

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Natálie Kroftová

**OXIDACE BENZO[A]PYRENU CYTOCHROMEM P450 1A1
EXPRIMOVANÝM V PROKARYOTICKÉM A EUKARYOTICKÉM SYSTÉMU**

**OXIDATION OF BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1
EXPRESSED IN PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC SYSTEMS**

Diplomová práce

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2013

Prohlášení

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

V Praze dne 19. května 2013

.....
Bc. Natálie Kroftová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení a za laskavý přístup při vypracovávání této diplomové práce.

Dále děkuji Mgr. Radku Indrovi za všestrannou pomoc a potřebné rady, Mgr. Tomáši Ječmenovi za vedení a trpělivost při izolaci a purifikaci mikrosomálních enzymů a celému kolektivu biochemické laboratoře za vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Můj vřelý dík patří rovněž Mgr. Šárce Blažkové, Ph.D. za věcné připomínky, nápady a podporu při psaní této práce a mé rodině za podporu během celého studia.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant P301/10/0356) a Univerzitou Karlovou v Praze (grant UNCE204025/2012).

Abstrakt

Benzo[a]pyren (BaP) je významným lidským kancerogenem. Je metabolizován řadou enzymových systémů jako jsou cytochromy P450 (CYP) a epoxidhydrolasa. Cílem předkládané diplomové práce bylo studium metabolismu BaP *in vitro* jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných induktory cytochromů P450 a dále lidským cytochromem P450 1A1 (CYP1A1) exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému. Eukaryotický expresní systém byl tvořen mikrosomy izolovanými z hmyzích buněk, zatímco prokaryotický expresní systém tvořily „zlomky“ membrán *E. coli*. V rámci rekombinantního lidského CYP1A1 byl zkoumán vliv cytochromu b₅, NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR) a epoxidhydrolasy na oxidaci BaP. Izolace a purifikace králičí jaterní CPR byla dalším cílem této práce. Metabolity vzniklé oxidací BaP byly separovány metodou HPLC. Výsledky získané v diplomové práci demonstrují, že jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných induktory CYP podrodiny 1A (Sudanem I), podrodiny 2B (fenobarbitalem) a podrodiny 3A (PCN) vykazují vyšší efektivitu oxidovat BaP než mikrosomy kontrolních potkanů. BaP je oxidován lidským CYP1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému na šest metabolitů (BaP-9,10-dihydrodiol, metabolit BaP s dosud neurčenou strukturou, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion a BaP-3-ol), zatímco oxidací BaP lidským CYP1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému vznikají pouze čtyři metabolity (metabolit BaP s dosud neurčenou strukturou, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion a BaP-3-ol). Cytochrom b₅ nemá významný vliv na oxidaci BaP lidským CYP1A1 exprimovaným v eukaryotickém i prokaryotickém systému. Oxidace BaP lidským CYP1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému je ovlivněna množstvím CPR. Nejvyšší efektivitu oxidovat BaP vykazuje systém enzymů rekonstituovaných v poměru CYP:CPR 1:3, t.j. s nejvyšším obsahem CPR. Při poměru CYP:CPR 1:1 oxiduje lidský CYP1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému BaP na další metabolit, BaP-7,8-dihydrodiol. Ten je intermediátem vedoucím k torbě kovalentních aduktů s DNA. V přítomnosti epoxidhydrolasy oxiduje lidský CYP1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému BaP na dihydrodioly, konkrétně BaP-9,10-dihydrodiol a BaP-7,8-dihydrodiol. Získané výsledky přispívají k poznání metabolismu BaP lidskými cytochromy P450 exprimovanými v modelových expresních systémech.

Klíčová slova:

benzo[a]pyren, metabolismus, cytochrom P450, prokaryotický a eukaryotický expresní systém, cytochrom b₅, NADPH:cytochrom P450 reduktasa, epoxidhydrolasa, HPLC

Abstract

Benzo[a]pyrene (BaP) is a human carcinogen, which is metabolized by a variety of enzymes such as cytochrome P450 (CYP) and epoxide hydrolase. The aim of this work was to study BaP metabolism *in vitro* by the hepatic microsomal system of rats treated with CYP inducers and by human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) expressed in eukaryotic and prokaryotic systems. An eukaryotic expression system consisted of microsomes isolated from insect cells, whereas a prokaryotic expression system was formed by the membrane fragments of *E. coli*. In the case of recombinant human CYP1A1, we investigated the influence of cytochrome b₅, NADPH:cytochrome P450 reductase (CPR) and epoxide hydrolase in BaP oxidation. Isolation and purification of rabbit hepatic CPR was another aim of this work. BaP metabolites were separated by HPLC. The results found in this work demonstrate the fact that hepatic microsomal systems of rats treated with an inducer of CYP1A (Sudan I), an inducer of CYP2B (phenobarbital) and an inducer of CYP3A (PCN) exhibit higher efficiency of BaP oxidation than microsomes of control rats. BaP is oxidized by human CYP1A1 expressed in the eukaryotic system to six metabolites (BaP-9,10-dihydrodiol, BaP metabolite with unknown structure, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-3-ol), whereas by human CYP1A1 expressed in the prokaryotic system only to four metabolites (BaP metabolite with unknown structure, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-3-ol). Cytochrome b₅ has no significant influence on BaP oxidation by human CYP1A1 expressed in both systems. BaP oxidation by human CYP1A1 expressed in the prokaryotic system is influenced by the amount of CPR. The enzymatic system reconstituted from CYP and CPR in a ratio of CYP:CPR of 1:3 (containing the highest amount of CPR) has the highest efficiency in BaP oxidation. Human CYP1A1 expressed in the prokaryotic system reconstituted with CPR in a ratio of CYP:CPR of 1:1 oxidizes BaP to another metabolite, BaP-7,8-dihydrodiol, an intermediate leading to formation of covalent DNA adducts. In the presence of epoxide hydrolase, human CYP1A1 expressed in the prokaryotic system oxidizes BaP to dihydrodiols, namely BaP-9,10-dihydrodiol and BaP-7,8-dihydrodiol. The results obtained in this work contribute to our knowledge of BaP metabolism by human CYP1A1 expressed in model expression systems.

Key words:

benzo[a]pyrene, metabolism, cytochrome P450, prokaryotic and eukaryotic expression systems, cytochrome b₅, NADPH:cytochrome P450 reductase, epoxid hydrolase, HPLC

(In Czech)

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD	12
1.1 KANCEROGENEZE.....	12
1.1.1 Základní fáze kancerogeneze	13
1.1.2 Kancerogenní faktory.....	14
1.1.2.1 Chemické kancerogeny	15
1.2 BENZO[A]PYREN	16
1.2.1 Přírodní a antropogenní zdroje benzo[a]pyrenu.....	17
1.2.2 Účinky benzo[a]pyrenu na organismus.....	17
1.2.3 Biotransformace benzo[a]pyrenu.....	18
1.2.3.1 Detoxifikace benzo[a]pyrenu v organismu	19
1.2.3.2 Aktivace benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů s DNA.....	21
1.3 SYSTÉM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ	22
1.3.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa	23
1.3.1.1 Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy	23
1.3.1.2 Mechanismus funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy	24
1.3.1.3 Indukce NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....	25
1.3.2 Cytochromy P450	26
1.3.2.1 Struktura cytochromu P450	26
1.3.2.2 Funkce cytochromu P450.....	27
1.3.2.3 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce.....	28
1.3.2.4 Nomenklatura cytochromů P450.....	30
1.3.2.5 Indukce cytochromů P450.....	30
1.3.2.6 Exprese lidských cytochromů P450 v eukaryotickém a prokaryotickém systému	32
1.3.2.7 Lidský cytochrom P450 1A1.....	34
1.3.3 Fosfolipidová membrána	34
1.4 CYTOCHROM B₅	35
1.4.1 Struktura cytochromu b ₅	35
1.4.2 Vliv cytochromu b ₅ na reakce katalyzované cytochromy P450.....	36
1.4.3 Mechanismus funkce cytochromu b ₅	36
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	38
3 MATERIÁL A METODY	39
3.1 MATERIÁL.....	39
3.1.1 Použitý materiál a chemikálie.....	39

3.1.2	Použité roztoky a pufrý	41
3.1.3	Použité přístroje	43
3.2	METODY	45
3.2.1	Izolace a purifikace NADPH:cytochrom P450 reduktasy	45
3.2.1.1	<i>Premedikace pokusných zvířat</i>	<i>45</i>
3.2.1.2	<i>Izolace jaterní mikrosomální frakce.....</i>	<i>45</i>
3.2.1.3	<i>Solubilizace jaterní mikrosomální frakce.....</i>	<i>46</i>
3.2.1.4	<i>Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B.....</i>	<i>47</i>
3.2.1.5	<i>Chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B</i>	<i>48</i>
3.2.2	Analytická stanovení.....	48
3.2.2.1	<i>Stanovení koncentrace proteinu.....</i>	<i>48</i>
3.2.2.2	<i>Stanovení koncentrace cytochromu P450</i>	<i>49</i>
3.2.2.3	<i>Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....</i>	<i>49</i>
3.2.3	SDS elektroforéza	50
3.2.4	Oxidace benzo[a]pyrenu mikrosomálním systémem monooxygenas se smíšenou funkcí.....	51
3.2.4.1	<i>Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana</i>	<i>51</i>
3.2.4.2	<i>Oxidace benzo[a]pyrenu lidskými cytochromy P450 1A1 za přítomnosti cytochromu b₅.....</i>	<i>52</i>
3.2.4.3	<i>Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému za přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....</i>	<i>53</i>
3.2.4.4	<i>Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému za přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy v liposomech</i>	<i>54</i>
3.2.4.5	<i>Oxidace benzo[a]pyrenu lidskými cytochromy P450 1A1 za přítomnosti epoxidhydrolasy</i>	<i>55</i>
3.2.4.6	<i>Separace metabolitů benzo[a]pyrenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií</i>	<i>55</i>
4	VÝSLEDKY	57
4.1	IZOLACE A PURIFIKACE NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASY	57
4.1.1	Izolace jaterní mikrosomální frakce.....	57
4.1.2	Solubilizace jaterní mikrosomální frakce	58
4.1.3	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B	58
4.1.4	Chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B	61
4.1.5	Charakterizace průběhu izolace a purifikace NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....	64
4.2	OXIDACE BENZO[A]PYRENU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ.....	65
4.2.1	Vliv induktorů cytochromů P450 na oxidaci benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana	67
4.2.2	Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému.....	69

4.2.3	Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému	70
4.2.4	Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy v liposomech na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému.....	73
4.2.5	Vliv epoxidhydrolasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému	74
5	DISKUSE.....	76
6	ZÁVĚR	81
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2',5'-ADP	adenosin-2',5'-difosfát
ACN	acetonitril
AhR	aryl hydrocarbon receptor
APS	peroxodisíran amonný
Arnt	AhR nuclear translocator
A _x	absorbance při vlnové délce x nm
BaP	benzo[a]pyren
BCA	bicinchoninová kyselina
β-NF	β-naftoflavon
BPDE	benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	constitutive androstane receptor
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
cDNA	komplementární ribonukleová kyselina
C _p , C _{CYP}	koncentrace proteinu, koncentrace cytochromu P450
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
cyt b ₅	cytochrom b ₅
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
dA	deoxyadenosin
DEAE	diethylaminoethyl-
dG	deoxyguanosin
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E-911	Emulgen 911
EC	číselný kód enzymu
EH	epoxidhydrólasa
EtOH	ethanol

FAD, FADH, FADH ₂	flavinadenindinukleotid oxidovaný, radikálový, redukovaný
FMN, FMNH, FMNH ₂	flavinmononukleotid oxidovaný, radikálový, redukovaný
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion redukovaný
GST	glutathion-S-transferasa
HEPES	sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonové kyseliny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
Hsp	protein tepelního šoku (heat shock protein)
CHAPS	sodná sůl 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonové kyseliny
IARC	Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
LR	nižší aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
M	mol/l
M1 – M6, Mx	metabolity benzo[a]pyrenu
MeOH	methanol
MF	mikrosomální frakce
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
mRNA	„messenger“ ribonukleová kyselina
NAD ⁺ , NADH	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný, redukovaný
NADP ⁺ , NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný, redukovaný
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1
P450	pigment s maximem absorpance při 450 nm, cytochrom P450
<i>p53</i>	tumor supresorový gen
PA	fenacetin
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PB	fenobarbital
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor

PXR	pregnane X receptor
R	vyšší aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
<i>ras</i> , <i>K-ras</i> , <i>Ha-ras</i>	onkogeny
RH	substrát
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	hydroxylovaný produkt
R'OH	alkohol vzniklý redukcí organického hydroperoxidu
R'OOH	organický hydroperoxid
ROS	aktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)
RPM	počet otáček za minutu
RXR	retinoid X receptor
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
SOL	solubilizát mikrosomální frakce
SULT	sulfotransferasa
SXR	steroid X receptor
TCDD	tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEA	triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	standardní jednotka enzymové aktivity
UDP	uridindifosfát
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UV	záření v ultrafialové oblasti spektra
v/v	poměr objem/objem
VIS	záření ve viditelné oblasti spektra
w/v	poměr hmotnost/objem

1 ÚVOD

Od roku 1971 bylo Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny ohodnoceno z hlediska kancerogenity více než 900 látek, z nichž je dnes 450 označeno za možné, pravděpodobné nebo prokazatelné kancerogeny pro člověka [28]. Tyto látky, mezi které lze zařadit např. různé chemické sloučeniny, se jak přirozeně, tak i antropogenní činností rozšířily do všech složek životního prostředí. Lidská populace je tak všem kancerogenům nevyhnutelně exponována. Jejich dlouhodobé působení na lidský organismus může být následně příčinou vzniku a vývoje nádorových onemocnění. Aby bylo možné tato onemocnění efektivně léčit, je nutná znalost nejenom protinádorových léčiv, ale i vyvolávajícího kancerogenu. Za nezbytné je považováno především poznání metabolismu daného kancerogenu a enzymů na něm participujících spolu s mechanismy, které vedou k iniciaci nádorových procesů.

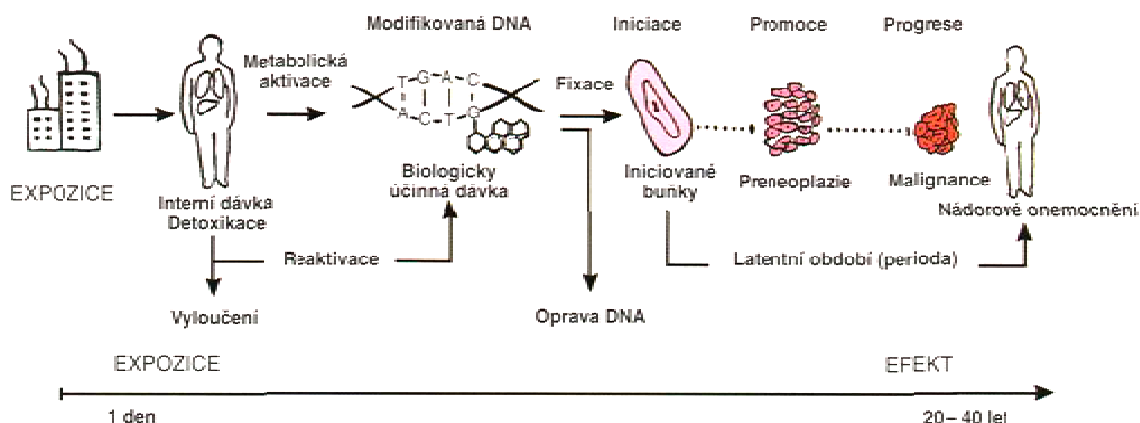
1.1 KANCEROGENEZE

Kancerogenezi je nazýván proces, který vede ke vzniku a vývoji nádorových onemocnění (Obr. 1). Tento proces lze charakterizovat jako nekoordinovaný růst abnormálních buněk, který probíhá částečně nebo úplně autonomně (bez regulačního zásahu organismu) a na úkor energetických a nutričních potřeb normálních buněk. [48]

V průběhu tohoto multifázového procesu, jehož jednotlivé fáze jsou popsány v kap. 1.1.1, dochází v důsledku působení zevních a v menší míře i vnitřních faktorů (kap. 1.1.2) ke vzniku mutací v tzv. kritických genech [23]. Jejich počet se odhaduje na několik set, což je méně než 0,1 % z celého genomu. Vznik mutací v těchto genech vede k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů, zejména těch, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu. [72]

Mezi výše zmíněné kritické geny se řadí především protoonkogeny, jejichž produkty, protoonkoproteiny, mají v buněčné regulaci stimulační efekt na proliferaci. Jakákoliv modifikace v protoonkogenech (např. mutace v jedné ze dvou alel, amplifikace či translokace úseků DNA) vede k jejich aktivaci na onkogeny, jejichž expresí vznikají tzv. onkoproteiny, které následně mohou být příčinou deregulace buněčného dělení a přeměny normální buňky v buňku nádorovou (maligní transformace). Významnou rodinou jsou např. onkogeny *ras*, k jejichž aktivaci stačí pouze bodová mutace. Rodina těchto onkogenů se vyskytuje u 10 až 20 % všech lidských nádorů. [71, 48]

Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílejí i tumor supresorové geny (tzv. antionkogeny). Jejich expresí vznikají proteiny, které participují na regulaci buněčné proliferace její inhibicí. Modifikace v těchto genech (např. mutace v obou alelách nebo jejich delece) vede stejně jako u výše popsaných protoonkogenů k maligní transformaci. K významným tumor supresorovým genům patří gen *p53*, který se v lidském genomu nachází na pozici 17p13.1. Mutace v tomto genu byla pozorována u více než 50 % všech lidských nádorů. [71, 48]



Obr. 1 Schéma multifázové kancerogeneze [převzato z 71]

1.1.1 Základní fáze kancerogeneze

Proces vzniku a vývoje nádorového onemocnění lze rozdělit minimálně na tři základní časové etapy, a to iniciaci, promoci a progresi (Obr. 1).

V iniciační fázi dochází v normální buňce, na kterou působí tzv. kancerogenní faktory (iniciátory), k mutacím ve výše popsaných kritických genech, které kódují proteiny regulující buněčnou proliferaci. V menší míře vznikají mutace v těchto genech i spontánně. [48] Výsledkem jsou aktivované onkogeny a deaktivované tumor supresorové geny, které jsou společně se selháním reparačních mechanismů příčinou vzniku iniciované buňky. Působení iniciátorů lze přitom charakterizovat jako genotoxické, kterým se tvoří kovalentní adukty s DNA, nebo epigenetické. To modifikuje DNA nekovalentními interakcemi (např. interkalací). [71, 64]

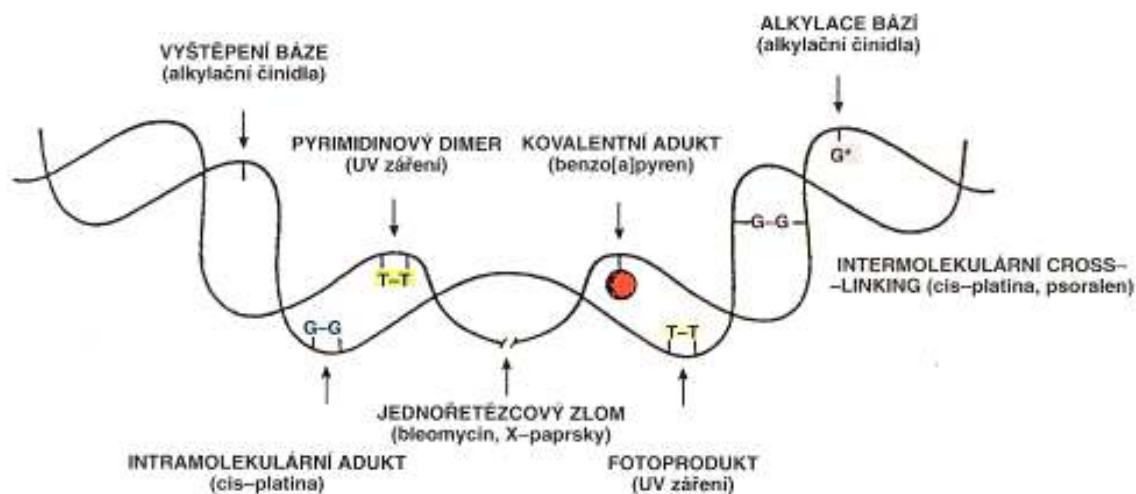
Ve fázi promoce, která může trvat několik let až desetiletí, se zvyšuje proliferace iniciovaných buněk a vzniká benigní nádor (preneplasie). Zároveň dochází působením tzv. promotorů (např. forbolesteru) k propagaci již existujících genetických modifikací. Tyto promoční faktory mají pouze epigenetické vlastnosti, jejich účinek se proto může

projevit až po působení genotoxických iniciátorů. Zvláště proteiny onkogenů exprimované po jejich aktivaci nebo redoxními reakcemi vzniklé aktivní formy kyslíku v kombinaci se selháním kontrolního mechanismu imunitního systému urychlují růst nádoru. [71, 64]

V poslední fázi kancerogeneze, progresi, se působením tzv. progresorů, faktorů s genotoxickými účinky, mění dosud částečně kontrolovaný růst benigního nádoru na růst nekontrolovatelný. Vzniká nádor maligní, který invazivně vrůstá do okolních tkání a tím je ničí. Jeho odštěpené buňky se zároveň mohou šířit lymfogenní nebo hematogenní cestou do ostatních tkání či orgánů a založit tam nová ložiska (metastázy). [71, 64]

1.1.2 Kancerogenní faktory

Vznik nádorového onemocnění může být vyvolán faktory s kancerogenními účinky. Mezi ně se řadí vnitřní faktory (dědičné dispozice) a ve větší míře pak faktory zevního prostředí, které se podle svých vlastností dělí na biologické, fyzikální a chemické. [48] Příklady modifikace DNA vlivem výše zmíněných zevních faktorů jsou uvedeny na Obr. 2.



Obr. 2 Příklady modifikace DNA vlivem zevních faktorů [převzato z 71]

Biologické činitele zastupují zejména onkoviry (DNA viry a RNA viry), u nichž se odhaduje, že jsou příčinou 15 až 20 % nádorových onemocnění [64]. Možný podíl virů na procesu kancerogeneze prokázal již v roce 1911 Peyton Rous [53], když objevil infekční agens vyvolávající u kuřat sarkomy (zhoubné nádory pojivové tkáně). U člověka je v současné době tento podíl jednoznačně prokázán u lidského papilomaviru ve spojitosti se vznikem karcinomu děložního čípku či u viru hepatitidy B v souvislosti se zvýšeným

výskytem hepatocelulárního karcinomu. Kromě uvedených DNA virů se na rozvoji rakovinných útvarů podílejí i RNA viry, např. virus T-buněčné leukemie dospělých. [48]

Mezi fyzikální vlivy patří zejména různé typy záření, které se navzájem liší svou schopností ionizovat a pronikat do tkání. Ultrafialové záření je sice neionizující, avšak s dostatečnou energií na to, aby bylo schopné způsobit poškození DNA. [48] Děje se tak především tvorbou thymidylových dimerů [71], jež může vést ke kancerogenezi. Vzhledem k malé pronikavosti ultrafialového záření k ní dochází zejména v buňkách kůže, kde může resultovat ve vznik kožního karcinomu či melanomu (pigmentového nádoru). Naopak za vysoce pronikavé lze považovat ionizující záření vznikající při rozpadu radioaktivních prvků, např. při výbuchu atomové bomby. Působením tohoto záření vznikají v DNA jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy, které mohou být příčinou následného vývoje leukemií, ale i některých solidních nádorů. [48]

Chemické faktory vyvolávající kancerogenezi jsou detailně popsány v kap. 1.1.2.1. Kromě výše uvedených faktorů nelze zanedbat i vliv podmínek životního prostředí člověka a jeho životní styl. Všechny uvedené faktory přitom u člověka působí většinou v malých množstvích, různých kombinacích a po dlouhou dobu, než iniciují kancerogenezi. [72]

1.1.2.1 Chemické kancerogeny

Chemické kancerogeny, ať již syntetického nebo přírodního původu, jsou velice významnou příčinou vývoje nádorových onemocnění [64]. Z více než 900 rozdílných látek, které byly hodnoceny z hlediska kancerogenity Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC), jich bylo 111 označeno za prokazatelné lidské kancerogeny [28]. Za nejzávažnější kancerogeny z výše zmíněných jsou pak považovány především látky, které patří do skupin polycyklických aromatických uhlovodíků (např. benzo[a]pyren), aromatických aminů, N-nitroasminů či chlorovaných uhlovodíků, ale též soli arsenu, chromu, niklu nebo kadmia [48].

Podle mechanismu jejich působení lze výše uvedené kancerogeny rozdělit do tří skupin. První skupinu tvoří genotoxické kancerogeny, které se kovalentně váží na DNA za tvorby aduktů. Kancerogeny druhé skupiny způsobují změny struktury molekul DNA. Děje se tak vznikem jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů nebo v menší míře křížovým propojením molekul tzv. cross-linking, ke kterému může docházet v jedné molekule DNA (intramolekulární cross-linking), mezi dvěma molekulami DNA (intermolekulární cross-linking) nebo mezi DNA a proteinem. Třetí skupinou jsou pak

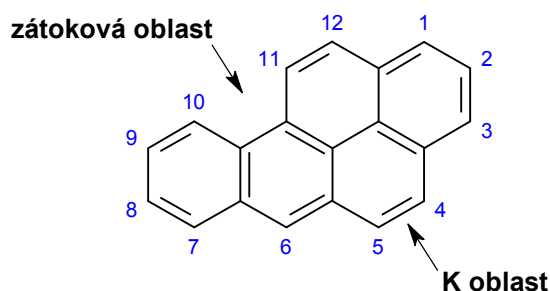
kancerogeny epigenetické, které modifikují DNA nekovalentními vazbami, např. interkalací do její dvoušroubovicové struktury. [71]

Z hlediska vývoje nádorových onemocnění je za nejzávažnější poškození DNA považována tvorba kovalentních aduktů. Tímto způsobem iniciuje kancerogenezi více než 90 % všech látek (včetně benzo[a]pyrenu), u kterých byla prokázána kancerogenita pro člověka. I když je většina těchto aduktů z DNA eliminována opravnými mechanismy, některé přetrvávají a pak způsobují mutace ve výše uvedených kritických genech, které vedou až k vývoji nádoru. [63]

Většina chemických kancerogenů ve své podstatě kancerogenní není. Aby mohly tyto kancerogeny, resp. prokancerogeny, genotoxicky působit, je nutná jejich metabolická aktivace [38]. Tu podstupuje až 98 % všech prokancerogenů (i benzo[a]pyren) [64], které jsou v organismu enzymově přeměněny nejprve na „proximální“ kancerogeny a dále na „ultimální“ kancerogeny. Za „ultimální“ kancerogen je u většiny chemických kancerogenů považováno reaktivní elektrofilní agens, které vykazuje dostatečnou afinitu k nukleofilním centrům v DNA. Jejich interakce může následně resultovat v tvorbu výše uvedených kovalentních aduktů. [38]

1.2 BENZO[A]PYREN

Benzo[a]pyren (BaP), jiným názvem též benzo[def]chrysen, se chemicky řadí mezi polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH). Tento PAH, sumárního vzorce $C_{20}H_{12}$, je tvořen pěti kondenzovanými benzenovými kruhy [IARC 2010]. Jeho struktura je znázorněna na Obr. 3.



