

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Katedra biochemie



ISOLACE A CHARAKTERISACE CYTOCHROMU P450 3A4 Z MEMBRÁN *E. COLI*

Bakalářská práce

Martin Stráňava

Školitelka: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Věra Kotrbová, Ph.D.

Praha 2009

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233148822

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením **RNDr. Lucie Bořek-Dohalské, Ph.D.** a **RNDr. Věry Kotrbové, Ph.D.** a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 28.5.2009



.....

Martin Stráňava

Rád bych poděkoval mým školitelkám **RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D.** a **RNDr. Věře Kotrbové, Ph.D.** za vynikající odborné a pedagogické vedení, za zadání zajímavého tématu a všestrannou pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Pavlovi Součkovi, CSc. za poskytnutí bakteriálních membrán a celému kolektivu laboratoře za vytvoření vhodných pracovních podmínek.

OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů	6
1 Úvod	8
1.1 Biotransformace xenobiotik	8
1.2 Monooxygenasový systém (MFO systém)	9
1.2.1 Cytochromy P450	9
1.2.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa.....	13
1.2.3 Cytochrom b ₅	15
1.3 Lidské cytochromy P450.....	16
1.3.1 Cytochrom P450 3A4	18
1.3.2 Heterologní exprese biotransformačních enzymů	20
2 Cíl bakalářské práce.....	22
3 Materiál a metody.....	23
3.1 Použitý materiál a chemikálie	23
3.2 Použité přístroje.....	25
3.3 Metody.....	25
3.3.1 Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny	25
3.3.2 Stanovení koncentrace cytochromu P450.....	26
3.3.3 Solubilisace.....	27
3.3.4 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B.....	28
3.3.5 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu	29
3.3.6 Chromatografie na koloně CM-Sepharosy CL6B	29
3.3.7 Odstranění detergentu pomocí silikagelu	30
3.3.8 Diskontinualní elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE).....	31
3.3.9 Metoda „Western Blotting“	32
3.3.10 Imunochemická detekce CYP 3A4.....	32

3.3.11 Stanovení aktivity CYP3A4 pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).....	33
4 Výsledky a diskuse.....	35
4.1 Isolace CYP3A4 z membrán <i>E. coli</i>	35
4.1.1 Solubilisace.....	35
4.1.2 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B.....	35
4.1.3 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu.....	39
4.1.4 Chromatografie na koloně CM-Sepharosy	39
4.1.5 Odstranění detergentu E-911 pomocí silikagelu	40
4.1.6 Charakterisace frakcí z průběhu izolace CYP3A4	43
4.2 Stanovení enzymové aktivity CYP3A4 na základě oxidace testosteronu	45
5 Závěr	48
6 Seznam použité literatury.....	49

Seznam použitých zkratk a symbolů

A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát
CM-Sepharosa CL6B	karboxymethyl-Sepharosa CL6B
CYP	cytochrom P450
Da	dalton
DEAE-Sepharosa CL6B	diethylaminoethyl-Sepharosa CL6B
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DTT	dithiotreitol
EDTA Na₂	dvojsodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
F1	frakce 1
F2	frakce 2
EtOH	ethanol
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadeninmononukleotid
GIT	gastrointestinální trakt
HAP	hydroxylapatit
HEPES	sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IgY, IgG	imunoglobulin třídy Y, G
MFO	monooxygenásový systém se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NS	nízkospinový stav

PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer system)
PVDF	polyvinilidenfluorid
RH	substrát
RED	NADPH: CYP reductasa
ROH	hydroxylovaný produkt
R*OOH	organický peroxid
RPM	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforesa v prostředí dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
SG	silikagel
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TST	testosteron
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITON	t-oktylfluoxypolyetoxyethanol
VS	vysokospinový stav
ϵ	molární absorpční koeficient
E-911	emulgen 911 (neiontový detergent)

1 Úvod

V současné době, díky rozvinutému chemickému i farmaceutickému průmyslu, přichází člověk do kontaktu s obrovským množstvím cizorodých látek (xenobiotik) mnohem častěji než v minulosti. Ve většině případů je působení xenobiotik a jejich vliv na organismus jen velmi málo prozkoumán, nebo dokonce není znám. Právě proto je v dnešní době výzkum zaměřený na enzymové systémy participující na metabolismu xenobiotik vysoce aktuální a velkou mírou přispívá k odhalení účinků těchto cizorodých látek na živé organismy.

1.1 Biotransformace xenobiotik

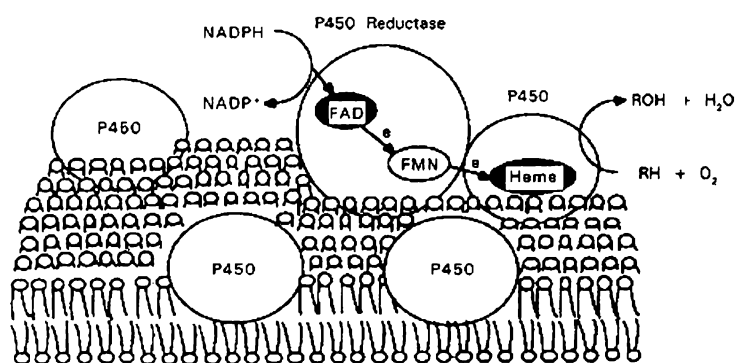
Téměř všechna xenobiotika jsou po vstupu do lidského organismu metabolisována na polárnější látky za účelem snadnějšího a rychlejšího vyloučení z těla. Ve většině případů tyto tzv. biotransformační reakce probíhají ve dvou fázích [1]. První fáze, tzv. derivatizační, zahrnuje soubor reakcí, které vedou ke zvýšení polaritě daného xenobiotika (děje oxidační, redukční, vytvoření nebo odkrytí funkčních skupin v molekule). Ve druhé fázi (konjugační) dochází ke konjugaci cizorodé látky s látkami endogenními (např. glutathion, kyselina glukuronová) a vyloučení z organismu [1,2].

Metabolických přeměn první fáze biotransformace se ve velké míře účastní **systém monoxygenas se smíšenou funkcí (MFO)**, jehož součástí jsou i enzymy nazvané **cytochromy P450** [3]. Tento systém neslouží pouze k odstraňování cizorodých látek z těla, ale také plní důležité funkce v biosynthese mnohých endogenních sloučenin, např. mastných kyselin, steroidních hormonů, prostaglandinů, cholesterolu. U exogenních látek se tyto enzymy podílejí na metabolismu chemikálií produkovaných jak cílevědomě, jako jsou např. léčiva, anestetika, agrochemikálie, tak i různých vedlejších a odpadních produktů, jako jsou např. zplodiny hoření obsahující benzo(a)pyren, nitrosaminy, aromatické aminy, organická rozpouštědla. Mnohé z těchto sloučenin patří do skupiny tzv. prokarcinogenů. Ty jsou v organismu systémem cytochromů P450 přeměňovány na vlastní karcinogenní látky, jejichž působení může vyvolat vznik nádorového onemocnění [4].

1.2 Monooxygenasový systém (MFO systém)

Monooxygenasový systém (MFO, mixed-function oxidase) je vícesložkový systém nescifických oxygenas. U eukaryot se nachází vázaný na vnější membránu hladkého i drsného endoplasmatického retikula nebo na membránu mitochondrií [5, 6]. Mezi jeho tři základní části patří **cytochrom P450** (kap. 1.2.1), který má funkci terminální oxidasy, **NADPH:cytochrom P450 reduktasa** (kap. 1.2.2), sloužící jako dělič elektronového páru a **membrána endoplasmatického retikula** (obr. 1) [3]. Tento systém se v největší míře vyskytuje v játrech, ledvinách, plicích a GIT, tedy v orgánech nejvíce exponovaných látkám cizorodé povahy [4]. Ty, které se nacházejí na mitochondriální membráně, zejména v kůře nadledvin, participují na metabolismu endogenních látek jako jsou steroidy nebo mastné kyseliny [7]. Prokaryotické cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné v cytoplazmě [8].

V některých případech může být součástí monooxygenasového systému **cytochrom b₅** (kap. 1.2.3) a příslušná **NADH:cytochrom b₅ reduktasa** [3].



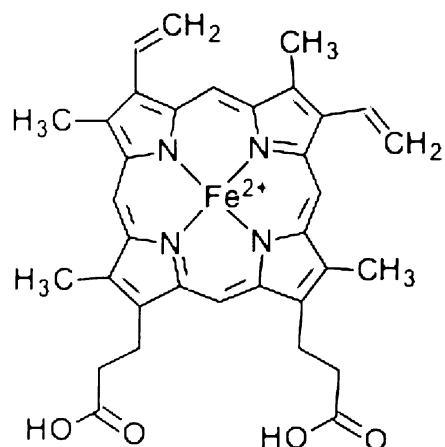
Obr. 1 Schéma uspořádání MFO v membráně endoplasmatického retikula [9]

1.2.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou přítomny téměř ve všech živých organismech. Byly nalezeny u savců [10], rostlin [11] i bakterií [12]. Jedná se o celou skupinu evolučně velmi starých proteinů, které se vyvíjeli cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archaeobakterií se do současnosti vyvinulo velké množství genů kódujících cytochromy

prokaryotních i eukaryotních organismů [4]. Byly objeveny v roce 1958 jako pigmenty, které v redukovaném stavu absorbují v komplexu s oxidem uhelnatým při 450 nm (z tohoto pochází i číselné označení 450 v názvu) [13].

Cytochromy P450 patří mezi **hemoproteiny typu b**. Aktivní místo těchto enzymů obsahuje Fe-protoporfyrin IX (**obr.2**) vázaný na apoprotein hydrofobními, koordinačními a



iontovými silami. První čtyři valence železa tvoří dusíky tetrapyrrolového kruhu. Thiolátová síra sulfhydrylové skupiny cysteinu je pátým ligandem železa protoporfyrinu IX a šestým ligandem je obvykle atom kyslíku molekuly vody [4]. Kromě kyslíku molekuly vody mohou jako šestý ligand sloužit i $-OH$ nebo $-COOH$ skupiny postranních řetězců aminokyselin apoproteinu nebo exogenních látek [3, 14].

Obr. 2 *Struktura Fe-protoporfyrinu IX* [15]

Nomenklatura cytochromů P450

Skupina cytochromů P450 tvoří tzv. „super-rodinu“ genů, která je dále rozdělena do rodin a podrodin na základě podobnosti aminokyselinové sekvence. Proteiny jedné rodiny by měli mít primární strukturu identickou z více než 40 %. Proteiny stejné podrodiny z více než 55 % [16]. Příslušnost k „super-rodině“ cytochromů P450 se označuje zkratkou CYP. Rodiny jsou označeny arabskými číslicemi, podrodiny velkými písmeny (A-Q) a individuální enzymy opět arabským číslem. Například enzym, který má označení CYP1A2 patří do rodiny 1, podrodiny A a jeho vlastní označení charakterisuje číslo 2.

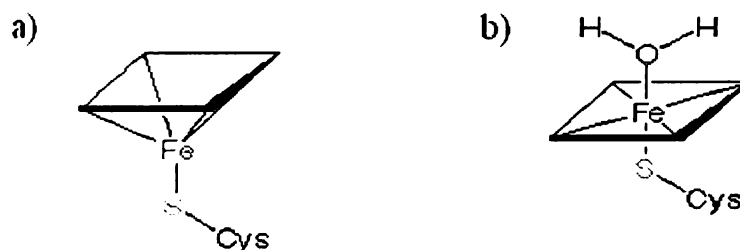
Spinové formy železa v cytochromu P450

Oxidovaný ion železa (Fe^{3+}) ve struktuře hemu cytochromu P450 má 5 valenčních elektronů v *d* orbitalech, které se mohou nacházet ve dvou uspořádáních [3, 7]:

- 1. Vysokospinový stav (VS)** - kdy jsou všechny valenční *d* elektrony železa nespárovány. Celkový spin je $5/2$. Atom železa je v tomto případě

pentakoordinovaný a vytahován atomem síry cysteinu mimo rovinu porfyrinového skeletu (**obr. 3a**). Tato forma vykazuje maximum absorbance Soretova pásu při 390 nm [7].

2. **Nízkospinový stav (NS)** - kdy má železo ve svých *d* orbitalech 4 párové a 1 nepárový elektron. Jeho celkový spin je 1/2. Maximum absorbance se nachází při 418 nm. Atom železa v nízkospinovém stavu je hexakoordinován, interaguje tedy ještě s jedním ligandem, kterým může být kyslík z molekuly vody, -OH nebo -COOH skupiny postranních řetězců aminokyselin v aktivním centru proteinu [3]. Atom železa se nachází v rovině porfyrinového skeletu (**obr. 3b**).



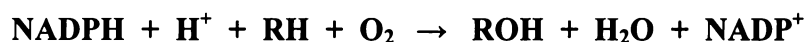
Obr. 3 *Struktury spinových forem atomu železa* [15]

- a) *vysokospinová forma*
b) *nízkospinová forma*

V mikrosomech jsou oba tyto stavy v rovnováze. Poměr VS/NS stoupá s rostoucí teplotou a vlivem vazby substrátu do aktivního centra enzymu, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu vysokospinové formy. Klesá v přítomnosti ligandů železa [3].

