

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Cílená mutageneze ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a jejich interakčních partnerů

**Mgr. Jan Milichovský**

Školitel: Doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2016

## Abstrakt

Cytochromy P450 jsou rozsáhlou skupinou proteinů metabolizujících široké množství substrátů. Řada z nich se významně podílí na metabolismu léčiv či jiných xenobiotik včetně řady chemických karcinogenů.

Hemoprotein cytochrom  $b_5$  je jedno-elektronový přenašeč elektronů spolupracující s NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou 3, který je spjatý s metabolismem zprostředkovaným cytochromy P450. Cytochrom  $b_5$  je schopen prostřednictvím modulace aktivity cytochromů P450 ovlivňovat metabolismus řady látek.

Cílem disertační práce bylo využít místně cílenou mutagenezi cytochromů P450 rodiny 1 k lepšímu porozumění mechanismu jejich nitroreduktasové aktivity. Dále byla studována interakce cytochromu  $b_5$  s cytochromy P450 podrodiny 1A pomocí místně cílené mutagenese jejich předpokládaného kontaktního rozhraní. V rámci práce byly také, za použití kombinace experimentu a teoretických přístupů, studovány rozdíly v redukcí lidských cytochromů P450 v intaktních bakteriálních buňkách během jejich heterologní exprese.

Z výsledků vyplývá, že nitroreduktasová aktivita CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 je zprostředkována hydroxylovou skupinou v aktivním místě a jejím zavedením lze u CYP1B1 získat uměle vyvolat nitroreduktasovou aktivitu. Pomocí mutagenese byly také identifikovány aminokyseliny, které se pravděpodobně účastní interakce lidského membránového cytochromu  $b_5$  s CYP1A1 a CYP1A2. Dále bylo také zjištěno, že některé cytochromy P450 produkované v bakteriálním systému jsou prakticky kompletně redukovány přímo v hostitelské buňce, zatímco jiné jsou redukovány jen minimálně. Proteinem, podílejícím se na tomto jevu je pravděpodobně bakteriální flavoprotein - flavodoxin.

# 1. Úvod

## Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou rozsáhlou skupinou proteinů obsahující přes dvacet tisíc zástupců. Vyskytují se téměř u všech forem života [1].

Lze je řadit k několika typům v závislosti na homologii či redoxním systému dodávajících jim elektrony potřebné pro jejich reakční cyklus. Jako elektronové donory mohou vystupovat bakteriální rozpustné proteiny nebo savčí membránové proteiny. Partnery v lidském těle jsou například NADPH: cytochrom P450 reduktasa (CPR) nebo adrenodoxin se svou NADPH:adrenodoxin reduktasou [2].

V lidském genomu se vyskytuje 57 aktivních genů cytochromu P450 a 58 mutovaných a neaktivních pseudogenů [3]. Jednou z funkcí cytochromů P450 je metabolismus cizorodých látek (xenobiotik), na kterém se podílí především enzymy rodiny 1 až 4 [4]. Již dříve byla popsána nitroreduktasová aktivita cytochromů P450 rodiny 1 a na základě teoretických předpokladů učiněných dle výsledků molekulárního modelování byla vyslovena hypotéza, že přítomnost aminokyseliny s hydroxylovou skupinou ve vhodné pozici vazebné kavity je pro tuto aktivitu nezbytná [5].

## Cytochrom b<sub>5</sub>

Cytochrom b<sub>5</sub> je hemoprotein, který se vyskytuje v mnoha tkáních a jako přenašeč elektronů se účastní celé řady reakcí. Mezi něž například patří desaturace mastných kyselin, redukce methemoglobinu na hemoglobin a biosyntéza cholesterolu [6-8]. Zapojuje se také do biochemické přeměny léčiv a jiných xenobiotik, a to díky interakcím s některými cytochromy P450 [9]. Jeho membránová forma je lokalizována na cytoplazmatické straně endoplazmatického retikula [10].

Cytochrom b<sub>5</sub> může být redukován NADPH: cytochrom P450 reduktasou nebo NADH: cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou a zapojovat se tak do reakcí katalyzovaných

cytochromy P450 [11, 12]. Efekt přítomnosti cytochromu  $b_5$  je ale vysoce závislý na sledovaných reakčních podmínkách a přítomnost tohoto proteinu může reakci stimulovat, inhibovat nebo být vůči reakci zcela neutrální [13, 14]. V případě podrodiny cytochromů P450 1A jsou v literatuře popsány substráty, u nichž byla popsána signifikantní stimulace metabolismu působením cytochromu  $b_5$ , jsou známy ale i takové, pro které nebyl modulační efekt pozorován [15- 20].

