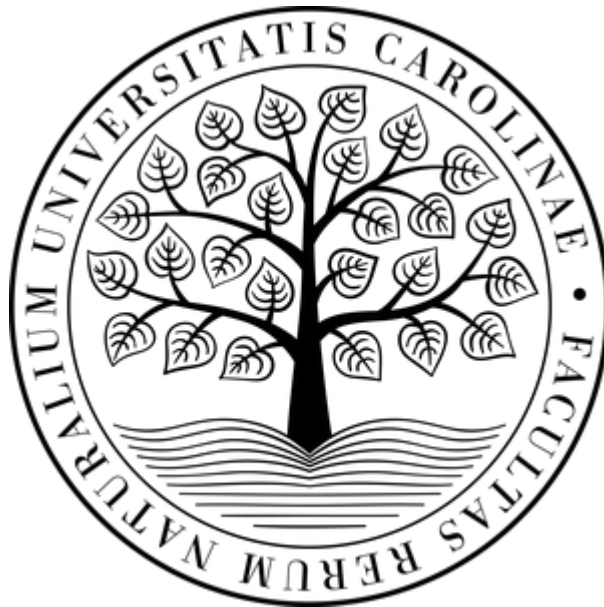


Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Jakub Netolický

Vliv cytochromu b_5 na enzymovou kinetiku hydroxylace Sudanu I lidským
cytochromem P450 1A1

Effect of cytochrome b_5 on enzyme kinetics of Sudan I hydroxylation catalyzed by human
cytochrome P450 1A1

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Václava Martínka, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně odcitoval.

V Praze dne 18.8.2019

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D., za odborné vedení této diplomové práce a za pomoc při vyhodnocování a vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a kamarádům, za podporu při celém mém vysokoškolském studiu a v neposlední řadě kolegům z laboratoře 221 za příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

Cytochromy P450 jsou jedny z hlavních enzymů přeměňujících xenobiotika. Jsou řazeny mezi monooxygenasy se smíšenou funkcí (MFO). Isoforma 1A1 je extrahepatální forma nacházející se hlavně v plicích, minoritně i v jiných orgánech. Je výrazně indukována polycyklickými aromatickými uhlovodíky a jejich deriváty prostřednictvím Ah receptoru. Jako markerová reakce pro tento enzym lze využít hydroxylace Sudanu I, který se dříve hojně používal jako barvivo v průmyslu. V 80. letech byl prokázán jeho negativní vliv na organismus. NADPH:cytochrom P450 reduktasa je hlavním donorem elektronů pro monooxygenační reakce katalyzované cytochromy P450. Dalším přenašečem elektronů pro reakce katalyzované cytochromy P450 je pak cytochrom b_5 . Jak již bylo dokázáno, vzájemný poměr reduktasy a cytochromu b_5 může mít vliv na přeměnu řady xenobiotik tedy i na hydroxylaci Sudanu I.

Tato práce se zabývá vlivem vzájemných poměrů NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b_5 vůči cytochromu P450 1A1 na hydroxylaci Sudanu I. Hlavním úkolem tedy je charakterizovat vliv poměrů elektronového donoru a elektronového přenašeče na hydroxylaci Sudanu I, konkrétně určit kinetické parametry K_M a V_{MAX} pro vybrané poměry proteinů. Dílčími úkoly práce pak bylo charakterizovat využívané proteiny a případně je purifikovat, optimalizovat metody přípravy vzorků a zpřesnit kvalitativní a kvantitativní stanovení metabolitů Sudanu I.

Klíčová slova: cytochrom P450, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytochrom b_5 , protein-protein interakce, Sudan I, HPLC, enzymová kinetika

Abstract

Cytochromes P450 are the major xenobiotics converting enzymes. They are classified as mixed function monooxygenases (MFO). Isoform 1A1 is an extrahepatic form found mainly in the lung and other tissues. It is strongly induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives via the Ah receptor. As a marker reaction for this enzyme can be used hydroxylation of Sudan I, which has previously been widely used as an azo dye in industry, but since 1980s it is banned for coloring food and cosmetics for its negative influence on the organism. NADPH:cytochrome P450 reductase is the major electron donor for cytochrome P450 catalyzed monooxygenation reactions. Another electron carrier for cytochrome P450 catalyzed reactions is cytochrome b₅. It was shown that cytochrome b₅ can stimulate, inhibit or have no effect on P450 catalyzed reactions.

This thesis aims to evaluate the influence of the ration between NADPH:cytochrome P450 reductase and cytochrome b₅ on cytochrome P450 1A1 catalyzed Sudan I hydroxylation. The main goal is to characterize the influence of electron donor and electron transfer ratios on hydroxylation of Sudan I, and to determine the kinetic parameters K_M and V_{MAX} for selected protein ratios. Partial aims of the thesis were to characterize the recombinant proteins used in this study and possibly to purify them, to optimize the methods of sample preparation and to refine the qualitative and quantitative determination of Sudan I metabolites.

(In Czech)

Key words: cytochrome P450, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase, cytochrome b₅, protein-protein interaction, Sudan I, HPLC, enzyme kinetics

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	9
1.1. Cizorodé látky a oxygenasa se smíšenou funkcí.....	10
1.1.1. Cytochrom P450	10
1.1.1.1. Cytochrom P450 1A1	15
1.1.2. Cytochrom b ₅	16
1.1.3. NADPH: cytochrom P450 reduktasa.....	17
1.2. Vzájemné membránové interakce proteinů asociovaných s CYP	20
1.3. Sudan I.....	22
1.3.1. Metabolismus Sudanu I	23
2. Cíle	25
3. Materiál a metody	26
3.1. Použitý materiál a chemikálie.....	26
3.2. Použité rekombinantní proteiny.....	26
3.3. Přístroje a vybavení	27
3.4. Metody	28
3.4.1. Charakterizace a purifikace cyt. b ₅	28
3.4.2. Charakterizace a purifikace CPR.....	31
3.4.3. Stanovení aktivity CPR reduktasy vůči cyt. c	32
3.4.4. Charakterizace CYP1A1.....	33
3.4.5. Metoda HPLC.....	34
3.4.6. Optimalizace extrakce Sudanu I.....	34

3.4.7.	Eluční a spektrální přiřazení metabolitů.....	36
3.4.8.	Kalibrace metody HPLC pro Sudan I a jeho metabolity.....	36
3.4.9.	Inkubace systémů obsahujících CYP1A1, cyt. b ₅ a CPR se Sudanem I.....	37
3.4.10.	Určení časové závislosti hydroxylace Sudanu I pomocí CYP1A1.....	39
3.4.11.	Kinetika hydroxylace Sudanu I pro vybrané poměry CPR a cyt. b ₅ vůči CYP1A1.....	40
4.	Výsledky	43
4.1.	Charakterizace a purifikace cyt. b ₅	43
4.2.	Charakterizace a purifikace CPR.....	46
4.3.	Charakterizace CYP1A1.....	50
4.4.	Optimalizace metod stanovení Sudanu I a jeho metabolitů.....	52
4.4.1.	Optimalizace extrakce Sudanu I.....	52
4.4.2.	Eluční a spektrální přiřazení Sudanu I a jeho metabolitů při metodě HPLC s využitím UV-VIS detekce.....	54
4.4.3.	Kalibrace metody HPLC.....	57
4.5.	Inkubace systémů obsahujících CYP1A1, cyt. b ₅ a CPR se Sudanem I.....	58
4.6.	Optimalizace času inkubace pro kinetická měření.....	65
4.7.	Kinetika hydroxylace Sudanu I při různých poměrech CPR a cyt. b ₅ vůči CYP1A1.....	66
5.	Diskuse	69
6.	Závěr	74
7.	Literatura	75

Seznam použitých zkratek

Ah receptor	receptor aryl uhlovodíků (z angl. Aryl hydrocarbon receptor)
a_{CPR}	aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
APS	peroxosíran amonný
A_x	absorbance při vlnové délce x
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
c_x	koncentrace látky x
CYB5R	NADH:cytochrom b_5 reduktasa
CYP resp. CYP1A1	cytochrom P450 resp. cytochrom P450 isoforma 1A1
Cyt. b_5	cytochrom b_5
Cyt. c	cytochrom c
DLPC	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ER	endoplazmatické retikulum
f	faktor korekce odpařování methanolu
FPLC	rychlá kapalinová proteinová chromatografie (z anglického: fast protein liquid chromatography)
GSH	glutathion
HCA	heterocyklické aromatické aminy
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (z anglického: high-pressure liquid chromatography)
IEX	iontově výměnná chromatografie (z anglického: ion exchange chromatography)
k_{cat}	číslo přeměny
K_M	Michaelisova konstanta
l	šířka kyvety
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí (z anglického: mixed function oxidases)

MWCO	mezní velikost proteinů, která může membránou projít (z anglického: molecular weight cut-off)
n	Hillův faktor
NAD⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
RPM	otáčky za minutu (z anglického: revolutions per minute)
RZ	poměr absorbance Sorretova pásu a absorbance při 280 nm (z německého: Reinheitszahl)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV/VIS	ultrafialová/viditelná spektrofotometrie (z angl. Ultraviolet/visiable spectrophotometry)
v	rychlost vzniku produktu
v/v	„volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml roztoku
V_{MAX}	maximální (limitní) rychlost reakce
w/v	„weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml roztoku
ε_x	molární extinkční koeficient proteinu x

1. Úvod

Cytochrom P450 (CYP) je jedním z hlavních enzymů biotransformace xenobiotik (cizorodých látek). Jeho hlavním úkolem je vnést do molekuly xenobiotika hydroxylovou skupinu a zvýšit tak její polaritu, aby mohla být snáze konjugována ve druhé fázi biotransformace či rovnou vyloučena. V některých případech může místo vyloučení dojít k bioaktivaci xenobiotika – molekula se ve své hydroxylované formě stane více reaktivní, což může vést ke karcinogenezi či v pozitivním slova smyslu k aktivaci léčiva. Právě znalost těchto přeměn a reakcí by nám měla pomoci lépe předvídat biotransformaci jak xenobiotik prospěšných, čili léčiv, tak xenobiotik kontaminujících naše životní prostředí, např. polutantů [1]. Spektrum CYP je v našem těle velmi rozmanité a v řadě orgánů se nachází více isoform tohoto enzymu. CYP jsou indukovatelné a při vystavení organismu některému induktoru se může poměr i zastoupení CYP v dané tkáni změnit [2].

Tato práce by měla doplnit a rozšířit poznatky o kooperaci CYP s jeho elektronovým donorem v podobě NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR) a elektronovým přenašečem cytochromem b_5 (cyt. b_5). Většina ostatních studií se zabývá vlastní biotransformací xenobiotik, v této práci je však využívána reakce již relativně prozkoumaná, a to přeměna Sudanu I cytochromem P450 1A1 (CYP1A1). Práce je zaměřena na ověření předpokladu, že změna poměrů složek systému, CYP1A1:CPR:cyt. b_5 , má vliv na rychlosti hydroxylace Sudanu I. Všechny použité proteiny byly připraveny rekombinantní expresí a jejich čistota a koncentrace, případně aktivita, byla v rámci této práce ověřena. Jak již bylo ukázáno v mé bakalářské práci, změna poměrů těchto proteinů má detekovatelný vliv na rychlost přeměny Sudanu I pomocí CYP1A1 [3]. V této práci by měly být výsledky výrazně zpřesněny a doplněny o další měření rozšiřující poznatky o této zajímavé oblasti biochemie cytochromu P450.

1.1. Cizorodé látky a oxygenasa se smíšenou funkcí

Xenobiotika (cizorodé látky) musí po vstupu do organismu projít procesem zvaným biotransformace, jejímž smyslem je zvýšit polaritu xenobiotika a tím zajistit jednodušší vyloučení z organismu. U živočichů jsou známy dvě fáze biotransformace. Není pravidlem, že fáze na sebe musí nutně navazovat nebo se předcházet [4]. U rostlin byla objevena ještě následná třetí fáze, při které probíhá další konjugace [5].

První fáze se nazývá derivatizační. Do molekuly je vnášena skupina zvyšující polaritu (nejčastěji -OH, -NH₂, -SH, -COOH). Oxidaci katalyzují flavinové monooxygenasy nebo oxygenasy se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mix function oxidases). Typickým představitelem MFO je systém, kde jako ternární enzym vystupuje cytochrom P450 (CYP) [4,6].

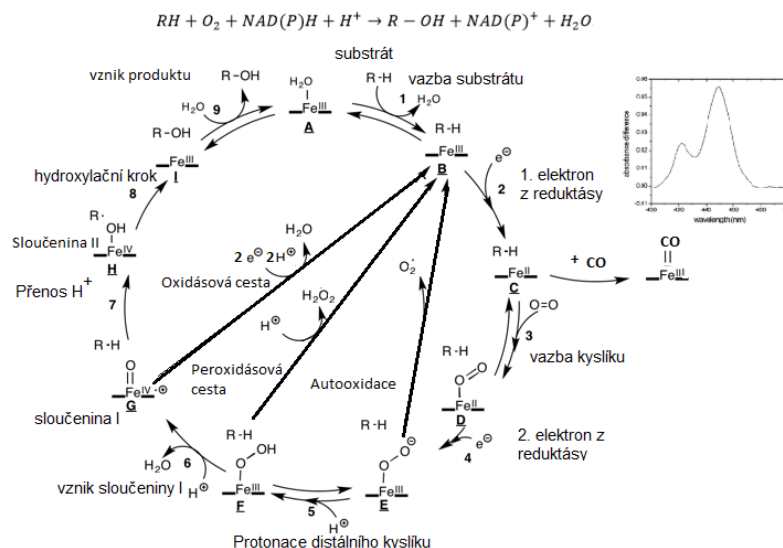
Druhá fáze se nazývá konjugační, v té probíhá konjugace derivatizovaného metabolitu s látkami těla vlastními (eobiotiky), např. s acetátem, sulfátem, kyselinou glukuronovou, glutathionem a některými aminokyselinami. Konjugáty s těmito eobiotiky jsou snáze vylučitelné z těla prostřednictvím moči či stolice [7].

Látka však může být po biotransformaci aktivována, může tedy vykazovat účinky na organismus buď pozitivní (léčiva), či negativní (přeměna z prekarcinogenu na karcinogen a možné zahájení maligní transformace) [8].

1.1.1. Cytochrom P450

Jak již bylo v předchozí kapitole zmíněno, CYP (EC 1.14.14.1.) se řadí mezi oxygenasy se smíšenou funkcí (MFO), to znamená, že se reakce účastní O₂, ale enzym má více katalytických aktivit – může vzniknout více různých produktů či reaktivních částic. Existují tři typy reakcí, které MFO katalyzuje: hydroxylace substrátu za spotřeby O₂, hydroxylace za spotřeby organického peroxidu (R-OOH) a produkce peroxidu vodíku [9].

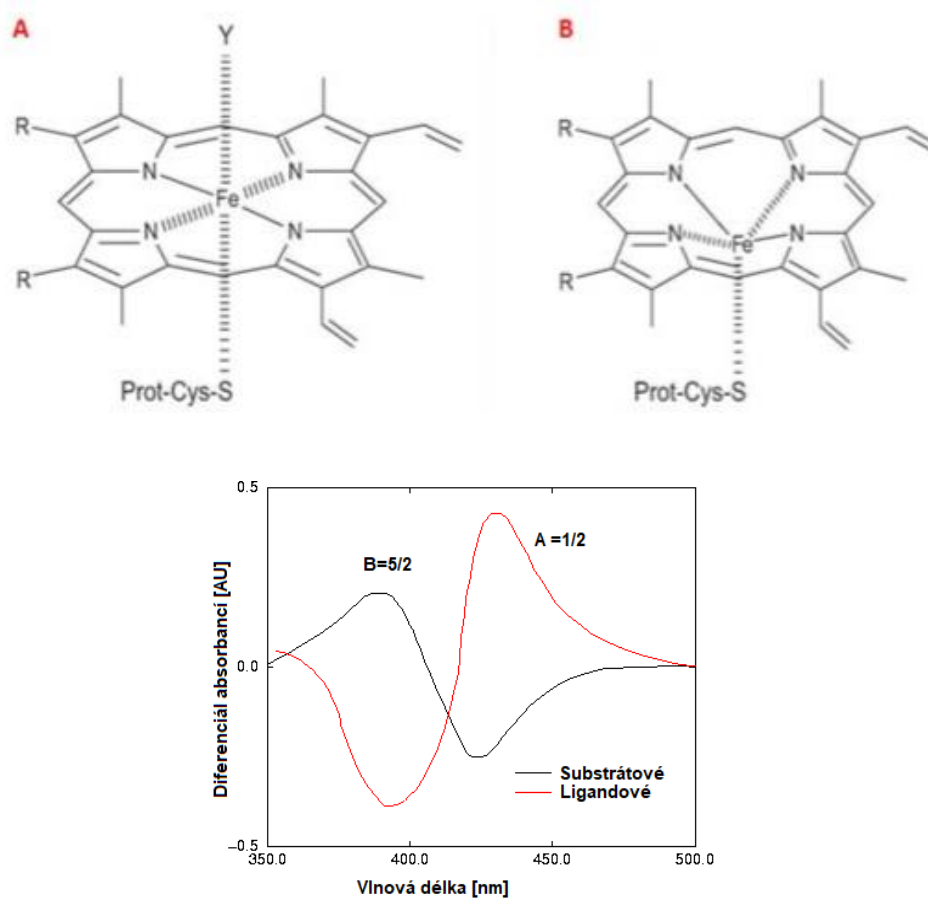
Na Obr. 1 je zobrazena rovnice hydroxylace obecného substrátu a schéma průběhu hydroxylace cytochromem P450.



Obr. 1 Rovnice reakce a schéma reakčního cyklu cytochromu P450. Schéma převzato a upraveno z [10], spektrum komplexu redukováného CYP s CO [11], alternativní cesty (oxidasová, peroxidasová a autooxidace doplněna do schématu podle [12]).

Navázání substrátu na nízkospinovou ferri-formu enzymu (A) způsobí odstoupení molekuly vody, která je šestým ligandem hemu, a změnu na vysokospinovou formu (B). Ta je prvním elektronem redukována na ferro-formu (C), v tomto kroku může dojít k navázání oxidu uhelnatého a Sorretův pás získá typické maximum při 450 nm. Následně se na redukované železo váže molekula kyslíku a vzniká oxo-ferri komplex (D), což je poslední stabilní intermediát v cyklu. Redukcí oxo-ferri komplexu dalším elektronem vznikne peroxo-ferri forma (E) a následnou protonací vznikne hydroperoxo-ferri forma (F). Redukce vzdálenějšího kyslíku a současná hydrolýza vede ke vzniku oxo-ferryl intermediátu (sloučeniny I) (G) a vody. Následně dochází k přenosu H^+ ze substrátu na kyslík vázaný na hemovém železe, a tak vzniká sloučenina II (H). V dalším kroku přechází -OH skupina na substrát za vzniku R-OH (I). V posledním kroku se váže opět voda jako šestý ligand železa a vzniká sloučenina (A).

Peroxidásová cesta vede přes protonaci hydroxoperoxo-ferri formy (F) za uvolnění vodíku do základního vysokospinového stavu (B). Obdobně je tomu i v případě autooxidace oxo-ferri formy (E), která také vede do základního vysokospinového stavu (B), kam směřuje i oxidásová cesta z (G) za příjmu 2 elektronů. (Popis reakčního cyklu převzat a upraven [3,13]). Rozdíl mezi vysokospinovým a nízkospinovým stavem je podrobně popsán na Obr. 2.



Obr. 2 Spinové stavy Fe^{3+} v hemu CYP a jejich absorpční spektrum, převzato a upraveno z [15,16].

A) Hexakoordinované železo (šestý ligand H_2O , $-OH$ či inhibitor CYP) - nízkospinový stav (1/2), redoxní potenciál -360 až -300 mV.

B) Pentakoordinované železo – vysokospinový stav (5/2), redoxní potenciál -170 mV.

CYP patří mezi dvousubstrátové enzymy (1. R-H, 2. O₂), kde záleží na pořadí navázání substrátů a pořadí uvolňování produktů [16]. Reakční centrum je tvořeno hemem. Pátým ligandem železa je -SH skupina cysteinu, kvůli této specifické vazbě se nazývá hemthiolátovým proteinem. Šestým ligandem v základním stavu je voda [15]. Pro svou funkci potřebuje CYP donory elektronů, a to v podobě NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR) nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasy (CYB5R), která potřebuje cyt. b₅ na přenos elektronů z této reduktasy na CYP. Bylo zjištěno, že přenosu elektronů u systému s CPR napomáhá cyt. b₅. Celý systém jak s donorem elektronu (např. CPR), tak s akceptorem elektronu (CYP) jsou asociovány na membráně endoplazmatického retikula (ER) [17]. Procesy přenosu elektronů na CYP a jednotlivé proteiny jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

Názvosloví CYP se tvoří podle následujících pravidel [18,19]:

Cytochrom P450 – P jako pigment, 450 podle charakteristické absorpce při 450 nm v komplexu s CO v redukovaném stavu viz Obr. 1 na str. 11

- první arabská číslice označuje rodinu (homologie primární struktury do 40 %)
- velké písmeno označuje podrodinu (homologie primární struktury větší než 55 %)
- poslední číslice označuje individualitu v podrodině

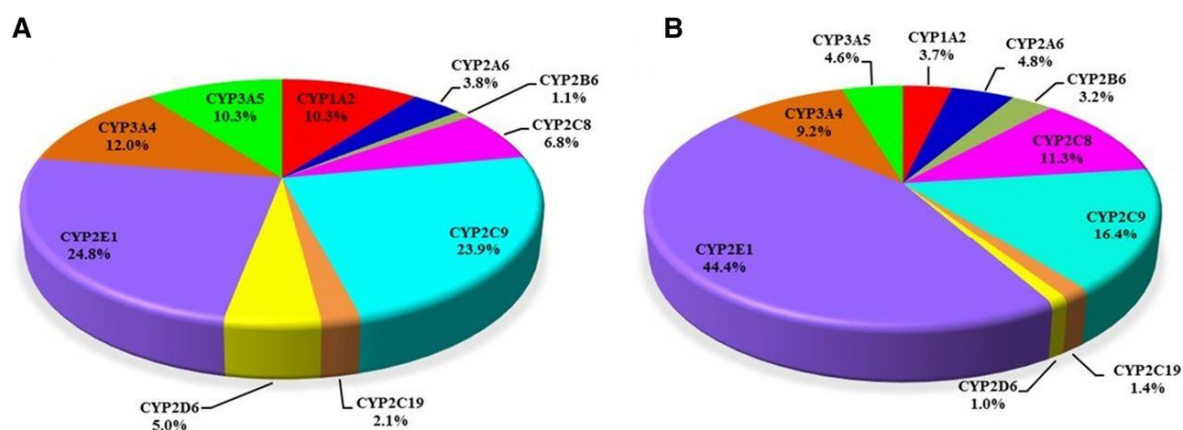
CYP1A1 – 1 rodina, A podrodina a poslední číslice uvádí pořadí při katalogizaci

CYP je rozšířený enzym u všech živých organismů. V současné době je známo okolo 12 500 CYP. Další cca 6 000 objevených není zatím pojmenováno. Z Tab. 1 na str. 14 je vidět, že enzymy typu CYP byly nalezeny u většiny živých organismů. Charakteristika individuality byla u většiny CYP určena pomocí sekvenčních studií [20].

Tab. 1 Tabulka známých CYP a rodin u jednotlivých skupin živých organismů. Převzato a upraveno z [20].