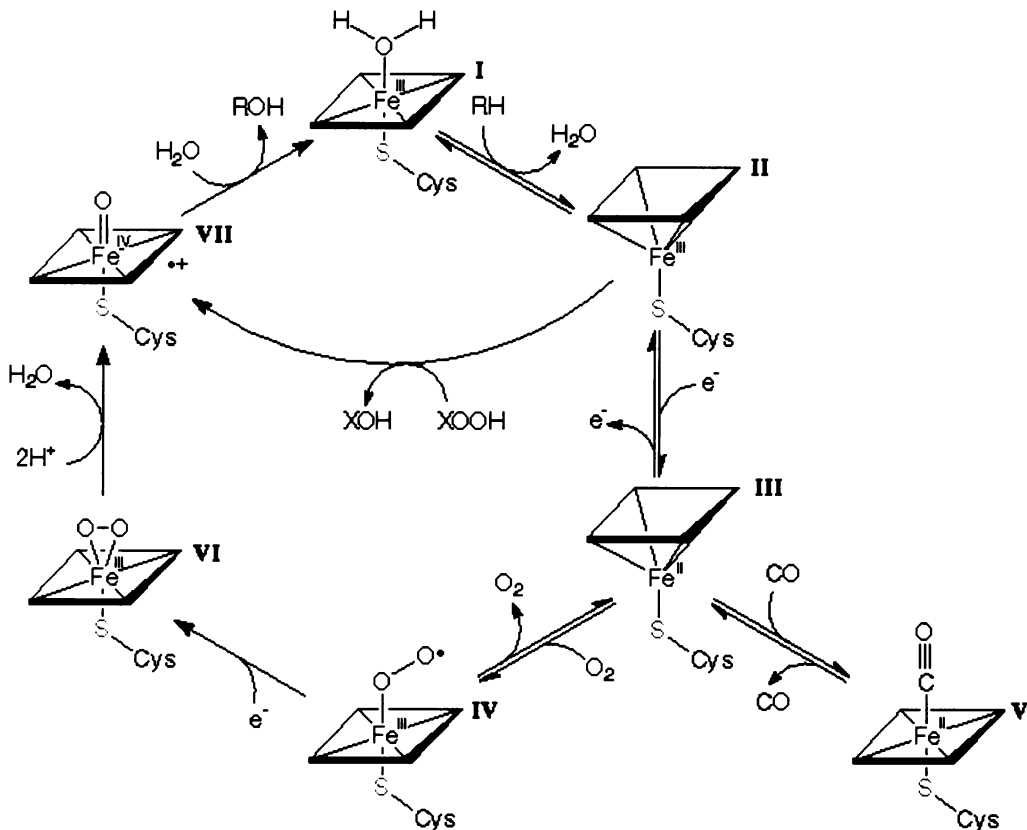
Katalytický mechanismus cytochromů P450

Funkce cytochromů P450 při oxidační biotransformaci cizorodých látek se dá zjednodušeně vyjádřit rovnicí



Tato rovnice poukazuje na to, že se jedná o monoxygenázovou reakci, při které vzniká hydroxylovaný produkt (ROH, oxygenasová funkce) jako výsledek navázání jednoho atomu z molekuly kyslíku na substrát (RH). Druhý atom kyslíku je redukován za vzniku molekuly vody. Zdrojem redukčních ekvivalentů pro redukci cytochromu P450 je

především NADPH. V některých případech to může být i NADH. Jako zdroj kyslíku mohou cytochromy P450 využívat nejen molekulární kyslík (O_2), ale i kyslík pocházející z peroxidů nebo peroxokyselin (není již potřebný zdroj redukčních ekvivalentů) [16]. Pokud je látka dobrým ligandem železa, mohou cytochromy P450 fungovat i jako reductasy. Elektrony z cytochromu P450 jsou předávány přímo substrátu, který je takto redukován [17]. V případě, že aktivovaná molekula kyslíku není zabudovaná do substrátu (některé vysoce hydrofobní látky), může dojít k jejímu uvolnění do prostředí, kde přijme dva protony a vzniká peroxid vodíku [7].



Obr. 4 Reakční cyklus cytochromu P450, zobrazena je i peroxidasová aktivita (vznik komplexu VII z komplexu II), RH-substrát, ROH-hydroxylovaný produkt, XOOH-peroxid [15]

Reakční cyklus cytochromu P450 je schématicky znázorněn na **obr. 4**. V klidovém stavu, bez navázaného substrátu, je železo hemu ve ferri formě (Fe^{III}) a hexakoordinované (nízkospinový stav). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody (I). Po vstupu substrátu (RH) do aktivního centra dochází k vytlačení molekuly vody, železo se stává

pentakoordinované (vysokospinový stav) a zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu (II). Následně interakcí cytochromu P450 s NADPH:CYP reduktasou dochází k jednoelektronové redukci železa na Fe^{II} (ferro forma). Železo zůstává pentakoordinováno (III). Enzym v této formě je pak schopný vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy, např. molekulu oxidu uhelnatého (V). Po navázání kyslíku dochází k přenosu elektronu z Fe^{II} na kyslík a k vytvoření ternárního ferri-superoxidového ($Fe^{III}-O_2$) komplexu (IV), kde je železo opět hexakoordinováno. Tento nepříliš stabilní komplex je redukován NADPH:CYP reduktasou nebo cytochromem b_5 prostřednictvím NADH:cytochrom b_5 reduktasy. Dochází k aktivaci kyslíku ve formě peroxidového aniontu ($Fe^{III}-O_2^{2-}$). Druhý elektron musí být doručen dostatečně rychle, jinak se komplex rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku. Po druhé redukci je komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku je redukován elektrony z NADPH nebo NADH za vzniku molekuly vody. Druhý atom zůstane navázán na železe hemu a vzniká ferrioxeniový komplex (VII) stabilizovaný mezomerním posunem elektronů z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na železe hemu. Následně dochází k rekombinaci radikálů za vzniku hydroxylovaného produktu (ROH) a obnovení nativní formy cytochromu P450 [8].

1.2.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Mikrosomální NADPH:CYP reduktasa (**obr. 6, str. 15**) je membránově vázaný protein katalysující přenos elektronů z NADPH na cytochrom P450. V daném organismu je jedna forma NADPH:CYP reduktasy schopná interakce s více isoformami cytochromu P450 [8]. Přenos elektronu byl také popsán na cytochrom c [18], cytochrom b_5 [19], hem oxygenasu [20] a jiné substráty. NADPH:CYP reduktasa obsahuje jako kofaktory **FAD** a **FMN** [21].

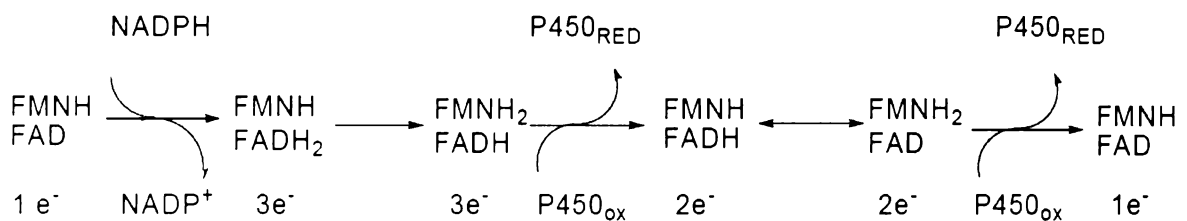
Celá molekula enzymu se skládá ze dvou funkčních domén. Z N-terminální hydrofobní domény zakotvené v membráně a C-terminální hydrofilní katalytické domény. C-terminální katalytická doména je složena z FAD a FMN vazebných domén, mezi

kterými se nachází tzv. „spojující“ struktura [21]. Ta je odpovědná za správnou orientaci FMN a FAD strukturních domén při přenosu elektronu.

FAD-vazebná doména je zodpovědná za nekovalentní vazbu NADPH. Pozitivně nabité aminokyseliny (arginin a lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy, kterou se tento koenzym liší od NADH a způsobuje tak vysokou selektivitu NADPH:CYP reductasy vůči NADPH [21].

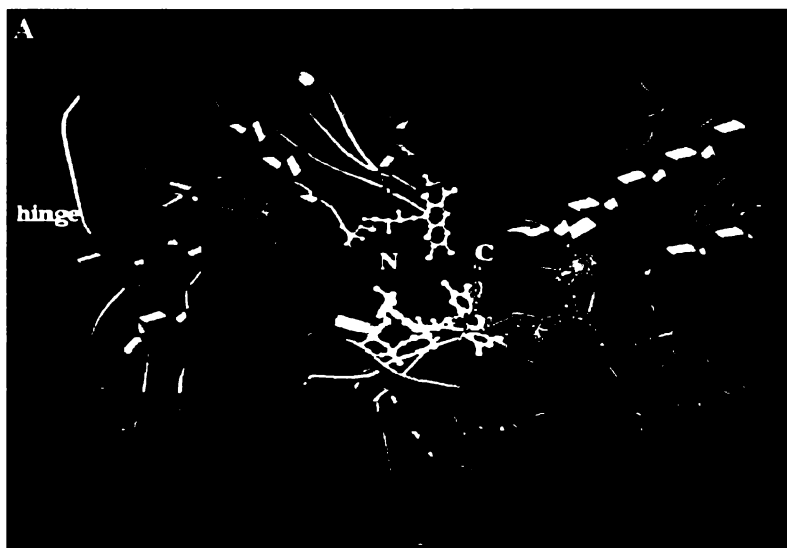
FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronu na akceptorovou molekulu (cytochrom P450 nebo cytochrom c). Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází v blízkosti povrchu enzymu a je tak snadno dostupná. Elektrony přecházejí na hem akceptorové molekuly z této strany [8].

Funkce NADPH:CYP reductasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin. Akceptorem elektronu od NADPH je FAD, který ho následně předá FMNH. Za redukcí cytochromu P450 je pak zodpovědný zcela redukovaný FMNH₂ (**obr. 5**) [22].



Obr. 5 Přenos elektronů mezi flaviny NADPH:CYP reductasy [8]

FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, ale jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8- methylových skupin isoalloxazinových kruhů (**obr. 6; str.15**), které leží těsně u sebe a svírají úhel 150 stupňů. Přenos elektronu mezi flaviny zprostředkovaný tímto způsobem je rychlý i proto, že není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny [21].



Obr. 6 *Struktura NADPH:CYP reductasy bez N-terminální kotvy, FMN vazebná doména je zobrazena tmavě modře, spojující doména červeně, FAD a NADPH vazebná doména světle modře, FAD žlutě, NADPH oranžově, FMN bíle [21]*

Interakce mezi NADPH:CYP reduktasou a cytochromem P450 jsou především elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:CYP reduktasy (aspartát, glutamát) [21].

Vzhledem k tomu, že NADPH:CYP reduktasa a cytochromy P450 spolu velmi úzce spolupracují při biotransformaci xenobiotik, látky indukující zvýšení množství cytochromu P450 indukují také i zvýšení množství NADPH:CYP reduktasy, avšak v menší míře [21].

1.2.3 Cytochrom b_5

Cytochrom b_5 je protein nacházející se v mnoha organismech např. u savců, rostlin, hmyzu a bakterií [23]. Je složený ze dvou domén: hydrofobní (kotvící protein na vnější straně membrány endoplasmatického retikula) a hydrofilní, cytosolické domény obsahující hem. Může přijímat elektron buď od NADH:cytochrom b_5 reduktasy nebo od NADPH:CYP reduktasy [23]. Takto redukovaný cytochrom b_5 se účastní biosynthesy některých lipidů a steroidních látek nebo dodává druhý elektron v reakčním cyklu cytochromů P450 (kap. 1.2.1) při metabolismu xenobiotik [24].

Interakce cytochromu P450 a cytochromu b_5 závisí hlavně na isoformě cytochromu P450 a na substrátu, který se danou reakcí přeměňuje. V závislosti na těchto podmínkách

může mít přítomnost cytochromu b₅ stimulační nebo inhibiční účinek. V některých případech přítomnost cytochromu b₅ nemá na katalysovanou reakci žádný vliv [23].

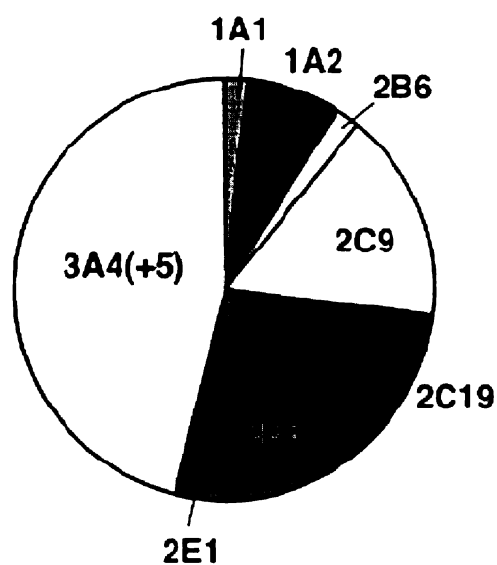
1.3 Lidské cytochromy P450

Z toxikologického hlediska patří cytochromy P450 mezi nejdůležitější enzymy podílející se na metabolismu cizorodých látek v lidském organismu. Z jaterních enzymů jsou to především isoformy CYP3A4, 1A2, 2A6, 2D6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2E1. Z cytochromů P450 přítomných ve vyšších koncentracích v jiných tkáních (ledviny, kůže, GIT, močové cesty) jsou to CYP1A1, 2B6, 2E1, 3A4 [4]. Podíl některých isoform cytochromu P450 na biotransformaci xenobiotik znázorňuje **obr. 7**.

Mezi nejvíce zastoupené cytochromy P450 patří CYP3A4, isoformy podrodiny 2C, dále CYP1A2 a 2E1 [4].

Výše zmíněné cytochromy P450 mají obvykle širokou substrátovou specifitu a metabolisují mnohé látky vyskytující se v životním prostředí jako polutanty nebo jako přirozená součást potravy. Existují však i cytochromy P450 s užší substrátovou specifikou, které metabolisují především endogenní sloučeniny jako jsou prostaglandiny, prostacykliny, cholesterol, tromboxany, vitamin D3 nebo žlučové kyseliny [4, 5]. Do této skupiny patří cytochromy následujících rodin: CYP5, 7, 8, 24, 27, 51 [4, 25].

Zastoupení cytochromů P450 a jejich obsah v jednotlivých tkáních závisí na mnoha faktorech. Mezi ně patří např. genetický polymorfismus, věk, kouření, konzumace alkoholu, přítomnost polutantů v životním prostředí nebo působení podávaných léčiv [4, 26, 27]. Jsou to enzymy jak konstitutivní, jejichž koncentrace v organismu nebo určitých tkáních je konstantní, tak inducibilní, jejichž koncentraci lze měnit podáváním vhodného induktoru [16].



