

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE :

**Studium enzymových systémů kvasinky
Candida tropicalis zodpovědných za
hydroxylaci fenolu**

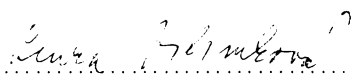
Lenka Vilímková

2006

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, 30. srpna 2006

Podpis: .....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za laskavé vedení a pomoc při teoretickém i praktickém zpracování zadaného tématu.

Za pomoc při práci v laboratoři patří velký dík Mgr. Veronice Kremláčkové, za dohled a cenné rady chci také poděkovat Ing. Janu Pácovi PhD.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali při vzniku této práce i po celou dobu studia.

Seznam použitých zkratek & symbolů:

A_{280 nm}: absorbance při 280 nm

A_{BSA}: absorbance hovězího sérového albuminu (BSA)

A_{vz}: absorbance vzorku

ADP: adenosindifosfát

AH Sepharosa: aminohexyl Sepharosa

BIS: N, N'-metylen-bis-akrylamid

BSA: hovězí sérový albumin

BSM: base synthetic medium

c_{bilkoviny}: koncentrace proteinů

CYP: cytochrom P450

cyt c: cytochrom c

DEAE Sepharosa: diethylaminoethyl Sepharosa

FAD: flavinadenindinukleotid

FMN: flavinmononukleotid

FMNH₂: redukovaný flavinmononukleotid

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)

kDa: kilodalton (násobek jednotky molekulové hmotnosti)

K_m: Michaelisova konstanta

MFO: systém oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)

M_r: relativní molekulová hmotnost

NADH: redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NADPH: redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

PAPS: 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát

PEG: polyethylenglykol

PVDF: poly-vinyliden-fluorid

RH: obecné označení substrátu

ROH: obecné označení hydroxylovaného substrátu

RPM: otáčky za minutu

ρ²⁵: hustota při 25 °C

SDS: dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulphate)

SDS-PAGE: elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

TEMED: N, N, N', N'-tetramethylendiamin

T_t: teplota tání

T_v: teplota varu

TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethan

V_{max}: maximální rychlost enzymové reakce

w/v: hmotnostní procenta

YNB: yeast nitrogen base

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD | 8 |
| 1.1. PŮSOBENÍ XENOBIOTIK NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ | 8 |
| 1.2. METABOLISMUS XENOBIOTIK..... | 9 |
| 1.2.1. Fáze biotransformace..... | 9 |
| 1.3. FENOLICKÉ LÁTKY, JEJICH VYUŽITÍ A TOXICITA..... | 11 |
| 1.3.1. Obecná charakterisace fenolu..... | 11 |
| 1.3.2. Chemické a fysikální vlastnosti fenolů..... | 11 |
| 1.3.3. Využití fenolu a jeho derivátů..... | 12 |
| 1.3.4. Toxicita fenolu a jeho působení na lidský organismus..... | 12 |
| 1.4. ORGANISMY SCHOPNÉ METABOLISOVAT FENOLICKÉ LÁTKY..... | 13 |
| 1.4.1. Kvasinka <i>Candida tropicalis</i> | 13 |
| 1.4.2. Předpoklady <i>C. tropicalis</i> pro degradaci fenolu..... | 14 |
| 1.5. ENZYMY BIOTRANSFORMUJÍCÍ FENOLY | 15 |
| 1.5.1. Cytosolární enzymy | 13 |
| 1.5.2. Mikrosomální monooxygenasový systém..... | 17 |
| 1.6. JEDNOTLIVÉ SLOŽKY MFO SYSTÉMU..... | 19 |
| 1.6.1. Systém cytochromů P450..... | 19 |
| 1.6.1.1. Struktura CYP..... | 19 |
| 1.6.1.2. Isoformy CYP..... | 19 |
| 1.6.1.3. Spektrální vlastnosti CYP..... | 20 |
| 1.6.1.4. Mechanismus působení CYP..... | 20 |
| 1.6.2. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa..... | 23 |
| 1.6.2.1. Struktura a funkce NADPH:CYP oxidoreduktasy..... | 19 |
| 1.6.2.2. Mechanismus působení NADPH:CYP oxidoreduktasy..... | 23 |
| 1.7. NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASA..... | 25 |
| 1.7.1. Struktura fenolhydroxylasy..... | 25 |
| 1.7.2. Mechanismus působení fenolhydroxylasy..... | 26 |
| 2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE | 29 |
| 3. MATERIÁL & METODY | 30 |
| 3.1. CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE..... | 30 |
| 3.1.1. Použité chemikálie..... | 30 |
| 3.1.2. Použité přístroje..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.3. Mikrobiální kmen..... | 33 |
| 3.2. MIKROBIOLOGICKÉ METODY..... | 34 |
| 3.2.1. Kultivace kvasinek <i>Candida tropicalis</i> | 34 |
| 3.3. ISOLACE SUBCELULÁRNÍCH FRAKČÍ..... | 34 |
| 3.3.1. Desintegrace a homogenisace buněk <i>C. tropicalis</i> | 34 |
| 3.3.2. Frakční centrifugace homogenátu..... | 35 |
| 3.4. ANALYTICKÉ METODY..... | 37 |
| 3.4.1. Stanovení koncentrace bílkovin metodou podle Lowryho..... | 37 |
| 3.4.2. Stanovení koncentrace CYP v mikrosomální frakci..... | 37 |
| 3.4.3. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy..... | 38 |
| 3.4.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)..... | 39 |
| 3.4.5. Elektroforesa za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS)..... | 40 |
| 3.4.6. Western blot (Westernův přenos)..... | 41 |
| 3.4.7. N-terminální sekvenace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy..... | 42 |
| 3.5. METODY POUŽITÉ PŘI PURIFIKACI ENZYMŮ..... | 43 |
| 3.5.1. Kapalinová iontoměničová chromatografie..... | 43 |
| 3.5.1.1. Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy CL6B..... | 43 |
| 3.5.2. Gelová permeační chromatografie..... | 45 |
| 3.5.2.1. Chromatografie na sloupci Sepharosy 4B..... | 45 |
| 3.5.2.2. Chromatografie na sloupci Sephacrylu S300..... | 46 |
| 3.5.3. Afinitní chromatografie..... | 46 |
| 3.5.3.1. Chromatografie na sloupci 2'5'ADP Sepharosy..... | 47 |
| 3.5.3.2. Chromatografie na sloupci 1-(4-OH-benzoyl)aminoethyl Sepharosy..... | 47 |
| 3.5.4. Frakční precipitace proteinů..... | 50 |
| 3.5.4.1. Separace proteinů srážením polyethylenglykolem 6000..... | 50 |
| 3.5.4.2. Separace proteinů srážením síranem amonným..... | 51 |
| 3.6. URČENÍ pH OPTIMA PRO NADPH-DEP. FENOLHYDROXYLASU..... | 52 |
| 4. VÝSLEDKY..... | 53 |
| 4.1. ISOLACE MIKROSOMŮ A CYTOSOLU Z KVASINKY <i>CANDIDA TROPICALIS</i> | 53 |
| 4.1.1. Vliv typů kultivace buněk <i>C. tropicalis</i> na mikrosomální a cytosolární enzymy oxidující fenol..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.1.1. Srovnání aktivit enzymů participujících na oxidaci fenolu v mikrosomálních frakcích izolovaných z kvasinky <i>C. tropicalis</i> kultivované v laboratorním a poloprovozním měřítku..... | 54 |
| 4.1.1.2. Srovnání aktivit enzymů participujících na oxidaci fenolu v cytosolárních frakcích izolovaných z kvasinky <i>C. tropicalis</i> kultivované v laboratorním a poloprovozním měřítku..... | 55 |
| 4.1.2. Vliv doby skladování buněk <i>C. tropicalis</i> získaných kultivací v poloprovozním měřítku na enzymy participující na oxidaci fenolu..... | 56 |
| 4.1.2.1. Vliv doby skladování buněk <i>C. tropicalis</i> na mikrosomální enzymy participující na oxidaci fenolu..... | 56 |
| 4.1.2.2. Vliv doby skladování buněk <i>C. tropicalis</i> na cytosolární enzymy participující na oxidaci fenolu..... | 58 |
| 4.2. OPTIMALISACE ISOLACE NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY Z CYTOSOLU KVASINKY <i>C. TROPICALIS</i>..... | 60 |
| 4.2.1. Isolace NADPH-dep. fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky <i>C. tropicalis</i> | 63 |
| 4.2.1.1. Chromatografie proteinů cytosolu <i>C. tropicalis</i> na sloupci DEAE Sepharosy..... | 63 |
| 4.2.1.2. Rechromatografie proteinů cytosolu kvasinky <i>C. tropicalis</i> na sloupci DEAE Sepharosy..... | 64 |
| 4.2.1.3. Purifikace fenolhydroxylasy srážením PEG 6000 do 20 % nasycení..... | 65 |
| 4.2.1.4. Gelová permeační chromatografie fenolhydroxylasy na sloupci Sephacrylu S300..... | 66 |
| 4.2.1.5. Shmutí efektivity isolačních kroků NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky <i>C. tropicalis</i> | 67 |
| 4.3. CHARAKTERISACE ISOLOVANÉ NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY <i>C. TROPICALIS</i>..... | 70 |
| 4.3.1. Kinetické charakteristiky NADPH-dependentní fenolhydroxylasy..... | 70 |
| 4.3.2. Určení pH optima NADPH-dependentní fenolhydroxylasy..... | 73 |
| 4.3.3. Spektrální vlastnosti NADPH-dependentní fenolhydroxylasy..... | 74 |
| 4.3.4. N-terminální sekvenace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy..... | 74 |
| 5. DISKUSE..... | 76 |
| 6. ZÁVĚR..... | 81 |
| 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 83 |

1. ÚVOD

1.1. PŮSOBENÍ XENOBIOTIK NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

V dnešní době se v našem životním prostředí hromadí řada cizorodých látek (xenobiotik), které představují pro mnoho organismů významnou zátěž. Mezi takové environmentální polutanty patří i fenolické látky, které se do prostředí dostávají zejména prostřednictvím petrochemického průmyslu, zpracování hnědého uhlí a výroby syntetických vláken a barviv [1]. Pro odstranění těchto polutantů je snahou nalézt vhodné dekontaminační metody, které by byly ekonomické a zároveň šetrné k našemu životnímu prostředí. K takovým metodám patří bioremediace, které pro dekontaminaci využívají metabolického potenciálu různých organismů, tedy i mikroorganismů. Ve své podstatě jde o napodobení a zintenzivnění procesu samočištění v přírodních vodách. Z odpadních vod jsou fenolické látky vzhledem k rychlejšímu a všestrannějšímu metabolismu mikroorganismů lépe odstraňovány v aerobním prostředí [2].

Proto je studium aerobních biodegradací fenolických látek a poznání enzymových systémů mikroorganismů, zodpovědných za jejich schopnost využívat tyto látky jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst a život, jedna z priorit současného výzkumu nejen v České republice, ale na celém světě. Toto poznání je důležité zejména z hlediska genového inženýrství, a to pro navržení rekombinantních kmenů mikroorganismů, které by byly využity v biotechnologiích a již zmiňovaných bioremediačních procesech.

1.2. METABOLISMUS XENOBIOTIK

Po vstupu xenobiotika (cizorodé látky) do buňky resp. organismu dochází obvykle k chemickým změnám této látky - tzv. biotransformacím, které většinou vedou k vyloučení této látky z organismu nebo alespoň k potlačení jejího negativního působení na organismus.

V některých případech však může dojít také ke zvýšení toxicity daného xenobiotika. Tyto metabolity pak mohou narušit biologické procesy v buňce nebo se vázat na biomakromolekuly (DNA, RNA, proteiny) [3].

Intensitu a průběh biotransformací ovlivňují jak fyzikální a chemické vlastnosti vlastního xenobiotika, tak i organismus, ve kterém je látka přeměňována. Enzymová výbava se i mezi organismy stejného druhu může značně lišit [4].

1.2.1. Fáze biotransformace

Metabolismus xenobiotik v organismu probíhá obvykle ve dvou fázích :

1) Derivatizační fáze

V této fázi probíhají zejména reakce oxidační, při kterých jsou do skeletu xenobiotika zaváděny polární funkční skupiny (např. skupiny hydroxylové a oxoskupiny). Často dochází také k odkrývání polárních funkčních skupin např. hydrolýsou esterů, amidů apod. V derivatizační fázi mohou probíhat rovněž reakce redukční, ale jsou méně časté než reakce oxidační.

Obecně lze říci, že všechny tyto děje zvyšují polaritu daného xenobiotika.

2) Konjugační fáze

Tato druhá fáze biotransformace vede k dalšímu zvýšení polarity xenobiotika, což následně usnadňuje vyloučení takto modifikované látky z buňky a poté i z celého organismu. V konjugační fázi dochází k tvorbě tzv. konjugátů, v nichž se spojuje endogenní polární látka (konjugační složka) s metabolitem xenobiotika, který vznikl v první fázi biotransformace.

Jako konjugační složky fungují např. kyselina glukuronová, PAPS (3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát), glutathion, glycin, cystein a další [5]. V případě fenolů se jedná o konjugaci se sulfátem z aktivního sulfátu (PAPS) nebo o konjugaci s kyselinou glukuronovou [2].

Reakce konjugační fáze probíhají v mikroorganismech minoritně nebo úplně chybí. Ve většině případů mikroorganismy metabolity xenobiotik využívají jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. V takovém případě je cizorodá látka po derivatizační fázi biotransformace začleněna do intermediárního metabolismu mikroorganismu [2].

1.3. FENOLICKÉ LÁTKY, JEJICH VYUŽITÍ A TOXICITA

1.3.1. Obecná charakterisace fenolů

Fenoly jsou sloučeniny s hydroxylovou skupinou přímo vázanou na aromatický kruh – ArOH [6]. Jedná se vlastně o hydroxylované deriváty benzenu. Samy mohou být dále hydrolysovány nebo konjugovány, a tak vytváří další škálu sloučenin [7]. Jsou to látky často se vyskytující v přírodě a mající též široké použití v průmyslové výrobě.

Název „fenol“ se používá jak pro pojmenování třídy sloučenin, tak jako jméno konkrétní látky [6]. Samotný fenol se nachází v kamenouhelném dehtu, odkud byl také poprvé v roce 1834 izolován. Až do 1.světové války byl kamenouhelný dehet také jediným zdrojem fenolu. Teprve poté se začal fenol vyrábět synteticky, a to např. sulfonací benzenu a následnou hydrolysou sulfonátu [8].

1.3.2. Chemické a fyzikální vlastnosti fenolů

Nízkomolekulární fenoly jsou obvykle rozpustné ve vodě a mají vysoký bod varu. Jsou to slabé kyseliny, které disociují ve vodných roztocích za vzniku iontů H_3O^+ a ArO^- [6].

Fenol $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ (hydroxybenzen) v čistém stavu je bezbarvá až bílá pevná látka, která má odporlivý nasládlý zápach. Je to hořlavá látka, která je rozpustná ve vodě. Velmi dobře se rozpouští také v etherech, ethanolu, acetonu, glycerolu a benzenu [7].

Důležité fyzikální vlastnosti fenolu [9]:

$$M_r = 94,114$$
$$T_t = 40,90^\circ\text{C}$$
$$T_v = 181,84^\circ\text{C}$$
$$\rho^{25} = 1,132 \text{ g.cm}^{-3}$$

Fenol má hygroskopické vlastnosti a také snadno podléhá oxidaci, proto je nutné ho uchovávat pod atmosférou dusíku, v chladu a ve tmě [10].

1.3.3. Využití fenolu a jeho derivátů

Fenol je surovinou pro výrobu výbušniny – kyseliny pikrové (2,4,6-trinitrofenolu). Používá se také při přípravě pryskyřic a lepidel, pentachlorofenol slouží pro konzervování dřeva. Různé sloučeniny fenolu jsou požívány jako stabilisátory potravin, jsou to např. BHT (butylovaný hydroxytoluen) a BHA (butylovaný hydroxyanisol) nebo jako antiseptika (hexachlorofen) [6].

Fenol je také meziproduktem při výrobě kaprolaktamu, ze kterého se vyrábí nylon a další syntetická vlákna [8].

1.3.4. Toxicita fenolu a jeho působení na lidský organismus

Fenol je v lidském těle metabolisován zejména v játrech, plicích a ledvinách. Vystavení lidského organismu působení fenolu může mít negativní vliv na činnost srdce, neboť dochází k blokaci sodných kanálků. Při chronickém působení fenolu na lidský organismus dochází k úbytku hmotnosti, objevují se průjmy, bolesti hlavy, závratě a tmavé zbarvení moči. Může dojít také ke vzniku methemoglobinémie a hemolytické anémie, stejně jako k poškození jater [7].

Při přímém styku pokožky s fenolem dochází k jejímu podráždění a může dojít až k nekrose [7]. Požití fenolu se projevuje obtížným dýcháním, objevuje se pění z úst a nosu postiženého. Dochází k destrukci mukosních membrán a ochabnutí centrálního nervstva, což může vést až k úmrtí [8]. Jako smrtelná dávka pro dospělého člověka se uvádí 5 až 12 g fenolu [11].

Pokud je do vzduchu, půdy nebo vody uvolněno velké množství fenolu, nebo pokud je do prostředí fenol uvolňován po dlouhou dobu v menších dávkách, může zde přetrvávat i po velmi dlouhou dobu. Malá množství fenolu však nepřetrvávají ve vzduchu déle než jeden den, z půdy jsou taková množství odstraněna do pěti dnů a ve vodách přetrvávají nejdéle devět dní [8].

1.4. MIKROORGANISMY SCHOPNÉ METABOLISOVAT FENOLICKÉ LÁTKY

Schopnost degradovat fenolické látky mají prokaryotní i eukaryotní mikroorganismy.

Z prokaryot byla tato schopnost studována např. u bakterie *Pseudomonas putida* [12], *Comamonas testosteroni* [13], *Alcaligenes faecalis*, *Mycobacterium vaccae* [14], *Rhodococcus sp.* a *Paracoccus sp.* [15].

Z eukaryotních organismů mají schopnost degradovat fenoly např. kmeny ***Candida tropicalis*** [16], *Trichosporon cutaneum* [17], *Rhodotorula rubra*, *Cryptococcus sp.*, *Fusarium flocciferum*, *Penicillium sp.* [18] Dodnes se však hledají nové kmeny, které by fenolické látky degradovaly účinněji než kmeny dosud používané, a to buď samostatně nebo ve směsných populacích.

1.4.1. Kvasinka *Candida tropicalis*

Eukaryotní organismus *Candida tropicalis* je jednou z více než 200 druhů kvasinek rodu *Candida*. Patří do skupiny tzv. nepravých kvasinek, které se rozmnožují pouze nepohlavně [19].

Jako většina kvasinek rodu *Candida* je i kmen *C. tropicalis* aerobní organismus schopný utilisovat různé cukry jako např. glukosu, sacharosu, manitol, inositol, xylosu a maltosu [19]. V průmyslu se využívá k přípravě krmného droždí z melasy i různých odpadních materiálů (např. louhů po citronovém kvašení) [20].

Kvasinka *C. tropicalis* patří mezi tzv. oportunní patogeny. Za normálních okolností je součástí běžné lidské mikroflóry (kolonizuje ústní a poševní sliznici a také trávicí trakt), u oslabených jedinců však může způsobit infekci tzv. candidosu, ohrožující zdraví a v některých případech i život postiženého jedince [21].

C. tropicalis vytváří protáhlé buňky, které tvoří dlouhá zaškrčená vlákna tzv. pseudomycelia. V určitých místech pseudomycelia vznikají svazky kratších elipsoidních buněk–blastospor [22].

1.4.2. Předpoklady *C. tropicalis* pro degradaci fenolu

C. tropicalis byla spolu s bakterií *Alcaligenes faecalis* nalezena ve vzorku půdy z Amazonského pralesa. Bylo zjištěno, že tyto mikroorganismy participují na tlení dřeva, tedy na rozkladu ligninu. Produktem tohoto tlení je kromě řady dalších aromatických látek také fenol. Toto zjištění tedy dokazuje přirozenou schopnost kmene *C. tropicalis* degradovat fenol a využívat ho jako zdroje uhlíku a energie pro svůj růst [28]. Jeví se tedy jako vhodný organismus pro studium mechanismů degradace fenolu.

V současné době je také zkoumána možnost využití *C. tropicalis* samostatně i jako součást směsné mikrobiální populace v různých bioreaktorech, které by sloužily pro dekontaminaci půd a podzemních vod zamořených naftou a oleji (např. transformátorovými) nebo odpadních vod s vysokým obsahem uhlovodíků [29].

1.5. ENZYMY BIOTRANSFORMUJÍCÍ FENOLY

Fenolické látky jsou nejčastěji metabolisovány oxidačními reakcemi, které byly popsány v kapitole 1.2. (str. 9).

Nejpočetnější skupinou enzymů participujících na oxidaci xenobiotik jako jsou aromáty, fenoly, nitroaromáty, aromatické aminy a azobarviva jsou enzymy označované jako oxygenasy, a to jak ze skupiny monooxygenas, tak i dioxygenas [30]. Obě skupiny enzymů pro svoji aktivitu vyžadují molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru, který je schopný jej aktivovat. Jako kofaktory slouží např. přechodné kovy (nejčastěji nehemové i hemové Fe) nebo flaviny [31].

