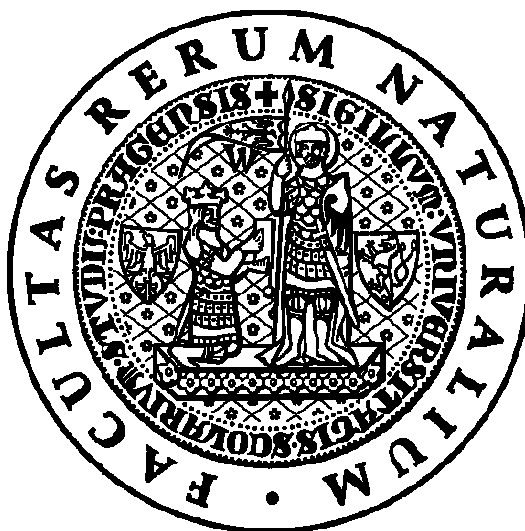


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ
KATEDRA BIOCHEMIE



Diplomová práce

**Mechanismus působení protinádorového léčiva ellipticinu
v cílových tkáních jeho účinku**

The mechanism of action of anticancer drug ellipticin in target tissues of its effect

Bc. Iveta Vranová

Vedoucí práce: *prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.*

21. srpna 2012

Prohlášení

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

V Praze dne 21. 8. 2012

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za vedení diplomové práce a také za její podporu, rady a věcné komentáře. Děkuji RNDr. Michaele Moserové, PhD., za objasnění experimentálních přístupů, odborné rady a trpělivost. Rovněž patří můj dík rodině za podporu při studiu a mému příteli za jeho velkou trpělivost a motivaci při psaní této práci.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantu GAČR P301/10/0356.

Abstrakt

Ellipticin je alkaloid čeledě Apocynaceae, který vykazuje významný protinádorový a anti-HIV účinek. Na metabolismu ellipticinu se podílí cytochromy P450 (CYP) a peroxidasy za vzniku aktivačních a detoxifikačních metabolitů. Již v dřívějších pracích byly identifikovány jednotlivé isoformy CYP, které se podílí na oxidaci ellipticinu v různých tkáních (játra, plíce, ledviny) laboratorního potkana, vhodného modelu ilustrujícího osud ellipticinu v lidském organismu. V této diplomové práci byl studován vliv ellipticinu na obsah a aktivitu cytochromů P450 a na dalších složek MFO systému v tomto zvířecím modelu. Pro stanovení obsahu CYP a dalších složek MFO systému v izolovaných mikrosomech byly využity spektroskopické a elektrochemické metody. Pro stanovení katalytické aktivity CYP a NADPH:cytochrom P450 reduktasy byly využity reakce se specifickými substráty. Z výsledků vyplývá, že u zvířat premedikovaných ellipticinem dochází k zvýšení exprese i katalytické aktivity CYP podrodiny 1A ve všech testovaných orgánech (játra, ledviny, plíce). V játrech navíc dochází vlivem ellipticinu ke zvýšení exprese cytochromu b₅ a zvýšení exprese a katalytické aktivity CYP3A. Podobně se i obsah a katalytická aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy měnila v závislosti na premedikaci zvířat ellipticinem.

Cytochrom P450 2S1 patří mezi cytochromy P450, u kterých doposud není zcela známa jejich fyziologická funkce v organismu. Pro objasnění funkce CYP2S1 a pro provádění metabolických studií bylo nutné CYP2S1 připravit pomocí heterologní exprese. Pro takové experimenty byly užity bakteriální systémy *E. coli*. V rámci diplomové práce byly popsány podmínky pro produkci plasmidu pCMV, který obsahoval gen pro CYP2S1 a z použitých bakteriálních kmenů byla izolována membránová frakce. V membránové frakci nebylo nalezeno žádné absorpční maximum při 450 nm typické pro CYP. Proto byl gen pro CYP2S1 upraven a vložen do expresního plasmidu pBAD-A, který obsahuje arabinosový operon. Pro produkci byly použity bakteriální kmeny vhodné pro tento regulační systém. Nicméně ani produkce v tomto expresním systému nepřinesla požadované výsledky pro produkci CYP2S1.

Klíčová slova

ellipticin, cytochromy P450, cytochrom b₅, cytochrom P450 2S1, heterologní exprese

Abstract

Ellipticine is an alkaloid isolated from Apocynaceae plants exhibiting significant antitumor and anti-HIV activities. Cytochromes P450 (CYP) and peroxidases are the enzymes participating in metabolism of ellipticine. This process provides activation and detoxication metabolites of ellipticine. The CYP enzymes, which participate in oxidation of ellipticine in different tissues (liver, lung and kidney) of rat, a model organism simulating the fate of ellipticine in humans have already been identified. In this work, the effects of ellipticine on contents and catalytic activities of CYPs and other components of the mixed-function oxidase (MFO) system in this animal system were studied. For detection of contents of CYPs and other components of the MFO system, spectroscopic and electrochemical methods were used. To determine catalytic activities of CYPs and NADPH:cytochrome P450 reductase, reactions with specific substrates of these enzymes were utilized. The results found in this study demonstrate that expression and catalytic activity of CYP1A is induced by ellipticine in all of the tested organs (liver, kidney and lung) of rats treated with the drug. Moreover in liver, the cytochrome b₅ expression is also induced. In addition, in this organ, expression and catalytic activity of CYP3A was increased by ellipticine. Likewise, the NADPH:cytochrome P450 reductase content and its catalytic activity were changed by ellipticine treatment.

The physiological function of cytochrome P450 2S1 organisms is still unclear. To explain its function and its participation in metabolism of xenobiotics, the pure CYP2S1 is necessary. In order to prepare this CYP, its heterologous expression in the bacterial expression systems of *E. coli* was used. The thesis describes the conditions suitable for production of plasmid pCMV, which contains the *CYP2S1* gene. The membrane fractions of the production bacterial system were isolated. The membrane fraction did contain any component exhibiting absorption maximum at 450 nm, typical for the CYP enzymes. Therefore, the *CYP2S1* gene were modified and inserted into the expression plasmid pBAD-A. This plasmid contains arabinose operon. For production of CYP2S1, other bacterial strains (TOP10 a LMG194) suitable for this regulatory system were used. However, the production of CYP2S1 in these expression systems was not successful again. No CYP2S1 was produced in the membrane fraction of these bacterial strains.

Key words

ellipticine, cytochromes P450, cytochrome b₅, cytochrome P450 2S1, heterologous expression

Obsah

1	ÚVOD	1
1.1	KANCEROGENEZE	1
1.1.1	Stupně kancerogeneze	2
1.1.2	Léčba nádorových onemocnění	2
1.1.3	Chemoterapie	3
1.1.4	Mechanismus účinku cytostatik	4
1.1.5	Osud léčiva v organismu	5
1.2	BIOTRANSFORMACE CIZORODÝCH LÁTEK	6
1.2.1	I. fáze biotransformace xenobiotik	7
1.2.2	II. fáze biotransformace xenobiotik	8
1.3	SYSTÉM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ	9
1.3.1	Cytochrom P450	10
1.3.1.1	Funkce a reakční mechanismus cytochromu P450	11
1.3.2	Regulace exprese cytochromů P450	13
1.3.2.1	Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu	14
1.3.2.2	Regulace hladiny cytochromů P450 inhibicí enzymu	15
1.4	CYTOCHROM b_5	16
1.4.1	Struktura cytochromu b_5	17
1.4.2	Mechanismus působení cytochromu b_5	19
1.4.3	Vliv cytochromu b_5 na reakce katalyzované cytochromy P450	20
1.5	CYTOCHROM P450 2S1	20
1.5.1	Regulace transkripce CYP2S1	22
1.5.2	Funkce CYP2S1	23
1.6	HETEROLOGNÍ EXPRESE	26
1.6.1	Plasmid pCMV-SPORT 6	27
1.6.2	Plasmid pBAD	28
1.7	ELLIPTICIN	30
1.7.1	Biotransformace ellipticinu	30
1.7.2	Mechanismy protinádorového působení ellipticinu	31

1.7.3	<i>Tvorba aduktů ellipticinu s DNA</i>	32
1.7.4	<i>Mechanismus oxidace ellipticinu</i>	33
2	CÍL PRÁCE	36
3	MATERIÁL A METODY	37
3.1	POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	37
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	40
3.3	METODY	41
3.3.1	<i>Premedikace laboratorních zvířat</i>	41
3.3.2	<i>Isolace mikrosomální frakce</i>	42
3.3.3	<i>Stanovení koncentrace proteinů</i>	43
3.3.4	<i>Stanovení obsahu cytochromu P450</i>	43
3.3.5	<i>Stanovení koncentrace cytochromu b₅</i>	44
3.3.6	<i>Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy</i>	45
3.3.7	<i>Sledování ethoxyresorufin-O-deethylační aktivity</i>	45
3.3.8	<i>Hydroxylace testosteronu</i>	46
3.3.9	<i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	47
3.3.10	<i>SDS elektroforéza</i>	47
3.3.11	<i>Metoda „Western blot“</i>	48
3.3.12	<i>Imunochemická detekce cytochromu P450</i>	49
3.3.13	<i>Příprava agarových ploten s ampicilinem</i>	49
3.3.14	<i>Příprava kompetentních buněk Escherichia coli</i>	50
3.3.15	<i>Transformace buněk E. coli</i>	51
3.3.16	<i>Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single cell colony“</i>	51
3.3.17	<i>Isolace plasmidové DNA</i>	51
3.3.18	<i>Isolace plasmidové DNA z agarosového gelu pomocí kitu „Jetquick-Gel Extraction Spin Kit“</i>	52
3.3.19	<i>Kultivace buněk E. coli</i>	53
3.3.20	<i>Kultivace buněk E. coli ve větším množství média</i>	53
3.3.21	<i>Isolace membránové frakce</i>	54
3.3.22	<i>Horizontální agarosová elektroforéza DNA</i>	55

3.3.23	<i>Určení koncentrace DNA</i>	56
3.3.24	<i>Polymerasová řetězová reakce - PCR</i>	56
3.3.25	<i>Štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a HindIII</i>	58
3.3.26	<i>Ligace</i>	58
4	VÝSLEDKY	59
4.1	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE ISOLOVANÉ Z TKÁNÍ LABORATORNÍHO POTKANA	59
4.2	VLIV ELLIPTICINU NA EXPRESI CYTOCHROMŮ P450 V MODELU LABORATORNÍHO POTKANA	59
4.2.1	<i>Vliv ellipticinu na expresi proteinů cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A1</i>	60
4.3	VLIV ELLIPTICINU NA EXPRESI DALŠÍCH ENZYMŮ A PROTEINŮ SYSTÉMU OXIDAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ.....	62
4.3.1	<i>Vliv ellipticinu na expresi cytochromu b₅ na úrovni proteinu</i>	63
4.3.2	<i>Vliv ellipticinu na expresi proteinu NADPH:cytochrom P450 reduktasy</i> ..	65
4.4	VLIV ELLIPTICINU NA ENZYMOVOU AKTIVITU CYTOCHROMŮ P450	66
4.4.1	<i>Vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu cytochromů P450 podrodiny 1A</i> ..	66
4.4.2	<i>Vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu cytochromu P450 podrodiny 3A</i> ..	67
4.5	VLIV ELLIPTICINU NA ENZYMOVOU AKTIVITU DALŠÍCH ENZYMŮ SYSTÉMU OXIDAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ	69
4.5.1	<i>Vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy</i>	69
4.6	PŘÍPRAVA CYTOCHROMU P450 2S1	71
4.6.1	<i>Příprava cytochromu P450 2S1 pomocí vektoru 2S1/pCMV</i>	71
4.6.1.1	Optimalizace produkce cytochromu P450 2S1	71
4.6.1.2	Isolace membránové frakce z buněk <i>E. coli</i> kmene C41 _{pLYS} a C43	74
4.6.2	<i>Příprava cytochromu P450 2S1 pomocí vektoru 2S1/pBAD-A</i>	76
4.6.2.1	Amplifikace insertu obsahující lidský gen <i>CYP2S1</i>	76
4.6.2.2	Vložení insertu <i>CYP2S1</i> do plasmidu pBAD-A	77
4.6.2.3	Exprese cytochromu P450 2S1 pomocí vektoru pBAD-A.....	78
4.6.2.4	Isolace membránové frakce z buněk <i>E. coli</i> kmene LMG194 a TOP10	79

5	DISKUSE.....	81
6	ZÁVĚR.....	86
7	LITERATURA.....	88

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
AQ4N	[1,4-bis{[2-(dimethylamino-N-oxid)ethyl]amino}-5,8-dihydroxy-anthracen-9,10-dion]
AQ4	1,4-bis{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-5,8-dihydroxyanthracen-9,10-dion
ARNT	jaderný translokátor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor nuclea translocator)
ATP	adenosintrifosfát
BaP	benzo[a]pyren
BaP-7,8-diol	dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyren
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CAR	konstitutivní androsteron receptor (constitutive androsteron receptor)
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa (cytochrome P450 reductase)
CYP	cytochrom P450
cyt b₅	cytochrom b ₅
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
DEX	dexamethason
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
EROD	ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylační aktivita
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenasa
GIT	gastrointestinální trakt
GR	receptor pro glukokortikoidy
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HRE	hypoxický regulační element (hypoxia response element)

HSP90	"heat shock" protein 90
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktosid
LB médium	Luria Broth médium
MeOH	methanol
MFO	monooxygenasový systém se smíšenou funkcí (mixed function oxidase)
mRNA	informační RNA (messenger RNA)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid redukována forma
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukována forma
OD	optická denzita
PAH	polycyklický aromatický uhlovodík
PCR	polymerasová řetězová reakce
PGG₂	prostaglandin G2
PGH₂	prostaglandin H2
PPAR	peroxisom-proliferační receptor (peroxisome proliferator-activated receptor)
PUVA	psoralen + UV-A
PXR	pregnan X receptor
P1	nerozrušené buňky a zbytky buněk
P2	inkluzní tělíška
P3	membránová frakce po frakční centrifugaci buněk <i>E. coli</i>
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
RARE	regulační element pro receptor retinové kyseliny (retinoic acid receptor response element)
Ras	Ras protein
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	hydroxylovaný produkt
RPM	počet otáček za minutu (revolution per minute)
RXR	retinoid X receptor
SDS	dodecylsírán sodný
Src	Src protein
S1	sonikované buňky
S3	cytosolární frakce po frakční centrifugaci buněk <i>E. coli</i>

TB médium	Terrific Broth médium
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
WB	metoda Western blot
XRE	xenobiotický regulační element (xenobiotic response element)

1 Úvod

1.1 KANCEROGENEZE

Proces tvorby nádorové buňky, její dediferenciace a vznik nádoru se nazývá kancerogeneze (resp. karcinogeneze). Nádorové buňky mohou napadnout kromě buněk v těsné blízkosti i přilehlé oblasti a rozšířit se tak do dalších orgánů [1]. Léčba nádorových procesů je náročná, protože nádorové buňky se od normálních buněk často liší pouze minimálně. Proto je imunitní systém nedokáže rozpoznat vůbec nebo může dojít až k paralýze imunitního systému.

Kancerogeneze je vícestupňový proces tvorby nádoru. Na počátku dochází k nahromadění několika genových mutací, což způsobí nesprávný přepis genu. Z takto přepsaného genu vzniká translační protein, který je nefunkční nebo je jeho funkce pozměněná. Tyto proteiny se většinou podílejí na regulaci buněčného cyklu. V procesu kancerogeneze může vznikat **benigní** nebo **maligní** nádor. Benigní nádor není rakovinný, ve většině případů je odstraněn a nedochází k návratu jeho tvorby. Naproti tomu maligní nádor neboli zhoubný nádor je velmi agresivní a je doprovázen vznikem metastáz. To znamená, že se může šířit dál v organismu a ničit tak okolní tkáň [2,3].

Na procesu kancerogeneze se podílí více faktorů, které je možné rozdělit do 2 základních skupin. Jsou to **vnější** a **vnitřní faktory**. Vnější faktory je možné dále podle povahy dělit:

- fyzikální – ultrafialové a ionizující záření,
- chemické – složky tabákového kouře, aflatoxiny, arsen, azbest,
- biologické – infekce z některých virů, parazitů a bakterií [4,5].

Mezi vnitřní faktory, které se podílí na mutacích genů, a které vedou k nádorovému bujení, patří metabolismus buněk nebo zděděné predispozice. Kromě těchto faktorů ovlivňují proces kancerogeneze věk, pohlaví a zdravotní stav (např. obezita) organismu. Nádorový proces není výsledkem pouze jednoho ze zmíněných faktorů. Častokrát je to souhrn více faktorů, které působí společně nebo postupně.

1.1.1 Stupně kancerogeneze

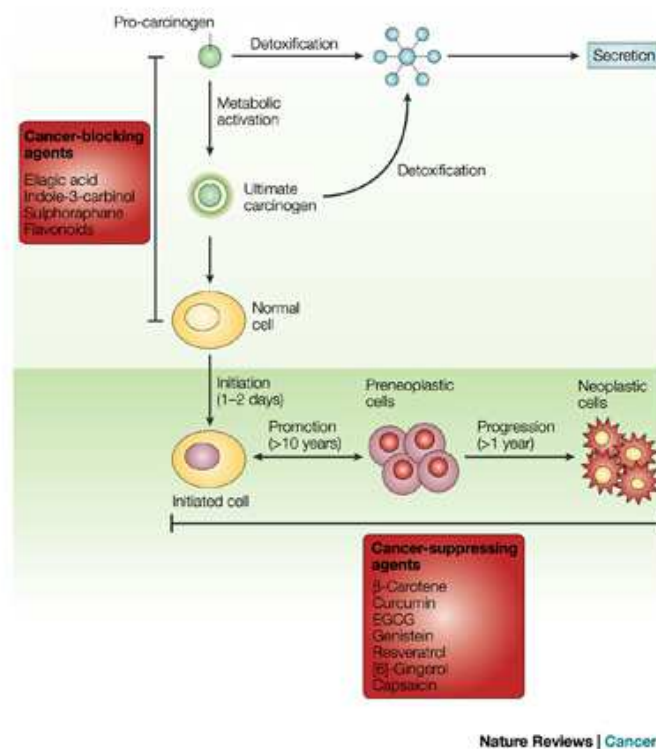
Na počátku procesu vzniku nádorové buňky je změna genetické informace. Nejčastěji dochází k mutaci DNA v **protoonkogenech** nebo **tumor supresorových genech**, jež jsou pro vznik nádorové buňky esenciální. Produkty těchto genů ovlivňují buněčný růst. Protoonkoproteiny (např. Ras protein, Src proteiny) jsou produkty protoonkogenů a jejich funkcí je stimulace růstu buňky. Když dojde k mutaci v protoonkogenu, mají protoonkoproteiny zvýšenou aktivitu. Naproti tomu produkty tumor supresorových genů potlačují růst buňky a udržují buňku v klidovém stádiu (G_0 fáze). Po genotoxickém zásahu jsou tyto proteiny (protein p53, RB proteiny) nefunkční [2]. Takto poškozená buňka vstupuje do **iniciační fáze**. V této fázi může dojít k reparaci poškozené DNA opravnými systémy a buňka tak může pokračovat v normálním růstu nebo dojde k její programové smrti, apoptóze. Pokud nedojde k opravě, buňka může setrvat v iniciační fázi několik týdnů až roků (latence). Další fáze kancerogeneze je **promoční fáze**. V této fázi, která trvá až několik let, dochází k zvýšené proliferaci. Látky, které upevňují mutace, způsobující změny v regulaci buněčného cyklu, se nazývají promotory [6]. Karcinogenní látky kromě cílové buňky působí také na její nejbližší okolí a tím vytváří ještě lepší podmínky pro proliferaci pozměněné buňky. Poslední stupeň vývoje nádoru je **progrese**. V tomto stádiu se doposud benigní nádor mění v maligní. Nádorové buňky se šíří krevním řečištěm do ostatních tkání a vznikají metastázy. Tento stupeň je ireverzibilní [7, 9, 10] (*Obrázek 1, str. 3*).

1.1.2 Léčba nádorových onemocnění

Léčba nádorových onemocnění se zaměřuje na léčbu, prodloužení života a zlepšení kvality života pacientů. Hlavní metody léčby jsou:

- **chirurgická léčba** – chirurgický výkon, vyjme se postižená tkáň z těla a zabrání se tak dalšímu šíření rakoviny,
- **chemoterapie** – použití speciálních léků, které zabrání dalšímu šíření rakoviny,
- **radioterapie** – ozařování, užívá se před chirurgickým zákrokem, někdy po zákroku a mnohdy také v kombinaci s chemoterapií,
- **biologická léčba** – napomáhá organismu ničit rakovinnou tkáň a často bývá v kombinaci s chemoterapií,

- **cílená terapie** – zasahuje přímo a cíleně do klíčových mechanismů kancerogeneze. Lék specificky ovlivňuje jeden buněčný proces s cílem poškodit nádorovou buňku a její okolí s minimálními nežádoucími účinky na zdravé buňky [11, 12].



Obrázek 1: Proces kancerogeneze. Prekarcinogenní látka je po vstupu do organismu aktivovaná endogenními látkami (např. cytochromy P450) na ultimativní karcinogen, který se váže na DNA v buňce. Vzniká iniciovaná buňka, která vstupuje do dalších fází kancerogeneze, které trvají až několik let. V červeném rámečku jsou uvedeny fytochemikálie, které blokují aktivaci na ultimativní karcinogen nebo potlačují promoční a progresní fázi. Převzato z [8].

1.1.3 Chemoterapie

Již z názvu chemoterapie je patrné, že tato terapie je založená na užívání chemických látek, **cytostatik**. Cytostatika jsou toxické látky, které zasahují do buněčného cyklu nádorové buňky a tím brání jejímu růstu a dělení. Nicméně cytostatika nerozlišují nádorovou a zdravou buňku. Proto při léčbě cytostatiky kromě toxického účinku na nádorovou buňku dochází k poškození zdravé tkáně. Ne všechny nádorové linie jsou vůči chemoterapii senzitivní. Některé mají obranné mechanismy, kterými unikají před působením těchto látek, jsou tzv. chemorezistentní. Podle citlivosti lze chemoterapii rozdělit do několika kategorií. **Kurativní chemoterapie** dosahuje klinické účinky od

projevů úlevy až k vyléčení, v závislosti na typu nádoru. **Adjuvativní** metoda je doplňkovou pro jiné možnosti léčení nádoru – radioterapie, podobně jako **neoadjuvativní**, která se využívá před chirurgickým zákrokem. **Paliativní** chemoterapie je určena pacientům, u kterých šance na vyléčení již není příliš vysoká, nicméně tento způsob léčby může prodloužit dobu přežití a zmírnit příznaky [13].

1.1.4 Mechanismus účinku cytostatik

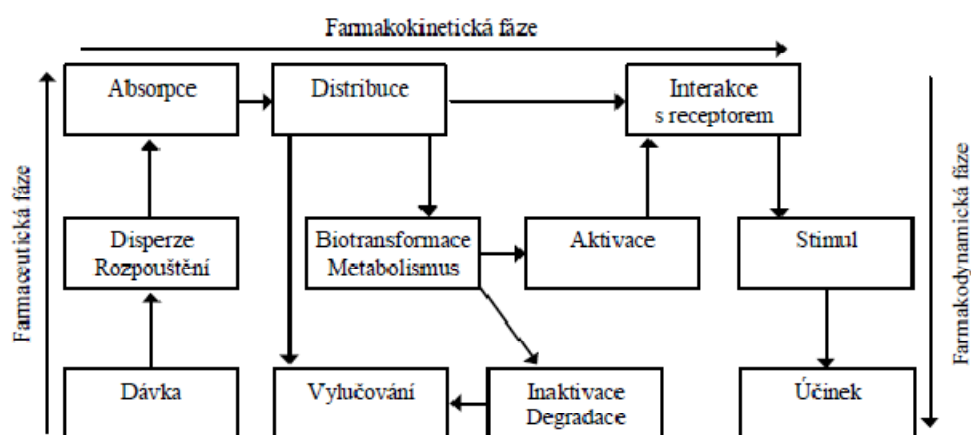
Cytostatika jsou látky, které působí různými mechanismy a na různé struktury v nádorové buňce, zejména na ty, které jsou nutné pro přežití buňky. Je to hlavně DNA nebo mitotické vřeténko, které je esenciální pro dělení buňky. Účinkem cytostatik dochází k zastavení růstu maligních buněk nebo k programové smrti – apoptóze. Cytostatika nejsou specifická, proto kromě rychle se dělících nádorových buněk působí i na zdravé buňky, které se dělí. Mechanismy účinku cytostatik jsou:

- **Poškození mitotického vřeténka** – inhibice polymerace tubulinových podjednotek na mikrotubuly, které mají funkci v metafázi v procesu buněčného dělení, patří sem tzv. mitotické jedy (vinkristin, vinblastin), nebo inhibice destrukce mikrotubulů (paklitaxel, docetaxel).
- **Poškození struktury a funkce nukleových kyselin** – prostřednictvím alkylace (mechlorethamin a jeho analog chlorambucil), interkalace (doxorubicin), štěpení DNA (epipodofylotoxiny) nebo inhibice topoisomeras (tekany), což má za následek nesprávné čtení genetické informace a z toho vyplývající nesprávná replikace a transkripce.
- **Porucha syntézy DNA a RNA inhibicí enzymů jejich metabolismu** – pomocí látek strukturně podobným metabolitům tzv. antimetabolity, dochází k inhibici syntézy DNA a RNA (analog kyseliny listové – methotrexát), anebo po svém zabudování do vlákna vznikají „falešné“ nukleové kyseliny.
- **Inhibice proteosyntézy** – působí pomocí enzymu L-asparaginázy štěpícího asparagin, nedostatek se projevuje poruchami proteosyntézy.
- **poškození buněčné membrány** [11,14,15].

Cytostatika kromě toho, že nerozeznají zdravou dělící se buňku od nádorové, způsobují nezvratné změny v genetické informaci „normálních“ buněk a mají toxický účinek na důležité orgány – játra, ledviny, plíce, srdce.

1.1.5 Osud léčiva v organismu

Obor, který se zabývá osudem léčiva po jeho vstupu do organismu, se nazývá **farmakokinetika**. Kvalitativně a kvantitativně popisuje farmakokinetické děje léčiva v organismu. Interakce mezi léčivem a organismem je komplikovaný proces, který se dá rozdělit do několika nejdůležitějších kroků, které spolu úzce souvisí. Prvním je **absorpce**, která představuje vstup léčiva do organismu, do krevního řečiště. Rychlost absorpce závisí na místě aplikace (intravenózní, perorální, inhalační, muskulární) na lékové formě a na vlastnosti léčiva. Léčivo se po vstupu do organismu transportuje mezi krevním řečištěm a orgány. Tato fáze, kdy léčivo musí překonat několik bariér (bariéry mezi organismem a vnějším prostředím, mezi krevním řečištěm a tkáněmi, membrány buněk) se nazývá **distribuce**. Jestli je léčivo lipofilní přestupuje do buňky difuzí. Jiné využívají transportní systém buňky nebo se dostávají do buňky endocytózou zprostředkovanou receptorem [17]. Léčiva se v krevním řečišti váží na molekuly bílkovin, vznikají tak komplexy – léčivo + bílkovina. Tento komplex může sloužit jako zásoba. Když klesne koncentrace volného léčiva, komplex se může rozpadnout, uvolní se volné léčivo a obnoví se rovnováha. Na druhé straně vznik takého komplexu snižuje koncentraci volného léčiva v cílových místech účinku. Tím dochází k nerovnoměrné distribuci farmaka. Jenom volné cytotstatikum je účinné a může podléhat dalším farmakokinetickým procesům. Léčivo ve volné formě je dále přeměňováno více či méně specifickými enzymy.



Obrázek 2: Osud léčiva v organismu. Převzato z [18]

Biotransformace je několikastupňový proces, který probíhá v metabolicky aktivních orgánech (játra, ledviny, plíce). Látka se stává víc polární a méně rozpustná v lipidech.

Některá cytostatika vstupují do organismu jako neúčinná proléčiva a právě v této fázi jsou metabolicky aktivované. Jiné jsou metabolickými procesy přeměňovány na méně účinné a méně toxické metabolity, které jsou vylučovány ven z organismu (*kapitola 1.2*). Metabolity se **vylučují** nejčastěji v moči nebo stolici. Mezi minoritní cesty vylučování patří vylučování potem, slinami nebo mateřským mlékem. Lipofilní látky se zpětně resorbují, protože se špatně vylučují ledvinami. Polární látky jsou vylučovány mnohem snadněji (*Obrázek 2, str. 5*) [16,17,18].

1.2 BIOTRANSFORMACE CIZORODÝCH LÁTEK

Cizorodé látky nebo xenobiotika (řec. *xenos* – cizí) jsou sloučeniny, které jsou tělu cizí. Jsou to sloučeniny, které nejsou za normálních podmínek přítomny v těle a nemají žádnou fyziologickou úlohu. Jejich koncentrace vysoko stoupá po přijetí z externího zdroje [19]. Jsou to látky jak hydrofilní tak hydrofobní povahy. Primárním zdrojem cizorodých látek je zejména chemický průmysl. Další šíření a využití xenobiotik produkovaných v chemickém průmyslu se označuje jako sekundární zdroj xenobiotik [20]. Kromě synteticky vyrobených cizorodých látek se do organismu mohou dostat také látky přírodního původu. Po vstupu do organismu jsou přeměňovány za účelem vyloučení z organismu. Obor, který se zabývá cizorodými látkami, se nazývá **xenobiochemie**. Xenobiochemie studuje, jak cizorodé látky působí na organismus a také jak organismus působí na xenobiotika.

Za biotransformaci xenobiotik jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení nebo potlačení toxicity. V takovém případě hovoříme o detoxifikaci cizorodé látky. Naopak když biotransformační reakce vedou k transformaci sloučeniny na metabolicky toxičtější látku, jedná se o aktivaci (*Obrázek 3, str. 8*). Jde zejména o aktivaci nemutagenních látek na mutageny nebo proléčiva na účinná léčiva [21]. U živočichů se rozlišují dvě fáze biotransformačních reakcí – **fáze I a fáze II**. V první fázi se do molekuly cizorodé látky zabudovává reaktivní polární skupina nebo se odkrývá funkční skupina již přítomná v molekule xenobiotika [21]. Proto se nazývá **derivatizační**. Zabudováním funkční skupiny se zvýší polarita sloučeniny a tím se látka připraví pro vstup do fáze II. Tato fáze se označuje jako **konjugační**, protože při ní dochází k tvorbě konjugátu polarizované cizorodé látky s endogenní sloučeninou. Těmito reakcemi se ještě zvyšuje polarita původně hydrofobní cizorodé látky. Takto metabolizovaná sloučenina je

eliminována z buněk a vyloučená ven z organismu. Většina těchto reakcí probíhá v játrech ale i v ledvinách, gastrointestinálním traktu (GIT) a plicích. Metabolismus látek v buňkách probíhá většinou v endoplazmatickém retikulu a cytosolu, ale jsou i další místa, jako mitochondrie a plazmatické membrány.

Důležitou součástí biotransformačních reakcí jsou **enzymy**. Obecně platí, že tyto enzymy chrání organismus vůči možnému škodlivému působení cizorodých nebo endogenních látek. Proto je většina tkání vybavena různými biotransformačními enzymy, které jsou v organismu přítomny buď konstitutivně, nebo je jejich množství indukováno po expozici xenobiotikem. Enzymy I. fáze jsou lokalizovány téměř výhradně v endoplazmatickém retikulu spolu s enzymem II. fáze, glukuronosyltransferásou. Naopak enzymy II. fáze včetně glutathion-S-transferázy jsou lokalizovány převážně v cytoplazmě [22,72].

1.2.1 I. fáze biotransformace xenobiotik

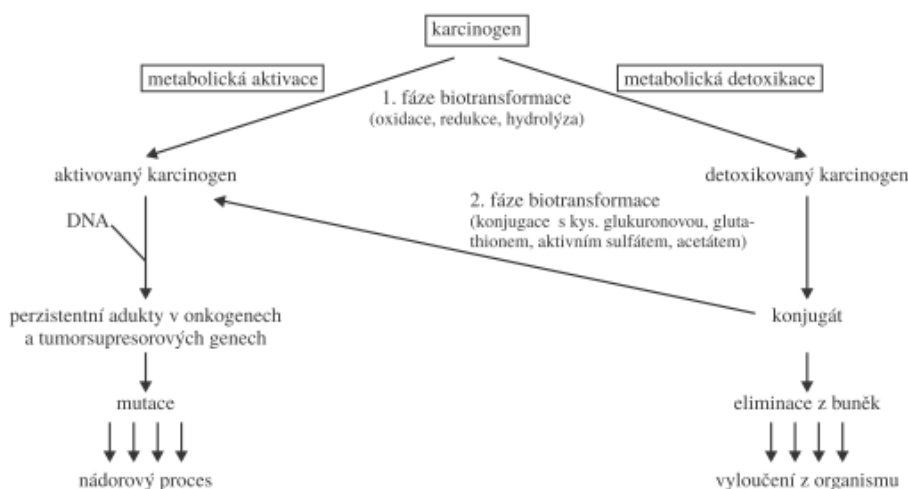
V první fázi biotransformace xenobiotik dochází ke zvýšení polaritý cizorodé sloučeniny zavedením nebo demaskováním polární skupiny do molekuly. To se děje především **oxidačními reakcemi**, ale i **redukčními**, případně **hydrolytickými**. Mezi oxidační reakce patří C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace a oxidace alkoholů. Mezi redukční reakce se řadí nitroredukce, azoredukce, a do hydrolytických biotransformačních reakcí vstupují estery a amidy. V první fázi biotransformace se xenobiotikum stává polárnější, je-li dostatečně polární, může být z organismu vyloučeno přímo. Ostatní polarizované cizorodé látky vstupují do II. fáze biotransformace. Tyto reakce tedy modifikují molekulu cizorodé látky tak, aby byla schopna konjugace s endogenními sloučeninami v konjugační fázi. Častým jevem zejména u léčiv nebo pro-karcinogenů je, že v první fázi biotransformace se teprve stávají účinnými a toxičtějšími.

Mezi hlavní enzymy, které katalyzují tyto reakce, patří **systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou** (*kapitola 1.3*). Dále na reakcích participují **peroxidasy**, flavínové monooxygenasy, dioxygenasy, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, katalasa, epoxidhydroxylasa. Z **redukčních enzymů** to jsou xantinoxidasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa [16,24,25].

1.2.2 II. fáze biotransformace xenobiotik

Konjugační reakce můžeme charakterizovat jako skupinu syntetických metabolických reakcí, při kterých xenobiotikum reaguje s endogenní sloučeninou nebo funkční skupinou za vzniku konjugátu. **Konjugát** je rozpustnější ve vodě než původní látka a je dostatečně polární na to, aby byl z buňky eliminován a vyloučen ven z organismu v moči nebo žluči. Cizorodá látka, která vstupuje do konjugační reakce musí ve své molekule obsahovat reaktivní funkční skupinu. Toto reaktivní centrum je do molekuly zavedeno v první fázi biotransformace. Mezi malé endogenní hydrofilní sloučeniny, které reagují s xenobiotiky za vzniku stabilního produktu, patří kyselina glukuronová, aktivní sulfát, aktivní acetát, glutathion, glycin, taurin a u rostlin glukosa. Většina z konjugačních reakcí jsou detoxikační a vzniklé konjugáty jsou transportovány a vylučovány. Nicméně za určitých podmínek i vznik konjugátu může vést k tvorbě aktivního metabolitu a zvýšení jeho toxicity. Takovým příkladem je vznik konjugátu z N-hydroxylovaného amínu a aktivovaného sulfátu případně aktivního acetátu. Takový konjugát se rozpadá za vzniku nitréniového iontu resp. karbéniového iontu, který může reagovat s DNA (*Obrázek 3*). Tento iniciační krok může stát na počátku celého procesu chemické kancerogeneze (*kapitola 1.1.1*).

Enzymy, které katalyzují konjugační reakce, patří hlavně do skupiny **transferas**. Jsou to zejména UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, N-acetyltransferasy a glutathion-S-transferasy [11,20,24,26].



Obrázek 3: Mechanismus působení kancerogenu. Převzato z [23].

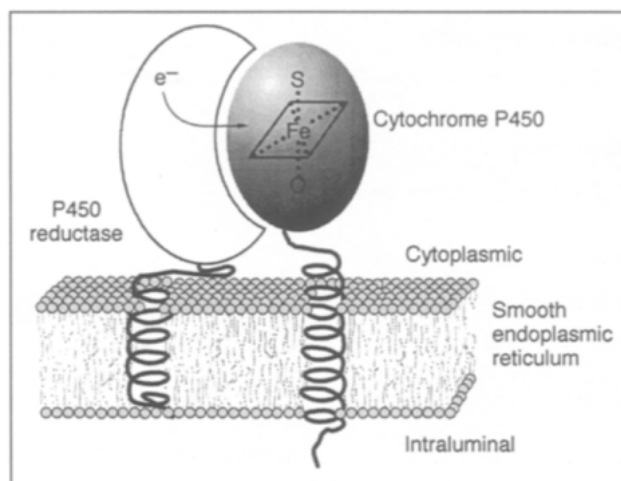
1.3 SYSTÉM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů lokalizovaných na vnější straně endoplasmatického retikula. Tento systém participuje na řadě oxidačních, oxygenačních nebo redukčních reakcích. Je složen ze tří základních složek: **NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cytochrom P450 a membrána** kde jsou tyto 2 enzymy zanořené (*Obrázek 4*). Kromě těchto tří složek může MFO systém (angl. mixed function oxidases) **fakultativně obsahovat cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasu.**

Na vnější straně endoplasmatického retikula (ER) je MFO systém zejména u orgánů, které jsou vystaveny působení cizorodých látek (játra, ledviny, plíce, GIT) a participuje na první fázi biotransformace. Cytochrom P450 a jeho reduktasa jsou těsně vázané na cytoplasmatické straně membrány ER [53].

Kromě membrány ER, je MFO systém lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně (kůra nadledvin). **Mitochondriální enzymový systém P450** se skládá z membránově vázaného cytochromu P450 a rozpustného NADPH-P450 redukčního systému. Ten je tvořen adrenodoxinem a NADPH:adrenoxin reduktasou. Mitochondriální MFO systém je přítomný u zvířat, zatímco u rostlin a hub nebyl doposud objeven [54].

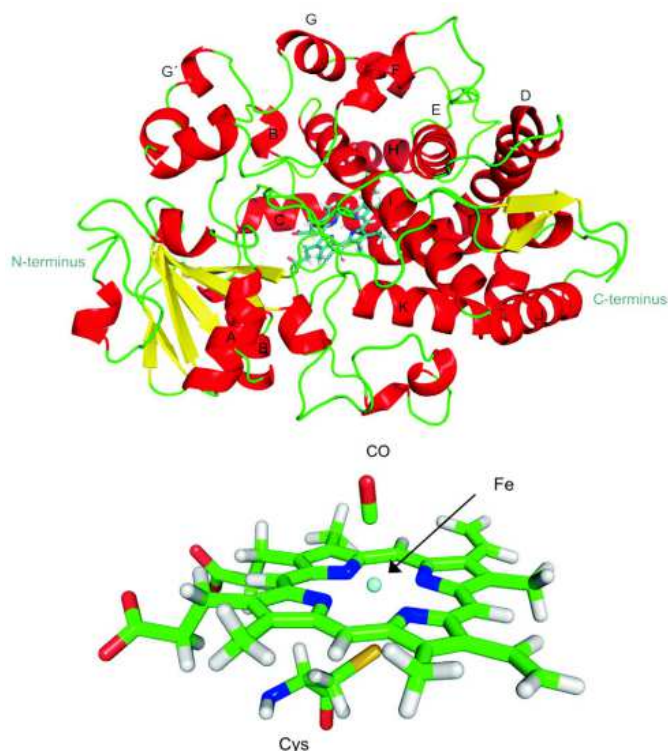
Třetí typ MFO systému, který byl popsán **u bakterií**, má obě složky (cytochrom P450 a redukující systém) přítomné v rozpustné formě v cytoplasmě.



Obrázek 4: Cytochrom P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa lokalizované na cytoplasmatické straně membrány ER [55].

1.3.1 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.) jsou hemové enzymy, které „aktivují“ molekulu kyslíku, která vstupuje do oxidačního metabolismu lipofilních organických látek. Omura a Sato ve své práci potvrdili, že nový pigment popsany v jaterních mikrosomech králíka [62,63], který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm, je hemoprotein. Na základě maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450 [64,65]. V eukaryotických buňkách je CYP membránově vázán v ER, obsahuje kolem 500 aminokyselin a prosthetickou skupinu protoporfyrin IX s navázaným železem. Na rozdíl od jiných hemových proteinů je atom Fe vázán přes thiolátovou skupinu cysteinu (proximální ligand) [56]. Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale jedná se o **hemthiolátový protein** (Obrázek 5).



Obrázek 5: Cytochrom P450 3A4 se značenou sekundární strukturou a jeho prosthetická skupina hem v aktivním centru. V dolní části obrázku je uvedena struktura hemu zobrazena pomocí MD simulace. Atom železa (azurová koule) je vázán na protoporfyrinový kruh a koordinovaný molekulou CO a cysteinem. Převzato z [67].

CYP participují v metabolismu různých endogenních a exogenních látek například steroidů, mastných kyselin, eikosanoidů, xenobiotik, envirometálních polutantů a

karcinogenů. U lidí bylo identifikováno 18 rodin, 44 podrodin a 57 funkčních CYP [57]. Funkční, substrátová a tkáňová specifita je u jednotlivých cytochromů P450 různá. CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, a CYP3A4 metabolizuje v játrech víc než 95 % léčiv. Rodina CYP4 se naproti tomu podílí na metabolismu mastných kyselin a eikosanoidů a CYP11, CYP17, CYP19 a CYP21 na metabolismu steroidů v kůře nadledvin, vaječnících a varlat [58].

Cytochromy P450 existují ve dvou spinových formách:

- **vysokospinová** – ion železa je v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je nad rovinou porfyrinového skeletu,
- **nízkospinová** – ion železa je hexakoordinován (spin 1/2) a hemové železo interaguje ještě s jedním ligandem (např. -OH, -COOH, -NH₂ skupina postranních řetězců aminokyselin apoproteinu, voda) a je v rovině kruhu protoporfyrinu IX [66].

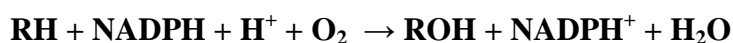
1.3.1.1 Funkce a reakční mechanismus cytochromu P450

CYP má několik enzymových aktivit (funkcí):

- **oxidasová** – aktivace molekuly kyslíku pro další (oxygenasovou) reakci CYP [68],
- **oxygenasová** – zabudování aktivovaného atomu kyslíku do molekuly substrátu,
- **peroxidasová** – místo kyslíku může CYP využít organický peroxid nebo peroxid vodíku a není potřeba NADPH,
- **redukční** – nedochází k aktivaci kyslíku, protože CYP redukuje přímo substrát, který je vázán na Fe v aktivním centru jako šestý ligand,
- **produkce peroxidu vodíku a aktivních forem kyslíku** – po aktivaci kyslíku nedojde k jeho zabudování do substrátu (oxygenasová reakce), ale takto aktivovaný kyslík je uvolněný do prostoru, kde z něho může vzniknout H₂O₂ (superoxiddismutasa, katalyzuje disproportionaci superoxidu kyslíku na peroxid vodíku a kyslík) [24,69].

Cytochrom P450 je terminální oxidasou MFO systému, zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku (resp. organického peroxid), jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu [59]. Elektrony potřebné k redukcí dodává z NADPH NADPH:cytochrom P450 reduktasa

[60] případně z NADH, NADH:cytochrom b₅ reductasa [61]. Monooxygenasovou reakci katalyzovanou MFO systém lze zapsat:

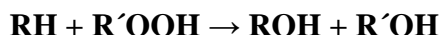


Na *obrázku 6* (str. 13) je znázorněn reakční cyklus CYP. Mechanismus působení CYP pozůstává z několika kroků:

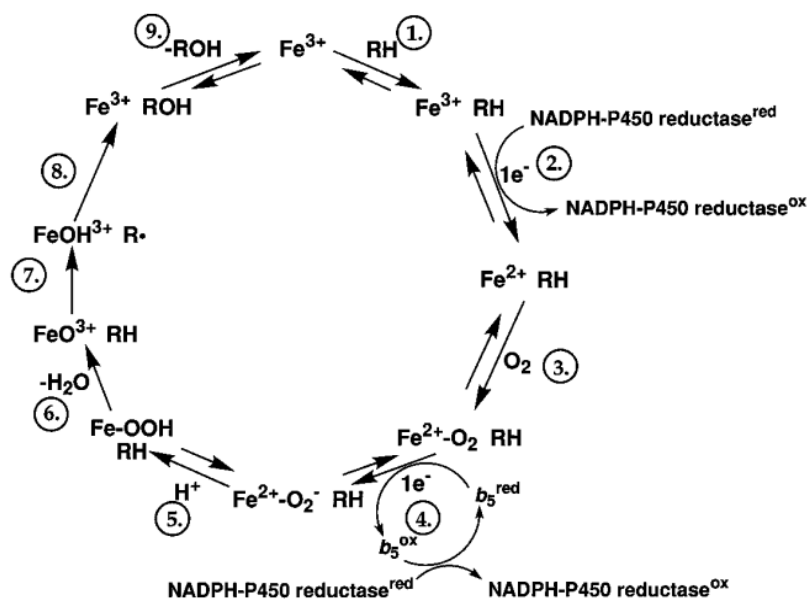
1. CYP je v klidovém stavu, Fe má náboj 3+ (ferri forma) a je hexakoordinováno (nizkospinová forma). Po navázání substrátu (RH) do aktivního místa enzymu se stává železo penatakoordinované (vytěsnění šestého ligandu) a nastává konformační změna molekuly CYP.
2. CYP s navázaným substrátem interaguje s NADPH:cytochrom P450 reductasou (CPR), čímž se hemové železo redukuje na Fe²⁺ (ferro forma) a je stále pentakoordinováno.
3. V tomto kroku se váže do aktivního centra CYP molekula kyslíku (nebo popřípadě molekulu CO) a vzniká ternární ferri-superoxidový komplex. Železo je opět v nizkospinovém stavu (hexakoordinováno).
4. Tento nestabilní komplex je redukován CPR nebo cytochromem b₅ za vzniku ferro-superoxidového komplexu. 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.
5. Jeden atom kyslíku je redukován na vodu, zatímco druhý zůstane vázán na iontu Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex.
7. V tomto kroku dochází k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu (RH•) a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa hemu.
8. Mesomerní posun elektronů. Vzniká forma s navázanými dvěma radikály (OH a substrát).
9. Rekombinace radikálů za uvolnění hydroxylovaného substrátu (ROH) z enzymu a obnovení nativní formy cytochromu P450 [21,24].

Jak již bylo zmíněno výše, CYP má kromě oxidásové a oxygenásové funkci i peroxidásovou. Donorem kyslíku tak kromě samotné molekuly O₂ mohou být peroxidy,

peroxikyseliny nebo hydroperoxydy (peroxidace lipidů). Sumární rovnice peroxidasové aktivity CYP je:



kde RH je substrát, R'OOH je hydroperoxid, ROH je hydroxylovaný produkt reakce a R'OH alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu. Tyto reakce probíhají neuspořádaným mechanismem (vazba peroxidu nezávisí od vazby substrátu) [21].



Obrázek 6: Reakční cyklus cytochromu P450. RH – substrát, ROH – monooxygenační produkt, Fe – atom železa. Převzato z [34,69].

1.3.2 Regulace exprese cytochromů P450

Cytochromy P450 se v lidském těle vyskytují především v játrech, ale i v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinách. V závislosti na tom, jestli je možné jejich množství ovlivnit se dělí na **konstitutivní** a **inducibilní**. Jejich obsah v jednotlivých tkáních proto nelze brát absolutně a je závislý na mnoha faktorech, které lze rozdělit do dvou skupin:

- **genetický polymorfismus** – vrozené změny DNA vedou k absenci CYP, k nemožnosti indukce CYP nebo i ke tvorbě formy CYP, která má změněnou katalytickou aktivitu. Za genetický polymorfismus lze označit geneticky podmíněnou odlišnost, která se vyskytuje minimálně u 2 % populace.
- **vnější podmínky** – chemické polutanty, léčiva, alkohol, kouření, výživa [59].

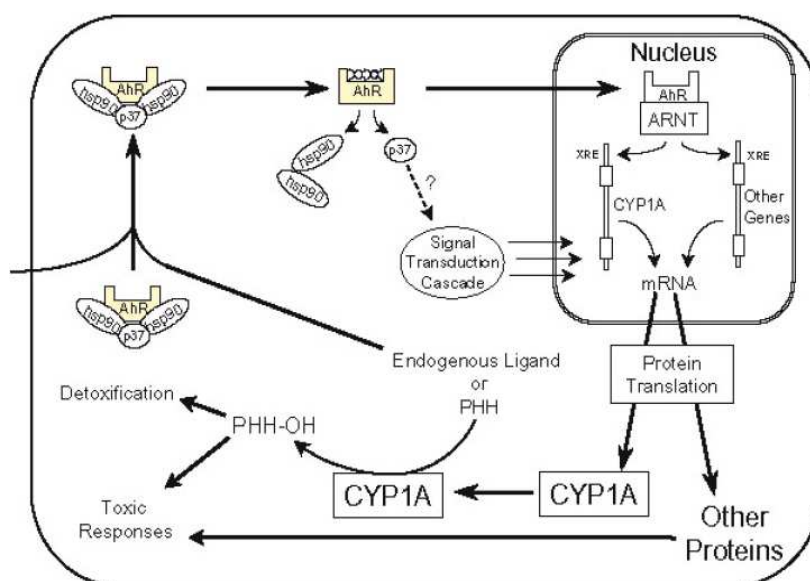
1.3.2.1 Regulace hladiny cytochromů P450 indukcí enzymu

Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů [66]. Indukce enzymu se může dít na 3 úrovních:

- **zvýšená transkripce,**
- **zvýšená translace mRNA a/nebo její stabilizace,**
- **potlačená degradace proteinu** [55].

Hlavním mechanismem enzymové indukce je zvýšení hladiny transkripce. Indukce cytochromů P450 cizorodými látkami (*Obrázek 7*) je zprostředkována intracelulárními receptory (cytosolární, jaderné). Mezi tyto receptory patří:

- **AhR** (aryl hydrocarbon receptor) – CYP1A1/2,
- **CAR** (constitutive androstane receptor) – CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4,
- **PXR** (pregnane X receptor) – CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP3A,
- **PPAR** (peroxisome proliferator activated receptor) – CYP4 [71,72].



Obrázek 7: Mechanismus indukce CYP1A přes AhR receptor. Převzato z [74].

CAR, PXR, PPAR jsou jaderné receptory s vazebnou doménou pro DNA. Po navázání ligandu na receptor tvoří s dalším jaderným receptorem RXR (angl. retinoid X receptor) heterodimer. Ten je schopný se vázat na několik různých míst v DNA (rozpoznávací element genu), které kódují CYP [71].

Mechanismus indukce exprese genu pro CYP1A1 je doposud nejlépe popsáný ze všech cytochromů P450. Indukce zahrnuje aktivaci cytosolického transkripčního faktoru AhR, který je za normálních podmínek inaktivován asociací s HSP90 (tzv. „heat shock“ protein). Po navázání ligandu na AhR dojde ke konformační změně disociaci HSP90 a transportu do jádra. V jádře dimerizuje s dalším proteinem ARNT (angl. Ah receptor nuclear transporter). AhR/ARNT komplex interaguje s vazebným elementem XRE na DNA (*Obrázek 7*). Po navázání na DNA se zahajuje transkripce genu CYP [55,71,73].

Indukce cytochromů P450 většinou zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxikaci a k vyloučení z organismu. Některé cytochromy P450 však mohou nereaktivní sloučeninu přeměňovat na chemicky aktivní, toxické či kancerogenní intermediáty. U léčiv vyžadujících metabolickou aktivaci může indukce cytochromu P450 vést ke zvýšení jejich farmakologického účinku [2].

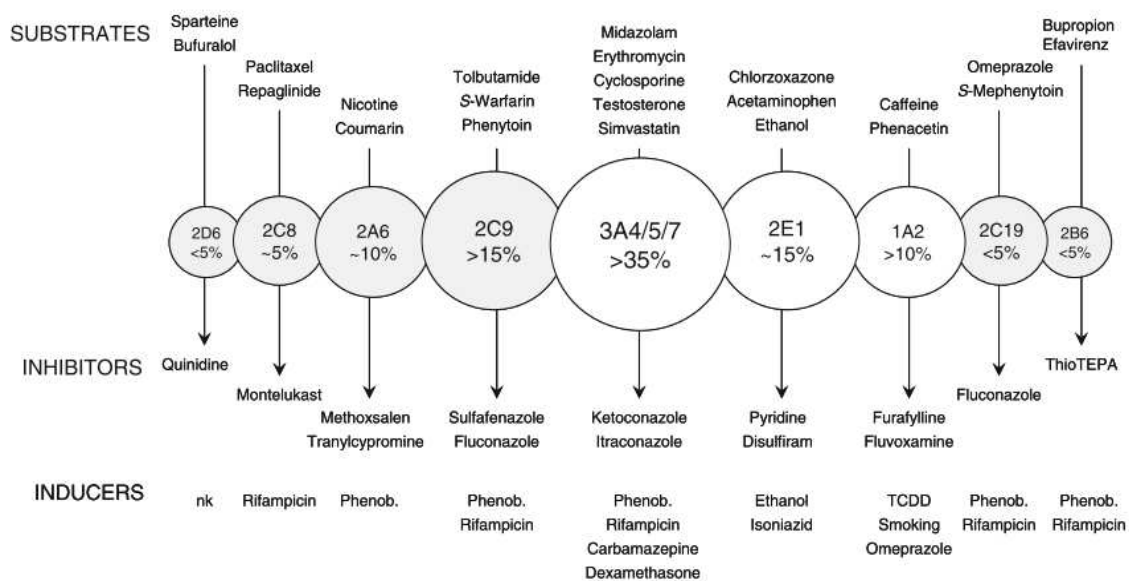
1.3.2.2 Regulace hladiny cytochromů P450 inhibicí enzymu

Inhibitor je látka, která snižuje katalytickou aktivitu daného enzymu. Míra inhibice závisí na koncentraci inhibitoru a čase působení. K inhibici enzymu může dojít prostřednictvím tvorby přechodného komplexu metabolit-enzym nebo silné kovalentní vazby metabolit-enzym [71]. V katalytickém cyklu cytochromu P450 jsou možné tři cíle zásahu inhibitoru: vazba substrát enzym, vazba O₂ a oxidace substrátu [75].

Inhibitory cytochromů P450 se dělí do tří skupin, podle toho zda tvoří:

1. **reversibilní vazbu** – soutěž mezi substrátem a inhibitorem o aktivní místo enzymu. Vazba inhibitoru je slabá a snadno se dá rozrušit,
2. **„kvazi“-ireversibilní komplex s atomem železa hemu** - inhibitor metabolizován cytochromy P450 na aktivní intermediát, který se váže na atom železa,
3. **ireversibilní vazbu** – inhibitor se váže na protein, hemovou část nebo urychluje degradaci a oxidační rozpad prosthetické skupiny [75].

Dále se inhibitory dělí podle toho, na jakou část enzymu se váží na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Častým jevem je smíšený typ inhibice [71]. Na *obrázku 8* jsou zobrazeny příklady některých specifických inhibitorů CYP.



Obrázek 8: Relativní zastoupení jednotlivých forem CYP v játrech. Jsou zde uvedeny též substráty, inhibitory a induktory CYP (nk – není známo). Převzato z [71].

1.4 CYTOCHROM b₅

Cytochrom b₅ (cyt b₅) je hemoprotein (cca 15 kDa), který je vázán v membráně endoplazmatického retikulu. Původně se označoval jako cytochrom m (m jako mikrosomy), protože byl přítomný v mikrosomech (subcelulární frakce získaná z endoplazmatického retikula po rozbití a ultracentrifugaci buněk) [27]. Obsahuje protoporfyrin IX a neváže CO. Cytochrom b₅ se vyskytuje u živočichů i rostlin. Primární struktura cyt b₅ je vysoce konzervovaná. Různé druhy savců vykazují až 80% stejných sekvencí v cytosolové doméně vázající hem. Nicméně v terminální karboxylové doméně je heterogenita v sekvencím pořadí aminokyselin vyšší. Zdá se, že v rostlinách není zachování primární struktury tak vysoké (63% identické sekvence). Podobně je to i u bakterií, kde je pouze 22% identické sekvence (rozpuštěné formy cyt b₅) k sekvenci savců. Nicméně i přes nízkou totožnost v sekvenci aminokyselin mezi různými kmeny, je jasné, že jde u všech zmíněných organismů o cyt b₅, který obsahuje hemovou prostetickou skupinu, klíčové aminokyseliny v aktivním centru a má stejné UV/VIS spektrum [27,28].

U savců je cyt b₅ přítomný ve třech isoformách, jako integrální protein lokalizovaný na vnější straně endoplazmatického retikula, na vnější straně mitochondrií a jako rozpustný protein v cytoplasmě maturovaných erytrocytů. Cyt b₅ v endoplazmatickém retikulu je syntetizován na volných ribozomech. Do membrány endoplazmatického retikula (ER) je

vložen až v postranlační modifikaci, bez účasti částice rozpoznávající signál. Informace o tom, aby byl cyt b₅ transportován do ER je zakódována v posledních 10 aminokyselinách [28,29].

Cyt b₅ se podílí na desaturaci cholesterolu, biosyntéze cholesterolu a plasmalogenů, redukcí methemoglobinu a participuje v hydroxylačních reakcích, katalyzovaných MFO systémem cizorodých a endogenních látek [30].

1.4.1 Struktura cytochromu b₅

Cytochrom b₅ je malý, cylindrický, kyselý, membránový protein, který je tvořen 6 α -helixy a 5 β -skládanými listy [27]. Proteinová struktura mikrosomálního cyt b₅ je uspořádaná do 2 domén:

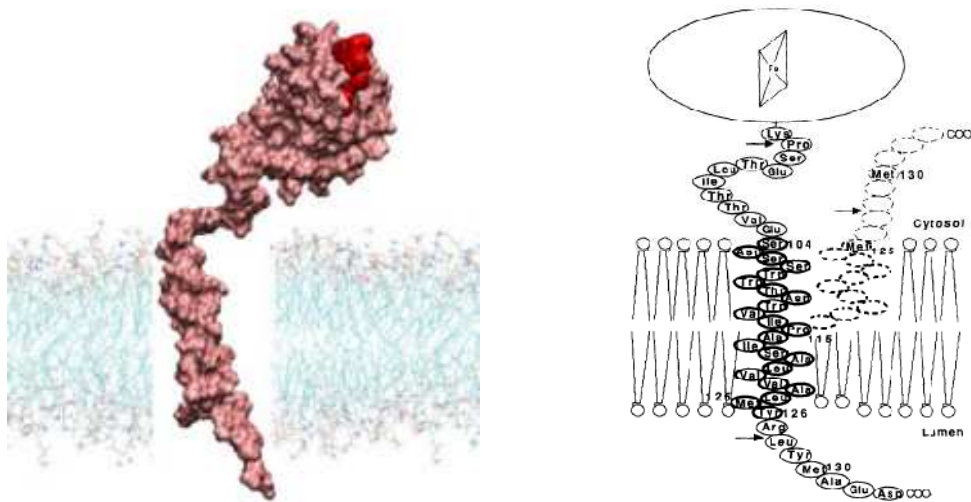
- **N-terminální** – větší, rozpustná, cytosolická, **hem-vazebná doména**,
- **C-terminální** – menší, hydrofobní, která kotví protein v membráně ER.

Tyto 2 domény jsou propojeny prostřednictvím 14-18 aminokyselin dlouhého peptidického řetězce, který poskytuje hemové doméně dostatečnou flexibilitu při vazbě na redoxní partnery a současně nechává protein zakotvený v membráně ER. Řetězec musí být tvořen minimálně sedmi aminokyselinovými zbytky, aby byl schopný interakce s MFO systémem. Přidání nebo záměna aminokyselin v spojovacím řetězci nemá na interakci mezi systémem MFO a cyt b₅ vliv [31].

Hem je v cyt b₅ umístěn v hydrofobní „kapse“. Hemové železo je koordinováno s dvěma histidylovými zbytky H68 a H44. Doménu vázající hem je možné odštěpit od zbytku řetězce pomocí proteasy, která štěpí před nebo za oblasti bohatou na prolin. Takto upravená rozpustná N-terminální doména je schopná přenášet elektron na rozpustné proteiny jako je cytochrom c nebo methemoglobin, ale je neschopná přenášet elektron na mikrosomální cytochrom P450.

Přesná topologie C-koncové domény není ještě zcela vyřešená. Existují 2 modely (konformace), které popisují možné uspořádání v membráně ER. Prvý je tzv. **transmembránový model**, kde hydrofobní doména tvořená z 22 hydrofóbních aminokyselin, prochází lipidovou dvouvrstvou ER a C-konec aminokyselinové sekvence je v lumen ER. Ve **vlásenkové konformaci** (angl. hairpin loop conformation) hydrofobní oligopeptid prostupuje pouze do vnější lipidové vrstvy a C-konec je v cytosolu (*Obrázek 9*). Předpokládá se, že nově syntetizovaný cyt b₅ se spontánně váže na membránu

ER ve vlásenkové konformaci, kde vazba mezi Ile¹¹⁴-Pro¹¹⁵ má *cis* konfiguraci. Následná izomerizace vazby na *trans* konfiguraci umožní přesunout C-terminální konec z cytosolické strany do lumen ER a zaujít transmembránovou konformaci [27].



Obrázek 9: Topologie cytochromu b₅ v membráně. Převzato z [29,70].

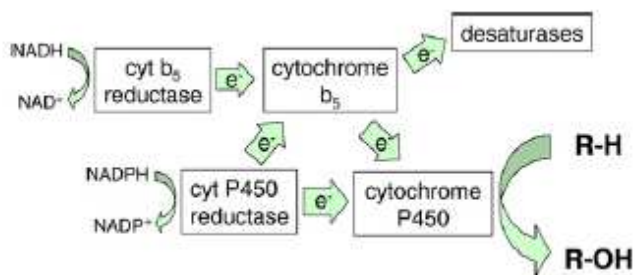
U savců je 23 aminokyselin ze 134 aminokyselin cytochromu b₅ glutamát nebo aspartát. Tyto aminokyseliny jsou lokalizovány hlavně v katalytické doméně proteinu. V okolí katalytické domény se nachází další záporně nabitě aminokyseliny, které se podílejí na iontových interakcích mezi cytochromem b₅ a dalšími elektronovými přenašeči a na interakcích tohoto páru přenašečů s ostatními proteiny. Vznik redoxních komplexů s cyt b₅ je tak založen na elektrostatických silách [27].

Dva histidylové zbytky v katalytickém centru se vážou na hemové železo jako pátý a šestý ligand. V takovém případě nemůže dojít k přímé interakci s molekulárním kyslíkem. Nicméně i tak může cyt b₅ fungovat jako prostředník elektronového přenosu mezi reduktasou a oxidačním enzymem. Cytochrom b₅ může přijmout elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasy a předat jej elektronovým akceptorům jako například cytochromu P450, cytochromu c nebo methemoglobinu.

1.4.2 Mechanismus působení cytochromu b₅

Mechanismus působení cytochromu b₅ v MFO systému není zcela jasně stále rozřešen. Efekt cyt b₅ je závislý na isoformě CYP, který katalyzuje reakci, na substrátu a také na experimentálních podmínkách. Existuje několik hypotéz, které se snaží vysvětlit mechanismus působení cyt b₅.

První hypotéza předpokládá, že dochází k **přímému přenosu elektronu z cyt b₅ na cytochrom P450**. Cyt b₅ přijímá elektron z NADPH:CYP reductasy. Elektron je potřebný pro druhou redukci v katalytickém cyklu MFO systému a pro vznik aktivovaného molekulárního kyslíku. Právě tento krok se považuje za rychlost limitující. Protože NADPH:CYP reductasa může redukovat cyt b₅, přímo není potřeba NADH ani cyt b₅ reductasy. Přenos elektronu z cyt b₅ na CYP je rychlejší než z NADPH:CYP reductasy na CYP (Obrázek 10) [27,28,31].



Obrázek 10: Schematické znázornění přenosu elektronu mezi CYP, cyt b₅ a jejich reductasami. Převzato z [27].

Druhý předpokládaný mechanismus není založen na katalytickém působení cyt b₅, ale na allosterickém. **Cyt b₅ vystupuje jako efektor** a nezáleží na tom jestli obsahuje hemovou skupinu nebo ne (apo-cyt b₅). Toto tvrzení bylo potvrzeno studiemi s CYP 3A, kdy apo-cyt b₅ byl stejně efektivní jako holo-enzym [32,33,34]. Allosterický stimulační efekt cytochromu b₅ byl pozorován také u dalších isoform CYP2C9, 4A7, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 3A5 a 17 [32,35].

Třetí hypotéza popisuje, že **cyt b₅ tvoří s CYP komplex**, který umožňuje přijmout 2 elektrony v jednom kroku od NADPH:CYP reductasy. V nepřítomnosti cyt b₅ CYP přijímá elektrony od své reductasy ve dvou krocích. Nejdřív přijme elektron, poté dojde k disociaci reductasy a k navázání molekuly kyslíku a následně přijetí druhého elektronu opět od NADPH:CYP reductasy.

Čtvrtý mechanismus předpokládá, že se cyt b₅ chová jako **pozitivní modifikátor monooxygenas**. Přítomnost cyt b₅ v MFO systému způsobí, že se sníží počet rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem, tím se sníží spotřeba NADPH a zvýší se množství produktu. Rozpojení komplexu se zdá, že je závislé na isoformě CYP a na substrátu [27].

1.4.3 Vliv cytochromu b₅ na reakce katalyzované cytochromy P450

Zdá se, že cyt b₅ může stimulovat nebo inhibovat reakce monooxygenásového systému, ale také nemusí působit vůbec. Cytochrom b₅ stimuluje reakce katalyzované různými cytochromy P450. Vliv cyt b₅ je zatím známý pouze u některých isoform CYP a jejich substrátů.

V rekonstituovaných systémech cytochromů P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem b₅ ve fosfolipidových vesikulách (liposomech) bylo pozorováno, že některé z CYP vyžadují ke své katalytické aktivitě cyt b₅:

- **methoxyfluran** – CYP2B4 za účasti NADPH:cytochrom P450 reduktasy,
- **prostaglandiny A1, E1, E2** – CYP2B4,
- **p-nitroanisol** – CYP3A6,
- **7-ethoxykumarin** – CYP2E1,
- **p-nitrofenetol** – CYP2B1,
- **kyselina arachidonová** – CYP4A7,
- **testosteron** – CYP3A4.

Při oxidaci **benzfetaminu** cytochromem P450 2B4 za účasti NADPH:cytochrom P450 reduktasy, má naopak cyt b₅ inhibiční účinek [27,35,36].

1.5 CYTOCHROM P450 2S1

Prostřednictvím databází htgs a dbEST byla nalezena cDNA nového lidského cytochromu P450, který byl označen jako **CYP2S1** [37]. Odpovídající gen pro tento protein byl nalezen na chromozomu 19. Na tomto chromozomu jsou umístěny geny pro další cytochromy P450 2A, 2B a 2F. Gen *CYP 2S1* má víc než 13kb a má 9 exonových částí, což je pro rodinu CYP2 typické.

Cytochrom P450 2S1 má 1515 bp a cDNA kóduje proteinový řetězec o délce 504 aminokyselin a molekulové hmotnosti 55,8 kDa (*Obrázek 11*). CYP2S1 má na N-konci hydrofobní úsek, ve svém řetězci obsahuje také oblast bohatou na prolin a konzervovaný cystein, který je pátým ligandem železa v hemové skupině cytochromu. Předpovězená aminokyselinová sekvence CYP2S1 vykazuje totožnost s dalšími CYP umístěnými na chromozomu 19 (CYP2B6, CYP2A6/13, CYP2F1) na 38-49%.

```

ATGGAGGCGACCGGCACCTGGGCGCTGCTGCTGGCGCTGGCGCTGCTCCTGCTGCTGACG
CTGGCGCTGTCCGGGACCAGGGCCCAGAGCCACCTGCCCCCGGGCCCACGCCGCTACCACTGC
TGGGAAACCTCCTGCAGCTACGGCCCAGGGCGCTGTATCAGGGCTCATGCGGCTGAGTAAGA
AGTACGGACCGGTGTTACCATCTACCTGGGACCCTGGCGGCCTGTGGTGGTCTGGTTGGGCA
GGAGGCTGTGCGGGAGGCCCTGGGAGGTCAGGCTGAGGAGTTCAGCGGCCGGGGAACCGTAGC
GATGCTGGAAGGGACTTTTGATGGCCATGGGGTTTTCTTCTCCAACGGGGAGCGGTGGAGGCAG
CTGAGGAAGTTTACCATGCTTGCTCTGCGGGACCTGGGCATGGGGAAGCGAGAAGGCAGGAG
CTGATCCAGGCGGAGGCCCGGTGTCTGGTGGAGACATTCCAGGGGACAGAAGGACGCCCATTC
GATCCCTCCCTGCTGCTGGCCCAGGCCACCTCCAACGTAGTCTGCTCCCTCCTCTTTGGCCTCCG
CTTCTCCTATGAGGATAAGGAGTCCAGGCCGTGGTCCGGGCAGCTGGTGGTACCCTGCTGGGA
GTCAGCTCCAGGGGGGTCAGACCTACGAGATGTTCTCCTGGTTCCTGCGGCCCTGCCAGGCC
CCCACAAGCAGCTCCTCCACCACGTCAGCACCTTGGCTGCCTTCACAGTCCGGCAGGTGCAGCA
GCACCAGGGGAACCTGGATGCTTCGGGCCCCGCACGTGACCTTGTGATGCCTTCCTGCTGAAG
ATGGCACAGGAGGAACAAAACCCAGGCACAGAATTCACCAACAGAATGCTGATGACAGTC
ATTTATTTGCTGTTTGTGGGACGATGACGGTCAGCACCCACGGTCGGCTATAACCTCCTGCTCCT
GATGAAATACCTCATGTCCAAAAGTGGGTACGTGAGGAGCTGAATCGGGAGCTGGGGGCTGG
CCAGGCACCAAGCCTAGGGGACCGTACCCGCTCCCTTACACCAGCGCGTTCTGCATGAGGC
CAGCGGCTGCTGGCGCTGGTGGCCATGGGAATACCCCGCACCCCTCATGCGGACCACCCGCTTCC
GAGGGTACACCCTGCCCCAGGGCACGGAGGTCTTCCCCCTCCTTGGCTCCATCCTGCATGACCC
CAACATCTTCAAGCACCCAGAAGAGTTCAACCCAGACCGTTTCCTGGATGCAGATGGACGGTTC
AGGAAGCATGAGGCGTTCCTGCCCTTCTCCTTAGGGAAGCGTGTCTGCCTTGGAGAGGGCCTGG
CAAAGCGGAGCTCTTCTCTTCTTACCACCATCCTACAAGCCTTCTCCCTGGAGAGCCCGTGC
CCGCCGGACACCCTGAGCCTCAAGCCCACCGTCAGTGGCCTTTTCAACATTCCCCCAGCCTTCC
AGCTGCAAGTCCGTCCTCCACTGACCTTACTCCACCACGCAGACCAGATGA

```

Obrázek 11: Sekvence DNA cytochromu P450 2S1 [103].

Metodou „Dot blot“ a „Northern blot“ bylo potvrzeno, že mRNA cytochromu P450 2S1 je exprimována zejména v plicích, v průduškách, žaludku, tenkém střevě a ve slezině. V menším zastoupení byla nalezena také v játrech, ledvinách, brzlíku, placentě, periferních leukocytech a kůži [37,38]. Samotný protein CYP2S1 byl exprimován v plicích, střevech a kůži [40]. Dalšími metodami (frakční homogenizace, diskontinuální sacharózový gradient

a metoda „Western blot“) bylo potvrzeno, že CYP2S1 je v buňce lokalizován v membráně endoplazmatickém retikula [37].

Kromě lidské isoformy CYP2S1 byla popsána také orthologní forma enzymu **myši** [39]. K izolaci cytochromu P450 2S1 byla použita myší buněčná linie Hepa-1. Myší a lidská forma CYP2S1 vykazují 78 % totožnost v aminokyselinové sekvenci. cDNA obou organismů byla totožná v nukleotidové sekvenci na 81 %. Myší forma CYP2S1 má na 49 % identickou sekvenci s dalšími myšími cytochromy rodiny CYP2, konkrétně CYP2G1 a CYP2B10.

Skupina genů CYP podrodiny 2S byla taky nalezena v dalších organismech včetně potkana. Protein CYP2S1 **u potkana** má 499 aminokyselin a vykazuje 76% homologii s lidským a 93% s myším cytochromem P450 2S1. mRNA cytochromu P450 2S1 je zastoupená v různých tkáních potkana. V nejvyšší míře byla mRNA CYP2S1 tvořena v plicích bez rozdílu pohlaví zvířete. Na úrovni proteinu byla zvýšena exprese pouze v plicích, žaludku a ledvinách [41].

1.5.1 Regulace transkripce CYP2S1

Studie *in vitro* u myší prokázali, že transkripce CYP2S1 je regulována **AhR receptorem**. Stejně výsledky byly zaznamenány i v studiích s modelem potkana [39,41]. Po navázání ligandu na regulační místo dojde k zvýšené transkripci genu pro CYP2S1. Ligandy pro Ah receptor patří do třídy chemických karcinogenů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), aromatické amíny a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, dioxin). Bylo již dříve prokázáno, že exprese genu pro **CYP2S1 je indukována dioxinem**. Indukce CYP2S1 dioxinem byla pozorována u myší v plicích a v játrech, v lidských plicních buňkách a v plicích, ledvinách a játrech potkana [39,41]. Tato skutečnost je zajímavá, protože všechny cytochromy P450, které indukuje dioxin, patří do rodiny **CYP1** (CYP1A1, 1A2, 1B1). Indukce je tedy regulována stejným mechanismem jako je tomu u rodiny CYP1, prostřednictvím AhR (*viz. kapitola 1.3.2.1*). V promotorové oblasti genu jsou dvě regulační oblasti, **XRE** (angl. xenobiotic response element) a **RARE** (angl. retinoic acid receptor response element).

Sekvence **XRE** v genu pro CYP2S1 je totožná s regulačními oblastmi rodiny CYP1 a je důležitá pro indukci polycyklickými aromatickými látkami. Regulační oblast XRE CYP2S1 se skládá ze tří přesahujících XRE sekvencí. Každá sekvence má schopnost

vázat dimer AhR/AhNT a umožnit indukci transkripce dioxinem.

Rivera s kolektivem poukázali na fakt, že součástí trimerní regulační oblasti XRE jsou také tři přesahující **sekvence HRE** (angl. hypoxia response element). Každá sekvence HRE může navázat HIF-1 (angl. hypoxia inducible factor 1) v podobě dimeru s ARNT a zvýšit tak transkripci genu pro CYP2S1 u myší. Exprese genu pro CYP2S1 je tedy **indukovatelná i hypoxií**. Exprese transkripčního faktoru HIF-1 je závislá na množství kyslíku v organismu nebo v buňce. Když dojde k poklesu koncentrace O₂, buňka je v hypoxickém stavu a snaží se reagovat na tento stav. Na úrovni transkripce je regulace zprostředkována právě HIF [42]. Ve stavu normoxie (normální hladina kyslíku) jsou mechanismy hypoxie potlačeny a HIF degradovány. Bylo potvrzeno, že v hypoxickém nádoru je zvýšená exprese CYP2S1 [43].

Oblast **RARE** je zapojena do regulace transkripce za přítomnosti *trans*-retinových kyselin [38,39]. Vskutku bylo potvrzeno, že kromě dioxinu a hypoxie indukují transkripci CYP2S1 ***trans*-retinové kyseliny** [38].

Smith se spolupracovníky ve své práci postulovali, že na indukci CYP2S1 v kůži pacientů trpících psoriásou, se kromě *trans*-retinových kyselin podílí také **ultrafialové záření** (290-400 nm), **PUVA** (= Psoralen UV-A) a **uhelný dehet** [38].

V lidské buněčné linii A549 byla kromě indukce genové transkripce CYP2S1 pomoci dioxinu, pozorovaná také jeho represe. **Dexamethasone** (DEX), který patří mezi glukokortikoidy, se využívá v léčbě zánětů a podílí se na expresi genů pomoci **GR receptoru** (angl. glucocorticoid receptor). Bez navázaného ligandu je GR lokalizován v cytoplasmě v podobě neaktivního multiproteinového komplexu. Po navázání DEX dochází ke konformační změně multiproteinového komplexu, přenosu GR do jádra a aktivaci nebo represi genové transkripce. Represe CYP2S1 dexamethasonem je zprostředkována GR v procesu, který je závislý také na deacetylaci histonů [48].

1.5.2 Funkce CYP2S1

CYP2S1 je konstitutivně tvořen v několika lidských tkáních. Protože je CYP2S1 indukovatelný dioxinem, předpokládalo se, že podobně jako jiné CYP, které jsou rovněž indukovatelné dioxinem, bude CYP2S1 participovat na biotransformaci chemických karcinogenů. Zejména ve tkáních vystavených působení cizorodých látek (respirační, gastrointestinální trakt, močové cesty a kůže), kde byla potvrzena vysoká exprese CYP2S1

se uvažovalo, že tento cytochrom P450 může hrát důležitou roli v metabolismu environmentálních karcinogenů včetně karcinogenních látek vznikajících při kouření [39].

Pro aktivační studie, byl tento protein produkován heterologní expresí a purifikován. Již v kapitole 1.5.1 bylo zmíněno, že transkripce genu *CYP2S1* může být zvýšená polycyklickými aromatickými uhlovodíky – **PAH**. Proto bylo navrženo, že tento enzym může tyto karcinogeny také aktivovat [39]. PAH jsou kromě jiného součástí cigaretového kouře a ten je jedním ze zásadních faktorů způsobujících rakovinu plic. Proto byly vybrány hlavní složky cigaretového kouře, které mají karcinogenní účinek [(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, benzo[a]pyren a 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin)] a nikotin a byly testovány jako substráty CYP2S1. Výsledky této studie poukázali na skutečnost, že CYP2S1 nekatalyzuje metabolické přeměny nikotinu a nepodílí se na metabolické aktivaci testovaných plicních karcinogenů [45].

Trans-retinové kyseliny rovněž indukují expresi CYP2S1 (viz. kapitola 1.5.1). Proto byly, podobně jako PAH, pokládány za substráty tohoto enzymu. Smith se spolupracovníky tento předpoklad ve své práci potvrdili a identifikovali 2 metabolity, kyselinu 4-hydroxy-retinovou a kyselinu 5,6-epoxy-retinovou [38]. Podobně Karlgren ve své práci prokázal, že CYP2S1 katalyzuje přeměnu naftalenu, nicméně jeho metabolity nebyly identifikovány [47].

Další skupina výzkumníků, která se zabývala touto problematikou vybrala hned 30 možných substrátů CYP2S1 např. naftalen, benzo[a]pyren, 5-methylchrysen, kyselina arachidonová a retinová [46]. V této studii **nebyla potvrzena žádná aktivita CYP2S1** vůči testovaným substrátům. Je zajímavé, že autoři Smith a Karlgren a jejich práce [38,47], které se zabývali možnými substráty pro CYP2S1 postulovaly, že tento enzym oxiduje *trans*-retinové kyseliny a naftalen. Skutečnost, že se CYP2S1 podílí na metabolismu *trans*-retinové kyseliny a naftalenu nebyl potvrzen ani v další studii vypracované Nishidou se spolupracovníky [44].

Bui se spolupracovníky ve svých pracích postulovali, že **CYP2S1 není redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR)**, ale že ke své aktivitě využívá kumenhydroperoxid a peroxid vodíku. Nicméně **kumenhydroperoxid** není za fyziologických podmínek v organismu přítomný, a proto nemůže sloužit jako kofaktor této reakce. Na druhé straně **peroxid vodíku** je endogenní sloučeninou a tak by mohl participovat na oxidaci substrátů prostřednictvím CYP2S1. Koncentrace, která je však

potřebná pro efektivní oxidaci *in vivo*, je podstatně vyšší než jeho endogenní množství [49]. Proto byly jako další kofaktory potřebné pro CYP2S1, předpokládány **hydroperoxyd mastných kyselin** (např. 13*S*-hydroperoxy-9*Z*,11*E*-oktadekadienová kyselina, 12*S*-hydroperoxy-5*Z*,8*Z*,11*E*,5*Z*-oktadekadienová kyselina). V metabolické studii byl pak tento předpoklad potvrzen s **benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiolem (BaP-7,8-diol)** [50]. Podobně jako kumenhydroperoxid a H₂O₂ i hydroperoxyd mastných kyselin také participují na oxidaci BaP-7,8-diolu cytochromem P450 2S1 na karcinogenní metabolit 7,8-dihydrodiol-*trans*-9,10-epoxid. Navíc ve srovnání těchto kofaktorů jsou hydroperoxyd mastných kyselin v epoxidaci neefektivnější. Uvedená epoxidace BaP-7,8-diolu probíhá radikálovým mechanismem. Nízká koncentrace těchto kofaktorů, která je potřebná pro epoxidaci BaP-7,8-diolu, umožňuje participaci CYP2S1, na metabolismu *in vivo*, protože v této koncentraci se v organismu nachází i za fyziologických podmínek. Je tedy zřejmé, že CYP2S1, za účasti hydroperoxydů, může hrát důležitou roli v karcinogenezi vyvolané benzo[*a*]pyrenem.

Jak již bylo zmíněno dříve, v nádorech při hypoxických podmínkách je exprese CYP2S1 zvýšena. Nishida se spolupracovníky ve své práci využili tento fakt a demonstrovali, že se CYP2S1 a další cytochrom P450 2W1 podílí na účinné metabolické aktivaci **protinádorového léčiva AQ4N** (1,4-bis{[2-(dimethylamino-*N*-oxid)ethyl]amino}-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dion) [44]. Toto pro-léčivo je metabolizováno na derivát AQ4 (1,4-bis{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dion), který je inhibítozem topoisomerasy II. Vedle toho autoři této studie poukázali na skutečnost, že **CYP2S1 je efektivně redukován NADPH:CYP reduktasou (CPR)**. CYP2S1 vykazoval za redukčních podmínek typické diferenční spektrum, kde se po redukci CPR, na CYP2S1 vázal CO a vznikal komplex s typickým absorpčním maximem při 450 nm.

Důvodem rozporu jestli CYP2S1 účinně interaguje s CPR nebo ne, může být fakt, že Bui se spolupracovníky použili ve všech experimentech aerobní podmínky, zatímco Nishida a kolektiv podmínky anaerobní. Je tedy nutné dále studovat, zda se CPR podílí na redukci CYP2S1 i za aerobních podmínek [51].

Vedle AQ4N byly jako další substráty CYP2S1 testovány deriváty lipidů. Konkrétně se jedná o **prostaglandin G₂ (PGG₂)** a **prostaglandin H₂ (PGH₂)** a **hydroperoxyd mastných kyselin** (např. 5*S*-, 12*S*-, a 15*S*-hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny, 13*S*-hydroperoxy-oktadecadienová kyselina), které se také podílí na bioaktivaci BaP-

7,8-diolu cytochromem P450 2S1 [52]. Všechny tyto reakce probíhají bez participace NADPH. Některé z produktů těchto reakcí participují na zánětlivých reakcích. Proto se zdá, že enzym CYP2S1 může hrát významnou roli v zánětlivých procesech.

1.6 HETEROLOGNÍ EXPRESE

Metoda heterologní exprese slouží ke klonování genů a produkci proteinů, které se za normálních podmínek v hostitelské buňce nevyskytují. Gen požadovaného proteinu je do hostitelského organismu vnesen v podobě plasmidu, což je rekombinantní molekula DNA. **Plasmid** je dvouřetězcová molekula DNA a může se replikovat nezávisle na chromozomu hostitelské buňky. Tato rekombinantní DNA se rovněž označuje jako vektor. Rozlišujeme **klonovací vektor**, který slouží k amplifikaci genu a **expresní vektor**, který je využíván k produkci proteinu.

Pro heterologní expresi bylo vyvinuto více expresních systémů. Patří sem kvasinkové, bakteriální, hmyzí a savčí systémy. Nicméně každý ze zmíněných systémů má své určité nevýhody jako jsou finanční náklady, pracovní obtížnost nebo míra výnosu. Mezi nejvíc využívané patří bakteriální systémy využívající gram-negativní bakterii *Escherichia coli*. *E. coli* dokáže růst rychle a na minimální mediu a je schopná rychlého množení klonovacích vektorů. Na druhé straně rekombinantní protein, který je produkován v *E. coli* se nemusí tvořit v dostatečném množství nebo je neaktivní, nebo je pro *E. coli* toxický, a proto se ukládá v buňce v podobě inkluzních tělísek. Bakteriální systém *E. coli* je vhodný pro expresi zejména prokaryotních genů. Nicméně tento systém může být využit i pro expresi eukaryotních genů, které nepodléhají posttranslačním úpravám, protože *E. coli* není schopná této modifikace [109-112].

Cytochromy P450 byly exprimovány ve všech zmíněných expresních systémech [105-107]. V bakteriích *E. coli* byl jako první exprimován hovězí CYP17A1 [108]. Samotná *E. coli* nemá žádné zastoupení cytochromů P450 ve své membráně. Použitelnost bakteriálního expresního systému pro produkci lidských CYP je významná, protože tento způsob exprese představuje možnost získat dostatečné množství vzorků pro další enzymové studie.

1.6.1 Plasmid pCMV·SPORT 6

Plasmid pCMV je odvozen od vysokokopiového plasmidu pUC a byl navržen pro expresi v bakteriálních a savčích systémech. Konstitutivní exprese vloženého genu je v savčích buňkách řízená lidským **cytomegalovirem (CMV promotor)**. Selekcí v bakteriálních buňkách umožňuje **ampicilinová resistance** (Obrázek 12).

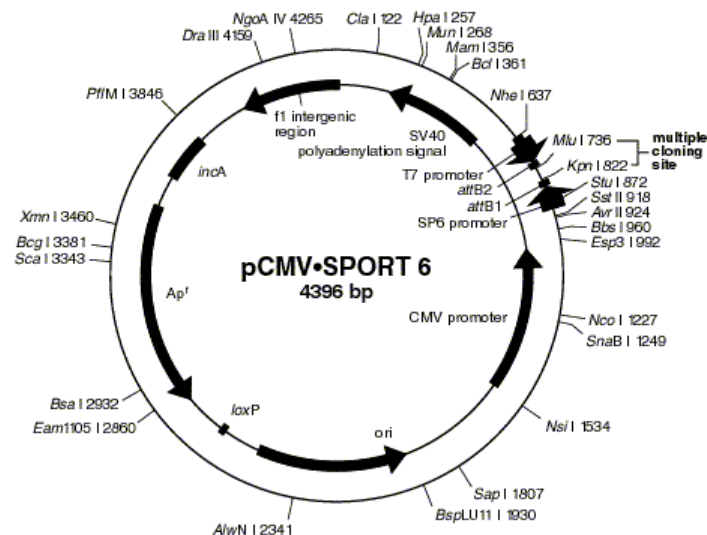
Tento plasmid obsahuje také **T7 promotor** a patří do tzv. T7 expresního systému. Nicméně gen pro T7 polymerasu se v DNA *E. coli* nevyskytuje. Proto je nutné dodat hostitelské buňce T7 RNA polymerasu infekcí bakteriofágem nebo indukovat její expresi. Proto se do bakteriálního genomu integruje lysogen bakteriofága T7 jako profág DE3, který kóduje gen pro T7 RNA polymerasu. T7 RNA polymerasa je v baktérii pod inducibilním promotorem. Kmen *E. coli* BL21(DE3) (např. *E. coli* C43) nese v genomu T7 RNA polymerasový gen pod lacZ promotorem. Přirozený lac represor, jehož gen je také vložený do genomu bakterie, brání expresi bez přítomnosti induktoru. Exprese T7 RNA polymerasy je indukována isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG). To znamená, že po přidání (IPTG) je zahájena translace genu T7 RNA polymerasy profágu genomovou RNA polymerasou *E. coli*. Pak T7 RNA polymerasa zahájí translaci vloženého genu, který je umístěn za T7 promotorem.

Někdy dochází k bazální expresi T7 RNA polymerasy a pokud je pod T7 promotor vložen gen produkující toxický produkt pro *E. coli*, může docházet k redukci růstu, smrti bakterie či nestabilitě plasmidu. Kmen BL21(DE3) LysS (napr. *E. coli* C41_{PLYS}) navíc obsahuje T7 lysozym (produkovaný genem LysS). T7 lysozym je schopen vázat exprimovanou T7 RNA polymerasu a inhibovat bazální transkripci cílového genu. Když dojde k indukci pomocí IPTG, T7 RNA polymerasa přestává být inhibována [109,114,115].

Kromě těchto 2 promotorů a genu pro ampicilinovou rezistenci je součástí plasmidu pCMV:

- „**polylinker**“ - místo pro štěpení restrikčními endonukleasami a vložení cílového genu,
- „**SV40 malý t-intron**“ - (Simian virus small t- intron), funkce není známa, ale předpokládá se, že může mít úlohu v úpravě transkriptu,
- „**polyadenylační signál**“ ,
- „**SP6 promotor**“ - váže SP6 RNA polymerasu (SP6 fág) [116],

- „pUC origin“ - počátek replikace, zajišťuje vysokou replikaci *E. coli*,
- „f1 oblast“ - počátek replikace f1 bakteriofágu, umožňuje jednovláknovou replikaci [116],
- „loxP“ - lox-Cre rekombinanční systém bakteriofága P1 [118].



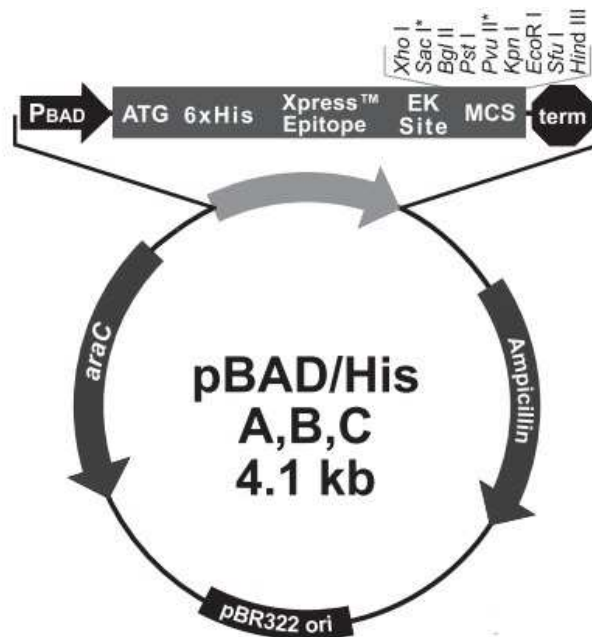
Obrázek 12: Restriční mapa plasmidu pCMV·SPORT 6 [113].

1.6.2 Plasmid pBAD

Plasmid pBAD/His je odvozen od expresního plasmidu pBR322. Pro dosažení optimálního množství rekombinantního proteinu obsahuje pBAD **arabinosový promotor** (Obrázek 13). L-arabinosový operon se skládá ze tří strukturních genů *araB*, *araA*, and *araD*. Tento operon je inducibilní a je pod kontrolou *araC* genu, který je v těsné blízkosti operonu, ale je přepisován v opačném směru. Protein *araC* vystupuje jako pozitivní i negativní regulátor. Když se L-arabinososa v buňce nevyskytuje, *araC* v podobě dimeru interaguje s operátorem L-arabinosového operonu (*araO*₁ a *araO*₂) a transkripce genu je blokována. V přítomnosti L-arabinosy se molekula sacharidu naváže na *araC* protein, dojde ke konformační změně disociací molekuly *araC* od *araO*₂ a navazání na *araI*, což umožní zahájení transkripce (Obrázek 14). Míru exprese je tehdy možné regulovat různou koncentrací L-arabinosy. Navíc přísná regulace pBAD regulačním *araC* proteinem se zdá být užitečná v případě exprese toxických nebo esenciálních genů.

Podobně jako u T7 expresního systému (kapitola 1.6.1) i tady dochází k bazální

expresi před indukcí L-arabinosou. Po přidání glukosy do buněk nebo represoru - fukosy dochází k inhibici bazální exprese [119-122].



Obrázek 13: Restrikční mapa plasmidu pBAD/His A,B,C [119].



Obrázek 14: Mechanismus indukce L-arabinosového operonu pomocí L-arabinosy [123].

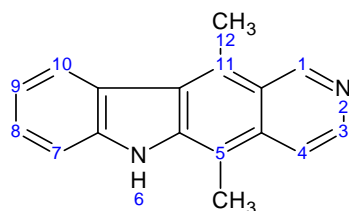
Kromě L-arabinosového operonu a araC genu je součástí plasmidu pBAD/His:

- „pBR322 origin“ - počátek replikace, zajišťuje replikaci *E. coli*,
- „ampicilínová rezistence“ - gen pro β -laktamasu, selekce plasmidu,
- „his tag“ - N-koncová modifikace rekombinantního proteinu, využití při afinitní chromatografii,
- „Xpress Epitope“ - detekce rekombinantního proteinu protilátkou ,

- „**EK site**“ - odštěpení N-terminálního peptidu enterokinasou pro získání nativního proteinu,
- „**polylinker**“ - místo pro štěpení restrikcí endonukleasami a vložení cílového genu,
- „**term**“ - ukončení transkripce vloženého genu.

1.7 ELLIPTICIN

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol, *Obrázek 15*) a některé jeho deriváty (9-hydroxyellipticin, 2-methyl-9-hydroxy-ellipticin, jsou rostlinné alkaloidy čeledi Apocynaceae.



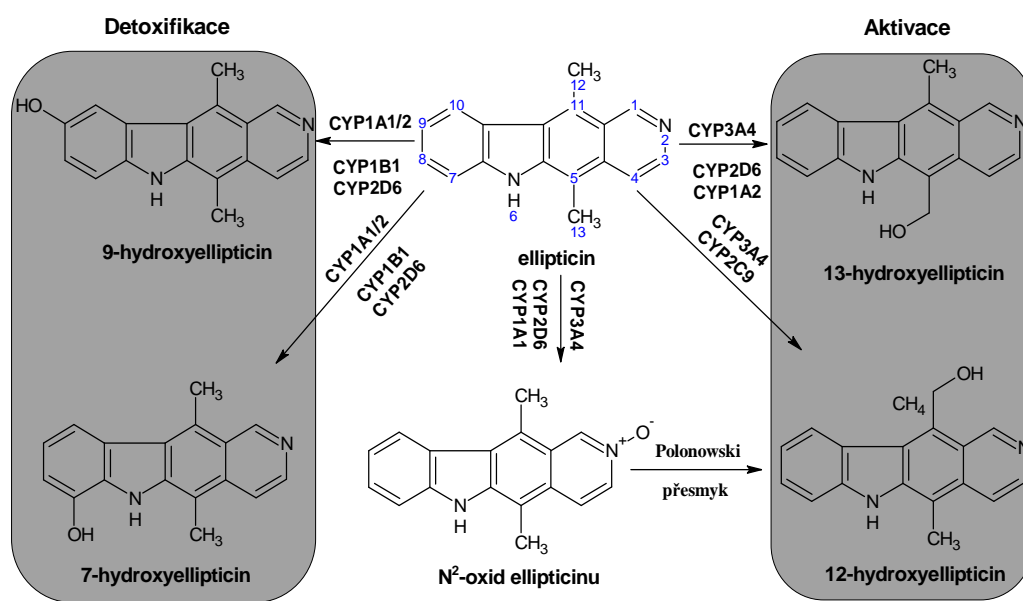
Obrázek 15: Struktura ellipticinu

Ellipticin a jeho polárnější deriváty vykazují významnou protinádorovou aktivitu. Využívají se hlavně ve formě acetátů k léčení karcinomu prsu s kostními metastázemi, účinné jsou též proti akutní myeloblastické leukémii, sarkomu ledvin a karcinomu štítné žlázy. Ellipticin vykazuje také anti-HIV aktivitu. Hlavním důvodem zájmu o ellipticin a jeho deriváty pro klinické využití je jejich vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, relativně nízké vedlejší toxické účinky (nefrotoxicita) a téměř nulová hematologická toxicita [76,77].

1.7.1 Biotransformace ellipticinu

V organismu je ellipticin přeměňován až na 5 metabolitů (*Obrázek 16*). Vedle 9-hydroxyellipticinu byly identifikovány ještě další 4 metabolity: 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, N²-oxid ellipticinu jako majoritní metabolity a 7-hydroxyellipticin jako minoritní produkt. Stejně metabolity jsou také tvořeny mikrosomy jater člověka a modelových organismů (potkan, králík, myš) [77].

Enzymy, které participují na tvorbě metabolitů ellipticinu, patří do rodiny cytochromů P450. Z výsledků studií shrnutých na *obrázku 16* je patrné, že na metabolické aktivaci ellipticinu se podílí CYP3A4, 1A, 2D6 a 2C9. Na oxidaci ellipticinu na detoxikační deriváty participují enzymy CYP1A, 1B1 a 2D6. Do skupiny enzymů, které se podílejí na metabolismu ellipticinu patří také peroxidasy (*kapitola 1.6.4*).



Obrázek 16: Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450. Upraveno dle [78].

1.7.2 Mechanismy protinádorového působení ellipticinu

Protinádorový účinek ellipticinu je vysvětlován několika mechanismy:

- 1. Interkalace do dvoušroubovicové molekuly DNA** – vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interkalace je zprostředkována slabými reversibilními hydrofobními interakcemi s bázemi DNA. Interakce mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem je rozhodující pro interkalaci do molekuly DNA. Vzhledem k fluorescenčním vlastnostem se ellipticin používá jako modelová interkalační sloučenina [78,80].
- 2. Inhibice topoisomerasy II** – interakce s topoisomerasou II a DNA za vzniku ternárního komplexu, který vede ke zlomům v řetězci DNA a následné smrti buňky. Mechanismus inhibice topoisomerasy II je předmětem výzkumu [76,78,80,81,82].
- 3. Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53** – prostřednictvím inhibice cyklin-

dependentní kinasy. Nahromadění defosforylovaného p53 může způsobit apoptózu [78,80,83].

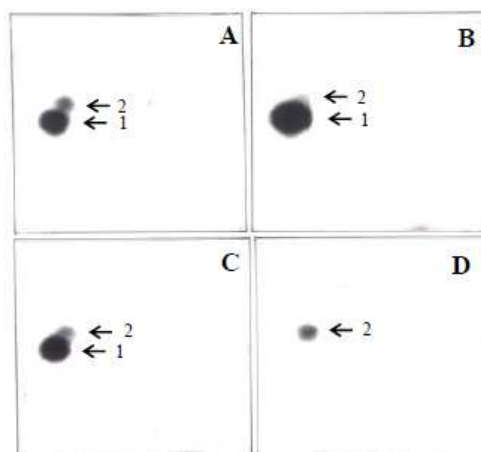
4. Inhibice oxidační fosforylace – akumulace ellipticinu v mitochondriích způsobuje narušení energetické rovnováhy v buňce (snížení obsahu ATP v buňce) [78,80, 84].

5. Inhibice telomerasy [80].

Výše popsané mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny na nespecifickém působení. Nicméně tento poznatek je v rozporu s poměrně úzkou specifitou účinku ellipticinu vůči určitým typům neoplasie. Možné vysvětlení lze hledat v enzymovém vybavení organismu. Enzymy podílející se na biotransformaci mohou produkovat účinnější metabolity léčiva, které poškozují nádor efektivněji. Právě do této kategorie „zapadá“ nedávno popsaný mechanismus účinku ellipticinu, kdy se **ellipticin** po enzymové aktivaci **kovalentně váže na DNA**, a vytváří tak **adukty s DNA**. V aktivaci ellipticinu jsou účinné cytochromy P450 nebo peroxidasy. Cílem vazby derivátů ellipticinu (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin) v DNA je deoxyguanosin [77,78,85,86,87].

1.7.3 Tvorba aduktů ellipticinu s DNA

Ellipticin je kromě detoxifikačních metabolitů přeměňován na tzv. aktivační metabolity, které jsou prekursory sloučenin, které se kovalentně váží na DNA, a vytvářejí adukty s DNA. Tvorba aduktů metabolitů ellipticinu s DNA byla předpovězena již DeMarinim [79]. Tvorba kovalentních aduktů byla potvrzena 2 nezávislými metodami: metodou „³²P-postlabeling“ a použitím [³H]ellipticinu [77]. Detekovány byly minimálně 2 adukty s DNA. Majoritní adukt (**adukt 1**), jehož vznik je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů a minoritní adukt (**adukt 2**), který vznikal i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací (*Obrázek 17*) [77]. Tvorba aduktů ellipticinu s DNA byla testována v některých tkáních potkana exponovaného ellipticinu, v plicních fibroblastických buňkách křečka (V-97) transfekovaných lidskými CYP (CYP3A4, 1A1 a 1A2), v lidských neuroblastomech, v nádorových buňkách prsního adenokarcinomu (MCF-7) a v lidských leukemických buňkách (HL-60 a CCRF-CEM) [77,85-89]. Mimo tyto adukty, bylo detekováno (*in vivo* v některých tkáních potkana, v buňkách V-97, MCF-716 a HL-60) dalších 5 minoritních aduktů [90,91].



Obrázek 17: Autoradiografie aduktů 1, 2 ellipticinu s DNA detekované metodou „³²P-postlabeling“. Adukty byly pozorovány po aktivaci cytochromy P450 potkana (A), králíka (B) člověka (C) a bez enzymové aktivace (D). Převzato z [92].

Metabolity, které jsou prekursory sloučenin, tvořící adukty s DNA jsou 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin, případně N²-oxid ellipticinu, který podléhá Polonowského přesmyku za vzniku 12-hydroxyellipticinu. 13-hydroxyellipticin se váže na DNA a vytváří adukt 1 (majoritní), a 12-hydroxyellipticin vytváří adukt 2 (minoritní). Cílovým deoxynukleotidem v DNA je deoxyguanosen.

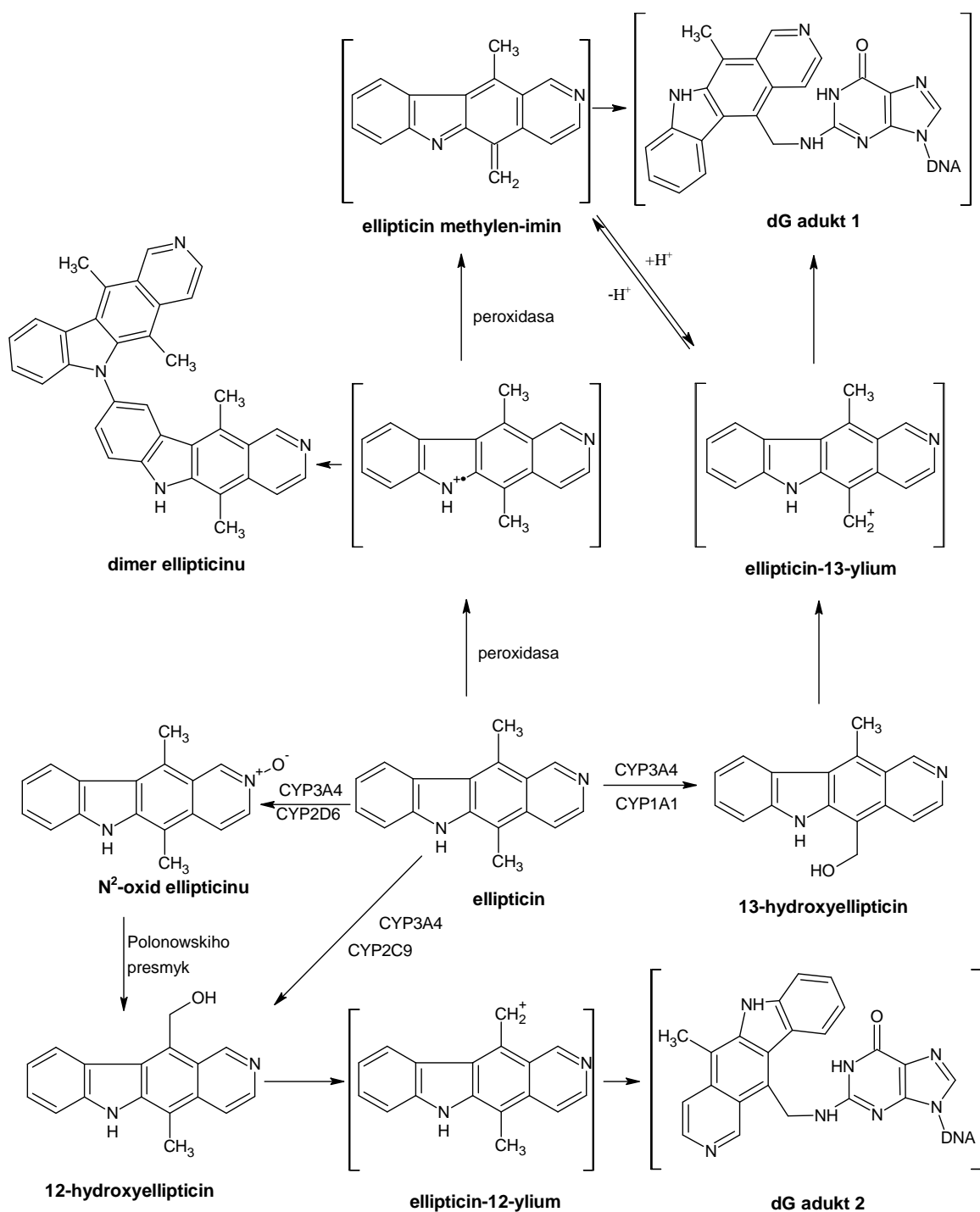
Ellipticin-13-ylium a **ellipticin-12-ylium** jsou předpokládanými reaktivními agens, tvořenými z 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu, které jako reaktivní karbeniové ionty mohou tvořit kovalentní vazbu s amino skupinou guaninu v DNA [78,89].

1.7.4 Mechanismus oxidace ellipticinu

Ellipticin je oxidován v organismu na aktivační a detoxikační metabolity. Na biotransformaci ellipticinu se podílí více isoformy CYP a peroxidasy. Oba typy enzymů jsou exprimovány v cílových nádorových tkáních, ve kterých ellipticin působí. Z lidských CYP se na detoxikaci ellipticinu podílí CYP1A1, 1A2, 1B1 a na aktivaci CYP3A4, 2C9, 2D6 a 1A2 (*Obrázek 16*). U potkana dochází k aktivaci orthologními formami CYP, přesněji CYP3A1 a CYP1A1/2, v organismu králíka pak především CYP2C3 (králíčí CYP3A6 se na aktivaci podílí v minimální míře) [80,92].

Kromě oxidace ellipticinu cytochromy P450, bylo zjištěno, že ellipticin je oxidován peroxidasami. Zatímco CYP jsou exprimovány hlavně v prsních a ledvinových nádorových tkáních, v jiných nádorových buňkách je jejich množství řádově nižší. Například

pro leukemické buňky HL-60 je ellipticin cytotoxický, i když je množství CYP exprimované v těchto buňkách nízké. Tento fakt se dá vysvětlit právě přítomností peroxidas (myeloperoxidasa - MPO), které jsou zodpovědné za oxidaci ellipticinu. Ellipticin je oxidován řadou peroxidas: lidskou cyclooxygenasou 2 (COX-2), ovčí COX-1, hovězí laktoperoxidasou LPO, lidskou myeloperoxidasou MPO a rostlinnou peroxidasou křenu selského (HRP) [88,91]. Metabolity ellipticinu tvořené po aktivaci peroxidasami se kovalentně váží na DNA. Adukty s DNA tvořené tímto způsobem jsou shodné s těmi, které jsou generovány z metabolitů (13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin) tvořených CYP (*Obrázek 18*) [91].



Obrázek 18: Oxidace ellipticinu lidskými CYP a peroxidasami na metabolity, které poskytují adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyli doposud experimentálně prokázány. Upraveno podle [93].

2 Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo studovat vliv ellipticinu na expresi proteinů a aktivitu cytochromů P450 a dalších složek MFO systému. Pro tento cíl bylo nutné vystavit laboratorní potkany působení ellipticinu (4, 40 mg/kg tělesné hmotnosti) a izolovat mikrosomální systémy z jater, plic a ledvin těchto zvířat. Dále bylo nutné provést studie sledující vliv ellipticinu na obsah cytochromů P450, které se podílí na jeho metabolických přeměnách (CYP1A1/2, CYP3A), a dalších složek MFO systému (NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cytochrom b₅). Kromě vlivu na obsah proteinů těchto enzymů byl též sledován vliv ellipticinu na aktivitu těchto enzymů.

Dalším cílem práce byla příprava orfánového cytochromu P450 2S1 a to pomocí heterologní exprese. K dosažení cílů bylo nejdříve nutné „namnožit“ plasmid nesoucí gen pro *CYP2S1* a nalézt vhodné podmínky pro produkci proteinu. Následně izolovat membránovou frakci a provést měření obsahu cytochromů P450. Pro další studie byl pak tento gen *CYP2S1* upraven vložением restričních míst pro štěpení a následně vložen do dalších expresních plasmidů. Opět byla izolovaná membránová frakce a byl měřen obsah cytochromů P450.

3 Materiál a metody

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

AbCam, USA

primární králičí polyklonální protilátka proti CYP1A1 (1:1000), primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 (1:750), primární králičí polyklonální protilátka proti cytochromu b₅ (1:750)

Biotium, USA

GelGreenTM Nucleic Acid Gel Stain

Duchefa Biochemie, Holandsko

Ampicilin

Fermentas, USA

SpectraTM multicolor broad range barevný standard pro elektroforézu a Western blot, 2-Log DNAMarker, Pfu DNA polymerasa, pufr pro Pfu DNA polymerasu, 25 mM MgSO₄

Fluka, Švýcarsko

akrylamid, dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), ethylacetát, 2-merkptoethanol, methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Friesland ČR, a.s., Česká Republika

sušené mléko Milli - odtučněné

Genomed, Německo

JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit

Invitrogen, USA

plasmid pBAD-A, *E. coli* LMG194, *E. coli* TOP10, plasmid pCMV s vloženým genem pro CYP2S1, L-arabinosa

Lachema Brno, Česká republika

dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, (di)hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, ethylendiamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli (EDTA, chelaton 3), ethanol, ethylacetát, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, octan sodný, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, sacharosa, síran měďnatý, uhličitan sodný, vínan sodný, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného

Linde, Česká republika

dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba Feinchemie, Rakousko

glutathion, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Lucigen (USA)

E. coli C41_{pLYS}, *E. coli* C43

Millipore Corp., USA

ImmobilonTM - P transfer membrána (PVDF)

New England BioLabs, USA

restrikční enzymy EcoRI (20000 U/ml) a XhoI (20000 U/ml), pufr NEB2, BSA (100x koncentrovaný, zásobní roztok BSA o koncentraci 100 mg/ml)

Proteintech Group, USA

primární králičí polyklonální protilátka proti CYP3A4 (1:600),

Reanal Budapešť, Maďarsko

glycin

Roche Diagnostic, Německo

tablety proteasových inhibitorů (Complete mini protease inhibitor)

Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 M-135 (1:500), primární kozí polyklonální protilátka proti CYP2S1 S-12 (1:500), sekundární slepičí protilátka IgY značená alkalickou fosfatase (1:5000)

Serva, Německo

Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), triton-X-100

Sevapharma, a.s., Česká republika

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA

dimethylsulfoxid (DMSO), fenacetin, nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný (NADPH), nikotinamidadenindinukleotid (NADP⁺), ellipticin, 4,4' - dikarboxy - 2,2' bicinchoninová kyselina (BCA), cytochrom c, sekundární králičí a slepičí protilátka IgY značená alkalickou fosfatase, LB médium, LB agar, TB médium, isopropylthio-β-D-galaktosid (IPTG), primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 (1:750), primární králičí polyklonální protilátka proti glyceraldehydrofosfátdehydrogenase (0.1-0.2 μg/ml), δ-aminolevulová kyselina

Thermo Scientific

značený standard pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v prostředí SDS – PageRuler,

Whatman, USA

chromatografický papír č. 3

Použité bakteriální kmeny *E. coli*

Kmen	Charakteristika	Firma/poskytl
DH5 α	klonování plasmidů	RNDr. Marek Ingr, Ph.D.
C41 _{p_{LYS}} (OverExpress DE3)	expresní kmen	Lucigen (USA)
C43 (OverExpress DE3)	expresní kmen	Lucigen (USA)
LMG194	expresní kmen	Invitrogen (USA)
TOP10	expresní kmen	Invitrogen (USA)

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Automatické mikropipety: BioHit (Finsko), Nichiryo (Japonsko)

Centrifugy: Allegra X-22R (Beckman Coulter), Beckman LE-80K (Beckman Coulter) a uhlový rotor 45Ti a 70 Ti, Eppendorf 5415 D/R (Eppendorf), Janetzki K23 (Německo), Janetzki K24 (Německo), Janetzki K70D (Německo), stolní minicentrifuga (Labnet), stolní minicentrifuga Gilson (GmC Lab), stolní minicentrifuga Microcentaur MSE

Laboratorní váhy: 440-35-N (Kern), EW 600-2M (Kern), EK-600H (A&D Instruments LTD)

Spektrofotometry: Hélios α Thermo Spectronic 9423 UVA 1002E (Velká Británie), Hewlett Packard E8453 (USA), Spektromom 195 D (Maďarsko), Spekord M40 Carl Zeiss Jena (Německo), NanoVue Plus Spectrophotometer GE Healthcare, Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55 (USA)

Systém HPLC: Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, Degasys DG-1210 Dionex, termobox pro kolonu COLUMN OVEN LCO 101, Nukleosil 100-5 C18 HD; 4 x 250 mm, kolona Macherey-Nagel (Německo), program: ChromeleonTM 6.11 build 490

Analytické váhy: analytické váhy 40 SM-200A (Pesa), HM-200 (A&D Instruments LTD), předvážky 440-35-N (Kern), EW 600-2M (Kern), EK-600H (A&D Instruments LTD)

Vodní lázně: Julabo TW2 (Biotech), Julabo TW8 (Biotech), GFL 1092 (MERCY) – třepací

Další přístroje: Aparatura pro elektroforézu Amersham (Biosciences, USA) a OMNIOBIO (ČR), aparatura pro Western blot (Whatman Biometra Fastblot B-43, Německo), Hamiltonova mikropipeta (Švýcarsko), magnetická míchačka Variomag Monotherm (Německo), pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA), laminární box BIO 126 (Labox), inkubátor IR 1500 Automatic CO₂ Incubator (Flow Laboratories), třepačka ORBI-SAFE TS Net Wise (Gallenkamp), třepačka IKA Yellow line OS2 basic (Německo), autokláv Varioklav 400E (H+P Labortechnik), ultrazvuková sonda Sonopuls HD 3100 (Bandelin), Potterův-Elvehjemův homogenizátor, sonikátor Elmasonic E 30H Elma (Německo) a Ultrasonic Compact Cleaner Teson1 Tesla (ČR), thermomixer Eppendorf S350 (Německo), míchačka Microshaker ML-1, vakuová „odparka“ Speed Vac® DNA 110 Savant (USA), vortex MS 1 Minishaker (Německo), SNAP i.d. (Millipore, USA), termocykler Tech Gene TECHNE, transiluminátor Dark Reader Clare Chemical Research, inkubátor IR 1500 Automatic CO₂ Incubator (Flow Laboratories)

3.3 METODY

3.3.1 Premedikace laboratorních zvířat

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 150-200 g) byli drženi při teplotě 22 ± 2 °C a granulovaná strava a voda jim byly podávány *ad libitum*. Po týdenní aklimatizaci byla zahájena případná premedikace. Den před usmrcením byla zvířatům odebrána strava. Samcům laboratorního potkana bylo intraperitoneálně (i.p.) jednorázově podáno 4 a 40 mg ellipticinu na jeden kilogram tělesné hmotnosti zvířete. Ellipticin byl rozpuštěn ve vodě, pro lepší rozpustnost bylo přidáno několik kapek kyseliny octové. 48 hodin po aplikaci byla zvířata usmrcena a z tkání (játra, ledviny, plíce) byly izolovány mikrosomální frakce.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č. 207/2004 v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 2).

3.3.2 Isolace mikrosomální frakce

Isolace mikrosomálních frakcí z tkání laboratorního potkana (játra, ledviny, plíce) byla provedena diferenční centrifugací. Celý postup izolace probíhal v chlazené místnosti při 5 °C a všechny použité nástroje a roztoky byly předem vychlazeny.

Jednotlivé orgány (játra, plíce, ledviny) byly vloženy do předem zváženého ledového roztoku pufru **P1** (153 mM KCl; 50 mM TRIS; (50 µM vit E může být); pH 7,4) a z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Jaterní, plicní a ledvinná 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.

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. Sediment byl rehomogenisován v roztoku P1 a zpracován za výše uvedených podmínek.

Poté byly supernatanty spojeny a 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 byly plněny maximálně do 2/3 výšky. Supernatant byl velmi opatrně odlit přes sediment bez kontaminace tzv. lehce sedlou vrstvou (mitochondrie). Sediment nebyl dále využit.

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 pufru **P2** (100 mM Na₄P₂O₇ · 10 H₂O; pH 7,4).

Z homogenní suspenze byla připravena finální mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při 60 000 RPM (centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 70 Ti, 6 x 94 ml). Mikrosomální sediment byl resuspendován v pufru **P3** (20% glycerol; 153 mM KCl; 50 mM TRIS; pH 7,4) a rehomogenisován pomocí malého homogenisátoru (2 ml). Výsledný mikrosomální preparát byl pipetován do mikrozkušavek dle Eppendorfa a uskladněn v -80 °C.

3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Wiechelmana a kol [94]. Tato metoda je založena na tvorbě modro-fialového komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin redukují měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilizované jako vínanový komplex) na měďné. Intensita zabarvení je stanovena spektrofotometricky (A_{562}), a je přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo potřebné pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno 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 byla 1% BCA v 50 dílech. Po rozpuštění BCA byl dále přidán 1 díl roztoku B (4% CuSO₄ · 5H₂O v destilované vodě). Činidlo bylo připraveno těsně před přidáním ke standardům a vzorkům.

Do sterilních mikrozkušavek dle Eppendorfa (1,5 ml) bylo pipetováno 20 μ l vzorku (v případě potřeby ředěného destilovanou vodou) a přidáno 980 μ l činidla. Pro sestavení kalibrační křivky bylo do mikrozkušavek pipetováno 20 μ l standardu BSA o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 mg/ml a přidáno 980 μ l činidla. Standardy byly stanovovány v „dubletech“ a vzorky s neznámými koncentracemi v „tripletech“. Po přidání činidla byly vzorky promíchány a inkubovány 60 min při teplotě 60 °C.

Po inkubaci byla měřena absorbance standardů při 562 nm proti „slepému“ vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 20 μ l destilované vody. Stejným způsobem byla měřena i absorbance vzorků. Byla sestavena kalibrační křivka a z ní určena koncentrace proteinu ve vzorcích. Měření bylo prováděno na spektrofotometru Spektromom 195D v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.4 Stanovení obsahu cytochromu P450

Principem metody pro stanovení obsahu cytochromu P450 v mikrosomálních preparátech je využití charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm [62,63].

Do zkumavky bylo pipetováno 1960 μ l pufru (0,1 M KH₂PO₄; 2% glycerol; pH 7,5) a bylo přidáno 40 μ l vzorku mikrosomů. Redukce cytochromu P450 byla uskutečněna přidáním malého množství (~5 mg) dithioničitanu sodného. Směs byla opatrně promíchána

tak, aby v ní nevznikaly bubliny. Následně byl vzorek rozdělen po 1 ml do dvou křemenných kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupraprskovém přístroji Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Německo) byla měřena základní linie („base line“) v rozmezí 405 až 490 nm. Vzorková kyveta byla následně sycena po dobu 60 sekund proudem oxidu uhelnatého a bylo měřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena z následujícího vztahu:

$$c_{P450} = A_{450} - A_{490} / \varepsilon_{P450} \cdot \text{\textit{ředění}} \quad [\mu\text{mol/l}]$$

c_{P450} koncentrace cytochromu P450

A_x absorbance při vlnové délce x nm

ε_{P450} molární absorpční koeficient cytochromu P450 při vlnové délce 450 nm;

($\varepsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.3.5 Stanovení koncentrace cytochromu b_5

Koncentrace cytochromu b_5 byla stanovena spektrofotometricky z absolutního spektra. Tento protein vykazuje díky navázanému hemu absorpční maximum při vlnové délce 413 nm. Spektrum bylo měřeno na dvoupraprskovém spektrofotometru Speckord M40 v kyvetě o optické dráze 1 cm a jednopaprskovém spektrofotometru Hélios α Thermo Spectronic [96,97].

Koncentrace byly počítány podle následujícího vzorce:

$$c_{413} = A_{413} - A_{500} / \varepsilon_{P450} \cdot \text{\textit{ředění}} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol/l}]$$

c_{413} koncentrace cytochromu b_5

A_x absorbance při vlnové délce x nm

ε_{413} molární absorpční koeficient cytochromu b_5 při vlnové délce 413 nm

($\varepsilon = 117 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.3.6 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy se provádí měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace NADPH [95]. Přírůstek redukovaného cyt c se měří při vlnové délce 550 nm.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa katalysuje reakci:



Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno 10 μl 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 μl NADPH (10 mM), vzorek byl rychle zamíchán a ihned proměřována absorbance při 550 nm po dobu 60 sekund. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v tripletech.

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

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

a_{red}	aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
sm	směrnice závislosti absorbance na čase
ϵ_{red}	molární absorpční koeficient cytochromu c při vlnové délce 550 nm ($\epsilon = 21,01 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)
Δt	změna času
l	délka kyvety

3.3.7 Sledování ethoxyresorufin-*O*-deethylační aktivity

Ethoxyresorufin-*O*-deethylační (EROD) aktivita byla použita jako „markerová“ reakce pro sledování aktivity cytochromů P450 podrodiny 1A. Tato podrodina katalyzuje deethylaci 7-ethoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin. Metabolismus 7-ethoxyresorufinu byl studován za použití mikrosomů (játra, ledviny, plíce) potkanů

kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných ellipticinem. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny v „dubletech“ o celkovém objemu 500 μ l a obsahovaly: 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce, 2,2 μ M 7-ethoxyresorufin (0,2 mM zásobní roztok v MeOH) a směs byla doplněna do 500 μ l fosfátovým pufrem (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4).

Do mikrozkuvek (Eppendorf) byly pipetovány mikrosomy a pufr. Poté bylo do směsi přidáno 5,62 μ l 7-ethoxyresorufinu. Směs byla inkubována 2 min za laboratorní teploty. Pro vlastní měření byla využita 96 jamková mikrotitrační destička. Z každé inkubační směsi bylo odebráno 3x150 μ l a pipetováno do jamek destičky. Vždy do jedné jamky z „tripletu“ bylo přidáno 17 μ l fosfátového pufru (blank) a do zbylých dvou bylo pipetováno 17 μ l 5 mM NADPH, čímž byla reakce iniciována. Bezprostředně byla měřena fluorescence vzniklého resorufinu (Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55). Fluorescence byla měřena v deseti 60-ti sekundových cyklech. V případě, že zjištěné hodnoty byly „off scale“, vzorky byly ředěny fosfátovým pufrem. Množství vzniklého resorufinu ve vzorcích bylo odečteno z kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestavena z 8 bodů (1,875; 3,75; 7,5; 15; 22,5; 30; 45; 60 pmol resorufinu na jamku). Pro sestavení kalibrační křivky byl použit 10 μ M roztok resorufinu v MeOH, který byl na výsledné koncentrace ředěn fosfátovým pufrem.

3.3.8 Hydroxylace testosteronu

Jako „markerová“ reakce pro sledování aktivity cytochromů P450 podrodiny 3A se využívá 6 β -hydroxylace testosteronu [99,100]. Metabolismus testosteronu byl studován za použití mikrosomů (játra, ledviny, plíce) potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných ellipticinem. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „tripletech“ o celkovém objemu 500 μ l a obsahovaly: 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce, 50 μ M testosteronu (10 mM zásobní roztok v MeOH), 0,1 mM NADPH-generující systém (10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa) a fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4).

Všechny složky byly do inkubační směsi připraveny v takovém množství, které odpovídalo uvedeným koncentracím, a směs byla doplněna do 500 μ l fosfátovým pufrem. Pre-inkubační směs obsahovala mikrosomy, testosteron a pufr a byla inkubována 5 minut při 37 °C za stálého třepání 400 RPM (Thermomixer Compaq, Eppendorf) v otevřených mikrozkuvkách. Po uplynutí doby bylo do směsi přidáno 50 μ l NADPH-generujícího

systemu. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 15 min za stálého třepání při 400 RPM a při 37 °C v otevřených mikrozkuvkách.

Reakce byla zastavena přidáním 100 µl 1 M Na₂CO₃/2 M NaCl a intenzivním zamícháním. Dále bylo do reakční směsi přidáno 5µl fenacetinu (1 mM zásobní roztok v MeOH), který slouží jako vnitřní standard pro HPLC a 1 ml dichlormethanu. Tato reakční směs byla 2 minuty intenzivně třepána (Microshaker ML-1) a pro ještě důkladnější oddělení fází byla centrifugována 3 minuty při 13 000 RPM (Microcentaur MSE). Spodní organická fáze byla odebrána do nových mikrozkuvek a byla provedena druhá extrakce z vodné fáze přidáním 1 ml dichlormethanu. Směs byla odpařena do sucha na vakuové odparce (Speed Vac® DNA 110 Savant). Vzorky byly uchovány v -20 °C. Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn ve 25 µl methanolu.

3.3.9 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metabolit testosteronu (6β-hydroxytestosteron) vzniklý v inkubačních směsích byl separován od testosteronu pomocí RP-HPLC (Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Separace metabolitu byla prováděná na koloně Nukleosil 100-5 C18 HD; 4 x 250 mm Macherey-Nagel při teplotě 35 °C a průtoku mobilní fáze 0,5ml/min. Jako mobilní fáze byla použita směs 75% (v/v) MeOH v H₂O, která byla před použitím sonikována pro odstranění vzduchu. K separaci docházelo isokratickou elucí. 6β-hydroxytestosteron byl detekován při vlnové délce 254 nm a pro kvantifikaci byla plocha jeho píku vztažena k ploše píku standardu fenacetinu.

3.3.10 SDS elektroforéza

Elektroforéza mikrosomálních proteinů v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) byla prováděna dle Laemmliho na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání [98].

Skla určená pro elektroforézu byla umyta, odmaštěna ethanolem a uchycena do elektroforetické aparatury. Mezi skla byl nanesen roztok pro přípravu 8% nebo 10% separačního gelu (případně 15% pro cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasu), který byl připraven z pufru A (0,375 M TRIS/HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8), polymeračního roztoku A (30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru A), tetramethylethylenediaminu

(TEMED) a persíranu amonného. Následně byl roztok pro přípravu gelu převrstven destilovanou vodou. Po polymeraci gelu (cca 30 min) byla destilovaná voda odlita. Na separační gel byl nanesen roztok pro přípravu 3% zaostřovacího gelu. Ten byl připraven z pufru B (0,125 M TRIS/HCl; 0,1% SDS (w/v); 0,0006% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8), polymeračního roztoku B (30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru B), TEMEDu a persíranu amonného. Do zaostřovacího gelu byl pro vytvoření jamek vložen hřeben. Po polymeraci (cca 15 min) byl hřeben vyjmut a elektrodový prostor byl vyplněn elektrodovým pufrem (0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3).

Vzorky pro SDS elektroforézu byly ředěny destilovanou vodou tak, aby koncentrace proteinu v jedné jamce byla 30 μ g (v případě odlišného množství proteinu v jamce je konkrétní hodnota uvedena ve výsledcích) V případě produkce CYP2S1 v bakteriích *E. coli* byly vzorky ředěny na stejnou $OD_{600} = 0,5$ nebo 1. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 3:1, následně byly cca 5 minut povařeny ve vodní lázni a nanášeny Hamiltonovou stříkačkou do jamek.

Po nanášení vzorků byly skleněné desky umístěny do elektroforetické vany, která byla vyplněna elektrodovým pufrem. Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání při napětí 80 V, pro průchod zaostřovacím gelem, které bylo po 30 minutách zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena, když čelo s bromfenolovou modří dorazilo přibližně 5 mm nad spodní okraj separačního gelu.

Následně byl celý gel vyjmut, odstraněn zaostřovací gel a separační gel přenesen do barvicí lázně (25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)) na 60 minut. Pro odstranění nadbytečné barvy byl gel přesunut do odbarvovací lázně (25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)) přes noc.

3.3.11 Metoda „Western blot“

„Western blot“ je metoda přenosu proteinů z elektroforetického gelu na membránu (PVDF, nitrocelulósová) schopnou sorbovat proteiny.

Gel byl po skončení elektroforézy asi 10 minut inkubován v transferovém pufru (0,025 M TRIS, 0,192 M glycin, pH 8,3). Na přenos proteinů byla použita PVDF membrána, která byla nejdříve „smočena“ v methanolu, potom asi minutu v destilované vodě a následně asi 5 minut v transferovém pufru. Dále byl sestaven tzv. „sandwich“. Ten byl tvořený třemi kusy chromatografického papíru Whatman 3 (rozměry jsou stejné jako

rozměry gelu), které byly „smočeny“ v transferovém pufru, PVDF membránou, gelem a dalšími třemi kusy chromatografického papíru. Pro odstranění bublin byla použita skleněná tyčinka. Elektropřenos byl prováděn 50 minut při 3,5 mA/cm² gelu.

Po skončení přenosu byla membrána dále použita pro imunochemickou detekci CYP. Gel byl pro kontrolu přenosu barven 45 minut v barvicí lázni a poté vložen přes noc do odbarvovací lázně.

3.3.12 Imunochemická detekce cytochromu P450

Po přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu byla tato membrána 1 hodinu blokována v blokovacím roztoku (5 % odtučněné, sušené mléko v PBS (1,8 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 0,134 M NaCl, pH 7,2, 0,3 % (v/v) TRITON X-100).

Při použití komerční primární králičí protilátky (CYP1A1, CYP3A, cytochrom b₅, GAPDH, CPR) byla inkubace s protilátkou provedena přes noc při 6 °C za stálého míchání. V případě primární slepičí protilátky (CYP1A1/2) byla membrána se sorbovanými proteiny inkubována s protilátkou 2 hod za laboratorní teploty na třepače (IKA Yellow line OS2 basic, Německo). Pak byla membrána umístěna do jamky systému detekujícího proteiny SNAP i.d. (Millipore, USA) a primární protilátky byly omyty puftrem PBS Triton X-100 (3 x 10-30 ml, podle velikosti jamky). Dále byla membrána 10 min inkubována v roztoku sekundární protilátky, králičí IgG proti slepičí IgY, případně kozí IgG proti králičí IgY (finální ředění 1:1429) nebo slepičí IgG proti kozí IgY (finální ředění 1:5000) všechny s navázanou alkalickou fosfatase (finální ředění 1:5000). Nenavázaná sekundární protilátka byla z membrány vymyta puftrem PBS Triton X-100 (3x10-30 ml). Membrána byla vyjmuta z jamky a promyta destilovanou vodou. Detekce proteinů byla provedena roztokem substrátu pro alkalickou fosfatase (BCIP/NBT), který byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody, reakce byla zastavena ponořením membrány do destilované vody.

3.3.13 Příprava agarových ploten s ampicilinem

Sterilní agar byl připraven rozpuštěním 4 g agaru v 100 ml vody a sterilizován autoklávováním při teplotě 121 °C. Těsně před použitím byl rozeřtán v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí bylo potřebné množství odlito do zkumavky Falcon a byl přidán ampicilin

do výsledné koncentrace 100 µg/ml. Následně bylo přibližně 10 ml směsi přelito do Petriho misky. Misky byly ponechány při laboratorní teplotě.

3.3.14 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Pro přípravu kompetentních buněk byla využita metoda popsaná v publikaci [102], která využívá chlorid vápenatý. Touto metodou byly připraveny kompetentní buňky *E. coli* kmenů TOP10 a LMG194 (kmeny DH5α, C41_{PLYS}, C43 byly již připraveny). Při přípravě buněk *E. coli* LMG194 bylo použitým antibiotikem tetracyklin, protože tento kmen obsahuje ve své DNA gen pro tetracyklinovou rezistenci. Kmen TOP10 byl připraven bez antibiotik.

Ze zásobní suspenze buněk *E. coli* (TOP10 a LMG194) bylo sterilním párátkem přeneseno část buněk do zkumavky Falcon se 10 ml LB média. Do média, které obsahovalo buňky LMG194 byl přidán tetracyklin do výsledné koncentrace 25 µg/ml. Následně byly buňky inkubovány přes noc ve třepačce při 37 °C a 220 RPM (třepačka ORBI-SAFE). Na druhý den bylo z „narostlé“ kultury odebráno 0,5 ml a přeneseno do 100 ml LB média bez přidání antibiotika (TOP10) a s tetracyklinem (LMG194) do výsledné koncentrace 25 µg/ml. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 220 RPM (třepačka ORBI-SAFE). Průběžně byla měřena optická denzita při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀) „narostlé“ kultury proti samotnému LB médiu. Když hodnota OD₆₀₀ dosáhla intervalu 0,3-0,5, byly buňky přeneseny do dvou zkumavek Falcon (50 ml), ponechány 10 minut v ledové tříšti a následně centrifugovány 10 min při teplotě 4 °C a 4000 RPM (centrifuga Allegro X-22R s rotorem 4250). Supernatant byl odlit a zkumavky byly ponechány asi 1 min v obrácené poloze. Peleta byla resuspendována v 10 ml ledově vychlazeného 100 mM CaCl₂ a ponechána stát 10 min v ledové tříšti. Zkumavky byly opět centrifugovány při stejných podmínkách. Supernatant byl odlit. Peleta byla resuspendována ve 2 ml 100 mM CaCl₂ a ponechána v ledové tříšti asi 1 hodinu. Po inkubaci buněk s chloridem vápenatým byly do každé zkumavky Falcon přidány 2 ml 50% glycerolu. Nakonec byly do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf pipetovány alikvoty o objemu 200 µl, které byly uloženy do -80 °C.

3.3.15 Transformace buněk *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* a vektor byly ponechány v ledové tříšti do rozmrznutí. Zásobní alikvot buněk o objemu 200 μ l byl rozdělen do dvou mikrozkušavek po 100 μ l. Do jedné z mikrozkušavek byl přidán 1 μ l plasmidu nebo 20 μ l ligační směsi, do druhé bylo přidáno stejné množství sterilní destilované vody. Směsi buněk byly ponechány 30 min v ledové tříšti. Poté byly mikrozkušavky vloženy do vodní lázně o teplotě 42 °C. V případě kmene DH5 α byl tzv. „tepelný šok“ (angl. heat shock) po dobu 90 s, v případě expresních kmenů 45 s (C41_{p_{LYS}}, C43, LMG194, TOP10). Poté byly ponechány 2 min v ledové lázni. Ke všem vzorkům bylo přidáno 300 μ l LB média a následně byly inkubovány 1,5 hod při 37 °C. Nakonec byly směsi buněk pipetovány na agarovou plotnu a rozetřeny. Plotny byly po vsáknutí suspenze obráceny dnem vzhůru a inkubovány v 37 °C přes noc v inkubátoru (IR 1500 Automatic CO2 Incubator).

3.3.16 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single cell colony“

Kolonie bakterií, které vyrostly na plotnách inkubovaných přes noc, obsahovaly vložený vektor s ampicilinovou rezistencí. Byly vybrány tři kolonie transformovaných buněk. Vyžíhanou pinzetou byla v laminární boxu pomocí párátko přepíchnutá 1 z vybraných kolonií a párátko bylo vhozeno do zkumavky Falcon. Ve zkumavce bylo připraveno 5-10 ml LB média s ampicilinem do výsledné koncentrace 100 μ g/ml. Zkumavka s povoleným víčkem byla inkubována v třepačce přes noc při 37 °C (resp. 30 °C) a 220 RPM. Druhý den bylo z „narostlé“ kultury odebráno 200-500 μ l do mikrozkušavek a uchováno v 15% glycerolu v -80 °C pro další použití.

3.3.17 Isolace plasmidové DNA

Do zkumavky Falcon (50 ml) s 10 ml LB média s ampicilinem bylo pipetováno 100 μ l buněk ze zmraženého alikvotu či z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell colony“. Zkumavka s povoleným víčkem byla následně inkubována přes noc ve třepačce při 37 °C a 220 RPM.

Druhý den byla „narostlá“ kultura buněk centrifugována 8 min, při teplotě 4 °C a rychlosti 4500 RPM (Allegro X-22R, rotor 4250). Supernatant byl odlit a peleta byla resuspendována v 200 μ l GTE pufru (50 mM glukosa, 25 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA,

pH 8,0), přenesena do mikrozkušavky a ponechána stát 5 min při laboratorní teplotě. Potom bylo do směsi přidáno 300 μ l čerstvě připraveného lyzačního pufru (0,2M NaOH, 1% SDS) a směs byla ponechána stát 5 min při laboratorní teplotě. Následně bylo do směsi přidáno 200 μ l vychlazeného K-acetátového pufru (3 M octan draselný, pH 5,5) a inkubováno 10 min na ledu. Po uplynutí inkubační doby byla provedena centrifugace 10 min, 16 000 g a při teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a bylo k němu přidáno stejné množství směsi fenol/chloroform-isoamylalkohol (25:24:1). Směs byla intenzivně protřepána a centrifugována 5 min, 16 000 g a teplotě 4 °C. Vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky a k ní byl přidán stejný objem isopropanolu. Směs byla ponechána na ledu 10 minut a centrifugována 10 min, 16 000 g, 4 °C. Supernatant byl odlit a peleta byla promyta 75% ethanolem a vysušena (Speed Vac). Peleta byla rozpuštěna ve 100 μ l TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) a bylo k ní přidáno 2 μ l RNasy A (1 mg/ml). Směs byla inkubována při 37 °C a 20 minut. Potom bylo do směsi přidáno 60 μ l roztoku PEG (20 % polyethylenglykol, 2,5 M NaCl) a inkubováno minimálně 1 hodinu na ledu. Nakonec byl roztok centrifugován 15 min při otáčkách 16 000 g a 4 °C. Peleta (plasmidová DNA) byla promyta 75% ethanolem, vysušena a rozpuštěna ve 20 μ l TE pufru a uložena v -20 °C pro další použití.

Koncentrace plasmidové DNA a její čistota byla změřena na spektrofotometru NanoVue Plus (*kapitola 3.3.23*).

3.3.18 Isolace plasmidové DNA z agarosového gelu pomocí kitu „Jetquick-Gel Extraction Spin Kit“

V případě ověření transformace nebo štěpení plasmidu byla provedena agarosová elektroforéza DNA (*kapitola 3.3.22*). Poté byla DNA vyříznuta z gelu, přenesena do předem zvážené mikrozkušavky a zvážená na analytických vahách. Dále bylo postupováno podle návodu „Jetquick-Gel Extraction Spin Kit“. Do zkušavky bylo přidáno vypočítané množství roztoku L1 (100 mg gelu = 300 μ l roztoku L1). Zkušavka byla na 15 minut vložena do termobloku (50 °C). Po rozpuštění gelu byla směs pipetována na JETquick kolonku umístěnou v mikrozkušavce a centrifugována při 13400 g, 1 min, 4 °C. Eluovaný roztok byl odstraněn, na kolonku bylo naneseno 500 μ l roztoku L1 a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek. Poté bylo na kolonku naneseno 500 μ l

roztoku L2 a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek. Eluovaný roztok byl odstraněn a kolonka byla centrifugována při 16100 g, 1 min, 4 °C pro odstranění zbytků roztoku L2. Nakonec byla kolonka vložena do nové mikrozkušavky a na střed kolonky bylo pipetováno 35 µl sterilní MQ vody (65 °C) a po 1 minutě byla DNA eluována centrifugací při 13400 g, 2 min, 4 °C.

3.3.19 Kultivace buněk *E. coli*

Tato metoda popisuje obecný postup kultivace buněk *E. coli*. Během experimentů byly upraveny podmínky kultivace.

Do zkumavky Falcon (50 ml) s 10 ml LB média s ampicilinem bylo pipetováno 100 µl buněk ze zmrazeného alikvotu či z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell colony“. Zkumavka s povoleným víčkem byla následně inkubována přes noc ve třepačce při 37 °C a 220 RPM.

Na druhý den bylo z "narostlé" kultury odebráno 100 µl a přeneseno do 10 ml LB nebo TB média s ampicilinem do výsledné koncentrace 100 µg/ml. Buňky byly inkubovány ve třepačce při 30 nebo 37 °C a 220 RPM. Při vlnové délce 600 nm byla průběžně měřena optická denzita (OD_{600}) „narostlé“ kultury proti samotnému LB nebo TB médiu. Když hodnota OD_{600} dosáhla intervalu 0,6-0,8 byla exprese indukována zvoleným množstvím IPTG (1M zásobní roztok) s přidavkem δ -aminolevulové kyseliny (0,5 M zásobní roztok). V případě kmenů *E. coli* TOP10 a LMG194 byla exprese indukována roztokem L-arabiny (20 % zásobní roztok) a s přidavkem δ -aminolevulové kyseliny (0,5 M zásobní roztok). V různých časových úsecích byly odebírány vzorky, které byly uskladněny (-20 °C) pro další použití. Kultivace byla zastavena centrifugací kultury při 4500 RPM po dobu 15 minut a 4 °C (centrifuga Allegra X-22R, rotor 4250).

3.3.20 Kultivace buněk *E. coli* ve větším množství média

Kultivace buněk ve větším objemu média, je vhodná pro získání většího množství proteinu. V postupu jsou uvedeny podmínky, doba kultivace a typ použitého média.

Plasmid pCMV s vloženým genem pro CYP2S1

Pro expresi tohoto typu plasmidu a za uvedených podmínek byly použity 2 expresní kmeny buněk *E. coli* – **C41_{pLYS}** a **C43**.

Do Erlenmayerovy láhve (2 l) s 500 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml) bylo přidáno 5 ml buněk z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell colony.“ Buněčná kultura byla inkubována v třepačce při 37 °C a 220 RPM. Když se hodnota OD (600 nm) pohybovala v intervalu 0,6-0,8 byla exprese indukována přidáním 1 M IPTG tak, aby výsledná koncentrace byla 50 µM. Do kultury byla také přidána kyselina δ-aminolevulová (0,5 M) do výsledné koncentrace 0,5 mM. Po dobu kultivace byly odebírány vzorky a kultivace byla zastavena po 24 hodinách. Potom byla „narostlá“ buněčná kultura centrifugována při 3000 RPM po dobu 20 minut, při teplotě 4 °C (centrifuga Janetzki K70D). Dále bylo pracováno pouze s peletou (viz. kapitola 3.3.21)

Plasmid pBAD-A s vloženým genem pro CYP2S1

Pro expresi tohoto typu plasmidu a za uvedených podmínek byly použity 2 expresní kmeny buněk *E. coli* – **TOP10** a **LMG194**.

Do Erlenmayerovy láhve (0,5 l) se 100 ml TB média s ampicilinem (100 µg/ml) bylo přidáno 1 ml buněk z kultury (LB médium, 30 °C, přes noc) získané přeočkováním metodou „single-cell colony“. Láhev s buněčnou kulturou byla inkubována v třepačce při 34 °C a 180 RPM. Když se hodnota OD (600 nm) pohybovala v intervalu 0,5-0,7 byla exprese indukována přidáním roztoku L-arabiny (20 %) tak, aby výsledná koncentrace byla 0,02 %. Do kultury byla také přidána kyselina δ-aminolevulová (0,5 M) do výsledné koncentrace 0,5 mM. Podmínky kultivace byly měněny na 30 °C a 115 RPM. Po dobu kultivace byly odebírány vzorky a kultivace byla zastavena po 24 hodinách. Potom byla „narostlá“ buněčná kultura centrifugována při 4500 RPM po dobu 15 minut, při teplotě 4 °C (centrifuga Allegra X-22R, rotor 4250). Dále bylo pracováno pouze s peletou (viz. kapitola 3.3.21)

3.3.21 Isolace membránové frakce

Pelety získané centrifugací buněčné kultury (kapitola 3.3.18/19) byly resuspendovány v draselno-fosfátovém pufru (10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,7) do objemu 10 nebo 25 ml. Do suspenze byla přidána 1 tableta proteasových inhibitorů

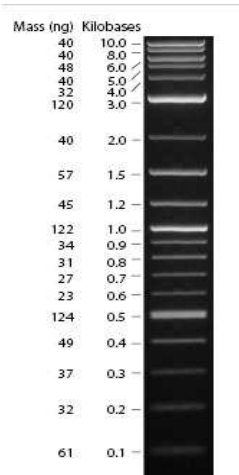
("complete protease inhibitor") a buňky byly rozrušeny sonikací pomocí sondy TE 76. Bylo provedeno 6 sonikačních cyklů trvajících 1 min při amplitudě 40 %. Buňky byly "drženy na ledu" a mezi cykly byly chlazeny v ledové lázni. Nerozrušené buňky a zbytky buněk byly odstraněny centrifugací 15 min, 4500 RPM a při teplotě 4 °C (centrifuga Allegra X-22R, rotor 4250). Supernatant byl dále centrifugován 20 min, 18 000g a 4 °C (centrifuga Allegra X-22R, rotor 630) pro odstranění inkluzních tělísek (tento krok byl vynechán při izolaci membránové frakce z bakteriálních kmenů *E. coli* C41_{pLYS} a C43). Ze získaného supernatantu byla připravena membránová frakce.

Supernatant byl přelit do ultracentrifugačních kyvet a byl odstředěn při rychlosti 60 000 RPM, 75 min a 4 °C (ultracentrifuga Beckman LE-80K, rotor Ti 70). Peleta byla resuspendována homogenizací v draselno-fosfátovém pufru (20 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 20 % glycerol (v/v), pH 7,7) a uskladněna (-80 °C) pro další použití.

3.3.22 Horizontální agarosová elektroforéza DNA

Horizontální agarosová elektroforéza je založena na rozdílné pohyblivosti molekul DNA v elektrickém poli. Nukleové kyseliny nesou díky fosfátovým skupinám záporný náboj a pohybují se ke kladnému pólu (anodě). Rychlost pohybu závisí na velikosti náboje a konformaci fragmentu DNA. Tato metoda byla využita jako kontrola po provedení dvojitého štěpení DNA a pro izolaci fragmentu DNA pro PCR a ligaci.

Nejdřív byl připraven roztok 1% (w/v) agarosu v 40 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (zásobní roztok byl 50x koncentrovaný – 2 M Tris, 2 M kyselina octová, 50 mM EDTA). Agarosa byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě a po ochlazení byly do roztoku přidány 2 µl barvy (Gelgreen). Roztok byl nalit do elektroforetické vany a do gelu byl upevněn hřeben k vytvoření jamek. Po ztuhnutí (cca 30 min) byl hřeben vyjmut a vana s gelem byla umístěna do elektroforetické aparatury, která byla naplněna 1x koncentrovaným TAE pufrem. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1:4 (40% (w/v) sacharosa, 0,1% (w/v) bromfenolová modř). Jako marker byl použit „2-log DNA Ladder“ (Obrázek 19). Elektroforéza probíhala 40 minut při 110 V. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut a umístěn na transiluminátor a separovaná DNA byla vizualizovaná.



Obrázek 19: Marker „2-log DNA Ladder“ [104].

3.3.23 Určení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena na spektrofotometru NanoVue Plus. Přístroj byl nastaven na 0,5 mm délku optické dráhy. Koncentrace vzorku 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ odpovídala absorbance rovné 1. Jako blank byl použit TE pufr (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ve kterém byla plasmidová DNA rozpuštěna. Měření bylo prováděno v tripletech. Takto byly zjištěny hodnoty koncentrace a absorbance při 230, 260, 280 a 320 nm, kterých poměr určuje čistotu izolované DNA.

3.3.24 Polymerasová řetězová reakce - PCR

Základním principem PCR je replikace nukleových kyselin. Je to cyklicky se opakující enzymová reakce, při které dochází k tvorbě nových řetězců vybraných úseků DNA. Podobně jako v replikaci DNA v organismu je potřebná DNA-polymerasa, která je termostabilní, primery a volné dNTP a syntéza probíhá ve směru 5' → 3'. Proces PCR probíhá ve 3 krocích. Nejdříve dochází k denaturaci dvouvláknové DNA, potom nasednutí primerů na oddělené vlákna a nakonec k syntéze nových řetězců DNA. Výsledkem je několikanásobné „namnožení“ vybraného úseku DNA.

Pomocí PCR byl upraven gen pro *CYP2S1* a to tak, že ke koncům genu byla připojena restriční místa. Primery pro PCR genu *CYP2S1* byly navrženy Mgr. Janem Milichovským (Tabulka 1). Byly navrženy tak, aby byla ke koncům genu připojena místa

pro restriční endonukleasy na 5'-OH konci pro NdeI (CATATG) a XhoI (CTCGAG) a na 3'-OH konci pro HindIII (AAGCTT) a BamHI (GGATCC). Lyofilizované primery byly rozpuštěny ve vodě na koncentraci 100 µM. Poté bylo odebráno 10 µl z obou roztoků a ředěno na koncentraci 20 µM. Takto připravené roztoky primerů sloužili jako zásobní roztoky. Jako templát sloužil vektor pCMV/CYP2S1.

Tabulka 1: Primery pro PCR genu CYP2S1

	Sekvence
"forward" primer	5'-GACCTCGAGCATATGGAGGCGACCGGC- 3'
"reverse" primer	5'-GTAGGATCCAAGCTTTCATCTGGTCTGCGTGGTG- 3'

Reakční směs pro PCR obsahovala:

- 1 µl plasmidu (0,13 µg/ µl),
- 1 µl "forward" primeru (20 µM),
- 1 µl "reverse" primeru (20 µM),
- 1 µl dNTP (10 mM),
- 5 µl pufru pro Pfu polymerasu (10x koncentrovaný),
- 1 µl Pfu polymerasy,
- 6 µl MgSO₄ (25 mM),
- 2 µl DMSO,
- sterilní MQ voda doplněno do 50 µl.

Reakce probíhala v termocycleru za daných podmínek:

- 30 cyklů:
 - 94 °C, 30 s - rozvolnění DNA,
 - 59 °C, 30 s - „nasednutí“ primerů,
 - 72 °C, 60 s - polymerace,
- 1 cyklus:
 - 72 °C, 8 min - dokončení polymerace,
 - 4 °C - držení teploty.

Získaný fragment (PCR produkt) byl přečištěn horizontální agarosovou elektroforézou a izolován pomocí kitu „Jetquick-Gel Extraction Spin Kit“.

3.3.25 Štěpení DNA pomocí endonukleas XhoI a HindIII

Pro vložení genu *CYP2S1* do plasmidu pBAD-A bylo nutné provést dvojitě štěpení endonukleasami XhoI a HindIII. Charakteristické palindromatické sekvence, které jsou nutné pro specifické štěpení těmito endonukleasami, se nacházely v DNA sekvencích jak plasmidu tak genu *CYP2S1*. Reakční směs objem 20 μ l byla inkubována 2 hod při 37 °C.

Reakční směs obsahovala:

- 5 μ l DNA (plasmidová nebo gen *CYP2S1* - produkt PCR),
- 2 μ l pufr NEB 2 (10x koncentrovaný),
- 1 μ l XhoI,
- 1 μ l HindIII,
- 0,2 μ l BSA (100x koncentrovaný),
- sterilní MQ voda doplněno do 20 μ l.

3.3.26 Ligace

Pro ligaci byl použit gen *CYP2S1* - PCR produkt (dále nazýváno jako insert) a plasmid pBAD-A. Celkový objem ligační směsi byl 20 μ l.

Složení ligační směsi:

- 12 μ l insertu,
- 5 μ l plasmidu pBAD-A,
- 2 μ l pufru pro T4 DNA ligasu,
- 1 μ l T4 DNA ligasa (ligasa z bakteriofágu T4).

Nejdříve byla smíchána plasmidová DNA a insert a tato směs byla vložena na 5 minut do ohřívače bloků na 45 °C a následně na 3 minuty inkubována na ledu. Poté byl přidán pufr a DNA ligasa. Reakce probíhala při 16 °C a přes noc.

4 Výsledky

4.1 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE ISOLOVANÉ Z TKÁNÍ LABORATORNÍHO POTKANA

První část diplomové práce byla věnována izolaci mikrosomů jater (JK, J4, J40), ledvin (LK, L4, L40) a plic (PK, P4, P40) z potkanů nepremedikovaných (kontrolních – K) a premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg ellipticinu na kilogram tělesné hmotnosti zvířete – 4, 40) dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Mikrosomální frakce byla charakterizována stanovením koncentrace proteinu (*Tabulka 2*) a stanovením specifického obsahu CYP (*kapitola 4.2*).

Tabulka 2: Koncentrace proteinu mikrosomálních frakcí jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných (kontrolních) a premedikovaných ellipticinem. J – játra, L – ledviny, P – plíce, K – kontrola (nepremedikované), 4 – mikrosomy zvířat premedikovaných ellipticinem 4 mg/kg, 40 – mikrosomy zvířat premedikovaných ellipticinem 40 mg/kg (zkratky používané i dále v textu).

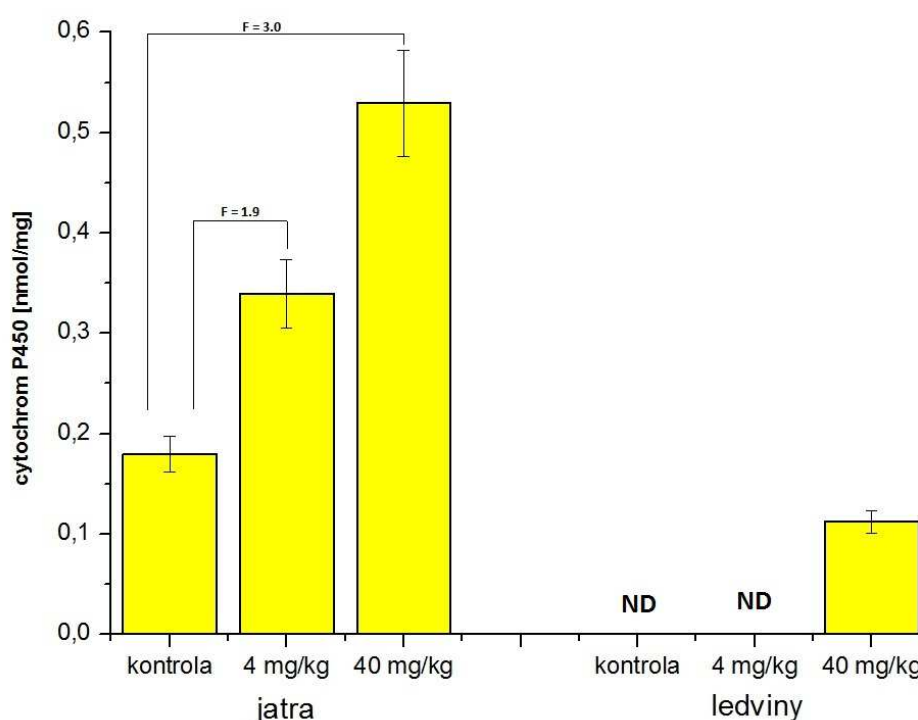
mikrosomy	koncentrace proteinů [mg/ml]
JK	33.4
J4	23.3
J40	41.3
LK	24.7
L4	18.0
L40	9.8
PK	3.7
P4	4.2
P40	3.0

4.2 VLIV ELLIPTICINU NA EXPRESI CYTOCHROMŮ P450 V MODELU LABORATORNÍHO POTKANA

Na biotransformaci ellipticinu na aktivační a detoxikační metabolity se podílí cytochromy P450 (*kapitola 1.7.1*) [77,78,80,92]. Proto bylo nutné prozkoumat, jestli je hladina a aktivita CYP v tkáních kontrolních a premedikovaných laboratorních potkanů stejná nebo se mění. Detailní výsledky jsou uvedeny v následujících kapitolách.

V mikrosomech izolovaných ze studovaných orgánů byla spektrofotometricky

stanovená koncentrace cytochromu P450. Při měření za redukčních podmínek vytvářel cytochrom P450 s CO komplex, který vykazuje typické maximum při 450 nm [64,65] (*kapitola 3.3.4*). Na *obrázku 20* je patrné, že v játrech je oproti ledvinám vyšší zastoupení CYP ve všech vzorcích (K, 4 a 40 mg/kg). Je známo, že játra jsou nejdůležitějším místem biotransformačních reakcí xenobiotik a mají nejbohatší zastoupení různých isoformů CYP. Nejvyšší obsah CYP byl zjištěn v mikrosomech v játrech potkanů premedikovaných 40 mg/kg elliptycinu. V ledvinách byl CYP detekován pouze u zvířat v premedikovaných 40 mg/kg elliptycinu. V plicích z důvodu nízkého obsahu CYP nebylo měření obsahu tohoto proteinu prováděno.



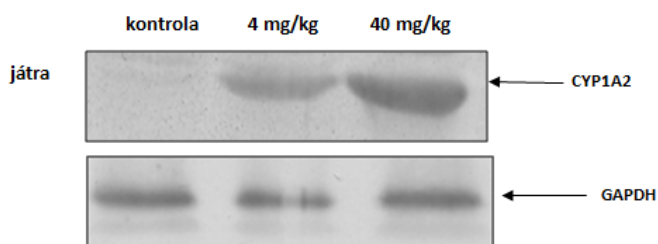
Obrázek 20: Specifický obsah cytochromu P450 v játrech a ledvinách kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných elliptycinem (4 a 40 mg/kg). ND – nedetekováno. Směrodatná odchylka činí 10 %. F = násobek změny

4.2.1 Vliv elliptycinu na expresi proteinů cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A1

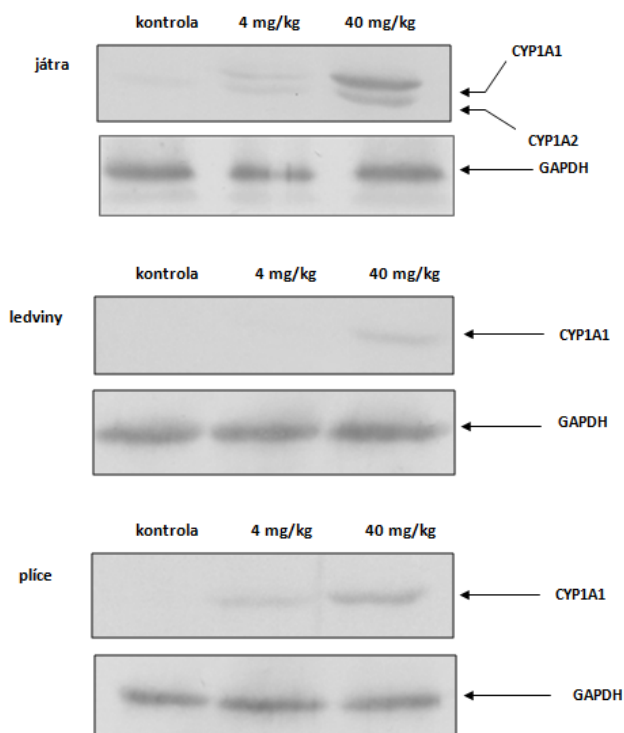
Míra exprese CYP1A1, 1A2 a 3A1 byla stanovena metodou Western blot (*kapitola 3.3.11*). Jako primární protilátky byly použity králičí anti-CYP1A1 a anti-CYP3A a slepičí anti-CYP1A2. Použitá sekundární protilátka obsahovala navázanou alkalickou fosfatase a pro vizualizaci byl proto použit substrát pro tento enzym.

Gen pro glycerinaldehydfosfátdehydrogenasu (GAPDH) je konstitutivně exprimován ve vysokém množství a ve většině tkání a buňkách. Proto je používán jako tzv. „loading“ kontrola pro metodu Western blot.

Obrázky 21 a 22 uvádějí výsledky získané při sledování vlivu ellipticinu na expresi studovaných CYP. Je patrné, že působením ellipticinu ve všech cílových tkáních dochází k velkému nárůstu exprese CYP1A1 a CYP1A2, zejména v játrech potkanů premedikovaných ellipticinem. Z důvodu tzv. „křížové reaktivity“ (angl. cross reactivity) protilátky anti-CYP1A1 byl kromě samotného CYP1A1 detekován též CYP1A2.



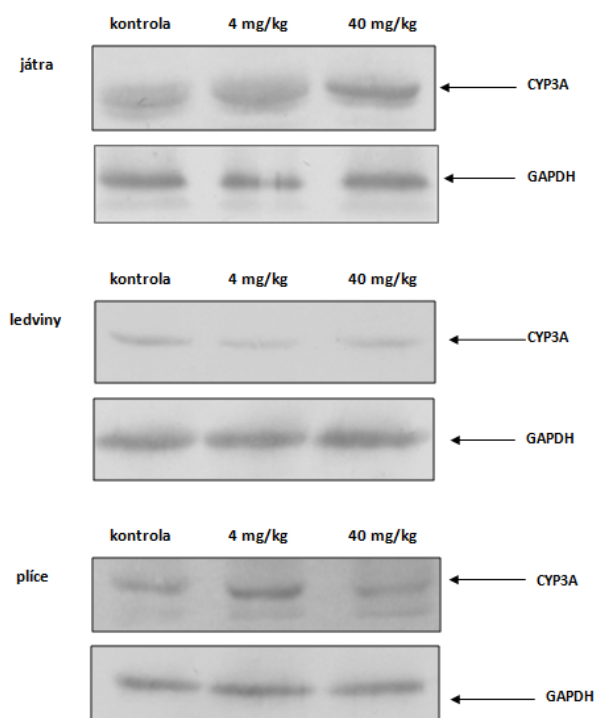
Obrázek 21: Exprese CYP1A2 a GAPDH sledovaná imunodetekcí v játrech kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg).



Obrázek 22: Exprese CYP1A1 a GAPDH sledovaná imunodetekcí v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg).

Vedle nárůstu exprese CYP1A1 a 1A2 způsobeného premedikací potkanů

ellipticinem byl zaznamenán podobný efekt nárůstu obsahu cytochromu P450 3A také v jaterních mikrosomech. Naproti tomu v ledvinách se zdá, že nejvyšší obsah CYP3A je v kontrolním preparátu a po premedikaci zvířete ellipticinem dochází k poklesu exprese tohoto CYP. V plicích byla pozorována úplně jiná tendence exprese CYP3A. V mikrosomech plic potkanů premedikovaných 4 mg/kg ellipticinu bylo zaznamenáno vyšší množství CYP3A než v mikrosomech kontrolních zvířat a vyšší než v plicích mikrosomech potkanů premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu (*Obrázek 23*).



Obrázek 23: Expresa CYP3A a GAPDH sledovaná imunodetekcí v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg).

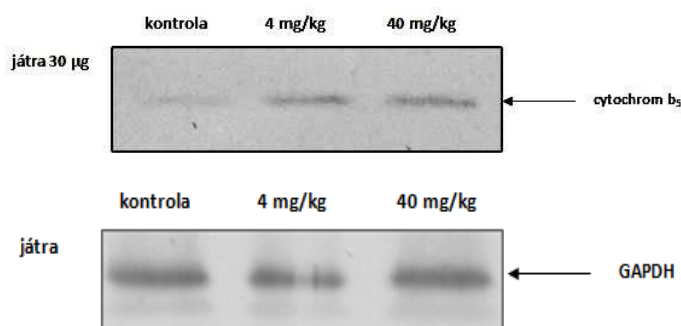
4.3 VLIV ELLIPTICINU NA EXPRESI DALŠÍCH ENZYMŮ A PROTEINŮ SYSTÉMU OXIDAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ

Nedělitelnou součástí MFO systému je kromě vlastního cytochromu P450 také jeho redukční partner NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Dalšími fakultativními složkami MFO systému jsou cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasa (*kapitola 1.3*). Proto byl rovněž sledován vliv premedikace experimentálních zvířat ellipticinem na expresi některých těchto proteinů.

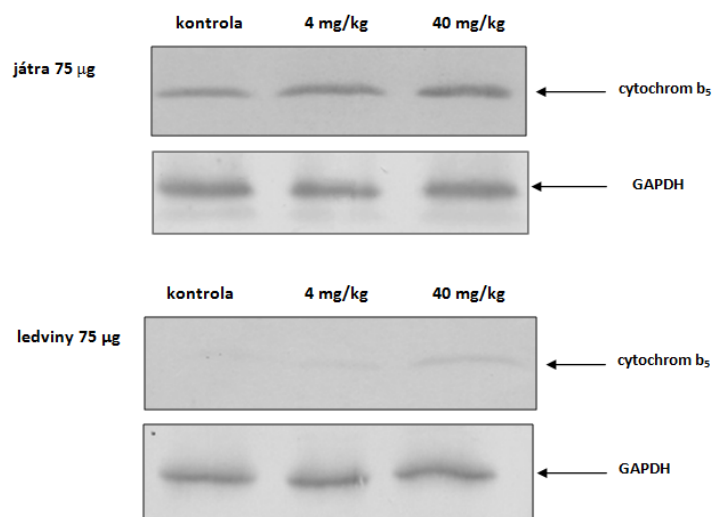
4.3.1 Vliv ellipticinu na expresi cytochromu b₅ na úrovni proteinu

Vliv premedikace laboratorních potkanů ellipticinem byl sledován i na úrovni exprese proteinu cytochromu b₅. Podobně jako v případě sledování exprese CYP1A a 3A byla využita metoda Western blot a následná imunochemická detekce pomocí specifické králičí primární protilátky proti cytochromu b₅. Jako sekundární protilátka byla použita kozí anti-králičí protilátka s navázanou alkalickou fosfatase. Vzorky, které byly použity pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu a následně pro přenos na membránu obsahovaly 30 µg mikrosomálních proteinů na jamku.

Vzhledem k nízkému zastoupení cytochromu b₅ v ledvinách a plicích kontrolních a premedikovaných zvířat nebyla exprese tohoto proteinu při daném množství (30 µg proteinů mikrosomální frakce) v těchto orgánech detekována (výsledky nejsou zobrazeny). Pouze v játrech byl obsah cyt b₅ stanoven (*Obrázek 24*). Proto bylo v dalších experimentech použito vyšší množství mikrosomálního proteinu (75 µg proteinů mikrosomální frakce), pro lepší detekci sledovaného proteinu. Z *obrázku 25* je patrné, že za těchto podmínek bylo možné kromě exprese cyt b₅ v játrech klasifikovat a také jeho expresi v ledvinách. V plicích ani za těchto podmínek nebylo možné množství cyt b₅ vyhodnotit, a to jak v kontrolních, tak i mikrosomech z zvířat premedikovaných.



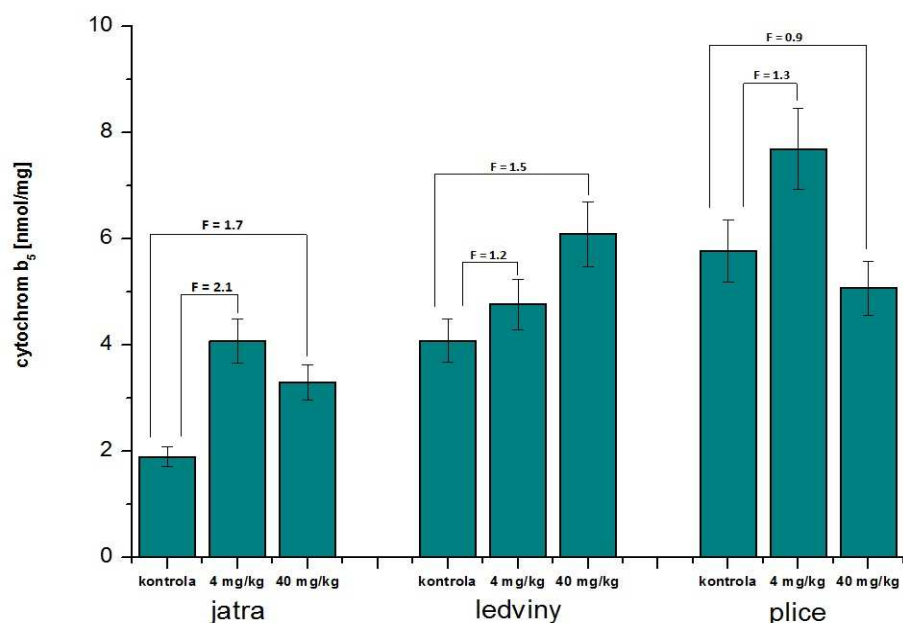
Obrázek 24: Exprese cytochromu b₅ a GAPDH sledovaná imunodetekcí v játrech kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg). Množství mikrosomů použitých na SDS polyakrylamidovou elektroforézu a přenos na membránu byl 30 µg.



Obrázek 25: Expres cytochromu b_5 sledovaná imunodetekcí v játrech a ledvinách kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg). Množství mikrosomů použitých na SDS polyakrylamidovou elektroforézu a přenos na membránu byl 75 µg.

Podobně jako v případě CYP1A1, 1A2 a 3A byla v jaterních mikrosomech zvířat premedikovaných ellipticinem zaznamenána vyšší hladina cytochromu b_5 než v mikrosomech zvířat kontrolních.

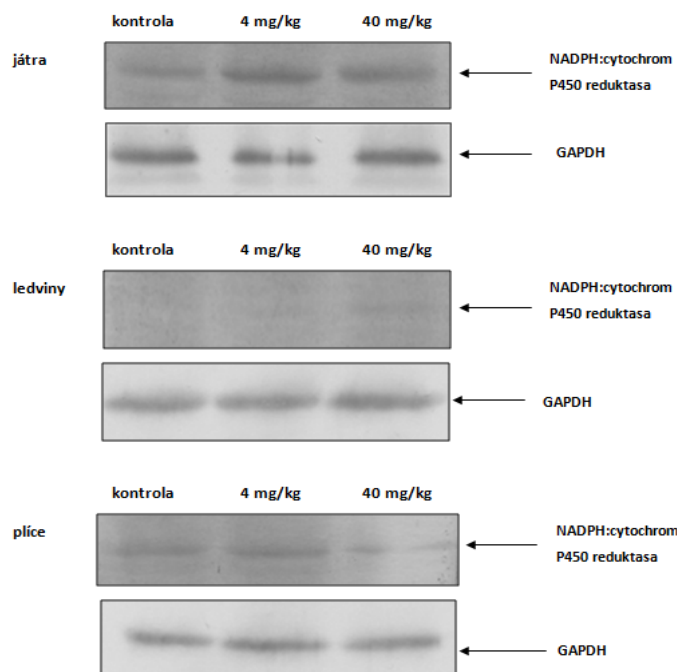
Pro další sledování vlivu premedikace potkanů ellipticinem na obsah cytochromu b_5 v mikrosomech byla použita spektrofotometrie využívající skutečnosti, že cytochrom b_5 vykazuje díky hemu v jeho molekule absorpční maximum při 413 nm. Na *obrázku 26* jsou znázorněny hodnoty zjištěného specifického množství cyt b_5 v podobě sloupcového diagramu. Z obrázku je patrné, že v játrech premedikovaných zvířat 4 mg/kg ellipticinu je nárůst koncentrace cyt b_5 oproti kontrole víc než dvojnásobný, což koreluje i z výsledky získané metodou Western blot. V játrech zvířat premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu byl pozorován mírný pokles v koncentraci cyt b_5 , ale stále byl vyšší než u zvířat kontrolních. V ledvinách byl zjištěn nejvyšší obsah cyt b_5 v mikrosomálních preparátech zvířat premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu. V plicích byl zjištěn nejvyšší obsah cyt b_5 v mikrosomech zvířat premedikovaných 4 mg/kg ellipticinem. V mikrosomech premedikovaných 40 mg/kg je obsah cyt b_5 ještě nižší než v kontrolních vzorcích.



Obrázek 26: Specifický obsah cytochromu b₅ v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů (K) a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg). Směrodatná odchylka činí 10 %. F = násobek změny.

4.3.2 Vliv ellipticinu na expresi proteinu NADPH:cytochrom P450 reductasy

Míra ovlivnění exprese ellipticinem byla sledovaná také v případě redukčního partnera CYP, NADPH:cytochrom P450 reductasy (CPR). Pro tyto studie byla opět využita metoda Western blot, v tomto případě s imunodetekcí specifickou primární protilátkou proti tomuto proteinu. Podle výsledů nalezených na imunoblotech (*Obrázek 27*) se zdá, že v jaterních mikrosomech zvířat premedikovaných 4 mg/kg ellipticinu dochází ke zvýšené expresi CPR a rovněž v ledvinách zvířat premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu. V plicích se hladina CPR po podání ellipticinu potkanům nemění.



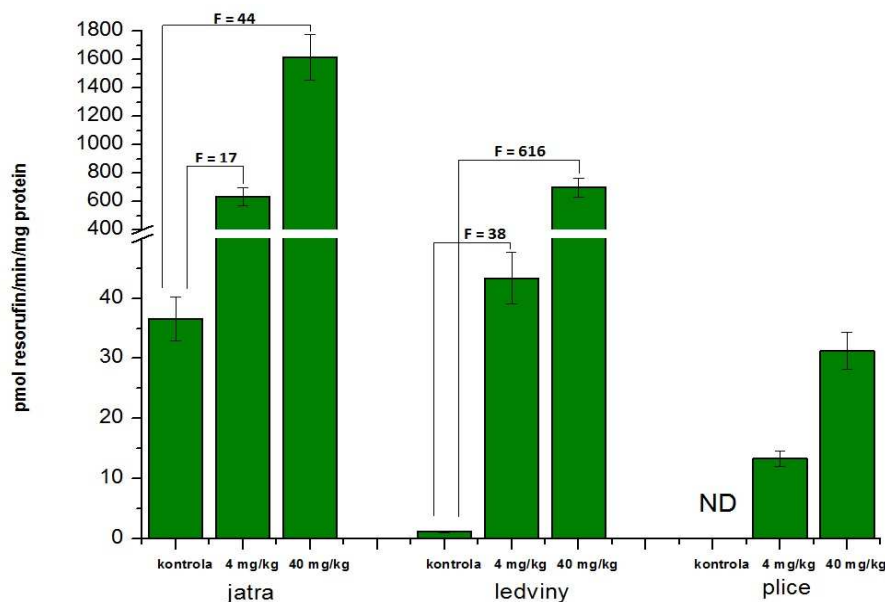
Obrázek 27: Expresa NADPH:cytochrom P450 reduktasy stanovená imunodetekcí v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg).

4.4 VLIV ELLIPTICINU NA ENZYMOVOU AKTIVITU CYTOCHROMŮ P450

V další části diplomové práce jsme sledovali vliv premedikace potkanů na aktivity jednotlivých cytochromů P450. Bylo sledováno, zda se nárůst resp. pokles obsahu CYP1A1 a 3A v jednotlivých tkáních projevuje i na úrovni enzymové aktivity příslušných enzymů. Ke sledování aktivit CYP byly využité reakce s tzv. „markerovými“ substráty. 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylasova aktivita (EROD) pro CYP1A a 6 β -hydroxylace testosteronu jako „markerová“ reakce pro CYP3A. EROD a 6 β -hydroxylace byly použity ke zjištění, zda změna obsahu CYP stanovená imunodetekcí koreluje s aktivitou CYP.

4.4.1 Vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu cytochromů P450 podrodiny 1A

Cytochromy P450 1A participují na přeměně 7-ethoxyresorufinu na resorufin. Tato reakce je pro CYP1A typická, a proto se využívá jako tzv. „markerová“ aktivita. Deethylací substrátu, kterou katalyzuje CYP1A, vzniká fluorescenční produkt, resorufin. Enzymová aktivita CYP1A v jednotlivých preparátech byla stanovená fluorimetricky (*kapitola 3.3.7*).

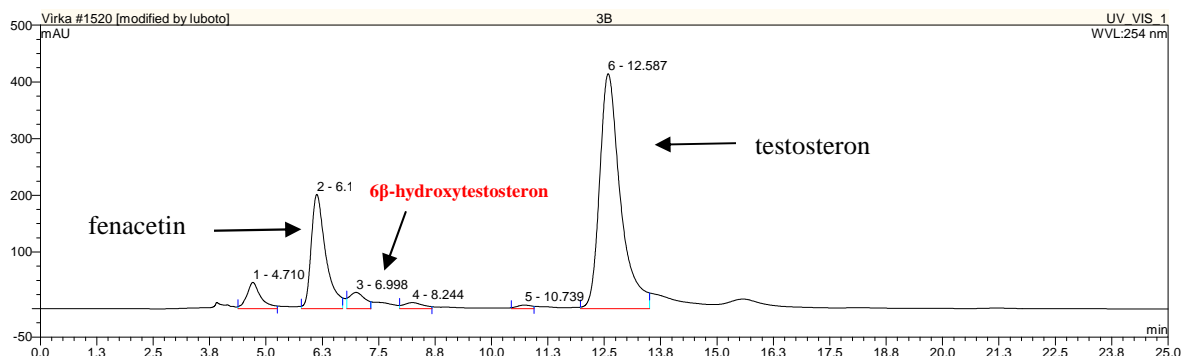


Obrázek 28: Aktivita CYP1A stanovená jako EROD v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg). Standardní odchylka 10 %. ND – nedetekováno. F = násobek změny.

Z výsledků uvedených na *obrázku 28* je patrné, že nejvyšší enzymovou aktivitu (EROD) vykazují mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných nejvyšší dávkou ellipticinu (40 mg/kg). Ve všech sledovaných orgánech (játra, ledviny plíce) zvířat po aktivaci ellipticinem je aktivita CYP1A několikrát vyšší než ve vzorcích zvířat kontrolních. Aktivita CYP1A ve všech vzorcích koreluje s obsahem proteinů CYP1A stanoveným imunodetekcí. Z těchto výsledků, ale i z výsledků experimentů sledujících expresi proteinů CYP1A1 a 1A2, je tedy patrné, že CYP podrodiny 1A, které se podílí na oxidaci ellipticinu na polárnější deriváty ve všech studovaných orgánech jsou indukovány ellipticinem [78,88].

4.4.2 Vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu cytochromu P450 podrodiny 3A

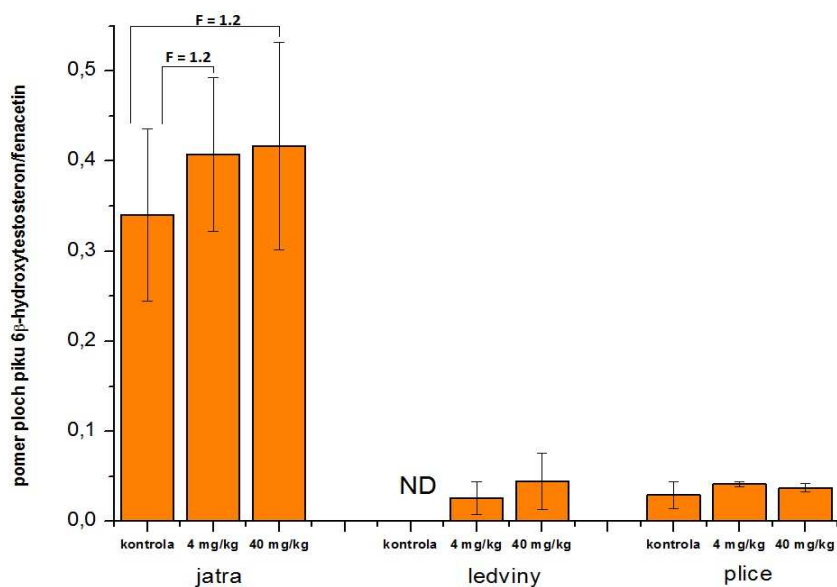
„Markerovou“ reakcí katalyzovanou cytochromy P450 3A je 6- β -hydroxylace testosteronu. Metabolit 6- β -hydroxytestosteron byl sledován pomocí HPLC a detekován při vlnové délce 254 nm. Kromě „markerového“ metabolitu byly metodou HPLC separovány další neznámé metabolity testosteronu s označením 1, 4, 5 (*Obrázek 29*). Pro vyhodnocení aktivity CYP3A byla plocha píku 6- β -hydroxytestosteronu vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu (*Obrázek 30*).



Obrázek 29: HPLC 6 β -hydroxytestosteronu tvořeného z testosteronu v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných 40 mg/kg elliptycinu. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 75% (v/v) methanol., 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce, průtok 0,5 ml/min, kolona Macherey-Nagel, teplota 35°C, aplikováno 20 μ l vzorku, detekce při 254 nm (*kapitola 3.3.8*).

Srovnáním aktivity CYP3A v jednotlivých orgánech experimentálních zvířat bylo zjištěno, že mikrosomální preparáty jater byly jednoznačně nejúčinnější v přeměně testosteronu na 6 β -hydroxytestosteron. To se dalo předpokládat, protože celkové množství cytochromů P450 je v jaterní tkáni nejvyšší. Z jaterních mikrosomů pak byly nejúčinnější mikrosomy zvířat premedikovaných 40 mg/kg elliptycinu. Vyšší aktivita CYP3A byla také zjištěna v ledvinách zvířat premedikovaných 40 mg/kg elliptycinu. V mikrosomálních vzorcích ledvin kontrolních zvířat pak nebyla pozorována žádná aktivita CYP3A. V mikrosomech plic byla nejvyšší aktivita CYP3A nalezena u zvířat premedikovaných 4 mg/kg elliptycinu.

Vztah mezi obsahem CYP3A (Western blot – *Obrázek 23*) a aktivitou těchto enzymů není tak jednoznačný, jako tomu bylo v případě CYP podrodiny 1A. Nárůst obsahu CYP3A v játrech zvířat premedikovaných elliptycinem odpovídá nárůstu aktivity tohoto cytochromu P450. Podobně i v plicích byl nejvyšší obsah CYP3A nalezen v mikrosomech zvířat premedikovaných 4 mg elliptycinu na kilogram, což koreluje s nejvyšší zaznamenanou aktivitou tohoto enzymu. Nicméně v mikrosomech ledvin nepremedikovaných zvířat je rozdíl mezi obsahem CYP3A a aktivitou těchto enzymů znatelný.



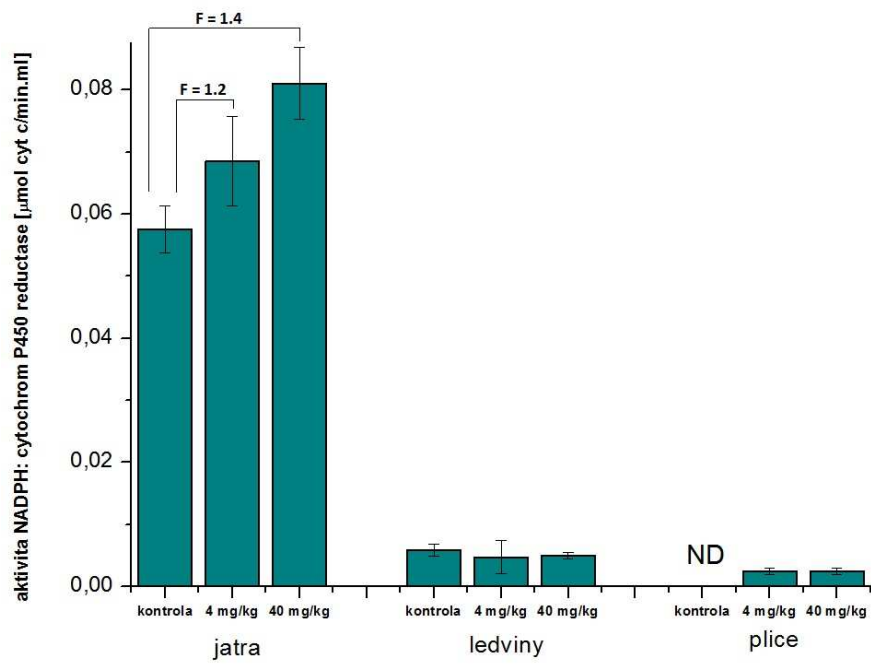
Obrázek 30: Aktivita CYP3A stanovená 6β-hydroxylací testosteronu v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg). ND – nedetekováno. F = násobek změny.

4.5 VLIV ELLIPTICINU NA ENZYMOVOU AKTIVITU DALŠÍCH ENZYMŮ SYSTÉMU OXIDAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je esenciální součástí systému MFO, a proto na její aktivitě závisí také funkčnost celého tohoto systému. NADPH:cytochrom P450 reduktasa v MFO systému vystupuje jako přenašeč elektronu podobně jako při redukci cytochromu c.

4.5.1 Vliv ellipticinu na enzymovou aktivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy bylo prováděno měřením rychlosti redukce cytochromu c, který je dalším substrátem tohoto enzymu [35,101], při vlnové délce 550 nm za současné oxidace NADPH (*kapitola 3.3.6*). V ledvinách se premedikací zvířat ellipticinem mění aktivita CPR jen nepatrně. V plicích nebyla za daných podmínek v mikrosomech kontrolních potkanů zjištěna žádná aktivita CPR. Ve vzorcích premedikovaných zvířat byla aktivita tohoto enzymu již detekována a byla pro obě dávky ellipticinu stejná. V mikrosomech jater byl zjištěn nárůst aktivity s rostoucím množstvím ellipticinu podaného experimentálním zvířatům (*Obrázek 31*).



Obrázek 31: Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy stanovená v játrech, ledvinách a plicích kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných ellipticinem (4 a 40 mg/kg). ND – nedetekováno. F = násobek změny.

4.6 PŘÍPRAVA CYTOCHROMU P450 2S1

4.6.1 Příprava cytochromu P450 2S1 pomocí vektoru 2S1/pCMV

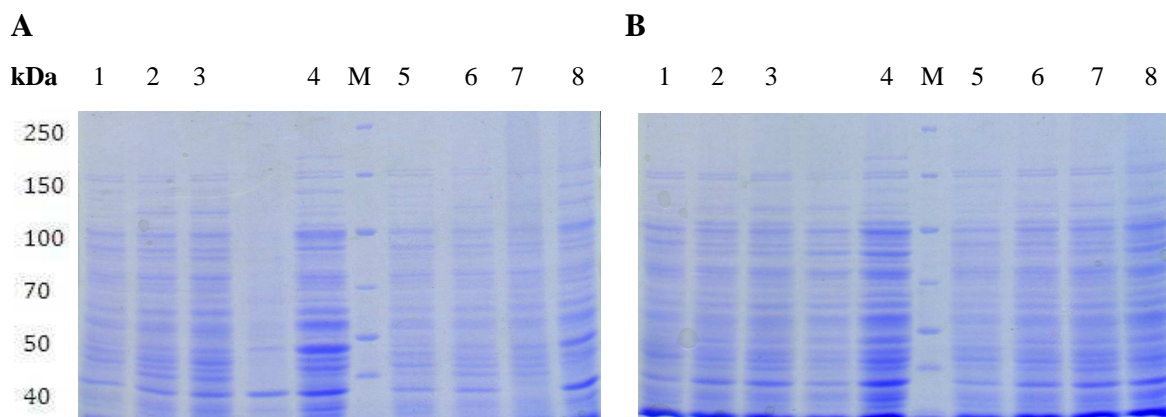
4.6.1.1 Optimalizace produkce cytochromu P450 2S1

Pro produkci cytochromu P450 2S1 byl použit konstrukt nesoucí gen pro lidský CYP2S1 v plasmidu odvozeném od pCMV, který byl pořízen z komerčního zdroje. Tento plasmid byl „namnožen“ a poté izolován metodou využívající směs fenol/chloroform-isoamylalkohol (*kapitola 3.3.17*). Uvedeným postupem bylo získáno 20 μ l plasmidové DNA o čistotě $A_{260}/A_{280} = 2,1$ a koncentraci 1,3 μ g/ μ l.

Isolovaná plasmidová DNA s vloženým genem pro CYP2S1 byla transformována do expresních kmenů *E. coli* typu C41_{pLYS} a C43. Tyto kmeny jsou určeny k expresi genů pomocí T7 RNA polymerasy a jsou běžně využívány v naší laboratoři pro přípravu jiných cytochromů P450. Pro expresi byly zvoleny 2 typy kultivačních médií, LB a TB médium, a dvě různé teploty, 30 a 37 °C. Pro indukci exprese požadovaného genu bylo do kultivační směsi přidáno IPTG a kyselina δ -aminolevulová (*kapitola 3.3.20*). Produkce byla porovnána pomocí polyakrylamidové elektroforézy v prostředí SDS. Vzorčky byly ředěny na přibližně stejný počet buněk ($OD_{600} = 0,7$).

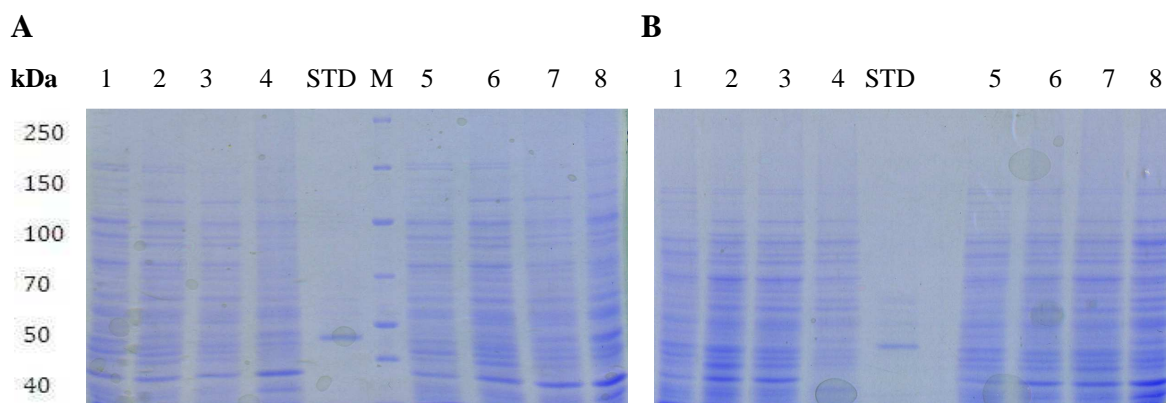
CYP2S1 má molekulovou hmotnost 55,8 kDa. V této oblasti molekulových hmotností byl v případě použití LB média a při 30 °C pozorován nárůst exprese proteinu u obou typů buněk (po 21 hodinách) (*Obrázek 32*). Zda se jedná o nárůst produkce CYP2S1, však můžeme pouze spekulovat. K potvrzení, že se jedná o CYP2S1 by byl nutný standard tohoto proteinu.

Na *obrázku 33* je zaznamenána exprese proteinů v buněčné kultivaci při 37 °C. V tomto případě nebyl pozorován téměř žádný nárůst obsahu proteinů v oblasti molekulových hmotností kolem 50 kDa. Pro lepší orientaci byl pro polyakrylamidovou SDS elektroforézu produkovaných proteinů jako standard použit CYP2B4, protože má přibližně stejnou molekulovou hmotnost jako CYP2S1 (55,7 kDa).



Obrázek 32: Expese genu *CYP2S1* v buňkách *E. coli* C41_{pLYS} a C43. Podmínky expese: 30 °C, 1 mM IPTG, expese probíhala 21 hodin. **A)** Produkce CYP2S1 v LB médiu. **B)** Produkce CYP2S1 v TB.

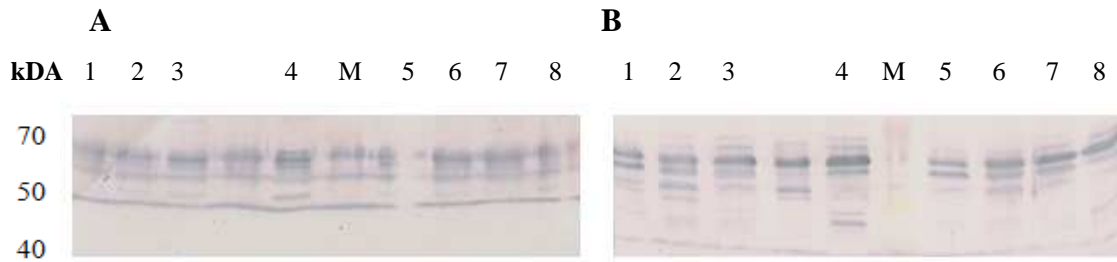
M – marker molekulových hmotností, 1 – vzorek před indukcí *E. coli* C41_{pLYS}, 2 – produkce po 1 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 3 – produkce po 3 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 4 – produkce po 21 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 5 – vzorek před indukcí *E. coli* C43, 6 – produkce po 1 hod *E. coli* C43, 7 – produkce po 3 hod *E. coli* C43, 8 – produkce po 21 hod *E. coli* C43.



Obrázek 33: Expese genu *CYP2S1* v buňkách *E. coli* C41_{pLYS} a C43. Podmínky expese: 37 °C, 1 mM IPTG, expese probíhala 21 hodin. **A)** Produkce CYP2S1 v LB médiu. **B)** Produkce CYP2S1 v TB médiu.

M – marker molekulových hmotností, STD – standard CYP2B4, 1 – vzorek před indukcí *E. coli* C41_{pLYS}, 2 – produkce po 1 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 3 – produkce po 3 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 4 – produkce po 21 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 5 – vzorek před indukcí *E. coli* C43, 6 – produkce po 1 hod *E. coli* C43, 7 – produkce po 3 hod *E. coli* C43, 8 – produkce po 21 hod *E. coli* C43.

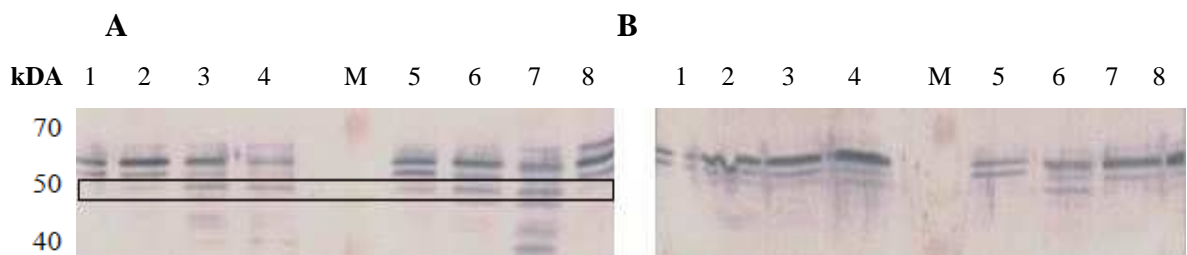
Protože elektroforetické srovnání produkce proteinu CYP2S1 nebylo dostatečně specifické, byla využita metoda Western blot, která využívá specifickou primární protilátku proti CYP2S1 (Sigma Aldrich). Z obrázku 34 a 35 je patrné, že použitá komerční protilátka není dostatečně specifická. Primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 reaguje kromě CYP2S1 i s dalšími proteiny produkovanými bakteriálním kmenem *E. coli*.



Obrázek 34: Expresse genu CYP2S1 v buňkách *E. coli* C41_{pLYS} a C43. Podmínky exprese: 30 °C, 1 mM IPTG, exprese probíhala 21 hodin. **A)** Produkce CYP2S1 v LB médiu. **B)** Produkce CYP2S1 v TB médiu.

M – marker molekulových hmotností, 1 – vzorek před indukcí *E. coli* C41_{pLYS}, 2 – produkce po 1 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 3 – produkce po 3 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 4 – produkce po 21 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 5 – vzorek před indukcí *E. coli* C43, 6 – produkce po 1 hod *E. coli* C43, 7 – produkce po 3 hod *E. coli* C43, 8 – produkce po 21 hod *E. coli* C43.

Aby bylo možné pokračovat v dalších experimentech produkce CYP2S1, bylo nutné z uvedených podmínek vybrat ty, při kterých byla produkce proteinů, o velikosti okolo 50-70 kDa, nejlepší. Na základě výsledků získaných metodou Western blot, byly jako nejvhodnější podmínky pro další produkci zvoleny - **LB médium, teplota 37 °C a oba kmeny *E. coli* C41_{pLYS} a C43** (Obrázek 35-A). Na obrázku 35-A je v rámečku zobrazen nárůst proteinu v oblasti molekulových hmotností 50 kDa u obou typů kmenu *E. coli*. Je patrné, že před indukcí pomocí IPTG se u kmenu *E. coli* C41_{pLYS} neexprimuje žádný protein o uvedené molekulové hmotnosti a po indukci je znatelný nárůst proteinu s touto molekulovou hmotností. Podobně u kmenu *E. coli* C43 je nárůst množství proteinu znatelný až po indukci IPTG.



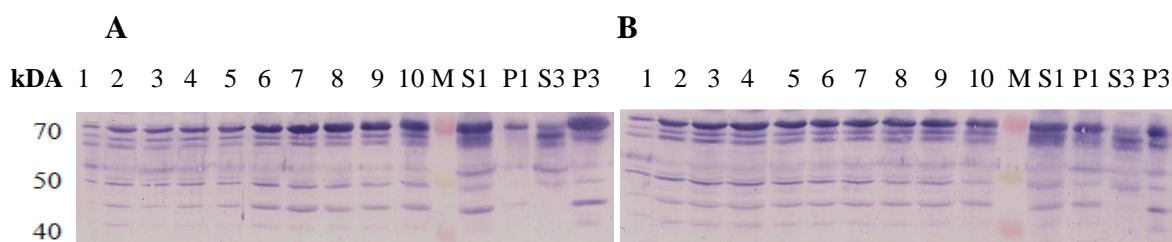
Obrázek 35: Expresse genu CYP2S1 v buňkách *E. coli* C41_{pLYS} a C43. Podmínky exprese: 37 °C, 1 mM IPTG, exprese probíhala 21 hodin. **A)** Produkce CYP2S1 v LB médiu. **B)** Produkce CYP2S1 v TB médiu.

M – marker molekulových hmotností, 1 – vzorek před indukcí *E. coli* C41_{pLYS}, 2 – produkce po 1 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 3 – produkce po 3 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 4 – produkce po 21 hod *E. coli* C41_{pLYS}, 5 – vzorek před indukcí *E. coli* C43, 6 – produkce po 1 hod *E. coli* C43, 7 – produkce po 3 hod *E. coli* C43, 8 – produkce po 21 hod *E. coli* C43.

Podobně jako elektroforetické srovnání, tak ani srovnání pomoci metody Western blot nepřineslo jednoznačné určení, jestli jsou bakteriální kmeny *E. coli* (C41_{p_{LYS} a C43) schopné produkovat protein CYP2S1. Proto bylo nutné přistoupit k dalšímu kroku, provést expresi proteinu ve větším měřítku a získat membránovou frakci, jejíž součástí jsou i cytochromy P450 s alespoň částečně odstraněnými ostatními bakteriálními proteiny.}

4.6.1.2 Isolace membránové frakce z buněk *E. coli* kmene C41_{p_{LYS} a C43}

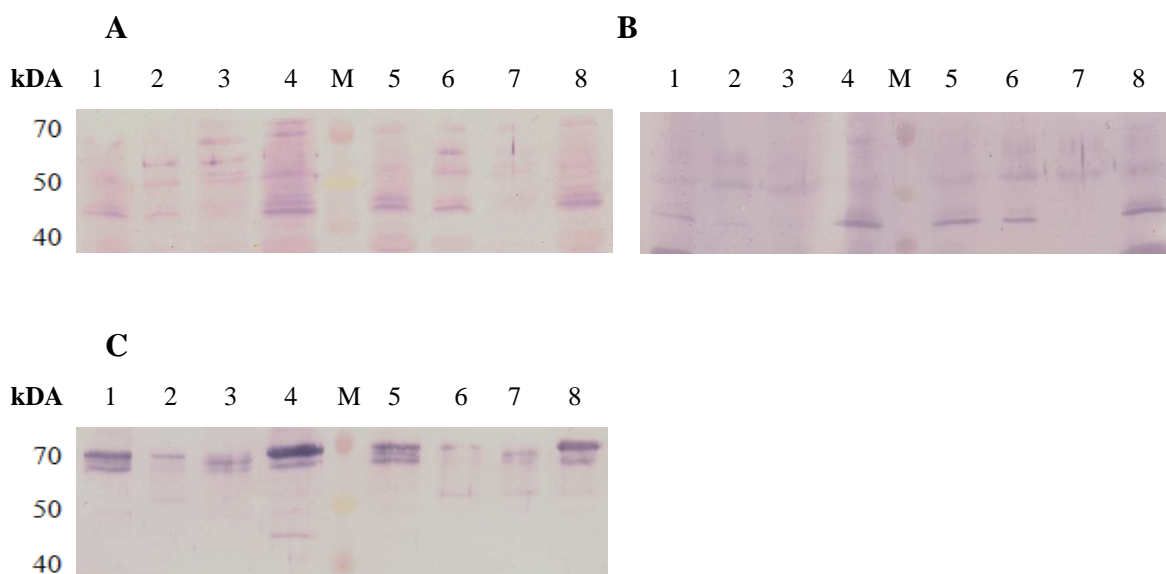
Při expresi CYP2S1 v 500 ml LB média, která probíhala 24 hodin, byly použity podmínky růstu při 37 °C a indukce 1 mM IPTG. Buňky *E. coli* byly po nárůstu sonikovány a byla z nich připravena membránová frakce. Pro detekci CYP2S1 v jednotlivých izolovaných frakcích (S1,P1,S3 a P3, zkratky jsou vysvětleny pod obrázkem 36) byla opět použita metoda Western blot za využití specifické protilátky proti CYP2S1. Jak je vidět z obrázku 36 v membránové frakci P2 nebyl pozorován žádný nárůst obsahu proteinu v oblasti molekulových hmotností kolem 50-70 kDa. Kromě toho protilátka opět označila více „proužků“ proteinů, což poukazuje na její nespecifitu.



Obrázek 36: Expresí CYP2S1 v 500 ml LB média a membránová frakce. **A)** Produkce CYP2S1 v buňkách *E. coli* C41_{p_{LYS}. **B)** Produkce CYP2S1 v buňkách *E. coli* C43. Vzorky 1-10 jsou ředěny na stejnou OD = 1, vzorky S1, P1 jsou ředěny 10x a S2, P2 jsou ředěny na koncentraci 1 µg/µl.}

M – marker molekulových hmotností, 1 – vzorek před indukcí, 2 – produkce po 1 hod, 3 - produkce po 2 hod, 4 - produkce po 3 hod, 5 - produkce po 4 hod, 6 - produkce po 5 hod, 7 - produkce po 6 hod, 8 - produkce po 9 hod, 9 - produkce po 12 hod, 10 - produkce po 24 hod, S1 - buňky rozrušené sonikací, P3 - zbytky buněk, S3 - cytosolární frakce, **P2 - membránová frakce**

Vzhledem k tomu, že použitá primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 (Sigma Aldrich) nebyla dostatečně specifická, byly pro detekci CYP2S1 použity ještě další tři komerční primární polyklonální protilátky (Santa Cruz M-135, Santa Cruz S-12, AbCam). Z obrázku 37 je patrné, že ani tyto komerční protilátky nebyly dostatečně specifické pro detekci CYP2S1.



Obrázek 37: Detekce proteinů izolované membránové frakce *E. coli* C41_{pLYS} a C43 metodou Western blot. **A)** Primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 - **Santa Cruz M-135**. **B)** Primární kozí polyklonální protilátka proti CYP2S1 - **Santa Cruz S-12**. **C)** Primární králičí polyklonální protilátka proti CYP2S1 - **AbCam**.

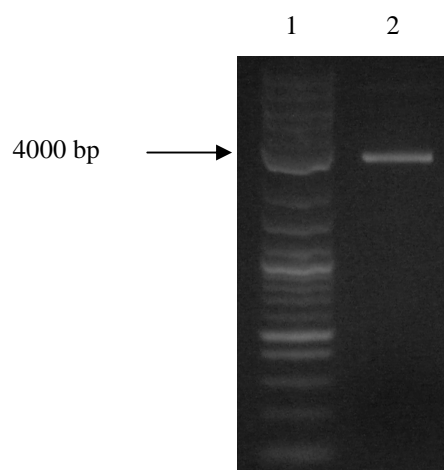
M – marker molekulových hmotností, 1 – buňky rozrušené sonikací *E. coli* C41_{pLYS}, 2 - zbytky buněk *E. coli* C41_{pLYS}, 3 - cytosolární frakce *E. coli* C41_{pLYS}, 4 - membránová frakce *E. coli* C41_{pLYS}, 5 – buňky rozrušené sonikací *E. coli* C43, 6 - zbytky buněk *E. coli* C43, 7 - cytosolární frakce *E. coli* C43, 8 - membránová frakce *E. coli* C43

Cytochromy P450 vytváří po navázání molekuly CO v redukovaném stavu komplex, který vykazuje absorpční maximum při 450 nm [62,63]. Množství CYP je tedy možné určit touto spektrální metodou. Vzorek membránové frakce izolované z obou kmenů *E. coli* (C41_{pLYS}, C43) byl proto analyzován i touto metodou. Ve spektru vzorků membránových frakcí nebyl, kromě píku při 420 nm zachycen žádný jiný pík (data nejsou uvedena).

Při přípravě membránové frakce bylo možné pozorovat, že supernatant (S3) resp. cytosolární frakce, měla červenou barvu. Tato skutečnost by mohla signalizovat přítomnost CYP. Proto byla kromě membránové frakce podrobena stanovení obsahu cytochromu P450 i uvedená cytosolární frakce. Ve spektru cytosolární frakce nebyl pozorován pík s maximem při 420 ani při 450 nm. Zaznamenán byl pouze pík proteinů absorbujících při 398 nm (data nejsou uvedena).

4.6.2 Příprava cytochromu P450 2S1 pomocí vektoru 2S1/pBAD-A

Vektor pBAD-A (Invitrogen) pořízený z komerčního zdroje, který obsahuje L-arabinosový promotor (*kapitola 1.6.2*) byl transformován do klonovacího kmene *E. coli* DH5 α a izolován ve větším množství. Isolována plasmidová DNA z tohoto kmene vykazovala poměr absorbancí A_{260}/A_{280} 1,8 a měla koncentraci 46 $\mu\text{g/ml}$ (*Obrázek 38*).

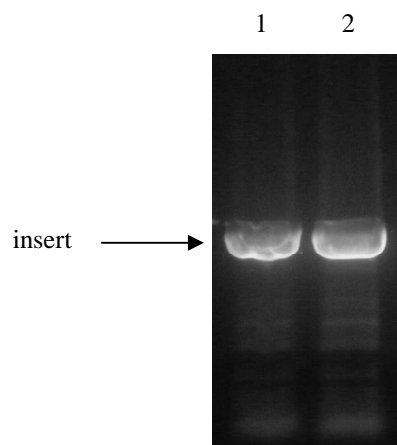


Obrázek 38: Agarosová elektroforéza plasmidu pBAD-A. 1 - „2-log DNA ladder“, 2 - plasmid pBAD-A.

4.6.2.1 Amplifikace insertu obsahující lidský gen *CYP2S1*

Před vložením genu *CYP2S1* do klonovacího vektoru pBAD-A, bylo potřeba zavést před a za gen vhodná restrikční místa. Proto byl gen *CYP2S1* amplifikován s použitím navržených primerů (*kapitola 3.3.24*). Na 5'-OH konec byla přidána štěpicí místa pro restrikční endonukleasy XhoI (CTCGAG) a NdeI (CATATG) - "forward" primer. "Reverse" primer obsahoval komplementární sekvence ke štěpicímu místu endonukleasy BamHI (CCTAGG) a HindIII (TTCGAA).

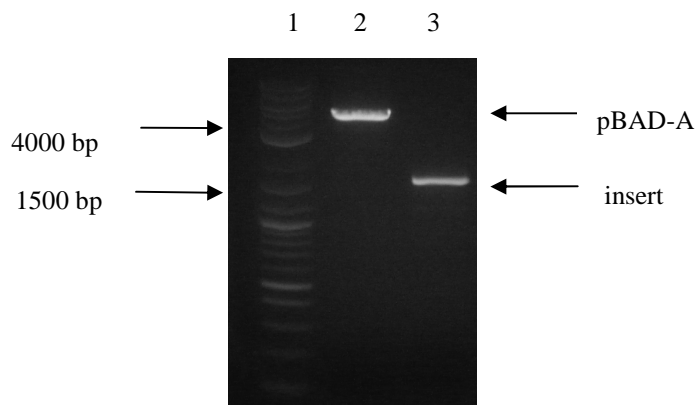
Takto byl připraven insert se štěpicími místy, který mohl být dále vložen do klonovacího plasmidu pBAD-A. Výsledný produkt byl přečištěn agarosovou elektroforézou a izolován pomocí kitu „Jetquick-Gel Extraction Spin Kit (*kapitola 3.3.18*) (*Obrázek 39*).



Obrázek 39: Agarosová elektroforéza PCR produktu, který obsahuje gen pro *CYP2S1*. 1,2 - produkt PCR (insert).

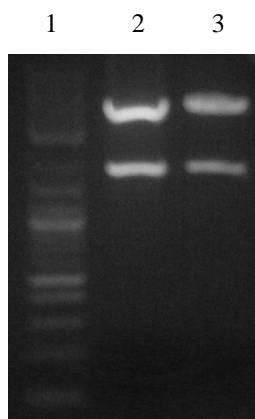
4.6.2.2 Vložení insertu *CYP2S1* do plasmidu pBAD-A

Po amplifikaci PCR produktu, který obsahoval gen pro *CYP2S1* byl insert spolu s plasmidem pBAD-A podroben štěpení restrikními endonukleasami XhoI a HindIII (Obrázek 40).



Obrázek 40: Produkty štěpení plasmidu pBAD-A a insertu restrikními endonukleasami XhoI a HindIII sledované agarosovou elektroforézou. 1 – „2-log DNA ladder“, 2 - insert štěpený endonukleasami XhoI a HindIII, 3 - plasmid pBAD-A štěpený endonukleasami XhoI a HindIII

Po izolaci obou fragmentů DNA z agarosového gelu byla provedena ligace insertu do plasmidu pBAD-A. Poté byl tento plasmid transformován do klonovacího kmene *E. coli* DH5 α a z nich byl izolován extrakcí směsi fenol/chloroform-isoamylalkohol **konstrukt pBAD-A/CYP2S1** (kapitola 3.3.17). Isolací bylo získáno 25 μ l plasmidové DNA o čistotě 1,9 (A_{260}/A_{280}) a koncentraci 0,045 μ g/ μ l. Isolovaný konstrukt byl pro ověření správné ligace štěpen endonukleasami XhoI a HindIII (Obrázek 41).

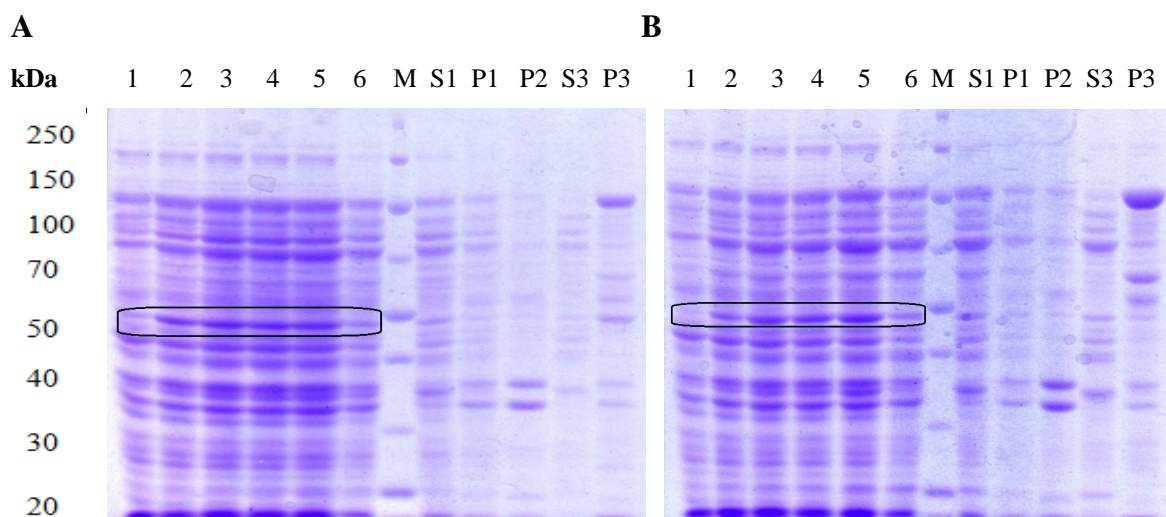


Obrázek 41: Ověření ligace konstruktů pBAD-A/CYP2S1 pomocí agarosové elektroforézy. 1 – „2-log DNA ladder“, 2,3 - pBAD-A/CYP2S1 štěpený endonukleasami XhoI a HindIII

4.6.2.3 Expresse cytochromu P450 2S1 pomocí vektoru pBAD-A

Isolovaná plasmidová DNA s vloženým genem pro CYP2S1 (konstrukt pBAD-A/CYP2S1) byla transformována do expresních kmenů *E. coli* TOP10 a LMG194. Tyto kmeny jsou schopné transportovat L-arabinosu, která slouží jako efektorová molekula pro regulační protein araC (*kapitola 1.6.2*), ale sami ji nepřeměňují. Kromě toho je kmen LMG194 schopný produkovat toxické proteiny a růst v RM médiu (minimální medium).

Podmínky pro expresi byly stejné jako jsou popsány v publikaci [49] a jsou uvedeny v *kapitole 3.3.20*. Produkce proteinů byla porovnána pomocí polyakrylamidové elektroforézy v prostředí SDS. Vzorky byly ředěny na přibližně stejný počet buněk ($OD_{600} = 0,5$).



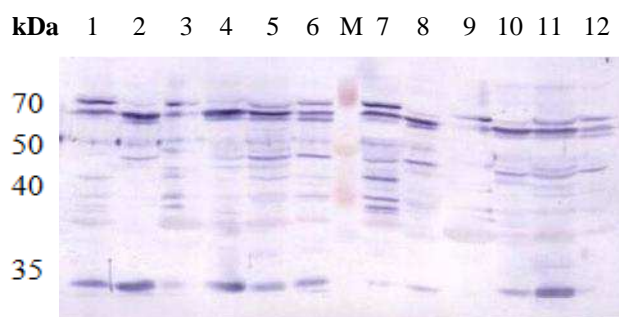
Obrázek 42: Expresse genu CYP2S1 v buňkách *E. coli*. Expresse probíhala 24 hodin. **A)** Produkce CYP2S1 v buňkách *E. coli* LMG194. **B)** Produkce CYP2S1 v buňkách *E. coli* TOP10. Vzorky 1-10 jsou ředěny na stejnou $OD = 0,5$, vzorky S1-P3 jsou ředěny na koncentraci $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

M – marker molekulových hmotností, 1 – vzorek před indukcí, 2 – produkce po 1 hod, 3 - produkce po 2 hod, 4 - produkce po 3 hod, 5 - produkce po 6 hod, 6 - produkce po 24 hod, S1 - buňky rozrušené sonikací, P1 - zbytky buněk, P2 - inkluzní tělíška, S3 - cytosolární frakce, **P3 - membránová frakce**

Podobně jako tomu bylo při expresi CYP2S1 v buňkách *E. coli* C41_{p_{LYS} a C43 (Obrázek 29), i v tomto případě nebyl v rozmezí molekulových hmotností 50-70 kDa detekován žádný nárůst proteinů s touto molekulovou hmotností. Pouze těsně pod velikostí 50 kDa je patrný nárůst obsahu proteinu po přidání L-arabiny do kultivačního média (Obrázek 42).}

4.6.2.4 Isolace membránové frakce z buněk *E. coli* kmene LMG194 a TOP10

Po ukončení exprese proteinů v buňkách *E. coli* kmene LMG194 a TOP10 byla „narostlá“ buněčná kultura sonikována a centrifugací byla získána frakce s „nabohaceným“ obsahem inkluzních tělíšek (P2) a následně membránová frakce (P3). Pro detekci CYP2S1 v jednotlivých isolačních frakcích byla opět použita metoda Western blot pomocí specifické protilátky proti tomuto enzymu. Ve vzorcích S3 a P3 byla stanovena koncentrace proteinů (Tabulka 3).



Obrázek 43: Detekce proteinů membránové frakce, izolované z buněk *E. coli* kmene LMG194 a TOP10, metodou Western blot s primární králičí polyklonální protilátkou proti CYP2S1 (Sigma Aldrich).

M – marker molekulových hmotností, 1 – vzorek před indukcí *E. coli* TOP10, 2 – produkce po 6 hod *E. coli* TOP10, 3 - buňky rozrušené sonikací *E. coli* TOP10, 4 - inkluzní tělíška *E. coli* TOP10, 5 - cytosolární frakce *E. coli* TOP10, 6 - membránová frakce *E. coli* TOP10, 7 – vzorek před indukcí *E. coli* LMG194, 8 – produkce po 6 hod *E. coli* LMG194, 9 - buňky rozrušené sonikací *E. coli* LMG194, 10 - inkluzní tělíška *E. coli* LMG194, 11 - cytosolární frakce *E. coli* LMG194, 12 - membránová frakce *E. coli* LMG194

Na základě obdržných výsledků (Obrázek 42, 43) je náročné určit, jestli buňky *E. coli* (TOP10, LMG194) produkují protein CYP2S1. Ani pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy, ani metody Western blot s použitím specifické protilátky proti CYP2S1,

nebylo možné detekovat dostatečný nárůst obsahu proteinu CYP2S1, a to ani v inkluzních těliscích ani v membráně *E. coli*.

Tabulka 3: Koncentrace proteinů cytosolární a membránové frakci izolované z buněk *E. coli* kmenů LMG194 a TOP10.

kmen	cytosolární frakce [mg/ml]	membránová frakce [mg/ml]
<i>E. coli</i> LMG194	1.0	2.6
<i>E. coli</i> TOP10	2.0	3.7

Ve vzorcích membránové frakce obou kmenů *E. coli* (LMG194, TOP10) byl spektrálně sledován obsah cytochromu P450. Ve spektru těchto vzorků však nebylo zjištěno žádné absorpční maximum (data nejsou uvedena). Podobně ani ve spektru cytosolární frakce izolované z obou kmenů *E. coli* nebylo nalezeno žádné absorpční maximum (data nejsou uvedena).

5 Diskuse

Ellipticin je léčivo, které je po vstupu do organismu metabolizováno na detoxikační a aktivační metabolity. Aktivační metabolity tvoří kovalentní adukty s DNA a tím brání další replikaci. Stejně metabolity ellipticinu jsou tvořeny mikrosomy jater člověka a modelových organismů (potkan, králík, myš) [77]. Na biotransformaci ellipticinu se podílí zejména cytochromy P450 [78]. V této diplomové práci byl vybrán jako modelový organismus studia působení ellipticinu laboratorní potkan kmene Wistar. V organismu potkana dochází k aktivaci ellipticinu enzymy CYP3A1 a CYP1A1/2, podobně jako v lidském organismu, kde je ellipticin oxidován především orthologními formami těchto enzymů, CYP3A4 a CYP1A1/2 [80,92]. V předkládané práci byl studován vliv ellipticinu na obsah a aktivitu cytochromů P450 3A1 a 1A1/2 v organismu potkana a dalších složek MFO systému (NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cytochrom b₅).

Pro studium působení ellipticinu na obsah a aktivitu CYP a dalších složek MFO systému *in vivo* bylo nutné touto sloučeninou potkana premedikovat. Potkani byly premedikováni jednorázovou dávkou 4 a 40 mg ellipticinu na kilogram tělesné hmotnosti zvířete. Použita byla intraperitoneální aplikace tohoto léčiva. Pro další studie byla z jater, ledvin a plic izolovaná mikrosomální frakce.

Za použití spektroskopických a elektrochemických metod (absorpční maximum CYP při 450 nm, Western blot s využitím specifických protilátek) byl stanoven obsah CYP, cyt b₅ a NADPH:cytochrom P450 reduktasy ve všech vzorcích kontrolních zvířat a zvířat premedikovaných ellipticinem.

Bylo zjištěno, že ellipticin indukuje expresi CYP1A1 a 1A2 v játrech, ledvinách i plicích použitého experimentálního modelu. Zvýšení exprese proteinů CYP podrodiny 1A, které je závislé na dávce ellipticinu koreluje se zvýšením jejich katalytické aktivity. Jak se dalo předpokládat, nejvyšší zastoupení a katalytická aktivita CYP1A1/2 byla nalezena v játrech potkanů premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu. Získané výsledky plně potvrdili schopnost ellipticinu indukovat CYP1A jak v hepatální tak extrahepatálních tkáních, jak bylo také zjištěno v předchozích studiích [124].

Vedle exprese CYP1A1 a 1A2 byla v játrech premedikací zvířat ellipticinem rovněž indukována exprese proteinu CYP3A. Zvýšená exprese CYP3A v játrech odpovídá katalytické aktivitě tohoto enzymu, která byla měřená tzv. "markerovou" reakcí CYP3A,

hydroxylací testosteronu za vzniku 6- β -hydroxytestosteronu. Nicméně v ledvinách potkanů docházelo účinkem ellipticinu k represi exprese CYP3A, což neodpovídalo jeho katalytické aktivitě. Rozpornost výsledků může být vysvětlena tím, že při stanovení obsahu CYP3A ve vzorcích metodou Western blot za pomoci specifické protilátky se detekuje celkový obsah proteinu, přičemž při aktivitních studiích je detekována pouze aktivní a plně funkční forma CYP3A.

Dalšími složkami systému oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí, které se podílí na biotransformaci ellipticinu, jsou NADPH:cytochrom P450 reduktasa, která v reakcích vystupuje jako donor elektronů pro CYP a cytochrom b₅, jehož funkce není ještě zcela objasněna. Předpokládá se však, že je donorem druhého elektronu v katalytickém cyklu CYP (*kapitola 1.4.2*).

Podobně jako v případě CYP, byl obsah cyt b₅ stanoven metodou Western blot, která prokázala, že ellipticin indukuje expresi cyt b₅ v játrech a ledvinách. V plicích vzhledem k nízkému zastoupení cyt b₅ nebylo možné měřit jeho obsah touto metodou. Cytochrom b₅ jako protein s navázanou hemovou skupinou vykazuje absorpční maximum při 413 nm. Tato skutečnost byla využita při spektroskopickém stanovení změny obsahu cyt b₅ ve vzorcích a obdržená data byla porovnána s výsledky získanými pomocí metody Western blot. V ledvinách se výsledky měření sledující obsah cyt b₅ oběma metodami shodovaly. V játrech byl ve vzorku mikrosomů zvířat premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu zjištěn nižší obsah cyt b₅ než ve vzorku mikrosomů zvířat premedikovaných 4 mg/kg ellipticinu. Tento výsledek neodpovídá výsledkům obdrženým metodou Western blot. Rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny tím, že při spektrofotometrickém stanovení cyt b₅ je vlastně měřen obsah hemové části tohoto proteinu a při nesprávném "sbalení" nebo v případě přítomnosti apo formy cyt b₅, která nemá hem, může být nalezena hodnota odlišná. V plicích bylo použitím této metody zaznamenaná indukce exprese cyt b₅ u vzorku mikrosomů zvířat premedikovaných 4 mg/kg ellipticinu.

Pro správné fungování MFO systému je nevyhnutná funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Ovlivnění jejího množství a katalytické aktivity má vliv na fungování celého MFO systému. Proto bylo nutné prozkoumat, jestli má ellipticin vliv i na tento enzym. Z výsledků je patrné, že kromě jater premedikovaných zvířat nemá ellipticin na obsah ani katalytickou aktivitu zásadní vliv. V ledvinách a plicích se po premedikaci ellipticinem obsah a aktivita této reduktasy mění jen minimálně.

V dalších fázích výzkumu se bude nutné zaměřit, kromě sledování vlivu ellipticinu

na expresi proteinů a jejich katalytickou aktivitu, také na poznání jak ovlivňuje premedikace ellipticinem expresi mRNA těchto proteinů. Výsledky, které byly získány v laboratoři na katedře biochemie, naznačují, že ellipticin rovněž indukuje expresi proteinů CYP1A1 a 1A2 přes zvýšenou expresi mRNA těchto enzymů [124].

Další část diplomové práce byla zaměřena na přípravu zajímavého cytochromu P450 2S1. Cytochrom P450 2S1 patří mezi enzymy, u kterých není ještě zcela objasněná jejich funkce v organismu. Proto je pro objasnění funkce a pro provádění metabolických studií nutné připravit CYP2S1 heterologní expresí. Pro heterologní expresi CYP2S1 byl vybrán bakteriální systém *E. coli*, který je ve srovnání s ostatními expresními systémy neefektivnější. Výhodou tohoto systému jsou rovněž nižší finanční náklady, relativně krátká doba produkce a vyšší množství získaného rekombinantního proteinu. Gen pro cytochrom P450 2S1 byl pořízen od firmy Invitrogen a byl vložen do plasmidu pCMV·SPORT 6. Plasmid byl vložen do klonovacího kmene *E. coli* DH5 α a byl izolován ve větším množství o dostatečné čistotě. Pro expresi byly vybrány 2 bakteriální kmeny *E. coli* C41_{pLYS} a C43. Tyto kmeny jsou odvozeny od kmene *E. coli* BL21(DE3) a jsou určeny k expresi genů pomocí T7 RNA polymerasy. Navíc *E. coli* C41_{pLYS} nese gen pro T7 lysozym, který inhibuje T7 RNA polymerasu a tím potlačuje bazální expresi T7 polymerasy a následně vloženého genu před indukci IPTG.

Pro expresi CYP2S1/pCMV·SPORT 6 ve větším množství bylo vybráno LB médium a produkce při teplotě 37 °C. Pro detekci exprese CYP2S1 (55,8 kDa) byla použita SDS polyakrylamidová elektroforéza. Nicméně na gelu, kde byly obarveny separované proteiny, nebylo možné pozorovat nárůst obsahu proteinu v oblasti molekulových hmotností 50-70 kDa, které odpovídají molekulové hmotnosti CYP2S1. Proto byla použita detekce proteinů pomocí metody Western blot s využitím specifické protilátky proti CYP2S1. Nicméně ani výsledky zéskané s použitím specifické protilátky neobjasnili, který „proužek“ proteinu na membráně odpovídá proteinu CYP2S1, protože primární polyklonální protilátka proti CYP2S1 nebyla dostatečně specifická. Touto protilátkou byly detekované i další proteiny produkované *E. coli*.

Pro objasnění, jestli *E. coli* produkuje požadovaný protein, byla izolována membránová frakce, ve které byl měřen obsah CYP spektrofotometricky. Ve vzorku membránové frakce izolované z obou expresních kmenů však nebylo detekováno absorpční maximum při 450 nm, typické pro komplex redukovaného cytochromu P450 v komplexu s

CO. Nicméně absorpční maximum bylo zaznamenáno při vlnové délce 420 nm. Při této vlnové délce absorbují jiné hemové proteiny *E. coli* [125] nebo denaturovaná forma CYP. Zajímavé je zjištění, že cytosolární frakce produkčního kmene měla červenou barvu, což by mohlo ukazovat na přítomnost hemových proteinů a tedy i CYP. Proto byla kromě membránové frakce podrobena stanovení obsahu cytochromu P450 i frakce cytosolární. Ve spektru byl zaznamenán pouze absorpční pík při 398 nm.

Ze získaných výsledků je velice obtížné rozhodnout jestli CYP2S1 byl produkován použitými bakteriálními systémy. Nabízí se více důvodů pro vysvětlení, proč produkce CYP2S1 nebyla úspěšná. Prvním může být nesprávně zvolená teplota produkce. Teplota 37 °C může být až příliš vysoká pro expresi CYP. Uvádí se, že optimální teplota by se měla pohybovat kolem 28-32 °C [125]. Dalším důvodem může být nesprávně zvolený expresní systém. Expres proteinů v buňkách *E. coli* C41_{pLYS} a C43 je sice běžná, ale pro srovnání produkce CYP2S1 je nutné porovnat více dostupných expresních systémů, které se používají k produkci CYP [BL21-Gold (DE3), BL21-Ripl (DE3)].

Další část diplomové práce se zabývala produkcí CYP2S1 za použití jiného expresního plasmidu. Plasmid pBAD-A obsahuje narozdíl od plasmidu pCMV arabinosový operon a pro expresi genu, který je pod kontrolou tohoto operonu, je nutné přidání L-arabiny do kultivačního média. Pro expresi tohoto typu vektoru byly použity 2 kmeny bakteriálních buněk *E. coli* TOP10 a LMG194. Nejdříve bylo nutné gen pro CYP2S1 amplifikovat a upravit jeho konce vložením restričních míst pro endonukleasy. Primery byly navrženy tak, aby byla na koncích sekvence proteinu přidána restriční místa kompatibilní s expresním vektorem. Pro vložení genu *CYP2S1* do plasmidu pBAD-A byly využity restriční endonukleasy XhoI a HindIII. Po izolaci byl konstrukt CYP2S1/pBAD-A ověřen štěpením použitými restričními endonukleasami a visualisován na gelu. Po ověření byl konstrukt vložen do expresních kmenů *E. coli* TOP10 a LMG194. Podmínky produkce CYP2S1 nebyly zvoleny náhodně, ale byly stejné, jako se uvádějí v publikaci [49]. Podobně jako v případě konstruktů CYP2S1/pCMV·SPORT 6 byla pro detekci exprese použita SDS polyakrylamidová elektroforéza. Nicméně na gelu s obarvenými separovanými proteiny nebylo možné pozorovat nárůst obsahu proteinů s molekulovou hmotností v oblasti 50-70 kDa. Pouze těsně pod oblastí, kde putují proteiny o velikosti 50 kDa byl pozorován nárůst obsahu proteinu po přidání L-arabiny do kultivačního média. I v tomto případě byla použita detekce proteinu pomocí metody Western blot s využitím specifické protilátky proti CYP2S1. Nicméně ani výsledky s použitím specifické

protilátky neobjasnili, který „proužek“ proteinu na membráně odpovídá proteinu CYP2S1, protože primární polyklonální protilátka proti CYP2S1 nebyla dostatečně specifická. Jako tomu bylo v případě konstruktů CYP2S1/pCMV·SPORT 6, byla izolovaná membránová frakce a inkluzní tělíska. Ve všech vzorcích byl pak měřen obsah CYP. Nicméně, žádné absorpční maximum nebylo zaznamenáno.

Ani konstrukt CYP2S1/pBAD-A a arabinosový expresní systém tedy nebyly úspěšné v produkci CYP2S1 do membrány *E. coli*. Jedním z důvodů, proč nebylo zjištěno žádné CO spektrum odpovídající cytochromům P450 v membránové frakci a teda *E. coli* neprodukovala CYP2S1, může plynout, že změnou koncentrace L-arabiny lze regulovat míru exprese rekombinantního proteinu. Pro expresi bylo do kultivačního média přidáno takové množství L-arabiny, aby výsledná koncentrace byla 0,2%. Tato koncentrace L-arabiny však zřejmě nebyla dostatečně vysoká, aby při takovém množství této látky došlo k indukci exprese genu, který je pod kontrolou arabinosového operonu.

Pro další studie heterologní exprese CYP2S1 bude nutné připravit specifickou protilátku proti lidskému CYP2S1. Použité komerční polyklonální protilátky totiž nejsou dostatečně specifické pro detekci CYP2S1 produkovaného v bakteriálním systému. Řešením může být tzv. vysycení nespécifických vazebných míst kultivačním médiem nebo připravit více specifickou protilátku.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala vlivem elliptycinu na expresi a katalytickou aktivitu cytochromů P450 a dalších složek MFO systému, které se podílí na jeho metabolické přeměně v modelovém organismu laboratorního potkana. Kromě toho předkládaná práce popisuje postupy heterologní exprese lidského cytochromu P450 2S1, jehož izolace je nezbytná pro provádění funkčních a metabolických studií.

Výsledky získané v diplomové práci lze shrnout následovně:

- Laboratorní potkani kmene Wistar byly intraperitoneálně premedikovány elliptycinem (4, 40 mg/kg tělesné hmotnosti). Z jater, ledvin a plic nepremedikovaných a premedikovaných zvířat elliptycinem pak byla izolovaná mikrosomální frakce.
- Premedikací laboratorního potkana elliptycinem dochází k indukci exprese proteinů i katalytické aktivity CYP1A1 a 1A2 ve všech sledovaných orgánech (játra, ledviny, plíce). Podobně je exprese a katalytická aktivita CYP3A vyšší v játrech premedikovaných zvířat než u zvířat kontrolních.
- V ledvinách a plicích se s premedikací elliptycinem mění množství a katalytická aktivita CYP3A (represe i indukce). Nicméně tendence zaznamenaná ve změně obsahu CYP3A neodpovídá úplně změně katalytické aktivity.
- Premedikací laboratorního potkana elliptycinem dochází k indukci exprese cytochromu b₅ v játrech a ledvinách premedikovaných zvířat.
- Premedikace laboratorního potkana elliptycinem ovlivňuje expresi a katalytickou aktivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy.
- Byl izolován plasmid pCMV s vloženým genem pro CYP2S1 v dostatečné

čistotě a koncentraci. Tento plasmid byl vložen do buněk *E. coli* C41_{pLYS} a C43. Pro produkci CYP2S1 ve větším množství bylo zvoleno LB médium a teplota 37 °C. Poté byla izolována membránová frakce, ve které byl analyzován obsah CYP. Ve vzorku byl zachycen pík absorbující při 420 nm, ale při 450 nm žádné absorpční maximum nebylo zaznamenáno.

- Gen pro CYP2S1 byl upraven vložemí restrikčních míst, amplifikován a vložen do expresního plasmidu pBAD-A, který má arabinosový operon a je regulován přídatkem L-arabiny. Tento plasmid byl vložen do buněk *E. coli* TOP10 a LMG194 a provedena byla exprese CYP2S1 při 30 °C v TB médiu. Z produkčních kmenů *E. coli* byla izolovaná membránová frakce, ve které byl sledován obsah CYP. Ve vzorku nebylo zjištěno žádné absorpční maximum při 450 nm.

7 Literatura

- [1] MedicineNet [online], Cancer, Dostupné z WWW:
<http://www.medicinenet.com/cancer/article.htm> [cit. 2012-03-07]
- [2] Stiborová, M., Mikšanová, M.: Živa 4, 146, 1999
- [3] Klener, P.: Protinádorová chemoterapie, Galén, Praha, 1996
- [4] World Health Organisation [online], Cancer, Dostupné z WWW:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> [cit. 2012-03-07]
- [5] Jemal, A., Siegel, R., Ward, M.E.: American Cancer Society. 1, 1-72., 2009
- [6] Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M.: Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 44, 239-267, 2004
- [7] Anisimov, V.N.: Critical Reviews in Oncology/Hematology, 45, 277-304, 2003
- [8] Surh, Y.J.: Nature Reviews Cancer 3, 768-780, 2003
- [9] Barrett, J.C., Wisemna, R.W.: Environmental Health Perspectives, 76, 65-70, 1987
- [10] Weinstein, B.I.: Cancer research, 48, 4135-4143, 1988
- [11] Vranová, I.: Bakalářská práce 2010, PřF UK Praha
- [12] Adam, Z., Pour, L., Vorlíček, J., Hájek, R., Koptíková, J., Šmardová, J.: Remedia, 15, 390-404, 2005
- [13] Nygren, P.: Acta Oncologica, 40, 166-174, 2001
- [14] Kotrbová, V.: Diplomová práce 2005, PřF UK Praha
- [15] Stiborová, M.: Biochemie chemické karcinogeneze, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha, 2011
- [16] Martínková, J., Chládek, J., Mičuda, S., Chládková, J.: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada, Praha, 2007
- [17] Lullman, H., Mohr, K., Hein, L.: Barevný atlas farmakologie, Grada, Praha, 2007
- [18] Hampl, F., Paleček, J.: Farmakochemie, Vydavatelství VŠCHT, Praha, 2002
- [19] Kramer, S.D., Testa, B.: Chemistry and Biodiversity, 6, 1477-1660, 2009
- [20] Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: Chemické Listy, 94, 913-918, 2000
- [21] Chromá, L., Macková, M., Martínek, V., Stiborová, M.: Chemické Listy, 95, 212-222, 2001
- [22] Xu, Ch., Li, Ch., Kong, A.T.: Archives of Pharmacal Research, 28, 249-268, 2005
- [23] Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: Carcinogenesis, 23, 617-265, 2002

- [24] Stiborová, M.: Xenobiochemie, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha, 2011
- [25] Stiborová, M., Hudeček J., Páca, J., Martínek V., Páca J.: Chemické Listy 98, 876 – 890, 2004
- [26] Hynie, S.: Xenobiochemie, přednáška na LF UK, Praha, 2011
- [27] Schenkman, J.B., Jansson, I.: Pharmacology and Therapeutics, 97, 139–152, 2003
- [28] Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M.: Protein Expression and Purification, 66, 203–209, 2009
- [29] Vergeres, G., Ramsden, J., Waskell, L.: The Journal of Biological Chemistry, 270, 3414-3422, 1995
- [30] Vergeres, G., Waskell, L.: Biochimie, 77, 604-620, 1995
- [31] Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, P., Shimada, T., Nakajima, M., Yokoi, T.: Protein Expression and Purification, 24, 329–337, 2002
- [32] Porter, T.D.: Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 16, 311-316, 2002
- [33] Guryev, O.L., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Estabrook, R.W.: Biochemistry, 40, 5018-5031, 2001
- [34] Yamazaki, H., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Shimada, T., Guengerich, F.P.: The Journal of Biological Chemistry, 271, 27438-44, 1996
- [35] Wang, M., Roberts, L.D., Paschke R., Shea, T.M., Masters, B.S.S., Kim, J.P.: Proceedings of the National Academy of Sciences, 94, 8411-8416, 1997
- [36] Shimada, T., Mernaugh, R.L., Guengerich, F.P.: Archives of Biochemistry and Biophysics, 435, 207–216, 2005
- [37] Rylander, T., Neve, E.P.A., Ingelman-Sundberg, M., Oscarson M.: Biochemical and Biophysical Research Communications, 281, 529–535, 2001
- [38] Smith, G., Wolf, C.R., Deeni, Y.Y., Dawe, R.S., Evans, A.T., Comrie, M.M., Ferguson, J., Ibbotson, S.H.: The Lancet, 361, 1336-1343, 2003
- [39] Rivera, S.P., Saarikoski, S.T., Hankinson, O.: Molecular Pharmacology, 61, 255–259, 2002
- [40] Saarikoski, S.T., Wikman, H.A.L., Smith, G., Wolff, CH.J., Husgafvel-Pursiainen K.: Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 53, 549–556, 2005
- [41] Deb, S., Bandiera, S.M.: Toxicology, 267, 91–98, 2010
- [42] Rivera, S.P., Wang, F., Saarikoski, S.T., Taylor, R.T., Chapman, B., Zhang, R., Hankinson, O: The Journal of Biological Chemistry, 282, 10881–10893, 2007

- [43] Downie, D., McFadyen, M.C.E., Rooney, P.H., Cruickshank, M.E., Parkin, D.E., Miller, I.D., Telfer, C., Melvin, W.T., Murray, G.I.: *Clinical Cancer Research*, 11, 7369–7375, 2005
- [44] Nishida, C.R., Lee, M., Ortiz de Montellano, P.R.: *Molecular Pharmacology*, 78, 497–502, 2010
- [45] Wang, S.L., He, X.Y., Hong, J.Y.: *Drug metabolism and disposition*, 33, 336–340, 2005
- [46] Wu, Z.L., Sohl, Ch.D., Shimada, T., Guengerich P.F.: *Molecular Pharmacology*, 69, 2007–2014, 2006
- [47] Karlgren, M., Miura, S., Ingelman-Sundberg, M.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 57 – S61, 2005
- [48] Bebenek, G.I., Solaimani, P., Bui, P.H., Hankinson, O.: *Toxicology Letters* 209, 30–34, 2012
- [49] Bui, P.H., Hankinson, O.: *Molecular Pharmacology*, 76, 1031–1043, 2009
- [50] Bui, P.H., Hsu, E.L., Hankinson, O.: *Molecular Pharmacology*, 76, 1044–1052, 2009
- [51] Gomez, A., Nekvindova, J., Travica, S., Lee, M.Y., Johansson, I., Edler, D., Mkrtchian, S., Ingelman-Sundberg, M.: *Molecular Pharmacology*, 78, 1004–1011, 2010
- [52] Bui, P.H., Imaizumi, S., Beedanagari, S.R., Reddy, S.T., Hankinson, O.: *Drug Metabolism and Disposition*, 39, 180–190, 2011
- [53] Omura, T.: *The Journal of Biochemistry*, 147, 297–306, 2010
- [54] Ghazarian, J.G., Colin, R. J., Knutson, J.C., Orjie-Johnson, W.H., D-Luc, H.: *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 3026–3033, 1974
- [55] Kitteringham, N.R., Pirmohamed M., Park, B.K.: *Baillière's Clinical Anaesthesiology*, 12, 191–211, 1998
- [56] Hasler, J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig Ch., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P.: *Molecular Aspects of Medicine*, 20, 1–137, 1999
- [57] Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W.: *Pharmacogenetics*, 6, 1–42 1996
- [58] Yang, X., Zhang, B., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Zhu, J., Gaedigk, A., Suver, Ch., Zhong, H., Leeder, J.S., Guengerich, P.F., Strom, S.C., Schuetz, E., Rushmore, T.H.,

- Ulrich, R.G., Slatter, J.G., Schadt, E.E., Kasarskis, A., Lum, P.Y.: *Genome Research*, 20, 1020–1036, 2012
- [59] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chemické Listy*, 93, 229 – 237, 1999
- [60] Heinemann, F.S., Ozols J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 4195-4201, 1983
- [61] Taniguchi, H., Ima,i Y., Sato, R.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232, 585-596, 1984
- [62] Klingerbenberg, M.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 376-386, 1958
- [63] Garfinkel, D.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77, 493-509, 1958
- [64] Omura, T., Sato, R.: *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2379-2385, 1964
- [65] Omura, T., Sato, R.: *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370-2378, 1964
- [66] Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: *Praktický Lékař.*, 1, 15-20, 1992
- [67] Hendrychová, T., Anzenbacherová, E., Hudeček, J., Skopalík, J., Lange, R., Hildebrandt, P., Otyepka, M., Anzenbacher, P.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 58–68, 2011
- [68] Bend, J.R., Foureman, C.L.: *Marine Enviromental Research*, 141, 405-406, 1984
- [69] Guengerich, P.F.: *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 10019-10022, 1991
- [70] Dürr, U.H.N., Waskell, L., Ramamoorthy, A.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 3235–3259, 2007
- [71] Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H.: *Archives of Toxicology*, 82:667–715, 2008
- [72] Tanaka, E.: *Sepsis*, 4:247–254, 2001
- [73] Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J.: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 311–317, 2005
- [74] Columbia enviromental Research center [online], EROD, Dostupné z WWW <http://www.cerc.usgs.gov/pubs/BEST/EROD.pdf> [cit. 2012-06-14]
- [75] Ortiz De Montellano, P.R.: *Cytochrome P450*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2005
- [76] Stiborová, M.; Frei, E.: *Chemické Listy*, 95, 549-555, 2001
- [77] Stiborová, M.; Bieler, A. C.; Wiessler, M.; Frei E.: *Biochemical Pharmacology.*, 62, 1675–1684, 2001
- [78] Stiborová, M., Sejbál, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E.: *Cancer Research*, 64,

8374-8380, 2004

- [79] DeMarini, D.M., Aby-Shakra, A., Gupta, R., Hendee, L.J., Levine, J.G.: *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 20, 12-18, 1992
- [80] Stiborová, M., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Kotrbová, V., Kukačková, K., Janouchová, K., Rupertová, M., Ryšlavá, H., Hudeček, J., Frei, E.: *General Physiology and Biophysics.*, 25, 245-261, 2006
- [81] Tewey, K.M.; Chen, L.G; Nelson, M.E.; Liu, FL.: *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 9182-9187, 1984
- [82] Multon, E.; Riou, J.; LeFevre, D.; Ahomadegbe, J.; Riou, G.: *Biochemical Pharmacology*, 38, 2077-2086, 1989
- [83] Ohashi, M.; Sugikawa, E.; Nakanishi, N.: *Japanese Journal of Cancer Research*, 86, 819-827, 1995
- [84] Schawaller, M., Allard, B., Lescot, E., Moreau, F.: *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 22709–22713, 1995
- [85] Frei, E., Arlt, M.V., Wiessler, M., Stiborová, M.: *Biochemical Pharmacology*, 64, 289-295, 2006
- [86] Poljaková, J., Frei, E., Gomez, E.J., Aimová, D., Eckschlager, T., Hraběta, J., Stiborová, M.: *Cancer Letters*, 252, 270–279, 2007
- [87] Stiborová, M., Breuer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Wiessler, M., Frei, E.: *International Journal of Cancer*, 107, 885–890, 2003
- [88] Poljaková, J., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 149, 449-453, 2005
- [89] Poljaková, J., Eckschlager, T., Hraběta, J., Hřebačková, J., Smutný, S., Frei, E., Martínek, V., Kizek, R., Stiborová, M.: *Biochemical Pharmacology*, 77, 1466-1479, 2009
- [90] Stiborová, M., Rupertová, M., Aimová, D., Ryšlavá, H., Frei, E.: *Toxicology*, 236, 50–60 2007
- [91] Stiborová, M, Poljaková, J., Ryšlavá, H., Dračínský, M., Eckschlager, T., Frei, E.: *International Journal of Cancer*, 120, 243–251, 2007
- [92] Stiborová, M., Stiborová-Rupertová, M., Bořek-Dohalská, L., Wiessler, M., Frei, E.: *Chemical Research in Toxicology*, 16, 38-47, 2003
- [93] Stiborová, M., Arlt, M.V., Henderson, J.C., Wolf, R.C., Kotrbová, V., Moserová, M., Hudeček, J., Phillips, D., Frei, E.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226, 318–327, 2008

- [94] Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: Analytical Biochemistry., 175, 231-237, 1988
- [95] Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, A.: The Journal of Cell Biology, 32, 415- 438, 1967
- [96] Strittmatter, P., Velick, S.F.: The Journal of Biological Chemistry, 221, 253-264, 1956
- [97] Estabrook, R.W., Werringloer, J.: Methods in Enzymology., 52, 212-220, 1978
- [98] Laemmli, U.K.: Nature, 227, 680-685, 1970
- [99] Fayer, J.L., Petullo, D.M., Ring, B.J., Wrighton, S.A., Ruterbories, K.J.: Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 46, 117-123, 2002
- [100] Bořek-Dohalská, L., Hodek, P., Hudeček, J., Stiborová, M.: Interdisciplinary Toxicology. 1, 155–159, 2008
- [101] Horecker, B.L.: The Journal of Biological Chemistry, 183, 593-605, 1950
- [102] Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., HSU, L.: Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 69, 2110-2114, 1972
- [103] CCDS Database [online] , Dostupné z WWW <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&ORGANISM=0&BUILDS=CURRENTBUILDS&DATA=CCDS12573.1> [cit. 2012-07-30]
- [104] New England Biolabs, 2-Log DNA Ladder [online], Dostupné z WWW <http://www.neb.com/nebecomm/products/productn3200.asp> [cit. 2012-08-01]
- [105] Renaud, J.P., Peyronneau, M.A., Urban, P., Truan, G., Cullin, C., Pompon, D., Beaune, P., Mansuy, D.: Toxicology, 82, 39-52, 1993
- [106] Buters, J.T., Korzekwa, K.R., Kunze, K.L., Omata, Y., Hardwick, J.P., Gonzalez, FJ.: Drug Metabolism and Disposition, 22, 688-692, 1994
- [107] Crespi, C.L., Penman, B.W., Steimel, D.T., Gelboin, H.V., Gonzalez, FJ.: Carcinogenesis, 12, 355-359, 1991
- [108] Barnes, H.J., Arlotto, M.P., Waterman, M.R.: Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 88, 5597-5601, 1991
- [109] Univerzita Palackého v Olomouci [online], Dostupné z WWW <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/8.pdf> [cit. 2012-01-08]
- [110] Barnes, H.J., Arlotto, M.P., Waterman, M.R.: Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 88, 5597-5601, 1991
- [111] Fisher, Ch.W., Shet, M.S., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, Ch.A., Etabrook, E.W.: Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 89, 10817-10821, 1992

- [112] Baneyx, F.: *Current Opinion in Biotechnology*, 411-421, 1999
- [113] Harvard University [online], Dostupné z WWW <http://plasmid.med.harvard.edu/PlasmidRepository/file/map/pcmv-sport6.gif> [cit. 2012-0802]
- [114] Quora [online], Dostupné z WWW <http://www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level> [2012-08-03]
- [115] Konvalinka, J.: *Molekulární biologie 2, přednáška na PŘF UK, katedra biochemie, Praha, 2011*
- [116] Butler, E.T., Chamberlin, M.J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 5772-5778, 1982
- [117] Wikipedia [online], Dostupné z WWW <http://en.wikipedia.org/wiki/Phagemid> [cit. 2012-08-03]
- [118] Harvard University [online], Dostupné z WWW <http://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetCloneDetail.do?cloneid=335898&species=>
- [119] Invitrogen: *Users Manual, verze J, 1-39, 2010*
- [120] Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J.: *Journal of Bacteriology*, 177, 4121-4130, 1995
- [121] Siegele, D.A., Hu, J.C.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 94, 8168-8172, 1997
- [122] Greenfield, L., Boone, T., Wilcox, G.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 75, 4724-4728, 1978
- [123] Sorensen, H.P, Mortensen, K.K.: *Journal of Biotechnology*, 115, 113-128, 2005
- [124] Aimová D., Svobodová L., Kotrbová V., Mrázová, B., Hodek, P., Hudeček, J., Václavíková, R., Frei, E., Stiborová, M.: *Drug Metabolism and Disposition*, 35, 1926-1934, 2007
- [125] Philips, I.R., Shephar, E.A.: *Cytochrome P450 Protocols*, Humana Press, New Jersey, 2006