	Počet CYP	CYP rodiny
Zvířata	4 088	156
Hmyz	2 137	67
Obratlovci	1 461	18
Bezobratlí (bez hmyzu)	490	71
Rostliny	4 267	126
Houby	2 784	399
Prvoci	247	62
Bakterie	1 042	333
Archebakterie	26	13
Viry	2	2

CYP jsou zastoupeny u člověka majoritně v játrech, dále byly ve vyšší míře detekovány v plicích, tenkém střevě, mozku, kůži a v nadledvinkách. Řada isoform je specifická orgánově. Rozdílem mezi jednotlivými isoformami je často také specifita vůči různým substrátům, tzv. substrátová specifita [21,22]. Jejich exprese bývá často indukovaná. Příklad studie zastoupení CYP v lidských játrech vidíme na Obr. 3.

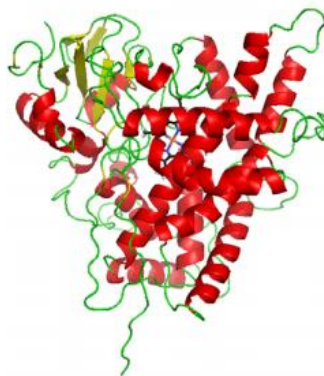


Obr. 3 Zastoupení hlavních isoform CYP v játrech člověka. (A) Obsah jednotlivých isoform celkového množství detekovaných CYP. (B) Obsah mRNA pro konkrétní isoformy CYP ze všech detekovaných. Hodnoty CYP a mRNA byly získány pomocí LC-MS/MS a kvantitativní PCR s reverzní transkripcí ze sta vzorků lidských jater [22].

1.1.1.1. Cytochrom P450 1A1

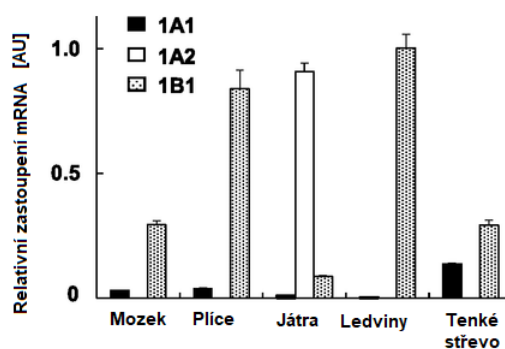
CYP1A1 patří do rodiny 1. Cytochromy této rodiny mají rozdílnou aminokyselinovou sekvenci. Lidský CYP1A1 má s CYP1B1 podobnost 38 %, naopak s CYP1A2 je homologie v aminokyselinové sekvenci 72 % [23]. Tyto isoformy jsou řazeny do stejné rodiny, i přesto že doslova nespňují pravidla v kap. 1.1.1, což je způsobeno podobnou indukcí a substrátovou specifitou. Jsou typické většinou pro polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), heterocyklické aromatické aminy (HCA) [24] a estradioly [26].

CYP1A1 je složen z 512 aminokyselin. Je to typický představitel extrahepatálního CYP, tzn. nenachází se obvykle v játrech. Patří mezi silně inducibilní enzymy. Jeho koncentrace v jednotlivých tkáních se odvíjí od genetického polymorfismu a vystavení xenobiotikům. Induktory exprese CYP1A1 jsou PAU např. benzo[a]pyren prostřednictvím Ah receptoru. Inducibilita a variabilita pravděpodobně způsobuje vznik rakoviny plic. Jeho mutacím je přičítán vliv na zvýšení rizika vzniku rakoviny plic u kuřáků [26,27]. Struktura CYP1A1 je zobrazena na Obr. 4.



Obr. 4 Model struktury CYP1A1. Převzato a upraveno z [28].

Kromě zmíněných plic, a za jistých okolností jater, se CYP1A1 vyskytuje i v jiných orgánech, konkrétně v mozku, ledvinách a tenkém střevě. Porovnání výskytu tří hlavních zástupců rodiny 1 v jednotlivých orgánech u kočkodana jako modelového organismu je zobrazeno na Obr. 5 na str. 16. Zastoupení jednotlivých isoform CYP se může měnit díky rozdílné inducibilitě [29,30].

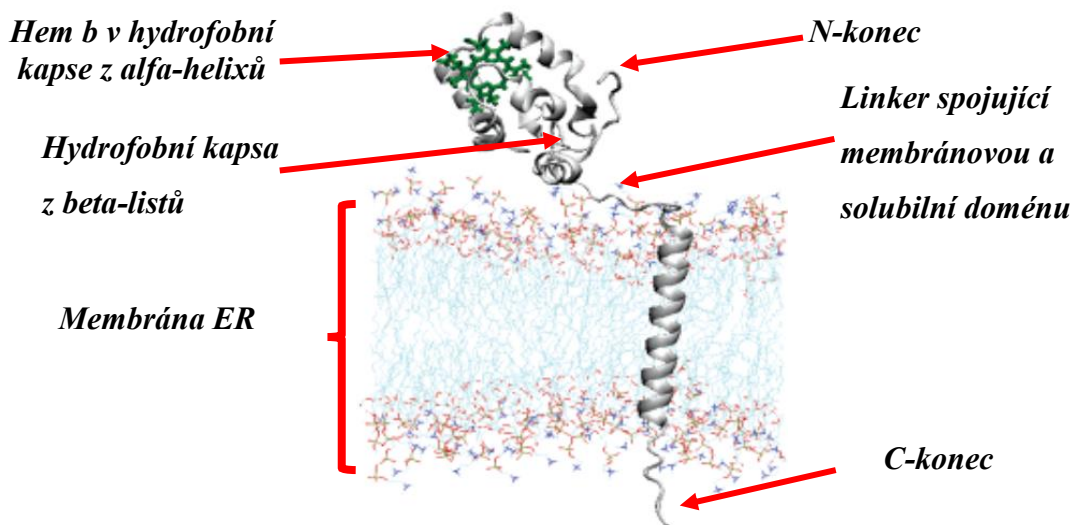


Obr. 5 Zastoupení *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1* v orgánech u kočkodana získáno pomocí RT-PCR. Převzato a upraveno z [29].

1.1.2. Cytochrom b_5

Cytochrom b_5 (cyt. b_5) je hemoprotein o velikosti cca 17kDa [31]. Cyt. b_5 se skládá ze šesti alfa-helixů a pěti beta-listů. N-koncová doména je orientovaná do cytoplazmy, C-koncová doména je hydrofobní a slouží jako membránová kotva. Obě domény jsou spojeny flexibilním „linkrem“ [32]. V hydrofobním jádře na N-koncové doméně je lokalizovaný protoporfyrin IX-hem b, koordinovaný dvěma histidiny. Na N-konci se nachází ještě druhé hydrofobní jádro, které je složeno z beta-listů [33]. Absorpční maximum pro oxidovanou formu je 413 nm a pro redukovanou 423, 526 a 557 nm [35].

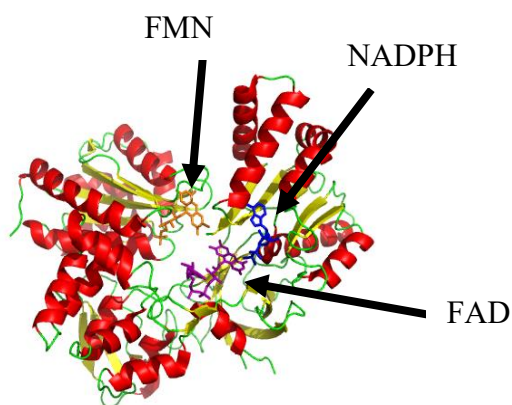
Známé jsou tři isoformy cyt. b_5 : mikrosomální v membráně ER, mitochondriální na vnější straně mitochondrie a cyt. b_5 přítomný v erytrocytech. První dva zmíněné cyt. b_5 jsou si velmi podobné. Místo jejich lokalizace je pravděpodobně kódováno v posledních několika aminokyselinách na C-konci. Erytrocytární cyt. b_5 má název odvozený od místa svého výskytu. V erytrocytech je tato isoforma odpovědná za přeměnu methemoglobinu zpět na hemoglobin. Mikrosomální isoforma slouží jako přenašeč (donor) elektronů např. pro biotransformaci exo- a endogenních látek pomocí CYP, získaných prostřednictvím CPR nebo CYB5R [35]. Kromě toho se mikrosomální cyt. b_5 podílí na základních fyziologických procesech, příkladem může být elongace a desaturace mastných kyselin nebo biosyntesa cholesterolu a plasmogenu [36]. Struktura mikrosomálního cyt. b_5 v membráně je zobrazena na Obr. 6 na str. 17.



Obr. 6 Mikrosomální isoforma cyt. *b5*. Převzato a upraveno z [37].

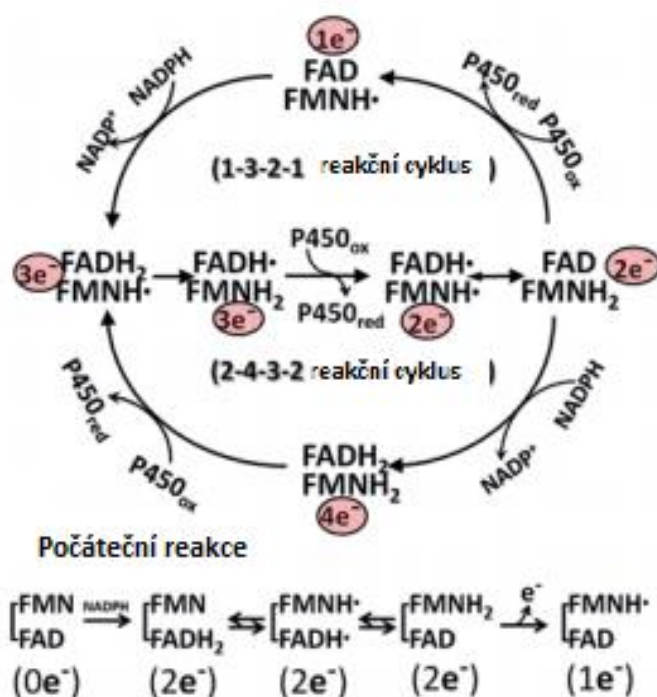
1.1.3. NADPH: cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) je protein o velikosti cca 78 kDa. CPR je hlavním donorem elektronů pro CYP, ale kromě toho se účastní i mnoha jiných procesů, např. odbourávání hemu, kde redukuje hem oxygenasu [38], desaturaci a elongaci mastných kyselin [39] či biosynthesu sterolů [40]. Obsahuje dva flavinové kofaktory (FAD, FMN), čímž je podobná např. NO synthase [41]. Struktura lidské CPR je znázorněna na Obr. 7. Struktura CPR je silně konzervovaná při porovnání její sekvence mezi různými organismy.



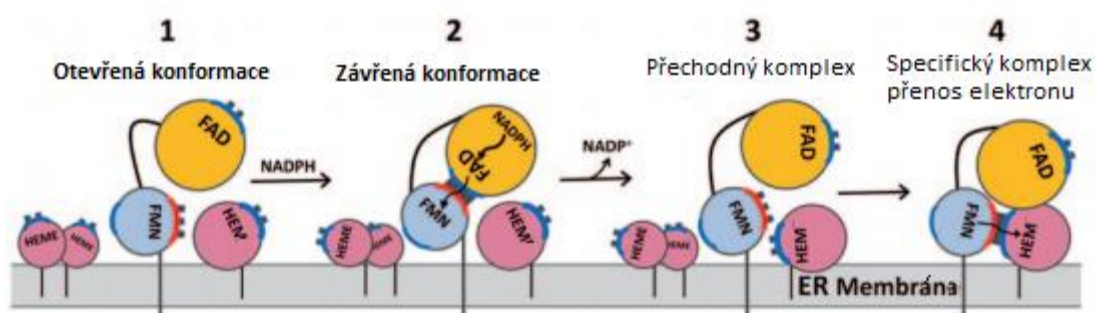
Obr. 7 Lidská CPR reduktasa s vyznačenými kofaktory a navázaným koenzymem NADPH. Převzato a upraveno z [3,42].

Jak již bylo uvedeno, CPR obsahuje dva flavinové kofaktory, FMN a FAD, ty jsou vázány na C-katalytické doméně, která je orientována do cytosolu. Kromě vazby flavinových kofaktorů zajišťuje také vazbu NADPH a celkový přenos elektronů na akceptor (CYP nebo cyt. b₅). C-terminální doménu můžeme tedy rozdělit na doménu vázající FAD a NADPH a doménu vázající FMN. Tyto dvě domény jsou spojeny flexibilní spojovací doménou a obsahujícími kofaktory, které slouží jako dělič elektronového páru. N-terminální doména prochází membránou a je v ní ukotvena hydrofobní částí helixu [43]. Schéma přenosu je znázorněno na Obr. 8, z něhož je patrné, že je vždy na CYP (obdobně by to bylo i na cyt. b₅) přenášen pouze jeden elektron a vznikají semichinoidní formy flavinových koenzymů a CPR tak funguje jako dělič elektronového páru [44].

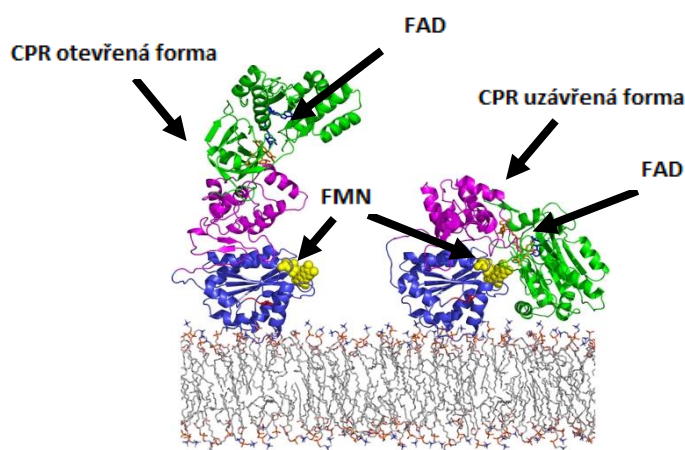


Obr. 8 Funkce CPR jako donoru elektronů – děliče elektronového páru. Jedná se o dva propojené katalytické cykly podle počtu elektronů přenášených kofaktory. Prostřední větev je společná oběma částím. In vivo je dominující 1-3-2-1. Pravděpodobně to závisí na poměru NADPH/NADP⁺. Převzato a upraveno z [45].

Aby mohlo dojít k přenosu elektronů mezi vázanými kofaktory (FMN a FAD), musí docházet ke konformační změně CPR. CPR je vázáno v membráně pomocí svého N-konce a je v otevřené konformaci. Navázáním NADPH se konformace uzavře, elektron (vodík) je přenesen na FAD a následně na FMN (přesný princip popsán na Obr. 8 str. 18). Následně odstupuje NADP⁺ a vzniká přechodný komplex, kdy jsou od sebe odděleny podjednotky nesoucí FAD a FMN. V další fázi vzniká komplex specifický pro přenos elektronu, ty jsou na hem CYP přenášeny z FMN podjednotky [46]. Celý tento proces přenosu elektronu a konformační změny je znázorněn na Obr. 9. Model otevřené a uzavřené formy CPR v membráně je zobrazen na Obr. 10.



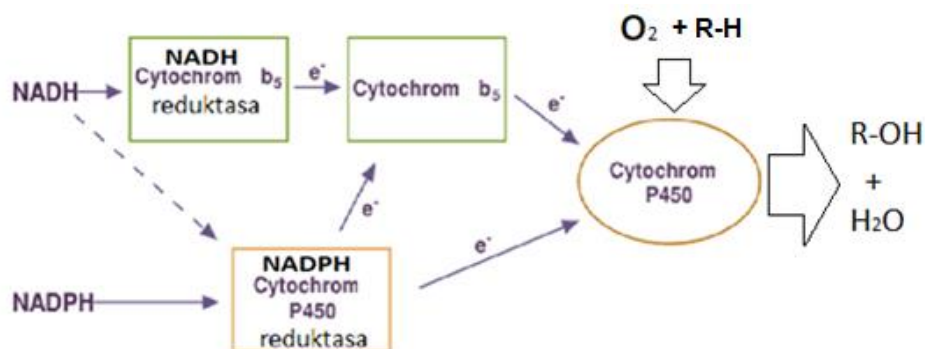
Obr. 9 Schéma konformačních změn CPR, vedoucí k přenosu elektronu. Převzato a upraveno z [46].



Obr. 10 CPR s vyznačenými kofaktory v membráně, vpravo kompaktní (uzavřená) forma, vlevo otevřená forma schopná přenášet elektrony na CYP. Převzato a upraveno z [47].

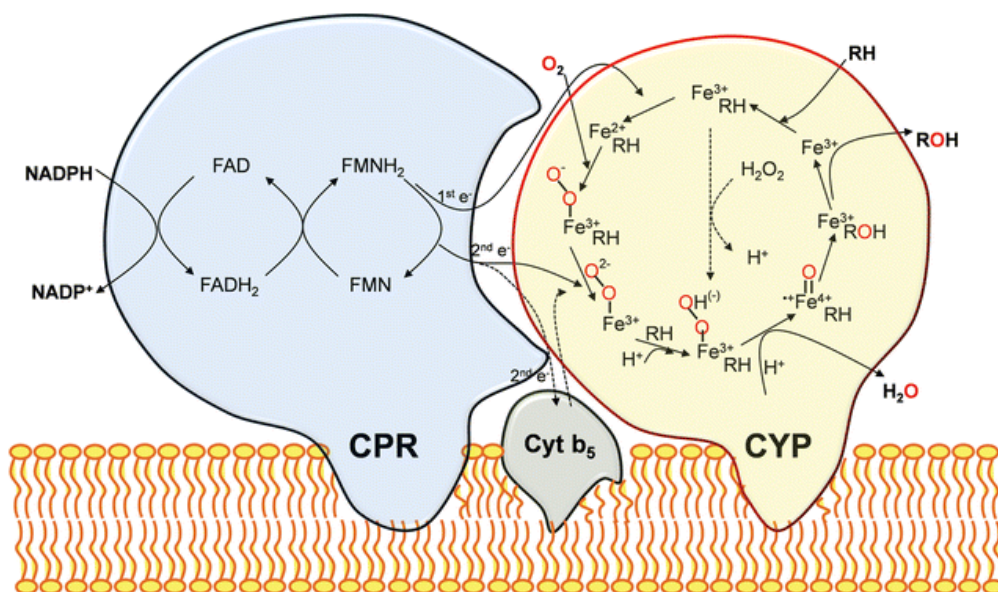
1.2. Vzájemné membránové interakce proteinů asociovaných s CYP

V této práci se zaměřuji hlavně na sledování účinnosti přeměny Sudanu I na jeho metabolity vlivem CYP1A1 při změně vzájemných poměrů CPR a cyt. b_5 vůči CYP1A1. Všechny tyto proteiny jsou asociovány s membránou ER. Cyt. b_5 zde funguje jako přenašeč elektronů z reduktasy (CPR nebo CYB5R) na CYP. U systému s CYB5R je přítomnost cyt. b_5 nutnou podmínkou pro průběh reakce, jelikož samostatně tato reduktasa CYP neredukuje. Dva elektrony, které jsou potřeba pro hydroxylaci substrátu, jsou postupně přeneseny na CYP [38,48]. Jednoduché schéma možného přenosu elektronů je zobrazeno na Obr. 11 s podrobným popisem procesu samotné hydroxylace pomocí CYP .

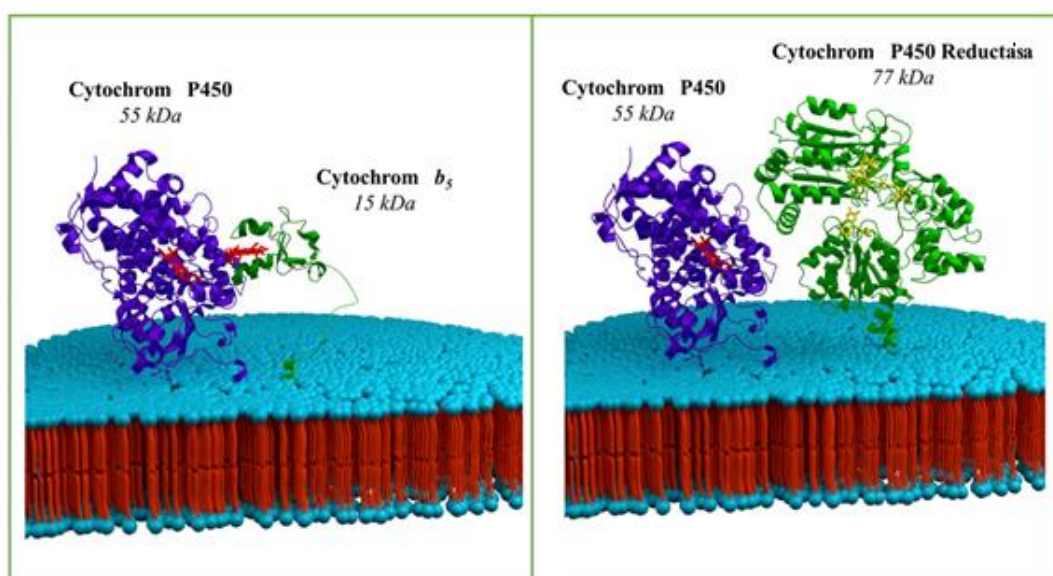


Obr. 11 Schéma přenosu elektronů mezi proteiny ER až na CYP. Převzato a upraveno z [3,48].

Výše popsané schéma znázorňuje možný přenos elektronů schematicky, souhrnné schéma pro systém MFO—CPR, cyt b_5 a CYP jako ternární enzym odpovědný za samotnou hydroxylaci substrátu na membráně ER a jako nutný přenos elektronů mezi proteiny je zobrazeno na Obr. 12 na str. 21. Podle dosavadních výsledků cyt. b_5 napomáhá přenosům elektronů, ale pro systém s CPR není nezbytně nutný [3]. Vzájemné interakce CYP a cyt. b_5 , resp. CYP a CPR na membráně ER jsou zobrazená na Obr. 13 str. 21.



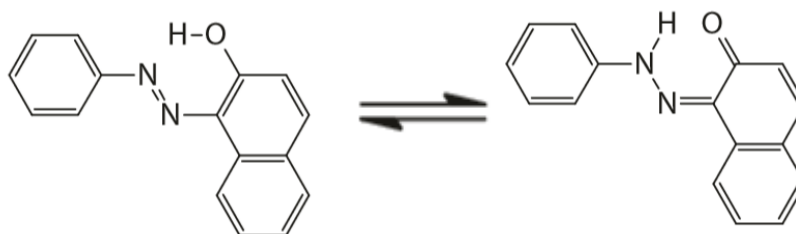
Obr. 12 Souhrnné schéma kooperace CPR, CYP a cytochromu b_5 v membráně ER. Převzato z [49].



Obr. 13 Model interakce CYP a cyt. b_5 vlevo a CYP a CPR vpravo. Převzato a upraveno z [50].

1.3. Sudan I

Sudan I (C.I. Solvent Yellow 14, podle IUPAC: 1-(Phenyldiazenyl) naphthalen-2-ol) je organické azobarvivo oranžové barvy [51]. Jak již systematický název napovídá, v molekule je přítomna skupina -N=N-. U Sudanu I jsou na azoskupinu připojeny benzen a 2-hydroxynaphthalen. Díky konjugaci vazeb, kterou posiluje právě azoskupina, je molekula Sudanu I barevná. Zpravidla mají azobarviva několik tautomerních struktur viz Obr. 14. Existuje mnoho skupin azobarviv, dají se dělit například podle počtu azoskupin na mono-, di-, tri-, tetra- azobarviva [52]. Pro Sudan I je nejlepší rozpouštědlo methanol, ve vodě se rozpouští velmi špatně [53].