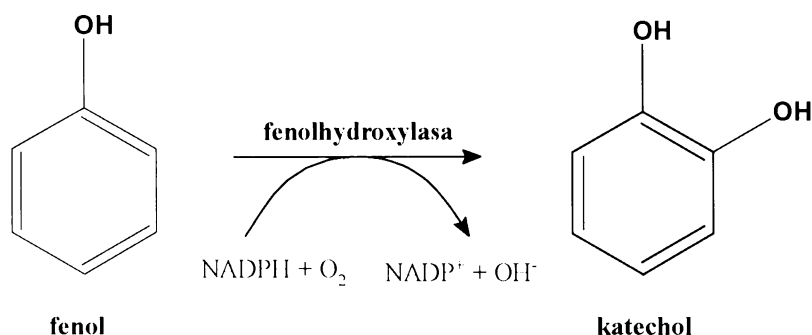
V řadě organismů se jako další enzymy při oxidaci zmiňovaných látek uplatňují také peroxidasy [32].

Tyto enzymy jsou lokalizovány v různých částech buňky (tzv. buněčných kompartmentech), a to buď v cytoplasmě nebo na membránách hladkého endoplasmatického retikula. Po izolaci z buňky těmto kompartmentům odpovídají tzv. arteficiální organely cytosol a mikrosomy.

1.5.1. Cytosolární enzymy

a) NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7)

Tento enzym patří mezi flavinové monooxygenasy a katalysuje hydroxylaci aromatického kruhu fenolu na katechol (Obr.1).



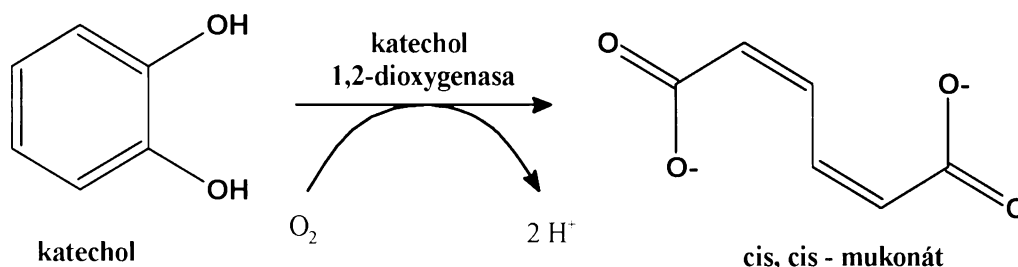
Obr.1 Hydroxylace fenolu na katechol

Podrobně je tento enzym charakterisován v kapitole 1.7. (str. 25)

b) Dioxygenasy štěpí aromatické kruhy zavedením dvou atomů kyslíku do substrátu.

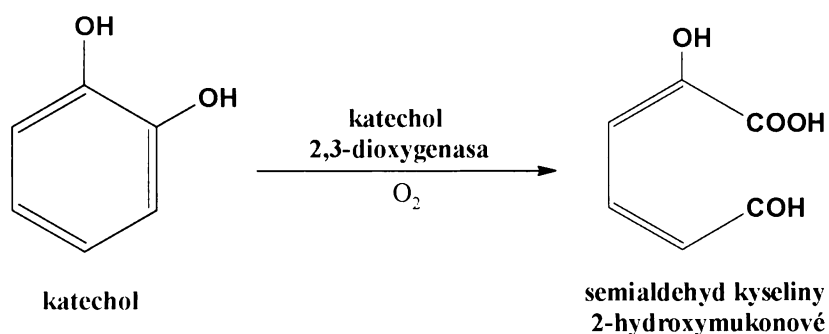
Katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1) participuje na degradaci fenolu intradiolovým štěpením katecholu za vzniku cis, cis-mukonátu [28] (**Obr.2**).

Katechol-1,2-dioxygenasa kvasinky *Candida maltosa* má molekulovou hmotnost 65 kDa a je složena ze dvou podjednotek. V případě kvasinky *Trichosporon cutaneum* má enzym trimerní strukturu a molekulovou hmotnost 105 kDa.



Obr.2 Intradiolové štěpení katecholu na cis, cis - mukonát

Katechol-2,3-dioxygenasa (EC 1.13.11.2) katalysuje extradiolové štěpení katecholu na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové [28] (**Obr.3**).

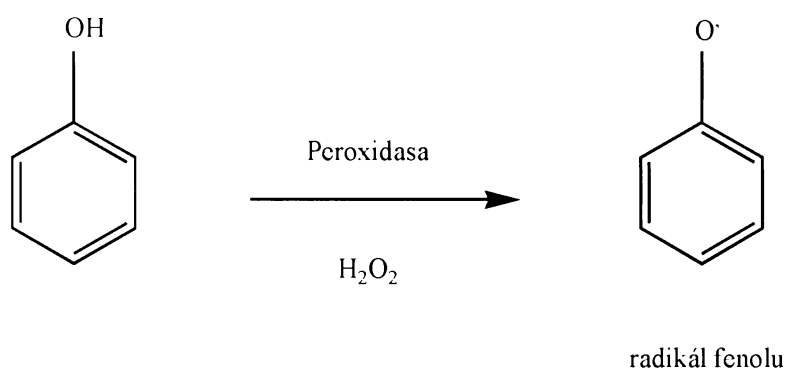


Obr.3 Extradiolové štěpení katecholu na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové

c) Peroxidasy (E.C. 1.11.1.7)

Jsou významnou skupinou enzymů, které jsou efektivní v biotransformaci fenolů. Peroxidasy redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další

sloučeniny (endogenní látky nebo xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat (redukovat) H_2O_2 , zatímco spektrum oxidovaných sloučenin je velmi široké. Svou širokou substrátovou specifitou se peroxidasy blíží mikrosomálnímu monooxygenasovému systému (MFO systému), který obsahuje cytochrom P450 (kapitola 1.5.2.). Substráty mohou být látky organické i anorganické. Mezi nejlepší substráty peroxidasy lze řadit právě fenoly. Oxidovány jsou za tvorby primárního radikálu na parentální OH-skupině [27,29,30] (**Obr.4**).



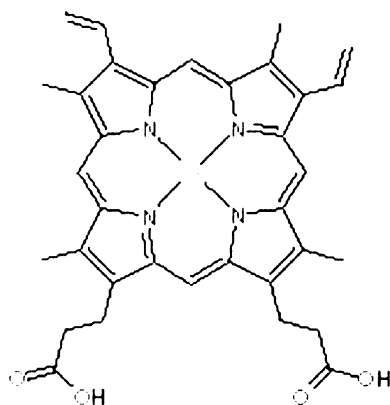
Obr.4 Vznik peroxidového radikálu při oxidaci fenolu působením peroxidasy

1.5.2. Mikrosomální monooxygenasový systém

Systém oxygenas se smíšenou funkcí (též MFO = mixed function oxidases) je u eukaryotických buněk vázán na membrány hladkého endoplasmatického retikula. Jeho hlavními složkami jsou **cytochrom P450 (= CYP)** plnící funkci terminální oxidasy a **NADPH:CYP oxidoreduktasa** sloužící jako dělič elektronového páru. Pasivní komponentou tohoto systému je **membránový fosfolipid**, který má zřejmě vliv na vazbu substrátu [31] a spinový stav železa [32]. Aktivní složkou MFO systému může být také **NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasa**, která však pro vlastní hydroxylaci není nezbytně nutná [2,33].

MFO systém hraje důležitou roli jak při metabolismu látek tělu vlastních, tak při přeměně (a detoxikaci) látek cizorodých. Studie MFO systému se datují od objevu cytochromu P450. V roce 1955 objevil Brodie [34], že enzymy provádějící řadu transformací

cizorodých látek v játrech jsou lokalizovány v membránách endoplasmatického retikula (mikrosomální frakce). Mikrosomální frakce izolovaná z jater obsahovala pigment, který při redukci měnil své spektrální vlastnosti [35]. Cytochrom P450 popsali roku 1958 nezávisle na sobě Klingenberg [36] a Garfinkel [37] jako pigment, který po redukci dithioničitanem sodným a vazbě oxidu uhelnatého vykazuje ve srovnání se známými metaloproteiny neobvyklé absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Tento protein byl až roku 1962 [38,39] identifikován jako hemoprotein obsahující hem b (**Obr.5**) a byl označen jako cytochrom P450 (pigment absorbující při 450 nm). Neobvyklé fyzikálně-chemické vlastnosti cytochromu P450 podnítily další výzkum, který vedl k určení jeho fyziologické funkce [40]. Tak byl tento enzym identifikován jako terminální oxidasa aktivující kyslík v různých reakcích katalysovaných MFO systémem [41]. Roku 1968 se Lu a Coonovi [42] podařilo poprvé získat purifikovaný CYP z mikrosomální frakce homogenátu králíčích jater. O dva roky později byl z cytosolu bakterie *Pseudomonas putida* získán rozpustný cytochrom P450_{CAM} v krystalickém stavu [43].



Obr.5 Hem b (převzato z <http://metallo.scripps.edu/promise>)

1.6. JEDNOTLIVÉ SLOŽKY MFO SYSTÉMU

1.6.1. Systém cytochromů P450 (EC 1.14.15.1)

Cytochromy P450 (CYP) tvoří velkou superrodinu proteinů, které mají schopnost metabolisovat širokou škálu substrátů od steroidů, mastných kyselin až po xenobiotika. Byly nalezeny v mikroorganismech, rostlinách i u savců včetně člověka [44].

Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membránách hladkého endoplasmatického retikula nebo mitochondrií, zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné [2,33].

Kromě funkce katabolické, která slouží k získání zdroje uhlíku a k detoxikaci cizorodých látek, mají cytochromy P450 také schopnost syntetisovat biologicky aktivní látky jako jsou steroidy, prostaglandiny a metabolity kyseliny arachidonové [45].

1.6.1.1. Struktura CYP

Cytochrom P450 je hemový enzym, který je tvořen jediným peptidovým řetězcem o délce přibližně 450 až 530 aminokyselinových zbytků. Molekulová hmotnost se pohybuje mezi 45 a 60 kDa [46].

Aktivní centrum obsahuje protoporfyrin IX, který je zanořen do hydrofobní „kapsy“ na povrchu apoproteinu a je zde vázán kombinací hydrofobních a coulombických interakcí [47]. Ion železa hemu může být penta- nebo hexakoordinovaný. Čtyři koordinační vazby jsou obsazeny porfyrinovou kóstrou a mají planární uspořádání. Proximálním axiálním ligandem je thiolátová síra cysteinového zbytku [48,49], která způsobuje anomální spektrální vlastnosti typické pro cytochromy P450. Distálním šestým ligandem mohou být jak zbytky aminokyselin, tak i různé exogenní látky jako např. CO [4].

1.6.1.2. Isoformy CYP

CYP se vyskytuje v různých isoformách, které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie primární struktury (pořadí aminokyselin). Rodiny jsou

označovány prvním číslem za zkratkou CYP, následuje velké písmeno označující podrodinu. Jednotlivé isoformy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny [50].

Isoenzymy z jedné rodiny jsou homologní z více než 40 %, v jedné podrodině pak vykazují homologii větší než 60 % [51].

Jednotlivé isoformy CYP se liší svou substrátovou specifitou, katalytickou aktivitou, aminokyselinovou sekvencí, imunochemickými a spektrálními vlastnostmi [52].

Cytochromy P450 lze rozdělit do tří podskupin [53,54]:

- striktně konstitutivní isoformy mající vysokou afinitu k eobiotikům
- konstitutivní isoformy schopné metabolisovat eo- i xenobiotické látky
- inducibilní isoformy tvořené po působení induktoru

U kvasinky *C. tropicalis* byl detekován inducibilní cytochrom P450, který hydroxyluje fenol na katechol [55].

1.6.1.3. Spektrální vlastnosti CYP

Cytochromy P450 mají svá typická absorpční spektra. Absorpční maximum nativního CYP v hexakoordinované formě (nizkospinová forma, atom Fe je v rovině s porfyrinem) je kolem 418 nm, v pentakoordinované formě (vysokospinová forma, atom Fe je výrazně nad rovinou porfyriu) je asi při 390 nm.

Ke zjištění přítomnosti CYP se využívá tvorby komplexu oxidu uhelnatého s redukováným CYP, kdy tento komplex absorbuje při 450 nm v tzv. Soretově pásu [38]. CO se váže jako šestý ligand, čímž CYP inhibuje. Pokud je enzym denaturován či jinak poškozen, přechází na cytochrom P420 (absorpční maximum při 420 nm) [56].

1.6.1.4. Mechanismus působení CYP

Enzymová aktivita CYP je dána spolupůsobením s NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou, která je rovněž lokalizovaná v membránách endoplasmatického retikula a dodává postupně elektrony pro tzv. první a druhou redukci CYP [26].

Obecný průběh monoogenasové reakce katalysované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí : $RH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$

(RH je substrát a ROH je hydroxylovaný produkt reakce)

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a sestává alespoň z osmi kroků (**Schéma 1**, str. 22):

I. Klidový stav CYP

V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (tj. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinováno (nízkospinový stav). Šestá valence obsazena kyslíkem vody nebo interním ligandem (hydroxylové skupiny aminokyselinových zbytků).

II. Vazba substrátu

Po vniknutí substrátu (RH) do aktivního místa CYP dochází k vytlačení šestého ligandu, železo zůstane pentakoordinované (vysokospinový stav) a zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu. To se projeví i změnou spektrálních vlastností CYP (posun absorpčního pásu hemu).

III. První redukce CYP

Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:CYP oxidoreduktasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (tj. s oxidačním číslem II), přičemž stále zůstává pentakoordinováno (vysokospinový stav). Tato forma je pak schopna vázat molekulární kyslík či jiné ligandy.

IV. Vazba molekuly kyslíku

Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří ternární ferrisuperoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované a v nízkospinové formě.

V. Vazba oxidu uhelnatého

Ligandem, který se místo molekuly kyslíku váže na pentakoordinovanou ferro formu CYP může být také CO. Komplex redukovaného CYP s oxidem uhelnatým pak vykazuje charakteristické absorpční spektrum v Soretově pásu při 450 nm.

VI. Druhá redukce CYP

Nepříliš stabilní ferrisuperoxidový komplex je dále redukován NADPH:CYP oxidoreduktasou nebo NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion.

Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku.

VII. Štěpení vazby O-O v molekule kyslíku

Komplex CYP s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou CYP, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je

redukován na vodu. Druhý atom kyslíku zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex. Ten je stabilisován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu (ROH), jenž je z enzymu uvolněn.

VII. Reakce ferro formy CYP s organickými peroxidy

V přítomnosti oxidačních činidel jako jsou organické peroxidy může z komplexu III vznikat přímo stav VII. Cytochrom P450 aktivovaný tímto způsobem je rovněž schopen katalysovat hydroxylaci substrátů. Tato reakce bývá označována jako **peroxidasová aktivita CYP**. Reakce s organickými hydroperoxidy probíhá, na rozdíl od reakce probíhající v přítomnosti NADPH a O_2 , neuspořádaným mechanismem. Vazba peroxidu tedy není závislá na vazbě substrátu. [26]

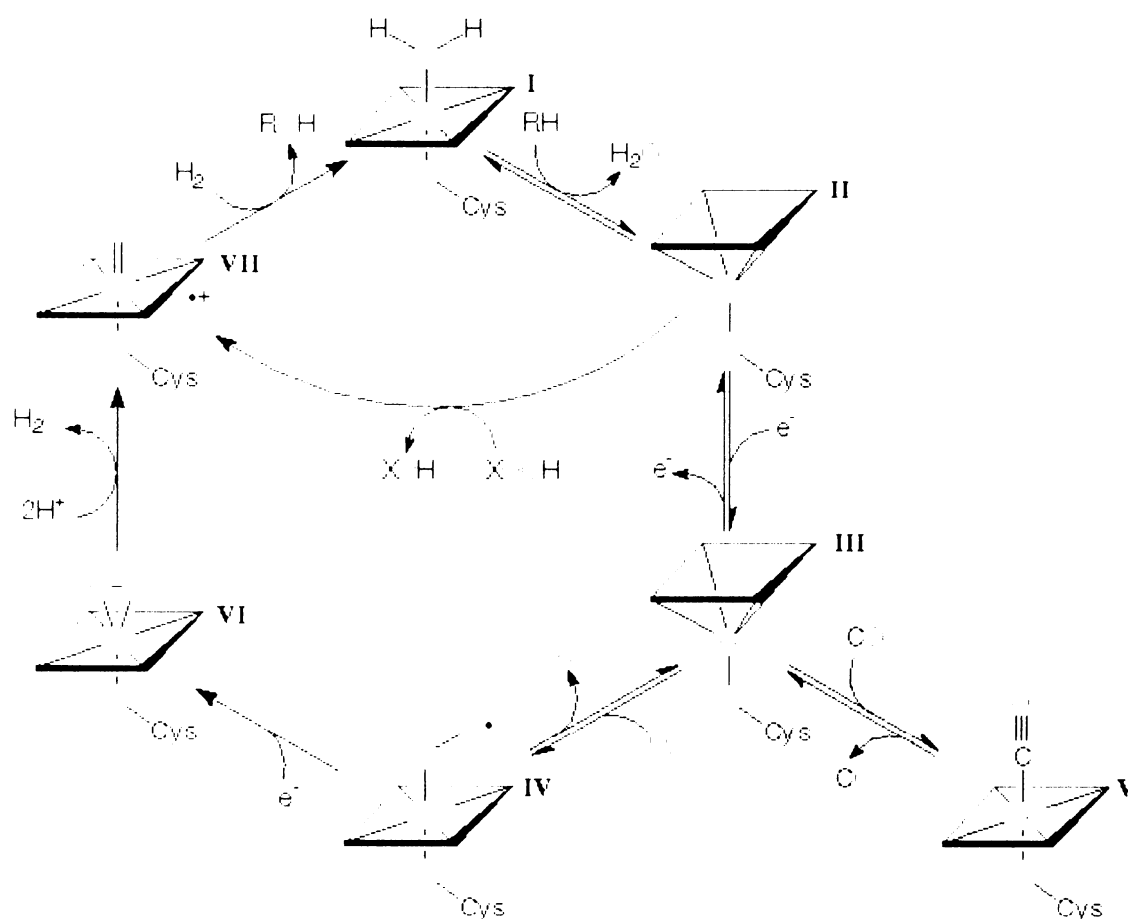


Schéma 1 Mechanismus působení CYP (převzato z <http://metallo.scripps.edu/promise>)

Substrátová specifita cytochromů P450 participujících na biotransformaci xenobiotik je široká. Hydroxylují celou škálu organických sloučenin jako např. polycyklické aromatické uhlovodíky, alifatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloučeniny, aromatické i alifatické aminy, fenoly a také celou řadu léčiv a parafarmaceutik [2,33].

1.6.2. NADPH : cytochrom P450 oxidoreduktasa (EC 1.6.2.4)

1.6.2.1. Struktura a funkce NADPH:CYP oxidoreduktasy

NADPH:CYP oxidoreduktasa je lokalizovaná v membránách endoplasmatického retikula a obsahuje oba známé zástupce flavinových kofaktorů, FMN i FAD.

Jedná se o žlutý flavoprotein, který katalysuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 [57]. NADPH:CYP oxidoreduktasa má dvě funkční domény. Hydrofobní N-terminální doménou je zakotvena v membráně endoplasmatického retikula, C-terminální doména je hydrofilní povahy [58].

C-terminální funkční doména se skládá z FMN- a FAD-vazebné strukturní domény, struktura umístěná mezi FMN- a FAD-vazebnou doménou zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén [58]. FAD-vazebná doména je zodpovědná za nekovalentní vazbu NADPH, zatímco FMN-vazebná doména zodpovídá za přenos elektronů na akceptorovou molekulu (CYP) [58].

Interakce mezi NADPH:CYP oxidoreduktasou a cytochromem P450 jsou především elektrostatické povahy, kdy kladně nabitý povrch CYP interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:CYP oxidoreduktasy. Uplatňují se však také hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami v oblasti membránových domén NADPH:CYP oxidoreduktasy a cytochromu P450 [58].

Schopnost NADPH:CYP oxidoreduktasy dělit elektronový pár byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových kofaktorů [59,60].

1.6.2.2. Mechanismus působení NADPH:CYP oxidoreduktasy

Akceptorem elektronů od NADPH je FAD, který následně předává elektrony FMN. Za jednoelektronovou redukci cytochromu P450, jakožto akceptorové molekuly, je (v případě

savčí NADPH:CYP oxidoreduktasy) zodpovědný redukováný hydrochinon FMNH₂ [31] (Schéma 2).

