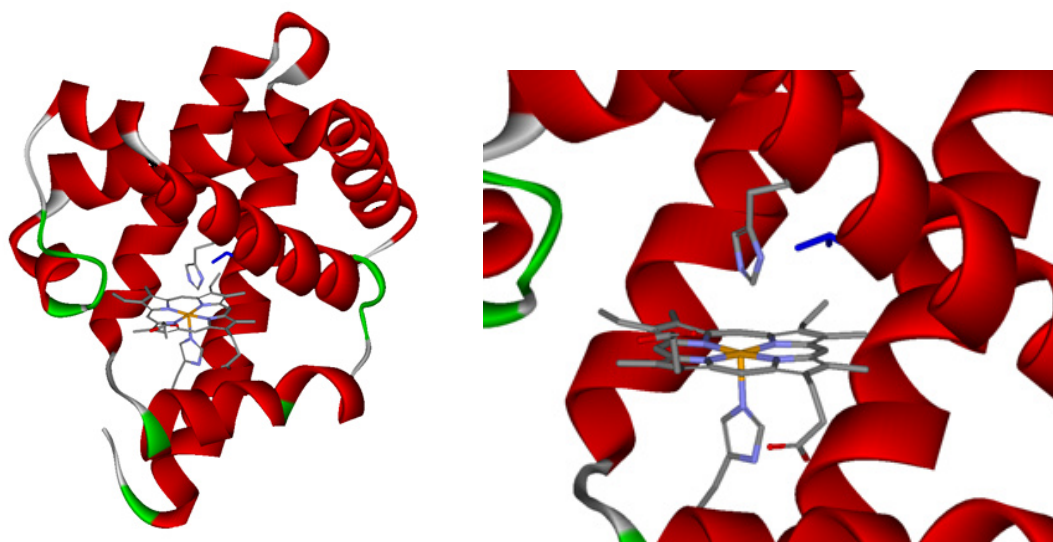
Obr. 2 – trojrozměrná struktura hemu. Atom železa je vyznačen oranžově, atomy dusíku fialově a atomy kyslíku červeně. Vytvořeno s použitím struktury 1VXH (www.pdb.org; 10.4.2009).

1.1.2 Myoglobin

Myoglobin (**Obr. 3**) patří mezi hemoproteiny. Má jednořetězcovou molekulu sekvenčně i strukturně homologní s β -podjednotkou hemoglobinu. Vyskytuje se ve svalových vláknech, kde je jeho úkolem skladovat kyslík a usnadňovat jeho difúzi ve svalech [4].

Trojrozměrnou strukturu myoglobinu vyřešil v roce 1957 J. C. Kendrew pomocí rentgenové krystalografie. Kompletní strukturu publikoval v roce 1960, za což obdržel o dva roky později Nobelovu cenu [5]. Molekula myoglobinu se skládá ze 153 aminokyselinových zbytků, které jsou uspořádány do 8 helixů označených písmeny A, B, C, D, E, F, G, H, α -helixy tvoří téměř 80 % proteinu. Helikální struktury jsou propojeny pomocí krátkých neuspořádaných úseků [4].

Nepolární methylové a vinylové skupiny, které obsahuje hem, směřují dovnitř molekuly myoglobinu, naproti tomu propionyl v ionizované formě směřuje do vnějšího vodného prostředí. Pátým ligandem železa je v molekule myoglobinu tzv. proximální (blízký) histidin F8 (His 93). Ten je na železo vázán prostřednictvím atomu N v postranním řetězci histidinu. Do oblasti šesté koordinační vazby se přibližuje distální (vzdálený) histidin E7 (His 64), který významně ovlivňuje rychlost autooxidace myoglobinu a vazbu šestého ligandu, většinou O₂ [8]. Místo kyslíku se mohou s velkou afinitou vázat některé další molekuly, např. CO a CN⁻, což je příčinou jejich vysoké toxicity [4]. Metmyoglobin je oxidovaná forma myoglobinu (Fe³⁺), která není schopna vázat kyslík. V organismu se vyskytuje v malém množství a jsou známy enzymové mechanismy, které redukují metmyoglobin zpět na myoglobin (metmyoglobin reduktasa) [9].



Obr. 3 – Prostorové uspořádání myoglobinu (vorvaň). Vyznačené jsou sekundární struktury a hem jako kofaktor (vlevo). Vpravo detail aktivního centra se znázorněním distálního a proximálního histidinu (H64 a H93) a V68 (modře). Vytvořeno s použitím struktury 1VXH (www.pdb.org; 10.4.2009).

Myoglobiny obratlovců jsou poměrně malé a bazické proteiny, s molekulovou hmotností cca 17,5 kDa a isoelektrickým bodem (pI) v rozmezí 7 - 9 (**Tab. 1**).

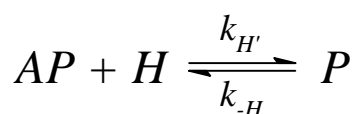
Tab. 1 – Přehled teoretických Mr a pI myoglobinů z různých organismů [10].

Organismus	Mr apo-proteinu [kDa]	Mr holoproteinu [kDa]	pI (teoreticky)
vorvaň	17,2	17,9	8,71
vorvaň H64Y/V68F	17,3	17,9	8,69
kůň	17,0	17,6	7,36 ^a
myš	16,9	17,6	7,23
tur	16,9	17,6	6,97
prase	17,0	17,6	6,83
člověk	17,1	17,7	7,29

^a Experimentálně určená hodnota 7,3 (majoritní složka) a 6,8 (minoritní složka) [11].

Apo-formy myoglobinů a hemoglobinů vykazují poměrně vysokou afinitu k heminu charakterizovanou rovnovážnou vazebnou konstantou v řádech $10^{12} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [12]. Ta je přisuzována hydrofobní interakci hemu s nepolárním vazebným místem (kapsou) v kombinaci se specifickými interakcemi některých aminokyselin vhodně umístěných ve vazebném místě (především proximálního His).

Zjednodušený model popisující kinetiku vazby hemu a apo-formy hemoproteinu znázorňuje reakce:



AP = apo-protein, H = hem, P = holoprotein

Rovnovážná konstanta vazby hemu na apo-formu je pak dána vztahem:

$$K_H = \frac{[P]}{[AP] \cdot [H]} = \frac{k_{H'}}{k_{-H}}$$

K_H = rovnovážná konstanta vazby hemu, $k_{H'}$ = rychlostní konstanta asociace s hemem, k_{-H} = rychlostní konstanta disociace holoproteinu

Přehled afinit studovaných hemoproteinů k hemu je znázorněn v **tabulce 2**.

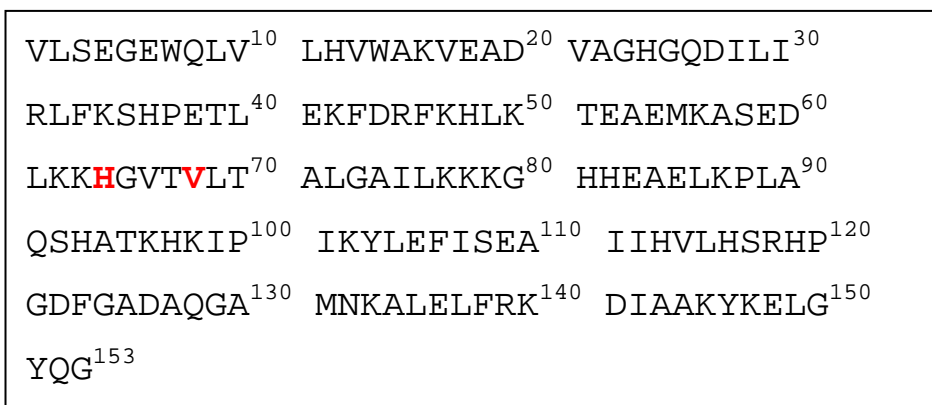
Tab. 2 - Přehled afinit studovaných hemoproteinů k hemu.

apo- protein/hemin	podmínky	$k_{H'}.10^{-7}$ ($M^{-1} s^{-1}$)	$k_{-H}.10^7$ (s^{-1})	$K_H.10^{-12}$ (M^{-1})	Lit.
nativní Mb	pH 8,0; 20 °C	7,0	8,4	80,0	[12]
Mb H64Y/V68F	pH 8,0; 20 °C	6,0	<1,0	>100,0	[12]
nativní Mb	pH 7,0; 37 °C	1,8	20,0	9,0	[13]
Mb H64Y/V68F	pH 7,0; 37 °C	1,7	110,0	1,5	[13]
hovězí cyt b ₅	pH 7,4; 25 °C	4,5	170,0	2,7	[14]
hovězí cyt b ₅	-	-	770,0	-	[15]

V případě savčích myoglobinů byla popsána mikroheterogenita jejich čistých proteinových preparátů. Při isoelektrické fokusaci či po iontoměničové chromatografii myoglobinu je často kromě majoritní frakce zaznamenána jedna či více minoritních frakcí. Bylo zjištěno, že se v tomto případě jedná o postsynthetickou mikroheterogenitu způsobenou spontánní deaminací jednoho nebo více postranních řetězců asparaginu či glutaminu [16].

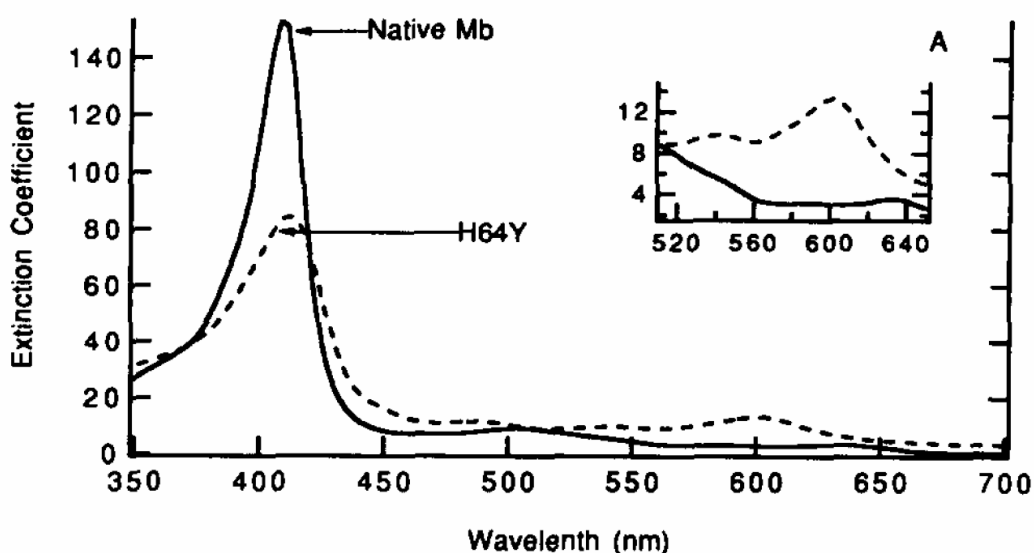
1.1.2.1 Myoglobin H64Y/V68F

Kromě myoglobinů popsaných u různých organismů byla připravena a studována také řada mutantních forem myoglobinu. Při studiu funkce myoglobinu byly záměrně mutovány především aminokyseliny v okolí hemu [12]. Jedním z těchto mutantů je i myoglobin H64Y/V68F. Aminokyselinová sekvence vorvaního myoglobinu s vyznačenými mutacemi H64Y/V68F je znázorněna na **obrázku 4**.



Obr. 4 - Aminokyselínová sekvence myoglobinu (vorvaň) [10]. V červeně vyznačených bodech dochází k mutaci His 64 → Tyr a Val 68 → Phe.

Mutantní myoglobin má nahrazen proximální histidin 64 tyrosinem udělujícím tomuto proteinu zelenou barvu způsobenou zintenzivněním jeho absorpčního pásu při 600 nm a snížením intenzity pásu při 411 nm (**Obr. 5**). Těto spektrální charakteristiky pak může být využito při sledování přechodu hemu z hemoproteinu s nižší afinitou na apo-formu tohoto mutantního myoglobinu. Záměna valinu 68 za fenylalanin pak především zvyšuje stabilitu tohoto proteinu [13].



Obr. 5 - Spektrální charakteristika myoglobinu H64Y v porovnání s nativním myoglobinem. Snížení absorpčního pásu při 411 nm a zvýšení při 600 nm uděluje mutantnímu myoglobinu zelenou barvu (převzato z [13]).

1.1.3 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou významné enzymy patřící do skupiny hemoproteinů. Vyskytují se jak u eukaryotních (rostliny, živočichové, kvasinky), tak u prokaryotních organismů (bakterie) [17, 18].

Cytochromy P450 jsou součástí komplexů monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z anglického mixed-function oxidases). MFO se podílí na přeměně látek tělu vlastních (endogenních) i látek tělu cizích (xenobiotik), přičemž převážnou část svých substrátů oxidují. Mezi základní složky MFO systému patří cytochrom P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasa a membránové lipidy. Fakultativními složkami MFO systému jsou cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasa [2].

Název cytochromu P450 je odvozen podle vazby hemu na apo-protein (podobná jako u cytochromů typu $b \rightarrow$ cytochrom) a podle charakteristického absorpčního maxima redukovaného komplexu P450 s CO v Soretově oblasti při 450 nm (\rightarrow 450) [19].

Dnes je známo mnoho izoforem cytochromu P450, které se liší svou strukturou i funkcí. Zastoupení jednotlivých izoforem v organismu závisí na mnoha faktorech, a to jak vnitřních (druh, rod, pohlaví, věk,...), tak vnějších (stravovací návyky, přítomnost cizorodých látek v organismu,...) [20]. Podle sekvenční homologie (podobnosti aminokyselinové sekvence) můžeme cytochromy rozdělit do několika skupin (superrodin, rodin, podrodin) [21]. Cytochromy P450 je možné dále dělit na membránově vázané a volné (vyskytující se v cytoplazmě) [22].

Prostetickou skupinou všech cytochromů P450 je hem typu b (**Obr. 1, 2**) navázaný na SH skupinu cysteinu [23], který slouží jako pátý ligand železa.

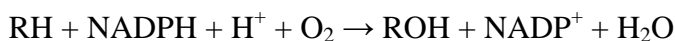
Primární strukturu apo-proteinu P450 určuje zhruba 500 aminokyselin [24], které jsou v sekundární struktuře uspořádány do 12 α -helixů označovaných A-L a 5 β -struktur označovaných 1-5. Terciární struktura vytváří tzv. hydrofobní kapsu a vstupní kanál, kudy se dostává molekula substrátu do aktivního místa [25].

Cytochromy P450 začleňují atom kyslíku do molekuly substrátu a tím ho oxidují. Substrát se stává více hydrofilním, snáze derivatizovatelným a snadněji se vylučuje z organismu. Hlavním úkolem těchto enzymů je tedy detoxifikace [26]. Může ale také nastat situace, kdy reakcí katalyzovanou P450 vzniká reaktivní intermediát, který je

pro organismus více toxický, než původní sloučenina. Intermediát může reagovat s makromolekulami, např. DNA nebo proteiny, a tím je trvale poškodit [27].

Kromě xenobiotik se cytochromy P450 uplatňují i při metabolismu látek tělu vlastních, příkladem může být syntéza steroidních hormonů, prostaglandinů nebo cholesterolu. Podobnou funkci mají cytochromy P450 i u rostlin, kde se podílí například na syntéze námelových alkaloidů nebo hydroxylaci kyseliny skořicové [28].

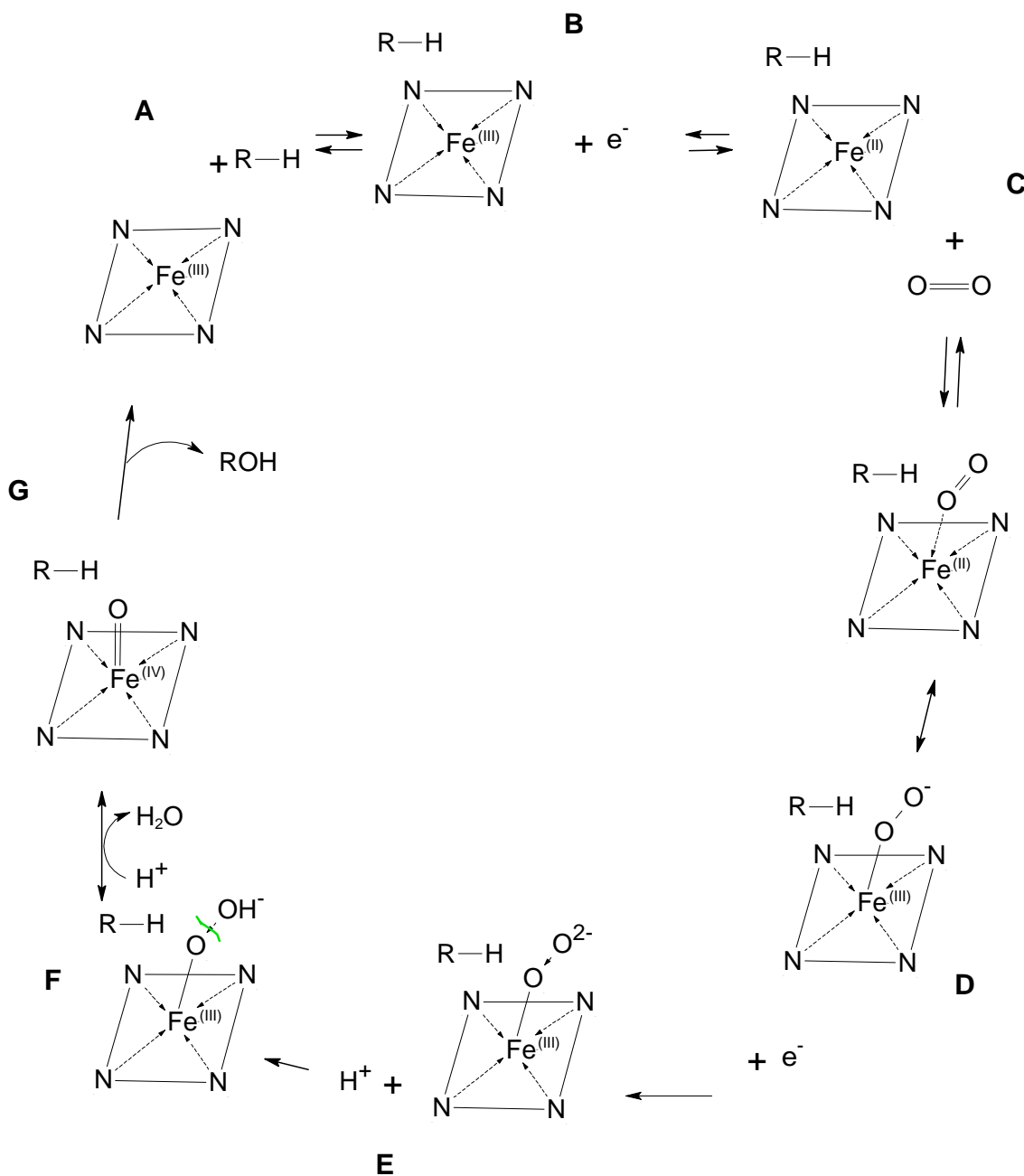
Souhrnnou rovnicí obecné monooxygenasové reakce představuje následující schéma [29]:



RH = substrát ROH = produkt reakce

Jednotlivé kroky reakčního cyklu jsou znázorněny na **obrázku 6**.

V klidovém stavu se vyskytuje atom železa v hemu v oxidované formě Fe^{III} . Po navázání substrátu (krok A na **obrázku 6**) dojde ke změně spinového stavu železa (z nízkospinového do vysokospinového) a ke změnám konformace enzymu. Tyto změny umožní přijetí prvního elektronu (krok B). Po redukci Fe^{III} na Fe^{II} dochází k navázání O_2 (krok C) a přesunu elektronu z Fe^{II} na kyslík za vzniku superoxidového anion-radikálu $\text{O}_2^{\cdot-}$. V následujícím kroku (krok D) dochází k přijetí druhého elektronu do cyklu a aktivaci kyslíku na peroxidový anion O_2^{2-} , který je stále vázán na hem. Druhá redukce se pokládá za rychlostně limitní faktor celé reakce. V případě, že není druhý elektron dodán do cyklu dostatečně rychle, vzniklý komplex se rozpadá za tvorby superoxidového anion-radikálu, který je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxidu vodíku. V dalším kroku reakčního cyklu (E, F) dochází k přijetí dvou protonů a uvolnění molekuly vody. Takto vzniklá reaktivní forma enzymu je schopna vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu. Následně dochází k rekombinaci radikálů za vzniku hydroxyderivátu substrátu (ROH), který je záhy uvolněn z aktivního centra enzymu a obnovuje se nativní forma cytochromu P450 (G) [2]. Přesný mechanismus rozpadu enzymového komplexu a tvorby produktu však ještě nebyl s určitostí stanoven.

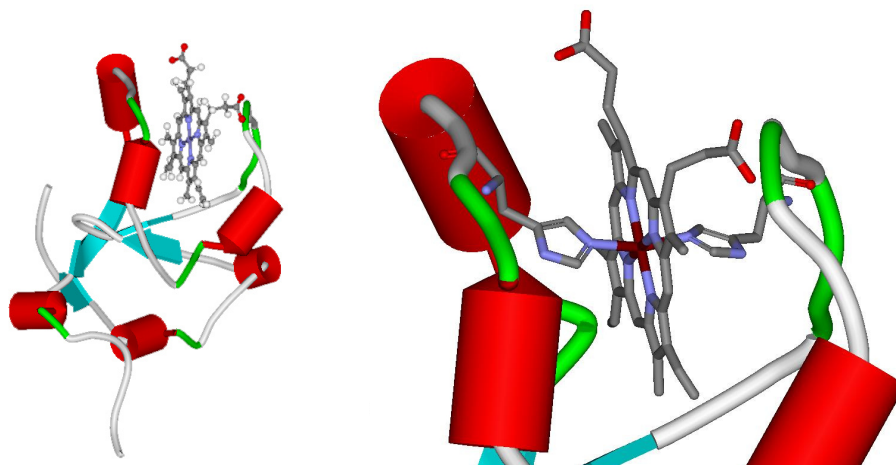


Obr. 6 - Jednotlivé kroky reakčního cyklu cytochromu P450.

1.1.4 Cytochrom b_5

Cytochrom b_5 patří stejně jako myoglobin a cytochrom P450 mezi hemoproteiny. Je to malý, kyselý (pI 5,2) protein o molekulové hmotnosti cca 15,9 kDa (králičí b_5). Molekula se skládá z několika helixů a β -struktur. Ligandy železa v hemu jsou dva histidiny [10].

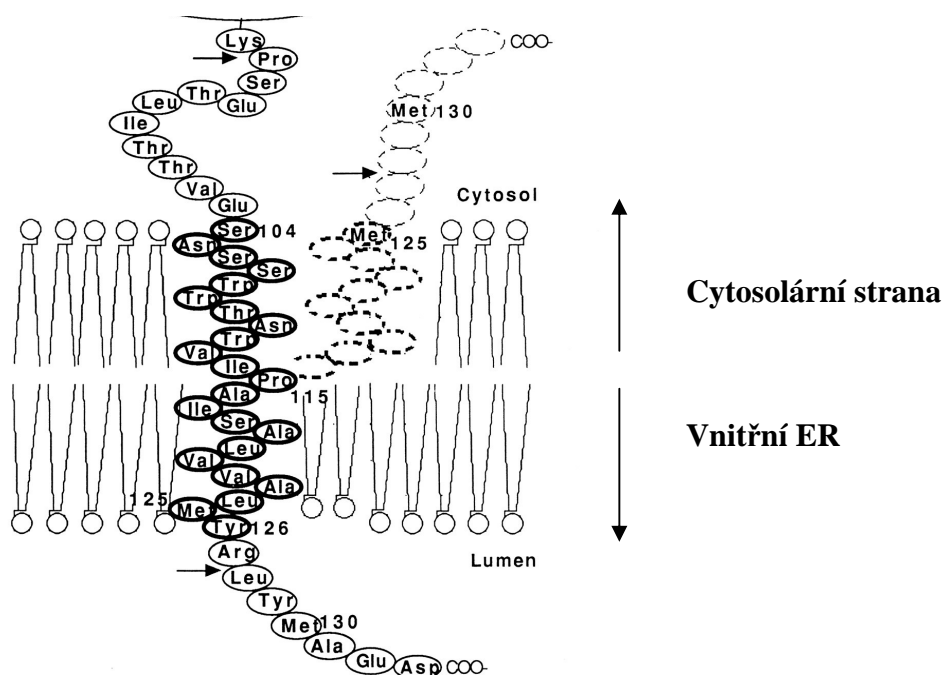
Struktura solubilní domény cytochromu b_5 izolovaná z ER potkana je znázorněna na **obrázku 7**.



Obr. 7 - Prostorové uspořádání cytochromu b_5 z ER potkana. Vyznačené jsou sekundární struktury a hem jako kofaktor (vlevo). Detail aktivního centra se znázorněním histidinových ligandů hemu (vpravo). Vytvořeno s použitím struktury 1B5A (www.pdb.org; 5.3.2007).