### **NADH:cytochrom $b_5$ reduktasa 3**

Enzym (CYB5R3) přenáší elektrony z NADH na cyt  $b_5$  a katalyzuje jednoelektronovou redukci ferricytochromu  $b_5$  na ferrocycyochrom  $b_5$ . Membránová forma má významnou funkci v řadě procesů, například při syntéze cholesterolu [21]. Bylo prokázáno, že tento protein může ve spojení se svým partnerským proteinem, cytochromem  $b_5$  efektivně přenášet elektrony na určité CYP bez přítomnosti CPR [23, 24].

## 2. Cíle práce

Cíle disertační práce lze rozdělit do tří oblastí:

- Ověření možnost interakce a redukce lidských membránových cytochromů P450 s bakteriálním flavodoxinem a přispět tak k vysvětlení faktu, že některé lidské cytochromy P450 se při heterologní expresi v bakteriální buňce nacházejí v redukovaném stavu.
- Studium vlivu záměny aminokyseliny v aktivním centru na funkci cytochromů P450, konkrétně schopnost rodiny CYP1 redukční cestou aktivovat aristolochovou kyselinu I (AAI).
- Studium vlivu lidského membránového cytochromu  $b_5$  na aktivitu lidských membránových cytochromů P450 1A1 a 1A2 v přítomnosti CPR nebo CYB5R3

## 3. Materiál a metody

Materiál a použité metody jsou uvedeny v publikacích, které tvoří přílohu č. 1-4 (viz Seznam publikací v autoreferátu), případně jsou uvedeny v dizertační práci.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Redukce savčích cytochromů P450 v intaktních bakteriálních buňkách a potenciální role flavodoxinu

V bakteriálním systému byla sledována redukce CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 a CYP2C8. Většina studovaných proteinů se v bakteriích vyskytovala v redukované formě, pouze CYP2C8 byl nalezen převážně ve formě oxidované (Tabulka 1).

**Tab. 1 Koncentrace exprimovaných cytochromů P450 v *Escherichia coli***

| Protein       | (- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )<br>c (P450)<br>nmol/ml | (- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )<br>„c (P420)“<br>nmol/ml | (+ Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )<br>c (P450)<br>nmol/ml | (+ Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )<br>„c (P420)“<br>nmol/ml |
|---------------|---|---|---|---|
| <b>CYP1A1</b> | 216,5 ± 14,4  | 420,4 ± 64,1  | 152,0 ± 15,1  | 396,4 ± 43,5  |
| <b>CYP1A2</b> | 512 ± 13,5  | 94,3 ± 48,7   | 692,7 ± 31,3  | 38,1 ± 53,9   |
| <b>CYP2B6</b> | 150,5 ± 32,3  | 423,7 ± 92,4  | 118,0 ± 36,4  | 242,9 ± 51,6  |
| <b>CYP2D6</b> | 49,5 ± 15,1   | 282,9 ± 66,0  | 33,7 ± 1,8  | 343,2 ± 42,1  |
| <b>CYP2C8</b> | 428,9 ± 131,6   | 408,1 ± 318,4   | 1294,5 ± 242,3  | 54,1 ± 93,6   |

Některé proteiny vykazovaly vyšší koncentraci správně „složené“ formy bez přítomnosti dithioničitanu sodného (např. CYP1A1), což může být způsobeno poškozením proteinu při dodání dithioničitanu a tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů.

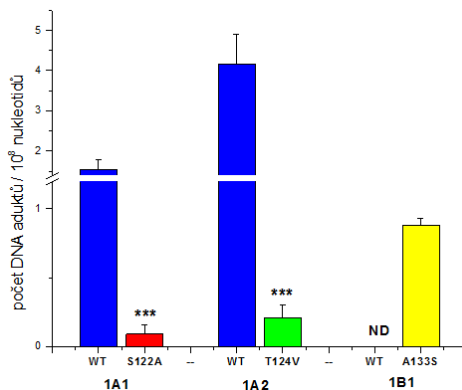
## **4.2. Studium vlivu mutace polární aminokyseliny v aktivním místě**

### **CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 na jejich enzymovou aktivitu**

Aktivita byla studována vůči aristolochové kyselině I jako substrátu, jejíž pozice v aktivním centru byla predikována pomocí molekulárního modelování. Na uvedenou studii navazuje tato část disertační práce.