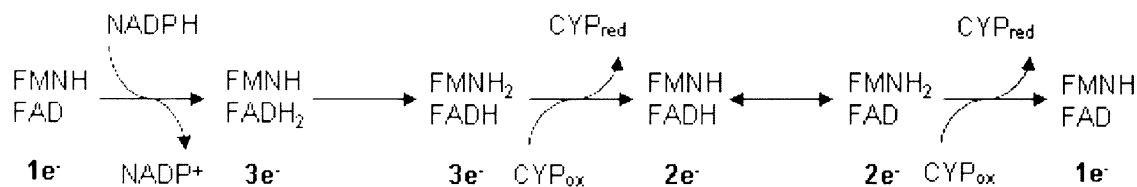


Schéma 2 Přenos elektronů NADPH:CYP oxidoreduktasou

Vedle endogenních substrátů jako jsou cytochrom P450 nebo cytochrom c metabolisuje NADPH:CYP oxidoreduktasa redukčními reakcemi také řadu nízkomolekulárních xenobiotik jako jsou 1,8-dinitropyren [61], 3-nitrobenzanthron [62] nebo aristolochové kyseliny [63].

1.7. NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASA (EC 1.14.13.7)

První zmínky o NADPH-dependentní fenolhydroxylase pocházejí z roku 1962, kdy byla studována fenolhydroxylasa mikroorganismu *Brevibacterium fuscum* [64]. Nižší uvedené informace o tomto enzymu však pocházejí ze studií fenolhydroxylasy izolované ze striktně aerobní kvasinky rodu *Trichosporon cutaneum*.

1.7.1. Struktura NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa kvasinky *Trichosporon cutaneum* je jasně žlutý enzym, což je typické pro flavoproteiny. Absorpční maximum se tedy pohybuje okolo 470 nm [65]. Tento enzym má dimerickou strukturu, molekulová hmotnost podjednotky je 76 kDa [66].

Prostetickou skupinou tohoto enzymu je FAD, který může být lokalizován ve dvou pozicích podle toho, v jaké fázi hydroxylace substrátu se enzym právě nalézá:

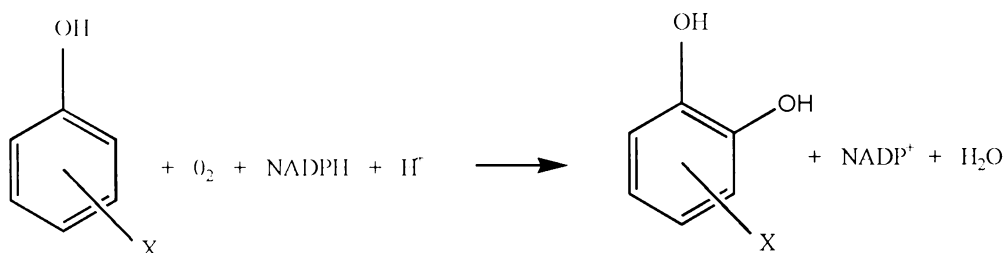
- I. FAD v poloze „out“: může se na něj navázat NADPH.
- II. FAD v poloze „in“: FAD je zanořený dovnitř proteinu, což umožňuje ochranu dalšího navázaného substrátu (fenolu) před účinky rozpouštědla. Zároveň jsou chráněny i vznikající intermediáty reakce [67].

V dimerní formě enzymu je FAD jedné podjednotky ve formě „in“ a ve druhé ve formě „out“ [68].

U kvasinky *Candida tropicalis* je prostetickou skupinou fenolhydroxylasy rovněž FAD. Enzym je pravděpodobně tetramer složený ze 4 podjednotek a molekulové hmotnosti pohybující se okolo 60 kDa [24].

1.7.2. Mechanismus působení fenolhydroxylasy

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa má poměrně širokou substrátovou specifitu. Je schopná hydroxylovat nejen fenoly, ale i jeho monohalogen-, monoamino- a monomethyl-deriváty [66,67,68], podle rovnice uvedené na **Obr. 6**.



Obr.6 Hydroxylace fenolu a jeho derivátů

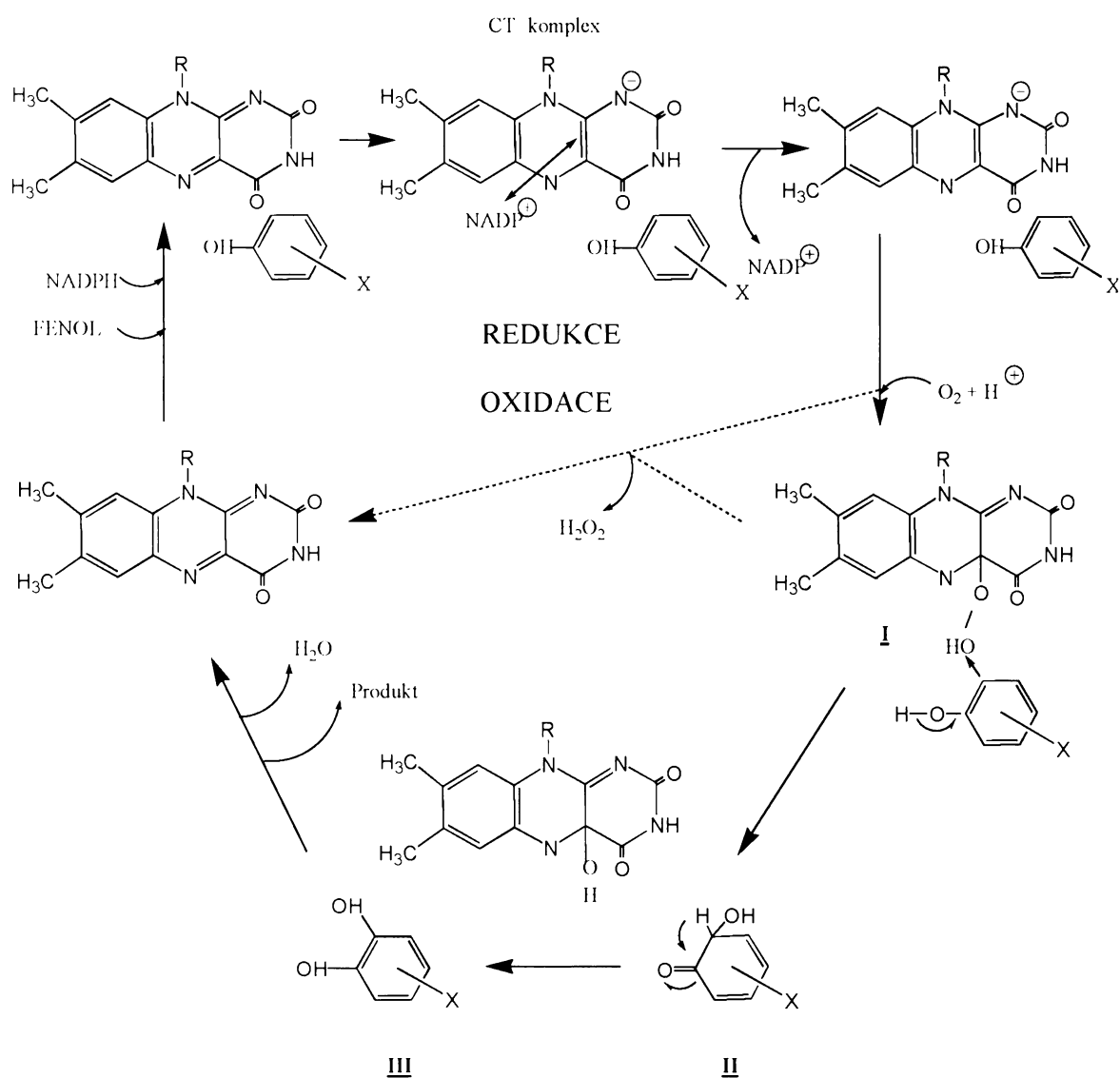
Schéma 3 (str. 27) ilustruje mechanismus hydroxylace fenolu, která probíhá ve dvou fázích:

I. Redukční fáze (FAD v poloze „out“)

- FAD v prvním kroku podléhá redukci NADPH

II. Oxidační fáze (FAD v poloze „in“)

- redukováný flavin reaguje s kyslíkem za vzniku komplexu I (C4a-hydroperoxyflavin), který je schopen hydroxylovat fenol nebo jeho deriváty
- produkt hydroxylace fenolu dále podléhá změnám vedoucím ke vzniku komplexu III (C4a-hydroxyflavin)
- produktem hydroxylace substrátu je příslušný hydroxyderivát a voda



X : substituenty (-Cl, -OH, -NH₂, -CH₃)

Schéma 3 Mechanismus působení fenolhydroxylasy kvasinky *Trichosporon cutaneum* [67]

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšířit poznatky o enzymech, které se podílejí na biodegradaci fenolu kvasinkou *Candida tropicalis*. Konkrétně se jednalo o následující dílčí cíle.

A) Poznat ovlivnění těchto enzymů

- 1) z hlediska vlivu různých typů kultivace buněk
- 2) z hlediska vlivu doby skladování zmražených buněk *C. tropicalis*.

B) Nalézt optimální postup pro izolaci jednoho z enzymů, které se ve studovaném mikroorganismu, kvasince *C. tropicalis*, majoritně podílejí na prvním kroku biodegradace fenolu, jmenovitě, cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylasy.

C) Charakterisovat purifikovanou NADPH-dependentní fenolhydroxylasu

- 1) stanovením kinetických konstant pro oxidaci fenolu
- 2) určením pH optima enzymu pro oxidaci fenolu
- 3) určením spektrálních vlastností enzymu
- 4) určením N-terminální aminokyselinové sekvence enzymu

3. MATERIÁL & METODY

3.1. CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

3.1.1. Použité chemikálie

Lachema (Brno)

bromfenolová modř
dihydrogenfosforečnan draselný
dihydrogenfosforečnan sodný
ethanol
glukosa
glycerol
hydrogenfosforečnan draselný
hydrogenfosforečnan sodný
hydroxid draselný
hydroxid sodný
chlorid sodný
kyselina octová
kyselina trihydrogenfosforečná
methanol
persíran amonný
uhličitan sodný
vínan sodnodraselný

Serva (SRN)

Comassie Brilliant Blue

Lékárna Faustův dům (Praha)

Folinovo činidlo

Seavapharma (Praha)

hovězí sérový albumin (BSA)

Fluka, Buchs (Švýcarsko)

akrylamid

dodecylsírán sodný (SDS)

fenol

katechol

methanol

TEMED

Linde (SRN)

oxid uhelnatý

plynný a kapalný dusík

VEB Laborchemie (NDR)

kyselina chloristá

Sigma (USA)

cytochrom c

deoxycholát sodný

dialyzační trubice

hovězí sérový albumin (BSA)

NADPH

„Wide Range“ – standardy proteinů pro SDS-PAGE

Sepharose 4B

AH Sepharose 4B

Pharmacia Biotech. (Švédsko)

DEAE Sepharose CL6B

Sephacryl S300 4B

Merck (SRN)

polyethylenglykol 6000

Amersham Biosciences (Švédsko)

2'5' ADP Sepharose 4B

3.1.2. Použité přístroje

Centrifugy: Janetzki K-24 (NDR), úhlový rotor 6x35 ml
Sanyo MicroCentaur MSE (Schoeller Instruments, U.K.), úhlový rotor
12x2 ml
Ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter, USA), úhlový rotor
Ti 45, 6x70 ml

Spektrofotometry: Diod-array Hewlett Packard E8453 (Hewlett-Packard, SRN)
Helios α (ThermoSpectronic, U. K.)
SPECORD M40 (Carl Zeiss, JENA, NDR)
SPEKTROMOM 195 D (MOM Budapest, Hungary)

Váhy: předvážky EW600-2M (KERN, SRN)
analytické váhy PESA 40SM-200A (PESA, Švýcarsko)

Sestava HPLC: pumpa P580 HPG (Dionex-Softtron, SRN)
autosampler ASI-100 (Dionex-Softtron, SRN)
UV-VIS detektor LCD 2563 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)
kolona Nucleosil 100-5 C18 4x250 mm (Merck, SRN)
software: Chromeleon verze 6.01

Sestava pro elektroforesu: zdroj napětí Electrophoresis Power Supply-EPS 301
(Amersham Biosciences, USA)

Sestava pro Western blot: zdroj napětí Electrophoresis Power Supply-EPS 301
(Amersham Biosciences, USA)
přístroj Fastblot B32 (Whatman Biometra, SRN)

PVDF membrány 0,45 µm (Millipore, USA)

Automatický sekvenátor: PROCISE (Applied Biosystems, USA)

Další: automatické mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japan)
homogenisátor dle Pottera a Elvehjema
chromatografické kolony C 2,6x40
C 1,6x30
C 1x20 (Pharmacia Biotech, Švédsko)
inkubátor Thermomixer compact (Eppendorf)
mikrostríkačka Hamilton (Hamilton Company, USA)
peristaltická pumpa PP05 (Laborotní přístroje Praha, ČR)
pH-metr model 370 (ATI Orion, USA)
sběrač frakcí BioLogic BioFrac (BIO-RAD, USA)
sonikátor (Ultrasonic compact cleaner, Teson1, Tesla, ČR)
vortex MS 1 Minishaker (Scholler Pharma Praha, ČR)
vortex MS 2 (IKA, USA)
hlubokomrazicí box -80°C (Sanyo Ultra Low, Japan)

3.1.3. Mikrobiální kmen

Pro experimenty byl použit kmen kvasinek *Candida tropicalis* Ct2, který byl získán na Mostecku z půd znečištěných fenolem.

3.2. MIKROBIOLOGICKÉ METODY

3.2.1. Kultivace kvasinek *Candida tropicalis*

Pro kultivaci kmene *C. tropicalis* bylo použito limitované YNB (yeast nitrogen base) médium, které obsahovalo fenol (250 mg.l⁻¹) jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Kvasinky *C. tropicalis* byly kultivovány v laboratorních fermentorech LF2 a B. Braun Biotech o objemech 2 litry. Jako inokulum byla použita kultura získaná z půd znečištěných fenolem (kapitola 3.1.3., str. 33) (Ing. Alena Kostečková, VŠCHT Praha).

Po úspěšných kultivacích v laboratorních fermentorech byly kultivace z důvodu získání dostatečného množství biomasy pro následné izolace subcelulárních frakcí a purifikace enzymů postupně převáděny do větších objemů tzv. „scale-up“ proces. Kultivace byla v konečném kroku prováděna ve fermentoru o objemu 1000 litrů (Ing. Miroslav Sobotka, CSc., MBÚ AV ČR). Získané buňky byly promyty a uskladněny v mrazicím boxu při -20°C a -80°C.

3.3. ISOLACE SUBCELULÁRNÍCH FRAKCIÍ

Desintegrace, homogenisace i všechny následné operace byly prováděny v chladové místnosti při 5°C.

Celkový průběh izolace jednotlivých kompartmentů znázorňuje **Schéma 4** (str.36).

3.3.1. Desintegrace a homogenisace buněk *C. tropicalis*

Jednotlivé izolace byly prováděny z cca 200 g zmražených buněk. Buňky byly po částech desintegrovány v třecí míse pomocí kapalného dusíku.

Následně byly rozbité buňky homogenisovány se 150 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6) (kapitola 3.3.2., str. 35). Pro tento krok byl použit nejprve „volnější“, po částečné homogenisaci pak také „těsnější“ homogenisátor dle Pottera a Elvehjema.

3.3.2. Frakční centrifugace homogenátu

Kvasinkový homogenát byl nejprve odstředěn 20 min při 15 000g (K-24, úhlový rotor 6x35 ml, 13 500 RPM). Supernatant byl dále centrifugován po dobu 65 min při 105 000g (ultracentrifuga OptimaTM LE-80K, úhlový rotor 6x70 ml, 35 000 RPM).

Usazené mikrosomy (peletka) byly resuspendovány ve 4 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6). Suspenze mikrosomů byla po 1 ml „aliquotech“ zmražena (-80°C) a uskladněna pro další stanovení.

Cytosol (150 ml) byl zmražen (-80°C) a později použit pro izolaci fenolhydroxylasy.

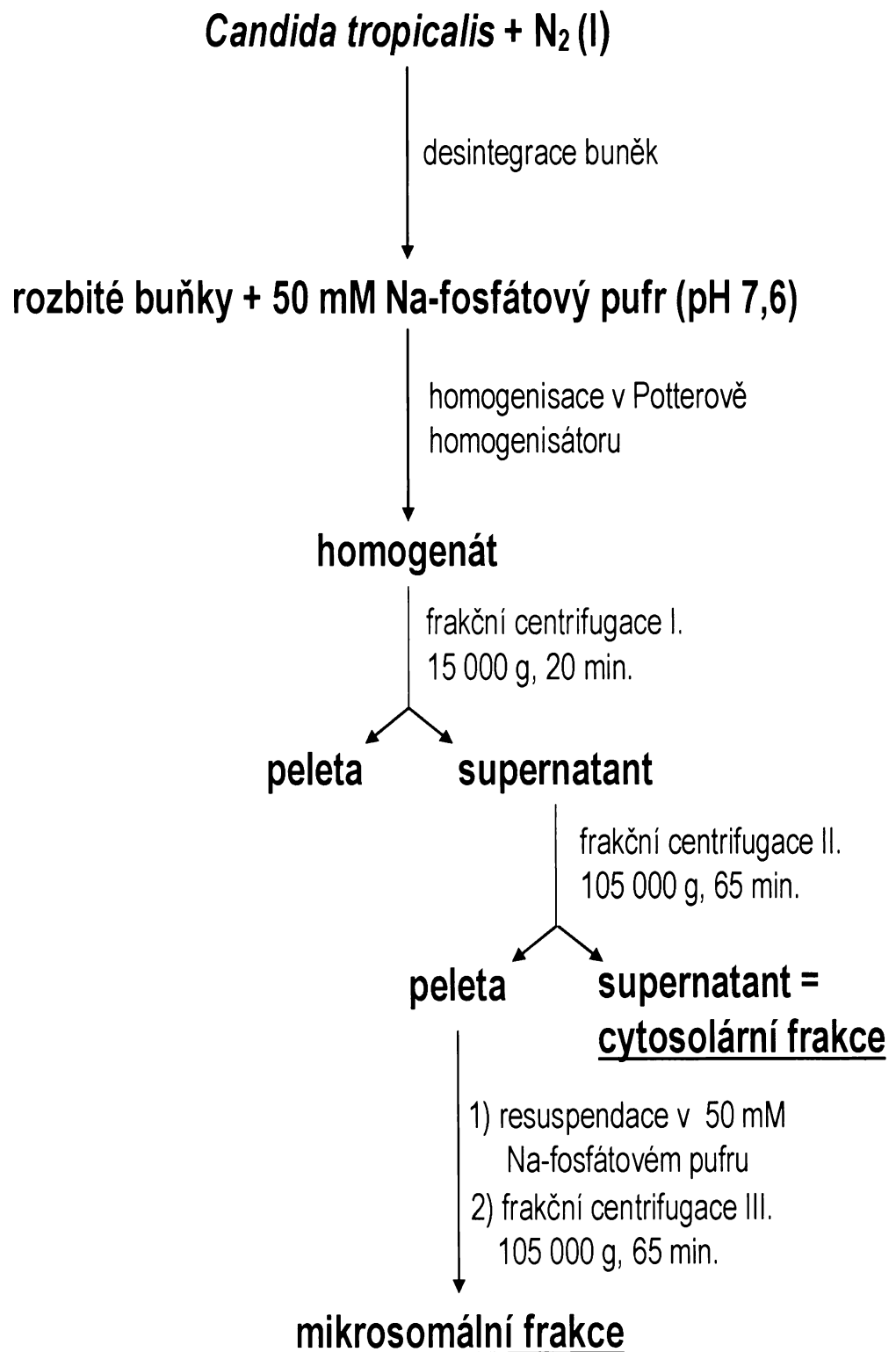


Schéma 4 Postup izolace subcelulárních frakcí z buněk *C. tropicalis*

3.4. ANALYTICKÉ METODY

3.4.1. Stanovení koncentrace bílkovin metodou podle Lowryho [69]

Princip: Bílkoviny přítomné ve vzorku se rozpustí v alkalickém roztoku deoxycholátu sodného a následně reagují po přidání Folinova činidla (roztok fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny) za vzniku modré rozpustné sloučeniny.

Postup: Do zkumavek bylo pipetováno n μ l ($n = 20, 50, 100$ μ l) vzorku a doplněno do 0,5 ml destilovanou vodou. Poté bylo přidáno 0,15 ml 2 % deoxycholátu sodného a 0,15 ml 1 % NaOH, roztok byl promíchán a nechán 10 minut stát. Dále byly přidány 3 ml čerstvě připraveného alkalického činidla o složení: 0,5 ml 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 ml 2 % vlnanu sodného + 49 ml 2 % Na_2CO_3 . Vše bylo promícháno a ponecháno 10 minut stát. Pak byly přidány 0,3 ml Folinova činidla, roztok byl opět promíchán a ponechán stát 30 minut. Následně byla měřena absorbance při 550 nm na spektrofotometru SPEKTROMOM.

Jako standardu bylo použito 0,5 ml roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 25 mg/100 ml, ve slepém vzorku bylo 0,5 ml destilované vody.

Výpočet:

$$C_{\text{proteinů}} = \frac{A_{\text{vz}} \cdot 0,125}{A_{\text{BSA}} \cdot n} \text{ (mg/ml)}$$

3.4.2. Stanovení koncentrace CYP v mikrosomální frakci [70]

Princip: Redukovaný CYP v komplexu s oxidem uhelnatým absorbuje při 450 nm, zatímco samotný redukovaný CYP záření o této vlnové délce neabsorbuje. Měřením diferenčních spekter lze tedy stanovit koncentraci cytochromu P450.