Cytochrom b_5 patří mezi integrální membránové proteiny, které se váží k membráně hydrofobní částí své molekuly (C-terminální doménou) [30]. Možné schéma jeho zanoření v membráně je znázorněno na **obrázku 8**. Přesný model membránově-vázané domény však zatím nebyl vyřešen. Cytochrom b_5 se nalézá v endoplasmatickém retikulu (mikrosomální cytochrom b_5) nebo ve vnější membráně mitochondrií (mitochondriální cytochrom b_5). Z hlediska přeměny cizorodých látek je významný mikrosomální b_5 , který se na metabolismu xenobiotik podílí společně s mikrosomálními cytochromy P450. Zvláštním typem cytochromu b_5 je rozpustný erythrocytární cytochrom b_5 , který vzniká proteolýzou z mikrosomálního b_5 během zrání erytrocytů [31].

Cytochrom b_5 je redukován NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasou nebo NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou. Hlavní funkcí cytochromu b_5 je pak poskytovat elektron jiným proteinům v redoxních reakčních cyklech, slouží tedy jako přenašeč elektronů [32]. Tyto elektrony ve většině případů cyt b_5 poskytuje cytochromu P450 (ať už mitochondriálnímu nebo mikrosomálnímu), v některých případech je ale může poskytovat i jiným enzymům, např. desaturasám [29].



Obr. 8 - Cytochrom b₅ ve spojení s membránou ER. Znázorněny jsou dva modely zanoření cytochromu b₅ v membráně. První, transmembránový model předpokládá průchod C-terminální domény do vnitřního ER. Druhý model předpokládá přítomnost C-terminální domény v cytosolu (čárkovaně). Převzato z [33].

V mitochondriích katalyzuje cytochrom P450 spolu s mitochondriálním cytochromem b₅ výhradně metabolismus endogenních substrátů, například syntézu steroidních hormonů (androgenů) [34]. Naproti tomu v ER dochází ve většině případů k metabolismu látek cizího původu (xenobiotik) za účasti mikrosomálního cytochromu P450. Z praxe jsou známé různé vlivy přidavku cytochromu b₅ do cyklu P450. Cytochrom b₅ může reakční cyklus cytochromu P450 stimulovat, inhibovat nebo na něj nemusí mít žádný vliv [35].

To zda, a případně jak, bude ovlivňovat cytochrom b₅ oxygenaci substrátu, určují následující faktory - povaha substrátu, typ (druh) cytochromu P450 a experimentální podmínky [35].

Navrženy jsou 3 způsoby, kterými může b₅ ovlivňovat reakční cyklus cytochromu P450 [25]:

- přenos obou potřebných elektronů do cyklu přes systém NADH:cytochrom b₅ reduktasy / cytochromu b₅
- přenos druhého elektronu na cytochrom P450 pomocí cytochromu b₅
- alosterická stimulace

1.2 EXPRESE REKOMBINANTNÍHO MYOGLOBINU H64Y/V68F

Podstatou exprese rekombinantních proteinů je vložení cizorodé DNA do předem připravené molekuly (nejčastěji plazmidu) a následná exprese cizorodého genu v hostitelské buňce, typicky *Escherichia coli* (*E. coli*) [36].

Plazmid je malá kruhová molekula DNA vyskytující se přirozeně v cytoplasmě bakteriálních buněk. Obsahuje genetickou informaci, která není bezpodmínečně nutná pro život bakterie, ale může být užitečná v určitých životních situacích [36]. Pro expresi proteinů se používají uměle upravené plazmidy. Plazmid, který slouží k přenesení cizorodé DNA do hostitelské buňky a zajištění jejího klonování v buňce, se nazývá klonovací vektor [37]. Plazmid, který slouží zároveň k produkci proteinu kódovaného klonovaným genem, se nazývá expresní vektor [36].

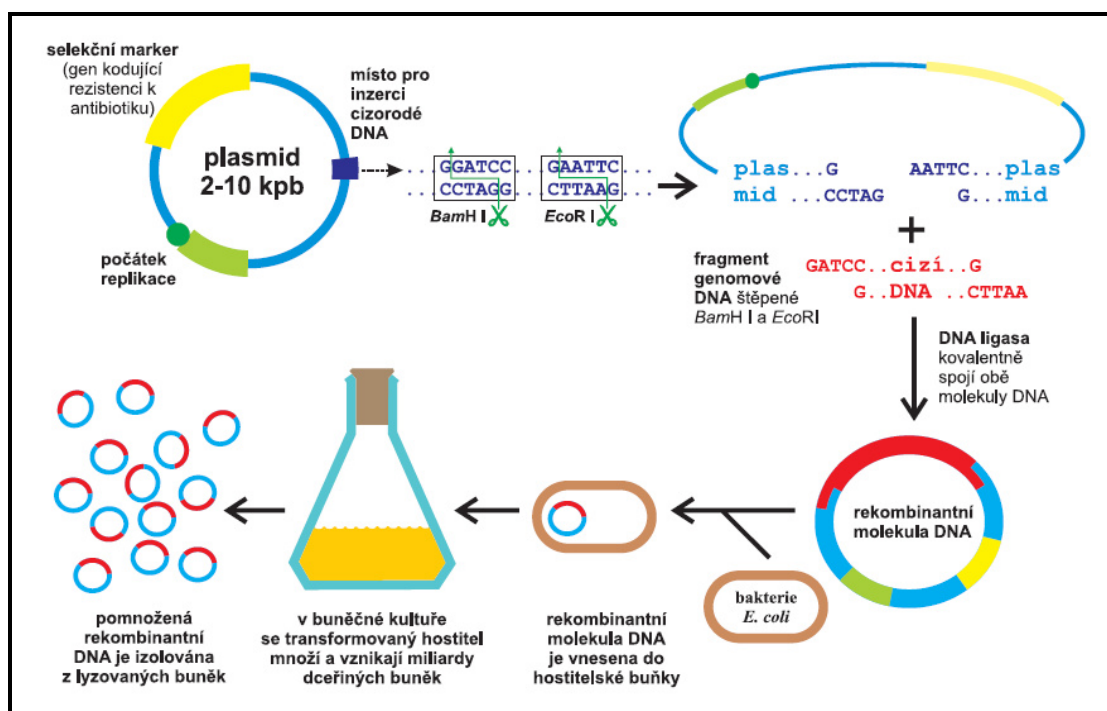
K vložení cizorodé DNA do plazmidu se používá technika využívající tzv. rekombinantní DNA. Speciální enzymy - restriční endonukleasy – štěpí plazmid v přesně definovaných pozicích a umožní tak „otevření kruhu“ plazmidu a vložení cílové sekvence DNA. K opětovnému spojení kompatibilních konců DNA slouží enzym zvaný DNA ligasa. Takto vzniklá molekula cirkulární DNA se označuje jako rekombinantní DNA a je základem exprese rekombinantních proteinů [37].

Schéma vzniku rekombinantní DNA a její následné vložení do hostitelské buňky je znázorněno na **obrázku 9**.

Nejčastější hostitelskou bakterií používanou pro expresi rekombinantních proteinů je *E. coli*. Kompetentní buňky vhodného hostitelského kmene jsou transformovány tak, že je do nich vpraven plazmid, který obsahuje cizorodou DNA [36]. Aby byla bakteriální buňka schopna cizorodou DNA přijmout, musí být daný kmen kultivován v podmínkách, které zajistí zvýšenou prostupnost buněčné stěny. Destabilizace cytoplazmatické membrány se provádí nejčastěji mírným tepelným šokem (42 °C) nebo vápenatými ionty, případně jejich kombinací. Jsou-li bakterie úspěšně transformované expresním plazmidem, získají rezistenci k určitému antibiotiku. Tím je možné tyto transformované bakterie odlišit při kultivaci na Petriho misce od netransformovaných bakterií [38]. Vyrostlé bakteriální kolonie jsou dále přeneseny do tekutého média a kultivovány do exponenciální fáze růstu. V této fázi není přítomen induktor, proto ještě není heterologní gen exprimován.

V okamžiku maximální účinnosti proteosyntetického aparátu je přidán induktor (např. IPTG), který expresi cizorodého genu odblokuje. V této fázi je růst kultury výrazně zpomalen a většina energie a živin je využita ve prospěch produkce rekombinantního proteinu [39, 40].

V závislosti na kultivační teplotě jsou po určité době buňky sklizeny. Po rozrušení buněčné stěny je centrifugací oddělena solubilní frakce od frakce nerozpustných proteinů, kde kromě nerozbitých buněk mohou být obsažena i tzv. inkluzní tělíska tvořená nesprávně složeným rekombinantním proteinem. Pomocí SDS-elektroforézy je analyzována produkce žádaného proteinu. Protein je ve většině případů dále izolován afinitní chromatografií [41, 42].



Obr. 9 – Schéma vzniku rekombinantní DNA a její následné vložení do hostitelské buňky.

Definovaný úsek DNA je vložen do bakteriálního plazmidu a vzniklý rekombinantní plazmid je následně vložen do hostitelské buňky schopné DNA přijmout. V selekčním médiu obsahujícím antibiotikum rostou pouze buňky nesoucí daný plazmid. Pomnožená rekombinantní DNA může být izolována v čisté formě. V případě, že rekombinantní molekula obsahuje gen pro expresi určitého proteinu, dochází k jeho produkci po přidání induktoru (převzato ze [37]).

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Primárním cílem práce bylo pomocí heterologní exprese připravit v dostatečné kvalitě a množství rekombinantní protein, mutantní vorvaní myoglobin H64Y/V68F, ve formě apo-proteinu (bez hemového kofaktoru). Tento protein by měl být díky své vysoké afinitě k hemu a specifickým spektrálním vlastnostem vhodný pro optimalizaci přípravy apo-forem ostatních hemoproteinů (např. cytochromu b_5).

Dalším cílem práce pak bylo nalézt vhodnou šetrnou metodu pro odstranění hemu z cytochromu b_5 s využitím mutantního apo-myoglobinu, a to především s ohledem na maximální zachování nativního stavu apo-cytochromu b_5 .

3 MATERIÁL A METODY

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Chemikálie a materiál použité v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

Boehringer Mannheim (Německo)

protease inhibitor cocktail tablets

Fluka (Švýcarsko)

akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), 2-merkaptoethanol, dodecylsulfát sodný (SDS)

Genomed (Německo)

JetStar Plasmid Maxiprep – kit pro izolaci plazmidové DNA

Lachema Brno, Lach-Ner (Česká republika)

CuSO₄.5H₂O, EDTA Na₂ (chelaton 3), ethanol, kyselina octová, octan sodný, NaHCO₃, Na₂CO₃, NaOH, vínan sodný, isopropylalkohol, bromfenolová modř, HCl, NaCl, persíran amonný, KH₂PO₄, ethylmethylketon (butanon), (NH₄)₂SO₄, NH₄HCO₃

Linde (Česká republika)

kapalný N₂

Penta (Česká republika)

glycerin, glycin, azid sodný, NaOH

Pharmacia (Švédsko)

CM-Sepharosa CL-6B, CNBr aktivovaná Sepharosa 4B

Serva Heidelberg (Německo)

ampicilin, Coomassie Brilliant Blue R-250, N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)

Sevapharma (Česká republika)

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma Aldrich (USA)

LB médium, TB médium, L agar, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), Trizma base, standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v prostředí SDS „Wide range“, CNBr aktivovaná Sepharosa 4B, kyselina δ -aminolevulová, IPTG, hemin

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

Použitá forma cytochromu b_5 (králičí b_5) a 95% apo-cytochrom b_5 byly připraveny kolegy (dr. Věrou Kotrbovou, Barborou Mrázovou a Martinou Svobodovou) na katedře biochemie, PřF, UK. Plazmid pUC19/SwMb_H64Y/V68F jsme obdrželi darem od prof. Johna S. Olsona (Rice University, Texas, USA). Tímto všem děkuji.

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Automatické mikropipety:

BioHit (Finsko)

Nichiryo (Japonsko)

Centrifugy:

Janetzki K70 (Německo)

Sanyo Microcentaur MSE (Japonsko)

Beckman Allegra X-22 (USA)

Inkubátory a termostatované lázně:

Inkubátor orbitální skříňový Sanyo-Gallenkamp (Japonsko)

Inkubátor IR 1500, Flow Laboratories (USA)

Termostatovaná lázeň Julabo TW2 (Německo)

Termostatovaná lázeň Julabo TW8 (Německo)

Spektrofotometry:

Hewlett Packard 8453 (USA)

Pye Unicam PU 8605, 8630, Philips (Velká Británie)

Helios α ThermoSpectronic, Unicam (Velká Británie)

Váhy:

Analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko)

Předvážky KERN EW600-2M (Německo)

Předvážky Helago A&D 128/99-3004 (Japonsko)

Další přístroje:

Aparatura pro elektroforézu miniVE Vertical Amersham Biosciences (Švédsko)

Autokláv Varioklav 400E, H+P Labortechnik (Německo)

Laminární box Labox BIO 126 (Česká republika)

Magnetická míchačka Variomag Monotherm (Německo)

Peristaltická pumpa PP-05, Laboratorní přístroje Praha (Česká republika)

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA)

Sběrač rakcí BioLogic BioFrac Fraction Collector, BIO-RAD (Velká Británie)

Sonikátor Elmasonic E 30H, Elma (Německo)

Sonikátor Bandelin Sonopuls HD 3100 (Německo)

Vakuová „odparka“ Speed Vac® DNA 110 Savant (USA)

Vortex MS 1 Minishaker Schiller Pharma (Německo)

3.3 METODY

3.3.1 Stanovení koncentrace proteinu pomocí BCA

Použita byla metoda dle Wiechelmana a kol. [43], při níž se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s BCA (4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou) v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin redukují měďnaté ionty přítomné v činidle na měďné a ty tvoří barevný komplex s BCA, jehož intenzita zabarvení (absorbance při 562 nm) je přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno těsně před použitím. BCA byla rozpuštěna ve 49 dílech **roztoku A** tak, aby výsledná koncentrace byla 1 % BCA v 50 dílech. Dále byl přidán 1 díl **roztoku B**.

Roztok A: 0,4% NaOH; 0,95% NaHCO₃; 2% Na₂CO₃; 0,16% vínan sodný; pH 11,25

Roztok B: 4% CuSO₄·5H₂O v destilované vodě

Ke 20 µl vzorku (v různém zředění) bylo přidáno do pečlivě vyžíhaných zkumavek 480 µl činidla. Blank obsahoval 20 µl destilované vody a 480 µl činidla.

Jako standard byl připraven roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 1,6 mg/ml. Ten byl dále ředěn na koncentrace 0,8 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml a 0,025 mg/ml. Tyto roztoky byly použity pro sestavení kalibrační křivky. Bylo pipetováno 20 µl standardu BSA a přidáno 480 µl činidla.

Takto připravené roztoky byly inkubovány při teplotě 60 °C (Julabo TW8) po dobu 45 minut. Po ochlazení byla měřena absorbance standardů a vzorků při 562 nm proti blanku. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka a z ní určena koncentrace proteinu ve vzorcích. Měření bylo provedeno na přístroji Hewlett Packard 8453 v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.2 SDS-elektroforéza

Pro separaci a identifikaci proteinů byla použita elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), postup vycházel z Laemmliho práce [44].

SDS-elektroforéza patří mezi elektromigrační metody, při níž dochází k rozdělení proteinů na základě jejich velikosti (relativní molekulové hmotnosti). SDS je aniontový detergent, bílkovinu denaturuje a obaluje tak, že všechny proteiny mají stejnou hodnotu povrchového náboje. Čím delší peptidový řetězec, tím více je látka v gelu zpomalována [37].

V experimentech byl použit polyakrylamidový gel v koncentracích 15 % (dolní separační gel) a 3 % (horní zaostřovací gel). Gel vzniká kopolymerací akrylamidu a N,N-methylen-bis-akrylamidu (BIS), jako iniciátor polymerace se využívá persíran amonný. N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) slouží jako stabilizátor volných radikálů, které vznikají působením světla na molekulu persíranu amonného [45].

Použité pufrы a roztoky:

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

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

Polymerační roztok A: 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS v pufru A

Polymerační roztok B: 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS v pufru B

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3

Vzorkový pufr redukující: 0,063 M Tris HCl; 2% SDS (w/v); 10% glycerol (v/v); 5% 2-merkптоethanol (v/v); 0,003% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

Fixační roztok: 10% isopropanol; 10% kyselina octová

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

Odbarvovací lázeň: 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

15% separační gel byl připraven smísením 3,5 ml pufru A + 3,5 ml polymeračního roztoku A + 7 μ l TEMEDu + persíranu amonného (několik zrníček na špičku špachtle). Gel byl nalit mezi dvě čistá, ethanolom odmaštěná skla do výšky 7 cm a převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí (30 minut) byla destilovaná voda vylita a povrch gelu osušen pomocí filtračního papíru. Na separační gel byl následně aplikován 3% zaostřovací gel připravený smísením 2,7 ml pufru B + 0,3 ml polymeračního roztoku B + 3 μ l TEMEDu + persíranu amonného (několik zrníček na špičku špachtle).

Ihned po nalití byl do roztoku zasunut hřeben pro vytvoření jamek, kam se následně aplikují vzorky (10 nebo 15 jamek). Po ztuhnutí zaostřovacího gelu (30 minut) bylo uvolněno dolní silikonové těsnění a skleněné desky byly umístěny do elektroforetické vany. Horní i dolní elektrodový prostor byl vyplněn elektrodovým pufrem, hřeben pro vytvoření jamek byl odstraněn.

Do jamek byly pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky dávkovány jednotlivé vzorky (5 μ l). Vzorky byly při přípravě ředěny v poměru 1:1 vzorkovým redukcujícím pufrem a povařeny 5 minut na vodní lázni. Pokud se postup přípravy vzorku či dávkované množství lišilo, je změna vyznačena u jednotlivých kapitol. Elektroforetická aparatura byla následně připojena ke zdroji stejnosměrného napětí.

Elektroforéza probíhala ve vertikálním provedení za konstantního napětí 150 V a proudu 20 mA na každý gel po dobu 1,5-2 hodin. Elektroforéza byla ukončena, když vzdálenost mezi čelem obsahujícím bromfenolovou modř a spodním okrajem gelu byla menší než 0,5 cm. Dvojice skel byla opatrně uvolněna pomocí špachtlí a horní zaostřovací gel byl odstraněn. Separační gel byl zpracován následujícím způsobem:

- 5 minut fixační roztok
- 5-10 minut vroucí barvicí lázeň
- 5-10 minut vroucí odbarvovací lázeň
- 20-30 minut studená odbarvovací lázeň, opakováno do úplného odbarvení

3.3.3 Příprava mutantního myoglobinu H64Y/V68F (vorvaň) rekombinantní expresí

Postup přípravy mutantního myoglobinu a jeho apo-formy vycházel z práce uveřejněné Hargrovem a kol. [13].

3.3.3.1 Transformace buněk *Escherichia coli* plazmidem pUC19/SwMb_H64Y/V68F

1 μ l plazmidové DNA (pUC19/SwMb_H64Y/V68F) byl naředěn 10 μ l miliQ vody. 1 μ l takto naředěné DNA se smísil se 100 μ l kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3)

nebo DH5 α v mikrozkuhavce Eppendorf a směs byla ponechána 45 minut na ledu. Poté byla vystavena na 45 s teplotnímu šoku při 42 °C (Julabo TW2) a ihned zchlazena v ledu po dobu tří minut. Poté bylo k buněčné suspenzi přidáno 300 μ l LB média a směs byla kultivována 1 hodinu při 37 °C (inkubátor IR 1500). Následně byly buňky vysety na agarovou půdu (L agar) v Petriho miskách obsahující ampicilin o koncentraci 200 μ g/ml. Pomocí sterilní skleněné hokejky bylo inokulum důkladně rozetřeno po celém povrchu agaru a po jeho vsáknutí byly Petriho misky uzavřeny parafilmem a inkubovány dnem vzhůru při 37 °C přes noc (16-18 hodin).

Po celou dobu bylo nutno zachovávat zásady sterilní práce, kultivační postupy a opatrně zacházet s kompetentními buňkami.

Média byla připravena následovně:

LB médium: 12,5 g suchého média bylo doplněno do 0,5 l destilovanou vodou

TB médium: 23,8 g suchého média se 4 ml glycerolu bylo doplněno do 0,5 l destilovanou vodou

L agar: 4 g agaru byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody, těsně před naléváním agarových ploten byl přidán ampicilin v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v agaru byla 200 μ g/ml

Všechny roztoky byly následně autoklávovány (Varioklav 400E).

3.3.3.2 Kultivace *E. coli*

Kultivace buněk byla provedena dvěma způsoby – vybráním a kultivací pouze jediné kolonie („single-cell colony“) nebo kultivací všech kolonií narostlých na agarovém médiu („multi-cell colony“). Při použití metody „single-cell“ byla vhodná kolonie vybrána pomocí sterilního párátko a ve falkonce bylo zaočkováno 5 nebo 7,5 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 200 μ g/ml. Směs byla inkubována při 37 °C a 250-300 rpm přes noc (15-23 hodin).

Při použití metody „multi-cell“ byly všechny kolonie narostlé na Petriho misce smyty pomocí celkem 7 ml LB média.

3.3.3.3 Amplifikace plazmidu pUC19/SwMb_H64Y/V68F v *E. coli* DH5 α

Buňky transformované plazmidem pUC19/SwMb_H64Y/V68F a kultivované technikou „single-cell colony“ byly zaočkovány 0,5 ml inokulátu do 500 ml LB média s ampicilinem (koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$). Po 15 hodinách inkubace při 37 °C a 200-220 rpm byly narostlé buňky sklizeny centrifugací (Janetzki K70, výkyvný rotor) při 2000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Plazmidová DNA byla izolována pomocí kitu Maxi Prep (JetStar 2.0, 220020).

3.3.3.4 Purifikace plazmidu pUC19/SwMb_H64Y/V68F

Plazmidová DNA byla izolována postupem uvedeným u kitu Maxi Prep. Kolona byla ekvilibrována 30 ml pufru (600 mM NaCl; 100 mM CH₃COONa; 0,15% Triton X-100; na pH 5,0 upravit pomocí CH₃COOH). Pelety byly rozpuštěny v 10 ml pufru 50 mM Tris HCl; 10 mM EDTA Na₂ pH 8,0 + RNAsa (100 $\mu\text{l/ml}$). Následně byla provedena lýza buněk pomocí 10 ml 200 mM NaOH + 1% SDS (w/v) a neutralizace 10 ml 3,1 M CH₃COOK upraveným pomocí CH₃COOH na pH 5,5. Vzorek plazmidu byl aplikován na kolonu a promýván 60 ml pufru (800 mM NaCl; 100 mM CH₃COONa; na pH 5,0 upravit pomocí CH₃COOH). Následně byl vzorek eluován 15 ml pufru (1500 mM NaCl; 100 mM CH₃COONa; na pH 5,0 upravit pomocí CH₃COOH) do sterilní falkonky. DNA byla precipitována přidáním 10 ml isopropanolu a oddělena centrifugací při 12000 rpm a 4 °C po dobu 30 minut (Beckman Allegro X-22). Plazmidová DNA pak byla promyta 10 ml 70% ethanolu a centrifugována při 15300 rpm a 4 °C po dobu 30 minut. Nakonec byl plazmid vysušen proudem vzduchu ve flowboxu, rozpuštěn v 500 μl TE pufru (50 mM Tris HCl; 5 mM EDTA Na₂ pH 8,0) a rozpipetován po 50 μl do sterilních mikrozkušavek Eppendorf. Uskladněn byl v mrazáku při -20 °C.

20 μl vzorku plazmidu bylo ředěno TE puftrem (50 mM Tris HCl; 5 mM EDTA Na₂ pH 8,0) na 2 ml a měřena absorbance při 260 a 280 nm (Helios α). Z poměru absorbancí (A_{260}/A_{280}) byla ověřena čistota preparátu a z hodnoty absorbance při 260 nm určena koncentrace plazmidové DNA ($A_{260} = 1 \rightarrow 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.3.3.5 Exprese vorvaního myoglobinu H64Y/V68F

Pro expresi bylo nutné použít TB médium obsahující buňky *E. coli* BL21 (DE3) narostlé na optickou denzitu (OD) 0,6-1,0 při 600 nm (spektrofotometr Helios α nebo Pye Unicam 8630). V případě „single-cell“ metody bylo pipetováno 1-2 ml LB média obsahujícího kultivované buňky (kapitola 3.3.3.2) do 500-600 ml TB média s ampicilinem (koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$). Směs byla inkubována při 37 °C a 200-220 rpm na požadovanou hodnotu OD (4-5 hodin).

V případě „multi-cell“ metody byl pipetován 1 ml LB média obsahujícího buňky *E. coli* (3.3.3.2) do 500 ml TB média s ampicilinem (koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$). Směs byla inkubována při 37 °C a 220 rpm na požadovanou hodnotu OD (3 hodiny).

Po dosažení OD 0,6-1,0 (600 nm) byla indukována produkce myoglobinu H64Y/V68F pomocí IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosidu) za přítomnosti kyseliny δ -aminolevulové (δ -ALA), která slouží jako prekurzor hemu. IPTG bylo přidáno do každé lahve s TB médiem, aby výsledná koncentrace byla 0,2 mM a δ -ALA tak, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mM. Místo δ -ALA lze použít i roztok heminu v destilované vodě o výsledné koncentraci 0,01 mM v TB médiu (pro lepší rozpustnost sonikovat 3 minuty, sonikátor Elmasonic). Směs byla inkubována při 37 °C a 200-220 rpm 14-17 hodin.