Obr. 7 Relativní podíl isoform cytochromu P450 na biotransformaci xenobiotik [28]

Tabulka 1 Přehled některých cytochromů P450 metabolisujících cizorodé látky [3, 29]

CYP	Inducibilita	Lokalisace	Substráty	Induktory	Inhibitory
1A1	inducibilní	plíce, játra, mozek, GIT	PAH, 7-ethoxyresorufin	PAH	α -naftoflavon, apigenin
1A2	konstitutivní i inducibilní	játra	aromatické aminy, PAH, kofein, 7-ethoxyresorufin	PAH, β -naftoflavon, cigar. kouř, TCDD, 3-methylcholanthren	furafyllin, α -naftoflavon, isosafrol
2A6	inducibilní	játra	kumarin, steroidy	barbituráty, dexamethason	methoxalen
1B1	inducibilní	kůže, mozek, srdce, plíce, GIT, játra, ledviny, placenta, slezina	PAH, 7-ethoxyresorufin	dioxiny	-
2B6	konstitutivní i inducibilní	játra, srdce	nikotin, 7-pentoxyresorufin, benzyloxyresorufin, benzfetamin	barbituráty	metyrapon, orfenadrin, ellipticin
2C8	konstitutivní	játra, ledviny	taxol, retinoidy, fenitoin	-	sulfafenazol, sulfinpyrazol
2C19	konstitutivní i inducibilní	játra, srdce	(S)-mefenithoin, omeprazol, diazepam, imipramin, fenytoin	barbituráty, rifampicin	(S)-mefenithoin, omeprazol
2D6	konstitutivní	játra, mozek, srdce	antidepresiva, β -blokátory	-	quinidin, paroxetin, fluoxetin
2E1	konstitutivní i inducibilní	játra, plíce, mozek, endothelium, srdce	ethanol, nitrosaminy, chlorzoxazon, halotan, acetaminofen, isoniazid	hlad, ethanol, aceton, toluen, isoniazid, pyrazol	disulfiram, diethyldithio-karbamat
3A4/5	konstitutivní i inducibilní	játra, GIT, plíce, mozek, endothelium, placenta, lymfocyty, ledviny	steroidy, acetaminofen, cyklosporin, taxol, tamoxifen, diazepam, erythromycin, ethynylestrediol, indinavir, midazolam, nifedipin, omeprazol, orfenadrin, prednison, ritonavir, saquinavir, terfenadin, triazolam, testosteron	steroidy, barbituráty, rifampicin	troleandomycin, ketokonazol, gestoden, clotrimazol, naringenin

V **tabulce 1 (str. 17)** jsou uvedeny enzymy účastnící se metabolismu cizorodých látek, včetně jejich lokalizace v organismu, charakteristických substrátů, induktorů a inhibitorů. Některé substráty jsou metabolisovány i několika různými cytochromy P450. Je to jednak v případě, kdy na jedné molekule substrátu probíhá několik přeměn, a nebo v případě kdy enzymy nejsou specifické a jednu reakci může katalyzovat více než jedna isoforma cytochromu P450. I přes tuto širokou substrátovou specifitu isoform existují více či méně specifické substráty, používající se k potvrzení přítomnosti nebo funkce příslušných cytochromů P450 [17].

1.3.1 Cytochrom P450 3A4

Isoforma CYP3A4 patří mezi nejdůležitější enzymy metabolisující cizorodé látky v lidském organismu. Důležitost enzymu není dána jenom jeho vysokým zastoupením v játrech (~30 %) a GIT, ale především účasti na metabolismu nejrůznějších podávaných léčiv (taxol, tamoxifen, diazepam, erythromycin, atrovastatin, indinavir), karcinogenů (aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy) a endogenních látek (testosteron, progesteron, kortisol). Celkově je známo více než 100 substrátů CYP3A4 [4, 17].

Struktura CYP3A4

Pochopení toho jak tento komplexní enzym rozpoznává tak širokou škálu substrátů bylo donedávna komplikováno nedostatkem znalostí o jeho třírozměrné struktuře. Homologní modely [30, 31] využívající bakteriální proteiny CYP_{HM3} (*Bacillus megaterium*) nebo CYP_{EryF} (*Saccharopolyspora erythraea*) měli limitované využití kvůli velké sekvenční odlišnosti. CYP3A4 a dva výše zmíněné proteiny jsou identické přibližně z 25 % [32]. Prostorovou strukturu CYP3A4 (**obr. 8; str. 19**) uveřejnili v roce 2004 nezávisle na sobě Williams [32] a Yano [33]. CYP3A4 je tak jako všechny savčí cytochromy P450 membránově vázán protein. Zachovává si strukturu charakteristickou pro cytochromy P450 s velkou C-terminální doménou, obsahující hem a aktivní centrum a s N-terminální hydrofobní doménou kotvící protein v membráně endoplasmatického retikula [32]. Při odstranění tohoto proteinu z membrány dochází k asociaci hydrofobních konců, což znesnadňuje krystalizaci enzymu pro účely rentgenostrukturní analýzy. Využívá se tedy krystalizace CYP3A4 bez N-terminální domény (**obr. 8; str. 19**) [32, 34].



Obr. 8 *Prostorová struktura CYP3A4 bez N-terminální vazební domény. Barvy od modré přes zelenou, žlutou až po červenou symbolizují směr od N-konce po C-konec [32]*

aktivního místa tohoto enzymu se totiž může vázat současně více molekul substrátu. Jde o tzv. homotropní kooperativitu. Jako příklad lze uvést oxidaci testosteronu a progesteronu. Při dostatečné velikosti aktivního místa v něm může menší molekula substrátu zaujmout více orientací („produktivní“ nebo „neproduktivní“ orientaci). Vazba dalšího substrátu napomáhá stabilisaci prvního substrátu v „produktivní“ orientaci a zvyšuje tak rychlost metabolismu [34, 36]. V případě, že se do aktivního centra váže efektor odlišný od molekuly substrátu, jedná se o tzv. heterotropní kooperativitu [38]. Mezi takové efekторы patří například α -naftoflavon [37, 39]. Vliv na vazbu substrátu může mít i skutečnost, že se enzym vyskytuje podle výsledků kinetických studií ve více „subpopulacích“, tj. v různých konformačních stavech. Tento jev však nebyl u cytochromů P450 zatím příliš poznán [40].

Toxikologický význam CYP3A4

Spektrum sloučenin metabolisovaných CYP3A4 je extrémně široké. Při takovém množství substrátů (~100) je vysoká pravděpodobnost jejich vzájemné interakce, která může vést k extrémnímu zvýšení nebo naopak snížení hladiny metabolitu. Z toho pak mohou vyplývat různé nežádoucí účinky, jako například nedosažení požadovaného

V aktivním centru enzymu se nacházejí převážně aminokyseliny hydrofobní povahy nenáročné na specifické interakce jako jsou např. Phe, Arg, Ala, Leu, Val [17, 30, 34]. Důležitou vlastností aktivního místa je jeho objemnost a poměrná otevřenost pro vazbu substrátu, což umožňuje metabolisovat substráty s velkou molekulovou hmotností jako jsou erytromycin ($M_r = 734$) nebo cyklosporin ($M_r = 1203$) [35]. Bylo zjištěno [36, 37], že některé enzymové reakce katalysované CYP3A4 neprobíhají podle klasické kinetiky popsané Michaelisem a Mentenovou. Do

terapeutického účinku léčiva nebo naopak předávkování. Příkladem této tzv. lékové interakce je případ antihistaminika terfenadinu, který se používá jako lék proti alergiím. Terfenadin má sám o sobě významné účinky jako blokátor draslíkových kanálů srdeční membrány a jeho zvýšené koncentrace vedou k srdečním arytmiím. Při současném podání antifungálních přípravků typu azolů (ketokonazol) a léků proti alergiím, dochází k nadlimitnímu zvýšení hladiny terfenadinu a tedy i k srdečním arytmiím. Azoly, které mají ve své struktuře imidazolový kruh, se váží přes atom dusíku na hemové železo cytochromu P450 a zabraňují tak vazbě kyslíku. Tím inhibují lidské cytochromy P450 a zejména CYP3A4 [17].

Problémy se mohou vyskytnout i při podání látek, které indukují zvýšení aktivity CYP3A4, jako jsou např. barbituráty, rifampicin nebo dexamethason. Indukce aktivity v některých případech může být natolik podstatná, že dochází k rozsáhlému odbourání podávaného léčiva a to pak není schopno svého terapeutického účinku. Takový případ může nastat při současném užívání antikoncepčních pilulek, obsahujících 17 α -ethinylestradiol, který je substrátem CYP3A4 a rifampicinu. Dochází k snížení hladiny ethinylestradiolu a nečekanému otěhotnění [41, 42]

1.3.2 Heterologní exprese biotransformačních enzymů

Heterologní exprese je exprese klonovaného genu v odlišném typu buňky, kde se normálně tento gen nevyskytuje [43]. Rekombinantní enzymy se nejčastěji využívají např. pro *in vitro* experimenty (studium enzymové aktivity po vložení bodové mutace) nebo pro určení struktury daného proteinu. Biotransformační enzymy byly úspěšně exprimovány v organismech jako jsou bakterie (*E. coli* [43], *Salmonella typhimurium* [44]), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* [45]), hmyzí buňky nebo různé typy savčích buňek [46]. Výhodou tohoto způsobu přípravy proteinů je jeho relativní jednoduchost, narozdíl od izolace proteinů z jater savců.

V případě savčích cytochromů P450 je k docílení adekvátního stupně exprese v *E. coli* potřebná modifikace cDNA sekvence v oblasti kodující N-terminální transmembránový úsek. Tímto způsobem se podařilo připravit některé isoformy cytochromu P450 např. CYP1A1, 1A2, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7 [47].

Heterologní exprese CYP3A4

U exprese CYP3A4 v *E. coli* se využívá expresní systém s vektorem **pCW/NF14** (s modifikovanou sekvencí pro N-terminální konec enzymu, kde jsou odstraněné aminokyseliny 3 až 12) v buňkách **DH5 α** . Takto modifikovaný CYP3A4 byl izolován i v předkládané práci. CYP3A4 (NF14) spolu s králičí NADPH:CYP reduktasou může vykazovat katalytickou aktivitu téměř jako purifikovaný lidský jaterní CYP3A4. Pro svou optimální funkci během preinkubace však potřebuje ještě glutathion. Tuto funkci mohou mít i některé thioly [48]. Dobrá katalytická aktivita tohoto enzymu byla pozorována při oxidaci nifedipinu, 6 β -hydroxylaci testosteronu; 8, 9-epoxidaci a 3 α -hydroxylaci aflatoxinu B₁ [48].

2 Cíl bakalářské práce

Cílem předkládané bakalářské práce byla:

1. Isolace membránového rekombinantního proteinu CYP3A4 z membrán *E. coli*.
Při izolaci bylo použito méně purifikačních kroků za účelem získání méně čistého proteinu s vyšším výtěžkem.
2. Charakterisace izolovaného CYP3A4 z hlediska stanovení jeho enzymové aktivity měřené jako 6 β -hydroxylace testosteronu a porovnání této aktivity s jinými funkčními systémy obsahujícími CYP3A4

3 Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie použité při experimentech pocházejí z následujících zdrojů:

BIO-RAD, USA

hydroxylapatit

Fluka, Švýcarsko

akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), dichlormethan, dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), 2-merkptoethanol, methanol, dodecylsulfát sodný (SDS)

Gentest, USA

SupersomyTM, lidské mikrosomy

Kao Corp., Japonsko

emulgen 911 (E-911)

Lachema Brno, Česká republika

bromfenolová modř, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dithioničitan sodný, EDTANa_2 (chelaton 3), ethanol, glycerol, HCl, chloroform, KCl, KH_2PO_4 , KOH, kyselina octová, methanol, MgCl_2 , NaCl, NaOH, NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NH_4SCN , octan sodný, persíran amonný, vinan sodný (tartát sodný)

Linde, Česká republika

dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba Feinchemie, Rakousko

glutathion, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Woelm-ICN Pharmaceuticals, Německo

silikagel

Merck, Německo

testosteron, 6 β -hydroxytestosteron

Pharmacia, Švédsko

DEAE-Sepharosa CL6B, CM-Sepharosa CL6B

Reanal Budapešť, Maďarsko

glycin

Serva Heidelberg, Německo

Coomassie Brilliant Blue R-250, N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Triton X-100

Sevapharma, a.s, Česká republika

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), dithiothreitol (DTT), fenacetin, sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS), cholát sodný, králičí protilátka značená alkalickou fosfatasou, nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), standard pro elektroforesu „Wide range“, standard pro „Western blotting“ ColorBurst.

Bakteriální membrány z *E. coli* obsahující CYP3A4 (CYP3A4 pCW/NF14) byly věnovány RNDr. Pavlem Součkem, PhD. ze Státního zdravotního ústavu v Praze. **Specifická slepičí protilátka proti CYP3A4** byla purifikována Doc. RNDr. Petrem Hodkem, CSc. v laboratoři katedry biochemie PřF UK. **Cytochrom b₅ a NADPH:CYP reduktasa** byly izolovány RNDr. Věrou Kotrbovou, PhD. v laboratoři katedry biochemie PřF UK.

3.2 Použité přístroje

Centrifugy

MLW T-52,2 (Německo), Beckman LE-80K a Allegra X-22 R (USA), minicentrifuga na mikrozkušavky

HPLC

Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, program CHROMELEON™ 6.01

Spektrofotometry

Hewlett Packard 8453 E USA, SPECORD M42 a MOM 195 D (Carl zeiss, JENA, Německo)

Váhy

Analytické váhy PESA 40SM-200A, předvážky KERN EW600-2M

Ostatní přístroje

pH metr s kombinovanou elektrodou, odparka Speed Vac DNA 110 (Savant), homogenisator dle Pottera a Elvehjema, sonikátor Ultrasonic compact cleaner (Teson1, Tesla), vortex MS 1 Minishaker (Schiller Pharma), inkubátor 624 Enviromental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison), termostatovaná lázeň KL1 (Laboratorní přístroje Praha), automatické mikropipety, sběrač frakcí BioLogic BioFrac Fraction Collector (BIO-RAD), peristaltická pumpa PP-05 (Laboratorní přístroje Praha), Ultrafiltrační cela (Amicon, Millipore), aparatura pro elektroforesu, aparatura na „Western blotting“.

3.3 Metody

3.3.1 Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny

Při stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA se využívá tvorby fialově zbarveného komplexu vznikajících měďných iontů (Cu^+) s BCA v alkalickém prostředí

[49]. Měďné ionty vznikají z iontů měďnatých stabilizovaných ve formě vinanového komplexu, redukcí funkčními skupinami některých přítomných aminokyselin. Intenzita zabarvení se následně určuje spektrofotometricky při 562 nm a je přímo úměrná koncentraci proteinu v roztoku. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA).

Činidlo pro stanovení bylo připraveno rozpuštěním BCA v 49 dílech roztoku A (0,4 % NaOH; 0,95 % NaHCO₃; 2 % Na₂CO₃·10H₂O; 0,16 % tartát sodný; pH 11,25) a jednom dílu roztoku B (4 % CuSO₄·5H₂O v destilované vodě), tak aby výsledná koncentrace BCA byla 1 %. Činidlo bylo připraveno těsně před stanovením.

Do čistých, vyžíhaných zkumavek bylo pipetováno 20 µl vhodně zředěného stanovovaného vzorku a 980 µl připraveného činidla. Vzorky standardu BSA byly připraveny ředěním roztoku o koncentraci BSA 1,6 mg/ml dvojkovou řadou. 20 µl jednotlivých roztoků BSA o koncentracích 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 a 0,025 mg/ml bylo pipetováno do zkumavek spolu s 980 µl činidla. Slepé vzorky obsahovali místo roztoku bílkoviny 20 µl destilované vody.