Postup: Do zkumavky bylo pipetováno 50 μ l vzorku (mikrosomů) a 1950 μ l pufru pro stanovení CYP (0,1M KH_2PO_4 , 2 % glycerol, pH 7,5), poté byl přidán pevný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1

mg). Po promíchání byl roztok rozdělen do dvou stíněných semimikrokyvet o optické dráze 1 cm. Roztok ve vzorkové kyvetě byl po dobu 1 minuty sycen oxidem uhelnatým. Následně bylo proměřeno diferenční spektrum v rozsahu 400-500 nm (dvoupaprskový spektrofotometr Helios α). Molární extinkční koeficient CYP v komplexu s CO činí 0,091 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$.

Výpočet:

$$c_{\text{CYP}} = \frac{(A_{450} - A_{490})}{0,091 \cdot l} \times \text{ředění} \quad (\mu\text{M})$$

3.4.3. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy [4]

Princip: NADPH:CYP oxidoreduktasa dodává elektrony cytochromu P450. Substrátem tohoto enzymu je rovněž cytochrom c. Pomocí redukce cytochromu c (o známém molárním extinkčním koeficientu $\epsilon = 21 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$) tedy můžeme stanovit aktivitu NADPH:CYP oxidoreduktasy.

Postup: Pro měření byla použita stíněná semimikrokyveta o optické dráze 1 cm. V celkovém objemu 1 ml 0,3 M KH_2PO_4 bylo obsaženo 1 mM EDTANa_2 , 0,5 mg/ml cyt c, 10 mM NADPH a takové množství vzorku, aby změna absorbance byla lineární po dobu 1 minuty. Nárůst absorbance byl měřen při 550 nm po dobu 1 minuty (spektrofotometr Diod-array Hewlett Packard E8453). Jako blank byla použita reakční směs bez NADPH.

Výpočet: aktivita =

$$\frac{\Delta A_{550} \cdot 5 \cdot 10^{-4}}{21 \cdot l \cdot l \cdot c_{\text{proteinů}}} \quad (\text{mmol cyt c/min/mg proteinu})$$

3.4.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pomocí HPLC byla sledována tzv. fenolhydroxylasová aktivita enzymů zodpovědných za hydroxylaci fenolu na katechol. Tato aktivita byla úměrná úbytku substrátu (fenolu) a přírůstku produktu (katecholu).

Měření probíhalo na koloně Nucleosil 100-5 C18 4x250 mm (Merck, SRN). K detekci při 275 nm sloužil UV-VIS detektor (LCD 2563, Laboratorní přístroje, Praha). Jako mobilní fáze byl použit 40 % roztok methanolu v destilované vodě. Kolona byla temperována na 35°C, vzorky aplikovány do smyčky o objemu 20 µl a rychlost průtoku mobilní fáze činila 0,5 ml.min⁻¹ (pumpa P580, Dionex).

Aktivity enzymů byly měřeny v mikrosomální frakci, v cytosolu a ve frakcích proteinů získaných z cytosolu. Objem vzorku vždy činil 80 µl. V celkovém objemu 100 µl byla koncentrace NADPH a fenolu 1 mM nebo byl použit 1mM katechol bez NADPH (katechol-1,2-dioxygenasa není NADPH-dependentní enzym). Inkubace probíhala v otevřených mikrozkuvkách na třepáčkách, při teplotě 37°C. Reakce byla ukončena přidáním 20 µl 0,6 M HClO₄ v časech 0, 10 a 35 minut. Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací při 13 000 RPM (Sanyo MicroCentaur MSE, úhlový rotor).

Vzorky pro měření závislosti oxidace fenolu (tvorby katecholu) na čase byly připraveny a inkubovány stejným způsobem jako v předchozím případě. Reakce byly ukončeny v časech 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180 minut.

Vzorky pro měření kinetických konstant byly připraveny tak, že ke vzrůstajícím koncentracím fenolu (0,1 mM – 5 mM) bylo přidáno 80 µl vzorku (NADPH-dependentní fenolhydroxylasa). Reakce byla startována přidáním 10 µl 10 mM NADPH a ukončena po 15 minutách. Pokud byla v cytosolu sledována tvorba katecholu, reakce probíhala 50 minut.

Pro kalibraci HPLC byly použity vzorky obsahující 80 µl inaktivovaných (20 µl 0,6 M HClO₄) mikrosomů resp. cytosolu a 1 mM NADPH. Vzorky obsahovaly různé koncentrace fenolu resp. katecholu: 0,2 mM, 0,5 mM, 0,8 mM. Další postup byl analogický postupu popsaném výše.

3.4.5. Elektroforesa za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS)

Princip: Pro separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti byla použita diskontinuální SDS elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (SDS–PAGE) v redukujícím prostředí. Dodecylsulfát sodný (SDS) uděluje všem molekulám uniformní záporný náboj, čímž jejich vlastní náboj překrývá a molekuly proteinů se poté elektroforeticky dělí na základě své molekulové hmotnosti [71].

Použité pufrы a roztoky :

pufr A: 0,375 M TRIS/HCl, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,8

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

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

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

elektrodový pufr: 25 mM TRIS, 0,25 M glycin, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,3

vzorkový pufr: 0,063 M TRIS /HCl, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol (v/v),

5 % 2-merkptoethanol (v/v), 0,003 % bromfenolová modř (w/v), pH 6,8

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

odbarvovací lázeň: 25 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Postup : Jednotlivé části aparatury určené k přípravě gelů byly pečlivě omyty, odmaštěny ethanolem a osušeny. Nejprve byl mezi skla nalit 10 % separační gel (8 ml pufr A, 4 ml polymerační roztok A, 10 μ l TEMED a 3 mg persíran amonný). Tento gel byl po dobu polymerace (cca 30 minut) převrstven destilovanou vodou. Po polymeraci gelu byla voda slita a gel osušen filtračním papírem. Separační gel byl poté převrstven 3 % velkoporovým rozdělovacím gelem (6,75 ml pufr B, 0,75 ml polymerační pufr B, 7,5 μ l TEMED, 3 mg persíran amonný). Bezprostředně po nalití gelu byl do něj vložen hřeben pro vytvoření aplikačních jamek. Jakmile byla polymerace rozdělovacího gelu dokončená, hřeben byl vyjmut a skla s gelem byla umístěna do aparatury. Poté byl do horní i dolní části aparatury nalit elektrodový pufr .

Vzorky byly smíchány v poměru 1:1 s 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem a vařeny po dobu 5 minut ve vodní lázni. Vychladnuté vzorky a standard „Wide Range“ (připravený analogicky jako vzorky) byly aplikovány do jednotlivých jamek mikrostříkačkou Hamilton.

Elektroforesa probíhala při konstantním napětí 130 V přibližně po dobu dvou hodin. Gel byl následně oddělen od skel a byl přesunut do barvicí lázně. Po 45 minutách barvení následovalo odbarvování gelu přes noc v odbarvovací lázni. Následující den byl gel byl vysušen v celofánové fólii.

3.4.6. Western blot (Westernův přenos)

Princip: Jedná se o přenos proteinů z gelu po SDS-PAGE na membránu, v našem případě byla použita PVDF membrána. Využívá se toho, že proteiny jsou po SDS-PAGE záporně nabitě (zejména kvůli zbytkovému SDS), tudíž se v elektrickém poli pohybují od záporného ke kladnému pólu. Tato metoda byla použita za účelem získání vzorku pro určení N-terminální aminokyselinové sekvence fenolhydroxylasy metodou Edmanova odbourávání. Visualizace byla provedena barvením Coomassie Brilliant Blue, neboť pro fenolhydroxylasu nebyly připraveny protilátky [72].

Použité pufrů a roztoky:

přenosový pufr: 0,025 M TRIS/HCl

0,192 M glycin, pH 8,8

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

odbarvovací lázeň: 25 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Postup: Byl použit přístroj Fastblot B32 (Whatman Biometra, SRN) pro polosuchý přenos. Po provedení SDS elektroforesy na polyakrylamidovém gelu byl gel pouze omyt vodou a poté byl ponechán 20 minut v přenosovém pufru. Dále bylo nastříháno 6 kusů filtračních papírů Whatman 3MM a jeden kus PVDF membrány, tak aby svou velikostí odpovídali velikosti gelu. PVDF membrána byla po dobu 5 sekund ponořena do 100 % methanolu, pak byla 2 minuty ponechána ve vodě a nakonec byla máčena v přenosovém pufru po dobu 5 minut. Filtrační papíry byly rovněž napuštěny přenosovým pufrům.

Byl vytvořen tzv. přenosový sendvič o uspořádání: anoda

3 kusy filtračního papíru

PVDF membrána

gel

3 kusy filtračního papíru

katoda

Při jeho přípravě bylo nutné odstranit vzduch, a to např. „válčováním“ přenosového sendviče zkumavkou.

Přístroj byl připojen ke zdroji napětí. Pro přenos byl nastaven proud: 3 mA/1 cm³ plochy membrány. Po 50 minutách byl přenos ukončen, PVDF membrána byla omyta vodou, 30 sekund barvena Coomassie Brilliant Blue a následně cca 1 hodinu odbarvována v odbarvovací lázni. Dále byla PVDF membrána pětkrát promyta ve vodě, usušena na vzduchu a uchována v mrazicím boxu pro další experiment.

3.4.7. N–terminální sekvenace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

Princip : Pro určení N–terminální aminokyselinové sekvence fenolhydroxylasy byla zvolena automatizovaná metoda Edmanova odbourávání. Principem metody je reakce fenylisothiokyanátu s N–terminální skupinou aminokyselin proteinů (či peptidů) za tvorby derivátu fenylthiokarbamoylu. V mírně kyselém prostředí se pak z proteinu uvolní fenylthiohydantoin–aminokyselina, která je identifikována chromatografickými metodami, v našem případě pomocí HPLC [72].

Postup: Analysována byla fenolhydroxylasa z PVDF membráně (po provedení Western blotu). Z membrány byla fenolhydroxylasa vyříznuta žiletkou a aplikována do automatického sekvenátoru. Další kroky byly prováděny automaticky dle zvoleného počítačového programu. Po ukončení požadovaného počtu cyklů byly aminokyseliny identifikovány metodou HPLC srovnáním se známými standardy.

3.5. METODY POUŽITÉ PŘI PURIFIKACI ENZYMŮ

Pro purifikaci fenolhydroxylasy byly použity kombinace několika metod. Jednalo se zejména chromatografické a precipitační metody.

Základním pufrům používaným při purifikaci byl 50 mM Na-fosfátový pufr s 1 mM EDTANa₂ a 1 μM FAD (pH 7,6).

3.5.1. Kapalinová iontoměničová chromatografie

Iontoměniče obsahují záporně či kladně nabitě skupiny a tudíž fungují jako měniče iontů. Iontoměniče s kyselými skupinami jsou označovány jako katexy a slouží pro výměnu kationtů. Anexy obsahují bazické skupiny a vyměňují anionty. Iontoměniče váží ionty elektrostatickými silami. Ačkoliv se mohou vyskytnout někdy i jiné typy vazby, tyto jevy jsou obvykle mnohem slabší. Dělení látek při iontoměničové chromatografii proto probíhá převážně podle elektrických vlastností látek. Dělení se pak podobá výsledkům získaným při jiných separačních technikách založených na elektrických nábojích látek, jež mají být odděleny, jako jsou např. elektroforesa.

Provedení může být buď vsádkové (statické) nebo na koloně (dynamické). Kolonový způsob je používán ve většině případů. Kolona se plní nabobtnalým iontoměničem.

Obecně platí pravidlo, že protein se naváže na katex, pokud pH pufru je nižší než isoelektrický bod proteinu. Na anex se protein váže je-li pH pufru vyšší než isoelektrický bod proteinu.

Elektrostatická vazba iontů na iontoměniče je tak silná, že při eluci zachycených látek je nutné měnit složení eluentu. Používají se proto gradienty pH nebo gradienty iontové síly.

3.5.1.1. Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy CL6B

Princip: DEAE Sepharosa je slabý anex. Nabitou skupinou je v tomto případě DEAE (diethylaminoethyl) nesoucí záporný náboj a tento ionex tudíž slouží k výměně anionů.

Příprava nosiče: DEAE Sepharosa (cca 100 ml) resuspendovaná ve 20 % ethanolu byla před použitím promyta 3x250 ml destilované vody, rozmíchána v 200 ml tzv.

cyklizačního pufru (1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,6) a ponechána přes noc při 5°C. Druhý den byl nosič opět promyt 3x250 ml destilované vody a 3x250 ml ekvilibračního pufru (50 mM Na-fosfátový pufr, pH 7,6). Nosič resuspendovaný v malém množství ekvilibračního pufru byl za nulového průtoku nalit na kolonu C 2,6x40 Pharmacia Biotech. Po sedimentaci byl sloupec DEAE Sepharosy dále ekvilibrován přímo v koloně.

Regenerace nosiče: Po použití byl nosič čištěn postupným promýváním 1x250 ml 1 M NaCl, 1x250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 1x250 ml destilované vody, 1x250 ml 0,5 M NaOH, 1x250 ml destilované vody, 1x250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 2x250 ml 20 % ethanolu. Poté byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20 % ethanolu, převeden do polyethylenové lahvičky a uchováván při 5°C.

Postup: Na kolonu DEAE Sepharosy ekvilibrovanou 50 mM Na-fosfátovým pufrem pH 7,6 bylo pomocí peristaltické pumpy nanášeno 260 ml vzorku (cytosolu) rychlostí 0,8 ml.min⁻¹. Zároveň byly pomocí automatického sběrače jímány eluované frakce. U jednotlivých frakcí byla měřena absorbance při 280 nm (A_{280nm}). Ta sloužila pro sledování „elučního profilu“ chromatografie. Po nanášení vzorku byla kolona promývána 50 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,6) až do poklesu absorbance při 280 nm (vymytí nezachycených proteinů).

Pro eluci fenolhydroxylasy byl použit lineární gradient iontové síly: 2x350 ml 50 mM Na-fosfátovém pufrem (pH 7,6) s přidávkem 0 až 0,35 M NaCl. Opět byla měřena absorbance (A_{280nm}) eluovaných frakcí.

Na základě „elučního profilu“ byla provedena elektroforesa (SDS-PAGE). Rovněž byla pomocí HPLC stanovena fenolhydroxylasová aktivita vybraných frakcí. Na základě vyhodnocení výsledků elektroforesy a stanovení enzymových aktivit byly frakce obsahující fenolhydroxylasu spojeny, přes noc dialysovány proti 8 l 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6) a dále purifikovány.

Po dialyze byla provedena rechromatografie na DEAE Sepharose. Použito bylo 50 ml nosiče v koloně C 1,6x30 Pharmacia Biotech. a objem vzorku (slitých frakcí po chromatografii na DEAE Sepharose) činil 115 ml. Eluce fenolhydroxylasy byla provedena lineárním gradientem: 2x150 ml 50 mM Na-fosfátovém pufrem (pH 7,6) s přidávkem 0 až 0,35 M NaCl. Přítomnost fenolhydroxylasy v eluovaných frakcích byla ověřena stejným

postupem jako bylo zmíněno výše. Frakce obsahující fenolhydroxylasu byly spojeny a přes noc dialysovány proti 4 l 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6).

3.5.2. Gelová permeační chromatografie

Gel s definovanou velikostí pórů je umístěn ve svislé koloně, kolona s tímto nosičem tudíž funguje jako molekulové síto. Směs látek (vzorek), která má být rozdělena se nanese na povrch gelu. Při frakcionaci (oddělení látek s málo rozdílnou molekulovou hmotností) by neměl objem vzorku přesáhnout 1 až 5 % objemu náplně kolony. Kolona je promývána za konstantní rychlosti elučním činidlem stejného složení jako má roztok v pórech gelu. Molekuly větší než póry gelu nepronikají do těchto pórů a procházejí tedy kolonou stejnou rychlostí jako eluční roztok. V eluátu se objeví ihned po eluci intersticiální kapaliny z kolony. Malé molekuly pronikají do pórů gelu a eluují se později než molekuly velké. Látky se tedy rozdělují podle zmenšující se velikosti molekul.

3.5.2.1. Chromatografie na sloupci Sepharosy 4B

Princip: Sepharosa se vyrábí z agarosy, má poměrně velké póry, ale není příliš mechanicky odolná. Sepharosa 4B se používá k separaci látek v rozsahu molekulových hmotností 30-5000 kDa.

Příprava nosiče: Sepharosa 4B (cca 50 ml) resuspendovaná ve 20 % ethanolu byla před použitím promyta 2x250 ml destilované vody, 2x250 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6), rozmíchána v malém množství 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6) a nalita do chromatografické kolony C 1,6x30 Pharmacia Biotech. Po sedimentaci byl nosič promýván 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) rychlostí 0,6 ml.min⁻¹.

Regenerace nosiče: Po použití byl nosič čištěn postupně 2x250 ml destilované vody, 1x250 ml 1 M NaCl, 2x250 ml destilované vody a 2x250 ml 20 % ethanolu. Nakonec byl nosič resuspendován ve 120 ml 20 % ethanolu, převeden do polyethylenové lahvičky a uchováván při 5°C.

Postup: Na připravenou kolonu Sepharosy 4B byl při nulovém průtoku nanesen vzorek proteinů (vysrážených polyethylenglykolem 6000 nebo síranem amonným) o objemu 2 ml. Poté byly proteiny vymývány 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) rychlostí 0,6 ml.min⁻¹. Pomocí automatického sběrače byly jímány eluované frakce a měřena jejich absorbance při 280 nm (A_{280nm}). Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita (HPLC). Frakce vykazující aktivitu byly spojeny, po malých „alíkvotech“ byly zmrazeny v kapalném dusíku a následně skladovány při -80°C.

3.5.2.2. Chromatografie na sloupci Sephacrylu S300

Princip: Sephacryl je zesíťovaný kopolymer allyldextranu a N, N'-methylenebisacrylamidu. Vyznačuje se velmi dobrou chemickou a mechanickou odolností. Na Sephacrylu S300 lze dělit molekuly v rozmezí molekulové hmotnosti 1-400 kDa.

Příprava nosiče, jeho regenerace a postup: byla analogická jako u Sepharosy 4B (kapitola 3.5.2.1., str. 45)

3.5.3. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je jedna z forem adsorpční chromatografie, která využívá funkčních rozdílů mezi molekulami biopolymerů (např. různé enzymy katalysují různé reakce). Afinitní chromatografií může být izolována kterákoliv molekula, která reaguje specificky a reversibilně s jinou molekulou. Těmito dvěma molekulami mohou být např. enzym – substrát nebo enzym – kofaktor apod. Imobilisací jedné z těchto látek se připraví biospecifický sorbent (může být označen jako ligand), který vytvoří nerozpustný komplex s látkou, kterou potřebujeme ze směsi oddělit. K disociaci toho komplexu je nutné změnit složení eluentu. Používají se různé eluční metody, např. eluce s deformujícími či denaturujícími činidly, hydrolysa raménka nebo matrice, eluce kompetujícím ligandem apod.

3.5.3.1. Chromatografie na sloupci 2'5'ADP Sepharosy

Princip: 2'5'ADP Sepharosa je afinitní nosič, který silně interaguje s NADP⁺ dependentními dehydrogenasami. Tyto enzymy s nosičem interagují při svém fyziologickém pH. Nеспецифickým interakcím nosiče s mobilní fází lze předejít použitím zvýšené iontové síly (asi tak 0,15 M).

Příprava nosiče: 2'5'ADP Sepharosa (cca 5 ml) resuspendovaná ve 20 % ethanolu byla před použitím promyta 2x25 ml destilované vody, 2x25 ml 50 mM Na-fosfátového pufru s 0,15M NaCl (pH 7,6), rozmíchána v malém množství tohoto pufru a nalita do chromatografické kolony 1x10. Po sedimentaci byl nosič promýván 50 mM Na-fosfátovým puftrem s 0,15 M NaCl (pH 7,6) rychlostí 0,3 ml.min⁻¹.

Regenerace nosiče: Po použití byl nosič čištěn postupně 25 ml roztoku o pH 8,5 (0,5 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl), 25 ml destilované vody, dále 25 ml roztoku o pH 4,5 (0,5 M octan sodný, 0,5 M NaCl) a nakonec opět 25 ml destilované vody. Celý tento postup byl ještě jednou zopakován, pak byl nosič promyt 2x25 ml 20 % ethanolu, v němž byl také převeden do polyethylenové lahvičky a uchován při 5°C.

Postup: Na kolonu ekvilibrovanou 50 mM Na-fosfátovým puftrem pH 7,6 byl nanesen vzorek o objemu 40 ml získaný částečnou purifikací na DEAE Sepharose. Aplikační pufr byl v prvním případě 50 mM Na-fosfátový pufr (pH 7,6) bez přídavku NaCl, ve druhém případě 50 mM Na-fosfátový pufr s 0,15 M NaCl (pH 7,6). Poté byly proteiny vymývány 50 mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6) rychlostí cca 0,3 ml.min⁻¹. Pomocí automatického sběrače frakcí byly jímány eluované frakce a měřena jejich absorbance při 280 nm (A_{280nm}).

