

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Adéla Hovorková

**Optimalizace metody stanovení enzymové aktivity
flavinových monooxygenas**

Optimization of flavin monooxygenase activity assay

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha, 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

.....

Adéla Hovorková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla vyjádřit poděkování RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost, cenné rady a zkušenosti, které mi předala při vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala mé rodině, která mi byla velkou oporou.

ABSTRAKT

Flavinové monoxygenasy, jako biotransformační enzymy katalyzující oxidaci širokého spektra cizorodých látek v organismech, byly dlouho v porovnání s cytochromy P450, rozsáhlejší skupinou biotransformačních enzymů, přehlíženy. Ke studiu metabolismu cizorodých látek se často užívají jaterní mikrosomy, které obsahují oba zmíněné biotransformační enzymy. Jejich katalytická aktivita se může z důvodu potřeby stejných kofaktorů překrývat, a proto je potřebné je vhodně rozlišit.

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací metody pro stanovení enzymové aktivity flavinových monoxygenas v jaterních potkaních mikrosomech. Modelovou reakcí pro optimalizaci metody byla oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu na methyl-*p*-tolylsulfoxid. Pro stanovení aktivity byly stanoveny nejvhodnější podmínky: prostředí o pH 9,5, 2mM methyl-*p*-tolylsulfid a 10minutová doba inkubace. Bylo zjištěno, že na oxidaci methyl-*p*-tolylsulfidu se podílejí i cytochromy P450, izoforma 1A1 nejvíce. Testovány byly i různé inhibitory obou výše zmíněných biotransformačních enzymů (kyselina lipoová, methimazol, Brij 35 a Triton X-100). Jako vhodný inhibitor katalytického účinku cytochromů P450 byl vybrán Brij 35, který neměl na rychlost oxidace katalyzovanou flavinovými oxygenasami žádný vliv.

V závěru práce byla z prozatím neznámého důvodu opakovaně zaznamenána tvorba vysokého množství produktu reakce methyl-*p*-tolylsulfoxidu i ve slepých vzorcích. Použitá metoda proto nemůže být doporučena pro stanovení enzymové aktivity flavinových monoxygenas v mikrosomálních frakcích a je na místě tuto metodu dále zkoumat a rozvíjet.

Klíčová slova: cytochromy P450, enzymová aktivita, flavinové monoxygenasy, methyl-*p*-tolylsulfid, methyl-*p*-tolylsulfoxid, potkaní jaterní mikrosomy.

ABSTRACT

Flavin monooxygenases, biotransformation enzymes catalyzing the oxidation of broad spectrum of xenobiotics, have long been overlooked compared to cytochromes P450, a larger group of biotransformation enzymes. Liver microsomes containing both flavin monooxygenases and cytochrome P450 are often used to study metabolism of xenobiotics. The catalytic activity of both enzymes may overlap due to the need of identical cofactors and it is therefore necessary to differentiate them appropriately.

This bachelor thesis deals with the optimization of the method for the determination of enzyme activity of flavin monooxygenases in rat liver microsomes. Model reaction for optimization of the method was the oxidation of methyl *p*-tolyl sulfide to methyl *p*-tolyl sulfoxide. To determine the activity, the most suitable conditions were set: sample buffer with pH 9.5, 2 mM methyl *p*-tolyl sulfide and a 10 minute incubation time. It has been found that in the oxidation of methyl *p*-tolyl sulfide cytochromes P450 are also involved, mostly isoform 1A1. Various inhibitors of both of the above mentioned biotransformation enzymes (lipoic acid, methimazole, Brij 35 and Triton X-100) have also been tested. Brij 35 was selected as a suitable inhibitor of the catalytic action of cytochromes P450, because it had no effect on the rate of oxidation catalyzed by flavin oxygenases.

For the hitherto unknown reason, the high amounts of the reaction product methyl *p*-tolyl sulfoxide were repeatedly found in blanks. Therefore, the method used cannot be recommended for the determination of the enzymatic activity of flavin monooxygenases in microsomal fractions and it is recommended to further investigate and develop this method.

Keywords: cytochromes P450, enzyme activity, flavin monooxygenases, methyl *p*-tolyl sulfide, methyl *p*-tolyl sulfoxide, rat liver microsomes.

[IN CZECH]

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
1.1 Metabolismus cizorodých látek.....	9
1.1.1 Xenobiotika	9
1.1.2 Biotransformace	10
1.1.2.1 I. fáze biotransformace	11
1.1.2.2 II. fáze biotransformace.....	11
1.1.3 Biotransformační enzymy	11
1.2 Oxygenasy.....	12
1.2.1 Monooxygenasy	12
1.2.2 Flavinové monooxygenasy	13
1.2.2.1 Struktura flavinových monooxygenas	14
1.2.2.2 Katalytický mechanismus	15
1.2.3 Cytochromy P450.....	16
1.3 Stanovení aktivity flavinové monooxygenasy	17
1.3.1 Enzymová aktivita.....	17
1.3.2 Metody stanovení aktivity flavinových monooxygenas	18
1.3.3 Specifita flavinových monooxygenas a cytochromů P450.....	20
2. CÍL PRÁCE.....	21
3. MATERIÁL A METODY.....	22
3.1 Použité přístroje a pomůcky.....	22
3.2. Použité chemikálie a materiál	23
3.3 Použité metody.....	24
3.3.1 Příprava inkubačních směsí při optimalizaci podmínek stanovení enzymové aktivity flavinových monooxygenas.....	24
3.3.2 Příprava inkubačních směsí s optimalizovanými podmínkami pro stanovení enzymové aktivity flavinových monooxygenas.....	25
3.3.3 Separace oxidačního metabolitu methyl-p-tolylsulfidu.....	26
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1 Vliv pH na oxidaci methyl-p-tolylsulfidu flavinovými monooxygenasami.....	27
4.2 Závislost rychlosti oxidace methyl-p-tolylsulfidu na koncentraci substrátu	28
4.3 Vliv inkubační doby na aktivitu flavinových monooxygenas	29
4.4 Oxidace methyl-p-tolylsulfidu potkaními izoformami cytochromu P450.....	29
4.5 Vliv inhibitorů na rychlost oxidace methyl-p- tolylsulfidu.....	30
4.6 Inkubační směsi s mikrosomy	32

4.7 Vliv koncentrace enzymu na rychlost oxidace MTS.....	34
4.8 Neenzymová tvorba methyl-p-tolylsulfoxidu ve slepých vzorcích	35
5 ZÁVĚR	37
SEZNAM LITERATURY.....	38

SEZNAM ZKRATEK

CYP	Cytochromy P450
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADOOH	Peroxyflavin
FMO	Flavinové monooxygenasy
K_m	Michaelisova konstanta
MTS	Methyl- <i>p</i> -tolylsulfid
MTSO	Methyl- <i>p</i> -tolylsulfoxid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBI	N-benzylimidazol

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Metabolismus cizorodých látek

Všechny organismy na Zemi, včetně nás lidí, jsou trvale a nevyhnutelně vystaveny cizorodým chemickým látkám (= xenobiotikům). Těmto látkám mohou být vystaveny úmyslně, užíváním potřebných léčiv a konzumací potravin, nebo neúmyslně, např. působením látek znečišťujících životní prostředí, průmyslových chemikálií, potravinářských aditiv a pesticidů [1,2].

Cizorodé látky mohou mít na organismy různé účinky, které mohou být prospěšné, například v případě léčiv, ale i škodlivé, jako v případě jedů. Působení xenobiotika na organismus však není jednostranné, biologický systém reaguje na přítomnost cizorodé látky a chemicky ji přeměňuje. Proces přeměny cizorodé látky v organismu se rozděluje do čtyř fází: absorpce do organismu, distribuce, biotransformace a eliminace z organismu ven. Tyto čtyři fáze lze souhrnně označit jako metabolismus cizorodých látek [1,3].

1.1.1 Xenobiotika

Xenobiotika, neboli cizorodé látky, jsou látky, které jsou pro metabolismus nepřírodní a cizí. Mezi xenobiotika zahrnujeme jak uměle syntetizované látky – léky, pesticidy, průmyslové chemikálie, tak i látky přírodního původu – alkaloidy, sekundární metabolity rostlin a toxiny produkované plísněmi, rostlinami nebo zvířaty [1,2].

Aby mohlo xenobiotikum v organismu jakkoli účinkovat, musí do něho nejprve vstoupit. Látky se z vnějšího prostředí do organismu dostávají nejčastěji vdechováním a pokožkou. Těmito cestami se látka do organismu často dostává neúmyslně. Běžnou vstupní cestou je také požití cizorodé látky, neboli perorální vstup. Při požití dochází k absorpci látky v celém trávicím traktu. Nejdůležitějším místem absorpce je však tenké střevo. Xenobiotika se mohou do organismu dostávat i jinými způsoby, kterými se aplikují především léky. Jedná se o vstup intravenózně (vpravením do žíly), subkutánně (vpravením pod kůži), intramuskulárně (vpravením do svalu) a intraperitoneálně (vpravením do břišní dutiny) [3].

Cizorodým látkám umožňuje vstup do organismu jejich lipofilní charakter. Lipofilita jim usnadňuje vstup přes buněčné membrány až do krevního řečiště. Malá lipofilní xenobiotika mohou procházet přes membránu pouze prostou pasivní difúzí po koncentračním gradientu. Větší lipofilní xenobiotika se přes membránu nedostanou prostou difúzí a jsou odkázané na membránové přenašeče [2].

Xenobiotika jsou absorbována do krevního řečiště, kterým jsou roznášena po celém těle až k cílovým buňkám. Tuto fázi metabolismu cizorodých látek nazýváme distribuce. Kam bude xenobiotikum distribuováno, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech xenobiotika, na jeho lipofilitě a také na prokrvenosti tkáně. Lipofilní látky dobře prostupují buněčnými membránami a mají tendenci se hromadit ve tkáních, které jsou bohaté na tuky. Centrální nervový systém je proti vstupu cizorodých látek ochraňován více než jiné orgány, a to díky hematoencefalické bariéře, která je bariérou mezi krví a mozkiem [1,3].

Lidé denně přijímají obrovské množství potenciálně škodlivých chemikálií. Lipofilita, usnadňující jejich vstup do organismu, ale zároveň znemožňuje jejich potřebnou eliminaci z organismu ven. Organismus tento problém řeší pomocí biotransformačních reakcí [1]. V organismu jsou přítomny tzv. biotransformační enzymy, které umožňují přeměňovat cizorodé látky do forem, které jsou obecně méně toxické a snáze se vylučují [4]. Mezi takové enzymy patří i flavinové monooxygenasy, kterými se v této bakalářské práci zabývám.

1.1.2 Biotransformace

Chemické přeměny, kterým podléhají cizorodé látky v organismu, nazýváme biotransformace. Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, xenobiotika vstupující do organismu mají většinou lipofilní charakter, který jim usnadňuje absorpci do organismu, ale zároveň znesnadňuje jejich vyloučení. Při biotransformaci se výrazně snižuje lipofilní charakter cizorodé látky, což umožní její vyloučení z organismu ven. Bez biotransformace by se lipofilní xenobiotika vylučovala z těla tak pomalu, že by nakonec organismus přemohla a zahubila [1,3].

Pro většinu produktů biotransformace skutečně platí, že jsou méně toxické než původní výchozí látka, ale existují i výjimky. Některé biotransformační reakce vedou naopak ke vzniku produktu, který je účinnější než samotné xenobiotikum. Takové reakce se nazývají metabolickou aktivací [3,5]. Existují případy, kdy je metabolická aktivace přínosná, zejména u aktivních forem některých léčiv, u kterých je nutné podstoupit biotransformaci, aby vůbec začala účinkovat [6]. Ke vzniku toxičtějšího produktu, než je samotná výchozí látka, vede nepřínosná metabolická aktivace, která může dokonce vést ke vzniku karcinogenních, mutagenních nebo tumorogenních produktů. Nejčastěji se však setkáváme s tím, že biotransformace naopak ukončí účinek léčiva nebo sníží toxicitu xenobiotika. Proces biotransformace je tedy velice důležitý jak pro farmakologii, tak pro toxikologii [1].