Po inkubaci při teplotě 60 °C po dobu jedné hodiny a zchladnutí byla změřena absorbance standardů při 562 nm proti slepému vzorku. Stejným způsobem byla změřena absorbance vzorků s neznámou koncentrací proteinů. Měření bylo prováděno na přístroji Hewlett Packard 8453 E v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.2 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Při stanovení koncentrace cytochromu P450 se využívá charakteristické absorbance komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm [50]. Vznik tohoto spektra se sleduje v diferenčním uspořádání, kdy se do vzorkové kyvety dvoupaprskového spektrofotometru umístí vzorek obsahující redukovanou formu cytochromu P450 v komplexu s oxidem uhelnatým a do kyvety pro srovnávací vzorek se umístí vzorek identický, který nebyl vystaven oxidu uhelnatému. Spektrum vykazuje v oblasti 450 nm maximum odpovídající nativní formě cytochromu P450. Neaktivní, denaturovaná forma poskytuje maximum při 420 nm. Tato metoda určuje koncentraci všech přítomných isoformů cytochromů P450. V případě *E. coli*, která neobsahuje vlastní cytochromy P450, je touto metodou stanovována pouze koncentrace exprimovaného rekombinantního CYP.

Do zkumavky bylo pipetováno 1960 μl fosfátového pufru (0,1 M KH_2PO_4 ; 2 % (v/v) glycerol; pH 7,5) a 40 μl vzorku obsahujícího cytochrom P450. Poté bylo přidáno malé množství ($\sim 5\text{mg}$) dithioničitanu sodného. Roztok byl promíchán a rozdělen do dvou kyvet o optické dráze 1 cm. Na dvoupraskovém přístroji Spekord M40 (Carl Weiss Jena, Německo) byla proměřena základní linie v rozmezí vlnových délek 400 až 500 nm. Vzorková kyveta byla probublána oxidem uhelnatým po dobu 45 sekund a následně změřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena podle vzorce:

$$c_{P450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{P450}} \cdot \text{\u0177ed\u011bn\u00ed [\u00b5M]}$$

c_{P450} - koncentrace cytochromu P450

A_x - absorbance při vlnové délce x nm

ϵ_{P450} - molární absorpční koeficient cytochromu P450 ($\epsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.3.3 Solubilisace

Solubilisace za pomoci detergentů se využívá jako metoda na převedení membránově vázaného proteinu do roztoku. Molekula detergentu má dvě rozdílné části - hydrofobní a hydrofilní část. Hydrofobní konec interaguje s transmembránovou doménou proteinu a uvolňuje ho tak z membrány. Hydrofilní konce jsou orientovány směrem do roztoku.

Membrány *E. coli* byly naředěny solubilizačním pufrem (20 mM Tris/Cl; 20 % glycerol; 1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; pH 7,5) tak, aby výsledná koncentrace proteinů v roztoku byla přibližně 2 mg/ml. K membránám byl dále přidán 10 % cholát sodný s 10 % E-911 pomalým přikapáváním z dělicí nálevky, za stálého míchání na ledu. Cholát sodný a E-911 byly přidány v takovém množství, aby jejich koncentrace v roztoku byla 0,4 %. Po přidavku celého obsahu dělicí nálevky byla směs ještě 1,5 hodiny míchána při 4 °C. Nerozpustné části byly ze solubilizátu odstraněny centrifugací po dobu 70 min. (Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 70 ml, 45 000 RPM nebo úhlový rotor 60 Ti 6 x 27 ml, 60 000 RPM). Pelety byly homogenizovány v 70 ml solubilizačního pufru a ponechány

v chladu. Byla stanovena koncentrace CYP3A4 v peletě i supernatantu. Supernatant byl poté aplikován na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B.

3.3.4 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

K separaci proteinů byla využita chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B, která patří mezi ionexovou chromatografii. Diethylaminoethyl (DEAE) je kovalentně navázán na řetězce sepharosy. Při pH 7,5; při kterém probíhala purifikace, je dusík v této struktuře nabit kladně a dobře váže anionty. Isoforma CYP3A4 má odlišný isoelektrický bod ($pI = 8,3$) [51] od většiny proteinů nacházejících se v solubilisátu. Při pH 7,5 je CYP3A4 nabit kladně a nezachytává se na nosiči. Proteiny s isoelektrickým bodem nižším než 7,5 zůstávají vázány na koloně.

DEAE-Sepharosa uchovávána ve 20 % ethanolu byla před použitím 3 x promyta 250 ml destilované vody, rozmíchána v 200 ml cyklizačního pufru (1 M TRIS/Cl; pH 7,4) a ponechána přes noc v lednici při teplotě 4 °C. Potom byl nosič znovu 3 x promyt 250 ml destilované vody a rozmíchán v malém objemu ekvilibračního pufru (20 mM TRIS/Cl; 20 % glycerol (v/v); 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 0,4 % E-911; pH 7,5), aby celkový objem nepřevyšoval objem kolony. Frita, která se nachází na dně kolony byla odplyněna proudem destilované vody. Nosič byl nalit na kolonu (v zastaveném toku) a ponechán sedimentovat přes noc. Byl promýván ekvilibračním pufrem rychlostí 1 ml/min tak dlouho, až pH pufru přitékajícího a vytékajícího z kolony bylo stejné.

Na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (2,5 x 20 cm, 80 ml nosiče) byl aplikován supernatant po solubilisaci (rychlost průtoku 1 ml/min) a byly jímány frakce po 10-12 ml. Byla měřena absorbance při 417 nm (spektrofotometr MOM 195 D) dokud nedošlo k jejímu poklesu na nulovou hodnotu.

Proteiny zachycené na koloně byly eluovány lineárním gradientem KCl (2 x 500 ml 0-0,4 M KCl v ekvilibračním pufru). Frakce byly jímány v objemu 12-13 ml a průběh eluce byl sledován měřením absorbance při 417 nm. Pro případ, že by ani po aplikaci gradientu KCl nedošlo k odstranění všech proteinů z kolony, byl aplikován 1 M KCl v ekvilibračním pufru (~100 ml).

Nosič byl regenerován postupným promýváním 250 ml 1 M KCl, 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 250 ml destilované vody, 250 ml 0,5 M NaOH, 250 ml destilované vody, 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 3 x 250 ml destilované vody a 2 x 250 ml

20 % čistého ethanolu. Nakonec byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20 % ethanolu a uschován při 4 °C. Roztok proteinu byl zahuštěn ultrafiltrací (membrána Amicon, PM-30, Millipore).

3.3.5 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu

Chromatografie s využitím hydroxylapatitu (HAP) se řadí do skupiny adsorpční chromatografie. Při purifikaci proteinů se využívá interakcí karboxylových skupin aminokyselin s vápenatými ionty na povrchu sorbentu [52]. Proteiny jsou tedy zadržovány na nosiči a balastní látky odcházejí v eluátu. Tento purifikační krok byl použit za účelem odstranění detergentu [53].

Bylo naváženo potřebné množství nosiče (z 1 g HAP vznikne ~ 2,5 ml výsledné suspenze), který byl 5 x promyt v destilované vodě a ponechán nabobtnat přes noc při 4 °C. Druhý den byl nosič 2 x promyt 50 ml destilované vody, rozmíchán v 15 ml destilované vody a nalit do dvou kolon. Dvě kolony byly připraveny pro dvě frakce s různou čistotou CYP3A4 (viz kap. 4.1.2). Kolona byla ekvilibrována 100 ml ekvilibračního pufru (10 mM KH_2PO_4 ; 20 % glycerol (v/v); 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT, 0,05 % cholát sodný) rychlostí asi 15 ml/hod.

Na ekvilibrované kolony č.1 (1,2 x 10 cm, 6 ml nosiče) a č.2 (1,2 x 10 cm, 6 ml nosiče) byly aplikovány zahuštěné frakce.

3.3.6 Chromatografie na koloně CM-Sepharosy CL6B

Chromatografie s využitím CM-Sepharosy CL6B (CM-karboxymethyl) patří stejně jako chromatografie na DEAE-Sepharose CL6B mezi ionexovou chromatografii. Narozdíl od DEAE-Sepharosy, je karboxy skupina CM-Sepharosy nabita záporně a váže kladně nabitě molekuly. Při pH ekvilibračního pufru 7,5 by se CYP3A4 měl vázat na povrch nosiče a ostatní látky odcházet v eluátu. Tato metoda byla použita za účelem odstranění detergentu z frakcí po chromatografiích na DEAE-Sepharose [53], neboť odstranění detergentu na koloně HAP nebylo úspěšné (viz kap. 4.1.3).

Při přípravě nosiče i kolony bylo postupováno stejně jako v případě DEAE-Sepharosy (kap. 3.3.4), rozdíl byl pouze v použitém cyklizačním (1 M KH_2PO_4 ; pH 7,4) a ekvilibračním (stejný jako pro ekvilibraci hydroxylapatitu, viz kap. 3.3.5) pufru. Opět byly připraveny dvě kolony, pro dvě frakce s různou čistotou CYP3A4 (viz kap. 4.1.2). Objem usazené CM-Sepharosy v kolonách byl kolem 10 ml.

Na ekvilibrované kolony č.1 (1,5 x 10 cm, 10 ml nosiče) a č.2 (1,3 x 10 cm, 10 ml nosiče) byly aplikovány zahuštěné frakce a jímány v intervalu 10 minut. Objemy frakcí z kolony č.1 se pohybovali v rozmezí 8-10 ml a z kolony č.2 v rozmezí 3-4 ml.

Pro detekci CYP3A4 byla měřena absorbance při 417 nm v jednotlivých zkumavkách a frakce obsahující CYP3A4 byly spojeny.

3.3.7 Odstranění detergentu pomocí silikagelu

Stanovení koncentrace detergentu (E-911) v zahuštěné frakci se provádělo podle Garewala [54]. Metoda je založena na reakci hexarhodanokobaltitanu amonného s ethoxy skupinami detergentu. Při vlastním odstranění detergentu z roztoku proteinu bylo postupováno podle práce Anzenbachera a spol. [55], metodou využívající adsorpci detergentu na částicích silikagelu.

Určení koncentrace detergentu v roztoku

Koncentrace detergentu E-911 v preparátu CYP3A4 byla určena z kalibrační křivky. Jako standard byl použit roztok E-911 v 50 % ethanolu o koncentraci 2 g/l. Pro sestrojení kalibrační křivky byly připraveny roztoky v 50 % ethanolu o objemu 300 µl a koncentracích E-911 0; 0,16; 0,50; 0,67; 1,33; 1,67 a 2,00 mg/ml. Do těchto zkumavek bylo následně přidáno 400 µl roztoku připraveného z thiokyanatanu amonného a dusičnanu kobaltnatého (17,8 g NH₄SCN; 2,8 g Co(NO₃)₂·6H₂O doplněno do 100 ml destilovanou vodou) a ponecháno reagovat 5 minut při laboratorní teplotě. Detergent s navázaným komplexem byl extrahován 1,5 ml dichlorethanu, vzorky byly míchány 2 minuty na „Vortexu“ a centrifugovány 5 minut při 3000 RPM (centrifuga MLW T-52.2). Dolní organická fáze byla odebrána a byla změřena její absorbance při 622 a 687 nm. Tyto hodnoty absorbance byly použity na sestrojení kalibrační závislosti.

Vlastní odstranění detergentu

Po stanovení obsahu detergentu bylo naváženo odpovídající množství silikagelu tak, aby poměr hmotnosti silikagelu ku hmotnosti detergentu ve vzorku byl 3:1. Centrifugační zkumavky obsahující roztok CYP3A4 a silikagel byly umístěny na elektrickou otáčivou míchačku a míchány 3 hodiny v chladu. Potom byly vzorky centrifugovány po dobu

5 minut při 3000 RPM. Supernatant byl odebrán a dialyzován přes noc proti 2 l dialyzačního pufru (50 mM KH_2PO_4 ; 20 % glycerol; pH 7,4).

Na závěr byly dialyzované frakce zahuštěny pomocí centrifugy Beckmann X-22 R (4500 RPM) a zkumavek Amicon (Millipore) s membránou PM 30 na výsledný objem přibližně 4,5 ml. Takto získaný finální preparát byl uschován v malých alikvotech při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.8 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE)

Diskontinuální elektroforesa v přítomnosti SDS slouží k dělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. SDS obaluje polypeptidové řetězce proteinu a uděluje jim uniformní záporný náboj, na základě kterého se pohybují ke kladně nabitě elektrodě [52]. Elektroforesa na polyakrylamidovém gelu byla prováděna dle Laemmliho [56].

Příprava polyakrylamidového gelu

Polyakrylamidový gel vzniká kopolymerací akrylamidu a síťovacího činidla BIS. Iniciace radikálového mechanismu kopolymerace se děje chemicky, kdy radikály vznikají z persíranu amonného v přítomnosti TEMEDu, který slouží jako stabilisátor vzniklých radikálů.

Mezi čisté a odmaštěné skla byl nalit 10 % separační gel následujícího složení: 5 ml pufru A (0,375 M TRIS/Cl; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,8), 2,5 ml polymeračního roztoku A (30 % akrylamid (w/v); 0,8 % BIS v pufru A), 7,5 μl TEMED a 75 μl persíranu amonného o koncentraci 100 mg/ml. Ihned po nalití byl gel převrstven destilovanou vodou. Po polymeraci byla voda odlita, povrch gelu vysušen filtračním papírem a gel převrstven 4 % zaostřovacím gelem následujícího složení: 2,6 ml pufru B (0,125 M TRIS/Cl; 0,1 % SDS (w/v), 0,0006 % bromfenolová modř; pH 6,8), 400 μl polymeračního roztoku B (30 % akrylamid (w/v); 0,8 BIS v pufru B), 3 μl TEMED a 60 μl persíranu amonného o koncentraci 100 mg/ml. Po převrstvení byl do gelu zasunut hřeben pro vytvoření jamek k aplikaci vzorků. Po polymeraci byl hřeben z gelu vyjmut, desky s gelem umístěny do elektroforetické vany a horní i dolní elektrodový prostor vyplněn elektrodovým pufrem (0,025 M TRIS/Cl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3).

Příprava vzorků a vlastní elektroforesa

Vzorky byly ředěny v poměru 3:1 4 x koncentrovaným vzorkovým redukujícím pufrem (0,063 M TRIS/Cl; 2 % SDS; 10 % glycerol; 5 % 2-merkapt ethanol; 0,003 % bromfenolová modř; pH 6,8) a vařeny 5 minut ve vodě. Do jamek, zalitých elektrodoým pufrem bylo pomocí mikrostřikačky Hamilton aplikováno 20 µl vzorku.