Příprava vzorků pro SDS-elektroforézu

Odebrané vzorky z lahví TB média obsahujícího buňky *E. coli* před a po indukci pomocí IPTG byly centrifugovány při 13000 rpm 2 minuty (Sanyo Microcentaur MSE). Pelety před indukcí IPTG byly rozpuštěny ve 20 μl vzorkového pufru, pelety po indukci IPTG byly rozpuštěny ve 200 μl vzorkového pufru. Na elfo byly pipetovány 3 μl těchto vzorků (**Obr. 10**).

U elektroforézy na **obrázku 11** bylo 20 μl vzorků TB média s buňkami před i po indukci pomocí IPTG ředěno 60 μl vzorkového pufru.

3.3.3.6 Sklizení buněk *E. coli* BL21 (DE3)

Narostlé buňky *E. coli* byly sklizeny centrifugací (Janetzki K70, výkyvný rotor) při 2500 rpm a teplotě 4 °C po dobu 20 minut. Pelety byly rozpuštěny v malém množství

TE pufru (50 mM Tris HCl; 5 mM EDTA Na₂ pH 8,0) ve falkonkách (objem pufru cca poloviční než objem získané pelety). Falkonky byly zmrazeny v tekutém N₂ a uloženy do mrazáku, kde byly při teplotě -80 °C skladovány pro další použití.

3.3.4 Izolace a purifikace myoglobinu H64Y/V68F

3.3.4.1 Dezintegrace buněk

Rozmražené buňky byly resuspendovány v 50 mM Tris HCl + 1 mM EDTA Na₂ pH 8,0 tak, aby bylo celkové množství pufru 4x větší než množství získaných buněk (pelety po centrifugaci). Pro ochranu myoglobinu H64Y/V68F před činností proteas, které štěpí peptidové vazby v bílkovinách, byla přidána směs inhibitorů proteas (protease inhibitor cocktail tablets, 1 tableta ~ 50 ml vzorku).

Rozrušení buněk bylo provedeno pomocí sonikátoru Bandelin Sonopuls HD 3100 v pulzním režimu, puls o délce 30 s byl přerušován 10-15 s intervaly. Sonikace probíhala vždy v jedné ze 2-4 falkonek na ledu. Celkový čas sonikace v každé falkonce byl 6 minut.

V dalším kroku byly vzorky kvůli oddělení cytosolární frakce od nerozbitých buněk a membrán centrifugovány (Beckman Allegro X-22) při 15000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 30-40 minut.

Vzorek pelety po centrifugaci (Beckman Allegro X-22) byl rozpuštěn ve 200 µl vzorkového pufru. Na elfo (**Obr. 12**) byly pipetovány 3 µl takto připraveného vzorku.

3.3.4.2 Vysolení 60% a 100% (NH₄)₂SO₄

Supernatant po centrifugaci byl sycen do 60% nasycení síranem amonným. K supernatantu byl pomalu a za stálého míchání přidáván pevný (NH₄)₂SO₄ (36,6 g do 100 ml) a směs byla ponechána 30 minut za stálého míchání v chladové místnosti (6 °C). Takto vysolený roztok byl centrifugován při 15000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 30-40 minut (Beckman Allegro X-22).

Supernatant byl dále srážen do 100% nasycení (28,3 g (NH₄)₂SO₄ do 100 ml supernatantu) a směs byla ponechána za stálého míchání 30 minut v chladové místnosti

(6 °C). Po centrifugaci (30-40 minut při 15000 rpm, 4 °C, Beckman Allegro X-22) byla peleta rozpuštěna v malém objemu 50 mM Tris HCl; 1 mM EDTA Na₂ pH 8,0 (cca 10 ml).

Vzorky pelety po centrifugaci (Beckman Allegro X-22) byly rozpuštěny ve 200 µl vzorkového pufru. Na elfo (**Obr. 13**) byly pipetovány 3 µl takto připravených vzorků.

3.3.4.3 Dialýza

Pomocí dialýzy byl odstraněn z roztoku síran amonný. Nízkomolekulární látka ((NH₄)₂SO₄) prochází přes polopropustnou membránu z prostředí s vyšší koncentrací (dialyzačního střevo) do prostředí s nižší koncentrací (20 mM KH₂PO₄ pH 6,0), tím dojde k odsolení směsi proteinů. Roztok byl dialyzován 3x proti 3 litrům 20 mM KH₂PO₄ pH 6,0 (dvakrát po 1 hodině a nakonec přes noc, dialyzační střevo Serva 44110, typ 20/32, MWCO – „molecular weight cut-off“ – 12000-14000 Da) při 6 °C.

Po dialýze byl retenát centrifugován při 15300 rpm a teplotě 4 °C po dobu 20-30 minut (Beckman Allegro X-22) a následně aplikován na kolonu, kde se myoglobin H64Y/V68F oddělil od ostatních proteinů pomocí iontoměničové chromatografie.

3.3.4.4 Iontově výměnná chromatografie (CM-Sepharosa CL-6B)

CM (carboxymethyl) Sepharosa CL-6B patří mezi slabé katexy - je disociována jen v určitém rozmezí pH a obsahuje záporně nabitě skupiny. Kyselá funkční skupina - OCH₂COO⁻ je schopna vázat kationty a separovat tak molekuly podle náboje. Před použitím byla CM-Sepharosa CL-6B v chladové místnosti (6 °C) 5x promyta destilovanou vodou o objemu 100-300 ml (3x větším než byl objem iontoměniče) a následně rozmíchána ve 100-300 ml cyklizačního pufru (1 M KH₂PO₄ pH 6,0), v němž byla ponechána min. 4 hodiny. V dalším kroku byl iontoměnič promyt 3x destilovanou vodou o objemu 100-300 ml. Po přidání 100-300 ml ekvilibračního pufru (20 mM KH₂PO₄ pH 6,0) a usazení nosiče byl přebytečný pufr odsát pomocí vodní vývěvy. Zbylý roztok byl po promíchání opatrně naléván přes tyčinku do kolony. Po sedimentaci nosiče byla upravena výška hladiny pufru na 2 cm nad povrch nosiče. Kolona byla následně promývána pomocí 20 mM KH₂PO₄ pH 6,0.

Na ekvilibrovanou kolonu o rozměrech 1,7 x 18 cm (objem nosiče 40 ml) nebo o rozměrech 1,7 x 10 cm (objem nosiče 23 ml) byl aplikován vzorek o objemu 25-35 ml, zároveň byly jímány frakce vytékající z kolony a proměřována jejich absorbance při 280 nm, 386 nm a 409 nm. Kolona byla následně promývána 20 mM KH_2PO_4 pH 6,0 až do poklesu absorbance při všech vlnových délkách na základní linii.

Eluce zachyceného mutantního myoglobinu byla provedena pomocí lineárního gradientu 20-50 mM KH_2PO_4 pH 6,0-9,0 (2x 150, 200 nebo 300 ml pufru).

Podle elučního profilu (absorbancí při 280 nm, 386 nm a 409 nm) a SDS-PAGE byly spojeny frakce obsahující mutantní myoglobin a zahuštěny pomocí mikrofiltrační falkonky (Amicon Ultra, membrána Ultracel PL-10, MWCO 10 kDa, Millipore). Finální preparáty byly rozpipetovány do 2 ml nebo 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf, zmrazeny v tekutém N_2 a uskladněny v mrazáku při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pro další použití.

CM-Sepharosa CL-6B byla regenerována promýváním následujícími roztoky o objemu 100-300 ml (3x větším než objem iontoměniče):

1 M KCl; 0,5 M NaOH; destilovaná voda; 1 M CH_3COONa ; destilovaná voda; 0,5 M NaOH; 3x destilovaná voda; 2x 20% ethanol (v/v). Nakonec byla CM-Sepharosa CL-6B uskladněna ve 100 ml 20% ethanolu při $6\text{ }^\circ\text{C}$.

Postupy uvedené v této kapitole (vysolení, dialýza, iontově výměnná chromatografie) byly z důvodu zachování maximální biochemické aktivity proteinu prováděny za snížené teploty při $6\text{ }^\circ\text{C}$ v chladové místnosti.

Vzorky pro elektroforézu (**Obr. 15**) byly připraveny smícháním 15 μl frakcí 73→77 a 81→83 s 5 μl vzorkového pufru, smícháním 5 μl frakcí 78, 79 s 5 μl vzorkového pufru a smícháním 10 μl frakce 80 s 5 μl vzorkového pufru.

V případě elektroforéz (**Obr. 17, 20 a 21**) byly všechny vzorky připraveny smícháním 5 μl jednotlivých frakcí s 15 μl vzorkového pufru.

3.3.5 Odstranění hemu z myoglobinu H64Y/V68F

Postup pro přípravu mutantního apo-myoglobinu byl použit dle Rossi-Fanelliho a kol. [46]. Myoglobin H64Y/V68F získaný purifikací na iontoměničové koloně byl pomocí 1 M HCl okyselen na pH 2,5-2,6. Disociovaný hem byl následně extrahován pomocí butanonu

(poměr objemu butanonu k roztoku proteinu 1:1) za mírného převrácení ve zkumavce po dobu 5 minut. Extrakce byla provedena celkem třikrát, během procesu se hem extrahoval do horní (organické) fáze. Po odsátí této fáze kapátkem byl bezbarvý roztok apo-myoglobinu H64Y/V68F ponechán 10 minut při 4 °C a následně dialyzován 1 hodinu proti 2 litrům destilované vody při 6 °C (dialyzační střevo Serva 44101, typ 8/32 nebo dialyzační střevo Serva 44110, typ 20/32). K úplnému odstranění butanonu se roztok dále dialyzoval přes noc nebo 1-2 dny při 6 °C proti 2 litrům 10 mM Tris HCl pH 8,0 nebo 2 litrům 10 mM NH₄HCO₃ pH 6,0. Po dialýze byl v případě potřeby apo-myoglobin H64Y/V68F zahuštěn pomocí mikrofiltrační falkonky (Amicon Ultra, membrána Ultracel PL-10, MWCO 10 kDa, Millipore) na finální preparát o objemu 1-5 ml a centrifugován při 13000 rpm 1 minutu (Sanyo Microcentaur MSE, úhlový rotor). Po zmrazení v tekutém N₂ byl vzorek v mikrozkuvkách Eppendorf uskladněn při -80 °C.

Všechny vzorky na elfo (**Obr. 23**) odebrané během extrakce v objemu 5 µl byly ředěny 15 µl vzorkového pufru. Dialyzační pufr (30 µl vzorku) byl naředěn 5 µl vzorkového pufru.

3.3.6 Charakteristika (apo-)myoglobinu H64Y/V68F a jiných hemových sloučenin

3.3.6.1 Absorpční spektrum heminu, (apo-)myoglobinu H64Y/V68F a cytochromu b₅

Absorpční spektrum heminu

5 mM roztok heminu byl připraven v mikrozkuvkavce Eppendorf rozpuštěním 6,5 mg heminu v 15 µl 1 M NaOH, 400 µl 50% ethanolu (v/v) a doplněním na objem 2 ml miliQ vodou. Roztok byl sonikován 2 minuty v ultrazvukové lázni (Elmasonic E 30H). Kontrola pomocí centrifugace při 13000 rpm po dobu 1 minuty (Sanyo Microcentaur MSE) dokázala, že všechny hemin je rozpuštěn (nebyla přítomna peleta). Z 5 mM heminu byl dále připraven 10x a 100x zředěnější roztok o koncentraci 50 µM a 500 µM.

Do křemenné kyvety o optické dráze 1 cm byl pipetován 1 µl 5 mM heminu, doplněn 20 mM Tris HCl pH 7,0 na objem 1 ml a výslednou koncentraci 5 µM a bylo změřeno absorpční spektrum v rozsahu 200-800 nm (Hewlett Packard 8453).

Absorpční spektrum apo-myoglobinu H64Y/V68F

43 μ l 23 μ M apo-myoglobinu H64Y/V68F bylo pipetováno do kyvety, doplněno 20 mM Tris HCl pH 7,0 na objem 1 ml (výsledná koncentrace 1 μ M) a následně bylo změřeno absorpční spektrum.

Absorpční spektrum myoglobinu H64Y/V68F

5 μ l 190 μ M myoglobinu H64Y/V68F (1. frakce chromatografického elučního profilu z **obr. 18**) bylo pipetováno do kyvety o optické dráze 1 cm a doplněno 20 mM Tris HCl pH 7,0 na objem 1 ml (výsledná koncentrace 0,95 μ M).

5 μ l 270 μ M myoglobinu H64Y/V68F (2. frakce chromatografického elučního profilu) bylo v kyvetě doplněno 20 mM Tris HCl pH 7,0 na objem 1 ml (výsledná koncentrace 1,35 μ M). Absorpční spektrum obou těchto roztoků bylo měřeno na přístroji Hewlett Packard 8453.

Absorpční spektrum cytochromu b₅

1 μ M roztok králičího cytochromu b₅ v 20 mM Tris HCl pH 7,0 byl pipetován do křemenné kyvety o optické dráze 1 cm a změřeno absorpční spektrum.

3.3.6.2 Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu, myoglobinu H64Y/V68F a cytochromu b₅

Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu H64Y/V68F

1 μ M mutantní myoglobin, který bylo možno použít pro zjištění pH, při kterém spontánně disociuje hem, byl připraven v celkovém objemu 2 ml postupem uvedeným v kapitole 3.3.6.3.

Roztok v křemenné kyvetě byl postupně okyselován různě ředěnou HCl (0,1-1 M), pH po jednotlivých krocích bylo stanoveno pomocí pH metru (od pH 7,0 do pH 3,5). Byla sledována změna absorpčního spektra v rozmezí 200-800 nm (Hewlett Packard 8453).

Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu

0,1 μM roztok myoglobinu z koňského srdce ve 150 mM KH_2PO_4 pH 6,0 byl v kyvetě o objemu 2 ml postupně okyselován 0,1–1 M HCl a byla sledována změna absorpčního spektra.

Vliv pH na disociaci hemu z cytochromu b_5

13,7 μl 73 μM králičího cytochromu b_5 bylo v kyvetě doplněno 150 mM KH_2PO_4 pH 6,0 na objem 2 ml, výsledná koncentrace cytochromu b_5 byla 0,5 μM . Roztok v kyvetě byl okyselován 0,1–1 M HCl a byla sledována změna absorpčního spektra.

3.3.6.3 Titrace apo-myoglobinu H64Y/V68F heminem, vliv pH

43 μl 23 μM apo-myoglobinu H64Y/V68F bylo pipetováno do křemenné kyvety o optické dráze 1 cm a doplněno na objem 1 ml 20 mM Tris HCl pH 7,0. Výsledná koncentrace apo-myoglobinu H64Y/V68F v kyvetě byla 1 μM . Poměr koncentrace mutantního apo-myoglobinu a heminu v bodě ekvivalence je 1:1. Příklad heminu byl proto zvolen tak, aby po 1. přídávku zásobního 50 μM heminu byla koncentrace heminu 5x menší než v předpokládaném bodě ekvivalence. Roztok 50 μM heminu byl přidáván po 4 μl do kyvety a byla sledována změna absorpčního spektra v rozmezí 200-800 nm (Hewlett Packard 8453).

Vliv pH na přijímání heminu apo-myoglobinem H64Y/V68F byl zjištěn následovně: 7,7 μl 250 μM apo-myoglobinu H64Y/V68F bylo pipetováno do kyvety o optické dráze 1 cm a doplněno na objem 2 ml pufrem (150 mM KH_2PO_4 pH 6,0) na výslednou koncentraci 1 μM . K tomuto roztoku bylo přidáno 8 μl 50 μM heminu a po několika minutách bylo změřeno absorpční spektrum (Hewlett Packard 8453). Následně bylo pH roztoku v kyvetě upraveno na 7,0 a po několika minutách opět změřeno absorpční spektrum.

3.3.6.4 Extrakce hemu z cytochromu b₅ pomocí apo-myoglobinu H64Y/V68F

Reakční směs v kyvetě o objemu 2 ml obsahovala cyt b₅ a apo-myoglobin H64Y/V68F v poměru 1:1,5 (1 μM:1,5 μM) nebo 1:8 (1 μM:8 μM). Jako pufr byla použita 20 mM Tris HCl pH 7,0, pH směsi bylo před spektrometrickým měřením ověřeno pomocí pH metru. Směs byla inkubována 70 minut při laboratorní teplotě (po 37. a 52. minutě byla směs okyselena vždy 1 μl 1 M HCl) nebo 16 hodin při 41 °C. Změna absorpčního spektra v rozsahu 200-800 nm byla sledována na přístroji Hewlett Packard 8453, v případě 16 hodinové inkubace bylo měření v rozsahu 350-700 nm provedeno v kinetickém modu (interval měření nastaven po 10 minutách s 10% nárůstem intervalu).

Všechna měření v kapitole 3.3.6 byla provedena na přístroji Hewlett Packard 8453 v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm proti blanku, kterým byl ve všech případech příslušný pufr.

3.3.7 Gel pro přípravu apo-forem hemoproteinů afinitní chromatografií

3.3.7.1 Příprava gelu s navázaným apo-myoglobinem nebo apo-myoglobinem H64Y/V68F

Pro přípravu gelu s navázaným apo-myoglobinem nebo mutantním apo-myoglobinem byla použita CNBr aktivovaná Sepharosa 4B, postup přípravy gelu vycházel z návodu výrobce [47]. Tento nosič reaguje v alkalickém prostředí s -NH₂ skupinami přítomnými v proteinu a kovalentně jej na sebe váže. 1-2 g CNBr Sepharosy 4B byly nejprve promyty 1 mM HCl (200 ml 1 mM HCl na gram suchého gelu) k odstranění laktosy, která slouží ke stabilizaci nosiče při lyofilizaci. Celkový objem 1 mM HCl byl přidáván po částech a zůstal v kontaktu s nosičem při 6 °C po dobu nejméně 30 minut, aby došlo k dostatečnému nabobtnání částic gelu. Po promytí desetinásobným objemem miliQ vody byl k nosiči přidán pufr (0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl pH 8,4) o objemu 1-5 ml a roztok

byl okamžitě smíchán s roztokem proteinu (myoglobinu, myoglobinu H64Y/V68F nebo apo-myoglobinu H64Y/V68F).

Proteiny byly rozpuštěny v pufru 0,1 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl pH 8,4 nebo v elučním pufru 20-50 mM KH₂PO₄ upraveném na pH 8,4 o objemu 4,5-5,5 ml. Pufry obsahující aminoskupiny (např. Tris HCl, NH₄HCO₃) nebylo možné použít z důvodu jejich interakce s vazebnými místy na CNBr Sepharose. Pokud roztok některého proteinu tyto pufry obsahoval, bylo nutné provést dialýzu 3x proti 2 litrům 0,1 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl pH 8,4 po dobu 1 hodiny (6 °C).

CNBr Sepharosa 4B a roztok proteinu byly pomalu a opatrně promíchávány při 6 °C přes noc. Následující den byl nezreagovaný protein vymyt pomocí 0,1 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl pH 8,4. Volná vazebná místa na nosiči byla blokována 0,2 M glycinem pH 8,0 o objemu 2-10 ml pomalým promícháváním po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Dále byl gel 4-5x střídavě promýván desetinásobným objemem 0,1 M acetátového pufru + 0,5 M NaCl pH 4,0 a 0,1 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl pH 8,4.

V případě přípravy gelu s navázaným myoglobinem nebo mutantním myoglobinem byl z těchto proteinů následně odstraněn hem promytím desetinásobným objemem 100-150 mM KH₂PO₄ pH 2,6 a extrakcí pomocí butanonu. Butanon byl přidán v objemu stejném jako objem gelu v koloně a po 5 minutách promíchávání byla horní (organická) fáze butanonu odsáta. Extrakce byla opakována do odbarvení gelu 3-8x. Při vícenásobné extrakci (větší než 4x) však docházelo ke zřetelnému poškození vazby proteinu na nosič. K částečnému odstranění butanonu z roztoku gelu bylo možné použít rotační vakuovou odparku Speed Vac (10-20 minut, nízký nebo střední stupeň zahřívání). K úplnému odstranění butanonu byl gel promýván 100 mM KH₂PO₄ pH 7,0 (příp. pH 7,4).

Takto připravený gel bylo možné po ekvilibraci ihned použít nebo uschovat v 1 M NaCl + 0,05% azidu sodném při teplotě 2-8 °C.

Současně byl připraven i gel kontrolní, který neobsahoval žádný protein a všechna jeho vazebná místa byla blokována pomocí 0,2 M glycinu pH 8,0.

Z 1 g suchého nosiče byly připraveny 2-2,5 ml gelu. Na 1 ml gelu by se mělo vázalo dle specifikace výrobce 5-10 mg proteinu.

3.3.7.2 Stanovení kapacity gelu s navázaným apo-myoglobinem a apo-myoglobinem H64Y/V68F

Přesně odebrané množství gelu (70-100 μ l gelu) bylo v mikrozkuhavce Eppendorf doplněno pufrém (100 mM KH_2PO_4 pH 7,0 nebo 7,4) do celkového objemu 1,5 ml. Po důkladném usazení gelu (samovolně nebo centrifugace Sanyo Microcentaur MSE 13000 rpm 2 minuty, z centrifugy vyjmout mikrozkuhavku Eppendorf až po 1 minutě) bylo pipetováno 900 μ l roztoku nad gelem do kyvety o optické dráze 1 cm a změřeno absorpční spektrum proti blanku (100 mM KH_2PO_4 pH 7,0 nebo 7,4) na spektrofotometru Hewlett Packard 8453. Po měření byl roztok přemístěn zpět do mikrozkuhavky a k němu postupně přidáván roztok 500 μ M heminu (po 4-20 μ l), 1-20 minut byla směs za laboratorní teploty promíchávána (v případě gelu 1 přes noc – po přidavku 45 μ l 500 μ M heminu) a po usazení změřeno spektrum za stejných podmínek. Po nasycení všech vazebných míst heminem absorbance při 392 nm (398 nm) prudce stoupá, v bodě zlomu je možné určit maximální kapacitu gelu.

Z důvodu možné nespecifické vazby heminu na gel bylo měření kapacity provedeno i u kontrolního gelu.

3.3.7.3 Příprava apo-cytochromu b_5 pomocí gelu s navázaným apo-myoglobinem H64Y/V68F

V následujícím experimentu byly testovány 4 různé druhy připravených gelů:

- gel připravený navázáním apo-myoglobinu H64Y/V68F na CNBr Sepharosu 4B
- gel připravený navázáním apo-myoglobinu H64Y/V68F natitrovaného heminem (postup titrace kapitola 3.3.6.3) na CNBr Sepharosu 4B, z kterého byl následně pomocí kyselé extrakce butanonem odstraněn hem (postup extrakce kapitola 3.3.5)
- gel připravený navázáním myoglobinu z koňského srdce na CNBr Sepharosu 4B, z kterého byl následně odstraněn hem
- kontrolní gel připravený blokadí všech vazebných míst na CNBr Sepharose 4B pomocí glycinu

Jako cytochrom b_5 byl použit izolovaný králičí $73 \mu\text{M}$ cytochrom b_5 a dále $1000 \mu\text{M}$ 95% apo-forma králičího cytochromu b_5 získaná rekombinantní expresí, u které bylo žádoucí úplné odstranění hemu.

$100 \mu\text{l}$ kontrolního gelu nebo $100 \mu\text{l}$ gelů s předpokládaným množstvím $0,125 \text{ mg}$ správně navázaného a funkčního proteinu (polovina z celkového množství proteinu), bylo smícháno s $25 \mu\text{l}$ $73 \mu\text{M}$ cytochromu b_5 nebo $25 \mu\text{l}$ 95% apo-cytochromu b_5 . Množství gelu vůči předpokládanému obsahu hemu bylo v případě $73 \mu\text{M}$ cytochromu b_5 zhruba čtyřnásobné, v případě 95% apo-cytochromu b_5 byl nadbytek gelu ještě vyšší. Vzorky byly následně inkubovány při 40°C za stálého třepání po dobu 3 hodin.

$25 \mu\text{l}$ $73 \mu\text{M}$ cytochromu b_5 bylo pipetováno do $600 \mu\text{l}$ 200 mM KH_2PO_4 pH 7,00 v 1 ml maskované křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm a změřeno absorpční spektrum v rozsahu 200-800 nm proti pufru. Stejným způsobem bylo změřeno i absorpční spektrum 95% apo-cytochromu b_5 .

Po 3 hodinách inkubace byly vzorky centrifugovány (Sanyo Microcentaur MSE 13000 rpm 3 minuty), z centrifugy byly vzorky opatrně vyjmuty až po 5 minutách pro důkladné usazení gelu. Bylo odebráno $400 \mu\text{l}$ roztoku nad gelem a měřeno absorpční spektrum.