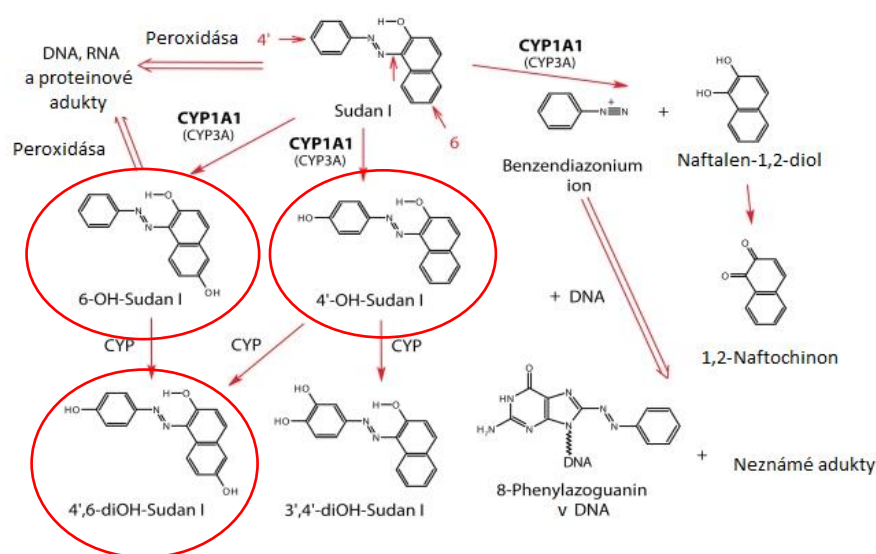


Obr. 14 Strukturní vzorce -enol a -keto formy Sudanu I. Vytvořeno a upraveno podle [54] v programu ChemSketch.

Sudan I patří mezi skupinu průmyslových barviv. Sudany, kterých existuje několik variant se od sebe liší barvou a čísly v názvech, např. Sudany I-IV. Byly používány pro barvení potravin (na ukázkou můžeme uvést třeba olej nebo chilli a z něj vyrobené produkty [55]). Vyjma potravin byla Sudanem I barvena i řada dalších výrobků, např. organická rozpouštědla, mazací tuky, vosky, plast a benziny [56]. Sudan I byl zakázán poté, co byl označen za karcinogenní. Bylo zjištěno, že způsobuje nádory jater a močového měchýře u laboratorních zvířat [57]. Ke karcinogenitě u modelových zvířat bylo později přidáno podezření z genotoxicity a karcinogenity u lidí. Kromě toho byla zjištěna spojitost mezi Sudanem I a kožní dermatitidou, a byl tedy zařazen mezi lidské alergeny [58,59].

1.3.1. Metabolismus Sudanu I

V rámci této diplomové práce je používán Sudan I pro markerovou reakci s CYP1A1, proto je na místě zmínit jeho metabolismus, který je z velké části zprostředkován právě CYP. Schéma metabolické přeměny Sudanu I s vyznačenými sloučeninami detekovanými v této práci je znázorněno na Obr. 15.



Obr. 15 Schéma metabolismu Sudanu I, červeně jsou označeny metabolity, které jsme využívali v experimentální části. Převzato a upraveno z [59].

Metabolismus Sudanu I probíhá hlavně v játrech, kde se jedná o oxidační a redukční procesy. Na králičích modelech bylo demonstrováno, že oxidační reakce vede k hydroxylaci na uhlíku 4' benzenovém kruhu, za vzniku 4'-hydroxy Sudanu I a na naftalenovém zbytku dochází k oxidaci v poloze 6 na 6-hydroxy Sudan I. Ve studiích in vivo byly tyto metabolity detekovány v moči a žluči pokusných zvířat. Detekovány byly jak ve formě konjugované s kyselinou glukuronovou či sulfátem, tak i ve formě nekonjugované. Studie ukazují, že vyloučení těchto metabolitů je snadné, proto se dají řadit mezi reakce detoxifikační. Kromě těchto oxidačních reakcí může být Sudan I metabolizován i redukční cestou, která se vyznačuje štěpením azoskupiny za vzniku 1-amino-2-naftolu, anilinu a p-amino-fenolu. Rovněž se jedná o detoxifikační reakce [60].

Další oxidací hlavních oxidačních produktů vznikají dva dihydroxyderiváty: 3'+6-dihydroxy Sudan I a 4'+6-dihydroxy Sudan I. Kromě těchto produktů byly detekovány i produkty oxidačního štěpení azoskupiny (použita metoda ^{32}P – postlabeling). Byl nalezen benzendiazoniový ion, který byl stanoven s guanidinovými zbytky jako 8-(fenyazo)guanin. Pravděpodobně se jedná o sloučeninu, která je zodpovědná za maligní transformaci v játrech [61,62].

U karcinogeneze močového měchýře se ukazuje, že jde o jiný princip vzniku aduktů s DNA. Adukty vznikají radikálovou (jednoelektronovou) oxidací Sudanu I a jeho derivátů. Enzymy katalyzující tyto reakce se nazývají peroxidasy [63].

2. Cíle

Cílem této práce je zmapovat aktivitu cytochromu P450 1A1 vůči Sudanu I za různých vzájemných poměrů NADPH:cytochrom P450 reductasy a cytochromu b₅. Dalším cílem bylo určení parametrů enzymové kinetiky pro primární metabolity Sudanu I při různých poměrech NADPH:cytochrom P450 reductasy a cytochromu b₅ vůči CYP1A1.

Hlavními úkoly práce jsou:

- Charakterizace použitých proteinů – čistota a případná purifikace, stanovení koncentrace a aktivity
- Optimalizace analytických metod a postupů – extrakce Sudanu I i jeho metabolitů a optimalizace metody stanovení pomocí HPLC
- Zjištění aktivity CYP1A1 vůči Sudanu I při různých poměrech CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1
- Určení parametrů enzymové kinetiky (K_M a V_{MAX}) pro hydroxylaci Sudanu I pomocí CYP1A1 pro vybrané poměry CYP1A1:CPR:cyt. b₅

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Avanti polar lipids (USA)	DLPC (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
BDH chemicals (UK)	Sudan Yellow (Sudan I)
BIO-RAD (USA)	Precision Plus Protein Unstained Standards, peroxosíran amonný
Carl-Roth (SRN)	CHAPS, Bromfenolová modř
Lach-ner (ČR)	dihydrogen fosforečnan draselný, chlorid sodný, hydroxid draselný, dichlormethan, ethanol, kyselina octová, ethyl-acetát
Penta (ČR)	methanol, glycin, dichlorbenzen, 1,2-dichlorethan
Serva (SRN)	akrylamid, N, N-methylen-bis-akrylamid (BIS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 2-merkapt ethanol, Coomassie Brilliant Blue R-250
Sigma-Aldrich (USA)	HEPES, GSH (L-glutathion), NADPH, dodecylsulfát sodný (SDS)

3.2. Použité rekombinantní proteiny

Lidský cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), lidský cytochrom b₅ (cyt. b₅) původní preparáty připravil RNDr. Mgr. Jan Milichovský, Ph.D. potkaní NADPH:cytochrom P450 reductasa (CPR) původní hrubý preparát připravil Mgr. Jan Dědič.

3.3. Přístroje a vybavení

Centrifugy	Z383K, Hermle (SRN), EBA 270, Hettich (SRN)
Filtr	MILLIPORE Express PLUS velikost pórů 0,22 μm, Merck (SRN)
HPLC	Agilent 1200 Series s DAD detektorem (USA)
Kolony	HiTrap™ 1 ml Q FF, GE Healthcare (USA) Chromolith Performance RP-18e 100mM, zrnitost 4,6 mm, Merck (SRN)
Koncentrátor	Purification System with Ultra-0.5 Device 10 kDa, Sigma-Aldrich (USA)
Sonikátor	Elmasonic E30H, Elma (SRN)
Spektrofotometr	Cary 60 UV-Vis, Agilent (USA), DS-11 FX, DeNovix (USA)
Termoblok	Termomixer compact, Eppendorf (SRN)
Vakuová odparka	Acid-Resistant CentriVap Centrifugal Concentrator, Labconco (USA)
Vodní lázeň	BS-11, Schoeller (ČR)
Zdroj elektroforéza	PowerPack Basic, BIO-RAD (USA)

3.4. Metody

3.4.1. Charakterizace a purifikace cyt. b₅

Čistota preparátu cytochromu b₅ byla ověřena pomocí SDS-PAGE a následně bylo přistoupeno k purifikaci pomocí iontově výměnné chromatografie v provedení rychlé proteinové chromatografie – FPLC (z angl. Fast Protein Liquid Chromatography).

První z metod byla SDS-PAGE. Nejdříve byla skla odmaštěna lihem a umístěna do držáků na nalévání gelu. Následně byl připraven 12% dělicí gel, který byl pipetován mezi skla. Pro vyrovnání hladiny a urychlení tuhnutí byl převrstven destilovanou vodou. Po 30 min byla voda slita a odsáta filtračním papírem. Během tuhnutí dělicího gelu byl připraven 5% zaostřovací gel a následně pipetován mezi skla. Do zaostřovacího gelu byl umístěn plastový hřeben. Po patnácti minutách bylo sklo vyndáno z držáku a umístěno do elektroforetické aparatury. Do vnitřní části aparatury byl nalit elektrodotový pufr o složení: 0,025M Tris-HCl 0,192M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3. Poté byl hřeben vyndán a dolit pufr až po okraj aparatury. Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro elektroforézu viz Tab. 2.

Tab. 2 Složení gelu pro SDS – PAGE pro jedno sklo.

	12% dělicí gel	5% zaostřovací gel
Voda [ml]	1,6	1,4
Polymerační roztok (30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS) [ml]	2,0	0,33
1,5M Tris-HCl (pH 8,8) [ml]	1,3	0
1,5M Tris-HCl (pH 6,8) [ml]	0	0,25
10% (w/v) SDS [μl]	50	20
10% (w/v) peroxosíran amonný (APS) [μl]	50	20
TEMED [μl]	2	2

Pro přípravu vzorků byl použit 4x koncentrovaný vzorkový pufr o složení 0,25M Tris-HCL, 20% (v/v) 2-merkapt ethanol, 40% (v/v) glycerol, 8 (v/v) SDS, 0,012% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8. Vzorky byly povařeny 20 minut a naneseny na gel. Jako standard byl použit Precision Plus Protein Unstained Standards. Elektroforéza byla prováděna při 200 V po dobu 80 minut.

Po doběhnutí elektroforézy byl gel ze skel sejmut, oříznut a dán na 3 hodiny do barvicí lázně o složení: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyseliny octové. Následné odbarvování bylo prováděno na míchače v odbarvovacím roztoku o složení: 25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová. Během odbarvování trvajících cca 5 hodin byl odbarvovací roztok několikrát vyměněn. Gel byl následně uchováván v destilované vodě.

Ke zvýšení čistoty preparátu cyt. b_5 byla použita metoda iontově výměnné chromatografie v provedení FPLC. Isoelektrický bod cyt. b_5 je pH 4,8. Pro purifikaci byl vybrán fosfátový pufr o pH 6,0. Byla využita kolona HiTrap™ 1 ml (Sephacrose) Q FF.

K dané separaci byly potřeba dva pufrы: Pufr A (ekvilibrační) o objemu 1 l ve složení 30mM KH_2PO_4 , 0,3% (w/v) CHAPS a pufr B, který byl připraven ze 300 ml pufru A přidáním NaCl, tak aby celková koncentrace byla 0,5M. Oba pufrы byly následně přefiltrovány přes MILLIPORE Express PLUS o velikosti pórů 0,22 μm .

100 μl preparátu cytochromu b_5 bylo naředěno 400 μl pufru A a 500 μl destilované vody a naneseno na FPLC, které bylo předtím řádně promyto a kolona byla ekvalibrována. Detekce probíhala spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Eluce byla provedena změnou iontové síly s rostoucí koncentrací pufru B. Průtoková rychlost dosahovala 1 ml/min. Frakce byly shromážděny pomocí automatického sběrače frakcí. Po ukončení separace byly FPLC a kolona promyty destilovanou vodou a následně skladovacím roztokem, 25% ethanollem.

Frakce nacházející se v oblasti majoritního píku byly následně spojeny a bylo provedeno zahuštění a výměna pufru pomocí centrifugace a koncentrátoru s 10 000 MWCO (mezní velikost molekul, které mohou membránou projít, z angl.: Molecular weight cut-off).

K tomuto objemu bylo třikrát přidáno 4 ml pufru o pH 7,4, 100mM KH₂PO₄, 0,3% (w/v) CHAPS. Vždy bylo zahuštěno na 1,5 ml a po dokončení byl odebrán vzorek na SDS-PAGE. Parametry centrifugace zprostředkovává Tab. 3.

Tab. 3 Parametry centrifugace – zahuštění a výměna pufru.

centrifuga	Hermle Z383K
typ rotoru	výkyvný
otáček za minutu (RPM)	4000
Teplota (°C)	4

Při vyhodnocování měření absorbance na spektrofotometru Cary 60 byly odečteny hodnoty absorbance při 280, 413 a 700 nm. Koncentrace byla stanovena podle Rov.1.

$$\Delta A_{413/280} = A_{413/280} - A_{700}, \quad \text{Rov. 1}$$

kde $\Delta A_{413/280}$ značí korigovanou absorbanci při vlnové délce 413 nebo 280 nm. Koncentrace byla vypočtena podle upraveného Lambert-Beerova zákona podle Rov. 2

$$c_{\text{cyt. } b_5} = \frac{\Delta A_{280}}{l \cdot \varepsilon} * \text{\textit{\textbf{ředění}}}, \quad \text{Rov. 2}$$

kde c je koncentrace cyt. b_5 , l šířka kyvety a ε je extinkční koeficient cytochromu b_5 při vlnové délce 280 nm. Dále byl stanovený faktor RZ (z něm. Reinheitszahl, poměr absorbance Sorretova pásu hemoproteinu a absorbance při 280 nm) podle Rov.3.

$$RZ = \frac{\Delta A_{413}}{\Delta A_{280}}, \quad \text{Rov. 3}$$

kde ΔA_{413} a ΔA_{280} jsou korekce absorbancí podle Rov. 1. Podle podobnosti RZ faktorů byly vybrány frakce, které byly následně převedeny do jedné zásobní mikrozkušavky.

3.4.2. Charakterizace a purifikace CPR

V rámci ověřování koncentrace a čistoty proteinů bylo nutné charakterizovat i CPR. Nejdříve byla provedena elektroforéza (viz 3.4.1), ze které bylo zjištěno, že se v preparátu nachází více proteinů o různých molekulových hmotnostech. Z pozice pruhů na elektroforetogramu bylo odhadnuto, že druhý výrazný pruh odpovídá CPR bez membránové kotvy. Pomocí ProtParam byly predikovány teoretické pI pro obě formy CPR. K oddělení těchto dvou forem byla použita metoda iontově výměnné chromatografie, zkráceně IEX (z anglického: ion exchange chromatography) v provedení FPLC.

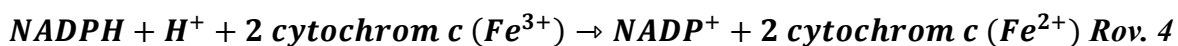
Pufry byly připraveny stejně jako při FPLC s cytochromem b_5 (str. 28). Rozdíl byl pouze v pufru A, kde byla koncentrace fosfátu 70mM KH_2PO_4 , a pH obou pufřů bylo 5,6. Průtoková rychlost byla opět 1 ml/min a gradient byl nastaven na 100 min do 100% koncentrace pufru B. Byla použita kolona HiTrap™ 1 ml (Sepharose) Q FF. Po ukončení separace byl přístroj i kolona promyta vodou a skladovacím roztokem 20% ethanolu.

Se získanými frakcemi (sběr po 1,4 ml) majoritních píků byla provedena SDS-PAGE elektroforéza podle str. 28. Podobné frakce byly spojeny a zahuštěny pomocí centrifugace stejně jako u cyt. b_5 .

Koncentrace CPR byla určena pomocí měření na spektrofotometru DeNovix s využitím predikovaného molárního absorpčního koeficientu ($97555 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a molekulové hmotnosti (76963 Da) programem ProtParam (UniProt kód: P00388). Jelikož použitý spektrofotometr udává koncentraci v g/l bylo potřeba výsledek přepočítat na molární koncentraci. Naměřená hodnota byla nejdříve vydělena molární hmotností a vynásobena ředěním vzorku.

3.4.3. Stanovení aktivity CPR reduktasy vůči cyt. c

Aktivita CPR byla stanovena spektrofotometricky, měřením rychlosti redukce cytochromu c (cyt. c) s využitím NADPH jako koenzymu. Měření bylo prováděno při 550 nm, kdy výrazně absorbuje právě redukováná forma cytochromu c, viz. Rov. 4.



Do křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm, bylo pipetováno 970 μl fosfátového pufru (300mM KH_2PO_4 , 0,3% (w/v) CHAPS, pH 7,5), 10 μl cyt. c o zásobní koncentraci 25 mg/ml a 10 μl ředěného CPR. Tato směs byla použita jako „blank“. Reakce byla startována přidavkem 10 μl 10mM NADPH a důkladným promícháním, následná změna absorbance byla detekována při 550 nm po dobu 1 min pomocí spektrofotometru Cary 60. Aktivita byla vypočtena podle Rov. 5 [64,65].

$$a_{\text{CPR}} = \frac{\Delta A_{550}}{\Delta t \cdot l \cdot \varepsilon_{\text{cyt c}}} \cdot \text{\textit{ředění}} \left[\mu\text{mol}_{\text{cyt c}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \right], \quad \text{Rov. 5}$$

kde a_{CPR} je aktivita CPR v $\mu\text{mol}_{\text{cyt c}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, ΔA_{550} je rozdíl absorbancí v čase, $\varepsilon_{\text{cyt c}}$ je molární absorpční koeficient cyt. c při 550 nm ($0,0211 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}^1$) a Δt je čas měření, l optická dráha (1 cm).

3.4.4. Charakterizace CYP1A1

Čistota cytochromu P450 1A1 (CYP1A1) byla stejně jako u cyt. b₅ a CPR charakterizována pomocí SDS-PAGE, viz 3.4.1. Po konzultaci s vedoucím práce bylo od další purifikace upuštěno a bylo bráno jako optimální, že v preparátu je zastoupeno více jak 80 % CYP1A1. Tento odhad byl proveden pomocí programu Image J.

U preparátu CYP1A1 bylo nutné, jako u všech předchozích proteinů, stanovit jeho koncentraci, čehož bylo dosaženo pomocí diferenčního spektra okolo 450 nm. Měření bylo prováděno na spektrometru Cary 60. Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno 290 μ l fosfátového pufru (300mM KH₂PO₄, 0,3% (w/v) CHAPS), 5 μ l zásobního preparátu CYP1A1. Tato směs byla měřena a bylo přidáno přibližně deset krystalků dithioničitanu sodného (Na₂S₂O₄), který plně zredukoval CYP. Tato směs byla použita jako „blank“ pro následné měření. Obsah kyvety byl probublán po dobu 10 sekund oxidem uhelnatým a byl pozorován silný nárůst absorbance okolo 450 nm způsobený vznikem komplexu CYP s CO. Výpočet viz Rov. 6.

$$c_{CYP} = \left(\frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{CYP}} \right) \cdot \text{ředění [mM]}, \quad \text{Rov. 6}$$

kde $A_{450/490}$ je absorbance při dané vlnové délce a ϵ_{CYP} je molární absorpční koeficient pro CYP v komplexu s CO, jehož hodnota činí 91 mmol⁻¹ · cm⁻¹ · l [66].

3.4.5. Metoda HPLC

K detekci a separaci Sudanu I a jeho metabolitů byla použita metoda HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie, z angl. high-pressure liquid chromatography), která je znázorněna v Tab. 4. Příprava detekovaných vzorků je popsána v dalších kapitolách.

Tab. 4 Popis metody HPLC používané k separaci a detekci Sudanu I a jeho metabolitů.

HPLC	Agilent 1200 Series s DAD detektorem
kolona	Chromolith Performance RP-18e 100 mm, zrnitost 4,6 mm
mobilní fáze	75% methanol
nástržik	40/75 µl
doba metody	10 min
průtoková rychlost	1,5 ml/min
teplota kolony	25 °C
detekce	480 nm

3.4.6. Optimalizace extrakce Sudanu I

V rámci přípravy experimentů s různými poměry CPR a cyt. b₅ k CYP bylo provedeno několik optimalizačních stanovení. Prvním z nich byla snaha ověřit, že standardně používaná metoda extrakce Sudanu I ethyl-acetátem a následné promíchání na vortexu a centrifugace (parametry viz Tab. 5), odebrání ethyl-acetátové frakce, odpaření a rozpuštění v methanolu, je nejlepší možností, jak připravit vzorky k detekci na HPLC.

Tab. 5 Parametry centrifugace využívané při extrakci Sudanu I.

centrifuga	EBA 270
typ rotoru	výkyvný
otáček za minutu (RPM)	3000
čas centrifugace	10 min

Do zkumavek bylo připraveno několik „inkubací“ o složení 499 μl fosfátový pufr (100mM KH_2PO_4 , 0,3%(w/v) CHAPS) a 1 μl Sudanu I (5mM). Následně byla provedena extrakce různými extrakčními činidly, pro která byla připravena také kontrola, tj. 1 μl Sudanu I v 99 μl daného rozpouštědla. Jedna z extrakcí byla provedena výše zmíněným, zavedeným postupem. Následně byly extrakty, rozpuštěný odparek v methanolu a standardy nastříknuty na HPLC (40 μl) a byla porovnávána relativní plocha píků vůči kontrole pro dané rozpouštědlo a vůči Sudanu I v methanolu (99 μl methanolu a 1 μl Sudanu I). Celý experiment je popsán v Tab. 6. Všechny roztoky byly připraveny v tripletech. Z naměřených a statisticky zpracovaných dat byl vytvořen graf a vybrána optimální metoda používaná i v dalších experimentech.

Tab. 6 Optimalizace extrakce Sudanu I.

Kontroly			
	methanol [μl]	Sudanu I [μl]	Následné zpracování
Sudan I v methanolu	99	1	40 μl nastříknuto na HPLC
Sudan I v ethyl-acetátu	99	1	40 μl nastříknuto na HPLC
Sudan I v dichlorbenzenu	99	1	40 μl nastříknuto na HPLC
Sudan I v 1,2-dichlorethanu	99	1	40 μl nastříknuto na HPLC

Rozpis inkubací a extrakcí různými rozpouštědly, všechny dělány v tripletech							
	Pufr [μl]	Sudan I 5mM [μl]	Extrakční činidlo	Objem extrakčního činidla [μl]	Odebráno extraktu [μl]	Další zpracování	Po změření
A	499	1	Ethyl-acetát	500	100	Nastříknuto 40 μl na HPLC	Započteno ředění extrakčním činidlem
B	499	1	dichlorbenzen	200	200		
C	499	1	1,2-dichlorethan	500	100		
D	499	1	Ethyl-acetát	500	200	Odpařeno na vakuové odparce, rozpuštěno v 100 μl methanolu, 40 μl nastříknuto na HPLC	

3.4.7. Eluční a spektrální přiřazení metabolitů

V rámci optimalizace analytických metod bylo provedeno eluční a spektrální přiřazení píků získaných metodou HPLC pro standardy metabolitů očekávaných při hydroxylaci Sudanu I zprostředkovanou CYP. Do vialky s 98 μ l methanolu bylo přidáno 2 μ l daného standardu o neznámé koncentraci. Následně bylo 40 μ l této směsi nastříknuto na HPLC. Po separaci byl získaný eluční profil porovnán s informacemi z literatury [67] o poloze píku pro daný metabolit. Následně bylo odečteno ze stejného měření UV/VIS spektrum daného metabolitu. Tyto dvě informace – spektrum a poloha píku na chromatogramu – byly používány v dalších experimentech pro přiřazování píků daných metabolitů.