Elektroforesa probíhala ve vertikálním uspořádání prvních 30 minut při napětí 80 V a poté při napětí 150 V, dokud čelo obsahující bromfenolovou modř nedosáhlo spodního okraje gelu.

Separací gel byl oddělen od zaostřovacího gelu a přenesen na 1 hodinu do barvicí lázně (25% Coomassie Brilliant Blue (w/v); 46 % ethanol (v/v); 9,2 % kyselina octová (v/v)). Po obarvení byl gel odbarvován přes noc v odbarvovací lázni (25 % ethanol (v/v); 10 % kyseliny octové (v/v)).

3.3.9 Metoda „Western Blotting“

„Western blotting“ je technika přenosu proteinů z elektroforetického gelu na PVDF nebo nitrocelulosovou membránu schopnou vázat proteiny.

Gel určený pro „Western blotting“ byl po elektroforese umístěn na 20 minut do přenosového pufru (0,025 M TRIS/Cl; 0,192 M glycin; pH 8,3). Podle velikosti gelu bylo vystřiženo 6 ks filtračního papíru a tři z nich byly umístěny do elektropřenosového aparátu. Na ně byla položena PVDF membrána, předtím smáčena v methanolu (10 s), destilované vodě (3 minuty) a poté v přenosovém pufru (5 minut). Následující vrstvu tvořil polyakrylamidový gel přeložen zbylými třemi vrstvami navlhčeného filtračního papíru. Elektropřenos byl prováděn 50 minut při 4 mV/cm² gelu. Po ukončení přenosu byl gel ještě obarven v barvicí lázni a odbarvován přes noc (viz kap. 3.3.8.)

3.3.10 Imunochemická detekce CYP 3A4

PVDF membrána byla přes noc inkubována v lednici v blokovacím roztoku (5 % sušené mléko v PBS (1,8 mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,134 M NaCl; pH 7,2); 0,3 % TRITON X-100). Poté byla membrána inkubována dvě hodiny v blokovacím roztoku s primární protilátkou (slepičí IgY proti CYP3A4) o koncentraci 30 µg/ml. Nenavázaná primární protilátka byla odmyta několikanásobným promytím membrány v blokovacím roztoku (3 x 5 minut). Poté byla inkubována dvě hodiny v 15 ml blokovacího roztoku

s přidavkem 7 μ l sekundární protilátky značené alkalickou fosfatasou (králičí IgG proti slepičí IgY). Po inkubaci byla membrána propláchnuta 3 x 5 minut v blokovacím roztoku, 3 x 5 minut v 0,3 % TRITONU v PBS a nakonec 5 minut ve vodě. Celý postup byl prováděn při laboratorní teplotě a za stálého míchání.

CYP3A4 byl detekován za použití substrátu pro alkalickou fosfatasu BCIP/NBT (tableta rozpuštěna v 10 ml destilované vody). Na místech kde došlo k navázání protilátky na CYP3A4, se po pěti minutách objevili fialové zóny. Reakce byla zastavena vložením membrány do destilované vody.

3.3.11 Stanovení aktivity CYP3A4 pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Specifickým substrátem CYP3A4 je testosteron, který je tímto enzymem hydroxylován v poloze 6 β [53]. K měření specifické aktivity CYP3A4 byly použity izolované finální frakce 1 a 2. Pro porovnání katalytické účinnosti dále pak i lidské mikrosomy a SupersomyTM (mikrosomy hmyzích buněk obsahující lidský rekombinantní CYP3A4 s NADPH:CYP reduktasou).

Reakční směs byla zpracována podle Briana a kol. [57]. Reakční směsi o objemu 0.5 ml obsahovaly vždy jeden z následujících enzymových systémů:

- Rekombinantní lidský CYP3A4 (0,05 μ M) izolovaný z membrán *E. coli* následně rekonstituovaný s NADPH:CYP reduktasou (0,1 μ M) v přítomnosti cytochromu b₅ (0,25 μ M) nebo bez tohoto proteinu.
- Lidské mikrosomy (0,2 μ M CYP).
- SupersomyTM obsahující lidský rekombinantní CYP3A4 (0,05 μ M) s NADPH:CYP reduktasou v přítomnosti cytochromu b₅ (0,54 μ M) nebo bez tohoto proteinu.

Reakční směs dále obsahovala:

- 50 μ M testosteron (2,5 μ l 10 mM zásobního roztoku v methanolu)
- 1 mM NADPH
- K-fosfátový pufr (0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,4)

Mikrosomy a SupersomyTM byly ředěny pufrům na výše uvedenou koncentraci CYP. Rekonstituce CYP3A4 izolované z membrán *E. coli* CYP3A6 s NADPH:CYP reduktasou byla provedena podle Burkeho a spol. [58]. CYP3A (0,5 μ M) byl rekonstituován s

NADPH:CYP reduktasou (1 μM), 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml zásob. roztok v chloroformu), 0,05 mg/ml CHAPS (v pufru HEPES), 3 mM glutathionem (30 mM zásob. roztok v H_2O), 30 mM MgCl_2 a 50 mM HEPES (500 mM zásob. roztok v H_2O , pH 7,4). Alikvot obsahující 25 pmol rekonstituovaného CYP3A4 byl přidán do inkubační směsi. Do všech uvedených směsí byl přidán testosteron a reakce byla startována přidavkem 50 μl NADPH. Inkubace probíhala 15 min při 37°C. K ukončení reakce došlo přidáním 100 μl roztoku 1 M Na_2CO_3 /2 M NaCl. Poté byl přidán fenacetin (5 μl 1 mM roztoku v metanolu) jako vnitřní standard. Směs byla extrahována 15 sekund na „Vortexu“ 2 ml dichlormetanu a centrifugována 5 minut při 3000 RPM (centrifuga T 52.2). Byl odebrán 1,5 ml organické fáze a odpařen dosucha pomocí vakuové odparky „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Takto připravené vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C a těsně před HPLC analýzou rozpuštěny ve 30 μl methanolu.

Podmínky HPLC:

- kolona C18, 250 x 4,6 mm, 5 μm
- teplota kolony 25 °C
- 70 % methanol v destilované vodě jako mobilní fáze
- Průtok 0,6 ml/min
- Nástřik 10 μl
- Detekce při vlnové délce 254 nm

4 Výsledky a diskuse

4.1 Isolace CYP3A4 z membrán *E. coli*

Nejprve byla v membránách *E. coli* stanovena koncentrace proteinů (kap. 3.3.1) a CYP3A4 (kap. 3.3.2).

Koncentrace proteinů byla **16,8 mg/ml**. V objemu 80 ml membrán *E. coli*, který byl k dispozici, bylo obsaženo **1345 mg** proteinů.

Koncentrace CYP3A4 byla **2,86 μ M**, což odpovídá **230 nmol** CYP3A4 v 80 ml vzorku.

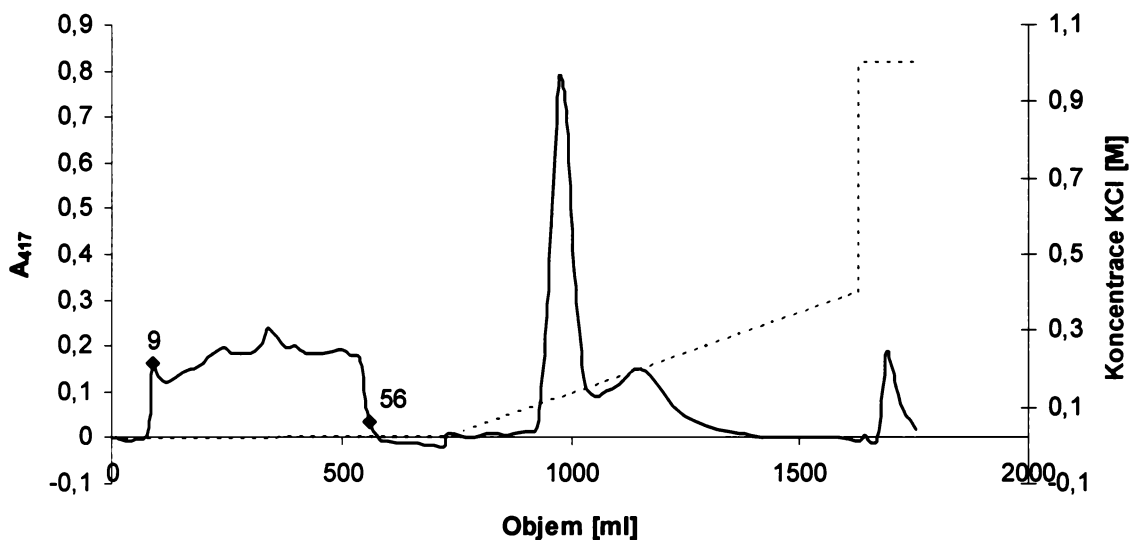
4.1.1 Solubilisace

Jelikož CYP3A4 je membranově vázaný protein, prvním krokem k izolaci tohoto enzymu byla jeho solubilisace pomocí detergentů (kap. 3.3.3).

Solubilisací bylo získáno **260 nmol** CYP3A4, což odpovídá výtěžku **113 %** (**Tab. 5, str. 44**). Tato vysoká hodnota procentuálního výtěžku by mohla být způsobena lepší přístupností oxidu uhelnatého k železu hemu CYP3A4 po jeho uvolnění do roztoku solubilisací. Koncentrace CYP3A4 stanovená v resuspendovaných peletách byla pod hranicí meze detekce. Z toho vyplývá, že solubilisací byl z membrán *E. coli* uvolněn veškerý CYP3A4. Solubilisát byl postupně nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B.

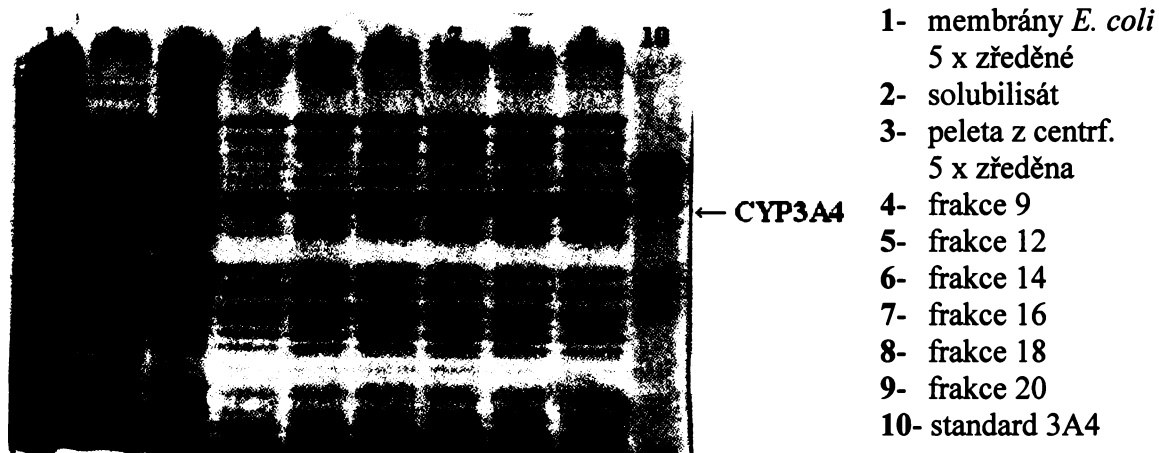
4.1.2 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

Chromatografie na DEAE-Sepharose CL6B byla provedena dle postupu uvedeném v kap. 3.3.4. V jednotlivých frakcích byla měřena absorbance při 417 nm. Chromatografii byla odstraněna část bakteriálních proteinů a došlo k „načištění“ CYP3A4. Ten se při daných podmínkách na nosič neváže a je eluován již při promývání kolony. Pro vymytí proteinů navázaných na kolonu DEAE-Sepharosy byl použit gradient 0-400 mM KCl a jednorázová aplikace 1 M KCl. Eluční profil proteinů eluovaných z kolony je zobrazen na **obr. 9 (str. 36)**.

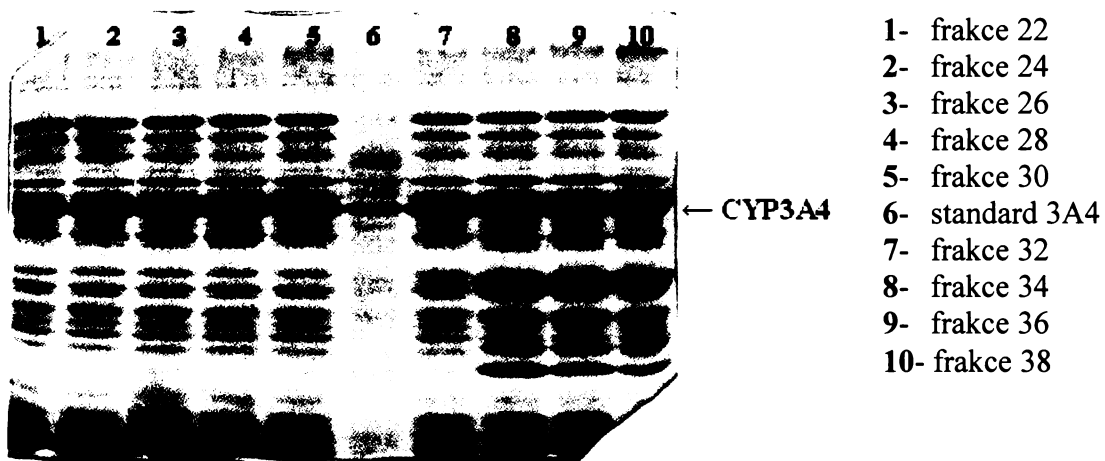


Obr. 9 Eluční profil proteinů z kolony DEAE-Sepharosy. Číslo v grafu (9 a 56) udávají frakce, v rozmezí kterých byl eluován CYP3A4. Píky ve zbylé části grafu charakterizují eluci proteinů z kolony po gradientu (0-400 mM KCl) a jednorázové aplikaci 1M KCl.