Biotransformace probíhá u savců, včetně člověka, nejčastěji v játrech, v menší míře také v plicích, ledvinách, stěně střev, slezině a dalších orgánech. Jednotlivé přeměny na buněčné úrovni probíhají převážně v endoplazmatickém retikulu buněk, ale jsou známé i přeměny, které probíhají v mitochondriích a cytosolu [7].

Biotransformační reakce, které jsou katalyzované biotransformačními enzymy, se rozdělují na dvě skupiny, při kterých se postupně mění polarita cizorodých látek [1].

1.1.2.1 I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace probíhají oxidační, redukční nebo hydrolytické reakce. Tyto reakce odhalují nebo přidávají nové funkční skupiny (-OH, -NH₂, -SH nebo -COOH), což vede k mírnému poklesu lipofility xenobiotika. Tento pokles lipofility většinou nestačí k tomu, aby bylo xenobiotikum vyloučeno z organismu ven. Proto na těchto odhalených nebo nově přidaných funkčních skupinách probíhá následně II. fáze biotransformace [1].

Nejvíce zastoupenou a také nejdůležitější reakcí biotransformace je oxidace. Téměř každé xenobiotikum je oxidováno kyslíkem, který organismus vdechuje [3].

1.1.2.2 II. fáze biotransformace

Do druhé fáze biotransformace řadíme acetylaci, metylaci, konjugaci s glutathionem, konjugaci s kyselinou glukuronovou, sulfátové konjugace a konjugace s glycinem. Kofaktory reakcí patřící do II. fáze biotransformace reagují s polárními funkčními skupinami přítomnými na xenobiotiku nebo těmi, které byly odhaleny či přidány při I. fázi biotransformace.

S výjimkou metylace a acetylaci vedou biotransformační reakce II. fáze k výraznému snížení lipofility xenobiotika a tím výrazně podporují jeho vyloučení z organismu. Většina enzymů podílejících se na II. fázi biotransformace se nachází v cytosolu. Existují případy, kdy I. fáze biotransformace nepředchází II. fázi, jak bychom očekávali. Je tomu tak například při biotransformaci morfinu [1].

1.1.3 Biotransformační enzymy

Na biotransformačních přeměnách se podílí velké množství enzymů. Nejvíce participující a nejčastěji užívaný enzymový systém při biotransformaci je systém izoenzymů cytochromů P-450. Méně participující jsou flavinové monooxygenasy, kterým se budu blíže věnovat v následujících kapitolách. Enzymy katalyzující biotransformační reakce jsou široce

distribuovány v organismu a obecně se jedná o enzymy se širokou substrátovou specifitou. Játra obvykle obsahují největší koncentraci enzymů metabolizujících xenobiotika. Dále je možno tyto enzymy najít v kůži, plicích, nosní sliznici, oku, gastrointestinálním traktu, ledvinách, nadledvinách, slinivce, slezině, srdci, mozku, varlatech, placentě, vaječnicích, plazmě, erytrocytech, krevních destičkách, lymfocytech a aortě [1,7].

Některé chemikálie stimulují syntézu enzymů podílejících se na xenobiotické biotransformaci. Tento proces, známý jako indukce enzymů, je adaptivní a reverzibilní odpověď na xenobiotickou expozici. Většina biotransformačních enzymů je syntetizována i za nepřítomnosti jejich substrátů, existují však i takové enzymy, jejichž syntéza je spuštěna přítomností samotného xenobiotika. Indukce enzymu umožňuje některým xenobiotikům urychlit jejich vlastní biotransformaci a eliminaci. Enzymy katalyzující biotransformační reakce často určují intenzitu a trvání účinku léků a hrají klíčovou roli v chemické toxicitě a chemické tumorogenezi [1].

1.2 Oxygenasy

Oxygenasy jsou enzymy patřící do skupiny oxidoreduktas. Tyto enzymy katalyzují vložení atomu kyslíku do organického substrátu za použití molekulárního kyslíku jako donoru kyslíku. Oxygenasy se dělí na dvě podskupiny. První podskupinou jsou monooxygenasy, které katalyzují vložení jednoho atomu kyslíku do organického substrátu. Druhou podskupinou jsou dioxygenasy, které katalyzují vložení obou atomů kyslíku do organického substrátu [8].

Mezi oxygenasy je řazena velká skupina enzymů, které se účastní oxidace xenobiotik, jako jsou aromáty, fenoly, nitroaromáty, aromatické aminy a azobarviva. Pro svoji aktivitu potřebují kromě výše zmíněné molekuly kyslíku kofaktor, který je schopný je aktivovat. Jako kofaktory slouží například přechodné kovy nebo flaviny [9].

1.2.1 Monooxygenasy

Tyto enzymové komplexy katalyzují zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu za současné redukce druhého atomu kyslíku na vodu. Aby mohlo k tomuto typu reakce dojít, potřebují monooxygenasy aktivovat molekulární kyslík. Bez aktivace kyslíku by nedošlo k žádné reakci v důsledku jeho spinového stavu. K aktivaci kyslíku ve většině případů využívají monooxygenasy organické kofaktory, které přenesou

elektron do molekulárního kyslíku a vznikne reaktivní meziprodukt. Následně může docházet k oxidaci organického substrátu. Jaký typ reaktivního meziproduktu kyslíku se vytvoří, závisí na typu kofaktoru, který je v monooxygenase přítomný. V některých případech nemusí být přítomen žádný kofaktor a monooxygenasy získávají elektron přímo ze samotného substrátu [8,9]. Tyto monooxygenasy nazýváme interní, patří mezi ně například tryptofan-2-monooxygenasa (TMO) [10]. Monooxygenasy, které jsou závislé na externích donorech elektronů (např. na nikotinamidadeninukleotidfosfát), nazýváme externí a patří mezi ně například flavinové monooxygenasy a cytochromy P450 [8].

Na základě prostetických skupin lze monooxygenasy klasifikovat do dvou základních skupin. První skupinou jsou flavinové monooxygenasy, jejichž prostetická skupina je flavinadeninukleotid. Druhou skupinou jsou monooxygenasy se smíšenou funkcí, které obsahují cytochrom P450 jako terminální oxidasu a jejich prostetickou skupinou je hem [8,9]. V této bakalářské práci se zaměřuji právě na flavinové monooxygenasy.

1.2.2 Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou flavoproteiny obsahující jeden flavinadeninukleotid (FAD) jako prostetickou skupinu. FMO řadíme do enzymové třídy monooxygenas, které jsou schopny vytvářet stabilní peroxyflavinový meziprodukt. Tyto enzymy katalyzují oxidaci širokého spektra xenobiotik, včetně léčiv, pesticidů a sloučenin pocházejících ze stravy. FMO byly dlouho přehlíženy ve srovnání s cytochromy P450, větší a podrobněji studovanou rodinou detoxikačních enzymů. FMO vyžadují ke katalýze FAD jako prostetickou skupinu, nikotinamidadeninukleotidfosfátu jako kofaktor a molekulární kyslík jako kosubstrát. Ke katalýze ale naopak nevyžadují doplňkové proteiny, protože přijímají redukční ekvivalenty přímo z NADPH. Neobvyklou vlastností této třídy enzymů je, že vazba substrátu nemá žádný vliv na rychlost katalyzované reakce [4,11].

FMO se v buňce vyskytuje v aktivované formě. Za aktivovanou formu označujeme FMO s navázaným aktivovaným kyslíkem (peroxyflavin), která vzniká ještě před navázáním substrátu. Aktivovaná forma FMO má schopnost oxidovat jakýkoliv nukleofil mající přístup k aktivnímu místu. Tato neobvyklá vlastnost FMO zodpovídá za jejich široký rozsah substrátů. Smíšená substrátová specifita byla prokázána již při počátečních studiích s purifikovaným prasečím jaterním FMO. Substráty vhodné pro FMO mohou být sloučeniny

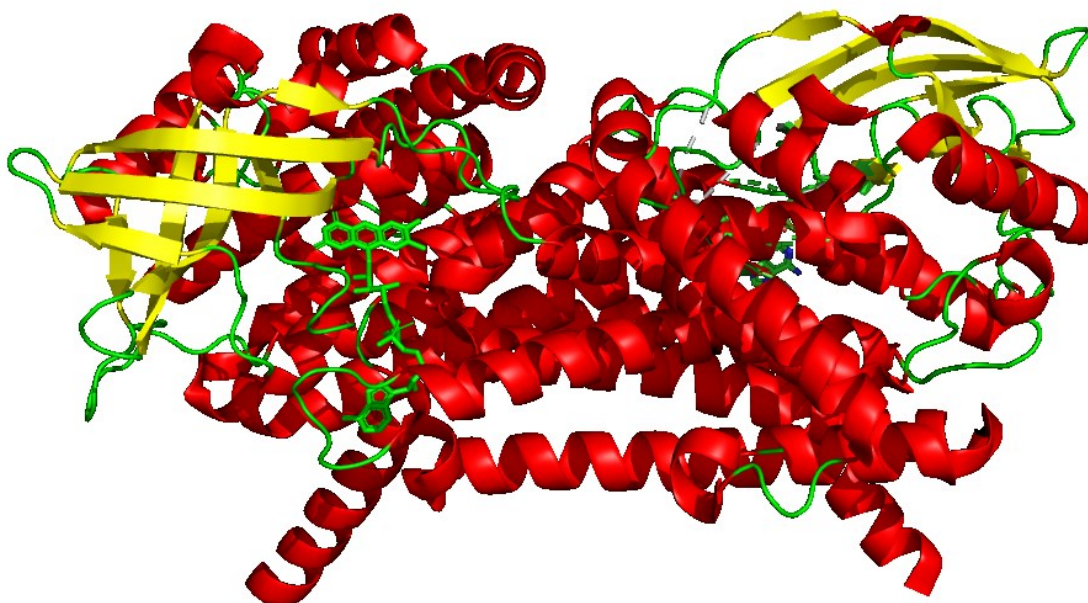
obsahující nukleofilní heteroatom jako je dusík, kyslík, selen, fosfor nebo sloučeniny obsahující jeden pozitivní náboj [4,11].

V roce 1984 byl získán první přímý důkaz o existenci více forem FMO, do té doby byla jejich existence pouze předpokládána [11]. Nyní již víme, že savci, včetně lidí, mají pět funkčních genů FMO, nazývaných FMO1 – FMO5 a FMO 6 jako pseudogen [4]. Nejstudovanější z těchto funkčních genů je FMO3. FMO1 a FMO3 jsou významné izoformy nacházející se převážně v játrech a ledvinách a jsou lokalizovány převážně v membránách endoplasmatického retikula [11,12]. V lidských játrech byla zaznamenána vyšší exprese FMO3 a nízká exprese FMO1, to ovšem neplatí ve fetálním období, kdy je v játrech exprese FMO1 vyšší. V lidských ledvinách je naopak exprese FMO1 vysoká a exprese FMO3 nízká. U potkanů je to odlišné, ti mají zaznamenanou expresi FMO3 v ledvinách vyšší než v játrech a exprese FMO1 je v játrech mírná [13]. FMO2 lze nalézt například v plicích nehumánních primátů. FMO4 společně s FMO5 představují vzácné izoformy [12]. Gen FMO6 je označován jako pseudogen kvůli své neschopnosti produkovat správně sestřiženou mRNA [13].

1.2.2.1 Struktura flavinových monooxygenas

Předpokládá se, že FMO je dimer, který se skládá ze dvou strukturálních domén, jedné velké domény a jedné malé neboli inzerční domény s kanálem mezi nimi (Obr. 1 na straně 15). Při katalýze interaguje FAD výhradně s velkou doménou a flavin je vystaven do prostoru mezi kanály. Naopak NADPH se při katalýze váže prostřednictvím své adeninové skupiny pouze na malou doménu a nikotinamidová skupina se vodíkovou vazbou váže na odkrytý isoalloxazinový kruh FAD [4,12].