3.4.8. Kalibrace metody HPLC pro Sudan I a jeho metabolity

Pro kalibraci bylo nejdříve nutné připravit roztoky metabolitů o dané koncentraci. Zásobní roztok metabolitů byl pipetován do vysušené vialky, na kterou byla vynulována analytická váha. Poté byl methanol dosucha odpařen a lahvička opět zvážena. Následně byl přidán 1,0 ml methanolu a směs byla důkladně promíchána. Takto byly připraveny zásobní roztoky o dané koncentraci pro všechny standardy metabolitů.

Pro kalibraci byl vytvořen kalibrační roztok o objemu 1,0 ml obsahující všechny metabolity (4'+6-dihydroxy Sudan I, 6-hydroxy Sudan I a 4'-hydroxy Sudan I) o koncentraci 0,01mM a Sudan I o koncentraci 0,1mM. Pro sestavení kalibrační přímky byly připraveny 1x, 2x, 3x, 5x, 10x zředěné roztoky. Tyto kalibrační vzorky byly nastříknuty na HPLC a následně byly z ploch píků v závislosti na koncentraci sestrojeny kalibrační grafy v programu Origin©.

3.4.9. Inkubace systémů obsahujících CYP1A1, cyt. b₅ a CPR se Sudanem I

Po optimalizaci všech dílčích kroků a stanovení čistoty proteinů a jejich koncentrace byl proveden pokus s různými molárními poměry cyt. b₅ a CPR vůči CYP1A1. Přesný rozpis koncentrací a časů inkubací je zobrazen pro zjednodušení v souhrnné Tab. 7 na str. 38.

Nejdříve byly připraveny liposomy odpařením dichlormethanu z roztoku s DLPC ve skleněné vialce, čímž vznikl na dně lipidický povlak. Byly přidány další složky – HEPES, voda, CHAPS, GSH – a poté byla lahvička sonifikována po dobu 5 minut. Poté byl přidán daný objem CYP1A1 a za stálého míchání byl nechán preinkubovat po dobu 10 minut při 36 °C. Mezitím bylo do vialek pro premixy pipetováno dané množství fosfátového pufru. Po pěti minutách byl k premixům přidán daný objem rekonstituovaného systému a CPR. Následovala další preinkubace 10 min při 36 °C za stálého míchání. Poté byly premixy pipetovány do inkubačních vialek, do každé z nich byl přidán daný objem cyt. b₅. Poslední preinkubace trvala za stálého míchání 5 minut při 36 °C. Následovalo přidání koenzymu NADPH a celá reakce byla odstartována přidáním daného objemu Sudanu I. Rozmezí mezi dávkami Sudanu I a mezi jednotlivými inkubacemi byla 30 s. Inkubace probíhala za stálého míchání 20 minut za teploty 36 °C, poté byla zastavena pomocí 100 μl ethyl-acetátu a důkladného promíchání na vortexu. Vialky byly stočeny na centrifuze a byla odebrána dolní vodná fáze. Následně byl ethyl-acetát odpařen na vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn ve 100 μl methanolu. Takto připravené vzorky byly nastříknuty na HPLC (objem nástřiku byl 75 μl). Píky byly k metabolitům přiřazeny pomocí porovnání elučního profilu (chromatogramu) a spektra. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí software k HPLC, korigována na odpařování methanolu během HPLC analýzy podle Rov. 7. Data byla zpracována pomocí programu Origin©.

$$c_{kor} = \frac{c_{met}}{f} [\mu M], \quad \text{Rov. 7}$$

kde c_{kor} je korigovaná koncentrace metabolitu, c_{met} je koncentrace metabolitu vypočtena z plochy píku pomocí kalibrace pro daný metabolit a f je faktor vypočtený jako podíl sumy koncentrací všech stanovovaných látek metodou HPLC (tří stanovovaných metabolitů Sudanu I a zbytkového Sudanu I) a prvotní koncentrace Sudanu I v inkubaci.

Tab. 7 Rozpis pokusu inkubací s různými poměry cyt. b5 a CPR vůči CYP1A1.

Rekonstituce CYP1A1 o celkovém objemu 105 μ l, nejdříve odpařeno DLPC v dichlormethanu, poté pipetovány dané objemy roztoků, před přidáním CYP sonifikováno 5 min						
	DLPC in CH ₂ Cl ₂	HEPES pH 7.4	H ₂ O	CHAPS v H ₂ O	GSH v H ₂ O	CYP1A1
Zásobní koncentrace	5 mg/ml	500 mM		0.5 mg/ml	30 mg/ml	44.3 μ M
Výsledná koncentrace	1 mg/ml	50 mM		0.05 mg/ml	3 mg/ml	2 μ M

Rozpis inkubací, objem inkubace 100 μ l, proteiny přidávy k danému objemu 100mM KH ₂ PO ₄ o pH=7,4								
označení inkubace	Poměr proteinů v inkubacích			Rekonstituovaný CYP1A1	CPR o zásobní koncentraci 20,5 μ M	Cyt. b5 o zásobní koncentraci 5,7 μ M	NADPH ve vodě o koncentraci 10mM	Sudan I v methanolu 6,5mM
	CYP1A1	CPR	cyt. b5	Koncentrace v inkubaci [μ M]	Koncentrace v inkubaci [μ M]	Koncentrace v inkubaci [μ M]	Koncentrace v inkubaci [μ M]	Koncentrace v inkubaci [μ M]
premix A								
A1	1	0.1	0	0.05	0.005	0.0	1000	13
A2	1	0.1	1	0.05	0.005	0.1	1000	13
A3	1	0.1	3	0.05	0.005	0.2	1000	13
A4	1	0.1	10	0.05	0.005	0.5	1000	13
A5	1	0.1	30	0.05	0.005	1.5	1000	13
premix B								
B1	1	0.3	0	0.05	0.015	0.0	1000	13
B2	1	0.3	1	0.05	0.015	0.1	1000	13
B3	1	0.3	3	0.05	0.015	0.2	1000	13
B4	1	0.3	10	0.05	0.015	0.5	1000	13
B5	1	0.3	30	0.05	0.015	1.5	1000	13
premix C								
C1	1	1	0	0.05	0.05	0.0	1000	13
C2	1	1	1	0.05	0.05	0.1	1000	13
C3	1	1	3	0.05	0.05	0.2	1000	13
C4	1	1	10	0.05	0.05	0.5	1000	13
C5	1	1	30	0.05	0.05	1.5	1000	13
premix D								
D1	1	3	0	0.05	0.15	0.0	1000	13
D2	1	3	1	0.05	0.15	0.1	1000	13
D3	1	3	3	0.05	0.15	0.2	1000	13
D4	1	3	10	0.05	0.15	0.5	1000	13
D5	1	3	30	0.05	0.15	1.5	1000	13
premix E								
E1	1	10	0	0.05	0.5	0.0	1000	13
E2	1	10	1	0.05	0.5	0.1	1000	13
E3	1	10	3	0.05	0.5	0.2	1000	13
E4	1	10	10	0.05	0.5	0.5	1000	13
E5	1	10	30	0.05	0.5	1.5	1000	13

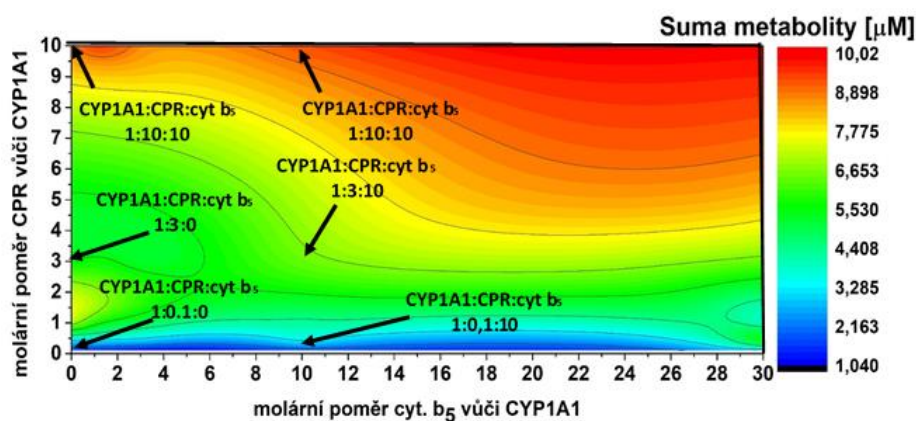
Časy inkubací a preinkubací	
inkubační směs	čas [min]
Rekonstituovaný systém s CYP	10
Rekonstituovaný systém s CYP+CPR	10
Rekonstituovaný systém s CYP+CPR+cyt. b5	5
Celá inkubace po nastartování Sudanem I	20
Rozmezí při přidávání Sudanu I	0.5

3.4.10. Určení časové závislosti hydroxylace Sudanu I pomocí CYP1A1

Dalším krokem bylo popsat kinetiku pro vybrané poměry proteinů. Před měřením kinetiky byl proveden pokus pro určení ideálního času inkubace. Pro toto měření byl vybrán systém s poměrem CYP1A1:CPR:cyt. b₅ 1:1:0. Inkubace byla připravena stejným způsobem jako v předchozí kapitole. Z inkubace o objemu 500 µl bylo odebíráno 100 µl v časech 5, 10, 20, 30 a 40 min. Po uplynutí daného inkubačního času byla reakce zastavena přidáním 100 µl ethyl-acetátu. Promícháno na vortexu a 10 minut stočeno za podmínek uvedených v Tab. 5 na str. 34, kde jsou také uvedeny podmínky HPLC (objem nástřiku byl 40 µl), pomocí kterých byla následně provedena analýza metabolitů. Z takto naměřených dat byl vybrán nejdelší měřený čas, ve kterém byl pozorován lineární nárůst koncentrace metabolitů.

3.4.11. Kinetika hydroxylace Sudanu I pro vybrané poměry CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1

Pro měření kinetiky byly vybrány poměry CYP1A1:CPR:cyt. b₅: 1:0,1:0, 1:0.1:10, 1:3:0, 1:3:10, 1:10:0 a 1:10:10. Vybrané poměry jsou znázorněny na vrstevnicovém grafu pro sumu všech metabolitů je zobrazeno Obr. 16 (graf je převzat z výsledků v kapitole 4.5). Experiment byl proveden jako v předchozích kapitolách, celkový objem inkubace byl 200 μl a metabolity byly extrahovány 100 μl ethyl-acetátu a následně analyzovány pomocí HPLC (objem nástřiku byl 40 μl). Rozpis inkubací je zobrazený v Tab. 8 na str. 42. Experimenty byly provedeny ve třech sériích, s konstantním poměrem CPR vůči CYP1A1.



Obr. 16 Vybrané poměry proteinů, u kterých byla stanovena kinetika hydroxylace vlivem CYP1A1.

Následně byly z naměřených koncentrací 6-hydroxy Sudan I a 4'-hydroxy Sudan I sestrojeny grafy v programu Origin© a proloženy Hillovou funkcí viz Rov.8, z které byly odečteny hodnoty pro K_M a V_{MAX} .

$$v = \frac{V_{MAX} \cdot [S]^n}{K^n + [S]^n}, \quad \text{Rov. 8}$$

kde v je rychlost vzniku produktu, V_{MAX} je maximální (limitní) rychlost reakce, $[S]$ je koncentrace substrátu, K je konstanta a n je Hillův koeficient, který je pro tento případ roven 1. A platí, že pokud je $n=1$, tak $K=K_M$, kde K_M je Michaelisova konstanta.

Pro vyhodnocování aktivity enzymu vůči substrátu bylo dále použito číslo přeměny (k_{cat}) resp. jeho poměr s K_M . k_{cat} bylo vypočteno podle následující rovnice:

$$k_{cat} = \frac{V_{MAX}}{[E]}, \quad \text{Rov. 9}$$

kde V_{MAX} je maximální (limitní) rychlost reakce a $[E]$ je celková koncentrace enzymu v inkubaci.

Tab. 8 Rozpis pokusů pro stanovení kinetiky hydroxylace Sudanu I pro různé poměry CPR a cyt. bs vůči CYP1A1.

Rekonstituce CYP1A1 o celkovém objemu 3x60 ul, nejdříve odpařeno DLPC v dichlormethanu, poté pipetovány dané objemy roztoků, před přidáním CYP sonifikováno 5 min							
	DLPC in CH ₂ Cl ₂	HEPES pH 7.4	H ₂ O	CHAPS v H ₂ O	GSH v H ₂ O	CYP1A1	
Zásobní koncentrace	5 mg/ml	500 mM		0,5 mg/ml	30 mg/ml	44,3 μM	
Výsledná koncentrace	1 mg/ml	50 mM		0,05 mg/ml	3 mg/ml	2 μM	

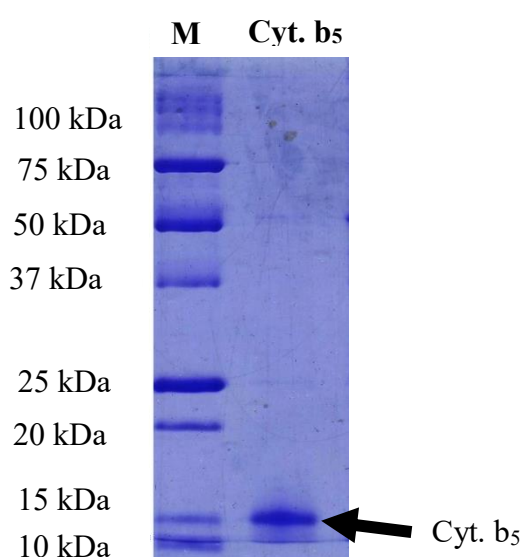
Rozpis inkubací, objem inkubace 200 μl, proteiny přidávány k danému objemu 100mM KH ₂ PO ₄ o pH=7,4								
označení inkubace	Poměr proteinů v inkubacích			Rekonstituovaný CYP1A1	CPR o zásobní koncentraci 20,5μM	Cyt. bs o zásobní koncentraci 5,7μM	NADPH ve vodě o koncentraci 10mM	Sudan I v methanolu 6,5mM
	CYP1A1	CPR	cyt. bs	Koncentrace v inkubaci [μM]	Koncentrace v inkubaci [μM]	Koncentrace v inkubaci [μM]	Koncentrace v inkubaci [μM]	Koncentrace v inkubaci [μM]
Poměr 1:0,1:0								
1A	1	0,1	0	0,05	0,005	0,0	1000	4,0
2A	1	0,1	0	0,05	0,005	0,0	1000	8,0
3A	1	0,1	0	0,05	0,005	0,0	1000	16,0
4A	1	0,1	0	0,05	0,005	0,0	1000	32,0
5A	1	0,1	0	0,05	0,005	0,0	1000	64,0
Poměr 1:0,1:10								
1B	1	0,1	10	0,05	0,005	0,5	1000	4,0
2B	1	0,1	10	0,05	0,005	0,5	1000	8,0
3B	1	0,1	10	0,05	0,005	0,5	1000	16,0
4B	1	0,1	10	0,05	0,005	0,5	1000	32,0
5B	1	0,1	10	0,05	0,005	0,5	1000	64,0
Poměr 1:3:0								
1C	1	3	0	0,05	0,15	0,0	1000	4,0
2C	1	3	0	0,05	0,15	0,0	1000	8,0
3C	1	3	0	0,05	0,15	0,0	1000	16,0
4C	1	3	0	0,05	0,15	0,0	1000	32,0
5C	1	3	0	0,05	0,15	0,0	1000	64,0
Poměr 1:3:10								
1D	1	3	10	0,05	0,15	0,5	1000	4,0
2D	1	3	10	0,05	0,15	0,5	1000	8,0
3D	1	3	10	0,05	0,15	0,5	1000	16,0
4D	1	3	10	0,05	0,15	0,5	1000	32,0
5D	1	3	10	0,05	0,15	0,5	1000	64,0
Poměr 1:10:0								
1E	1	10	0	0,05	0,5	0,0	1000	4,0
2E	1	10	0	0,05	0,5	0,0	1000	8,0
3E	1	10	0	0,05	0,5	0,0	1000	16,0
4E	1	10	0	0,05	0,5	0,0	1000	32,0
5E	1	10	0	0,05	0,5	0,0	1000	64,0
Poměr 1:10:10								
1F	1	10	10	0,05	0,5	0,5	1000	4,0
2F	1	10	10	0,05	0,5	0,5	1000	8,0
3F	1	10	10	0,05	0,5	0,5	1000	16,0
4F	1	10	10	0,05	0,5	0,5	1000	32,0
5F	1	10	10	0,05	0,5	0,5	1000	64,0

Časy inkubací a preinkubací	
inkubační směs	čas [min]
Rekonstituovaný systém s CYP	10
Rekonstituovaný systém s CYP+CPR	10
Rekonstituovaný systém s CYP+CPR+cyt. bs	5
Celá inkubace po nastartování Sudanem I	20
Rozmezí při přidávání Sudanu I	0,5

4. Výsledky

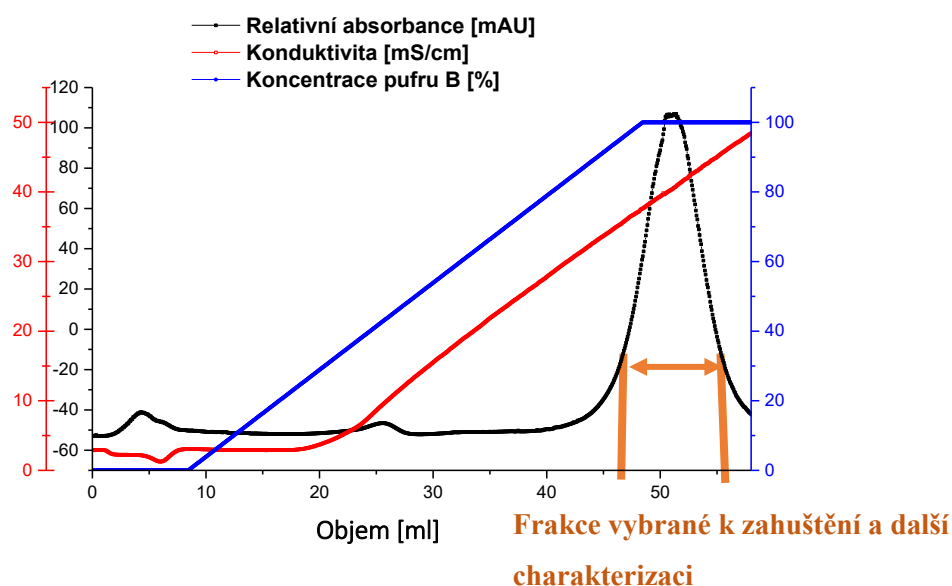
4.1. Charakterizace a purifikace cyt. b₅

Všechny použité proteiny musely být charakterizovány. Jako první byl charakterizován cyt. b₅, který se v tomto případě nevyznačuje vlastní enzymovou aktivitou, ale v systémech s CYP slouží jako elektronový přenašeč. K ověření jeho čistoty byla použita SDS-PAGE, elektroforetogram viz Obr. 17.

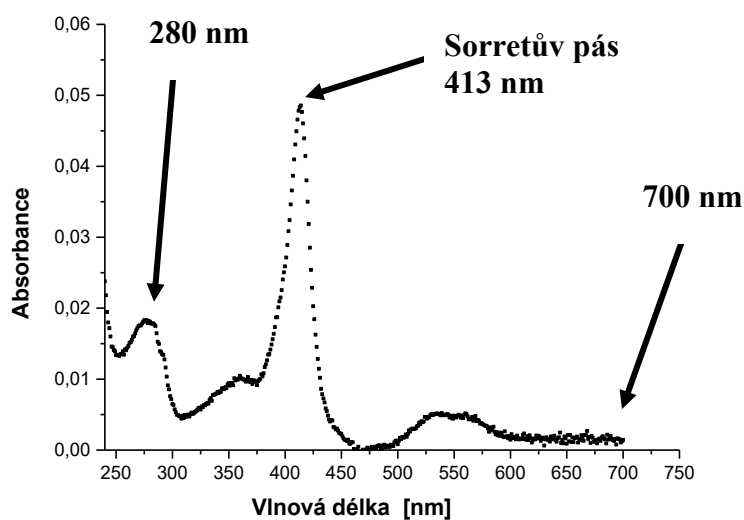


Obr. 17 Elektroforetogram zásobního preparátu s vyznačeným pásem odpovídajícím cyt. b₅. M značí marker s vyznačenými molekulovými hmotnostmi.

Zásobní cyt. b₅ byl i přes svou značnou čistotu purifikován pomocí iontové výměnné chromatografie, tato metoda potvrdila rovněž jeho čistotu, což je patrné z chromatogramu na Obr. 18 na str. 44. Spektrum cyt. b₅ naměřené na spektrofotometru Cary 60 je zobrazeno na Obr. 19 na str. 44.



Obr. 18 Chromatogram purifikace cyt. b_5 s oranžově vyznačeným úsekem frakcí, které byly spojeny a zahuštěny. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm.



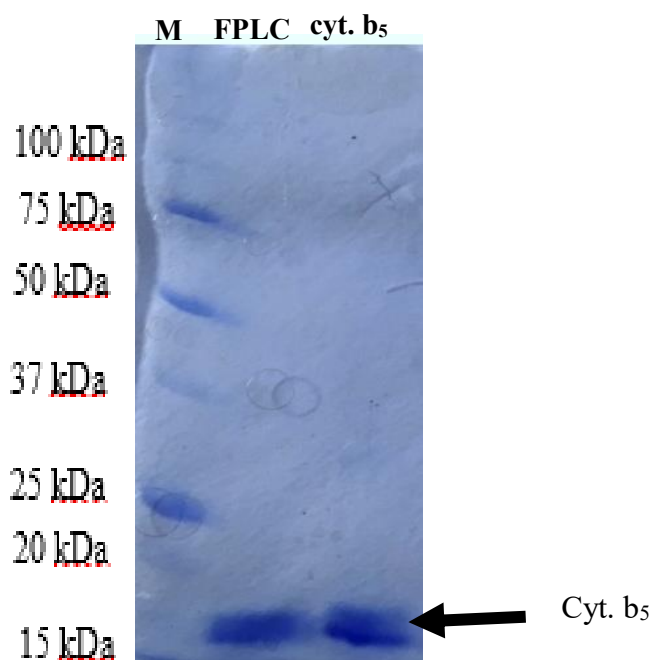
Obr. 19 Spektrum cyt. b_5 s vyznačenými pásy použitými k jeho charakterizaci.

Naměřené hodnoty, vypočtená koncentrace a RZ podle vzorců v kapitole 3.4.1, viz Tab. 9 na str. 45. Molární absorpční koeficient potřebný pro výpočty koncentrace byl predikován pomocí programu ProtParam (UniProt kód: P00167) a měl hodnotu $29450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Tab. 9 UV/VIS charakterizace cyt. b₅.