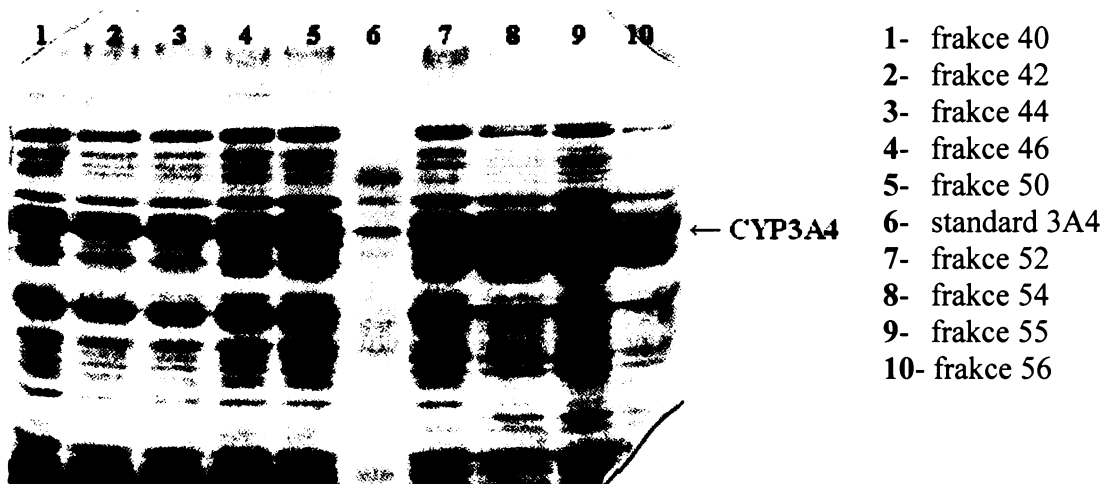
CYP3A4 se nachází ve frakcích 9 až 56 (eluční objem 90-560 ml), což bylo potvrzeno pomocí elektroforesy (obr. 10; obr. 11, 12, str. 37).



Obr. 10 Elektroforesa vzorků membrán *E. coli*, solubilisátu, pelety a frakcí 9 až 20 z kolony DEAE-Sepharosy CL6B



Obr. 11 Elektroforesa vzorků frakcí 22 až 38 z kolony DEAE-Sepharosy CL6B



Obr. 12 Elektroforesa vzorků frakcí 40 až 56 z kolony DEAE-Sepharosy CL6B

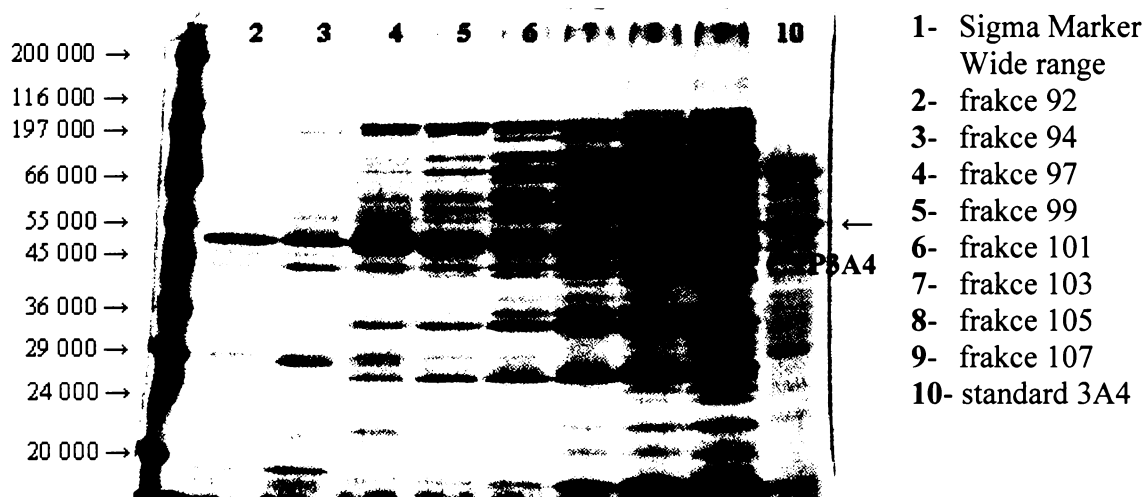
Pro další izolaci byl na základě výsledků elektroforesy obsah zkumavek rozdělen do dvou frakcí podle čistoty CYP3A4:

- **frakce 1 (F1)** o vyšší čistotě CYP3A4 s celkovým objemem **250 ml** obsahovala eluáty č.9 až 32,
- **frakce 2 (F2)** o nižší čistotě CYP3A4 s celkovým objemem **180 ml** obsahovala eluáty č.33 až 49

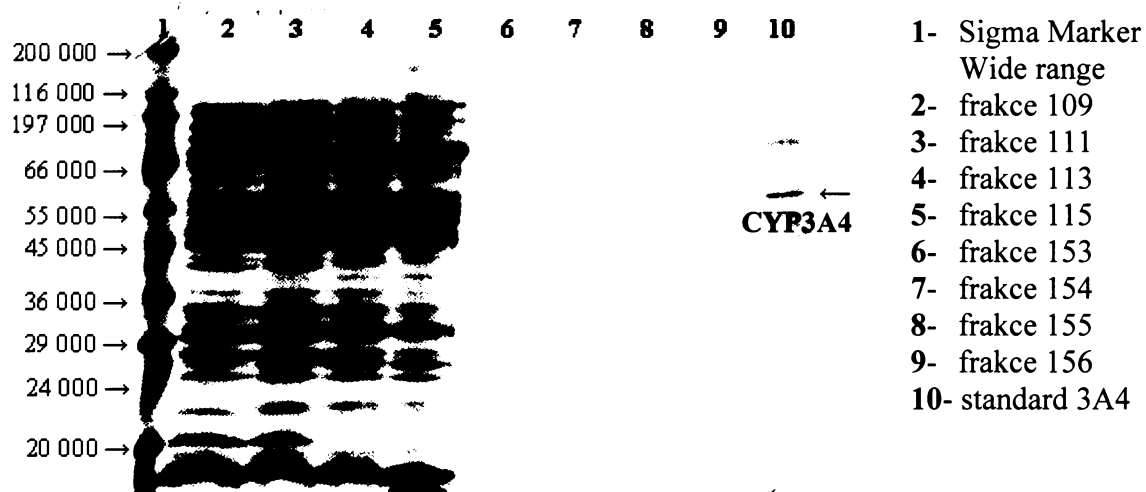
Eluáty byly následně zahuštěny na objem **50 ml (frakce 1)** a **80 ml (frakce 2)**. Frakce 1 obsahovala **126 nmol CYP3A4** v koncentraci **2,53 μM** , což odpovídá výtěžku

48 % (Tab. 5, str. 44). Frakce 2 obsahovala 121 nmol CYP3A4 o koncentraci 1,51 μM s výtěžkem 47 % (Tab. 5, str. 44). Celkový výtěžek je tedy 95 %.

Z frakcí z gradientu 0-400mM KCl a z jednorázové aplikace 1 M KCl byly odebrány vzorky a byla provedena elektroforesa (obr. 13, 14).



Obr. 13 Elektroforesa frakcí 92 až 107 z gradientu 0-400 mM KCl (čísla na levé straně obrázku značí relativní molekulovou hmotnost)



Obr. 14 Elektroforesa frakcí z gradientu 0-400 mM KCl - frakce 109-115 a z aplikace 1 M KCl - frakce 153-156, (čísla na levé straně obrázku značí relativní molekulovou hmotnost). V případě frakcí 153-156, vysoká iontová síla způsobila vysrážení proteinů a jejich slabé proniknutí do gelu.

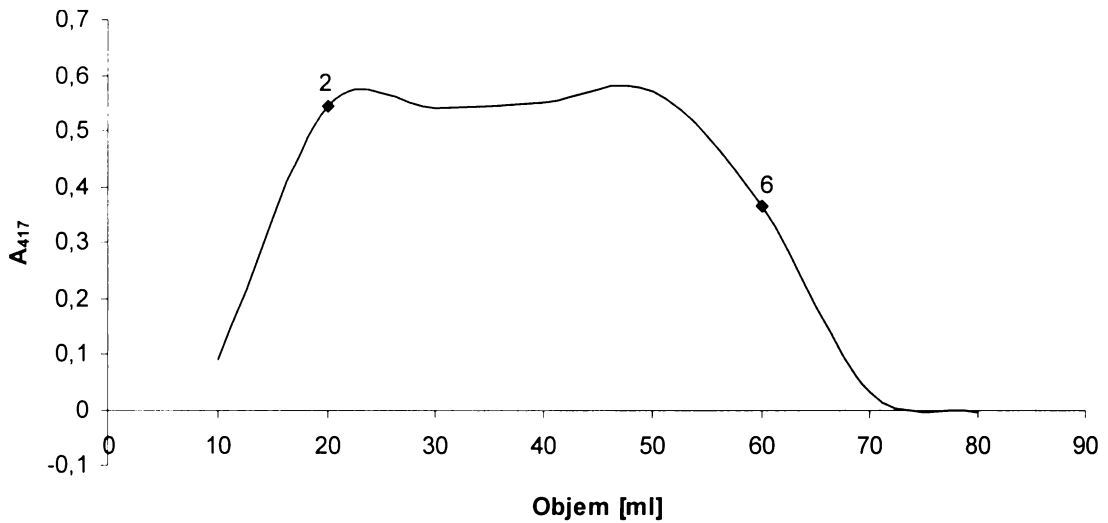
Obrázky elektroforesy **13** a **14** (str. **38**) potvrzují, že nedošlo k zachycení CYP3A4 na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B, a že veškerý CYP3A4 byl eluován ve frakcích 9 až 56.

4.1.3 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu

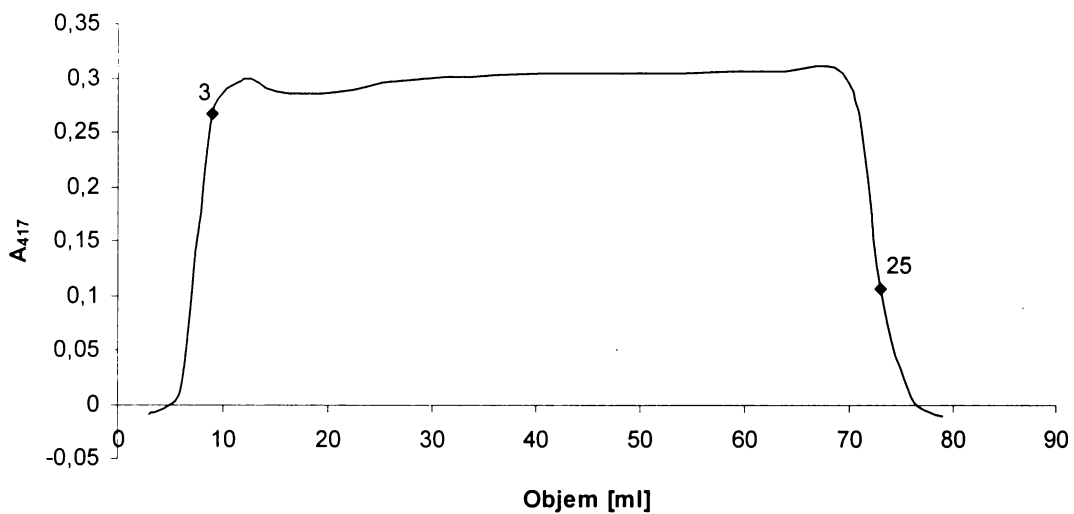
Chromatografie na koloně hydroxylapatitu byla prováděna podle návodu v kap. 3.3.5. Frakce 1 a 2 byly aplikovány na kolonu za účelem odstranění detergentu a jejich dalšího „načištění“ od ostatních proteinů [53]. Mělo dojít k navázání CYP3A4 na nosič (HAP) a odmytí detergentu E-911. Při nanášení vzorku obsahujícího CYP3A4 však došlo k postupnému zneprůchodnění kolony, které mohlo být zapříčiněno vysokou koncentrací detergentu. Frakce 1 byla pravděpodobně zahuštěna na příliš malý objem obsahující vysoké procento detergentu a proto byla frakce 2 zahuštěna pouze na objem 80 ml. Ani toto však nepomohlo a tento krok byl z uvedených důvodů vynechán. K odstranění detergentu byla zvolena chromatografie na koloně CM-Sepharosy CL6B. Část vzorku, již navázaného na nosič (HAP), byla eluována vsádkově pomocí pufru s vysokou iontovou silou (0,5 M KH_2PO_4).

4.1.4 Chromatografie na koloně CM-Sepharosy

Chromatografie na koloně CM-Sepharosy CL6B byla provedena postupem popsáním v kap. 3.3.6. Při této chromatografii mělo dojít k zachycení CYP3A4 na kolonu a odstranění detergentu, které nebylo úspěšné při chromatografii na koloně hydroxylapatitu. Jak však zobrazují eluční profily frakcí 1 a 2 (**obr. 15, 16, str. 40**), k navázání CYP3A4 na nosič nedošlo. Možnou příčinou mohla být vysoká koncentrace detergentu ve vzorcích. Ten mohl zřejmě obalit celý povrch proteinu a tím zabránil jeho navázání na nosič. Pro odstranění detergentu byla zvolena metoda využívající silikagel.



Obr. 15 Eluční profil frakce 1a na koloně CM-Sepharosy CL6B. Roztoky ze zkumavek č.2 až č.6 byly spojeny a použity při další práci.



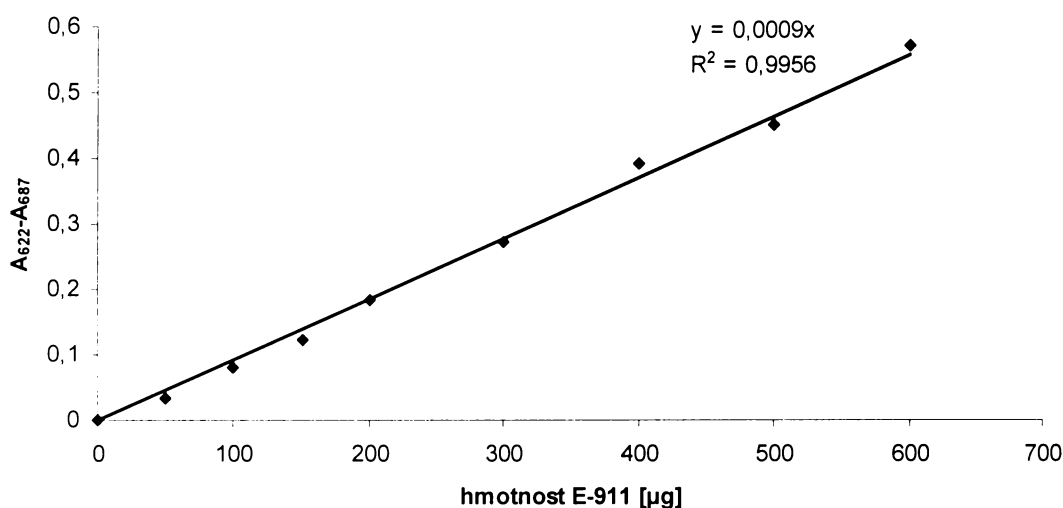
Obr. 16 Eluční profil frakce 2a na koloně CM-Sepharosy CL6B. Roztoky ze zkumavek č.3 až č.25 byly spojeny a použity při další práci.