Pomocí krystalové struktury komplexu enzym-substrát kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* bylo zjištěno, že FMO netvoří kvartérní strukturu společně s NADPH, FAD a substrátem, ale že substrát soutěží o vazebné místo s NADPH, nahrazuje ho a váže se na isoalloxazinový kruh. K přijímání molekuly kyslíku dochází pouze v přítomnosti substrátu [4].



Obrázek 1: Struktura FMO. Červenou barvou jsou vyznačeny α -helixy, žlutou barvou jsou vyznačeny β - skládané listy a zelenou barvou jsou označeny flexibilní spojovací úseky. Na levé straně pod žlutými β - skládanými listy je zeleně vyznačena struktura FAD. Vytvořeno v PyMol.

1.2.2.2 Katalytický mechanismus

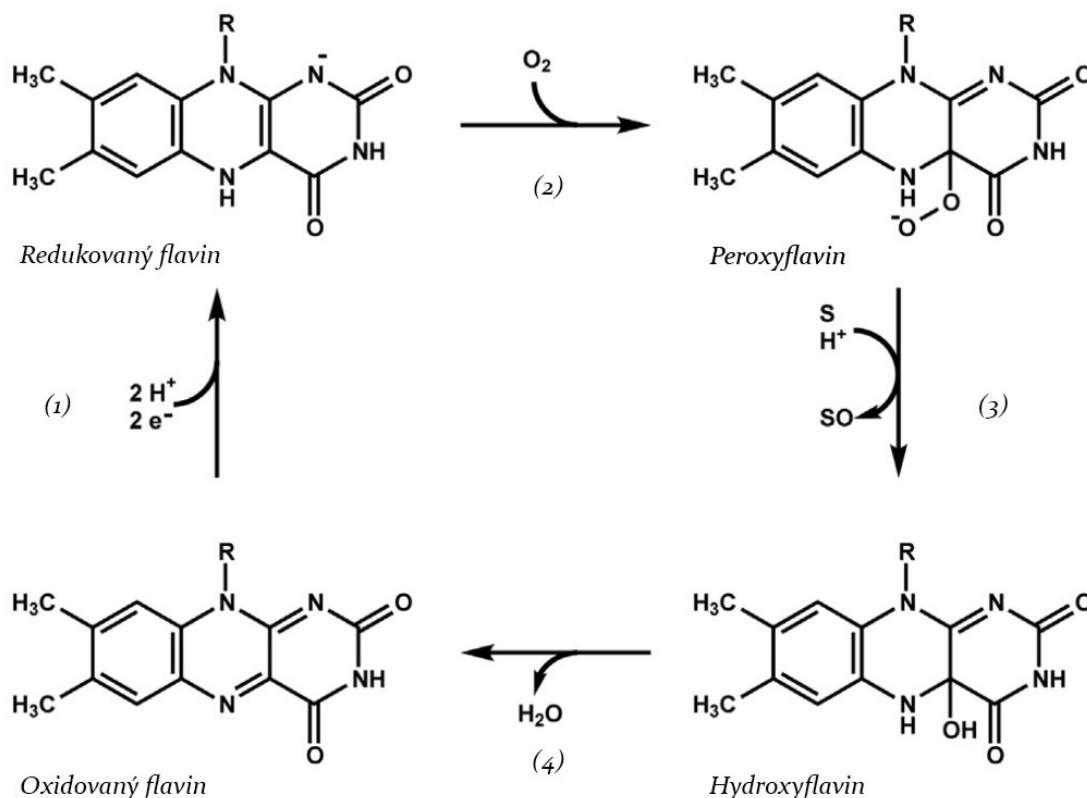
Produkty reakcí katalyzované FMO jsou obecně polárnější, snadněji vylučovatelné a méně toxické nebo farmakologicky aktivní než původní sloučenina [4].

Místem oxidačního působení FMO je nukleofil s centrem bohatým na elektrony, což jsou obvykle atomy dusíku, síry, fosforu nebo selenu [14].

FMO vytváří stabilní 4a-peroxyflavinový meziprodukt, který je stabilní po dobu několika minut až hodiny při 4 °C. Tento stabilní meziprodukt atakuje, v závislosti na jeho protonačním stavu, nukleofilní nebo elektrofilní substrát a rozděluje vazbu kyslík-kyslík [11,10].

V prvním kroku katalytického cyklu (Obr. 2 na straně 16) podléhá FAD dvouelektronové redukci pomocí NADPH (1). Redukovaný flavin rychle reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxyflavinu (FADOOH) (2). Tento meziprodukt je připraven na atak nukleofilního substrátu. Následně dochází k vložení jednoho atomu kyslíku z meziproduktu do substrátu za vzniku druhého meziproduktu hydroxyflavinu. Po monooxygenaci substrátu (3) se vzniklý hydroxyflavin rozkládá na oxidovaný flavin (4) a oxidovaný kofaktor se obnoví ztrátou druhého atomu kyslíku z meziproduktu, který se uvolňuje ve formě vody. Dochází tedy k nukleofilnímu ataku substrátu na FADOOH, který

vede k tomu, že jeden atom molekulárního kyslíku je přenesen na substrát a druhý atom kyslíku je redukován na vodu [10,11,15].



Obrázek 2: Katalytický mechanismus FMO. (1) Dvouelektronová redukce FAD na FADH_2 pomocí elektronů z NADPH. (2) Reakce redukovaného FADH_2 s molekulou kyslíku za vzniku meziproduktu peroxyflavinu. (3) Nukleofilní substrát atakuje peroxyflavin za vzniku hydroxyflavinu. (4) Rozklad hydroxyflavinu na oxidovaný flavin za současné redukce druhého atomu kyslíku na H_2O . Převzato a upraveno [10].

1.2.3 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou evolučně staré hemoproteiny, které jsou zásadní v metabolismu cizorodých látek. Patří do skupiny monooxygenas, které získávají potřebný elektron z externích donorů, konkrétně molekul NADPH. Tato skupina enzymů se podílí na biotransformaci léčiv, metabolismu chemických karcinogenů, rozkladu herbicidů a insekticidů, přeměně alkanů, terpenů a aromatických sloučenin, biosyntéze fyziologicky důležitých sloučenin (steroidů, steroidních hormonů, mastných kyselin, eikosanoidů, vitaminů rozpustných v tucích a žlučových kyselin) a přeměně polynenasycených mastných kyselin na biologicky aktivní molekuly [6,16,17,18].

Název cytochromy P450 je odvozen od jejich zařazení mezi hemoproteiny a zároveň od jejich typického absorpčního maxima redukovaného komplexu vázaného na CO při

vlnové délce 450 nm. Cytochrom znamená hemoprotein, písmeno P symbolizuje pigment a číslo 450 odráží výše zmíněné absorpční maximum [16].

CYP je mnohem větší funkční genová skupina než FMO. Obecně je CYP hlavním přispěvatelem k oxidativnímu metabolismu xenobiotik. Přestože jsou aktivní vůči mnoha stejným substrátům, CYP a FMO často produkují odlišné metabolity [11].

1.3 Stanovení aktivity flavinové monooxygenasy

1.3.1 Enzymová aktivita

Množství enzymu nebo jeho obsah v biologickém materiálu lze jen málokdy vyjádřit přímo v gramech nebo molech, jelikož enzymy nelze kvantitativně izolovat z důvodu přebytku balastních bílkovin. Množství enzymu lze vyjadřovat v gramech nebo molech jen pokud máme čistý enzym se známou molekulovou hmotností, ale tyto podmínky často nejsou při práci s enzymem splněné. Proto se častěji vyjadřuje množství enzymu právě měřením jejich katalytického účinku neboli enzymové aktivity, která udává, jaké množství substrátu/produktu je přeměněno/vytvořeno enzymem za jednotku času. Enzymová aktivita se udává nejčastěji ve standardních jednotkách $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U), nebo méně častěji v SI jednotkách mol/s (kat) [19, 20].

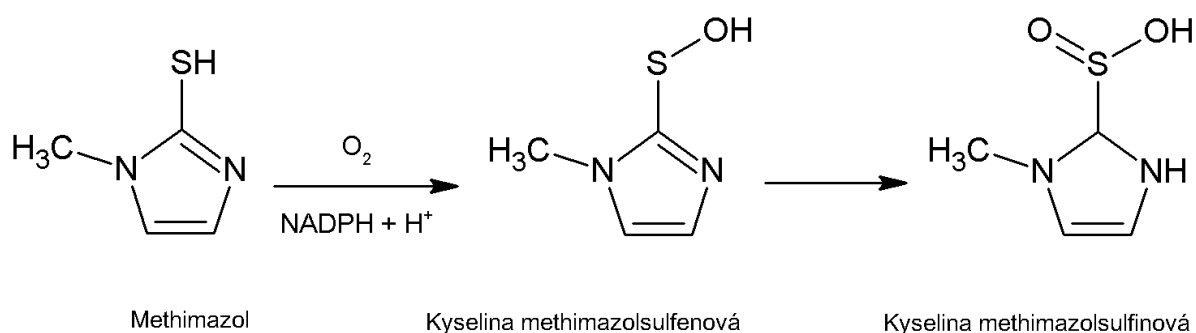
Pro určení enzymové aktivity je potřeba mít vhodnou a jednoduchou metodu pro určování úbytku substrátu s časem nebo ještě lépe přírůstku produktu s časem. Dalšími podmínkami pro určení enzymové aktivity je znalost hodnoty Michaelisovy konstanty (K_m) pro substrát, který používáme, a celou reakci provádět při saturační koncentraci substrátu, při které probíhá reakce kinetikou 0. řádu, kde je rychlost reakce úměrná pouze koncentraci enzymu. Dále je nezbytné znát jaké je teplotní a pH optimum daného enzymu a při těchto hodnotách je vhodné sledovat průběh reakce a stanovovat enzymovou aktivitu [19]. Ze získaného časového průběhu reakce je určena počáteční rychlost v_0 , která je dále převedena na jednotky enzymové aktivity [20].

Existuje ještě tzv. specifická aktivita enzymu, která určuje míru čistoty enzymového preparátu. Tato veličina se získá vztahem enzymové aktivity na množství proteinu v daném enzymovém preparátu. Jednotka specifické aktivity je U/mg [19,20].

1.3.2 Metody stanovení aktivity flavinových monooxygenas

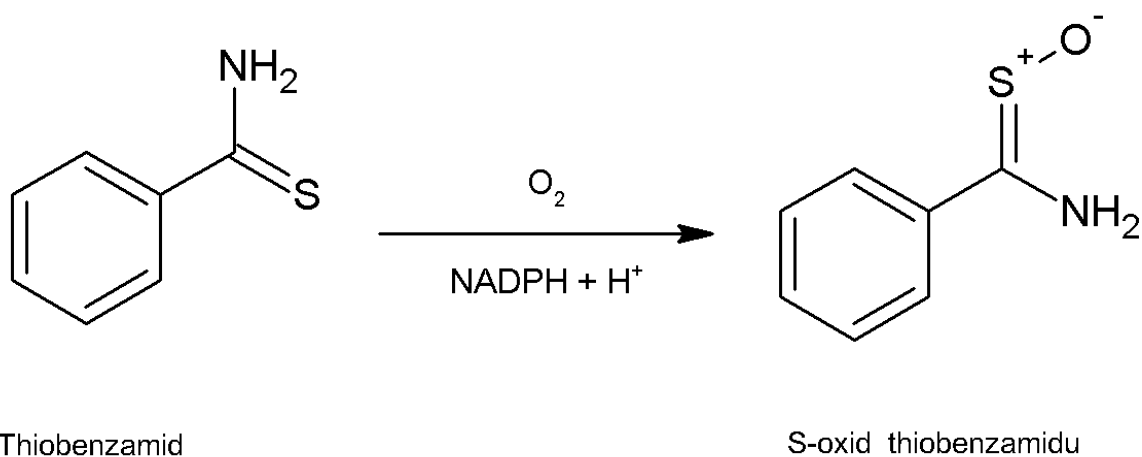
Pro stanovení enzymové aktivity FMO existuje několik metod, které se od sebe liší použitím rozdílných substrátů. V odborné literatuře jsou nejčastěji uváděné tři následující metody.