<i>A</i> ₂₈₀	<i>A</i> ₄₁₃	<i>A</i> ₇₀₀	ΔA ₂₈₀	ΔA ₄₁₃	ředění	Koncentrace [μM]	RZ
0,0182	0,0483	0,0014	0,0167	0,0469	100 x	56,6	2,81

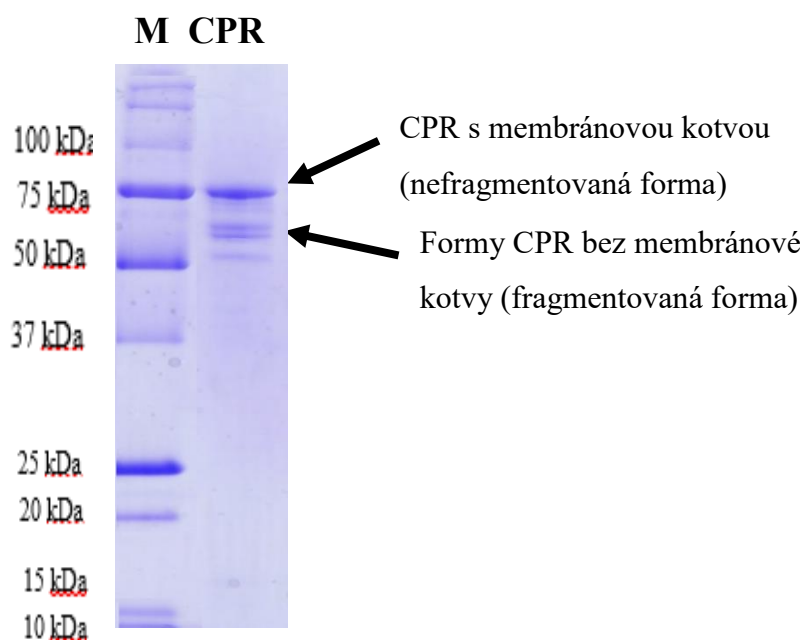
Následně byla provedena SDS-PAGE k porovnání vzorku cyt. b₅ před a po FPLC. Na Obr. 20 je vidět, že se během FPLC a zahušťování protein nefragmentoval a dominantní zůstává pouze jeden pruh odpovídající cyt. b₅.



Obr. 20 Elektroforetogram porovnání zásobního preparátu cyt. b₅ před purifikací pomocí iontové výměnné chromatografie (cyt. b₅) a preparátu po purifikaci (FPLC) s vyznačeným majoritním pásem pro cyt. b₅. M značí marker s vyznačenými molekulovými hmotnostmi.

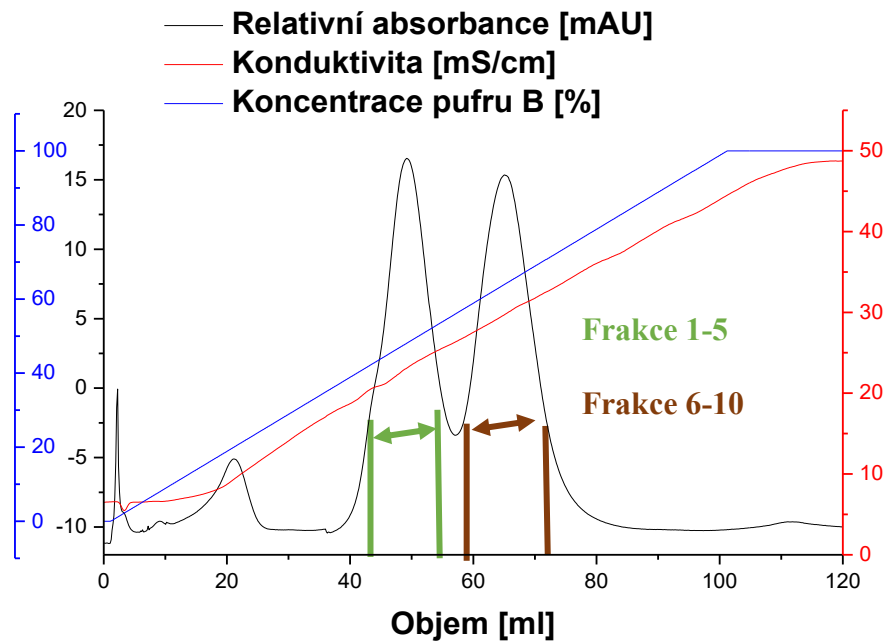
4.2. Charakterizace a purifikace CPR

I u CPR byla snaha o její purifikaci. U vzorku tohoto enzymu byla purifikace nutná vzhledem k informacím z elektroforetogramu (znázorněn na Obr. 21), z něhož je patrná fragmentace. Jedná se pravděpodobně o formu CPR s kotvou a o formy bez membránové kotvy.

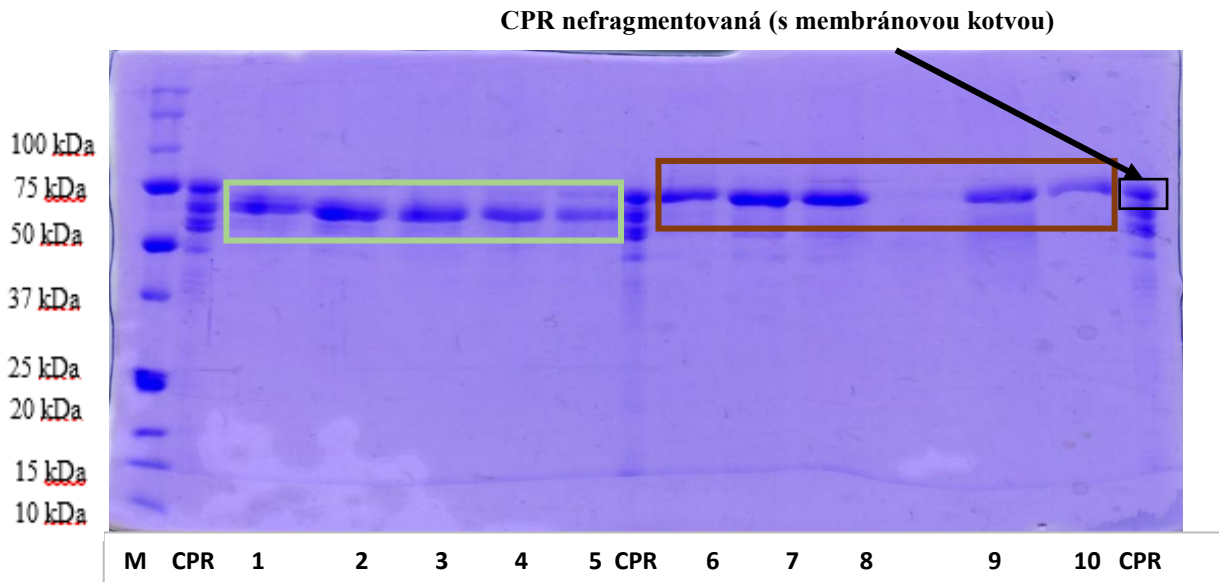


Obr. 21 Elektroforetogram zásobního vzorku CPR (CPR) s vyznačenými pruhy pro formu s membránovou kotvou a pro formu bez membránové kotvy. Tato CPR která byla následně purifikována pomocí FPLC. M značí marker s vyznačenými molekulovými hmotnostmi.

Vzhledem k výsledku elektroforézy bylo přistoupeno k iontově výměnné chromatografii. Predikce pI očekávaných forem CPR s membránovou kotvou a bez ní, jejichž přítomnost byla odhadnuta z elektroforetogramu pomocí programu ProtParam, činí pro CPR 5,30 a pro CPR bez kotvy cca 5,60. I přes velmi úzké rozmezí pI se podařilo majoritní formy od sebe relativně dobře oddělit. Chromatogram je zobrazen na Obr. 22 na str. 47. S frakcemi odpovídajícími daným majoritním píkům byla provedena SDS-PAGE, elektroforetogram, což je zobrazeno na Obr. 23 str. 47.

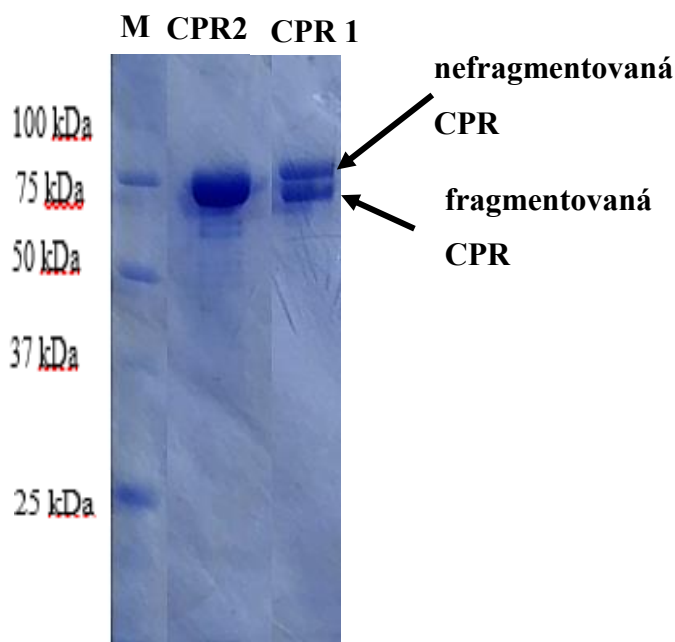


Obr. 22 Chromatogram iontové výměnné chromatografie pro CPR, zeleně vyznačená oblast frakcí 1-5, hnědě frakce 6-10, které byly dále naneseny na gel. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm.



Obr. 23 Elektroforetogram frakcí 1-5 a 6-10 získaných pomocí iontové výměnné chromatografie preparátu CPR, kde CPR označuje původní preparát. Černě jsou vyznačeny pruhy pro nefragmentovanou CPR, zeleně jsou vyznačeny pruhy pro fragmentovanou CPR bez membránové kotvy. M značí marker s vyznačenými molekulovými hmotnostmi.

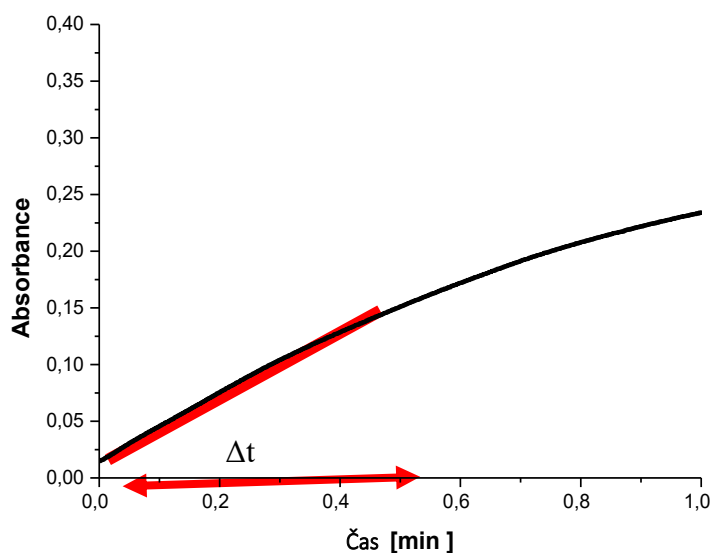
Z výsledku elektroforézy je patrné, že se povedlo rozdělit dvě majoritní formy CPR. Dále byly frakce 6-10 převedeny do jednoho roztoku a zahuštěny stejným principem jako v předchozí kapitole pro cyt. b₅. Vzhledem k purifikační náročnosti jak časové, tak materiální byl nakonec dále charakterizován a k pokusům použit jiný zásobní roztok CPR. Tímto pokusem se však povedlo dokázat, že pomocí iontově výměnné chromatografie je možné rozdělit dva proteiny, jejichž rozdíl pI je velmi malý. Porovnání preparátu CPR dále používaného ve všech pokusech a preparátu, který jsme se snažili v této kapitole purifikovat pomocí FPLC, je znázorněno na elektroforetogramu na Obr. 24.



Obr. 24 Elektroforetogram porovnání nově získaného preparátu CPR (CPR2) a preparátu CPR, který byl purifikován pomocí iontově výměnné chromatografie (CPR1) a na kterém jsou vyznačeny pásy pro fragmentovanou a nefragmentovanou formu CPR. M značí marker s vyznačenými molekulovými hmotnostmi.

Koncentrace CPR k dalším pokusům byla stanovena pomocí DeNovix spektrofotometru a predikovaného extinkčního koeficientu o hodnotě $97555 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molekulové hmotnosti 76963 Da (obojí pomocí programu ProtParam, UniProt kód: P00388). Koncentrace CPR byla $20,5 \mu\text{M}$.

Po zjištění koncentrace CPR následovalo měření aktivity vůči cyt. c. Měřena byla redukce cyt. c po dobu 1 minuty. Z naměřených dat byl použit úsek, kde je závislost lineární, ve výpočtech se počítalo tedy s daným rozdílem časů. Příklad závislosti absorbance na čase pro CPR je uveden na Obr. 25.



Obr. 25 Příklad závislosti absorbance na čase pro určení aktivity CPR po dobu 1 minuty.

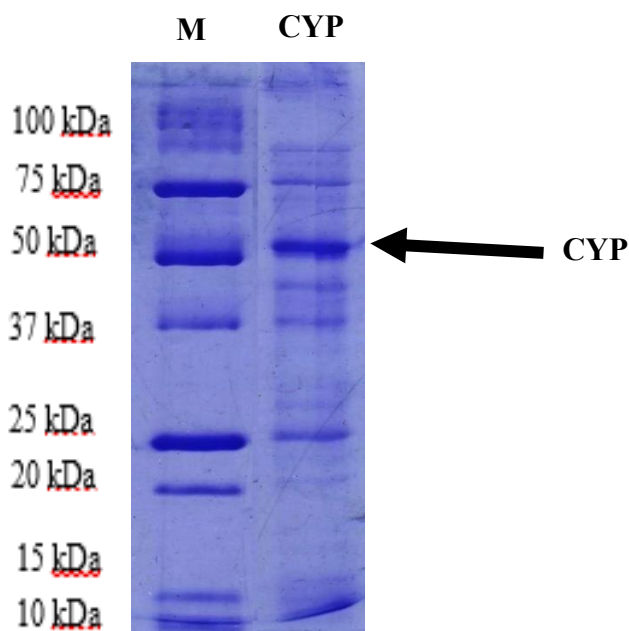
Naměřená hodnoty a vypočtená aktivita jsou uvedeny v Tab. 10. Molární absorpční koeficient cyt. c měl hodnotu $0,0211 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$. Z naměřených dat vyplývá, že je CPR aktivní, což bylo ověřeno redukcí cyt. c.

Tab. 10 Naměřené hodnoty, výpočty aktivity a čísla přeměny pro námi použitý vzorek CPR.

Koncentrace	t_2		t_1			Δt		Aktivita
[μM]	[min]	$A_{550,2}$	[min]	$A_{550,1}$	ΔA	[min]	Ředění	[$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$]
20,5	0,48	0,03	0	0,13	0,1	0,48	1000x	9,9

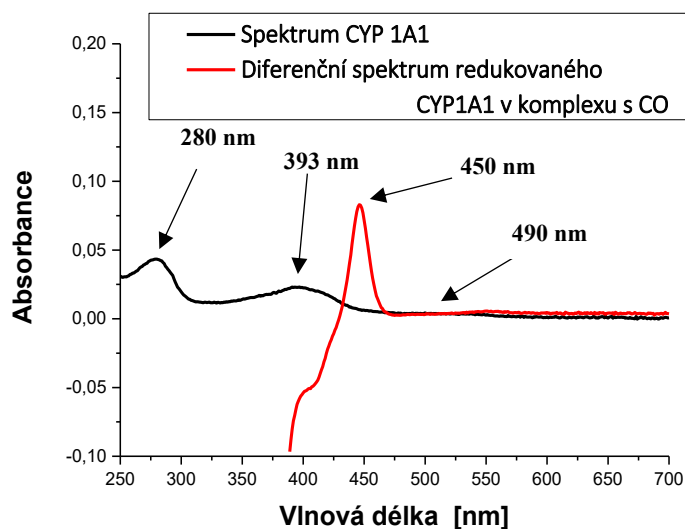
4.3. Charakterizace CYP1A1

Po přečištění a charakterizaci cyt. b₅ a CPR bylo nutno charakterizovat také CYP1A1. Jako v předchozích případech byla zvolena jako první metoda SDS-PAGE, výsledný elektroforetogram viz Obr. 26.



Obr. 26 Elektroforetogram zásobního preparátu s vyznačeným odpovídajícím pruhem pro CYP1A1. M značí marker s vyznačenými molekulovými hmotnostmi.

Z elektroforetogramu je patrné, že v zásobním preparátu není pouze CYP, ale množství kontaminant není velké a také jejich přítomnost neinterferuje s poměrně selektivní metodou stanovení koncentrace CYP. Z předchozích zkušeností vyplývá, že úplné přečištění od ostatních proteinů je časově i materiálně náročné, a proto k němu v tomto případě nebylo přikročeno. Ke stanovení koncentrace byla použita metoda redukce CYP pomocí dithioničitanu a poté probublání CO, při kterém se tvoří komplex CYP (Fe²⁺ a CO). Tento komplex má typický posun a nárůst absorbance na 450 nm (viz Obr. 27 na str. 51).



Obr. 27 Spektrum CYP a spektrum komplexu CYP-(Fe²⁺) s CO, v daných spektrech jsou vyznačeny typické pásy.

Z diferenčního spektra, podle kapitoly 3.4.4, byla stanovena koncentrace CYP. Naměřené hodnoty a výpočty jsou zobrazeny v Tab. 11. Takto získaná hodnota koncentrace zásobního CYP byla použita v následujících experimentech.

Tab. 11 Naměřené hodnoty absorbance a výpočty koncentrace pro preparát CYP 1A1.

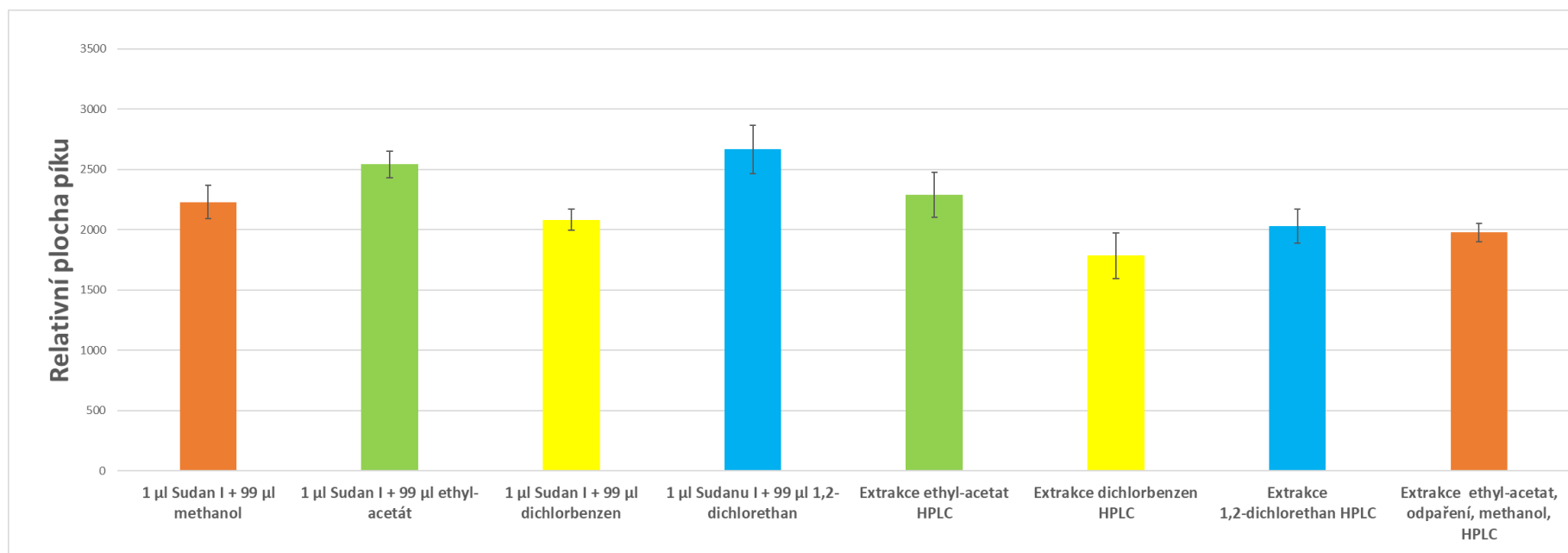
A_{450}	A_{490}	ΔA	Ředění	Molární absorpční koeficient [mmol ⁻¹ ·cm ⁻¹ ·l]	Koncentrace [μM]
0,0722	0,0039	0,0683	59x	91	44,3

4.4. Optimalizace metod stanovení Sudanu I a jeho metabolitů

4.4.1. Optimalizace extrakce Sudanu I

Ke zlepšení reprodukovatelnosti výsledků studií metabolismů, bylo provedeno ještě několik dílčích optimalizací. První z nich se zaměřovala na reprodukovatelnost extrakce Sudanu I (v inkubacích společně se svými metabolity). Cílem této optimalizace byla snaha ověřit, že nejlepší možný způsob je zavedená metoda extrakce. Čímž je myšlena extrakce Sudanu I z inkubace do ethyl-acetátu, následné odebrání ethyl-acetátu, odpaření, rozpuštění v methanolu a poté nastříknutí na HPLC, kde jako mobilní fáze je používán 75% (v/v) methanol.

Pro vybraná rozpouštědla použitá k extrakci a jejich kontroly (kapitola 3.4.6) byl sestrojen graf na Obr. 28 na str. 53.

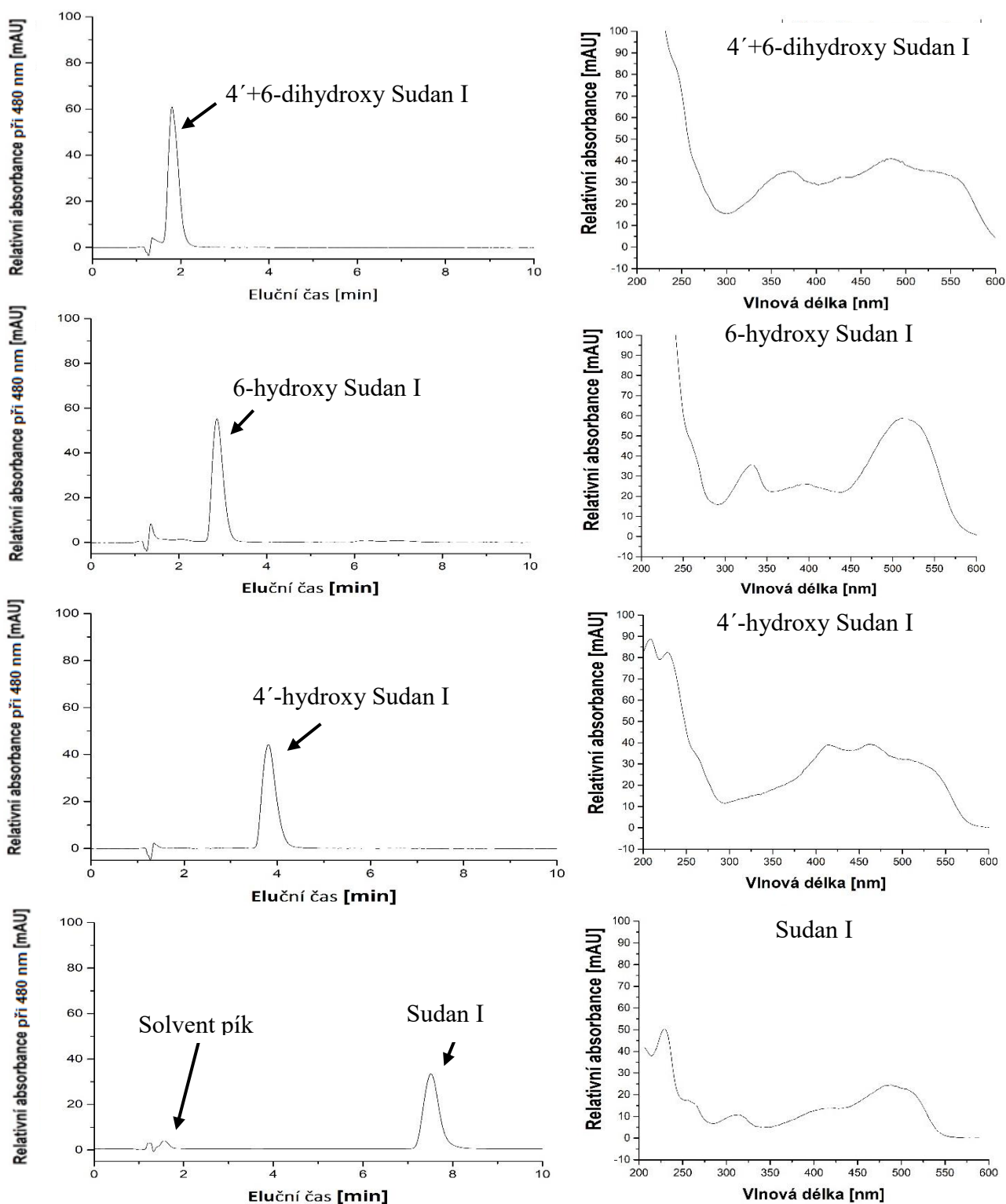


Obr. 28 Sloupcový graf pro jednotlivá rozpouštědla použitá k extrakci a pro jejich kontroly. Data jsou uváděna včetně chybových úseček získaných ze 3 samostatných měření. Z grafu vyplývá, že nejpodobnější množství vůči kontrole v methanolu je u extrakce ethyl-acetátem s odpařením a rozpuštěním v methanolu.