3.5.3.2. Chromatografie na sloupci 1-(4-OH-benzoyl) aminohexyl Sepharosy

Princip: Pro izolaci fenolhydroxylasy byl speciálně připraven afinitní nosič 1-(4-OH-benzoyl) aminohexyl Sepharosa. Tento nosič by měl být pro fenolhydroxylasu specifický,

neboť 4-OH-benzoylová skupina má analogickou strukturu jako fenol, který je substrátem fenolhydroxylasy.

Jako matrice pro syntesu afinitního nosiče byla zvolena AH Sepharosa. Iontosorb AH (aminohexyl) má šestiuhlíkové hydrofobní raménko o délce asi 20 Å a používá se k navázání ligandů obsahujících volné karboxylové skupiny, neboť sám obsahuje volné aminoskupiny.

Jako ligand byla vybrána kyselina p-hydroxybenzoová.

Syntesa nosiče (Mgr. Veronika Kremláčková, PŘF UK): AH Sepharosa v suchém stavu byla postupně promyta 0,5 M NaCl (200 ml roztoku/1 g gelu) a destilovanou vodou (50 ml vody/1g gelu). Nakonec bylo 6 ml nabobtnalého gelu resuspendováno v 6 ml destilované vody. K této suspensi byl za míchání na třepačce (ne magnetickým míchadlem) přidán roztok 0,0552 g kyseliny p-hydroxybenzoové v 6 ml ethylenglykolu. Ethylenglykol brání nespecifické interakci hydrofobního raménka s látkami, které jsou chromatografovány. Dále byl k suspensi matrice a ligandu po kapkách přidán koncentrovaný roztok EDC (hydrochlorid N'-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid) tak, že jeho výsledná koncentrace byla 0,5 μM. Optimum pro vazebnou reakci leží mezi pH 4,5 až 6, reakční směs byla tedy udržována v tomto rozmezí přidávkou 2 M NaOH a 2 M HCl. Následně byla reakční směs míchána na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 5 hodin a po dalších 17 hodin byla míchána v chladové místnosti při 5°C.

Po proběhnutí vazebné reakce byla suspence promývána na fritě, aby byl vymyt nezachycený ligand a nezreagovaný EDC. Použity byly následující roztoky: 50 ml 50 % ethylenglykolu, 50 ml 50 % dioxanu, 100 ml destilované vody, 20 ml 1 M K-fosfátového pufru (pH 3,5), 100 ml destilované vody, 20 ml 1 M K-fosfátového pufru (pH 11) a nakonec 100 ml destilované vody.

Kontrola navázání ligandu na matrici: Připravený nosič byl nejprve dán do bazického cyklu (1M K-fosfátový pufr, pH 11), byl promyt destilovanou vodou a poté převeden do kyselého cyklu (1 M K-fosfátový pufr, pH 3,5). Opět následovalo promytí vodou. Do polostíněných semimikrokyvet byla dána jako blank Sepharosa 4B resuspendovaná ve vodě a jako vzorek byl použit afinitní nosič 1-(4-OH-benzoyl) aminohexyl Sepharosa. Po sedimentaci gelů byla odsáta voda a přidán glycerol. Kyvety byly uzavřeny víčkem,

protřepány a bylo proměřeno absorpční spektrum v oblasti 300 až 500 nm (spektrofotometr Diod-array Hewlett Packard E8453). Dále bylo proměřeno spektrum kyseliny p-hydroxybenzoové v ethylenglykolu. Při porovnání spekter bylo zřejmé, že se podařilo navázat ligand na matici.

Postup: Připravený afinitní nosič byl promyt 3x30 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6) a poté byl nalit do chromatografické kolony C 1x10, kde byl po sedimentaci dále ekvilibrován 50 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,6).

Na tento nosič byl nanesen vzorek (20 ml) získaný částečnou purifikací na sloupci DEAE Sepharosy. Následovalo promytí kolony 50 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,6). Z horní části sloupce afinitního nosiče bylo odebráno malé množství gelu, k němu byl přidán vzorkový pufr pro SDS-PAGE (vše připraveno analogicky jako u SDS-PAGE, kapitola 3.4.3., str. 40). Roztok byl centrifugován v mikrozkuhavce při 13 000 RPM (Sanyo MicroCentaur MSE, úhlový rotor) a supernatant byl aplikován jako vzorek na polyakrylamidový gel. Po barvení a odbarvení gelu byl identifikován „band“ příslušící fenolhydroxylase, což potvrdilo navázání fenolhydroxylasy na afinitní nosič.

Eluce byla nejprve prováděna lineárním gradientem iontové síly: 50 ml 50 mM Na-fosfátového pufru s NaCl o koncentraci 0 až 0,35 M. Jednotlivé frakce (cca po 1,5 ml) byly jímány pomocí automatického sběrače a byla u nich proměřena absorbance při 280 nm. Tímto způsobem k eluci fenolhydroxylasy nedošlo. Byla proto použita eluce kompetujícím ligandem (fenolem). Nosič byl postupně promýván 20 ml 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM a 5 mM roztoku fenolu v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6). Ani v tomto případě nebyla eluce úspěšná. Bylo nutné přikročit k „drastickému“ způsobu eluce. Afinitní nosič byl převeden z kolony do frity, zde byl mnohonásobným promytím pufrem zbaven fenolu, který zde zůstal po eluci kompetujícím ligandem. K suspensi nosiče s navázaným enzymem bylo přidáno takové množství roztoku NADPH, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 mM a tato reakční směs byla po dobu 3 hodin inkubována při 37°C. Po usazení nosiče byl odebrán vzorek supernatantu a v něm byla pomocí HPLC zjištěna fenolhydroxylasová aktivita. Fenolhydroxylasa částečně přeměnila ligand, tím se z nosiče uvolnila, a byla dále schopna katalysovat přeměnu fenolu na katechol.

3.5.4. Frakční precipitace proteinů

Frakční precipitace proteinů je další způsob, kterým lze od sebe separovat proteiny. Obvykle se k roztoku proteinu přidává roztok srážecího činidla. Podle poměru objemu vzorku (roztok proteinů) a srážecího činidla lze získat frakce proteinů lišící se stupněm nasycení srážecím činidlem.

Frakční precipitace může být použita jak u proteinů cytosolu, tak u proteinů částečně purifikovaných např. chromatografickými metodami.

3.5.4.1. Separace proteinů srážením polyethylenglykolem 6000 (PEG 6000)

Princip: Polyethylenglykol (polyethylenoxid) je produktem polymerace ethylenoxidu. Jedná se tedy o polyether : HO-[-CH₂-CH₂-O-]_n-H.

PEG 6000 se běžně používá při výrobě mýdel, detergentů, ve farmaceutickém průmyslu, kosmetice a medicíně. Důležité je však také jeho použití při frakční precipitaci proteinů, izolaci plasmidové DNA apod.

Postup: Nejprve byl připraven 50 % roztok polyethylenglykolu: 50 g PEG 6000 bylo za míchání rozpuštěno v 50 g 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6).

K roztoku proteinů (40 ml) bylo na ledové lázni za stálého míchání magnetickým míchadlem po kapkách přidáno potřebné množství 50 % roztoku PEG 6000. Po přidání celého objemu srážecího činidla byl roztok ještě 15 minut míchán a poté byl precipitát oddělen centrifugací při 13 500 RPM (Janetzki K-24) po dobu 30 minut. Po odstředění byl supernatant z kyvet slit do kádinky a peleta byla resuspendována v 1 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6). Takto získaná frakce byla aplikována na kolonu Sepharosy 4B, popř. na kolonu Sephacrylu S300 (kapitola 3.5.2., str. 45)

Pro výpočet potřebného množství 50 % roztoku PEG 6000 byl použit vztah:

$$x = (n_2 - n_1) / (1 - n_2)$$

kde vynásobením objemu roztoku proteinů (V_{vzorek}) číslem x získáme objem 50 % roztoku PEG 6000, n_1 je stupeň nasycení výchozího roztoku proteinů a n_2 je požadovaný stupeň nasycení.

3.5.4.2. Separace proteinů srážením síranem amonným $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Princip: Síran amonný je bezbarvá krystalická látka. Kvůli dobré rozpustnosti a také cenové dostupnosti je nejrozšířenější solí, která se používá při srážení proteinů metodou tzv. vysolování. Vysolování proteinu z roztoku nastane tehdy, když překročíme koncentraci soli, při které je protein v roztoku maximálně rozpustný. Dalšími přidávkami soli ubývá molekul vody, které jsou schopny interagovat s proteinem a postupně dochází k jeho precipitaci.

Postup: Nejprve byl připraven nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 190 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bylo za míchání rozpuštěno v 250 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6).

K roztoku proteinů (40 ml), které měly být frakcionovány, bylo na ledové lázni za stálého míchání magnetickým míchadlem po kapkách přidáno potřebné množství nasyceného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Po přidání celého objemu srážecího činidla byl roztok ještě 15 minut míchán a poté byl precipitát oddělen centrifugací při 13 500 RPM (Janetzki K-24) po dobu 30 minut. Po odstředění byl supernatant z kyvet slit do kádinky a peleta byla resuspendována v 1 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6). Takto získaná frakce byla nanesena na kolonu Sepharosy 4B, popř. na kolonu Sephacrylu S300 (kapitola 3.5.2., str. 45)

Pro výpočet potřebného množství nasyceného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ byl použit vztah:

$$x = (n_2 - n_1) / (1 - n_2)$$

kde vynásobením objemu roztoku proteinů (V_{vzorek}) číslem x získáme objem nasyceného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, n_1 je stupeň nasycení výchozího roztoku proteinů a n_2 je požadovaný stupeň nasycení.

3.6. URČENÍ pH OPTIMA PRO NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASU

Zásobní roztoky 10 mM fenolu a 10 mM NADPH byly připraveny z 1 M Na-fosfátového pufru v rozsahu pH 5-10. Příprava vzorků a samotná inkubace je popsána v kapitole 3.4.4. (str. 39).

4. VÝSLEDKY

4.1. ISOLACE MIKROSOMŮ A CYTOSOLU Z KVASINKY *CANDIDA TROPICALIS*

4.1.1. Vliv typů kultivace buněk *C. tropicalis* na mikrosomální a cytosolární enzymy oxidující fenol

Kultura kvasinek *C. tropicalis* byla kultivovaná dvojím způsobem:

A) v laboratorních fermentorech

Pěstování buněk *C. tropicalis* bylo dvoustupňové. V prvním stupni byl do pěti 500 ml baněk (á 100 ml YNB + 250 mg fenolu) přidán 1 ml inokulovaných buněk, následovala 48 hodinová kultivace na třepačkách a rozdělení suspenze buněk do patnácti 500 ml baněk s BSM médiem (á 100 ml BSM + 250 mg fenolu). Po 24 hodinách kultivace byly buňky promyty destilovanou vodou, centrifugovány (K-70 D) a uskladněny v mrazicím boxu při teplotě -80°C pro následnou izolaci subcelulárních frakcí.

Isolace subcelulárních frakcí byla prováděna ze 6 litrů buněčné suspenze (asi 40 g buněk) postupem popsaným v kapitole 3.3. (str. 34).

B) v poloprovozním měřítku

Kultivace buněk kvasinky *C. tropicalis* v poloprovozním měřítku byla prováděna na pracovišti MBÚ AV ČR pod vedením Ing. Miroslava Sobotky, CSc. Tento způsob byl volen proto, abychom dosáhli větších výtěžků buněk studované kvasinky, dostatečných pro izolaci enzymů biotransformujících fenol. Kultivace kvasinky *C. tropicalis* byla tedy postupně převáděna na postup využívající větších objemů media a připravovaného mikroorganismu („scale-up“ metoda). Jako inokulum pro kultivaci ve větším fermentoru byla vždy použita biomasa získaná kultivací v předešlém stupni (v laboratorním fermentoru). Kultivace byla zahájena v laboratorním fermentoru Braun Biotech (pracovní objem 1,5 l), po 48 hodinách bylo kultivační medium s buňkami kvasinky přeneseno do 10 l fermentoru Chemap a po 12 hodinách byl obsah tohoto fermentoru použit jako inokulum pro 100 l fermentor (pracovní označení C). V tomto zařízení probíhala kultivace 44 hodin a

zde získaná biomasa sloužila jako inokulum pro 1000 l fermentor (pracovní označení E). Zde probíhala kultivace 88 hodin. V průběhu kultivací ve všech fermentorech, bylo měřeno a kontrolováno množství rozpuštěného kyslíku, pH (udržováno roztokem 0,1 M NaOH na hodnotě 5,2) a koncentrace fenolu. Po kultivaci byly buňky promyty destilovanou vodou a po částech (cca 500 g) zmrazeny a dále uchovány při -20°C po dobu tří let.

Isolace subcelulárních frakcí byla prováděna z cca 200 g zmražených buněk analogicky, jako bylo popsáno v kapitole 3.3. (str. 34).

4.1.1.1. Srovnání aktivit enzymů participujících na oxidaci fenolu v mikrosomálních frakcích izolovaných z kvasinky *C. tropicalis* kultivované v laboratorním a poloprovozním měřítku

Mikrosomální frakce izolované z kvasinky *C. tropicalis* byly analysovány z hlediska obsahu cytochromu P450, aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy a fenolhydroxylasové aktivity (**Tab.1**, str. 55)

Obsah cytochromu P450 v mikrosomální frakci izolované z buněk *C. tropicalis* byl stanoven metodou diferenční spektrometrie (kapitola 3.4.2., str. 37).

Aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy byla stanovena měřením nárůstu absorbance při 550 nm, kdy substrát tohoto enzymu, cytochrom c, je tímto enzymem redukován (kapitola 3.4.3., str. 38).

Fenolhydroxylasová aktivita byla určena pomocí HPLC. Vzorek byl inkubován s 1 mM fenolem a 1 mM NADPH při 37°C . V časech 0, 10 a 35 minut byla reakce ukončena přidávkem 0,6 M HClO_4 a množství fenolu a jeho oxidačního produktu, katecholu, bylo stanoveno pomocí HPLC (kapitola 3.4.4., str. 39).

Z **Tab.1** (str. 55) je patrné, že mikrosomy izolované z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v laboratorním měřítku obsahují téměř srovnatelná množství cytochromu P450 NADPH:CYP oxidoreduktasy jako mikrosomy izolované z buněk pěstovaných v poloprovozním měřítku. Fenolhydroxylasová aktivita v mikrosomech těchto buněk byla však 1,3x vyšší než v buňkách kultivovaných v poloprovozním měřítku.

Tab.1 Obsah cytochromu P450, aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy a fenolhydroxylasové aktivity v mikrosomech izolovaných z kvasinek *C. tropicalis* kultivovaných v laboratorním měřítku (mikrosomy A) a v poloprovozním měřítku (mikrosomy B)

| | obsah CYP [nmol/mg prot.] | aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy [nmol cyt c/min/mg prot.] | fenolhydroxylasová aktivita [nmol fenolu/min/mg prot.] |
|-------------|------------------------------|--|---|
| mikrosomy A | 0,36 | 1,52 | 3,79 |
| mikrosomy B | 0,31 | 1,25 | 2,81 |

4.1.1.2. Srovnání aktivit enzymů participujících na oxidaci fenolu v cytosolárních frakcích izolovaných z kvasinky *C. tropicalis* kultivované v laboratorním a poloprovozním měřítku

V cytosolárních frakcích izolovaných z buněk kultivovaných obojím způsobem byla porovnáвана fenolhydroxylasová aktivita (**Tab.2**, str. 56). Obsah proteinů v tomto případě závisel na množství pufru, které bylo použito k homogenisaci desintegrovaných buněk *C. tropicalis* při izolaci cytosolu.

Fenolhydroxylasová aktivita byla měřena pomocí HPLC. Vzorek byl inkubován s 1 mM fenolem a 1 mM NADPH při 37°C. V časech 0, 10 a 35 minut byla reakce ukončena přidávkem 0,6 M HClO₄ a množství fenolu a katecholu analysováno pomocí HPLC (kapitola 3.4.4., str. 39).

Hodnoty presentované v **Tab.2** (str. 56) potvrzují stejný trend fenolhydroxylasové aktivity cytosolární frakce jako v případě enzymů izolovaných z mikrosomů *C. tropicalis*. Vyšší specifickou i obecnou aktivitu vykazuje enzym izolovaný z buněk kultivovaných v laboratorním měřítku. Specifická aktivita fenolhydroxylasy je v těchto buňkách 3x vyšší než v cytosolu buněk pěstovaných v poloprovozním měřítku.

Tab.2 Fenolhydroxylasová aktivita v cytosolech izolovaných z *C. tropicalis* kultivovaných v laboratorním měřítku (cytosol A) a v poloprovozním měřítku (cytosol B)

| | koncentrace bílkovin [mg/ml] | fenolhydroxylasová aktivita | |
|-----------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | obecná [nmol/min/ml preparátu] | specifická [nmol/min/mg prot.] |
| cytosol A | 1,84 | 42,30 | 22,24 |
| cytosol B | 2,16 | 15,62 | 7,23 |

4.1.2. Vliv doby skladování buněk *C. tropicalis* získaných kultivací v poloprovozním měřítku na enzymy participující na oxidaci fenolu

Buňky kvasinky *C. tropicalis* získané kultivací v poloprovozním měřítku (popis kultivace kapitola 4.1.1. B, str. 53) byly po dobu tří let skladovány při -20°C . Během těchto tří let byly z buněk izolovány subcelulární frakce, mikrosomy a cytosol, (kapitola 3.3., str. 33) a analysovány z hlediska jejich efektivity oxidovat fenol.

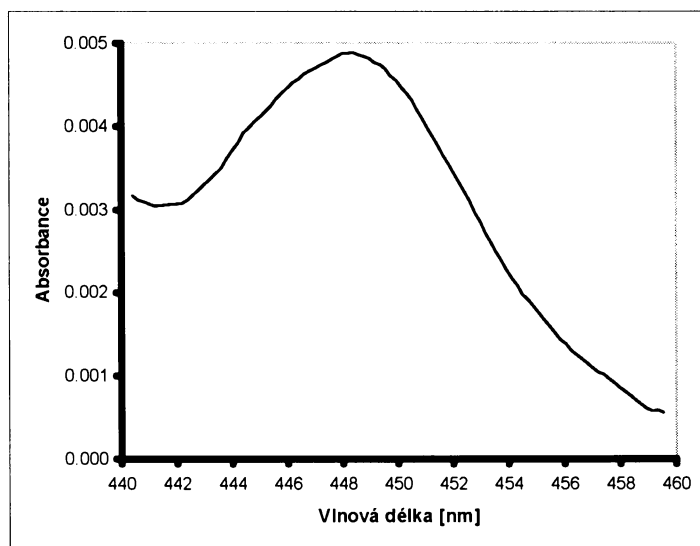
4.1.2.1. Vliv doby skladování buněk *C. tropicalis* na mikrosomální enzymy participující na oxidaci fenolu

V mikrosomech byl sledován obsah cytochromu P450, aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy a fenolhydroxylasová aktivita. Stanovení byla provedena způsobem zmíněným výše (kapitola 4.1.1.1, str. 54). Srovnání sledovaných parametrů zobrazuje **Tab.3** (str. 57). Se vzrůstající dobou skladování buněk *C. tropicalis* dochází k poklesu aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy (4,8x), drasticky klesá i fenolhydroxylasová aktivita (14,8x). Obsah cytochromu P450 v mikrosomech se však snížil pouze 2,6krát.

Tab.3 Obsah cytochromu P450, aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy a fenolhydroxylasová aktivita v mikrosomech izolovaných z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v poloprovozním měřítku, které byly po dobu tří let skladovány při -20 °C

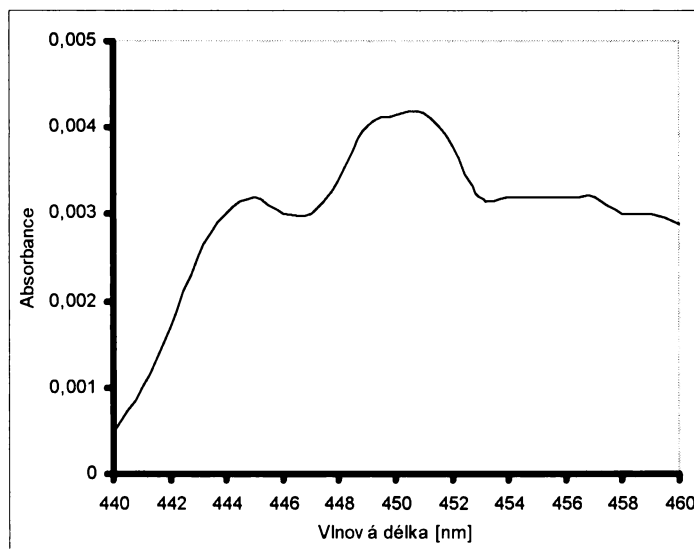
| doba skladování mikrosomů [měsíce] | obsah CYP [nmol/mg prot.] | aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy [nmol cyt c/min/mg prot.] | fenolhydroxylasová aktivita [nmol fenolu/min/mg prot.] |
|------------------------------------|---------------------------|---|--|
| 0 | 0,31 | 1,25 | 2,81 |
| 12 | 0,29 | 0,97 | 2,17 |
| 30 | 0,24 | 0,29 | 1,05 |
| 36 | 0,12 | 0,26 | 0,19 |

V mikrosomální frakci byl obsah cytochromu P450 stanoven metodou diferenční spektrometrie (kapitola 3.4.2., str. 37). Diferenční spektrum komplexu redukováného CYP s oxidem uhelnatým je znázorněno na **Obr.7**. Je zde patrné absorpční maximum v oblasti kolem 450 nm (v tzv. Soretově pásu), které odpovídá vazbě CO jako ligandu a CYP se nachází v hexakoordinované formě.



