

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**STUDIUM STIMULACE
NADPH:CYTOCHROM P450
OXIDOREDUKTASY FLAVONOIDY**

Bakalářská práce

Praha 2006

Martina Teplá

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**STUDIUM STIMULACE
NADPH:CYTOCHROM P450
OXIDOREDUKTASY FLAVONOIDY**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2006

Martina Teplá

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Hodka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24.8. 2006

Tepla Martina
.....

podpis

Především bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Petru Hodkovi, CSc., který mě výborně vedl po celou dobu svou odbornou radou a pomocí.

Mé největší poděkování patří Michaelle Krausové za všestrannou pomoc při řešení problémů spjatých s experimentální částí práce.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	3
1.TEORETICKÁ ČÁST.....	4
1.1. CYTOCHROM P450.....	4
1.1.1. Úvod.....	4
1.1.2. Nomenklatura CYP a dělení forem.....	5
1.1.3. Chemická struktura CYP.....	5
1.1.4. MFO systém a monooxygenace.....	6
1.1.4.1. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce.....	6
1.1.4.2. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa.....	7
1.2.FLAVONOIDY.....	9
1.2.1. Úvod.....	9
1.2.2. Struktura a výskyt flavonoidů.....	9
1.2.3. Použité flavonoidy.....	10
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	11
3. MATERIÁL A METODY.....	12
3.1. MATERIÁL.....	12
3.2. METODY.....	13
3.2.1. Stanovení koncentrace CYP V MS frakcích.....	13
3.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy.....	13
3.2.2.1. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c.....	13
3.2.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy redukcí ferrikyanidu.....	14

3.2.3. Modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy.....	15
3.2.4. Stanovení aktivity CYP2B4 <i>O</i> -depentylací 7-pentoxyresorufin.....	15
3.2.5. Modulace přeměny 7-pentoxyresorufinu CYP2B4.....	16
4. VÝSLEDKY.....	17
4.1. Stanovení koncentrace CYP v MS frakcích.....	18
4.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy.....	19
4.2.1. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c.....	19
4.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy redukcí ferrikyanidu.....	20
4.3. Modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy.....	20
4.3.1. Modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c.....	20
4.3.2. Modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí ferrikyanidu.....	22
4.4. Optimalizace a přeměny pentoxyresorufinu CYP2B4 v MS.....	22
5. DISKUSE.....	25
6. SOUHRN.....	26
7. SEZNAM LITERATURY.....	27

SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
ANF	α -naftoflavon
A_{red}	aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy
BNF	β -naftoflavon
c	koncentrace
C_{P450}	koncentrace cytochromu P450
CYP	cytochrom P450
cyt c	cytochrom c
DMSO	dimethylsulfoxid
Met	methanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	mikrosomální frakce
NAD⁺ (NADH)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadeninukleotid fosfát oxidovaný (redukovaný)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
S	substrát
s.a.	specifická aktivita
s.o.	specifický obsah
t	čas
RH	redukovaný substrát
ROH	hydroxylovaný produkt

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. CYTOCHROM P450

1.1.1. Úvod

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) náleží mezi nejdůležitější enzymy účastnící se první fáze metabolismu cizorodých látek (xenobiotik). Metabolizované látky spadají většinou do skupiny hydrofobních sloučenin a jsou systémem CYP přeměňovány na látky polárnější, jež jsou dále snáze konjugovány a eliminovány z organismu. Biotransformace xenobiotik cytochromem P450 byla dříve vnímána jako proces oxidační detoxikace cizorodých látek. Pozdější výzkumy ale ukázaly, že vlivem CYP dochází v některých případech k aktivaci sloučeniny. Aktivaci lze hodnotit jako pozitivní (např. přeměna proléčiva v jeho aktivní, tj. farmakologicky účinnou formu) nebo jako negativní (zejména metabolickou aktivaci karcinogenů).

Cytochromy P450 se rovněž uplatňují při biosyntéze a metabolismu endogenních látek, zejména lipidů, steroidních hormonů, prostaglandinů, žlučových kyselin, vitamínu D3 atd.

Gafrinkel s Klingenbergem v roce 1958 objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450nm.^{1,2} Hemoproteinový charakter tohoto pigmentu dokázali roku 1964 Omura a Sato a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450.³

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií z doby více než před 1,5 miliardami let se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódujících cytochromy P450 prokaryotních i eukaryotních organismů. Celkově bylo popsáno asi 500 isoform. S vývojem samozřejmě vzrostlo i množství funkcí, které cytochromy P450 v jednotlivých organismech plní.

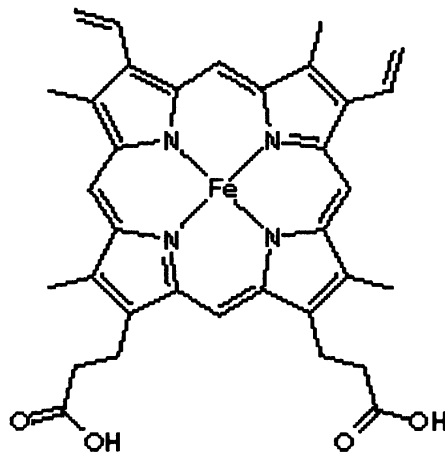
Cytochromy P450 se v lidském těle vyskytují především v játrech, nicméně významné jsou i jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplasmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií.

1.1.2. Nomenklatura CYP a dělení forem

Názvoslovný systém CYP byl zaveden roku 1987 a je založen na celkové podobnosti primárních sekvencí aminokyselin jednotlivých forem CYP. Podle procenta homologie aminokyselinové sekvence proteinové části dělíme CYP do rodin, vykazují alespoň 40% homologie v primární struktuře proteinu a označují se arabskými číslicemi (např. CYP1). Rodiny se dále dělí do podrodin, které vykazují alespoň 60% homologie v primární struktuře proteinu a označují se velkými písmeny (např. CYP1A). Jednotlivé CYP jsou označeny arabskými číslicemi (např. CYP1A1). Toto názvosloví vystihuje evoluční genetickou příbuznost funkcí jednotlivých forem CYP v různých organismech.^{4,5}

1.1.3. Chemická struktura CYP

Eukaryotický mikrosomální cytochrom P450 je hemoprotein složený z jednoho polypeptidového řetězce o délce kolem 500 aminokyselin obsahující jednu molekulu hemu b (Obr. 1) vázanou koordinačně kovalentní vazbou přes $-SH$ skupinu cysteinu, která je proximálním ligandem železa hemu.⁶ Nejedná se tedy o klasický cytochrom, ale o hemithiolátový protein.⁷ Vyskytuje se většinou v podobě shluků několika molekul o relativní molekulové hmotnosti až 500 kDa zanořených do membrány.⁸



Obrázek 1: Hem typu b⁹

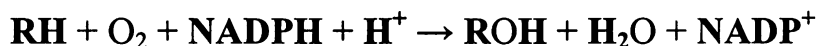
1.1.4. MFO systém a monooxygenace

Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO) je soubor enzymů lokalizovaných na vnější straně endoplasmatického retikula. Tento systém katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík.¹⁰ Je též označován jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí. Má tři základní složky: flavoproteinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasu, která slouží jako zdroj a dělič elektronového páru, hemthiolátový enzym cytochrom P450 jako terminální oxidasu a cytoplasmatickou membránu. Membránové lipidy udržují aktivní konformaci cytochromu P450, zvyšující afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450-NADPH:cytochrom P450 reduktasa a jsou zásobárnou hydrofobních substrátů cytochromu P450.⁶

1.1.4.1. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Monooxygenasová reakce zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími z flavoproteinové reduktasy, kterou je převážně NADPH:cytochrom P450 reduktasa, ale donorem druhého elektronu může být i NADH:cytochrom b₅ reduktasa.⁶

Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované MFO systémem lze vyjádřit sumární rovnicí:



V této rovnici je RH označován substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce.

1.1.4.2. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa

Enzym **NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa** (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný „žlutý protein“, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450¹² (daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450). Dále je také schopna redukovat cytochrom c¹³, cytochrom b₅¹⁴, hem oxygenázu, ferrikyanid, elongázu mastných kyselin a další.^{6,15} NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa může být za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b₅ reduktasou.¹⁶ Tato skutečnost je důležitá hlavně vzhledem k tomu, že jako redukovaný koenzym zde nemusí působit jen NADPH, ale též NADH.

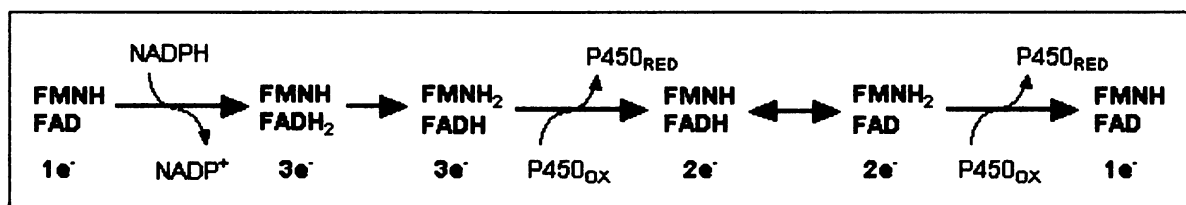
NADPH:cytochrom P450 reduktasa je z pohledu fylogeneze velmi konzervovaný enzym, NADPH:cytochrom P450 reduktasy z různých rostlinných a živočišných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci. Například lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92%, přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se nachází v N-terminální „kotvící“ oblasti a naopak FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná.¹⁷ Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce.¹⁸

NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně¹⁹, a hydrofilní C-terminální doménu (72 kDa).²⁰ Účinkem pankreatické proteasy, trypsinu, lze solubilizovat C-terminální doménu, která je částečně funkční: je schopna přenášet elektrony na cytochrom c a některé arteficiální akceptory elektronů, ale cytochrom P450 již neredukuje.²⁰

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a akceptorovou molekulou (cytochromem P450, cytochromem c) jsou hlavně elektrostatické povahy – kladně nabitý povrch akceptorové molekuly (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (asparát, glutamát). V případě cytochromu P450 se kromě iontových interakcí uplatňují také interakce hydrofóbní mezi nepolárními aminokyselinami v oblasti domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450.^{21,22}

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prostetických skupin.^{23,24,25} Akceptorem elektronů od NADPH je FAD, který elektrony následně předává

FMN. Za jednoelektronovou redukci akceptorové molekuly, cytochromu P450, je zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂.²⁶



1.2.FLAVONOIDY

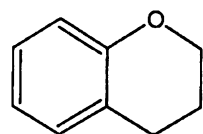
1.2.1.Úvod

Flavonoidy představují velmi rozsáhlou skupinu fytochemikálií vykazujících širokou paletu biologických aktivit. Významné jsou především pro své antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a protialergické účinky. Rovněž mají schopnost ovlivňovat různé typy enzymů a buněčných receptorů. Některé flavonoidy však vykazují účinky mutagenní, jiné mohou podstatně zasahovat do biochemických drah.²⁷

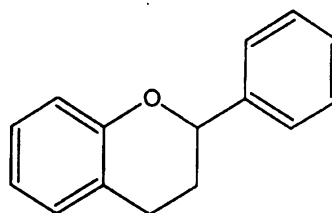
Mezi proteiny interagující s flavonoidy patří i CYP. Flavonoidy, jakožto heterogenní skupina látek, ovlivňuje enzymy různými cestami. Navozují expresi některých CYP, mohou stimulovat či inhibovat jejich metabolické aktivity. Touto cestou mohou ovlivňovat aktivaci karcinogenů či metabolismus léčiv. Inhibice CYP naopak vede k blokáde aktivace karcinogenů. Předpokládá se, že flavonoidy jakožto součást lidské stravy snižují riziko nádorových onemocnění, závislých zejména na steroidních hormonech. Pro svou strukturní podobnost se steroidními hormony se mohou vázat na receptory pro estrogény, nebo naopak blokovat klíčový enzym biosyntézy estrogenů, aromatasu.²⁷

1.2.2. Struktura a výskyt flavonoidů

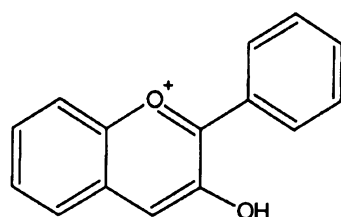
Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu rostlinných látek, jejichž struktury lze odvodit od flavanového skeletu (Obr. 3). Flavanový skelet se sestává ze dvou benzenových kruhů, A, B a pyranového kruhu C, napojeného na kruh A. Heterocyklus C obsahující kyslíkový atom je zodpovědný za typické vlastnosti flavonoidů. Fenylyl B může být na pyranový kruh napojen buď v pozici 2, jedná se pak o flavonoidy, nebo v pozici 3, pak hovoříme o isoflavonoidech, případně v pozici 4 u syntetických flavonoidů, tzv. neoflavonoidů. Další klasifikace je založena na stupni oxidace a substituce pyranového kruhu: flavany, flavanony, isoflavanony, flakony, isoflavony, chalkony, anthokyanidiny, flavonolignany a další. Flavonoidy se vyskytují prakticky ve všech druzích rostlin a to ve formě volné nebo glykosidicky či esterově vázané. Koncentrují se zejména v semenech, ovocné slupce, kůře a květech.



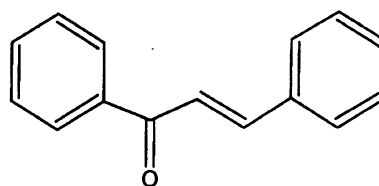
CHROMAN



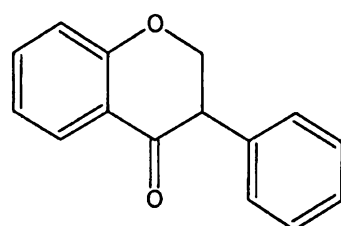
FLAVAN



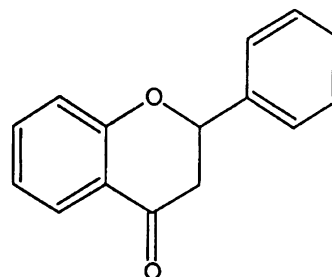
ANTHOKYANIDIN



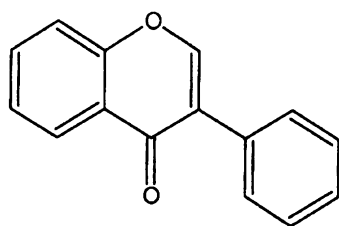
CHALKON



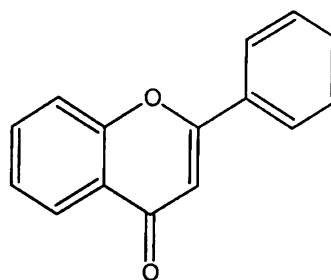
ISOFLAVANON



FLAVANON



ISOFLAVON

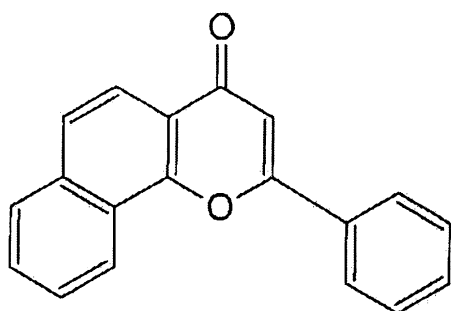


FLAVON

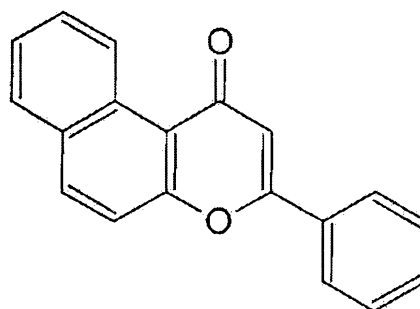
Obrázek 2: Struktury základních skeletů flavonoidů

1.2.3. Použité flavonoidy

V předchozích studiích byl sledován vliv flavonoidů na aktivitu cytochromů P450. Byl potvrzen inhibiční efekt α -naftoflavonu (7,8-benzoflavon) na aktivitu různých isoform CYP.²⁸ Tato práce se zaměřuje na studium vlivu α -naftoflavonu a jeho izomeru β -naftoflavonu (5,6-benzoflavon), na aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy.



α - naftoflavon



β - naftoflavon

Obrázek 3: Struktury sledovaných flavonoidů

2.CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předpokládané bakalářské práce bylo přispět k objasnění stimulačního efektu flavonoidů na aktivitu NADPH:cytochromu P450 oxidoreduktasy v závislosti na typu akceptoru přenášených elektronů.

K dosažení tohoto cíle bylo nutné splnit následující dílčí úkoly.

1. Ověření přítomnosti a metabolické aktivity CYP2B4 a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v MS frakcích králíka premedikovaného phenobarbitalem.
2. Optimalizace a studium metabolické aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy za použití cytochromu c a ferrikyanidu jako dvou arteficiálních akceptorů elektronů.
3. Optimalizace a studium přeměny pentoxyresorufinu CYP2B4 v MS pro sledování systému obsahujícího fyziologický akceptor elektronů.
4. Studium vlivu flavonoidů na aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy se všemi akceptory elektronů - cytochromu c, ferrikyanidu a CYP2B4 .

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

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

Linde, ČR

kapalný dusík

Merck, SRN

α -naftoflavon, β -naftoflavon

Reanal, Maďarsko

glukosa-6-fosfát

Sigma, USA

dimethylsulfoxid, nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (NADP^+) a redukovaný (NADPH), glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, 7-pentoxyresorufin

Lachema

ferrikyanid

MS indukované fenobarbitalem byly poskytnuty katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Všechny ostatní chemikálie byly produkty firmy Lachema, Brno, ČR.

3.2. METODY

3.2.1. Stanovení koncentrace CYP v MS frakcích

Koncentrace CYP v MS frakcích byla stanovena spektrofotometricky metodou dle Omury a Sato.³ Bylo využito absorbance komplexu redukovaného CYP s CO při 450 nm.

Mikrosomy byly naředěny na koncentraci proteinu 1-2 mg/ml 0,1 M K-fosfátovým pufrům; pH 7,4. Roztok byl sycen 60 s CO a poté rozdělen do dvou křemenných kyvet (optická dráha kyvet 0,5 cm) a byla registrována základní linie absorbance. Pak byl obsah vzorkové kyvety redukován dithioničitanem sodným a bylo měřeno diferenční spektrum v rozsahu vlnových délek 402-500 nm na Specordu M40.

Koncentrace CYP byla spočtena dle vzorce:

$$C_{\text{CYP}} = (A / \varepsilon) \times \text{ředění}$$

A.....změna absorbance [$A_{450} - A_{490}$]

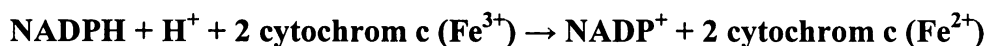
εmolární absorpční koeficient [$0,126 \text{ cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]

C_{CYP}koncentrace CYP [$\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]

3.2.2 Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy

3.2.2.1. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c.

Stanovení NADPH:cytochrom P450 reduktasy se provádí měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace NADPH při vlnové délce 550 nm.



Kyveta obsahovala: 980-x μ l 0,3 M K-fosfátového pufru; pH 7,5
x μ l MS frakce (koncentrace proteinu v kyvetě 1-2 mg/ml)
10 μ l cytochromu c (25 mg/ml)
10 μ l 10 mM NADPH

Nejprve je proměřena základní linie při 550 nm, poté bylo do kyvety přidáno 10 μ l NADPH a po důkladném promíchání měřena časová změna absorbance při 550 nm. Jako hodnota reduktasové aktivity (A_{RED}) byla brána změna absorbance při 550 nm (A_{550}) za určitý časový úsek. A_{RED} byla spočítána dle vzorce:

$$A_{RED} = [A_{550} / (\epsilon \times t \times l)] \times \text{ředění}$$

ϵmolární absorpční koeficient [$21 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]
t.....čas registrace [s]
l.....optická dráha kyvety [cm]
 A_{RED} aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy [$\mu\text{mol cyt c} / \text{min.ml}$]

3.2.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy redukcí ferrikyanidu.

Stanovení NADPH:cytochrom P450 reduktasy se provádí měřením rychlosti redukce ferrikyanidu za současné oxidace NADPH při vlnové délce 420 nm.

Pufr obsahoval: 0,3 M KH_2PO_4
0,1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Kyveta obsahovala: 980-x μ l pufru; pH 7,5
x μ l MS frakce (koncentrace proteinu v kyvetě 1-2 mg/ml)
10 μ l 10 mM NADPH

Nejprve je proměřena základní linie při 420 nm, poté bylo do kyvety přidáno 10 μl NADPH a po důkladném promíchání měřena časová změna absorbance při 420 nm. Jako hodnota reduktasové aktivity (A_{RED}) byla brána změna absorbance při 420 nm (A_{420}) za určitý časový úsek. A_{RED} byla spočítána dle vzorce:

$$A_{\text{RED}} = [A_{420} / (\epsilon \times t \times l)] \times \text{ředění}$$

ϵmolární absorpční koeficient [$1,02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

t.....čas registrace [s]

l.....optická dráha kyvety [cm]

A_{RED} aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy [$\mu\text{mol cyt c} / \text{min.ml}$]

3.2.3. Modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy

Aktivita reduktasy byla stanovena pomocí cytochromu c a ferrikyanidu dle postupu na straně 14 a 15. Kyveta obsahovala přidavek 5 μl roztoku modulátoru, případně rozpouštědla v případě kontrolních studií. Směs tedy obsahovala proměnné rozpětí koncentrací (10 μM - 200 μM) studovaných modulátorů přidávaných jako roztoky v methanolu.

3.2.4. Stanovení aktivity CYP2B4 O- depentylací 7- pentoxyresorufinu

Inkubační směs o celkovém reakčním objemu 500 μl obsahovala:

250 μl 0,3 M K-fosfátového pufru; pH 7,5

x μl MS frakce (koncentrace proteinu v kyvetě 1-2 mg/ml)

5 μl 0,5 mM 7-pentoxyresorufinu

50 μl 10 mM NADPH

190 – x μl H₂O

Do skleněné zkumavky s příslušným množstvím pufru bylo přidáno odpovídající množství MS, poté byl přidán roztok substrátu. Reakce byla iniciována NADPH-generujícím systémem. Po uplynutí sledované doby inkubace, jež probíhala za stálého třepání při teplotě 37°C (inkubátor G24 New Brunswick Scientific) byla reakce zastavena přidáním 2 ml methanolu. Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 2 minut na přístroji Vortex a následně centrifugována po dobu 10 minut při 5000 RPM (centrifuga Janetzki K2, výkyvný rotor 6 x 6 ml). 200 µl supernatantu bylo vneseno do mikrotitrační destičky. Následně byla změřena fluorescence na spektrofluorimetru při excitačním záření o vlnové délce 520 nm a emisním 585 nm, štěrbinách šířky 15 a 10 a registračním čase 5 s.

3.2.5. Modulace přeměny 7- pentoxyresorufinu CYP2B4

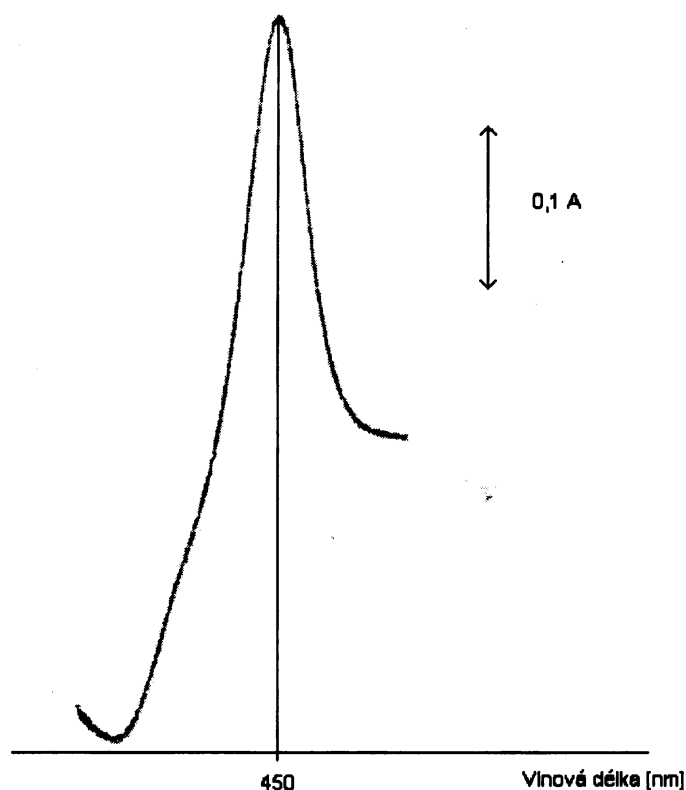
Metabolické studie byly prováděny dle postupu na straně 16. Reakční směs obsahovala 5 µl roztoků modulátorů, případně rozpouštědla v případě kontrolních studií. Směs tedy obsahovala proměnné rozpětí koncentrací (10 µM - 200 µM) studovaných modulátorů přidávaných jako roztoky v methanolu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Stanovení koncentrace CYP v MS frakcích

Koncentrace CYP byla změřena spektrofotometricky modifikovanou metodou Omury a Sato³, kdy byl vzorek nejdříve syčen CO, poté proměřena základní linie a následně byla provedena ve vzorkové kyvetě redukce (CO~Fe²⁺) a měřeno diferenční spektrum CYP.

Typické diferenční spektrum ukazuje obrázek 4. Je zřejmé, že CYP po redukcí vykazuje klasické absorpční maximum při 450 nm. Jedná se o velmi kvalitní preparát, protože není téměř patrné absorpční maximum při 420 nm, které vykazuje inaktivní forma cytochrom P450, cytochrom P420. Koncentrace CYP v mikrosomální suspenzi byla **227,7 μM**.



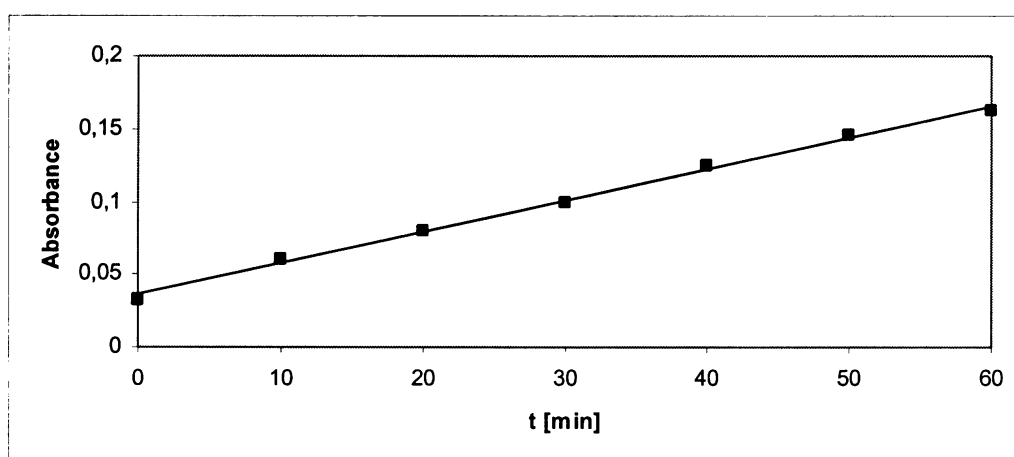
Obrázek 4: Diferenční spektrum CYP

Reakční směs obsahovala MS 2B4, K-fosfátový pufr s přidavkem 20% glycerolu. Směs ve vzorkové kyvetě byla sycena 60 s CO. Obsah vzorkové kyvety byl redukován dithioničitanem sodným a bylo měřeno diferenční spektrum v rozsahu vlnových délek 402 – 500 nm.

4.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy

4.2.1. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c

Aktivita reduktasy byla stanovena pomocí cytochromu c. Rychlost přenosu redukčních ekvivalentů NADPH:CYP oxidoreduktasou z NADPH na cytochrom c byla sledována spektrofotometricky jako časový přírůstek absorbance při vlnové délce 550 nm odpovídající přírůstku redukované formy cytochromu c (Obr. 5).

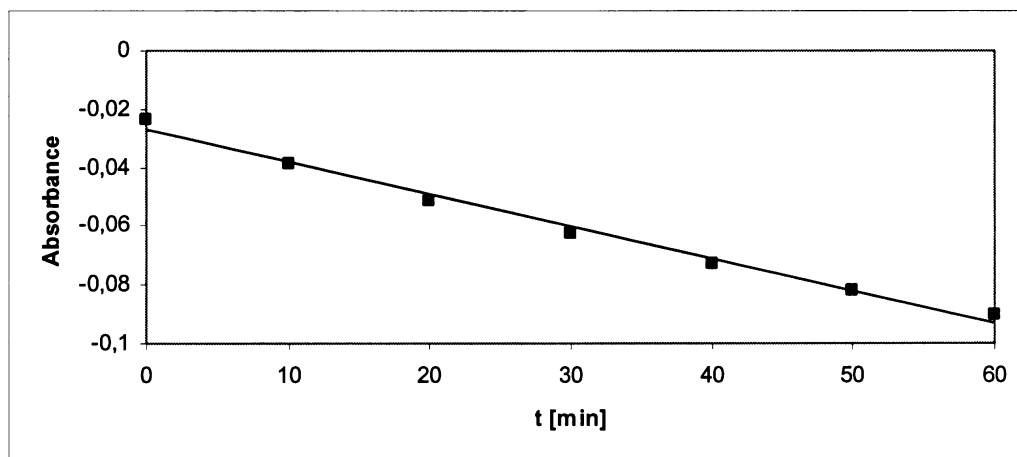


Obrázek 5: Spektrofotometrické stanovení reduktasy

Reakční směs obsahovala MS frakci a cytochrom c v 0,3 M draselném fosfátovém pufru; pH 7,5. Nejprve byla proměřena základní linie při 550 nm, poté bylo do směsi přidáno 10 μ l 10 mM NADPH a po důkladném míchání měřena časová změna absorbance při 550 nm.

4.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy redukcí ferrikyanidu

Dalším akceptorem elektronů je ferrikyanid. Aktivita reduktasy byla stanovena měřením rychlosti redukce ferrikyanidu při vlnové délce 420 nm (Obr.6).



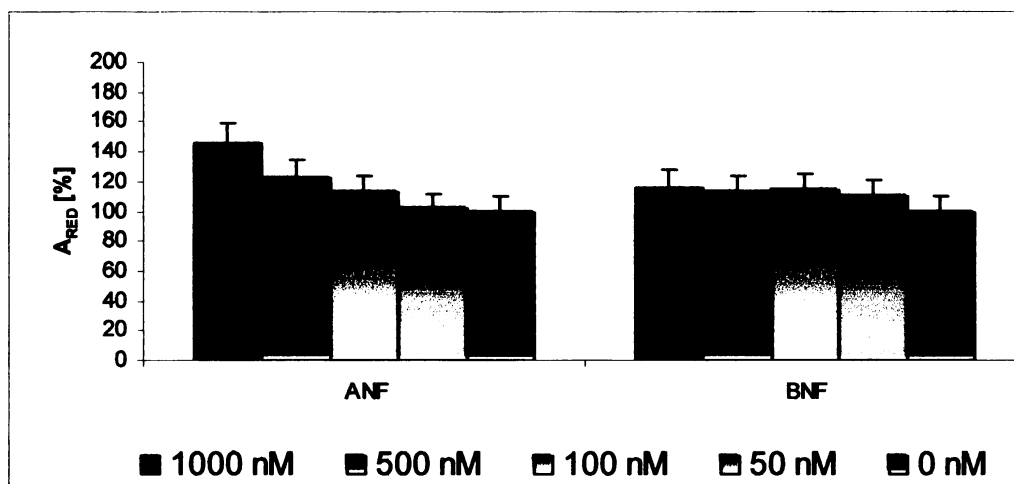
Obrázek 6: Spektrofotometrické stanovení reduktasy

Reakční směs obsahovala MS frakci, 0,3 M draselný fosfátový pufru; pH 7,5 s přidavkem 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$. Nejprve byla proměřena základní linie při 420 nm, poté bylo do směsi přidáno 10 μ l 10 mM NADPH a po důkladném míchání měřena časová změna absorbance při 420 nm.

4.3. Modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy

4.3.1. Sledování modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c

NADPH:CYP oxidoreduktasa tvoří nepostradatelnou součást MFO systému. Modulace její aktivity může mít vliv na aktivitu terminální oxidasy, tedy cytochromu P450. Aktivita tohoto enzymu byla stanovena nejprve pomocí cytochromu c (Obr.7). Jako modulátory byly použity ANF (α -naftoflavon) a BNF (β -naftoflavon) jako methanolicke roztoky.

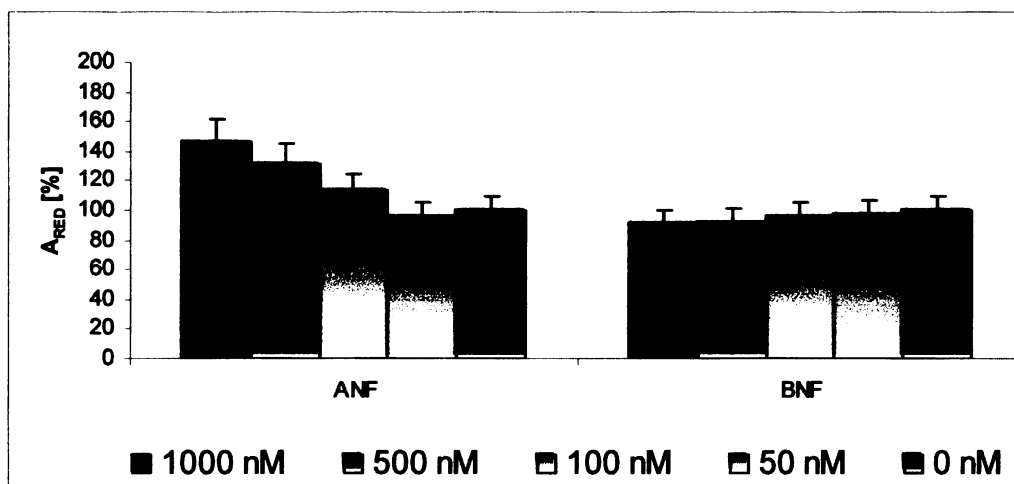


Obrázek 7: Ovlivnění aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy flavonoidy

Reakční směs obsahovala MS frakci, proměnné rozpětí koncentrací modulátorů (1000, 500, 100 a 50 nM). ANF (α -naftoflavon) a BNF (β -naftoflavon) byl do reakční směsi přidáván jako methanolický roztok. Jako substrát enzymu byl užít cytochrom c. Do grafu byla vynesena aktivita reduktasy [%], jako 100% aktivita byla brána hodnota aktivity reduktasy (A_{RED}) s odpovídajícím objemem daného rozpouštědla.

Jak dokazuje obrázek 7, oxidačně-redukční aktivitu NADPH:CYP oxidoreduktasy stimuluje pouze α -naftoflavon. Tato stimulace navíc vykazuje koncentrační závislost. Druhý testovaný flavonoid, β -naftoflavon, redukci cytochromu c tímto enzymem neovlivňuje.

4.3.2 Sledování modulační aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí ferrikyanidu



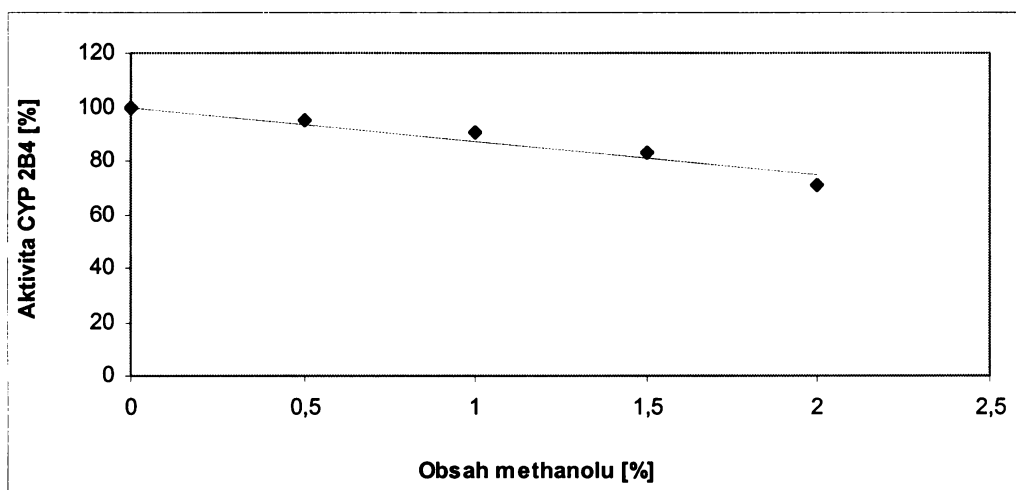
Obrázek 8: Ovlivnění aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy flavonoidy

Reakční směs obsahovala MS frakci, proměnné rozpětí koncentrací modulátorů (1000, 500, 100 a 50 nM). ANF (α -naftoflavon) a BNF (β -naftoflavon) byl do reakční směsi přidáván jako methanolický roztok. Jako substrát enzymu byl užít ferrikyanid. Do grafu byla vynesena aktivita reduktasy [%], jako 100% aktivita byla brána hodnota aktivity reduktasy (A_{RED}) s odpovídajícím objemem daného rozpouštědla.

Jak dokazuje obrázek 8, oxidoredukční aktivitu NADPH:CYP oxidoreduktasy stimuluje opět pouze α -naftoflavon. β -naftoflavon aktivitu reduktasy neovlivňuje.

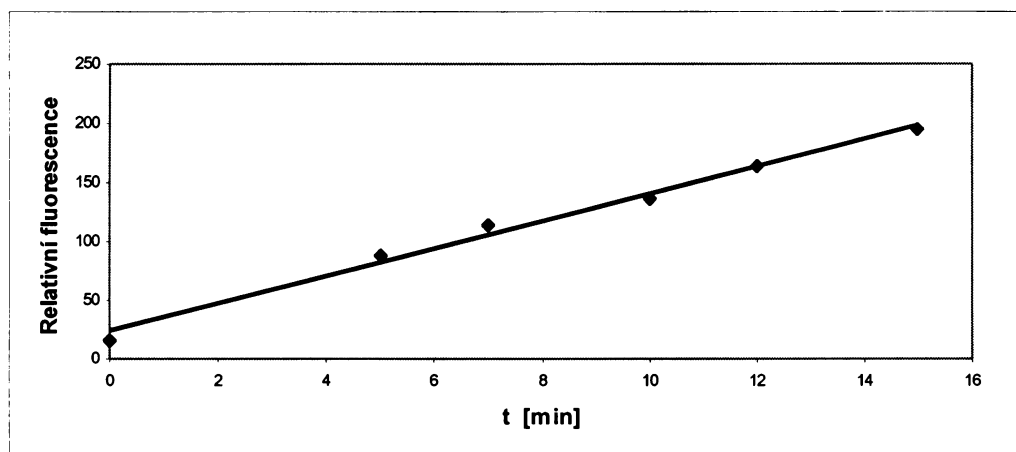
4.4. Optimalizace a studium přeměny pentoxyresorufinu CYP2B4

Měření bylo prováděno na spektrofluorimetru při excitačním záření o vlnové délce 520 nm.



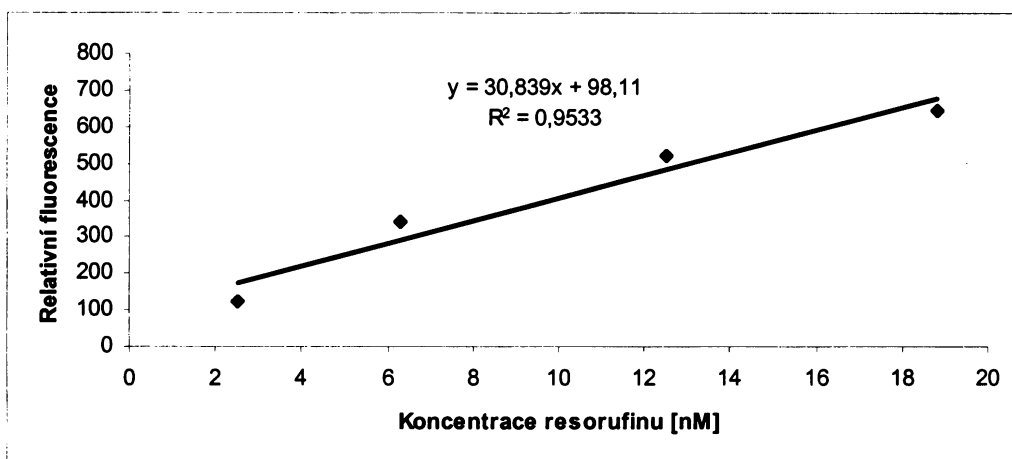
Obrázek 9: Vliv methanolu na aktivitu CYP 2B4

Reakční směs (500 μ) obsahovala MS frakci, 7-pentoxyresorufin, NADPH-GS. Po inkubaci 30 minut při 37°C byla změřena fluorescence, $\lambda_{excitační} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{emisní} = 585 \text{ nm}$, štěrby 15 a 10.



Obrázek 10: Časová závislost produkce resorufinu

Reakční směs (500 μ) obsahovala MS frakci, 7-pentoxyresorufin. Při inkubaci při 37°C byl postupně do směsi přidáván NADPH-GS. Poté byla změřena fluorescence, $\lambda_{excitační} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{emisní} = 585 \text{ nm}$, štěrby 15 a 10.



Obrázek 11: Kalibrační křivka resorufinu

Roztoky resorufinu v 0,1 M K-fosfátovém pufru; pH 7,4. Byla zde měřena fluorescence, $\lambda_{excitační} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{emisní} = 585 \text{ nm}$, štěrbin 15 a 10.

5. DISKUSE

V předpokládané bakalářské práci je sledována modulace aktivity NADPH:CYP oxidoreduktasy. Aby bylo možno tento záměr splnit, bylo třeba nejprve stanovit základní charakteristiky mikrosomálních preparátů. Byla změřena koncentrace CYP spektrofotometricky modifikovanou metodou Omury a Sato³, kdy je vzorek nejprve syčen CO, proměřena základní linie a následně je provedena ve vzorkové kyvetě redukce ($\text{CO}\sim\text{Fe}^{2+}$) a měřeno diferenční spektrum CYP. CYP po redukcí v komplexu s CO vykazoval klasické absorpční maximum při 450 nm. Absence absorpčního maxima při 420 nm dokazuje, že preparát neobsahoval inaktivní cytochrom P420.

Dále byla stanovena aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy za použití cytochromu c a ferrikyanidu jako substrátů. V obou případech byla nalezena odpovídající aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy pro daný typ mikrosomálních preparátů.

Navíc byla pomocí metody fluorimetrie sledována O-depentylační aktivita CYP2B4 za použití 7-pentoxyresorufinu jako fyziologického substrátu.

Díky splnění uvedených dílčích úkolů bylo možno hlavní pozornost soustředit na hlavní cíl této práce, kterým bylo studium vlivu flavonoidních struktur na aktivitu NADPH:CYP oxidoreduktasy. Jako modulátory byly použity testované syntetické flavonoidní sloučeniny α -naftoflavon a β -naftoflavon. Vliv na aktivitu studovaného enzymu byl sledován jako ovlivnění schopnosti této oxidoreduktasy redukovat cytochrom c a ferrikyanid. Získané výsledky zobrazené na obrázku 7 a 8 (strana 21, 22) jasně ukazují, že α -naftoflavon redukční aktivitu zvyšuje. Přítomnost β -naftoflavonu nevede k ovlivnění této aktivity. Lze tedy předpokládat, že stimulační efekt na redukcí cytochromu c a ferrikyanidu souvisí pravděpodobně se změnami redoxních potenciálů systému vlivem přítomnosti této sloučeniny. V případě O-depentylační aktivity CYP2B4 za použití 7-pentoxyresorufinu jako fyziologického substrátu nebyl pozorován žádný stimulační efekt testovaných flavonoidů. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že limitujícím krokem sledované metabolické reakce byla přeměna 7-pentoxyresorufinu na resorufin nikoli přenos elektronů z oxidoreduktasy.

Skutečnost, že α -naftoflavon má schopnost stimulovat NADPH:CYP oxidoreduktasu je významná zejména proto, že tento enzym nespolupracuje pouze s CYP, ale funguje jako donor a transportér elektronů i pro další metabolické reakce.

6. SOUHRN

1. Byla stanovena koncentrace CYP v MS frakcích. Stanovená hodnota byla 227,7 μM .
2. Byla stanovena aktivita NADPH:CYP oxidoreduktasy pomocí cytochromu c a ferrikyanidu jako substrátů.
3. Byl sledován vliv studovaných flavonoidních sloučenin na oxidačně redukční aktivitu NADPH:CYP oxidoreduktasy vůči cytochromu c a ferrikyanidu. V obou případech byla zjištěna stimulace enzymu α -naftoflavonem. β -naftoflavon aktivitu reduktasy signifikantně neovlivňoval.
4. S použitím fyziologického substrátu, 7-pentoxyresorufinu, byl sledován vliv flavonoidů (α -naftoflavonu a β -naftoflavonu) na aktivitu reduktasy. V použitém koncentračním rozmezí (1 μM – 100 μM) α -naftoflavonu a β -naftoflavonu nebyl pozorován žádný stimulační efekt.

7. SEZNAM LITERATURY

1. Garfinkel, D.: Arch. Biochem. Biophys. 77, 493 (1958)
2. Klingenberg, M.: Arch. Biochem. Biophys. 75, 376 (1958)
3. Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2370 (1964)
4. Nelson, D. W., Nelson, D. R., Feyreisen, R.: Xenobiotica 24, 1149 (1989)
5. Gonzales, F. J.: Pharmacol. Ther. 45, 1 (1990)
6. Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: Prac. Lék. 1, 15 (1992)
7. Hudeček, J.: Hemoproteiny, přednáška PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2003)
8. Guengerich, F. P., Holladay, L. A.: Biochemistry 18, 5442 (1972)
9. <http://metallo.scripps.edu/PROMISE>.
10. Coon, M. J.: Nutr. Rev. 36, 3198 (1978)
11. Coon, M. J., Ding, X., Pernecky, S., Vaz, A. D.: FASEB J. 6, 669 (1992)
12. Schacter, B. A., Nelson, E. B., Karcer, H. S., Masters, B. S. S.: J. Biol. Chem. 247, 3601 (1972)
13. Horecker, B. L.: J. Biol. Chem. 183, 593 (1950)
14. Enoch, H. G., Strittmater, P.: J. Biol. Chem. 254, 8976 (1979)
15. Souček, P., Gut, I.: Xenobiotica 22, 83 (1983)
16. Stiborová, M.: Xenobiochemie, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2004)
17. <http://www.expasy.ch/>
18. Shen, A. L., Kasper, C. B., Handbook of Experimental Pharmacology, 35 (1993)
19. Kasper, C. B.: J. Biol. Chem. 246, 577 (1971)
20. Wang, M., Roberts, L. D., Paschke, R., Shea, M. T., Masters, S. S. B., Kim, P. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 8411 (1997)
21. Nadler, S. G., Strobel, H. W.: Arch. Biochem. Biophys. 261, 418 (1998)
22. Tamburini, P. P., Schenkman, J. B.: Mol. Pharmacol. 30, 178 (1986)

23. Oprian, D. D., Coon, M. J.: J. Biol. Chem. 257, 8935 (1982)
27. Vermilion, J. L., Coon, M. J.: J. Biol. Chem. 253, 8812 (1978)
28. Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J.: J. Biol. Chem. 256, 266 (1981)
29. <http://www.farmakologie.net/interakce/cytochrom.html>
30. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Chem. Listy 93, 229 (1999)
31. Fiedlerová, J.: Diplomová práce, PřF UK (2005)