Z grafu je patrné, že nejbližší referenčnímu Sudanu I v methanolu je opravdu již dříve zavedená extrakce ethyl-acetátem, odebrání ethyl-acetátu, jeho odpaření na vakuové odparce a následné rozpuštění v methanolu. Kromě tohoto zjištění je vidět, že u ostatních rozpouštědel je velká směrodatná odchylka, která je v grafech znázorněna chybovými úsečkami. Tyto velké odchylky jsou pravděpodobně způsobovány rychlým vypařováním rozpouštědel. Tato metoda extrakce byla ještě mírně upravena v rámci pokusů s CYP a jeho hydroxylací Sudanu I. Úpravy byly provedeny pro potřeby tohoto ověřovacího pokusu, konkrétní postup u pokusu viz kapitola 3.4.9.

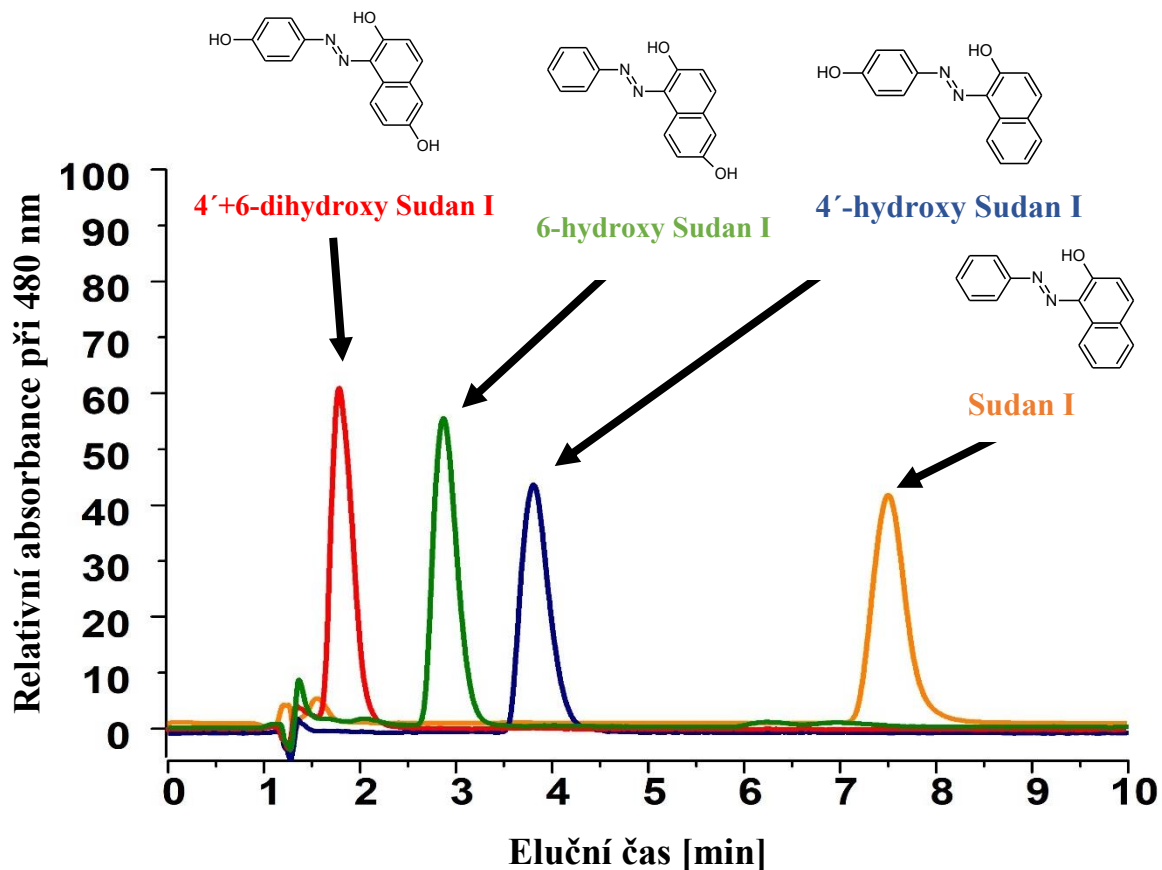
4.4.2. Eluční a spektrální přiřazení Sudanu I a jeho metabolitů při metodě HPLC s využitím UV-VIS detekce

V rámci optimalizace a zpřesnění měření bylo provedeno eluční a spektrální přiřazení standardů metabolitů Sudanu I podle informací z literatury [67]. K tomu byly využity standardy metabolitů Sudanu I. Byla provedena metoda HPLC, ze které byly získány eluční profily (chromatogramy) a spektra pro jednotlivé metabolity a Sudan I. Tato získaná data byla používána v rámci přiřazování metabolitů v dalších experimentech. Spektra pro jednotlivé metabolity a eluční profily jsou zobrazeny na Obr. 29, str. 55. Při těchto pokusech nebyla známa koncentrace metabolitů, šlo hlavně o určení pozice píku a jejich spektra. V následující kapitole byly připraveny roztoky o přesné koncentraci metabolitů a byla sestrojena kalibrace.



Obr. 29 Eluční profily (vlevo) a spektra (vpravo) od shora pro 4'+6-dihydroxy Sudan I, 6-hydroxy Sudan I, 4'-hydroxy Sudan I a Sudan I. Solvent pík značen u Sudanu I je také přítomen na všech ostatních chromatogramech. U chromatogramu i u spekter byla použita relativní absorbance jako jednotka přístroje prakticky využívaná při vyhodnocování chromatogramů získaných metodou HPLC. Řazeno podle pořadí eluce.

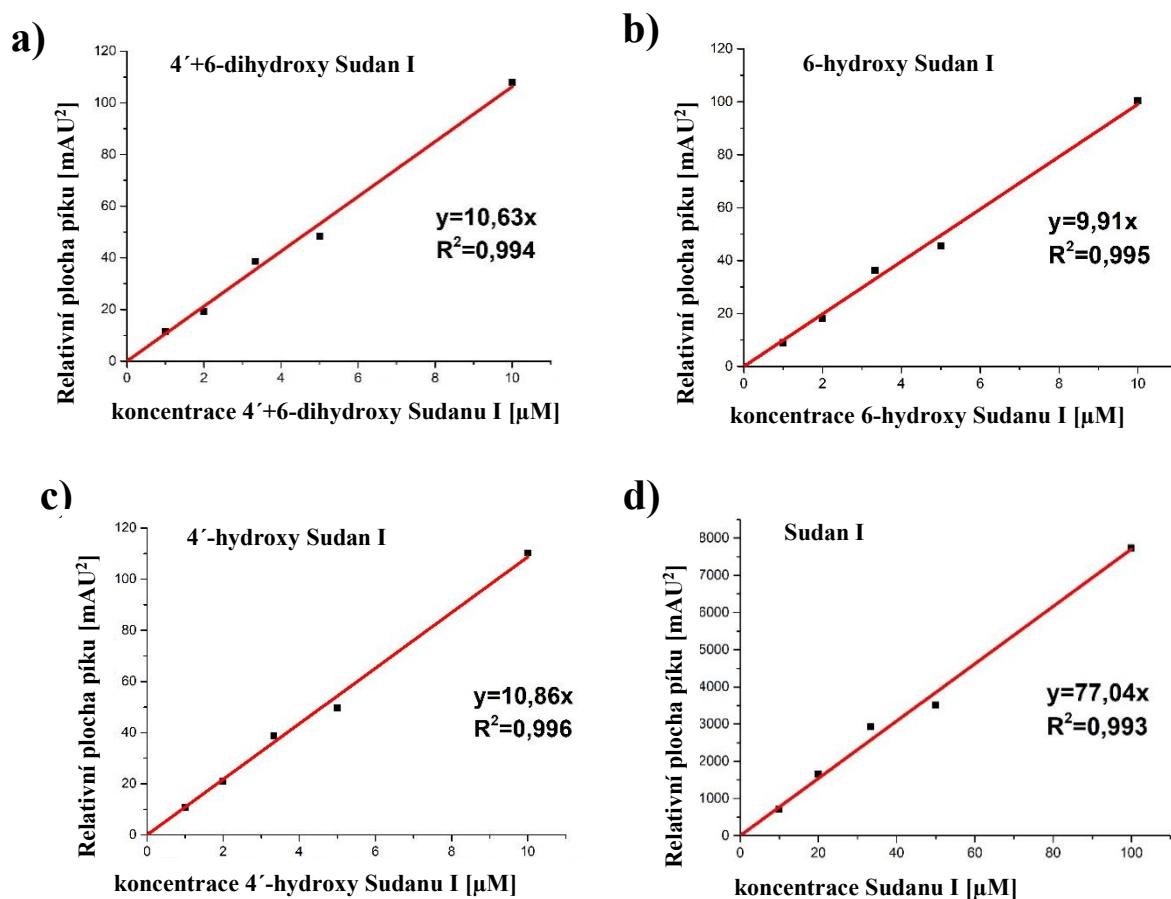
Dále byl sestaven teoretický chromatogram pro jednotlivé metabolity a Sudan I, který je zobrazen na Obr. 30.



Obr. 30 Teoretický chromatogram sestavený překryvem chromatogramů pro jednotlivé standardy o neznámé koncentraci. K daným pikům náleží vzorce, z kterých je patrné, že metabolity vytékají podle své, od nejpolarnějšího k nejméně polárnímu, což je způsobeno využitím reverzní fáze (kolony).

4.4.3. Kalibrace metody HPLC

Pro kvantifikaci Sudanu I a jeho hydroxyderivátů pomocí metody HPLC s detekcí ve viditelném spektru, konkrétně při vlnové délce 480 nm, byla použita metoda externí kalibrace s využitím směšného vzorku všech stanovovaných látek. To bylo možné díky jejich různému elučnímu času (viz kapitola 4.4.2). Pomocí vyhodnocovacího softwaru k HPLC byla určena plocha píků pro jednotlivé metabolity a Sudan I. Data byla dále zpracována v programu Origin© a k samotnému přepočtu na koncentrace bylo využito směrnice lineární regrese. Toto vyhodnocení bylo provedeno samostatně pro každou detekovanou látku. Kalibrační grafy jsou vyznačeny na Obr. 31.



Obr. 31 Kalibrační grafy pro a) 4'+6-dihydroxy Sudan I, b) 6-hydroxy Sudan I, c) 4'-hydroxy Sudan I, d) Sudan I. Měřeno při vlnové délce 480 nm.

4.5. Inkubace systémů obsahujících CYP1A1, cyt. b₅ a CPR se Sudanem I

Po předchozích ověřeních koncentrace a čistoty proteinů a optimalizaci metody HPLC byly provedeny experimenty s různými poměry CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1, kde byl jako markerový substrát použit Sudan I. K vyhodnocení účinnosti systému se využily plochy píků detekovaných metabolitů a Sudanu I. Přiřazení bylo provedeno podle kapitoly 4.4.2 a následně byly na tyto naměřené hodnoty aplikovány kalibrace, které jsou popsány v kapitole 4.4.3. V rámci analytického vyhodnocení byla využita korekce na množství přidávaného Sudanu I, jelikož se methanol ve vialkách při dlouhých měření na HPLC odpařoval.

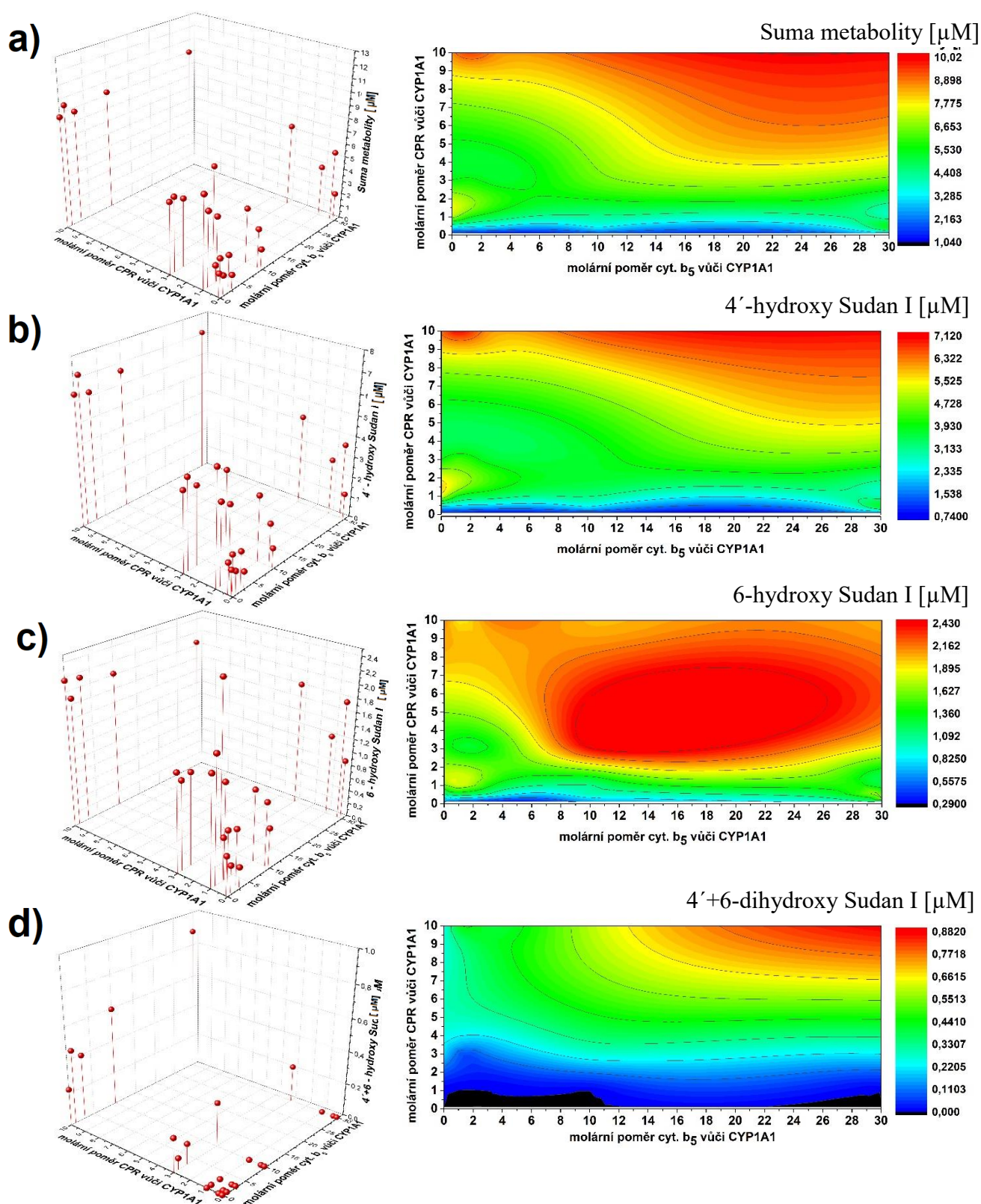
Poté byla data vyhodnocena pomocí softwaru Origin©. Nejdříve byly vytvořeny 3D grafy pro jednotlivé metabolity a pro celkový součet metabolitů, který je součtem koncentrací jednotlivých metabolitů, jak je zobrazeno na Obr. 32 na str. 60. Pro lepší přehlednost byla data znázorněna také pomocí vrstevnicových grafů.

Na vrstevnicovém grafu pro sumu metabolitů, Obr. 32 a) na str. 60, je patrná vysoká účinnost při vysokých poměrech CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1. Tato závislost je viditelná při vysokých koncentracích CPR, přestože účinnost mírně slábne v oblasti s čtyřnásobným nadbytkem cyt. b₅ vůči CYP1A1. Od tohoto bodu můžeme pozorovat zvyšující se aktivitu s přibývajícím množstvím cyt. b₅. Okolo třinásobného nadbytku CPR vůči CYP1A1 můžeme sledovat víceméně stagnující množství metabolitů při zvyšující se koncentraci cyt. b₅. Tento pás, jak již bylo zmíněno, se s rostoucím poměrem cyt. b₅ shora zmenšuje a u nadbytku cyt. b₅ je vidět, že i v oblasti subekvimolárních zastoupení CPR reakce probíhá s vyšší účinností. Z lokálních maxim stojí za zmínku maximum okolo poměru CPR:cyt. b₅ 1,5:1. Více méně na druhé straně grafu při poměru 1:30 nalézáme lokální minimum. Celkové minimum nacházíme při subekvimolárních poměrech CPR, kromě výše zmíněné oblasti okolo třicetinásobného nadbytku cyt. b₅, kde je patrné zvýšení účinnosti přeměn. U tohoto pásu globálních minim stojí za zmínku, že i přes subekvimolární poměr CPR vůči CYP1A1 reakce probíhá v celém rozsahu měřených poměrů cyt. b₅, i když v rámci celého grafu s výrazně menší účinností.

Na grafu na Obr. 32 b) na str. 60 pro 4'-hydroxy Sudan I vidíme dvě maxima okolo poměru CYP1A1:CPR:cyt. b₅ 1:10:1 a 1:10:30. Mezi těmito poměry se táhne pás vysoké míry přeměny, který se se zvětšujícím poměrem cyt. b₅ a snižujícím se poměrem CPR rozšiřuje. Lokální maximum vidíme při poměru CPR:cyt. b₅ kolem 1,5:1. Globální minimum se nachází v pásu subekvimolárního poměru CPR vůči CYP1A1.

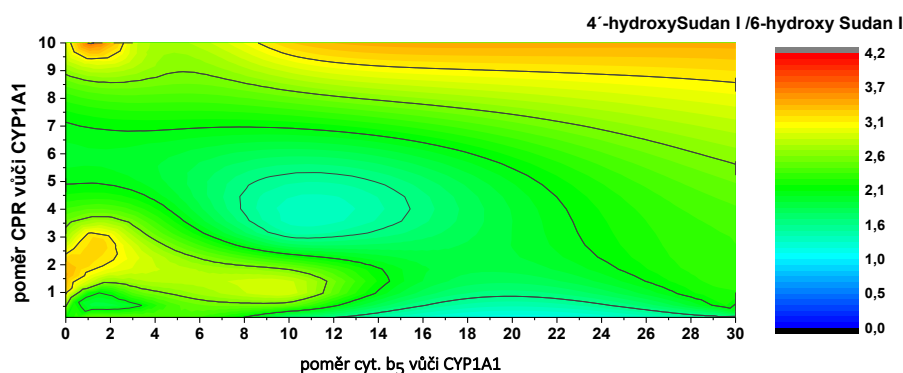
Na grafu na Obr. 32 c) na str. 60 pro 6-hydroxy Sudan I vidíme globální maximum okolo poměru CYP1A1:CPR:cyt. b₅ 1:5:17. Pozice globálního maxima může korespondovat s přeměnou na 4'+6-dihydroxy Sudan I (viz diskuse). Dále vidíme lokální maximum okolo poměru CPR:cyt. b₅ 1,5:1. Další dvě výrazně menší lokální maxima vidíme při poměru 3:2 a 1,5:30. Mezi lokálním maximem 1,5:1 a 1,5:30 můžeme vidět pás, kde je množství 6-hydroxy Sudanu I prakticky konstantní. Z grafu, hlavně 3D bodového, je vidět, že přeměna při subekvimolárních poměrech CPR vůči CYP1A1 je relativně vyšší než u 4'-hydroxy Sudanu I.

Na grafu na Obr. 32 d) na str. 60 pro 4'+6-dihydroxy Sudan I vidíme maximum při maximálním měřeném nadbytku CPR i cyt. b₅. Minimum vidíme v pásu subekvimolárního poměru CPR vůči CYP1A1 do cca čtyřnásobného nadbytku CPR. Černá místa na vrstevnicovém grafu znamenají, že v inkubacích nebyl dihydroxy derivát detekovaný.



Obr. 32 3D grafy znázorňující tvorbu jednotlivých metabolitů Sudanu I, vlevo 3D bodové a vpravo vrstevnicové pro: a) Suma koncentrací všech metabolitů, b) 4'-hydroxy Sudan I c) 6-hydroxy Sudan I d) 4'+6-dihydroxy Sudan I.

V dalším kroku byl sestrojen graf poměru primárních metabolitů 4-hydroxy Sudanu I vůči 6-hydroxy Sudanu I na Obr. 33. Podle teze, která byla popsána v mé bakalářské práci, by měl být poměr vzniku těchto metabolitů konstantní [3]. Změna tohoto poměru může naznačovat přeměnu jednoho nebo druhého metabolitu na sekundární metabolit 4'+6-hydroxy Sudan I. V grafu na Obr. 33 můžeme pozorovat tři lokální maxima při poměrech CPR:cyt. b₅ cca 1:0,2 další je při poměru 10:1 a poslední je pás maxim při desetinásobném nadbytku CPR a přibližně od čtrnáctinásobného nadbytku do třicetinásobného nadbytku cyt. b₅. Minima nacházíme při poměrech 4:11 a 0,1:20.



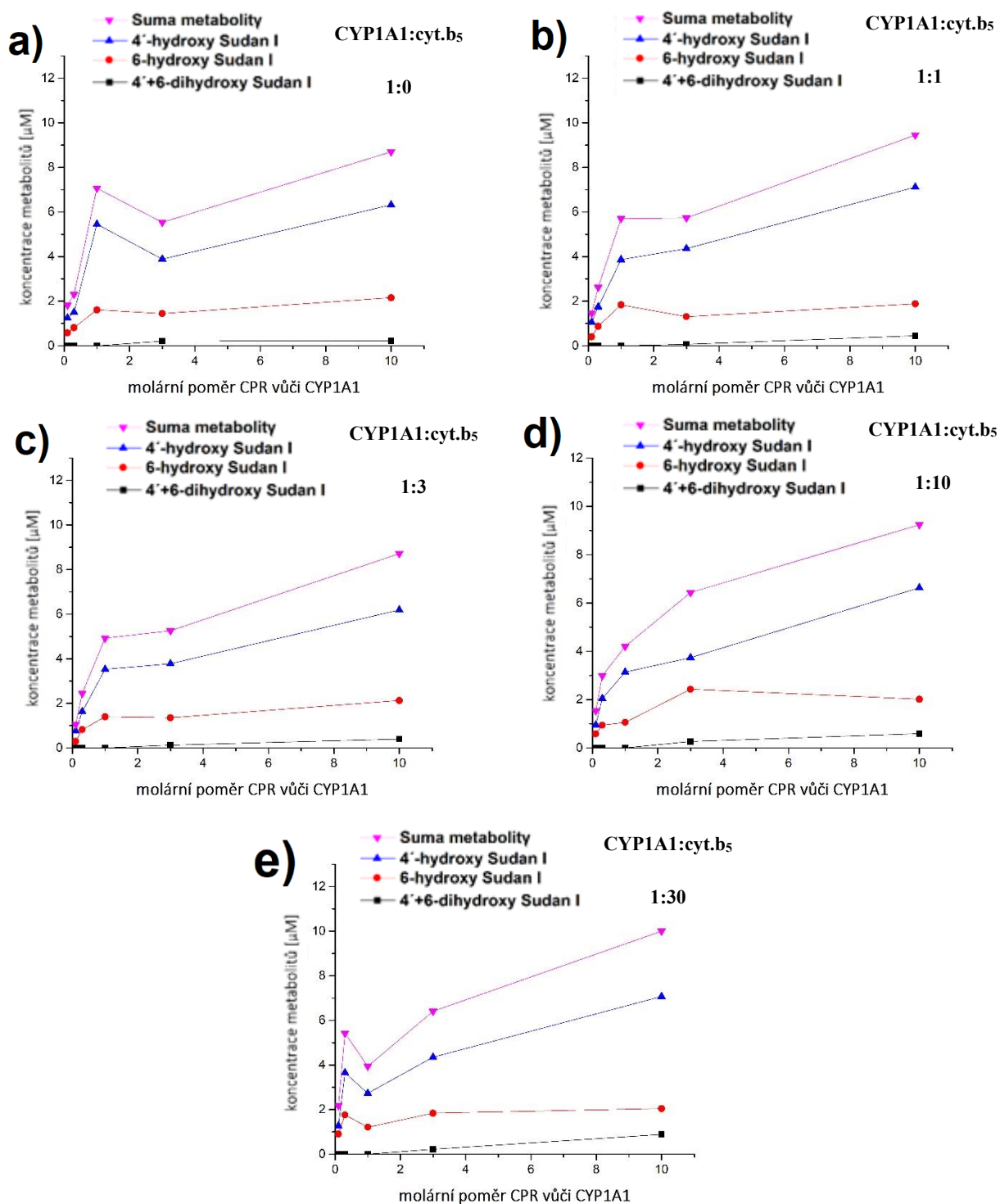
Obr. 33 Vrstevnicový graf poměru monohydroxy derivátů (4'-hydroxy a 6-hydroxy Sudanu I) pro různé poměry CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1.

Tendence z tohoto grafu byly porovnávány s grafy pro jednotlivé metabolity na Obr. 32 na str. 60. Pro minimum přibližně ve středu grafu vidíme, že se nachází cca v místě maxima pro 6-hydroxy Sudan I, což odpovídá danému snížení poměru. Podobný vztah platí u minima pro subekvimolární poměr CPR, kdy se zvyšuje zastoupení 6-hydroxy Sudanu I v inkubaci. Horní pás maxim naopak koreluje s polohou maxima u 4'-hydroxy Sudanu I a snížením účinnosti přeměny na 6-hydroxy Sudanu I. Pro maxima u nízkých poměrů cyt. b₅ vůči CPR nevykazuje poměr primárních metabolitů vztah ke koncentraci 4'+6-hydroxy Sudanu I. Tato maxima mohou být způsobena pouze zvýšenou aktivitou při těchto poměrech k tvorbě 4'-hydroxy Sudanu I resp. snížením tvorby 6-hydroxy Sudanu I.

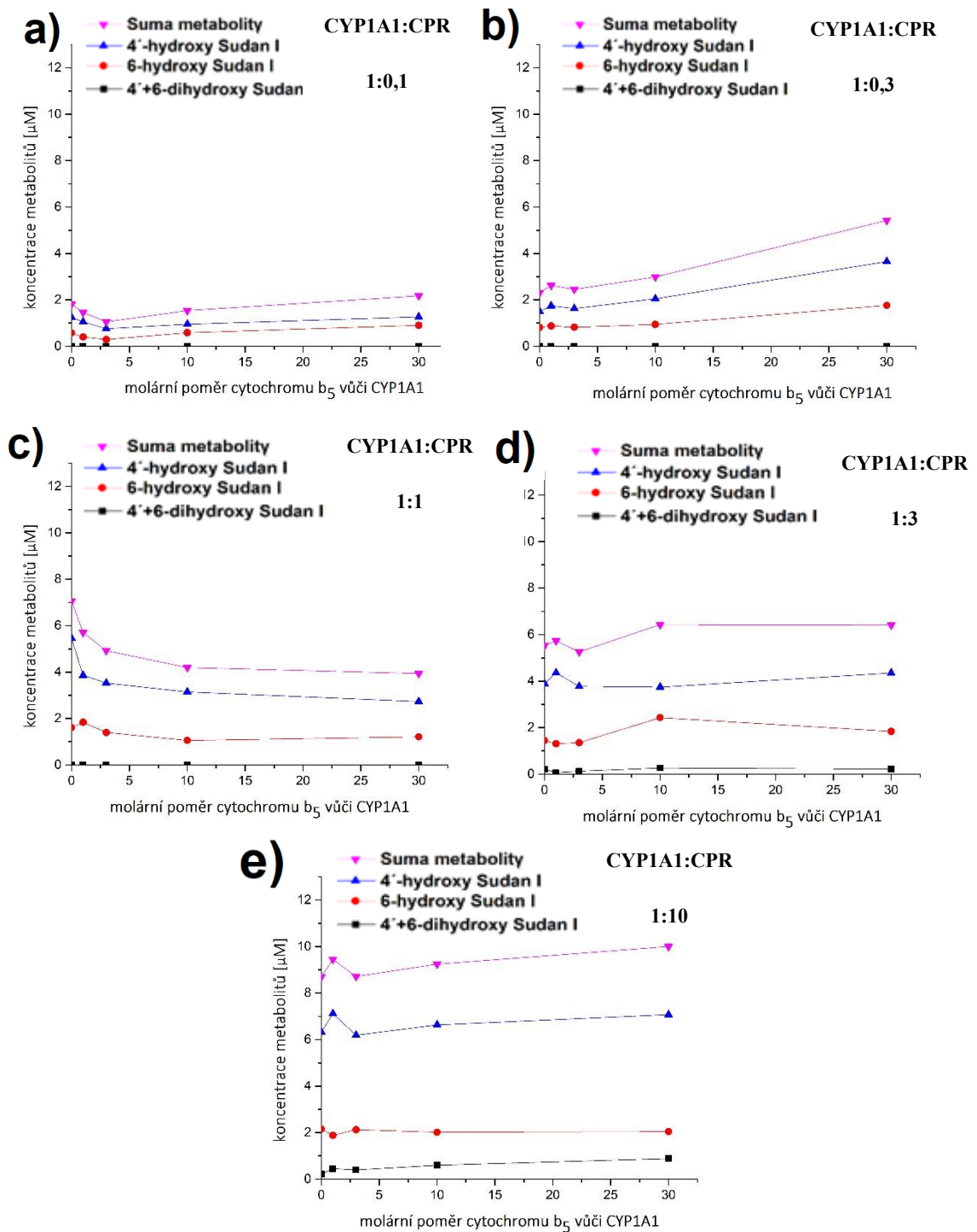
Pro bližší pochopení efektu při různých poměrech proteinů byla vytvořena řada řezů 3D grafy z Obr. 32 str. 60. Řezy grafy při konstantních hodnotách cyt. b₅ jsou zobrazeny na Obr. 34 na str. 63, řezy při konstantních hodnotách CPR jsou zachyceny na Obr. 35 str. 64.

Při konstantním poměru cyt. b₅ při přidavku CPR je vidět, že suma koncentrace metabolitů roste ve všech případech. U všech řezů, vyjma Obr. 34 d) na str. 63, je vidět propad účinnosti reakce při poměru CYP1A1:CPR 1:3, resp. 1:1 (Obr. 34 e) na str. 63). Teno propad může být způsoben vzájemnými interakcemi proteinů v liposomech či mezi sebou navzájem. Z grafů na Obr. 34 d) a e) na str. 63 vyplývá, že 4'+6-dihydroxy Sudanu I přibývá na úkor 6-hydroxy Sudanu I. Dále je z grafů patrné, že maximální přídavek CPR zvyšuje účinnost reakce přibližně desetkrát ve srovnání s 0,1 molárním poměrem CPR, a že všechny metabolity vykazují nárůst koncentrace při přidavku CPR do inkubační směsi.

U druhé série řezů na Obr. 35 na str. 64, s konstantním poměrem CPR vůči CYP1A1 je možné pozorovat při poměru 1:0,1 (Obr. 35 a) na str. 64) zpočátku inhibici, a při zvýšení koncentrace cyt. b₅ mírný nárůst koncentrace metabolitů. Z grafu na Obr. 35 b) na str. 64 pro poměr CYP1A1:CPR 1:0,3 je patrný nárůst metabolitů při přidavku cyt. b₅. U grafu na Obr. 35 c) na str. 64 pro poměr CYP1A1:CPR 1:1 vidíme v celém rozsahu měřených poměrů inhibici přidavkem cyt. b₅. Pro poměry CYP1A1:CPR, číselně znázorněné jako 1:3 a 1:10, (Obr. 35 d) a e) na str. 64), můžeme při pohledu na sumu metabolitů říci, že se jejich koncentrace při přidavku cyt. b₅ prakticky nemění. Z grafů je také patrné, že nejvíce 4'+6-dihydroxy Sudanu I vzniká při poměru CYP1A1:CPR 1:10.



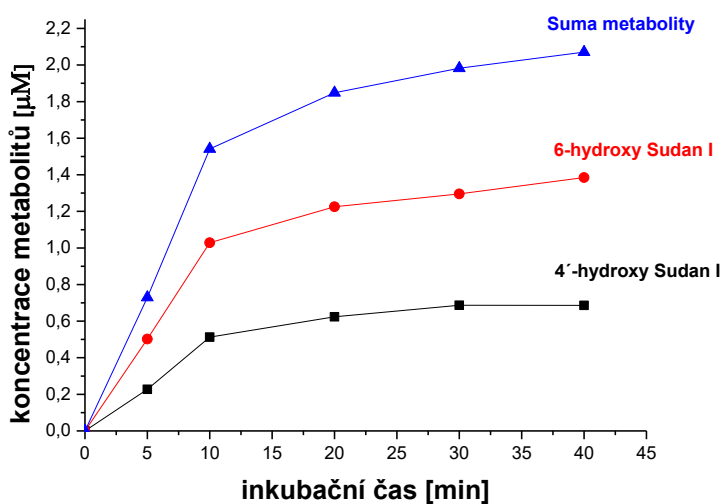
Obr. 34 Grafy závislosti koncentrace metabolitů na molárních poměrech CPR vůči CYP1A1, při konstantních poměrech cyt. b₅ vůči CYP1A1 (uvedeno v grafech).



Obr. 35 Grafy závislosti koncentrace metabolitů na molárních poměrech cyt. b_5 vůči CYP1A1, při konstantních poměrech CPR vůči CYP1A1 (uvedeno v grafech).

4.6. Optimalizace času inkubace pro kinetická měření

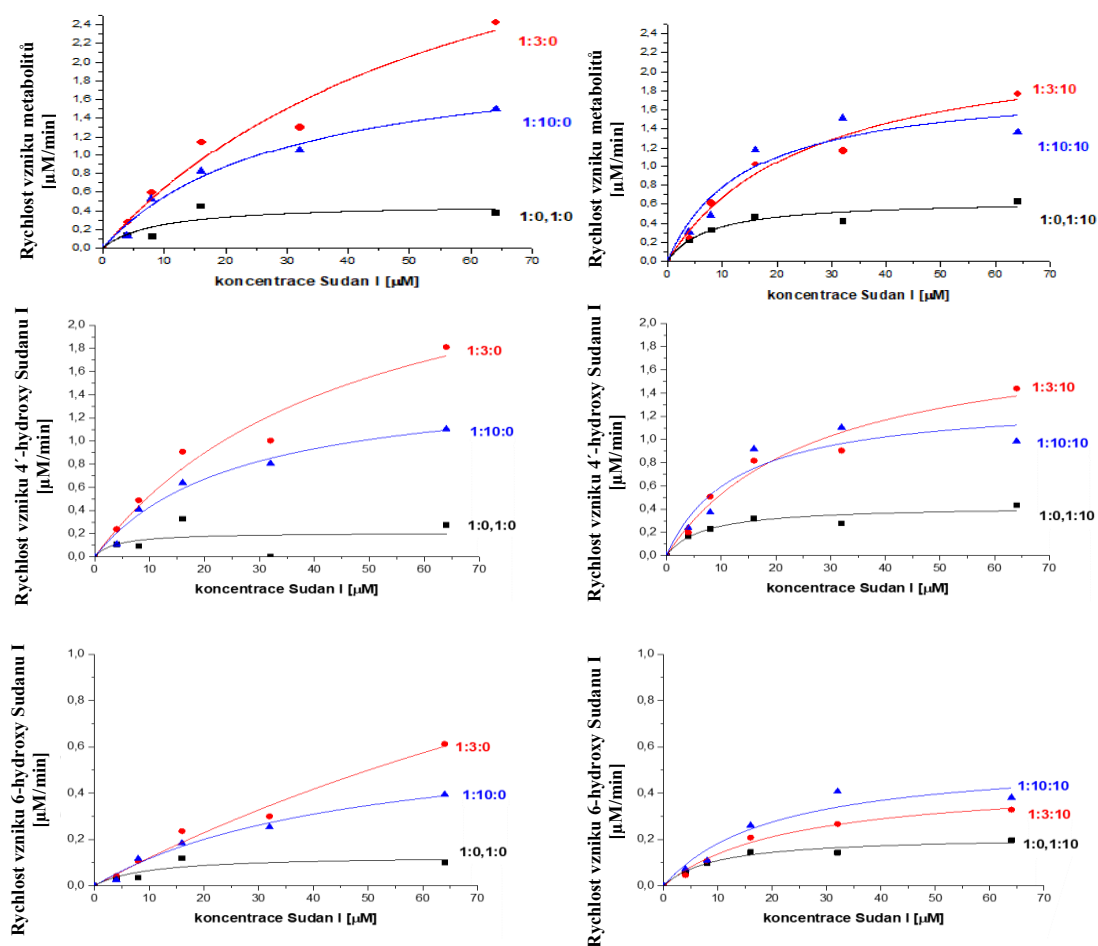
Pro stanovení kinetiky systému CYP1A1 s různými poměry CPR a cyt. b₅ bylo nejdříve nutno určit časovou závislost, tedy dobu, po kterou hydroxylace Sudanu I probíhá lineárně. Graf závislosti koncentrace metabolitů na čase inkubace je zobrazen na Obr. 36. Z grafu je patrné, že z našich zvolených časů je nárůst lineární až do doby 10 min. Tento čas byl použit u následujícího měření enzymových kinetik. Za těchto podmínek nebyl detekován žádný 4'+6-dihydroxy Sudan I.



Obr. 36 Stanovení linearitu rychlosti hydroxylační reakce. Poměr proteinů byl CYP1A1:CPR:cyt.b₅ 1:1:0.

4.7. Kinetika hydroxylace Sudanu I při různých poměrech CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1

Po zjištění ideálního času inkubace v předchozí kapitole bylo vybráno několik poměrů CPR a cyt. b₅ vůči CYP1A1, u kterých byla změřena kinetika vzniku primárních metabolitů. Kinetické grafy pro jednotlivé poměry proteinů a primární metabolity a jejich součet, které byly proloženy Hillovou funkcí s nadefinovaným Hillovým koeficientem $n=1$, jsou zobrazeny na Obr. 37.



Obr. 37 Kinetické grafy pro teoretický součet metabolitů (nahore), 4'-hydroxy Sudan I (uprostřed) a 6-hydroxy Sudan I (dole). Vlevo jsou zobrazené grafy pro poměry bez cyt. b₅, vpravo s cyt. b₅.

Odečtené hodnoty K_M a V_{MAX} a jejich chyby a dopočtené kinetické parametry k_{cat} a k_{cat}/K_M pro dané poměry proteinů jsou zobrazeny v Tab. 12.

Tab. 12 Hodnoty V_{MAX} a K_M a jejich chyby, k_{cat} a poměr k_{cat}/K_M pro vybrané poměry koncentrací proteinů pro 6-hydroxy Sudan I a 4'-hydroxy Sudan I.

Suma metabolitů								
Poměr koncentrace proteinů			V_{MAX}	Chyba +/-	K_M	Chyba +/-	k_{cat}	k_{cat}/K_M
CYP1A1	CPR	cyt b_5	[$\mu M/min$]		[μM]		[min^{-1}]	[$\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$]
1	0,1	0	0,5	0,2	8,9	8,5	9,6	1,1
1	3	0	4,6	1,3	61	29	92	1,5
1	10	0	2,2	0,3	30	7,9	43	1,5
1	0,1	10	0,6	0,1	7,7	3,0	13	1,7
1	3	10	2,4	0,3	26	7,5	48	1,9
1	10	10	1,9	0,3	14	7,3	38	2,6
4'-hydroxy Sudan I								
Poměr koncentrace proteinů			V_{MAX}	Chyba +/-	K_M	Chyba +/-	k_{cat}	k_{cat}/K_M
CYP1A1	CPR	cyt b_5	[$\mu M/min$]		[μM]		[min^{-1}]	[$\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$]
1	0,1	0	0,2	0,1	8,6	8,2	7,0	0,8
1	3	0	3,0	0,7	47	21	60	1,3
1	10	0	1,5	0,2	26	6,8	31	1,2
1	0,1	10	0,4	0,1	6,8	3,1	8,6	1,3
1	3	10	2,0	0,3	26	9,3	40	1,5
1	10	10	1,3	0,3	13	6,8	27	2,1
6-hydroxy Sudan I								
Poměr koncentrace proteinů			V_{MAX}	Chyba +/-	K_M	Chyba +/-	k_{cat}	k_{cat}/K_M
CYP1A1	CPR	cyt b_5	[$\mu M/min$]		[μM]		[min^{-1}]	[$\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$]
1	0,1	0	0,1	0,04	9,9	9,3	2,6	0,3
1	3	0	2,3	1,3	182	133	46	0,3
1	10	0	0,7	0,1	48	14	14	0,3
1	0,1	10	0,2	0,02	9,7	2,6	4,3	0,4
1	3	10	0,5	0,04	23	4,9	9,1	0,4
1	10	10	0,6	0,1	21	9,9	11	0,5

Z Tab. 12 na str. 67 je patrné, že změna poměru CPR ku CYP1A1 má výrazný vliv na kinetiku přeměny Sudanu I na jeho primární metabolity. V některých případech jsou vidět i řádové rozdíly v hodnotách K_M a V_{MAX} . Stejně jako v předchozích experimentech byla sestrojena kinetika i pro teoretickou sumu všech metabolitů.

Při pohledu na oba primární metabolity i jejich sumu pozorujeme, že nejnižší hodnoty K_M i V_{MAX} jsou typické pro subekvimolární poměry CPR. Nejvyšší hodnoty K_M i V_{MAX} byly zaznamenány u poměrů s trojnásobným nadbytkem CPR. Tyto trendy jsou u obou derivátů více méně totožné. Přičemž v absolutních číslech vykazuje tvorba 6-hydroxy Sudanu I vyšší hodnoty K_M a nižší V_{MAX} , s jedinou výjimkou, kterou je K_M při poměru 1:3:10, jež je zde o něco nižší než pro 4'-hydroxy Sudan I. V čem se však tyto deriváty liší, je vliv přídavku cyt. b₅. V případě tvorby 4'-hydroxy Sudanu I přídavek cyt. b₅ poněkud zlepšuje K_M a při subekvimolárním poměru CPR zlepšuje i V_{MAX} . Zato v případě tvorby 6-hydroxy Sudanu I přídavek cyt. b₅ při nejnižších koncentracích CPR nemá prakticky žádný vliv na K_M , ale zvyšuje V_{MAX} , a naopak při nadbytku CPR pak cyt. b₅ několikanásobně zlepšuje K_M , ale zhoršuje V_{MAX} .

Protože parametry K_M a V_{MAX} často vykazovaly opačné trendy, byla snaha zjistit, který z parametrů převládá. Pro porovnání kinetiky pro jednotlivé poměry proteinů k CYP1A1 bylo vypočteno číslo přeměny k_{cat} , a následně poměr tohoto čísla přeměny vůči K_M , který vyjadřuje konstantu specifity či též katalytické efektivity enzymu (k_{cat}/K_M). Čím je toto číslo vyšší, tím lépe enzym daný substrát přeměňuje. Z hodnot k_{cat}/K_M uvedených v Tab. 12 na str. 67 vyplývá, že přídavek cyt. b₅ zvyšuje katalytickou efektivitu hydroxylace Sudanu I zprostředkovanou CYP1A1 až téměř na dvojnásobek.

5. Diskuse

V první části práce jsem se zaměřil na charakterizaci zájmových proteinů, které byly již dříve na katedře připraveny. Cyt. b₅ vykazuje poměrně nízkou afinitu k hemu a během heterologní exprese pak může být preparát kontaminován neaktivní apoformou. Původní preparát cyt. b₅ použitý pro další experimenty, jak se ukázalo, apoformu neobsahoval, pomocí IEX z něj však byly úspěšně odstraněny neznámé kontaminující proteiny. To bylo důležité proto, aby mohla být co nejpřesněji stanovena jeho koncentrace pomocí UV-vis spektroskopie.

V rámci charakterizace CPR byla nejprve provedena SDS-PAGE, která prokázala, že v zásobním roztoku bylo přítomno několik zón proteinu, z nichž většina vykazovala nižší molekulovou hmotnost než nefragmentovaná CPR. Vzhledem ke známé nestabilitě tohoto proteinu, bylo předpokládáno, že se jedná o kontaminaci fragmenty bez membránové kotvy. Predikovaný rozdíl isoelektrických bodů těchto fragmentů byl v řádu desetin pH, přesto se tyto formy povedlo oddělit pomocí iontově výměnné chromatografie, což bylo následně ověřeno i na SDS-PAGE. V rámci optimalizace tohoto dělení bylo vyzorováno, že je nezbytné tuto purifikaci provádět v chladové místnosti. Bohužel takto purifikovaného zásobního vzorku nebyl dostatek na všechny plánované experimenty. Z toho důvodu byl využit jiný, nefragmentovaný preparát CPR, u kterého byla určena koncentrace a aktivita vůči cyt. c pomocí UV/VIS spektrofotometrie.

Rekombinantní lidský CYP1A1 využitý dále v práci vykazoval poněkud větší množství nečistot, které je obtížné bez velkých ztrát odstranit. Jelikož však hostitelský organismus (*E. coli*) žádné vlastní CYP nemá, lze v tomto případě jeho koncentraci určit specificky testem na CYP, pomocí posunu absorpčního pásu jeho komplexu s CO v redukovaném stavu.

Pro zpřesnění stanovení často jen malého množství metabolitů, které mohou vznikat např. při nízkých koncentracích substrátu během kinetických měření, bylo také nutné optimalizovat některé kroky přípravy a analýzy vzorků. Kroky obnášely ověření účinnosti extrakce Sudanu I a optimalizaci kvalitativního a kvantitativního určení metabolitů Sudanu I.

Optimalizace extrakce potvrdila, že nejlepší možností je extrakce ethyl-acetátem, jeho odpaření a rozpuštění odparku v methanolu. Ostatní zkoušená rozpouštědla, kromě sníženého množství Sudanu I vykazovala známky obsahu jiných látek, které u některých rozpouštědel rozmývaly píky pro Sudan I, případně byl detekován jiný pík pro dané rozpouštědlo, tyto píky by pak navyšovaly plochy píků pro metabolity v následujících pokusech. I pro zvolenou metodu přípravy vzorku (extrakce ethyl-acetátem, jeho odpaření a následné rozpuštění odparku v methanolu) se musí zohlednit možnost vzniku nepřesností při vyhodnocování výsledků z HPLC. Jedná se hlavně o to, že se odparek rozpouštěný v malém objemu (100 μ l) ve vialkách o objemu cca 1,5 ml rychle odpařuje, což se negativně projevuje hlavně u dlouhých sérií měření. Proto byla u experimentů zavedena korekce na toto odpařování.

V rámci přípravy hlavních experimentů, mapování účinnosti poměrů proteinů dodávajícím / přenášejícím elektrony pro CYP1A1 a měření kinetiky pro vybrané poměry proteinů bylo provedeno přiřazení píků podle elučních profilů z HPLC a informací získaných z literatury [61]. Dále bylo provedeno spektrální rozlišení metabolitů, kde byly pozorovány spektrální posuny hlavních píků pro oba monohydroxymetabolity i dihydroxymetabolit. Tyto poznatky byly dále použity v následných experimentech pro jasné stanovení detekovaných metabolitů. V experimentech byla použita externí kalibrace s využitím navážených standardů metabolitů. Pro zlepšení následného kvantitativního vyhodnocování by však bylo optimální zjednodušit získání kalibrační závislosti například zjištěním odpovídajících extinkčních koeficientů pro všechny detekované metabolity a daná rozpouštědla.

Jedním z hlavních cílů bylo zmapování aktivity CYP1A1 vůči Sudanu I pro různé poměry CPR a cyt. b₅. Cílem bylo zpřesnit a rozšířit soubor předběžných výsledků získaných v rámci mé bakalářské práce [3]. V bakalářské práci jsem se zaměřoval na poměry do třicetinásobného nadbytku CPR a cca sedmnáctinásobného nadbytku cyt. b₅. V diplomové práci byly proměřeny poměry do desetinásobného nadbytku CPR a třicetinásobného nadbytku cyt. b₅. Oproti bakalářské práci byl navíc zařazen ještě jeden subekvimolární poměr CPR vůči CYP. Zde byly zvoleny nižší poměry, které pravděpodobně lépe popisují fyziologický poměr proteinů v buňkách, resp. na membráně ER. Očekává se, že v buňkách

bude nadbytek cyt. b₅ oproti CYP i oproti CPR. Z výsledků jak v této, tak v mé bakalářské práci, je vidět, že změny poměrů proteinů ovlivňují efektivitu hydroxylace Sudanu I. U obou sérií výsledků je patrné, že se zvyšujícím se poměrem proteinů rychlost reakce roste, avšak průběhy vrstevnicových grafů se liší. To může být ovlivněno několika faktory. Zaprvé změnou enzymových preparátů používaných pro experimenty. Zadruhé u bakalářské práce byla provedena pouze purifikace a charakterizace cyt. b₅, koncentrace ostatních proteinů byly převzaty od kolegů, kteří dané enzymy produkovali, a z tohoto důvodu nebylo možné ověřit správnost jimi stanovené koncentrace. Například u preparátu CYP1A1 byla stanovena koncentrace pomocí proteinových technik, zatímco v této diplomové práci byla použita technika komplexu CYP s CO, která je specifická jen pro aktivní formu CYP. Tyto nejasnosti pravděpodobně způsobují místy odlišné výsledky a jejich porovnání je tedy pouze orientační.

Pro popsání vlivu změny koncentrace CPR byly sestrojeny řezy 3D grafy (z Obr. 32 na str. 60) viz Obr. 34 str. 63. Při konstantních poměrech cyt. b₅ je patrné, že se zvyšující se koncentrací CPR roste množství metabolitů ve všech případech. Tento výsledek potvrzuje, že aktivita CPR je v systému jediným proteinem získávajícím elektrony z NADPH a cyt. b₅ jen napomáhá přenosu těchto elektronů dále na CYP1A1. Dominantním, rychlost určujícím krokem je aktivita CPR resp. jeho schopnost dodávat potřebné elektrony CYP.

Naopak při konstantních poměrech CPR na Obr. 35 str. 64 vidíme, že cyt. b₅ má při různých koncentracích CPR různý vliv. Vidíme jak inhibici reakce při poměru CYP1A1:CPR 1:1, tak na druhou stranu stimulaci reakce při poměru 1:0,1 a 1:0,3. U ostatních poměrů nevykazuje cyt. b₅ na reakci výrazný vliv, snad jen u vzniku 4'+6-dihydroxy derivátu stimuluje jeho tvorbu při vysokém poměru CPR (Obr. 35 e)). Menší vliv změny koncentrace cyt. b₅ na efektivitu reakce byl očekáván, jelikož koreluje s výsledky v mé bakalářské práci. Se vzrůstající koncentrací CPR je vidět, že se vytrácí vliv přídavku cyt. b₅. Tento efekt může být způsobený také tím, že se cyt. b₅ na přenosu elektronů již nepodílí, jelikož je CYP v membráně ER asociovaný hlavně se svým primárním donorem elektronů CPR. Výsledky také naznačují, že cyt. b₅ kromě role přenašeče elektronů, za určitých podmínek neovlivňuje či i inhibuje studovanou reakci, což naznačuje, že by mohl mít na CYP1A1 i vliv alosterický.

Po tomto popsání vlivu jednotlivých poměrů proteinů na přeměnu Sudanu I si lze klást otázku, jak měnící se poměry ovlivňují enzymovou kinetiku reakce. To by také mohlo přispět k objasnění příp. alosterického vlivu cyt. b₅. Nejdříve bylo nutné zjistit časovou závislost přeměny Sudanu I na jeho metabolity, z které je patrné, že tato závislost vykazuje linearitu do cca 10 min při poměru CYP1A1:CPR:cyt. b₅ 1:1:0. Tento čas je kratší než pro jiné známé substráty, jako je například ellipticin, kde je časová závislost lineární až do 30 min [68,69]. Avšak u zmíněného experimentu s ellipticinem se jedná o mikrosomální enzymy, v pokusech byly používány rekombinantně připravené proteiny a také je zde samozřejmě nutné brát v potaz efekt substrátu, protože každý substrát je přeměňován s jinou rychlostí.

Se znalostí optimálního času inkubace byla provedena kinetická měření. Z naměřených hodnot byly sestrojeny grafy a proloženy Hillovou funkcí, s Hillovým koeficientem (n) rovným jedné, jelikož výsledky nenaznačovaly alosterickou modulaci zprostředkovanou substrátem nebo jeho vícenásobnou vazbu do aktivního centra. Byly získány hlavní kinetické parametry, V_{MAX} a K_M viz Tab. 12 na 67. Při chronické expozici, tedy za nízké koncentrace xenobiotika, je za fyziologických podmínek určující parametr K_M . Čím je hodnota K_M menší, tím je pravděpodobně i afinita enzymu k substrátu vyšší. Hodnota K_M se s rostoucí koncentrací CPR někdy i řádově zhoršovala, což by mohlo naznačovat např. alosterický vliv CPR na CYP, kdy by např. jejich delší protein-protein interakcí mohlo dojít k ovlivnění afinity k substrátu. Zajímavé je, že přídavek molárního nadbytku cyt. b₅ hodnoty K_M při vyšších koncentracích CPR zase snižuje, a tak částečně kompenzuje její negativní efekt. Pro akutní expozici, kdy je enzym vystaven vysoké koncentraci substrátu, je určujícím parametrem limitní rychlost reakce V_{MAX} . Ta je velmi nízká při subekvimolární koncentraci CPR. Ostatní podmínky ji již tak výrazně neovlivňují, i když je patrný určitý zpomalující vliv cyt. b₅ při třínásobném nadbytku CPR, rozdíl hodnot však nejsou tak výrazné jako pro K_M .

Jako další parametr k porovnání účinností hydroxylace Sudanu I pro jednotlivé poměry proteinů byl zvolen poměr k_{cat}/K_M , neboli katalytická efektivita enzymu, tento poměr v sobě zahrnuje vliv obou hlavních kinetických parametrů. Čím je tento poměr vyšší, tím je vyšší aktivita enzymu k danému substrátu. Z Tab. 12 na str. 67 je patrné, že efekt na zvýšení

katalytické efektivity má přidavek desetinásobného nadbytku cyt. b₅, a to ve všech případech. V tripletech s nebo bez cyt. b₅ je vidět, že tento parametr roste nebo se nemění, až na výjimku u 4'-hydroxy Sudanu I pro poměr proteinů 1:3:0. Na základě těchto výsledků můžeme shrnout, že přidavek cyt. b₅ má na kinetiku znatelný vliv, a tento vliv je vyšší, než vliv zvyšující se koncentrace CPR, u které se trendy rostoucí K_M a V_{MAX} resp. k_{cat} prakticky zcela navzájem kompenzují.

Trendy při kinetických měřeních naznačují, že přidavek cyt. b₅ má tendenci snižovat K_M ve všech případech. Tento efekt je výraznější u tvorby 6-hydroxy Sudanu I a při vyšších koncentracích reduktasy. Také V_{MAX} se při přidavku cyt. b₅ snižuje, a to u všech poměrů kromě nejnižšího poměru CPR vůči CYP1A1. Toto protichůdné působení přítomnosti cyt. b₅ na oxidaci Sudanu I zprostředkovanou CYP1A1 může pomoci vysvětlit některé protichůdné závěry ohledně vlivu cyt. b₅ na oxidaci dalších substrátů CYP1A1 a případně dalších příbuzných cytochromů P450. Vysvětlení spočívá v koncentraci substrátu: Je-li studie prováděna za nízkých koncentrací substrátu, kde je jeho efektivita ovlivněna především parametrem K_M , bude cyt. b₅ působit stimulačně v důsledku snižování K_M , zatímco ve studiích používajících vysoké koncentrace substrátu, při nichž je efektivita katalýzy ovlivněna především parametrem k_{cat} , se může jevit cyt. b₅ inhibičně, jelikož snižuje maximální reakční rychlost. Za určitých koncentrací substrátu také mohou být tyto protichůdné efekty v rovnováze a přidavek cyt. b₅ pak nemusí vykazat významný efekt na efektivitu katalýzy.

6. Závěr

V první fázi řešení práce se podařilo charakterizovat a přechistit starší preparáty CPR a cyt. b₅. U CPR byla navíc ověřena aktivita vůči cyt. c. U CYP1A1 byla stanovena čistota a zpřesněna koncentrace.

V rámci optimalizačních kroků bylo ověřeno, že extrakce Sudanu I ethyl-acetátem a následné odpaření a rozpuštění v ethanolu je nejlepší ze zkoušených postupů přípravy vzorků pro analýzu na HPLC. Byla provedena externí kalibrace pro stanovení Sudanu I a jeho derivátů (4'-hydroxy Sudanu I, 6-hydroxy Sudanu I a 4'+6-dihydroxy Sudanu I) na nové instrumentaci.

Jedním z hlavních výsledků pak bylo stanovení tvorby zmíněných hydroxyderivátů Sudanu I katalyzované lidským CYP1A1 pro různé poměry CYP1A1:CPR:cyt. b₅. Na základě těchto výsledků pak byly sestrojeny vrstevnicové grafy (Obr. 32 na str. 60) a jejich řezy pro konstantní poměry CPR na Obr. 34 na str. 63 a pro cyt. b₅ na Obr. 35 na str. 64. Ukázalo se, že hydroxylaci Sudanu I výrazně ovlivňuje zvyšující se koncentrace CPR, tedy zvyšující se molární poměr CYP1A1:CPR. Zatímco zvyšující se koncentrace cyt. b₅ pro konstantní poměry CPR vykazují pro různé poměry různé vlivy: kdy můžeme sledovat jak stimulaci, tak inhibici a u některých poměrů také to, že přidání cyt. b₅ nemá na rychlost reakce vliv.

V návaznosti na předchozí pokus byly vybrány některé poměry proteinů, pro které byla následně provedena kinetická měření a stanoveny kinetické parametry (K_M , V_{MAX} , resp. k_{cat} a jejich poměr k_{cat}/K_M), které jsou zobrazeny v Tab. 12 na str. 67. Na základě těchto měření se podařilo dokázat, že molární poměry jak CPR, tak i cyt. b₅ výrazně ovlivňují kinetiku hydroxylace Sudanu I zprostředkovanou CYP1A1 a to ovlivněním obou faktorů: K_M i V_{MAX} .

7. Literatura

1. Kalgutkar, A.S., Gardner, I., Obach, R.S., Shaffer, C.L., Callegari, E., Henne, K.R., Mutlib, A.E., Dalvie, D.K., Lee, J.S., Nakai, Y., O'Donnell, J.P., Boer, J., Harriman, S.P. (2005) A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **6**, 161–225.
2. Stiborova, M., Hudecek, I., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromu P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* **93**, 229–37.
3. Netolický, J. (2017) Molární poměr cytochromu b₅ k jeho reduktasám ovlivňuje aktivitu cytochromu P450 1A1 vůči Sudanu I. *Bakalářská práce*.
4. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. listy* **94**, 913–18.
5. Chroma, L., Mackova, M., Stiborova, M., Martinek, Vaclav, Macek, Tomas Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické listy* **2001**, 212–22.
6. Stiborova, M., Hudecek, J., Paca, J., Martinek, V., Paca jr., J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy* **98**, 876–90.
7. Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E. (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **154**, 103–16.
8. Testa, B. (2004) Prodrug research: futile or fertile? *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2097–2106.
9. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947–80.
10. Hassan, F., Mohammed, G., Mahdi, S., Mahdy, S., Win, Y.-F., Mohammed, S., Yousif, E. (2016) Cytochrome P450s in Breast Cancer. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **7**.
11. Choi, S.-J., Kim, M., Kim, S.-I., Jeon, J.-K. (2003) Microplate Assay Measurement of Cytochrome P450-Carbon Monoxide Complexes. *Journal of biochemistry and molecular biology* **36**, 332–35.
12. Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I. (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* **105**, 2253–77.
13. Milichovský, J. (2017) Cílená mutagenese ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a jejich interakčních partnerů. *Rigorózní práce*.

14. Physical Properties of P450 URL:
<http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node50.html> [Viděno duben 16, 2019].
15. Testa, B., Krämer, S.D. (2007) The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chem. Biodivers.* **4**, 257–405.
16. Isin, E.M., Guengerich, F.P. (2008) Substrate Binding to Cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem* **392**, 1019–30.
17. Gan, L., von Moltke, L.L., Trepanier, L.A., Harmatz, J.S., Greenblatt, D.J., Court, M.H. (2009) Role of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome-b₅/NADH-b₅ Reductase in Variability of CYP3A Activity in Human Liver Microsomes. *Drug Metab Dispos* **37**, 90–96.
18. McKinnon, R.A. (2000) Cytochrome P450 1. Multiplicity and Function. *The Australian Journal of Hospital Pharmacy* **30**, 54–56.
19. Nelson, D.R. (2006) in *Cytochrome P450 Protocols*, Methods in Molecular Biology., Phillips, I.R., Shephard, E.A. (Humana Press, Totowa, NJ), s 1–10.
20. Nelson, D.R. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1814**, 14–18.
21. Guengerich, F.P. (1997) Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol.* **43**, 7–35.
22. Zhang, H.-F., Wang, H.-H., Gao, N., Wei, J.-Y., Tian, X., Zhao, Y., Fang, Y., Zhou, J., Wen, Q., Gao, J., Zhang, Y.-J., Qian, X.-H., Qiao, H.-L. (2016) Physiological Content and Intrinsic Activities of 10 Cytochrome P450 Isoforms in Human Normal Liver Microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **358**, 83–93.
23. Walsh, A.A., Szklarz, G.D., Scott, E.E. (2013) Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J. Biol. Chem.* **288**, 12932–43.
24. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **56**, 2979–84.
25. Go, R.-E., Hwang, K.-A., Choi, K.-C. (2015) Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **147**, 24–30.
26. Stejskalova, L., Pavek, P. (2011) The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 715–30.

27. Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J. (2004) Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *J. Biol. Chem.* **279**, 23847–50.
28. Lewis, B.C., Mackenzie, P.I., Miners, J.O. (2007) Comparative homology modeling of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and confirmation of residues involved in 7-ethoxyresorufin O-deethylation by site-directed mutagenesis and enzyme kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **468**, 58–69.
29. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E., Yamazaki, H. (2016) Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Functional Characterization of Marmoset Cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1. *Drug Metab Dispos* **44**, 8–15.
30. Lin, J.H. (2006) CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. *Pharm. Res.* **23**, 1089–1116.
31. Dürr, U.H.N., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b₅ and their reductases—Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 3235–59.
32. Clarke, T.A., Im, S.-C., Bidwai, A., Waskell, L. (2004) The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b₅ in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36809–18.
33. Altuve, A., Silchenko, S., Lee, K.-H., Kuczera, K., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D.R., Rivera, M. (2001) Probing the Differences between Rat Liver Outer Mitochondrial Membrane Cytochrome b₅ and Microsomal Cytochromes b₅. *Biochemistry* **40**, 9469–83.
34. Strittmatter, P., Velick, S.F. (1956) The isolation and properties of microsomal cytochrome. *The Journal Of Biological Chemistry* **221**, 253–64.
35. Douglas, R.H., Hultquist, D.E. (1978) Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b₅ are identical to segments of microsomal cytochrome b₅. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3118–22.
36. Vergères, G., Waskell, L. (1995) Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77**, 604–20.
37. Dürr, U.H.N., Yamamoto, K., Im, S.-C., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) Solid-State NMR Reveals Structural and Dynamical Properties of a Membrane-Anchored Electron-Carrier Protein, Cytochrome b₅. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 6670–71.

38. Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S., Masters, B.S. (1972) Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J. Biol. Chem.* **247**, 3601–7.
39. Guengerich, F.P. (2005) Reduction of cytochrome b₅ by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **440**, 204–11.
40. Nes, W.D. (2011) Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical reviews* **111**, 6423–51.
41. Daff, S. (2004) An appraisal of multiple NADPH binding-site models proposed for cytochrome P450 reductase, NO synthase, and related diflavin reductase systems. *Biochemistry* **43**, 3929–32.
42. McCammon, K.M., Panda, S.P., Xia, C., Kim, J.-J.P., Moutinho, D., Kranendonk, M., Auchus, R.J., Lafer, E.M., Ghosh, D., Martasek, P., Kar, R., Masters, B.S., Roman, L.J. (2016) Instability of the Human Cytochrome P450 Reductase A287P Variant Is the Major Contributor to Its Antley-Bixler Syndrome-like Phenotype. *J. Biol. Chem.* **291**, 20487–502.
43. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S.S., Kim, J.-J.P. (1997) Three-dimensional structure of NADPH–cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8411–16.
44. Oprian, D.D., Coon, M.J. (1982) Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. *J. Biol. Chem.* **257**, 8935–44.
45. Waskell, L., Kim, J.-J.P. (2015) in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano, P.R. (Springer International Publishing, Cham), s 37.
46. Iyanagi, T., Xia, C., Kim, J.-J.P. (2012) NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: Prototypic Member of the Diflavin Reductase Family. *Arch Biochem Biophys* **528**, 72–89.
47. Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I.L., Huang, W.-C., Grossmann, J.G., Roberts, G.C.K. (2009) Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *The Journal of biological chemistry* **284**, 36628–37.
48. Porter, T.D. (2002) The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 311–16.
49. Durairaj, P., Hur, J.-S., Yun, H. (2016) Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial Cell Factories* **15**, 125.

50. Barnaba, C., Gentry, K., Sumangala, N., Ramamoorthy, A. (2017) The catalytic function of cytochrome P450 is entwined with its membrane-bound nature. *F1000Research* **6**, 662.
51. Pubchem URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5858445> [Viděno prosinec 27, 2018].
52. Øllgaard, H., Frost, L., Galster, J., Hansen, O.C. (1998) Survey of azo-colorants in Denmark. *Consumption, use, health and environmental aspects Miljøprojekt*.
53. Řeboun, M. (2013) Rozpustnost modelových karcinogenů a její modulace v přítomnosti biomolekul. *Diplomová práce*.
54. Rauf, M.A., Hisaindee, S., Saleh, N. Spectroscopic studies of keto-enol tautomeric equilibrium of azo dyes. *RSC Adv.* **5**, 18097–110.
55. Dyes Sudan I to IV in food URL: https://mobil.bfr.bund.de/cm/349/dyes_sudan_I_IV.pdf [Viděno leden 10, 2019].
56. Møller, P., Wallin, H. (2000) Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **462**, 13–30.
57. Garner, R., Martin, C., Clayson, D. (1984) Carcinogenic aromatic amines and related compounds. *Chemical carcinogens* **1**, 175–302.
58. Kgzuka, T., Tashiro, M., Sano, S., Fujimoto, K., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Nakaminami, G. (1980) Pigmented contact dermatitis from azo dyes: I. Cross-sensitivity in humans. *Contact Dermatitis* **6**, 330–36.
59. Stiborová, M., Martínek, V., Semanská, M., Hodek, P., Dračínský, M., Cvačka, J., Schmeiser, H., Frei, E. (2009) Oxidation of the carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxy-naphthalene (Sudan I) by cytochromes P450 and peroxidases: a comparative study. *Interdisciplinary Toxicology* **2**.
60. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I Is a Potential Carcinogen for Humans: Evidence for Its Metabolic Activation and Detoxication by Human Recombinant Cytochrome P450 1A1 and Liver Microsomes. *Cancer Res* **62**, 5678–84.
61. Dracinsky, M., Cvačka, J., Semanska, M., Martinek, V., Frei, E., Stiborová, M. (2009) Mechanism of formation of (deoxy)guanosine adducts derived from peroxidase-catalyzed oxidation of the carcinogenic nonaminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I). *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1765–73.

62. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M. (1995) Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 489–98.
63. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M., Hradec, J. (1993) Detoxication products of the carcinogenic azodye Sudan I (Solvent Yellow 14) bind to nucleic acids after activation by peroxidase. *Cancer letters* **68**, 43–47.
64. Guengerich, F.P., Martin, M.V., Sohl, C.D., Cheng, Q. (2009) Measurement of cytochrome P450 and NADPH–cytochrome P450 reductase. *Nature Protocols* **4**, 1245–51.
65. Stráňava, M. (2012) Heterologní exprese NADPH:cytochrom P450 reduktasy. *Diplomová práce*.
66. Omura, T., Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *The Journal Of Biological Chemistry* **239**, 2370–78.
67. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I Is a Potential Carcinogen for Humans: Evidence for Its Metabolic Activation and Detoxication by Human Recombinant Cytochrome P450 1A1 and Liver Microsomes. *Cancer Res* **62**, 5678–84.
68. Stiborová, M., Borek-Dohalská, L., Aimová, D., Kotrbová, V., Kukacková, K., Janouchová, K., Rupertová, M., Ryslavá, H., Hudeček, J., Frei, E. (2006) Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes - similarity between human and rat systems. *General Physiology And Biophysics* **25**, 245–61.
69. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M. (2011) Cytochrome b₅ shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochemical Pharmacology* **82**, 669–80.