4.1.5 Odstranění detergentu E-911 pomocí silikagelu

Detergent ve vzorku byl odstraněn pomocí silikagelu postupem popsaným v kap. 3.3.7.

Sestrojení kalibrační přímky a určení množství detergentu ve frakcích 1 a 2

Pro přípravu roztoků o přesné koncentraci detergentu nutných pro sestavení kalibrační závislosti (**obr. 17**) byl použit zásobní roztok detergentu E-911 o koncentraci 2 g/dm^3 v 50 % (v/v) ethanolu. Množství detergentu v obou frakcích bylo odhadnuto z obsahu detergentu v solubilisátu a po jeho zahuštění. Objemy frakce 1 a 2, které byly použity pro stanovení detergentu, byly zvoleny tak, aby množství detergentu v nich obsažených leželo přibližně uprostřed kalibrační přímky. Podle tohoto přiblížení byly zvoleny následující objemy: 200 μl frakce 1 a 250 μl frakce 2.



Obr. 17 Kalibrační přímka pro stanovení hmotnosti detergentu

Ukázalo se však, že uvedený odhad značně podhodnotil koncentraci detergentu ve vzorcích. V případě frakce 1 se stanovení pohybovalo u horní hranice kalibrační přímky a v případě frakce 2 byl rozdíl $A_{622}-A_{687}$ již mimo rozsah kalibrace. Nicméně v obou případech byla koncentrace detergentu vypočtena z kalibrační přímky.

Koncentrace detergentu v jednotlivých frakcích byla následující:

- **frakce 1 - 3,15 μg detergentu na 1 μl vzorku**
- **frakce 2 - 5,16 μg detergentu na 1 μl vzorku**

Vliv množství silikagelu na obsah CYP3A4

Množství silikagelu potřebného pro efektivní odstranění detergentu by se mělo pohybovat v rozmezí od 4 do 8 mg silikagelu na 1 mg E-911 [55]. Optimální poměr silikagelu k detergentu byl nejprve stanoven experimentálně v malých (200 μl) alikvotech

vzorků (**Tab. 2, 3**). Ke vzorkům bylo naváženo dané množství silikagelu a vše inkubováno za stálého třepání 3 hodiny při 4 °C. Silikagel s navázaným detergentem byl odstraněn centrifugací. V supernatantech byla poté stanovena koncentrace CYP3A4. Množství zbylého detergentu bylo opět stanoveno z kalibrační přímky (**obr. 17, str. 41**).

Tabulka 2 Vliv množství silikagelu na koncentraci CYP3A4 ve *frakci 1*

Poměr SG/E-911	c _{E-911} [µg/µl]	% E-911	c _{CYP} [µM]	% CYP
0	3,15	100	2,00	100
4	0,11	3,60	0,85	42,5
7	0	0	0,87	43,5

Tabulka 3 Vliv množství silikagelu na koncentraci CYP3A4 ve *frakci 2*

Poměr SG/E-911	c _{E-911} [µg/µl]	% E-911	c _{CYP} [µM]	% CYP
0	5,16	100	1,36	100
4	0,51	9,80	0,78	57,4
7	0	0	0,21	15,4

Z tabulek 2 a 3 je zřejmé, že vysoký obsah silikagelu ve vzorcích vede k velkým ztrátám CYP3A4. V tabulkách 2 a 3 není uveden poměr silikagelu k detergentu 10:1 a 12:1, neboť v těchto případech už koncentrace CYP nebyla téměř měřitelná. Velký úbytek CYP3A4 byl zaznamenán už při poměru silikagelu a detergentu 4:1. Ztráty mohou být způsobené například tím, že se na silikagel může kromě detergentu vázat i CYP3A4, který zůstává adsorbován na jeho částicích. Při stanovení koncentrace CYP3A4 metodou diferenční spektroskopie byly pozorovány vyšší hodnoty absorbance v oblasti 420 nm, která je charakteristická pro denaturovanou formu CYP3A4. Znamená to tedy že silikagel může způsobovat i částečnou denaturaci CYP3A4, což se projeví nižší absorbancí při 450 nm.

Pro konečné odstranění detergentu ve frakcích 1 a 2 byl určen poměr **3 mg silikagelu na 1 mg detergentu**. Supernatanty byly dialyzovány přes noc a následně zahuštěny ultrafiltrací na konečný objem **4,5 ml pro frakci 1** a **4,7 ml pro frakci 2**.

V těchto vzorcích byla opět stanovena koncentrace CYP3A4 a detergentu (**Tab.4, str. 43**).

Tabulka 4 Koncentrace CYP3A4 a detergentu ve frakcích před a po zahuštění

Vzorek	V _{celk} [ml]	c _{CYP} [μM]	nmol CYP	c _{det.} [mg/ml]	m _{det} [mg]	% deterg.
F1(a)	35	2,0	70	3,15	110,3	100
F1(b)	4,5	4,95	22,3	4,20	18,9	17
F2(a)	75	1,36	102	5,16	387	100
F2(b)	4,7	11,3	53,2	19,25	90,5	23

(a) - frakce před zahuštěním, (b) - frakce po zahuštění

V_{celk.} - celkový objem dané frakce

c_{CYP} - koncentrace CYP3A4

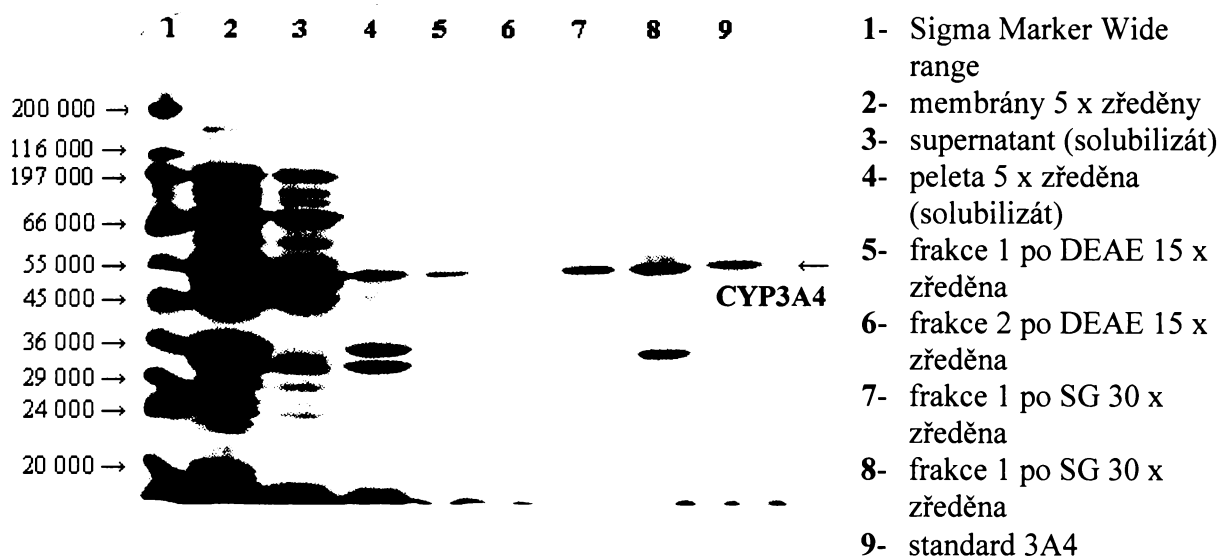
c_{det.} - koncentrace detergentu

m_{det.} - hmotnost detergentu

Jak je vidět z tabulky 4, z **frakce 1** se podařilo **odstranit 83 % detergentu** a z **frakce 2 77 % detergentu**. Ztráty CYP3A4 však byly vysoké. V případě frakce 1 se **ztráta** pohybovala kolem **68 %** a v případě frakce 2 přibližně kolem **48 %**.

4.1.6 Charakterisace frakcí z průběhu izolace CYP3A4

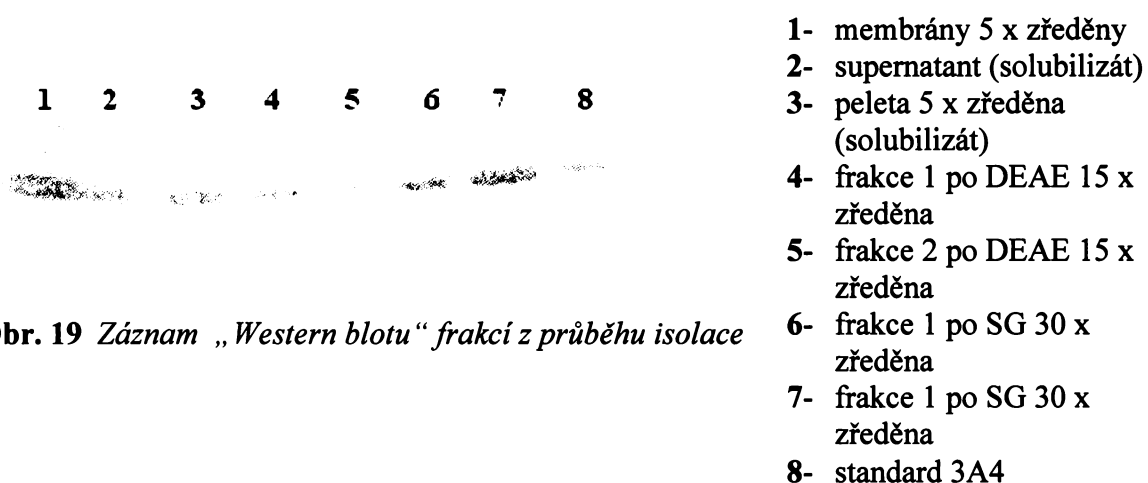
Na **obr. 18** je znázorněn průběh izolace CYP3A4 z membrán E. coli pomocí SDS elektroforesy.



Obr. 18 Elektroforesa frakcí z průběhu izolace

Může se zdát, že frakce po DEAE-Sepharose CL6B (č. 5 a 6) jsou čistší než frakce ostatní (č. 7, 8, 9). Je to však způsobeno větším naředením vzorků, nacházejících se v jamkách č. 5 a 6 a tedy i slabší viditelností přítomných proteinů.

Přítomnost CYP3A4 v jednotlivých preparátech byla prokázána specifickou imunochemickou metodou „Western Blot“ (obr. 19).



Obr. 19 Záznam „Western blotu“ frakcí z průběhu izolace

Přehled dat uvádějících charakteristiky jednotlivých preparátů CYP3A4 v průběhu izolace je uveden v tabulce 5. Jak je z ní patrné, celkově bylo získáno **75,5 nmol CYP3A4**, což odpovídá **výtěžku 29 %**.

Tabulka 5 Charakteristiky preparátů CYP3A4 z průběhu izolace

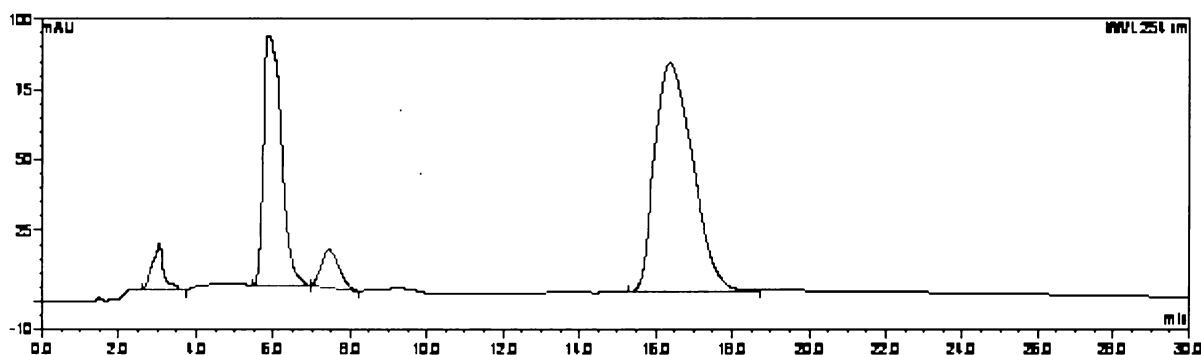
Vzorek	V _{celk} [ml]	c _{prot.} [mg/ml]	m _{prot} [mg]	c _{CYP} [μM]	nmol CYP	Výtěžek [%]
Membrány	80	16,8	1345	2,86	230	88
Supernatant (solub.)	500	1,53	763	0,52	260	100
Frakce 1 po DEAE	50	1,97	98,9	2,53	126	48
Frakce 2 po DEAE	80	1,19	95,1	1,51	121	47
Frakce 1 po SG-final	4,5	11,6	52,4	4,95	22,3	9
Frakce 2 po SG-final	4,7	5,0	23,5	11,3	53,2	20

V_{celk.} - celkový objem dané frakce
c_{prot.} - koncentrace proteinů
m_{prot.} - hmotnost proteinů
c_{CYP} - koncentrace CYP3A4

4.2 Stanovení enzymové aktivity CYP3A4 na základě oxidace testosteronu

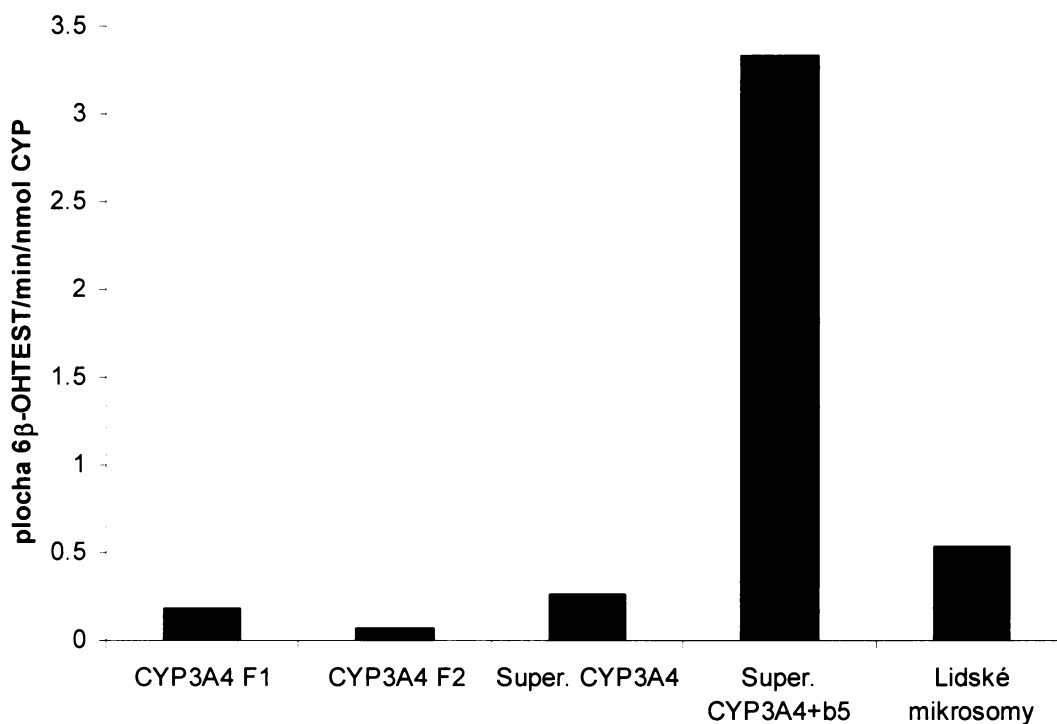
Specifickým substrátem CYP3A4 je testosteron, který je tímto enzymem hydroxylován v poloze 6 β [53], proto byla jeho oxidace v této poloze využita ke zjištění aktivity enzymu CYP3A4 izolovaného z membrán *E. coli*. Pro srovnání katalytické účinnosti CYP3A4 byly dále použity lidské mikrosomy a SupersomyTM (mikrosomy hmyzích buněk obsahující lidský rekombinantní CYP3A4 s NADPH:CYP reduktasou).