Obr.7 Diferenční spektrum komplexu redukováného CYP s oxidem uhelnatým. Mikrosomy byly izolovány z buněk *C. tropicalis* bezprostředně po kultivaci v poloprovozním měřítku

Na **Obr.8** je rovněž uvedeno diferenční spektrum komplexu redukovaného CYP s oxidem uhelnatým. Toto spektrum je spektrum CYP v mikrosomech, které byly izolovány z buněk skladovaných tři roky. Porovnáním s **Obr.7** (str. 57) je patrné, že došlo ke změnám spektrálních vlastností CYP.



Obr.8 Diferenční spektrum komplexu redukovaného CYP s oxidem uhelnatým. Mikrosomy byly izolovány z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v poloprovozním měřítku po třech letech skladování při -20°C .

4.1.2.2. Vliv doby skladování buněk *C. tropicalis* na cytosolární enzymy participující na oxidaci fenolu

V cytosolu izolovaném z buněk *C. tropicalis* byla sledována fenolhydroxylasová aktivita. Stanovení byla provedena způsobem zmíněným výše (kapitola 4.1.1.2, str. 55). Z výsledků uvedených v **Tab.4** (str. 59) je patrné, že s rostoucí dobou skladování buněk kvasinky *C. tropicalis* při -20°C fenolhydroxylasová aktivita klesá.

Tab.4 Porovnání specifické a obecné fenolhydroxylasové aktivity v cytosolu získaném z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v poloprovozním měřtku, které byly po dobu tří let skladovány při -20 °C

| doba skladování cytosolu [měsíce] | koncentrace bílkovin [mg/ml] | fenolhydroxylasová aktivita | |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | obecná [nmol/min/ml preparátu] | specifická [nmol/min/mg prot.] |
| 0 | 2,16 | 15,62 | 7,23 |
| 12 | 1,97 | 13,44 | 6,82 |
| 30 | 5,98 | 9,93 | 1,66 |
| 36 | 7,35 | 9,59 | 1,30 |

4.2. OPTIMALISACE ISOLACE NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY Z CYTOSOLU KVASINKY *C. TROPICALIS*

Aby bylo možné charakterisovat vlastnosti NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, bylo nutné nalézt optimální a efektivní způsob izolace tohoto enzymu z cytosolu kvasinky *C. tropicalis*. Tato problematika je v laboratoři, kde byla vypracovávána diplomová práce, řešena již několik let. Výsledky ilustrující pokusy o izolaci enzymu jsou součástí diplomové práce V. Kremláčkové [24]. V předkládané diplomové práci byla testována vhodnost především metod chromatografických (chromatografie iontoměničová, afinitní, molekulová síta), ale i metod separujících proteiny frakční precipitací (precipitace síranem amonným či polyethylenglykolem 6000).

Základním krokem izolace fenolhydroxylasy byla kapalinová iontoměničová chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy (kapitola 3.5.1.1., str. 39). Po ní následovala dialýsa frakcí, ve kterých byla zjištěna fenolhydroxylasová aktivita, z důvodů odstranění NaCl, jehož gradient byl použit pro separaci proteinů obsažených v cytosolu *C. tropicalis*. Následovala rechromatografie na DEAE Sepharose a frakce vykazující fenolhydroxylasovou aktivitou byly opět dialysovány.

Preparát získaný těmito purifikačními kroky vykazoval fenolhydroxylasovou aktivitu, určenou jak úbytkem fenolu, tak i tvorbou jeho oxidačního produktu, katecholu (metoda HPLC, kapitola 3.4.4., str. 39). Z výsledků však bylo patrné, že množství oxidovaného fenolu neodpovídá množství vzniklého katecholu. Bylo proto testováno, zda získaný preparát neobsahuje enzymy, pro které je katechol substrátem. Inkubace získaného enzymového preparátu s katecholem (kapitola 3.4.4., str. 39) potvrdila přítomnost takových enzymů, s největší pravděpodobností katechol-1,2-dioxygenasy, která byla v kvasinkách *C. tropicalis* detegována [28]. Použitím pouze chromatografie na DEAE Sepharose tedy nebylo možné získat preparát fenolhydroxylasy, který by zároveň neobsahoval katechol-1,2-dioxygenasu. Následovně tedy bylo nutné provést další purifikační kroky.

Z důvodu nenáročného provedení a cenové dostupnosti byla jako další krok testována frakční precipitace síranem amonným (kapitola 3.5.4.2., str. 51). Preparát vykazující fenolhydroxylasovou aktivitu získaný chromatografií a rechromatografií na DEAE Sepharose byl podroben frakční precipitaci síranem amonným, nejprve od 0 do 65 % nasycení a poté od 65 do 80 % nasycení touto solí. Uvedeným postupem však rovněž nebyl získán enzymový preparát prostý katechol-1,2-dioxygenasy. Vzorek získaný po precipitaci síranem amonným byl tedy chromatografován na sloupci Sepharosy 4B, která funguje jako molekulové síto. Po eluci však byly získány frakce s velmi nízkým obsahem proteinů a aktivita fenolhydroxylasy téměř nebyla detegována (výsledky nejsou uvedeny).

Při dalších izolacích fenolhydroxylasy byla proto po chromatografií a rechromatografií na DEAE Sepharose zařazena další purifikační metoda, afinitní chromatografie na sloupci 2'5'ADP-Sepharosy (kapitola 3.5.3.1., str. 47). Je totiž známo, že tento nosič interaguje s aktivními centry některých NADP^+ -dependentních enzymů [73]. Nejprve byl na sloupec 2'5'ADP Sepharosy aplikován vzorek enzymového preparátu v 50 mM Na-fosfátovém pufru. K interakci fenolhydroxylasy s nosičem a její vazbě na něj však nedošlo. Vzhledem k tomu, že některé z NADP^+ -dependentních enzymů snaději interagují s 2'5'ADP Sepharosy v prostředí o vyšší iontové síle, byl tento postup rovněž testován. V tomto případě bylo použito prostředí zvýšené koncentrace NaCl (0,15 M NaCl). Avšak ani za těchto podmínek NADPH-dependentní fenolhydroxylasa z *C. tropicalis* s 2'5'ADP Sepharosou neinteragovala.

Tento neúspěch vedl ke snaze syntetizovat afinitní nosič s ligandem, který by měl analogickou strukturu se substrátem fenolhydroxylasy, fenolem. Postupem uvedeným v kapitole 3.5.3.2. (str. 47) byl tedy připraven afinitní nosič 1-(4-OH-benzoyl) aminohehyl Sepharosa. Jako ligand byla zvolena kyselina p-hydroxybenzoová. Na takto modifikovanou Sepharosu se preparát NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, získaný chromatografií a rechromatografií na DEAE Sepharose, skutečně vázal. Problémem však byla zpětná resorpce (eluce) enzymu z tohoto nosiče. Eluce enzymu byla nejprve prováděna pomocí lineárního gradientu iontové síly: 50 ml 50 mM Na-fosfátového pufru o koncentraci NaCl 0 až 0,35 M. Tímto postupem však eluce fenolhydroxylasy nebylo dosaženo. Byla proto testována možnost uvolnění enzymu prostřednictvím ligandu

kompetujícího se substrátem enzymem, jmenovitě fenolem. Sloupec s afinitním nosičem byl postupně promýván 20 ml 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM a 5 mM fenolem v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6). Ani v tomto případě nebyla eluce úspěšná. Bylo proto nutné přikročit k „drastickému“ způsobu uvolnění enzymu z afinitního nosiče. Nosič byl převeden z kolony na fritu, zde byl mnohonásobným promytím pufrům zbaven fenolu, který zde zůstal po eluci kompetujícím ligandem. K suspenzi nosiče s navázaným enzymem bylo přidáno takové množství roztoku NADPH, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 mM a tato reakční směs byla po dobu 3 hodin inkubována při 37°C. Po usazení nosiče byl odebrán vzorek supernatantu, a v něm byla pomocí HPLC zjištěna fenolhydroxylasová aktivita. Fenolhydroxylasa částečně přeměnila ligand, tím se z nosiče uvolnila, a byla tak dále schopna katalysovat přeměnu fenolu na katechol. Po provedení SDS elektroforesy (kapitola 3.4.5., str. 40) se vzorkem supernatantu obsahujícího uvolněnou fenolhydroxylasu a vzorkem gelu (afinitního nosiče) bylo zjištěno, že pouze malé množství NADPH-dependentní fenolhydroxylasy se z nosiče uvolnilo. Majoritní množství enzymu zůstalo navázáno na afinitním nosiči. Ačkoliv tímto purifikačním krokem byla NADPH-dependentní fenolhydroxylasa separována, nebylo možné ji dále použít pro její charakterisaci.

Jako další purifikační krok byla použita frakční precipitace proteinů prostřednictvím polyethylenglykolu 6000 (kapitola 3.5.4.1., str. 50). Srážen byl enzymový preparát získaný chromatografií a rechromatografií na DEAE Sepharose, a to do 20 % nasycení PEG 6000. Tímto purifikačním krokem se skutečně podařilo získat preparát NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, který neobsahoval katechol-1,2-dioxygenasu. Jak je patrné z **Tab.5** (str. 68), precipitace enzymu pomocí PEG 6000 však vedla ke snížení jeho fenolhydroxylasové aktivity. Pro oddělení PEG 6000 od vzorku byla zvolena gelová permeační chromatografie na sloupci Sephacrylu S300 (kapitola 3.5.4.2., str. 51). Tímto postupem se podařilo získat purifikovanou NADPH-dependentní fenolhydroxylasu, která je vhodná pro stanovení kinetických konstant, pH optima a dalších enzymových charakteristik.

Další kapitoly detailně popisují jednotlivé kroky izolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky *C. tropicalis*, které se ukázaly jako vhodné k její purifikaci.

4.2.1. Isolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky *C. tropicalis*

Jako optimální způsob izolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu *C. tropicalis* lze tedy považovat postup zahrnující následující purifikační kroky:

- 1) chromatografii na sloupci DEAE Sepharosy následovanou dialýsou získaných frakcí
- 2) rechromatografii na sloupci DEAE Sepharosy následovanou dialýsou získaných frakcí
- 3) separaci proteinů srážením PEG 6000 do 20 % nasycení
- 4) gelovou permeační chromatografií na sloupci Sephacrylu S300

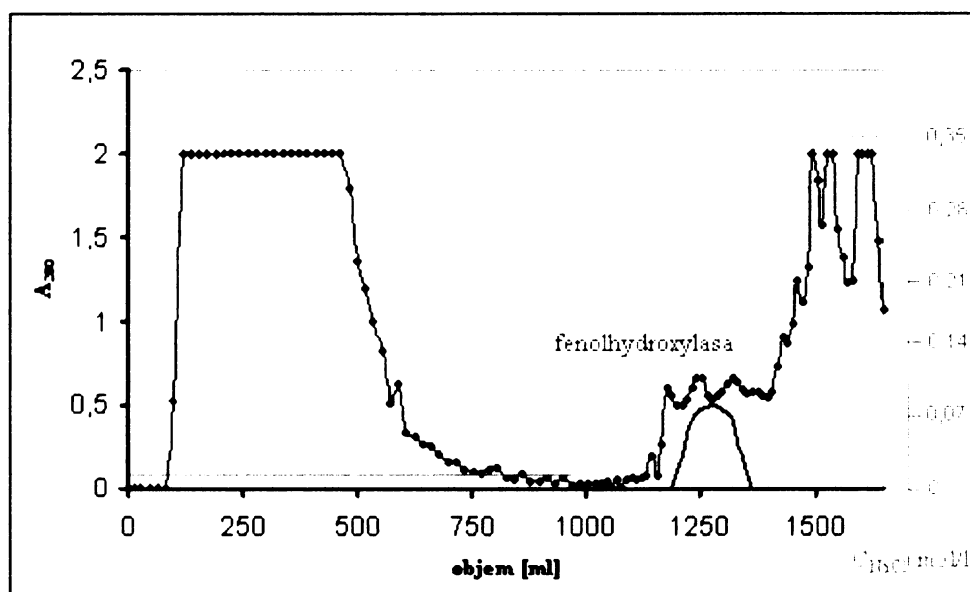
4.2.1.1. Chromatografie proteinů cytosolu *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy

Na kolonu DEAE Sepharosy (kolona Pharmacia Biotech C 2,6x40) o objemu 100 ml bylo pomocí peristaltické pumpy nanášeno 260 ml cytosolu *C. tropicalis* rychlostí 0,8 ml.min⁻¹. Zároveň byly jímány eluované frakce. U jednotlivých frakcí bylo měřeno množství eluovaných proteinů, sledováním absorbance při 280 nm ($A_{280\text{nm}}$). Po aplikaci cytosolu byla kolona promývána 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) až do poklesu absorbance při 280 nm (vymytí nezachycených proteinů).

Pro eluci fenolhydroxylasy byl použit lineární gradient NaCl: 2x350 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6) s přidavkem 0 až 0,35 M NaCl.

Na základě „elučního profilu“ byla provedena elektroforesa (SDS-PAGE). Rovněž byla pomocí HPLC stanovena fenolhydroxylasová aktivita vybraných frakcí. Na základě vyhodnocení výsledků elektroforesy a stanovení enzymových aktivit byly frakce (75 až 85) obsahující fenolhydroxylasu spojeny, přes noc dialysovány proti 8 l 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6) a dále purifikovány.

Průběh chromatografie proteinů cytosolu buněk kvasinky *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy je znázorněn na **Obr.9** (str. 63). Modře jsou označeny frakce 75 až 85, u nichž byla detegována fenolhydroxylasová aktivita.

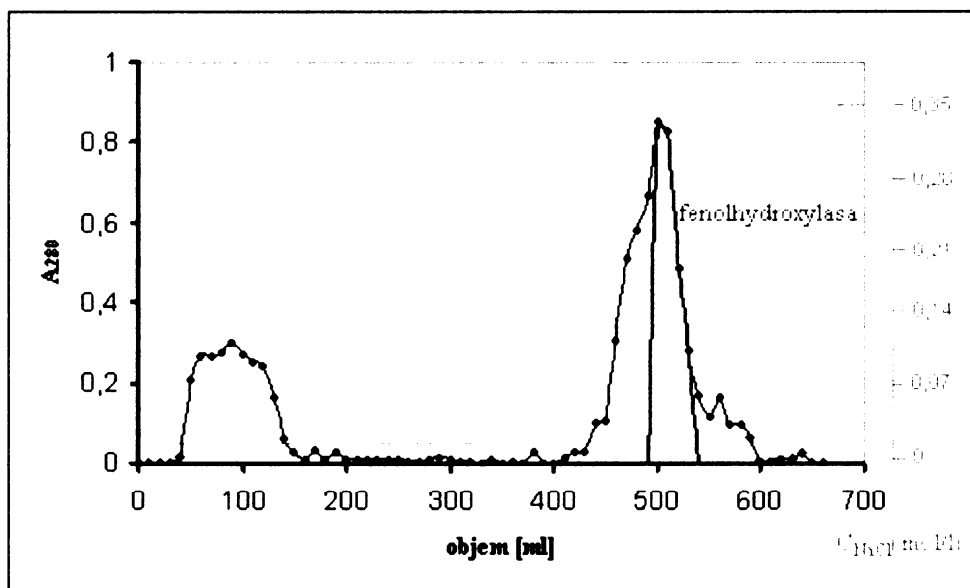


Obr.9 Chromatografie proteinů cytosolu kvasinky *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy. Experimentální podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.5.1.1. (str. 43)

4.2.1.2. Rechromatografie proteinů cytosolu kvasinky *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy

Po dialyze byla provedena rechromatografie frakcí vykazujících fenolhydroxylasovou aktivitu na DEAE Sepharose. Eluce fenolhydroxylasy byla opět provedena gradientem NaCl: 2x150 ml 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6) o koncentraci NaCl 0 až 0,35 M. Přítomnost fenolhydroxylasy v eluovaných frakcích byla ověřena stejným postupem jako bylo zmíněno v kapitole 4.2.1.1. (str. 63). Frakce obsahující fenolhydroxylasu (50 až 54) byly spojeny a přes noc dialysovány proti 4 l 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6).

„Eluční profil“ rechromatografie fenolhydroxylasy na sloupci DEAE Sepharosy je znázorněn na **Obr.10** (str. 65). V modře označených frakcích 50 až 54 byla přítomna NADPH-dependentní fenolhydroxylasa.



Obr.10 Chromatografie částečně purifikované fenolhydroxylasy na sloupci DEAE Sepharosy. Experimentální podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.5.1.1. (str. 43)

4.2.1.3. Purifikace fenolhydroxylasy srážením PEG 6000 do 20 % nasycení

K roztoku proteinů získaných předchozími purifikačními kroky (40 ml slitých frakcí 50 až 54 po rechromatografii na DEAE Sepharose) bylo na ledové lázni za stálého míchání po kapkách přidáno 26,6 ml 50 % roztoku PEG 6000. Po přidání celého objemu srážecího činidla byl roztok ještě 15 minut míchán a poté byl precipitát oddělen centrifugací. Po odstředění byl supernatant z kyvet slit a peleta byla resuspendována ve 2 ml 50 mM Na-fosfátového pufru (pH 7,6).

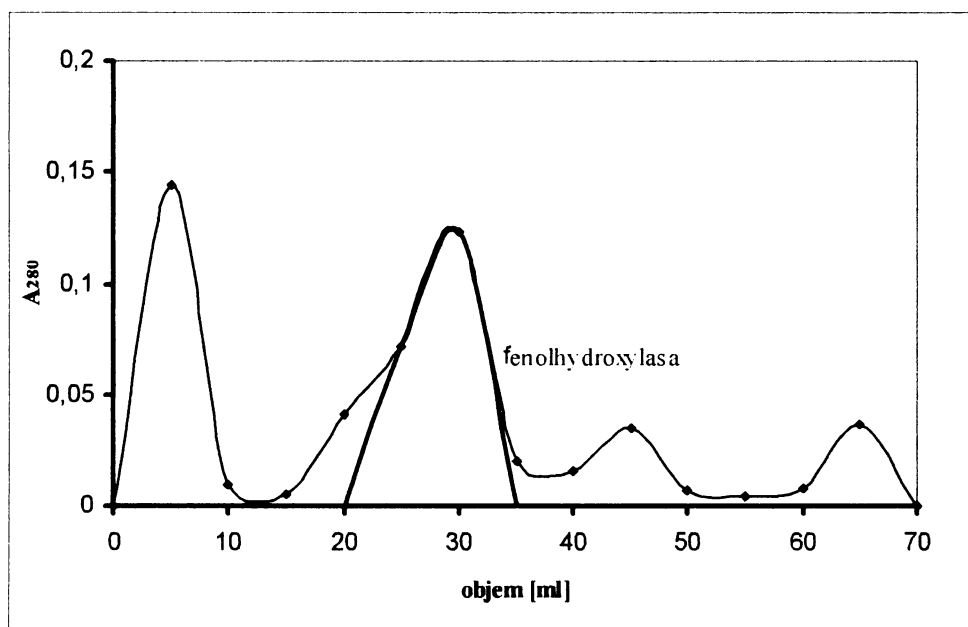
Tento purifikační krok se ukázal jako velmi účinný. Frakční precipitací proteinů PEG 6000 se totiž téměř podařilo oddělit NADPH-dependentní fenolhydroxylasu od katechol-1,2-dioxygenasy. Získaný enzymový preparát již totiž katechol nepřeměňoval.

4.2.1.4. Gelová permeační chromatografie fenolhydroxylasy na sloupci Sephacrylu S300

Na kolonu Sephacrylu S300 (kolona Pharmacia Biotech. C 1,6x30) byl aplikován vzorek proteinů získaných frakční precipitací polyethylenglykolem 6000 o objemu 2 ml. Poté byly proteiny eluovány 50 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,6) rychlostí 0,6 ml.min⁻¹. Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita. Frakce 4 až 7 vykazující fenolhydroxylasovou aktivitu byly spojeny, rozděleny do „alíkvotů“ (po 200 µl) a zmrazeny v kapalném dusíku. Následně byly skladovány při -80°C pro další charakterisaci.

Průběh gelové permeační chromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylasy zachycuje **Obr.11**.

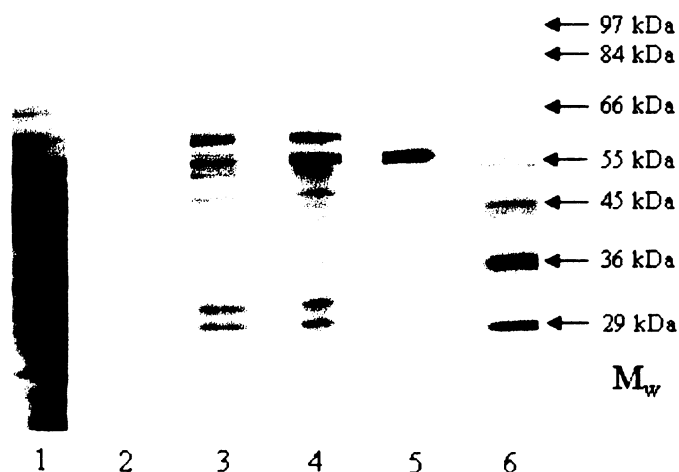
Tento krok byl použit nejen kvůli oddělení dalších proteinů od fenolhydroxylasy, ale i k odstranění PEG 6000. Byl získán enzymový preparát obsahující jako majoritní protein NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (**Obr.12 A**, str. 67, dráha 5).



Obr.11 Gelová permeační chromatografie částečně purifikované fenolhydroxylasy na sloupci Sephacrylu S300. Experimentální podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.5.2.2 (str. 46)

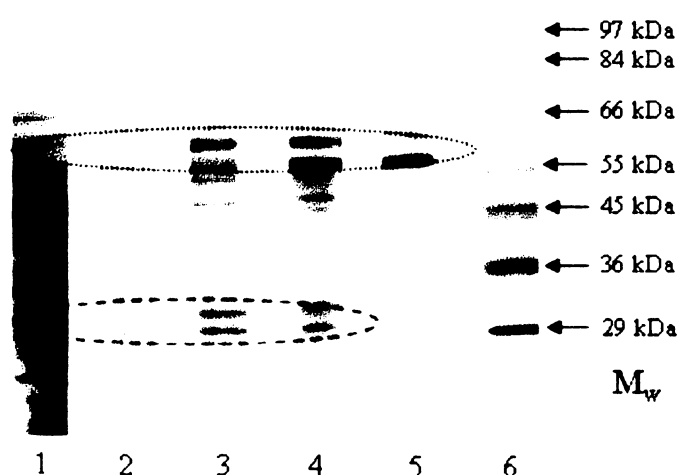
4.2.1.5. Shrnutí efektivity isolačních kroků NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky *C. tropicalis*

Celým isolačním postupem bylo získáno 3,8 mg proteinové frakce vysoce nabožené NADPH-dependentní fenolhydroxylasou. Z **Obr.12 A** je patrné, že se jedná zřejmě o protein, jehož podjednotky mají molekulovou hmotnost okolo 60 kDa.



Obr.12 A Elektroforesa (SDS-PAGE) preparátů fenolhydroxylasy po jednotlivých purifikačních krocích:

- 1: cytosol
- 2: slité frakce 75 až 85 po chromatografii na DEAE Sepharose
- 3: slité frakce 50 až 54 po rechromatografii na DEAE Sepharose
- 4: proteinová frakce po precipitaci PEG 6000
- 5: proteinová frakce po chromatografii na Sephacrylu S300
- 6: standard molekulových hmotností proteinů „Wide Range“



Obr.12 B Elektroforesa (SDS-PAGE) preparátů fenolhydroxylasy po jednotlivých purifikačních krocích, popis je uveden u **Obr.12 A** (červeně je označena NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, růžově je označena oblast pravděpodobného výskytu katechol-1,2-dioxygenasy)

Tab.5 Přehled isolačních kroků NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky *C. tropicalis*

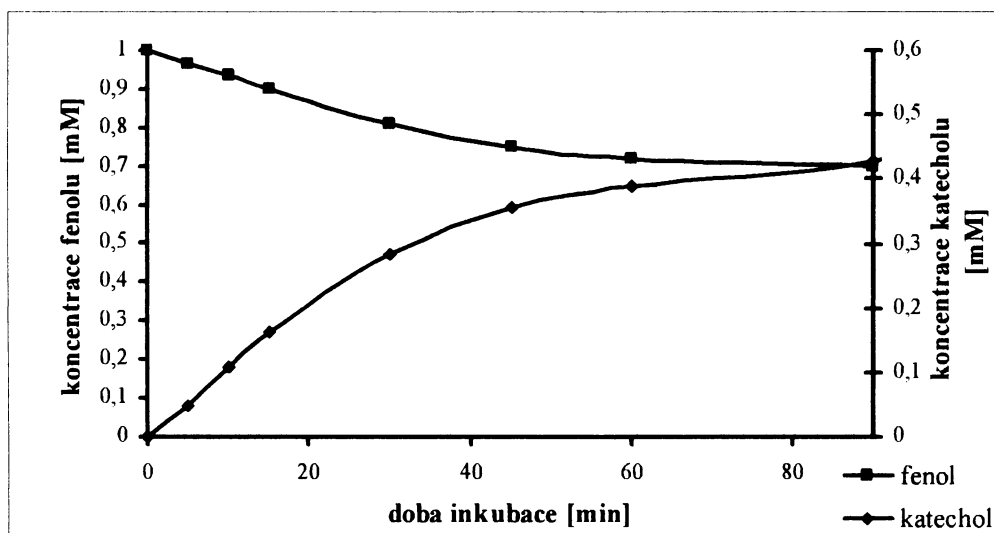
| | koncentrace bílkovin [mg/ml] | fenolhydroxylasová aktivita | | výtěžek [%] |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------|
| | | obecná [nmol/min/ml preparátu] | specifická [nmol/min/mg prot.] | |
| cytosol | 7,35 | 9,59 | 1,30 | 100 |
| chromatografie na DEAE Sepharose | 1,00 | 17,65 | 17,66 | 81,4 |
| rechromatografie na DEAE Sepharose | 0,23 | 12,00 | 52,25 | 19,3 |
| frakční precipitace PEG 6000 | 5,52 | 7,54 | 1,37 | 15,1 |
| chromatografie na Sephacrylu S300 | 0,38 | 8,77 | 22,83 | 3,5 |

Tab.5 (str. 68) shrnuje celkový průběh izolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu kvasinky *C. tropicalis*. Jednotlivými kroky purifikace dochází ke zvyšování specifické aktivity NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, specifická aktivita enzymu byla především zvýšena rechromatografií na sloupci DEAE Sepharosy. Při třetím purifikačním kroku však dochází vlivem interakce fenolhydroxylasy s PEG 6000 k výraznému poklesu fenolhydroxylasové aktivity. Ta je pak částečně obnovena oddělením PEG 6000 na sloupci Sephacrylu S300. Získaný enzymový preparát byl dále částečně charakterisován.

4.3. CHARAKTERISACE ISOLOVANÉ NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY *C. TROPICALIS*

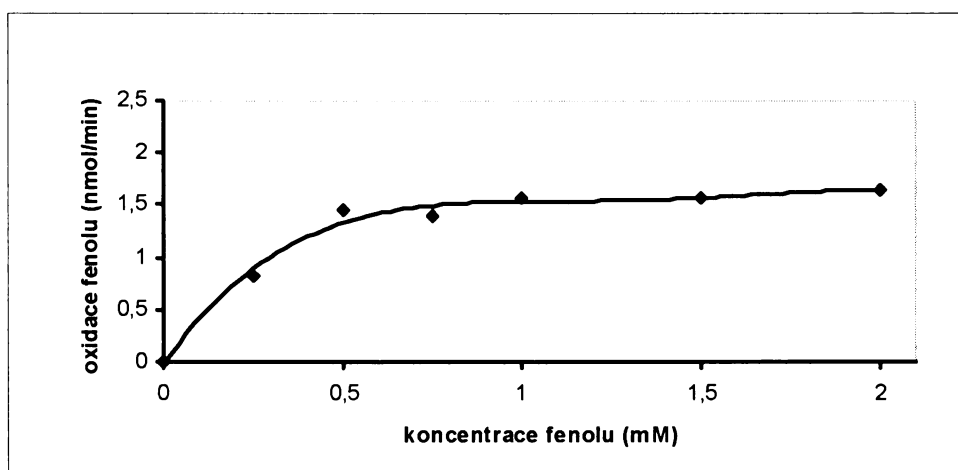
4.3.1. Kinetické charakteristiky NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa kvasinky *C. tropicalis* je enzym, který oxiduje fenol za vzniku katecholu. Při inkubaci fenolhydroxylasy s fenolem dochází k úbytku fenolu. Tomu následně odpovídá nárůst katecholu (**Obr.13**).

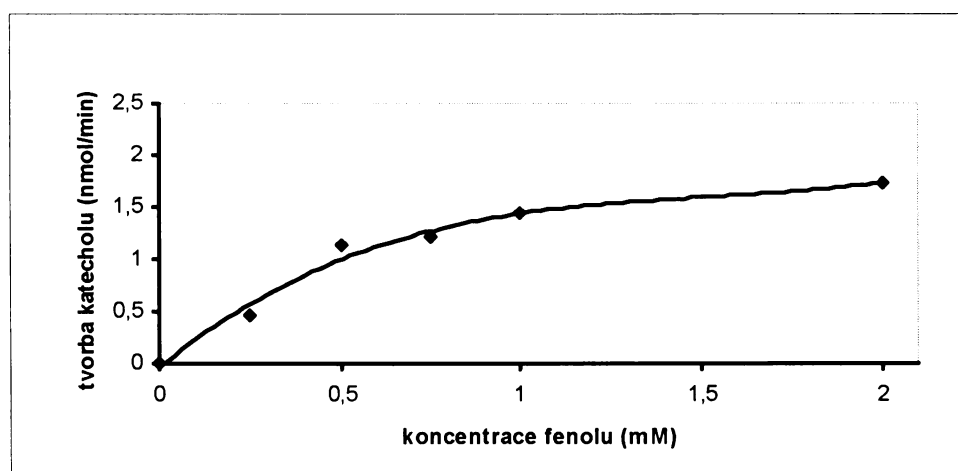


Obr.13 Závislost oxidace fenolu a tvorby katecholu na době inkubace. Reakční směs obsahovala NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (0,038 mg), 1 mM fenol, 1 mM NADPH, jednotlivé reakce byly ukončeny v časech 0-90 min

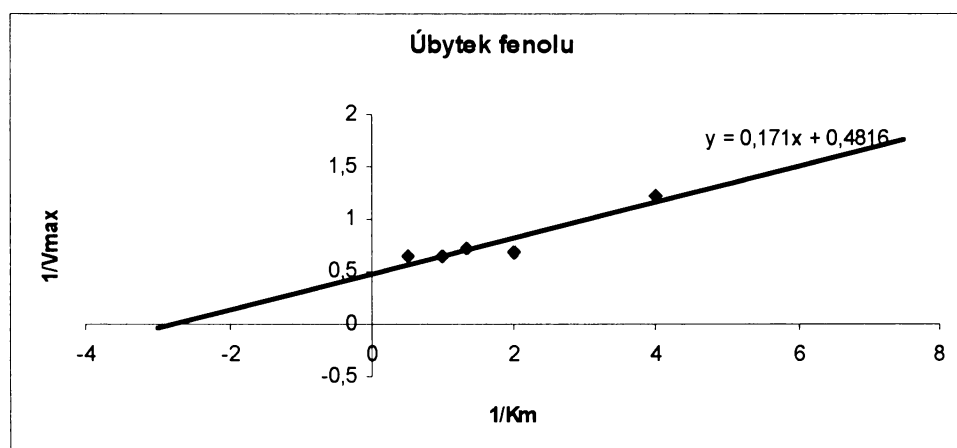
Spotřeba fenolu a tvorba katecholu byla sledována v reakční směsi obsahující izolovanou NADPH-dependentní fenolhydroxylasu, NADPH a různé koncentrace fenolu (**Obr.14 A, B**, str. 71) .



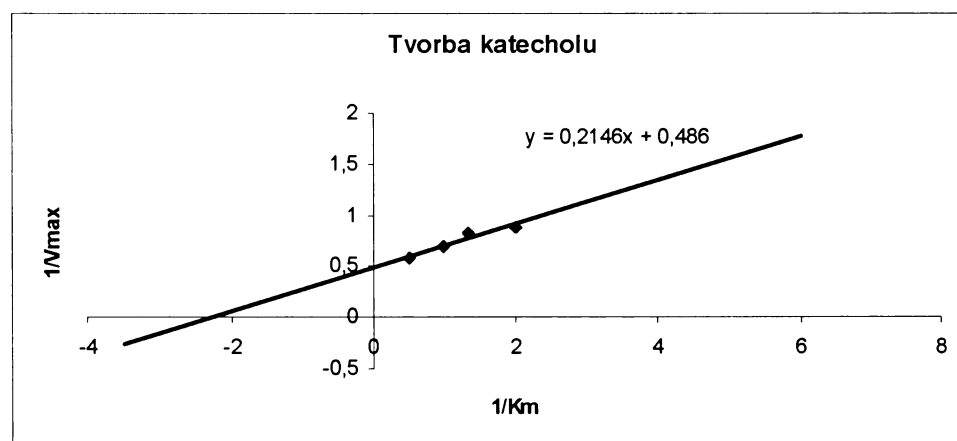
Obr.14 A Závislost počáteční rychlosti oxidace fenolu na koncentraci substrátu (fenolu). Měřena byla spotřeba fenolu, reakční směs obsahovala NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (0,038 mg), 1 mM NADPH, 0-2 mM fenol, doba inkubace byla 30 minut



Obr.14 B Závislost počáteční rychlosti oxidace fenolu na koncentraci substrátu (fenolu). Měřen byl přírůstek katecholu, reakční směs obsahovala NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (0,038 mg), 1 mM NADPH, 0-2 mM fenol, doba inkubace byla 30 minut



Obr.15 A Určení kinetických konstant K_m , V_{max} NADPH-dependentní fenolhydroxylasy pro oxidaci fenolu bylo provedeno dvojnásobným reciprokým vynesemím kinetických dat z **Obr.14 A** (str. 71) odpovídajících koncentracím fenolu 0-0,4 mM



Obr.15 B Určení kinetických konstant K_m , V_{max} NADPH-dependentní fenolhydroxylasy pro oxidaci fenolu bylo provedeno vynesemím $1/v$ proti koncentraci substrátu (fenolu) kinetických dat z **Obr.14 A** odpovídajících koncentrací fenolu 0,5, 0,75, 1 a 2 mM

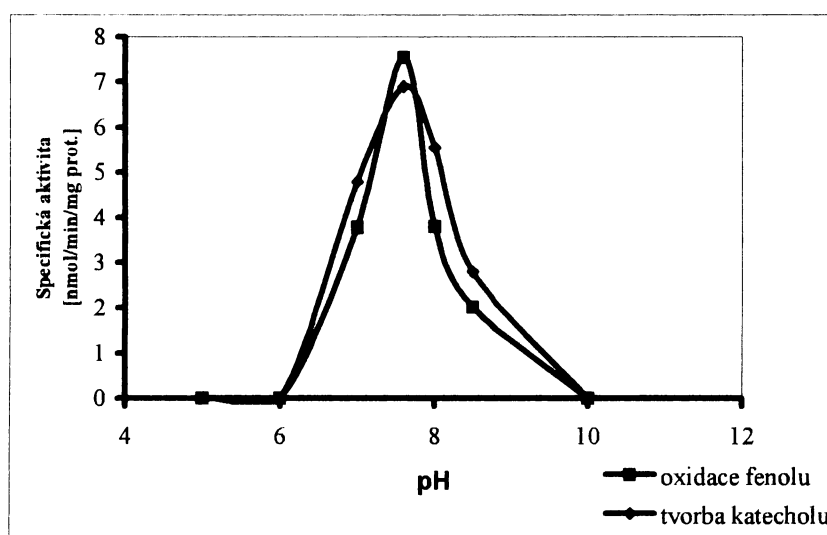
Tab.6 Hodnoty Michaelisovy konstanty K_m a maximální rychlosti reakce V_{max} cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylasy kvasinky *C. tropicalis* pro oxidaci fenolu a tvorbu katecholu. Kinetické konstanty byly určeny z rychlosti přeměny substrátu (fenolu) a vzniku produktu (katecholu)

| reakce | K_m [mM] | V_{max} [nmol/min/mg prot.] |
|------------------|------------|-------------------------------|
| oxidace fenolu | 0,45 | 54,3 |
| tvorba katecholu | 0,45 | 54,4 |

Hodnoty K_m a V_{max} získané jak měřením spotřeby fenolu, tak měřením tvorby katecholu odpovídaly reakční kinetice Michaelise a Mentenové a byly prakticky shodné.

4.3.2. Určení pH optima NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

Pro stanovení pH optima (postup popsán v kapitole 3.6., str. 52) byly použity roztoky 1 M Na-fosfátového pufru v rozmezí pH 5 až 10. pH optimum bylo určeno z křivky závislosti hydroxylace fenolu a tvorby katecholu na pH Na-fosfátového pufru (**Obr. 16**).

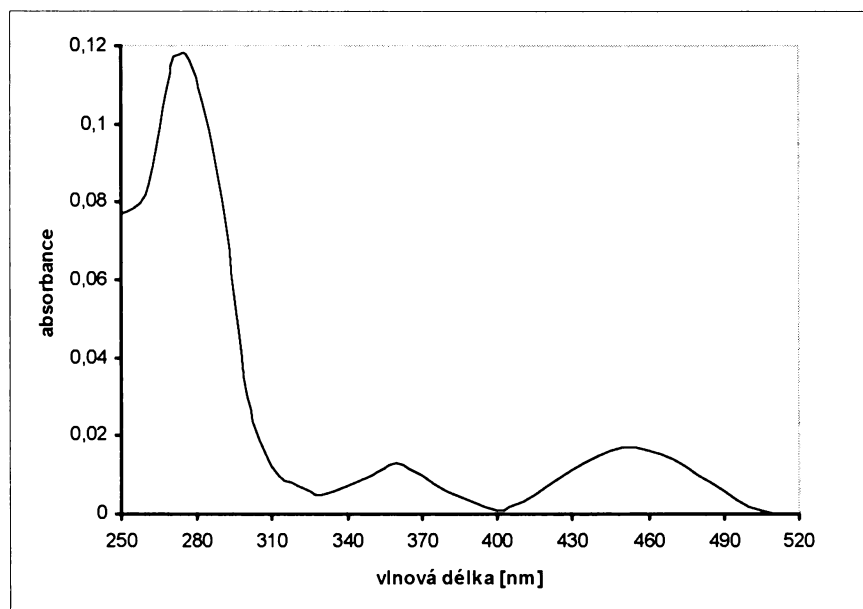


Obr.16 Závislost oxidace fenolu resp. tvorby katecholu na pH

Z **Obr.16** (str. 73) je patrné, že pH optimum NADPH-dependentní fenolhydroxylasy pro hydroxylaci fenolu i tvorbu katecholu leží v oblasti pH 7,4 až 7,6.

4.3.3. Spektrální vlastnosti NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je jasně žlutý enzym, což naznačuje, že se jedná o flavoproteinový enzym. Z výsledků spektrální analýzy enzymu vyplývá, že enzym jako prosthetickou skupinu obsahuje FAD. Spektrum enzymu uvedené na **Obr.17** tuto skutečnost potvrzuje (absorpční maximum v oblasti kolem 460 nm je pro FAD typické).



Obr.17 Absorpční spektrum purifikované NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

4.3.4. N-terminální sekvenace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

Pro určení N-terminální aminokyselinové sekvence fenolhydroxylasy byla zvolena metoda využívající Edmanova odbourávání (kapitola 3.4.7., str. 42, použit byl sekvenátor PROCISE, Applied Biosystems, USA). Analysována byla fenolhydroxylasa na PVDF membráně (metoda Western blot, kapitola 3.4.6., str. 41). Sekvenace byla provedena dvakrát, ale ani v jednom případě se N-terminální sekvenci fenolhydroxylasy nepodařilo určit. Tento fakt nelze v současnosti ještě jednoznačně vysvětlit. Jedním z důvodů může

být skutečnost, že N-koncová aminokyselina enzymu je posttranslačně modifikována. Druhým důvodem může být blokáce N-koncové aminokyseliny ethylenglykolem, monomerem PEG 6000, uvolněným z této sloučeniny při jejím použití pro izolaci enzymu. Přesné vysvětlení této skutečnosti bude předmětem našich dalších studií.

5. DISKUSE

V dnešní době se v našem životním prostředí hromadí řada cizorodých látek, které představují zátěž pro mnoho organismů včetně člověka. Mezi takové environmentální polutanty patří také fenolické látky. U mnohých mikroorganismů byla zjištěna schopnost metabolisovat cizorodé látky a využívat je dokonce jako zdroj energie pro svůj růst. Jedním z těchto mikroorganismů je také kvasinka *Candida tropicalis*, u níž byla prokázána schopnost oxidovat fenol [28]. Studium aerobních biodegradací fenolických látek a poznání enzymových systémů mikroorganismů jako je *C. tropicalis* je tedy jednou z priorit současného výzkumu nejen v České republice, ale i v dalších vyspělých průmyslových zemích. Laboratoř, ve které byla předkládaná práce vypracována, se testováním možností biodegradace fenolu enzymovými systémy nejen kvasinky *C. tropicalis*, ale i jiných mikroorganismů, zabývá již několik let. V případě kvasinky *C. tropicalis* je využíván kmen Ct2, který byl získán z půd kontaminovaných fenolem z oblasti Mostecka.

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, jak je ovlivněna aktivita enzymů participujících na první fázi aerobního metabolismu fenolu, jeho hydroxylaci na katechol, v cytosolu a mikrosomech buněk *C. tropicalis*, které byly kultivovány za dvou rozdílných podmínek. Jmenovitě v laboratorním a poloprovozním měřítku. Dále bylo sledováno, jak jsou aktivity těchto enzymů kvasinky *C. tropicalis* ovlivněny skladováním buněk mikroorganismu při -20°C . Sledovány byly aktivity dvou typů enzymových systémů. Prvním byl systém oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí obsahující cytochrom P450 (CYP) a jeho reduktasu (NADPH:CYP reduktasu). Ten byl v mikrosomech kvasinky *C. tropicalis* jednoznačně prokázán, rovněž jako jeho účinnost v hydroxylaci fenolu na katechol [55]. Druhý byl enzym NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, který je přítomný v rozpustné frakci buněk *C. tropicalis*, cytosolu. Při srovnání obsahu cytochromu P450, aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy a fenolhydroxylasové aktivity v mikrosomální frakci izolované z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v laboratorním a poloprovozním měřítku, bylo zjištěno, že obě mikrosomální frakce obsahují téměř srovnatelná množství CYP a aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy je rovněž srovnatelná. Fenolhydroxylasová aktivita v mikrosomech z buněk kultivovaných v laboratorním měřítku byla však 1,3x vyšší než u buněk pěstovaných v poloprovozním měřítku. Porovnání fenolhydroxylasové aktivity v cytosolárních frakcích izolovaných z buněk kultivovaných obojím způsobem potvrzuje stejný trend jako v případě enzymů izolovaných z mikrosomů *C. tropicalis*.

Specifická aktivita fenolhydroxylasy je 3x vyšší v cytosolu získaném z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v laboratorním měřítku.

Z těchto výsledků vyplývá, že z hlediska aktivity enzymů metabolisujících fenol je pro získání mikrosomálních i cytosolárních subcelulárních frakcí, efektivních v oxidaci fenolu, vhodnější kultivace buněk *C. tropicalis* v laboratorním měřítku. Druhou stránkou věci je však časová i experimentální náročnost takové kultivace. Abychom získali dostatečné množství buněk pro izolaci a charakterisaci enzymů biotransformujících fenol by bylo nutné takovou kultivaci v laboratoři mnohokrát opakovat.

Při zjišťování ovlivnění schopnosti enzymů subcelulárních frakcí izolovaných z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v poloprovozním měřítku a skladovaných při -20°C několik let oxidovat fenol bylo zjištěno, že po třech letech skladování kvasinek došlo k poklesu aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy *C. tropicalis* (4,8x). Významně klesla i fenolhydroxylasová aktivita (14,8x). Obsah cytochromu P450 se snížil pouze 2,6x, ale změny v diferenčních spektrech, charakterisujících stav (formu) cytochromu P450, nasvědčují tomu, že takto dlouhé skladování zmražených buněk mění vlastnosti tohoto enzymu. Také v případě cytosolárních enzymů dochází k poklesu aktivity enzymu hydroxylující fenol (NADPH-dependentní fenolhydroxylasy). Specifická aktivita tohoto enzymu klesla v cytosolární frakci izolované po třech letech skladování buněk 5,5x. Ze zjištěných výsledků je zřejmé, že enzymy mikrosomální i cytosolární frakce kvasinky *C. tropicalis* oxidující fenol jsou pravděpodobně degradovány při skladování za -20°C . Doba skladování zmražených buněk pro další využití musí být tedy minimální.

Dalším úkolem diplomové práce bylo izolovat a charakterisovat cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylasu. Tento enzym oxiduje fenol za tvorby katecholu. Ačkoliv byla cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylasa již v minulosti částečně purifikována [24], bylo nutné izolaci tohoto enzymu optimalisovat, abychom byli schopni získat potřebné množství enzymu pro jeho další charakterisaci.

Při optimalisaci izolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy bylo navázáno na výsledky diplomové práce Mgr. Veroniky Kremláčkové [24]. Jako základní krok purifikace tohoto

enzymu byla zvolena kapalinová iontoměničová chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy. Tímto purifikačním krokem dochází ke značné purifikaci enzymu (specifická aktivita enzymu se zvýšila více než 17krát). Rechromatografie na tomto nosiči pak také významně zvýšila specifickou aktivitu izolované fenolhydroxylasy. Oba tyto purifikační kroky však neřešily problém separace fenolhydroxylasy od katechol-1,2-dioxygenasy, enzymu dalšího kroku biodegradace fenolu v kvasince *C. tropicalis*. Ten byl v tomto mikroorganismu skutečně prokázán [28]. Přítomnost uvedeného enzymu ve frakcích obsahujících fenolhydroxylasu byla zjištěna i v našich experimentech, při měření fenolhydroxylasové aktivity pomocí HPLC.

Jako možný způsob separace katechol-1,2-dioxygenasy byla nejprve testována frakční precipitace síranem amonným, následovaná chromatografií na sloupci Sepharosy 4B, která by měla tyto proteiny o rozdílné molekulové hmotnosti oddělit. Po eluci však byly získány frakce s velmi nízkým obsahem proteinů a aktivita fenolhydroxylasy téměř nebyla detegována. Dále byla testována afinitní chromatografie fenolhydroxylasy na 2'5'ADP-Sepharose. Je totiž známo, že tento nosič interaguje s aktivními centry některých NADP⁺-dependentních enzymů [73]. NADPH-dependentní fenolhydroxylasa z *C. tropicalis* však s 2'5'ADP Sepharosou neinteragovala. Tato skutečnost nás vedla k přípravě (syntese) jiného afinitního nosiče, s ligandem, který má analogickou strukturu se substrátem fenolhydroxylasy, fenolem. Připraven byl nový nosič, 1-(4-OH-benzoyl) aminoheptyl Sepharosa. NADPH-dependentní fenolhydroxylasa s tímto nosičem skutečně interagovala, vážala se na vhodný ligand, ale problémem bylo zpětné uvolnění fenolhydroxylasy z nosiče. Z časových důvodů bylo od tohoto způsobu purifikace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy upuštěno. Nicméně problematika interakce a uvolnění NADPH-dependentní fenolhydroxylasy studované kvasinky s 1-(4-OH-benzoyl) aminoheptyl Sepharosou bude v naší laboratoři předmětem dalších experimentů. Jednalo by se totiž o velmi efektivní krok při purifikaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasy.

Jako další purifikační krok po chromatografii a rechromatografii fenolhydroxylasy na sloupci DEAE Sepharosy byla testována také frakční precipitace polyethylenglykolem 6000 do 20 % nasycení. Tento purifikační krok se ukázal jako velmi účinný. Frakční precipitací proteinů PEG 6000 se totiž téměř podařilo oddělit NADPH-dependentní

fenolhydroxylasu od katechol-1,2-dioxygenasy. Získaný enzymový preparát již katechol nepřeměňoval. Precipitace enzymu pomocí PEG 6000 však vedla ke snížení jeho fenolhydroxylasové aktivity. Pro oddělení PEG 6000 od vzorku byla zvolena gelová permeační chromatografie na sloupci Sephacrylu S300 (kapitola 3.5.4.2., str. 51). Celým isolačním postupem bylo získáno 3,8 mg proteinové frakce vysoce nabožené NADPH-dependentní fenolhydroxylasou, která je vhodná pro určení enzymových charakteristik.

Z hlediska enzymové charakterisace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy byly určeny kinetické konstanty K_m a V_{max} pro fenol jako substrát enzymu a katechol jako produkt jeho enzymové oxidace. Zjištěné kinetické charakteristiky enzymu plně odpovídají charakteristikám preparátu, který byl v naší laboratoři izolován a charakterisován již dříve [24]. Kinetiky určující hodnoty K_m a V_{max} , získané jak měřením spotřeby fenolu, tak tvorby katecholu odpovídaly reakční kinetice Michaelise a Mentenové a byly prakticky shodné.

Dále bylo pro hydroxylaci fenolu a tvorbu katecholu, katalysované NADPH-dependentní fenolhydroxylasou *C. tropicalis* určeno pH optimum. To se pohybuje v rozmezí hodnot 7,4 až 7,6.

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je řazena mezi flavinové enzymy. Této skutečnosti nasvědčuje i jasně žlutá barva získané proteinové frakce nabožené NADPH-dependentní fenolhydroxylasou. Z výsledků spektrální analýzy enzymu vyplývá, že enzym jako prosthetickou skupinu obsahuje FAD. Spektrální vlastnosti enzymu tuto skutečnost potvrzují (absorpční maximum v oblasti kolem 460 nm je pro FAD typické).

Předmětem diplomové práce byla rovněž snaha porovnat aminokyselinové složení izolované fenolhydroxylasy se složením fenolhydroxylas jiných mikroorganismů. Pro určení N-terminální aminokyselinové sekvence fenolhydroxylasy byla zvolena metoda využívající Edmanova odbourávání. Určení N-terminální sekvence fenolhydroxylasy však nebylo úspěšné. Použitou metodou nebyla detegována žádná z aminokyselin enzymu. Tento fakt nelze v současnosti ještě jednoznačně vysvětlit. Jedním z důvodů může být skutečnost, že N-koncová aminokyselina enzymu je posttranslačně modifikována. Druhým důvodem může být blokáce N-koncové aminokyseliny ethylenglykolem, monomermem PEG

6000, uvolněným z této sloučeniny při jejím použití pro izolaci enzymu. Přesné objasnění této skutečnosti bude předmětem našich dalších studií.

6. ZÁVĚR

Cíle předkládané diplomové práce, kterými bylo rozšířit poznatky o enzimech, které se podílejí na biodegradaci fenolu kvasinkou *Candida tropicalis*, byly splněny. Zjištěny byly následující poznatky:

- A) 1) Aktivita enzymů participujících na první fázi aerobního metabolismu fenolu, jeho hydroxylaci na katechol, v cytosolu a mikrosomech buněk *C. tropicalis*, je ovlivněna kultivací buněk za rozdílných podmínek: v laboratorním a poloprovozním měřítku. Ačkoliv jsou obsah cytochromu P450 a aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy v mikrosomální frakci získané izolací z buněk kultivovaných v laboratorním i poloprovozním měřítku prakticky stejné, v mikrosomech buněk pěstovaných v laboratorním měřítku byla detegována 1,3x vyšší fenolhydroxylasová aktivita než v případě kultivace v poloprovozním měřítku. Porovnáním fenolhydroxylasové aktivity v cytosolárních frakcích izolovaných z buněk kultivovaných obojím způsobem se potvrzuje stejný trend jako v případě enzymů izolovaných z mikrosomů *C. tropicalis*. Specifická aktivita fenolhydroxylasy v cytosolu získaném z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v laboratorním měřítku je 3x vyšší, než u buněk kultivovaných v poloprovozním měřítku.
- 2) Při studiu ovlivnění schopnosti enzymů subcelulárních frakcí izolovaných z buněk *C. tropicalis* kultivovaných v poloprovozním měřítku a skladovaných při -20°C několik let oxidovat fenol bylo zjištěno, že s rostoucí dobou skladování zmražených buněk dochází k poklesu fenolhydroxylasové aktivity těchto enzymů. V mikrosomální frakci po třech letech skladování buněk byla detegována aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy 4,8x nižší, než byla bezprostředně po kultivaci buněk *C. tropicalis*. Významně klesla i fenolhydroxylasová aktivita (14,8x). Obsah cytochromu P450 se snížil 2,6x, a změny v diferenčních spektrech, charakterisujících stav (formu) cytochromu P450, nasvědčují tomu, že dlouhé skladování zmražených buněk negativně ovlivňuje vlastnosti tohoto enzymu. V případě cytosolárních enzymů dochází rovněž k poklesu aktivity enzymu, který oxiduje fenol (NADPH-dependentní

fenolhydroxylasy). Specifická aktivita tohoto enzymu klesla v cytosolární frakci izolované po třech letech skladování buněk 5,5x.

B) Byl optimalisován postup, kterým lze z cytosolu kvasinky *C. tropicalis* izolovat NADPH dependentní fenolhydroxylasu, tedy enzym *C. tropicalis*, který se majoritně podílí na prvním kroku biodegradace fenolu tímto mikroorganismem. Isolační postup zahrnuje následující čtyři kroky:

- 1) chromatografií na sloupci DEAE Sepharosy následovanou dialysou získaných frakcí
- 2) rechromatografií na sloupci DEAE Sepharosy následovanou dialysou získaných frakcí
- 3) separaci proteinů srážením PEG 6000 do 20 % nasycení
- 4) gelovou permeační chromatografií na sloupci Sephacrylu S300

Tímto postupem bylo získáno 3,8 mg proteinové frakce vysoce nabohacené NADPH-dependentní fenolhydroxylasou.

C) Purifikovaná NADPH-dependentní fenolhydroxylasa byla částečně charakterisována:

- 1) Kinetika enzymové oxidace fenolu na katechol, katalysované NADPH-dependentní fenolhydroxylasou, odpovídá reakční kinetice Michaelise a Mentenové. Hodnota Michaelisovy konstanty (K_m) pro fenol je 0,45 mM, maximální rychlost (V_{max}) oxidace fenolu na katechol je 54,3 nmol/min/mg proteinu.
- 2) pH optimum hydroxylace fenolu na katechol, katalysované NADPH-dependentní fenolhydroxylasou, leží v oblasti pH 7,4 až 7,6.
- 3) Určením spektrálních vlastností enzymu bylo potvrzeno, že NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je flavinový enzym.
- 4) N-terminální aminokyselina NADPH-dependentní fenolhydroxylasy je blokována, což zabránilo určení její N-terminální sekvence

7. LITERATURA

- [1] Masák, J., Plechová, J., Plachý, J.: Speciální mikrobiální technologie, VŠCHT Praha (1992)
- [2] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J.: *Bullet. Čs. spol. biochem. molekul. biol.* **28**, 57 (2000)
- [3] Šulc, M.: Diplomová práce, PřF UK (1995)
- [4] Suchá, V.: Diplomová práce, PřF UK (2002)
- [5] Prokeš, J.: *Základy toxikologie II*, Karolinum, str. 7,40 (1998)
- [6] McMurry, J.: *Organic chemistry - Sixth edition*, Brooks/Cole, str. 587-595 (2004)
- [7] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology
- [8] www.nsc.org (National Safety Council)
- [9] Vohlídal, J. a kol.: *Chemické tabulky* (1982)
- [10] Piskač, P., Čermák, V.: *Ekotoxikologická databáze* (<http://plumbum.ceu.cz>)
- [11] Tichý, M.: *Toxikologie pro chemiky*, Karolinum (1998)
- [12] Koturi G., Robinson C. V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 539 (1991)
- [13] Páca, J. Jr., Páca, J., Kostečková, A., Stiborová, M.: *Sborník příspěvků: VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno 3.– 4. 2. 2003* (Wimmerová, M., Beneš, P. Ed.), str. 59. Vydavatelství MU, Brno-Kraví Hora (2004)
- [14] Burbac, B. L., Perry, J. Z.: *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1025 (1993)
- [15] Hensel, Z., Straube G.: *Ant. Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **57**, 33 (1990)
- [16] Komárková, E., Páca, J., Klapková E., Stiborová, M., Soccol, C. R., Sobotka, M.: *Arch. Biol. & Technol.* **46**, 537 (2003)
- [17] Hutshionson, D. H., Robinson, C. V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 599 (1988)
- [18] Anselmo, A. M., Cabral, J. M. S., Novais, J. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 200 (1989)
- [19] Ijah, U.J.J.: *Waste management* **18**, 293-299 (1998)
- [20] Vodrážka, Z.: *Biochemie III*, Academia Praha, str. 89 (1993)
- [21] Merkerová, M.: Diplomová práce, VŠCHT Praha (2003)
- [22] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Victoria publishing, str.59 (1995)
- [23] Bastos, A. E., Moon, D. H., Rossi, A., Trevors, J. T., Tsai, S. M.: *Arch. Microbiol.* **174**(5), 346-352 (2000)
- [24] Páca, J. Jr.: Disertační práce, PřF UK (2005)

- [25] Harayama, S., Kok, M., Neidle, E. L.: *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565 (1992)
- [26] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. JR., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004)
- [27] Stiborová, M., Mikšanová, M., Martínek, V., Frei, E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 297 (2000).
- [28] Krug, M., Straube, G.: *J. Basic. Microbiol.*, 26, 271 (1986)
- [29] Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P.: *FEBS Lett.* 232, 378 (1988)
- [30] Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F., Hughes, M. F.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 1 (1990)
- [31] Williamson, D. G., O'Donnee, V. J.: *Biochemistry* 8, 1289-1300 (1969)
- [32] Reiniš, M.: Diplomová práce, PřF UK, Praha (1985)
- [33] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999).
- [34] Brodie, B. B., Axelrod, J., Cooper, J. R., Gaudette, L. E., LaDu, B. N., Mitoma, C., Udenfriend, S.: *Science N. Y.* 121, 603-604 (1955)
- [35] Claudie, A.: *Microsomes Endoplasmatic Reticulum and Interactions of Cytoplasmic Membranes*, Academic Press, London (1969)
- [36] Klingerberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 76, 376-386 (1958)
- [37] Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958)
- [38] Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 237, 1375-1376 (1962)
- [39] Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 (1964)
- [40] Estabrook, R. W., Cooper, D. Y. Rosenthal, O.: *Biochem. Z.* 388, 741-747 (1963)
- [41] Cooper, D. Y., Levin, S. S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., Estabrook, R. W.: *Science* 147, 400-403 (1965)
- [42] Lu, A. Y. H., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 243, 1331-1332 (1968)
- [43] Dus, K., Katagiri, M., Yu, C. A., Erbes, D. L., Gunselus, I. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1423 (1970)
- [44] Graham, S. E., Peterson, J. A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 24-29 (1999)
- [45] Graham, S. E., Truan, G., Peterson, J. A., Falck, J. R., Wei, S., Helvig, C., Capdevila, J. H.: *J. Biol. Chem.* 272, 1127-1135 (1997)
- [46] Ichikawa, Y., Hiwatashi, A.: *Biochem. Biophys. Acta* 705, 82 (1982)
- [47] White, R. E., Coon, M. J.: *Annu. Rev. Biochem.* 49, 315-355 (1980)

- [48] Champion, P. M., Stallard, B. R., Wagner, G. C., Gunsalus, I. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5469-5472 (1982)
- [49] Hahn, J. E., Hodgson, K. O., Andersson, L. A., Dawson, J. H.: *Biol. Chem.* 257, 10934-10941 (1982)
- [50] Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Eatebrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzales, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okada, K., Nebert, D. W.: *DNA Cell Biol.* 12, 1 (1993)
- [51] Moulisová, V.: Diplomová práce, PŘF UK (2001)
- [52] Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., Deisenhofer, J. *Structure* 3, 41-62 (1995)
- [53] Leighton, J. K., Kemper, B.: *J. Biol. Chem.* 259, 11165 (1984)
- [54] Drašner, M.: Diplomová práce, PŘF UK, Praha (1985)
- [55] Stiborová, M., Suchá, V., Mikšanová, M., Páca, J. Jr, Páca, J.: *Gen. Physiol. Biophys.* 22, 167 (2003).
- [56] Gallo, M., Roche, B., Azoulay, E.: *Biochem. Biophys. Acta* 419 (3), 425-434 (1976)
- [57] Schacter, B. A., Nelson, E. B., Karcer, H. S., Masters, S. S. B.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972)
- [58] Wang, M., Roberts, L. D., Paschke, R., Shea, M. T., Masters, S. S. B., Kim P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8411 (1997)
- [59] Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Masery, V., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 256, 266 (1981)
- [60] Oprian, D. D., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.* 257, 8935 (1982)
- [61] Fu, P. P.: *Drug Metab. Rev.* 22, 209 (1990).
- [62] Arlt, V. M., Stiborová, M., Hewer, A., Schneider, H. H., Philips, D. H.: *Cancer Res.* 63, 2752 (2003)
- [63] Stiborová, M., Frei, E., Wiessler, M., Schneider, H. H.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1128 (2001).
- [64] Nakagawa, H. Y., Takeda, Y.: *Biochem. Biophys. Acta* 62, 423-426 (1972)
- [65] Neujahr, H. Y., Gall, A.: *Eur. J. Biochem.* 35, 386 (1973)
- [66] Sejlitz, T., Wernstedt, Ch., Engström, A., Neujahr, H. Y.: *Eur. J. Biochem.* 187, 225 (1990)
- [67] Dong, X., Ballou, D. P., Masery, V.: *Biochemistry* 40, 12369 (2001)

- [68] Ivoilov, V. S., Karasevich, I. N.: Microbiol. 52(6), 956-961 (1983)
- [69] Barthová, J., Sofrová, D., Tichá, M.: Základní praktikum z biochemie. UK Praha, str. 67 (1984)
- [70] Sottocasa, G. L., Kuylenstierna, I., Bergstrand, A.: J. Cell Biol. 32, 415-438 (1967)
- [71] Kremláčková, V.: Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2005)
- [72] www.protocol-online.org
- [73] www.chromatography.amershambiosciences.com

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

| Jméno, příjmení a adresa | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|--------------------------|----------|-----------------|----------|
| | | | |