Obr. 3 Struktura benzo[a]pyrenu [upraveno dle 27]

1.2.1 Přírodní a antropogenní zdroje benzo[a]pyrenu

Benzo[a]pyren a ostatní polycyklické aromatické uhlovodíky jsou široce rozšířenými polutanty životního prostředí, které vznikají při nedokonalém spalování organického materiálu (jako jsou např. lesní požáry). Tyto látky lze nalézt hlavně v ovzduší, ale také ve vodě, půdě a sedimentech, kde se nacházejí ve stopových koncentracích (cca 1 ng.m^{-3}). [27]

Expozice lidské populace těmto látkám je, zdá se, nevyhnutelná. Bylo zjištěno, že koncentrace benzo[a]pyrenu a dalších PAH se v městských oblastech pohybují od 1 do 30 ng.m^{-3} . Kromě znečištěného vzduchu lidé inhalují průmyslové emise, výfukové plyny a v neposlední řadě cigaretový kouř, u kterého činí koncentrace PAH na jednu cigaretu až 50–100 ng. Vedle inhalace vstupují tyto látky do organismu perorální cestou. Jejich zdrojem je tepelně zpracovávané maso, dále obilí a zelenina, která roste na kontaminovaných půdách. Za zmínku stojí i kožní aplikace léčivých přípravků např. tinktury z kamenouhelného dehtu, která je též zdrojem PAH. [27]

Dále jsou benzo[a]pyrenu a dalším PAH, a to ve vysokých koncentracích ($10\text{--}100 \text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$), vystaveni především pracovníci z oblastí výroby hliníku a zpracování uhlí a kamenouhelného dehtu. Nižšími koncentracemi PAH (cca $1 \text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$) jsou pak vystaveni kominíci. [27]

1.2.2 Účinky benzo[a]pyrenu na organismus

Podle IARC patří benzo[a]pyren mezi látky kancerogenní pro člověka [28]. Skutečnost, že směsi látek obsahující polycyklické aromatické uhlovodíky, a tedy i benzo[a]pyren, způsobují procesy vedoucí v lidském organismu ke kancerogenezi, je známá již od roku 1775, kdy Sir Percival Pott popsal souvislost mezi působením sazí a incidencí skrotálního karcinomu u londýnských kominíků [51]. Tato hypotéza byla nicméně potvrzena až v roce 1930, kdy byl benzo[a]pyren poprvé izolován a zároveň byla prokázána jeho kancerogenita experimentem na myším modelu. [11].

V současné době je kancerogenní účinek benzo[a]pyrenu na organismus prokázán u všech experimentálních zvířat, kterým byl benzo[a]pyren různou aplikační formou podán. Mezi nejčtenější rakovinné útvary testovaných hlodavců (myš, potkan, křeček) patří nádor plic, kůže, jater, žaludku a prsní žlázy. Podstata genotoxického účinku benzo[a]pyrenu spočívá především v jeho aktivaci prostřednictvím cytochromů P450 a epoxidhydrólasy a

následné vazbě reaktivních intermediátů s DNA za tvorby kovalentních aduktů *in vivo* i *in vitro* (kap. 1.2.3.2) [27]. Ta pak resultuje v mutaci K-*ras* nebo Ha-*ras* onkogenů [36, 24, 31]. Kromě výše jmenovaného genotoxického účinku působí benzo[a]pyren také cytotoxicky, např. produkcí oxidačního stresu ovlivňuje buněčný cyklus a apoptosu. Dále působí i jako teratogen [27].

V lidském organismu je zvýšená expozice směsí látek obsahujících benzo[a]pyren, ke které dochází např. vlivem kouření nebo v průběhu práce v prostředí rizikových povolání uvedených výše, spojována především s výskytem nádoru plic, horních cest dýchacích, kůže a močového měchýře [27]. Genotoxický účinek benzo[a]pyrenu se v lidském organismu projevuje podobně jako u experimentálních zvířat tvorbou kovalentních aduktů s DNA, která však resultuje v mutaci tumor supresorového genu *p53* [54]. Dále může na genové úrovni docházet též ke chromosomálním aberacím, zlomům v řetězci DNA, „cross-linkingu“ či oxidaci guanosinu. Cytotoxický účinek benzo[a]pyrenu je i v lidském organismu založen na produkci aktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, ROS). [27]

Jednou z neopominutelných vlastností benzo[a]pyrenu je též jeho schopnost zvýšit expresi enzymů první i druhé fáze biotransformace (kap. 1.2.3), konkrétně cytochromů P450 rodiny 1 a některých transferas. Děje se tak prostřednictvím Ah receptoru mechanismem popsáním v kap. 1.3.2.5 [13].

1.2.3 Biotransformace benzo[a]pyrenu

Po vstupu benzo[a]pyrenu do organismu (např. inhalační, perorální či kožní cestou) dochází k jeho metabolické přeměně, biotransformaci. Tato biotransformace primárně vede k jeho detoxifikaci (kap. 1.2.3.1) a následnému vyloučení z organismu. Podstata detoxifikace přitom spočívá ve zvýšení polaritativy původně nepolárního benzo[a]pyrenu, ke kterému dochází v tzv. první a druhé fázi biotransformace. V první (derivatizační) fázi se tak děje zaváděním hydrofilní funkční skupiny do jeho molekuly. Tyto reakce jsou katalyzované zejména enzymy lokalizovanými v membránách endoplasmatického retikula. Po derivatizaci může být benzo[a]pyren v druhé fázi biotransformace konjugován s endogenními látkami, a to prostřednictvím enzymů, transferas. Vzniklé konjugáty jsou pak, jak již bylo zmíněno výše, z organismu vyloučeny. [64]

Kromě výše uvedené detoxifikace může biotransformace benzo[a]pyrenu vést i k jeho metabolické aktivaci (kap. 1.2.3.2) Na této aktivaci se podílejí zejména enzymy

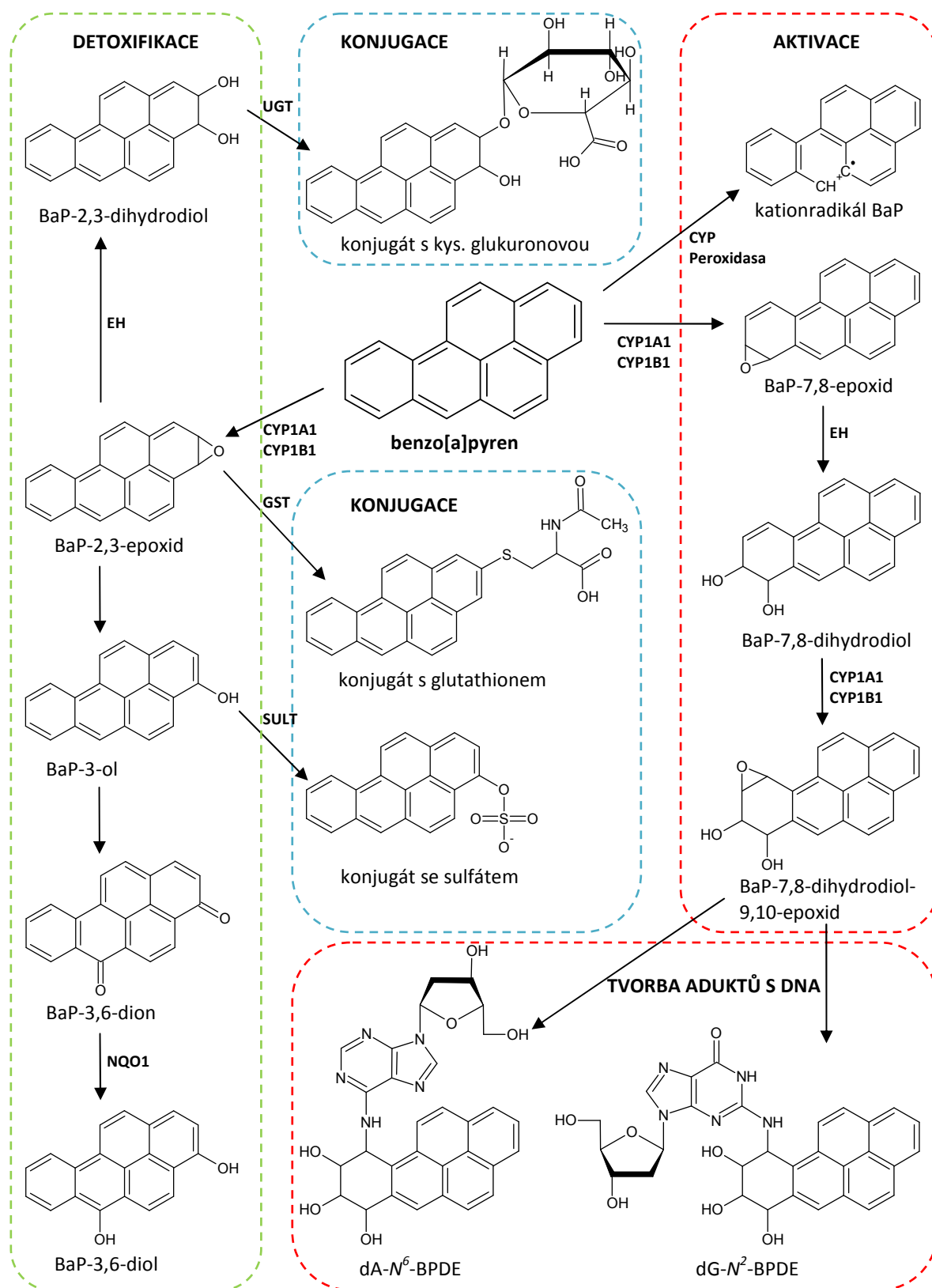
první fáze biotransformace, ovšem ani aktivační reakce katalyzované transferasami (enzymy druhé fáze biotransformace) nejsou vyloučeny.[63]

1.2.3.1 Detoxifikace benzo[a]pyrenu v organismu

Detoxifikace benzo[a]pyrenu v organismu (Obr. 4) je v prvním kroku zprostředkována oxidačními reakcemi, které jsou katalyzovány cytochromy P450, a to především rodiny 1 (CYP1A1/2 a CYP1B1). Tyto enzymy jsou lokalizovány v membránách endoplasmatického retikula, kde jsou součástí systému monooxygenas se smíšenou funkcí (kap. 1.3). Jako detoxifikační metabolity benzo[a]pyrenu vznikají touto reakcí BaP-epoxydy zejména v poloze 2,3; 4,5 a 9,10. [56]

Uvedené meziprodukty oxidace benzo[a]pyrenu mohou v dalším kroku katalyzovaném transferasami, konkrétně glutathion S-transferasami, konjugovat s glutathionem a být ve formě merkapturové kyseliny exkretovány močí z organismu [29]. Kromě konjugace podléhají uvedené meziprodukty spontánní isomerizaci na fenoly (např. BaP-3-ol, BaP-9-ol) nebo hydrolýze. Ta je zprostředkována dalším mikrosomálním enzymem, epoxidhydrolasou, za tvorby příslušných dihydrodiolů benzo[a]pyrenu. [56]

Výše uvedené fenoly a dihydrodioly jsou po konjugaci s UDP-glukuronovou kyselinou a aktivním sulfátem za katalýzy dalších transferas, UDP-glukuronosyltransferas a sulfotransferas, vyloučeny ve formě glukosiduronátů a sulfátů močí z organismu [29]. Fenoly benzo[a]pyrenu mohou být dále přeměněny na BaP-diony, např. v poloze 1,6; 3,6 a 6,12, které následně podléhají redukci katalyzované např. NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasou 1 a tvoří se příslušné hydrochinony benzo[a]pyrenu. Zatímco výše zmíněné chinony benzo[a]pyrenu jsou „proximálními“ kancerogeny, jejich redukované formy představují detoxifikační metabolity, které se jako konjugáty exkretují močí z organismu. [56]



Obr. 4 Schéma detoxifikace a aktivace benzo[a]pyrenu v organismu [upraveno dle 56, 6, 1]

CYP1A1/CYP1B1 – cytochrom P450 1A1/1B1, EH – epoxidhydróláza, NQO1 – NAD(P)H-chinonoxidoreduktáza, GST – glutathion-S-transferáza, UGT – UDP-glukuronosyltransferáza, SULT – sulfottransferáza, BPDE – BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, dA – deoxyadenosin, dG - deoxyguanosin

1.2.3.2 Aktivace benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů s DNA

Na metabolické aktivaci benzo[a]pyrenu participují zejména enzymy, které se nacházejí v membránách endoplasmatického retikula, jako jsou cytochromy P450 a epoxidhydrolasa. Benzo[a]pyren je rovněž aktivován i peroxidasami. [83]

V prvním tzv. „dihydrodiol-epoxidovém“ mechanismu aktivace benzo[a]pyrenu dochází nejprve prostřednictvím cytochromů P450 k jeho oxidaci na BaP-7,8-epoxid. Ten je dále hydrolytickou reakcí katalyzovanou epoxidhydrolasou přeměněn na BaP-7,8-dihydrodiol. V druhé reakci katalyzované cytochromy P450 je výše jmenovaný metabolit benzo[a]pyrenu oxidován na BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE). Tento vicinální dihydrodiol-epoxid, jenž má epoxidovou skupinu v tzv. zátokové oblasti benzo[a]pyrenu (Obr. 3), představuje vlastní elektrofilní agens, které reaguje s DNA za tvorby stabilních kovalentních aduktů. [83] V rámci DNA tvoří BPDE adukty zejména s deoxyguanosem na exocyklické aminoskupině, nicméně ani vazba s deoxyadenosem není vyloučena [6]. Vezme-li se v úvahu stereochemie, byl jako majoritní elektrofilní intermediát identifikován 7*R*,8*S*-dihydroxy- 9*S*,10*R*-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP (anti-BPDE) [83]. Tento isomer BPDE byl poté označen za „ultimální“ kancerogen. Kromě cytochromu P450 1A1 se na výše popsaném mechanismu aktivace benzo[a]pyrenu podílí i další cytochrom P450 rodiny 1, a to CYP1B1[57].

Druhý tzv. „kation-radikálový“ mechanismus aktivace je založen na jednoelektronové oxidaci benzo[a]pyrenu katalyzované jak peroxidasami tak i cytochromy P450. Tímto způsobem vzniká vysoce reaktivní kation-radikál benzo[a]pyrenu, přičemž kladný náboj je lokalizován na C6. Tento kation-radikál představuje vlastní elektrofilní agens, které reaguje v DNA s oběma purinovými bázemi, a to v poloze C8 a N7. Vzniklé kovalentní adukty jsou však nestabilní a podléhají spontánní apurinaci. [9, 37] Za zmínku stojí, že apurinní místa se tvoří též reakcí DNA s výše popsaným BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidem [24].

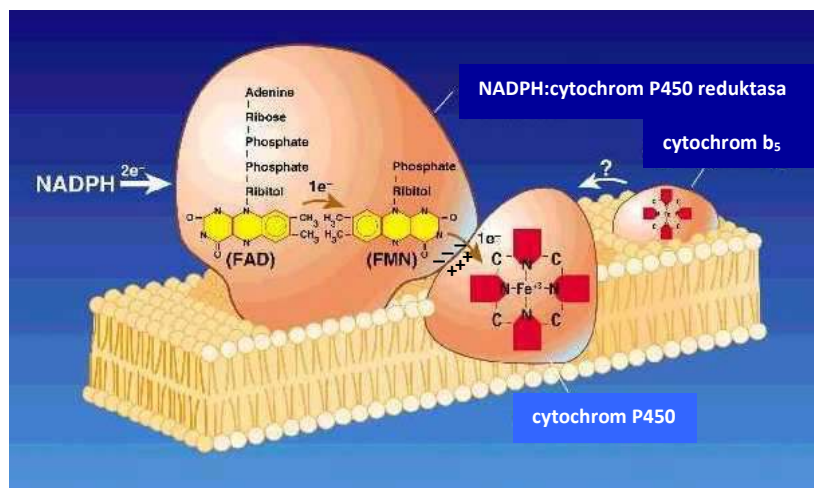
Další mechanismus aktivace benzo[a]pyrenu předpokládá jeho methylování na 6-methyl-BaP a následnou oxidaci na 6-hydroxymethyl-BaP prostřednictvím cytochromů P450. Po konjugaci s aktivním sulfátem, katalyzované sulfotransferasou, se z vytvořeného 6-[(sulfoxy)methyl]-BaP sulfoskupina uvolňuje a vzniká vysoce reaktivní karbeniový ion, který se kovalentně váže na DNA. [17] Výše popsaný mechanismus je vzácným příkladem, kdy k aktivaci xenobiotika dochází prostřednictvím enzymů druhé fáze biotransformace.

V tvorbu kovalentních aduktů, a to jak stabilních, tak i nestabilních, resultuje i interakce DNA s tzv. *ortho*-chinonem benzo[a]pyrenu (BaP-7,8-dion), který vzniká z výše jmenovaného BaP-7,8-dihydrodiolu prostřednictvím aldo-ketoreduktasy 1 [56]. V neposlední řadě kovalentní adukty s DNA tvoří i BaP-9-ol-4,5-epoxid, který vzniká cytochromy P450 katalyzovanou oxidací BaP-9-olu [16].

1.3 SYSTÉM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ

Mezi klíčové enzymy metabolizující cizorodé látky (xenobiotika), tedy i benzo[a]pyren, patří oxidasy (oxygenasy) se smíšenou funkcí (tzv. MFO systém z angl. „mixed function oxidases system“). Ty jsou lokalizovány především na vnější straně membrány endoplasmatického retikula. MFO systém katalyzuje velkou škálu oxidačních, oxygenačních, popřípadě peroxidačních reakcí, ve kterých využívá jako jeden za substrátů molekulární kyslík. V menší míře se pak podílí také na katalýze redukčních reakcí [69].

Výše jmenovaný systém (Obr. 5) se skládá ze tří složek. Z NADPH:cytochrom P450 reduktasy (kap. 1.3.1), která slouží jako dělič elektronového páru, cytochromu P450 (kap. 1.3.2) jako terminální oxidasy a neméně důležité fosfolipidové membrány (kap. 1.3.3). Fakultativně může MFO systém obsahovat též cytochrom b_5 (kap. 1.4) a NADH:cytochrom b_5 reduktasu [64].



Obr. 5 Uspořádání MFO systému v membránách endoplasmatického retikula [upraveno dle 33]

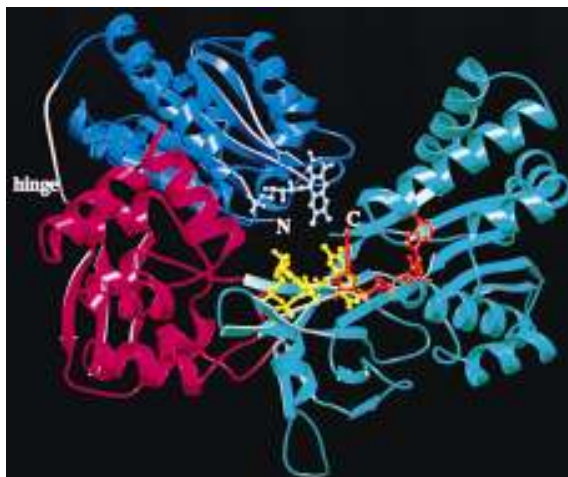
1.3.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Nepostradatelnou složkou MFO systému eukaryotických organismů je NADPH:cytochrom P450 reduktasa (EC 1.6.2.4), flavoprotein lokalizovaný v membránách endoplasmatického retikula. Tento enzym katalyzuje transport elektronů z NADPH na cytochrom P450, přičemž v každém organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy schopna spolupracovat s více isoformami cytochromu P450. Přenos elektronů katalyzovaný zmíněnou reduktasou byl popsán i pro další elektronové akceptory, a to na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid či elongasu mastných kyselin. Vedle výše zmíněných endogenních substrátů katalyzuje tento enzym též redukci látek exogenní povahy (např. aristolochových kyselin [68], 3-nitrobenzanthronu [5]).

1.3.1.1 *Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy*

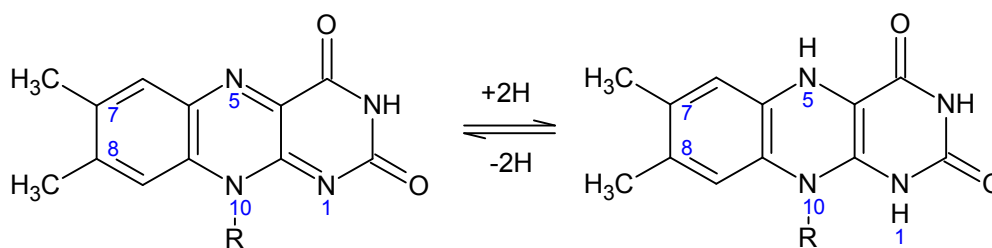
NADPH:cytochrom P450 reduktasa se skládá ze dvou funkčních domén, hydrofóbní N-terminální (6 kDa) a hydrofilní C-terminální domény (72 kDa). Hydrofóbní doména slouží kromě ukotvení enzymu v membráně také k tvorbě funkčního systému s cytochromem P450. Přitom se uplatňují hydrofóbní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (např. leucin, valin, tryptofan), na které jsou membránové domény obou enzymů bohaté. [70, 79]

Hydrofilní funkční doména této reduktasy je složena z FAD- a FMN-vazebné strukturní domény (Obr. 6). Za správnou prostorovou orientaci obou domén pak zodpovídá „spojovací“ struktura, která je umístěná mezi nimi. Díky tomu se molekuly prosthetických skupin obou těchto domén, tedy flavinových koenzymů FAD a FMN, nachází blízko u sebe, přičemž mezi sebou svírají úhel zhruba 150°. FAD a FMN jsou v kontaktu prostřednictvím dvou methylových skupin, které jsou vázané v poloze 7 a 8 isalloxazinových kruhů obou koenzymů. To patrně umožňuje přímý přenos elektronů mezi FAD a FMN (Obr. 7), který je díky nezapojení aminokyselinových zbytků do tohoto přenosu poměrně rychlý. [70, 79]



Obr. 6 Hydrofilní funkční doména NADPH:cytochrom P450 reduktasy [převzato z 79]

Světle modře je zobrazena FAD-vazebná doména, tmavě modře FMN-vazebná doména, vínově „spojovací“ struktura, žlutě FAD, bíle FMN a červeně NADPH.



Obr. 7 Oxidovaná a redukováná forma flavinových koenzymů [upraveno dle 65]

Vodíkový atom se váže na atom dusíku v poloze 1 a 5 isoalloxazinového kruhu. R vázaný na atom dusíku v poloze 10 odpovídá u FAD ribitolu-5'-fosfátu a adenosinmonofosfátu spojených pyrofosfátovou vazbou, u FMN pak ribitolu-5'-fosfátu.

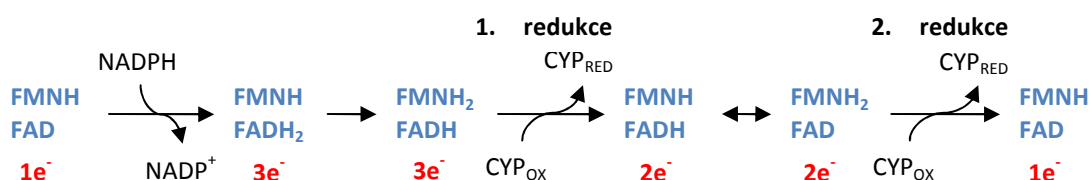
1.3.1.2 Mechanismus funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy

NADPH se nekovalentně váže na FAD-vazebnou doménu. Její pozitivně nabitě aminokyseliny (např. arginin, lysin) přítom v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou, kterou se tento koenzym liší od dalšího nikotinamidového koenzymu, a to NADH. Tato interakce pak způsobuje vysokou selektivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči NADPH. [70, 79]

Transport elektronů na cytochrom P450 zprostředkovává druhá strukturální doména hydrofilní části této reduktasy, tedy FMN-vazebná doména. Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází blízko povrchu enzymu, představuje tak tu část FMN, z které elektrony opouštějí NADPH:cytochrom P450 reduktasu a jsou přijímány Fe

hemu cytochromu P450. Přenos elektronů je přitom umožněn interakcemi mezi výše zmíněnou reduktasou a cytochromem P450, které jsou především elektrostatické povahy. Záporně nabitý povrch NADPH:cytochrom P450 reduktasy, jenž je bohatý na aspartát a glutamát, interaguje s kladně nabitým povrchem cytochromu P450, který má vyšší zastoupení aminokyselin lysinu a argininu. [70, 79]

Současná přítomnost obou flavinových koenzymů, tedy FAD a FMN, v molekule NADPH:cytochrom P450 reduktasy jí umožňuje působit jako dělič elektronového páru a redukovat tak cytochrom P450 v sekvenčně oddělených krocích (tzv. první a druhá redukce cytochromu P450). Tato funkce byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou koenzymů. Akceptorem elektronů resp. atomů vodíku od již zmíněného NADPH je FAD, který je následně předává FMN. Redukovaný FMN (FMNH₂) je nakonec (v případě savčí NADPH:cytochrom P450 reduktasy) zodpovědný za jednoelektronovou redukci cytochromu P450 (Obr. 8). [70].



Obr. 8 Schéma přenosu elektronů mezi flavinovými koenzymy NADPH:cytochrom P450 reduktasy [upraveno dle 50]

Zatímco přenos prvního elektronu na cytochrom P450 může zprostředkovat pouze NADPH:cytochrom P450 reduktasa, na druhé redukci cytochromu P450 se může podílet i jiná reduktasa, NADH:cytochrom b₅ reduktasa, a to prostřednictvím cytochromu b₅. Tento flavoprotein však využívá jako koenzymu NADH. [70]

1.3.1.3 Indukce NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Některé ze sloučenin schopných indukovat cytochromy P450 indukují současně i NADPH:cytochrom P450 reduktasu, avšak tento enzym v menší míře. Jestli k indukci NADPH:cytochrom P450 reduktasy dochází stejnými mechanismy, případně prostřednictvím stejných receptorů jako při indukci cytochromu P450 nebylo prozatím prokázáno. [70] Doposud bylo zjištěno, že NADPH:cytochrom P450 reduktasu indukují např. 3,3',4,4'-tetrachlorbifenyl [81] a některé dimethylcyklosiloxany [87]. Dále byla

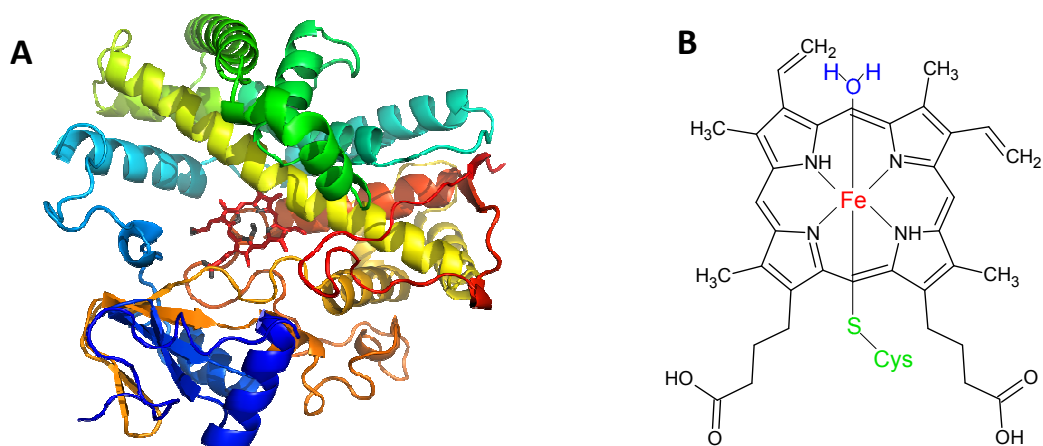
stanovena zvýšená aktivita této reductasy v jaterních ledvinných a plicních mikrosomech u potkanů, kteří byli po jeden měsíc vystaveni inhalaci zplodin motorových vozidel [76].

1.3.2 Cytochromy P450

V roce 1958 byl Klingenbergem [32] a Garfinkelem [19] objeven v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazoval v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum Soretova pásu při 450 nm. Roku 1964 pak Omura a Sato [45] dokázali jeho hemoproteinový charakter a na základě strukturní podobnosti s dalšími hemoproteiny, konkrétně cytochromy typu b, a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450 (Obr. 9 A).

1.3.2.1 Struktura cytochromu P450

Cytochrom P450 (50 kDa) patří mezi hemoproteiny, které obsahují jako prosthetickou skupinu hem b neboli protoporfyrin IX (Obr. 9 B). Ten je hydrofóbními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry cysteinu vázáný v aktivním centru enzymu. Thiolátová síra je pátým ligandem ionu železa této prosthetické skupiny a přispívá k výjimečným spektrálním a katalytickým vlastnostem, které odlišují tento enzym od ostatních hemoproteinů. Na základě této skutečnosti je cytochrom P450 označován též jako hemthiolátový protein. Šestáým ligandem je pak atom kyslíku molekuly vody. [70]



Obr. 9 Struktura králičího cytochromu P450 2B4 (A) a schéma prosthetické skupiny cytochromu P450, protoporfyrinu IX (B) [převzato z 74 (A), upraveno dle 65 (B)]

Výše popsané aktivní centrum je vysoce konzervovanou oblastí enzymu. Naopak za nejvíce variabilní oblast je považováno vazebné místo pro substrát [30], které určuje

substrátovou specifitu enzymu. Některé formy cytochromů P450 jsou univerzální a katalyzují oxidaci velkého množství různých sloučenin, zatímco jiné formy jsou vysoce specifické a metabolizují pouze malý počet substrátů. [70] Aktivní centrum se společně s vazebným místem pro substrát nachází na distální straně enzymu. Na proximální straně se pak nachází vazebné místo pro redoxní partnery (NADPH:cytochrom P450 reduktasu, cytochrom b_5 a další), které obsahuje velký počet kladně nabitých aminokyselinových zbytků, hlavně lysinu a argininu. Tato katalytická doména se nachází na C-konci enzymu. [30]

Na N-konci se u eukaryotických cytochromů P450 nalézá hydrofóbní doména, která slouží k ukotvení enzymu v membráně. Tato doména je, podobně jako výše uvedené vazebné místo pro substrát katalytické domény, nejvíce variabilní oblastí enzymu. [2]

1.3.2.2 Funkce cytochromu P450

V eukaryotických organismech se cytochromy P450 vyskytují především v játrech, dále také v plicích, ledvinách, GITu, nadledvinkách, mozku a kůži. V buňkách těchto tkání a orgánů jsou pak tyto hemthiolátové proteiny lokalizovány v membránách mitochondrií a ve větší míře v membránách endoplasmatického retikula. V obou systémech hrají cytochromy P450 velice důležitou roli, která spočívá jak v metabolismu eobiotik (jako jsou steroidy a mastné kyseliny), tak především xenobiotik. [69]

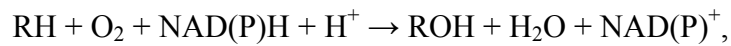
V MFO systému funguje cytochrom P450 (1.14.14.1) jako terminální oxidasa, která nicméně vykonává dvě základní funkce, a to funkci oxidasovou a monooxygenasovou. Oxidasová funkce spočívá ve vazbě molekulárního kyslíku a jeho aktivaci. Aktivovaný molekulární kyslík je následně monooxygenasovou aktivitou tohoto enzymu využit k zabudování jednoho jeho atomu do molekuly hydrofóbního substrátu. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Elektrony potřebné pro redukci cytochromu P450 jsou dodávány postupně (v tzv. první a druhé redukci cytochromu P450, kap. 1.3.1.2) NADPH:cytochrom P450 reduktasou, v případě druhého elektronu i NADH:cytochrom b_5 reduktasou prostřednictvím cytochromu b_5 . [70].

Kromě základní reakce katalyzované cytochromy P450, jejíž mechanismus je detailně popsán v kap. 1.3.2.3, participují tyto enzymy i na dalších reakcích. Vedle kyslíku může cytochrom P450 využít jako substrát i organický hydroperoxid [25]. Takto aktivovaný cytochrom P450 je schopný katalyzovat hydroxylaci substrátu, což je označováno jako peroxidasová aktivita cytochromu P450 (Obr. 10 IX). [70] Mezi další

reakce katalyzované těmito enzymy patří přímá redukce substrátu a produkce peroxidu vodíku (Obr. 10 XI) a aktivních forem kyslíku (Obr. 10 X) [65].

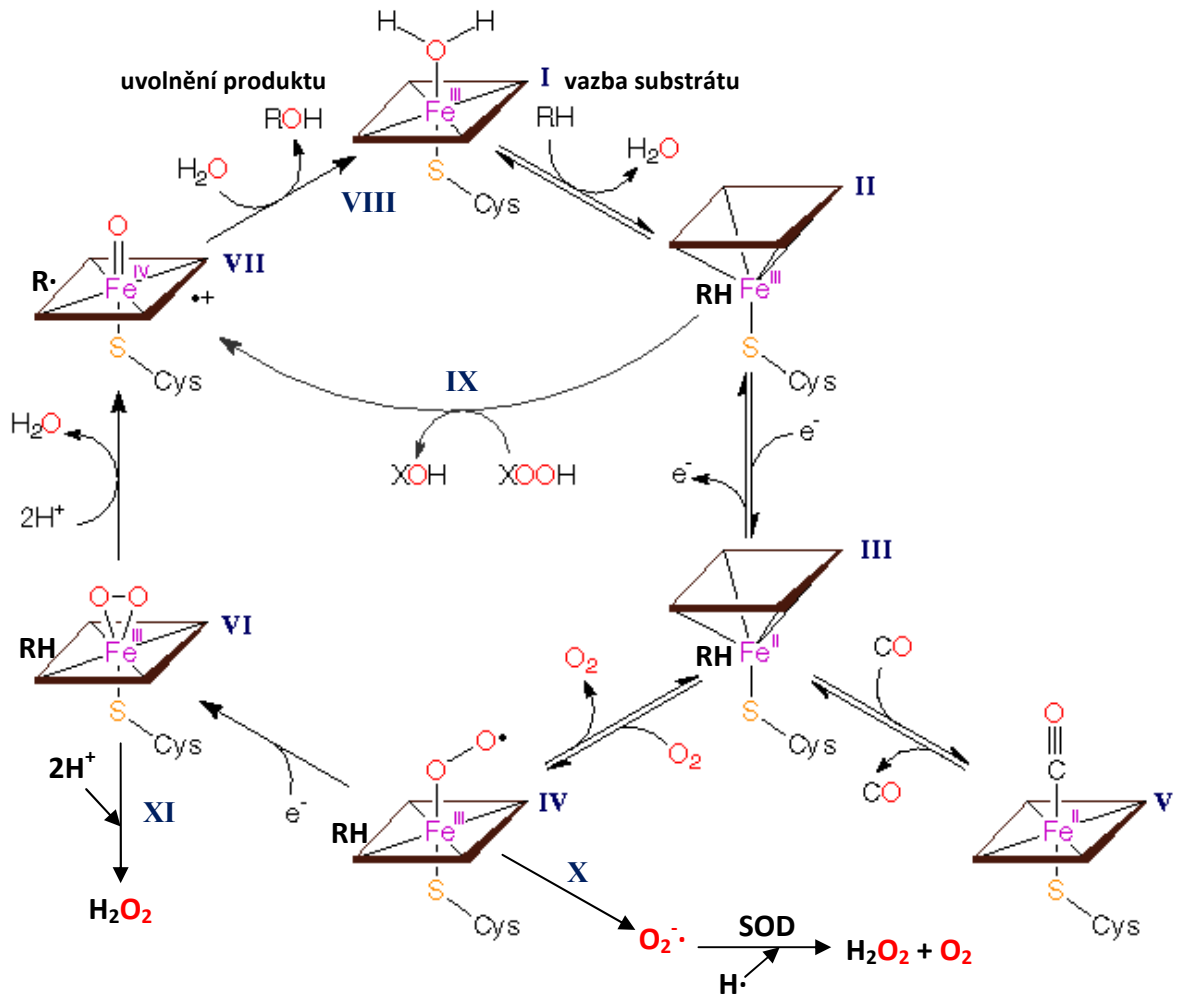
1.3.2.3 Reakční mechanismus monoxygenasové reakce

Monoxygenasová reakce představuje základní reakci katalyzovanou cytochromy P450. Její obecný průběh je možné vyjádřit sumární rovnicí:



kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce [70].

Reakční cyklus cytochromů P450, jenž probíhá uspořádaným mechanismem, je pravděpodobně složen z osmi kroků. Schéma tohoto cyklu ilustruje Obr. 10 [70].



Obr. 10 Schéma reakčního mechanismu monoxygenasové reakce cytochromu P450 s naznačenou peroxidasovou aktivitou [upraveno dle 39]

RH – substrát, ROH – hydroxylovaný produkt reakce, R'OOH – organický hydroperoxid, R'OH – alkohol vzniklý redukcí organického hydroperoxidu, SOD - superoxididmutasa

I. V klidovém stavu je ion železa hemu v oxidačním čísle III (ferri forma) a je hexakoordinován (tedy v nízkospinovém stavu). Jako šestý ligand ionu železa je koordinován atom kyslíku molekuly vody.

II. Vniknutím molekuly substrátu (RH) do aktivního centra enzymu je vytlačen šestý ligand iontu železa, čímž se změní jeho koordinační stav a stane se pentakoordinovaným (vysokospinový stav). Zároveň s tím nastane v molekule enzymu změna její konformace, což se projeví změnou spektrálních vlastností cytochromu P450.

III. Tato konformační změna způsobená navázáním substrátu umožňuje jednoelektronovou redukci cytochromu P450 jeho interakcí s NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Ion železa se přitom redukuje z oxidačního čísla III na oxidační číslo II (ferro forma), jeho koordinační stav však zůstává zachován. Tato forma enzymu je následně schopna vázat molekulární kyslík či jiné ligandy (např. oxid uhelnatý, Obr. 10 V).

IV. Po navázání molekulárního kyslíku se vytvoří ternární ferrisuperoxidový komplex ($\text{RHFe}^{3+}[\text{O}_2^{\cdot-}]$), ve kterém je ion železa opět v oxidačním čísle III a hexakoordinovaném stavu. Tento komplex, který není příliš stabilní, je následně redukován druhým elektronem přeneseným buď již výše zmíněnou reduktasou nebo jiným enzymem, a to NADH:cytochrom b_5 reduktasou, prostřednictvím cytochromu b_5 . Tímto krokem se aktivuje vázaná molekula kyslíku na peroxidový anion (O_2^{2-}). Není-li druhý elektron doručen dostatečně rychle, výše uvedený komplex se rozpadá, přičemž se uvolňuje superoxidový anionradikál. Ten je pak superoxidodismutasou (SOD) přeměněn na peroxid vodíku.

VI. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku ($\text{RHFe}^{3+}[\text{O}_2^{2-}]$) je po redukci druhým elektronem již zcela aktivovanou formou cytochromu P450. Následně dochází k heterolytickému rozštěpení vazby O-O výše zmíněného peroxidového aniontu, přičemž jeden atom kyslíku zůstane vázán na ion železa hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex ($\text{RH}[\text{Fe}-\text{O}]^{3+}$). Druhý atom kyslíku je mezitím redukován na oxidový anion (O^{2-}) a po přijetí dvou protonů se uvolní jako molekula vody.

VII. Vzniklý komplex cytochromu P450 s jedním atomem kyslíku se stabilizuje posunem elektronu z thiolátové síry, pátého ligandu iontu železa, na atom kyslíku. Tímto způsobem vzniklý reaktivní radikál kyslíku je schopný vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu, čímž se vytvoří radikál substrátu a na ion železa hemu vázaný hydroxylový radikál ($[\text{R}\cdot][\text{Fe}-\text{OH}]^{3+}$).

VIII. V posledním kroku dochází k rekombinaci obou výše jmenovaných radikálů a vzniká hydroxyderivát substrátu vázaný na ion železa hemu ($[\text{ROH}]\text{Fe}^{3+}$). Následně produkt (ROH) z aktivního centra enzymu disociuje a obnovuje se nativní forma cytochromu P450. [70]

1.3.2.4 Nomenklatura cytochromů P450

Do současné doby bylo nalezeno více než 9 000 genů kódujících cytochromy P450 ve všech živých organismech, od prokaryot až po člověka [44]. To vyžadovalo zavedení důkladného systematického názvosloví, které navrhl Nebert se svými spolupracovníky [42] a zároveň zavedl CYP jako zkratku pro cytochrom P450 (CYtochrome P450) [43].

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách, kterým se někdy říká i isoformy či isoenzymy. Tyto formy cytochromů P450 jsou podle míry homologie své primární struktury (sekvence aminokyselin) rozděleny do genetických rodin a podrodin. Rodiny cytochromů P450 vykazují 40 % homologii aminokyselinové sekvence svých proteinů a jsou označovány arabským číslem za zkratkou cytochromu P450 (CYP1). Následují podrodiny cytochromů P450, u kterých byla nalezena 55 % homologie v jejich primární struktuře. Ty se označují velkým písmenem za číslem příslušné rodiny (CYP1A). Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny arabskou číslicí za písmenem podrodiny cytochromů P450 (CYP1A1). [69] Geny, které kódují jednotlivé isoformy cytochromů P450, se pak značí kurzívou (*CYP1A1*) [64].

V lidském organismu bylo, díky dokončené sekvenaci genomu, identifikováno 57 genů a 58 pseudogenů (t.j. nefunkčních kopií) cytochromů P450. Expresí těchto genů vzniká 57 isoform cytochromů P450, které byly klasifikovány do 18 rodin a 44 podrodin. Pouze čtyři z výše uvedených rodin hemthiolátových proteinů se účastní metabolismu xenobiotik, a to CYP1, CYP2 a CYP3 (v menší míře též CYP4). Ostatní rodiny participují na metabolismu kyseliny arachidonové, mastných kyselin, biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin a mnoha dalších látek endogenní povahy. [44]

1.3.2.5 Indukce cytochromů P450

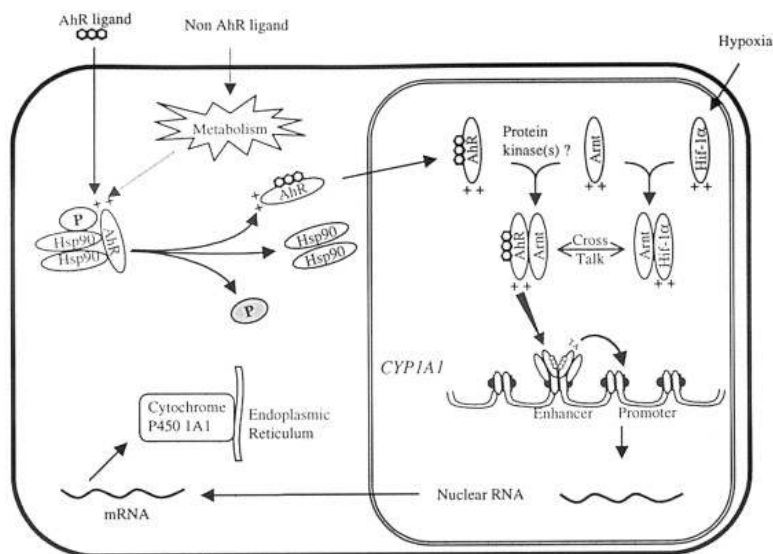
Většina forem cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Jejich obsah v jednotlivých tkáních není konstantní, naopak silně závisí na různých faktorech, jako je např. expozice látkám chemické i fyzikální povahy, kouření, konzumace alkoholu či

genetický polymorfismus. Tímto způsobem může dojít k obohacení určité tkáně o formy cytochromů P450, které se v ní vyskytují pouze v malém množství. Např. účinkem 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD) se koncentrace cytochromu P450 1A1, který je v játrech přítomen v mizivém množství, může zvýšit až 100 krát. [69]

Tato variabilita obsahu jednotlivých forem cytochromů P450 v jednotlivých tkáních je dána výše popsanou možností jejich indukce [69]. Tu lze definovat jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, při které se zvyšuje jejich transkripce na základě stimulace látkami exogenní povahy (t.j. induktory) [41]. Na úrovni transkripce se jedná o tzv. přímou indukci cytochromů P450, ke které dochází prostřednictvím specifických receptorů přítomných v cytoplasmě nebo jádru buňky. Další možností indukce, avšak již nepřímé, je stabilizace syntetizované mRNA daného cytochromu P450 nebo jeho molekuly proteinu [65].

Prostřednictvím receptorů popsaných níže jsou indukovány cytochromy P450 zejména rodin 1 až 4, tedy těch, které se podílejí na metabolismu xenobiotik.

Indukce cytochromů P450 rodiny 1 (CYP1A1/2 a CYP1B1) (Obr. 11) je zprostředkována Ah receptorem (aryl hydrocarbon receptor, AhR). Ten se v cytoplasmě váže na Hsp (heat shock proteins), díky kterým je schopný vázat ligand. Po navázání induktoru (ligandu) a disociaci Hsp se AhR transportuje do jádra, kde dimerizuje s Arnt (AhR nuclear translocator). Takto vzniklý komplex následně funguje jako transkripční aktivátor. [65, 13] Mezi typické ligandy AhR patří planární aromatické látky (dioxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky a další) [12].



Obr. 11 Schéma indukce cytochromu P450 1A1 prostřednictvím Ah receptoru [převzato z 13]

AhR – aryl hydrocarbon receptor, Hsp90 – heat shock protein, Arnt – AhR nuclear translocator

Mezi jaderné receptory, které zprostředkovávají indukci cytochromu P450, patří CAR (constitutive androstane receptor). Ten se ve formě monomeru či heterodimeru s dalším receptorem, a to RXR (retinoid X receptor), váže s DNA, čímž zvyšuje expresi CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/19 a CYP2D6, tedy cytochromů P450 rodiny 2. [65, 80] Mezi induktory této rodiny cytochromů P450 patří fenobarbital a jiné barbituráty [12].

Dalšími jadernými receptory jsou PXR (pregnane X receptor) pro živočišné organismy a SXR (steroid X receptor) pro organismy lidské [39]. Tyto receptory se s DNA váží pouze ve formě heterodimeru s již výše zmíněným RXR. Tím se zvyšuje exprese cytochromů P450 rodiny 3 (CYP3A4/5) [65, 80], jejichž induktory jsou především steroidní látky (pregnenolon-16 α -karbonitril, dexamethason) [12].

Indukce cytochromů P450 rodiny 4 je pak zprostředkována dalšími jadernými receptory, a to PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors). Ty, podobně jako předchozí receptory, dimerizují s RXR s následnou vazbou s DNA. Jejich induktory jsou zejména klofibrát a jiné fibráty. [65, 80]

Příkladem regulace exprese genů na posttranskripční úrovni, konkrétně stabilizace mRNA, je indukce cytochromu P450 2E1 [12]. Tento isoenzym je indukován látkami o malé molekulové hmotnosti, jako je např. ethanol či aceton vzniklý hladověním [69].

1.3.2.6 Exprese lidských cytochromů P450 v eukaryotickém a prokaryotickém systému

Dříve byly lidské cytochromy P450, jež se používají ke studiu metabolismu celé škály xenobiotik, izolovány z různých lidských tkání a orgánů. Nevýhoda těchto izolací spočívá především v nemožnosti získat dostatečné množství enzymu přijatelné stability a katalytické aktivity. Za další nevýhodu lze považovat také přítomnost více forem izolovaných lidských cytochromů P450 [60], jelikož nelze jednotlivé isoenzymy indukovat.

V současnosti je výše uvedený způsob získávání lidských cytochromů P450 nahrazen rekombinantní expresí jejich jednotlivých isoenzymů v různých heterologních expresních systémech. Tyto isoenzymy je navíc možné syntetizovat ve větším měřítku, pokud se jako expresní systémy použijí mikroorganismy, které lze kultivovat ve velkých koloniích. [60]

Mezi eukaryotické a prokaryotické expresní systémy, které se momentálně používají, patří savčí a hmyzí buňky, kvasinky a bakterie [52]. Při použití savčích buněk jako eukaryotického expresního systému pro lidské rekombinantní cytochromy P450 [18], které jsou však exprimované v malém množství, není nutná „ko-exprese“ nezbytné složky MFO

systemu, NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Ta je totiž ve výše zmíněném systému již obsažena, a to v přijatelném množství. Nevýhodami savčího expresního systému jsou však zejména technická a časová náročnost genetické manipulace a kultivace. [86]

Rekombinantní exprese lidských cytochromů P450 v hmyzích buňkách, dalším používaném eukaryotickém expresním systému, je realizována buď infekcí jedním Baculovirem, do jehož DNA bylo vneseno více genů příslušného lidského isoenzymu („ko-exprese“) nebo tzv. „ko-infekcí“. Tou je myšlena infekce výše uvedeného systému více Baculoviry, z nichž do každého byl vnesen jeden gen daného isoenzymu. [61] Výhodou tohoto expresního systému je především schopnost exprese celkem velkých množství lidských cytochromů P450. Naopak nevýhodou je kromě technické náročnosti přípravy též nedostatečné množství NADPH:cytochrom P450 reduktasy v hmyzích buňkách, která tudíž musí být „ko-exprimována“ spolu s výše zmíněnými cytochromy P450. [60]

Kultivace dalších dvou expresních systémů, a to mikrobiálních buněk jako jsou kvasinky a bakterie, je mnohem jednodušší a rychlejší než kultivace výše jmenovaných buněk vyšších organismů. I když je hladina exprimovaných lidských cytochromů P450 v buňkách kvasinek (např. *Saccharomyces cerevisiae* [18]) nižší v porovnání s bakteriálním expresním systémem, jejich exprese a následná modifikace se více podobá procesům probíhajícím u vyšších organismů. To je dáno tím, že kvasinky obsahují stejně jako ostatní eukaryotické buňky membránové organely. [60]

Nejpoužívanějším prokaryotickým expresním systémem i expresním systémem vůbec je bakterie *Escherichia coli*. Její výhody spočívají ve snadné genetické manipulaci a kultivaci stejně jako v nárůstu velkého množství biomasy a ve schopnosti exprese vysoké hladiny lidských cytochromů P450. [18] I přes výše jmenovaná pozitiva byla rekombinantní exprese membránově vázaných lidských cytochromů P450 v *E. coli* zprvu málo účinná (cca 1 %), a to především kvůli absenci membránových organel [49]. Aby se dosáhlo lepšího navázání cytochromů P450 do prokaryotické membrány a tím i vyšší míry jejich exprese, byly navrženy různé úpravy jejich cDNA. Např. Barnes a kol. [7] navrhli modifikaci 5'-konce cDNA cytochromu P450 nebo Pritchard a kol. [52] fúzi cDNA cytochromu P450 s bakteriální vedoucí sekvencí.

Kromě organel neobsahuje *E. coli* ani NADPH:cytochrom P450 reduktasu, kterou je tudíž nezbytné „ko-exprimovat“ spolu s cytochromy P450. „Ko-exprese“ lidského cytochromu P450 a této reduktasy v *E. coli* je realizována buď transfekcí jedním plasmidem, do kterého byla vnesena cDNA příslušného lidského isoenzymu a cDNA

reduktasy [15] nebo transfekcí dvěma plasmidy. V tom případě je do prvního plasmidu vnesena cDNA daného isoenzymu a do druhého cDNA NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Expresí fúzního proteinu, ve kterém je lidský cytochrom P450 a jeho reduktasa součástí jednoho polypeptidového řetězce, představuje další způsob rekombinantní přípravy enzymů [26, 47].

1.3.2.7 Lidský cytochrom P450 1A1

Lidský cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) náleží spolu s dalšími dvěma isoenzymy (CYP1A2 a CYP1B1) do stejné rodiny cytochromů P450, a tou je rodina 1 [44]. S CYP1A2 vykazuje tento hemthiolátový protein vysokou míru homologie v aminokyselinové sekvenci, která činí až 70 % [69].

Cytochrom P450 1A1 je typický extrahepatální enzym, který se majoritně vyskytuje v plicích a dále také v ledvinách, GIT, kůži a jiných extrahepatálních tkáních. Naopak v játrech se nachází pouze ve velmi nízkých koncentracích. Jako většina ostatních forem cytochromů P450 patří i CYP1A1 mezi inducibilní enzymy. Mechanismus indukce CYP1A1 je popsán v kap. 1.3.2.5. Hlavními induktory těchto enzymů jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, které jsou mimo jiné obsaženy též v cigaretovém kouři. To je hlavní důvod, proč byly vysoké koncentrace cytochromu P450 1A1 nalezeny právě v plicích kuřáků. Tento cytochrom P450 byl zároveň detekován u karcinomu plic a nádorů prsu. [69]

Cytochrom P450 1A1 se významně podílí na metabolismu xenobiotik, a to zejména látek planární struktury, [2] jako je např. benzo[a]pyren a jiné polycyklické aromatické uhlovodíky. Hlavní role tohoto isoenzymu přitom spočívá v přeměně těchto substrátů (prokancerogenů) na jejich aktivní formy. Cytochromy P450 1A1 mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých kancerogenů. [69]

1.3.3 Fosfolipidová membrána

Nezastupitelnou úlohu ve správné funkci MFO systému hrají též fosfolipidové membrány. Lipidy těchto membrán, zvláště pak fosfatidylcholin, interagují s ukotveným cytochromem P450, a způsobují tak změny v jeho konformaci, které následně vedou ke zvýšení jeho afinity k substrátu. Tyto lipidy zároveň vytvářejí vesikulární útvary, které napomáhají cytochromu P450 v interakci s dalším membránově vázaným enzymem, a to

s NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Tím je stimulována tvorba funkčně aktivního komplexu obou enzymů. V neposlední řadě dochází ve výše zmíněných membránách ke kumulaci látek hydrofóbní povahy, které mohou sloužit jako substráty cytochromu P450. [64]

1.4 CYTOCHROM B₅

MFO systém může fakultativně obsahovat též cytochrom b₅. Tento malý (17 kDa) hemoprotein byl původně pojmenován cytochrom m, jelikož byl objeven v mikrosomech [59]. V eukaryotických organismech je cytochrom b₅ lokalizován na vnější straně membrány endoplasmatického retikula a mitochondrií [78]. V obou těchto systémech se podílí na přenosu elektronů řady oxidačních a redukčních reakcí. Ty zahrnují desaturaci či elongaci mastných kyselin [58] stejně jako biosyntézu cholesterolu [20] a plasmalogenů [46]. Neméně významná je role cytochromu b₅ v reakcích katalyzovaných cytochromy P450 [58], která je popsána níže.

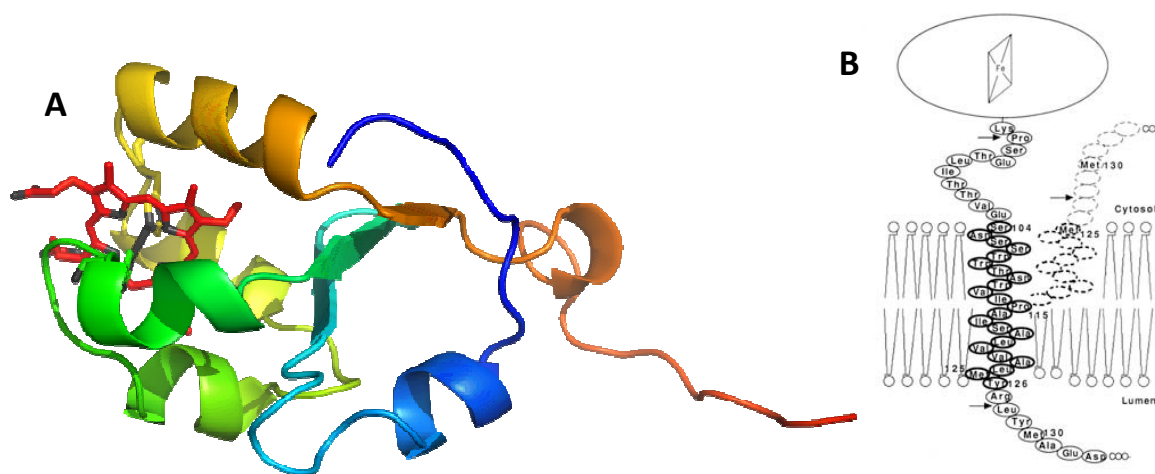
1.4.1 Struktura cytochromu b₅

Cytochrom b₅ (Obr. 12 A) se skládá z šesti α -helixů a pěti β -skládaných listů uspořádaných do dvou domén, hydrofóbní N-terminální domény a hydrofilní C-terminální domény. Menší hydrofóbní doménu tvoří 14 – 18 aminokyselin, kterými je tento protein ukotven v membráně. Topologie výše uvedené domény je znázorněna na Obr. 12 B. První model předpokládá průchod C-konce hydrofóbní domény do lumen endoplasmatického retikula, zatímco v druhém modelu je C-konec orientován do cytoplasmy [78].

Větší hydrofilní doména obsahuje jako prosthetickou skupinu hem b (t.j. protoporfyrin IX). Ten je umístěn v hydrofóbní dutině katalytické oblasti tvořené čtyřmi α -helixy takovým způsobem, že jedna jeho hrana je v kontaktu s cytoplasmou. Ion železa tohoto hemu koordinuje, narozdíl od cytochromu P450, dva imidazolové zbytky vysoce konzervovaných histidinů. Kromě nich je katalytická oblast bohatá na záporně nabitě aminokyselinové zbytky, a to aspartátu a glutamátu, které jsou také vysoce konzervované. Ty tvoří komplementární povrch ke kladně nabitému povrchu cytochromu P450. [59]

Obě domény jsou propojeny oblastí bohatou na prolin [59]. Délka této oblasti ovlivňuje schopnost výše popsané katalytické domény vázat se k různým redoxním

partnerům. Např. pro úspěšnou interakci cytochromu b_5 s cytochromem P450 je třeba, aby byla spojovací oblast složena nejméně ze sedmi aminokyselin. [10]



Obr. 12 Struktura králičího cytochromu b_5 (A) a schéma předpokládaného ukotvení tohoto proteinu v membráně endoplasmatického retikula (B) [převzato z 75 (A) a 34 (B)]

1.4.2 Vliv cytochromu b_5 na reakce katalyzované cytochromy P450

Interakce cytochromu b_5 s cytochromem P450 je vysoce komplexní, ovlivňuje ji totiž nejen isoforma cytochromu P450, ale i jeho substrát. Cytochrom b_5 je na jedné straně schopný stimulovat řadu reakcí katalyzovaných cytochromy P450, na druhou stranu může působit i jako inhibitor, nebo být zcela bez vlivu. Podstata vlivu tohoto hemoproteinu je prozatím známá pouze u některých isoformách cytochromu P450 a jejich substrátů. [59]

1.4.3 Mechanismus funkce cytochromu b_5

Role cytochromu b_5 v rámci MFO systému není dosud zcela objasněna. Mechanismus účinku tohoto hemoproteinu v monooxygenasové reakci katalyzované cytochromy P450 je vysvětlována čtyřmi následujícími způsoby:

První mechanismus účinku cytochromu b_5 zahrnuje přímý přenos elektronu z tohoto hemoproteinu do cyklu monooxygenasové reakce. V této reakci (kap. 1.3.2.3) katalyzované cytochromy P450 se jako limitující faktor jeví rychlost přijetí druhého elektronu, který je nezbytný k tvorbě aktivovaného molekulárního kyslíku vázaného na cytochrom P450. [59] Není-li tento elektron doručen dostatečně rychle, dochází k rozpadu ferrisuperoxidového komplexu. Přitom se místo oxidovaného substrátu uvolňuje

superoxidový anionradikál, který je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku. [70]

Druhou variantou tohoto mechanismu účinku je předpoklad, že se cytochrom b_5 chová jako pozitivní modifikátor monooxygenas tím, že redukuje četnost rozpojení komplexu cytochromu P450 se superoxidovým anionradikálem. Díky cytochromu b_5 vstupuje druhý elektron do monooxygenasové reakce rychleji, než je rychlost rozpadu výše jmenovaného komplexu. Zároveň se vytvoří více aktivovaného kyslíku, který reaguje se substrátem za vzniku produktu. [59]

Třetí vysvětlení mechanismu účinku cytochromu b_5 navrhuje tvorbu komplexu s cytochromem P450. Za absence cytochromu b_5 přijímá cytochrom P450 jeden elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy, od které se následně disociuje, aby mohl navázat molekulární kyslík. Po reasociaci s výše jmenovanou reduktasou pak od ní přijímá i druhý elektron. Vytvoření komplexu cytochromu P450 s cytochromem b_5 urychluje formování aktivovaného kyslíku odstraněním dvojí interakce cytochromu P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou. [59]

Ve čtvrtém mechanismu účinku cytochromu b_5 se předpokládá skutečnost, že tento hemoprotein slouží jako efektor bez redoxní role v cytochromem P450 katalyzované monooxygenasové reakci. To potvrzuje stimulaci některých cytochromů P450 jak cytochromem b_5 , tak i apo-cytochromem b_5 , tedy cytochromem b_5 s absencí prosthetické skupiny (protoporfyrinu IX). Funkce cytochromu b_5 jako efektoru pravděpodobně spočívá v posílení rozpadu ferrioxenového komplexu cytochromu P450 za tvorby produktu nebo v usnadnění toku elektronů přes systém. [59]

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo studium metabolismu benzo[a]pyrenu enzymy mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí *in vitro*. Konkrétně byla studována oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana a dále lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému. V rámci studia rekombinantního lidského cytochromu P450 1A1 byl rovněž zkoumán vliv cytochromu b₅, izolované NADPH:cytochrom P450 reduktasy a epoxidhydrolasy na oxidaci benzo[a]pyrenu.

Izolace a purifikace NADPH:cytochrom P450 reduktasy z jater králíka domácího byla dalším cílem předkládané práce.

Jako modelové enzymové systémy byly použity jaterní mikrosomy izolované z potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných induktory cytochromů P450 a dále lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v membráně endoplasmatického retikula hmyzích buněk a v membráně *E. coli*.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie, které byly použity v experimentech, pocházejí z následujících zdrojů:

Affymetrix (USA)

Sodná sůl 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonové kyseliny (CHAPS)

BD Biosciences (USA)

SupersomesTM, mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných Baculovirem nesoucím cDNA lidského cytochromu P450 1A1 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CYP1A1) (eukaryotický expresní systém)

British Drug Houses (GB)

Sudan I

Calbiochem (USA)

Nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP⁺), nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný (NADPH)

Cypex (Velká Británie)

Bactosomes, „zlomky“ membrán *Escherichia coli* transfekované jedním plasmidem/dvěma plasmidy nesoucích cDNA lidského cytochromu P450 1A1 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou o její vyšší a nižší aktivitě (CYP1A1R, CYP1A1LR) (prokaryotický expresní systém)

Desert Biologicals (USA)

Emulgen 911 (E-911)

Farmakon (Olomouc, Česká republika)

Fenobarbital (PB)

Fluka (Švýcarsko)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)

J.T.Baker (USA)

Acetonitril (ACN), methanol (MeOH)

Koch-Light Laboratories (Velká Británie)

Protaminsulfát

Laboratoř katedry biochemie PŘF UK (Praha, Česká republika)

Mikrosomy izolované z jater potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných induktory cytochromů P450 [Sudan I, fenobarbital (PB), pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN) a ethanol (EtOH)] RNDr. Věrou Černou, Ph.D. dle Stiborové a kol. [66, 67]. Cytochrom b₅ (cyt b₅) a epoxidhydrolasa (EH) izolované z králíčích jater RNDr. Věrou Černou, Ph.D. a RNDr. Michaelou Moserovou, Ph.D. dle Yanga a Cederbauma [84] a dle Yasukochiho [85] postupy upravenými dle disertační práce RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. [73].

Lachema (Brno, Česká republika)

Bromfenolová modř, dekahydrát difosforečnanu tetrasodného, disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTANa₂), hydrogenuhličitan sodný, chlorid hořečnatý, monohydrát uhličitanu sodného, pentahydrát síranu měďnatého, peroxodisíran amonný (APS), vinan sodný

Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný, ethanol (EtOH), ethylacetát, glycerol, glycin, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová

Linde (Praha, Česká republika)

Oxid uhelnatý, plynný dusík

Merck Milipore (Německo)

Odstředivé filtrační zařízení Amicon Ultra-15 30K, ultrafiltrační membrána Amicon PM10 a PM30

Pharmacia Fine Chemicals (Švédsko)

2',5'-ADP-Sepharosa 4B, DEAE-Sepharosa CL6B

Reanal (Maďarsko)

Glukosa-6-fosfát

Roche (Švýcarsko)

Complete Inhibitor

Serva (Německo)

Akrylamid, N,N'-methylen-bis(akrylamid) (BIS), dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylen-diamin (TEMED), sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Sigma-Aldrich (USA)

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), benzo[a]pyren (BaP), cytochrom c (cyt c), dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dimethylsulfoxid (DMSO), dithioničitan sodný, dithiothreitol (DTT), fenacetin (PA), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), flavinmononukleotid (FMN), glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, glutathion redukovaný (GSH), hovězí sérový albumin (BSA), cholát sodný, pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN), sacharosa, standardy pro SDS elektroforézu, triethylamin (TEA), vitamin E

3.1.2 Použité roztoky a pufrы

Pufrы pro izolaci a purifikaci NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Pufr PR1 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce, pH 7,5)

153 mM KCl/KOH, 10 mM EDTANa₂, těsně před použitím přidat: 500 μ M PMSF, 50 μ M vitamin E

Pufr PR2 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce, pH 7,5)

100 mM KCl/HCl, 100 mM Na₄P₂O₇·10H₂O, 1 mM EDTANa₂

Pufr PR3 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce, pH 7,5)

250 μ M sacharosa/NaOH, 10 mM EDTANa₂, 1 mM DTT, těsně před použitím přidat: 250 μ M vitamin E, 1 tableta Complete Inhibitoru/50 ml pufru

Pufr PR4 (pufr pro solubilizaci, pH 7,5)

100 mM Tris/acetát, 100 mM KCl, 1 mM EDTANa₂, 1 mM DTT, 20 % glycerol (v/v)

Pufr PR5 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B, pH 7,5)

5 mM Tris/acetát, 1 mM EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v)

Pufr PR6 (dialyzační pufr, pH 7,0)

5 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTANa₂, 100 μ M DTT, 10 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911 (w/v)

Pufr PR8 (dialyzační pufr, pH 7,4)

25 mM TEA, 1 mM DTT, 20 % glycerol (v/v)

Pufr AP1 (cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B, pH 7,5)

1 M Tris/acetát

Pufr AP2 (nalévací pufr pro DEAE-Sepharosu CL6B, pH 7,5)

5 mM Tris/acetát, 20 % glycerol (v/v)

Pufr CP1 (ekvilibrační pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B, pH 7,0)

50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTANa_2 , 100 μM DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,2 % E-911 (w/v)

Pufr CP2 (eluční pufr NADPH:CYP reduktasy pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B, pH 7,5)

50 mM KH_2PO_4 , 200 mM KCl, 1mM EDTANa_2 , 100 μM DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % E-911

Roztoky a pufrы pro analytická stanovení

Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu

Roztok A (pH 11,25)

0,4 % NaOH (w/v), 0,95 % NaHCO_3 (w/v), 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (w/v), 0,16 % vinan sodný (w/v)

Roztok B

4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v)

Pufr pro stanovení koncentrace cytochromu P450 (pH 7,5)

100 mM KH_2PO_4 , 2 % glycerol (v/v)

Pufr pro stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy (pH 7,4)

300 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTANa_2

Roztoky pro SDS elektroforézu

Vzorkový pufr (5× koncentrovaný, pH 6,8)

250 mM Tris/HCl, 500 mM DTT, 10 % SDS (w/v), 0,5 % bromfenolová modř (w/v), 50 % glycerol (v/v)

Elektrodový pufr (pH 8,5)

20 mM Tris/HCl, 200 mM glycin, 0,1 % SDS (w/v)

Separační gel (8 %, 5 ml)

2,3 ml H₂O, 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 1,3 ml 29,2 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 µl 10 % SDS (w/v), 3 µl TEMED, 50 µl 10 % APS (w/v)

Separační gel (10 %, 5 ml)

1,9 ml H₂O, 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 1,7 ml 29,2 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 50 µl 10 % APS (w/v)

Separační gel (12 %, 5 ml)

1,6 ml H₂O, 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,0 ml 29,2 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 50 µl 10 % APS (w/v)

„Zaostřovací“ gel (4 %, 2 ml)

1,4 ml H₂O, 0,25 ml 1,0 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,33 ml 29,2 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 20 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 20 µl 10 % APS (w/v)

Barvicí lázeň CBB R-250

0,25 % CBB R-250 (w/v), 45 % MeOH (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Odbarvovací roztok

35 % EtOH (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Roztoky pro oxidaci benzo[a]pyrenu systémem monooxygenas se smíšenou funkcí

„NADPH-generující“ systém

10 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U.ml⁻¹ glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

3.1.3 Použité přístroje

Aparatura pro SDS elektroforézu

Electrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Biosciences (Švédsko), Vertical Electrophoresis System

Centrifugy

Allegra X-22R Centrifuge, Beckman Coulter (USA), Centrifuge 5418, Eppendorf (Německo), Janetzki K-23 (Německo), Janetzki K-24 (Německo), Optima LE-80K, Beckman Coulter (USA)

Homogenizátory podle Pottera a Elvehjema

Magnetické míchačky

Electronicrührer Monotherm, Variomag (Německo), KMO 2 basic, IKA (Německo)

Peristaltická pumpa

Peristaltic Pump PP-05

pH metr s kombinovanou elektrodou

HI 2211 pH/ORP Meter, HANNA Instruments (USA)

Pipety

Biohit Proline (Finsko), Nichipet EX, NICHIRYO (Japonsko), Pasteurovy pipety

Sběrač frakcí

Fraction Collector Model 2128, BIO RAD (USA)

Spektrofotometry

Infinite M200 PRO, TECAN (Švýcarsko), Specord M-40, Carl Zeiss Jena (Německo)

Systém HPLC, DIONEX (USA)

z komponent: Degasys DG-1210, Pump P580, Automated Sample Injector ASI-100, UV/VIS Detector UVD 170S/340S

termostat kolony Column Oven LCO 101, ECOM (Praha, Česká republika)

kolony Nucleosil 100-5 C18 250/4, MACHEREY-NAGEL (Německo), Nucleosil HD 100-5 C18 250/4, MACHEREY-NAGEL (Německo)

Termostatové lázně

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories (Velká Británie), Thermomixer Compact, eppendorf (Německo)

Třepačky

Minishaker MS1, IKA (Německo), Orbital Shaker OS2 Basic, IKA yellow line (Německo)

Ultrafiltrační cela Amicon

Ultrazvuková lázeň

Elmasonic E30 H, Elma (Německo)

Váhy

Analytické váhy Discovery OHAUS (Švýcarsko), PESA 40SM-200A (Švýcarsko), předvážky KERN EW600-2M (Německo)

Vakuová odparka

Acid-Resistant CentriVap Concentrator, LABCONCO (USA)

3.2 METODY

3.2.1 Izolace a purifikace NADPH:cytochrom P450 reduktasy

NADPH:cytochrom P450 reduktasa, použitá ke studiu metabolismu benzo[a]pyrenu, byla izolována z jater králíka domácího dle Dignama a Strobela [14] postupem upraveným dle diplomové práce Mgr. Tomáše Ječmena [30]. Celý izolační proces byl prováděn v chlazené místnosti při teplotě 6 °C, všechny nástroje a roztoky byly též vychlazeny.

3.2.1.1 Premedikace pokusných zvířat

Dva samci králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*, New Zealand White, Velaz) o hmotnosti cca 2 kg byli chováni 14 dnů v kleci při teplotě 20 ± 2 °C. Peletová strava a voda jim byly podávány *ad libitum*. Od čtvrtého dne byli premedikováni 0,1 % roztokem fenobarbitalu ve vodě (w/v) za účelem indukce cytochromu P450 podrodiny 2B. Před usmrcením oxidem uhličitým zvířata 18 hodin hladověla pro snížení hladiny glykogenu v játrech. Všechny experimenty se zvířaty byly prováděny v laboratořích pro práci se zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

3.2.1.2 Izolace jaterní mikrosomální frakce

Dvoje vyjmutá a opláchnutá játra byla vložena do vychlazeného pufru PR1. Po zvážení byla játra rozstříhána (každá zvlášť) na menší díly a několikrát promyta puftrem PR1, aby bylo dosaženo dokonalého „odkrvení“. Následně byla jaterní tkáň (opět každá zvlášť) homogenizována „volným“ homogenizátorem podle Pottera a Elvehjema v pufru PR1 o objemu odpovídajícímu čtyřnásobku hmotnosti tkáně v gramech (400 ml).

Filtrované homogenáty byly 10 minut centrifugovány při $600 \times g$ v předchlazené centrifuze Janetzki K-23 (výkyvný rotor 4×70 ml, 2 000 RPM). Za účelem zvýšení výtěžku byly sedimenty „rehomogenizovány“ s $\frac{1}{4}$ původního objemu pufru PR1 (100 ml), filtrovány a za výše uvedených podmínek znovu centrifugovány. Poté byly supernatanty z obou centrifugací spojeny a 20 minut centrifugovány při $15\,000 \times g$ v předchlazené centrifuze Janetzki K-24 (úhlový rotor 6×35 ml, 13 000 RPM).

Získané supernatanty byly odděleny od tzv. „lehce sedlé“ vrstvy mitochondriální frakce a byly dále centrifugovány 65 minut při $105\,000 \times g$ v předchlazené ultracentrifuze Optima LE-80K (úhlový rotor Ti45 6×70 ml, 45 000 RPM). Po odlití supernatantů (cytosolární frakce) byly získané sedimenty „rehomogenizovány“ „těsným“ homogenizátorem v pufru PR2 o objemu odpovídajícímu dvojnásobku hmotnosti tkáně v gramech (200 ml) a znovu centrifugovány za výše uvedených podmínek. Po opětovném odlití supernatantů byly sedimenty „rehomogenizovány“ v pufru PR3 o objemu odpovídajícímu $\frac{1}{4}$ původní hmotnosti tkáně v gramech (50 ml), ke kterému byl přidán roztok připravený rozpuštěním 1 tablety Complete Inhibitoru v 1 ml pufru PR3.

Z obou mikrosomálních frakcí byl odebrán vzorek (150 μ l) pro analytická stanovení (kap. 3.2.2) a SDS elektroforézu (kap. 3.2.3). V obou mikrosomálních frakcích, uchovávaných před provedením solubilizace na ledu, byla stanovena koncentrace proteinu postupem popsaným v kap. 3.2.2.1, koncentrace cytochromu P450 postupem v kap. 3.2.2.2 a cytochrom c reduktasová aktivita postupem v kap. 3.2.2.3.

3.2.1.3 Solubilizace jaterní mikrosomální frakce

Obě mikrosomální frakce byly spojeny a ředěny puftrem PR4 na výslednou koncentraci proteinu $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Za stálého míchání na ledu byl k ředěné mikrosomální frakci po kapkách (1 kapka/s) přidán roztok Complete Inhibitoru v pufru PR4 tak, že 1 tableta Complete Inhibitoru odpovídá 50 ml ředěné mikrosomální frakce a rozpouští se v 0,5 ml pufru PR4. Dále byl přidán roztok protaminsulfátu ($15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ zásobní roztok v H_2O) do výsledné koncentrace $0,375 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ protaminsulfátu v konečném objemu solubilizátu. Následně byl pod atmosférou dusíku přikapáván rychlostí 1 kapka/3 s 10 % roztok cholátu sodného (w/v) a 10 % roztok Emulgenu 911 (w/v) do výsledné koncentrace $1 \text{ mg detergentu}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu.

Po 20 minutách míchání byl solubilizát centrifugován 60 minut při $105\,000 \times g$ v předchlazené ultracentrifuze Optima LE-80K (úhlový rotor Ti45 6×70 ml, 45 000 RPM). Získaný supernatant, ze kterého byl odebrán vzorek (150 μ l) pro stanovení (kap. 3.2.2.1 až 3.2.2.3 a 3.2.3), byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5).

3.2.1.4 *Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B*

Na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (2,5 × 40 cm, 120 ml, pH 7,5) ekvilibrovanou pufrům PR5 byl rychlostí 0,5 ml/min nanesen supernatant získaný solubilizací izolované jaterní mikrosomální frakce. Pro eluci cytochromu P450 byla kolona promývána pufrům PR5 s přidavkem 10 % roztoku Emulgenu 911 o výsledné koncentraci 0,4 % (w/v). V jímáných frakcích o objemu cca 20 ml byla měřena absorbance při 417 nm na spektrofotometru Specord M-40. Promývání bylo ukončeno po vymytí cytochromu P450 z kolony provázeného poklesem absorbance při 417 nm na počáteční hodnotu.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cytochrom b₅ a další proteiny, které zůstaly navázány na koloně DEAE-Sepharosy CL6B, byly eluovány lineárním gradientem 2 × 400 ml 50 – 400 mM KCl v pufru PR5 (0,8 ml/min). V jímáných frakcích o objemu cca 12 ml byla měřena absorbance při 413 nm a cytochrom c reduktasová aktivita (spektrofotometr Specord M-40).

Následně byla provedena SDS elektroforéza frakcí v oblastech maxim absorbance při 417 nm a 413 nm a frakcí v oblasti cytochrom c reduktasové aktivity. Frakce s vysokým obsahem cytochromu P450 byly spojeny, zahuštěny za použití ultrafiltrační membrány Amicon PM30 a dialyzovány přes noc proti 2 × 1 000 ml pufru PR5. Následně byl preparát cytochromu P450 zmražen a uchován při teplotě -80 °C.

Frakce s vysokým obsahem cytochromu b₅ a frakce cytochromu b₅ vykazující alespoň desetinu absorpčního maxima „píku“ při 413 nm byly spojeny, zahuštěny za použití ultrafiltrační membrány Amicon PM10 a dialyzovány přes noc proti 1 × 2 000 ml pufru PR6. Následně byly oba preparáty cytochromu b₅ naneseny na dvě kolony DEAE-Sepharosy CL6B 2 (pH 8,1). Další postup purifikace cytochromu b₅ již není součástí této práce.

Frakce s vysokým obsahem NADPH:cytochrom P450 reduktasy a bez kontaminace tetrahydrofolátreduktasou byly spojeny, zahuštěny za použití ultrafiltrační membrány Amicon PM30 a dialyzovány přes noc proti 1 × 2 000 ml pufru PR6. Nedopatřením došlo k úniku cca poloviny preparátu NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR 2) z dialyzační trubice do dialyzačního pufru. pH preparátu NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR 1), který zůstal v dialyzační trubici, bylo upraveno roztokem KH₂PO₄ na hodnotu 7,0. Následně byly oba preparáty NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR 1 a 2), ze kterých byl odebrán vzorek (150 µl) pro stanovení (kap. 3.2.2.1 až 3.2.2.3 a 3.2.3), naneseny na dvě kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0).

3.2.1.5 Chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B

Na kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (1,4 × 6,5 cm, 10 ml, pH 7,0) ekvilibrovanou pufrům CP1 byl rychlostí 0,5 ml/min nanesen preparát CPR 1, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0. Stejným způsobem byl na druhou kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) nanesen preparát CPR 2 v dialyzačním pufru. Následně byly obě kolony promyty 250 ml pufru CP1, aby došlo k „odmytí“ zbylých kontaminantů.

Navázané preparáty CPR 1 a 2 byly z obou kolon 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) eluovány 2 × 30 ml pufru CP2 s přidavkem NADP⁺ o výsledné koncentraci 500 μM. V jímaných frakcích o objemu cca 4 ml byla měřena cytochrom c reduktasová aktivita (spektrofotometr Specord M-40).

Následně byla provedena SDS elektroforéza frakcí, ve kterých byla detekována cytochrom c reduktasová aktivita. Frakce s vysokým obsahem CPR 1 a 2 byly spojeny. Ke spojeným frakcím obou preparátů CPR byl přidán 5 mM roztok FMN do výsledné koncentrace 50 μM. Oba preparáty CPR byly zahuštěny (Amicon Ultra-15 30K) a dialyzovány přes noc proti 2 × 2 000 ml pufru PR8. Následně byly oba preparáty CPR, ze kterých byl odebrán vzorek (150 μl) pro stanovení (kap. 3.2.2.1 až 3.2.2.3 a 3.2.3), v „alíkvotech“ zmrazeny a uchovány při teplotě -80 °C pro další experimenty (kap. 3.2.4.3 a 3.2.4.4).

3.2.2 Analytická stanovení

3.2.2.1 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentraci proteinu lze stanovit metodou dle Wiechelmana a kol. [82] pomocí 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninové kyseliny (BCA). Některé postranní řetězce aminokyselin redukují měďnaté ionty přidané do roztoku ve formě vinanového komplexu na ionty měďné. Ty reagují v alkalickém prostředí s BCA za tvorby fialově zbarveného komplexu. Intenzitu zbarvení, jež je přímo úměrná koncentraci proteinu, lze stanovit spektrofotometricky měřením absorbance při 562 nm.

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno těsně před použitím rozpuštěním BCA ve 49 dílech roztoku A na výslednou koncentraci 1% a dále přidáním 1 dílu roztoku B.

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno v „tripletech“ 9 μl H₂O („slepý“ vzorek), roztoků standardu (hovězí sérový albumin, BSA) o koncentracích 0,125; 0,25; 0,50; 0,75;

1,00; 1,50 a 2,00 mg.ml⁻¹ a stanovovaných vzorků. Po přidání 260 µl činidla pro stanovení koncentrace proteinu ke každému vzorku byly tyto inkubovány 30 minut při 37 °C v termostatové lázni IR 1500 Automatic CO₂ Incubator. Po ochlazení byla na spektrofotometru Infinite M200 PRO měřena absorbance při 562 nm. Ze zjištěných hodnot absorbancí roztoků standardu BSA o známých koncentracích, od nichž byla odečtena hodnota absorbance „slepého“ vzorku, byla sestrojena kalibrační přímka. Dosazením hodnot absorbancí stanovovaných vzorků (menších o hodnotu absorbance „slepého“ vzorku) do této kalibrační přímky byly odečteny koncentrace proteinu.

3.2.2.2 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentraci cytochromu P450 lze stanovit metodou diferenční spektrometrie, jelikož jeho komplex v redukovaném stavu s navázaným oxidem uhelnatým vykazuje charakteristickou absorpci při 450 nm [45].

Ve zkumavce bylo 40 µl vzorku doplněno pufrem pro stanovení CYP na 1 600 µl. Po přidání cca 5 mg dithioničitanu sodného byl roztok promíchán a do dvou křemenných kyvet bylo pipetováno po 800 µl roztoku, ve kterých byla na spektrofotometru Specord M-40 měřena základní linie v rozmezí vlnových délek 400 – 500 nm. Poté byl vzorkový roztok sycen 45 sekund pomalým proudem oxidu uhelnatého a následně bylo za stejných podmínek měřeno diferenční absorpční spektrum. Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze vzorce

$$c_{\text{CYP}} = \frac{(A_{450} - A_{490})}{l \cdot \epsilon_{\text{CYP},450}} \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{M}];$$

c_{CYP} molární koncentrace cytochromu P450,

A_{450} resp. A_{490} absorbance při 450 nm resp. 490 nm,

$\epsilon_{\text{CYP},450}$ molární absorpční koeficient cytochromu P450 při 450 nm

($\epsilon_{\text{CYP},450} = 0,091 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ [45]),

loptická dráha kyvety (1 cm),

ředění.....hodnota v tomto případě rovna 40.

3.2.2.3 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Aktivitu, specifickou aktivitu a celkovou aktivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy lze stanovit měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace

NADPH [62]. Koncentraci cytochromu c je možné vypočítat na základě známého molárního absorpčního koeficientu tohoto cytochromu při vlnové délce 550 nm.

V kyvetě bylo 760 µl pufru pro stanovení CPR smícháno s 10 µl roztoku cytochromu c o koncentraci 25 mg.ml⁻¹ (w/v) a měřena absorbance „pozadí“ při 550 nm. K takto vzniklému roztoku bylo v opakovaných pokusech přidáváno 10 µl ředěného vzorku a reakce startována 20 µl 10 mM roztoku NADPH (w/v) tak dlouho, dokud nebylo nalezeno ředění vzorku, při kterém byla následně měřená směrnice lineární. Kyveta byla vždy rychle promíchána a po dobu 1 minuty byla na spektrofotometru Specord M-40 měřena změna absorbance při 550 nm. Stanovovaná aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy byla poté vypočtena ze vzorce

$$a_{\text{CPR}} = \frac{\Delta A_{550}}{l \cdot \epsilon_{\text{CPR},550} \cdot t} \quad [\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}];$$

specifická aktivita CPR byla vypočtena ze vzorce

$$a_{\text{sp,CPR}} = \frac{\Delta A_{550}}{l \cdot \epsilon_{\text{CPR},550} \cdot t \cdot c_p} \quad [\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}];$$

celková aktivita CPR byla vypočtena ze vzorce

$$a_{\text{celk,CPR}} = \frac{\Delta A_{550} \cdot V_{\text{CPR}}}{l \cdot \epsilon_{\text{CPR},550} \cdot t} \quad [\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}];$$

ΔA_{550} změna absorbance při 550 nm za dobu t,

loptická dráha kyvety (1 cm),

$\epsilon_{\text{CPR},550}$ molární absorpční koeficient CPR při 550 nm

($\epsilon_{\text{CPR},550} = 21,01 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ [62]),

tdoba měření (1 min),

c_pkoncentrace proteinu [mg . ml⁻¹],

V_{CPR}objem CPR [ml].

3.2.3 SDS elektroforéza

Elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) je metoda sloužící k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Metoda byla prováděna dle Laemmliho [35] na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 4 % „zaostřovacího“ gelu (pH 6,8) a 8 %, 10 % nebo 12 % separačního gelu (pH 8,8) pro NADPH:cytochrom P450 reduktasu, cytochrom P450 nebo cytochrom b₅.

20 µl vhodně ředěných vzorků bylo smícháno s 5 µl pětkrát koncentrovaného vzorkového pufru. Výsledné roztoky byly 5 minut povařeny na vodní lázni a po centrifugaci nanесeny do jamek v gelu (20 µl). Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání při pH 8,5 za konstantního napětí 80 V při průchodu „zaostřovacím“ gelem (cca 30 minut) a 150 V při průchodu gelem separačním. Poté byly gely 45 minut barveny v barvicí lázni roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 a následně odbarveny v odbarvovacím roztoku. Odbarvené gely byly uchovávány při 4 °C v 1 % roztoku kyseliny octové (v/v).

3.2.4 Oxidace benzo[a]pyrenu mikrosomálním systémem monooxygenas se smíšenou funkcí

3.2.4.1 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana

Ke studiu oxidace benzo[a]pyrenu byly použity jaterní mikrosomy izolované z potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných induktory cytochromů P450, a to Sudanem I (indukce CYP1A), fenobarbitalem (indukce CYP2B a CYP2C), pregnenolon-16 α -karbonitrilem (indukce CYP3A) a ethanolem (indukce CYP2E1).

Inkubační směsi o objemu 500 µl byly připraveny do mikrozkuavek vždy ve dvou paralelních vzorcích následujícího složení:

- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- 0,5 mg.ml⁻¹ proteinů mikrosomální frakce (viz. Tab. 1)
- 50 µM BaP (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- „NADPH-generující“ systém

Do mikrozkuavek byly k fosfátovému pufru nejprve pipetovány kontrolní mikrosomy nebo mikrosomy premedikovaných potkanů. Po přidání 5 µl BaP byla oxidace startována 50 µl „NADPH-generujícího“ systému. Směsi byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v termostatové lázni Thermomixer Compact za přístupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 20 minut.

Reakce byla terminována přidáním 1 000 µl ethylacetátu. Po přidavku 5 µl fenacetinu (1 mM zásobní roztok v MeOH) jako vnitřního standardu pro HPLC byly směsi 5 minut intenzivně protřepávány. Pro důkladné oddělení obou fází byly směsi 5 minut centrifugovány při 13 000 RPM (Centrifuge 5418). Horní organická fáze (cca 750 µl) byla

odebrána do nových mikrozkuvek a vodná fáze znovu extrahována 1 000 μ l ethylacetátu. Po odebrání druhé organické fáze byl ethylacetát odpařen dosucha ve vakuové odparce Acid-Resistant CentriVap Concentrator. Vzorky byly následně před analýzou uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 1 Koncentrace proteinu v izolovaných mikrosomálních frakcích použitých pro experimenty

mikrosomy potkanů	c_p [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
kontrolních premedikovaných Sudanem I	18,9
fenobarbitalem	43,1
PCN	29,4
EtOH	53,2
	21,6

c_p – koncentrace proteinu, PCN – pregnenolon-16 α -karbonitril, EtOH – ethanol

3.2.4.2 Oxidace benzo[a]pyrenu lidskými cytochromy P450 1A1 za přítomnosti cytochromu b_5

Oxidace benzo[a]pyrenu byla studována za použití lidských cytochromů P450 1A1 exprimovaných v eukaryotickém (mikrosomy izolované z hmyzích buněk, CYP1A1) nebo prokaryotickém („zlomky“ membrán *E. coli*) systému. Ten byl představován systémy s vyšší (CYP1A1R) a nižší (CYP1A1LR) aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy. K těmto systémům byl v polovině případů přidán v poměru 1:5 cytochrom b_5 izolovaný z králičích jater.

Inkubační směsi o objemu 250 μ l byly připraveny do mikrozkuvek vždy ve dvou paralelních vzorcích následujícího složení:

- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4)
- 100 nM CYP1A1 (1 000 nM zásobní CYP),
100 nM CYP1A1R (1 300 nM zásobní CYP)
nebo 100 nM CYP1A1LR (4 200 nM zásobní CYP)
- 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ cyt b_5 (zásobní cyt b_5 ; 56,8 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- 50 μ M BaP (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- „NADPH-generující“ systém

Do mikroskopavek byly k fosfátovému pufru nejprve pipetovány CYP1A1, CYP1A1R nebo CYP1A1LR. K polovině vzorků byl přidán cyt b₅ v poměru 1:5. Směsi byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v termostátové lázni Thermomixer Compact za přístupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Po přidání 2,5 µl BaP byla oxidace startována 25 µl „NADPH-generujícího“ systému a směsi 20 minut inkubovány za předchozích podmínek.

Následující postup se shoduje s postupem popsáním v kap. 3.2.4.1.

3.2.4.3 Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému za přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reductasy

Ke studiu oxidace benzo[a]pyrenu byly použity lidské cytochromy P450 1A1 exprimované v prokaryotickém systému („zlomky“ membrán *E. coli*) s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A1LR). K tomuto systému byla v níže uvedených poměrech přidána NADPH:cytochrom P450 reductasa izolovaná z králičích jater.

Inkubační směsi o objemu 250 µl byly připraveny do mikroskopavek vždy ve dvou paralelních vzorcích následujícího složení:

- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- 100 nM CYP1A1LR (4 200 nM zásobní CYP)
- 40; 60; 80; 100; 200 nebo 300 nM CPR
- 50 µM BaP (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- „NADPH-generující“ systém

Do mikroskopavek byly k fosfátovému pufru nejprve pipetovány CYP1A1LR a CPR o výsledném poměru 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1; 1:2 nebo 1:3. Směsi byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v termostátové lázni Thermomixer Compact za přístupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Po přidání 2,5 µl BaP byla oxidace startována 25 µl „NADPH-generujícího“ systému a směsi 20 minut inkubovány za předchozích podmínek.

Následující postup se shoduje s postupem popsáním v kap. 3.2.4.1.

3.2.4.4 Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému za přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reductasy v liposomech

Oxidace benzo[a]pyrenu byla studována za použití lidských cytochromů P450 1A1 exprimovaných v prokaryotickém systému („zlomky“ membrán *E. coli*) s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A1LR). K tomuto systému byla přidána v níže uvedených poměrech izolovaná NADPH:cytochrom P450 reductasa a arteficiální membrána tvořená liposomy (dilauroylfosfatidylcholin, DLPC).

Rekonstituované systémy o objemu 110 μ l byly připraveny v následujícím složení:

- 1 mg. ml^{-1} DLPC (5 mg. ml^{-1} v CCl_4)
- H_2O
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H_2O , pH 7,4)
- 0,05 mg. ml^{-1} CHAPS (0,5 mg. ml^{-1} v pufru HEPES)
- 3 mM GSH (30 mM zásobní roztok v H_2O)
- 100 nM CYP1A1LR (4 200 nM zásobní CYP)
- 40; 60; 80; 100; 200 nebo 300 nM CPR

Do skleněných zkumavek byl pipetován roztok DLPC v CCl_4 , který byl následně odpařen proudem dusíku tak, aby se na dně a stěnách zkumavek vytvořila vrstva lipidu. Po přidání H_2O , roztoků CHAPS v HEPES a GSH byly směsi sonikovány 2×3 minuty v ultrazvukové lázni Elmasonic E 30 H. Poté byly přidány CYP1A1LR a CPR o výsledném poměru 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1; 1:2 nebo 1:3 a směsi inkubovány 10 minut na třepačce Orbital Shaker OS2 Basic při laboratorní teplotě.

Rekonstituované systémy byly následně použity k přípravě inkubačních směsí o objemu 250 μ l a dvou paralelních vzorcích:

- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4)
- 50 μ M BaP (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- „NADPH-generující“ systém

Do mikrozkušavek bylo k fosfátovému pufru pipetováno vždy 2×50 μ l rekonstituovaného systému. Po přidání 2,5 μ l BaP byla oxidace startována 25 μ l „NADPH-

generujícího“ systému a směsi inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v termostatové lázni Thermomixer Compact za přístupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 20 minut.

Následující postup se shoduje s postupem popsáním v kap. 3.2.4.1.

3.2.4.5 Oxidace benzo[a]pyrenu lidskými cytochromy P450 1A1 za přítomnosti epoxidhydrolasy

Ke studiu oxidace benzo[a]pyrenu byly použity lidské cytochromy P450 1A1 exprimované v prokaryotickém systému („zlomky“ membrán *E. coli*) s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A1LR). K tomuto systému byla přidána epoxidhydrolasa izolovaná z králičích jater.

Inkubační směsi o objemu 500 µl byly připraveny do mikrozkušavek ve dvou paralelních vzorcích následujícího složení:

- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- 100 nM CYP1A1LR (4 200 nM zásobní CYP)
- 0,5 mg.ml⁻¹ EH (zásobní EH; 4,6 mg.ml⁻¹)
- 50 µM BaP (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- „NADPH-generující“ systém

Do mikrozkušavek byly k fosfátovému pufru nejprve pipetovány CYP1A1LR a EH. Směsi byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v termostatové lázni Thermomixer Compact za přístupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Po přidání 5 µl BaP byla oxidace startována 50 µl „NADPH-generujícího“ systému a směsi 20 minut inkubovány za předchozích podmínek.

Následující postup se shoduje s postupem popsáním v kap. 3.2.4.1.

3.2.4.6 Separace metabolitů benzo[a]pyrenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Vzorky obsahující jednotlivé metabolity benzo[a]pyrenu připravené postupy popsány v kap. 3.2.4.1 až 3.2.4.5 byly rozpuštěny v 25 µl MeOH, protřepány a centrifugovány.

Benzo[a]pyren a jeho metabolity vzniklé v inkubačních směsích byly následně separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi (RP-HPLC)

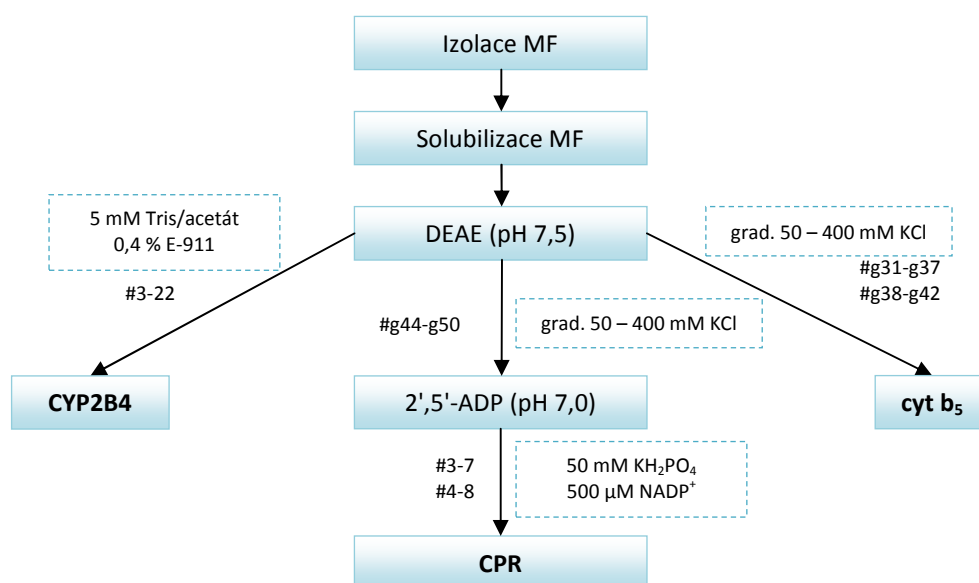
na přístroji Dionex s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min a objemem nástřiku na kolonu 20 μ l. Pro separaci byl použit 50 minutový program „BaP_Met.acetonitril_01“ [40] s 35 minutami eluce lineárním gradientem 50 – 85 % acetonitrilu (v/v), během něhož se eluovaly metabolity benzo[a]pyrenu. Mobilní fáze byly připraveny do skleněných láhví a před použitím odplyněny sonikací 1 hodinu v ultrazvukové lázni Elmasonic E 30 H. Separace probíhala na koloně Nucleosil (100-5 C18 250/4) termostatované v Column Oven LCO 101 na 35 °C. Jednotlivé metabolity benzo[a]pyrenu byly detekovány UV/VIS detektorem při vlnové délce 254 nm.

Ke „sběru“ dat, vyhodnocení chromatogramů a kvantifikaci ploch „píků“ benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů byl použit program Chromeleon™ 6.11 build 490. Plochy „píků“ metabolitů benzo[a]pyrenu byly vztaženy k ploše „píku“ vnitřního standardu fenacetinu a dále zpracovány do grafu v tabulkovém procesoru MS Excel 2007.

4 VÝSLEDKY

4.1 IZOLACE A PURIFIKACE NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASY

První část předkládané diplomové práce je zaměřena na izolaci a purifikaci NADPH:cytochrom P450 reductasy, enzymu použitého ke studiu metabolismu benzo[a]pyrenu v další části této práce (kap. 4.2). Tento enzym, jenž je nezbytnou složkou MFO systému, byl izolován z jater králíka domácího. Průběh této izolace a následné purifikace ilustruje schéma na Obr. 13.



Obr. 13 Schéma průběhu izolace NADPH:cytochrom P450 reductasy

MF – mikrosomální frakce, DEAE – kolona DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5), 2',5'-ADP – kolona 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0), CPR – cytochrom P450 reductasa, CYP 2B4 – cytochrom P450 2B4, cyt b₅ – cytochrom b₅, grad. – gradient

Nejprve byla provedena izolace a solubilizace jaterní mikrosomální frakce pokusných zvířat, po kterých následovala purifikace NADPH:cytochrom P450 reductasy pomocí ionexové (DEAE-Sepharosa) a afinitní (2',5'-ADP-Sepharosa) chromatografie.

Souběžně s výše uvedenou reduktasou byly izolovány též cytochrom P450 2B4 a cytochrom b₅, jejichž finální purifikace však nebyla cílem této předkládané práce.

4.1.1 Izolace jaterní mikrosomální frakce

Mikrosomální frakce byla izolována z homogenizovaných jater králíka domácího metodou diferenční centrifugace podle postupu popsaného v kap. 3.2.1.2.

Výše jmenovanou metodou byly ze dvou homogenizovaných králičích jater o hmotnosti 85 g a 100 g připraveny dvě jaterní mikrosomální frakce. První mikrosomální frakce bylo získáno 35 ml o koncentraci proteinu $35 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a koncentraci cytochromu P450 $57 \text{ }\mu\text{M}$ (2 000 nmol). Druhé mikrosomální frakce bylo připraveno 31 ml o koncentraci proteinu $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a koncentraci cytochromu P450 $24 \text{ }\mu\text{M}$ (750 nmol).

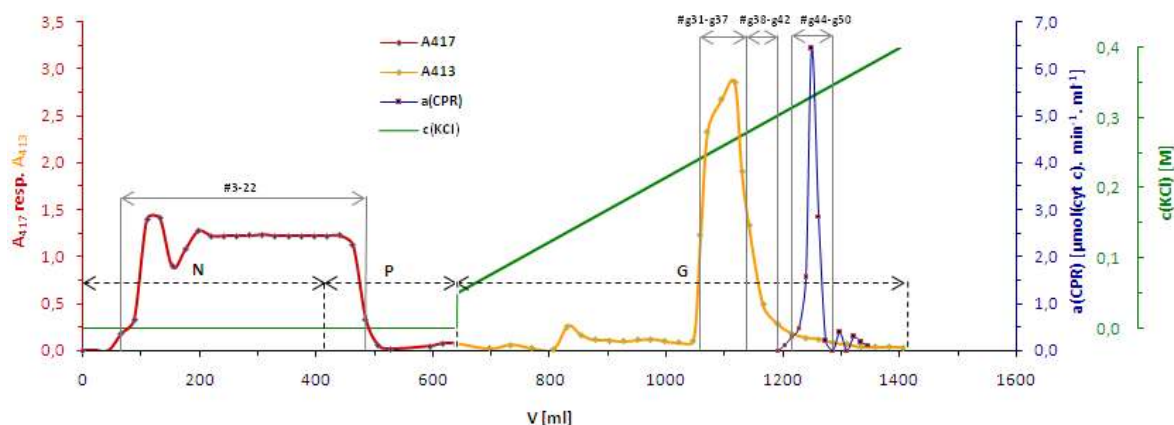
4.1.2 Solubilizace jaterní mikrosomální frakce

Izolovaná jaterní mikrosomální frakce obsahovala řadu membránových proteinů (např. cytochrom P450 2B4, cytochrom b_5 , NADPH:cytochrom P450 reduktasu a další) Solubilizací této frakce pomocí detergentů (postupem popsáným v kap. 3.2.1.3) se zvýšila rozpustnost přítomných proteinů v polárních rozpouštědlech.

Z 66 ml spojené jaterní mikrosomální frakce bylo ředěním získáno 360 ml suspenze o koncentraci proteinu $9,9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, koncentraci cytochromu P450 $9,3 \text{ }\mu\text{M}$ (3 350 nmol) a cytochrom c reduktasové aktivitě $0,5 \text{ }\mu\text{mol cyt c}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po přidavku detergentů, a to cholátu sodného (21,5 ml 10 % roztoku) a Emulgenu 911 (21,5 ml 10 % roztoku), bazického protaminsulfátu (10 ml $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ zásobního roztoku) a směsi proteasových inhibitorů (7 tablet Complete Inhibitoru) činil objem solubilizátu 415 ml. Zároveň v něm byla stanovena koncentrace proteinu $8,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, koncentrace cytochromu P450 $10,2 \text{ }\mu\text{M}$ (4 200 nmol) a cytochrom c reduktasové aktivita $0,4 \text{ }\mu\text{mol cyt c}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.1.3 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

Solubilizované proteiny, a to cytochrom P450 2B4, cytochrom b_5 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa, byly separovány pomocí ionexové chromatografie, konkrétně pomocí chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy, podle postupu popsáného v kap. 3.2.1.4. Průběh výše uvedené chromatografie ilustruje Obr. 14.

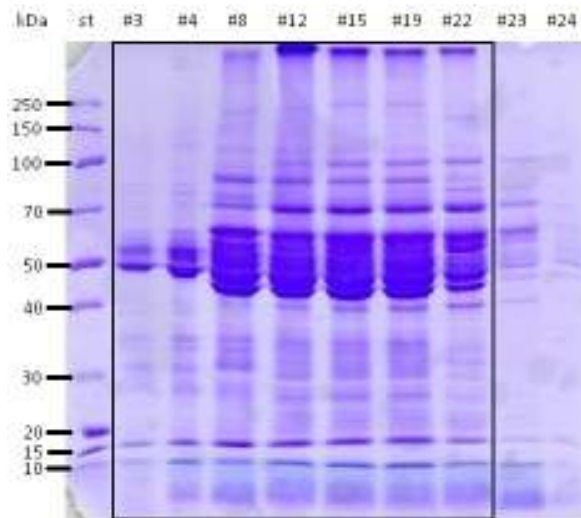


Obr. 14 Chromatografie supernatantu získaného solubilizací izolované jaterní mikrosomální frakce, na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5)

Podmínky chromatografie: kolona DEAE-Sepharosy CL6B (2,5 × 40 cm, 120 ml, pH 7,5), isokratická eluce pufrům PR5 s 0,4 % roztokem E-911 (w/v) a eluce lineárním gradientem 50 – 400 mM KCl v pufru PR5, A_{417} resp. A_{413} – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm (detekce cytochromu P450 2B4) resp. 413 nm (detekce cytochromu b_5), $a(\text{CPR})$ – cytochrom c reduktasová aktivita (detekce NADPH:cytochrom P450 reduktasy), $c(\text{KCl})$ – molární koncentrace KCl, #3-22 resp. #g44-50 – spojené frakce, N – nanášení, P – promývání, G – eluce gradientem

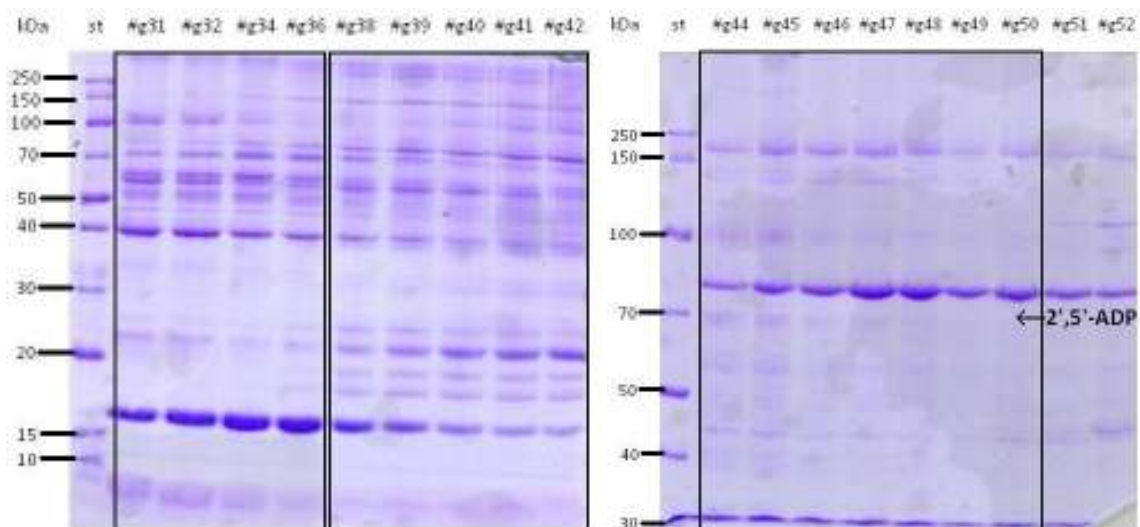
Promýváním solubilizátu naneseného na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5) pomocí detergentu, t.j. Emulgen 911, byl eluován cytochrom P450 2B4, který se na výše jmenované kolonu neváže. Tím došlo k oddělení tohoto proteinu od dalších dvou složek solubilizátu, a to cytochromu b_5 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Eluce separovaného cytochromu P450 2B4 byla sledována měřením absorbance při 417 nm. Cytochrom b_5 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa, které zůstaly na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5) navázané, byly z vazby na tuto kolonu uvolněny lineárním gradientem KCl. Zároveň došlo k vzájemnému oddělení obou těchto složek. Zatímco eluce cytochromu b_5 tímto gradientem byla sledována měřením absorbance při 413 nm, přítomnost NADPH:cytochrom P450 reduktasy v gradientem soli eluovaných frakcích byla zjišťována měřením cytochrom c reduktasové aktivity.

Obr. 15 a Obr. 16 zobrazují SDS elektroforézy frakcí s nejvyšší absorbancí při 417 nm a 413 nm a frakcí, ve kterých byla detekována cytochrom c reduktasová aktivita.



Obr. 15 SDS elektroforéza frakcí obsahujících cytochrom P450 2B4, eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5) isokraticky pomocí Emulgenu 911

Podmínky SDS elektroforézy: 10 % separační gel, barvení CBB R-250, st – standard molekulových hmotností, #3-24 – frakce



Obr. 16 SDS elektroforéza frakcí obsahujících cytochrom b_5 (vlevo) a NADPH:cytochrom P450 reduktasu (vpravo), eluovaných z kolony DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5) lineárním gradientem KCl

Podmínky SDS elektroforézy: 12 % separační gel (vlevo) a 8 % (vpravo), barvení CBB R-250, st – standard molekulových hmotností, #g44-52 – frakce, 2',5'-ADP – frakce nanesené na kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B

SDS elektroforéza jednotlivých frakcí obsahujících cytochrom P450 2B4 ukázala, že ve frakcích 3 – 22 se nacházejí přibližně stejná množství cytochromu P450 2B4, tudíž byly tyto frakce spojeny. Po zahuštění na 90 ml a dialýze byl preparát cytochromu P450 2B4 zmražen (2 × 45 ml) a uchován při teplotě -80 °C.

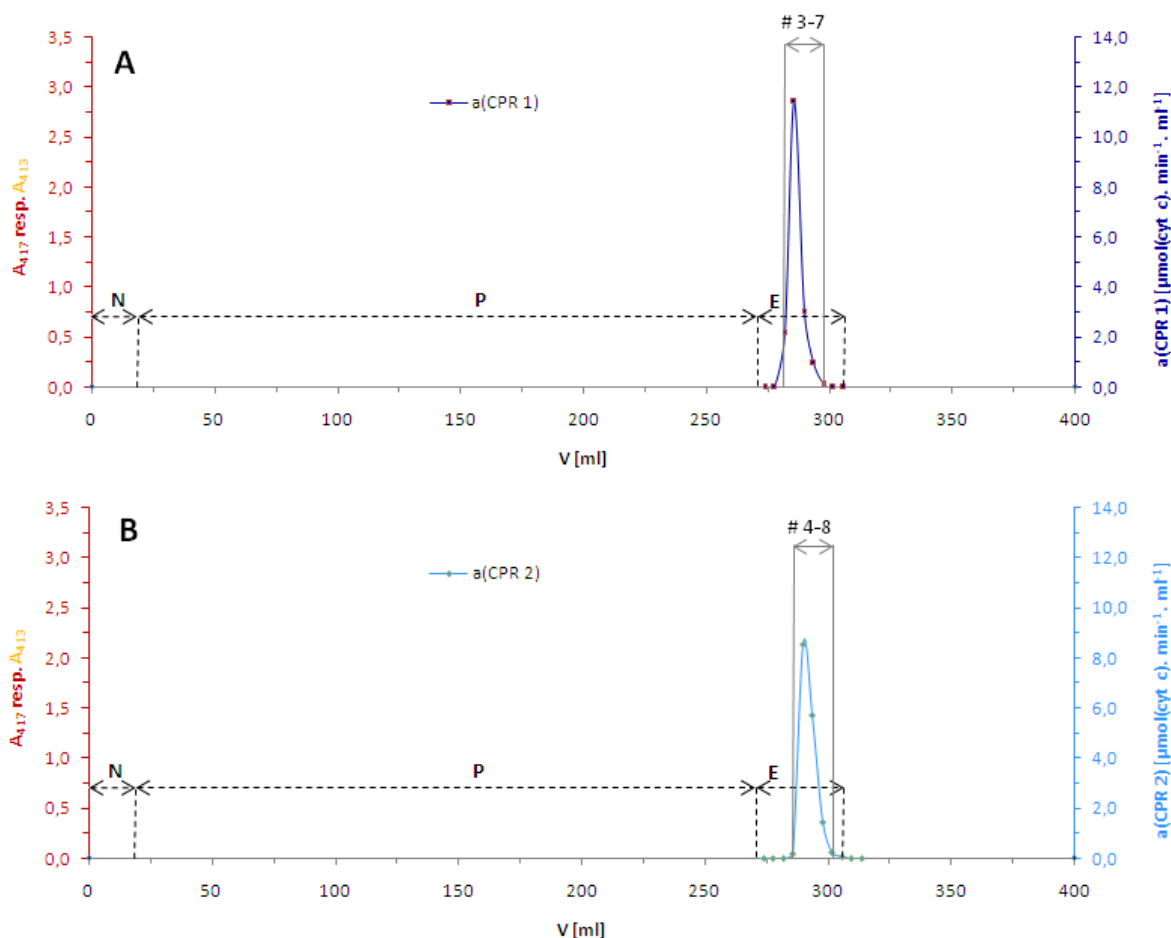
Měřením absorbance při 413 nm a cytochrom c reduktasové aktivity ve frakcích eluovaných gradientem koncentrace KCl bylo zjištěno, že na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5) došlo k úplnému oddělení cytochromu b₅ od NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Cytochrom b₅ byl dle chromatografie i SDS elektroforézy (zóna o molekulové hmotnosti 17 kDa) obsažen ve frakcích g31 – g42. Spojeny byly frakce g31 – g37 z absorpčního vrcholu „píku“ a frakce g38 – g42, jejichž absorbance při 413 nm přesáhla desetinu absorpčního maxima „píku“. Oba preparáty cytochromu b₅ byly zahuštěny na 31 ml a 23 ml, dialyzovány a dále purifikovány. Další purifikace cytochromu b₅ však již nebyla cílem této diplomové práce.

Ve frakcích g44 – g52 eluovaných gradientem koncentrace KCl na koloně DEAE-Sepharosy CL6B (pH 7,5) byla zjištěna cytochrom c reduktasová aktivita a zároveň se v těchto frakcích nacházela zóna odpovídající molekulové hmotnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy (78 kDa). Podle SDS elektroforézy byla ve frakcích g51 – g52 přítomna též tetrahydrofolátreduktasa o molekulové hmotnosti 95 kDa. Jelikož není možné při následné chromatografii na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) jejich vzájemné oddělení [Ječmen 2010], byly frakce obsahující obě reduktasy z dalšího zpracování vyřazeny.

Frakce obsahující pouze NADPH:cytochrom P450 reduktasu, t.j. g44 – g50 byly spojeny. Preparát NADPH:cytochrom P450 reduktasy byl zahuštěn na 35 ml, ve kterém byla stanovena koncentrace proteinu 7,9 mg.ml⁻¹ a cytochrom c reduktasová aktivita 3,2 μmol cyt c.min⁻¹.ml⁻¹. Při dialýze došlo nedopatřením k úniku přibližně poloviny preparátu NADPH:cytochrom P450 reduktasy do dialyzačního pufru, takže další purifikace probíhala se dvěma preparáty této reduktasy.

4.1.4 Chromatografie na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B

Oba preparáty NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR 1 a 2), které byly separovány pomocí ionexové chromatografie (DEAE-Sepharosa), byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie, konkrétně pomocí 2',5'-ADP-Sepharosy, postupem popsáním v kap. 3.2.1.5. Průběh výše uvedené chromatografie ilustruje Obr. 17.

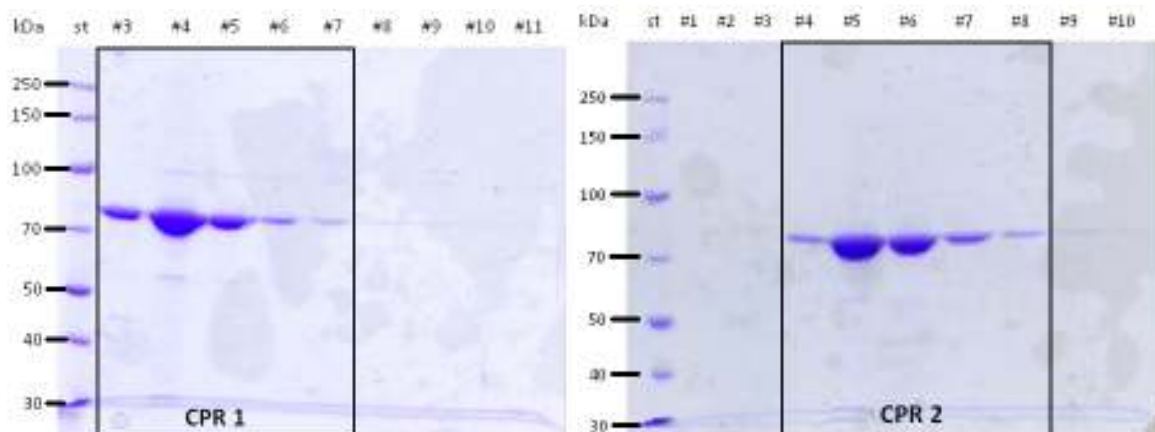


Obr. 17 Chromatografie frakcí obsahujících NADPH:cytochrom P450 reduktasu 1 (A) a 2 (B) na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0)

Podmínky chromatografie: kolona 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (1,4 × 6,5 cm, 10 ml, pH 7,0), promývání puřem CP1, isokratická eluce puřem CP2 s 500 μ M roztokem NADP^+ , a(CPR 1) a a(CPR 2) – cytochrom c reduktasová aktivita (detekce NADPH:cytochrom P450 reduktasy 1 a 2), #3-7 – spojené frakce, N – nanášení, P – promývání, E – eluce

Promýváním obou preparátů NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR 1 a 2) nanesených na dvě kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) byly odstraněny kontaminanty, které se na výše uvedené kolony specificky neváží. Odstraněním těchto kontaminantů zůstala na obou kolonách 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) navázána pouze NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Ta byla z vazby na tyto kolony uvolněna isokratickou elucí pomocí NADP^+ . Přítomnost tohoto enzymu v isokraticky eluovaných frakcích byla zjišťována měřením cytochrom c reduktasové aktivity.

Obr. 18 zobrazuje SDS elektroforézu frakcí, ve kterých byla detekována cytochrom c reduktasová aktivita.



Obr. 18 SDS elektroforéza frakcí obsahujících NADPH:cytochrom P450 reduktasu, eluovaných z kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) isokraticky pomocí NADP⁺

Podmínky SDS elektroforézy: 8 % separační gel, barvení CBB R-250, st – standard molekulových hmotností, #3-11 – frakce, vlevo CPR 1, vpravo CPR 2

Ve frakcích 3 – 7 eluovaných z první kolony a frakcích 4 – 8 eluovaných z druhé kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0) byla zjištěna cytochrom c reduktasová aktivita, která přesáhla setinu aktivity v maximu „píku“. Přítomnost NADPH:cytochrom P450 reduktasy ve výše uvedených frakcích byla následně potvrzena SDS elektroforézou (zóna o molekulové hmotnosti 78 kDa).

Na základě výše jmenovaných skutečností byly frakce 3 – 7, které obsahovaly CPR 1, a frakce 4 – 8 s obsahem CPR 2 spojeny. Po přidavku FMN byly oba preparáty NADPH:cytochrom P450 reduktasy zahuštěny na 5 ml a 9 ml. V prvním preparátu byla stanovena koncentrace proteinu $6,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a cytochrom c reduktasová aktivita $3,1 \mu\text{mol cyt c}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, v druhém preparátu činila koncentrace proteinu $6,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a cytochrom c reduktasová aktivita $3,3 \mu\text{mol cyt c}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Po dialýze byly oba preparáty NADPH:cytochrom P450 reduktasy v „alíkvotech“ zmrazeny a uchovány při teplotě $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Preparát NADPH:cytochrom P450 reduktasy o vyšší cytochrom c reduktasové aktivitě, tedy CPR 2, byl následně použit pro studium metabolismu benzo[a]pyrenu, jehož výsledky jsou prezentovány v další části předkládané diplomové práce, konkrétně v kap. 4.2.3 a 4.2.4.

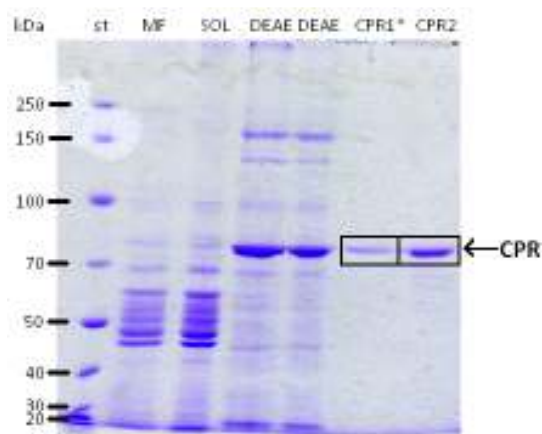
4.1.5 Charakterizace průběhu izolace a purifikace NADPH:cytochrom P450 reductasy

Izolací a následnou purifikací byly získány dva preparáty králičí jaterní NADPH:cytochrom P450 reductasy. CPR 1 bylo získáno 5 ml o cytochrom c reduktasové aktivitě $3,1 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá celkové aktivitě CPR $16 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}$ a výtěžku izolace 8,7 %. CPR 2 bylo pak získáno 9 ml o cytochrom c reduktasové aktivitě $3,3 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá celkové aktivitě CPR $30 \mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}$ a výtěžku izolace 16,7 %. Průběh izolace a purifikace králičí jaterní NADPH:cytochrom P450 reductasy je shrnut v Tab. 2 a čistota preparátů zachycena na SDS elektroforéze na Obr. 19.

Tab. 2 Izolace a purifikace NADPH:cytochrom P450 reductasy

	V	c_p	a	s.a	a_{celk}	
	[ml]	[mg·ml ⁻¹]	[$\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$]	[$\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	[$\mu\text{mol cyt c} \cdot \text{min}^{-1}$]	[%]
MF	360	9,9	0,5	0,05	178	100,0
SOL	415	8,1	0,4	0,05	174	97,6
DEAE	35	7,9	3,2	0,41	113	63,6
CPR 1	5	6,3	3,1	0,49	16	8,7
CPR 2	9	6,8	3,3	0,49	30	16,7

V – objem, c_p – koncentrace proteinu, a – cytochrom c reduktasová aktivita, a_{sp} – specifická aktivita, a_{celk} – celková aktivita, % – procentuální výtěžek oproti mikrosomální frakci, MF – mikrosomální frakce, SOL – solubilizát mikrosomální frakce, DEAE – NADPH:cytochrom P450 reduktasa eluovaná z kolony DEAE-Sepharosy CL6B, CPR 1 a 2 – finální NADPH:cytochrom P450 reduktasa



Obr. 19 SDS elektroforéza shrnující průběh izolace NADPH:cytochrom P450 reductasy

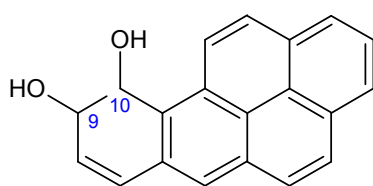
Podmínky SDS elektroforézy: 8 % separační gel, barvení CBB R-250, st – standard molekulových hmotností, MF – mikrosomální frakce, SOL – solubilizát mikrosomální frakce, DEAE – NADPH:cytochrom P450 reduktasa eluovaná z kolony DEAE-Sepharosy CL6B, CPR 1 a 2 – finální NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR 1* - nedopatřením $10 \times$ ředěná finální CPR 1)

4.2 OXIDACE BENZO[A]PYRENU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ

Další část předkládané diplomové práce se zabývá studiem metabolismu benzo[a]pyrenu enzymy mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí. Konkrétně byla oxidace benzo[a]pyrenu studována jaterním mikrosomálním systémem potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných induktory cytochromů P450 a dále lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému. Eukaryotický systém, v němž byly výše zmíněné cytochromy P450 exprimovány, byl tvořen mikrosomy izolovanými z hmyzích buněk, zatímco systém prokaryotický tvořily „zlomky“ membrán *E. coli*.

V rámci cytochromu P450 1A1 byl detailněji zkoumán i vliv dalších složek MFO systému na oxidaci benzo[a]pyrenu, a to cytochromu b_5 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Izolace a purifikace tohoto enzymu je náplní kap. 4.1. V neposlední řadě byla pozornost věnována roli epoxidhydrolasy, enzymu lokalizovaném v membráně endoplasmatického retikula, tedy i v mikrosomech, na tuto oxidaci.

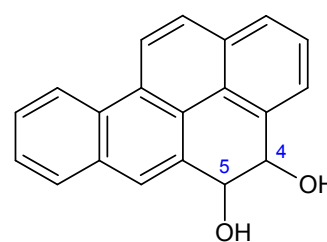
Benzo[a]pyren je mikrosomálním systémem jater potkanů a lidskými cytochromy P450 1A1 exprimovanými v eukaryotickém a prokaryotickém systému, metabolizován až na sedm metabolitů, označovaných jako M1 – M6 a Mx. Struktura těchto metabolitů, t.j. M1 – M6, byla již určena [39] a je uvedena na Obr. 20. U neznámého metabolitu benzo[a]pyrenu, Mx, nebyla struktura prozatím charakterizována.



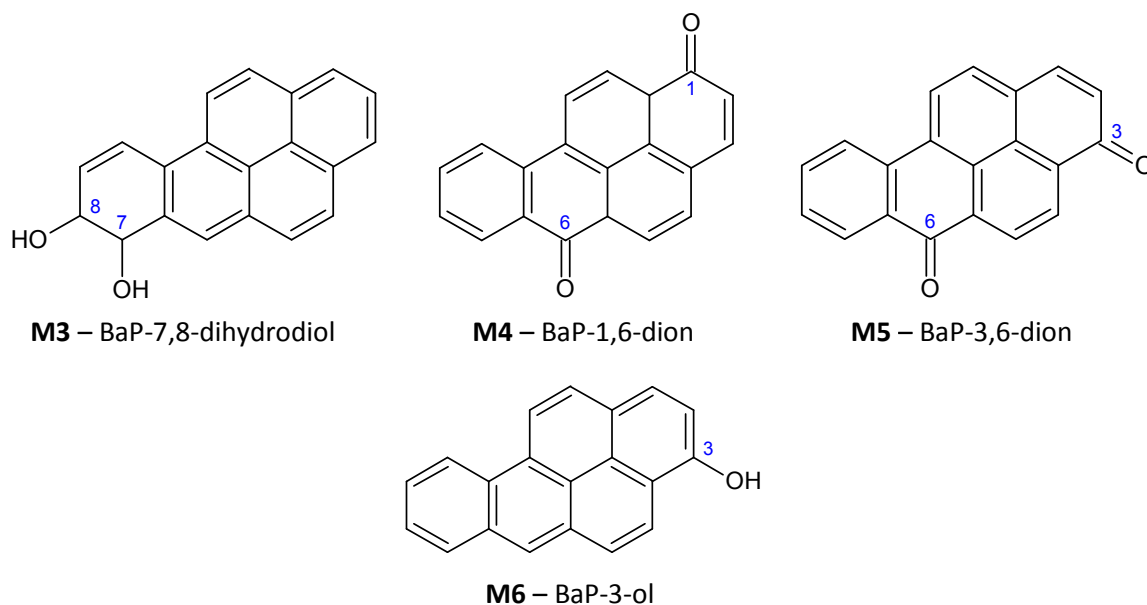
M1 – BaP-9,10-dihydrodiol

?

Mx – ?

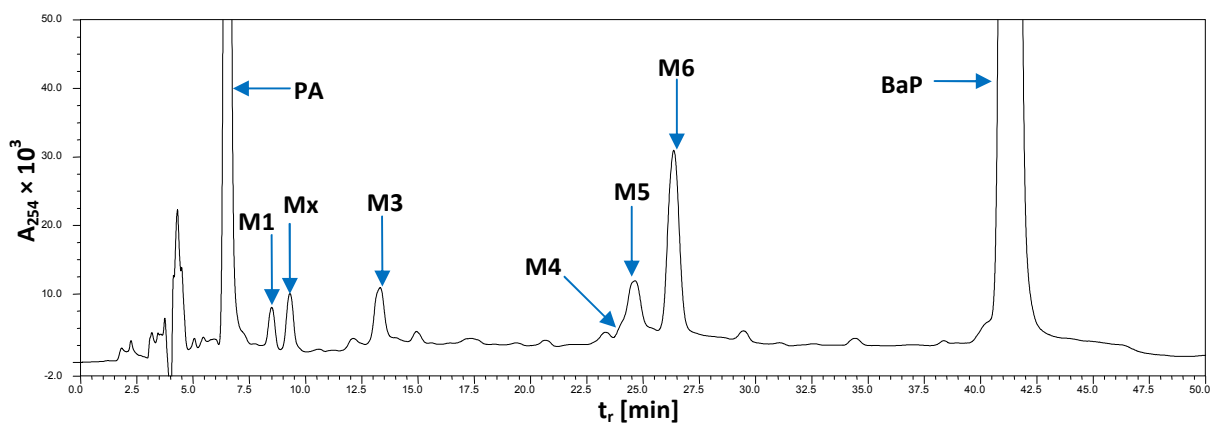


M2 – BaP-4,5-dihydrodiol



Obr. 20 Struktura metabolitů benzo[a]pyrenu

Metabolity benzo[a]pyrenu vzniklé oxidací výše uvedenými enzymovými systémy byly separovány metodou HPLC vyvinutou RNDr. Michaelou Moserovou, Ph.D. [40] a detekovány při vlnové délce 254 nm (postupem popsaným v kap. 3.2.4.6). Příklad separace benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému výše uvedenou metodou je uveden na Obr. 21.



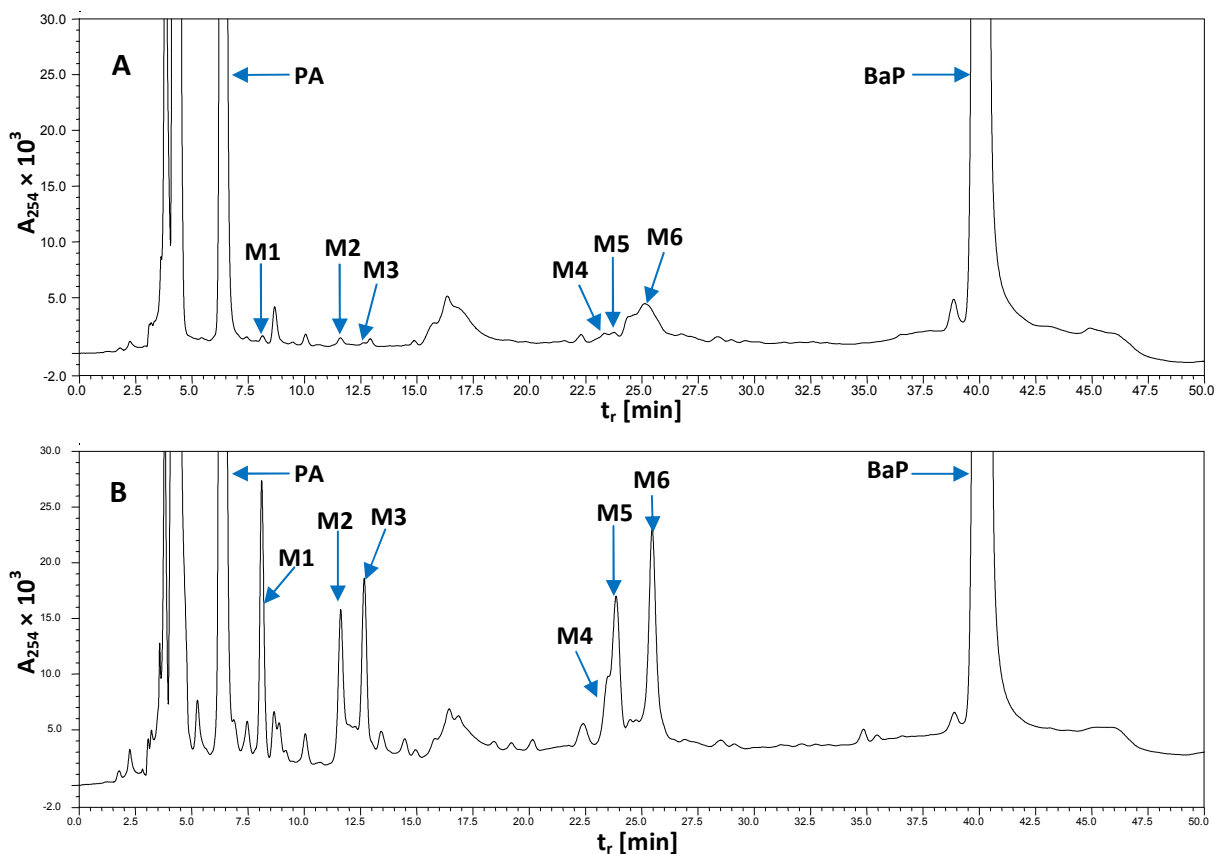
Obr. 21 HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému

Podmínky měření: kolona Nucleosil (100-5, C18, 250/4), eluce lineárním gradientem 50 – 85 % acetonitrilu (v/v), A_{254} – absorbance měřená při vlnové délce 254 nm, PA – fenacetin, M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, Mx – neznámý metabolit BaP, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion, M6 – BaP-3-ol, BaP – benzo[a]pyren

4.2.1 Vliv induktorů cytochromů P450 na oxidaci benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana

Tato část diplomové práce se zabývá studiem vlivu induktorů cytochromů P450 na oxidaci benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana. V experimentech byly použity jaterní mikrosomy potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných induktory cytochromů P450 (viz kap. 3.2.4.1). Induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A byl Sudan I, podrodiny 2B a 2C byl fenobarbital, podrodiny 3A byl pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN) a isoenzymu 2E1 byl ethanol [13, 80]. Vzniklé metabolity benzo[a]pyrenu a benzo[a]pyren byly separovány pomocí HPLC.

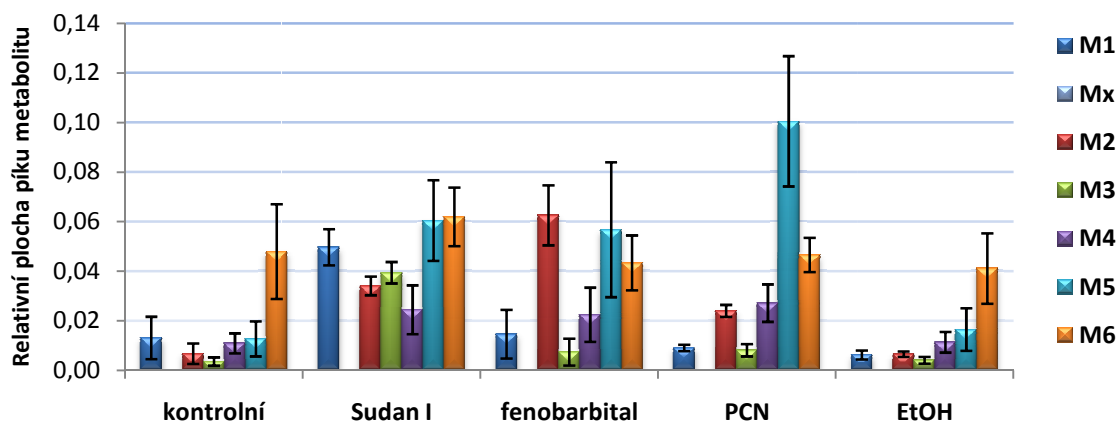
Porovnání HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací jaterními mikrosomy potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A, Sudanem I, je patrné z Obr. 22.



Obr. 22 HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací jaterními mikrosomy potkanů kontrolních (nepremedikovaných) (A) a premedikovaných Sudanem I (B)

Podmínky měření: kolona Nucleosil (100-5, C18, 250/4), eluce lineárním gradientem 50 – 85 % acetonitrilu (v/v), A_{254} – absorbance měřená při vlnové délce 254 nm, PA – fenacetin, M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, M2 – BaP-4,5-dihydrodiol, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion, M6 – BaP-3-ol, BaP – benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren je jaterními mikrosomy jak potkanů kontrolních, tak i všech premedikovaných, metabolizován na šest metabolitů [BaP-9,10-dihydrodiol (M1), BaP-4,5-dihydrodiol (M2), BaP-7,8-dihydrodiol (M3), BaP-1,6-dion (M4), BaP-3,6-dion (M5) a BaP-3-ol (M6)], jak ukazuje graf na Obr. 23.



Obr. 23 Vliv induktorů cytochromů P450 na oxidaci benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkanů (srovnání efektivity jaterních mikrosomů potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných Sudanem I, fenobarbitalem, pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN) a ethanolem (EtOH))

Inkubační směs obsahovala 0,5 mg.ml⁻¹ proteinů mikrosomální frakce a 50 μ M benzo[a]pyren. M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, Mx – neznámý metabolit BaP, M2 – BaP-4,5-dihydrodiol, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion a M6 – BaP-3-ol. Výsledky v grafu jsou uvedeny jako průměry a směrodatné odchylky čtyř měření.

Mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, fenobarbitalem a PCN jsou v oxidaci benzo[a]pyrenu efektivnější než mikrosomy kontrolních potkanů. Při použití mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I, majoritním induktorem cytochromu P450 1A1, bylo zvýšeno množství všech tvořených metabolitů, zejména BaP-7,8-dihydrodiolu (M3), jehož tvorba byla zvýšena 11,2krát, a BaP-4,5-dihydrodiolu (M2), a to 5,1krát. Oxidací benzo[a]pyrenu potkaními mikrosomy indukovanými fenobarbitalem došlo k výraznému nárůstu množství dvou metabolitů, a to BaP-4,5-dihydrodiolu (M2) 9,4krát a BaP-3,6-dionu (M5) 4,5krát. Mikrosomy potkanů premedikovaných PCN metabolizují benzo[a]pyren za vzniku 7,9krát většího množství BaP-3,6-dionu (M5) oproti mikrosomům kontrolních potkanů. Metabolity benzo[a]pyrenu [BaP-9,10-dihydrodiol

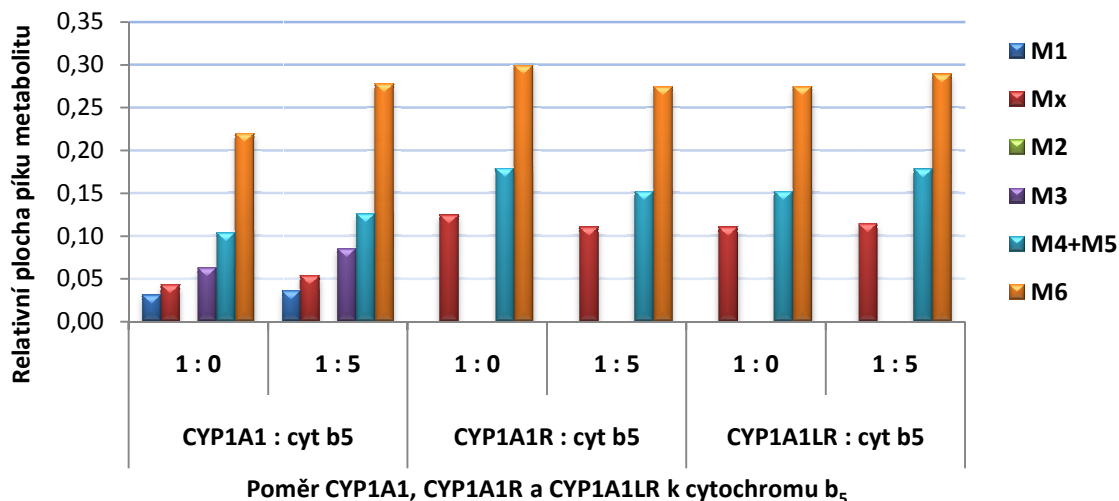
(M1), BaP-7,8-dihydrodiol (M3), BaP-1,6-dion (M4) a BaP-3-ol (M6)] byly tvořeny ve stejném poměru mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem a PCN, jako mikrosomy potkanů nepremedikovaných.

Tvorba metabolitů benzo[a]pyrenu mikrosomy potkanů premedikovaných ethanolem byla srovnatelná s tvorbou metabolitů pomocí mikrosomů kontrolních potkanů. Oba systémy zároveň vykazují v tvorbě všech metabolitů benzo[a]pyrenu podobnou tendenci.

4.2.2 Vliv cytochromu b₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému

V této části diplomové práce byla pozornost zaměřena na zkoumání vlivu cytochromu b₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1. Konkrétně byl použit lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v eukaryotickém (CYP1A1) a prokaryotickém systému. Ten byl představován systémy s vyšší (CYP1A1R) a nižší (CYP1A1LR) aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Cytochrom b₅ izolovaný z králíčích jater byl rekonstituován s výše zmíněnými systémy v poměru CYP:cyt b₅ 1:0 a 1:5 postupem popsaným v kap. 3.2.4.2. Vzniklé metabolity benzo[a]pyrenu a benzo[a]pyren byly separovány metodou HPLC. Vzhledem k nedostatečné separaci píků dvou metabolitů benzo[a]pyrenu [BaP-1,6-dion (M4) a BaP-3,6-dion (M5)] byly plochy píků těchto metabolitů kvantifikovány dohromady.

Oxidací benzo[a]pyrenu CYP1A1 vzniká šest jeho metabolitů [BaP-9,10-dihydrodiol (M1), Mx, BaP-7,8-dihydrodiol (M3), BaP-1,6-dion (M4), BaP-3,6-dion (M5) a BaP-3-ol (M6)]. Při použití CYP1A1R a CYP1A1LR dochází oběma systémy shodně ke tvorbě čtyř metabolitů benzo[a]pyrenu, a to Mx, BaP-1,6-dionu (M4), BaP-3,6-dionu (M5) a BaP-3-olu (M6). Přídavek cytochromu b₅ ke všem systémům, tedy CYP1A1, CYP1A1R a CYP1A1LR, nevede ke změně v počtu tvořených metabolitů benzo[a]pyrenu, jak je patrné z grafu na Obr. 24.



Obr. 24 Vliv cytochromu b_5 na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém (CYP1A1) a prokaryotickém systému s vyšší (CYP1A1R) a nižší (CYP1A1LR) aktivitou NADPH:cytochrom P450 reductasy

Inkubační směs obsahovala 100 nM CYP1A1, CYP1A1R nebo CYP1A1LR, 0,5 mg.ml⁻¹ cytochromu b_5 (v poměru CYP:cyt b_5 1:0 nebo 1:5) a 50 μ M benzo[a]pyren. M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, Mx – neznámý metabolit BaP, M2 – BaP-4,5-dihydrodiol, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion a M6 – BaP-3-ol. Výsledky v grafu jsou uvedeny jako průměry dvou měření.

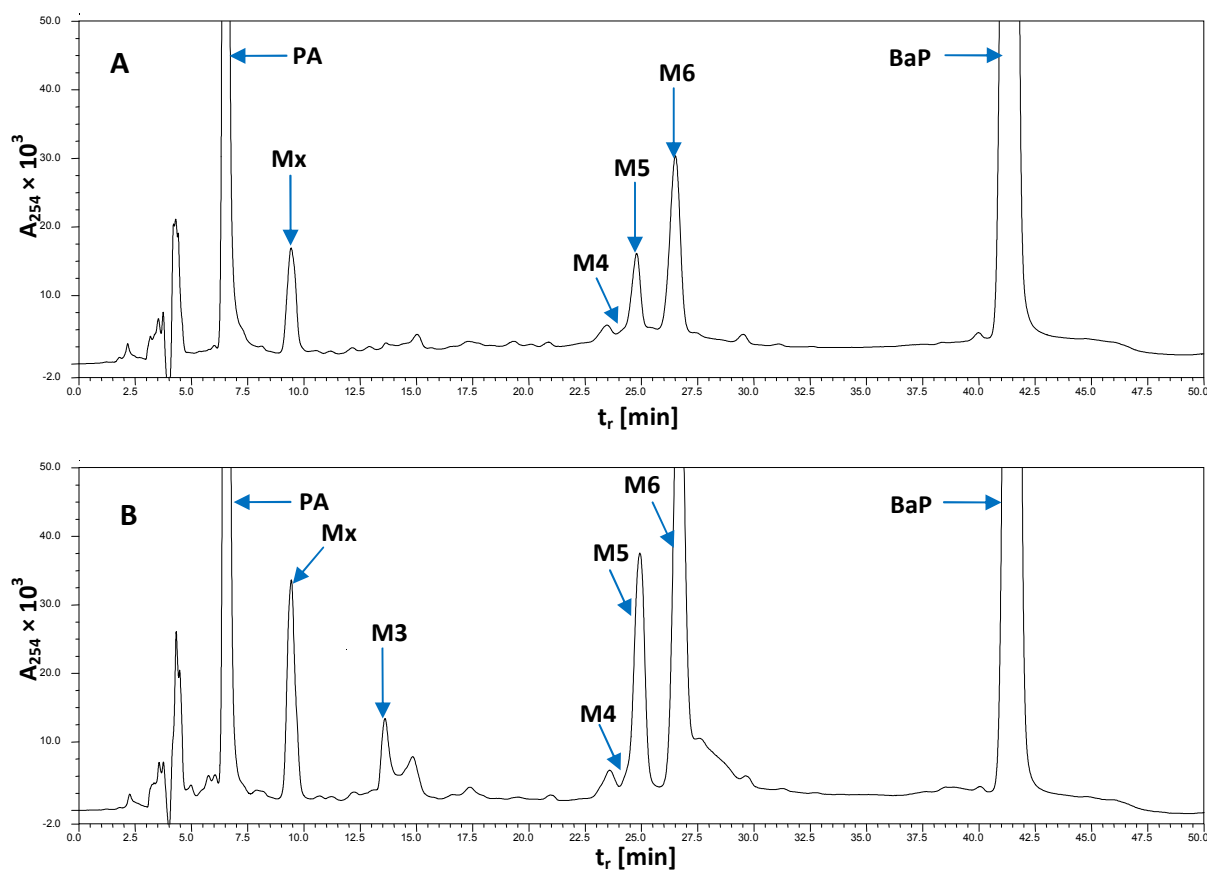
Vlivem cytochromu b_5 došlo k nepatrnému zvýšení účinnosti CYP1A1 v tvorbě metabolitů benzo[a]pyrenu. Množství metabolitů tvořených tímto systémem (t.j. CYP1A1 rekonstituovaným s cytochromem b_5) bylo celkově zvýšeno 1,2krát. V případě prokaryotických systémů (CYP1A1R a CYP1A1LR) byla schopnost metabolizovat benzo[a]pyren srovnatelná za přítomnosti i absence cytochromu b_5 . Přidáním tohoto proteinu k výše zmíněným systémům zároveň nedochází ke změně v poměru tvořených metabolitů benzo[a]pyrenu.

4.2.3 Vliv NADPH:cytochrom P450 reductasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému

Další část diplomové práce se zabývá studiem vlivu NADPH:cytochrom P450 reductasy (CPR) na oxidaci benzo[a]pyrenu CYP1A1LR, tedy lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou CPR. CPR izolovaná z králíčích jater (kap. 4.1) byla rekonstituována s CYP1A1LR v poměru CYP:CPR 1:0,4 –

1:3 postupem popsaným v kap. 3.2.4.3. Vzniklé metabolity benzo[a]pyrenu a benzo[a]pyren byly separovány metodou HPLC. Plochy píků BaP-1,6-dionu (M4) a BaP-3,6-dionu (M5) byly z důvodu nedostatečné separace kvantifikovány dohromady (viz kap. 4.2.2).

Porovnání HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací CYP1A1LR rekonstituovaného s NADPH:cytochrom P450 reduktasou v poměru CYP:CPR 1:0,4 a 1:3 ilustruje Obr. 25 (A a B).

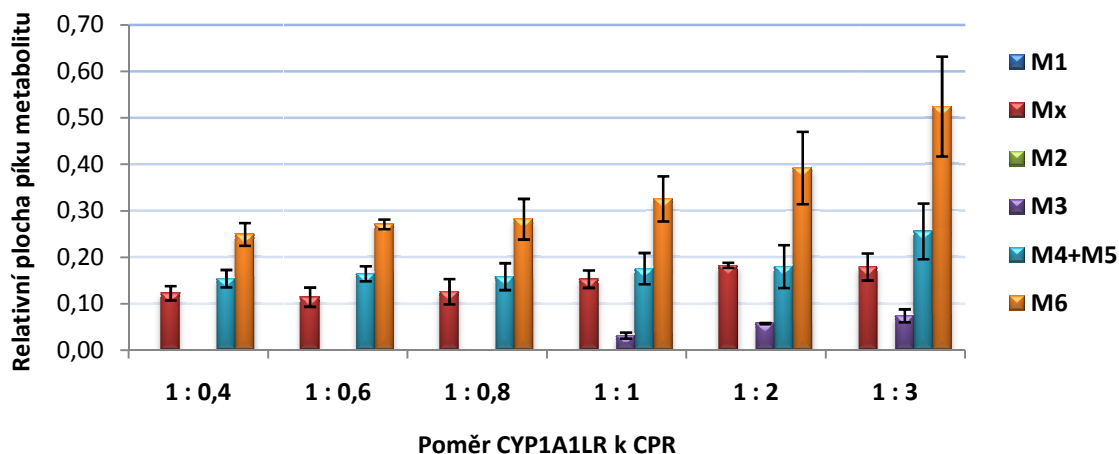


Obr. 25 HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A1LR) rekonstituovaným s NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR) v poměru CYP:CPR 1:0,4 (A) a 1:3 (B)

Podmínky měření: kolona Nucleosil (100-5, C18, 250/4), eluce lineárním gradientem 50 – 85 % acetonitrilu (v/v), A_{254} – absorbance měřená při vlnové délce 254 nm, PA – fenacetin, Mx – neznámý metabolit BaP, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion, M6 – BaP-3-ol, BaP – benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren je tímto systémem metabolizován až na pět metabolitů [Mx, BaP-7,8-dihydrodiol (M3), BaP-1,6-dion (M4), BaP-3,6-dion (M5) a BaP-3-ol (M6)]. V systémech s nižším obsahem CPR, s poměrem CYP:CPR 1:0,4 až 1:0,8, dochází k tvorbě pouze čtyř

metabolitů, a to Mx, BaP-1,6-dionu (M4), BaP-3,6-dionu (M5) a BaP-3-olu (M6). Při vyšší koncentraci CPR (poměr CYP:CPR 1:1 – 1:3) je benzo[a]pyren CYP1A1LR oxidován za vzniku dalšího metabolitu, BaP-7,8-dihydrodiolu (M3), jak ukazuje graf na Obr. 26.



Obr. 26 Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR) na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A1LR)

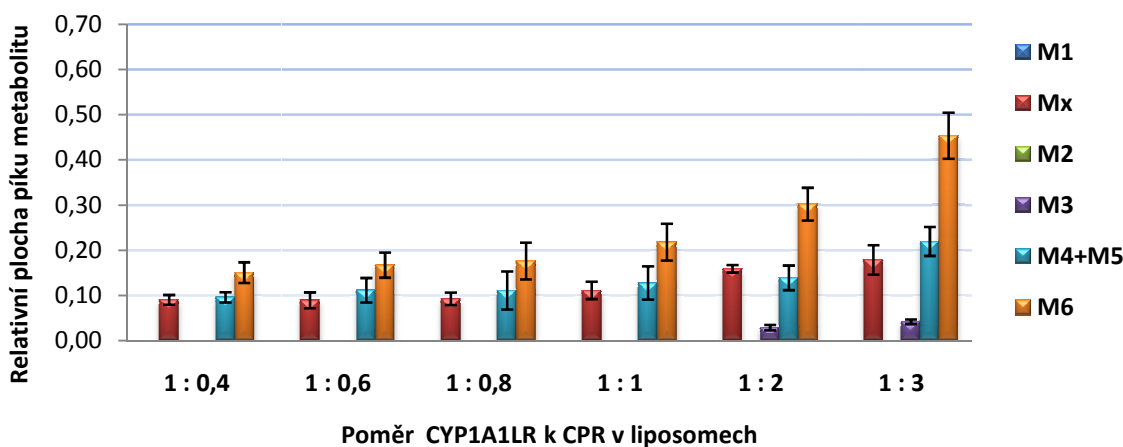
Inkubační směs obsahovala 100 nM CYP1A1LR, 40; 60; 80; 100; 200 nebo 300 nM CPR a 50 μM benzo[a]pyren. M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, Mx – neznámý metabolit BaP, M2 – BaP-4,5-dihydrodiol, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion a M6 – BaP-3-ol. Výsledky v grafu jsou uvedeny jako průměry a směrodatné odchylky čtyř měření.

Se zvyšující se koncentrací NADPH:cytochrom P450 reduktasy se zvyšuje efektivita CYP1A1LR oxidovat benzo[a]pyren. Ten je neúčinněji metabolizován systémem s nejvyšším obsahem CPR, tedy systémem obsahujícím CYP1A1LR k CPR v poměru 1:3. Při použití tohoto systému došlo k nárůstu tvorby všech metabolitů benzo[a]pyrenu oproti systému bez přidané CPR. Tvorba Mx byla zvýšena 1,5krát, BaP-1,6-dionu (M4) a BaP-3,6-dionu (M5) celkem 1,7krát a BaP-3-olu (M6) 2,1krát. Přídavkem různých množství tohoto enzymu k výše zmíněnému systému dochází ke změně poměru a počtu tvořených metabolitů benzo[a]pyrenu.

4.2.4 Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy v liposomech na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému

V další části diplomové práce byla pozornost zaměřena na zkoumání vlivu NADPH:cytochrom P450 reduktasy v prostředí liposomů na oxidaci benzo[a]pyrenu CYP1A1LR. Izolovaná CPR byla rekonstituována s CYP1A1LR a liposomy ve stejném poměru CYP:CPR jako v kap. 4.2.3 postupem popsaným v kap. 3.2.4.4. Vzniklé metabolity benzo[a]pyrenu a benzo[a]pyren byly separovány metodou HPLC. Z důvodu nedostatečné separace píků BaP-1,6-dionu (M4) a BaP-3,6-dionu (M5) byly jejich plochy stejně jako v kap. 4.2.2 kvantifikovány dohromady.

Oxidací benzo[a]pyrenu tímto systémem vzniká až pět jeho metabolitů [Mx, BaP-7,8-dihydrodiol (M3), BaP-1,6-dion (M4), BaP-3,6-dion (M5) a BaP-3-ol (M6)] podobně jako v případě systému rekonstituovaném bez liposomů. Na rozdíl od tohoto systému vzniká BaP-7,8-dihydrodiol (M3) oxidací benzo[a]pyrenu CYP1A1LR v prostředí liposomů až při poměru CYP:CPR 1:2, jak je patrné z grafu na Obr. 27.



Obr. 27 Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR) v liposomech na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A1LR)

Inkubační směs obsahovala 100 nM CYP1A1LR, 40; 60; 80; 100; 200 nebo 300 nM CPR a 50 μ M benzo[a]pyren. M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, Mx – neznámý metabolit BaP, M2 – BaP-4,5-dihydrodiol, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion a M6 – BaP-3-ol. Výsledky v grafu jsou uvedeny jako průměry a směrodatné odchylky šesti měření.

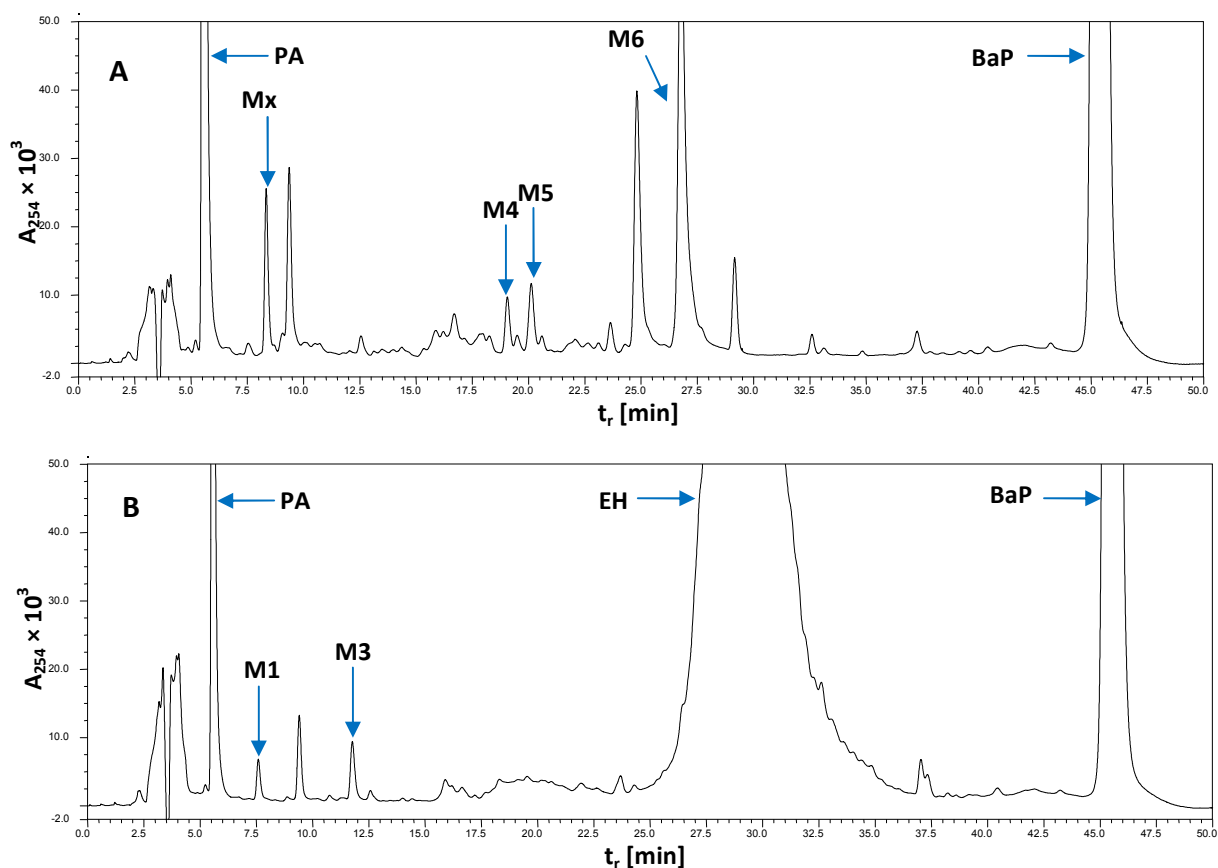
Tendence zvýšené efektivity CYP1A1LR oxidovat benzo[a]pyren se zvyšující se koncentrací CPR zůstala zachována i v systému rekonstituovaném s CPR v liposomech. Také došlo, shodně jako v systému rekonstituovaném bez liposomů, i tady k největšímu nárůstu množství všech tvořených metabolitů benzo[a]pyrenu u systému s poměrem CYP:CPR 1:3. Přitom tvorba Mx byla zvýšena 2krát, BaP-1,6-dionu (M4) a BaP-3,6-dionu (M5) celkem 2,3krát a BaP-3-olu (M6) 3krát oproti systému bez přidané CPR.

Z porovnání množství všech metabolitů benzo[a]pyrenu tvořených CYP1A1LR rekonstituovaným s CPR bez liposomů, a tím samým systémem v prostředí liposomů vyplývá, že vyšší efektivity oxidovat benzo[a]pyren dosahuje systém s absencí liposomů. Avšak při porovnání obou systémů z hlediska nárůstu tvorby jednotlivých metabolitů při vzrůstajícím poměru CYP:CPR vykazuje rychlejší nárůst v tvorbě metabolitů systém rekonstituovaný s liposomy.

4.2.5 Vliv epoxidhydrolasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému

Cílem této části práce bylo zjistit, jaký vliv má epoxidhydrolasa (EH) na oxidaci benzo[a]pyrenu CYP1A1LR. Izolovaná epoxidhydrolasa byla rekonstituována s výše zmíněným systémem v poměru CYP:EH 1:0 a 1:5 postupem popsáním v kap. 3.2.4.5. Vzniklé metabolity benzo[a]pyrenu a benzo[a]pyren byly separovány metodou HPLC.

Porovnání HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací CYP1A1LR rekonstituovaného s epoxidhydrolasou v poměru CYP:EH 1:0 a 1:5 ilustruje Obr. 28.



Obr. 28 HPLC benzo[a]pyrenu a jeho metabolitů vzniklých oxidací cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reductasy bez přítomnosti epoxidhydrolasy (A) a za její přítomnosti (B)

Podmínky měření: kolona Nucleosil HD (100-5, C18, 250/4), eluce lineárním gradientem 50 – 85 % acetonitrilu (v/v), A_{254} – absorbance měřená při vlnové délce 254 nm, PA – fenacetin, M1 – BaP-9,10-dihydrodiol, Mx – neznámý metabolit BaP, M3 – BaP-7,8-dihydrodiol, EH – epoxidhydrolasa nebo jiné látky přítomné v preparátu tohoto enzymu, M4 – BaP-1,6-dion, M5 – BaP-3,6-dion, M6 – BaP-3-ol, BaP – benzo[a]pyren

CYP1A1LR oxiduje za přítomnosti epoxidhydrolasy benzo[a]pyren na dva další metabolity, a to BaP-9,10-dihydrodiol (M1) a BaP-7,8-dihydrodiol (M3), na rozdíl od systému bez tohoto enzymu.

Výsledky tohoto experimentu však nemohly být kvantifikovány z důvodu eluce EH nebo jiných látek přítomných v preparátu tohoto enzymu v retenčních časech metabolitů benzo[a]pyrenu M4 – M6.

5 DISKUSE

Benzo[a]pyren je lidským kancerogenem, který vzniká při nedokonalém spalování organického materiálu. Kromě inhalace znečištěného vzduchu je člověk vystaven účinkům benzo[a]pyrenu i prostřednictvím cigaretového kouře, stravy a rizikových povolání (hlavně z oblasti zpracování uhlí a kamenouhelného dehtu). [27] Genotoxický účinek benzo[a]pyrenu je způsoben tvorbou kovalentních aduktů, které vznikají vazbou aktivovaných metabolitů benzo[a]pyrenu na DNA. Na této metabolické aktivaci se podílejí zejména dva isoenzymy cytochromu P450, a to CYP1A1 a CYP1B1. [6]

Nicméně v nedávné době dospělo několik laboratoří ke spornému výsledku, který ukazuje, že cytochrom P450 1A1 hraje *in vivo* důležitější roli v detoxifikaci benzo[a]pyrenu než v jeho aktivaci, která byla zjištěna *in vitro* [77, 4, 3]. Aby mohlo být takové zjištění řádně vysvětleno, je nezbytné problematiku metabolismu benzo[a]pyrenu jak *in vivo*, tak i *in vitro* znovu detailně prostudovat. Předkládaná diplomová práce navazuje na výsledky získané z předchozích studií, které se touto problematikou zabývaly. [39]

V předkládané diplomové práci byl studován metabolismus benzo[a]pyrenu enzymy mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí *in vitro*. Ke studiu metabolismu tohoto kancerogenu bylo použito několik modelových enzymových systémů. Vedle studie využívající potkaní mikrosomální systémy, ve kterých byly indukovány jednotlivé formy cytochromů P450, byl použit i lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v eukaryotickém a prokaryotickém systému. V rámci těchto rekombinantních enzymových systémů cytochromu P450 1A1 pak byl zkoumán vliv dalších enzymů lokalizovaných v membránách endoplasmatického retikula na oxidaci benzo[a]pyrenu.

K separaci metabolitů vzniklých oxidací benzo[a]pyrenu výše uvedenými enzymovými systémy bylo použito metody HPLC vyvinuté RNDr. Michaelou Moserovou, Ph.D. [40] s kolonou Nucleosil (100-5, C18, 250/4).

Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných induktory cytochromů P450

Prvními enzymovými systémy, které byly použity ke studiu oxidace benzo[a]pyrenu, byly jaterní mikrosomy izolované z potkanů, kterým byly podávány induktory cytochromů P450. Byl sledován vliv premedikace potkanů Sudanem I (který indukuje CYP1A),

fenobarbitalem (PB, který indukuje CYP2B a CYP2C), pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN, který indukuje CYP3A) a ethanolem (který indukuje CYP2E1).

Všechny výše uvedené mikrosomální systémy, ve kterých byly indukovány jednotlivé formy cytochromů P450, přeměňují benzo[a]pyren na šest metabolitů (BaP-9,10-dihydrodiol, BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion a BaP-3-ol). Totožné metabolity benzo[a]pyrenu byly zjištěny a identifikovány v disertační práci RNDr. Michaely Moserové Ph.D. [39], ale i v dřívějších studiích [55, 22, 6, 56]. V prvních dvou studiích byly navíc identifikovány další dva metabolity benzo[a]pyrenu (BaP-6,12-dion a BaP-9-ol).

Nejefektivněji přeměňovaly benzo[a]pyren mikrosomy izolované z potkanů premedikovaných Sudanem I, což potvrzuje, že benzo[a]pyren je nejvýznamněji metabolizován cytochromy P450 podrodiny 1A, jak prokázaly i předchozí studie [6, 39]. Kromě této podrodiny cytochromů P450 se na přeměně benzo[a]pyrenu pravděpodobně podílejí i některé formy cytochromů P450 podrodiny 2B a 2C, případně podrodiny 3A, což prokázal vznik většího množství (oproti kontrole) např. BaP-4,5-dihydrodiolu a BaP-3,6-dionu v mikrosomech potkanů indukovaných fenobarbitalem a vznik většího množství (oproti kontrole) BaP-3,6-dionu v mikrosomech potkanů indukovaných PCN. Z toho vyplývá, že cytochromy P450 podrodiny 2B a 2C i 3A sice benzo[a]pyren metabolizují, ale pouze na některé jeho metabolity. Mikrosomy potkanů premedikovaných ethanolem katalyzovaly oxidaci benzo[a]pyrenu se stejnou efektivitou jako mikrosomy kontrolních potkanů, z čehož vyplývá, že se cytochrom P450 2E1 na metabolismu benzo[a]pyrenu nepodílí.

V této diplomové práci jsme se dále zaměřili na cytochrom P450 1A1. Ten je vedle cytochromů P450 1A2 a 1B1 majoritním isoenzymem, který katalyzuje oxidaci benzo[a]pyrenu [6].

Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému

Oxidace benzo[a]pyrenu byla dále studována pomocí rekombinantního lidského cytochromu P450 1A1, který byl exprimován v eukaryotickém a prokaryotickém systému.

Eukaryotický expresní systém byl tvořen mikrosomy izolovanými z hmyzích buněk, které byly transfekované Baculovirem nesoucím cDNA lidského cytochromu P450 1A1 a lidské NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Na rozdíl od výše uvedených potkaních

mikrosomů, vzniká oxidací benzo[a]pyrenu katalyzovanou tímto enzymovým systémem další (neznámý) metabolit, Mx, a zároveň se netvoří BaP-4,5-dihydrodiol. Ostatní tvořené metabolity benzo[a]pyrenu jsou shodné. Totožné metabolity benzo[a]pyrenu (kromě neznámého metabolitu, Mx) byly zjištěny i v práci Bauera a kol. [8], ve které byla navíc identifikována tvorba dalšího metabolitu benzo[a]pyrenu, a to BaP-9-olu. Předpokládáme, že BaP-4,5-dihydrodiol, který v organismu vzniká z BaP-4,5-epoxidu hydrolýzou katalyzovanou epoxidhydrolasou [21], se netvoří, protože epoxidhydrolasa přítomná v hmyzích buňkách se pravděpodobně liší od savčí (v tomto případě potkaní) epoxidhydrolasy. Struktura neznámého metabolitu benzo[a]pyrenu nebyla dosud určena, důvod jeho vzniku jsme tedy prozatím nehodnotili.

Prokaryotický systém byl tvořen „zlomky“ membrán *E. coli*, které byly transfekované jedním či dvěma plasmidy nesoucími cDNA stejných lidských enzymů jako v případě eukaryotického systému, tedy cytochromu P450 1A1 a NADPH:cytochrom P450 reductasy. V práci jsme používali dva typy tohoto enzymového systému, a to s vyšší a nižší aktivitou „ko-exprimované“ lidské reductasy. Jelikož v tomto systému není přítomná epoxidhydrolasa z důvodu absence membránových organel, nedochází při oxidaci benzo[a]pyrenu k tvorbě dihydrodiolů benzo[a]pyrenu, konkrétně nevzniká BaP-9,10-dihydrodiol a BaP-7,8-dihydrodiol. Ostatní metabolity benzo[a]pyrenu jsou shodné s metabolity vznikajícími oxidací benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému, včetně neznámého metabolitu Mx.

Vliv cytochromu b₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém a prokaryotickém systému

Dále byla pozornost zaměřena na zkoumání vlivu cytochromu b₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným jak v eukaryotickém, tak i prokaryotickém systému. Cytochrom b₅, fakultativní složka MFO systému, ovlivňuje přenos elektronů řady oxidačních reakcí katalyzovaných cytochromy P450. [59]. Sledovali jsme, zda tento protein může nějakým způsobem ovlivnit oxidaci benzo[a]pyrenu výše uvedenými enzymovými systémy. V experimentech bylo zjištěno, že množství i poměr všech metabolitů vznikajících oxidací benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém i prokaryotickém systému jsou srovnatelné za přítomnosti i absence cytochromu b₅. Přidání cytochromu b₅ tedy oxidaci benzo[a]pyrenu oběma enzymovými systémy nijak významně neovlivňuje.

Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému

V další části práce byl hodnocen vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou reduktasy. NADPH:cytochrom P450 reduktasa je součástí MFO systému, ve kterém katalyzuje transport elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromů P450 [70]. Zajišťuje přitom správnou funkci cytochromu P450 v metabolismu xenobiotik.

Zajímalo nás, zda bude efektivita výše uvedeného enzymového systému oxidovat benzo[a]pyren ovlivněna množstvím přidávané NADPH:cytochrom P450 reduktasy. V experimentech byl proto tento enzymový systém rekonstituován s výše uvedenou reduktasou v šesti poměrech (tj. CYP:CPR 1:0,4 – 1:3), přičemž bylo zjištěno, že se zvyšujícím se množstvím přidávané reduktasy dochází k nárůstu tvorby všech metabolitů benzo[a]pyrenu. Nejvýraznější nárůst byl přitom pozorován u BaP-1,6-dionu a BaP-3,6-dionu (celkem 1,7krát) a BaP-3-olu (2,1krát), tedy u metabolitů benzo[a]pyrenu, které jsou jeho detoxifikačními produkty. Zvyšující se množství přidávané reduktasy k uvedenému enzymovému systému tedy zvyšuje jeho efektivitu oxidovat benzo[a]pyren v hodnocených poměrech (t.j. CYP:CPR 1:0,4 – 1:3). Vzhledem k tomuto trendu by bylo vhodné dále otestovat rekonstituované systémy s vyšším poměrem CYP:CPR.

Od poměru CYP:CPR 1:1 výše vznikal navíc jeden metabolit benzo[a]pyrenu, a to BaP-7,8-dihydrodiol, který je po další oxidaci katalyzované cytochromy P450 odpovědný za tvorbu kovalentních aduktů s DNA, a tedy kancerogenitu benzo[a]pyrenu [6, 83]. Pro vznik tohoto metabolitu při vyšších poměrech cytochromu P450 a reduktasy zatím nemáme řádné vysvětlení. Jednou z hypotéz je možná přítomnost malého množství epoxidhydrolasy v membránách *E. coli*, která v kombinaci s vyšším obsahem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (v tomto případě při poměru CYP:CPR 1:1 – 1:3), umožňuje vznik BaP-7,8-dihydrodiolu. Tento jev bude předmětem dalšího výzkumu.

Stejně hodnocení vlivu NADPH:cytochrom P450 reduktasy bylo dále provedeno ve výše uvedeném rekonstituovaném systému při přidání liposomů. Liposomy byly použity vzhledem k tomu, že simulují prostředí membrány endoplasmatického retikula. Ta pak může diktovat optimální terciární strukturu tohoto enzymu. Přidání NADPH:cytochrom P450 reduktasy v liposomech zvyšuje efektivitu lidského cytochromu P450 1A1 exprimovaného v prokaryotickém systému oxidovat benzo[a]pyren podobně, jako

v systému rekonstituovaném s reduktasou bez liposomů. Množství metabolitů vznikajících v systémech s liposomy je však nižší než v systémech bez liposomů, efektivita oxidace je zde tedy nižší. Z těchto výsledků vyplývá, že uspořádání exprimovaného lidského cytochromu P450 1A1 a jeho reduktasy v membráně *E. coli* (prokaryotickém systému) je podobné uspořádání těchto enzymů v membráně endoplasmatického retikula eukaryotických buněk.

Se zvyšujícím se množstvím NADPH:cytochrom P450 reduktasy však roste efektivita oxidace benzo[a]pyrenu, a tedy i množství jeho metabolitů rychleji než v systému bez liposomů. Vzhledem k tomuto trendu by bylo vhodné v další práci analyzovat efektivitu rekonstituovaných systémů s vyšším obsahem reduktasy. Ke vzniku BaP-7,8-dihydrodiolu také dochází, ale až od poměru CYP:CPR 1:2.

Vliv epoxidhydrolasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému

V další části práce byl zkoumán vliv epoxidhydrolasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší aktivitou NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Epoxidhydrolasa je enzym lokalizovaný v membráně endoplasmatického retikula, kde katalyzuje jednu z reakcí nezbytnou pro metabolismus benzo[a]pyrenu, a to přeměnu BaP-epoxidu na BaP-dihydrodiol [21]. Přidání tohoto enzymu do výše uvedeného enzymového systému vedlo podle očekávání ke vzniku dihydrodiolů benzo[a]pyrenu, konkrétně BaP-9,10-dihydrodiolu a BaP-7,8-dihydrodiolu. Z uvedeného vyplývá, že prokaryotický systém tvořený „zlomky“ membrán *E. coli* je schopný vytvořit s epoxidhydrolasou funkční komplex, který umožňuje katalýzu výše uvedené hydrolytické reakce.

6 ZÁVĚR

Z výsledků předkládané diplomové práce vyplývá, že stanovené cíle byly splněny. Získány byly následující výsledky:

- ✓ Jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A (Sudanem I), podrodiny 2B (fenobarbitalem) a podrodiny 3A (pregnenolon-16 α -karbonitrilem) vykazují vyšší efektivitu oxidovat benzo[a]pyren než mikrosomy kontrolních potkanů.
- ✓ Benzo[a]pyren je oxidován lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému na šest metabolitů (BaP-9,10-dihydrodiol, metabolit BaP s dosud neurčenou strukturou, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-3-ol).
- ✓ Lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému katalyzuje oxidaci benzo[a]pyrenu pouze na čtyři metabolity (metabolit BaP s dosud neurčenou strukturou, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-3-ol).
- ✓ Cytochrom b₅ nemá významný vliv na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém i prokaryotickém systému.
- ✓ Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému je ovlivněna přidáním izolované NADPH:cytochrom P450 reductasy. Nejvyšší efektivitu oxidovat benzo[a]pyren přitom vykazuje systém rekonstituovaný v poměru CYP:CPR 1:3, t.j. s nejvyšším obsahem reductasy. Při poměru CYP:CPR 1:1 katalyzuje lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému oxidaci benzo[a]pyrenu za tvorby dalšího metabolitu, a to BaP-7,8-dihydrodiolu.
- ✓ Lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému rekonstituovaném s NADPH:cytochrom P450 reductasou v prostředí liposomů vykazuje v hodnocených poměrech cytochromu P450 a reductasy nižší efektivitu oxidace benzo[a]pyrenu než systém rekonstituovaný bez liposomů.
- ✓ V přítomnosti epoxidhydrolasy katalyzuje lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému oxidaci benzo[a]pyrenu za tvorby dvou dalších metabolitů, a to BaP-9,10-dihydrodiolu a BaP-7,8-dihydrodiolu.

Získané výsledky přispívají k poznání metabolismu benzo[a]pyrenu lidskými cytochromy P450 exprimovanými v modelových eukaryotických a prokaryotických expresních systémech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Aimová, D.; Poljaková, J.; Kotrbová, V.; Moserová, M.; Frei, E.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: *Interdiscip. Toxicol.* 1, 160-168 (2008).
2. Anzenbacher, P. A.; Anzenbacherová, E.: *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 737-747 (2001).
3. Arlt, V. M.; Poirier, M. C.; Sykes, S. E.; John, K.; Moserová, M.; Stiborová, M.; Wolf, C. R.; Henderson, C. J.; Phillips, D. H.: *Toxicol. Lett.* 213, 160-166 (2012).
4. Arlt, V. M.; Stiborová, M.; Henderson, C. J.; Thiemann, M.; Frei, E.; Aimová, D.; Singh, R.; Gamboa da Costa, G.; Schmitz, O. J.; Farmer, P. B.; Wolf, C. R.; Phillips, D. H.: *Carcinogenesis* 29, 656-665 (2008).
5. Arlt, V. M.; Stiborová, M.; Hewer, A.; Schmeiser, H. H.; Phillips, D. H.: *Cancer Res.* 63, 2752-2761 (2003).
6. Baird, W. M.; Hooven, L. A.; Mahadevan, B.: *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106-114 (2005).
7. Barnes, H. J.; Arlotto, M. P.; Waterman, M. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5597-5601 (1991).
8. Bauer, E.; Guo, Z.; Ueng, Y. F.; Bell, L. C.; Zeldin, D.; Guengerich F. P.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 136-142 (1995).
9. Cavalieri, E. L.; Rogan, E. G.: *Xenobiotica* 25, 677-688 (1995).
10. Clarke, T. A.; Im, S. C.; Bidwai, A.; Waskell, L.: *J. Biol. Chem.* 279, 36809-36818 (2004).
11. Cook, J. W.; Hewett, C. L.; Hieger, I.: *J. Chem. Soc.* 395, 1-3 (1933).
12. Danielson, P. B.: *Curr. Drug Metab.* 3, 561-597 (2002).
13. Delescluse, C.; Lemaire, G.; de Sousa, G.; Rahmani, R.: *Toxicology* 153, 73-82 (2000).
14. Dignam, J. D.; Strobel, H. W.: *Biochemistry* 16, 1116-1123 (1977).
15. Dong, J.; Porter, T. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 254-259 (1996).
16. Fang, A. H.; Smith, W. A.; Vouros, P.; Gupta, R. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 383-389 (2001).
17. Flesher, J. W.; Horn, J.; Lehner, A. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 554-558 (1997).
18. Friedberg, T.; Pritchard, M. P.; Bandera, M.; Hanlon, S. P.; Yao, D.; McLaughlin, L. A.; Ding, S.; Burchell, B.; Wolf, C. R.: *Drug Metab. Rev.* 31, 523-544 (1999).

19. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958).
20. Grinstead, G. F.; Gaylor, J. L.: *J. Biol. Chem.* 257, 13937-13944 (1982).
21. Holder, G.; Yagi, H.; Dansette, P.; Jerina, D. M.; Levin, W.; Lu A. Y. H.; Conney, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4356-4360 (1974).
22. Hundley, S. G.; Freudenthal, R. I.: *Cancer Res.* 37, 3120-3125 (1977).
23. Hussain, S. P.; Harris, C. C.: *Cancer Res.* 58, 4023-4037 (1998).
24. Chakravarti, D.; Venugopal, D.; Mailander, P. C.; Meza, J. L.; Higginbotham, S.; Cavalieri, E. L.; Rogan, E. G.: *Mutat. Res.* 649, 161-178 (2008).
25. Chromá, L.; Macková, M.; Macek, T.; Martínek, V.; Stiborová, M.: *Chem. Listy* 95, 212-222 (2001).
26. Chun, Y. J.; Shimada, T.; Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 48-58 (1996).
27. International Agency for Research on Cancer: *Benzo[a]pyrene* [online] 2010 [cit. 23.4.2013]. Dostupné na:
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf>
28. International Agency for Research on Cancer: *IARC Monographs – Classifications* [online] 10.4.2013 [cit. 23.4.2013] Dostupné na:
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
29. Jacob, J.; Seidel, A.: *J. Chromatogr. B* 778, 31-47 (2002).
30. Ječmen, T.: *Diplomová práce*, PŘF UK, Praha (2010).
31. Jerina, D. M.; Wei, S. J. C.; Chang, R. L.; Merkler, K. A.; Gwynne, M.; Cui, X. X.; Murthy, B.; Huang, M. T.; Xie, J. G.; Lu, Y. P.; Lou, Y. R.; Conney, A. H.: *Carcinogenesis* 20, 1689-1696 (1999).
32. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386 (1958).
33. Kotrbová, V.: *Doktorská disertační práce*, PŘF UK, Praha (2008).
34. Kotrbová, V.; Aimová, D.; Ingr, M.; Bořek-Dohalská, L.; Martínek, V.; Stiborová, M.: *Protein Expr. Purif.* 66, 203-209 (2009).
35. Laemmli, U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
36. Mass, M. J.; Ross, J. A.; Jeffers, A. J.; Nelson, G.; Galati, A. J.; Stoner, G. D.: *Mol. Carcinog.* 8, 186-192 (1993).
37. Melendez-Colon, V. J.; Luch, A.; Seidel, A.; Baird, W. M.: *Carcinogenesis* 20, 1885-1891 (1999).
38. Miller, E. C.; Miller, J. A.: *Cancer* 47, 2327-2345 (1981).

39. Moserová, M.: *Disertační práce*, PřF UK, Praha (2011).
40. Moserová, M.; Kotrbová, V.; Aimová, D.; Šulc, M.; Frei, E.; Stiborová, M.: *Interdiscip. Toxicol.* 2, 239-244 (2009).
41. Mrázová, B.: *Doktorská disertační práce*, PřF UK, Praha (2010).
42. Nebert, D. W.; Adesnik, M.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gonzales, F. J.; Guengerich, F. P.; Gunsalus, I. C.; Johnson, E. F.; Kemper, B.; Levin, W.; Phillips, I. R.; Sato, R.; Waterman, M. R.: *DNA* 6, 1-11 (1987).
43. 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.; Phillips, I. R.; Sato, R.; Waterman, M. R.: *DNA* 8, 1-13 (1989).
44. Nelson, D. R.: *Cytochrome P450s in humans* [online] 4.2.2009 [cit. 15.4.20013]. Dostupné na: <http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf>
45. Omura, T.; Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 (1964).
46. Paltauf, F.; Prough, R. A.; Masters, B. S. S.; Johnston, J. M.: *J. Biol. Chem.* 249, 2661-2662 (1974).
47. Parikh, A.; Guengerich, F. P.: *Protein Expr. Purif.* 9, 346-354 (1997).
48. Petruželka, L.; Konopásek, B.; Aschermannová, A.; Helmichová, E.; Janků, F.; Kleibl, Z.; Mališ, J.; Mareš, P.; Novotný, J.; Příbylová, O.; Špička, I.; Tesařová, P.: *Klinická onkologie* Praha: Karolinum (2003); s. 9-30; ISBN 80-246-0395-0.
49. Porter, T. D.; Larson, J. R.: *Methods Enzymol.* 206, 108-116 (1991).
50. Porter, T. D.; University of Kentucky: Enzymology of cytochrome P450 reductase [online] 27.11.2001 [cit. 9.4.2013]. Dostupné na: http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm
51. Pott, P.: *Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum* (1775) v *CA Cancer J. Clin.* 24, 110-116 (1974).
52. Pritchard, M. P.; Ossetian, R.; Li, D. N.; Henderson, C. J.; Burchell, B.; Wolf, C. R.; Friedberg, T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 345, 342-354 (1997).
53. Rous, P.: *J. Exp. Med.* 4, 397-411 (1911).
54. Ruggeri, B.; DiRado, M.; Zhang, S. Y.; Bauer, B.; Goodrow, T.; Klein-Szanto, A. J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1013-1017 (1993).
55. Selkirk, J. K.; Croy, R. G.; Gelboin, H. V.: *Science* 184, 169-171 (1974).
56. Shimada, T.: *Drug Metab. Pharmacokinet.* 4, 257-276 (2006).

57. Shimada, T.; Oda, Y.; Gillam, E. M.; Guengerich, F. P.; Inoue, K.: *Drug Metab. Dispos.* 29, 1176-1182 (2001).
58. Schenkman, J. B.; Jansson, I.: *Drug Metab. Rev.* 31, 351-364 (1999).
59. Schenkman, J. B.; Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152 (2003).
60. Schroer, K.; Kittelmann, M.; Lütz, S.: *Biotechnol. Bioeng.* 106, 699-706 (2010).
61. Sokolenko, S.; George, S.; Wagner, A.; Tuladhar, A.; Andrich, J. M.; Aucoin, M. G.: *Biotechnol. Adv.* 30, 766-781 (2012).
62. Sottocasa, G. L.; Kuylenstierna, B.; Ernster, L.; Bergstrand, A.: *J. Cell. Biol.* 32, 415-438 (1967).
63. Stiborová, M.: *Chem. Listy* 96, 784-791 (2002).
64. Stiborová, M.: *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismů působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace* [online] [cit. 19.5.2013]. Dostupné na:
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>
65. Stiborová, M.: *Xenobiochemie* [přednáška] PŘF UK, Praha (2012).
66. Stiborová, M.; Asfaw, B.; Frei, E.; Schmeiser, H. H.; Wiessler, M.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 489-498 (1995).
67. Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H. H.; Wiessler, M.; Hradec, J.: *Carcinogenesis* 11, 1843-1848 (1990).
68. Stiborová, M.; Frei, E.; Wiessler, M.; Schmeiser, H. H.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1128-1137 (2001).
69. Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E.: *Chem. Listy* 93, 229-237 (1999).
70. Stiborová, M.; Hudeček, J.; Páca Jr., J.; Martínek, V.; Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004).
71. Stiborová, M.; Mikšanová, M.: *Živa* 4, 146 (1999).
72. Stratil, P.; Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379-387 (2004).
73. Šulc, M.: *Disertační práce*, PŘF UK, Praha (2002).
74. The SCOP and ASTRAL authors: *Structural Classification of Proteins and ASTRAL release 1.75B* [online] 1.2013 [cit. 9.4.2013]. Dostupné na:
<http://scop.berkeley.edu/sunid=94963>
75. The SCOP and ASTRAL authors: *Structural Classification of Proteins and ASTRAL release 1.75B* [online] 1.2013 [cit. 9.4.2013]. Dostupné na:
<http://scop.berkeley.edu/sunid=41084>

76. Ueng, T. H.; Hwang, W. P.; Chen, R. M.; Wang, H. W.; Kuo, M. L.; Park, S. S.; Guengerich, F. P.: *J. Toxicol. Environ. Health* 54, 509-527 (1998).
77. Uno, S.; Dalton, T. P.; Derkenne, S.; Curran, C. P.; Miller, M. L.; Shertzer, H. G.; Nebert, D. W.: *Mol. Pharmacol.* 65, 1225-1237 (2004).
78. Vergères, G.; Waskell, L.: *Biochimie* 77, 604-620 (1995).
79. Wang, M.; Roberts, D. L.; Paschke, R.; Shea, T. M.; Masters, B. S. S.; Kim, J. J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411-8416 (1997).
80. Waxman, D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 11-23 (1999).
81. White, R. D.; Shea, D.; Solow, A. R.; Stegeman, J. J.: *Biochem. Pharmacol.* 53, 1029-1040 (1997).
82. Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D.: *Anal. Biochem.* 175, 231-237 (1988).
83. Xue, W.; Warshawsky, D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73-93 (2005).
84. Yang, M. X.; Cederbaum, A. I.: *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 438-444 (1994).
85. Yasukochi, Y.; Peterson, J. A.; Masters, B. S.: *J. Biol. Chem.* 254, 7097-7104 (1979).
86. Yun, C. H.; Yim, S. K.; Kim, D. H.; Ahn, T.: *Curr. Drug Metab.* 7, 411-429 (2006).
87. Zhang, J.; Falany, J. L.; Xie, X.; Falany, C. N.: *Chem. – Biol. Interact.* 124, 133-147 (2000).

Souhlas s použitím práce

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