4 VÝSLEDKY

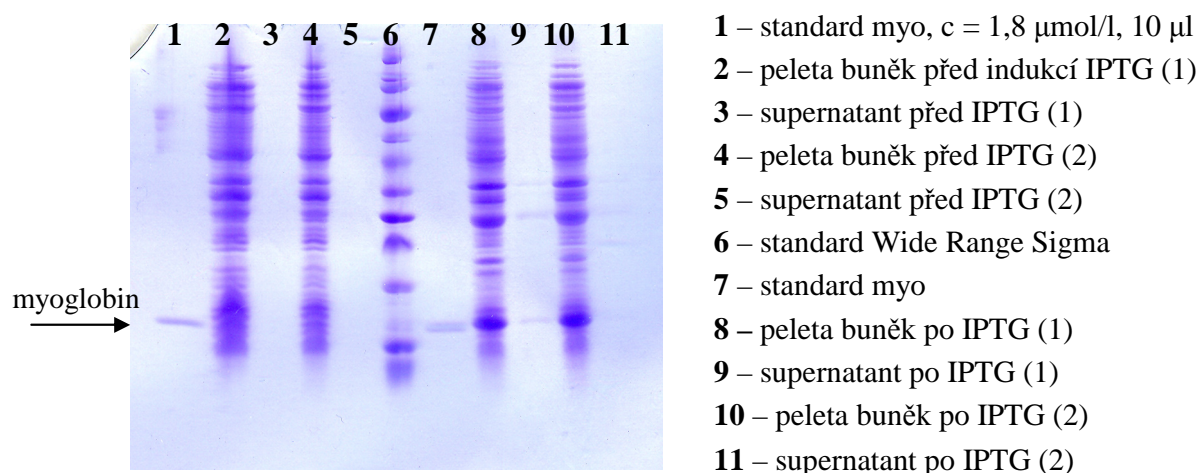
4.1 PŘÍPRAVA VORVANÍHO MYOGLOBINU H64Y/V68F REKOMBINANTNÍ EXPRESÍ

Jedním z cílů diplomové práce bylo připravit mutantní myoglobin H64Y/V68F rekombinantní expresí.

Pro amplifikaci plazmidu pUC nesoucího gen pro vorvaní mutantní myoglobin H64Y/V68F (kapitola 3.3.3.3) byly použity kompetentní buňky *E. coli* DH5 α . Amplifikovaný plazmid byl izolován a purifikován pomocí kitu MaxiPrep v množství 1,5 mg (koncentrace 3 mg/ml) a dostatečné čistotě ($A_{260}/A_{280} = 2,2$).

Pro vlastní expresi proteinu (kapitola 3.3.3.5) byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL21 (DE3), které mají narozdíl od *E. coli* DH5 α gen pro T7 RNA polymerasu a jsou tudíž vhodné pro expresi proteinu pod kontrolou T7 promotoru. Po transformaci příslušných buněk plazmidem pUC19/SwMb_H64Y/V68F a jejich kultivaci do exponenciální fáze růstu byla indukována produkce mutantního myoglobinu pomocí IPTG. Výsledky exprese byly sledovány pomocí SDS-PAGE.

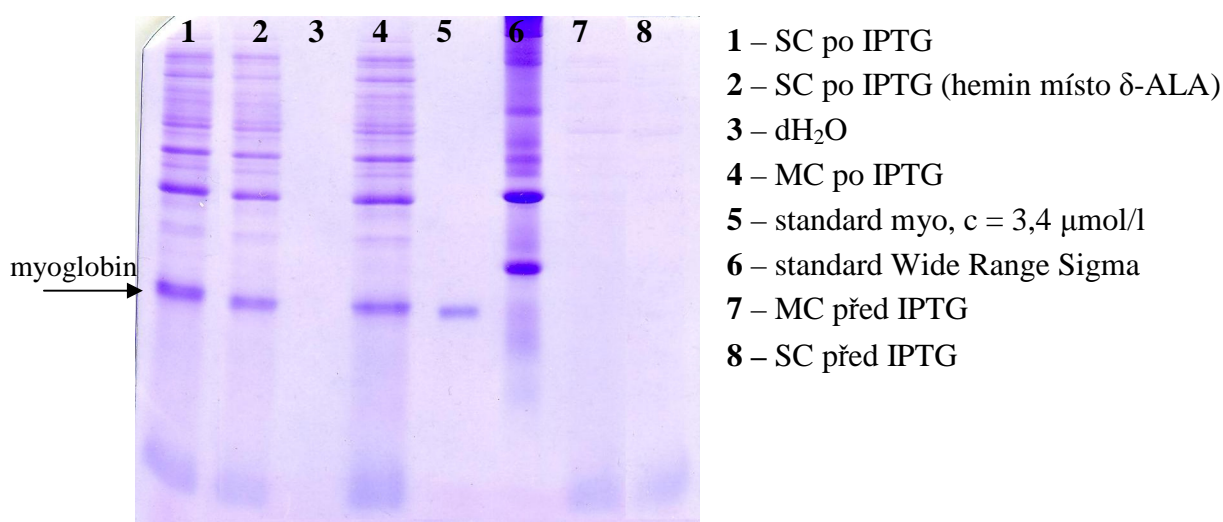
Rekombinantní mutantní myoglobin H64Y/V68F byl úspěšně produkován v buňkách *E. coli* jako cytosolární protein, který prakticky není exkretován do média (**Obr. 10**).



Obr. 10 – Exprese myoglobinu H64Y/V68F v buňkách *E. coli* metodou „single-cell“.

V supernatantu (3; 5; 9; 11) není přítomný žádný protein, mutantní myoglobin je produkován do cytosolu buněk.

Expres v těchto buňkách byla celkem prováděna 4x, aby bylo připraveno dostatečné množství proteinu pro následné experimenty. Expres byla provedena za různých podmínek – použitím metody „single-cell“ (SC) nebo „multi-cell“ (MC) kolonie a použitím δ -ALA nebo heminu jako prekurzoru hemu. V případě SC i MC je patrná stejná produkce mutantního myoglobinu (dráhy 1 a 4 na **obrázku 11**). Podobně i porovnání přítomnosti δ -ALA nebo heminu jako prekurzorů hemu (dráhy 1 a 2 na **obrázku 11**) ukazuje, že výtěžky při použití obou sloučenin jsou podobné. Z výsledků získaných pomocí SDS-elektroforézy a podle stanovení koncentrace proteinů metodou BCA ve finálních preparátech bylo zjištěno, že kultivace buněk za všech výše uvedených podmínek vykazuje podobný výtěžek, který pak závisí především na objemu média použitého pro kultivaci buněk (**Tab. 3, strana 52**).

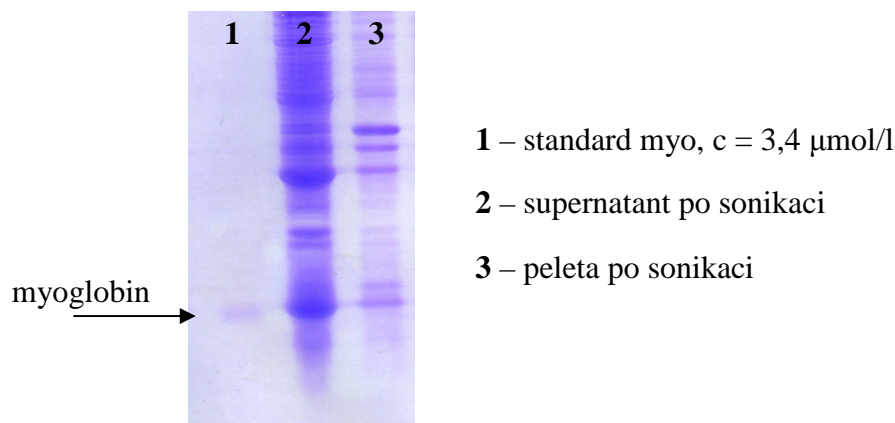


Obr. 11 – Porovnání exprese myoglobinu H64Y/V68F v buňkách *E. coli* metodou „single-cell“ i „multi-cell“ a vlivu přidání prekurzoru hemu.

Jako nejvhodnější metodu lze doporučit provedení „multi-cell“, které nevyžaduje přeočkování kultury a je tedy, oproti metodě SC, až o 24 hod kratší, přičemž výtěžek obou metod je stejný. Jako prekurzor hemu je pak z důvodu lepší rozpustnosti vhodnější δ -ALA.

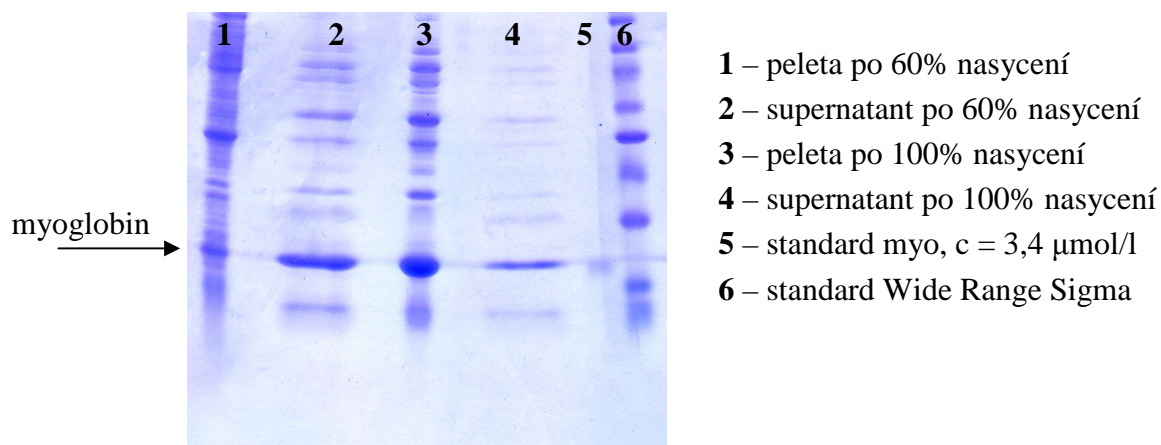
4.2 IZOLACE A PURIFIKACE MYOGLOBINU H64Y/V68F

Buňky *E. Coli* s exprimovaným myoglobinem H64Y/V68F byly dále homogenizovány pomocí sonikace (kapitola 3.3.4.1) a následně centrifugovány. Pro další postup byl použit pouze supernatant, v peletách zůstalo malé množství myoglobinu H64Y/V68F (**Obr. 12**).



Obr. 12 – Centrifugace po sonikaci buněk *E. coli*. Většina myoglobinu H64Y/V68F je přítomna v supernatantu, který je dále zpracováván. Pouze malé množství proteinu je přítomno v peletách.

Cytosolární frakce byla frakcionována srážením $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (kapitola 3.3.4.2). Mutantní myoglobin byl přítomen především ve frakci s 60-100% nasycením, v průběhu vysolování však docházelo k mírným ztrátám izolovaného proteinu (**Obr. 13**).

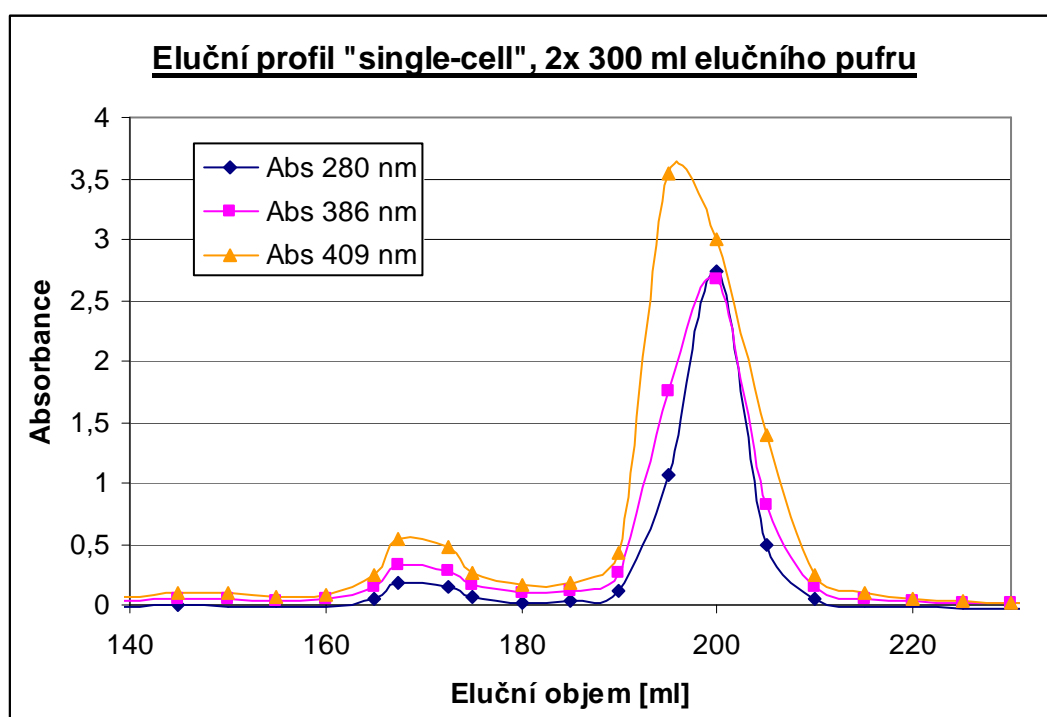


Obr. 13 – Vysolování síranem amonným. Supernatant po 60% nasycení (2) a peleta po 100% nasycení (3) jsou dále využívány, ve frakcích 1 a 4 dochází k mírným ztrátám proteinu.

Rozpuštěná peleta po vysolení 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ byla následně dialyzována a přečištěna iontoměničovou chromatografií na CM-Sepharose CL-6B (kapitola 3.3.4.4). Frakce obsahující největší množství myoglobinu H64Y/V68F byly dle elučních profilů a SDS-PAGE spojeny a zahuštěny. Celý postup izolace a purifikace myoglobinu H64Y/V68F byl proveden celkem 3x, eluční profily a související SDS-PAGE však nebyly ve všech případech shodné, proto jsou dále popisovány samostatně.

4.2.1 Purifikace myoglobinu H64Y/V68F (metoda „single-cell“, pomalý gradient)

Purifikace mutantního myoglobinu (získaného metodou „single-cell“) elučním pufrem o objemu 2x 300 ml (**Obr. 14**) dokázal přítomnost myoglobinu ve dvou frakcích, majoritní a minoritní (způsobenou částečnou spontánní deaminací). Minoritní frakce byla zahuštěna v elučním objemu 165 až 185 ml (dílčí frakce 73→77) a majoritní frakce v objemu 185 až 210 ml (dílčí frakce 78→83).

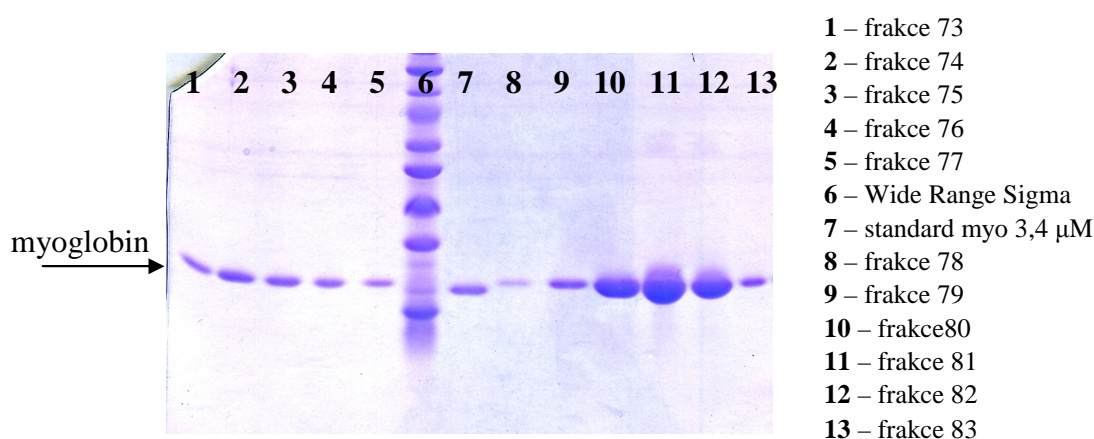


Obr. 14 – Eluční profil po purifikaci myoglobinu H64Y/V68F připraveného metodou „single-cell“ na CM-Sepharose. Mutantní myoglobin je přítomen ve dvou frakcích, minoritní a majoritní.

Při 280 nm byla při eluci sledována přítomnost proteinů, při 386 nm přítomnost volného hemu a při 409 nm přítomnost myoglobinu. SDS-PAGE (**Obr. 15**) prokázala čistotu obou hlavních frakcí.

Minoritní frakce byla z celkového objemu 20 ml zahuštěna na 0,9 ml (koncentrace dle BCA 0,6 mg/ml), majoritní frakce z celkového objemu 25 ml na 1 ml (3,0 mg/ml) a na 1,5 ml (12,5 mg/ml).

Celkové množství získaného myoglobinu H64Y/V68F z první frakce činilo **0,5 mg**, z druhé frakce **22 mg**.



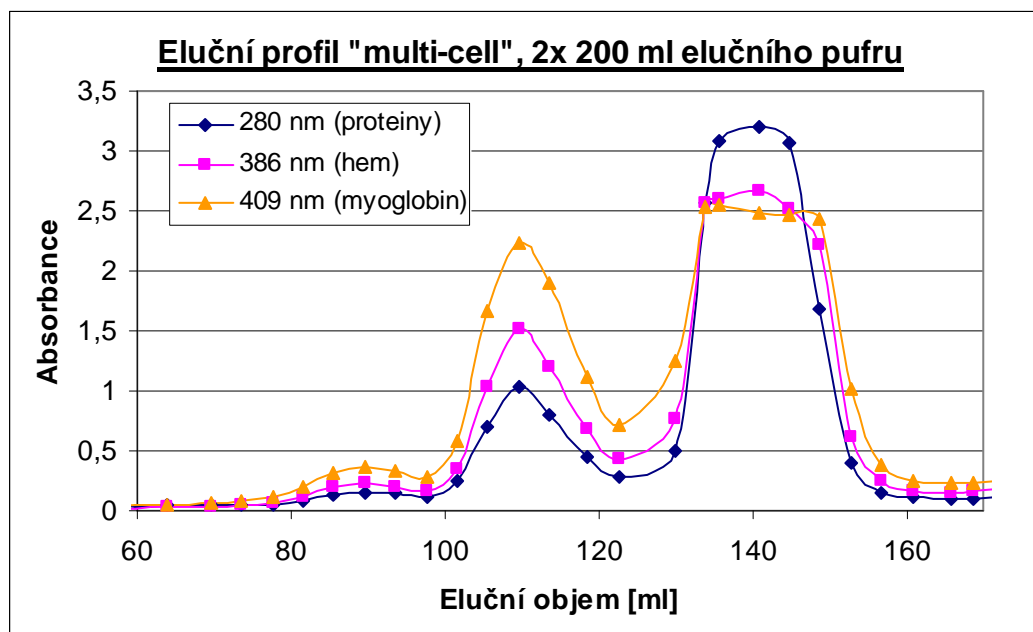
Obr. 15 – Eluce myoglobinu H64Y/V68F připraveného metodou „single-cell“ na CM-Sephrose. Frakce 73→77 a 78→83 byly spojeny a zahuštěny.

4.2.2 Purifikace myoglobinu H64Y/V68F (metoda „multi-cell“)

Purifikace mutantního myoglobinu (získaného metodou „multi-cell“) elučním puforem o objemu 2x 200 ml (**Obr. 16**) dokázala také přítomnost myoglobinu ve dvou frakcích, dle zvětšené absorbance obou frakcí je patrné, že bylo připraveno celkově větší množství mutantního myoglobinu než v provedení „single-cell“ (**Obr. 14**). K tomu přispěl téměř 2x větší objem bakteriální kultury.

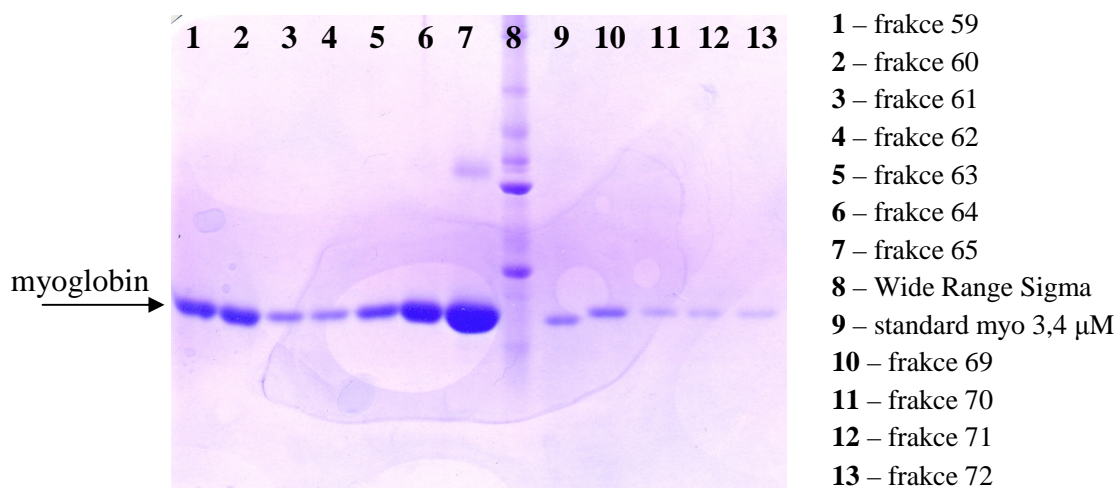
SDS-PAGE (**Obr. 17**) prokázala čistotu obou hlavních frakcí.

První frakce mutantního myoglobinu (metoda „multi-cell“) získaná elucí byla zahuštěna v elučním objemu 80 až 130 ml (dílčí frakce 51→61) a druhá frakce v objemu 130 až 155 ml (dílčí frakce 62→69).



Obr. 16 – Eluční profil purifikace myoglobinu H64Y/V68F (MC) na CM-Sepharose. Snížením elučního objemu došlo k urychlení eluce proteinu, obě hlavní frakce jsou stále dostatečně rozdělené. Obě frakce obsahují vysoké množství proteinů.

První frakce byla z celkového objemu 50 ml zahuštěna na 2,3 ml (koncentrace dle BCA 3,0 mg/ml), druhá frakce z celkového objemu 25 ml na 5,5 ml (7,1 mg/ml) a na 1 ml (2,2 mg/ml). Celkové množství získaného myoglobinu H64Y/V68F z první frakce činilo **7 mg**, z druhé frakce **38 mg**.

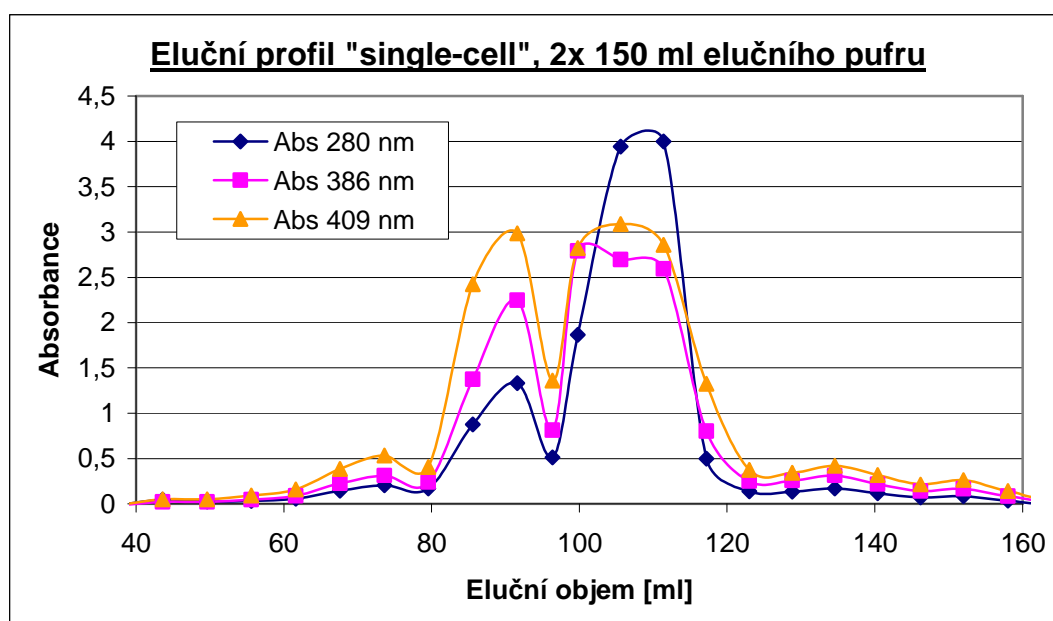


Obr. 17 – Eluce myoglobinu H64Y/V68F připraveného metodou „multi-cell“ na CM-Sepharose. Frakce 51→61 a 62→69 byly spojeny a zahuštěny.

4.2.3 Purifikace myoglobinu H64Y/V68F (metoda „single-cell“, rychlý gradient)

Podobné výsledky vykazovala i purifikace mutantního myoglobinu (získaného metodou „single-cell“), tentokrát však eluovaného puforem o objemu 2x 150 ml (**Obr. 18**). Čistý mutantní myoglobin vytékal z kolony ve dvou hlavních frakcích, v obou byl přítomen vysoký obsah proteinu. Oddělení obou frakcí ale není zcela dostačující.

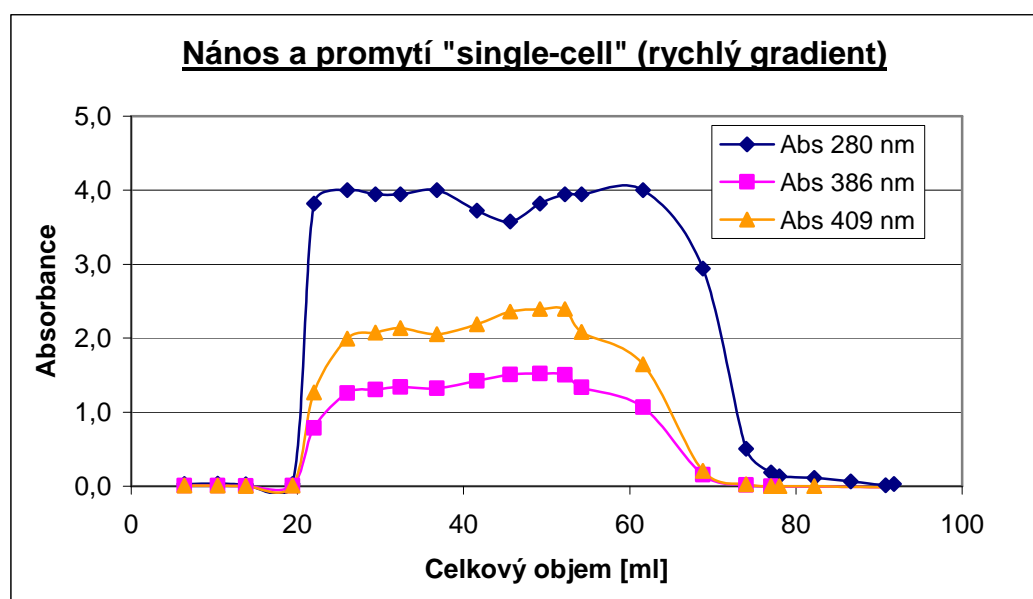
V elučním profilu (**Obr. 18**) je také patrná nejkyselější minoritní frakce eluovaná při objemu 70 ml. Z poměru absorbancí $A_{409}/A_{280} \sim 2,5$ lze soudit, že se jedná také o hemoprotein.



Obr. 18 – Eluční profil po purifikaci myoglobinu H64Y/V68F připraveného metodou „single-cell“ na CM-Sepharose. Dalším snížením elučního objemu došlo k urychlení eluce proteinu.

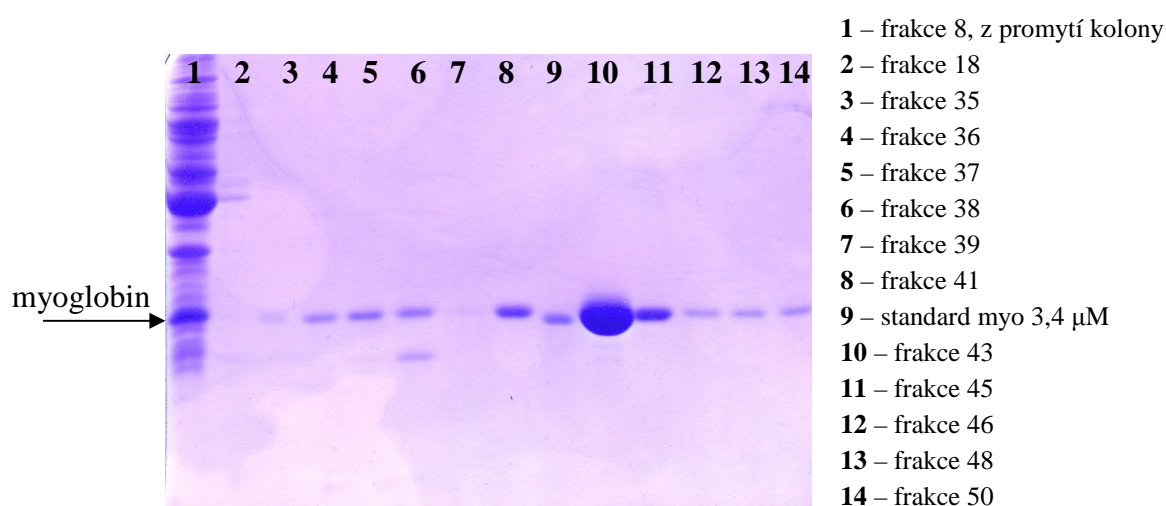
Z kolony při promývání vytékal světle červený roztok, zdálo se tedy, že nedošlo k navázání veškerého přítomného hemoproteinu (**Obr. 19**). Při promytí vzorku na koloně se část myoglobinu skutečně nezachytila a vytekla z kolony spolu s ostatními proteiny, viz dráha č.1 na **obrázku 20**.

Podobný problém se vyskytl i při purifikaci myoglobinu H64Y/V68F získaného metodou „multi-cell“.



Obr. 19 – Nános a promytí myoglobinu H64Y/V68F připraveného metodou „single-cell“ (rychlý gradient) na CM-Sepharose.

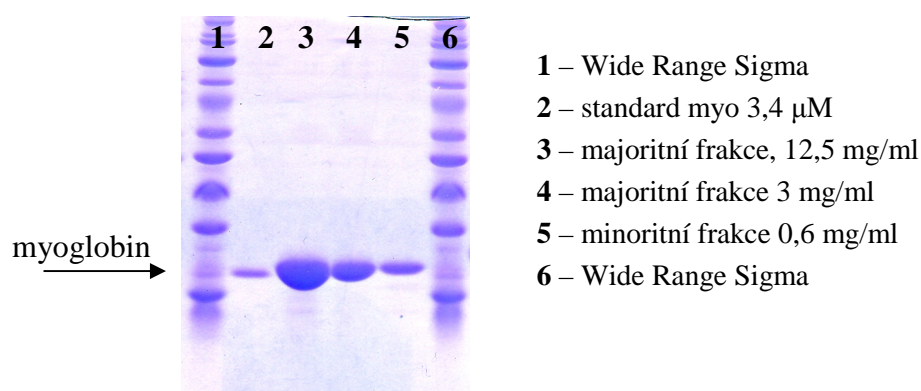
První frakce mutantního myoglobinu (metoda „single-cell“, rychlý gradient) získaná elucí byla zahuštěna v elučním objemu 70 až 100 ml (dílčí frakce 36, 37, 39, 40, 41) a druhá frakce v objemu 100 až 140 ml (dílčí frakce 42→49). První frakce byla z celkového objemu 30 ml zahuštěna na 2,4 ml (koncentrace dle BCA 3,4 mg/ml) a 0,7 ml (2,1 mg/ml), druhá frakce z celkového objemu 40 ml na 8 ml (4,8 mg/ml) a na 2,7 ml (1,4 mg/ml). Celkové množství získaného myoglobinu H64Y/V68F z první frakce činilo **10 mg**, z druhé frakce **42 mg**. SDS-PAGE (**Obr. 20**) porovnála čistotu obou hlavních frakcí.



Obr. 20 – Eluce myoglobinu H64Y/V68F („single-cell“, rychlý gradient). Frakce 36→41 (kromě frakce 38 z důvodu znečištění) a 42→49 byly spojeny a zahuštěny.

4.2.4 Charakterizace finálních vzorků myoglobinu H64Y/V68F

Finální preparáty byly rozpipetovány do mikrozkušavek Eppendorf, zmraženy v tekutém N₂ a uskladněny v mrazáku při -80 °C. Ukázka SDS-PAGE finálního preparátu, vzorku připraveného metodou „single-cell“ a purifikovaného na CM-Sepharose, eluovaného 2x 300 ml elučního pufru, je znázorněna na **obrázku 21**.

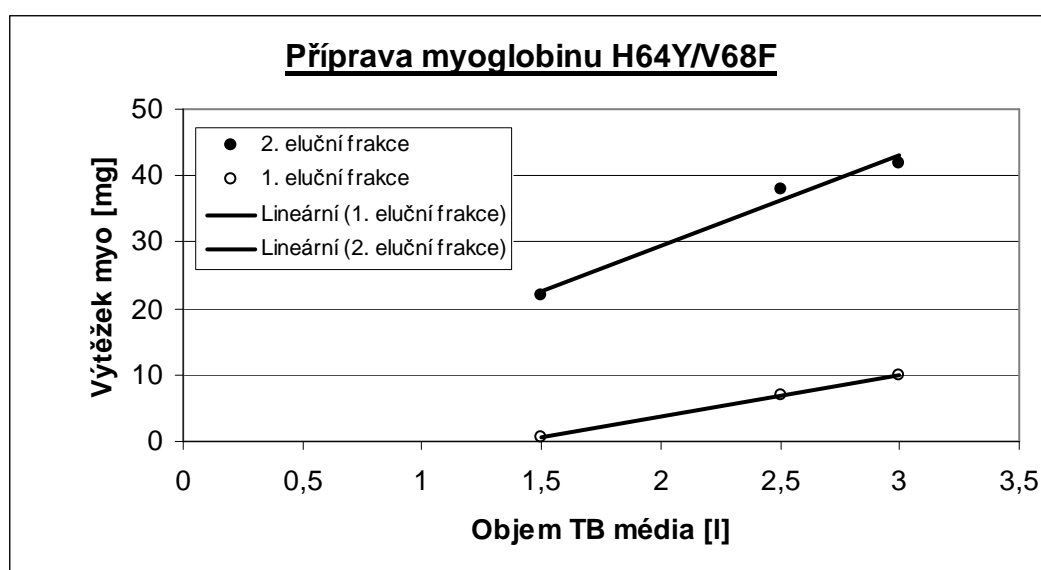


Obr. 21 – Finální preparáty purifikovaného myoglobinu H64Y/V68F na CM-Sepharose o různých koncentracích.

Celkem bylo rekombinantní expresí připraveno **120 mg** mutantního myoglobinu H64Y/V68F, na první frakci elučního profilu z tohoto množství připadá **17,5 mg**, druhá frakce činí **102 mg** mutantního myoglobinu (**Tab. 3**). Koncentrace proteinů byly určovány metodou BCA (kapitola 3.3.1). Ačkoliv byl myoglobin H64Y/V68F připravován rekombinantní expresí za různých experimentálních podmínek, byla zjištěna prakticky lineární závislost celkového výtěžku proteinu na objemu kultivačního média (**Obr. 22**). Ostatní sledované faktory, jako např. volba metody SC nebo MC či volba prekursoru hemu, v případě exprese mutantního myoglobinu H64Y/V68F nehrají významnou roli.

Tab. 3 – Výtěžek přípravy mutantního myoglobinu H64Y/V68F rekombinantní expresí.

Purifikace na koloně CM-Sepharosy č.	Objem TB média [l]	Výtěžek 1. eluční frakce [mg]	Výtěžek 2. eluční frakce [mg]
1 (SC)	1,5	0,5	22
2 (MC)	2,5	7,0	38
3 (SC)	3,0	10,0	42
Celkem	7,0	17,5	102



Obr. 22 – Závislost výtěžku přípravy mutantního myoglobinu H64Y/V68F rekombinantní expresí na objemu kultivačního média.

4.3 PŘÍPRAVA APO-FORMY MYOGLOBINU H64Y/V68F

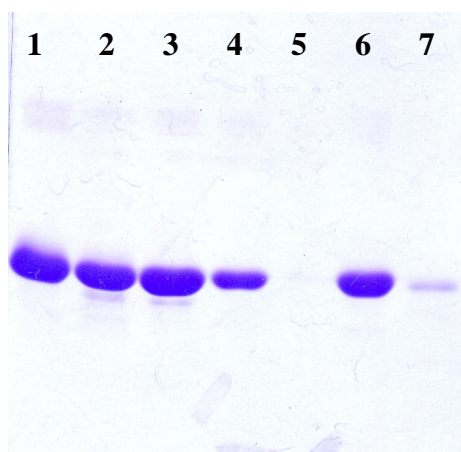
Příprava apo-myoglobinu H64Y/V68F postupem dle Rossi-Fanelliho a kol. [46] (kapitola 3.3.5) byla poměrně ztrátovým krokem. Kritickým bodem byla pravděpodobně extrakce hemu butanonem při nízkém pH (2,5-2,6), v důsledku čehož při následném kroku (dialýza) velké množství proteinu ireverzibilně precipitovalo. Stanovením koncentrací proteinů (metoda BCA, kapitola 3.3.1) byl při dodržení postupu extrakce určen výtěžek 20 %.

Z celkového množství 10 mg myoglobinu H64Y/V68F bylo získáno **2,1 mg** apo-myoglobinu H64Y/V68F (**Tab. 4**).

Zkrácením doby dialýzy (z 1-2 dnů na 12 hodin) a výměnou dialyzačního pufru (10 mM Tris HCl pH 8,0 byl nahrazen 10 mM NH_4HCO_3 pH 6,0) se podařilo výtěžek zvýšit až na 60 % (**Obr. 23**). V originálním postupu je pH dialyzačního pufru (pH 8,0) poměrně blízko teoretické hodnotě isoelektrického bodu mutantního myoglobinu (8,7) [10]. Z tohoto důvodu bylo původní pH pufru upraveno z 8,0 na 6,0. Z celkem 38,5 mg myoglobinu H64Y/V68F bylo získáno **21,6 mg** apo-myoglobinu H64Y/V68F (**Tab. 4**).

Tab. 4 – Přehled množství apo-myoglobinu H64Y/V68F získaného z myoglobinu H64Y/V68F

Číslo extrakce	Myo H64Y/V68F [mg]	Apo-myoglobin H64Y/V68F [mg]	Apo-myoglobin H64Y/V68F [ml]	Apo-myoglobin H64Y/V68F [mg/ml]
1	3,0	0,6	1,0	0,6
2	7,0	1,5	3,0	0,5
Souhrn	10,0	2,1	4,0	-
3	3,0	1,3	3,3	0,4
4	35,5	20,3	4,5	4,5
Souhrn	38,5	21,6	7,8	-
Celkem	48,5	23,7	11,8	-



- 1 – před okyselením 1 M HCl
- 2 – po okyselení 1 M HCl
- 3 – po třetí extrakci butanonem
- 4 – retenát apo-myoglobinu H64Y/V68F
- 5 – dialyzační pufr NH_4HCO_3
- 6 – apo-myoglobin H64Y/V68F po zahuštění
- 7 – standard myo 3,4 $\mu\text{mol/l}$

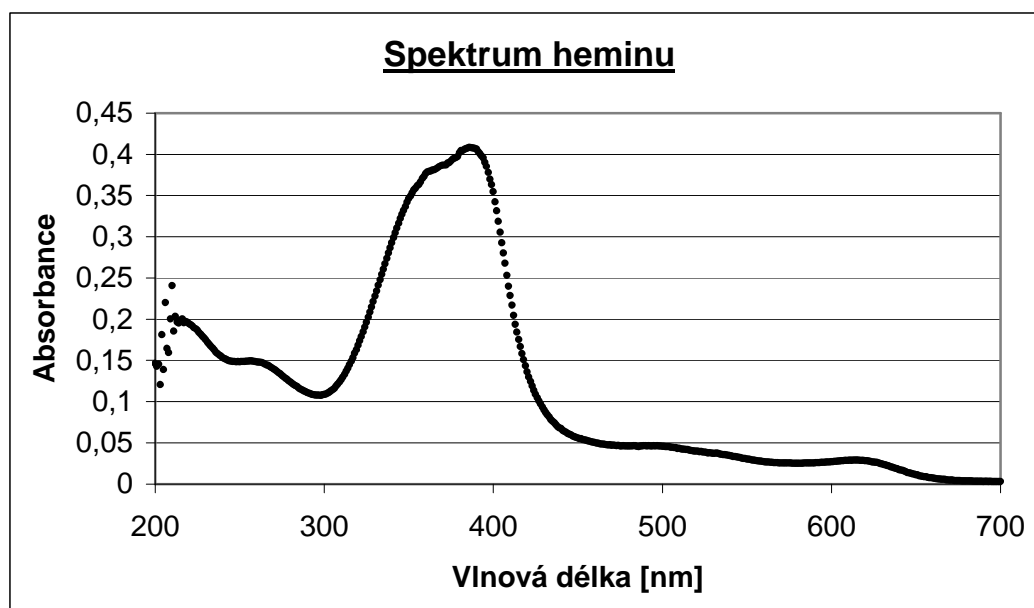
Obr. 23 – Odstranění hemu z mutantního myoglobinu po jednotlivých krocích. Při dialýze vzrostl objem dvojnásobně. I po zahuštění na původní objem je patrný úbytek proteinu.

4.4 CHARAKTERISTIKA (APO-)MYOGLOBINU H64Y/V68F A JINÝCH HEMOVÝCH SLOUČENIN

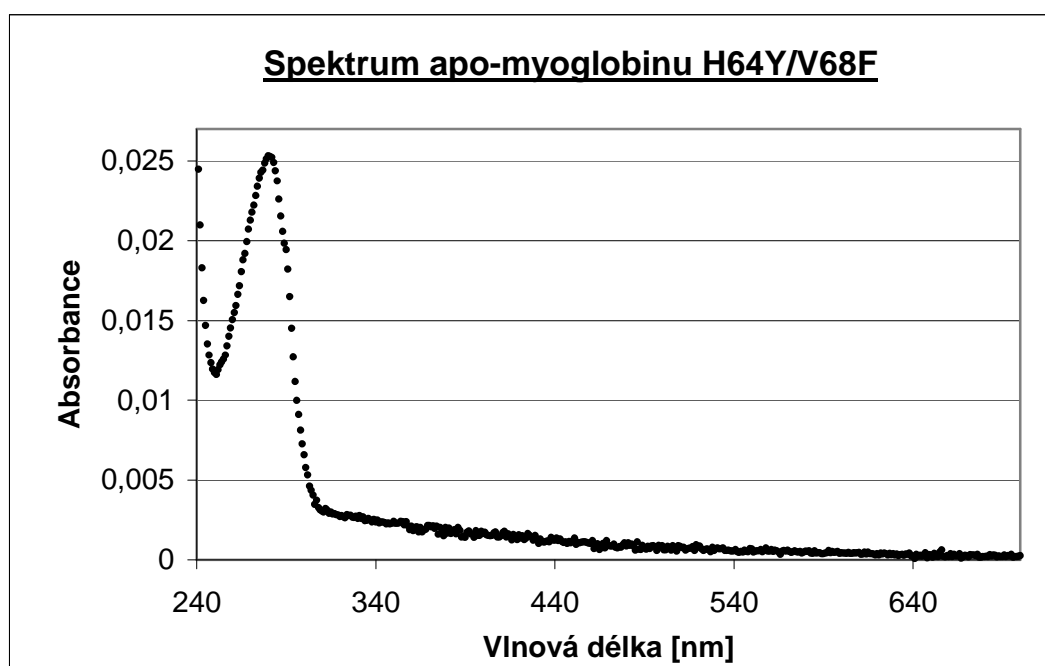
4.4.1 Absorpční spektra jednotlivých sloučenin

Absorpční spektra čistých studovaných proteinů a heminu jsou uvedena dále.

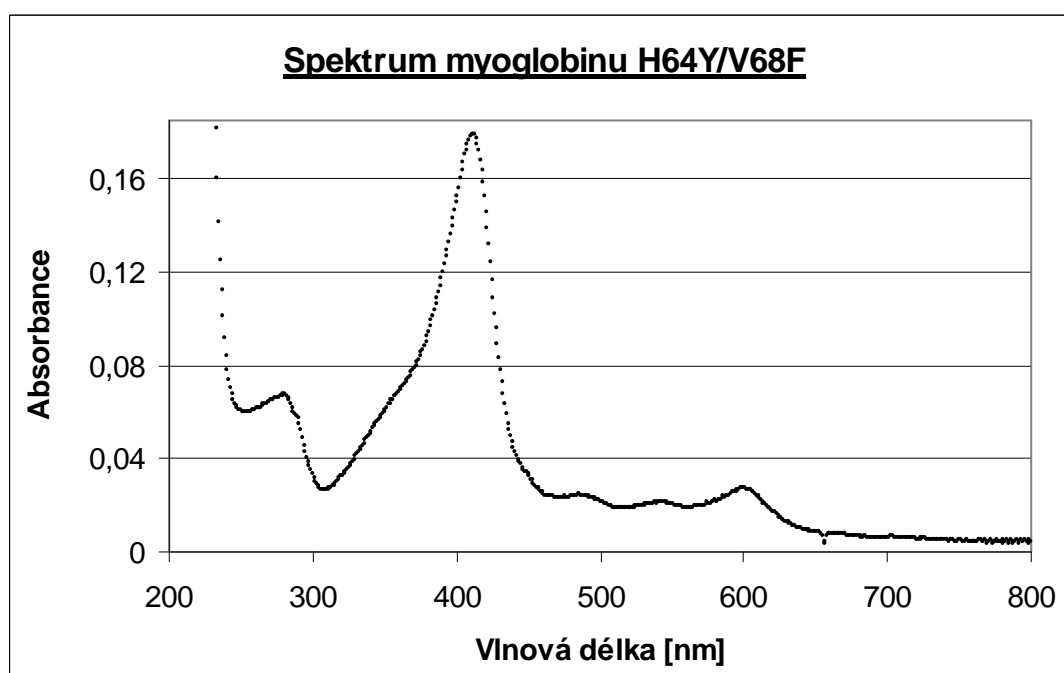
Absorpční spektrum 5 μM heminu je znázorněno na **obrázku 24** (maximum při 386 nm), spektrum 1 μM apo-myoglobinu H64Y/V68F na **obrázku 25**, spektrum 1 μM mutantního myoglobinu H64Y/V68F na **obrázku 26** (maximum při 412 nm) a spektrum 1 μM cytochromu b_5 izolovaného z jaterní mikrosomální frakce králíka je na **obrázku 27** (maximum při 413 nm).



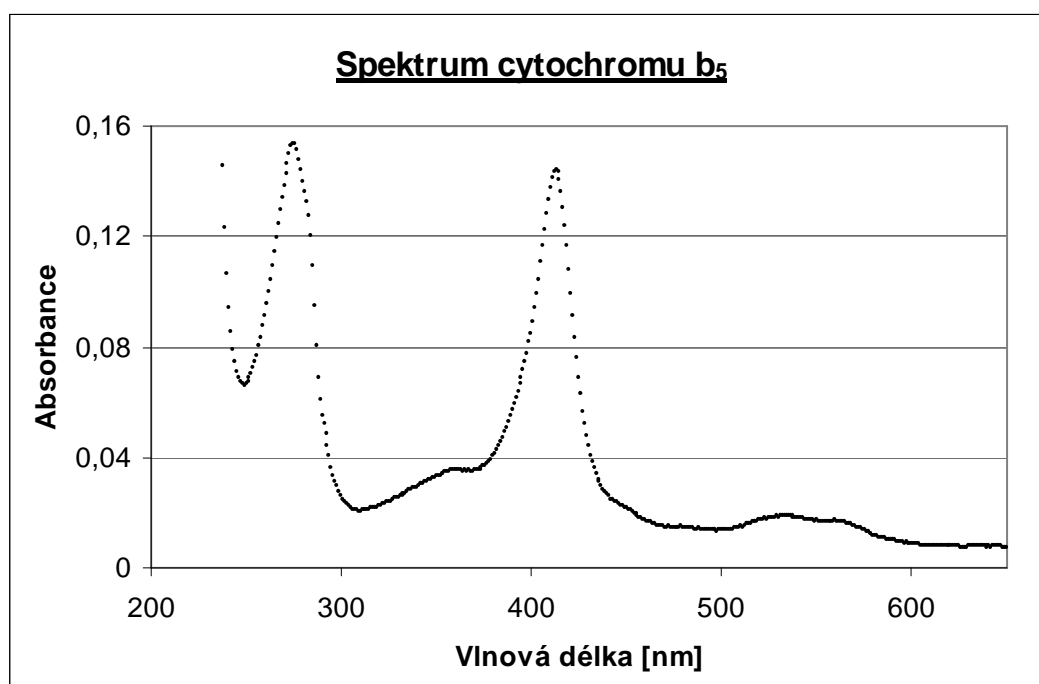
Obrázek 24 – Absorpční spektrum 5 μM heminu. Absorpční maximum leží při 386 nm.



Obr. 25 – Absorpční spektrum 1 μ M apo-myoglobinu H64Y/V68F. Absorpční maximum leží při 280 nm.



Obr. 26 – Absorpční spektrum 1 μ M myoglobinu H64Y/V68F. Absorpční maxima leží při 280 a 412 nm, u myoglobinu bez mutací leží v Soretově pásu absorpční maximum při 409 nm.



Obr. 27 – Absorpční spektrum 1 μM cytochromu b₅. Absorpční maxima leží při 280 a 413 nm.

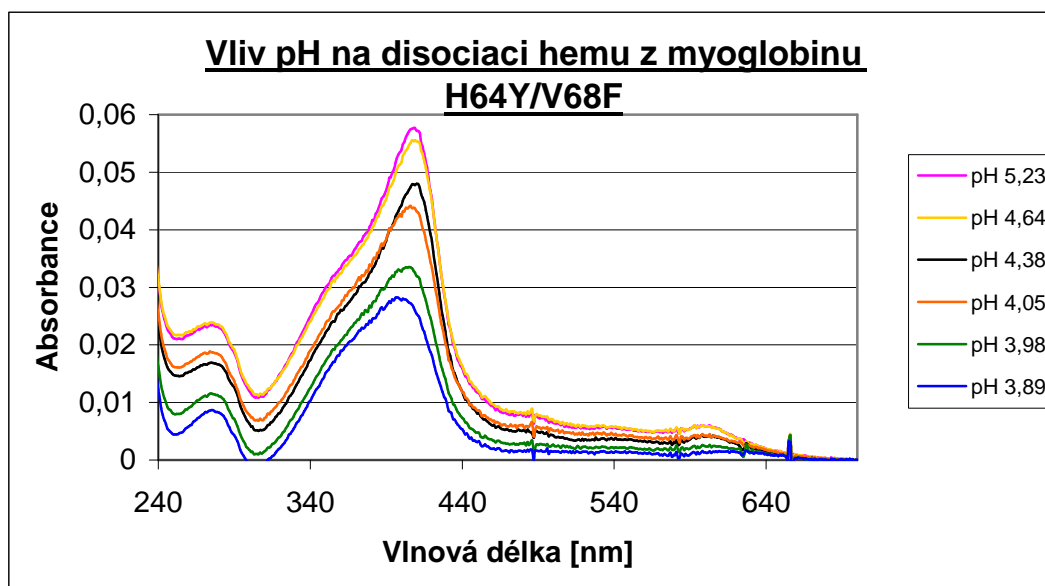
4.4.2 Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu, myoglobinu H64Y/V68F a cytochromu b₅

Postupem uvedeným v kapitole 3.3.6.2 byly sledovány spektrální změny v jednotlivých vzorcích proteinů při postupném okyselování. V určitém rozmezí pH docházelo k labilizaci vazby mezi hemem a vazebnou doménou hemoproteinu, hem postupně z proteinu disocioval, což se projevovalo jako posun absorpčního pásu hemu z vlnové délky cca 410 na 390 nm. U sledovaných proteinů byly měřeny spektrální změny a závislost polohy absorpčního maxima hemu na pH.

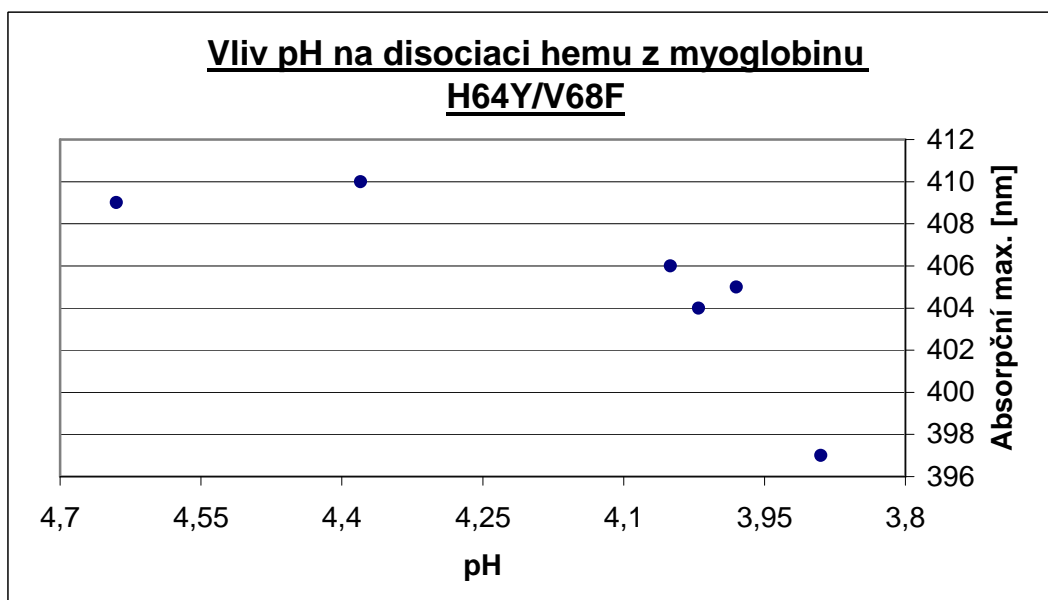
4.4.2.1 Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu H64Y/V68F

Z mutantního myoglobinu H64Y/V68F disociuje hem kolem pH 4,0, v intervalu mezi 4,1 a 3,9 (Obr. 28), což je také demonstrováno poměrně ostrým posunem maxima hemu z 410 na 397 nm při pH kolem 4 (Obr. 29). Současně dochází k celkovému poklesu absorbance hemu související s asi poloviční hodnotou extinkčního koeficientu volného oproti vázanému hemu (Obr. 30).

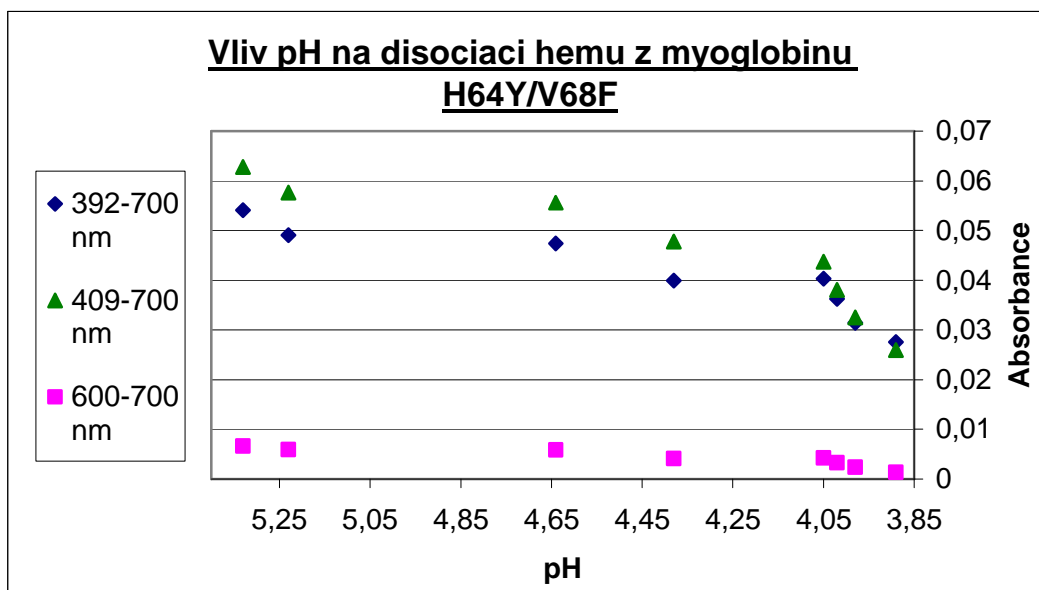
Patrný je také úplný zánik absorpčního pásu při 600 nm, který je typický pro hem koordinčně vázaný na tyrosin (Obr. 28 a 30).



Obr. 28 – Vliv pH na disociaci hemu z mutantního myoglobinu. Kolem pH 4,0 dochází k výrazné labilitě vazby hemu na protein. Graf byl korigován na vlnovou délku 700 nm.



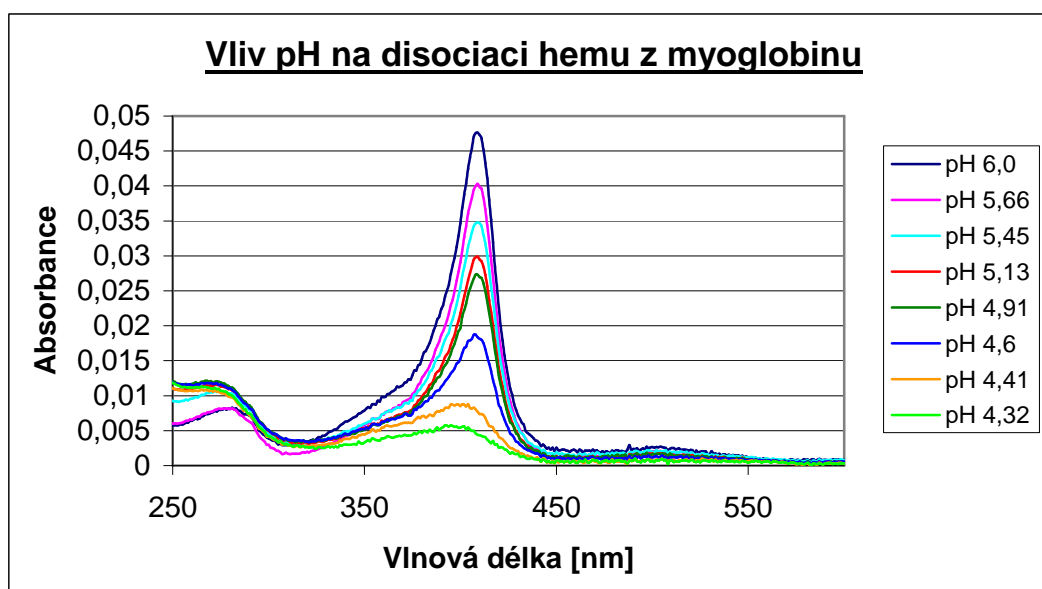
Obr. 29 – Vliv pH na disociaci hemu z mutantního myoglobinu. Při pH 3,9 se objevuje absorpční maximum signalizující uvolnění hemu.



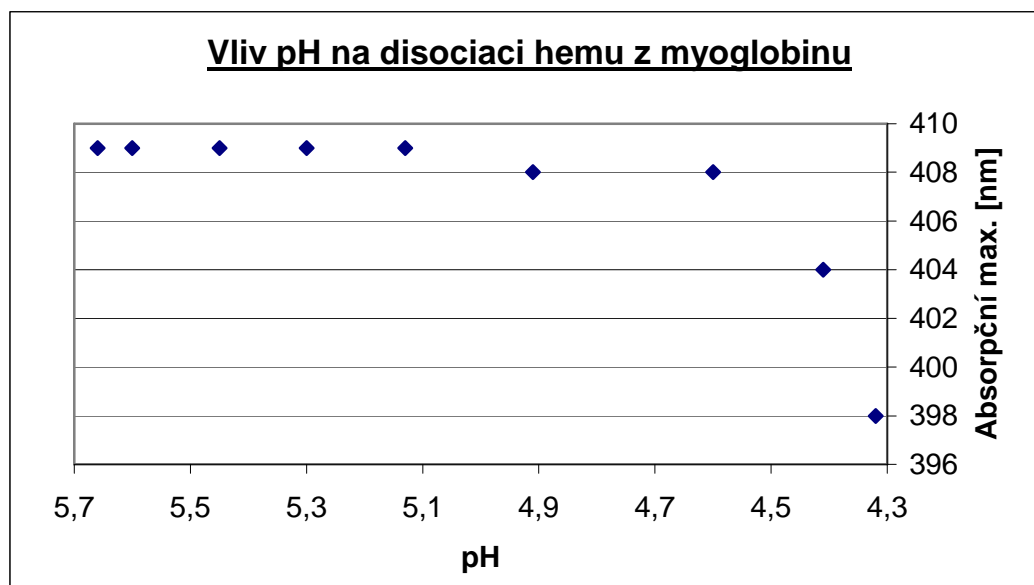
Obr. 30 – Vliv pH na disociaci hemu z mutantního myoglobinu. V rozmezí pH 4,1 a 3,9 je patrná změna absorpčního maxima signalizující uvolnění hemu.

4.4.2.2 Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu

Z myoglobinu disociuje hem kolem pH 4,5, v intervalu mezi 4,6 a 4,3 (**Obr. 31**), což se projevuje ostrým posunem maxima hemu z 409 na 398 nm při pH kolem 4,3 (**Obr. 32**).

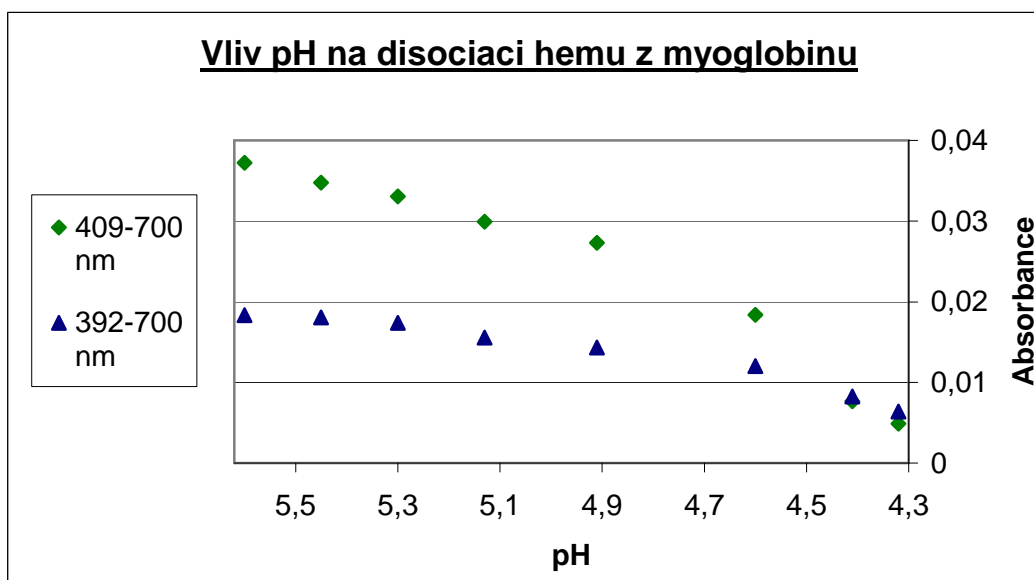


Obr. 31 – Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu. V rozmezí pH 4,6 – 4,4 je patrné znatelné oslabení vazby hemu. Graf byl korigován na vlnovou délku 700 nm.



Obr. 32 – Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu. Při pH 4,4 došlo ke snížení absorpčního maxima na 404 nm, při pH 4,3 je patrné absorpční maximum signalizující přítomnost volného hemu (398 nm).

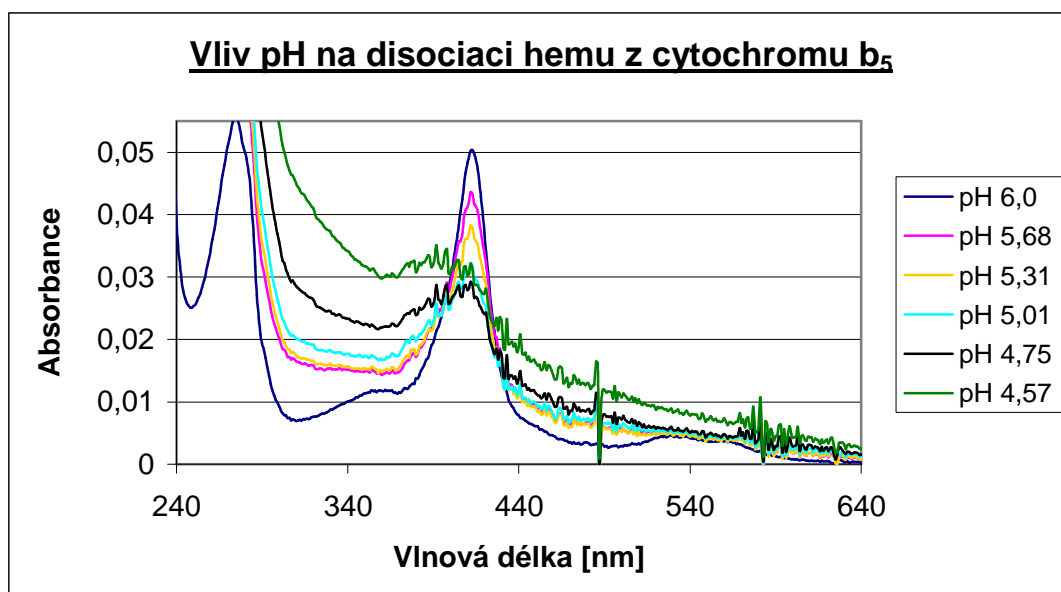
Podobně jako u výše popisované mutantní formy také u přirozeně se vyskytujícího myoglobinu dochází k celkovému poklesu absorbance hemu související s poloviční hodnotou extinkčního koeficientu volného oproti vázanému hemu (**Obr. 33**).



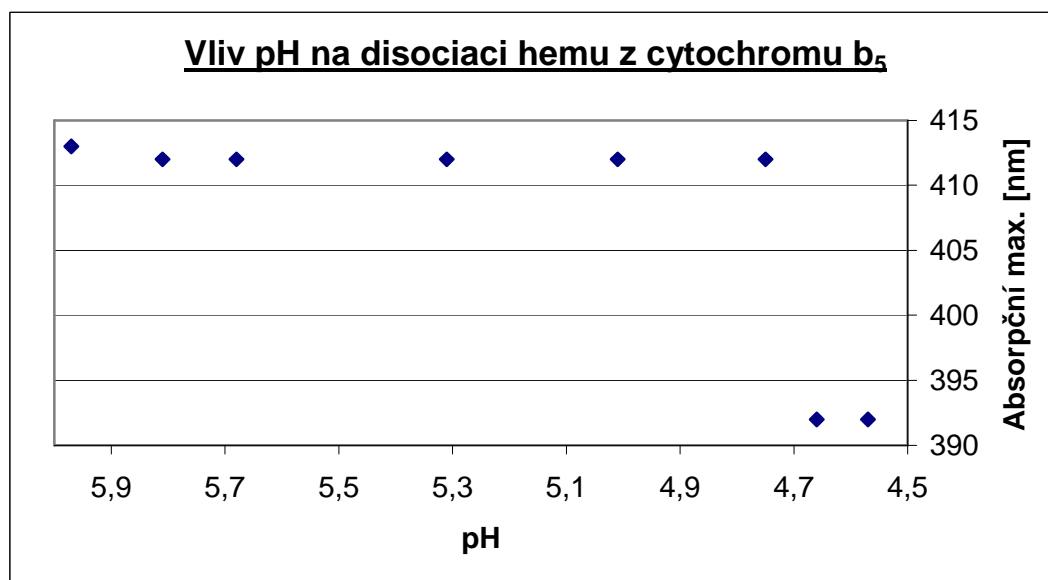
Obr. 33 – Vliv pH na disociaci hemu z myoglobinu. Při pH 4,4 jsou hodnoty absorbancí při 392 a 409 nm podobné a po dalším okyselení je již patrné absorpční maximum značící přítomnost volného hemu.

4.4.2.3 Vliv pH na disociaci hemu z cytochromu b_5

Z cytochromu b_5 disociuje hem již při pH kolem 4,7, v intervalu mezi 5,0 a 4,6 (Obr. 34), což je demonstrováno velmi ostrým posunem maxima hemu z 412 na 392 nm při pH 4,7 (Obr. 35).

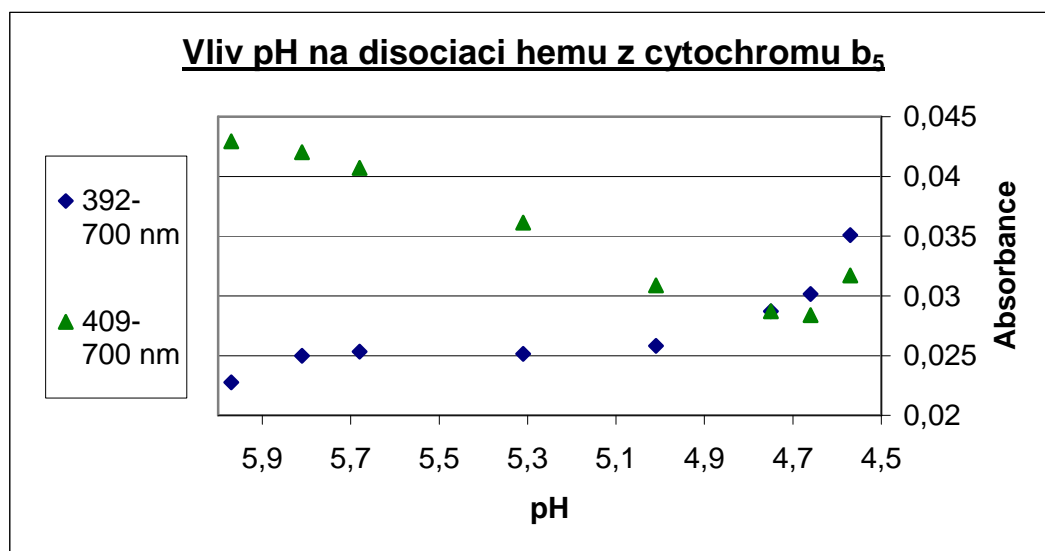


Obr. 34 – Vliv pH na disociaci hemu z cytochromu b_5 . Při pH 4,7 se v absorpčním spektru začíná objevovat spektrum volného heminu. Graf byl korigován na vlnovou délku 700 nm.



Obr. 35 – Vliv pH na disociaci hemu z cytochromu b_5 . V rozmezí pH 4,75 a 4,65 je patrná rychlá změna absorpčního maxima cytochromu b_5 (413 nm) na absorpční maximum 392 nm.

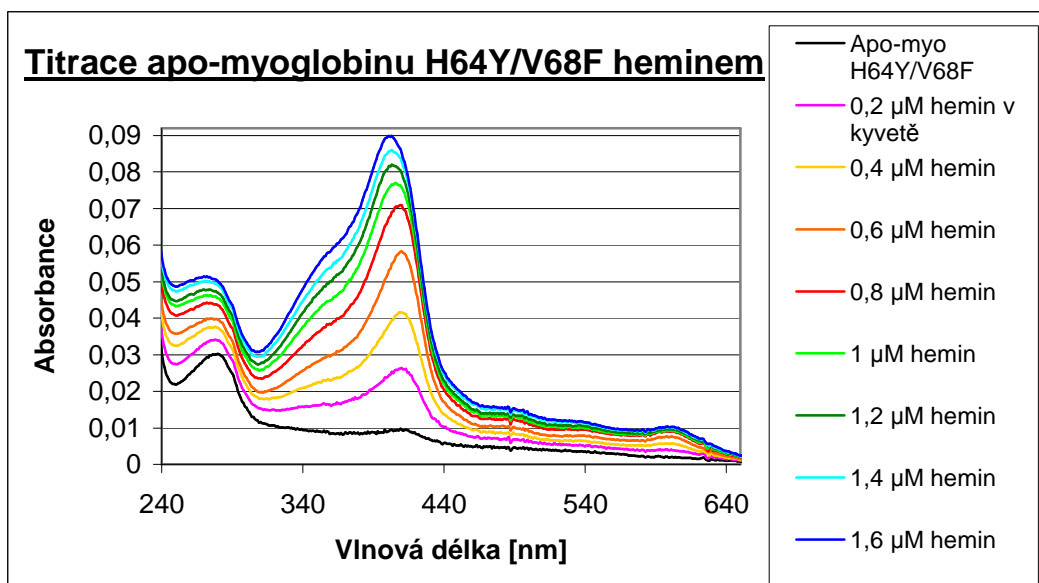
Podobně jako u myoglobinu současně s posunem absorpčního maxima dochází při okyselení k celkovému poklesu absorbance způsobenému disociací hemu z proteinu (**Obr. 36**). Predikovaný pI cytochromu b₅ leží kolem pH 5, to by mohlo vysvětlovat, proč při poklesu pH pod 4,7 navíc dochází k precipitaci a nárůstu rozptylu způsobeného zákallem (**Obr. 34, 36**).



Obr. 36 – Vliv pH na disociaci hemu z cytochromu b₅. Hodnota pH, při které dochází ke zřetelnému posunu absorpčních maxim, je 4,7.

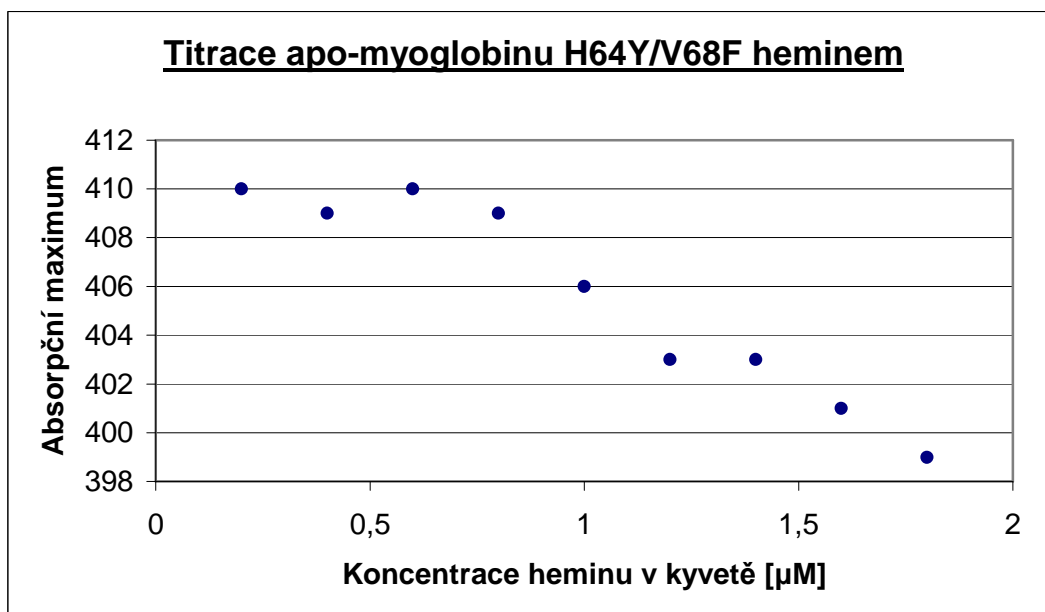
4.4.3 Titrace apo-myoglobinu H64Y/V68F heminem

K důkazu, že mutantní apo-myoglobin připravený postupem uvedeným v kapitole 3.3.5 je schopen vázat hemin, což je předpoklad pro vazbu (odstranění) hemu z jiných hemoproteinů, byl mutantní apo-myoglobin titrován 50 μ M heminem. Koncentrace proteinu a heminu v reakční směsi byla volena tak, aby po 5. přidavku 50 μ M heminu byl poměr koncentrací apo-myoglobinu H64Y/V68F a heminu 1:1 (kapitola 3.3.6.3), tedy v předpokládaném bodě ekvivalence. Byly sledovány změny absorpčního spektra (**Obr. 37**) a absorpčního maxima (**Obr. 38**). Po 1. přidavku heminu je patrné absorpční maximum při 410 nm, které s dalšími přidávkami kolísá mezi 409 a 410 nm (přítomnost mutantního myoglobinu). Mezi 4 a 5. přidávkou heminu pak došlo k prvnímu posunu maxima na 406 nm, které s dalšími přidávkami ještě klesalo. To signalizovalo přítomnost volného heminu. Bylo tedy prokázáno, že připravený preparát mutantního apo-myoglobinu obsahuje více než 80% apo-myoglobinu schopného vázat hemin.



Obr. 37 – Změny absorpčního spektra apo-myoglobinu H64Y/V68F při titraci heminem.

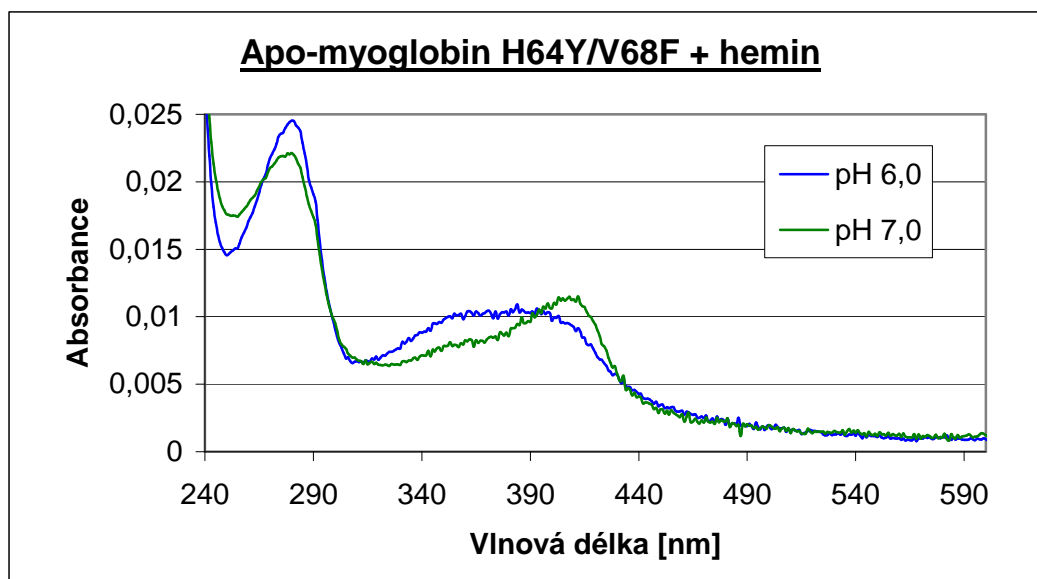
Roztok obsahoval 1 μM apo-myoglobin při pH 7,0. Graf byl korigován na vlnovou délku 700 nm.



Obr. 38 – Změny absorpčního maxima po jednotlivých přidacích heminu.

Významný vliv na vazbu heminu mutantním apo-myoglobinem má pH prostředí (Obr. 39). Zatímco po přidavku heminu při pH 6,0 lze ve spektru ihned detekovat volný hemin, po úpravě na pH 7,0 se spektrum posouvá ve prospěch myoglobinu.

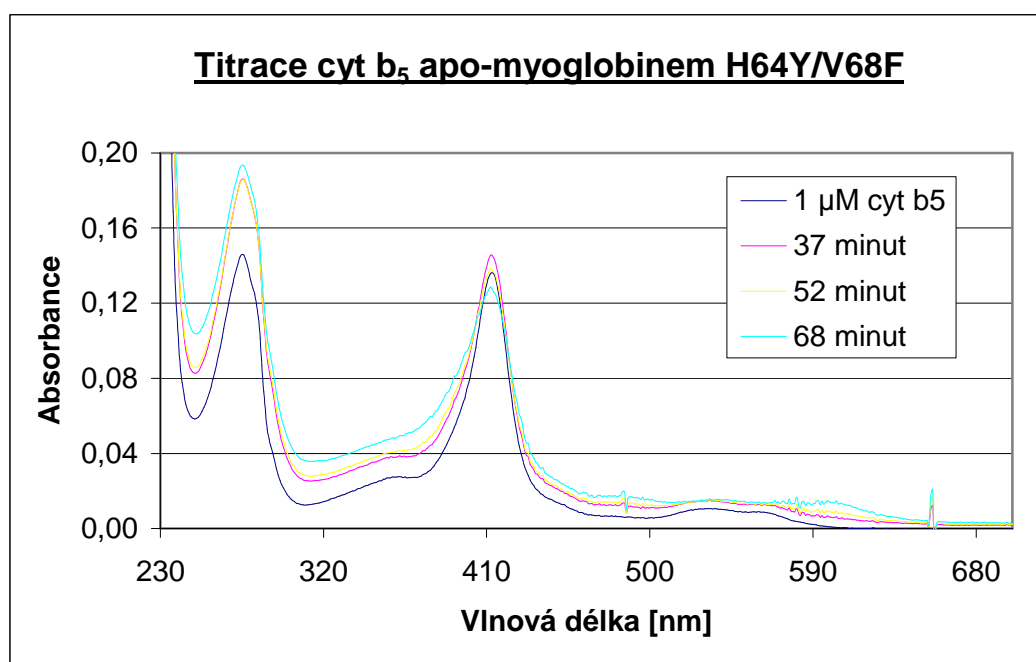
Toto chování by mohlo být způsobeno např. protonací distálního histidinu (pK postranního řetězce His na povrchu proteinu ~ 6.6) [48].



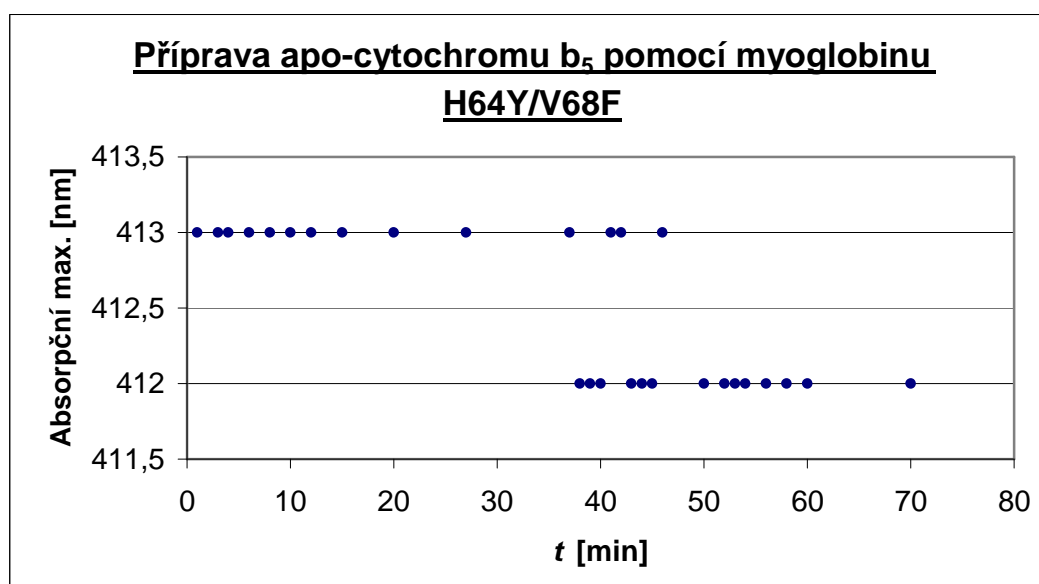
Obr. 39 – Vliv pH na vazbu hemu k mutantnímu apo-myoglobinu. Při pH 6,0 mutantní apo-myoglobin hemin nepřijímá, po úpravě reakční směsi na pH 7,0 dochází ke zřetelnému posunu absorpčního maxima ve prospěch myoglobinu.

4.4.4 Příprava apo-formy cytochromu b_5 pomocí apo-myoglobinu (H64Y/V68F)

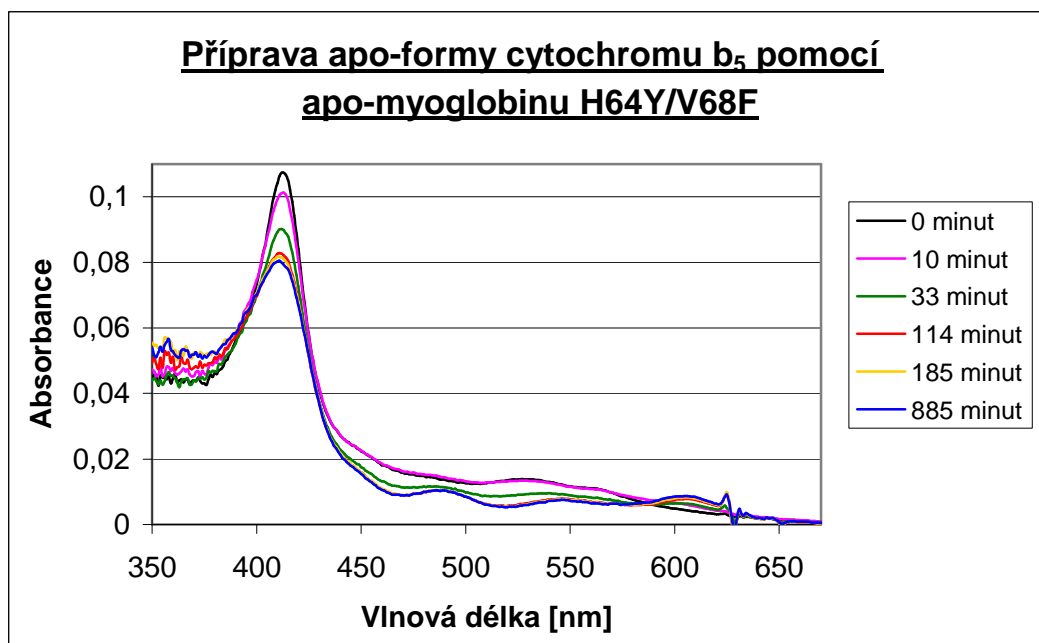
Při inkubaci cytochromu b_5 s apo-myoglobinem H64Y/V68F (kapitola 3.3.6.4) za laboratorní teploty nedocházelo ke znatelnému přechodu hemu do mutantního apo-myoglobinu (**Obr. 40, 41**). To bylo patrně způsobeno velmi nízkou rychlostí disociace hemu z cytochromu b_5 při teplotě 25 °C (k_H $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, viz **Tab. 2, strana 14**). Pro urychlení uvolňování hemu z vazby na cytochrom b_5 proto byla reakční směs inkubována za zvýšené teploty (41 °C), za těchto podmínek došlo k úplnému přechodu hemu z cytochromu b_5 na mutantní apo-myoglobin po 3 hodinách. Přejít hemu z cytochromu b_5 na apo-myoglobin H64Y/V68F je patrný jako posun absorpčního pásu hemu z 413 na 410 nm (**Obr. 42, 43**) a jako nárůst absorpčního pásu při 600 nm (**Obr. 43**).



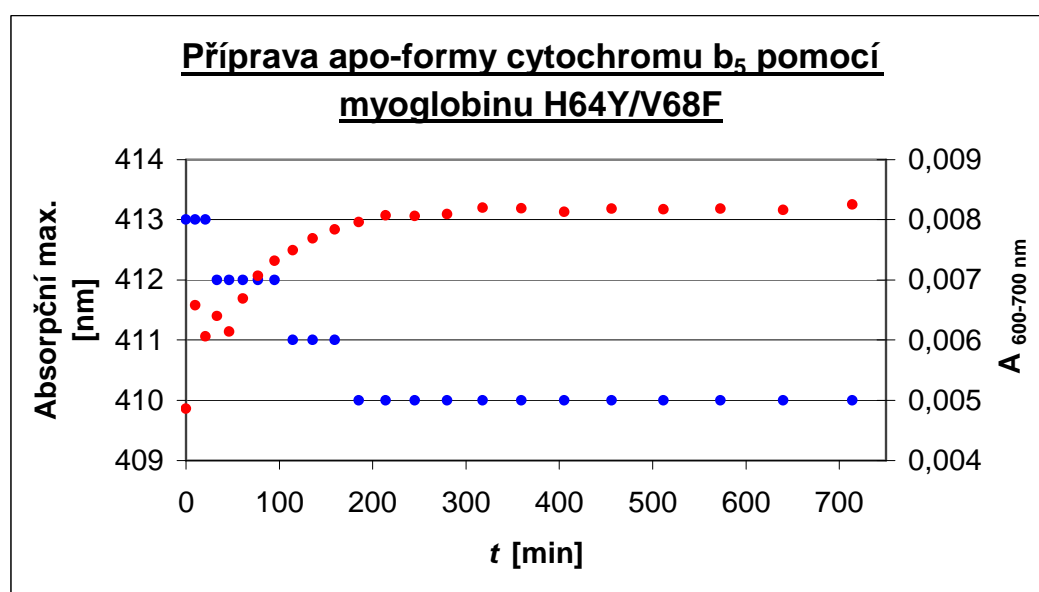
Obr. 40 – Změny absorpčního spektra při inkubaci cytochromu b₅ s mutantním apo-myoglobinem v poměru 1:1,5 při laboratorní teplotě. Roztok obsahoval 1 μM cytochrom b₅ a 1,5 μM apo-myoglobin H64Y/V68F při pH 7,0. Po 37. minutě byla směs okyselena 1 M HCl (orientační pH 6,6), 2. okyselení (orientační pH 3,6) bylo provedeno v 52. minutě. Graf byl korigován na vlnovou délku 800 nm.



Obr. 41 – Inkubace cytochromu b₅ s mutantním apo-myoglobinem v poměru 1:1,5 při laboratorní teplotě. Po 37. minutě byla směs okyselena 1 M HCl (orientační pH 6,6), 2. okyselení (orientační pH 3,6) bylo provedeno v 52. minutě. Přejchod hemu z cytochromu b₅ (413 nm) na mutantní apo-myoglobin není v tomto časovém rozsahu viditelný.



Obr. 42 – Změny absorpčního spektra při inkubaci cytochromu b₅ s mutantním apo-myoglobinem v poměru 1:8 při 41 °C. Roztok obsahoval 1 μM cytochrom b₅ a 8 μM apo-myoglobin při pH 7,0. Graf byl korigován na vlnovou délku 700 nm.



Obr. 43 – Inkubace cytochromu b₅ s mutantním apo-myoglobinem v poměru 1:8 při 41 °C a pH 7,0. Během prvních 200 minut je patrný posun absorpčního maxima z 413 na 410 nm (osa y vlevo, modré body). Zároveň dochází k nárůstu absorbance při 600 nm (osa y vpravo, červené body).

4.5 GEL PRO PŘÍPRAVU APO-FOREM HEMOPROTEINŮ AFINITNÍ CHROMATOGRAFIÍ

4.5.1 Příprava gelů určených k přípravě apo-hemoproteinů

Postupem uvedeným v kapitole 3.3.7.1 bylo připraveno 7 různých gelů pro přípravu apo-forem hemoproteinů. Vzájemně se lišily především typem imobilizovaného proteinu (myoglobinu), který byl navázán na nosič (CNBr Sepharosa 4B společnosti Pharmacia). Zároveň byl připraven i gel kontrolní, jehož vazebná místa byla blokována glycinem. Ze všech gelů (s výjimkou gelu č. 6 a kontroly) byl následně odstraněn hem pomocí kyselé extrakce butanonem (kapitola 3.3.5). Přehled připravených gelů, jejich množství a předpokládaná kapacita je uvedena v **tabulce 5**.

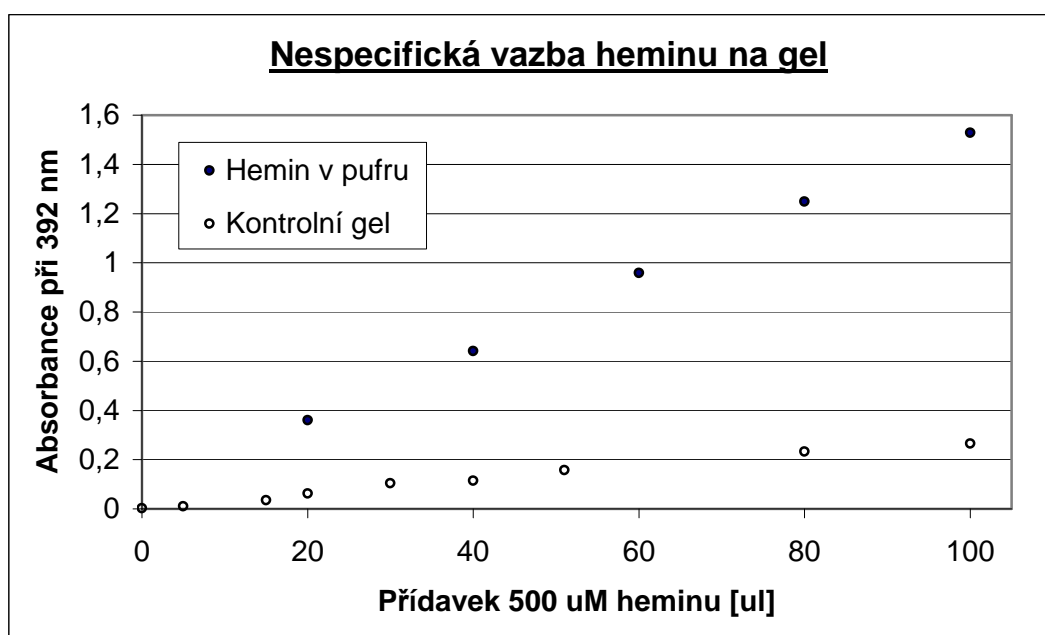
Tab. 5 – Přehled gelů určených k přípravě apo-hemoproteinů.

Gel	Imobilizovaná molekula	Množství [ml]	Orientační kapacita gelu.10 ⁷ [mol _{hemu} /ml]	Orientační max. množství cyt b ₅ [mg _{b5} /ml]
1	myoglobin (koňské srdce) ^a	1,0	2,8	4,4
2	myoglobin (koňské srdce)	0,8	1,5	2,4
3	myoglobin H64Y/V68F 2. eluční frakce	1,0	2,1	3,3
4	myoglobin H64Y/V68F 1. eluční frakce	2,4	2,0	3,2
5	myoglobin H64Y/V68F 2. eluční frakce	2,0	1,5	2,4
6	apo-myoglobin H64Y/V68F	2,0	1,5	2,4
7	apo-myoglobin H64Y/V68F natitrovaný heminem	2,0	1,5	2,4
kontrolní	glycin	0,5	-	-

^a CNBr Sepharosa 4B společnosti Sigma

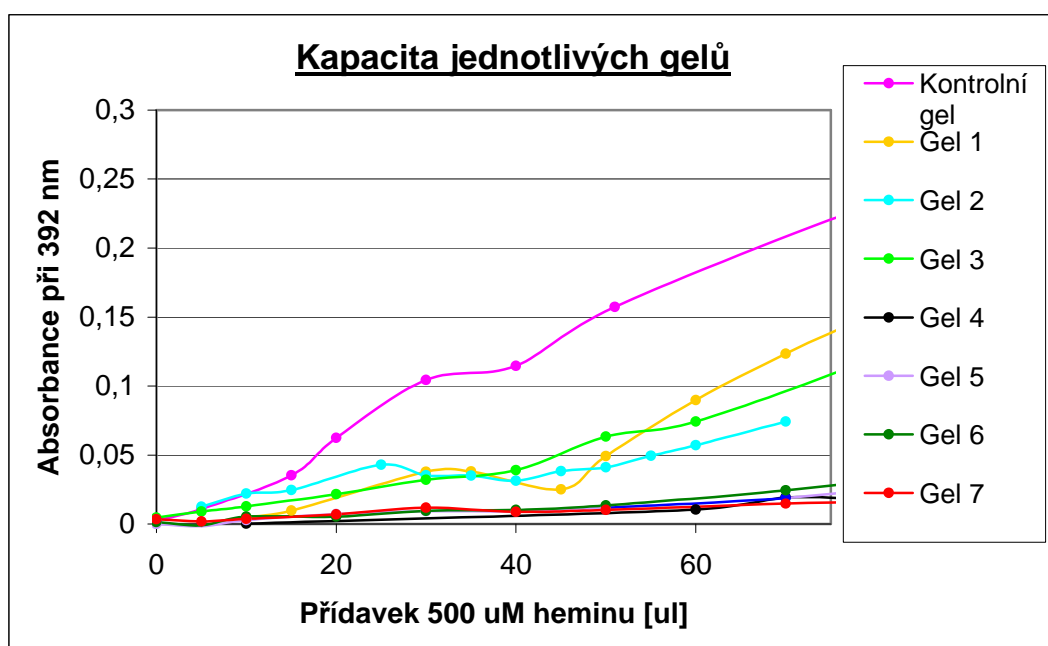
4.5.2 Kapacita gelů určených k přípravě apo-hemoproteinů

Určení maximální kapacity gelu (kapitola 3.3.7.2) s potřebnou přesností a reprodukovatelností bylo obtížným krokem. Počet molů hemu navázaného na apo-protein teoreticky odpovídá molům hemoproteinu (cytochromu b_5), který se na apo-protein také váže. Ovšem z důvodu poměrně vysoké nespecifické vazby heminu na gel samotný (**Obr. 44**) bylo obtížné s přesností určit bod zlomu, kdy došlo k nasycení všech vazebných míst nosiče.



Obr. 44 – Porovnání přídavků roztoku heminu do pufru a kontrolního gelu. Ačkoliv není v kontrolním gelu navázan apo-protein, který by specificky vychytával hemin, absorbance po jednotlivých přídavcích heminu ke kontrolnímu gelu neodpovídá absorbanci roztoku heminu v příslušném pufru. Graf byl korigován na 700 nm.

Závislost absorbance jednotlivých gelů na přídavku heminu je znázorněna na **obrázku 45**, která spolu s naměřenými absorpčními spektry sloužila jako základ pro určení kapacity gelů. Bod, od kterého docházelo k většímu nárůstu absorbance, byl považován za maximální kapacitu: gel 1 (40 μ l), gel 2 (30 μ l), gel 3 (30 μ l), gel 4 (40 μ l), gel 5 (30 μ l), gel 6 (30 μ l), gel 7 (30 μ l).



Obr. 45 – Porovnání kapacit jednotlivých gelů. Pozn.: gelu 1 a 3 bylo na stanovení kapacity odebráno pouze 70 μ l (ostatní 100 μ l). Body byly korigovány na vlnovou délku 700 nm.

4.5.3 Využití vybraných gelů k přípravě apo-cytochromu b_5

Apo-myoglobin H64Y/V68F lze, jak dokazují výsledky (kapitola 4.3.4), úspěšně použít k přípravě apo-cytochromu b_5 pomocí 3 hodinové inkubace při 41 °C. Oba proteiny však při této metodě musí být smíchány a inkubovány v roztoku, takže pro přípravu čisté apo- b_5 je nutná její následná separace ze směsi. Proto byl pro přípravu čisté apo-formy hemoproteinu použit gel, na kterém byl imobilizovaný vybraný apo-myoglobin. Ten specificky váže hem z molekuly cytochromu b_5 , v ideálním případě pak v roztoku zůstávají pouze molekuly apo-cytochromu b_5 .

Inkubace 73 μ M cytochromu b_5 nebo 95% apo-formy cytochromu b_5 s vybranými gely (gel 2, 6, 7) 3 hodiny při 40 °C ukázala, že rychlost přestupu hemu z cytochromu b_5 na imobilizovaný apo-myoglobin je nižší než v případě volného apo-myoglobinu. Kromě toho dochází i ke ztrátám cytochromu b_5 (výrazný pokles absorbance při 280 nm), které mohou být způsobeny elektrostatickou interakcí imobilizovaného apo-myoglobinu (bazický protein) a cytochromu b_5 (kyselý protein). Při přípravě apo-cytochromu b_5 z holoproteinu by absorbance při 280 nm měla poklesnout o cca 45 % [49]. To znamená, že v této směsi pokles absorbance při 413 nm o 100 % způsobí pokles absorbance při 280 nm o 45 %.

Na základě této úvahy byl pro odhad ztráty proteinu sorpcí na nosič navržen následující vzorec:

$$\text{sorpce proteinu [\%]} = \frac{\Delta A_{280}}{(0,45 \cdot \Delta A_{413} - 1)} \cdot 100$$

Celkový úbytek hemu korigovaný na ztráty sorpcí pak lze vyjádřit takto:

$$\text{úbytek hemu [\%]} = 100 \cdot \Delta A_{413} - \text{sorpce proteinu [\%]}$$

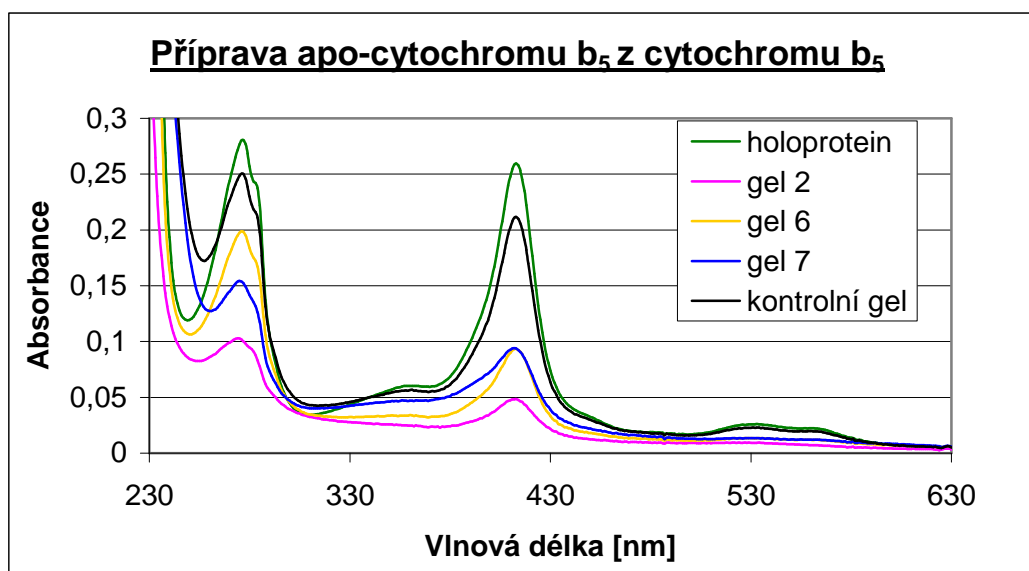
Vypočtené hodnoty shrnuje **tabulka 6**.

Tab. 6 – Ztráta proteinu sorpcí a úbytek hemu z 95% apo-cytochromu b₅ nebo cyt b₅.

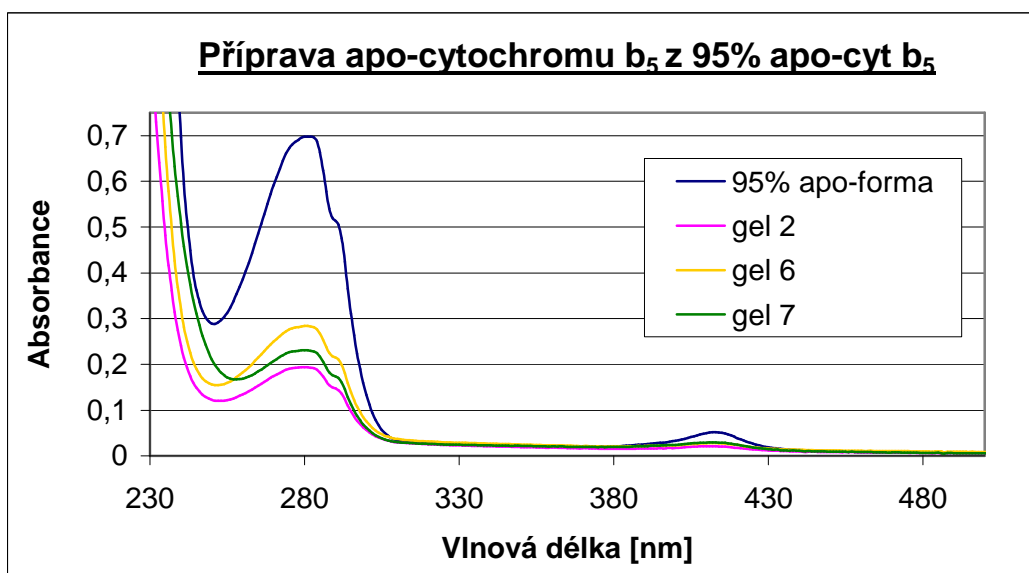
Gel + odhemovávaný protein	ztráta cyt b ₅ sorpcí [%]	úbytek hemu [%]
2 + 95% apo-b ₅	57	3,9
2 + b ₅	46	36,0
6 + 95% apo-b ₅	48	3,3
6 + b ₅	22	43,0
7 + 95% apo-b ₅	56	~0
7 + b ₅	35	23,0
kontrolní gel + b ₅	9	8,8

Absorpční spektra směsí na začátku a konci inkubace jsou znázorněna na **obrázcích 46, 47**. Všechny testované gely vykazovaly poměrně vysokou nežádoucí sorpci cytochromu b₅. Při přípravě apo-formy z izolovaného králíčího cyt b₅ bylo ztraceno 22–46 % proteinu. Při dočištění 95% apo-formy rekombinantního králíčího cyt b₅ byly ztráty pravděpodobně v důsledku cca 10x vyšší koncentrace proteinu ještě vyšší (48–57 %). Výjimkou byl kontrolní gel se ztrátami pouze 9 %. Je tedy zřejmé, že sorpce cytochromu b₅ na nosič je způsobena právě přítomností imobilizovaného myoglobinu.

Odstranění hemu z 95% apo-cytochromu b_5 s použitím testovaných gelů bylo zcela neefektivní, pravděpodobně v důsledku vysoké sorpce, zatímco příprava apo-cytochromu b_5 z izolovaného králíčeho cytochromu b_5 bylo úspěšnější (23 – 43%). Nejlepší vlastnosti jevil gel 6, který při odstranění 43 % hemu z cytochromu b_5 vykazoval pouze 22% ztráty cyt b_5 sorpcí na imobilizovaný apo-myoglobin.



Obr. 46 – Příprava apo-cytochromu b_5 z králíčeho cyt b_5 . Graf byl korigován na 700 nm.



Obr. 47 – Příprava apo-cytochromu b_5 z 95% apo-formy cytochromu b_5 . Největší ztráta proteinu je u gelu 2 (72 %). Graf byl korigován na vlnovou délku 700 nm.

5 DISKUZE

Cytochrom b_5 je v současnosti poměrně intenzivně studovaným membránovým proteinem, jeho isoforma nacházející se na cytosolární straně membrány endoplasmatického retikula je spolu s cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou součástí systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systému). MFO systém je významným enzymovým aparátem metabolizujícím cizorodé látky hydrofobní povahy v našem organismu. Ačkoliv se cytochrom b_5 zásadním způsobem podílí na metabolické efektivitě tohoto systému, není mechanismus jeho působení v MFO dosud uspokojivě vysvětlen. V poslední době převažují teorie, že cytochrom b_5 urychluje přenos druhého elektronu na cytochrom P450 [50] nebo působí jako alosterický modulátor cytochromu P450 (bez přenosu elektronů) [25]. Tyto práce byly podpořeny experimenty využívajícími apo-formu cytochromu b_5 neschopnou přenosu elektronů, popř. i cytochrom b_5 s hemem nahrazeným Mn-protoporfyrinem IX [32]. Chování cytochromu b_5 se liší pro různé isoformy cytochromů P450 a může být závislé i na konkrétním oxidovaném substrátu. V laboratoři, kde byla tato práce vypracována, je studován metabolismus řady xenobiotik pomocí různých isoform cytochromů P450, je tedy důležité zhodnotit chování každého studovaného systému vůči cytochromu b_5 samostatně. Právě z důvodu potřeby většího množství čisté a zároveň nativní apo-formy cytochromu b_5 pro tyto experimenty vzešlo téma předkládané práce. Zpracování zadaného tématu bylo zaměřeno především na přípravu rekombinantního vorvaního myoglobinu H64Y/V68F a na ověření možností jeho využití k přípravě čisté nativní apo-formy cytochromu b_5 .

Mutantní myoglobin H64Y/V68F byl úspěšně připraven metodou rekombinantní exprese v buňkách *E. coli* BL21 (DE3), jako nejefektivnější se ukázalo zaočkování média pomocí „multi-cell“ kolonie a využití kyseliny δ -aminolevulové jako prekurzoru hemu. Exprimovaný protein byl následně izolován a purifikován iontoměničovou chromatografií na koloně CM-Sepharosy CL-6B. Elucí lineárním gradientem byly získány dvě hlavní frakce mutantního myoglobinu. Majoritní myoglobinová frakce představovala více než 80 % získaného čistého myoglobinu H64Y/V68F, kromě ní byla po separaci na iontoměniči získána minoritní frakce obsahující protein s podstatně nižším pI, jinak ovšem zcela odpovídající myoglobinu H64Y/V68F. S největší pravděpodobností se jedná o protein vznikající spontánní deaminací postranních řetězců asparaginu či glutaminu

u části molekul myoglobinu [16]. Při deaminaci dojde k demaskování karboxylové skupiny způsobující snížení celkové bazicity myoglobinu. Takto dochází k poklesu pI o cca 0,5, což se projeví snížením afinity k použitému kyselému iontoměničiči. Nepatrná přítomnost další, ještě kyslejší formy mutantního myoglobinu (**Obr. 16 a 18**) naznačuje, že v molekule myoglobinu je pravděpodobně ještě další poměrně labilní amidická skupina schopná spontánní hydrolyzy. Celkem bylo získáno 17,5 mg v minoritní a 102 mg myoglobinu H64Y/V68F v majoritní frakci. Byla zjištěna prakticky lineární závislost celkového výtěžku proteinu na objemu kultivačního média, z 1 l TB média lze připravit v průměru 15 mg majoritní frakce mutantního myoglobinu H64Y/V68F.

Z připraveného myoglobinu H64Y/V68F byl následně odstraněn hem pomocí kyselé extrakce butanonem. V tomto kroku docházelo k nezanedbatelným ztrátám proteinu ireverzibilní precipitací, pravděpodobně v důsledku poměrně drastického snížení pH použitého při extrakci (pH 2,5). Modifikací původní metody vyvinuté pro odhemování jiného hemoproteinu [46] se podařilo zvýšit výtěžek solubilního myoglobinu z 20 % na 60 %. Úpravy metody spočívaly především ve zkrácení doby dialýzy, změně dialyzačního pufru a v úpravě pH mimo předpokládaný isoelektrický bod myoglobinu. Z výsledků získaných v následných experimentech bylo zjištěno, že pH disociace hemu z mutantního myoglobinu je již v oblasti 4,0, lze tak navrhnout zvýšení pH při extrakci na 3,0-3,5. U cytochromu b₅ není vhodné použít postup využívající kyselého pH, protože by mohlo dojít k denaturaci proteinu. Jedním z cílů práce proto bylo vyvinout takový postup, který zachová nativní stav apo-formy cytochromu b₅.

Již některé dřívější studie se zabývaly využitím apo-myoglobinu k disociaci hemu z jiných hemoproteinů, v roce 1962 Banerjee dokázal, že apo-myoglobin je schopen extrahovat hem z hemoglobinu [51, 52], v roce 1991 Smith a kol. používali apo-myoglobin k disociaci hemu z různých peroxidas [30]. V roce 1994 pomocí mutantního apo-myoglobinu H64Y/V68F Hargrove a kol. měřili rychlost disociace hemu z nativního myoglobinu a hemoglobinu [13]. V této diplomové práci byl použit apo-myoglobin H64Y/V68F k přípravě apo-cytochromu b₅. Specifickou vlastností myoglobinu H64Y/V68F je jeho charakteristický absorpční pás při 600 nm, díky němuž je možné proces disociace a asociace hemu s tímto proteinem dobře monitorovat i v přítomnosti ostatních hemoproteinů. Reakční směs cytochromu b₅ s nadbytkem připraveného apo-myoglobinu H64Y/V68F dospěla do rovnováhy po 200 minutách inkubace při 41 °C, jak naznačuje zastavení růstu absorbance ve specifickém pásu holoformy myoglobinu

H64Y/V68F. Zároveň bylo ve stejnou dobu zaznamenáno ukončení pohybu hlavního absorpčního pásu hemu z 413 nm (typického pro cytochrom b_5) na konečných 410 nm (odpovídajících přítomnosti hemu vázanému pouze v myoglobinu H64Y/V68F) (**Obr. 43**). Lze tedy konstatovat, že se úspěšně podařilo odstranit hem z cytochromu b_5 pomocí připraveného apo-myoglobinu H64Y/V68F. Nevýhodou výše popisovaného experimentu je fakt, že pro další využití apo-cytochromu b_5 je nutné protein v dalším kroku přechistit a odstranit tak veškerý přítomný mutantní myoglobin.

Jiný přístup k přípravě apo-cytochromu b_5 byl imobilizovat mutantní apo-myoglobin H64Y/V68F na vhodný nosič, kde by specificky vychytával hem a bylo by tak možné v jednom kroku získat čistou apo-formu žádaného hemoproteinu. Bylo připraveno několik různých gelů, které se vzájemně lišily typem imobilizovaného proteinu, ve všech případech byla jako nosič použita CNBr Sepharosa 4B. Všechny gely vykazovaly afinitu k heminu zhruba odpovídající očekávanému množství imobilizovaného proteinu. Jako problematická se však ukázala nežádoucí nespecifická sorpce značně kyselého cytochromu b_5 ($pI \sim 5,2$) na imobilizovaný bazický myoglobin H64Y/V68F ($pI \sim 8,7$). Nosič s imobilizovaným mutantním myoglobinem se tak částečně choval spíše jako iontoměnič. Také důsledky těsné protein-protein interakce a tím spojené blokace přístupu k vazebné kapse pro hem přispěly k podstatnému zpomalení přechodu hemu.

Mutantní apo-myoglobin imobilizovaný na CNBr Sepharose 4B lze pravděpodobně pro přípravu apo-cytochromu b_5 použít, neposkytuje však ideální podmínky pro snadnou a rychlou přípravu čistého apo-hemoproteinu. Jako nejvhodnější pro šetrnou přípravu apo-cytochromu b_5 se ukázal gel 6 (s imobilizovaným apo-myoglobinem H64Y/V68F), ani ten však na rozdíl od volného apo-myoglobinu H64Y/V68F při inkubaci po dobu 3 hodin za teploty 40 °C nedokázal cytochrom b_5 úplně odhemovat. Došlo k odstranění jen 43 % hemu při 22% ztrátě proteinu sorpcí. Z časových důvodů pak již nemohly být provedeny experimenty snažící se eliminovat sorpci cytochromu b_5 na imobilizovaný mutantní apo-myoglobin.

6 SHRNU TÍ A ZÁVĚR

Výsledky uvedené v diplomové práci odpovídají vytyčeným cílům. Lze je shrnout následovně:

1. Plazmid pUC19/SwMb_H64Y/V68F nesoucí gen pro expresi mutantního vorvaního myoglobinu H64Y/V68F byl v dostatečném množství a čistotě amplifikován a funkčně ověřen.
2. Byl připraven mutantní myoglobin H64Y/V68F metodou rekombinantní exprese v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) a to v průměrném výtěžku 15 mg/l kultivačního média. Celkem bylo připraveno přes 100 mg čistého rekombinantního proteinu.
3. Odstraněním hemu z části připraveného mutantního myoglobinu bylo připraveno celkem 24 mg apo-formy myoglobinu H64Y/V68F.
4. Funkčnost a identita připraveného mutantního apo-myoglobinu H64Y/V68F byla potvrzena odpovídající afinitou k hemu a charakteristickými spektrálními vlastnostmi.
5. Byly nalezeny podmínky vhodné pro přípravu apo-formy cytochromu b₅ s využitím apo-myoglobinu H64Y/V68F v roztoku (3 hodiny při 41 °C a pH 7). Díky specifickým spektrálním vlastnostem myoglobinu H64Y/V68F je možné tento proces dobře monitorovat.
6. Imobilizací apo-myoglobinu H64Y/V68F na CNBr Sepharose se podařilo připravit gel, kterým je možno specificky odstranit hem z holofomy cytochromu b₅ bez nutnosti další separace. Před použitím k přípravě většího množství apo-formy cytochromu b₅ bude metoda vyžadovat ještě další optimalizaci.

Předkládaná diplomová práce přináší výsledky, které rozšiřují poznání v oblasti přípravy a vlastností apo- a holoforem hemoproteinů, dlouhodobě studovaných na katedře biochemie, PřF, UK a zároveň přispívá k řešení výzkumného záměru MSM0021620808 (*Molekulárně biologické, genetické a epigenetické aspekty vzniku a rozvoje modelových tumorů dospělého věku. Význam pro epidemiologii, časnou diagnostiku a léčbu.*) a grantů Grantové agentury České republiky 303/09/0472 a 203/09/0812.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kačaras, D.: Dostupné z URL: <<http://kacaras.blog.cz/0610/clovek-se-sklada-ze-100-bilionu-bunek-a-vsechny-pracuji-stejne-jako-jeden-celek>> [cit. 2.5.2009]
- [2] Gut, I.; Souček, P.; Hodek, P.; Cikrt, M.; Entlicher, G.: Monooxygenázy závislé na cytochromu P 450. Jediné aktivační a detoxikační systémy. *Pracovní lékařství* **1**, 15-20 (1992).
- [3] Vokurka M.; Hugo J. a kol.: *Velký lékařský slovník*. Maxdorf 2007.
- [4] Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. Praha, Victoria Publishing 1995.
- [5] Kodíček, M.: *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha, VŠCHT 2007.
- [6] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_b.png> [cit. 9.4.2009]
- [7] Duchoň, J. a kol.: *Lékařská chemie a biochemie*. Praha, Avicenum 1985.
- [8] Kolektiv autorů: *Biochemie – základní kurz*. Praha, Karolinum 1999.
- [9] Hvízdalová, I.: Enzymy a barva masa. *Meat Processing* **4**, 51 (2006).
- [10] program ProtParam dostupný z URL: <<http://www.expasy.org/>>
- [11] Radola, B. J.: Isoelectric focusing in layers of granulated gels. Thin-layer isoelectric focusing of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **295**:2,412-428 (1973).
- [12] Hargrove M. S.; Barrick D.; Olson J. S.: The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry* **35**, 11293-9 (1996).
- [13] Hargrove, M. S.; Singleton, E. W.; Quillin, M. L.; Ortiz, L. A.; Phillips, G. N.; Olson, J. S. and Mathews, A. J.: His64- (E7)-Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of heme dissociation, *Journal of Biological Chemistry* **269**, 4207-4214 (1994).
- [14] Gruenke L. D.; Sun J.; Loehr T. M.; Waskell. L.: Resonance raman spectral properties and stability of manganese protoporphyrin IX cytochrome b₅. *Biochemistry* **36**:23, 7114-7125 (1997).
- [15] Altuve A.; Wang L.; Benson D. R.; Rivera, M.: Mammalian mitochondrial and microsomal cytochromes b₅ exhibit divergent structural and biophysical characteristics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **314**, 602–609 (2004).
- [16] Edmundson, A. B.: Amino-acid sequence of sperm whale myoglobin. *Nature* **205**, 883-7 (1965).
- [17] Hodgson, E.: Comparative aspects of the distribution of cytochrome P-450 dependent mono-oxygenase systems: an overview. *Drug Metabolism Reviews* **10**, 15-33 (1979).
- [18] Ozols, J.: Structure of cytochrome b₅ and its topology in the microsomal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects* **997**, 121-130 (1989).
- [19] Omura, T.; Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I, II. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2370-2385 (1964).
- [20] Souček, P.; Gut, I.: Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotika* **22**, 83-103 (1992).
- [21] Anderson, J. L.; Chapman, S. K.: Ligand probes for heme proteins. *Dalton Transactions* **1**, 13-24, (2005).

- [22] Štefl, M.: Bakalářská práce, katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, UK Praha (2006).
- [23] Murakami, K.; Mason, H. S.: An electron spin resonance study of microsomal Fe. *Journal of Biological Chemistry* **242**, 1102-1110 (1967).
- [24] Kurzban, G. P.; Strobel, H. W.: Preparation and characterization of FAD-dependent NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 7824-7830 (1986).
- [25] Porter, T. D.: The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **16**, 311-316 (2002).
- [26] Ristau, O.; Rein, H.; Jänig, G. R.; Ruckpaul, K.: Quantitative analysis of the spin equilibrium of cytochrome P-450 LM-2 fraction from rabbit liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects* **536**, 226-34 (1978).
- [27] Nakanishi N.; Takeuchi F.; Okamoto H.; Tamura A.; Hori H.; Tsubaki M.: Characterization of heme-coordinating histidyl residues of cytochrome b₅ based on the reactivity with diethylpyrocarbonate: a mechanism for the opening of axial imidazole rings. *Journal of Biochemistry* **140**, 561-71 (2006).
- [28] Douglas, R. H.; Hultquist, D. E.: Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b₅ are identical to segments of microsomal cytochrome b₅. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3118-3122 (1978).
- [29] Vergeres, G.; Waskell, L.: Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77**, 604-620 (1995).
- [30] Smith, M. L.; Paul, J.; Ohlsson, P. I.; Hjortsberg, K.; Paul, K. G.: Heme-protein fission under nondenaturing conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:3, 882-6 (1991).
- [31] Douglas, R. H.; Hultquist, D. E.: Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b₅ are identical to segments of microsomal cytochrome b₅. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3118-3122 (1978).
- [32] Porter, T. D.: The Roles of Cytochrome b₅ in Cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **16**, 311-316 (2002).
- [33] Vergeres G.; Ramsden J.; Waskell L.: The carboxyl terminus of the membrane-binding domain of cytochrome b₅ spans the bilayer of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **270**:7, 3414-3422 (1995).
- [34] Ogishima, T.; Kinoshita, J. Y.; Mitani, F.; Suematsu, M.; Ito, A.: Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b₅ as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 21204-11 (2003).
- [35] Zhang, H.; Myshkin, E.; Waskell, L.: Role of cytochrome b₅ in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 499-506 (2005).
- [36] Rosypal, S. a kol.: *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia 2003.
- [37] Kotrba, P.; Knejzlík, Z.; Chodora, Z.: Izolace, klonování a analýza DNA. Dostupné z URL: <www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf> [cit. 28.1.2007]
- [38] Raclavský, V.: Metody molekulární genetiky, klonování DNA. Dostupné z URL: <<http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm>> [cit. 6.2.2007]

- [39] Jung, Y.; Kwak, J.; Lee, Y.: High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 187-91 (2001).
- [40] Hewson, R.; Newbold, R. J.; Whitford, D.: The expression of bovine microsomal cytochrome b₅ in *Escherichia coli* and a study of the solution structure and stability of variant proteins. *Protein Engineering* **6**, 953-64 (1993).
- [41] Holmans, P. L.; Shet, M. S.; Martin-Wixtrom, C. A.; Fisher, Ch. W.: The high-level expression in *Escherichia coli* of the membrane-bound form of human and rat cytochrome b₅ and studies on their mechanism of function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **312**, 554-565 (1994).
- [42] Funk, D. W.; Lo, T. P.; Mank, M. R.; Brayer, G. D.; MacGillivray, R. T. A.; Mank, A. G.: Mutagenic, electrochemical, and crystallographic investigation of the cytochrome b₅ oxidation-reduction equilibrium: involvement of asparagine-57, serine-64 and heme propionate-7. *Biochemistry* **29**, 5500-5508 (1990).
- [43] Wiechelmann K. J.; Braun R. D.; Fitzpatrick J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* **175**:1, 231-7 (1988).
- [44] Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
- [45] Kotrbová, V.: Diplomová práce, katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, UK Praha (2005).
- [46] Rossi-Fanelli, A. a kol.: Studies on the structure of hemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin. *Biochimica et Biophysica Acta* **30**:3, 608-615 (1958).
- [47] Sigma-Aldrich: Informace o produktu C9142. Dostupné z URL:
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c9142pis.Par.0001.File.tmp/c9142pis.pdf> [cit. 11.3.2009]
- [48] Perutz, M. F.; Gronenborn; A. M., Clore; G. M.; Fogg, J. H.; Shih, D. T.: The pKa values of two histidine residues in human haemoglobin, the Bohr effect, and the dipole moments of alpha-helices. *Journal of Molecular Biology* **183**:3, 491-8 (1985).
- [49] Kotrbová V. a kol.: Preparation of a biologically active apo-cytochrome b₅ via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* – in press (2009).
- [50] Zhang H.; Im S. C.; Waskell, L.: 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. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 29766-76 (2007).
- [51] Banerjee R.: Thermodynamic study of the heme-globin association. I. Dissociation equilibrium of metmyoglobin: thermodynamic data. *Biochimica et Biophysica Acta* **64**, 368-84 (1962).
- [52] Banerjee R.: Thermodynamic study of the heme-globin association. II. Methemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta* **64**, 385-95 (1962).