Na **obr. 20** je ukázka eluce testosteronu a jeho 6 β -hydroxyderivátu po inkubaci testosteronu s CYP3A4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou podle postupu uvedeného v kap. 3.3.11.



Obr. 20 Testosteron a jeho 6 β -hydroxyderivát po inkubaci s CYP3A4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou podle postupu uvedeném v kap 3.3.11. Eluční časy jednotlivých komponent inkubační směsi detekovaných při 254 nm: **6 min.** fenacetin (vnitřní standard), **7,5 min.** 6 β -hydroxytestosteron **16,8 min.** testosteron. **3 min** tento pik byl přítomen i v kontrolních vzorcích (v inkubační směsi obsahující všechny složky kromě NADPH).

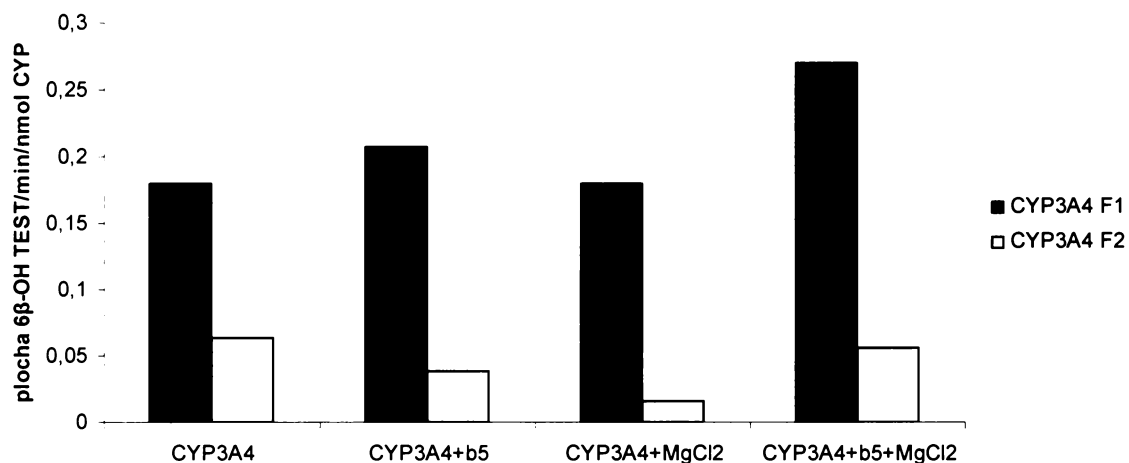
Tvorba 6 β -hydroxytestosteronu ve výše zmíněných enzymových systémech je zřejmá z **obr. 21** (str. 46).



Obr. 21 Tvorba 6β-hydroxytestosteronu v enzymových systémech obsahujících CYP3A4, (F1-frakce 1, F2-frakce 2, Super.-SupersomyTM)

6β-Hydroxylace testosteronu byla nejefektivnější v „supersomálním“ systému, kde je spolu s CYP3A4 exprimovaný i cytochrom b₅, který jak známo ovlivňuje katalytickou aktivitu tohoto enzymu [23]. Pokud není cytochrom b₅ v SupersomechTM exprimován snižuje se aktivita CYP3A4 měřená jako 6β-hydroxylace testosteronu 12,8 krát. Nižší aktivita CYP3A4 byla zjištěna v rekonstituovaných systémech obsahujících izolovaný CYP3A4 z membrán *E. coli*. Frakce 1 obsahující CYP3A4 přeměňovala testosteron 2,8 krát účinněji než frakce 2. Lidské mikrosomy, které svým složením nejvíce odpovídají *in vivo* podmínkám, oxidovaly testosteron také poměrně efektivně.

Jak je z předchozího obrázku zřejmé, aktivita CYP3A4 je závislá na přítomnosti cytochromu b₅. Bylo také zjištěno, že aktivitu enzymu mohou například ovlivnit ionty Mg²⁺. Vliv těchto faktorů byl proto sledován ve frakcích 1 a 2 (**obr. 22, str. 47**).



Obr. 22 Vliv cytochromu b_5 a Mg^{2+} iontů na 6β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou CYP3A4 izolovanou z membrán *E. coli* (F1 - frakce 1, F2 - frakce 2).

Frakce 2 obsahující CYP3A4 byla prakticky katalyticky neúčinná. Ani cytochrom b_5 ani ionty Mg^{2+} nezvýšily aktivitu tohoto enzymu. Naopak se zdá, že samotná přítomnost Mg^{2+} oxidaci testosteronu inhibuje. Zřejmě je však aktivita CYP3A4 tak nízká, že uvedené odchylky mezi jednotlivými systémy, které jsou znázorněny na **obr. 22**, jsou v rámci experimentální chyby a nemůžeme zde prokazovat aktivační či inhibiční účinek použitých faktorů.

Aktivita CYP3A4 obsaženého ve frakci 1 je ve směru oxidace testosteronu 2,8 krát efektivnější než frakce 2. I když se zdá, že přítomnost samotného cytochromu b_5 nebo iontů Mg^{2+} nemají na aktivitu tohoto enzymu prakticky žádný vliv, jejich společná přítomnost v inkubační směsi s CYP3A4 zvyšuje jeho aktivitu 1,5 krát. Mohlo by to být dáno tím, že vlivem použitých faktorů dojde k ovlivnění struktury CYP3A4 tak, že selepší přístupnost substrátu do aktivního centra a tím se zvýší i katalytická účinnost enzymu. Tyto výsledky potvrzují nutnost uvádět přesné experimentální uspořádání daných pokusů.

5 Závěr

Isolací CYP3A4 z membrán *E. coli* byly získány dvě frakce o různé čistotě CYP3A4. Frakce 1 o vyšší čistotě CYP3A4 a frakce 2 o čistotě nižší. Celkový obsah CYP3A4 v těchto frakcích byl 75,5 nmol, což odpovídá výtěžku 29 %. Nízký výtěžek byl způsobem v největší míře ztrátami při odstranění detergentu pomocí silikagelu, které se pohybovali kolem 70 %.

Charakterisace těchto frakcí na základě stanovení enzymové aktivity ukázala, že frakce 1 je v průměru 2,8 krát efektivnější v přeměně testosteronu na 6 β -hydroxytestosteron než frakce 2. Frakce 2 byla katalyticky velmi málo účinná a na aktivitu CYP3A4 v tomto systému neměli vliv ani cytochrom b₅ ani přítomnost iontů Mg²⁺. Aktivita CYP3A4 ve frakci 1 byla zvýšena za přítomnosti cytochromu b₅ spolu s ionty Mg²⁺. V případě působení těchto dvou faktorů odděleně nebyl prokázán jejich aktivační vliv na enzymovou aktivitu CYP3A4. Oproti mikrosomálnímu a supersomálnímu systému mají obě izolované frakce podstatně nižší aktivitu.

6 Seznam použité literatury

1. Parkinson A.: *Biotransformation of xenobiotics*, Casarett and Doull's Toxicology, 6th Edition, McGraw-Hill, New York, str. 135 (2001)
2. Jakoby W. B., Ziegler D. M.: *J. Biol. Chem.* 265, 20715 (1990)
3. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)
4. Stiborova M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. listy* 93, 229 (1999)
5. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* 28, 57 (2000)
6. Guengerich F. P.: *Biol. Chem.* 266, 10019 (1991)
7. Kotrbová V.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2005)
8. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. jr., Martínek V., Páca J.: *Chem. listy* 98, 876 (2004)
9. Ohkawa H., Imaishi H., Shiota N., Yamada T., Inui H., Ohkawa H.: *Plant Biotechnology* 15, 173 (1998)
10. Gebhart R.: *Pharmacol. Ther.* 52, 275 (1994)
11. Bolwell G. P., Bozak K., Zimmerlin A.: *Phytochemistry* 37, 1492 (1989)
12. Pulos T. L., Cupp J.V., Li H.: *sv. 2. Case Bound*, New York, (1995)
13. Klingenberg M.: *Arch Biochem. Biophys.* 75(2), 376 (1958)
14. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: *Faseb J.* 6(2), 669 (1992)
15. <http://metallo.scripps.edu/promise/>, (20.4.2009)
16. Anzenbacher P., Anzenbacherová E.: *Cell Mol. Life Sci.* 58(5-6), 737 (2001)
17. Anzenbacherová E., Anzenbacher P.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol* (1998)
18. Horecker B. L.: *J. Biol. Chem.* 183, 593 (1950)
19. Epoch H. G., Strittmatter P.: *J. Biol. Chem.* 254, 8976 (1979)
20. Schacter B. A., Nelson E. B., Karcer H. S., Masters B. S. S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972)
21. Wang M., Roberts L. D., Paschke R., Shea M. T., Masters B. S. S., Kim P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411 (1997)
22. Vermilion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* 256, 266 (1981)
23. Schenkman J., Jansson I.: *Pharmacology and Therapeutics* 97, 139 (2003)
24. Hildebrandt A., Estabrook RW.: *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 66 (1971)

25. Nebert D.W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Philips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA* 8, 1 (1989)
26. Daly A. K.: *J. Mol. Med.* 73, 539 (1995)
27. Stephens E. A., Tailor J. A., Kaplan N., Yang C. H., Hsieh L. L., Lucier G. W., Bell D. A.: *Pharmacogenetics* 4, 209 (1994)
28. Guengerich F. P.: *The AAPS Journal* 8(1), Article 12 (2006)
29. Bořek-Dohalská L.: *Disertační práce*, PřF UK, Praha (2002)
30. Szklarz D. G., Halpert J. R.: *Journal of Computed-Aided Molecular design* 11, 265 (1997)
31. Lewis D. F., Eddershaw P. J., Goldfarb P. S., Tarbit M. H.: *Xenobiotica* 26, 1067 (1996)
32. Williams P. A., Cosme J., Vinkovič D. M., Ward A., Angove H. C., Day P. J., Vonrhein C., Tickle I. J., Jhoti H.: *Science* 305 (2004)
33. Yano J. K., Wester M. R., Schoch G. A., Griffin K. J., Stout C. D., Johnson E. F.: *J. Biol. Chem.* 279, 38091 (2004)
34. Scott E. E., Halpert J. R.: *Trends in Biochemical Science* 30, No.1 (2005)
35. Rendic S.: *Drug. Metab. Rev.* 34, 83 (2002)
36. Ueng Y. F., Kuwabara T., Chun Y. J., Guengerich F. P.: *Biochemistry* 36, 370 (1997)
37. Shou M., Grogan J., Mancewicz J. A., Krausz K. W., Gonzales F. J., Gelboin H. V., Korzekwa K. R.: *Biochemistry* 33, 6450 (1994)
38. Hosea N. A., Miller G. P., Guengerich F. P.: *Biochemistry* 39, 5929 (2000)
39. Kenworthy K. E., Clarke S. E., Andrews J., Houston J. B.: *Drug Metab. Dispos.* 29, 1644 (2001)
40. Koley A. P., Buters J. T. M., Robinson R. C., Markowitz A., Friedman F. K.: *J. Biol. Chem* 272, 3149 (1997)
41. Reimers D., Ježek A.: *Prax. Pneumol.* 25, 255 (1971)
42. Janz D., Schmidt D.: *Lancet* 1, 1113 (1974)
43. Guengerich F. P., Parikh A.: *Curr. Opin. Biotechnik.* 8, 623 (1997)
44. Thier R., Pemble S. E., Taylor J. B., Humphreys W. G., Persmark M., Ketterer B., Guengerich F. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2281 (1973)
45. Mumberg D., Miller R., Funk M.: *Elsevier* 156, 119 (1995)

46. Zuber M. X., Simpson E. R., Waterman M. R.: *Science* 234, 1258 (1986)
47. Guengerich F. P., Parikh A., Johnson E. F., Richardson T. H., Wachenfeldt C., Cosme J., Jung F., Strassburg C. P., Manns M. P., Tukey R. H., Pritchard M., Fournel-Gigleux S., Burchell B.: *Drug Metab. Dispos.* 25, 1234 (1997)
48. Gillam E. M. J., Baba T., Kim B. R., Ohmori S., Guengerich F. P.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 305, 123 (1993)
49. Wiechelman K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: *Anal. Biochem.* 175, 231 (1988)
50. Omura T., Sato R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964)
51. Gervot L., Carriere V., Costet P., Caugnenc P. H., Berger A., Beaune P., Waziers I.: *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2, 381 (1996)
52. Anzenbacher P., Kovář J.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, ministerstvo školství ČSR, Praha (1986)
53. Gillam E. M. J., Guo Z., Ueng Y. F., Yamazaki H., Cock I., Reilly P. E. B., Hooper W. D., Guengerich F. P.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 317, 374 (1995)
54. Garewal H. S.: *Anal. Biochem.* 54, 319 (1973)
55. Anzenbacher P., Šípál Z., Hodek P.: *Biomed. Biochim. Acta* 43, 1343 (1984)
56. Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970)
57. Brian W. R., Sari M. A., Iwasaki M, Shimada T., Kaminsky L. S., Guengerich F. P.: *Biochemistry* 29, 11280 (1990)
58. Burke M. D., Thompson S., Elcombe O. R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer M. T.: *Biochem. Pharmacol.* 34, 3337 (1985)

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

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka