

3445

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Oxidace protinádorového léčiva ellipticinu cytochromy P450 3A a 2B

Diplomová práce

Lucie Svobodová

školitelka: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2007

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

V Praze dne 17. dubna 2007

Svobodová Lucie
.....

Lucie Svobodová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, všestrannou pomoc a laskavý přístup při vypracovávání této práce.

Děkuji celému kolektivu laboratoře, zejména RNDr. Věře Kotrbové za pomoc, potřebné rady, trpělivost a za vytvoření příjemného pracovního prostředí, dále RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. za hmotnostní analýzy a také celé své rodině za pomoc a podporu při studiu.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1 ÚVOD	7
1.1 Karcinogenese	7
1.1.1 Nádorová onemocnění a podstata jejich vzniku	7
1.1.2 Karcinogenní faktory	9
1.2 Léčba nádorových onemocnění	10
1.2.1 Chemoterapie	11
1.2.2 Farmakokinetika cytostatik	12
1.2.3 Mechanismus protinádorového účinku cytostatik	13
1.3 Biotransformace xenobiotik	14
1.3.1 I. fáze biotransformace xenobiotik (derivatizační fáze)	16
1.3.2 II. fáze biotransformace xenobiotik (konjugační fáze)	16
1.4 Mikrosomální monooxygenasový systém	17
1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reductasa	18
1.4.2 Cytochrom P450	18
1.4.2.1 Enzymové funkce cytochromu P450	20
1.4.2.2 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce	21
1.4.2.3 Názvosloví cytochromů P450	22
1.4.3 Cytochrom b ₅	22
1.4.3.1 Mechanismus působení cytochromu b ₅	23
1.4.3.2 Vliv cytochromu b ₅ na reakce katalyzované MFO systémem	24
1.5 Ellipticin	24
1.5.1 Biotransformace ellipticinu	25
1.5.2 Mechanismus účinku ellipticinu	25
1.5.3 Tvorba kovalentních aduktů s DNA	26
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	28
3 MATERIÁL A METODY	29
3.1 Použitý materiál a chemikálie	29
3.2 Použité přístroje	31
3.3 Metody	32

3.3.1 Analytické metody	32
3.3.1.1 Stanovení koncentrace proteinu	32
3.3.1.1.1 Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA	32
3.3.1.2 Stanovení obsahu cytochromu P450.....	32
3.3.1.3 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy.....	33
3.3.1.4 Stanovení koncentrace cytochromu b ₅	34
3.3.2 Elektromigrační metody.....	35
3.3.2.1 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	35
3.3.2.1.1 Příprava polyakrylamidového gelu.....	35
3.3.2.1.2 Příprava vzorků pro elektroforesu.....	36
3.3.2.1.3 Vlastní elektroforesa	36
3.3.3 Isolace cytochromu P450 2B4, NADPH:CYP reductasy a cytochromu b ₅ 36	
3.3.3.1 Premedikace králíka domácího fenobarbitalem (PB)	36
3.3.3.2 Isolace mikrosomální frakce	36
3.3.3.3 Solubilisace	38
3.3.3.4 Chromatografické metody	38
3.3.3.4.1 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B I.....	38
3.3.3.4.2 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (HAPI).....	39
3.3.3.4.3 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (HAPII).....	40
3.3.3.4.4 Rechromatografie na koloně hydroxylapatitu (HAPIII).....	41
3.3.3.4.5 Chromatografie NADPH:CYP reductasy na koloně 2', 5'ADP-Sepharosy 4B.....	41
3.3.3.4.6 Chromatografie cytochromu b ₅ na koloně DEAE-Sepharosy CL6B II.....	42
3.3.4 Studium oxidace ellipticinu cytochromy P450	43
3.3.4.1 Studium oxidace ellipticinu izolovanými králičími cytochromy P450 3A6 a 2B4.....	43
3.3.4.1.1 Příprava rekonstituovaného systému.....	43
3.3.4.1.1.1 Vliv koncentrace CYP na oxidaci ellipticinu	43
3.3.4.1.1.2 Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu.....	44
3.3.4.1.2 Inkubace ellipticinu s rekonstituovaným systémem	45
3.3.4.2 Studium oxidace ellipticinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 a 2B6	46
3.3.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	47
3.3.6 Hmotnostní spektrometrie MALDI –TOF	47
4 VÝSLEDKY.....	48
4.1 Isolace cytochromu P450 2B4, NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅48	
4.1.1 Isolace mikrosomální frakce	50

4.1.2	Solubilizace.....	50
4.1.3	Chromatografie mikrosomálních proteinů na koloně DEAE-Sepharosy CL6B I.....	50
4.1.4	Chromatografie cytochromu P450 2B4 na koloně hydroxylapatitu I.....	55
4.1.5	Chromatografie cytochromu P450 2B4 na koloně hydroxylapatitu II.....	58
4.1.6	Rechromatografie cytochromu P450 2B4 na koloně hydroxylapatitu III...	60
4.1.7	Chromatografie NADPH:cytochrom P450 reduktasy na koloně 2',5' ADP- Sepharosy	62
4.1.8	Chromatografie cytochromu b ₅ na koloně DEAE-Sepharosy CL6B II	63
4.1.9	Identifikace finálních preparátů izolace	66
4.2	Oxidace ellipticinu králičími cytochromy P450 3A6 a 2B4	68
4.2.1	Oxidace ellipticinu králičím cytochromem P450 3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou.....	69
4.2.2	Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou	71
4.2.3	Oxidace ellipticinu králičím cytochromem P450 2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou	73
4.2.4	Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou	74
4.3	Oxidace ellipticinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 a 2B6.....	76
4.3.1	Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 3A4....	76
4.3.2	Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 3A4.....	78
4.3.3	Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 2B6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou	80
4.3.4	Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2B6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou	81
5	DISKUSE	83
6	SHRUTÍ A ZÁVĚR.....	87
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	89

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2',5' ADP-Sepharosa 4B	2',5'adenosyldifosfát-Sepharosa 4B
AIDS	syndrom získané imunodeficiency (acquired immune deficiency syndrom)
a_{red}	aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
ATP	adenosin trifosfát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
c (c_p)	koncentrace (koncentrace proteinu)
CYP	cytochrom P450
cyt b₅	cytochrom b ₅
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
DEAE-Sepharosa CL6B	diethylaminoethyl-Sepharosa CL6B
DLPC	dilauroylfosfatidylcholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EC	číselný kód enzymu
EDTA Na₂	ethylen diamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli
FAD /FADH/FADH₂	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma) /semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN /FMNH/FMNH₂	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma) /semichinoidní radikál/hydrochinon
HAP	hydroxylapatit
HEPES	sodná sůl 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny
HIV	human imunodeficiency virus
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
l	optická dráha kyvety
M	mol/l
M1-M5	metabolity ellipticinu
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function)

	oxygenases)
NAD⁺ (NADH)	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
P1, AP1, HP1,(2,3,...)	DP1, pufr číslo 1 (2,3,...)
P450	pigment a maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
PAPS	2' (nebo 3')-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PB	fenobarbital
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný produkt
R[•]OOH	organický peroxid
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-ELFO	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
sm	směrnice závislosti absorbance na čase
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	standardní jednotka enzymové aktivity
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
ε	molární absorpční koeficient
ΔA	změna absorbance
Δt	změna času
λ	vlnová délka

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění bývají často označována jako civilizační choroby. Víme však již z archeologických nálezů, že nádorová onemocnění se vyskytovala prakticky vždy. Vzhledem k tomu, že nejvýznamnějším rizikovým faktorem při vzniku většiny nádorů je věk, je tedy zcela zřejmé, proč se nádorová onemocnění stala problémem až posledních 50 let^[1], neboť došlo díky zlepšující se zdravotní a sociální péči k výraznému prodloužení života. Doba potřebná k nahromadění kritického počtu genetických změn nutných pro propuknutí rakovinného procesu dosahuje s prodlužujícím se věkem svého optima^[2].

Tato civilizační choroba navíc postihuje stále nižší věkové ročníky. Je to dáno, oproti minulosti, zásadně odlišnou skladbou potravy, která obsahuje převahu cukrů a tuků, ale také stresem a kontaminací složek životního prostředí látkami s karcinogenním účinkem. Nevhodná strava a karcinogeny přítomné ve vodě, ovzduší a potravě způsobují, že se tvoří vyšší počet jednotlivých nádorových buněk, než je pro organismus přirozené. Imunitní systém, který může být stresem a polutanty oslaben, pak není schopen na tuto situaci dostatečně zareagovat^[3].

1.1 Karcinogenese

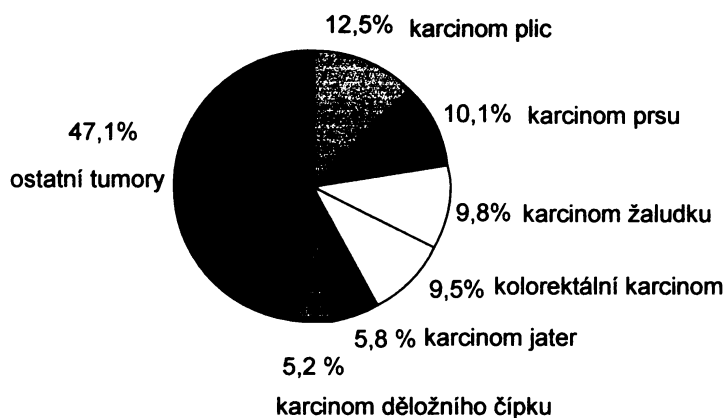
Za karcinogenesi (kancerogenesi) je považován proces maligní (zhoubné) transformace nenádorové buňky v nádorovou, následné dělení buněčného klonu, včetně další dediferenciace a zvyšování zhoubného (maligního) potenciálu dělících se buněk^[4, 5, 6, 7, 8].

1.1.1 Nádorová onemocnění a podstata jejich vzniku

Narušení regulačního mechanismu dělení a diferenačních schopností buňky vede k tvorbě nádorů. **Nádor** (někdy označován též jako **novotvar** či **tumor**) je nově vytvořená abnormální tkáň dělící se neregulovaným způsobem^[9].

Nádory bývají často klasifikovány podle možnosti proniknout do jiných tkání na **benigní** (nezhoubné), které nemají schopnost rozšiřovat se (metastazovat) do jiných částí těla a lze je díky charakteristickému ohraničení chirurgicky odstranit. Druhou a mnohem nebezpečnější skupinou jsou tzv. **maligní** (zhoubné) tumory, jež schopnost metastazovat mají.

Další dělení nádorů může být podle tkání, ve kterých vznikly. Nejčastěji jsou to epiteliální tkáně. Světové prvenství v četnosti nádorového onemocnění určitého orgánu nese **karcinom plic**, jako druhý **karcinom prsu** a třetí **karcinom žaludku**. Do šestice nejčetnějších nádorů patří **kolorektální karcinom** (konečniku a tlustého střeva), **karcinom jater** a **děložního čípku**^[1] (Obr.1).



Obr. 1: Zastoupení jednotlivých typů nádorových onemocnění podle postižené tkáně ve světě^[1]

Podstata maligního zvratu spočívá v genetických změnách (mutacích DNA) příslušné buňky^[4, 5, 6, 7, 10] prostřednictvím faktorů uvedených v kapitole 1.1.2.

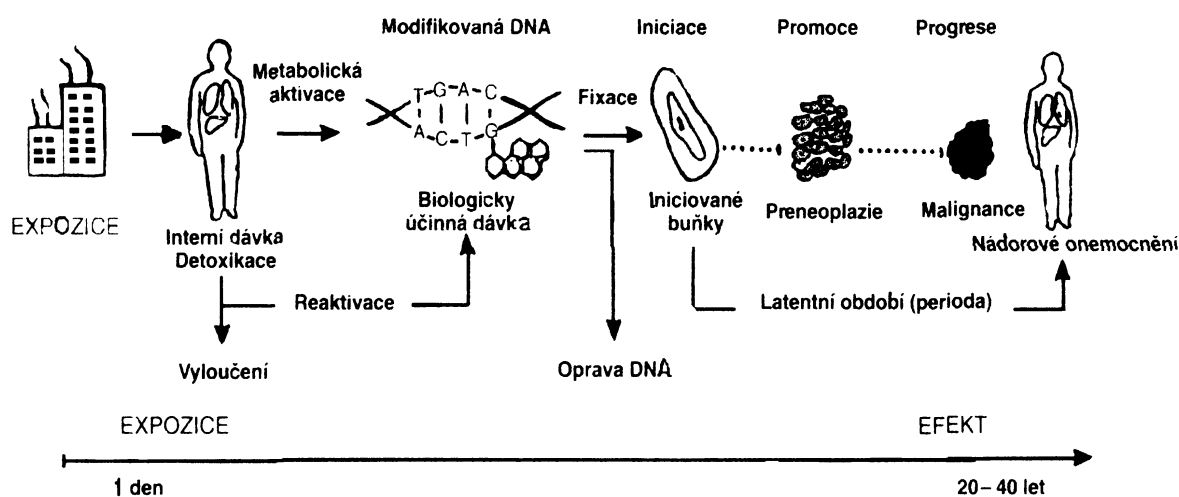
Geny, jejichž změny se mohou podílet na vzniku zhoubného bujení, nazýváme **onkogeny**. Onkogeny jsou geny kódující proteiny pozitivně regulující normální růst buňky, jejichž poruchy vedou ke ztrátě růstové kontroly a přeměně normální buňky v nádorovou. Nealterované buněčné onkogeny se nazývají protoonkogeny^[11]. Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílí také **tumor supresorové geny** (antionkogeny), jejichž produkty potlačují proliferaci normálních somatických buněk a udržují je ve stadiu klidu^[9]. Můžeme je definovat jako geny, jejichž inaktivace má onkogenní účinky^[12, 13].

Proces vzniku nádorů (karcinogenesi) můžeme rozdělit do tří fází (Obr. 2):

1. **iniciace**
2. **promoce**
3. **progrese**

Buňka, ve které došlo k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor supresorových genů a toto poškození DNA nebylo opraveno reparačními enzymy, je označována jako **buňka iniciovaná**^[9]. Tato mutace může zůstat bez funkčních důsledků řadu let nebo být eliminována opravnými mechanismy^[14]. V tomto stadiu může buňka přetrvávat i několik let, pokud však není mutace eliminována reparačním systémem organismu a ani imunitní systém tuto buňku nezničí, může postoupit do další fáze vzniku nádoru - **promoce**. Působením tzv. promočních faktorů na iniciovanou buňku může dojít vlivem prohlubujících se změn v genetické informaci k proliferaci těchto buněk s poruchou diferenciací a buněčné komunikace a tím k vzniku **benigního nádoru**^[9].

Ve fázi progresu je maligní transformace buněk finalizována. Působením progresoru se totiž mění dosud částečně kontrolovatelný růst benigního nádoru na růst nekontrolovatelný, vzniká **maligní nádor**, který infiltruje i do sousedních tkání a likviduje je^[14].



Obr. 2: Schéma víceetapového procesu kancerogeneze^[9, 10]

1.1.2 Karcinogenní faktory

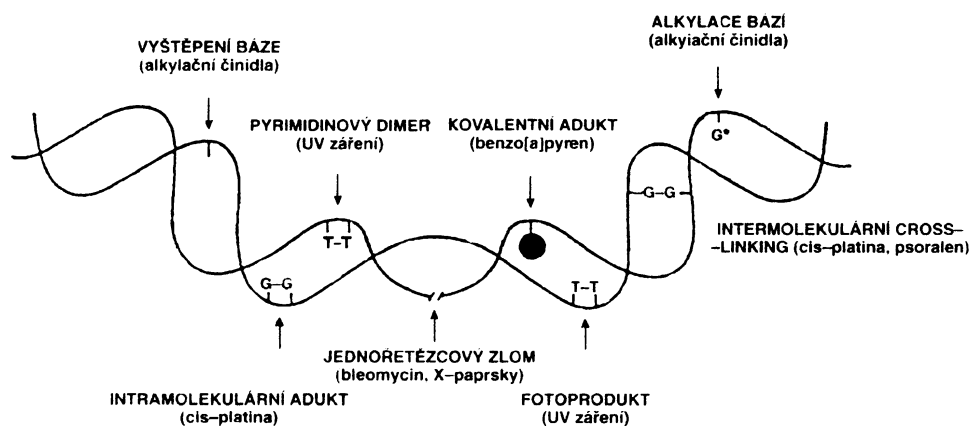
S vývojem přírodních věd nabylo na významu několik teorií vysvětlujících příčiny nádorových procesů: **chemická** (vliv některých chemikálií), **fyzikální** (např. vliv ionizujícího záření, mechanické vlivy)^[8] a **biologická** (některé viry, genetické předpoklady,

pathologicko – fyziologické procesy)^[15]. Teorie o vnitřních faktorech staví do popředí místní i celkovou dispozici (dědičnost, oslabení a poškození obranyschopnosti člověka)^[8].

Nádorové onemocnění je komplexní děj, na němž se podílejí faktory zevní (exogenní karcinogeny) a vnitřní (endogenní karcinogeny, dědičné mutace). Mezi nejvýznamnější zevní faktory vztahující se ke karcinogenezi patří právě faktory chemické (chemické karcinogeny)^[4, 5, 6, 7, 10]. Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny bylo přes padesát rozdílných chemických sloučenin ohodnoceno jako karcinogeny vyvolávající nádorová onemocnění u člověka^[5].

Chemické karcinogeny lze podle mechanismu jejich působení rozdělit do dvou základních skupin. **Genotoxické** karcinogeny se vážou na DNA kovalentní vazbou, tvoří tedy kovalentní adukty^[6, 16]. Právě kovalentní modifikace DNA (vznik kovalentních aduktů) je považována za nejvýznamnější z hlediska iniciace nádorových procesů^[17]. Vedle genotoxických karcinogenů jsou známy karcinogeny **epigenetické**, které též modifikují DNA, avšak nekovalentně. Příklady mechanismů poškození DNA jsou uvedeny na **obrázku 3**, mezi nejdůležitější patří interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA, jedno- a dvouřetězové zlomy v DNA, cross-linking atd^[8, 9, 15].

Řada karcinogenů způsobí modifikaci DNA teprve až po své metabolické aktivaci^[9].



Obr. 3: Příklady mechanismů poškození DNA různými vnějšími faktory^[9]

1.2 Léčba nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění představují závažný celospolečenský problém. Účinná prevence jejich vzniku je značně nedokonalá a včasná diagnostika je stále spíše výjimkou. Tím většího významu nabývá léčba zhoubných nádorů. Ačkoliv dnes již dovedeme některá

nádorová onemocnění vyléčit, nelze v širším měřítku považovat výsledky léčby za zcela uspokojivé^[18].

Léčba nádorových onemocnění je komplikována zejména skutečností, že léčbou potřebujeme zcela zničit buňky nikoli cizorodé, jak je tomu například u bakteriálních infekcí, ale tělu vlastní. Nádorové buňky se sice více či méně liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, a proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a eliminovány. Odlišnosti od normálních buněk jsou však buď příliš malé, takže jsou imunitním systémem ignorovány, nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé zbraně imunitního systému^[19].

V současné době se používají základní tři terapeutické metody: chirurgická léčba, radioterapie a medikamentózní léčba cytostatiky neboli chemoterapie. Ve většině případů nestačí k úspěšnému léčení nebo vyléčení pouze jediná z uvedených metod. Větší naději na úspěch má zpravidla komplexní přístup vyjádřený jejich vzájemnou kombinací, neboť tyto základní metody protinádorové léčby se vhodně doplňují^[18].

Chirurgickým zákrokem lze odstranit objemný nádor, který je ohraničený a neprorůstá do vitálně důležitých struktur. Po zákroku lze ozářením do jisté míry eliminovat reziduální tumor. Diseminovaný nádorový proces však může ovlivnit jediné chemoterapie. U některých typů nádorů, spíše však ve speciálních případech, se uplatňuje i imunoterapie. Léčbou budoucnosti by se mohla stát terapie genová^[14, 20].

1.2.1 Chemoterapie

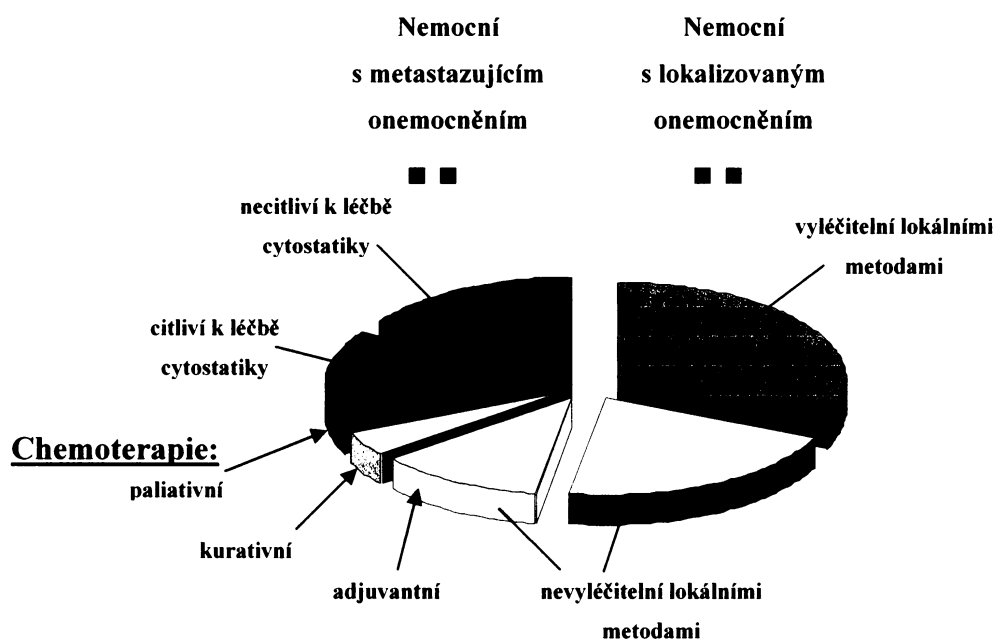
Chemoterapie je z výše zmíněných metod metodou nejmladší. Původně byla chápána jako metoda doplňková, postupem času však nabývala na významu a dnes je rovnocenná chirurgické léčbě i radioterapii.

Přes významné pokroky, kterých bylo v léčbě nádorů chemoterapií dosaženo, nejsou dnešní možnosti protinádorové terapie zcela uspokojivé^[20,21]. Citlivost nádorů k chemoterapii je pro různá nádorová onemocnění značně rozdílná. Dle tohoto kritéria může být chemoterapie rozdělena do několika kategorií^[20, 21]:

- **kurativní (primární) chemoterapie** - určená pro léčbu nádorů s vysokou citlivostí k podávanému cytostatiku s předpokladem trvalého vyléčení pacienta.

- **paliativní chemoterapie** - podávána za účelem zvýšení kvality a prodloužení života pacienta, u něhož je naděje na vyléčení malá.
- **adjuvantní chemoterapie** - používána jako doplňující léčba při indikaci jiné základní terapeutické metody (chirurgické léčby, radioterapie) za účelem zvýšení účinnosti těchto metod a zničení zbytkové populace nádorových buněk.
- **neoadjuvantní chemoterapie** – určená pro zlepšení operability nádoru před chirurgickým zákrokem.

Podíl chemoterapie na celkovém úspěchu léčby nádorových onemocnění je uveden na **Obr. 4**^[14, 18].



Obr. 4: Podíl chemoterapie na celkovém úspěchu léčby nádorových onemocnění^[14, 18]

1.2.2 Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika cytostatik zahrnuje řadu dílčích pochodů, které spolu velmi úzce souvisejí a vzájemně na sebe navazují^[20].

Resorpce - rychlost a stupeň resorpce závisí na řadě faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou aplikační cesty, aplikační formy (rozpuštnost) a průnik cytostatik membránami

(pasivní či usnadněná difuze, aktivní transport, filtrace membránovými póry, pinocytosa).

Distribuce je komplexním procesem, v němž se uplatňuje celá řada faktorů. Koncentrace cytostatika v jednotlivých orgánech i v cílové tkáni je dána mimo jiné prokrvením příslušné tkáně či nádoru. V intravaskulárním prostoru může docházet v různé míře k vazbě na krevní elementy nebo na bílkoviny krevní plasmy (převážně nespecificky na albuminovou frakci), což může být příčinou snížené dostupnosti léčiva pro cílové tkáně. Z extracelulárního prostoru může docházet k vazbě cytostatika na necílové tkáně. Po průniku membránou se jen část váže přímo na cílový receptor. Zbývající část vazbou na intracelulární bílkoviny a lipidy tvoří jakousi rezervu.

Biotransformace (*kapitola 1.3*) mění účinnost a fyzikální vlastnosti látky - metabolity jsou polárnější, méně rozpustné v lipidech. Metabolické přeměny léčiv se účastní jednak enzymy intermediálního metabolismu, jednak enzymy přítomné v tzv. mikrosomální frakci buněk. Aktivita biotransformačních enzymů může být ovlivněna kupříkladu současně podávanými léky.

Vylučování ledvinami závisí na faktorech extrarenálních (povaha látky, vazba na bílkovinu, biotransformace) a renálních (glomerulární filtrace, tubulární sekrece). Snadno jsou exkretovány polární metabolity, naopak lipofilní látky jsou často v tubulech zpětně resorbovány. Vylučování játry je časté u cytostatik s velkými molekulami (antibiotika).

1.2.3 Mechanismus protinádorového účinku cytostatik

Cytostatická léčba je založena na omezení buněčné proliferace nádorových buněk. Cytotoxický účinek protinádorových léčiv závisí na jejich chemické povaze a lze ho vyložit několika základními mechanismy^[18]:

1. **Porucha syntézy nukleových kyselin inhibicí různých klíčových enzymů metabolismu** látkami, které se strukturálně podobají přirozeným metabolitům a označují se proto jako analoga nebo antimetabolity. Mohou blokovat dílčí reakce intermediálního metabolismu nebo jsou nejprve samy metabolicky proměněny, aktivovány, zpravidla přeměnou na nukleotid, a v této formě včleněny do nukleových kyselin. Toto včlenění chybného metabolitu vede k syntéze falešné DNA, jejíž funkce

(především replikace) jsou pak porušené. Podle substrátů, na jejichž úrovni antimetabolity působí, se rozeznává několik skupin. Jsou to analoga kyseliny listové (metotrexát), analoga purinů (merkaptopurin), analoga adeninu (2-deoxykoformycin) a analoga pyrimidinů (5-fluorouracil).

2. Přímé poškození struktury a funkce již hotových nukleových kyselin.

Dochází k němu vlivem látek, jejichž mechanismus působení je založen buď na kovalentní vazbě cytostatika na DNA, tzv. alkylace (cyklofosamid) nebo na vazbě nekovalentní, tzv. interkalace (doxorubicin). Výsledkem je v obou případech znemožnění replikace DNA. Třetí možností mechanismu je přímé rozštěpení molekuly DNA cytostatikem (bleomycin).

3. Alterace (poškození) tzv. mikrotubulárního proteinu.

Denaturací nebo stabilizací mikrotubulárního proteinu dochází k poškození dělicího vřeténka, které zajišťuje při mitóze správnou migraci chromosomů k pólům dělicí se buňky, a tím k zablokování mitózy v metafázi. Takto působí zejména alkaloidy (vinblastin, vincristin).

4. Porucha proteosyntézy.

V praxi se používá omezeně, neboť látky inhibující proteosyntézu jsou většinou značně toxické. Osvědčila se zejména L-asparagináza, která přeměňuje L-asparagin na kyselinu asparagovou a amoniak. Nedostatek této aminokyseliny se pak projeví poruchou proteosyntézy v buňce.

5. Poškození buněčné membrány.

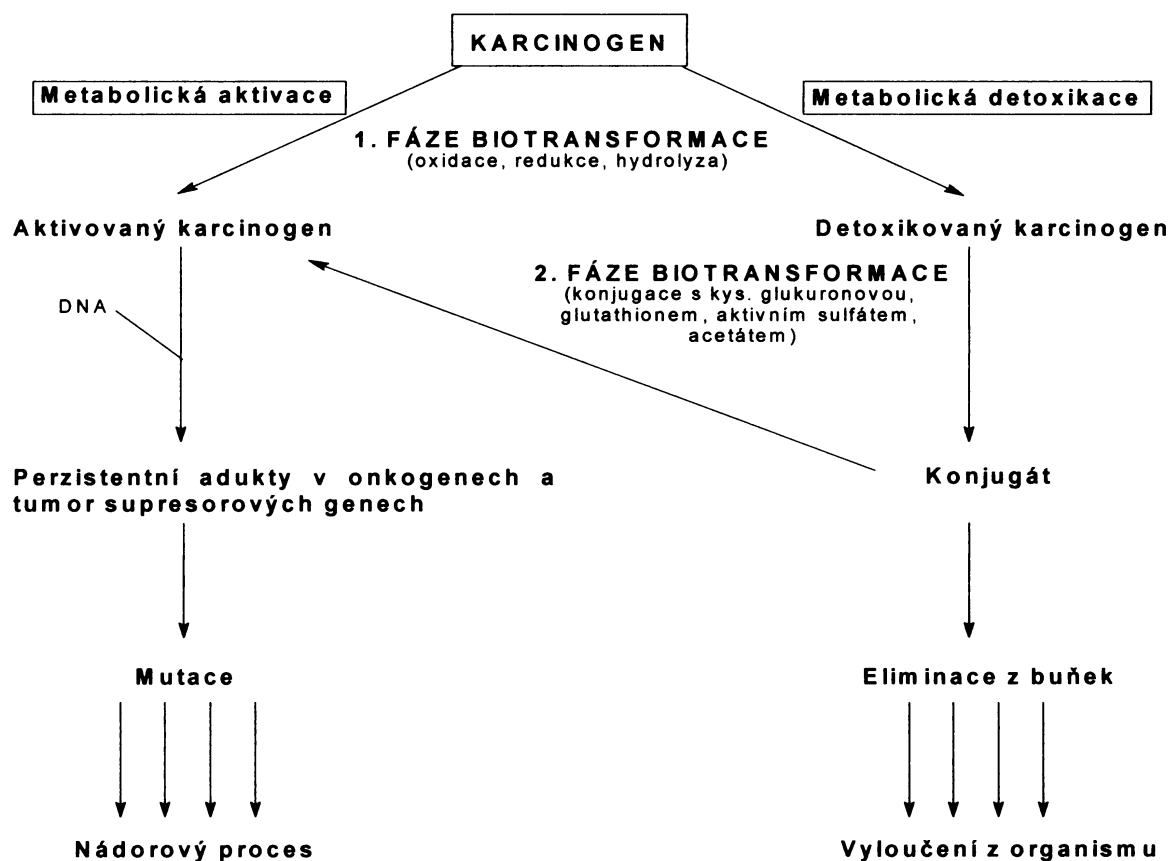
1.3 Biotransformace xenobiotik

Cizorodé látky hydrofobní povahy procházejí snadno biologickou membránou dovnitř buněk organismu, jejich cesta z těla ven je však obtížná. Dochází proto k nerovnováze mezi vstupem a eliminací z organismu, a tedy k jejich akumulaci^[22]. Látky lipofilního charakteru nemohou být z těla vyloučeny přímo, ale musí být nejdříve přeměněny na polárnější metabolity snáze se vylučující^[23].

Za **biotransformaci** cizorodých látek jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení z organismu nebo potlačení jejich působení^[24].

Procesy obecně nazývané biotransformace xenobiotik můžeme rozdělit na dvě cesty, a to **detoxifikační** (vznikají netoxické, biologicky inertní látky) a **aktivační**, která je významná u některých léčiv, ale aktivováno je též 98 % genotoxických karcinogenů^[25].

K detoxikaci a následnému vyloučení xenobiotika dochází většinou jeho napojením (konjugací) na některý z běžných endogenních produktů metabolismu. Pokud cizorodá látka neobsahuje ve své molekule skupinu schopnou konjugační reakce, musí se taková skupina nejprve vytvořit. Biotransformace mnohých xenobiotik (zejména u živočichů) jsou proto dvoustupňové procesy^[26] (Obr. 5).



Obr. 5: Schéma mechanismu působení chemických karcinogenů^[18]

1.3.1 1. fáze biotransformace xenobiotik (derivatizační fáze)

V první fázi biotransformace dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly nebo k demaskování funkčních skupin již přítomných^[27].

Reakce derivatizační fáze lze rozdělit na **oxidační**, **redukční** a **hydrolytické**. Mezi oxidační reakce patří C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů, aldehydů aj. Příkladem reakcí hydrolytických jsou hydrolýza esterů či amidů. Třetím možným mechanismem je redukce (nitro- a azoredukce). Touto redukční cestou mohou být aktivovány karcinogeny: 2-nitroanisol^[28], 1-nitropyren^[29, 30], 1,6-dinitropyren^[30], či aristolochové kyseliny^[31, 32, 33].

Mezi enzymy katalyzující derivatizační reakce xenobiotik patří jednak **enzymy mikrosomální frakce** (subcelulární systém získaný destrukcí endoplasmatického retikula při homogenizaci buněk), tak **cytosolu** (tímto pojmem je označován roztok cytoplasmu a izolačního pufru). Klíčovým enzymovým systémem I. fáze biotransformace je mikrosomální systém **monooxygenas se smíšenou funkcí** (*kapitola 1.4*) obsahující cytochrom P450. Dalšími enzymovými systémy participujícími na derivatizační fázi jsou **D,T-diaforasa**, **hemové peroxidasy**, mikrosomální monooxygenasa obsahující flavin (Zieglerův enzym), alkohol- a aldehyddehydrogenasy a reduktasy (cytosolární xanthinoxidasa)^[22].

1.3.2 2. fáze biotransformace xenobiotik (konjugační fáze)

V druhé fázi biotransformace jsou na reaktivní funkční skupiny vytvořené v derivatizační fázi vázány malé endogenní hydrofilní molekuly. Tímto krokem se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly a usnadní se tím její vyloučení z organismu. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí^[34, 35].

Mezi reakce podílející se na biotransformaci patří: konjugace s kyselinou glukuronovou, s glutathionem, s glycinem, sulfátová konjugace, dále pak methylace a acylace^[36]. Nejtypičtější konjugáty u živočichů, vylučované močí, jsou O- nebo N-glukosiduronáty. Konjugaci derivatizovaného xenobiotika s UDP-glukosou katalyzuje enzym **UDP-glukuronosyltransferasa**^[22]. Za výraznou součást antikancerogenních procesů je považován enzym **glutathion-S-transferasa**, který je schopen vázat reaktivní

metabolity a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem^[37]. Pomocí peptidas je γ -glutamylový zbytek odštěpen v ledvinách a glycylový v játrech (méně často se tvoří konjugáty přímo s cysteinem za katalýzy transpeptidasou). Cysteylový zbytek je dále acetylován a vzniká merkapturová kyselina, která již může být vyloučena močí. Glutathion a cystein jsou považovány za „scavengery“ (vychytávače) cizorodých látek^[22].

Výkaly jsou vylučovány například konjugáty fenolické povahy s aktivním sulfátem nebo konjugáty karboxylových kyselin s glycinem nebo taurinem. Takto se také vylučuje kyselina cholová, která je finálním produktem degradace endogenních steroidních látek^[22].

Druhá fáze biotransformace je ve většině případů fází detoxikační^[8], může v ní však také dojít k aktivaci xenobiotika na toxičtější sloučeninu (**Obr. 5**). Tak je tomu například u konjugátů se sulfátem vznikajících z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem **sulfotransferas**. Konjugát sulfátu s N-hydroxysloučeninami (z první fáze biotransformace) je v kyselém prostředí moči nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (event. karbéniového) iontu^[22]; vzniká tak elektrofil reagující s DNA a proteiny. Enzymovými systémy střevní flóry může také dojít k sekundární dekonjugaci^[37].

1.4 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Do skupiny enzymů označovaných jako monooxygenasy patří oxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“, MFO), obsahující **cytochrom P450 (CYP)** jako terminální oxidasu^[38, 39], dále flavoproteinový enzym **NADPH:CYP reduktasu**, která slouží jako dělič elektronového páru a třetí neméně důležitou částí je **membrána endoplasmatického retikula (ER)**. Fakultativně může ještě obsahovat cytochrom b_5 a NADPH: cytochrom b_5 reduktasu^[22].

MFO systém katalysuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík^[40]. Pro svoji aktivitu vyžaduje molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru, který je schopen jej aktivovat. Jako kofaktory slouží např. přechodné kovy (nejčastěji nehemové i hemové Fe) nebo flaviny^[38, 39, 41, 42].

Tento enzymový systém katalyzuje inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu^[24].

MFO systém může být lokalizován^[43]:

- **Na vnější straně membrány hladkého i hrubého endoplasmatického retikula** v orgánech exponovaných látkami cizorodé povahy (játra, ledviny, plíce, GIT, kůže, mozek). Zde se účastní první fáze biotransformace xenobiotik.

- Na **mitochondriální membráně**, jak je tomu zejména v kůře nadledvin, kde participuje na metabolismu endogenních látek (například steroidů a mastných kyselin).

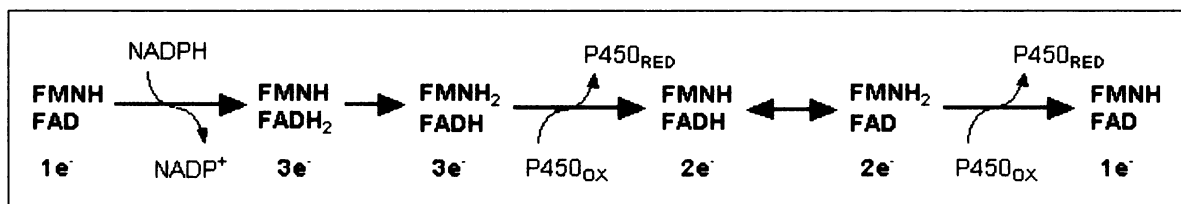
1.4.1 NADPH: cytochrom P450 reduktasa

NADPH:CYP reduktasa (EC 1.6.2.4) je „žlutý protein“ lokalizovaný v membránách endoplasmatického retikula, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450^[44] (v daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450). Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další^[45]. Za určitých okolností může být NADPH:cytochrom P450 reduktasa zastoupena NADH:cytochrom b₅ reduktasou, která jako koenzym využívá NADH^[22].

NADPH:CYP reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), která je zakotvena v membráně^[46] a hydrofilní C-terminální doménu (72 kDa)^[47].

Funkce NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redox potenciálů obou flavinových (FMN i FAD) prosthetických skupin^[48, 49].

Jak je patrné z **obrázku 6**, příjemcem elektronů od NADPH je FAD, který elektrony dále předává FMN. Za jedoelektronovou redukci CYP, který je akceptorovou molekulou, je zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂ (v případě savčí NADPH:CYP reduktasy)^[24].



Obr. 6: Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:CYP reduktasy^[24]

1.4.2 Cytochrom P450

Garfinkel s Klingenbergem v roce 1958 objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum

při **450 nm**^[50, 51]. Hemoproteinový charakter tohoto pigmentu dokázali roku 1964 Omura a Sato^[50]. Na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali **cytochromem P450**^[52] (**Obr. 7**).

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je terminální oxidasou MFO systému: zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu^[53], přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu^[54]. Elektrony potřebné k redukcí dodává NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa^[55], případně NADH:cytochrom b₅ reduktasa^[56].

Porfyrinový skelet (*protoporfyrin IX*) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím **thiolátové síry** sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu^[45]. Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale o **hemthiolátový protein**^[43, 57].

Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od většiny ostatních hemoproteinů (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti)^[58, 59, 60]. Šestáým ligandem je atom kyslíku molekuly vody^[24].

Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou **spinových formách**^[22, 45, 57]:



Obr. 7: *Struktura lidského cytochromu P450 3A4*^[61]

- **Vysokospinová forma** vzniká v případě, že ion železa je v **pentakoordinovaném** stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu. Tato forma vykazuje maximum Soretova pásu při **390 nm**.

- **Nízko-spinová forma** (spin 1/2)

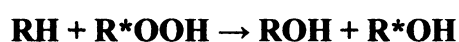
je charakteristická absorpčním maximem při **418 nm**. Ion železa je **hexakoordinován**, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (např. s -OH, -COOH nebo -NH₂

skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu^[45] či atomem kyslíku z molekuly vody^[24]) a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX.

Obě spinové formy jsou v klidovém stavu v rovnováze. Jejich poměr se značně mění při **vazbě substrátu** do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu, a tedy nárůstu obsahu vysokospinové formy. V absorpčním spektru se tedy ukáže nárůst absorbance při 390 nm a pokles při 418 nm - tzv. „substrátové spektrum“. **Šestým ligandem** železa se však může stát i samotný **substrát** (či nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu), pak registrujeme pokles absorbance při 390 nm a nárůst (dle heteroatomu) při 418 až 460 nm, tedy tak zvané „ligandové spektrum“^[22].

1.4.2.1 Enzymové funkce cytochromu P450

- **Oxidasová funkce** - aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce^[62]. Spontání reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. V aerobních organismech se proto nachází řada proteinů nesoucí prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, s jejichž pomocí jsou schopny oxidační potenciál kyslíku využít^[62].
- **Oxygenasová aktivita** - zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.
- **Redukční reakce** - elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K tomu dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, a je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*^[34].
- **Peroxidasová aktivita** - místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R*OOH) nebo peroxid vodíku^[63]. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů^[64]. Produktem reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát (ROH):



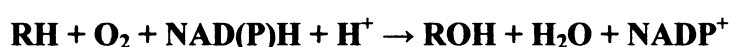
- **Produkce H₂O₂ a aktivních forem kyslíku** - k tomuto jevu dochází tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne

oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová. Aktivní forma kyslíku je z molekuly uvolněna do okolí, kde přijme protony nebo dismutuje^[22].

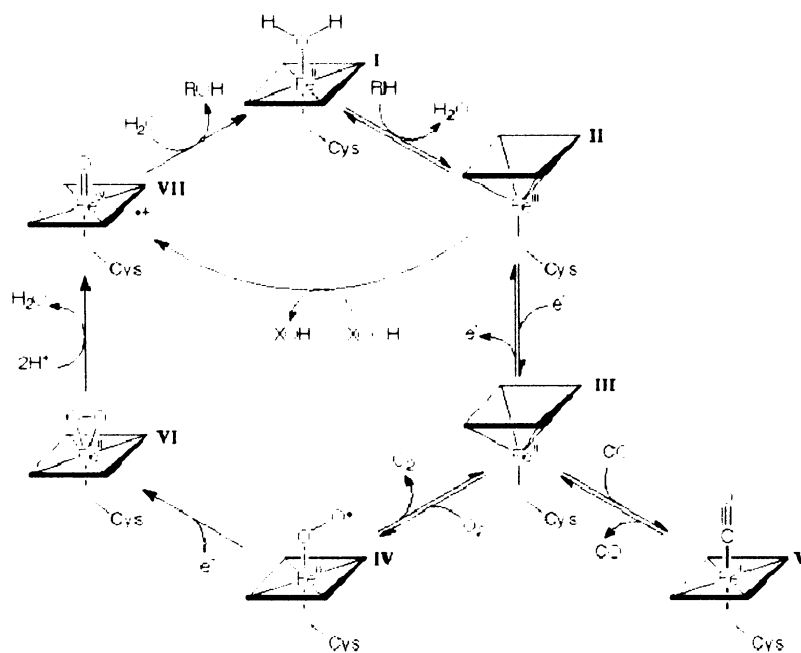
1.4.2.2 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Monooxygenasová reakce je nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450.

Průběh reakce zahrnující aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu obecně vyjadřuje sumární rovnice (kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce)^[24]:



Reakční cyklus sestává alespoň z osmi kroků^[24] a je schematicky znázorněn na **Obr. 8**:



Obr. 8: Reakční cyklus cytochromu P450^[65]

V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (Fe^{III}) a je hexakoordinované(I).

Po vniknutí substrátu RH do aktivního místa dojde k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane pentakoordinované, a též dojde ke konformační změně v molekule enzymu^[24, 45](II).

Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:CYP reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (Fe^{II}) a zůstává stále pentakoordinováno. Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (III). Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří **ternární ferri-superoxidový komplex**, kde je železo opět hexakoordinované. Tento nepříliš stabilní komplex je dále

redukován NADPH:CYP reduktasou nebo NADH:cytochrom b_5 reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (IV). Vazba kyslíku na formu (III) může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který tvoří **ternární ferrokomplex** cytochrom P450-CO-RH^[34] (V). Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody (VI). Zatímco druhý zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak **ferrioxenový komplex** (VII), který je stabilisován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu (**ROH**), jež je z enzymu uvolněn^[39, 66, 67, 68].

1.4.2.3 Názvosloví cytochromů P450

Cytochromy se vyskytují v různých **isoformách (isoenzymech)**, které jsou na základě homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) řazeny do genetických **rodin a podrodin**^[69].

Současné systematické názvosloví navrhli Nebert a spolupracovníci, podle kterého jsou cytochromy P450 označovány zkratkou **CYP**, za ní následuje číslo příslušející rodině a dále velké písmeno značící podrodinu cytochromů P450^[70]. Jednotlivé isoenzymy jsou pak určeny číslem za písmenem podrodiny. Do stejné rodiny patří cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než **40%** homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než **60 %**^[71].

1.4.3 Cytochrom b_5

Cytochrom b_5 je malý (16 kDa)^[72], cylindrický, kyselý membránový protein^[73] skládající se z šesti α -helixů a pěti β -skládaných listů^[79]. Součástí tohoto hemoproteinu je nekovalentně vázaná jedna či dvě molekuly hemu b ^[74].

Skládá se ze dvou domén, větší hem vázající **hydrofilní** domény, jež je aktivní v redox reakcích, a z menší **hydrofobní** domény, která ukotvuje protein do membrány^[75, 76, 77, 78]. Tato hydrofobní doména je v membráně vázána karboxylovou

částí obsahující 14-18 aminokyselin a je spojena s globulární doménou oblastí tvořenou 7 aminokyselinami bohatými na prolin a následujícími 7 aminokyselinami umístěnými na konci polypeptidového řetězce^[78]. Hem je lokalizován v hydrofobní „kapse“ a hemové železo je koordinováno dvěma plně konzervovanými postranními řetězci histidinů, jejichž vazba v pozici pátého a šestého ligandu hemového železa zabraňuje jeho přímé interakci s molekulárním kyslíkem. Přesto je cytochrom b_5 schopen fungovat jako prostředník přenosu elektronů mezi reduktasou a oxidačními enzymy^[79].

Tento membránově vázaný protein, lokalizovaný v membráně endoplasmatického retikula může přijmout elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy^[75, 80, 81, 82, 83, 84] nebo od NADH:cytochrom b_5 reduktasy^[84, 85]. Takto redukovaný cytochrom b_5 poskytuje redukční ekvivalenty pro syntézu některých lipidů^[75, 76, 77] a dále je donorem elektronu proteinovým elektronovým akceptorům jako například cytochromu c ^[86, 87, 88, 89], cytochromu P450^[75, 76, 77, 87], metmyoglobinu^[90] či methemoglobinu^[91].

1.4.3.1 Mechanismus působení cytochromu b_5

Z dosud provedených studií je zřejmé, že cytochrom b_5 má vliv na různé enzymové systémy včetně MFO systému. Přesný mechanismus však nebyl doposud zcela objasněn a je vykládán čtyřmi způsoby^[79]:

1. **Jeden z předpokládaných mechanismů** se týká přímého přenosu druhého elektronu z cytochromu b_5 do monooxygenasového reakčního cyklu. Právě rychlost přijetí druhého elektronu se zdá být limitujícím krokem v monooxygenasové reakci cytochromů P450. Pokud není druhý elektron, který je třeba k tvorbě více aktivovaného molekulárního kyslíku navázaného na cytochrom P450, doručen dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu a uvolňuje se superoxidový anionradikál místo oxidovaného substrátu^[26, 36, 79].
2. **Další výklad** tohoto mechanismu uvádí cytochrom b_5 jako pozitivní modifikátor monooxygenas, který snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Umožňuje totiž rychlejší vstup druhého elektronu do monooxygenasové reakce a tím zabraňuje rozpadu komplexu se superoxidovým anionradikálem. Vytvoří se tak aktivovaný kyslík, který reaguje se substrátem a tvoří se produkt^[26, 36, 79].

3. **Třetí možnost výkladu** se zakládá na tvorbě dvou-hemoproteinového komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem b₅. Bez cytochromu b₅ přijímá cytochrom P450 elektron od reduktasy, poté disociuje vazbu s reduktasou, váže kyslík a opět tuto vazbu reasociuje a přijímá druhý elektron. Vytvoření komplexu s cytochromem b₅ by posilovalo rychlost formování aktivního kyslíku odstraněním dvojí interakce s reduktasou^[26, 36, 79].
4. **Čtvrtý mechanismus** předpokládá přímé působení cytochromu b₅ jako efektoru, zvyšující tvorbu produktu, bez oxidačně-redukční role v monooxygenasové reakci. To by potvrdzovalo stimulaci některých cytochromů P450 nejen cytochromem b₅, ale i cytochromem b₅ postrádajícím hem (apo-cytochrom b₅). Cytochrom b₅ v takovém případě pravděpodobně posiluje rozklad oxygenovaného hemoproteinu na produkty nebo usnadní tok elektronů přes systém^[26, 36, 79].

1.4.3.2 Vliv cytochromu b₅ na reakce katalyzované MFO systémem

Z dosavadních studií lze usuzovat, že cytochrom b₅ může v řadě reakcí katalyzovaných cytochromy P450 (např. 3A4, 2C9, 17A, 4A7)^[92] působit stimulačně, některé reakce však může naopak inhibovat^[77]. Experimentální výsledky zjevně závisí na dané isoformě CYP a též na navázaném substrátu^[77, 93]. Funkce cytochromu b₅ je zatím známá pouze u některých izoformech cytochromu P450 a jejich substrátů^[79].

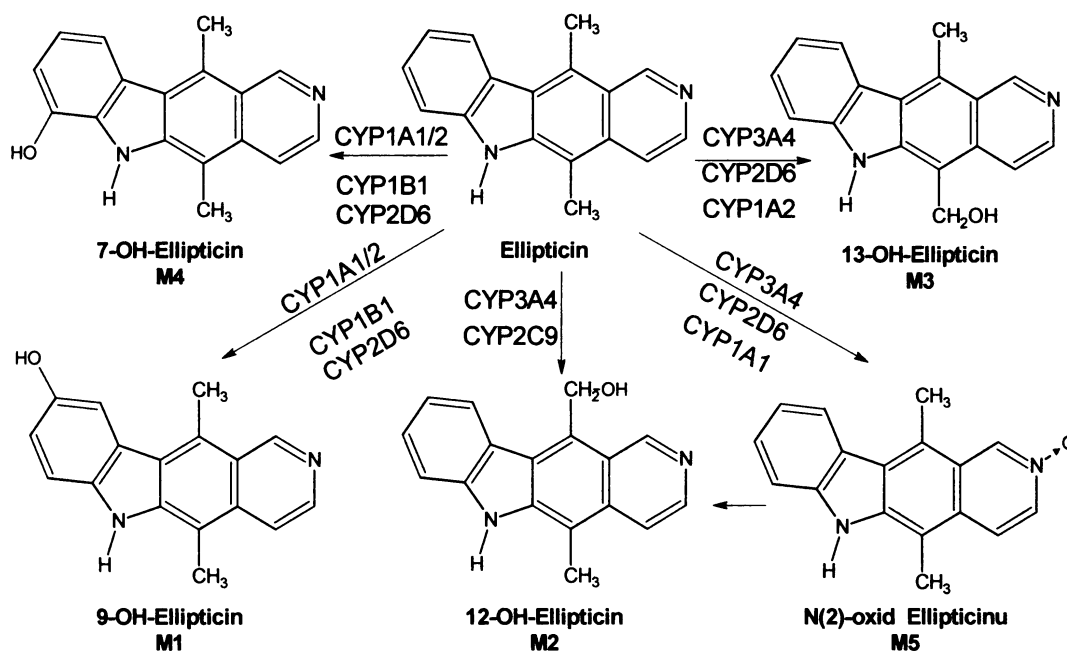
1.5 Ellipticin

Ellipticin (5, 11-dimethyl-6*H*-pyrido[4, 3-*b*] karbazol, **Obr. 9**) a některé jeho deriváty patří mezi alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia elliptica*, *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*). Vykazují významnou protinádorovou aktivitu^[94, 95, 96, 97]. Ellipticin samotný a jeho polárnější deriváty **9-methoxyellipticin** a **2-methyl-9-hydroxyellipticin** jsou ve formě acetátu již dlouhou dobu farmakologicky využívány, především k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukemie, sarkomů ledvin, a karcinomu štítné žlázy^[14, 98, 99]. Byla zjištěna i jejich anti-HIV aktivita, proto se zkoumá i použití ellipticinu při inhibici reversní transkriptasy při léčbě AIDS^[100, 101]. Předností ellipticinu je jeho vysoká účinnost a relativně

nízké vedlejší účinky (jeho hematologická toxicita je zanedbatelná, nefrotoxicita je mechanismem vzniku podobná *cis*-platině)^[14, 102].

1.5.1 Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je v organismu přeměňován na následujících **pět metabolitů (Obr. 9)**:



Obr. 9: Schéma metabolismu ellipticinu cytochromy P450^[103]

Metabolity 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu jsou tvořeny nejen lidskými jaterními mikrosomy, ale rovněž i mikrosomy modelových organismů (potkan a králík)^[35].

1.5.2 Mechanismus účinku ellipticinu

Ellipticin působí několika mechanismy účinku:

- 1. Interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA**^[14, 104, 105, 106], způsobená slabými reverzibilními interakcemi s bázemi DNA^[107], vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interakce mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě je určující pro orientaci této sloučeniny v DNA^[108].

Ellipticin je díky své fluorescenci používán i jako modelová interkalární sloučenina^[108, 109].

2. **Inhibice topoisomerasy II.** Ellipticin interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního katalyticky neaktivního komplexu, který vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA^[110].

3. **Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53^[111, 112]**, jejíž příčinou je pravděpodobně inhibice specifické cyklin-dependentní kinasy. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může vyústit v indukci apoptosy.

4. **Inhibice oxidační fosforylace**, jenž vede k letálnímu snížení obsahu ATP v buňkách a následně k jejich zániku^[113].

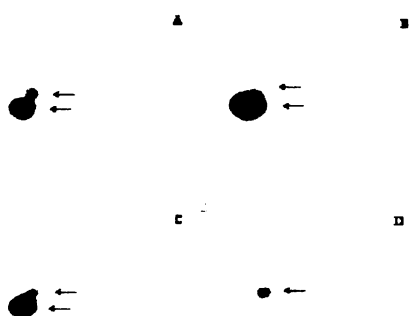
5. **Inhibice telomerasy^[107]**

Všechna výše uvedená vysvětlení mechanismu protinádorového účinku ellipticinů se zakládají na jejich nespecifickém působení. To je však v rozporu s jejich poměrně úzkou specifitou účinku vůči určitým typům nádorů. Velmi důležitým aspektem je navíc individuální variabilita v odpovědi pacientů na léčbu ellipticinou^[114]. Jedním z vysvětlení specifity chemoterapeutického účinku i selektivní odpovědi na podané léčivo může být rozdílná enzymová výbava lidského organismu enzymy, které jsou důležité pro biotransformaci ellipticinu a mohou aktivovat léčivo na terapeuticky účinnější derivát^[114].

Podařilo se odhalit nový mechanismus působení tohoto léčiva, kterým je :

Tvorba kovalentních aduktů s DNA (viz kapitola 1.5.3)

1.5.3 Tvorba kovalentních aduktů s DNA



Mechanismem, který by mohl vysvětlovat vysokou účinnost ellipticinu v protinádorové terapii, je tvorba kovalentních aduktů s DNA, neboť nejsilnějšími protinádorovými agens jsou právě cytostatika kovalentně modifikující DNA^[35].

Obr. 10: Autoradiografie aduktů tvořených aktivovaným ellipticinem s DNA. K aktivaci byly použity mikrosomy potkana (A), králíka (B), mikrosomy lidské (C). Kontrolní vzorek bez mikrosomů (D)^[115]

V průběhu metabolismu je ellipticin v organismu aktivován na farmakologicky účinnější metabolity, které se kovalentně váží na DNA^[103, 116, 117, 118, 119], může tedy působit jako alkylační činidlo. Tento fakt byl potvrzen pomocí dvou nezávislých metod, použitím [³H]ellipticinu a ³²P- postlabelingu^[120]. Ve všech testovaných systémech v podmínkách *in vitro* byly detekovány minimálně dva adukty ellipticinu s DNA^[103, 116] (**Obr. 10**), a to **majoritní adukt (adukt 1)**, jehož tvorba je závislá na přítomnosti aktivačních enzymů, a **minoritní adukt (adukt 2)**^[116], který vznikal i bez přítomnosti enzymového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací^[115, 116]. Cílovým deoxynukleotidem, který je modifikován aktivovaným ellipticinem v DNA, je deoxyguanosin^[115].

Jako metabolity zodpovědné za tvorbu kovalentních aduktů byly určeny 13-hydroxyellipticin (M3), tvořící majoritní adukt 1 vazbou s deoxyguanosinem v DNA, a 12-hydroxyellipticin (M2), eventuálně N²-oxid ellipticinu (M5), z něhož vzniká 12-hydroxyellipticin přesmykem^[103], jejichž vazbou na DNA vzniká adukt minoritní^[103]. Kovalentní adukty generuje ellipticin také v plicích fibroblastických buňkách křečka (V79) transfekovaných lidskými CYP^[119], dále *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana exponovaného tomuto protinádorovému léčivu^[117] a i v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7)^[103]. Pomocí kochromatografie na TLC a HPLC byly identifikovány tytéž adukty 1 a 2. V těchto případech se však tvoří i další minoritní adukty^[103, 115, 117, 119].

Aktivaci ellipticinu oxidačními reakcemi katalysují dva typy hemových enzymů: cytochromy P450^[115, 116, 117, 119] a peroxidasasy. Které isoformy CYP jsou však za aktivaci ellipticinu zodpovědné, bylo určeno několika metodami. Použity byly selektivní inhibitory jednotlivých cytochromů P450, purifikované cytochromy P450 rekonstituované s NADPH:CYP reduktasou, dále mikrosomy hmyzích buňek transfekované Bakulovirem exprimující lidské cytochromy P450 a reduktasu (SupersomyTM) nebo korelace aktivity jednotlivých cytochromů P450 s množstvím vznikajících metabolitů^[35]. Jako hlavní enzymy aktivující ellipticin na metabolity kovalentně modifikující DNA byly určeny lidské isoformy CYP3A4, následované CYP1A1/2 a CYP1B1^[115, 116]. V organismu potkana dochází k aktivaci ellipticinu orthologními formami cytochromů, a to CYP3A1 a CYP1A1/2^[115, 116, 117]. Králičí jaterní mikrosomy jsou v aktivaci ellipticinu velice účinné, ale orthologní CYP3A6 v této aktivaci nehraje hlavní roli, více se na aktivaci podílí CYP2C3^[115, 116].

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo podrobněji prostudovat úlohu cytochromů P450 podrodiny 3A a 2B v oxidaci ellipticinu, a to za použití dvou systémů. Použity byly:

- Rekonstituovaný systém izolovaných králíčích cytochromů P450 3A6 a 2B4 s NADPH:CYP reduktasou
- Lidské orthologní formy těchto enzymů, CYP3A4 a CYP2B6 v Supersomech™

Pro úspěšné dosažení cíle byly řešeny následující problematiky:

- Oxidace ellipticinu cytochromy P450, pro které je ellipticin vhodným substrátem (CYP3A4 a CYP3A6) a špatně oxidovatelným substrátem (CYP2B6 a CYP2B4)
Součástí této diplomové práce byla i izolace CYP2B4 a NADPH:CYP reduktasy, potřebných pro tyto studie.
- Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu těmito enzymy
S tímto úkolem byla též spojena izolace cytochromu b₅.

Tato diplomová práce vznikla za podpory GA ČR (grant 203/06/0329) a MŠMT ČR (grant MSM0021620808).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

BIO-RAD, USA: hydroxylapatit

Farmakon Olomouc, Česká republika: fenobarbital sodný

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), 2-merkptoethanol, fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), protaminsulfát, dodecylsulfát sodný (SDS), tokoferol (vitamin E), Tween 20

Chemopetrol, Česká republika: suchý led

Koch-Light Lab., Velká Británie: 2-merkptoethanol

Lachema Brno, Česká republika: aceton, bromfenolová modř, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, diethyleter, dithioničitan sodný, EDTANa_2 (chelaton 3), ethanol, ethylacetát, glycerol, HCl, hexan, chloroform, KCl, KH_2PO_4 , KOH, kyselina octová, methanol, MgCl_2 , NaCl, NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaOH, octan sodný, persíran amonný, sacharosa, vinan sodný

Lach Ner, Česká republika: methanol

Linde, Česká republika: dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba Feinchemie, Rakousko: glutathion, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Merk, Německo: ethylacetát

Pharmacia, Švédsko: DEAE-Sepharosa CL6B, 2',5'-ADP-Sepharosa,

Reanal Budapešť, Maďarsko: glukosa-6-fosfát Na₂, glycin

Serva Heidelberg, Německo: Coomassie Brilliant Blue R-250, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), triton-X-100

Sevapharma, a.s, Česká republika: hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA: NP-10 (tergitol), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), cytochrom c, ellipticin, fenacetin, flavinmononukleotid (FMN), sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), 1-heptansulfonová kyselina, 3-[(3cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS), cholát sodný, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH), nikotinamidadenindinukleotid (NADP⁺), standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforesu v prostředí SDS „Wide range“

BD Biosciences Company, GENTEST, USA:

CYP3A4 + NADPH:CYP reduktasa SupersomesTM

CYP3A4 + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom b₅ SupersomesTM

CYP2B6 + NADPH:CYP reduktasa SupersomesTM

CYP2B6 + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom b₅ SupersomesTM

Velaz, Česká republika: králík domácí

Cytochrom P450 3A6 byl izolován v naší laboratoři RNDr. Věrou Kotrbovou s dalšími kolegy postupem popsáním v práci RNDr. Miroslava Šulce, PhD.^[121]. Za možnost jeho použití jim tímto velmi děkuji. Cytochrom P450 2B4, NADPH:CYP reduktasa a cytochrom b₅ byly izolovány z králíka indukovaného fenolbarbitalem (PB) jako součást této diplomové práce (*kap. 3.3.3*).

3.2 Použité přístroje

Centrifugy: Janetzki K23 (Německo), Janetzki K24 (Německo), MLW T-52,2 (Německo), Beckman LE-80K Ultracentrifuge (USA), Sanyo Micro Centaur MSE (Francie)

Spektrofotometry: Hewlett Packard E8453 (USA), SPECORD M42 (Carl Zeiss, JENA, Německo), spektrofotometr MOM 195 D (Maďarsko)

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

Systém HPLC: Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, kolona (High Performance Columns, Beckman), program: CHROMELEONTM 6.01

Další přístroje: pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou, homogenisátor dle Pottera a Elvehjema, sonikátor Elmasonic E 30 H (P-Lab), vortex MS 2 Minishaker (Schoeller Pharma), „třepačka“ IKA VX 2 Janke & Kunkel (Německo), inkubátor Thermomixer compact (Eppendorf), termostátovaná lázeň Julabo TW 8 (Schoeller instruments), automatické mikropipety Nichipetex (NICHIRYO, Japan), sběrač rakcí BioLogic BioFrac Fraction Collector (BIO-RAD), sběrač frakcí Fraction Collector FCC-60 (Laboratorní přístroje Praha), peristaltická pumpa PP-05 (Laboratorní přístroje Praha), ultrafiltrační cela (Amicon, Lexington), aparatura pro elektroforesu Amersham (Biosciences, USA)

3.3 Metody

3.3.1 Analytické metody

3.3.1.1 Stanovení koncentrace proteinu

3.3.1.1.1 Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA

Koncentrace proteinu byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol.^[122], při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin totiž redukují měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilisované jako vínanový komplex) na měďné. Intenzita zabarvení, stanovená spektrofotometricky (A_{562}), je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo potřebné pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno těsně před upotřebením, rozpuštěním BCA ve 49 dílech **roztoku A** (0,4 % NaOH; 0,95 % NaHCO₃; 2 % Na₂CO₃.H₂O; 0,16 % tartarát sodný; pH 11,25) tak, aby výsledná koncentrace BCA byla 1 % v 50 dílech. Dále byl přidán 1 díl **roztoku B** (4 % CuSO₄.5H₂O v destilované vodě).

Do čistých, vyžíhaných centrifugačních zkumavek bylo pipetováno 20 μ l vzorku (dle potřeby ředěného destilovanou vodou) a přidáno 980 μ l činidla. Pro „sestrojení“ kalibrační křivky bylo do zkumavek pipetováno 1, 2, 5, 10, 15, 20 μ l standardu hovězího sérového albuminu (BSA) (1 mg/ml), doplněno destilovanou vodou do 20 μ l a přidáno 980 μ l činidla.

Takto připravené roztoky byly inkubovány při teplotě 60 °C po dobu 60 minut. Po následném zchladnutí byla měřena absorbance standardů při 562 nm proti slepému vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 20 μ l destilované vody. Tímto způsobem byla měřena i absorbance vzorků. Ze zjištěných hodnot byla „sestrojena“ kalibrační křivka, která sloužila pro určení koncentrace proteinu ve vzorcích. Měření bylo prováděno na spektrofotometru MOM 195 D (Maďarsko) v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.1.2 Stanovení obsahu cytochromu P450

Jelikož cytochromy P450 nemají žádný společný substrát, který by umožnil stanovení aktivity celkového cytochromu P450, využívá se charakteristické absorpce komplexu

cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm^[50]. Stanovení koncentrace cytochromu P450 se provádí metodou diferenční spektroskopie na základě výše popsaného jevu.

Do zkumavky bylo pipetováno 1960 μ l fosfátového pufru (0,1 M KH_2PO_4 ; 2 % glycerol; pH 7,5) a přidáno 40 μ l vzorku. Přidáním malého množství (~5 mg) dithioničitanu sodného došlo k redukci cytochromu P450. Po opatrném promíchání (aby se netvořily bubliny) byl vzorek rozdělen do dvou kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupaprskovém přístroji Spekord M42 (Carl Zeiss Jena, Německo) proměřena základní linie („base line“) v rozmezí 400 až 500 nm. Vzorková kyveta byla následně probublána 45 sekund proudem oxidu uhelnatého a měřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze vzorce:

$$c_{\text{P450}} = A_{450} - A_{490} / (\epsilon_{\text{P450}} \cdot l) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{M}]$$

c_{P450}koncentrace cytochromu P450

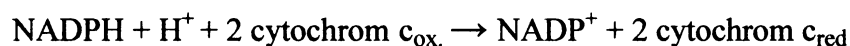
A_xabsorbance při vlnové délce x nm

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

l.....optická dráha kyvety

3.3.1.3 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy se provádí měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace NADPH. Přírůstek redukovaného cytochromu c se měří při vlnové délce 550 nm^[123]. NADPH:cytochrom P450 reduktasa katalysuje reakci:



Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno 10 μ l vhodně ředěného vzorku, aby změna absorbance byla lineární alespoň po dobu 1 min. Vzorek byl doplněn do 1 ml pufrům s cytochromem c (0,3 M KH_2PO_4 ; 0,5 mg/ml cytochromu c; 1 mM EDTA Na_2 ; pH 7,5). Obsah kyvety byl důkladně promíchán a na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E byl při 550 nm měřen „blank“. Reakce byla zahájena přidáním 10 μ l

NADPH (10 mM), vzorek rychle zamíchán a ihned proměřována absorbance při 550 nm po dobu 100 sekund.

Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy byla vypočítána ze směrnice závislosti absorbance při 550 nm na čase podle vzorce:

$$a_{\text{red}} = \text{sm} / (\epsilon_{\text{red}} \cdot \Delta t \cdot l) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol}_{\text{cyt}}/\text{min} \cdot \text{ml}]$$

a_{red}aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy

smsměrnice závislosti absorbance na čase

ϵ_{red}molární absorpční koeficient reduktasy ($\epsilon = 21,01 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

Δt změna času

l.....optická dráha kyvety

3.3.1.4 Stanovení koncentrace cytochromu b_5

Cytochrom b_5 je hemoprotein vykazující absorpční maximum při vlnové délce 413 nm^[124]. Jeho koncentraci lze určit spektrofotometricky.

Absorpční spektrum v rozsahu 200-500 nm bylo měřeno proti slepému vzorku, kterým byl filtrát získaný zahuštěním finálního preparátu cytochromu b_5 (spektrofotometr Hewlett Packard E8453, 1 ml křemenné kyvety o optické dráze 1 cm). Koncentrace cytochromu b_5 byla vypočtena ze vzorce:

$$c_{\text{cyt } b_5} = A_{413} - A_{500} / (\epsilon_{\text{cyt } b_5} \cdot l) \cdot \text{ředění vzorku} \quad [\mu\text{M}]$$

$C_{\text{cyt } b_5}$aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy

A_xabsorbance při vlnové délce x nm

$\epsilon_{\text{cyt } b_5}$ molární absorpční koeficient cytochromu b_5 ($\epsilon = 117 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

l..... optická dráha kyvety

3.3.2 Elektromigrační metody

3.3.2.1 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Provedení elektroforesy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1 % dodecylsulfátu sodného (SDS) vycházelo z postupu popsáno v práci Laemmliho^[125].

Diskontinuální SDS elektroforesa slouží k rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. SDS obaluje molekulu proteinu uniformním záporným nábojem, který zcela překrývá její přirozený náboj. Za těchto podmínek se proteiny „dělí“ na základě své velikosti, resp. molekulové hmotnosti.

3.3.2.1.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Polyakrylamidový gel vzniká kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a síťovacího činidla, kterým je nejčastěji N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS). Pro iniciaci polymerační reakce je nutná přítomnost volných radikálů, které vznikají např. působením světla na molekuly iniciátoru persíranu amonného. Jako stabilizátor volných radikálů se používá N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED).

Mezi čistá a ethanolem odmaštěná skla zachycená v aparatuře pro přípravu gelů byl nalit **10 % separační gel** připravený smícháním 8 ml **pufaru A** (0,375 M TRIS/HCl; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,8), 4 ml polymeračního **roztoku A** (30 % akrylamid (w/v); 0,8 % BIS v pufaru A), 10 µl TEMED a malého množství (~3 mg) persíranu amonného. Bezprostředně po nalití byl gel převrstven destilovanou vodou, která byla po polymeraci vylita, a povrch gelu vysušen filtračním papírem. Separační gel byl převrstven **3 % velkoporovým gelem**, který byl připraven smícháním 6,75 ml **pufaru B** (0,125 M TRIS/HCl; 0,1 % SDS (w/v); pH 6,8), 0,75 ml polymeračního **roztoku B** (30 % akrylamid (w/v); 0,8 % BIS v pufaru B), 7,5 µl TEMED a malého množství persíranu amonného. Po nalití byl do roztoku zasunut hřeben pro vytvoření jamek k aplikaci vzorku. Po zpolymerování gelu (30 min) byl hřeben opatrně vyňat, skleněné desky umístěny do elektroforetické vany a horní i dolní elektrodový prostor vyplněn elektrodovým pufrem (0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3).

Pro elektroforesu vzorků NADPH:CYP reductasy byl používán **7,5 % separační gel**, který byl připraven smícháním 9 ml pufaru A, 3 ml polymeračního roztoku A, 7,5 µl TEMED a malého množství (~3 mg) persíranu amonného.

3.3.2.1.2 Příprava vzorků pro elektroforesu

Vzorky byly ředěny v poměru 1:1 nebo 3:1 s 2 x, respektive 4 x koncentrovaným vzorkovým redukujícím pufrem (0,063 M TRIS/HCl; 2 % SDS; 10 % glycerol; 5 % 2-merkaptoethanol; 0,003 % bromfenolová modř; pH 6,8) a povařeny 5 minut ve vodní lázni. Poté byly aplikovány mikrostříkačkou Hamilton do jamek gelu převrstvených elektrodovým pufrem.

3.3.2.1.3 Vlastní elektroforesa

Elektroforesa probíhala ve vertikálním uspořádání při napětí 80 V (pro prvních 30 min), které bylo poté zvýšeno na 150 V. Elektroforesa byla zastavena, když „čelo“, obsahující bromfenolovou modř, „doputovalo“ ke spodnímu okraji separačního gelu. Gel byl vyjmut a na 45 minut přenesen do barvicí lázně (25 % Coomassie Brilliant Blue (w/v); 46 % ethanol (v/v); 9,2 % kyselina octová (v/v)). Po obarvení byl gel odbarvován v odbarvovací lázni (25 % ethanol (v/v); 10 % kyselina octová (v/v)) přes noc a poté vysušen mezi dvěma celofánovými fóliemi.

3.3.3 Isolace cytochromu P450 2B4, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b₅

3.3.3.1 Premedikace králíka domácího fenobarbitalem (PB)

Pokusné zvíře králík domácí (*Oryctolagus cuniculus v. edulis*, VELAZ), samec o hmotnosti 2-2,5 kg, bylo chováno v plechové kleci při konstantní laboratorní teplotě 22 ± 2 °C a vlhkosti vzduchu 60 %. Bylo krmeno peletovou stravou (VELAZ), po celou dobu premedikace mu byl umožněn přístup k napajedlu *ad libidum*. Premedikace byla zahájena po týdenní aklimatizaci.

Králík byl premedikován 0,1 % fenobarbitalem v pitné vodě (w/v) po dobu 14 dní. Poté byl usmrcen a byla provedena izolace mikrosomální frakce.

3.3.3.2 Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně králíka domácího

Isolace mikrosomální frakce byla provedena diferenční centrifugací^[126]. Pokusné zvíře se nechalo nejméně 18 hodin před usmrcením hladovět pro snížení hladiny

glykogenu. Po narkotizaci pomocí CO₂ bylo zvíře usmrceno stržením vazů (M. Stiborová, ústní sdělení).

Celý postup izolace probíhal v chlazené místnosti při 5 °C a všechny použité nástroje a roztoky byly předem vychlazeny.

Vyjmutá a opláchnutá játra byla vložena do předem zváženého ledového roztoku pufru **P1** (153 mM KCl; 10 mM EDTANa₂; 0,5 mM PMSF; 50 μM vit E; pH 7,5) a z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Jaterní tkáň byla nastříhána na malé kousky a několikrát promyta puftrem P1 pro co nejdokonalejší odkrvení. Poté byla po malých dávkách homogenisována nejdříve ve volnějším, následně v těsnějším homogenisátoru dle Pottera a Elvehjema s roztokem P1, jehož celkový objem v ml odpovídá 4 x hmotnosti jaterní tkáně (g). Homogenát byl filtrován přes čtyřikrát složenou gázu.

Získané homogenáty byly odstředěny 10 minut při 2000 RPM (centrifuga Janetzki K-23, Německo) ve výkyvném rotoru 4 x 70 ml za chlazení na 4 °C. Supernatant byl uchován v chladu a sediment rehomogenisován s 1/4 původního objemu roztoku P1 a zpracován za výše uvedených podmínek.

Spojené supernatanty byly centrifugovány po dobu 20 minut při 13 000 RPM (centrifuga Janetzki K-24, Německo) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml za chlazení na 4 °C. Kyvety mohou být plněny maximálně do 2/3 výšky. Supernatant byl velmi opatrně odlit přes sediment bez kontaminace tzv. lehce sedlou vrstvou (mitochondrie).

Z takto získaného supernatantu byla připravena mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při 45 000 RPM (centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 94 ml). Supernatant po centrifugaci je cytosolární frakce. Bílý tukový povlak ze stěn kyvet byl setřen smotkem gázy. Peleta mikrosomů byla resuspendována v asi dvojnásobném množství pufru **P2** (100 mM Na₂P₄O₇·10 H₂O; 100 mM KCl; 1 mM EDTANa₂; pH 7,5).

Z homogenní suspenze byla připravena finální mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při výše uvedených podmínkách. Mikrosomální sediment byl resuspendován v pufru **P3** (0,25 mM sacharosa; 10 mM EDTANa₂; 1 mM PMSF; 250 μM vit. E; 1 mM DTT; pH 7,5) v objemu odpovídajícím 1/4 původní hmotnosti jater a rehomogenisován pomocí malého homogenisátoru. Výsledný mikrosomální preparát byl zmražen v kapalném dusíku a uschován při -80 °C, nebo byl použit pro izolaci enzymu.

3.3.3.3 Solubilizace

V izolované mikrosomální frakci byla stanovena koncentrace cytochromu P450 diferenční spektroskopii a koncentrace bílkovin metodou BCA.

Dalším nutným krokem při purifikaci membránových proteinů je jejich solubilizace z membrán ER pomocí směsi detergentů (iontový detergent cholát sodný a neiontový NP-10). Detergenty slouží k rozrušení lipidové dvojvrstvy a navázáním na membránovou část enzymu blokují hydrofóbní interakce a udržují tak protein v rozpustné formě.

Mikrosomální frakce byla ředěna solubilizačním pufrem **P4** (10 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); pH 7,4) na výslednou koncentraci proteinu 5 mg/ml. Získaná suspenze byla míchána v Erlenmayerově baňce na ledu pod atmosférou dusíku a po kapkách k ní bylo přidáno 15 mg/ml protaminsulfátu a poté z dělicí nálevky směs 10 % cholátu sodného (w/v), 0,5 M PMSF, 10 % NP-10 (w/v) do výsledné koncentrace 0,375 mg/ml protaminsulfátu, 2,5 mg cholátu sodného/mg proteinu, 0,5 mM PMSF a 0,2 % NP-10. Po přidání všech roztoků byla směs ještě 20 minut míchána za uvedených podmínek. Nerozpustné podíly byly odděleny centrifugací po dobu 65 minut (Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 94 ml, 45 000 RPM).

Supernatant byl aplikován na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B I ekvilibrovanou pufrem **AP2** (3 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % NP-10; pH 7,7).

3.3.3.4 Chromatografické metody

3.3.3.4.1 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B I

DEAE-Sepharosa (ve 20 % ethanolu (v/v)) byla před použitím promyta 3 x 350 ml destilované vody, poté rozmíchána v 200 ml cyklizačního pufru **AP1** (1 M KH₂PO₄; pH 7,7) a ponechána přes noc při 4 °C. Druhý den byl nosič opět promyt 3 x 350 ml destilované vody a poté ekvilibrován několikanásobným promícháním s ekvilibračním pufrem **AP2**. Po nalití na kolonu (v zastaveném toku) a sedimentaci nosiče byla další ekvilibrace provedena přímo v koloně. Při ekvilibraci byla zjišťována iontová síla a pH pufru před aplikací na kolonu a po jeho průchodu kolonou. Pokud se získané hodnoty příliš nelišily, byla kolona již dostatečně ekvilibrována a připravena k použití.

Na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B I (2,5 x 22,5 cm; 110 ml) byl pomocí peristaltické pumpy aplikován supernatant po solubilizaci rychlostí 1 ml/min,

zároveň byly jímány frakce po 10-15 ml a měřena absorbance při 417 nm (spektrofotometr MOM 195 D, Maďarsko, kyveta o optické dráze 1 cm). Po aplikaci vzorku byla kolona promývána pufrům AP3 (15 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % NP-10; pH 7,7) až do poklesu absorbance na nulovou hodnotu.

CYP2B4 se za daných podmínek na nosič neváže. Podle proměřeného elučního profilu a SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.2.1) frakcí odebraných před a po absorpčním maximu byly spojeny frakce obsahující CYP2B4. Spojené frakce byly dále zahuštěny (Amicon, membrána PM-30, Millipore) na 20 ml a nanесeny na ekvilibrovanou kolonu hydroxylapatitu I.

Pro eluci cytochromu b_5 byl použit lineární gradient 2 x 500 ml pufru AP4-AP5 (25-75 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol; 0,6 % NP-10; pH 7,7), průtoková rychlost 1 ml/min. Podle elučního profilu (absorbance při 413 nm) a SDS elektroforesy byly spojeny frakce obsahující cytochrom b_5 , zahuštěny (Amicon, membrána PM-10, Millipore) na 30 ml a dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru AP3.

Pro eluci NADPH:cytochrom P450 reduktasy byl použit lineární gradient 2 x 270 ml 0-0,4 M KCl v pufru AP6 (10 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol; 0,5 % NP-10; pH 6,0) při průtokové rychlosti 0,6 ml/min. Eluce enzymu byla sledována stanovením NADPH:cytochrom c reduktasové aktivity v jednotlivých frakcích (viz kapitola 3.3.1.3). Podle reduktasové aktivity byly spojeny frakce obsahující NADPH:CYP reduktasu, zahuštěny (Amicon, membrána PM-30, Millipore) na 18 ml a dialyzovány přes noc proti 2000 ml pufru AP7 (5 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 0,1 mM DTT; 0,5 % NP-10; 20 % glycerol (v/v); pH 7,0). V dialyzovaných frakcích bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 roztokem 1 M KH_2PO_4 . Takto upravené frakce byly nanесeny na ekvilibrovanou kolonu 2', 5'ADP-Sepharosy 4B.

Po použití byl nosič čištěn postupným promýváním 1 x 250 ml 1 M KCl, 1 x 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 1 x 250 ml destilované vody, 1 x 250 ml 0,5 M NaOH, 1 x 250 ml destilované vody, 1 x 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 2 x 250 ml 20 % ethanolu (v/v). Pak byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20 % ethanolu (v/v) a skladován při 5 °C.

3.3.3.4.2 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (HAPI)

Hydroxylapatit byl navážen v potřebném množství (1 g suchého hydroxylapatitu postačí pro vznik 2-3 ml nosiče), kapacita tohoto adsorbentu je 40 nmol/ml gelu. Navážený

hydroxylapatit byl rozmíchán ve vodě a nechán bobtnat přes noc při 4 °C. Druhý den byl nosič promyt 2 x 75 ml destilované vody, poté rozmíchán v minimálním objemu (10 ml) destilované vody a nalit na kolonu (se zastaveným tokem a destilovanou vodou nade dnem kolony). Po sedimentaci nosiče byla upravena hladina kapaliny tak, aby byla asi 1-2 cm nad povrchem nosiče. Kolona byla promyta nejprve 25 ml destilované vody a poté 50 ml ekvilibračního pufru **HP1** (3 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % NP-10; pH 7,7), rychlostí 15 ml /hod.

Na ekvilibrovanou kolonu hydroxylapatitu I (1,4 x 10 cm; 15 ml) puftrem **HP1** byly nanесeny spojené frakce po chromatografii na DEAE-Sepharose CL6B I obsahující CYP2B4 rychlostí 10 ml/hod, zároveň byly sbírány frakce po 2 ml a měřena absorbance při 417 nm (spektrofotometr MOM 195 D, Maďarsko, kyveta o optické dráze 1 cm). Po nanесení vzorku byla kolona promyta puftrem **HP2** (5 mM NaH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); 0,4 % NP-10; pH 7,5) do poklesu absorbance na základní hladinu.

Pro eluci CYP2B4 byl použit lineární gradient 2 x 300 ml 10-300 mM NaH_2PO_4 v pufru **HP3** (1 mM EDTANa_2 , 20 % glycerol (v/v); 0,6 % NP-10; pH 7,5). Po proměření elučního profilu a SDS-elektroforese jednotlivých frakcí byly frakce obsahující CYP2B4 spojeny, zahuštěny (Amicon, membrána PM-30, Millipore) na 10 ml a dialysovány proti 2000 ml pufru **HP4** (10 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); pH 7,5).

Takto získaný preparát byl nanесen na kolonu hydroxylapatitu II.

Po použití není nosič regenerován, je dále nepoužitelný.

3.3.3.4.3 Chromatografie na koloně hydroxylapatitu (HAPII)

Příprava nosiče je shodná s *kap. 3.3.3.4.2*.

Na ekvilibrovanou kolonu hydroxylapatitu II (1,8 x 15 cm; 25 ml nosiče) puftrem **HP5** (10 mM KH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % NP-10; pH 7,5) byly nanесeny spojené a dialysované frakce po chromatografii na koloně HAPI rychlostí 4 ml/hod a zároveň byly sbírány frakce po 2 ml a měřena absorbance při 417 nm (spektrofotometr MOM 195 D, Maďarsko, kyveta o optické dráze 1 cm). Po nanесení vzorku byla kolona promyta puftrem **HP6** (12 mM NaH_2PO_4 ; 1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); 0,3 % NP-10; pH 7,5).

Pro eluci CYP2B4 byl použit lineární gradient 2 x 300 ml 15-300 mM NaH_2PO_4 v pufru **HP7** (1 mM EDTANa_2 ; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % NP-10; pH 7,5). Po proměření elučního profilu a SDS-elektroforese jednotlivých frakcí byly frakce obsahující CYP2B4

spojeny, zahuštěny (Amicon, membrána PM-30, Millipore) a dialyzovány proti 2000 ml pufru HP4.

3.3.3.4.4 Rechromatografie na koloně hydroxylapatitu (HAPIII)

Příprava nosiče je shodná s *kap. 3.3.3.4.2.*

Rechromatografie na koloně hydroxylapatitu III je závěrečným krokem v purifikaci CYP2B4 a slouží zejména k odstranění detergentu z enzymového preparátu.

Na ekvilibrovanou kolonu HAP III (1,4 x 6,5 cm; 10 ml nosiče) puftrem **HP8** (10 mM NaH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný; pH 7,5) byly naneseny spojené frakce po chromatografii na HAPII obsahující CYP2B4. Po nanesení vzorku byla kolona promývána puftrem **HP9** (15 mM NaH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 20 % glycerol (v/v); pH 7,5) až do poklesu absorbance při 280 nm na nulovou hodnotu. CYP2B4 byl z kolony eluován izokraticky puftrem **HP10** (300 mM NaH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 20 % glycerol (v/v); 0,1 % cholát sodný; pH 7,5). Na závěr byl proměřen eluční profil a po SDS–elektroforese jednotlivých frakcí byly frakce obsahující CYP2B4 spojeny, zahuštěny (Amicon, membrána PM-30, Millipore) a dialyzovány proti 2000 ml pufru **HP11** (50 mM KH₂PO₄; 20 % glycerol; pH 7,5).

Takto získaný finální preparát byl zmražen v malých alikvotech v Eppendorfových mikrozkuvkách v kapalném dusíku a uschován při -80 °C.

3.3.3.4.5 Chromatografie NADPH:CYP reduktasy na koloně 2',5'ADP-Sepharosy 4B

2',5'ADP-Sepharosa (10 ml, ve 20 % ethanolu(v/v)) byla před použitím promyta 2 x 25 ml destilované vody, poté rozmíchána v 10 ml destilované vody a nalita do kolony (se zastaveným tokem a hladinou destilované vody nad dnem kolony). Po sedimentaci nosiče byla upravena hladina kapaliny v koloně tak, aby byla asi 1-2 cm nad povrchem nosiče. Kolona byla promyta nejprve 25 ml destilované vody a poté 50 ml ekvilibračního pufru **DP1** (50 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol; 0,5 % cholát sodný; pH 7,0) rychlostí 15 ml/hodinu.

Na ekvilibrovanou kolonu 2',5'ADP-Sepharosy 4B (1,4 x 6,5 cm; 7 ml) byly naneseny spojené frakce po chromatografii na DEAE-Sepharose CL6B I obsahující NADPH:CYP reduktasu s pH upraveným na 7,0 rychlostí 10 ml/hod. Zároveň byly jímány frakce po 1 ml a měřena aktivita NADPH:CYP reduktasy v jednotlivých frakcích. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml pufru **DP1**. Pro eluci NADPH:CYP reduktasy byl použit pufr **DP2** (0,5 mM NADP⁺; 0,2 M KCl; 50 mM KH₂PO₄; 1 mM

EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol (v/v); 0,5 % cholát sodný (w/v); pH 7,5). Frakce, jejichž reduktasová aktivita dosahovala alespoň 1/10 maximální aktivity, byly spojeny a zahuštěny (Amicon, membrána PM-30, Millipore). K preparátu byl přidán jeho koenzym FMN v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 μM a poté dialyzován 12 hodin proti 2 x 2000 ml pufru **DP3** (50 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 20 % glycerol; pH 7,5). U takto získaného preparátu byla stanovena aktivita NADPH:CYP reduktasy. Finální produkt byl zmražen v malých alikvotech v kapalném dusíku a uschován při -80 °C.

Po použití byl nosič čištěn postupným promytím 25 ml 0,5 M TRIS/HCl; 25 ml 0,5 M NaCl pH 8,5; 25 ml destilované vody; 25 ml 0,5 M octan sodný; 0,5 M NaCl pH 4,5; 25 ml destilované vody. Tento postup byl opakován ještě jednou a pak byl nosič promyt 25 ml destilované vody a 2 x 25 ml 20 % ethanolu. Nakonec byl nosič rozmíchán v 10 ml 20 % ethanolu a uchováván při 4 °C.

3.3.3.4.6 Chromatografie cytochromu b₅ na koloně DEAE-Sepharosy CL6B II

Na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B II (1,4 x 15 cm, 20 ml) ekvilibrovanou puftrem AP3 byly aplikovány frakce po chromatografii na DEAE-Sepharosy CL6B I obsahující cytochrom b₅ rychlostí 30 ml/hod. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 100 ml pufru **AP4*** (15 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTANa₂; 0,1 % cholát sodný; 20 % glycerol; pH 7,7). Eluce cytochromu b₅ byla provedena puftrem **AP5*** (200 mM KH₂PO₄; 200 mM KCl; 0,1 mM EDTANa₂; 0,1 % cholát sodný; 20 % glycerol; pH 7,7). Během eluce byly sbírány frakce po 5 ml a měřena absorbance při 413 nm (spektrofotometr MOM 195 D, Maďarsko, kyveta o optické dráze 1 cm). Po proměření elučního profilu separovaných proteinů a provedení SDS elektroforesy byly spojeny frakce obsahující cytochrom b₅. Finální preparát byl zahuštěn na 4 ml a dialyzován 2 x 8 hodin proti 2000 ml pufru **AP6*** (50 mM KH₂PO₄; 20 % glycerol; 0,1 mM DTT; pH 7,7). Takto upravený finální preparát cytochromu b₅ byl zmražen v malých alikvotech v kapalném dusíku a uschován při -80 °C.

3.3.4 Studium oxidace ellipticinu cytochromy P450

3.3.4.1 Studium oxidace ellipticinu izolovanými cytochromy P450 3A6 a 2B4 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou

3.3.4.1.1 Příprava rekonstituovaného systému

Isolované cytochromy P450 jsou bez spolupůsobení NADPH:CYP reduktasy nefunkční, proto byl vytvořen rekonstituovaný systém obsahující kromě CYP také NADPH:CYP reduktasu a DLPC, který vytváří liposomy a simuluje tím prostředí membrány endoplasmatického retikula. Společně jednotlivé složky vytváří funkční MFO systém obsahující jedinou isoformu CYP.

Pro rekonstituci byly použity tyto izolované králičí enzymy CYP2B4, CYP3A6, NADPH:CYP reduktasa a cytochrom b₅.

Jejich koncentrace jsou uvedeny v **tabulce I**:

Tab. I: *Koncentrace a aktivita izolovaných enzymů použitých pro rekonstituce*

NADPH:CYP reduktasa	14,2 $\mu\text{mol}_{\text{cyt}}/\text{ml} \cdot \text{min}$
CYP2B4	58,7
CYP3A6	7,2
cytochrom b ₅	58,8

3.3.4.1.1.1 Vliv koncentrace CYP na oxidaci ellipticinu

Rekonstituovaný systém o celkovém objemu 50 μl byl připraven o výsledném složení:

- 12,5; 25; 50 pmol cytochrom P450, v případě CYP3A6 i 100 a 150 pmol
- 50 pmol NADPH:CYP reduktasa
- 0,05 mg/ml CHAPS (0,5 mg/ml v pufru HEPES)
- 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml v chloroformu)
- 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok v H₂O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H₂O; pH 7,4)

3.3.4.1.1.2 Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu

Výsledné složení rekonstituovaného systému v celkovém objemu 50 µl bylo:

- 12,5; 25; 50 pmol cytochrom P450, v případě CYP3A6 i 100 a 150 pmol
- 50 pmol NADPH:CYP reduktasa
- 37,5; 75; 150 pmol cytochromu b₅, v případě CYP3A6 i 300 a 450 pmol (CYP : cytochrom b₅ = 1 : 3)
- 0,05 mg/ml CHAPS (0,5 mg/ml v pufru HEPES)
- 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml v chloroformu)
- 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok v H₂O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H₂O; pH 7,4)

Pod atmosférou dusíku byl ve skleněných zkumavkách nejdříve odpařen dosucha roztok DLPC v chloroformu o koncentraci 5 mg/ml tak, že se na dně a stěnách zkumavky vytvořila vrstvička tohoto lipidu. Poté byly přidány do zkumavek připravené zásobní roztoky detergentu CHAPS (1 mg/ml), glutathionu (30 mM), pufru HEPES (500 mM; pH 7,4 upraveno pomocí KOH) a H₂O v takovém množství, aby výsledné koncentrace v rekonstituovaném systému odpovídaly výše uvedenému složení. Směsi byly sonikovány 2 x 3 minuty (Elmasonic E 30 H, P-Lab), což přispívá k snadnější tvorbě liposomů. Dále k nim bylo přidáno 12,5; 25; 50; (100; 150) pmol cytochromu P450, 50 pmol NADPH:cytochrom P450 reduktasy (**Tab. II, str. 45**), při studiu vlivu cyt b₅ (*kap. 3.3.4.1.1.2*) též 37,5; 75; 150; (300; 450) pmol cytochromu b₅. Směsi byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce IKA VX 2. Takto připravené rekonstituované systémy byly použity pro inkubace s ellipticinem.

Tab. II: Příprava rekonstituovaného systémuCelkový objem rekonstituovaného systému 50 μ l.

Zásobní roztok	5 mg/ml	500 mM	30 mM			14,2 μ M	58,8 μ M	
Výsledná koncentrace	1 mg/ml	50 mM	3 mM		12,5-150 pmol	50 pmol	0-450 pmol	
CYP3A6	10	5	5	34,7	1,8	3,5	0	12,5
CYP3A6	10	5	5	32,9	3,6	3,5	0	25
CYP3A6	10	5	5	29,3	7,2	3,5	0	50
CYP3A6	10	5	5	22,2	14,3	3,5	0	100
CYP3A6	10	5	5	15,0	21,5	3,5	0	150
CYP2B4	10	5	5	35,4	1,1*	3,5	0	12,5
CYP2B4	10	5	5	34,4	2,15*	3,5	0	25
CYP2B4	10	5	5	32,2	4,3*	3,5	0	50
CYP3A6	10	5	5	34,1	1,8	3,5	0,65	12,5
CYP3A6	10	5	5	31,6	3,6	3,5	1,3	25
CYP3A6	10	5	5	26,8	7,2	3,5	2,55	50
CYP3A6	10	5	5	17,1	14,3	3,5	5,1	100
CYP3A6	10	5	5	7,4	21,5	3,5	7,65	150
CYP2B4	10	5	5	34,8	1,1*	3,5	0,65	12,5
CYP2B4	10	5	5	33,1	2,15*	3,5	1,3	25
CYP2B4	10	5	5	29,7	4,3*	3,5	2,55	50

*Pro snadnější manipulaci byl CYP2B4 před použitím 5 x zředěn fosfátovým pufrem na $c=11,76 \mu$ M

3.3.4.1.2 Inkubace ellipticinu s rekonstituovaným systémem

Inkubační směsi byly připraveny vždy v dubletech o celkovém objemu 500 μ l a následujícím složení :

- 25, 50, 100 nM CYP v rekonstituovaném systému, v případě CYP3A6 i 200 a 300 nM

- 10 μM ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS)
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

Všechny složky byly přidávány do směsi v množství odpovídajícím výše uvedeným koncentracím. Reakce byla startována přidáním 50 μl NADPH-generujícího systému. Roztoky byly inkubovány v otevřených Eppendorfových zkumavkách za stálého třepání 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Germany) po dobu 20 minut při 37 °C. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 5 μl fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a ellipticinové metabolity byly intenzivním třepáním extrahovány ethylacetátem (2 x 1 ml, 2 min, 1,400 RPM, Vortex MS2 Minishaker, Schoeller Pharma). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 3 min při 13000 RPM (centrifuga MSE MicroCentaur, Sanyo UK). Horní, organická vrstva byla odebrána (2 x 750 μl) a v digestoři odpařena dosucha. Vzorky byly před analýzou uchovány při teplotě -20 °C.

Vzorky byly rozpuštěny ve 20 μl methanolu a analysovány pomocí HPLC.

3.3.4.2 Studium oxidace ellipticinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 a 2B6

Pro studium oxidace ellipticinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 byly použity mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných Baculovirem (SupersomesTM), exprimující lidský rekombinantní CYP3A4 nebo CYP2B6 s NADPH:CYP reduktasou a v některých případech je exprimován navíc i cytochrom b_5 .

Koncentrace rekombinantních enzymů jsou uvedeny v **tabulce III**:

Tab. III: Koncentrace rekombinantních cytochromů P450 použitých pro inkubace

CYP3A4	2
CYP2B6	1
CYP3A4 + b_5	1
CYP2B6 + b_5	1

Inkubační směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ o celkovém objemu 250 μ l a následujícím složení :

- 25, 50, 100 nM CYP
- 10 μ M ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM $MgCl_2$; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM $NADP^+$; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS)
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

Postup inkubace je shodný s postupem v kapitole 3.3.4.1.2.

3.3.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Separace metabolitů ellipticinu vzniklých v inkubačních směsích byla provedena pomocí HPLC za použití mobilní fáze s kyselinou 1-heptansulfonovou (64 % methanol; 5 mM kyselina 1-heptansulfonová; 32 mM kyselina octová). Před použitím byly vždy z mobilní fáze odstraněny bubliny sonikací v ultrazvukové lázni. Byla použita kolona Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Beckman) s průtokem mobilní fáze 0,7 ml/minutu. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 313 nm a 37 °C. Pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

3.3.6 Hmotnostní spektrometrie MALDI –TOF

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda pro určování hmotností molekul a jejich částí, ionizovaných na kladné nebo záporné ionty.

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight) ionizuje biomolekuly pomocí přenosu energie matricí (nízkomolekulární organická látka) z laseru na biomolekulu^[127]. Jako matrice se využívají látky s absorpčním maximem blízkým vlnové délce laseru (N_2 , 337 nm) jako například kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina ferulová nebo kyselina 2,5-dihydroxybenzoová. V uspořádání MALDI-TOF jsou pak v analyzátoru TOF (Time of Flight) určeny efektivní hmoty m/z z doby letu vzniklých iontů. (Měřeno RNDr. M. Šulcem, PhD., v laboratořích MBÚ AV ČR, Praha 4).

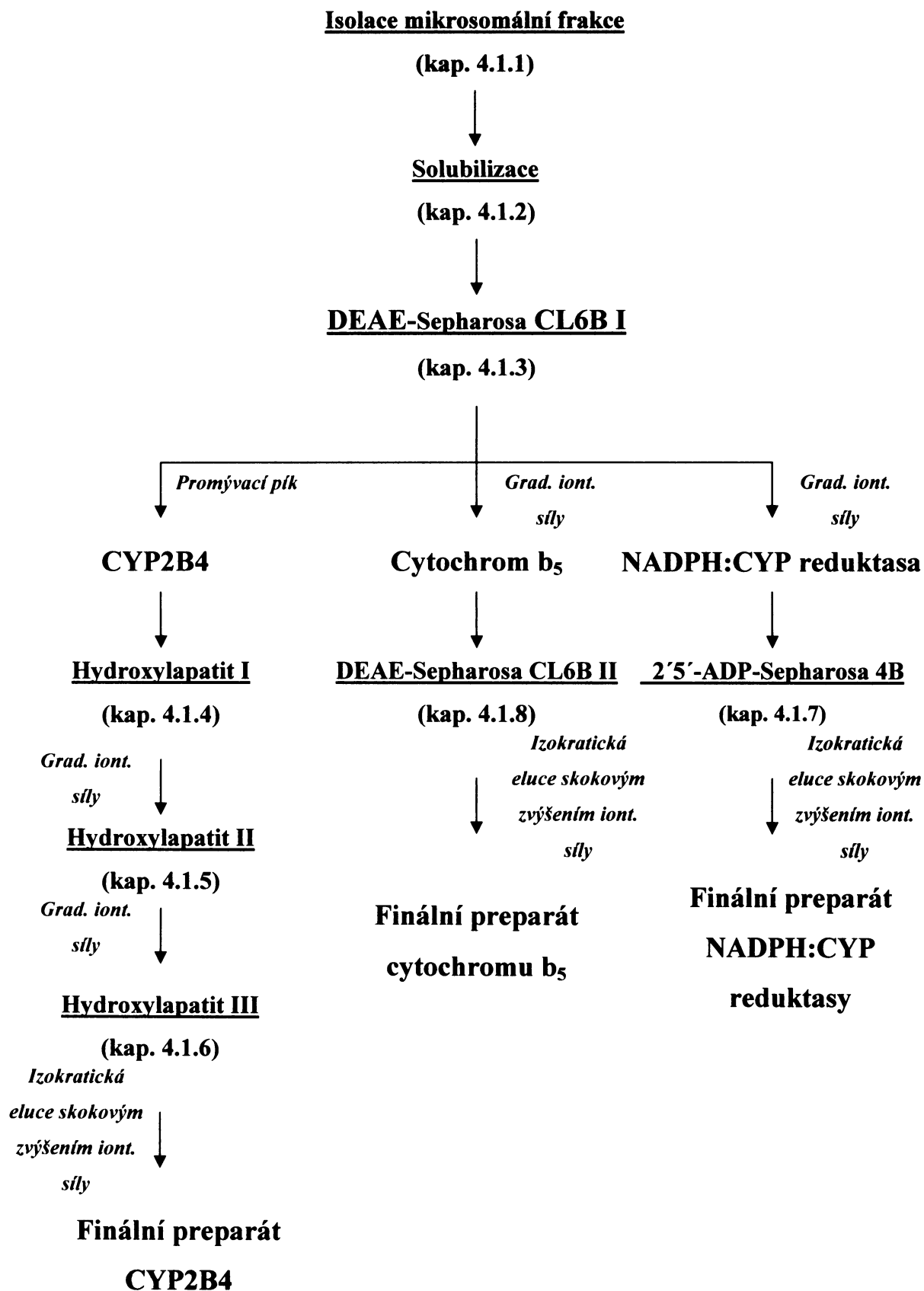
4 VÝSLEDKY

4.1 Isolace cytochromu P450 2B4, NADPH:cytochrom P450 reductasy a cytochromu b₅

Ke studiu metabolismu ellipticinu jednotlivými isoformami CYP rekonstituovanými s NADPH:CYP reductasou v rámci této diplomové práce byly použity izolované enzymy CYP2B4, CYP3A6, NADPH:CYP reductasa a cytochrom b₅.

Jelikož cytochrom P450 2B4 nebyl v laboratoři, kde byla diplomová práce vypracována, k dispozici, část diplomové práce byla věnována izolaci tohoto enzymu a společně s ním i NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅, neboť tyto enzymy jsou izolovány ze stejného výchozího materiálu postupem bezprostředně navazujícím. Cytochrom P450 3A6 byl v laboratoři izolován v rámci předchozích studií.

Postupnou purifikaci enzymů MFO systému znázorňuje schéma na **obr. 11**:

Obr. 11: Schéma izolace CYP2B4, NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅

4.1.1 Isolace mikrosomální frakce

K izolaci CYP2B4, NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅ byly použity mikrosomy z jater králíka premedikovaného fenobarbitalem (*kap. 3.3.3.1*), který je induktorem podrodiny CYP2B^[22].

Mikrosomy byly izolovány dle postupu v *kapitole 3.3.3.2*. Koncentrace cytochromu P450 v mikrosomech byla stanovena postupem popsaným v *kapitole 3.3.1.2* a činila **57,6 μM**, což odpovídá celkovému látkovému množství **1325 nmol** (**tab. IV, str. 65**). Aktivita NADPH:cytochrom P450 reductasy byla stanovena postupem v *kapitole 3.3.1.3* a měla hodnotu **4,3 μmol_{cyt} /min.ml**, v celkovém objemu **98,9 μmol_{cyt} /min** (**tab. V, str. 66**). Koncentrace proteinů stanovená metodou BCA (*viz kap. 3.3.1.1.1*) byla **39,0 mg/ml**.

4.1.2 Solubilisace

Dalším krokem při izolaci těchto enzymů byla jejich solubilisace pomocí detergentů (*kap. 3.3.3.3*).

Supernatant, získaný centrifugací solubilizátu, o objemu **205 ml** obsahoval CYP o koncentraci **9,0 μM**, tedy přibližně **1837 nmol CYP**, což odpovídá výtěžku **139 %** původně obsaženého cytochromu P450 v mikrosomech (**tab. IV, str. 65**). Aktivita NADPH:CYP reductasy dosáhla **132 %** původní aktivity, tj. **0,6 μmol_{cyt} /min.ml**, (v celkovém objemu pak **132,0 μmol_{cyt} /min**) (**tab. V, str. 66**). V solubilizátu byly enzymy „naředěny“ a dostaly se do prostředí, ve kterém byly přístupnější k jejich stanovení. Proto je možné, že jejich výtěžek byl vyšší než v mikrosomální frakci.

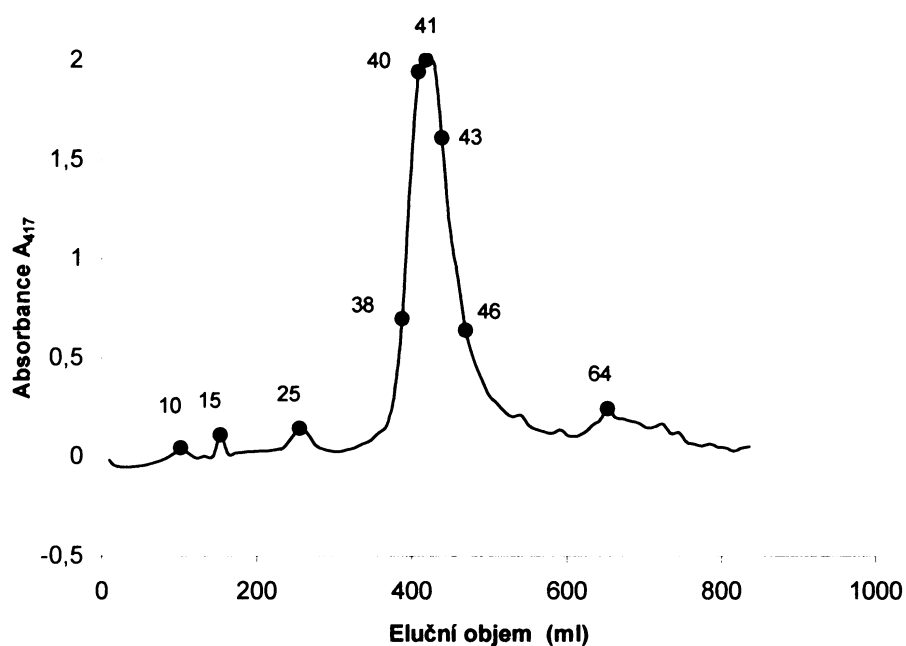
Solubilisát byl postupně nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B I.

4.1.3 Chromatografie mikrosomálních proteinů na koloně DEAE-Sepharosy CL6B I

Chromatografie na tomto iontoměničiči byla provedena postupem popsaným v *kapitole 3.3.3.4.1*, přičemž byla v jednotlivých frakcích sledována absorbance při 417 nm a 413 nm

(spektrofotometr MOM 195 D, Maďarsko, kyveta o optické délce 1 cm). Měřena byla též aktivita NADPH:CYP reductasy (viz kap. 3.3.1.3).

Cytochrom P450 2B4 se za daných podmínek na nosič neváže, jelikož je v daném pH kladně nabitý, a tudíž s anexovým nosičem neinteraguje. Je eluován již při promývání kolony (**Obr. 12**).



Obr. 12: Eluce frakcí obsahujících CYP2B4 při promývání kolony DEAE-Sepharosy CL6B I (čísla udávají frakce použité na elektroforesu)

Čistota frakcí z okolí maxima A₄₁₇ elučního profilu byla kontrolována na SDS-PAGE (**Obr. 13**, str. 52), na jejímž základě byly spojeny frakce 35-50 nanášecího píku obsahující CYP2B4, které odpovídají elučnímu objemu 357–510 ml.

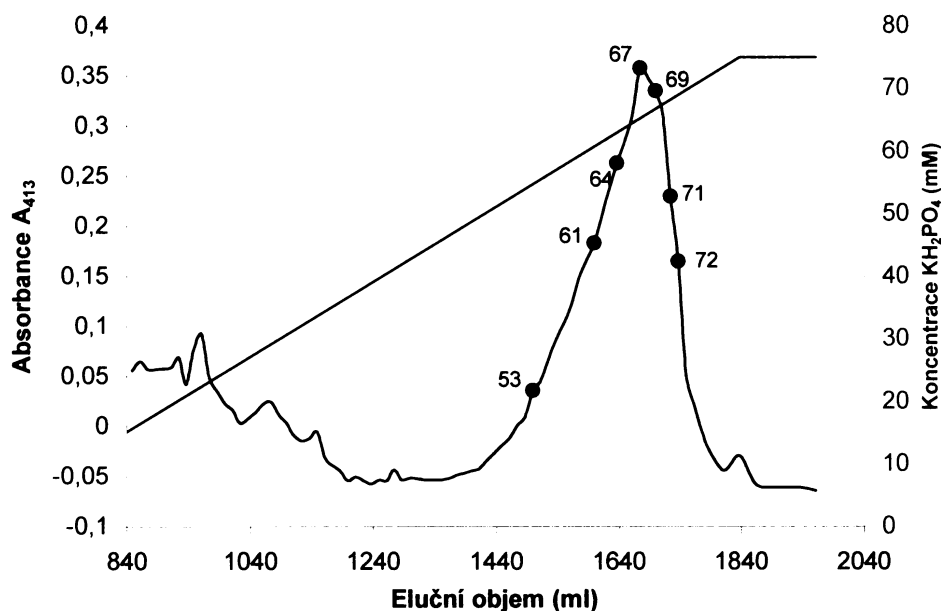
Tyto spojené frakce byly zahuštěny na membráně Amicon, PM-30, Millipore na objem 20 ml.

Po stanovení CYP (koncentrace $c = 26,43 \mu\text{M}$, látkové množství $n = 529 \text{ nmol}$, výtěžek 40 %, viz tab. IV, str. 65) byly zahuštěné frakce naneseny na ekvilibrovanou kolonu hydroxylapatitu I.

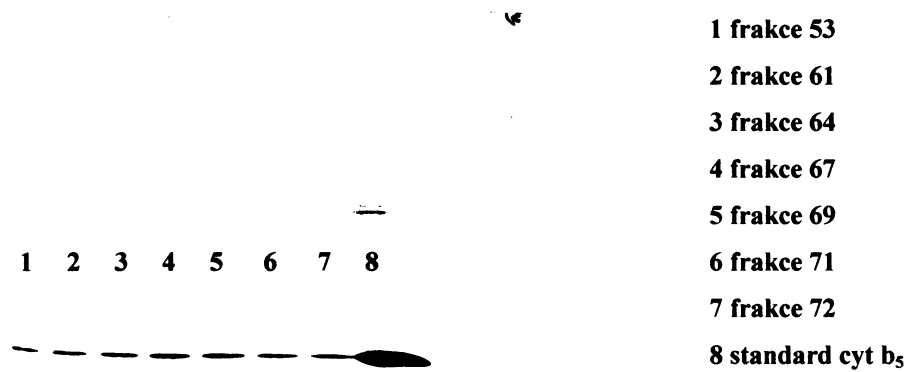


Obr. 13 : SDS-PAGE frakcí CYP2B4 eluovaných při promývání kolony DEAE-Sepharosy CL6B I

K eluci cytochromu b_5 , který je stejně jako NADPH:CYP reduktasa na kolonu vázán, byl použit vzrůstající lineární gradient iontové síly 25-75 mM KH_2PO_4 v 2 x 500 ml pufru AP4-AP5. Po proběhnutí gradientu byla kolona stále zbarvena navázaným enzymem, proto jsme přistoupili k použití izokratické eluce. Použit byl 75 mM KH_2PO_4 pufr AP5.



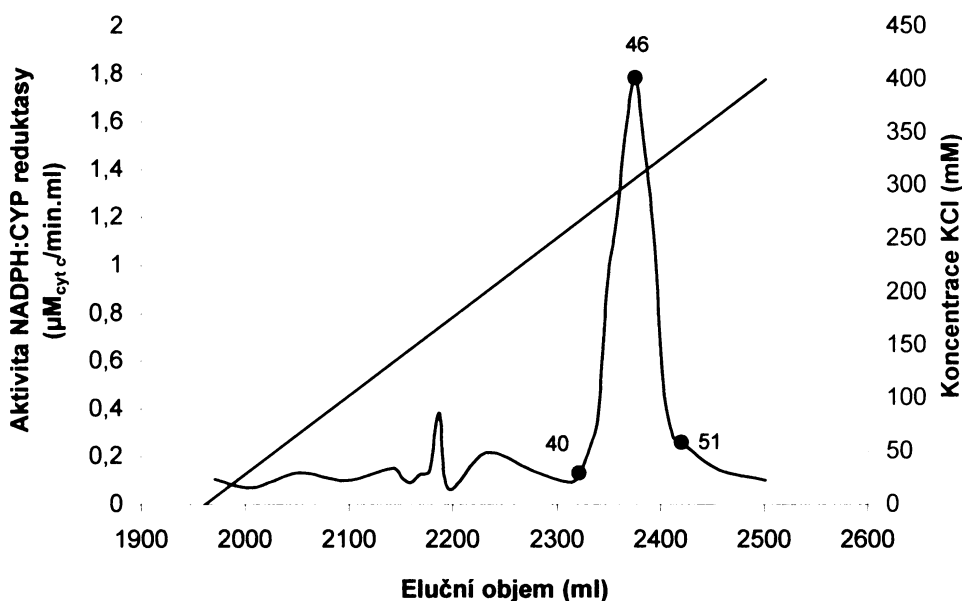
Obr. 14: Eluce cytochromu b_5 z kolony DEAE-Sepharosy CL6B I lineárním gradientem iontové síly (25–75 mM KH_2PO_4), čísla udávají frakce použité na elektroforesu



Obr. 15: SDS-PAGE frakcí po chromatografii cyt b₅ na DEAE-Sepharose CL6BI

Jak je patrné z SDS-elektroforesy (**Obr. 15**) frakcí eluovaných při tomto gradientu (**Obr. 14**), téměř „čistý“ cytochrom b₅ byl obsažen ve frakcích 53-74 (eluční objem 1498,9-1761,4 ml). Jedinou kontaminantou je protein v horní části gelu, který je přítomem ve všech vzorcích téměř v neměnném množství. Pravděpodobně se jedná o dimerní formu cyt b₅.

Tyto frakce byly spojeny a zahuštěny na membráně Amicon, PM-10, Millipore na objem 30 ml a dialyzovány přes noc proti pufru AP3. Tento preparát byl následně aplikován na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B II.



Obr. 16: *Eluce NADPH:CYP reductasy na koloně DEAE-Sepharosy CL6B I lineárním gradientem iontové síly (0–400 mM KCl), čísla 40 a 51 naznačují rozmezí frakcí, ve kterých byla NADPH:CYP reductasa nejvíce obsažena a číslo 46 značí frakci o nejvyšší aktivitě NADPH:CYP reductasy*

Ze zjištěných hodnot aktivity NADPH:CYP reductasy frakcí po gradientu (0–400 mM KCl) na DEAE-Sepharose CL6B I je patrné, že je tento enzym přítomen zejména ve frakcích 40 až 51 (eluční objem 2321,4 až 2420,4 ml) (Obr. 16). Tyto frakce byly spojeny, zahuštěny (Amicon, PM-30, Millipore) a dialysovány proti pufru AP7 (viz kap. 3.3.3.4.1). Poté byly použity pro další purifikaci reductasy na koloně 2',5' ADP-Sepharosy 4B.

Frakce byly zahuštěny na 17,5 ml a aktivita NADPH:CYP reductasy zde činila 3,2 μmol_{cyt} /min.ml, v celkovém objemu pak 56,4 μmol_{cyt} /min. Chromatografií na DEAE-Sepharose CL6B I jsme tedy získali 56 % původní aktivity NADPH:CYP reductasy (tab. V, str. 66).

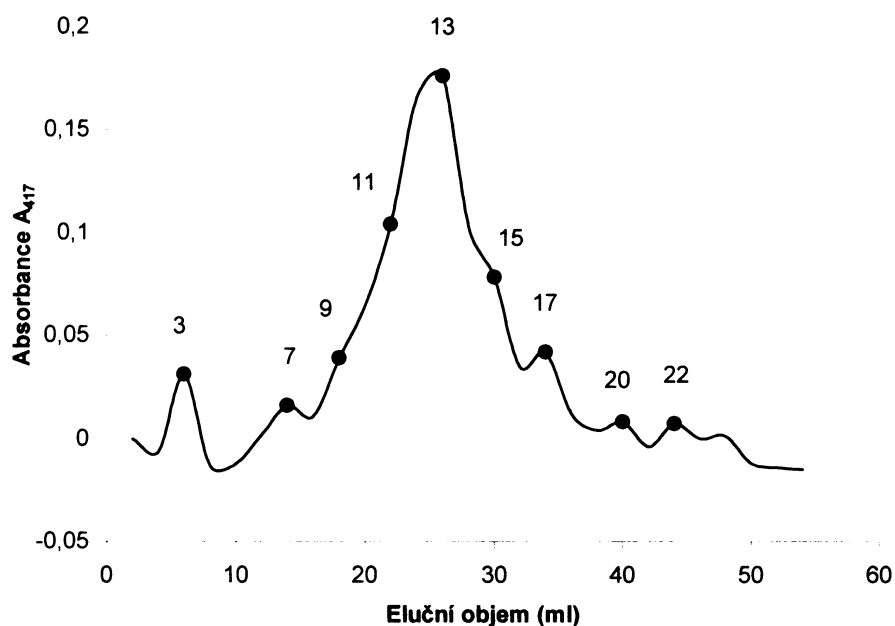
Chromatografií na koloně DEAE-Sepharosy CL6B I bylo dosaženo částečného „načištění“ CYP2B4 a odstranění části kontaminujících proteinů. Zejména díky použití

velmi mírného gradientu při eluci cyt b₅ došlo k dobré separaci proteinů a oddělení téměř čistého cyt b₅.

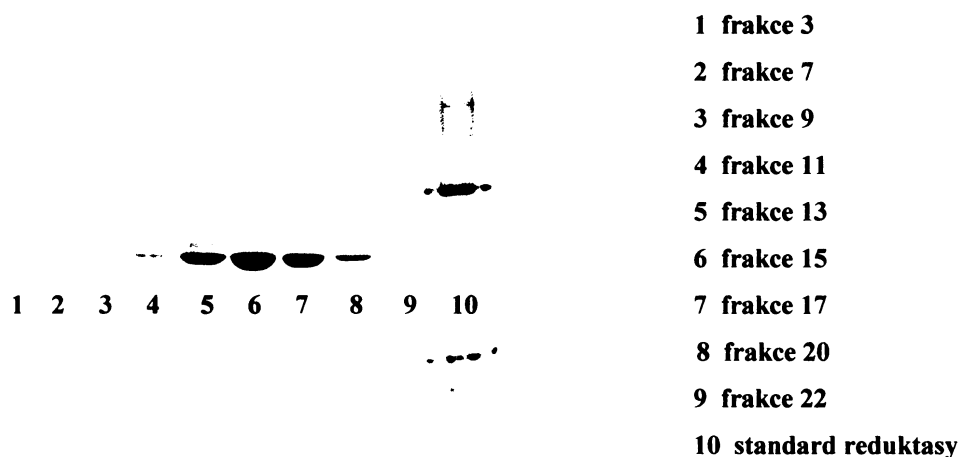
4.1.4 Chromatografie CYP2B4 na koloně hydroxylapatitu I

Chromatografie cytochromu P450 2B4 na hydroxylapatitu byla provedena postupem popsaným v kapitole 3.3.3.4.2.

Již při promývání této kolony ekvilibračním pufrem byl eluován **protein (Obr. 17)** s pracovním označením **X**. Podle jeho výrazně žlutého zbarvení jsme se domnívali, že se pravděpodobně nejedná o hemoprotein. SDS-elektroforesa prokázala poměrně vysokou čistotu těchto frakcí (**Obr. 18**). Tento protein byl později identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF jako **epoxid hydrolasa**.

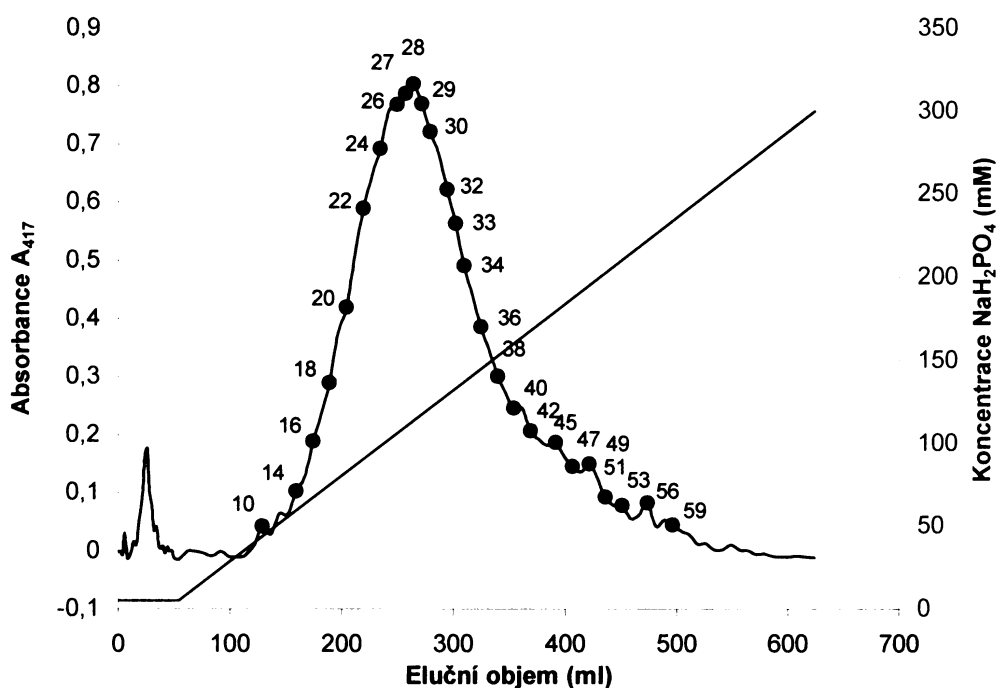


Obr. 17: *Chromatografie na koloně HAP I, eluce proteinu X při promývání kolony (čísla udávají frakce použité na SDS-PAGE)*

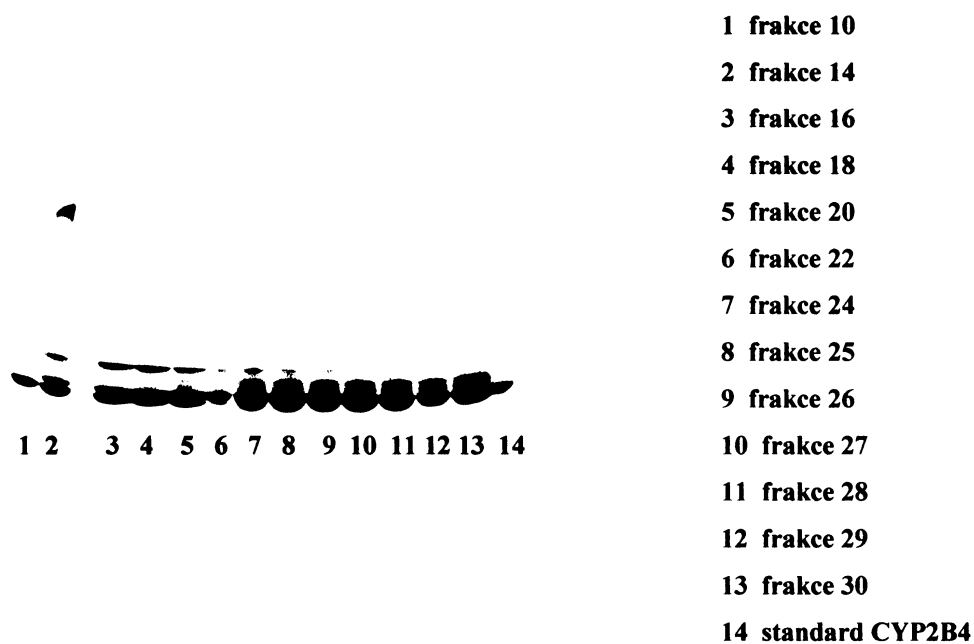


Obr. 18: SDS-PAGE frakcí získaných při promývání kolony HAPI

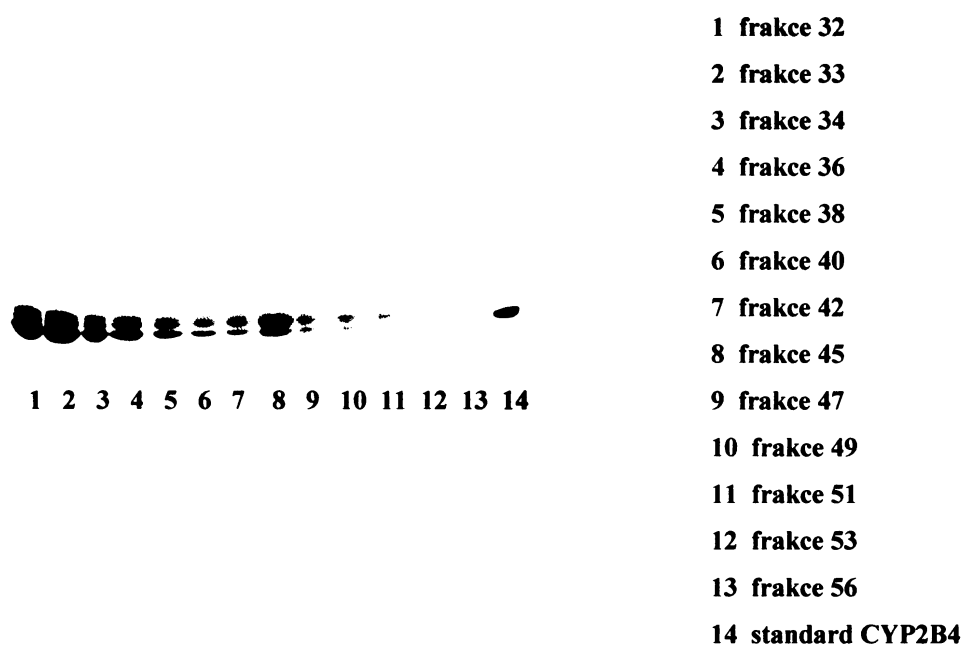
Navázaný CYP byl z nosiče eluován lineárním gradientem 2 x 300 ml 10-300 mM NaH_2PO_4 v pufru HP3 (**Obr. 19**). Ve frakcích o objemu 7,5 ml jímáných v průběhu gradientu, byla opět sledována absorbance při 417 nm. Obsah a čistota eluovaných proteinů ve frakcích s nejvyšší absorbancí byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (**Obr. 20 a 21**).



Obr. 19: Eluce CYP2B4 na koloně HAP I lineárním gradientem iontové síly 10–300 mM NaH_2PO_4 (čísla udávají frakce použité na elektroforesu)



Obr. 20: SDS-PAGE frakcí eluovaných při purifikaci CYP2B4 na koloně HAPI
(1. část)



Obr. 21: SDS-PAGE frakcí eluovaných při purifikaci CYP2B4 na koloně HAPI
(2. část)

Jak je z výsledků patrné, nedošlo k dostatečné separaci proteinů a frakce obsahující CYP2B4 jsou stále kontaminovány jinými proteiny. K další purifikaci byla proto použita delší kolona hydroxylapatitu (HAPII) a pozvolnější gradient iontové síly.

Frakce 24 až 36 (eluční objem 180 až 270 ml) obsahující nejvíce „načištěné“ CYP2B4 byly spojeny, zahuštěny na membráně Amicon, PM-30, Millipore na celkový objem 10 ml a dialyzovány proti pufru HP4 (kapitola 3.3.3.4.2).

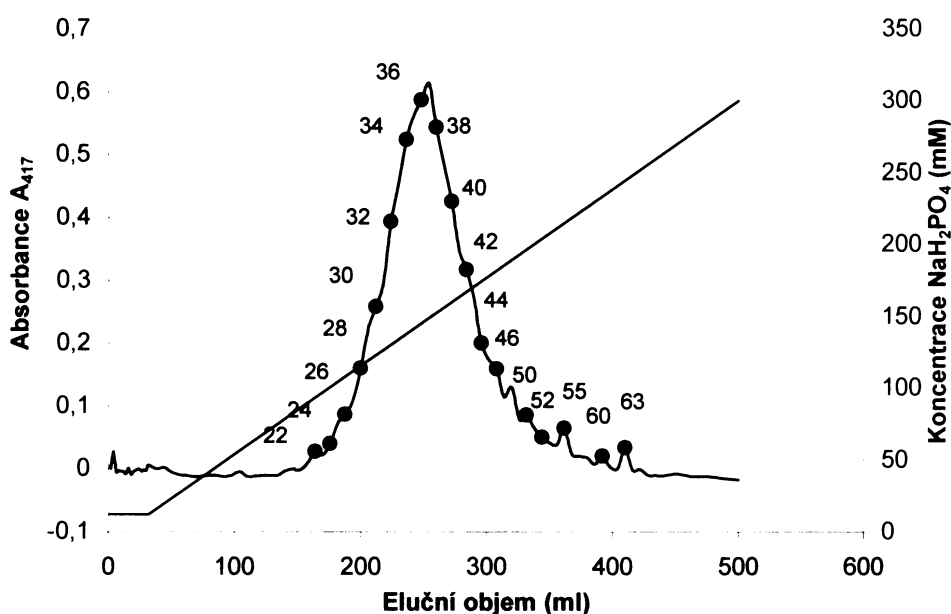
Koncentrace CYP v zahuštěných frakcích byla 16,5 μM , což odpovídá 165 nmol. Výtěžek byl tedy 12,5 % (tab. IV, str. 65).

Takto připravený preparát byl dále purifikován chromatografií na koloně hydroxylapatitu II (HAPII).

4.1.5 Chromatografie CYP2B4 na koloně hydroxylapatitu II

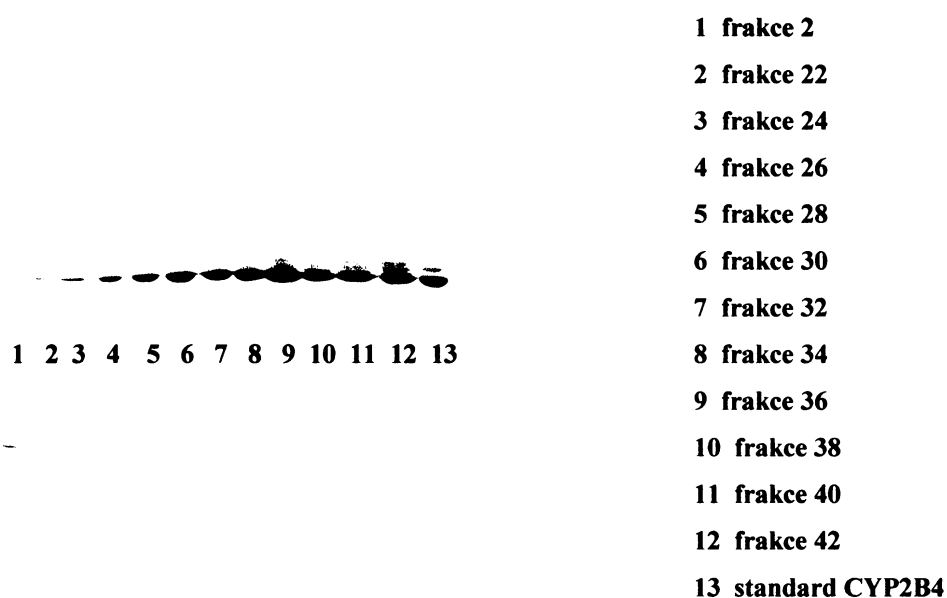
Na základě elučního profilu a elektroforezy bylo patrné, že jsou v preparátu přítomny příměsi balastních proteinů, proto jsme zvolili delší kolonu hydroxylapatitu a pozvolnější gradient 2 x 350 ml 15-300 mM NaH_2PO_4 v pufru HP7, aby došlo k lepší separaci proteinů (Obr. 22).

Postup chromatografie na této koloně byl totožný s postupem v kapitole 3.3.3.4.3. V jednotlivých frakcích byla opět sledována absorbance při 417 nm.

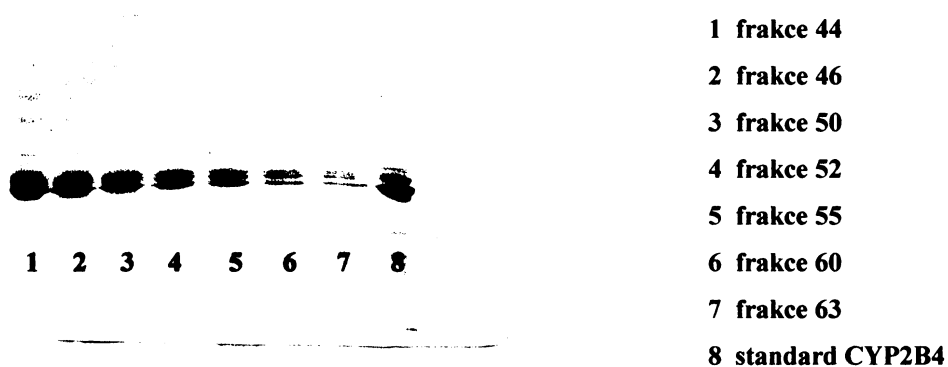


Obr. 22: Eluce CYP2B4 na koloně HAPII lineárním gradientem iontové síly 15–300 mM NaH_2PO_4 (čísla označují frakce použité na elektroforesu)

Po proměření elučního profilu a SDS–elektroforese (**Obr. 23 a 24**) jsme zahustili spojené frakce **26–44** (eluční objem **188–296 ml**) na objem **6 ml** a dialyzovali proti pufru HP4 (*kapitola 3.3.3.4.3*). V takto získaném preparátu byla stanovena koncentrace CYP2B4 rovna **14,7 μM** , což odpovídá látkovému množství **162 nmol** a výtěžku **12,2 %**.



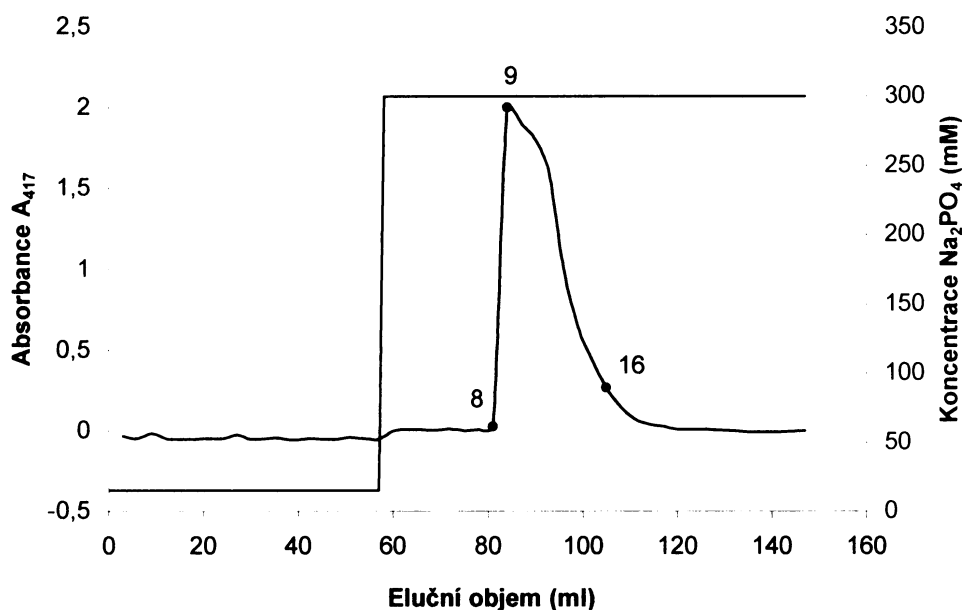
Obr. 23: SDS-PAGE frakcí eluovaných při purifikaci CYP2B4 na koloně HAPII
(1.část)



Obr. 24: SDS-PAGE frakcí eluovaných při purifikaci CYP2B4 na koloně HAPII
(2. část)

4.1.6 Rechromatografie CYP2B4 na koloně hydroxylapatitu III

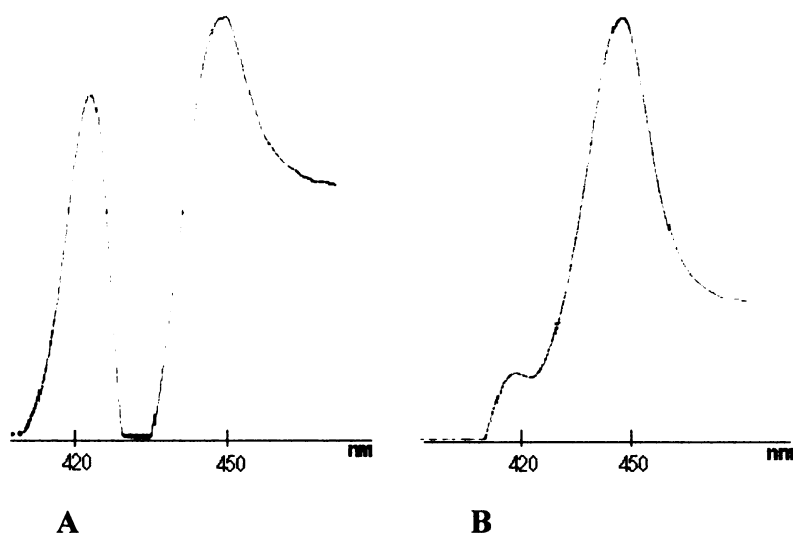
Pro odstranění detergentů byl preparát po chromatografii na HAPII aplikován na další kolonu hydroxylapatitu III a CYP2B4 byl eluován izokraticky 300 mM NaH₂PO₄ (Obr. 25).



Obr. 25: Rechromatografie CYP2B4 na koloně HAP III, eluce CYP2B4 izokraticky 300 mM NaH₂PO₄ (čísla 8 a 16 označují rozmezí frakcí, ve kterých byl obsažen finální preparát a číslo 9 značí frakci o nejvyšší absorbanci při 417 nm)

Podle elučního profilu byly zahuštěny frakce 8–16 (eluční objem 81–105 ml) na 15 ml a dialyzovány proti pufru HP11 (viz kapitola 3.3.3.4.4). Na závěr byl preparát zahuštěn na 4,8 ml. Finální produkt vykazoval koncentraci 58,7 μM, což odpovídá látkovému množství 282 nmol. Celkový výtěžek byl 21,3 % (tab. IV, str. 65).

Při chromatografii CYP2B4 na koloně HAP I byl CYP2B4 nejspíše reverzibilně denaturován, což prokázala i diferenční spektroskopie (vysoký „peak“ při 420 nm). Po provedení dialýzy v pufru HP4 byl enzym převeden do pro něj optimálního prostředí a pravděpodobně došlo k jeho částečné renaturaci (Obr. 26).



Obr. 26: Diferenční spektroskopie cytochromu P450 2B4

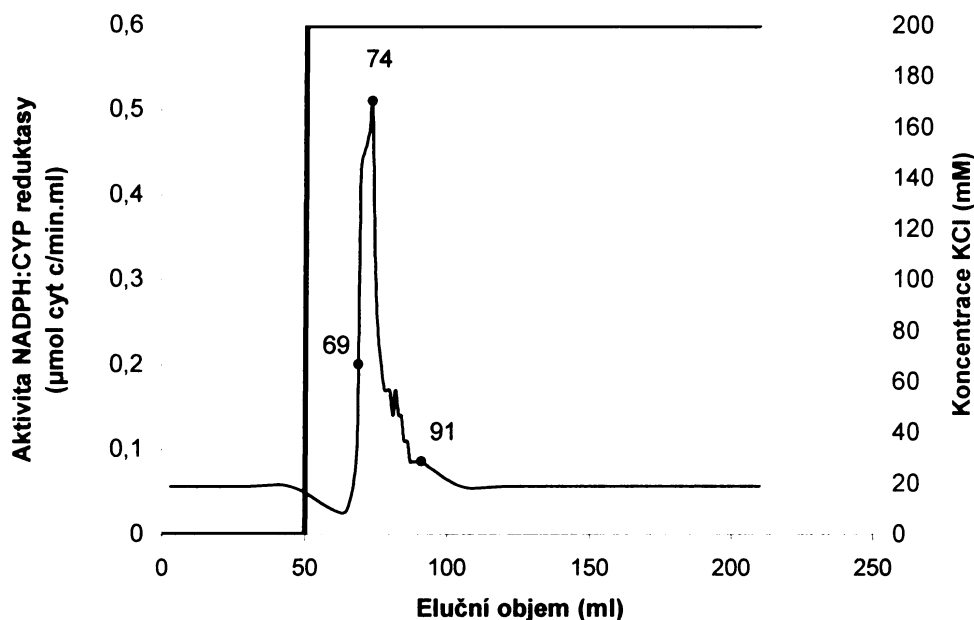
A - reversibilně denaturovaný CYP2B4, vysoký „peak“ při 420 nm.

B – renaturovaný CYP2B4 po dialýze v pufru HP4

Takto získaný finální preparát byl zmrazen po malých alikvotech (400 μ l) v „Eppendorfových“ mikrozkuvkách v kapalném dusíku uschován při -80 °C. Čistota výsledného produktu byla ověřena pomocí SDS elektroforesy (**Obr. 30, str. 65**).

Identifikace produktu izolace byla provedena metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (*kapitola 4.1.9*).

4.1.7 Chromatografie NADPH:cytochrom P450 reductasy na koloně 2',5' ADP- Sepharosy 4B



Obr. 27: *Eluce NADPH:CYP reductasy 200 mM KCl s 0,5 mM NADP⁺ na koloně 2',5'ADP-Sepharosy 4B (čísla udávají rozmezí frakcí, které byly zahuštěny a dialyzovány jako finální preparát)*

K purifikaci NADPH:CYP reductasy byla použita afinitní chromatografie na 2',5'ADP-Sepharose 4B, která byla provedena podle postupu popsaného v kapitole 3.3.3.4.5. Reduktasa byla z kolony eluována 200 mM KCl s 0,5 mM NADP⁺ (pufr DP2). V jímaných frakcích o objemu asi 1 ml byla sledována aktivita reductasy.

Na základě aktivit měřených ve frakcích elučního píku (**Obr. 27**) byly spojeny frakce **69-91** (eluční objem **69-91 ml**). Tyto frakce s největším obsahem NADPH:CYP reductasy byly poté zahuštěny na membráně Amicon, PM-30, Millipore na objem **15 ml**. K zahuštěným frakcím bylo přidáno takové množství FMN, aby se jeho výsledná koncentrace rovnala 0,5 µM. Takto upravený preparát byl podroben dialýze proti pufru DP3 a zahuštěn na výsledný objem **2,3 ml**. Ve finálním preparátu byla stanovena aktivita NADPH:CYP reductasy, která činila **14,2 µmol_{cyt c}/min.ml**. Celková koncentrace byla tedy **32,0 µmol_{cyt c}/min**, což odpovídá výtěžku **32 %** (viz tab. V, str. 66).

Tímto krokem byl z preparátu NADPH:cytochrom P450 reduktasy odstraněn detergent a také většina proteinových kontaminant. Zároveň bylo dosaženo významného zvýšení specifické aktivity tohoto enzymu.

Finální produkt byl zmražen v malých alikvotech (400 μ l) v „Eppendorfových“ mikrozkuvkách v kapalném dusíku a uschován při -80 °C. Čistota výsledného produktu byla ověřena pomocí SDS elektroforezy (**Obr. 30, str. 65**).

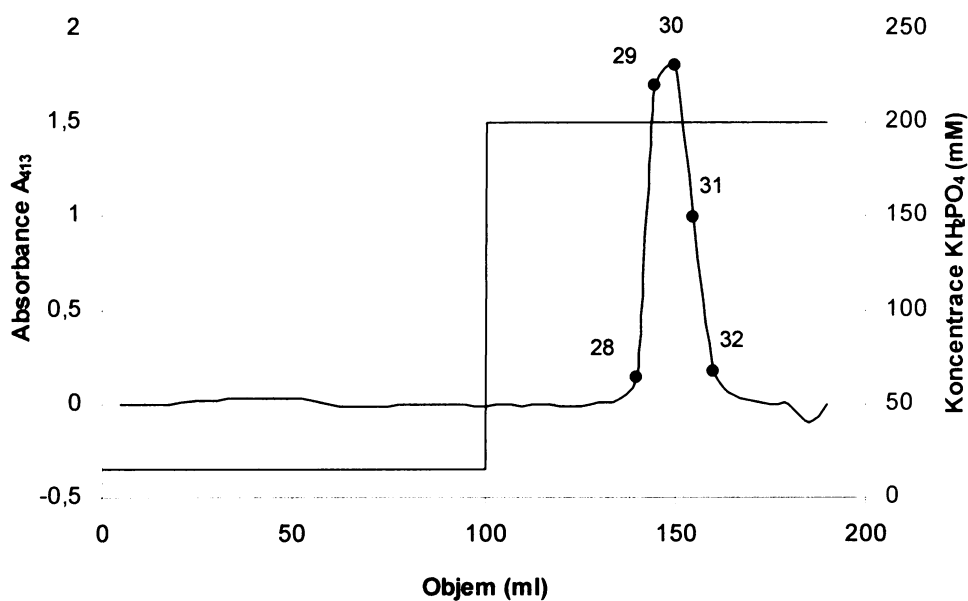
4.1.8 Chromatografie cytochromu b_5 na koloně DEAE–Sepharosy CL6B II

K převedení cytochromu b_5 do pufru s nižším obsahem detergentu byla použita chromatografie na koloně DEAE–Sepharosy CL6B II, postup dle kapitoly 3.3.3.4.6 .

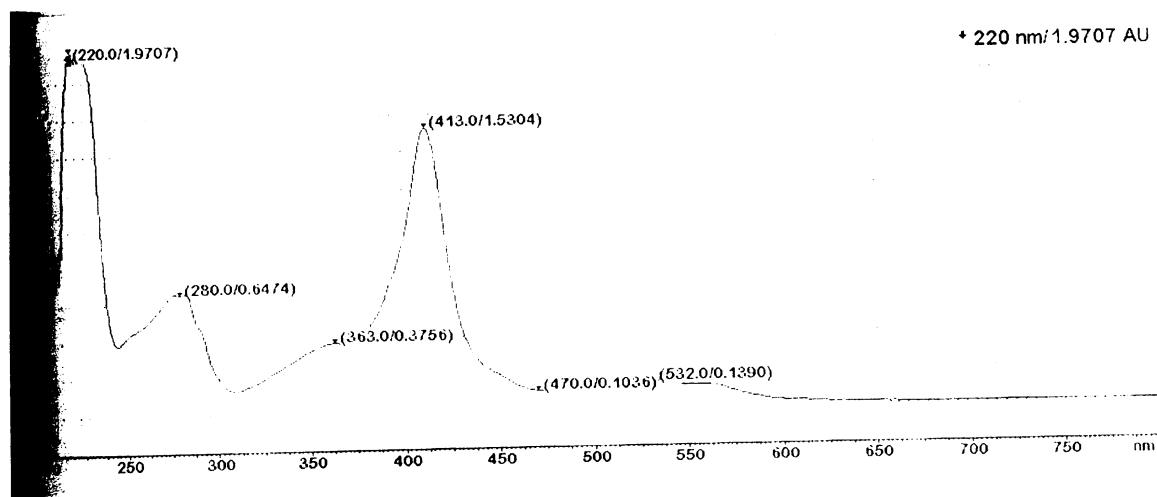
Po nanesení preparátu a „odmytí“ detergentu (pokles A_{280}) pufrům AP4* byl cyt b_5 eluován izokraticky 200 mM KH_2PO_4 v pufru AP5*.

Podle elučního profilu (**Obr. 28**) byly spojeny frakce 28 až 32 (eluční objem 140 až 160 ml) o největším obsahu cytochromu b_5 . Zdialyzované frakce proti pufru AP6* byly zahuštěny na membráně Amicon, PM-10, Millipore na výsledný objem 4 ml.

Koncentrace cytochromu b_5 byla stanovena spektrofotometricky (**Obr. 29**) a činila 58,8 μM , celkově bylo získáno 235 nmol.



Obr. 28: Chromatografie cytochromu b_5 na koloně DEAE-Sepharosy CL6B II (čísla udávají frakce o největším obsahu cyt b_5)

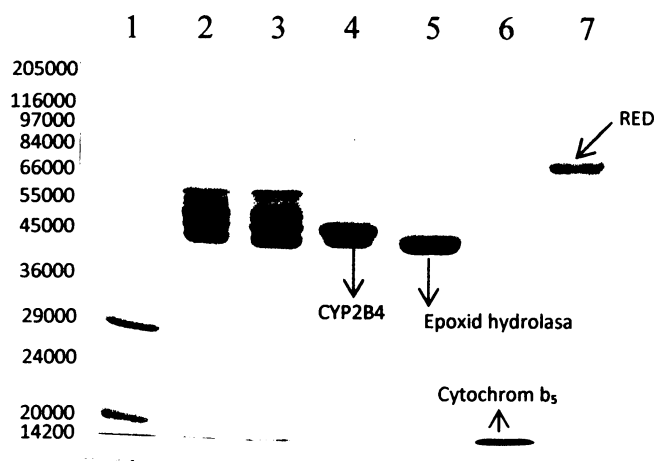


Obr. 29: Spektrofotometrické stanovení cytochromu b_5

Finální preparát cytochromu b_5 byl zmražen v malých alikvotech (400 μ l) v „Eppendorfových“ mikrokumavkách v kapalném dusíku a uschován při -80 $^{\circ}$ C .

Čistota výsledného produktu byla ověřena pomocí SDS elektroforesy (**Obr. 30**, str. 65).

Identifikace finálních produktů izolace byla provedena metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (kapitola 4.1.9).



Obr. 30: SDS-PAGE finálních preparátů izolace (1-standard „Wide range“, Sigma; 2-mikrosomy; 3-spojené frakce po solubilizaci; 4-CYP2B4; 5- epoxid hydrolasa; 6- cytochrom b₅; 7-NADPH:CYP reduktasa)

Tab. IV: Bilanční tabulka izolace CYP2B4

vzorek	V (ml)	c _p (mg/ml)	m _p (mg)	c _{CYP} (μM)	n _{CYP} (nmol)	spec.obsah CYP (nmol/mg)	výtěžek (%)
MS frakce	23,0	39,0	897,0	57,6	1325	1,5	100,0
solubilizát	205,0	4,3	877,4	9,0	1837	2,1	139,0
DEAE-Seph.	20,0	11,2	225,0	26,4	529	2,4	40,0
HAPI	10,0	7,1	71,0	16,5	165	2,3	12,5
HAPII	11,0	4,4	48,4	14,7	162	3,3	12,2
HAPIII	4,8	7,5	36,0	58,7	282	7,8	21,3

Legenda: V – objem (ml)

c_p – koncentrace proteinu (mg/ml)

m_p – hmotnost proteinu (mg)

c_{CYP} - molární koncentrace CYP (μmol/dm³)

Tab. V: Bilanční tabulka izolace NADPH:CYP reductasy

vzorek	V (ml)	c _p (mg/ml)	m _p (mg)	a _{red} ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}}/\text{min. ml}$)	celk. a _{red} ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}}/\text{min}$)	spec.a _{red} ($\text{mmol}_{\text{cytc}}/\text{min. mg}$)	výtěžek (%)
MS frakce	23,0	39,0	897,0	4,3	98,9	0,1	100,0
solubilizát	205,0	4,3	877,4	0,6	132,0	0,2	132,0
DEAE-Seph.	17,5	6,1	107,5	3,2	56,4	0,5	56,0
2',5'-ADPSeph.	2,3	1,0	2,3	14,2	32,0	14,2	32,0

Legenda: V – objem (ml)

c_p – koncentrace proteinu (mg/ml)

m_p – hmotnost proteinu (mg)

a_{red} – aktivita reductasy ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$)

celk. a_{red} – celková aktivita reductasy ($\mu\text{mol}_{\text{cytc}} \cdot \text{min}^{-1}$)

4.1.9 Identifikace finálních preparátů izolace

K identifikaci jednotlivých proteinů (CYP2B4, cytochrom b₅ a protein „X“) byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (kap. 3.3.6). Srovnáním měřených spekter peptidů, vzniklých štěpením jednotlivých proteinových proužků po SDS-PAGE trypsinem, s databází NCBI_{nr} (2005/06/01) bylo provedeno programem ProFound přístupným na internetové adrese http://129.85.19.192/profound_bin/webProFound.exe. Výsledky identifikace jednotlivých proteinů jsou souhrnně uvedeny v obr. 31.

Proteiny byly identifikovány podle předpokladu jako cytochrom P450 2B4 a cytochrom b₅. V případě neznámého proteinu „X“ bylo určeno, že se jedná o mikrosomální epoxid hydrolasu 1.

Měření spekter a vyhledání v databázi bylo provedeno RNDr. M. Šulcem, PhD. v laboratořích MBÚ AV ČR v Praze 4-Krči.

061005and11CYPisol

Protein number	MALDI-TOF data file	Protein Number	Protein Name [Organisms]	MW (kDa)	pI	ProFound Est'd Z	Sequence coverage (%)	mass
b5/T	12SRef		cytochrome b5 - rabbit	11.0	6.1	1.34	88	
2B4/T	13SRef	AAA65840.1	cytochrome P450 2B4 - rabbit HYEP_RABIT Epoxide hydrolase 1	55.7	9.3	2.34	33	1
XB/T	22SRef	P04066	(Microsomal epoxide hydrolase)	52.49	7.3	2.32	41	2

Name	Institute	TelNum	Email
Verka Kotrbova	katBioch	221951285	verakotrbova@centrum.cz
Address	ICO		

Date	MS	pathway	sample name	b5/T	2b4/T	XB/T
061008	MALDI-TOF	data/230208/Sulc/CYP		12SRef	13SRef	22SRef
				m/z	m/z	m/z
		12SRef	b5/T ingel 061005, extr. CCA o.l.			
		13SRef	2B4/T ingel 061005, extr. CCA o.l.	1134.5	825.5	819.6
		22SRef	XB/T ingel 061005, extr. CCA o.l.	1186.5	851.4	837.6
				1412.6	901.4	915.6
				1511.7	1153.5	947.6
				1640.8	1382.5	989.5
				2205.9	1392.5	1003.5
					1443.5	1026.6
					1502.6	1066.6
					1572.6	1078.6
					1722.8	1250.7
					1781.8	1274.6
					1931.9	1300.7
					1932.9	1389.7
					2014	1474.8
					2165	1456.8
					2352.9	1517.8
					2509	1643.9

Obr. 31: Identifikace produktů izolace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

4.2 Oxidace ellipticinu králičími cytochromy P450 3A6 a 2B4 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou

Abychom mohli studovat metabolismus ellipticinu jednotlivými isoformami cytochromu P450 *in vitro*, bylo třeba vytvořit funkční MFO systém obsahující jedinou isoformu CYP oxidující ellipticin.

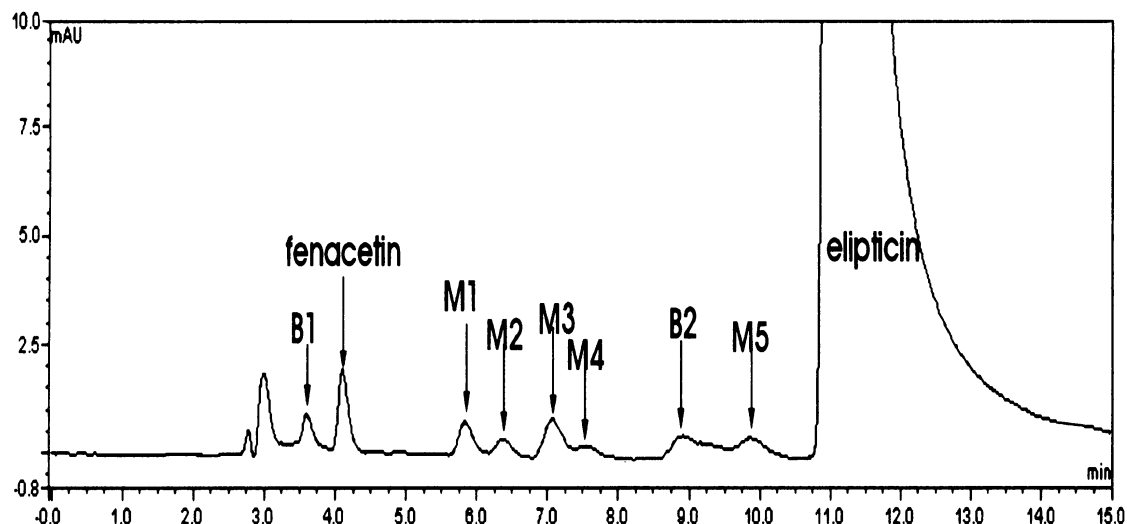
Jelikož jsou izolované cytochromy P450, jež jsme pro toto studium používali, samy o sobě nefunkční, byly provedeny jejich rekonstituce s NADPH:CYP reduktasou a fosfolipidy (DLPC), které vytváří liposomy a simulují tak prostředí membrány endoplasmatického retikula.

Rekonstituce cytochromů P450 3A6 a 2B4 s NADPH:CYP reduktasou byly provedeny podle postupu popsaného v kapitole 3.3.4.1.1. Následně byl tento systém inkubován s 10 μ M ellipticinem (viz kapitola 3.3.4.1.2). Ellipticinové metabolity vzniklé v inkubační směsi byly extrahovány ethylacetátem. Pomocí HPLC (kapitola 3.3.5) bylo separováno a detekováno **pět metabolitů (Obr. 32)**, jejichž struktura byla již popsána v předchozích studiích v laboratoři, kde byla tato práce vypracována^[103].

Jedná se o následující metabolity ellipticinu:

- **M1** : 9- hydroxyellipticin
- **M2** : 12-hydroxyellipticin
- **M3** : 13-hydroxyellipticin
- **M4** : 7- hydroxyellipticin
- **M5** : N(2)-oxid ellipticinu

Pro kvantifikaci metabolitů byly jejich plochy píků vztaženy k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.



Obr. 32: Metabolity ellipticinu tvořené oxidací ellipticinu potkaním mikrosomálním systémem separované a detekované pomocí HPLC (Píky B1 a B2 jsou přítomné i v kontrolních inkubacích bez ellipticinu)^[35]

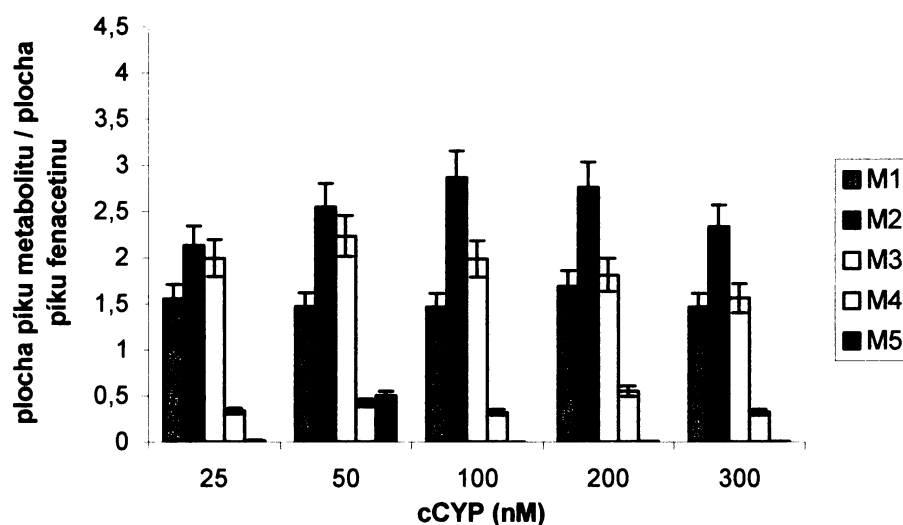
4.2.1 Oxidace ellipticinu králičím cytochromem P450 3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou

Úkolem této části diplomové práce bylo prostudovat úlohu králičího izolovaného cytochromu P450 3A6 v oxidaci ellipticinu.

Sledovali jsme zastoupení jednotlivých metabolitů ellipticinu, které vznikly v inkubační směsi v závislosti na koncentraci cytochromu P450. Z výsledků (**Obr. 33**, **Tab. VI**), které jsou vždy průměrem alespoň 3 nezávislých měření, je patrné, že:

- Při všech použitých koncentracích cytochromu P450 3A6 majoritně vznikal 12-hydroxyellipticinu (M2), přičemž se vzrůstající koncentrací až do 100 nM docházelo k jeho nárůstu. Z **obr. 33** můžeme usuzovat, že při dále se zvyšující koncentraci CYP3A6 došlo k saturaci a k poklesu tvorby tohoto metabolitu.
- Druhým nejvíce zastoupeným metabolitem ellipticinu byl 13-hydroxyellipticin (M3), jehož množství bylo nejvyšší při koncentraci cytochromu P450 3A6 50 nM.

- Množství 9-hydroxyellipticinu (M1) se s koncentrací CYP3A6 výrazně neměnilo. 9-hydroxyellipticin (M1) byl třetím nejpočetnějším metabolitem tvořeným CYP3A6.
- 7-hydroxyellipticin (M4) a N(2)-oxid ellipticinu (M5) vznikaly v minoritním množství a jejich přítomnost ve vzorcích byla těžko detekovatelná. Navíc pík 7-hydroxyellipticinu (M4) částečně splýval se signálem 13-hydroxyellipticinu (M3) a N(2)-oxid ellipticinu (M5) s píkem nepřeměněného ellipticinu.



Obr. 33: Oxidace ellipticinu králičím cytochromem P450 3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. V inkubační směsi byly použity: 25–300 nM CYP3A6; 100 nM NADPH:CYP reduktasa; 10 μ M ellipticin

Tab. VI: Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací ellipticinu králičím CYP3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou

Metabolity ellipticinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)				
	25	50	100	200	300
M1	25,8	20,5	22,1	24,8	25,7
M2	35,3	35,5	43,2	40,5	41,1
M3	33,1	31,1	29,9	26,6	27,4
M4	5,5	5,9	4,8	8,0	5,7
M5	0,3	7,0	0,0	0,1	0,1

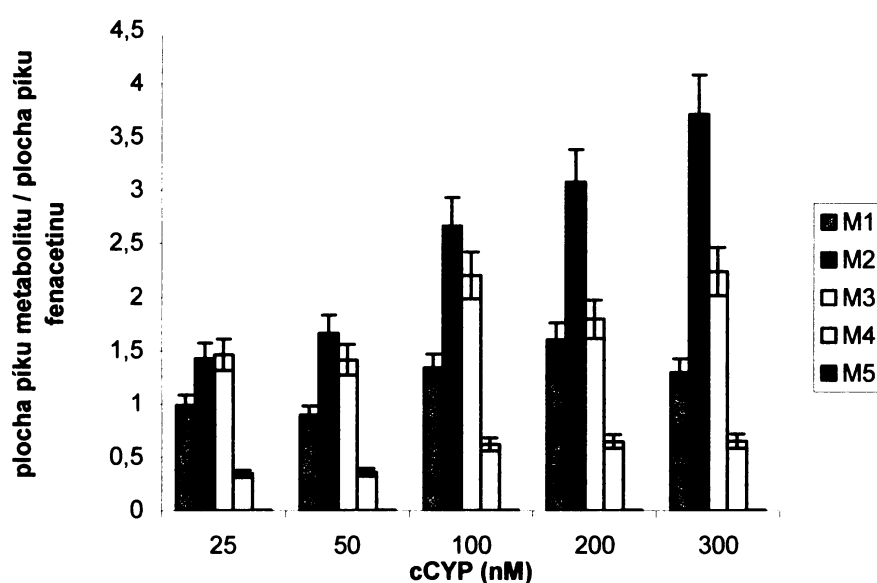
4.2.2 Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou

Jak již bylo zmíněno v úvodní části této práce, stimulační a inhibiční efekt cytochromu b₅ není zcela prozkoumán a funkce cytochromu b₅ je objasněna pouze u některých isoformů cytochromu P450^[79]. Dalším cílem této studie tedy bylo prostudovat vliv cytochromu b₅ na tvorbu metabolitů ellipticinu králičím CYP3A6.

Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A6 byl studován v obdobném rekonstituovaném systému jako předchozí studie (*kapitola 4.2.1*), pouze s přidavkem cytochromu b₅ v poměru CYP3A6:cytochrom b₅ 1:3 (*viz. kapitola 3.3.4.1.1.2*).

Výsledky, které jsou průměrem minimálně 3 nezávislých měření, jsou znázorněny na **obrázku 34** a v **tabulce VII**. Vyplývá z nich, že:

- Při koncentracích CYP3A6 25 a 50 nM měl cytochrom b₅ inhibiční vliv na tvorbu všech metabolitů vzniklých oxidací ellipticinu tímto enzymem, přičemž nebyla pozorována výraznější změna v zastoupení jednotlivých metabolitů. U metabolitu 9-hydroxyellipticinu (M1) bylo snížení nejvyšší 1,7 x, u 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3) asi 1,5 x.
- Při koncentraci CYP3A6 100 nM byl inhibiční vliv cyt b₅ na vznik téměř všech metabolitů nepatrný (1,1 x).
- S rostoucí koncentrací CYP3A6 na 200 nM byl zaznamenán malý nárůst tvorby 12-hydroxyellipticinu (M2) 1,1 x, na tvorbu ostatních metabolitů cytochrom b₅ neměl vliv.
- Cytochrom b₅ působil výrazněji stimulačně na vznik 12-hydroxyellipticinu (M2) při koncentraci CYP3A6 300 nM (nárůst 1,6 x). Zvyšoval též tvorbu 13-hydroxyellipticinu (1,4 x), naproti tomu vznik 9-hydroxyellipticinu (M1) mírně inhiboval (1,1 x).



Obr. 34 : Vliv cytochromu b_5 na oxidaci elliptycinu králičím cytochromem P450 3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. V inkubační směsi byly použity: 25-300 nM CYP3A6; 100 nM NADPH:CYP reduktasa; 75-900 nM cytochrom b_5 (v poměru 1 : 3 vzhledem k CYP); 10 μ M ellipticin

Tab. VII: Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací elliptycinu králičím CYP3A6 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou a cytochromem b_5 (poměr CYP: cytochrom b_5 byl 1:3)

Metabolity elliptycinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)				
	25	50	100	200	300
M1	23,4	20,6	19,6	22,5	16,4
M2	33,8	38,3	39,0	43,2	47,0
M3	34,6	32,6	32,2	25,2	28,4
M4	8,1	8,3	9,1	9,0	8,2
M5	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1

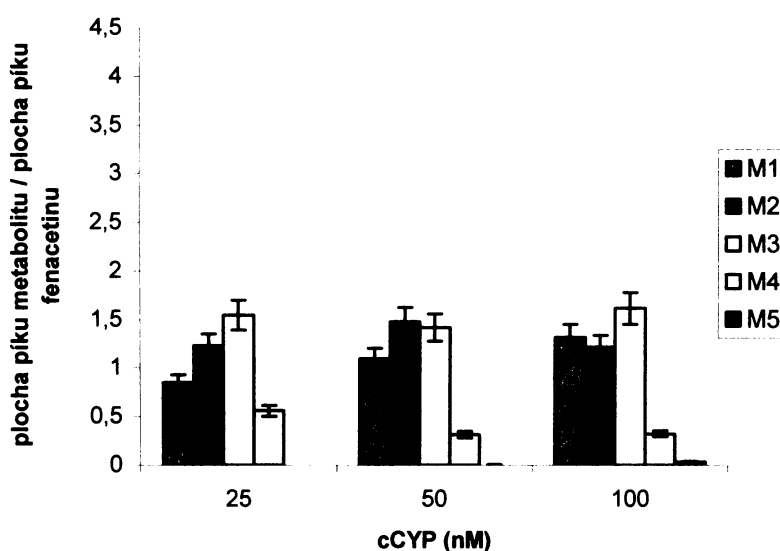
4.2.3 Oxidace ellipticinu králičím cytochromem P450 2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou

Cytochrom P450 2B4 je dalším enzymem oxidujícím ellipticin. Z dřívějších studií^[103] však vyplývá, že oxiduje ellipticin s menší účinností než CYP3A. Dalším úkolem předkládané diplomové práce je podrobněji prostudovat schopnost CYP2B4 oxidovat ellipticin.

Opět bylo sledováno zastoupení vzniklých metabolitů ellipticinu v závislosti na koncentraci cytochromu P450 2B4.

Výsledky z minimálně 3 nezávislých měření (**Obr. 35, Tab. VIII**) ilustrují, že:

- Schopnost cytochromu P450 2B4 oxidovat ellipticin je nižší než CYP3A6.
- Nejvíce zastoupenými metabolity tvořenými CYP2B4 jsou 13–hydroxyellipticin (M3) a 12–hydroxyellipticin (M2).
- Zvýšené koncentrace CYP2B4 v inkubačních mediích prakticky nevedou k nárůstu tvorby metabolitů ellipticinu.



Obr. 35: Oxidace ellipticinu králičím cytochromem P450 2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. V inkubační směsi byly použity: 25, 50, 100 nM CYP2B4; 100 nM NADPH:CYP reduktasa, 10 μ M ellipticin

Tab. VIII: Procentuální zastoupení jednotlivých metabolitů tvořených oxidací elliptycinu králičím CYP2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou

Metabolity elliptycinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)		
	25	50	100
M1	20,3	25,4	29,2
M2	29,4	34,3	27,0
M3	37,0	32,9	39,9
M4	13,3	7,3	7,2
M5	0,0	0,1	0,7

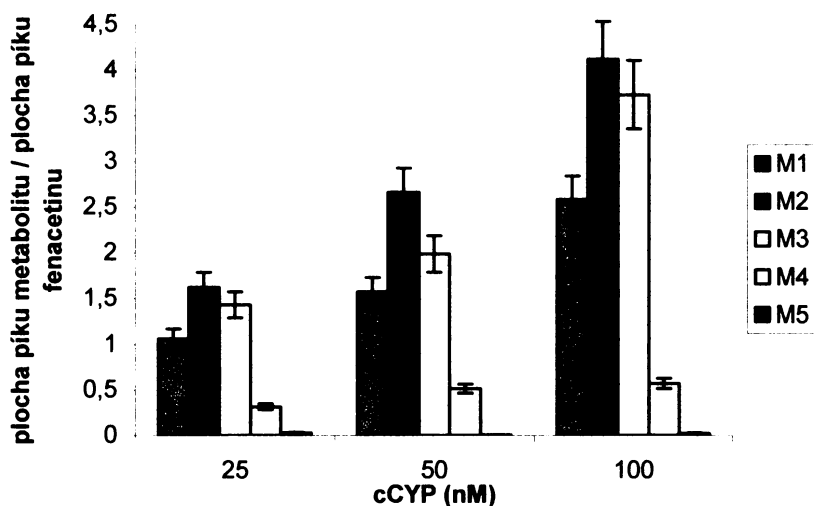
Z uvedených výsledků vyplývá, že cytochrom P450 2B4 je v metabolismu elliptycinu málo účinným enzymem.

4.2.4 Vliv cytochromu b₅ na oxidaci elliptycinu cytochromem P450 2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou

Výsledky tohoto experimentu, získané jako průměr minimálně 3 nezávislých měření, jsou uvedeny na obrázku 36 a v tabulce IX. Ukazují, že:

- Cytochrom b₅ stimuluje vznik jednotlivých metabolitů elliptycinu CYP2B4.
- Tvorba metabolitů elliptycinu v přítomnosti cytochromu b₅ je závislá na koncentraci CYP2B4 v inkubační směsi.
- K největšímu nárůstu docházelo u tvorby 12-hydroxyelliptycinu (M2), 13-hydroxyelliptycinu (M3) a 9-hydroxyelliptycinu (M1), a to v uvedeném pořadí.
- Znatelný vliv cytochromu b₅ na tvorbu metabolitů byl pozorován již při koncentraci CYP2B4 v inkubační směsi 50 nM. Množství metabolitu 12-hydroxyelliptycinu (M2) bylo navýšeno asi 1,8 x, metabolitů 9-hydroxyelliptycinu (M1) a 13-hydroxyelliptycinu (M3) asi 1,4 x. Vzestup byl pozorován i u tvorby 7-hydroxyelliptycinu (M4), a to asi 1,6 x.

- Stimulační působení cytochromu b_5 se nejvýrazněji projevilo při koncentraci CYP2B4 100 nM, kdy zastoupení 12-hydroxyellipticinu (M2) vzrostlo 3,4 x, 13-hydroxyellipticinu (M3) 2,3 x, 9-hydroxyellipticinu (M2) 2 x a 7-hydroxyellipticinu (M4) 1,8 x.



Obr. 36: Vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Inkubační směs obsahovala: 25, 50, 100 nM CYP2B4; 100 nM NADPH:CYP reduktasa; 75-300 nM cytochrom b_5 (v poměru 1 : 3 vzhledem k CYP); 10 μ M ellipticin

Tab. IX: Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací ellipticinu králičím CYP2B4 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou a cytochromem b_5 (poměr CYP: cytochrom b_5 byl 1:3)

Metabolity ellipticinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)		
	25	50	100
M1	23,8	23,3	23,4
M2	36,4	39,5	37,4
M3	32,1	29,5	33,8
M4	7,0	7,6	5,2
M5	0,7	0,1	0,2

4.3 Oxidace ellipticinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 a 2B6

Jak již bylo popsáno v úvodu, z dosavadních studií je lidská isoforma cytochromu P450 3A4 považována za jednu z neúčinnějších v aktivaci ellipticinu na metabolity schopné vazby na DNA^[103, 115, 116]. Úkolem této části diplomové práce bylo podrobněji prostudovat aktivační působení CYP3A4 na protinádorové léčivo ellipticin a porovnat působení tohoto enzymu s králičí orthologní formou CYP3A6, studovanou též v rámci předkládané diplomové práce (*viz. kapitola 4.2.1*).

Pro doplnění znalostí o roli cytochromů P450 podrodiny 2B v oxidaci ellipticinu, bylo dalším úkolem této práce studium oxidace ellipticinu právě lidskou isoformou této podrodiny CYP2B6.

K práci byly použity komerční preparáty supersomů (SupersomesTM). Jedná se o mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných Baculovirem (SupersomesTM), exprimující lidský rekombinantní CYP3A4 nebo CYP2B6 s NADPH:CYP reduktasou (*kapitola 3.3.4.2*). Inkubace byly provedeny dle *kap. 3.3.4.2 a 3.3.4.1.2*.

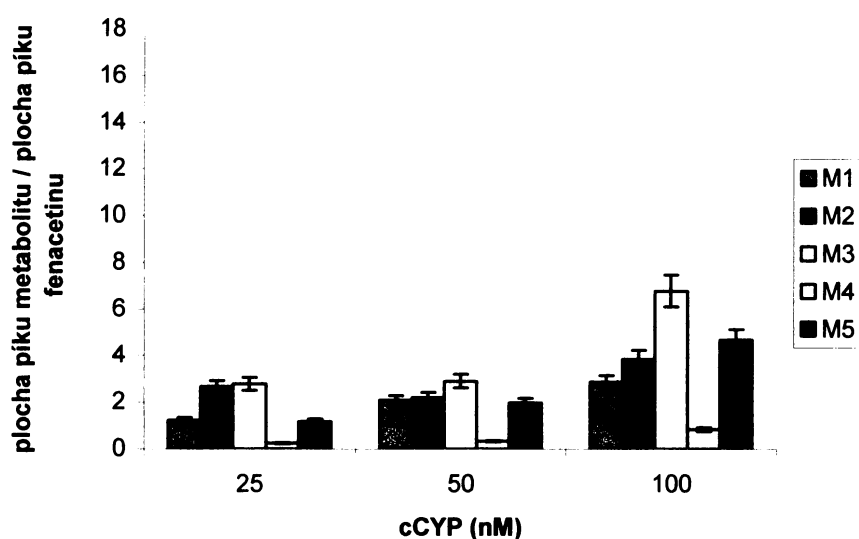
4.3.1 Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 3A4

Výsledky získané při studiu oxidace ellipticinu rekombinantním cytochromem P450 3A4 jsou shrnuty v **obrázku 37** a **tabulce X**. Jsou průměrem minimálně 3 nezávislých měření.

Ze získaných výsledků je možno usuzovat, že:

- Cytochrom P450 3A4 účinně aktivuje ellipticin ve smyslu tvorby metabolitů 13-hydroxyellipticinu (M3) a 12-hydroxyellipticinu (M2) interagujících s DNA za vzniku aduktů.
- Největšího zastoupení dosáhl 13–hydroxyellipticin (M3), tvořící majoritní adukt v DNA. Jeho množství se se stoupající koncentrací CYP3A4 v inkubační směsi zvyšovalo, nejvýraznější byl tento nárůst při koncentraci CYP3A4 100 nM.

- Druhým nejpočetnějším metabolitem při koncentraci CYP3A4 25 a 50 nM byl 12-hydroxyellipticin (M2), při koncentraci enzymu 100 nM však vznikalo více N(2)-oxidu ellipticinu (M5).
- Dalším nejhojnějším metabolitem v pořadí byl 9-hydroxyellipticin (M1). 7-hydroxyellipticin (M4) byl tvořen CYP3A4 jen nepatrně. Tvorba všech metabolitů, kromě 12-hydroxyellipticinu (M2) se jeví být závislá na koncentraci CYP3A4 v inkubační směsi.



Obr. 37: Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 3A4. Inkubační směs obsahovala: 25, 50, 100 nM CYP3A4+NADPH:CYP reduktasa (*Supersomes*TM); 10 μ M ellipticin.

Tab. X: Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací ellipticinu lidským rekombinantním CYP3A4

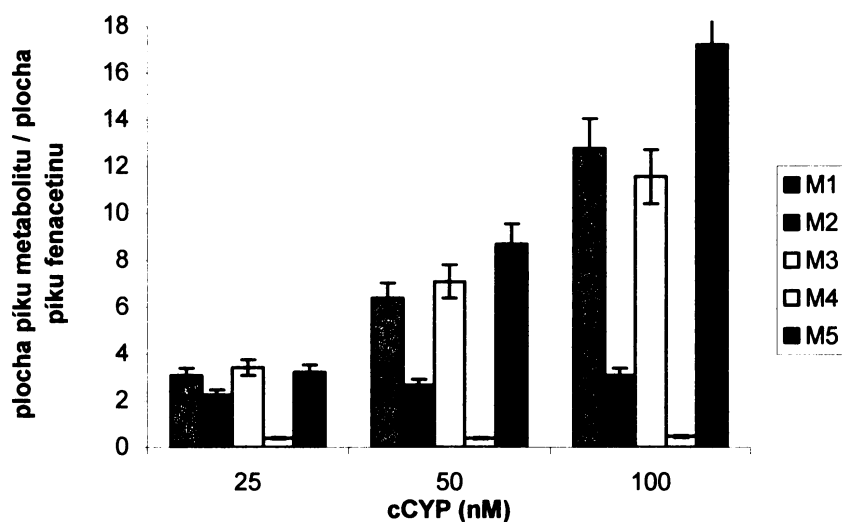
Metabolity ellipticinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)		
	25	50	100
M1	15,2	21,9	15,1
M2	33,1	23,2	20,2
M3	34,4	30,5	35,7
M4	3,0	3,6	4,4
M5	14,3	20,8	24,6

4.3.2 Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu lidským rekombinantním CYP3A4

V případě lidského cytochromu P450 3A4 byl v literatuře popsán vliv cytochromu b₅ na jeho působení^[128]. Proto jsme se též v rámci této diplomové práce zajímali, jakým způsobem bude ovlivňovat cytochrom b₅ metabolismus ellipticinu tímto enzymem. Použit byl CYP3A4 v SupersomechTM.

Výsledky, které jsou průměrem alespoň 3 nezávislých měření, uvedené na **obr. 38** a v **tab. XI** ukazují, že:

- Cytochrom b₅ působil výrazně stimulačně na tvorbu metabolitů 9-hydroxyellipticinu (M1), 13-hydroxyellipticinu (M3) a N(2)-oxidu ellipticinu (M5).
- Navýšení tvorby metabolitu 9-hydroxyellipticinu (M1) se s koncentrací CYP3A4 v inkubační směsi zvětšovalo a při koncentraci 100 nM CYP3A4 dosáhlo 4,5 násobku oproti množství vzniklému v předchozí inkubaci bez cytochromu b₅.
- Nárůst N(2)-oxidu ellipticinu (M5) vlivem cytochromu b₅ byl nejvýraznější při koncentraci CYP3A4 50 nM, a to 4,4 x. Při zvyšující se koncentraci CYP3A4 na 100 nM množství tohoto metabolitu vykazovalo saturační závislost, navýšení způsobené přítomností cytochromu b₅ bylo však stále zřetelné (nárůst asi 3,7 x).
- Tendence zvýšené tvorby metabolitu 13-hydroxyellipticinu (M3) byly stejné jako u N(2)-oxidu ellipticinu (M5). Nejvyšší hodnoty dosáhlo množství zmíněného metabolitu při koncentraci CYP3A4 50 nM, kdy vzniklo 2,4 x více 13-hydroxyellipticinu (M3) oproti inkubaci bez přítomnosti cytochromu b₅.
- Inhibičně působil cytochrom b₅ na tvorbu 12-hydroxyellipticinu (M2) při koncentraci CYP3A4 v inkubační směsi 25 a 50 nM. Stejný inhibiční vliv měl cytochrom b₅ i na tvorbu 7-hydroxyellipticinu (M4) při koncentraci CYP3A4 100 nM.



Obr. 38: Vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 3A4. V inkubační směsi byly použity: 25, 50, 100 nM CYP3A4+ NADPH:CYP reduktasa+ cytochrom b_5 (SupersomesTM); 10 μ M ellipticin

Tab. XI: Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací ellipticinu lidským rekombinantním CYP3A4 s cytochromem b_5

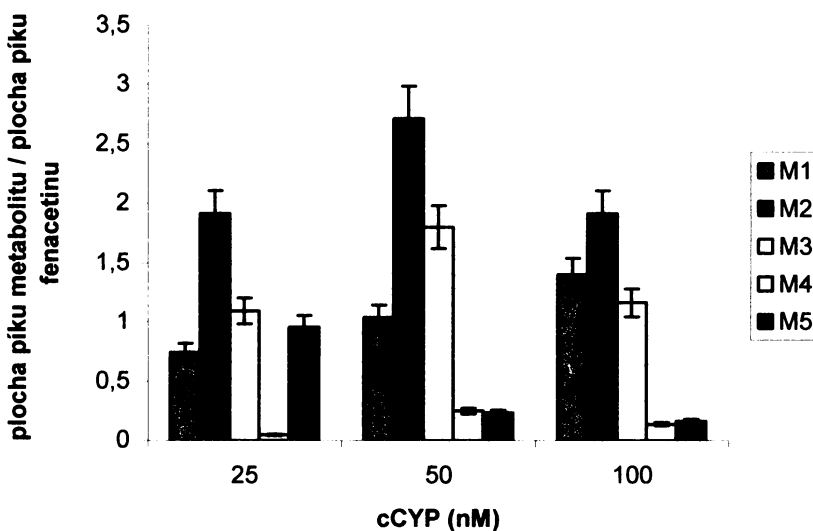
Metabolity ellipticinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)		
	25	50	100
M1	25,0	25,4	28,3
M2	18,2	10,5	6,9
M3	27,7	28,1	25,6
M4	3,1	1,5	1,0
M5	26,0	34,5	37,2

4.3.3 Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 2B6

Z výsledků, které jsme získali zprůměrováním minimálně 3 nezávislých měření, na obr. 39 a v tab. XII je patrné, že:

- Při všech koncentracích CYP2B6 majoritně vznikal 12-hydroxyellipticin (M2). Druhým nejvíce zastoupeným metabolitem byl 13-hydroxyellipticin (M3). Oba vykazovaly saturační závislost na koncentraci CYP2B6 v inkubaci.
- Dalším v pořadí metabolitů tvořených CYP 2B6 byl 9-hydroxyellipticin (M1), jehož množství s koncentrací vzrůstalo.
- Ostatní metabolity ellipticinu byly detekovány pouze v malém množství.

Je patrné, že lidský rekombinantní CYP2B6 je oproti lidskému rekombinantnímu enzymu CYP3A4 v oxidaci ellipticinu mnohem méně účinný.



Obr. 39: Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 2B6. Složení inkubační směsi: 25, 50, 100 nM CYP2B6+NADPH:CYP reductasa (*SupersomesTM*); 10 μ M ellipticin

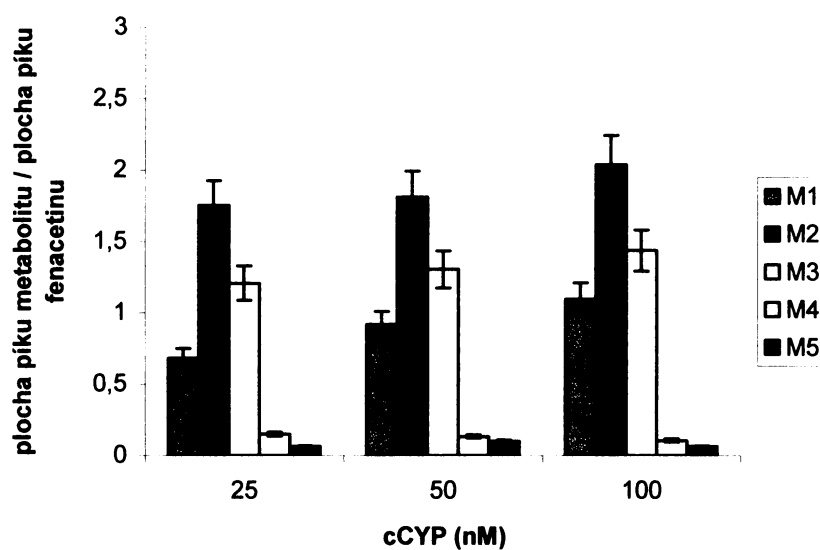
Tab. XII: *Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací elliptycinu lidským rekombinantním CYP2B6*

Metabolity elliptycinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)		
	25	50	100
M1	15,7	17,2	29,2
M2	40,2	45,0	40,1
M3	23,0	29,8	24,3
M4	1,0	4,1	2,9
M5	20,1	3,9	3,5

4.3.4 Vliv cytochromu b₅ na oxidaci elliptycinu lidským rekombinantním CYP2B6

Působení cytochromu b₅ na oxidaci elliptycinu lidským rekombinantním CYP2B6 je shrnuto na **obr. 40**. Z výsledků vyplývá, že:

- Cytochrom b₅ působí na metabolismus elliptycinu CYP2B6 převážně inhibičně.
- U metabolitů 9-hydroxyelliptycinu (M1) a 12-hydroxyelliptycinu (M2) došlo při všech koncentracích CYP2B6 v inkubační směsi k mírnému poklesu jejich tvorby.
- Cytochrom b₅ slabě stimuloval tvorbu 13-hydroxyelliptycinu (M3) při koncentraci CYP2B6 25 a 100 nM (asi 1,2 x).
- Vliv cytochromu b₅ na vznik 7-hydroxyelliptycinu (M4) a N(2)-oxidu elliptycinu (M5) nebylo možné přesně vyhodnotit, neboť tvorba těchto metabolitů byla velmi malá.



Obr. 40: Vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 2B6. Složení inkubační směsi: 25, 50, 100 nM CYP2B6+NADPH:CYP reduktasa+ cytochrom b_5 (SupersomesTM); 10 μ M ellipticin

Tab. XIII: Procentuální zastoupení metabolitů tvořených oxidací ellipticinu lidským rekombinantním CYP2B6 s cytochromem b_5

Metabolity ellipticinu [%]	koncentrace CYP v inkubační směsi (nM)		
	25	50	100
M1	17,7	21,5	23,2
M2	45,5	42,5	43,0
M3	31,3	30,6	30,3
M4	3,9	3,1	2,0
M5	1,6	2,3	1,3

5 DISKUSE

V rámci této diplomové práce byla studována úloha cytochromů P450 3A a 2B v oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu. K tomuto studiu byly použity dva systémy, jednak rekonstituovaný systém izolovaných králičích cytochromů P450 3A6 a 2B4 s NADPH:CYP reduktasou a dále lidské rekombinantní cytochromy P450 3A4 a 2B6 v Supersomech™.

Uvedené králičí enzymy, CYP2B4 a NADPH:CYP reduktasa, byly izolovány jako součást předkládané diplomové práce.

V této práci jsme navázali na již provedené experimenty, které ukazují lidský CYP3A4 jako nejučinnější v oxidaci ellipticinu a oproti tomu CYP podrodiny 2B jako málo efektivní v oxidaci tohoto cytostatika^[103, 115, 116].

Ve všech experimentech byl ellipticin přeměňován cytochromy P450 na pět metabolitů: 9-hydroxyellipticinu (M1), 12-hydroxyellipticinu (M2), 13-hydroxyellipticinu (M3), 7-hydroxyellipticinu (M4) a N²-oxidu ellipticinu (M5), které byly separovány a detekovány pomocí HPLC.

Oxidace ellipticinu cytochromy P450 3A a 2B

Výsledky získané inkubací izolovaných králičích enzymů CYP3A6 a CYP2B4 s ellipticinem ukazují, že CYP2B4 je málo účinným enzymem v oxidaci ellipticinu, neboť všechny metabolity ellipticinu v inkubaci s CYP2B4 vznikaly v nízkém množství a nebyla pozorována téměř žádná závislost jejich tvorby na koncentraci CYP2B4 v inkubačním mediu.

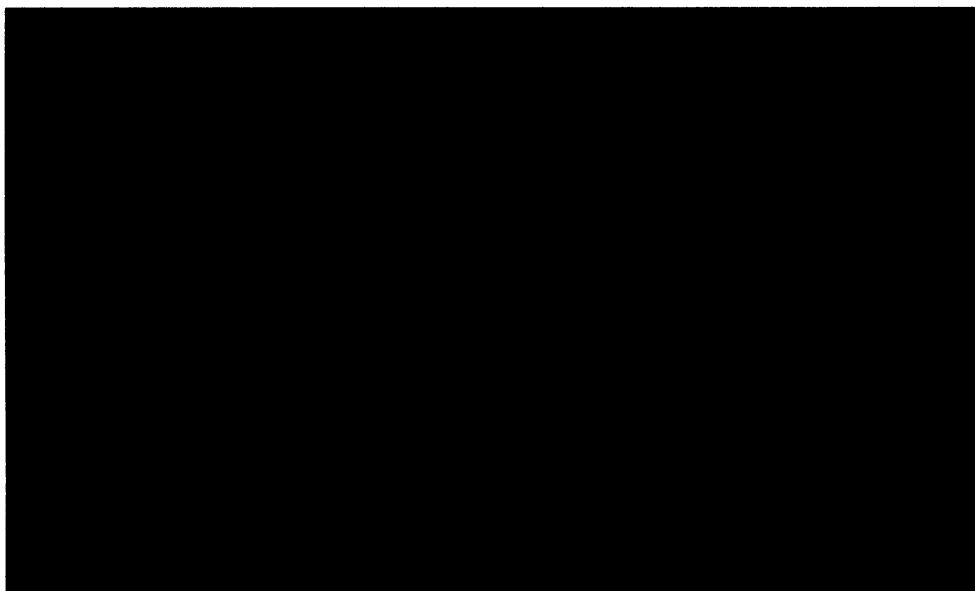
Ve srovnání s CYP2B4, králičí izolovaný enzym CYP3A6 tvořil metabolity ellipticinu efektivněji, přičemž majoritně docházelo ke vzniku 12-hydroxyellipticinu (M2). Jeho tvorba se jevila být koncentračně závislá. Se vzrůstající koncentrací CYP3A6 v inkubační směsi až do 100 nM docházelo k nárůstu tohoto metabolitu, dále se zvyšující koncentrace CYP3A6 již neměla pozitivní vliv na tvorbu metabolitů ellipticinu, což by mohlo být způsobeno nasycením aktivním center enzymu substrátem. Druhým nejvíce zastoupeným metabolitem ellipticinu CYP3A6 se jevil 13-hydroxyellipticin (M3), při vyšších koncentracích CYP3A6 ale docházelo také k poklesu jeho tvorby.

Inkubace lidského rekombinantního enzymu CYP3A4 (v Supersomech™) s ellipticinem plně potvrzují výsledky z předchozích studií. Z testovaných enzymů

CYP3A4 oxidoval ellipticin jednoznačně nejefektivněji, zejména ve smyslu tvorby 13-hydroxyellipticinu (M3). 13-hydroxyellipticin (M3) je hlavním metabolitem přeměny ellipticinu lidskými mikrosomy^[103]. Tento enzym také významně katalyzoval tvorbu N(2)-oxidu ellipticinu (M5). Množství obou vznikajících metabolitů 13-hydroxyellipticinu (M3) i N(2)-oxidu ellipticinu (M5) vykazovalo výrazně vzrůstající tendenci s koncentrací CYP3A4 v inkubační směsi. Již v dřívějších studiích byly tyto dva metabolity určeny jako odpovídající za tvorbu kovalentních aduktů v DNA^[116]. Jako třetí nejpočetnější metabolit vznikal 12-hydroxyellipticin (M2).

Získané výsledky též korelují s počítačovým modelem struktury CYP3A4, do jehož aktivního centra byl jako substrát „dokován“ ellipticin. Tento model, který byl vytvořen a studován v rámci předchozích experimentů^[103], zde uvádíme pro vysvětlení našich výsledků oxidace ellipticinu CYP3A4 na molekulárním základě.

Modelováním byla nalezena čtyři možná vazebná seskupení CYP3A4 s ellipticinem^[103]. Na **obr. 41** je ukázáno nejvýznamnější vzájemné vazebné postavení CYP3A4 a ellipticinu. Reaktivní kyslíkový radikál, jež je součástí ferrioxenového komplexu CYP3A4, je zde v těsné blízkosti methylové skupiny na uhlíku C-13 ellipticinu. V této pozici dochází snadno k hydroxylaci ellipticinu, a tedy k tvorbě 13-hydroxyellipticinu (M3).



Obr. 41: Model struktury CYP3A4 s ellipticinem „dokovaným“ do aktivního centra tohoto enzymu^[103]

V dalších dvou méně často se vyskytujících vazebných seskupeních CYP3A4 a jeho substrátu ellipticinu se kyslík dostává jednak do blízkosti methylu uhlíkového atomu C-12 a též do přítomnosti dusíku v poloze N-2 ellipticinu. Ty jsou pak cílem hydroxylace za vzniku 12-hydroxyellipticinu, respektive N(2)-oxidu ellipticinu^[103].

Výsledky našich experimentů též ukazují, že lidská isoforma CYP3A4 je ve srovnání s jeho králičí orthologní formou CYP3A6 významnější v oxidaci ellipticinu na metabolity kovalentně modifikující DNA. To opět souhlasí s dosavadními experimenty^[35, 115, 116].

Studium oxidace ellipticinu lidským rekombinantním cytochromem P450 2B4 ukázalo, že i tato isoforma CYP podrodiny 2B, je v oxidaci ellipticinu málo účinná. Oproti jeho králičí orthologní formě však došlo k nárůstu ve tvorbě 12-hydroxyellipticinu (M2). Tvorba tohoto metabolitu se jevila být koncentračně závislá na obsahu CYP2B4 v inkubaci. Z uvedených výsledků můžeme usuzovat, že ellipticin není vhodným substrátem pro jeho oxidaci cytochromy P450 podrodiny 2B. V současné době jsou v naší laboratoři prováděny studie sledující vazbu ellipticinu do aktivního centra CYP2B4 pomocí počítačového modelování („docking“ ellipticinu) (Stiborová, ústní sdělení). Výsledky z těchto studií napovídají, že preferenční vazba ellipticinu do aktivního centra CYP2B4 je vazba ellipticinu jako ligandu Fe hemu, prostřednictvím interakce s dusíkem pyrimidinového kruhu ellipticinového skeletu. Taková vazba je pro oxidaci ellipticinu zcela nevýhodná (Stiborová, ústní sdělení).

Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 3A a 2B

V rámci studia oxidace ellipticinu CYP3A a CYP2B jsme se též zabývali vlivem cytochromu b₅ na tvorbu metabolitů ellipticinu. V předchozích studiích bylo zjištěno, že cytochrom b₅ může působit v reakcích katalyzovaných cytochromem P450 stimulačně, některé reakce však může naopak inhibovat^[77]. Jeho vliv je zjevně závislý na isoformě CYP a navázaném substrátu^[77, 93]. Funkce cytochromu b₅ je zatím známá pouze u některých izoform cytochromu P450 a jejich substrátů^[79].

Z provedených experimentů je patrné, že působení cytochromu b₅ je rozdílné u jednotlivých isoform CYP. Přítomnost cytochromu b₅ v inkubačních směsích CYP3A6 s ellipticinem měla při nižších koncentracích CYP3A6 inhibiční efekt na tvorbu všech pěti metabolitů ellipticinu, při vyšší koncentraci CYP3A6 však došlo vlivem cytochromu b₅ k nárůstu v tvorbě 12-hydroxyellipticinu (M2).

V inkubacích CYP2B4 s ellipticinem působil cytochrom b₅ stimulačně na tvorbu metabolitů ellipticinu, především 12-hydroxyellipticinu (M2), 13-hydroxyellipticinu (M3) a 9-hydroxyellipticinu (M1), v tomto uvedeném pořadí.

Nejvýrazněji se však stimulace tvorby metabolitů ellipticinu projevila u lidského CYP3A4, a to zejména při tvorbě 9-hydroxyellipticinu (M1), dále 13-hydroxyellipticinu (M3) a N(2)-oxidu ellipticinu (M5). Přeměna ellipticinu na 12-hydroxyellipticin (M2) byla naopak mírně inhibována. Tato pozitivní interakce mezi CYP3A4 a cytochromem b₅ může být vysvětlena několika způsoby. Zakládají se jak na schopnosti cytochromu b₅ urychlit přenos druhého elektronu do monooxygenasové reakce a zabránit tím rozpadu ternárního ferri-superoxidového komplexu, tak na stabilizaci komplexu vlivem cytochromu b₅ nebo například na přímém působení cytochromu b₅ jako efektoru, zvyšující tvorbu produktu, bez oxidačně-redukční úlohy cyt b₅ v monooxygenasové reakci^[79].

V případě lidského CYP2B6 jsme nezaznamenali výrazný vliv cytochromu b₅ na metabolismus ellipticinu tímto enzymem, tendence byly spíše inhibiční.

Výsledky uvedené v této diplomové práci dokreslují výsledky experimentálních studií získaných v průběhu předchozích prací^[26, 34, 35, 43, 103].

6 SHRNU TÍ A ZÁVĚR

Výsledky získané v diplomové práci splňují zadané cíle. Významně přispěly k poznání efektivity cytochromů P450 3A a 2B v oxidaci ellipticinu. Výsledky je možno shrnout následovně:

- Všechny studované cytochromy P450 podrodiny 3A a 2B přeměňovaly ellipticin na pět shodných metabolitů, a to na 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N(2)-oxid ellipticinu (M5). Tvorba 7-hydroxyellipticinu (M4) a N(2)-oxidu ellipticinu (M5) však byla u téměř všech testovaných CYP velmi malá, a tudíž špatně detekovatelná. Jedinou výjimku tvořil lidský rekombinantní CYP3A4, který katalyzoval přeměnu ellipticinu na N(2)-oxid ellipticinu (M5) efektivně.
- Množství a poměrné zastoupení detekovaných metabolitů ellipticinu se u jednotlivých isoform CYP lišilo.
- Studium oxidace ellipticinu lidským rekombinantním CYP3A4 v SupersomechTM se potvrdily výsledky z dosavadních studií, podle kterých je CYP3A4 nejvýznamnějším enzymem v přeměně ellipticinu na metabolity kovalentně modifikující DNA (13-hydroxyellipticin (M3) a 12-hydroxyellipticin (M2))^[103]. Jeho orthologní králičí forma CYP3A6 však katalyzovala oxidaci ellipticinu na tyto metabolity, ve srovnání s lidským CYP3A4, méně účinně. Tím jsme potvrdili a vysvětlili výsledky předchozích studií^[115].
- Z výsledků této práce je zřejmé, že oba studované cytochromy P450 podrodiny 2B, CYP2B6 a CYP2B4, nehrají významnou roli v oxidaci ellipticinu na jeho účinnější metabolity, neboť množství vzniklých metabolitů byla v porovnání s metabolity ellipticinu CYP3A nízká.
- Vliv cytochromu b₅ na tvorbu metabolitů ellipticinu jednotlivými isoformami CYP není jednotný. Cytochrom b₅ nejvýrazněji stimuloval vznik metabolitů u lidského CYP3A4, zejména 9-hydroxyellipticinu (M1), 13-hydroxyellipticinu (M3) a N(2)-oxidu ellipticinu (M5). Došlo i k výrazné změně v poměrném zastoupení jednotlivých metabolitů ellipticinu. Stimulační

působení cytochromu b₅ se projevilo i v inkubacích s ellipticinem o vyšší koncentraci králičího CYP2B4. Naopak inhibiční efekt na tvorbu metabolitů ellipticinu vykazoval cytochrom b₅ při nižších koncentracích králičího enzymu CYP3A6 a lidského rekombinantního CYP2B6.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. http://sz.ordinace.cz/lekce_úvod.php?lekce=8
2. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie*, Brno (2002)
3. <http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>
4. Doll R., Peto R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1191 (1981)
5. IARC: *Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Overall Evaluations of Carcinogenicity* (Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Suppl. 7), IARC, Lyon, 224 (1987)
6. Miller E. C., Miller J. A.: *Cancer* 47, 2327 (1981)
7. Hemminki K.: *Arch. Toxicol.* 52, 249 (1983)
8. Stiborová M.: *Chem. Listy* 96, 784-791 (2002)
9. Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* 4, 146 (1999)
10. Beach A. C., Gupta R. C.: *Carcinogenesis* 13, 1053 (1992)
11. Balmain A., Brown K.: *Adv. Cancer Res.* 51, 147 (1988)
12. Hussain S. P., Harris C. C.: *Cancer Res.* 58, 4023 (1998)
13. Arlt V. M., Shmeiser H. H., Pfeifer G. P.: *Carcinogenesis* 22, 133 (2001)
14. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha (1996)
15. Stiborová M.: *Biochemie chemické kancerogeneze*, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2005)
16. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: *Chem. Listy* 92, 661 (1998)
17. Miller E. C., Miller J. A.: *Cancer* 47, 1055 (1981)
18. Klener P.: *Vesmír* 73, 205 (1994/4)
19. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2002)
20. Klener P.: *Klinická onkologie*, Galén, Praha (2002)
21. Klener P.: *Chemoterapie-minimum pro praxi*, Triton, Praha (1999)
22. Stiborová M.: *Xenobiochemie*, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2005)
23. Menn J. J.: *Environ. Health Persp.* 27, 113 (1978)
24. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: *Chem. Listy* 98, 876 (2004)
25. Marešová L.: *Diplomová práce*, PŘF UK, Praha (1992)

26. Březinová A.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2005)
27. Kasper C. B., Henton D. C., Foureman G. L., Curtis J. F., Hughes M.F.: v knize *Enzymatic Basis of Detoxication II.* (Ed. Jakoby, W.B.), Academic Press, New York, str.3 (1980)
28. Stiborová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 857 (1998)
29. Howard P. C., Beland F. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 727 (1982)
30. Djuric Z., Fifer E. K., Yamazoe Y., Beland F. A.: *Carcinogenesis* 9, 357 (1988)
31. Marková V.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2003)
32. Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 23, 617 (2002)
33. Stiborová M., Hájek M., Frei E., Schmeiser H. H.: *Gen. Physiol. Biophys.* 20, 375 (2001)
34. Aimová D.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2001)
35. Kotrbová V.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2005)
36. Mrázová B.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2006)
37. Turek B., Hrubý S., Černá M.: *Nutriční toxikologie*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, str. 18-27, Brno (1994)
38. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999)
39. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* 28, 57 (2000)
40. Coon M. J.: *Nutr. Rev.* 36, 319 (1978)
41. Ghisla S., Massey V.: *Eur. J. Biochem.* 181, 1 (1989)
42. Eggink G., Engel H., Vriend G., Terpstra P., Witholt B.: *J. Mol. Biol.* 212, 135 (1990)
43. Aimová D.: *Dizertační práce*, PřF UK, Praha (2005)
44. Schacter B. A., Nelson E. B., Marver H. S., Masters B. S. S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972)
45. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)
46. Kasper C. B.: *J. Biol. Chem.* 246, 577 (1971)
47. Wang M., Roberts L. D., Paschke R., Shea M. T., Masters B. S. S., Kim P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411 (1997)
48. Oprian D. D., Coon. M. J.: *J. Biol. Chem.* 257, 8935 (1982)
49. Vermilion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* 256, 266 (1981)
50. Omura T., Sato R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964)

51. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)
52. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376 (1958)
53. Guengerich, F.P., Holladay, L.A.: *Biochemistry* 18, 5442 (1979)
54. Coon M. J., Persoon A.V.: v knize *Enzymatic Basis of Detoxication I.* (Ed. Jakoby, W.B.), Academic Press, New York, str.117 (1980)
55. Heinemann F. S., Ozols J.: *J. Biol. Chem.* 258, 4195 (1983)
56. Taniguchi H., Imai Y., Sato R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 585 (1984)
57. Hudeček, J.: *Hemoproteiny a metaloproteiny*, přednáška na PřF UK, Praha (2003)
58. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P., v knize: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics* (Archakov A.I., Bachmanova G.I., ed.), str. 1. INCO-TNC, Moscow 1992
59. Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: *J. Mol. Struct.* 214, 149 (1989)
60. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 811 (1998)
61. <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do>
62. Bend J. R., Foureman G. L.: *Mol. Environ. Res.* 14, 405 (1984)
63. Anari M. R., Khan S., Jatoe S. D., O'Brien P. J.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 22, 305 (1997)
64. Dahl A. R., Hadley W. M.: *Toxicol. Appl. Pharm.* 67, 200 (1983)
65. <http://metallo.scripps.edu/promise>
66. Guengerich F. P.: *J. Biol. Chem.* 266, 10019 (1991)
67. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: *FASEB J.* 6, 669 (1992)
68. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Chem. Listy* 95, 212 (2001)
69. Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzales F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okada K., Nebert D. W.: *DNA Cell Biol.* 12, 1 (1993)
70. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Philips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA* 8, 1 (1989)
71. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Drug Metab. Rev.* 27, 397 (1995)
72. Vergeres G., Waskell L.: *Biochimie* 77, 604 (1995)

73. Lu G., Lindqvist Y., Schneider G., Dwivedi U., Campbell W.: *J. Mol. Biol.* 248, 931-948 (1995)
74. Von Jagow G., Sebald W.: *Annu. Rev. Biochem.* 49, 281 (1980)
75. Hildebrandt A., Estabrook R. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 66-79 (1971)
76. Canova-Davis E., Waskell L.: *J. Biol. Chem.* 259, 2541-2546 (1984)
77. Peterson J., Prough R.: *Cytochrome P450-Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano P. R., ed.) 89-117, Plenum Press, New York (1986)
78. Mathews F. S.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 45, 1-56 (1985)
79. Schenkman J. B., Jansson I.: *Pharmakol. and Ther.* 97, 139-152 (2003)
80. Bilimoria M. H., Kamin H.: *Ann. NY Acad. Sci.* 212, 428 (1973)
81. Enoch H. G., Strittmatter P.: *J. Biol. Chem.* 254, 8976 (1979)
82. Omura T., Takesue S.: *J. Biochem.* 67, 249 (1970)
83. Iyanagi T., Makino N., Mason H. S.: *Biochemistry* 13, 1701-1710 (1974)
84. Oshino N., Omak Y., Sato R.: *J. Biochem.* 69, 155-167 (1971)
85. Strittmatter P., Velick S. F.: *J. Biol. Chem.* 221, 253-264 (1956 a)
86. Hara T., Minakami S.: *J. Biochem.* 69, 325 (1971)
87. Jansson I., Schenkman J. B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 89 (1977)
88. Staron K., Kaniuga Z.: *Acta Biochim. Pol.* 21, 61 (1974)
89. Strittmatter P., Velick S. F.: *J. Biol. Chem.* 221, 277-286 (1956 b)
90. Livingston D. J., McLachlan S. J., LaMar G. N., Brown W. D.: *J. Biol. Chem.* 260, 15699 (1985)
91. Hultquist D. E., Dean R. T., Douglas R. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 28 (1974)
92. Yamazaki H., Shimada T., Martin M.V., Guengerich F. P.: *J. Biol. Chem.* 276, 30885 (2001)
93. Zhang H., Myshkin E., Waskell L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 499 (2005)
94. Dalton L. K., Demerac S., Elmes B. C., Loder J. W., Stan J. M., Teitei T.: *Aust. J. Chem.* 20, 2715 (1967)
95. Le Pecq J. B., Dat Xuong N., Gosse C., Paoletti C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 5078 (1974)
96. Rouesse J. G., Le Chevalier T., Caille F., Mondesir J. M., Sancho-Ganier H., Levin M. E., Spielman M., DeJaeger R., Amidù J. L.: *Cancer Treat. Rep.* 69, 707 (1985)

97. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: *Biomed. Pharmacoter.* 52, 391 (1998)
98. Acton E. M., Narayanan V. L., Risbood P. A., Shoemaker R. H., Vistova D. T., Boyd M. R.: *J. Med. Chem.* 37, 2185 (1994)
99. Juret P., Tanguy A., Girard A.: *Nouv. Presse Med.* 8, 1495 (1979)
100. Mathé G.: *Biomed. Pharmacoter.* 53, 57 (1999)
101. Sharples D., Hajós G., Riedl Z., Csányi D., Molnár J., Szabó D.: *Arch. Pharm. Med. Chem.* 334, 269 (2001)
102. Diop B., Toure P., Sow M. T., Toure M., Halliez M. L., Castaigner J. P., Mondestr J. M., DeJaeger R.: *Med. Afr. Noire* 31, 107 (1984)
103. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374 (2004)
104. Ashby J., Elliot B. M., Styles J. A.: *Cancer Lett.* 9, 21 (1980)
105. Bertrand J. R., Giacomoni P. U.: *Chemioterapia* 4, 445 (1985)
106. DeMarini D. M., Abu-Shakra A., Gusta R., Hendee L. J., Levine J. G.: *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 12 (1992)
107. Auclair C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1 (1987)
108. Singh M. P., Hill G. C., Peoc'h D., Rayner B., Imbach J. L., Lown J. W.: *Biochemistry* 33, 10271 (1994)
109. Chu Y., Hsu M. T.: *Nucleic Acid Res.* 20, 4033 (1992)
110. Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thompson R. B.: *J. Biol. Chem.* 270, 14998 (1995)
111. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Jpn. J. Cancer Res.* 86, 819 (1995)
112. Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Hamanyma M., Nakanishi N., Ohashi M., *Anticancer Res.* 19, 3099 (1999)
113. Schwaler M. A., Allard B., Leskot E., Moreau F.: *J. Biol. Chem.* 270, 22709 (1995)
114. Stiborová M., Frei E.: *Chem. Listy* 95, 549-555 (2001)
115. Stiborová M., Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.* 16, 38 (2003)
116. Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675 (2001)

117. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int. J. Cancer* 107, 885 (2003)
118. Bořek-Dohalská L., Frei E., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 603 (2004)
119. Frei E., Bieler C. A., Artl V. M., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.* 64, 289 (2002)
120. Stiborová M., Rupertová M., Hodek P., Frei E., Schmeiser H. H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 476 (2004)
121. Šulc M., *Disertační práce*, PŘF UK, Praha (2002)
122. Wiechelman K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: *Anal. Biochem.* 175, 231 (1988)
123. Sottocasa G. I., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A.: *J. Cell Biol.* 32, 415 (1967)
124. Hagihara B., Sato N., Yamanaka T.: *The enzymes* 9 (Ed. Boyer, P. D.), Academic Press, New York, 549-593 (1975)
125. Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970)
126. Lindström-Seppä P., Koivusaari U., Hänninen O.: *Aquatic. Toxicol.* 3, 35 (1983)
127. Hudeček J.: *Metody biochemie*, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2003)
128. Yamazaki H., Johnson W. W., Ueng Y. F., Shimada T., Guenrerich F.P.: *The Journal of Biological Chemistry* 271, 27438 (1996)