První metoda využívá jako substrát methimazol. Tuto metodu popsali v roce 1984 Thomas E. Roche a Aparna Dixit [21]. Methimazol (2-merkpto-1-methylimidazol) je velice specifický substrát s vysokou afinitou pro FMO3, který je schopný kompetitivně inhibovat metabolismus jiných sloučenin [22]. Studie ukázala, že se methimazol váže shora na isoalloxazinový kruh FAD v FMO3. Vazba methimazolu na isoalloxazinový kruh může vést k fluorescenčním změnám FAD [23]. Ke stanovení specifické enzymové aktivity FMO se užívá S-oxidace methimazolu na kyselinu methimazolsulfenovou, která je nestabilní a přechází neenzymovou reakcí na kyselinu sulfinovou, která je již dostatečně stabilní, aby mohla být detekována (Obr. 3) [24]. Při této metodě se enzymová aktivita stanovuje spektrofotometricky, po přidání methimazolu se měří absorbance vzniklé kyseliny sulfinové při vlnové délce 412 nm a sleduje se nárůst koncentrace produktu [22].



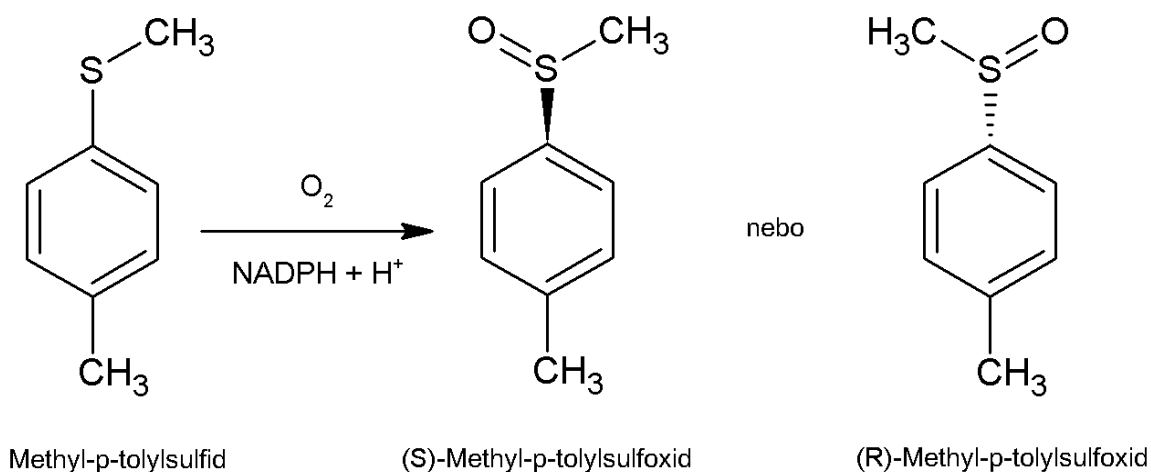
Obrázek 3: Oxidace methimazolu. Oxidace methimazolu na kyselinu methimazolsulfenovou, která je nestabilní a přechází samovolně na stabilnější kyselinu methimazolsulfinovou. Převzato a upraveno [24].

Druhou metodou je metoda užívající jako substrát thiobenzamid. Jedná se o starší a méně citlivou metodu, než je předchozí metoda s methimazolem jako substrátem [21]. Opět dochází k S-oxidaci za vzniku S-oxidu thiobenzamidu (Obr. 4 na straně 19). Množství produktu je stanovováno po jeho separaci na HPLC spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 370 nm [25].



Obrázek 4: Oxidace thiobenzamidu: Oxidace thiobenzamidu na S-oxid thiobenzamidu. Převzato a upraveno [26].

Poslední metodou je metoda užívající jako substrát methyl-*p*-tolylsulfid (MTS), který je oxidován na methyl-*p*-tolylsulfoxid (MTSO) (Obr. 5). Při analýze je množství vzniklého produktu opět vyhodnocováno po separaci na HPLC spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 237 nm [27]. Na tento substrát jsem se zaměřila i při optimalizaci metody pro stanovení aktivity FMO pro potřeby Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv.



Obrázek 5: Oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu. Znárodnění oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu na methyl-*p*-tolylsulfoxid, který má dva možné enantiomery. Převzato a upraveno [28].

1.3.3 Specifita flavinových monooxygenas a cytochromů P450

Při zkoumání metabolismu xenobiotik se velmi často používají jaterní mikrosomy, které obsahují FMO i CYP jako biotransformační enzymy. Oba tyto enzymy se nacházejí v endoplazmatickém retikulu a potřebují NADPH a kyslík jako své kofaktory. Sloučeniny obsahující ve svých strukturách nukleofilní atomy mohou být substrátem jak pro FMO, tak pro CYP a mezi enzymy tedy může docházet k překryvu jejich katalytických aktivit, které je potřeba vhodným způsobem rozlišit [24].

Pro rozlišení mezi oběma enzymovými systémy se používá tepelná inaktivace FMO a inhibice CYP oxidem uhelnatým, N-oktylaminem nebo N-bezylimidazolem (NBI). Jako obecný inhibitor CYP se užívá NBI. Imidazoly interagují s vazebným místem substrátu a jeden atom dusíku z imidazolového kruhu přímo váže ligand hemové skupiny CYP, který je zodpovědný za vazbu kyslíku. Jako pH optimum pro FMO je uváděna zásaditá hodnota 8,5, která se rovněž užívá k minimalizaci účinku CYP, pro které je pH optimum uváděno mezi 7,0 a 7,5 [24,29].

K inhibici FMO se často užívá S-oxidace methimazolu na kyselinu sulfinovou (Kap. 1.3.2 na straně 18). Tato reakce je zprostředkována FMO a nezahrnuje účast CYP [24].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat metodu pro měření enzymové aktivity FMO v mikrosomálních frakcích, ve kterých jsou obsaženy také CYP, které se s FMO mohou svou katalytickou aktivitou překrývat. Jako modelový enzymový preparát byly zvoleny potkaní jaterní mikrosomy. Ke stanovení aktivity FMO byla využita reakce oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu.

Hlavní úkoly práce:

- Optimalizovat reakční podmínky (pH vzorkového pufru, koncentrace substrátu a doba inkubace)
- Určit, zda CYP ovlivňují studovanou reakci, a která z izoforem CYP případně nejvíce přispívá ke zvýšení rychlosti oxidace MTS
- Omezit vliv CYP na oxidaci MTS
- Ověřit funkčnost optimalizovaných podmínek a zvoleného inhibitoru CYP na měření enzymové aktivity FMO v potkaních mikrosomech

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytická váha:

Discovery DV215CD

Ohaus, USA

Precisa 40SM-200A

Pesa, Švýcarsko

Centrifugy:

Centrifuge 5418

Eppendorf, Německo

Minicentrifuga Spectrafuge™

Labnet, Korea

HPLC systém:

Agilent 1200 Series s DAD detektorem

Agilent, USA

Inkubátory:

Thermomixer compact

Eppendorf, Německo

Kolona:

Nucleosil 100-5, C18 (205 x 4 mm, 5µm)

Macherey-Nagel, Německo

Magnetická míchačka:

IKA RH basic 2

IKA, Německo

pH metr:

HI-2211

HANNA Instruments, USA

Předvážka:

KERN 440-35A, 440-35N

Kern & Sohn GmbH, Německo

Vortexy:

GV Lab

GILSON, Německo

Termolyne Maxi Mix II.

Thermo Scientific, USA

MS1 Minishaker

IKA, Německo

3.2. Použité chemikálie a materiál

Acetonitril pro HPLC	VWR Chemicals (Francie)
Brij 35	MERCK – Schuchardt (Německo)
Glycin	Lach-Ner, s.r.o. (Česká republika)
Hydroxid sodný	Lach-Ner, s.r.o. (Česká republika)
Jaterní mikrosomy kontrolních potkanů	Laboratoř prof. RNDr. Petra Hodka, CSc.
Jaterní mikrosomy potkanů vystavených β-naftoflavony	Laboratoř prof. RNDr. Petra Hodka, CSc
Kyselina lipoová	Sigma Aldrich (Japonsko)
Lidská FMO3 v Supersomech™	BD Gentest™ (USA)
Methanol pro HPLC	VWR Chemicals (Francie)
Methimazol	Sigma Aldrich (Čína)
MTS	Sigma Aldrich (Indie)
MTSO	Sigma Aldrich (Indie)
NADPH	Roche Diagnostics GmbH (Německo)
Potkaní rekombinantní cytochromy	
P450 v Supersomech™	BD Gentest™ (USA)
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)

3.3 Použité metody

3.3.1 Příprava inkubačních směsí při optimalizaci podmínek stanovení enzymové aktivity flavinových monooxygenas

Při optimalizaci metody stanovení enzymové aktivity FMO jsem vycházela z postupů již popsanych pokusů a komerčních návodu [27,30,31]. Pro optimalizaci metody sloužící k měření enzymové aktivity FMO byly inkubace reakčních směsí prováděny postupně za různých podmínek lišících se v několika parametrech: pH prostředí, koncentrace substrátu a doba inkubace. Celkový objem inkubačních směsí činil 250 μ l.

Složení inkubačních směsí:

- Glycinový pufr (50 mM glycin, pH uvedeno dále, rozpuštěno v destilované H₂O)
- 0,2 μ g/ μ l lidské FMO3 v SupersomechTM (5 mg/ml)
- 1 mM NADPH (zásobní roztok 10 mM, rozpuštěno v glycinovém pufru)
- MTS o různých koncentracích (v methanolu)

Prvním měnícím se parametrem při optimalizaci metody bylo pH glycinového pufru. Kvůli minimalizaci účinku CYP, které mají pH optimum okolo 7,0 až 7,5, byla zkoušena různá pH glycinového pufru (pK = 9,6) [29]. Byly připraveny inkubační směsi s glycinovými pufrů o pH 8,5; 9,0 nebo 9,5, u kterých bylo upravováno pH pomocí 1M hydroxidu sodného. V těchto reakčních směsích byl použit 1mM MTS [27]. Po zvolení vhodného pH byla připravena sada inkubačních směsí s odlišnými koncentracemi MTS. Byl použit MTS o koncentraci 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 a 10 mM (koncentrace zásobních roztoků byla 2, 10, 20, 100, 200, 400 a 2 000 mM). Jako poslední byl optimalizován čas inkubace. Inkubační směsi se nechaly inkubovat 0, 5, 10, 15, 20 nebo 30 minut.

Kromě samotných inkubačních směsí byly připraveny i slepé vzorky. U slepých vzorků chyběla vždy jedna složka (MTS, NADPH nebo supersomy), která byla vždy nahrazena příslušným rozpouštědlem o stejném objemu. Ve slepých vzorcích bez MTS byl chybějící objem doplněn methanolem. V blancích, ve kterých bylo vynecháno NADPH nebo supersomy, byl chybějící objem doplněn glycinovým pufrům o příslušném pH.

Do plastových mikrozkuhavek byl nejprve pipetován glycinový pufr o příslušném pH. Následně byly do všech mikrozkuhavek pipetovány supersomy a roztok NADPH

a směs byla pomocí pipety řádně zamíchána. Po promíchání byly směsi ve 20sekundových intervalech vkládány do inkubátoru předem vyhřátého na 37 °C, kde byly směsi preinkubovány 5 minut při 400 rpm (Thermomixer compact). Po pěti minutách byl ke vzorkům přidáván po 20sekundových intervalech substrát MTS o příslušné koncentraci a směs byla zlehka promíchána pomocí vortexu. Reakční směsi byly následně ihned vkládány zpět do inkubátoru, kde byly příslušnou dobu inkubovány stále při 400 rpm a 37 °C. Po inkubaci byla reakce zastavována přidáním 75 µl acetonitrilu a protřepáním 10 sekund na vortexu.

Vzorky byly po zastavení reakce centrifugovány 10 minut při 13 000 g (centrifuga Eppendorf 5418). Následně byl odebrán supernatant, který byl analyzován pomocí HPLC. Pokud nebyly vzorky měřeny ihned, byly uchovány ve skleněných vialkách při -20 °C.

