

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie

ELEKTROCHEMICKÁ PŘEMĚNA A ANALÝZA STABILITY CYTOCHROMU *c*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. David Novák
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP

Olomouc 2015

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pod odborným dohledem doc. Ing. Jana Vacka, Ph.D. z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Bc. David Novák

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Janu Vackovi, Ph.D. (Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP) za odborné vedení, ale především za předané znalosti a zkušenosti. Dále děkuji prof. Ing. Lence Hernychové a Ing. Petře Dvořákové, Ph.D. (MOU, Brno) za provedení LC-MS analýz, Mgr. Petru Dobešovi, Ph.D. (MOU, Brno) za vytvoření počítačových modelů proteinu, Janu Košařovi (Katedra organické chemie PřF UP) za asistenci při přípravě lyofilizovaných vzorků, Mgr. Martině Zatloukalové za pomoc s elektroforetickými separacemi a Westernovým přenosem, Mgr. Jiřímu Vrbovi, Ph.D. za provedení nativní a denaturační elektroforézy, prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. a celému Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za výborné pracovní prostředí.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. David Novák

Název práce: Elektrochemická přeměna a analýza stability cytochromu c

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Byl studován cytochrom c (cyt c) izolovaný z koňského a telecího srdce. Z obou vzorků byly připraveny apoformy, jež byly následně podrobeny spolu s nativními cyt c elektrochemickým analýzám. Také byla studována jejich stabilita pomocí elektroforézy a Westernova přenosu. Eliminace hemu v případě apoforem byla potvrzena LC-MS analýzou. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti denaturačního činidla prokázala, že nedochází k degradaci proteinu během izolace. Dále bylo prokázáno, že monoklonální (Ab A-8) a polyklonální (Ab H-104) protilátky se váží jak na nativní cyt c, tak i na strukturu apocytochromů. Při studiu redoxních vlastností byl identifikován redukční signál hemu (pík HM) i samotného proteinu (pík H), čímž bylo možné od sebe rozpoznat nativní cyt c od apocytochromů. Pík H apocytochromů byl podstatně vyšší než u nativních cyt c. Příčinou je denaturace apocytochromu a s tím spojené rozvolnění struktury, jež bylo potvrzeno pomocí nativní elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Také byly pozorovány oxidační signály cyt c a apoforem při použití voltametrických metod. Předložené výsledky přispívají k pochopení redoxních vlastností konjugovaných proteinů. Mohou sloužit jako základ pro studium jejich struktury pomocí elektrochemických senzorů.

Klíčová slova: cytochrom c, elektrochemie, strukturní stabilita, redoxní vlastnosti, struktura, Westernův přenos, elektroforéza

Počet stran: 62

Jazyk: Čeština

Bibliographical information:

Author's first name and surname: Bc. David Novak

Title: Electrochemical behavior and stability of cytochrome *c*

Type of thesis: Master

Department: Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University, Czech Republic

Supervisor: Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Year of presentation: 2015

Abstract:

Cytochromes *c* (cyt *c*) and their apoforms from bovine and equine heart were studied. Both cyt *c* native forms and apoforms were isolated and subjected to electrochemical analysis at carbon and Hg-containing electrodes. For the apoforms, the elimination of heme was confirmed by LC-MS and inevitable degradation of the samples during isolation was investigated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis together with protein identification by monoclonal (Ab A-8) and polyclonal (Ab H-104) antibodies. Using chronopotentiometry the reduction signal of heme (peak HM) and the signal of the protein moiety (peak H) were observed. The peak H of the apocytochrome forms was significantly higher than that of the native cyt *c* forms. The reason for this is that the apoforms of cyt *c* undergo a relaxation of their structure compared to the native proteins, which was confirmed by native polyacrylamide gel electrophoresis. In addition to this, both structural forms (native cyt *c* vs. apocyt *c*) also gave a different electrooxidation pattern using voltammetry. The results presented here could contribute to understanding the redox properties of conjugated proteins in general. They could also serve as a starting point for further studies on the structure and function of cytochromes using electrochemical sensors.

Keywords: cytochrome *c*, electrochemistry, structural stability, redox properties, western blot, electrophoresis

Number of pages: 62

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1	Historie cytochromu c	12
3.2	Funkce cytochromu c.....	12
3.2.1	Elektronový transport.....	12
3.2.2	Peroxidázová aktivita	13
3.2.3	Antioxidační aktivita	14
3.2.4	Apoptóza	15
3.3	Struktura cytochromu c	17
3.3.1	Kovalentní vazba mezi hemem a proteinem	20
3.3.2	Nekovalentní interakce prostetické skupiny s proteinem.....	20
3.3.3	Evolučně stálé motivy a jejich funkce.....	21
3.3.4	Posttranslační modifikace cyt c.....	23
3.4	Metody experimentálního výzkumu	24
3.4.1	Rentgenostrukturní analýza.....	24
3.4.2	Ramanova spektrometrie	24
3.4.3	Nukleární magnetická rezonance	24
3.4.4	Hmotnostní spektrometrie	24
3.4.5	Elektrochemické metody	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	Chemikálie a přístrojové vybavení	29
4.1.1	Chemikálie	29
4.1.2	Roztoky	29
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	30
4.2	Příprava a purifikace apocytochromů.....	31

4.3	HPLC/MS analýza cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	34
4.3.1	Proteolytické štěpení cytochromu <i>c</i> a apocytochromu.....	34
4.3.2	HPLC separace	35
4.3.3	Hmotnostní spektrometrie	35
4.4	Elektrochemické analýzy cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	35
4.4.1	Příprava zásobních roztoků a vzorků proteinů	35
4.4.2	<i>In situ</i> potenciometrická analýza cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	35
4.4.3	<i>In situ</i> voltametrická analýza cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	35
4.5	Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	36
4.5.1	Příprava vzorků	36
4.5.2	Příprava 15% polyakrylamidového dělicího gelu	36
4.5.3	Příprava zaostřovacího gelu	36
4.6	Denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	37
4.6.1	Příprava vzorků	37
4.6.2	Příprava 15% polyakrylamidového dělicího gelu	37
4.6.3	Příprava zaostřovacího gelu	37
4.7	Westernův přenos cytochromu <i>c</i> a apocytochromu.....	38
4.7.1	Přenesení proteinu na povrch membrány	38
4.7.2	Navázání protilátek a detekce.....	38
4.8	Molekulový model cyt <i>c</i>	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1	Příprava a purifikace apocytochromů	39
5.2	Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	40
5.3	Denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	41
5.4	Westernův přenos cytochromu <i>c</i> a apocytochromu.....	41
5.5	HPLC/MS analýza cytochromu <i>c</i> a apocytochromu	42

5.6	<i>In situ</i> potenciometrická analýza cytochromu c a apocytochromu.....	44
5.6.1	Vliv rozpouštěcího proudu	48
5.6.2	Vliv pH.....	50
5.6.3	Vliv potenciálu akumulace	52
5.7	<i>In situ</i> voltametrická analýza cytochromu c a apocytochromu	52
5.7.1	Voltametrie se střídavou složkou napětí	52
5.7.2	Voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím	55
6	ZÁVĚR.....	57
7	LITERATURA.....	60

1 ÚVOD

Savčí mitochondriální cytochrom *c* (cyt *c*) je esenciální součástí respiračního řetězce zajišťující bioenergetiku celé buňky. Kromě své proteinové složky obsahuje také prostetickou skupinu, hem typu *c*. Je lokalizován na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány, avšak není její součástí. Pouze mezi nimi probíhají elektrostatické interakce zajišťující mobilitu cyt *c*, jenž je nezbytná pro jeho funkci [1].

Jeho primárním úkolem je přenos elektronů mezi komplexem III a IV dýchacího řetězce. Mimo to působí jako zhášec superoxidových radikálů [2].

Cyt *c* je schopen tvořit komplex s fosfolipidy kardiolipiny (CL). Komplex cyt *c*-CL má peroxidázovou aktivitu umožňující katalýzu peroxidace těchto fosfolipidů. Jejich oxidační poškození může vést až k narušení integrity mitochondriální membrány a uvolnění cyt *c* do cytosolu [3]. Zde se stává spouštěčem apoptózy, díky navázání na Apaf-1 (aktivující faktor apoptotické proteázy 1) za tvorby apoptozómu aktivujícího kaspázovou kaskádu. Antiapoptotickou funkcí komplexu cyt *c*-CL je přeměna peroxynitritového aniontu na dusičnanový, kdy tento komplex působí jako antioxidant. Cyt *c* je také schopen vázat CO a NO s vysokou afinitou, čímž je inhibována jeho peroxidázová aktivita a také nemůže dojít k jeho translokaci [4].

Je známo téměř 300 sekvencí cyt *c*. Největší variabilita byla pozorována u bakteriálních cyt *c*. Délka polypeptidového řetězce se pohybuje v rozmezí 104 ± 10 aminokyselinových zbytků. Při jejich porovnání byly nalezeny evolučně stálé sekvence aminokyselin zodpovědné za unikátní vlastnosti tohoto proteinu. Jedním z nich je motiv CxxCH tvořící dvě thioetherové vazby mezi –SH skupinami Cys reziduí a dvěma vinyly hemu. Atom železa je koordinován do středu porfyrinového kruhu, jehož ligandy jsou čtyři pyrrolové dusíky, Met80 a His18 [5].

Výzkum související s cyt *c* je velmi intenzivní v širokém spektru chemických, biologických a medicínálních odvětví. V této práci se budu zabývat studiem redoxních vlastností cyt *c* izolovaného z koňského a telecího srdce o délce 104 aminokyselin lišící se pouze třemi z nich [5].

2 CÍLE PRÁCE

V současnosti není v odborné literatuře informace o elektroaktivitě proteinové složky konjugovaných proteinů. Dostupné elektrochemické studie jsou zaměřeny na využití voltametrických metod pro výzkum pouze prostetické skupiny hemu. Z tohoto důvodu byl zvolen cyt *c* jako modelový protein pro studium redoxních vlastností konjugovaných proteinů. K tomu jsme použili:

1. Nativní cyt *c* představující velice stabilní molekulu rigidní struktury.
2. Apocytochrom získaný eliminací hemu, jež způsobila denaturaci proteinu a maximální rozvolnění jeho struktury.

Dali jsme si za cíl:

1. Navrhnout a optimalizovat přípravu apoforem cyt *c* ze dvou komerčně dostupných cyt *c* izolovaných z koňského a telecího srdce.
2. Ověřit, zda během izolace nedochází k fragmentaci molekuly proteinu.
3. Porovnat redoxní vlastnosti obou strukturních forem (cyt *c* vs. apocytochrom) pomocí moderních elektrochemických metod.
4. Využít získané informace k posouzení strukturní stability cyt *c* a jeho apoformy.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Historie cytochromu c

Cytochrom c (cyt c) je konjugovaný protein sytě červené barvy, právě díky neproteinové složce, jenž mimo jiné slouží jako chromofor. První poznatky o jeho izolaci se datují do roku 1930 [6]. Dnes patří mezi nejstudovanější konjugované proteiny vůbec a to mimo jiné z důvodu své termodynamické stability, jenž umožňuje snadnou purifikaci. Cyt c byl také jeden z prvních proteinů, které se podařilo krystalizovat [7].

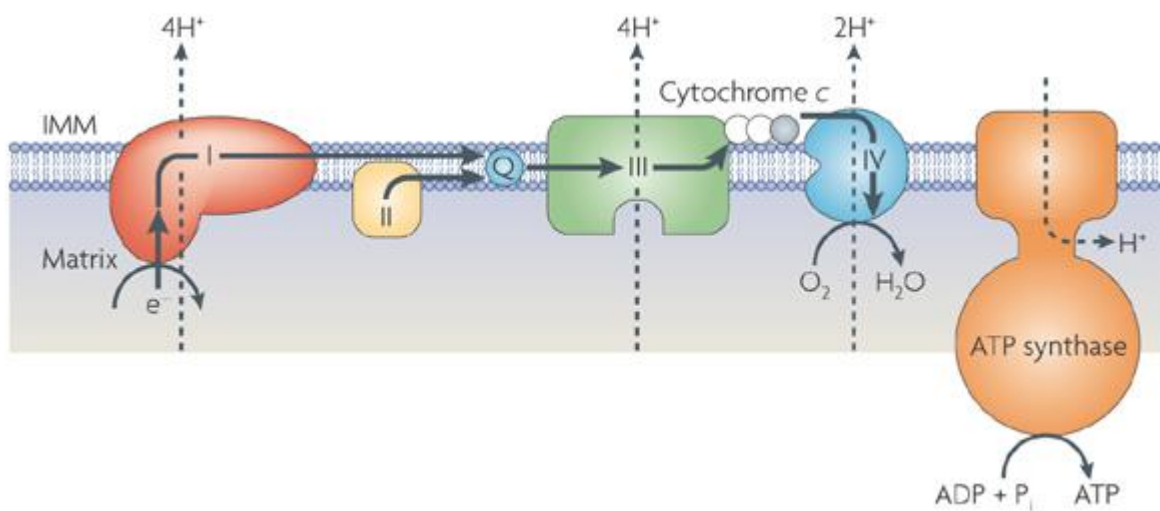
3.2 Funkce cytochromu c

Díky svým funkcím je cyt c esenciální pro život i smrt buňky. Podílí se na výrobě energie, má antioxidační a peroxidázovou aktivitu. V následujících odstavcích budou jednotlivé funkce cyt c detailně popsány.

3.2.1 Elektronový transport

Cyt c je lokalizovaný v mezimembránovém prostoru mitochondrie a je považován za nejmenší a nejjednodušší proteinem elektronového transportního řetězce (obrázek 1) [7]. Elektronový transportní řetězec zajišťuje chemiosmotický gradient pro syntézu ATP. Multienzymové komplexy pumpující protony jsou spojeny malými elektronovými nosiči, jako je cyt c, který není součástí membrány, ale asociuje s jejím povrchem pomocí elektrostatických interakcí. Pohyb cyt c mezi komplexem III (reduktáza) a komplexem IV (oxidáza) se pravděpodobně uskutečňuje na základě dvou dimenzionální difuze [1].

Primární funkcí proteinu je přijímat, transportovat a odevzdat elektron z komplexu III (*bc1* komplex) do komplexu IV (cytochrom c oxidáza), čehož je schopen díky hemové skupině, podléhající redoxním reakcím, při nichž mění atom železa svůj oxidační stav z Fe(II) na Fe(III) a naopak [4]. Proteinová složka cyt c zajišťuje selektivní výběr partnera pro elektronovou výměnu, aby nedošlo k nevhodnému přesměrování elektronového toku [1].



Obrázek 1: Oxidativní fosforylace začíná vstupem elektronu do elektronového transportního řetězce na vnitřní mitochondriální membráně (IMM) nepropustné pro nízkomolekulární látky. Elektronový transportní řetězec se skládá z komplexu I-IV, pohyb elektronů je znázorněn černými šipkami. Přenos z jednoho komplexu na druhý je zprostředkován elektronovými nosiči ubichinonem (Q) a cytochromem c. Elektron přenesený cytochromem c z komplexu III na komplex IV umožní konverzi O_2 na H_2O . Převzato z [8].

3.2.2 Peroxidázová aktivita

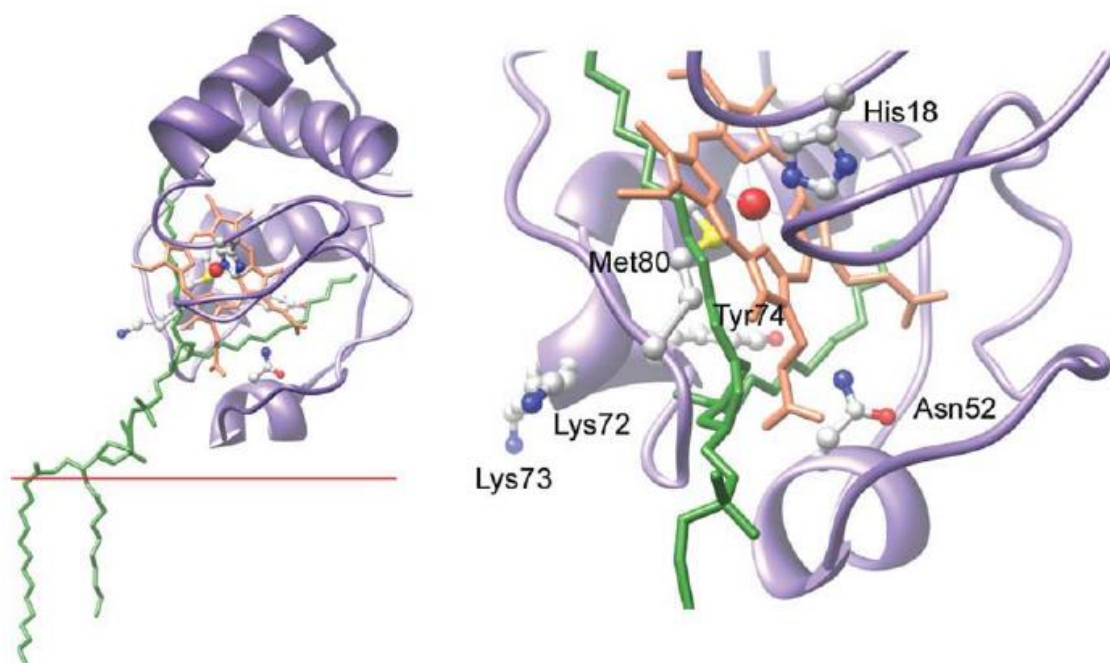
Peroxidázová aktivita je schopnost cyt c katalyzovat peroxidaci kardiolipinů (CL), fosfolipidů hojně zastoupených v mitochondriální membráně (20%). K této situaci dochází v případě zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejím konečným důsledkem je uvolnění cyt c do cytosolu, kde odstartuje apoptózu. Proto, aby cyt c získal peroxidázovou aktivitu, je zapotřebí jeho navázání na molekulu CL umístěnou na vnitřní mitochondriální membráně. Nejméně 15% mitochondriálního cyt c je vázáno na CL [4]. Tato vazba může vzniknout, pokud dojde k elektrostatické interakci mezi kladně nabitým povrchem cyt c (především Lys rezidua) a záporně nabitým fosfátem CL [3].

Navíc dochází k hydrofobní interakci jednoho nebo dvou řetězců mastných kyselin kardiolipinu vnořených do proteinu, což také způsobí změnu jeho konformace, včetně narušení vazby mezi trojmocným atomem železa v centru hemu a atomem síry rezidua Met80 [3]. Konkrétně se předpokládá vznik vodíkové vazby mezi fosfátem vnořeného CL a Asn52 (obrázek 2) [4].

Cyt c se od ostatních peroxidáz liší právě vazbou mezi sírou rezidua Met80 s atomem železa, jenž se v ostatních hemových proteinech s peroxidázovou aktivitou nevyskytuje. Toto vazebné místo bývá volné a váže se zde peroxid vodíku. Dalších pět vazebných míst železa je obsazených čtyřmi dusíky porfyrinového kruhu a jedním dusíkem rezidua His18. Při studiu

struktury komplexu cyt c-CL pomocí lypozomů se ukázala možnost vzniku cyt c-CL nanostruktur, kde je molekula proteinu obklopena lipidovou monovrstvou. Výsledky studií poukazují na přeměnu cyt c v peroxidázu jako na velmi komplexní děj, při kterém dochází ke změně jak terciární, tak i sekundární struktury proteinu, jenž umožní navázání peroxidu vodíku k hemu, jakožto axiálního ligandu železa a tím katalyzovat peroxidaci lipidů tvořící mitochondriální membrány [3].

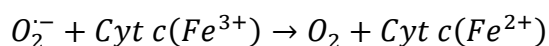
Inhibice peroxidázové aktivity komplexu cyt c-CL může být způsobena navázáním NO nebo CO. Oba plyny mají vysokou afinitu k hemovému atomu železa. Interakce s CO se řídí běžnou kinetikou druhého řádu. Oproti tomu vazba s NO je podstatně komplikovanější proces. Při vzniku komplexu cyt c-CL se předpokládá otevření hemové štěrbiny a oslabení vazby His18-Fe umožňující nahrazení páteho ligandu His18 za NO [4].



Obrázek 2: Model komplexu cyt c-CL. Membrána je znázorněna červenou linkou, CL má zelenou barvu. Dále jsou znázorněna významná rezidua pro tvorbu komplexu. Převzato z [4].

3.2.3 Antioxidační aktivita

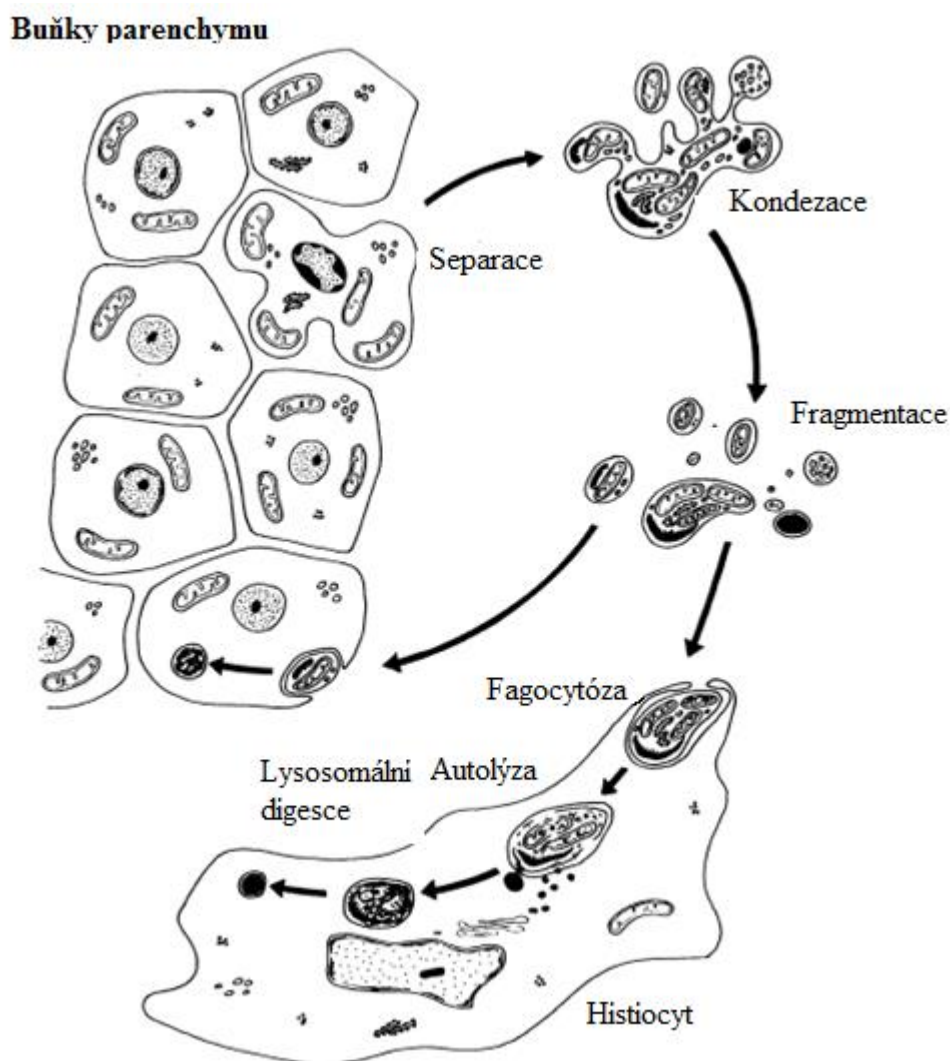
Respirační řetězec produkuje velké množství superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), který je uvolněn do mitochondriálního mezimembránového prostoru. $O_2^{\cdot-}$ a další ROS způsobují desorpci cyt c z vnějšího povrchu vnitřní mitochondriální membrány do mezimembránového prostoru, kde cyt c plní antioxidační aktivitu (rovnice 1). Komplex cyt c-CL je také schopen zhaset peroxynitritový radikál ($ONOO^{\cdot-}$) jeho přeměnou na NO_3^- [4].



Rovnice 1: Přeměna superoxidového radikálu na molekulární kyslík katalyzovaná cyt c(III).

3.2.4 Apoptóza

Na udržení buněčné homeostázy, odstranění poškozených buněk a vývoji organismu se podílí programovaná buněčná smrt, apoptóza. Její dynamické a morfologické rysy jsou velmi odlišné od stárnutí a nekrózy. Celý proces je fyziologický, kdy dochází ke smršťování buňky, vzniku nepravidelných záhybů „blebů“ na plasmatické membráně, způsobených rozvolněním cytoskeletu a jeho odpojením od cytoplasmatické membrány. Kondenzuje se chromatin, rozpadá se jaderná membrána a nakonec se zformují apoptotická tělíska, jež jsou následně degradována buňkami mononukleárního fagocytárního systému (obrázek 3) [9].



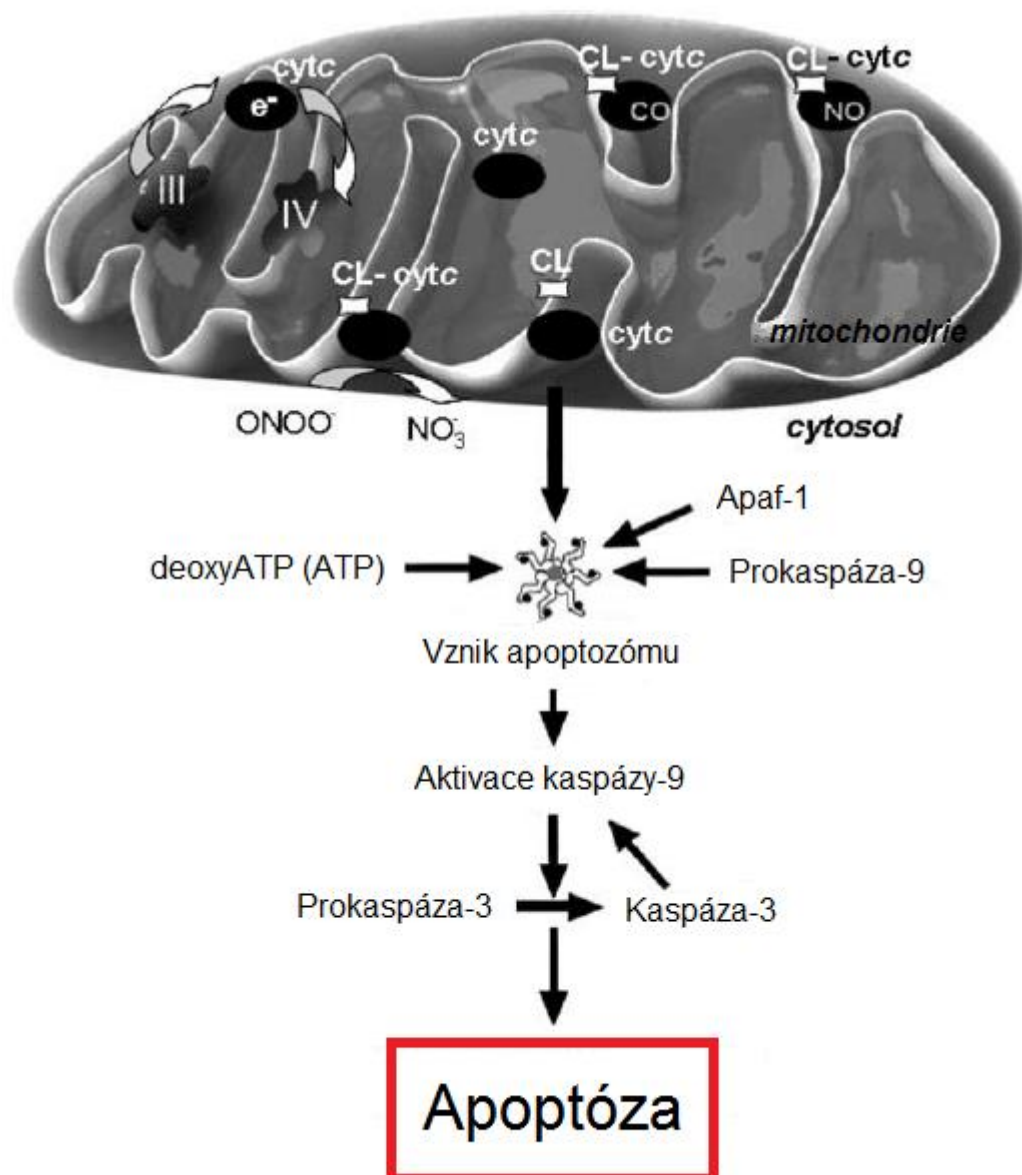
Obrázek 3: Morfologické změny buňky během apoptózy [10].

Nedílnou součástí apoptotické kaskády je podrodina cystein aspartátových proteáz známé jako kaspázy. Název je odvozen od Cys rezidua nacházejícího se v aktivním místě kaspáz a schopnosti specificky štěpit peptidovou vazbu za Asp rezidui [11]. Kaspázy jsou za fyziologických podmínek inaktivní. Pro získání aktivní kaspázy během apoptózy je zapotřebí proteolytického štěpení prokaspázy na malou a velkou podjednotku, často pomocí jiné kaspázy. Dvě rozštěpené kaspázy vytvoří heterotetramer, jenž je aktivní formou enzymu. Poruchy v regulaci apoptózy mohou zapříčinit vážné neurodegenerativní choroby, nádorová onemocnění a poruchy imunitního systému. Aktivace kaspáz může proběhnout několika způsoby [9].

Jedním z nich je aktivace prostřednictvím tumor nekrotizujícího faktoru (TNF), „receptoru smrti“ umístěného na povrchu buňky. Jeho agonisté aktivují sérii protein-protein interakcí, které vedou ke vzniku signalizačního komplexu vyvolávající smrt (DISC), jenž aktivuje kaspázy a dojde k programované buněčné smrti [9].

Další možností je uvolnění cyt *c* z mitochondrie do cytosolu, kde při kontaktu s deoxyATP cyt *c* spustí alosterickou aktivaci a hepta-oligomerizaci Apaf-1 generující apoptozóm, který aktivuje kaspázovou kaskádu vedoucí rovněž k programované buněčné smrti. Pro regulaci těchto událostí slouží represory a iniciátory jako jsou Bid a Bcl-2 proteiny [11]. Při mutaci genů kódujících tyto proteiny a následné expresi nefunkčních proteinů, může dojít k zablokování řízené buněčné smrti a postupně až ke vzniku nádorového onemocnění [4].

K apoptóze přispívá i tvorba komplexu cyt *c*-CL, jenž způsobí změnu terciární struktury cyt *c*, což vede ke snížení potenciálu potřebného pro správnou funkci v respiračním řetězci, získání peroxidázové aktivity cyt *c*, možnosti navázat CO nebo NO. Antiapoptotickou aktivitou komplexu cyt *c*-CL je zhášení ONOO⁻ radikálů (obrázek 4). Pokud dojde k permeabilizaci mitochondriální membrány je narušena bioenergetika celé organely. Produkuje se nadměrné množství ROS, jež vede k uvolnění cyt *c* do cytosolu a následné aktivaci apoptózy [4].



Obrázek 4: Cyt c jako přenašeč elektronů mezi komplexy III a IV v respiračním řetězci, součást komplexu cyt c-CL vázající NO a CO nebo zhářející peroxynitritový radikál, v neposlední řadě jako součást apoptozómu aktivující kaspázovou kaskádu [4].

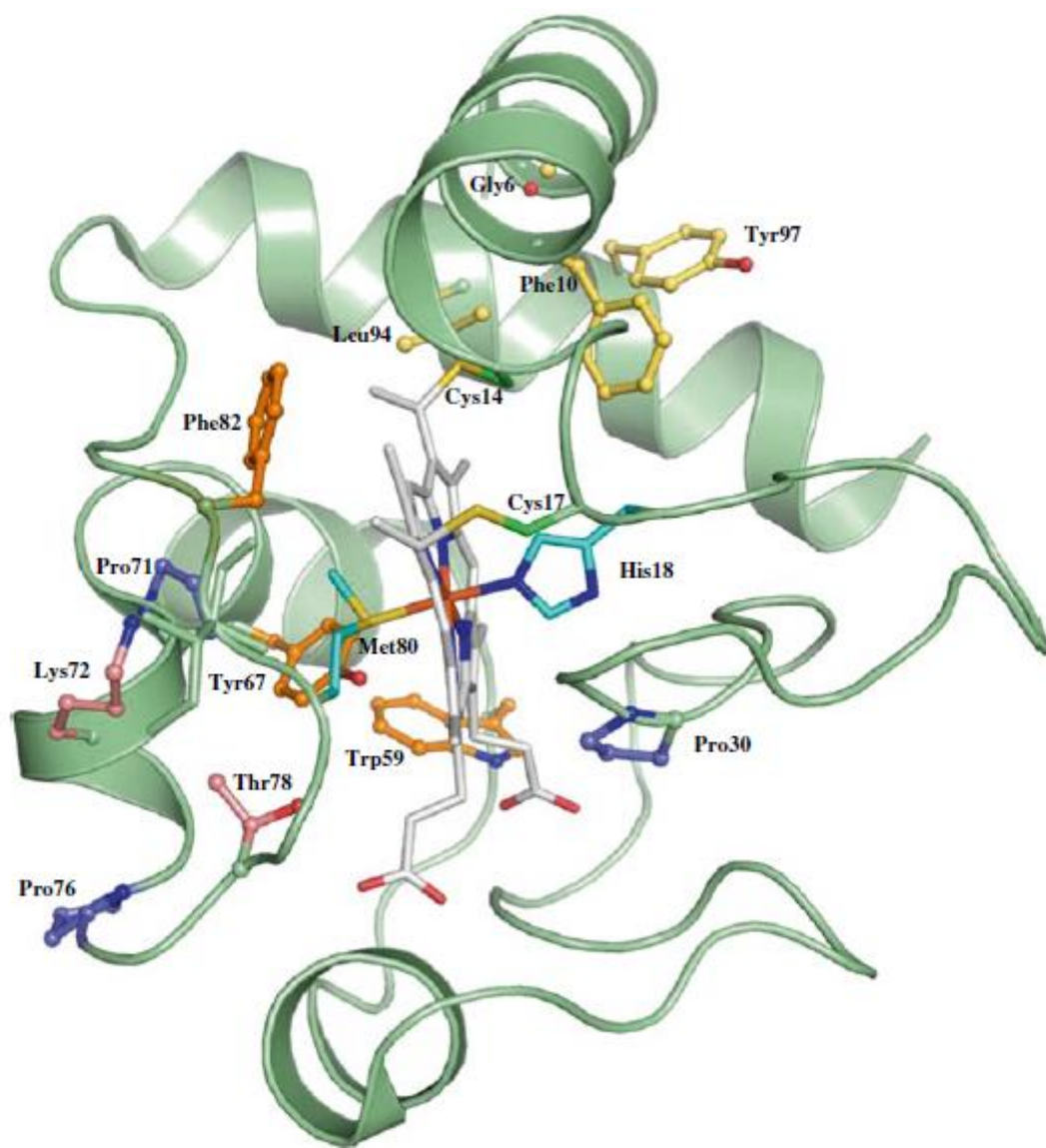
3.3 Struktura cytochromu c

Dnes je známo 285 kompletních aminokyselinových sekvencí cyt c z různých druhů organismů. Počet aminokyselinových reziduí v mitochondriálních cyt c se pohybuje v rozmezí 104 ± 10 . Některé z nich se v sekvenci vyskytují vždy a jsou označovány za „klíčová rezidua“. Konkrétně se jedná o Gly6, Phe10, Cys14, Cys17, His18, Gly29, Pro30, Gly41,

Asn52, Trp59, Tyr67, Leu68, Pro71, Pro76, Thr78, Met80 a Phe82, jenž plní důležitou úlohu ve struktuře, funkci a stabilitě molekuly [5].

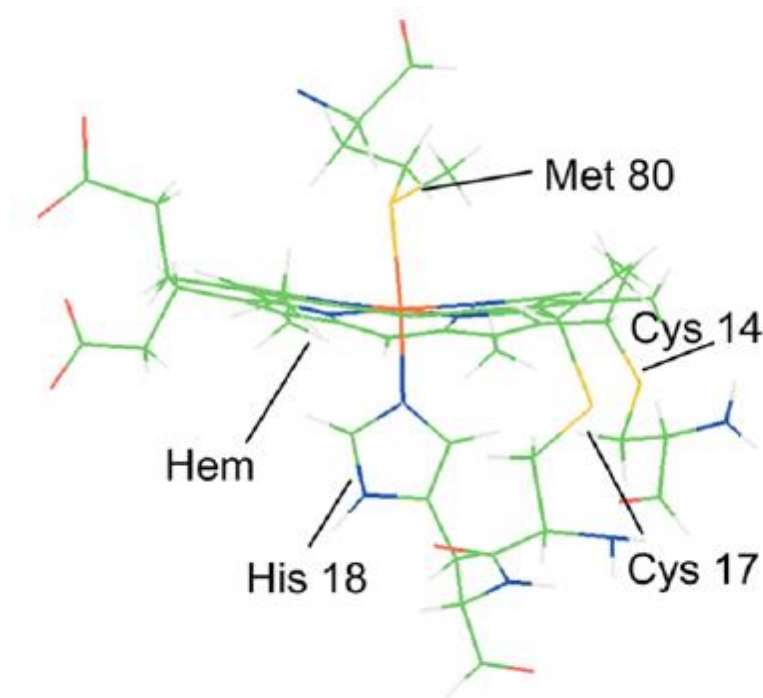
Cyt *c* může obsahovat jeden nebo několik hemů typu *c*. Atom železa je vždy axiálně koordinován histidinem postranního řetězce. Největší strukturní variabilita byla pozorována u cyt *c* izolovaných z bakterií. Celkem byly popsány čtyři třídy cyt *c* v závislosti na počtu hemů, pozici axiálního ligandu železa a redoxního potenciálu [12,13].

Cyt *c* izolovaný z telecího srdce má identickou primární strukturu s cyt *c* izolovanými z prasečího a ovčího srdce. Polypeptidové řetězce cyt *c* izolovaných z koňského (obrázek 5) a telecího srdce jsou tvořeny 104 aminokyselinami, uspořádanými kolem hemové prostetické skupiny připojené dvěma thioetherovými vazbami prostřednictvím Cys14 a Cys17. Hem je tvořen porfirinovým kruhem, v jehož středu je koordinačně vázán atom železa mezi 4 atomy dusíku (obrázek 6). V sekvenci koňského cyt *c* se nachází 3 Val rezidua, z toho dva z nich ve dvou sekvencích Val-Glu-Lys, která je i hemovým tryptickým a chymotrypsinovým štěpem a třetí v sekvenci Val-Gln-Lys. Poměrně vysoký počet bazických aminokyselinových zbytků způsobuje vysokou hodnotu izoelektrického bodu (pI) v rozmezí 10,0-10,5. Jedná se především o Lys rezidua, jenž jsou zároveň nejvíce zastoupenou aminokyselinou s počtem devatenáct (cyt *c* izolovaný z koňského srdce), osmnáct (cyt *c* izolovaný z telecího srdce), dále dvě Arg a tři His rezidua u cyt *c* izolovaných z koňského i telecího srdce. *N*-koncová α -aminoskupina cyt *c* izolovaných z koňského i telecího srdce je acetylována [14,15].



Obrázek 5: Struktura koňského cytochromu c s označenými klíčovými aminokyselinovými zbytky. Znázorněno pomocí PDB id 1HRC [5,12].

Jako první byla zjištěna trojrozměrná struktura mitochondriálního cyt c, izolovaného ze srdce tuňáka a to v sedmdesátých letech minulého století, pomocí rentgenové strukturní analýzy [13,16].



Obrázek 6: Struktura hemu typu c kovalentně vázaná k molekule proteinu prostřednictvím Cys14 a Cys17, včetně ligandů Met80 a His18. Převzato z [17].

3.3.1 Kovalentní vazba mezi hemem a proteinem

Kovalentní vazba je zprostředkována dvěma thioetherovými vazbami mezi jedinými Cys rezidui cyt c Cys14, Cys17 s druhým a čtvrtým vinylem postranního řetězce hemu. Zmíněné aminokyseliny jsou součástí pentapeptidového motivu – Cys – Xxx – Xxx – Cys – His –(CxxCH), jenž je zachován u většiny organismů. Kovalentní vazba mezi hemem a polypeptidem je typická pro cytochromy typu c. Zvyšuje pevnost axiálního ligandu hemu, tvoří redoxní potenciál a zvyšuje stabilitu molekuly při konformačních změnách, aby nedocházelo k samovolné ztrátě hemu. Syntéza apocytochromu probíhá v cytoplasmě, ten je posléze transportován do mitochondrie, kde je pomocí cyt c syntetázy kovalentně navázán hem za vzniku „zralého“ holocytochromu c [5].

3.3.2 Nekovalentní interakce prostetické skupiny s proteinem

Pro zajištění funkční struktury cyt c jsou zapotřebí axiální ligandy hemu. Konkrétně se jedná o His18, který se nachází proximálně vpředu a Met80, jenž přistupuje distálně z boku. Ukázalo se, že vazba Met80 – Fe(III) podléhá disociaci již za mírných podmínek, na rozdíl od His18, který je vázán k hemu i v denaturačním prostředí konc. GuHCl. Stabilita této vazby je přisuzována pentapeptidovému motivu CxxCH, jehož součástí je His18 a vodíkové vazbě mezi α -aminoskupinou His18 a karbonylem Ala15, jenž je další složkou pentapeptidu [5].

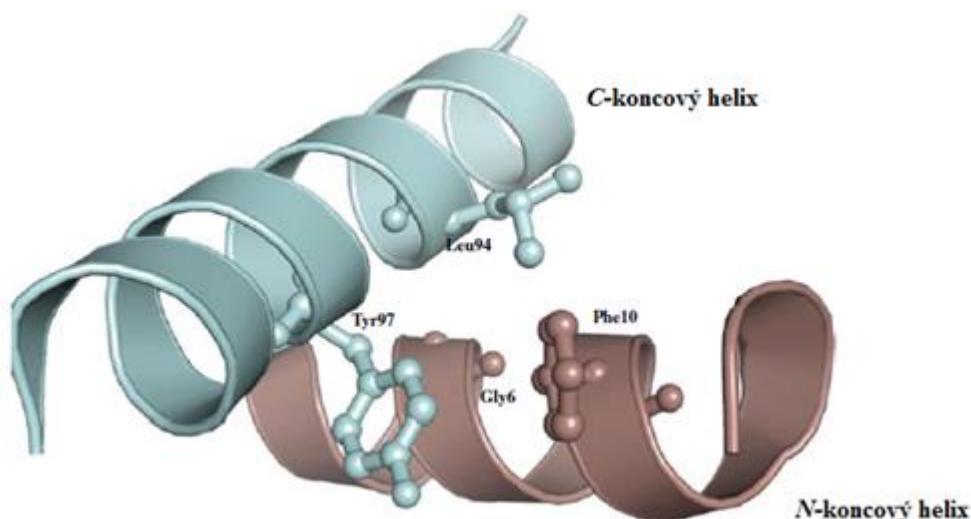
Koordinace mezi ϵ -dusíkem His18 a atomem železa je prostorově uspořádána tak, aby nedocházelo ke kontaktu s hemem, proto imidazolový kruh His svírá téměř pravý úhel (76°) s rovinou pyrrolového dusíku hemu. Díky His18 snadněji vzniká thioetherová vazba mezi Cys a hemem, stabilizuje jej v rámci struktury a také se zapojuje do mechanismů elektronového přenosu [5].

Navzdory nízké stabilitě, má vazba mezi Met80 a atomem železa velký význam pro udržování redoxního potenciálu, konformační a termodynamické stability a schopnost elektronového transportu. Met80 je přímo zodpovědný za vysoký redukční potenciál cyt *c*, což se projevilo při jeho záměně za Cys, kdy došlo k výraznému snížení redoxního potenciálu o ~ 600 mV [5].

3.3.3 Evolučně stálé motivy a jejich funkce

Dalším strukturním motivem vyskytujícím se v cyt *c* jsou *N*- a *C*-koncové helixy, jenž spolu interagují (obrázek 7). Důvodem je správné složení proteinu, ke kterému dojde okamžitě po vzniku thioetherových vazeb mezi hemem a polypeptidem na konci *N*-koncového helixu. Oba helixy spolu interagují prostřednictvím Leu94, Tyr97 z *C*-koncového helixu a Gly6, Phe10 z *N*-koncového helixu. Gly6 a Tyr97 jsou evolučně nejvíce stálé, na pozici Gly6 se jen zřídka vyskytuje Asp. Leu94 může být nahrazen Val nebo Ile. Oproti tomu na místě Phe10 se objevuje velké množství variant, přičemž se ukazuje, že by měl být rozpoznávacím místem pro cyt *c* hem lyázu. Malá velikost Gly6 v *N*-koncovém helixu se vytváří prostor pro postranní řetězec Leu94 [5].

Na rozdíl od *N*-koncového helixu je u *C*-koncového helixu pozorována o poznání větší variabilita a také k němu není kovalentně vázán hem, což vede k větší flexibilitě v jeho pohybu. Při záměně Gly6, Phe10 nebo Tyr97 za záporně nabitou aminokyselinu funkčnost proteinu zůstala zachována, ale naopak při jejich substituci za kladně nabitou aminokyselinu (Arg, Lys) cyt *c* nebyl schopen plnit svou funkci [5].



Obrázek 7: Interakce klíčových reziduí N- a C-koncových helixů. Převzato z [5].

Klíčovým aminokyselinovým zbytkem pro apoptózu je Tyr97, jenž je lokalizován na povrchu molekuly, tím pádem může interagovat s hydrofobními látkami, jako jsou kardirolipiny vnitřní mitochondriální membrány a tak se podílet na jejich peroxidaci, která způsobí uvolnění cyt *c* z mitochondrie do cytoplasmy [5].

V celé sekvenci proteinu je Trp59 jediným zástupcem této aminokyseliny. Přesto je důležitý díky vodíkové vazbě mezi jeho indolovým kruhem a propionátem hemu. Tato hydrofobní interakce stabilizuje strukturu celého proteinu a indol udržuje elektrostatické prostředí kolem hemu [5].

Dalším významným zbytkem je Tyr67, jehož hydroxylová skupina ovlivňuje spektrální a redoxní vlastnosti hemu, protože se v redukovaném stavu účastní vodíkové vazby s funkčními skupinami postranních řetězců Asn52, Thr78, Met80 a s fixovanou molekulou vody označovanou Wat166. Molekula Wat166 v oxidovaném stavu ruší všechny zmíněné vodíkové můstky mezi Tyr67 a ostatními třemi aminokyselinami. Po změně uspořádání elektrostatických sil v popsané síti vodíkových vazeb dojde opět ke konformačním změnám cyt *c*. Všechny popsané děje by mohly být součástí mechanismu ovládající redoxní potenciál cyt *c*. Hydroxylová skupina Tyr67 dále brání přístupu molekulárního kyslíku, čímž zamezuje autooxidaci cyt *c* [5].

Zásadním reziduem pro vazbu s redoxními partnery je Phe82, jehož umístění na povrchu molekuly v těsné blízkosti hemu souvisí právě s jeho funkcí. Dále dochází k ovlivňování samotného hemu, konkrétně stabilizuje jeho nativní prostředí a zamezuje průniku rozpouštědla do hemové kapsy, díky jeho planárnímu hydrofobnímu fenylu,

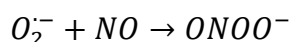
podílejícího se na π - π interakcích s porfyrinem. Přítomnost rozpouštědla v blízkosti hemu dokonce snižuje redoxní potenciál [5].

Pro vazbu s cytochrom c oxidázou a tvorbu komplexu cyt c – komplex III je důležitý Lys72. Jeho bazický charakter umožňuje působení elektrostatických sil mezi cyt c a záporně nabitým povrchem mitochondriální membrány. U rostlin a hub dochází k methylaci Lys72, jejíž význam se prozatím nepodařilo objasnit. Lys72 je zapojen i do interakce s Apaf-I tvořící s cyt c apoptozóm iniciující apoptózu [5].

3.3.4 Posttranslační modifikace cyt c

Z posttranslačních modifikací cyt c byla pozorována fosforylace Tyr48 (cyt c z hovězích jater), Tyr97 (cyt c z hovězího srdce), Thr28 a Ser47 (z lidských kosterních svalů). Fosforylace odlišných částí cyt c v různých orgánech naznačuje jeho aktivní zapojení do signalizačních drah buňky. Fosforylace Tyr97 zabraňuje aktivaci apoptózy [5].

Nitrace Tyr reziduí do *ortho* polohy brání elektronovému transportu, narušuje potenciál mitochondriální membrány a zvyšuje peroxidázovou aktivitu cyt c. Oproti fosforylaci je stabilnější a specifitější. K *in vivo* nitraci dochází pouze na Tyr67, Tyr74 a Tyr97. Tyr74 je součástí sekvence tvořeného rezidui 70-85, včetně Met80 koordinujícího s hemem. Konformační změny způsobené nitrací Tyr74 umožní navázání peroxidu vodíku k hemu vedoucí k získání peroxidázové aktivity. Kromě toho se také posune pKa cyt c k neutrálním hodnotám pH, čímž se zamezí reakci cyt c s cytochrom c oxidázou, dojde k záměně axiálního ligandu hemu Met80 za Lys73 nebo Lys79 a zabrání se zformování funkčního apoptozómu vlivem elektrostatických změn na povrchu proteinu [5]. Nitrace Tyr je irreverzibilní proces a je spojována s patogenezí chorob souvisejících s nitračním stresem. Reaktivní formou dusíku je peroxynitritový anion vznikající reakcí superoxidového radikálu s oxidem dusnatým, obsahující jeden nepárový elektron (rovnice 2). Peroxynitritový anion může vznikat v cytosolu a poté difundovat do mitochondrie nebo se formuje přímo v mitochondrii činností komplexů I-III [18].



Rovnice 2: Vznik peroxynitritového aniontu ze superoxidového radikálu a oxidu dusnatého.

Nejzastoupenější aminokyselina ve struktuře cyt c lysin, který podléhá acetylaci, jenž neutralizuje jeho kladný náboj, zvyšuje hydrofobicitu a ovlivňuje konformaci proteinu a tím i jeho funkce. V tomto ohledu je nejlépe prostudována N-koncová acetylace, ke které dochází

přenesením acetylové skupiny z acetyl-CoA na koncovou α -amino skupinu za přítomnosti N-koncové acetyl transferázy, jenž by měla působit jako prevence degradace cyt c [5].

3.4 Metody experimentálního výzkumu

Při studiu vlastností klíčových reziduí byli využíváni mutantní formy cyt c se záměnou sledovaného aminokyselinového zbytku. Výsledky výzkumů jsou shrnuty v práci od Zaidi et al. [5].

3.4.1 Rentgenostrukturní analýza

Pro studium hemu, jakožto aktivního místa elektronového transportu, bylo využito rezonančního neelastického rentgenového rozptylu (RIXS). Porovnání bis-imidazolového modelového komplexu hemu s cyt c odhalilo kvantitativní rozdíly, odrážející vliv ligandů Met80 a His18. Výsledky poukazují na větší sílu vazby mezi His18-Fe než Met80-Fe [17].

3.4.2 Ramanova spektrometrie

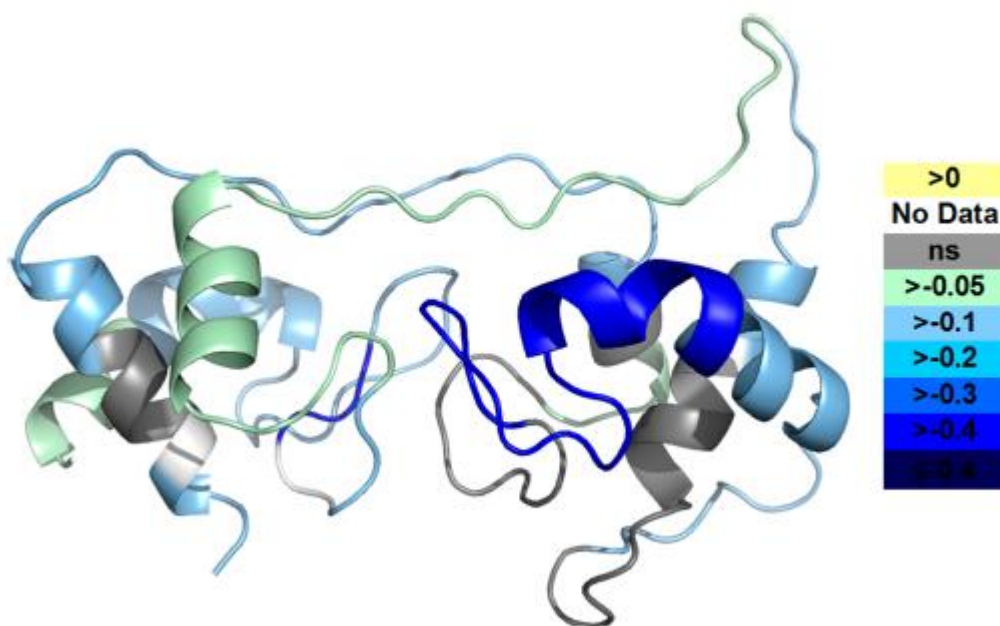
Monitorování intracelulárního redoxního stavu cyt c bylo provedeno pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Byla pozorována zvýšená hladina redukováného cyt c v *ex vivo* buňkách během hypoxie a reoxigenace [19].

3.4.3 Nukleární magnetická rezonance

Pomocí NMR byly zkoumány interakce mezi cyt c a oligonukleotidem o délce 41 párů bází za použití TROSY (transverse relaxation-optimized spectroscopy)-HSQC (heteronuclear single quantum coherence) experimentů. Takto se povedlo identifikovat vazebné místo DNA na povrchu cyt c. Výsledky byly potvrzeny pomocí gelové permeační chromatografie [20].

3.4.4 Hmotnostní spektrometrie

Moderní metody umožňují analýzu struktury proteinů v kapalných vzorcích. Proto bylo využito vodík deuterium výměnné hmotnostní spektrometrie (HDX-MS) a homologního modelování při analýze dihemového cyt c izolovaného z *Heliobacterium modesticaldum* (obrázek 8). Výsledky ukázaly, že v závislosti na oxidačním stavu se mění strukturní flexibilita a také dochází ke konformačním změnám [21].



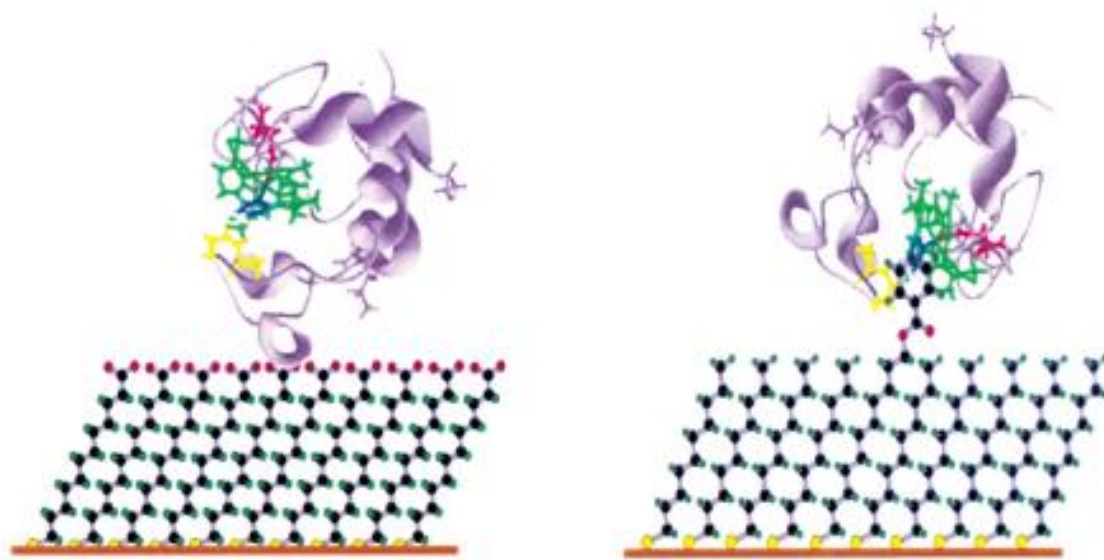
Obrázek 8: Rozdíly v příjmu deuteria mezi oxidovaným a redukováným stavem jsou znázorněny barevným kódem. Převzato z [21].

3.4.5 Elektrochemické metody

V posledních několika letech jsou intenzivně studovány vlastnosti biomolekul schopných redoxních dějů a jejich spojení s anorganickými nanomateriály, jenž vede k sestavování bioelektronických zařízení s širokou škálou aplikací například v medicíně jako biosenzory [22].

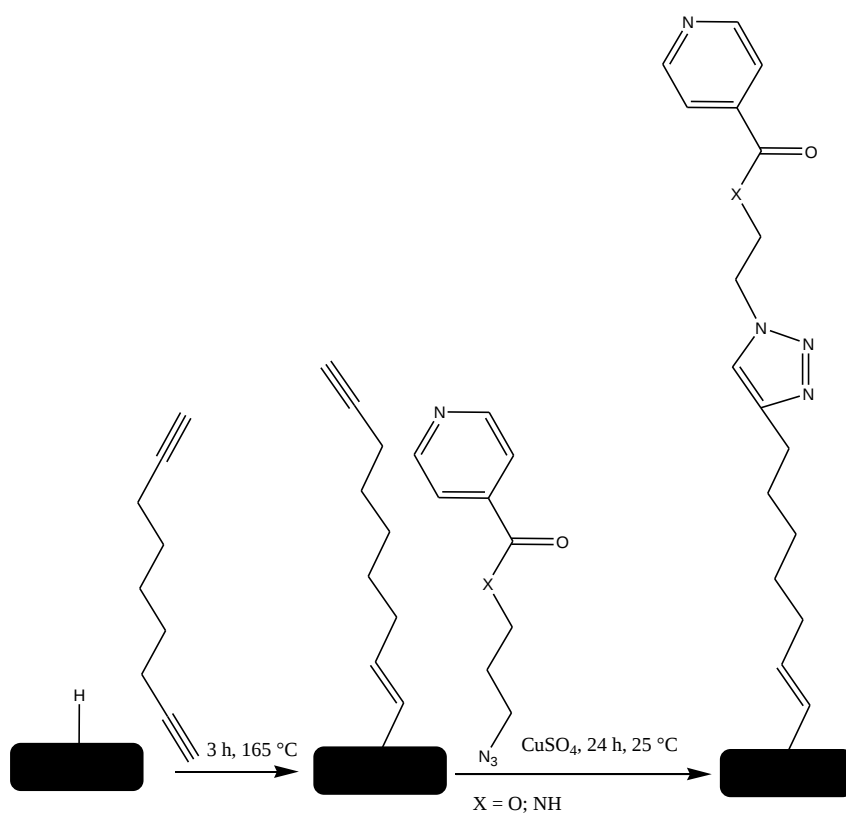
Pro studium kinetiky elektronového transportu cyt c byla využita spektroelektrochemická metoda [23] umožňující detailní studium procesů na povrchu zlatých elektrod [24]. Tato zlatá elektroda byla pokryta kovalentně vázanou samoskladnou monovrstvou (SAM), tvořenou koncově modifikovanými alkanthioly (obrázek 9). Pozitivně nabitě aminoskupiny lyzinů v bezprostřední blízkosti hemu a záporně nabitě karboxylové skupiny SAM mezi sebou elektrostaticky interagují a stabilizují tak vazbu mezi cyt c a SAM. Studovaný cyt c RC9–K13A je rekombinantní protein exprimovaný v kvasinkách. Liší se záměnou Lys13 za Ala a jeho *N*-konec nebyl acetylován. Výhodou studia mechanismů elektronového transportu v biologických systémech touto technikou je možnost regulace hnací síly reakce prostřednictvím potenciálu vkládaného na elektrodu a vzdálenosti, kterou musí elektron urazit, pomocí různě dlouhých řetězců alkylthiolů. Reakční rychlost elektronového transportu rekombinantního cyt c byla o více než šest řádů menší než u

nativního proteinu. Tento fakt poukazuje na skutečnost, že Lys13 umožňuje nejefektivnější cestu elektronového přenosu mezi cyt c a karboxylovým koncem SAM [23].



Obrázek 9: Schéma adsorpce cyt c na SAM dvěma různými mechanismy: Vlevo elektrostatické interakce mezi Lys zbytky cyt c a karboxylovými konci SAM. Vpravo koordinace mezi pyridinovými konci SAM a hemem. Převzato z [25].

Dále byl studován přenos elektronů mezi hemovou prostetickou skupinou koňského cyt c a pyridinylovým zbytkem SAM modifikovanou Si (100) elektrodou pomocí cyklické voltametrie. Předpokládaný receptorový ligand byl připraven Huisgenovou cykloadicí acetylenem ukončené alkylové monovrstvy s azidy kyseliny isonikotinové nebo jejího amidu, za přítomnosti měďného (I) katalyzátoru. Takto byl modifikován konec SAM neoxidované Si (100) elektrody (rovnice 3). Tento tip reakcí je označován jako tzv. „click“ reakce, jejíž výhody jsou vysoké výtěžky, jednoduchost a specifita. Díky tomu byl získán kvalitně modifikovaný povrch elektrochemického senzoru. Křemíková elektroda sama o sobě podléhá na svém povrchu spontánní oxidaci způsobující vznik pasivující amorfnní vrstvy. Avšak při její modifikaci SAM byla před samovolnou oxidací ochráněna. Měření cyt c bylo provedeno nejprve na acetylenem ukončené SAM modifikované Si (100) elektrodě, ale bez signálu na voltamogramu, protože se neočekává interakce mezi acetylenem a lysinovými zbytky. Při použití elektrody modifikované funkčními deriváty isonikotinové kyseliny byly zjištěny pozoruhodné rozdíly. Amid kyseliny isonikotinové taktéž nepodléhal elektrochemické reakci s cyt c, až její ester vytvořil s cyt c dobře definované redoxní vlny při potenciálu -114 ± 13 mV a -196 ± 11 mV.



Rovnice 3: Modifikace povrchu křemíkové elektrody [22].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie

Cyt *c* izolovaný z telecího a koňského srdce ($\geq 95\%$), Sephadex[®] G-25, dimethylsulfoxid (DMSO), dodecylsulfát sodný (SDS), telecí sérový albumin (BSA), hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl), chlorid sodný (NaCl), 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol hydrochlorid (TRIS), hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4), octan sodný (CH_3COONa), kyselina octová (CH_3COOH), kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4), kyselina boritá (H_3BO_3), síran stříbrný (Ag_2SO_4), dithiothreitol (DTT), guanidin hydrochlorid (GuHCl), ethanol, methanol, glycerol, bromfenolová modř, persíran amonný, tetramethylethylendiamin (TEMED), butanol, TWEEN, močovina, uhličitan amonný byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA). Helium (99,999%) pocházejí od firmy Linde Gas (Praha, Česká republika). Coomassie Brilliant Blue G-250, transferový pufr Trans-Blot Turbo, membrána PVDF byly dodány firmou Bio-Rad (USA). Roztok monomeru akrylamid:bis 29:1 dodaný výrobcem OmniPur-Calbiochem (USA). Cyt *c* primární polyklonální králičí protilátka (H-104), cytochrom *c* primární monoklonální myši protilátka (A-8), sekundární protilátka kozí anti-myši IgG-HRP a sekundární protilátka kozí anti-králičí IgG-HRP, Western Blotting Luminol Reagent byly dodány společností Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Fotografický film BioMax Light Film byl zakoupen od společnosti KODAK (USA).

4.1.2 Roztoky

Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda (dd H_2O) připravená pomocí zařízení Ultrapur, Watrex (Praha, Česká republika).

Eluční pufr pro chromatografickou purifikaci apocytochromu

0,1 M fosfátový pufr pH = 7: Roztok 0,1 M Na_2HPO_4 byl titrován roztokem 0,1 M NaH_2PO_4 do pH = 7.

Bradfordovo činidlo

0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuštěno v 50 ml 95% ethanolu, přidáno 100 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněno dd H_2O do 1 l.

Pufr pro přípravu roztoku apocytochromů s DTT a GuHCl

0,05 M acetátový pufr pH = 5: Bylo rozpuštěno 1,701 g CH_3COONa v 200 ml dd H_2O , upraveno pH pomocí konc. CH_3COOH a doplněno dd H_2O na 250 ml.

Pufry pro elektrochemickou analýzu

Tlumivý roztok Tris-HCl: Směs 20 mM TRIS a 20 mM NaCl upraveno na pH = 7,4 pomocí konc. HCl.

Britton-Robinsonův pufr pro elektrochemické analýzy: Směs kyselin složená z 0,04 M CH_3COOH (2,29 ml 98% CH_3COOH), 0,04 M H_3PO_4 (2,74 ml 85% H_3PO_4), 0,04 M H_3BO_3 (2,474 g). Všechny složky přidány do dd H_2O a pH bylo upraveno pomocí 0,2 M NaOH a dále doplněno deionizovanou vodou do 1 l.

Roztoky pro gelovou elektroforézu a Westernův přenos

10 x zaostřovací pufr: Rozpuštěno 7,5 g TRIS-HCl v 40 ml dd H_2O , pomocí konc. HCl upraveno pH na 6,8 a doplněno dd H_2O na 50 ml.

Vzorkovací pufr pro denaturační elektroforézu: Bylo smícháno 2,5 ml 10 x Stacking gel buffer s 1 g SDS, 5 ml glycerolu, 5 mg bromfenolové modře a 0,775 g DTT, vše doplněno do 10 ml dd H_2O .

Vzorkovací pufr pro nativní elektroforézu: Bylo smícháno 2,5 ml 10 x Stacking gel buffer s 5 ml glycerolu, 5 mg bromfenolové modře, vše doplněno do 10 ml dd H_2O .

4 x separační pufr: Připraven rozpuštěním 36,3 g TRIS-HCl v 150 ml dd H_2O , pomocí konc. HCl upraveno pH na 8,8 a doplněno dd H_2O do 200 ml.

Migrační pufr: Vznikl rozpuštěním 3,03 g TRIS-HCl, 14,41 g glicinu a 10 ml SDS (0,1 %) v 1 l deionizované vody.

TBS: Připraven rozpuštěním 12,11 g TRIS-HCl v 900 ml dd H_2O , upraveno pH pomocí konc. HCl na 7,5, přidáno 9 g NaCl a doplněno do 1 l dd H_2O .

TBS/T: Naředěno 50 ml TBS do 450 dd H_2O a přidáno 250 μl TWEEN.

Roztok 5% mléka: 5 g sušeného mléka v 95 ml TBS/T.

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytická kolona (Jupiter C18, 1.0 x 50 mm, 5 μm , 300Å, Phenomenex, CA),

Analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko),

Centrifuga Eppendorf miniSpin (Eppendorf, Německo),

Centrifuga chlazená Rotina 38 R (Biotech, Česká republika),

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA),

Inkubátor Enviromental Shaker (Biosan, Lotyšsko),

Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, Česká Republika),

Mikrokolona (Michrom Bioresources, USA),

Novagen[®] D-Tube[™] Dialyzers (Merck Millipore, USA),

pH metr inoLab Level 1 (SchoellerInstruments, Česká Republika) se skleněnou kombinovanou elektrodou SenTix41 (WTW, Německo),

Spektrofotometr pro měření v 96-jamkových destičkách Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko),

Systém pro elektroforézu Mini-Protean[®] 3 Cell se zdrojem PowerPac 200 nebo PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories, Německo),

Systém pro elektrochemickou analýzu μ Autolab III analyzátor (EcoChemie, Holandsko) v tříelektroдовém uspořádání: pomocná platinová elektroda, referenční Ag/AgCl/3M KCl a pracovní uhlíková elektroda z pyrolytického grafitu o ploše 9 mm² nebo rtuťová kapková visící elektroda o ploše 0,4 mm² součástí systému Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Švýcarsko),

Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo),

Třepačka Reax Top (Heidolph, Německo),

Ultrazvuková termostatická vodní lázeň Elmasonic S 10 H (Elma, Německo),

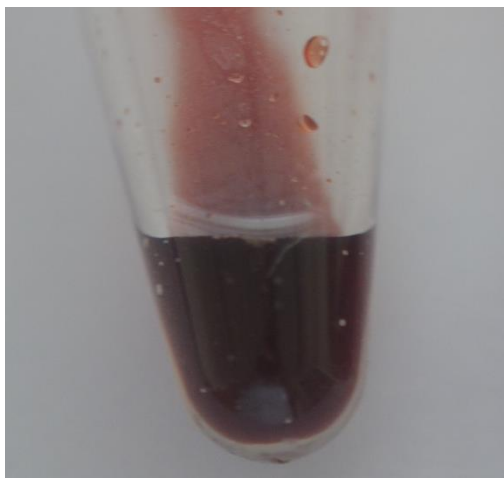
UV-Vis spektrofotometr UV-2401 PC (Shimadzu, Japonsko),

Zařízení pro Westernův přenos Trans-Blot[®] Turbo[™] (Bio-Rad, USA).

4.2 Příprava a purifikace apocytochromů

Apocytochromy byly připraven modifikací postupu skupinou Fisher, et al. [26]. V ultrazvukové lázni při 40 °C bylo rozpuštěno 40 mg Ag₂SO₄ v 4,5 ml H₂O

s 400 μl CH_3COOH . Vzniklý roztok byl smíchán s 24 mg cyt c rozpuštěného v 500 μl H_2O (obrázek 10).



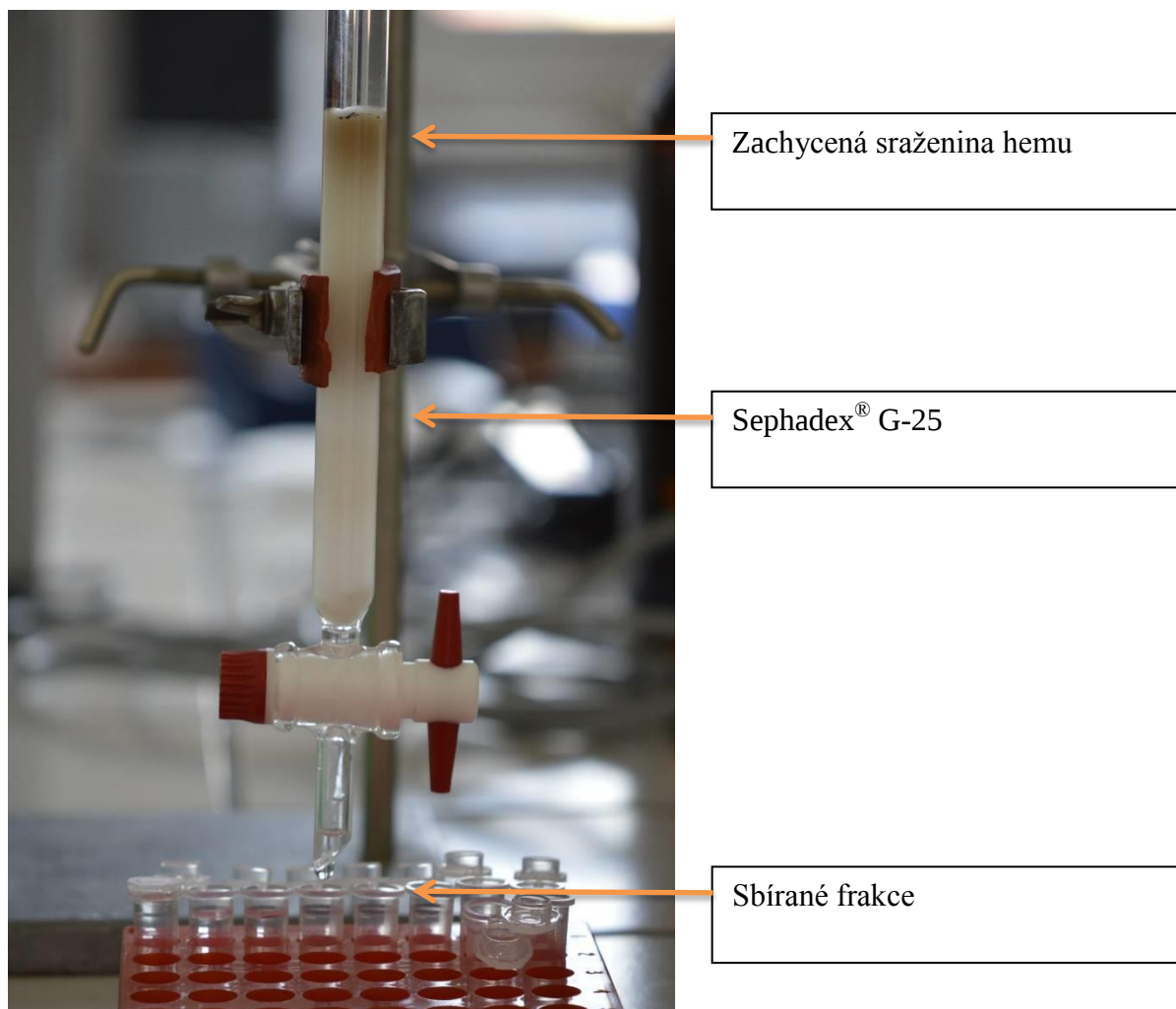
Obrázek 10: Roztok cyt c a Ag_2SO_4 v H_2O s přidavkem CH_3COOH .

Následovala čtyř hodinová inkubace při 40 °C. Zkumavky se vzorky byly zabaleny do alobalu, aby nedocházelo k fotochemické reakci (degradaci). Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 12 000 x g, došlo k usazení precipitovaného hemu na dno zkumavky (obrázek 11).



Obrázek 11: Vzorky cyt c s Ag_2SO_4 po centrifugaci s hnědými precipitáty hemu.

Supernatant byl dále purifikován na koloně naplněné sorbentem Sephadex[®] G-25 ekvilibrované 0,1 M CH_3COOH (obrázek 12).



Obrázek 12: Purifikace na koloně naplněné sorbentem Sephadex® G-25. Tmavý zákal v horní části kolony je zachycená hemová složka.

Byly sbírány frakce po 1 ml, obsah proteinu byl měřen metodou dle Bradfordové a nepřítomnost hemu ověřena pomocí UV-Vis spektrofotometrie.

Frakce obsahující apoprotein byly lyofilizovány. Lyofilizát byl rozpuštěn v 1 ml acetátového pufru obsahující 6 M GuHCl a 1 M DTT. Zkumavka byla zabalena do alobalu a roztok byl inkubován dvě hodiny při 25 °C.

Po inkubaci opět proběhla centrifugace při 12 000 x g , byl viditelný žluto-zelený precipitát (obrázek 13).



Obrázek 13: Vzorek apocytochromu s DTT a GuHCl po centrifugaci. Je viditelný žlutozelený precipitát.

Znovu byla provedena purifikace supernatantu na sorbentu Sephadex[®] G-25, vzorek byl odsolen pomocí dialyzační kolony Novagen[®] D-Tube[™] Dialyzers a opět lyofilizován. Byl získán bezbarvý apocytochrom zbavený hemového chromoforu (obrázek 14).



Obrázek 14: Zkoncentrovaný vzorek apocytochromu.

4.3 HPLC/MS analýza cytochromu c a apocytochromu

4.3.1 Proteolytické štěpení cytochromu c a apocytochromu

Vzorky cyt c izolovaného z koňského a telecího srdce včetně jejich apoforem byly denaturovány rozpuštěním v roztoku 9 M močoviny a zahřáty na 60 °C po dobu 60 min. Cyt c neobsahuje disulfidické vazby, proto nebylo přidáno žádné redukční činidlo. Následně byly

vzorky naředěny 900 μ l roztoku 100 mM uhličitanu amonného (pH = 8) a štěpeny v roztoku trypsinu v poměru 1:20 přes noc při 37 °C.

4.3.2 HPLC separace

Peptidy byly zachyceny a odsoleny online pomocí mikrokolony (Michrom Bioresources, Auburn, CA) po dobu 2 min při průtoku 20 μ l/min. Poté byl eluát aplikován na analytickou kolonu (Jupiter C18, 1.0 x 50 mm, 5 μ m, 300Å, Phenomenex, CA) a separován za použití lineárního gradientu: 10 % B 0-2 min, 40 % B 2-55 min. Mobilní fáze: A – 0.1% kyselina mravenčí ve vodě, B – 80% acetonitril / 0.08% kyselina mravenčí.

4.3.3 Hmotnostní spektrometrie

Byl použit hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific) s ionizací elektrosprejem on line spojeným s robotickým systémem založeným na HTS-Xt platformě (CTC Analytics Comp.). Analýzy byly provedeny dle metodiky [27].

4.4 Elektrochemické analýzy cytochromu c a apocytochromu

Všechny elektrochemické analýzy byly prováděny za přítomnosti kyslíku.

4.4.1 Příprava zásobních roztoků a vzorků proteinů

Zásobní roztoky cyt c a apocytochromů o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ byly připraveny do tlumivého roztoku TRIS-HCl pH = 7,4. Tento roztok byl ředěn do Britton-Robinsonova pufru na koncentraci 1 μ M.

4.4.2 *In situ* potenciometrická analýza cytochromu c a apocytochromu

Připravený vzorek (5 ml) byl přenesen do elektrochemické cely, kde byl podroben chronopotenciometrické rozpouštěcí analýze za konstantního proudu (CPSA).

Parametry CPSA: rozpouštěcí proud -12,5 μ A, počáteční potenciál 0 V, koncový potenciál -2 V.

4.4.3 *In situ* voltametrická analýza cytochromu c a apocytochromu

Připravený vzorek (5 ml) byl přenesen do elektrochemické cely, kde byl podroben voltametrii s vkládaným střídavým napětím (ACV) a voltametrii s pravoúhlým vkládaným napětím (SWV).

Parametry ACV: frekvence 66,21 Hz, počáteční potenciál 0 V, koncový potenciál -1,95 V.

Parametry SWV: frekvence 200 Hz, počáteční potenciál 0 V, koncový potenciál 1,4 V.

4.5 Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu c a apocytochromu

4.5.1 Příprava vzorků

Vzorky proteinů o koncentraci 1 mg/ml byl smíchán se vzorkovacím pufrem v poměru 4:1 (vzorek:vzorkovací pufr). Bylo aplikováno 5 µg proteinu na gel.

4.5.2 Příprava 15% polyakrylamidového dělicího gelu

Komponenty byly smíchány v následujícím pořadí:

1. 3,75 ml roztoku monomeru akrylamidu:bis 29:1
2. 3,65 ml dd H₂O
3. 2,5 ml 4 x separačního pufru
4. 100 µl 10% persíranu amonného
5. 10 µl TEMED

Vše bylo promícháno na elektromagnetické míchačce, nanášeno mezi dvě skla o požadované tloušťce 1,5 mm a zalito butanolem.

4.5.3 Příprava zaostřovacího gelu

Po ztuhnutí dělicího gelu byl vylit butanol, skla vysušena a připraven a aplikován zaostřovací gel:

1. 440 µl roztoku monomeru akrylamidu:bis 29:1
2. 830 µl 10 x zaostřovacího pufru
3. 2,03 ml dd H₂O
4. 25 µl 10% persíranu amonného
5. 5 µl TEMED

4.6 Denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu c a apocytochromu

4.6.1 Příprava vzorků

Vzorky proteinů o koncentraci 1 mg/ml byl smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 4:1 (vzorek:vzorkovací pufre). Směs byla zahřáta na 95 °C po dobu 5 min a poté aplikováno 10 µg proteinu na gel.

4.6.2 Příprava 15% polyakrylamidového dělicího gelu

Komponenty byly smíchány v následujícím pořadí:

6. 3,75 ml roztok monomeru akrylamidu:bis 29:1
7. 3,65 ml dd H₂O
8. 2,5 ml 4 x separačního pufru
9. 100 µl 10% SDS
10. 100 µl 10% persíranu amonného
11. 10 µl TEMED

Vše bylo promícháno na elektromagnetické míchačce, naneseo mezi dvě skla o požadované tloušťce 1,5 mm a zalito butanolem.

4.6.3 Příprava zaostřovacího gelu

Po zaschnutí dělicího gelu byl vylit butanol, skla vysušena a připraven a aplikován zaostřovací gel:

6. 440 µl roztok monomeru
7. 830 µl 10 x zaostřovacího pufru
8. 330 µl 10% SDS
9. 2,03 ml dd H₂O
10. 25 µl 10% persíranu amonného
11. 5 µl TEMED

4.7 Westernův přenos cytochromu c a apocytochromu

4.7.1 Přenesení proteinu na povrch membrány

Nejdříve byla provedena rehydratace membrány 1 min v MeOH a 2 min v dd H₂O. Poté byl připraven blotovací sendvič z papíru, membrány, gelu a dalšího papíru, který byl vložen do blotovacího zařízení na 10 min při proudu $I = 2$ A. Po skončení přenosu byla membrána 3 x promyta po 5 min v TBS/T a blokována v 5% roztoku sušeného mléka v TBS/T 3 hodiny.

4.7.2 Navázání protilátek a detekce

Membrána byla inkubována s primárními protilátkami v 5% roztoku mléka (ředění 1:500) přes noc. Následně 3 x promyta v roztoku TBS/T po dobu 5 min. Inkubována 2 hod se sekundární protilátkou v 5% roztoku mléka (ředění 1:5000) a opět 3 x promyta v TBS/T po dobu 5 min. Pro detekci byla využita komerčně dostupná sada Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Vizualizace byla provedena na fotografický film (KODAK BioMax Light Film).

4.8 Molekulový model cyt c

Monomer cyt c (PDB kód: 4RSZ) byl vizualizován v programu PyMOL (Molecular Graphics System, version 1.5.0.4; Schrödinger, LLC).

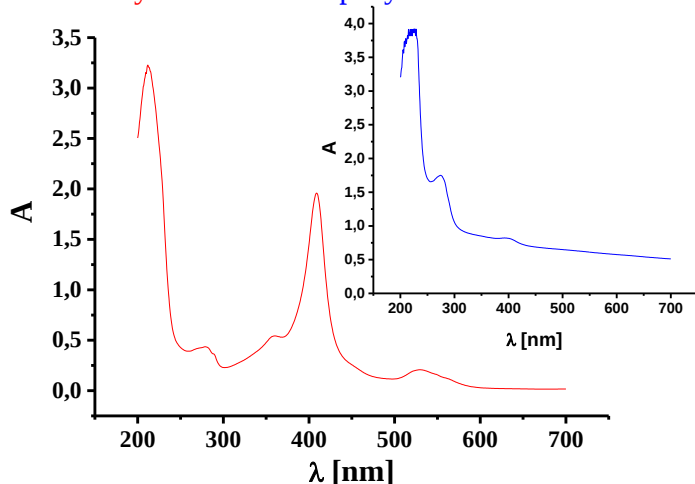
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro účely předložené diplomové práce byl použit cyt *c* izolovaný z koňského a telecího srdce. Oba proteiny jsou komerčně dostupné s deklarovanou čistotou $\geq 95\%$. Obě nativní formy proteinu byly použity pro přípravu apofořem a to dle již dříve popsaneho postupu [26]. Nativní cyt *c* obsahuje hemovou složku a představuje model vysoce stabilního proteinu s kompaktní strukturou [5]. Naproti tomu apořorma hemovou složku neobsahuje a tudíž představuje model proteinu s destabilizovanou (relaxovanou) strukturou [5]. Nejprve byly vzorky cyt *c* a jeho apofořem charakterizovány pomocí UV-Vis spektroskopie (sekce 5.1), elektroforézy za nativních (sekce 5.2) a denaturačních (sekce 5.3) podmínek v kombinaci s Westernovým přenosem (sekce 5.4). Validita vzorků byla taktěž potvrzena metodou HPLC/MS (sekce 5.5). Dále byly vzorky cytochromů včetně jejich apofořem podrobeny elektrochemickým analýzám (sekce 5.6) a výsledky byly interpretovány vzhledem ke známé krystalové struktuře nativního cyt *c* (sekce 5.6 a 5.7).

5.1 Přířrava a purifikace apocytochromů

Apocytochromy byly připraveny pomocí metody založené na eliminaci hemu po inkubaci nativních řorem proteinu s Ag_2SO_4 , následně DTT v denaturačním prostředí GuHCl a purifikací na koloně plněné sorbentem Sephadex[®] G-25, dle metodiky [26]. Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla sledována metodou dle Bradfordové. Pro kontrolu zda skutečně dochází k eliminaci hemu, byla na konci izolace změřena UV-Vis spektra purifikovaných vzorků apocytochromů a to od 200 do 700 nm a výsledky byly srovnány s UV-Vis spektry nativních řorem cyt *c*. Ve spektru nativního cyt *c* je možné pozorovat výrazný absorpční pás v oblasti okolo 400 nm náležící hemové složce proteinu, který se ve spektru apocytochromu nevyskytuje (obrázek 15). Uvedené pozorování dokazuje, že purifikační procedura vede k získání apofořem cyt *c* což je taktěž v souladu s výsledky dalších autorů [26].

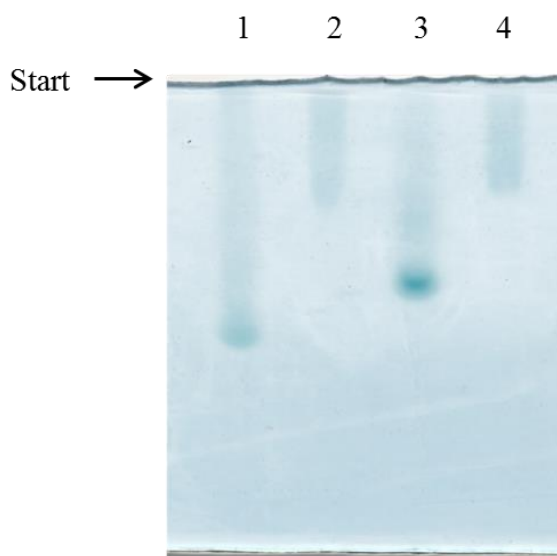
UV-Vis: **cytochrom c** vs. **apocytochrom c**



Obrázek 15: Porovnání UV-Vis spekter nativního cyt c (červeně) a apocytochromu (modře).

5.2 Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu c a apocytochromu

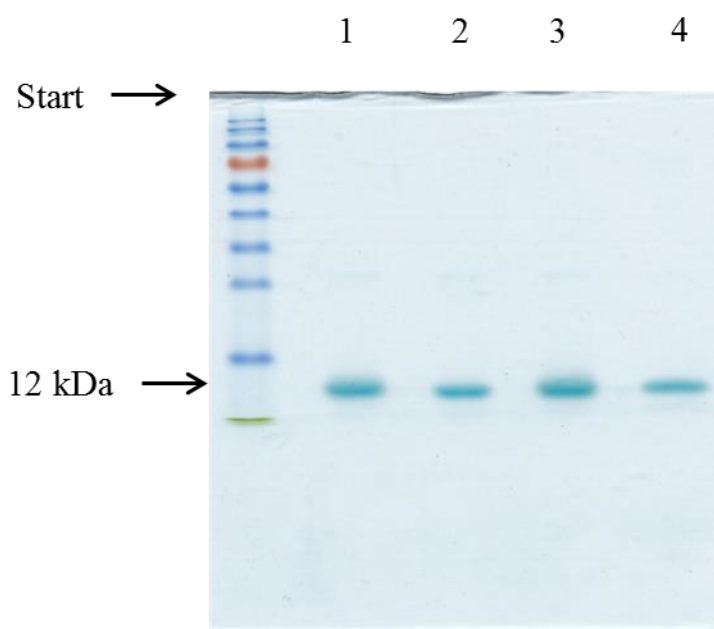
Cyt c z telecího a koňského srdce včetně jejich apoformy byly studovány pomocí nativní elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (obrázek 16). Z obrázku je patrná podstatně vyšší elektroforetická mobilita nativních cyt c (proužky 1 a 3) oproti apoformám (proužky 2 a 4). Důvodem je kompaktní molekula nativního proteinu kladoucí menší odpor při průchodu gelem. Na rozdíl od rozvolněné struktury apocytochromů, jenž znesnadňuje pohyb gelem a tudíž se i snižuje elektroforetická pohyblivost těchto vzorků.



Obrázek 16: Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. 1) Cytochrom c izolovaný z koňského srdce a jeho 2) apocytochrom. 3) Cytochrom c izolovaný z telecího srdce a jeho 4) apocytochrom.

5.3 Denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu cytochromu c a apocytochromu

UV-Vis spektroskopické analýzy ani nativní gelová elektroforéza neumožňují kvantitativně zhodnotit, zda nedochází v průběhu purifikačních postupů a manipulace se vzorky k jejich poškození, především fragmentaci [8]. Z tohoto důvodu byla provedena denaturační elektroforéza, dle protokolu [28]. Hodnoceno bylo, zda nedochází k fragmentaci polypeptidového řetězce a to především apoforem cytochromů c, které představují strukturně destabilizované formy proteinu. Pouze jeden proužek (MW = 12 kDa) u každého vzorku značí neporušenou primární strukturu proteinů (obrázek 17).

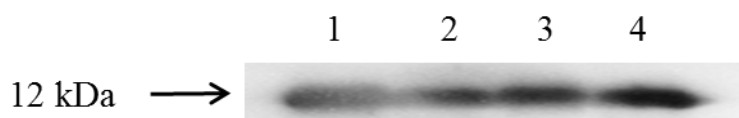


Obrázek 17: Denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. 1) Cytochrom c izolovaný z koňského srdce a jeho 2) apocytochrom. 3) Cytochrom c izolovaný z telecího srdce a jeho 4) apocytochrom.

5.4 Westernův přenos cytochromu c a apocytochromu

Vzorky obou strukturních forem proteinu byly po provedení SDS-PAGE taktéž zkoumány pomocí cytochrom c vázající polyklonální králičí protilátky (H-104) [29] (obrázek 18) a monoklonální myší protilátky (A-8) [30] (obrázek 19). Obě primární protilátky se selektivně váží na aminokyselinové zbytky 1-104 po provedení Westernova přenosu. To že se obě protilátky navázaly na nativní cytochromy c i na jejich apoformy taktéž potvrzuje neporušenou primární strukturu apocytochromů. Uvedené také dokazuje, že oba typy protilátek se selektivně váží nejenom na nativní formu proteinu, ale také na strukturně

destabilizované apoformy. Je zde tedy možnost využít obě výše specifikované protilátky pro účely dalšího výzkumu pomocí molekulárně biologických metod a strukturních studií.



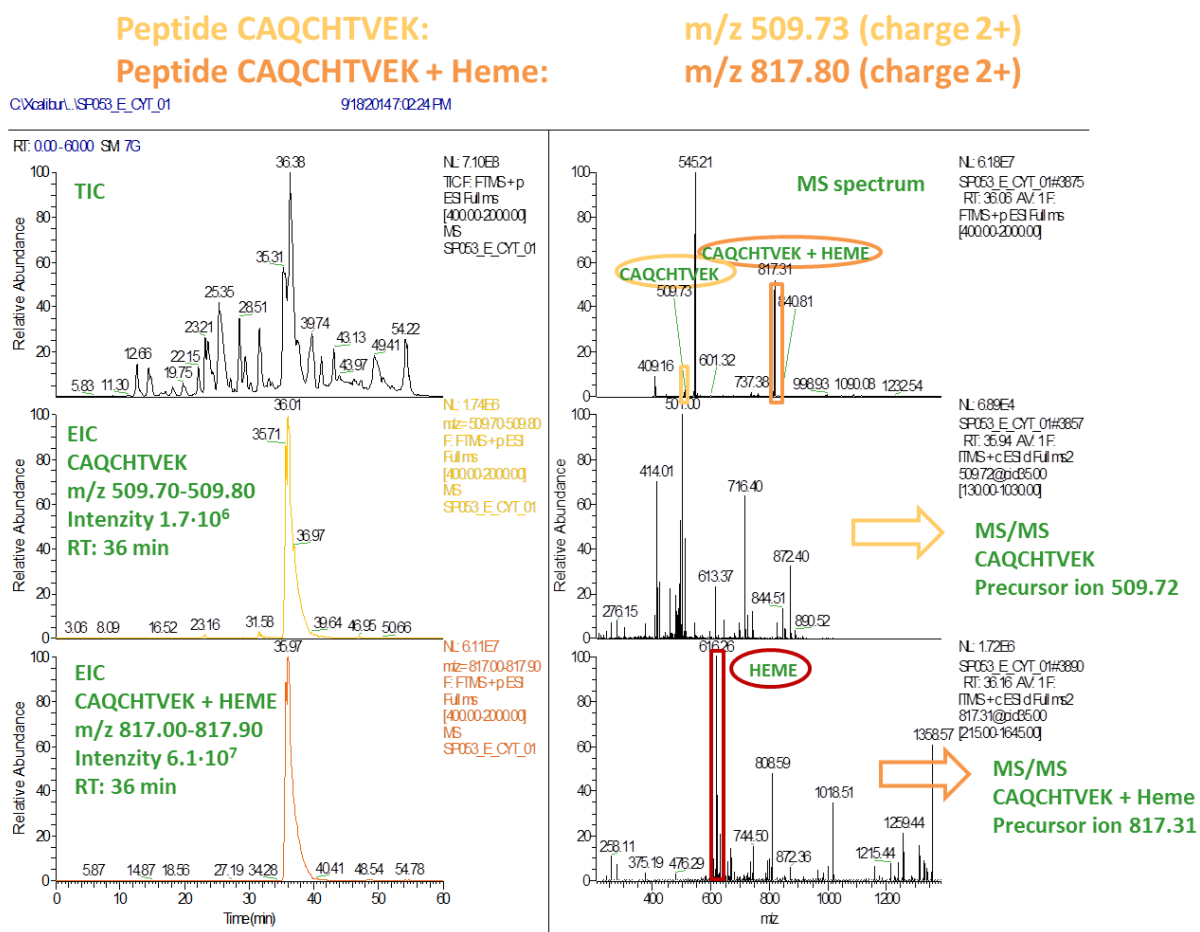
Obrázek 18: Westernův přenos po aplikaci polyklonální králičí protilátky H-104. 1) Cytochrom *c* izolovaný z koňského srdce a jeho 2) apocytochrom. 3) Cytochrom *c* izolovaný z telecího srdce a jeho 4) apocytochrom.



Obrázek 19: Westernův přenos po aplikaci monoklonální myší protilátky A-8. 1) Cytochrom *c* izolovaný z koňského srdce a jeho 2) apocytochrom. 3) Cytochrom *c* izolovaný z telecího srdce a jeho 4) apocytochrom.

5.5 HPLC/MS analýza cytochromu *c* a apocytochromu

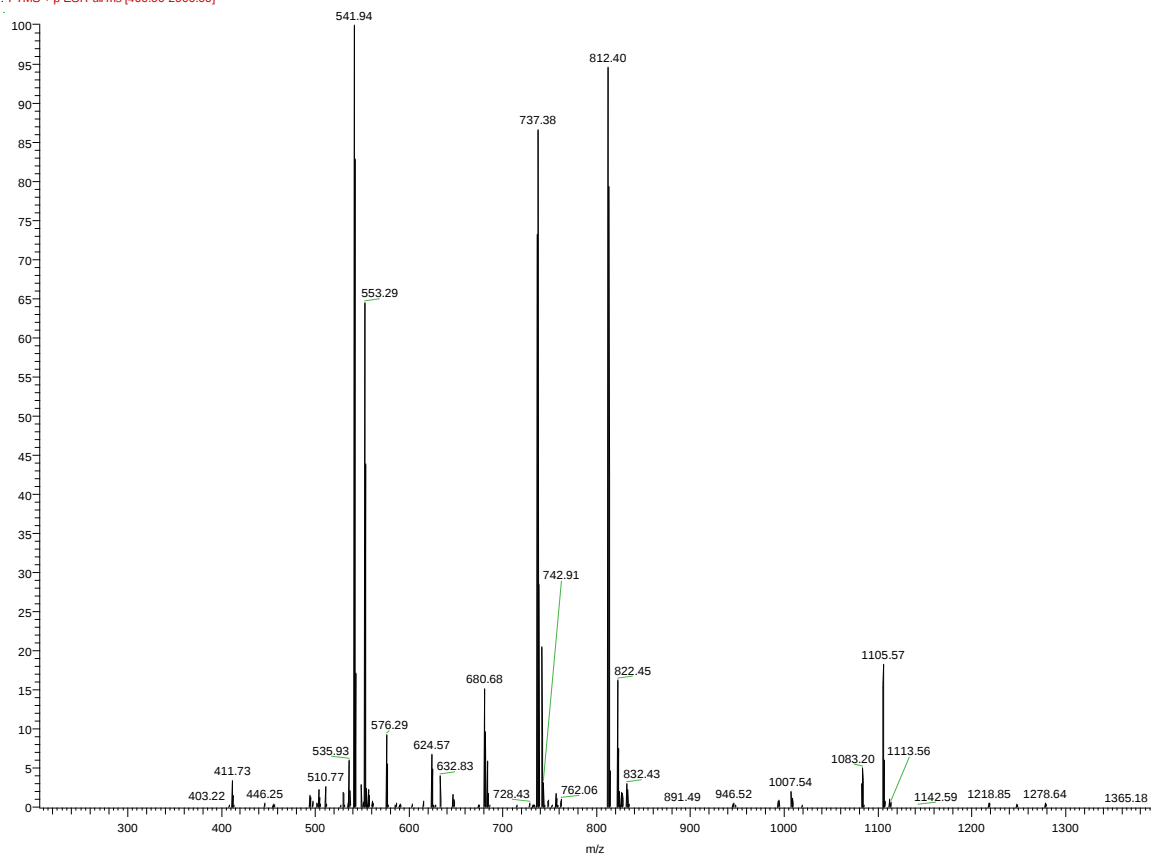
Pro exaktní ověření eliminace hemové složky při přípravě apocytochromů byla použita HPLC/MS technika v kombinaci s tryptickým štěpením dle metodiky [28]. Při HPLC/MS analýze cyt *c* izolovaného z koňského srdce se podařilo identifikovat peptid CAQCHTVEK prostřednictvím jehož Cys zbytku je vázán hem. Na obrázku 20 je uveden MS chromatogram (TIC: total ion current) a pod ním SIM (single ion monitoring) chromatogramy sledovaného peptidu. Jak je vidět, byla zjištěna přítomnost, jak sledovaného peptidu bez hemu, tak i s hemem, přičemž MS spektrum ukazuje řádově vyšší intenzitu peptidu s hemem, než bez hemu. Uvedené může být způsobeno dekonjugací hemu v průběhu ESI ionizačního procesu. Doloženy jsou i MS/MS spektra sledovaného peptidu (obrázek 20). Při fragmentaci peptidu CAQCHTVEK s hemem se odštěpuje fragment při m/z 616,26, který odpovídá právě jednotce hemu. Uvedené výsledky jsou v souladu s již publikovanými daty [28].



Obrázek 20: HPLC/MS analýza cytochromu c z koňského srdce. Chromatogram vlevo nahoře (TIC: total ion current), pod ním jsou zobrazeny vyextrahované chromatogramy (SIM: single ion monitoring) peptidu bez hemu a s hemem. V pravém sloupci nahoře je MS spektrum extrahované z chromatogramu při $t_R = 36$ min, dále jsou ukázány MS/MS spektra sledovaného peptidu bez a s přítomností hemové složky.

Dále je pozorováno MS spektrum naměřené po tryptickém štěpení apocytochromu původem z koňského srdce (obrázek 21). U vzorku cyt c izolovaného z koňského srdce (obrázek 20) byly identifikovány píky při m/z 817,31 pro peptid CAQCHTVEK s hemem a při m/z 509,72 pro samotný peptid. U vzorků apocytochromu izolovaného z koňského srdce (obrázek 21) nebyly tyto píky odpovídající peptidu s hemovou složkou v MS spektrech nalezeny. Výše popsané výsledky nasvědčují eliminaci hemu, což je v souladu s výsledky UV-Vis a elektroforetických analýz.

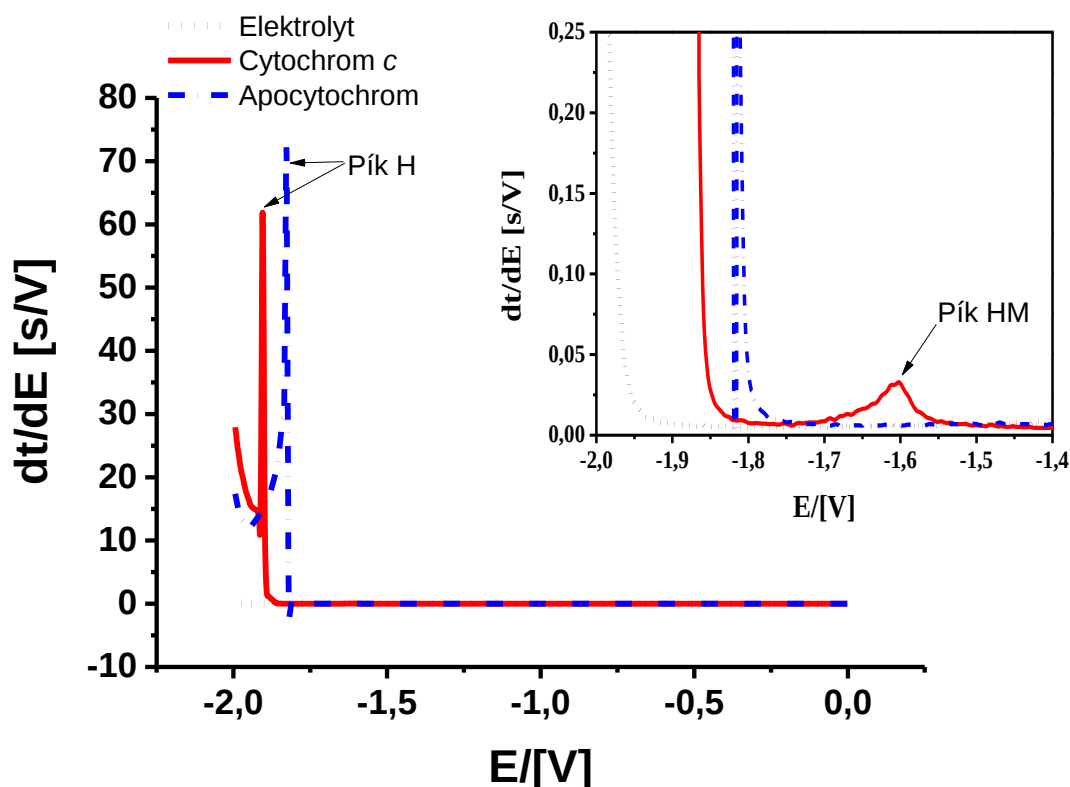
SP053_E_APO_01 #4044-4498 RT: 35.02-37.98 AV: 65 NL: 2.23E7
F: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]



Obrázek 21: MS spektrum koňského apocytochromu.

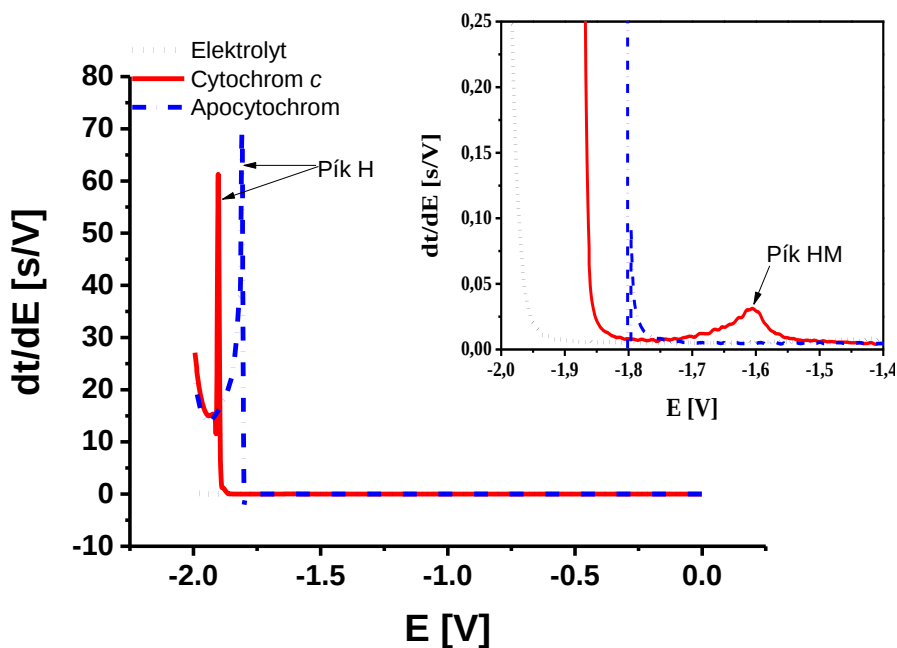
5.6 *In situ* potenciometrická analýza cytochromu c a apocytochromu

Vzorky cyt c izolované z telecího (obrázek 22) a koňského (obrázek 23) srdce a jejich příslušné apoformy byly analyzovány pomocí rozpouštěcí chronopotenciometrie za konstantního proudu (CPSA) na rtuťové kapkové visící elektrodě (HMDE).



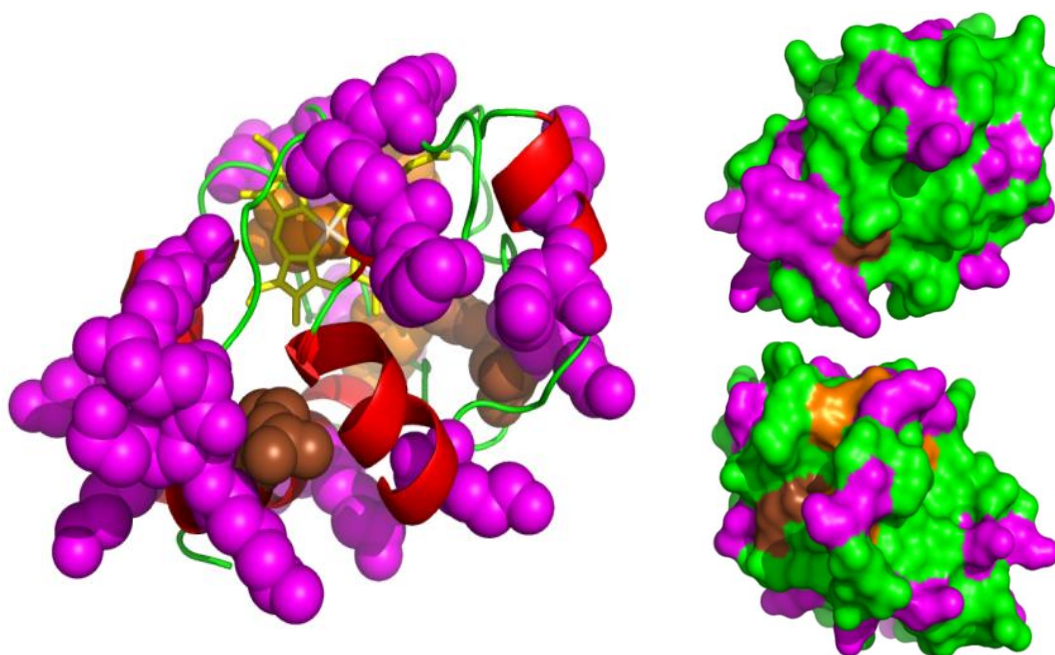
Obrázek 22: Chronopotenciogramy cyt c izolovaného z telecího srdce a jeho apoformy o koncentraci 1 μM . Rozpouštěcí proud -12,5 μA . Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr pH = 6,5. Vložený obrázek: zvětšená oblast od -1,4 do -2,0 V.

Kvalitativní rozdíly mezi chronopotenciogramy cyt c izolovaného z koňského a telecího srdce nebyly pozorovány (srovnej obrázky 22 a 23). Byl identifikován katalytický pík H cyt c při potenciálu kolem -1,9 V. V případě apocytochromů byl katalytický pík H pozorován při potenciálech kolem -1,8 V. Za elektrokatalytický pík H odpovídají Cys a bazická (Lys, Arg, His) aminokyselinová residua lokalizované na povrchu proteinu, které interagují s povrchem elektrody a zapojují do reakce katalytického vylučování vodíku (CHER) [31,32,33]. U obou apofořem byl pozorován nárůst výšky píků H a jeho posun směrem k pozitivnějším potenciálům ve srovnání s elektrokatalytickými odezvami nativních fořem proteinu. Uvedené poukazuje na usnadněný průběh elektrokatalytické reakce v případě obou apofořem, jenž může být způsobeno rozvolněním jejich struktury, která pravděpodobně umožňuje zapojení vyššího počtu elektrokatalyticky aktivních center molekuly do sledovaného elektrodového děje, tj. CHER.



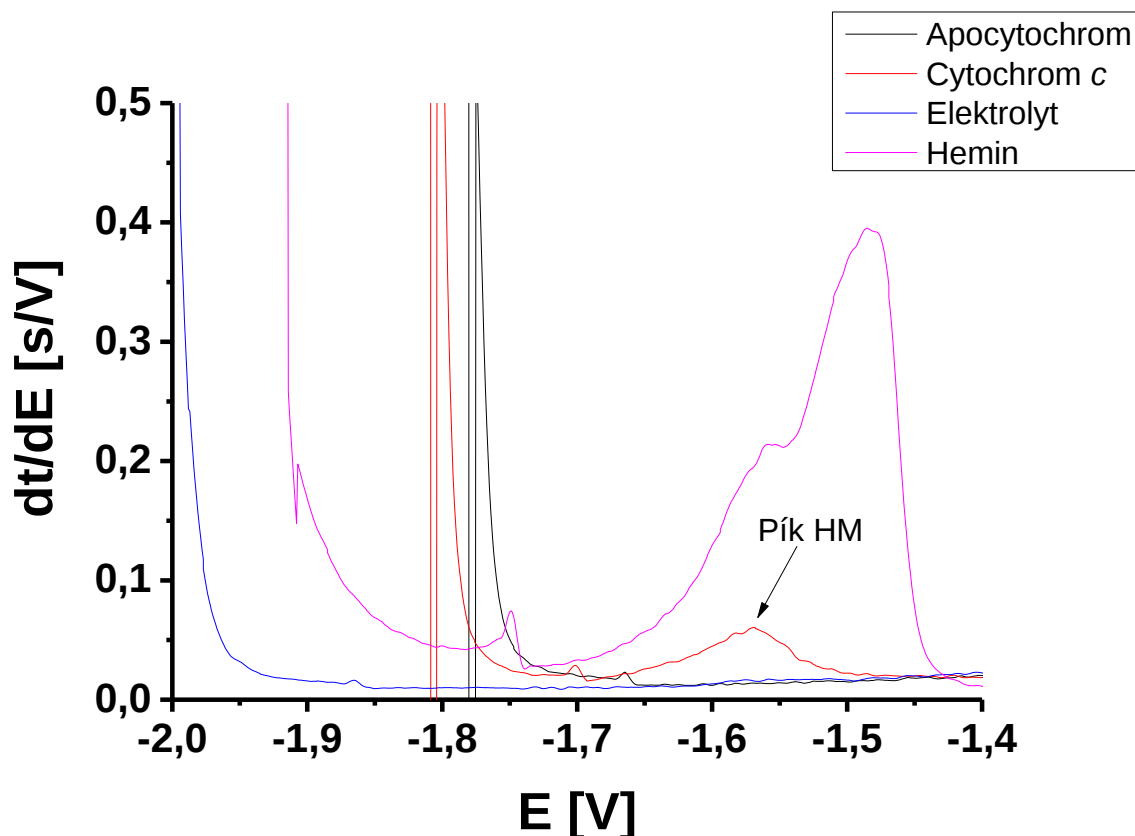
Obrázek 23: Chronopotenciogramy cytochromu c izolovaného z koňského srdce a jeho apoformy o koncentraci 1 μM . Rozpouštěcí proud -12,5 μA . Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPISA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr pH = 6,5.

Elektrokatalyticky aktivní bazická aminokyselinová residua jsou ukázána na modelu cyt c izolovaného z koňského srdce pomocí programu PyMOL. K dispozici je kalotový model pro zobrazení trojrozměrného uspořádání (obrázek 24, vlevo) a povrchové modely molekuly z přední i zadní strany (obrázek 24, vpravo).

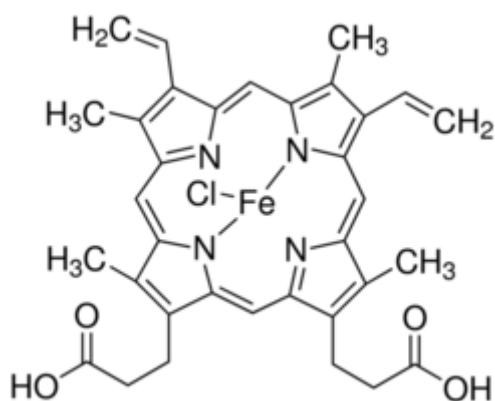


Obrázek 24: Modely cyt c izolovaného z koňského srdce s vyznačenými Lys – fialová (18); Arg – hnědá (2); His – oranžová (3); Hem – žlutá; Alfa-helix – červená. Připraveno pomocí PyMOL.

V chronopotenciogramu obou zkoumaných cyt c byl také identifikován redukční pík samotného hemu (pík HM) při potenciálu kolem -1,6 V (viz vložené chronopotenciogramy v obrázcích 22 a 23), který se v záznamech apocytochromů nevyskytuje. Pro potvrzení, zda se jedná opravdu o signál hemu, byla provedena komparativní analýza (obrázek 25) samotného heminu, lišící se od hemu typu c pouze atomem chlóru (obrázek 26).



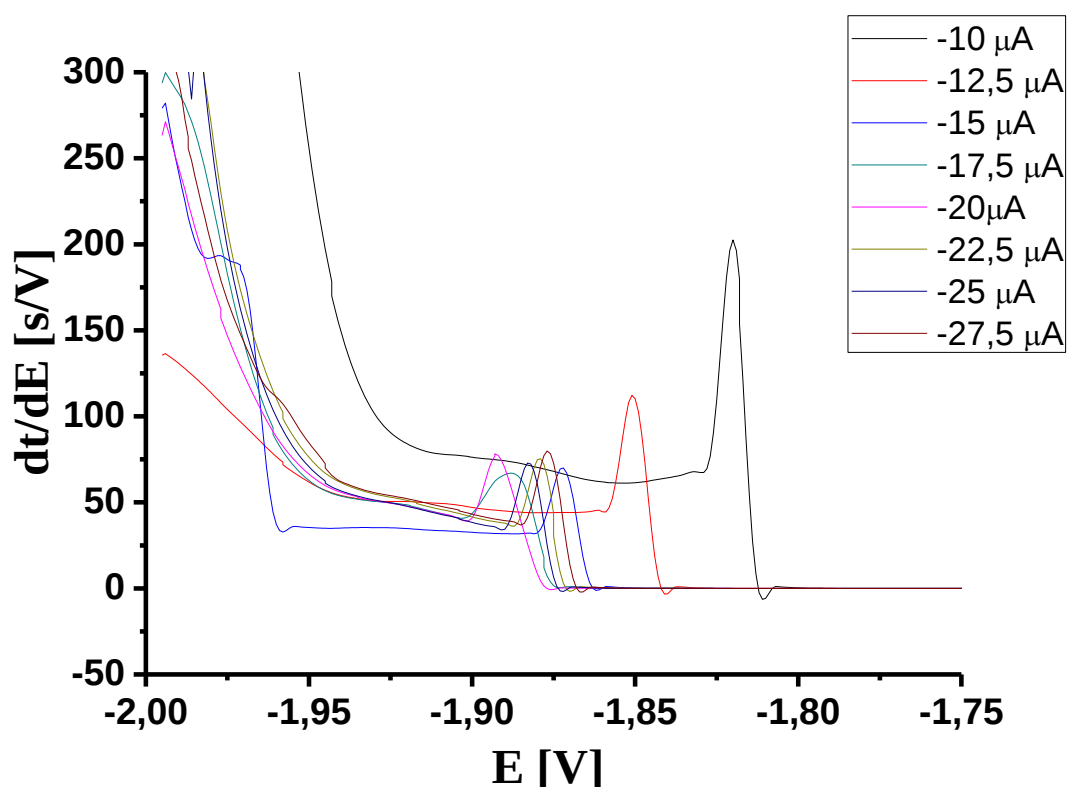
Obrázek 25: Chronopotenciogramy cytochromu c izolovaného z telecího srdce, jeho apoformy a samotného heminu o koncentraci 1 μ M. Rozpouštěcí proud -20 μ A. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr pH = 6,5.



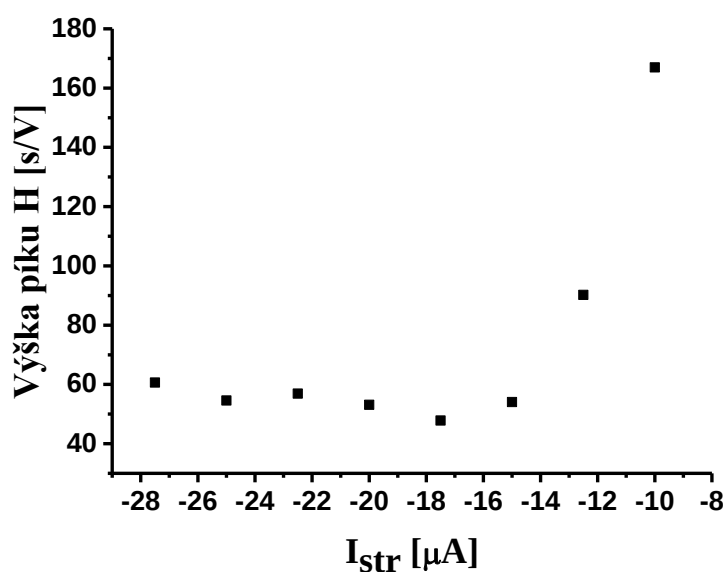
Obrázek 26: Struktura heminu.

5.6.1 Vliv rozpouštěcího proudu

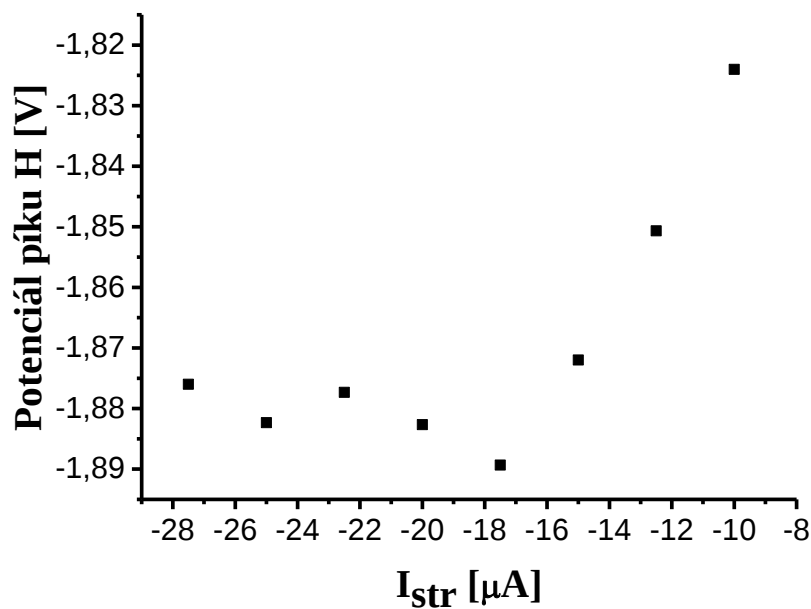
Dále byla studována závislost výšky a potenciálu píku H cyt c na rozpouštěcím proudu (obrázek 27). Jak je vidět, se zápornějším rozpouštěcím proudem, klesá výška píku H (obrázek 28) a posouvá se k zápornějším potenciálům (obrázek 29). Průběh obou závislostí poukazuje na elektrokatalytický děj. K uvedeným analýzám byl použit cyt c izolovaný z telecího srdce a pro další experimenty byl použit rozpouštěcí proud $-12,5 \mu\text{A}$, při kterém poskytuje cyt c dobře vyvinutý a reprodukovatelný pík H.



Obrázek 27: Chronopotenciogramy píku H cytochromu c izolovaného z telecího srdce při různých rozpouštěcích proudech. $c(\text{cyt c}) = 1 \mu\text{M}$. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.



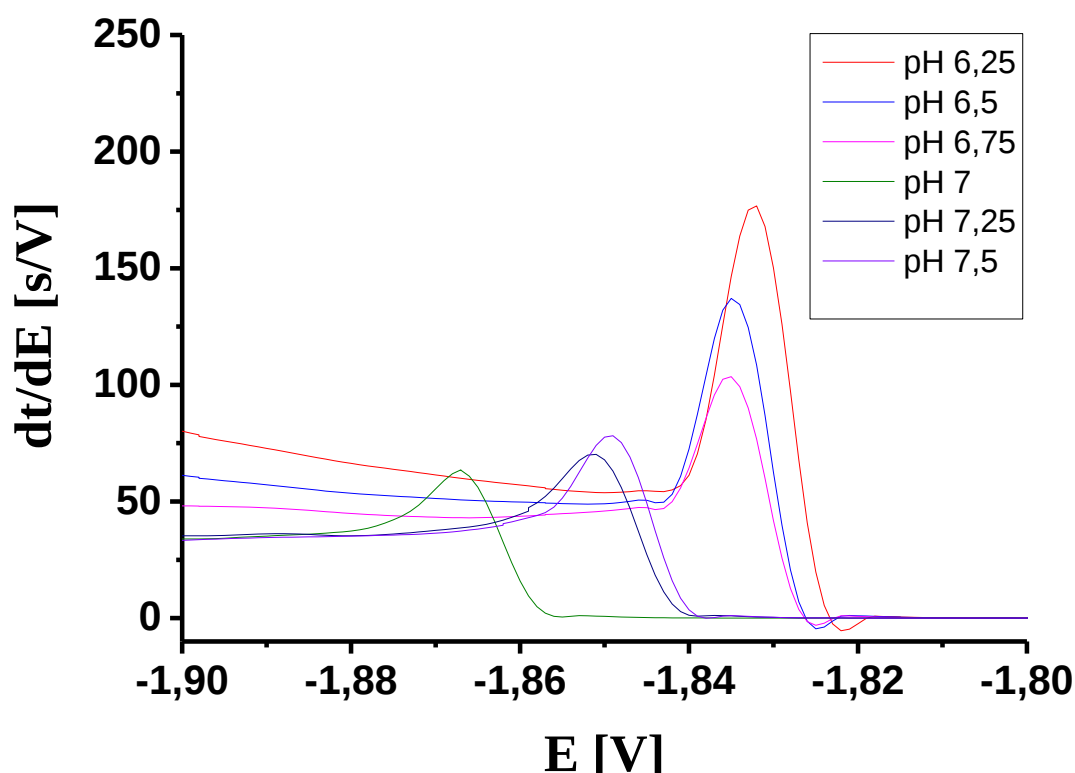
Obrázek 28: Závislost výšky píku H cytochromu c izolovaného z telecího srdce na rozpouštěcím proudu (I_{str}). $c(\text{cyt } c) = 1 \mu M$. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $pH = 6,5$.



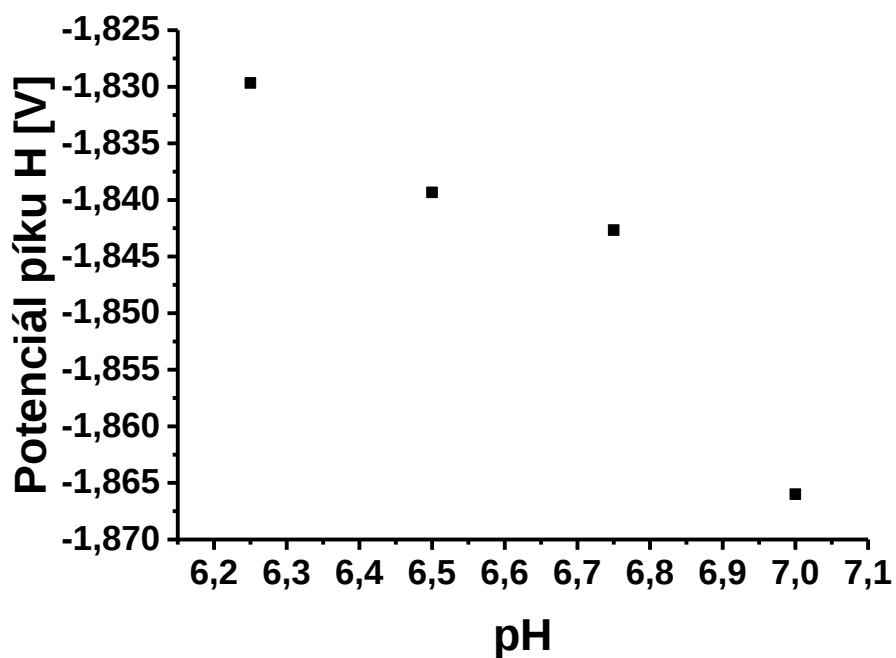
Obrázek 29: Závislost potenciálu píku H cytochromu c izolovaného z telecího srdce na rozpouštěcím proudu (I_{str}). $c(\text{cyt } c) = 1 \mu M$. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $pH = 6,5$.

5.6.2 Vliv pH

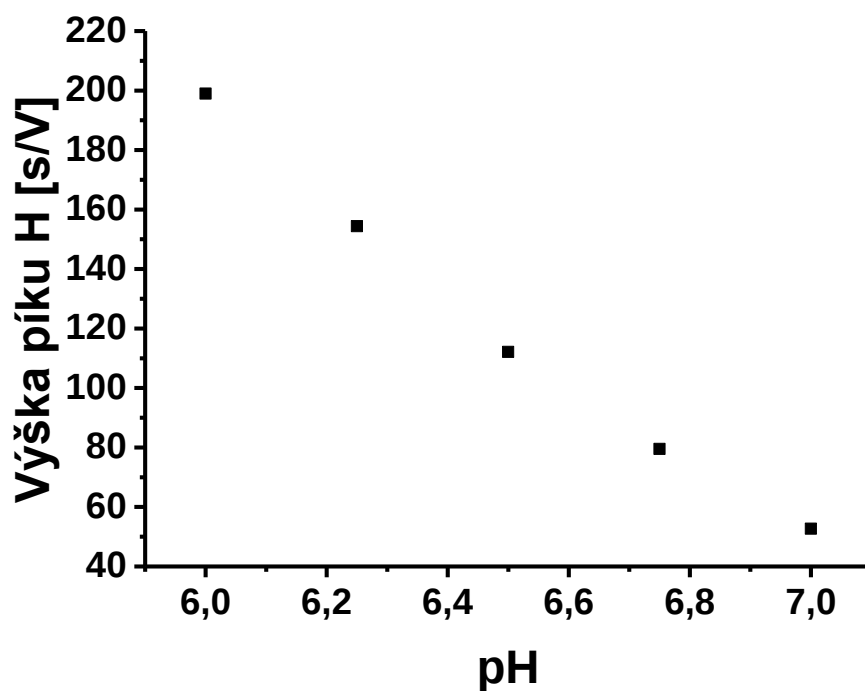
Zkoumán byl také vliv pH základního elektrolytu na elektrokatalytický pík H cyt c (obrázek 30). S rostoucím pH docházelo k posunu píku H do zápornějších potenciálů (obrázek 31) a ke snížení katalytického píku H (Obrázek 32), což koresponduje s pozorováním ostatních autorů [32,34], kdy se snižující se hodnotou pH prostředí roste koncentrace protondonoru v základním elektrolytu, což přispívá k efektivnějšímu průběhu CHER.



Obrázek 30: Chronopotenciogramy (pík H) cytochromu c izolovaného z telecího srdce při různých pH. $c(\text{cyt } c) = 1 \mu\text{M}$. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Rozpouštěcí proud $-12,5 \mu\text{A}$. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton- Robinsonův pufr.



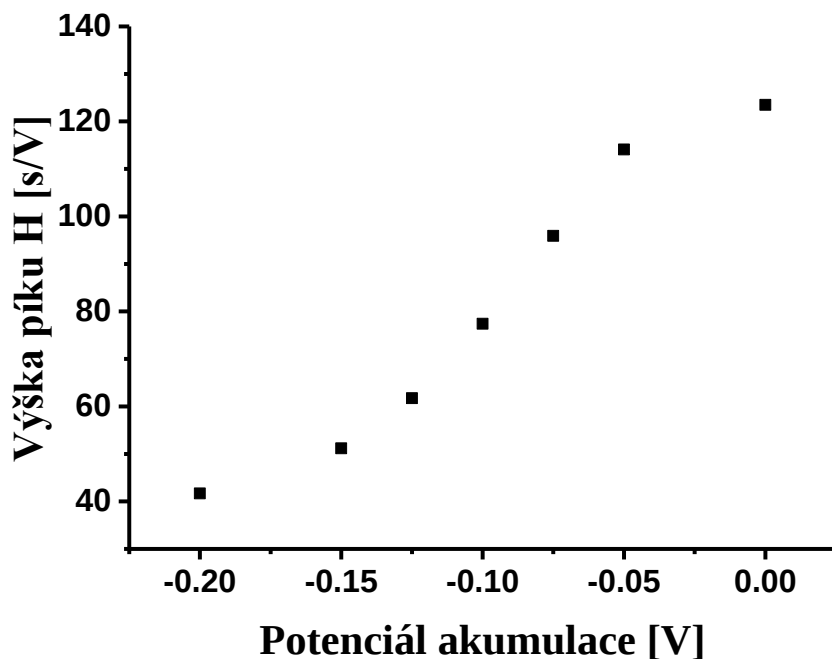
Obrázek 31: Závislost potenciálu píku H cytochromu c izolovaného z telecího srdce na pH $c(\text{cyt } c) = 1 \mu\text{M}$. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr.



Obrázek 32: Závislost výšky píku H cytochromu c izolovaného z telecího srdce na pH. $c(\text{cyt } c) = 1 \mu\text{M}$. Adsorpce 10 s při potenciálu 0 V. Rozpouštěcí proud $-12,5 \mu\text{A}$. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr.

5.6.3 Vliv potenciálu akumulace

Studován byl i vliv potenciálu akumulace na výšku píku H cyt c (obrázek 33). Čím byl potenciál akumulace blíže nule, pík H narůstal. Uvedené naznačuje, že adsorbovanou vrstvu proteinu je vhodné vytvářet při potenciálech od 0 V do 50 mV, což zajišťuje nejvyšší elektrokatalytické odezvy.



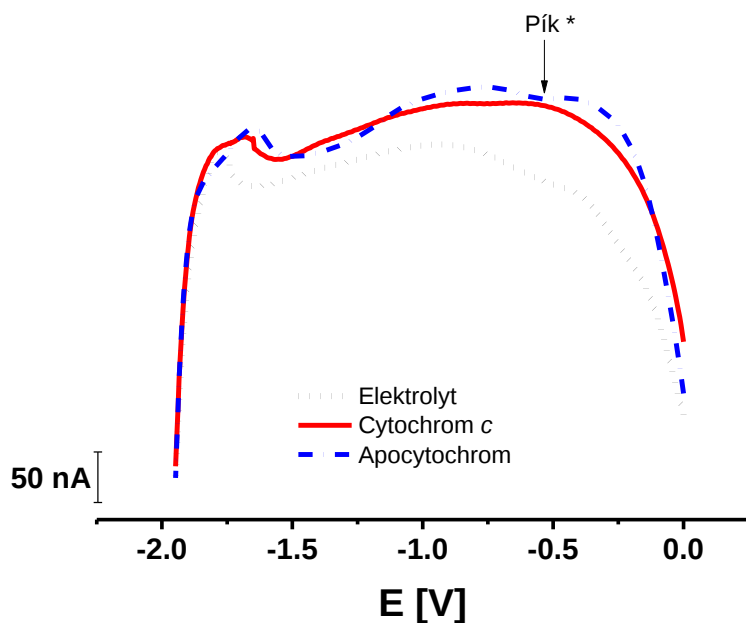
Obrázek 33: Závislost výšky píku H cytochromu c izolovaného z telecího srdce na potenciálu akumulace. $c(\text{cyt } c) = 0,1 \mu\text{M}$. Adsorpce 30 s. Rozpouštěcí proud $-27 \mu\text{A}$. Měřeno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.

5.7 In situ voltametrická analýza cytochromu c a apocytochromu

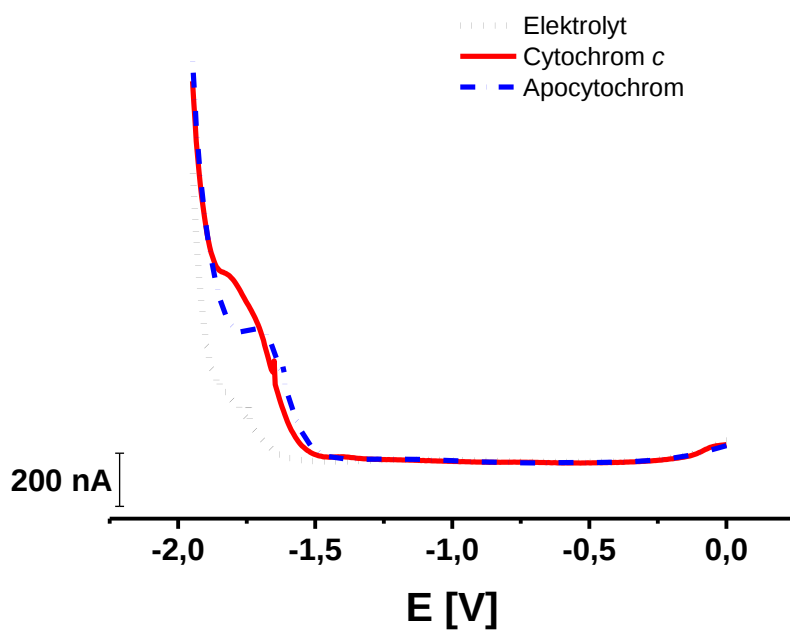
5.7.1 Voltametrie se střídavou složkou napětí

Provedeny byly taktéž experimenty za použití voltametrie se střídavou složkou napětí (ACV) a to jak v módu out-of-phase (obrázek 34, obrázek 36) který reflektuje adsorpčně desorpční děje a taktéž v módu in-phase, který obecně reflektuje děje založené spíše na výměně elektronů [35]. Out-of-phase AC voltamogramy potvrzují, že adsorbovaná vrstva proteinů se v průběhu elektrochemického skenu nedesorbuje a pravděpodobně nepodléhá rozsáhlým reorientačním procesům. V případě apocytochromů je pozorován pík (*) při potenciálu $-0,6 \text{ V}$, který pravděpodobně souvisí s redukcí Hg-S vazby vzniklé mezi dvěma Cys proteinu a povrchem elektrody. Redukce Hg-S vazby je obvykle spojena s reorientací

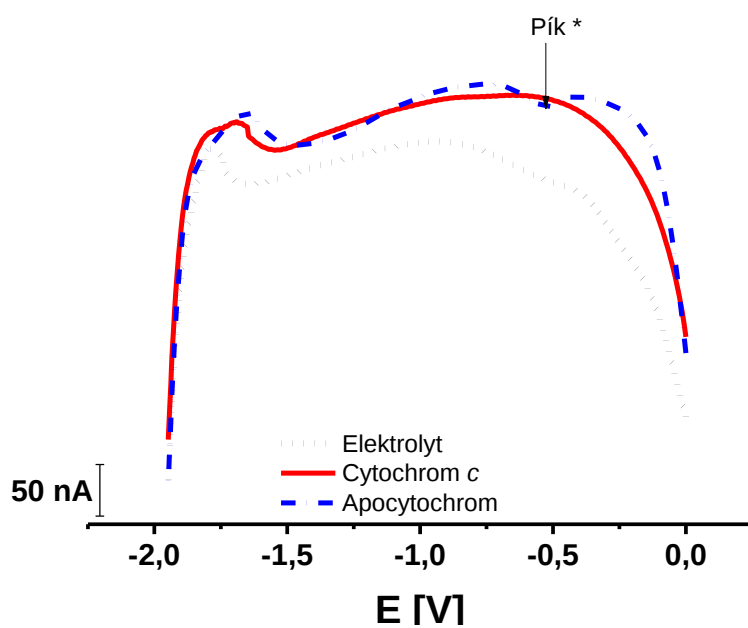
adsorbované vrstvy proteinu [36]. In-phase AC voltamogramy (obrázek 35, obrázek 37) potvrzují katalytické vylučování vodíku a výsledky korespondují s výsledky dosaženými pomocí CPSA.



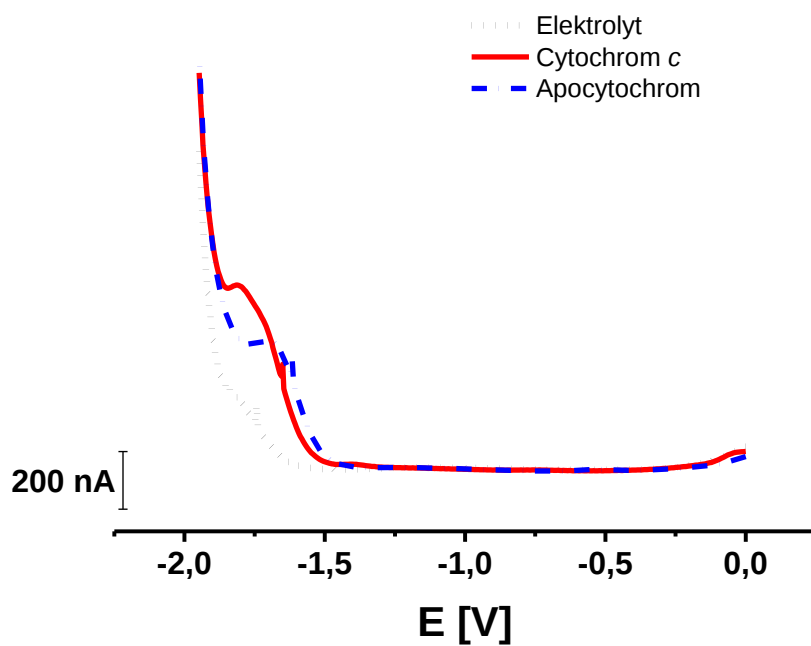
Obrázek 34: AC voltamogram (out-of phase) cytochromu *c* izolovaného z telecího srdce o koncentraci 1 μM . Použita HMD elektroda (in situ). Základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.



Obrázek 35: AC voltamogram (in-phase) cytochromu *c* izolovaného z telecího srdce o koncentraci 1 μM . Použita HMD elektroda (in situ). Základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.



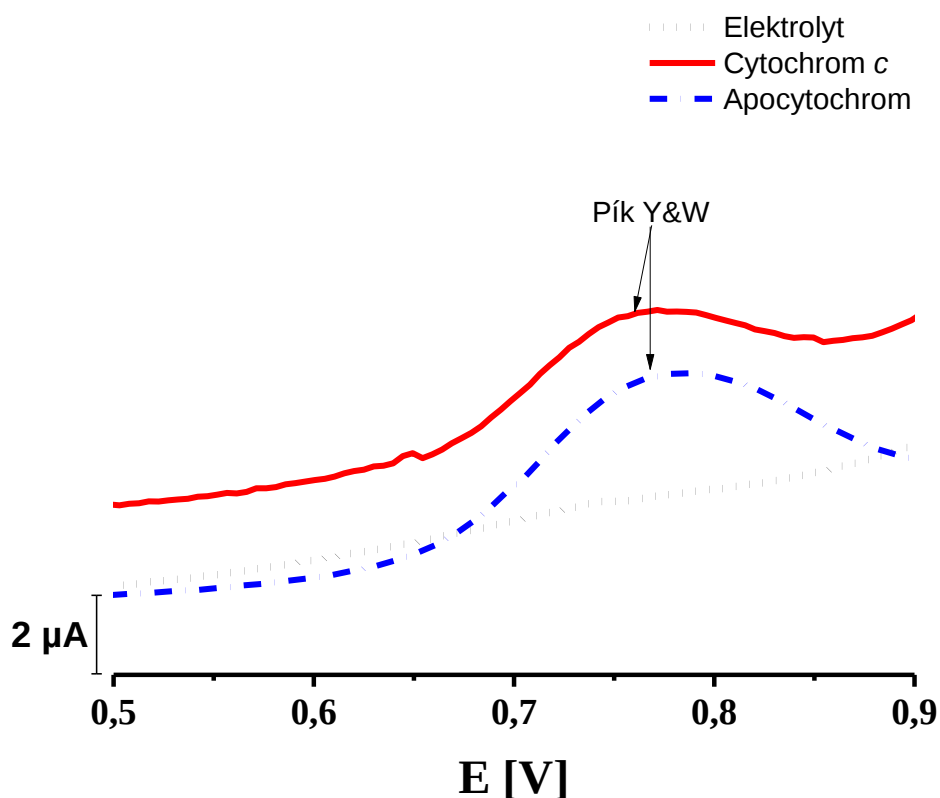
Obrázek 36: AC voltamogram (out-of phase) cytochromu c izolovaného z koňského srdce o koncentraci $1 \mu\text{M}$. Použita HMD elektroda (in situ). Základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.



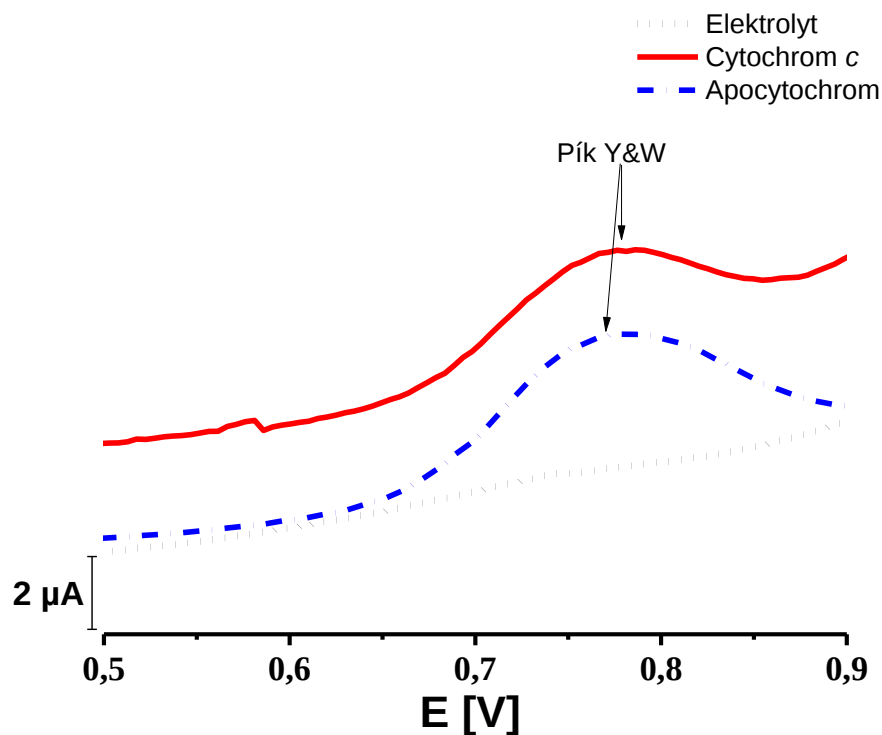
Obrázek 37: AC voltamogram (in-phase) cytochromu c izolovaného z koňského srdce o koncentraci $1 \mu\text{M}$. Použita HMD elektroda (in situ). Základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.

5.7.2 Voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím

Jako poslední elektrochemická technika byla použita voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV) pro analýzu cyt *c* a jejich apoforem izolovaných z telecího (obrázek 38) i koňského (obrázek 39) srdce, kde je zřetelný oxidační pík Tyr resp. Trp (pík Y&W) při potenciálu kolem +0,77 V, což je v souladu s dřívějšími SWV analýzami různých proteinů [37]. Tyr residua jsou znázorněny na molekulovém modelu (obrázek 40). Cyt *c* obsahuje pouze 1 Trp zbytek, jehož participaci na anodické reakci nelze vyloučit.

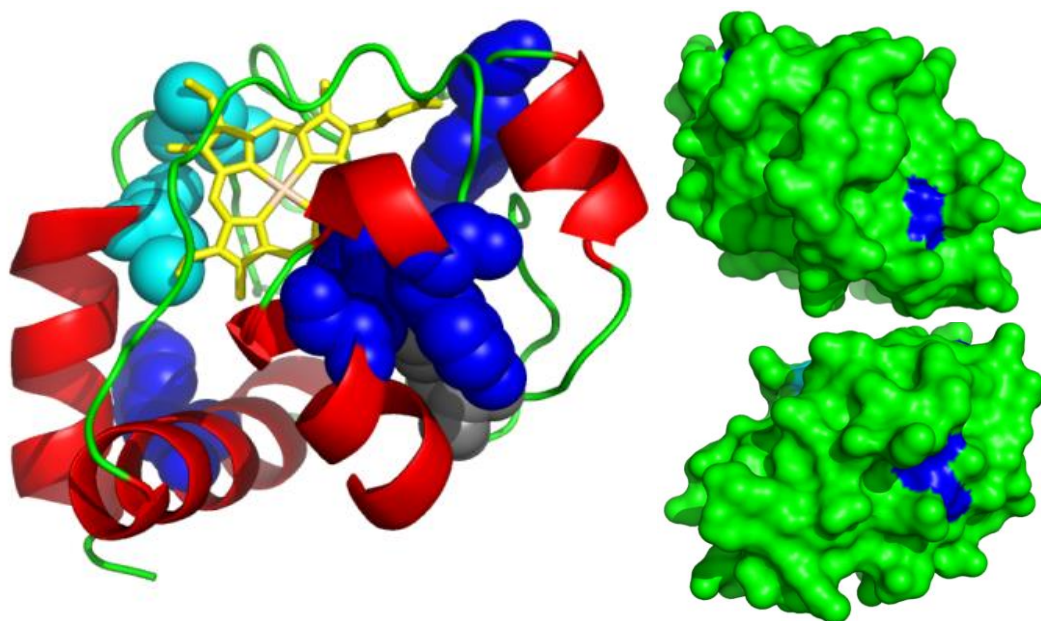


Obrázek 38: Square wave voltametrie (*in situ*) cytochromu *c* izolovaného z telecího srdce o koncentraci $1 \mu M$. Použita elektroda z pyrolytického grafitu. Základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $pH = 6,5$.



Obrázek 39: Square wave voltametrie (in situ) cytochromu c izolovaného z koňského srdce o koncentraci $1 \mu\text{M}$. Použita elektroda z pyrolytického grafitu. Základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr, $\text{pH} = 6,5$.

Opět byly vytvořeny kalotový a povrchové modely cyt c pro vizualizaci elektroaktivních center molekuly (Obrázek 40) pomocí programu PyMOL.



Obrázek 40: Modely cyt c s vyznačenými Trp – šedá (1); Tyr – modrá (4); Cys – tyrkysová (2); Hem – žlutá; Alfa-helix – červená. Připraveno pomocí PyMOL.

6 ZÁVĚR

Byly studovány cytochromy *c* izolované z koňského a telecího srdce, včetně jejich apoform. Apocytochromy byly připraveny eliminací hemu z cyt *c* a následnou purifikací. Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu ukázala větší elektroforetickou pohyblivost nativních cyt *c* oproti apoformám, pravděpodobně způsobenou kompaktnější molekulou nativních cyt *c*. Denaturační gely dokázaly, že nedochází ke štěpení apocytochromů během jejich přípravy. Toto bylo potvrzeno i pomocí Westnova přenosu s monoklonální a polyklonální protilátkou. Obě protilátky se navázaly jak na nativní cyt *c*, tak i na jejich apoformy. V chronopotenciogramech se podařilo identifikovat nejenom katalytický pík H nativního i apocytochromu, jakožto signál proteinové části, ale také signál samotného hemu (pík HM) u nativního cyt *c*. Pro ověření, zda se jedná skutečně o signál hemu, byla provedena komparativní analýza se samotným heminem. Závěrem byly studovány elektrochemické vlastnosti obou forem proteinu pomocí ACV a SWV, kde se podařilo identifikovat píky Tyr u nativních cyt *c* i jejich apoform.

Výsledky předložené v této práci přispívají k lepšímu pochopení redoxních vlastností konjugovaných proteinů a mohou být dále využity jako základ pro další studie, například pro zkoumání interakcí cyt *c* s lipozomy obsahující kardiolipiny.

Seznam zkratek

acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ACV	voltametrie se střídavou složkou napětí
Apaf-1	aktivující faktor apoptotické proteázy 1
ATP	adenosintrifosfát
CHER	reakce katalytického vylučování vodíku
CL	kardiolipin
CO	oxid uhličitý
CPSA	rozpuštěcí chronopotenciometrie za konstantního proudu
cyt c	cytochrom c
cyt c-CL	komplex cytochrom c kardiolipin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DISC	signalizační komplex vyvolávající smrt
GuHCl	guanidin hydrochlorid
HDX	vodíko-deuteriová výměna
HMDE	rtuťová kapková visící elektroda
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
konc.	koncentrovaný
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NO	oxid dusnatý
RIXS	rezonanční neelastický rentgenový rozptyl
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAM	samoskladná monovrstva

SWV	voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím
TROSY	transverse relaxation-optimized spectroscopy
TNF	tumor nekrotizující faktor

7 LITERATURA

- [1] C.J.A. Wallace, Understanding cytochrome c function: engineering protein structure by semisynthesis, *FASEB J.* 7 (1993) 505-515.
- [2] M.O. Pereverzev, T.V. Vygodina, A.A. Konstantinov, V.P. Skulachev, Cytochrome c, an ideal antioxidant, *Biochemical Society Transactions* 31 (2003) 1312-1315.
- [3] Y.A. Vladimirov, E.V. Proskurnina, A.V. Alekseev, Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome c-cardiolipin complex, *Biochemistry (Moscow)* 78 (2013) 1086-1097.
- [4] P. Ascenzi, F. Polticelli, M. Marino, R. Santucci, M. Coletta, Cardiolipin drives cytochrome c proapoptotic and antiapoptotic actions, *IUBMB Life* 63 (2011) 160-165.
- [5] S. Zaidi, M.I. Hassan, A. Islam, F. Ahmad, The role of key residues in structure, function, and stability of cytochrome-c, *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (2014) 229-255.
- [6] R. Hill, D. Keilin, Porphyrin of component c of cytochrome and its relationship to other porphyrins, *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 107 (1930) 286-292.
- [7] J.M. Stevens, Cytochrome c as an experimental model protein, *Metallomics* 3 (2011) 319-322.
- [8] N. Cibiček, J. Vacek, Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně, (2014) 112-117.
- [9] X. Jiang, X. Wang, Cytochrome c-mediated apoptosis, *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004) 87-106.
- [10] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics, *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257.
- [11] E.A. Slee, M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.-G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green, S.J. Martin, Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner, *The Journal of Cell Biology* 144 (1999) 281-292.
- [12] R.P. Ambler, Sequence variability in bacterial cytochromes c, *Biochim Biophys Acta* 1058 (1991) 42-47.
- [13] I. Bertini, G. Cavallaro, A. Rosato, Cytochrome c: Occurrence and functions, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* 106 (2006) 90-115.
- [14] E. Margoliash, E.L. Smith, G. Kreil, H. Tuppy, Amino-Acid Sequence of Horse Heart Cytochrome C : The Complete Amino-acid Sequence, *Nature* 192 (1961) 1125-1127.
- [15] T. Nakashima, H. Higa, H. Matsubara, A.M. Benson, K.T. Yasunobu, The Amino Acid Sequence of Bovine Heart Cytochrome c, *Journal of Biological Chemistry* 241 (1966) 1166-1177.
- [16] R. Swanson, B.L. Trus, N. Mandel, G. Mandel, O.B. Kallai, R.E. Dickerson, Tuna cytochrome c at 2.0 Å resolution. I. Ferricytochrome structure analysis, *J Biol Chem* 252 (1977) 759-775.
- [17] T. Kroll, R.G. Hadt, S.A. Wilson, M. Lundberg, J.J. Yan, T.-C. Weng, D. Sokaras, R. Alonso-Mori, D. Casa, M.H. Upton, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, Resonant Inelastic X-ray Scattering on Ferrous and Ferric Bis-imidazole Porphyrin and Cytochrome c: Nature and Role of the Axial Methionine-Fe Bond, *Journal of the American Chemical Society* 136 (2014) 18087-18099.
- [18] J.M. García-Heredia, I. Díaz-Moreno, P.M. Nieto, M. Orzáez, S. Kocanis, M. Teixeira, E. Pérez-Payá, A. Díaz-Quintana, M.A. De la Rosa, Nitration of tyrosine 74 prevents human cytochrome c to play a key role in apoptosis signaling by blocking caspase-9

- activation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797 (2010) 981-993.
- [19] A. Almohammed, S.M. Kapetanaki, B.R. Wood, E.L. Raven, N.M. Storey, A.J. Hudson, Spectroscopic analysis of myoglobin and cytochrome c dynamics in isolated cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation, 2015.
- [20] C. Wettstein, C. Kyne, A. M. Doolan, H. Mohwald, P.B. Crowley, F. Lisdat, Study of Cytochrome c-DNA Interaction - Evaluation of Binding Sites on the Redox Protein, *Nanoscale* 6 (2014) 13779-13786.
- [21] Y. Zhang, E.L.W. Majumder, H. Yue, R.E. Blankenship, M.L. Gross, Structural Analysis of Diheme Cytochrome c by Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Homology Modeling, *Biochemistry* 53 (2014) 5619-5630.
- [22] S. Ciampi, J.J. Gooding, Direct Electrochemistry of Cytochrome c at Modified Si(100) Electrodes, *Chemistry – A European Journal* 16 (2010) 5961-5968.
- [23] K. Niki, J.R. Sprinkle, E. Margoliash, Intermolecular biological electron transfer: an electrochemical approach, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 37-40.
- [24] T. Sagara, S. Igarashi, H. Sato, K. Niki, Voltammetric application of electromodulated electroreflection absorption spectroscopy: electroreflectance voltammetry as an in situ spectroelectrochemical technique, *Langmuir* 7 (1991) 1005-1012.
- [25] D.E. Khoshtariya, J. Wei, H. Liu, H. Yue, D.H. Waldeck, Charge-Transfer Mechanism for Cytochrome c Adsorbed on Nanometer Thick Films. Distinguishing Frictional Control from Conformational Gating, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 7704-7714.
- [26] W.R. Fisher, H. Taniuchi, C.B. Anfinsen, On the Role of Heme in the Formation of the Structure of Cytochrome c, *Journal of Biological Chemistry* 248 (1973) 3188-3195.
- [27] E.B. Sawyer, E. Stephens, S.J. Ferguson, J.W.A. Allen, P.D. Barker, Aberrant attachment of heme to cytochrome by the Ccm system results in a cysteine persulfide linkage, *Journal of the American Chemical Society* 132 (2010) 4974-4975.
- [28] J. Vacek, J. Vrba, M. Zatloukalová, M. Kubala, Electrochemical oxidation of proteins using ionic liquids as solubilizers, adsorption solvents and electrolytes, *Electrochimica Acta* 126 (2014) 31-36.
- [29] N.P. Malek, H. Sundberg, S. McGrew, K. Nakayama, T.R. Kyriakidis, J.M. Roberts, A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase, *Nature* 413 (2001) 323-327.
- [30] S.A. Maxwell, A. Rivera, Proline Oxidase Induces Apoptosis in Tumor Cells, and Its Expression Is Frequently Absent or Reduced in Renal Carcinomas, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 9784-9789.
- [31] M. Heyrovský, Catalytic Hydrogen Evolution at Mercury Electrodes from Solutions of Peptides and Proteins, in: F.S. Emil Paleček, J. Wang (Eds.), *Perspectives in Bioanalysis*, Elsevier, 2005, pp. 657-687.
- [32] V. Dorčák, V. Vargová, V. Ostatná, E. Paleček, Lysine, Arginine, and Histidine Residues in Peptide-Catalyzed Hydrogen Evolution at Mercury Electrodes, *Electroanalysis* 27 (2015) 910-916.
- [33] M. Havlikova, M. Zatloukalova, J. Ulrichova, P. Dobes, J. Vacek, Electrocatalytic assay for monitoring methylglyoxal-mediated protein glycation, *Analytical Chemistry* 87 (2015) 1757-1763.
- [34] T. Doneux, V. Ostatná, E. Paleček, On the mechanism of hydrogen evolution catalysis by proteins: A case study with bovine serum albumin, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 9337-9343.

- [35] L. Havran, S. Billová, E. Palecek, Electroactivity of avidin and streptavidin. Avidin signals at mercury and carbon electrodes respond to biotin binding, *Electroanalysis* 16 (2004) 1139-1148.
- [36] R. Večerková, L. Hernychová, P. Dobeš, J. Vrba, B. Josypčuk, M. Bartošík, J. Vacek, Investigation of protein FTT1103 electroactivity using carbon and mercury electrodes. Surface-inhibition approach for disulfide oxidoreductases using silver amalgam powder, *Analytica Chimica Acta* 830 (2014) 23-31.
- [37] V. Brabec, V. Mornstein, Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions, *Biochimica et biophysica acta* 625 (1980) 43-50.