3.3.2 Příprava inkubačních směsí s optimalizovanými podmínkami pro stanovení enzymové aktivity flavinových monooxygenas

Další sady inkubačních směsí byly již proměřovány za optimálních podmínek (glycinový pufr o pH 9,5; koncentrace MTS 2 mM a inkubace 10 minut).

Složení inkubačních směsí bylo stejné jako u předchozích směsí sloužících k optimalizaci podmínek, nebo bylo ve směsích zaměněno FMO3 za různé formy cytochromů P450, potkaní jaterní mikrosomy nebo jaterní mikrosomy potkanů vystavených β-naftoflavonu, který je známým a účinným induktorem CYP1A1 [32].

Složení inkubačních směsí:

- 50 mM glycinový pufr o pH 9,5
- Proměnná složka:
 - 0,2 µg/µl lidské FMO3 v SupersomechTM (5 mg/ml)
 - 0,1 pmol/µl CYP v SupersomechTM (1 nmol/ml nebo 2 nmol/ml)
 - 1 mg/ml potkaní jaterní mikrosomy (32,3 µg/µl)
 - 1 mg/ml jaterní mikrosomy potkanů vystavených β-naftoflavonu (54,3 mg/ml)
- 1 mM NADPH (zásobní roztok 10 mM, rozpuštěno v glycinovém pufru)
- 2 mM MTS (zásobní roztok 400 mM, v methanolu)

Inkubační směsi byly připravovány postupem, který je uveden v kap. 3.3.1. na straně 24. Pro zamezení katalytické činnosti enzymů přítomných v použitých enzymových preparátech (CYP a FMO) byly v některých pokusech do inkubačních směsí navíc přidávány jejich inhibitory. Jednalo se o kyselinu lipoovou [11], která měla ve směsi inhibovat NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasu a tedy zamezit reakci katalyzované cytochromy P450, methimazol [33], který byl použit jako inhibitor FMO a neiontové detergenty Brij 35 nebo Triton X-100 [13], které deaktivují CYP. Látky byly přidávány v různých koncentracích, blíže uvedených v kapitole s výsledky.

3.3.3 Separace oxidačního metabolitu methyl-*p*-tolylsulfidu

Separace metabolitu methyl-*p*-tolylsulfoxidu probíhala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Agilent 1200 Series s DAD detektorem) na koloně Nucleosil 100-5, C18 s detekcí v UV/VIS spektru. Separace probíhala při 45 °C. Jako mobilní fáze, která protékala kolonou rychlostí 0,9 ml/min, byl použit koncentrační gradient methanolu (Tab.1)

Během měření byl methanol míchán v různém poměru s ultra čistou vodou a docházelo tedy k tzv. gradientové eluci. V rámci optimalizace metody stanovení enzymové aktivity FMO bylo potřeba určit nejvhodnější průběh gradientové eluce. V prvních sedmi minutách byl methanol přítomen ze 46 %. V následujících minutách se koncentrace methanolu lineárně zvyšovala, až jeho koncentrace dosáhla 100 %, po dosažení 100 % se opět jeho koncentrace začala snižovat na původních 46 %. Časy, při kterých se zvyšovala koncentrace methanolu ze 46 % na 100 % a následně opět snižovala na původních 46 %, byly různě měněny a optimalizovány. Gradient, který byl zvolen jako optimální pro separaci metabolitu methyl-*p*-tolylsulfoxidu, je uveden v Tab. 1.

Tabulka 1: Gradientová eluce pro separaci MTSO. Mezi nulou a sedmou minutou koncentrace methanolu zůstávala na počátečních 46 %. Mezi 7 a 17 minutou koncentrace methanolu lineárně rostla na 100 %. Mezi 17 a 21 minutou se koncentrace methanolu snižovala na původních 46 %. Mezi 21 a 25 minutou zůstala koncentrace methanolu na 46 %.

Čas [min]	0	7	17	21	25
c methanolu [%]	46	46	100	46	46

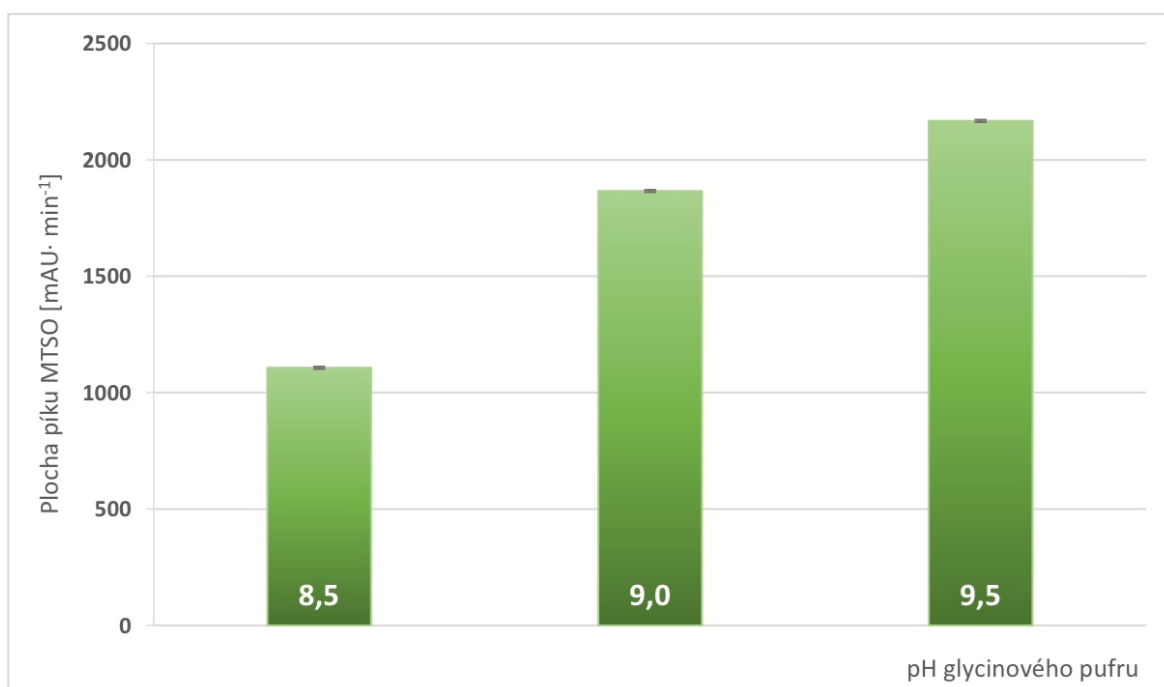
Na základě kalibrační křivky sestavené pro závislost plochy píku na koncentraci MTSO pro rozsah koncentrací 2-120 µM byla určena koncentrace produktu v inkubačních směsích, ze které byla vypočítána rychlost tvorby MTSO.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv pH na oxidaci methyl-*p*-tolylsulfidu flavinovými monooxygenasami

Při optimalizaci metody stanovení enzymové aktivity FMO byl nejdříve sledován vliv pH na oxidaci MTS na MTSO. Bylo zvoleno zásadité pH (8,5; 9,0 a 9,5), které odpovídá pH optimu FMO a mírně snižuje účinnost CYP, jejichž pH optimum leží v neutrální oblasti pH [24]. Při pokusu byl použit komerčně dostupný rekombinantní enzym lidská FMO3 v SupersomechTM. Největší množství MTSO vzniklo v reakční směsi s glycinovým pufrům o pH 9,5 (Obr. 6). Vzhledem k tomu, že poměrně zásadité pH 9,5 mělo pozitivní vliv na oxidaci MTS katalyzovanou FMO3 a zároveň je nejvíce vzdálené od pH optima CYP, které by mohly na reakci také participovat, byl glycinový pufr o pH 9,5 zvolen pro přípravu dalších inkubačních směsí.

Glycinový pufr o pH 9,5 byl také použit v postupu měření aktivity FMO uvedeném v komerčním návodu [30], z něhož jsem vycházela. V dalších dvou studiích, ze kterých jsem při optimalizaci metody pro stanovení aktivity FMO vycházela, bylo použito pH glycinového pufru 8,5 nebo 9,0 [27,31].

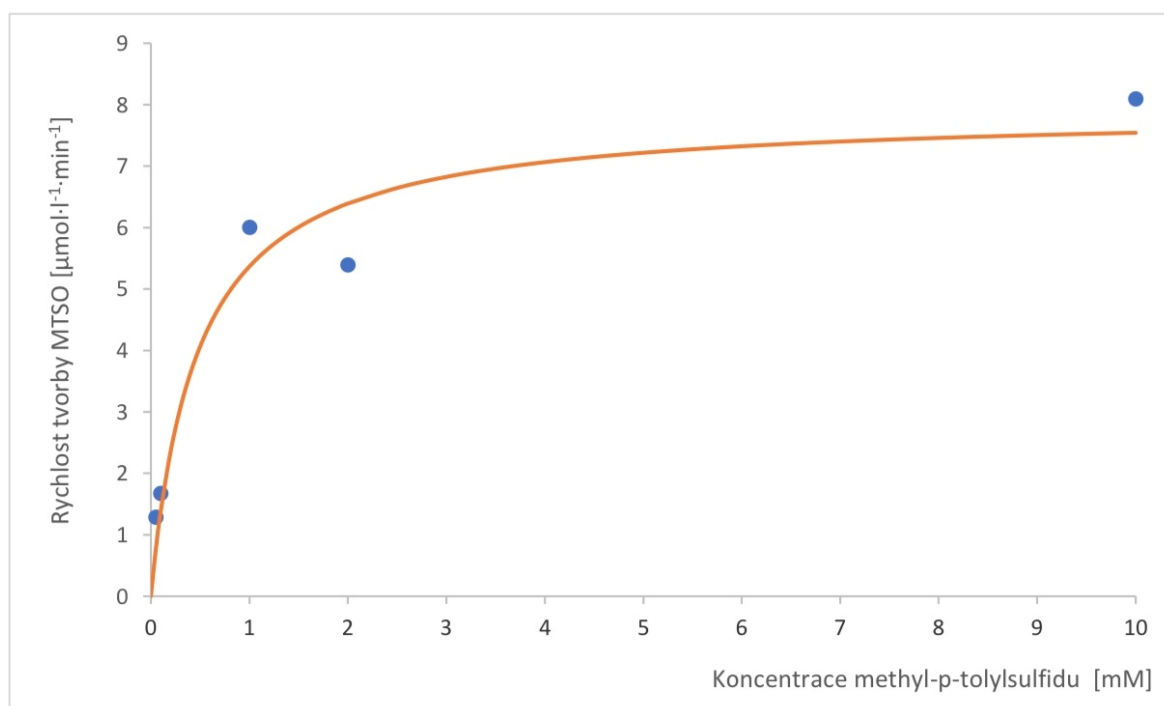


Obrázek 6: Závislost rychlosti oxidace MTS na pH glycinového pufru. Zobrazené hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

4.2 Závislost rychlosti oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu na koncentraci substrátu

Dalším optimalizovaným parametrem pro stanovení aktivity FMO byla koncentrace MTS. Záměrem bylo ověřit, jak množství vznikajícího MTSO vzrůstá s rostoucí koncentrací MTS a následně zvolit vhodnou a dostatečně vysokou koncentraci substrátu, aby byla enzymová aktivita FMO měřená při nasycení enzymu substrátem. Při pokusu byla použita komerčně dostupná lidská FMO3 v SupersomechTM.

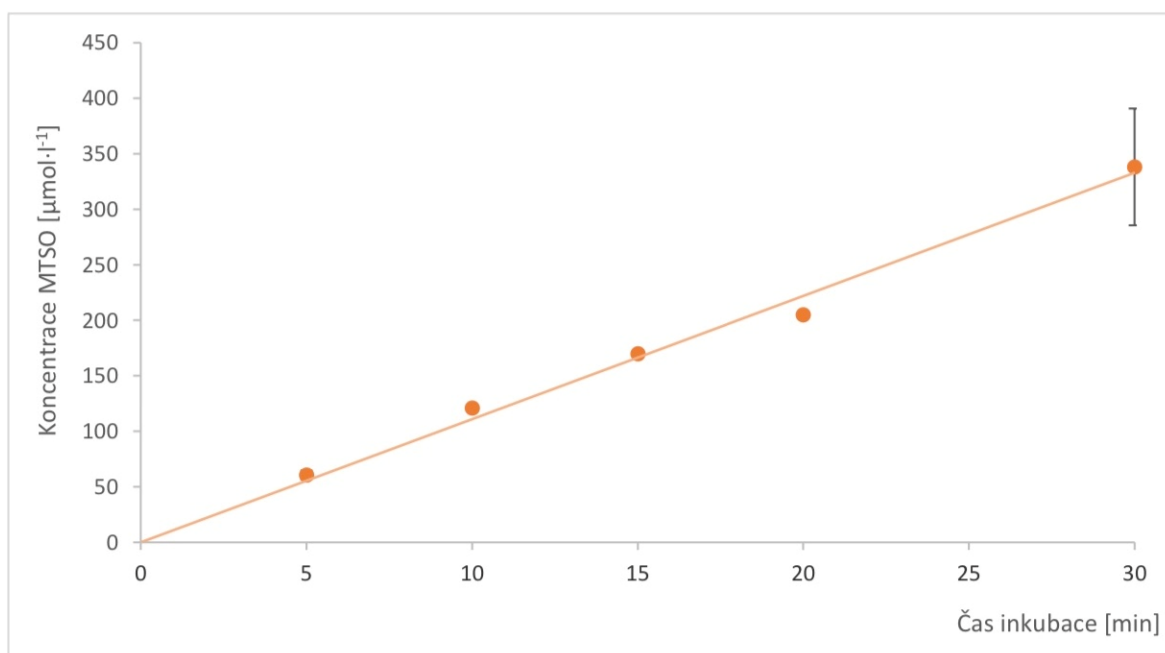
Z výsledků byl potvrzen hyperbolický nárůst rychlosti tvorby MTSO s rostoucí koncentrací substrátu (Obr. 7). Jako optimální koncentrace MTS pro stanovení aktivity FMO byla zvolena 2mM koncentrace MTS, protože při vyšších koncentracích již rychlost reakce významně nestoupala. Vybraná 2mM koncentrace MTS odpovídá používané koncentraci MTS v komerčním návodu [30] a je v souladu s publikovanou hodnotou K_m rekombinantní FMO3 pro MTS (45 μ M) [34], která je mnohonásobně nižší.



Obrázek 7: Závislost rychlosti oxidace MTS na koncentraci substrátu.

4.3 Vliv inkubační doby na aktivitu flavinových monooxygenas

Dalším pokusem byla optimalizována doba inkubace reakčních směsí, které obsahovaly komerčně dostupný rekombinantní lidský enzym FMO3 v SupersomechTM. Byla zjištěna přibližně lineární závislost množství vznikajícího MTSO na času inkubace až do 30. minuty (Obr. 8), která byla téměř ideální do použití doby inkubace 10–15 minut. Jako optimální byla ponechána 10minutová doba inkubace, která také odpovídá době inkubace v komerčním návodu [30].

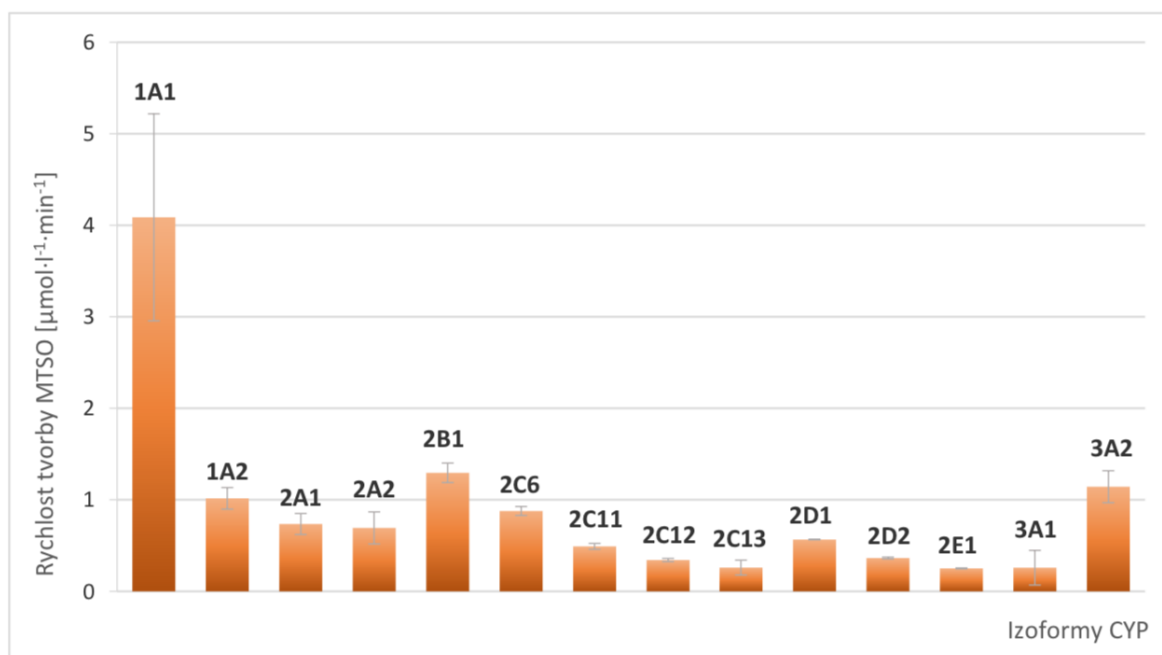


Obrázek 8: Závislost množství vznikajícího MTSO na času inkubace. Zobrazené hodnoty jsou průměry ze dvou měření. Chybové úsečky znázorňují rozdíl získaných hodnot ze dvou měření.

4.4 Oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu potkaními izoformami cytochromu P450

Záměrem dalšího měření bylo zjistit, zda oxidaci MTS katalyzují i CYP a popřípadě jaké konkrétní izoformy CYP se přeměny účastní. Pokus byl proveden s potkaními rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM, protože metoda pro stanovení enzymové aktivity FMO byla následně zkoušena na potkaních jaterních mikrosomech. Reakční směsi obsahovaly 25 pmol příslušné izoformy CYP. Nejvyšší rychlost reakce

přeměny MTS na MTSO byla zaznamenána u CYP1A1 (Obr. 9), a proto byla tato izoforma CYP zvolena na následné testování vlivů inhibitorů na rychlost oxidace MTS.



Obrázek 9: Oxidace MTS potkaními izoformami CYP v *Supersomech*TM (25 μmol /inkubace). Uvedené hodnoty jsou průměry ze dvou měření. Chybové úsečky znázorňují rozdíl získaných hodnot ze dvou měření.

4.5 Vliv inhibitorů na rychlost oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu

Účelem dalšího pokusu bylo ověřit účinnost inhibitorů NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasy (kyselina lipoová), FMO (methimazol) a CYP (detergenty Brij 35 a Triton X-100). Byly připraveny dvě varianty inkubačních směsí, jedna obsahující rekombinantní lidskou FMO3 a druhá obsahující rekombinantní potkaní CYP1A1. Součástí pokusu byly i kontrolní vzorky, které místo zkoušené látky obsahovaly destilovanou vodu nebo glycinový pufr (pH 9,5).

Nejprve byly testovány neiontové detergenty o dvou koncentracích: Triton X-100 a Brij 35, které by měly deaktivovat CYP jejich solubilizací a narušením interakce mezi CYP a reduktasou [13]. Tato činidla byla přidána i do inkubačních směsí s FMO3, aby se vyloučila případná inhibice tohoto enzymu. Oba použité detergenty rušily oxidaci MTS katalyzovanou cytochromem P450 a na aktivitu FMO3 neměly velký vliv (Tab. 2 na straně

31). Ve směsích obsahujících FMO3 a detergent Brij 35 nebylo zaznamenáno žádné snížení rychlosti oxidace MTS, a proto byl vybrán jako inaktivátor CYP používaný pro další měření.

Tabulka 2: Vliv detergentů na oxidaci MTS zprostředkovanou FMO3 a CYP1A1. K měření byla použita komerčně dostupná rekombinantní lidská FMO3 v SupersomechTM a rekombinantní potkaní CYP1A1 v SupersomechTM. Uvedená procenta se vztahují ke kontrolnímu vzorku obsahujícímu vodu místo roztoku detergentu.

	FMO3		CYP1A1	
	Rychlost tvorby MTSO [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	[%]	Rychlost tvorby MTSO [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	[%]
Bez detergentu	12,9	100 %	4,4	100 %
0,05% Triton X - 100	11,5	89 %	-	0 %
0,1% Triton X - 100	11,1	86 %	-	0 %
0,1% Brij 35	13,5	105 %	-	0 %
0,2% Brij 35	13,8	100 %	-	0 %

Při dalším měření byly testovanými látkami 2mM kyselina lipoová [11] jako případný inhibitor NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, 2mM methimazol [31] jako inhibitor FMO3 a methanol, v němž byl rozpuštěn použitý methimazol, abychom si ověřily, zda nemá na tvorbu produktu nežádoucí vliv.

V reakční směsi obsahující 25 pmol CYP1A1 nezpůsobila 2mM kyselina lipoová inhibici NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (Tab. 3 na straně 32), která by vedla k zastavení oxidace MTS. Ve směsi obsahující FMO3 je ovšem vidět mírný pokles rychlosti oxidace MTS, který by se dala vysvětlit působením kyseliny lipoové jako inhibitoru FMO. Bylo prokázáno, že kyselina lipoová vlivem některých izoform FMO (FMO1 a FMO2) podléhá S-oxygenaci a je tedy i jejich substrátem. Může snižovat aktivitu FMO v jiné reakci [35]. Kyselina lipoová nebyla v dalších experimentech používána.

V inkubační směsi s FMO3 obsahující methanol byl překvapivě zaznamenán pokles tvorby MTSO. Tento pokles ale nebyl při žádném dalším měření zaznamenán (Obr. 10 na

straně 33 a Obr. 11 na straně 34), jedná se zřejmě o chybu v měření. Ve směsi obsahující CYP methanol pokles tvorby produktu nezpůsobil.

Dále byla v inkubačních směsích vyzkoušena a potvrzena účinnost 2mM methimazolu jako inhibitoru FMO3. Ve směsích obsahujících FMO3 a methimazol nevznikl žádný MTSO a reakce byla úplně zastavena. Slabý inhibiční účinek měl methimazol i na CYP1A1, což bylo potvrzeno i u některých jiných izoform CYP [36].

Tabulka 3: Vliv zkoumaných látek na oxidaci MTS. K měření byla použita komerčně dostupná rekombinantní lidská FMO3 v SupersomechTM a rekombinantní potkaní CYP1A1 v SupersomechTM. Uvedená procenta se vztahují ke kontrolnímu vzorku obsahujícímu pufr místo zkoumaného inhibitoru.

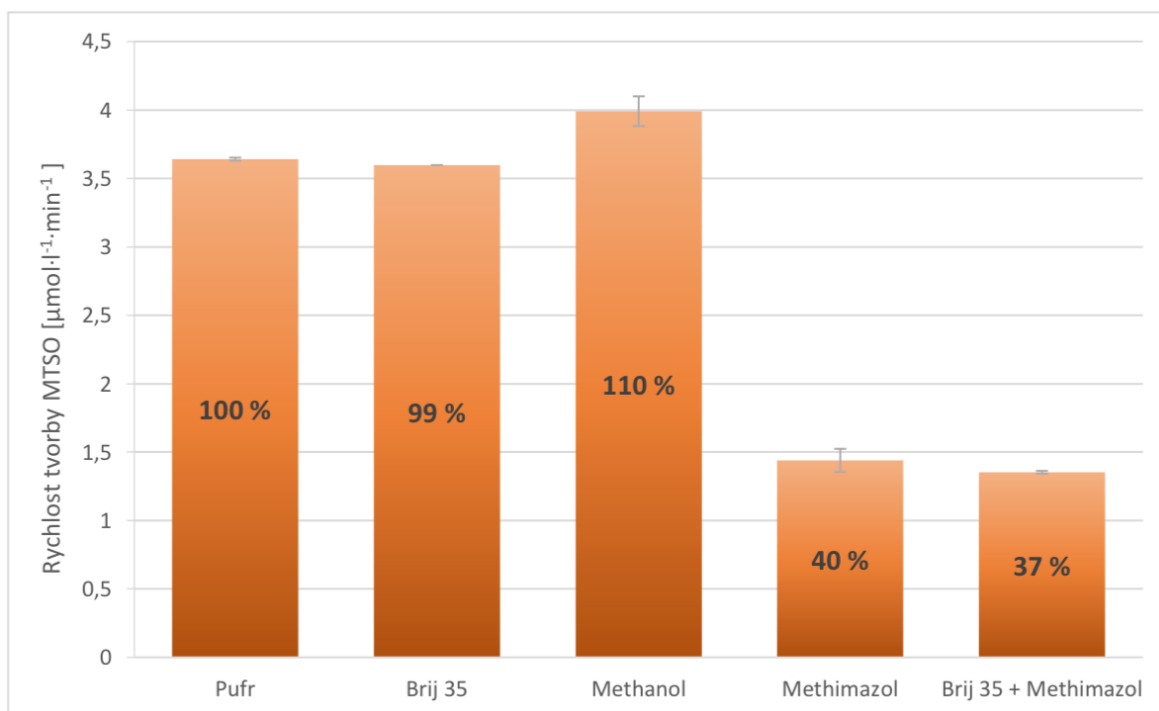
	FMO3		CYP1A1	
	Rychlost tvorby		Rychlost tvorby	
	MTSO [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	[%]	MTSO [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	[%]
Pufr	9,6	100 %	4,6	100 %
Kyselina lipoová	8,3	87 %	5,3	117 %
Methanol	7,3	76 %	5,1	110 %
Methimazol	-	0 %	3,9	86 %

4.6 Inkubační směsi s mikrosomy

Pro měření enzymové aktivity FMO v potkaních jaterních mikrosomech byla využita reakce oxidace MTS za optimalizovaných podmínek (glycinový pufr pH 9,5; 2mM MTS a 10minutová doba inkubace). Dále byl sledován vliv neiontového detergentu Brij 35, methanolu a methimazolu na rychlost reakce.

Nejprve byly použity kontrolní jaterní potkaní mikrosomy, které obsahují přirozené zastoupení izoform CYP s převládající podrodinou 2C [37]. Z výsledků bylo potvrzeno, že methanol neinhibuje oxidaci MTS a vznik MTSO (Obr. 10 na straně 33). Ve směsi, kde byl použit methimazol jako inhibitor FMO3, byla tvorba MTSO snížena na 40 %, nedošlo tedy k úplnému zastavení reakce jako v případě reakce katalyzované rekombinantními FMO3 (kapitola 4.5 na straně 30). Přítomnost detergentu Brij 35 v reakční směsi neovlivnila rychlost sledované reakce, což naznačuje, že se mikrosomální CYP na oxidaci MTS nepodílely. To potvrzuje i výsledek z inkubační směsi, do které byl přidán Brij 35 i inhibitor

FMO methimazol, a ve které nebylo pozorováno podstatné snížení rychlosti reakce oproti inkubačním směsím se samotným methimazolem. V této reakční směsi stále docházelo k nezanedbatelné tvorbě MTSO a je tedy možné, že reakci také ovlivňuje nějaký jiný enzym (např. cyklooxygenasa) přítomný v mikrosomech, nebo se současně odehrává i neenzymová přeměna MTS (viz kapitola 4.8 na straně 35). Důvodem také může být, že FMO přítomné v potkaní mikrosomální frakci, ve které by se měly vyskytovat izoformy FMO1 a FMO3, nebyly methimazolem inhibovány úplně.

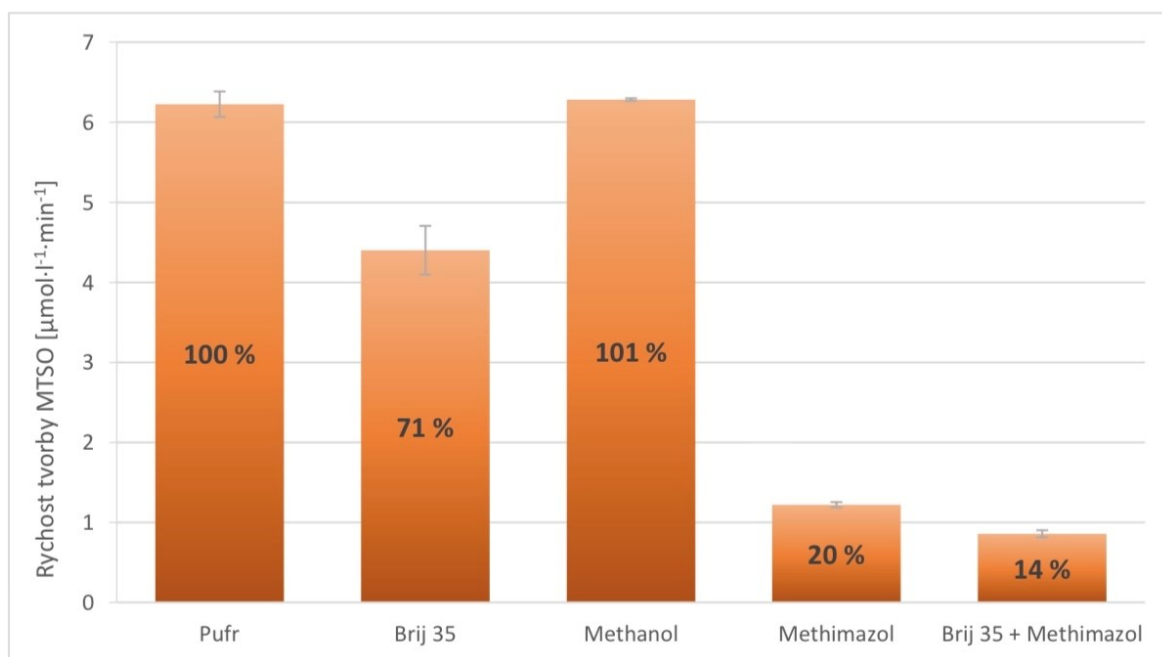


Obrázek 10: Tvorba MTSO zprostředkovaná potkaními jaterními mikrosomy v závislosti na složení inkubačních směsí. Uvedené hodnoty jsou průměry ze dvou měření. Chybové úsečky znázorňují rozdíl získaných hodnot ze dvou měření. Procenta uvedená na sloupcích jsou vztahena ke vzorku obsahující pouze pufr.

V dalším pokusu byly použity místo kontrolních potkaních jaterních mikrosomů jaterní mikrosomy potkanů, kteří byli vystaveny působení β -naftoflavonu, specifickému induktoru CYP1A1 [32]. Tyto jaterní mikrosomy byly vybrány z důvodu získaných výsledků uvedených v kapitole 4.4 na straně 29, ve kterých bylo zjištěno, že CYP1A1 nejvíce ze všech CYP přispívá k oxidaci MTS na MTSO. Jako inaktivátor CYP byl použit opět 0,1% Brij 35.

Výsledky opět potvrdily, že methanol nemá vliv na tvorbu MTSO (Obr. 11 na straně 34). Brij 35 způsobil výraznější snížení rychlosti oxidace MTS než v případě kontrolních

mikrosomů, což dokazuje, že reakce zde byla více ovlivněna cytochromy P450 oproti reakci zprostředkované mikrosomy z kontrolních potkanů. Při použití methimazolu byla tvorba MTSO snížena na 20 %, což je o polovinu méně než u inkubačních směsí obsahujících kontrolní potkaní jaterní mikrosomy, ale stále vznikalo malé množství MTSO. Při použití kombinace methimazolu a Brije 35 byla rychlost oxidace MTS opět snížena více oproti reakčním směsím s kontrolními mikrosomy. To potvrzuje větší ovlivnění oxidace MTS cytochromy P450, na které může mít methimazol také inhibiční vliv [36].

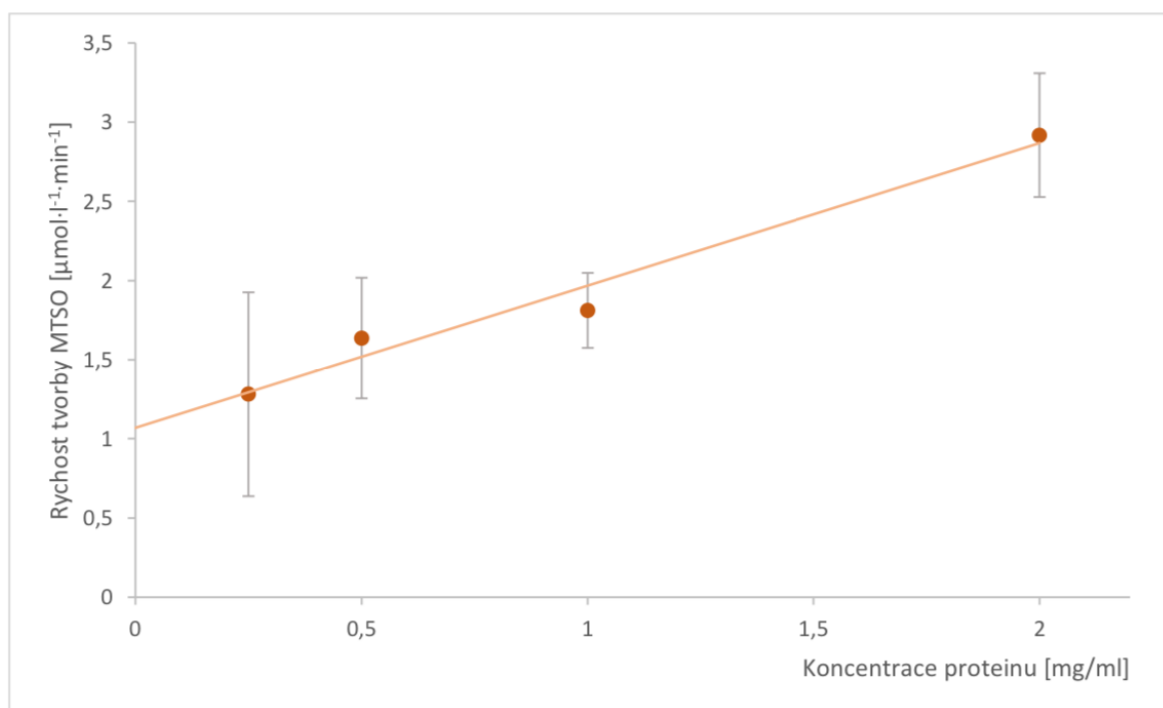


Obrázek 11: Tvorba MTSO v závislosti na složení inkubačních směsí. V inkubačních směsích byly použity jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných β-naftoflavonem, induktorem izoformy CYP1A1. Uvedené hodnoty jsou průměry ze dvou měření. Chybové úsečky znázorňují rozdíl získaných hodnot ze dvou měření. Procenta uvedená na sloupcích jsou vztažena ke vzorku jedna obsahující pouze pufr.

4.7 Vliv koncentrace enzymu na rychlost oxidace MTS

Záměrem posledního pokusu bylo ověřit lineární závislost rychlosti oxidace MTS na množství použitých kontrolních jaterních potkaních mikrosomů, a tedy koncentraci FMO v reakční směsi. Při přípravě inkubačních směsí byly použity optimalizované podmínky a 0,1% Brij 35 jako inhibitor CYP. Byly připraveny i dva slepé vzorky, jeden bez přítomnosti mikrosomů a druhý bez přítomnosti NADPH. U obou slepých vzorků byl předpokládán vznik zanedbatelného množství MTSO tak, jak tomu bylo ve všech předchozích měření, ale v obou z nich byla zaznamenána tvorba poměrně velkého množství MTSO. Vzhledem k reakční směsi s obsahem FMO o koncentraci 1 mg/ml byl ve slepém vzorku bez obsahu

NADPH výtěžek MTSO 55 % a ve slepém vzorku bez přítomnosti mikrosomů 94 %. U slepého vzorku, který neobsahoval NADPH, bylo množství vzniklého MTSO menší než u slepého vzorku bez mikrosomů, a proto byl využit k vyhodnocení závislosti rychlosti oxidace MTS na koncentraci FMO (Obr. 12), i když je třeba zdůraznit, že toto vyhodnocení je pouze orientační a nemůže být považováno za skutečnou závislost rychlosti měřené reakce na koncentraci FMO.



Obrázek 12: *Závislost rychlosti reakce na koncentraci proteinu v potkaních jaterních mikrosomech. Uvedené hodnoty jsou průměry ze tří měření, ze kterých jsou vypočtené směrodatné odchylky.*

4.8 Tvorba methyl-p-tolylsulfoxidu ve slepých vzorcích

V průběhu experimentální práce byly u každého pokusu připravovány slepé vzorky inkubačních směsí, které neobsahovaly buď kofaktor NADPH nebo enzym. Ve slepých vzorcích byla následně analyzována případná tvorba MTSO, která by nebyla zprostředkována FMO nebo CYP.

V experimentech popsaných v kapitolách 4.1–4.6 nebyl ve většině případů ve slepých vzorcích detekován žádný vznikající MTSO. Pouze v reakčních směsích s jaterními potkaními mikrosomy bez NADPH byl MTSO nalezen, jeho množství ovšem nepřesáhlo 3 % množství MTSO vytvořeného v úplných inkubačních směsích a hodnoty naměřené pro slepé vzorky byly odečteny od hodnot naměřených pro úplné inkubační směsi.

Po delší pracovní přestávce způsobené uzavřením VŠ z důvodu zamezení šíření onemocnění COVID-19 bylo opakováno měření s kontrolními potkaními jaterními mikrosomy (výsledky v BP neuvedeny) a provedeno měření závislosti rychlosti oxidace MTS na koncentraci enzymu (kap. 4.7 na straně 34). V těchto pokusech docházelo k tvorbě velkého množství MTSO ve všech slepých vzorcích, ve kterých množství naměřeného MTSO dosahovalo 20–130 % MTSO vytvořeného v úplných inkubačních směsích v závislosti na vzorku. V jednom případě inkubační směsi s 1mM NADPH ale bez enzymového preparátu a v jednom případě inkubační směsi s jaterními mikrosomy kontrolních potkanů (1 mg/ml) ale bez NADPH došlo k tvorbě až 10 nmol MTSO.

Pomocí HPLC byla provedena analýza proměnlivých vzorků obsahujících vedle MTS i jednotlivé složky reakční směsi s cílem zjistit, zda některá z nich nemá za daných reakčních podmínek vliv na neenzymovou tvorbu MTSO z MTS. Bylo prokázáno, že nedochází k samovolné přeměně MTS na MTSO ve vzorkovém pufru o pH 9,5 s přídavkem acetonitrilu, jehož objem odpovídá množství acetonitrilu přidávaného z důvodu zastavení reakce. Ani přítomnost detergentu Brij 35 o koncentraci 0,1 %, ani zahřátí směsi 2mM MTS, glycinového pufru a 0,1% Brij 35 na 37 °C po dobu 10 min a následné přidání acetonitrilu nevedlo k tvorbě MTSO. Ve vzorcích obsahujících mikrosomy ale žádné NADPH nebo NADPH bez enzymového preparátu již však MTSO nalezen byl. Žádná reprodukovatelná souvislost mezi vlivem NADPH (bez enzymu) nebo mikrosomů (bez přidaného NADPH) na množství vznikajícího MTSO však nebyla pozorována. Navíc, jak už bylo zmíněno, v předchozích experimentech (kap. 4.1–4.6) k této neenzymové tvorbě MTSO téměř nedocházelo. Z časových důvodů nebyla příčina původu MTSO v reakčních směsích dále zkoumána. Ještě by mohl být prověřen vliv různého množství NADPH na stabilitu MTS za stávajících reakčních podmínek a případný vliv delšího stání hotových vzorků (po inkubaci, zastavení reakce, stočení a odebrání supernatantu) před samotnou analýzou na HPLC.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala optimalizací metody pro stanovení aktivity flavinových monooxygenas. Z počátku se jevila optimalizace jako úspěšná, ovšem v závěru měření se vyskytly problémy se slepými vzorky a optimalizovaná metoda tedy neposkytla vyhovující výsledek.

Hlavní závěry bakalářské práce:

- Při použití rekombinantní lidské FMO3 se podařilo optimalizovat podmínky reakce, oxidace methyl-*p*-tolylsulfidu, pro stanovení enzymové aktivity flavinových monooxygenas (glycinový pufr pH 9,5; 2mM MTS a 10minutová doba inkubace).
- Jako vhodný inaktivátor katalytického účinku cytochromů P450 byl vybrán neiontový detergent Brij 35 o koncentraci 0,1 %.
- Z důvodu významné tvorby methyl-*p*-tolylsulfoxidu, která není v reakčních směsích zprostředkována enzymy, není zde používaná metoda vhodná pro stanovení aktivity flavinových monooxygenas v mikrosomálních frakcích.
- Důvody nezanedbatelného množství methyl-*p*-tolylsulfoxidu vznikajícího ve slepých vzorcích musí být dále zkoumány.

SEZNAM LITERATURY

- [1] PARKINSON, A.: Biotransformation of xenobiotics. V *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klassen C.D, ed.). McGraw-Hill, New York, 2001, 133–224.
- [2] CALDWELL, J.; GARDNER, I.; SWALES, N.: An Introduction to Drug Disposition: The Basic Principles of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. *Toxicologic Pathology*. 1995, **23**, 102–114.
- [3] HORÁK, J.; LINHART, I.; KLUSOŇ, P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2004.
- [4] PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A: Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008, **29**, 294–301.
- [5] LINHART, I.: *Toxikologie*. 2. vyd. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2004.
- [6] STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; HODEK, P.; FREI, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy*. 1999, **93**, 229–237.
- [7] TICHÝ, M.: *Toxikologie pro chemiky*. 2. vyd. Praha, Karolinum, 2003.
- [8] TORRES PAZMINO, D.E.; WINKLER, M.; GLIEDER, A.; FRAAIJE, M.W.: Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*. 2010, **146**, 9–24.
- [9] STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PÁČA, J. JR.; MARTÍNEK, V.; PÁČA, J: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy*. 2004, **98**, 876–890.
- [10] HUIJBERS, M.M.E.; MONTERSINO, S.; WESTPHAL, A.H.; TISCHLER, D.; BERKEL, W.J.H.: Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, **544**, 2–17.

- [11] KRUEGER, S.K.; WILLIAMS, D.E.: Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005, **106**, 357–387.
- [12] ESWARAMOORTHY, S.; BONANNO, J.B.; BURLEY, S.K.; SWAMINATHAN, S.: Mechanism of action of flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2006, **103**, 9832–9837.
- [13] NOVICK, R.M.; MITZEY, A.M.; BROWNFIELD, M.S.; ELFARRA, E.A.: Differential Localization of Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) Isoforms 1, 3, and 4 in Rat Liver and Kidney and Evidence for Expression of FMO4 in Mouse, Rat, and Human Liver and Kidney Microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009, **329**, 1148–1155.
- [14] PHILLIPS, I.R.; DOLPHIN, C.T.; CLAIR, P.; HADLEY, M.R.; HUTT, A.J.; MCCOMBIE, R.R.; SMITH, R.L.; SHEPHARD, E.A.: The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man. *Chemico-Biological Interaction*. 1995, **96**, 17–32.
- [15] ALFIERI, A.; MALITO, E.; ORRU, R.; FRAAIJE, M.W.; MATTEVI, A.: Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2008, **105**, 6572–6571.
- [16] BERNHARDT, R.: Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*. 2006, **124**, 128–45.
- [17] HANNEMANN, F.; BICHET, A.; EWEN, K.M.; BERNHARDT, R.: Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, **1770**, 330–344.
- [18] DENISOV, I.G.; MAKRIS, T.M.; SLIGAR, S.G.; SCHLICHTING, I.: Structure and chemistry of Cytochrome P450. *Chem, Rev*. 2005, **105**, 2253–2277.

- [19] SOFROVÁ, D.: *Biochemie – základní kurz*. 4. vyd. Praha, Karolinum, 2009.
- [20] MACHOLÁN, L.; BARTHOVÁ, J.; KUČERA, I.; ZELINKA, J.: *Enzymologie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983.
- [21] DIXIT, A.; ROCHE, T.E.: Spectrophotometric Assay of the Flavin-Containing Monooxygenase and Changes in Its Activity in Female Mouse Liver with Nutritional and Diurnal Conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983, **233**, 50–63.
- [22] KRUEGER, S.K.; MARTIN, S.R.; YUEH, M.; PEREIRA, C.B.; WILLIAMS, D.E.: Identification of active flavin-containing monooxygenase isoform 2 in human lung and characterization of expressed protein. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002, **30**, 34–41.
- [23] GAO, CH.; CATUCCI, G.; GILARDI, G.; SADEGHI, S.J.: Binding of methimazole and NADP(H) to human FMO3: In vitro and in silico studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **118**, 460–468.
- [24] GROTHUSEN, A.; HARDT, J.; BRÄUTIGAM, L.; LANG, D.; BÖCKER, R.: A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Arch Toxicol*. 1996, **71**, 64–71.
- [25] RYU, S.D.; YI, H.G.; CHA, Y.N.; KANG, J.H.; KANG, J.S.; JEON, Y.CH.; PARK, H.K.; YU, T.M.; LEE, J.N.; PARK, CH.S.: Flavin-containing monooxygenase activity can be inhibited by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *Life Sciences*. 2004, **75**, 2559–2572.
- [26] <http://eawag-bbd.ethz.ch/core/graphics/r1311.gif> 11.3.2020, 10:22
- [27] LAVADO, R., APARICIO-FABRE, R., SCHLENK, D., Effects of salinity acclimation on the pesticide-metabolizing enzyme flavin-containing monooxygenase (FMO) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2013, **157**, 9–15.

- [28] DROR, A.; FISHMAN, A.: Engineering Non-Heme Mono- and Dioxygenases for Biocatalysis. *Computational Structural Biotechnology Journal*. 2012, **2**, 1–12.
- [29] THALACKER, F.W.; SWANSON, H.R.; FREAR, D.S.: Characterization, Purification, and Reconstitution of an Inducible Cytochrome P450-Dependent Triasulfuron Hydroxylase from Wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1994, **49**, 209–223.
- [30] https://certs-ecatalog.corning.com/life-sciences/certs/456233_9085004.pdf 3.4.2020, 16:08
- [31] YEUNG, C.K.; RETTIE A.E.: Prochiral Sulfoxidation as a Probe for Flavin-Containing Monooxygenases. *Methods in Molecular Biology*. 2006, **320**, 163–172.
- [32] LNĚNIČKOVÁ, K.; SKÁLOVÁ, L.; STUHLÍKOVÁ RAISOVÁ, L.; SZOTÁKOVÁ, B.; MATOUŠKOVÁ, P.: Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: Time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels. *Acta Pharmaceutica*. 2018, **68**, 75–85.
- [33] SCHLENK, D.: Occurrence of flavin-containing monooxygenases in non-mammalian eukaryotic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1998, **121**, 185–195.
- [34] SHIMIZU, M.; YANO, H.; NAGASHIMA, S.; MURAYAMA, J.Z.; CASHMAN, J.R.; YAMAZAKI, H.: Effect of Genetic Variants of the Human Flavin-Containing Monooxygenase 3 on N- and S-Oxygenation Activities. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006, **35**, 328–330.
- [35] PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A.: Endogenous Roles of Mammalian Flavin-Containing Monooxygenases. *Catalysts*. 2019, **9**, 1–19.
- [36] GUO, Z.Y.; RAEISSI, S.; WHITE, R.B.; STEVENS, J.C.: Orphenadrine and methimazole inhibit multiple cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 1997, **25**, 390–393.

[37] MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G.M.M.; KANTER, R.: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2006, **2**, 875–894.