Nejprve byly heterologní expresí získány proteiny CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1, poté i jejich mutanti CYP1A1-S122A, CYP1A2-T124V a CYP1B1-A133S. Tyto změny vedly buď k odstranění, nebo přidání hydroxylové skupiny do aktivního centra. Aktivita proteinů, ve spojení s jejich partnerským proteinem CPR, byla ověřena prza použitím markerových substrátů a ačkoliv byla aktivita mutantů snižena, pokles nebyl natolik silný, aby znemožnil stanovení aktivity vůči aristolochové kyselině I.

Hlavním výsledkem bylo stanovení aktivity proteinů v redukční přeměně zmíněného substrátu, která vede k produkci reaktivních metabolitů tvořících adukty s DNA. Právě pomocí metody kvantifikující množství aduktů s DNA byla aktivita enzymů stanovena (Obrázek 1).



**Obr. 1 Kvantifikace aduktů DNA vzniklých z redukčních metabolitů aristolochové kyseliny I aktivací exprimovanými CYP v rekonstituovaných systémech**

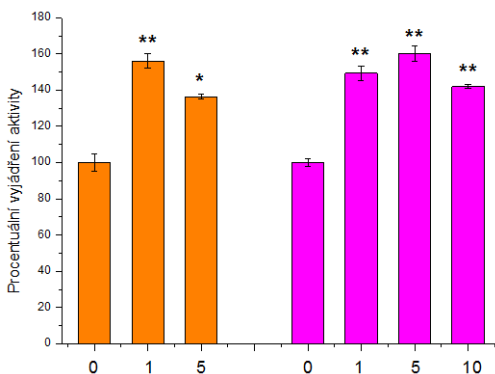
ND představuje nedetekovatelné množství aduktů; výsledky jsou vztaženy na aktivitu samotné CPR. Signifikance vzorků je stanovena proti vzorku obsahující stejný CYP bez obsahu cyt b<sub>5</sub>.

Aktivita mutantů CYP1A1 a CYP1A2 byla významně snížena oproti aktivitě jejich přirozených forem. Oproti tomu, zavedení hydroxylové skupiny do přirozené formy CYP1B1 zvýšila tvorbu aduktů na hodnoty téměř srovnatelné s aktivitou přirozené formy CYP1A1.

Absence hydroxylové skupiny v proteinech CYP1A1 S122A a CYP1A2 T124V vede ke snížené schopnosti redukce nitroskupiny aristolochové kyseliny I a tím ke snížené tvorbě aduktů s DNA. Naproti tomu, mutant proteinu CYP1B1 A133S obsahující serin, vykazuje v této přeměně zvýšenou aktivitu. Prokázalo se tedy, že přítomnost vhodně umístěné hydroxylové skupiny je důležitá pro nitroreduktasovou aktivitu CYP rodiny 1 vůči AAI.

### 4.3. Studium aktivity lidských rekombinantních cytochromů P450 v rekonstituovaných systémech

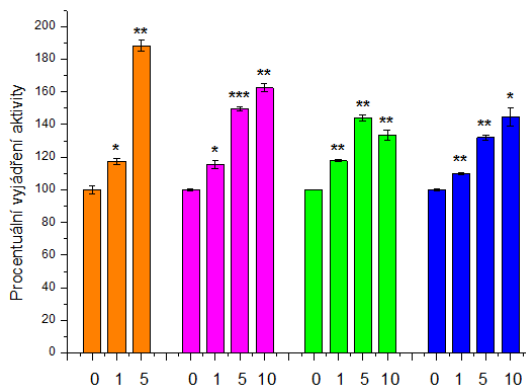
Cytochrom  $b_5$  pozitivně moduloval aktivitu CYP1A1 (Obrázek 2) a CYP1A2 (Obrázek 3) vůči všem testovaným substrátům.



**Obr. 2** Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A1 přítomností přirozené formy cytochromu  $b_5$

Oranžové sloupce – aktivita vůči Sudanu I; fialové sloupce – aktivita vůči fenacetinu. Molární poměr cyt  $b_5$  vůči CYP1A1 byl různý, což je naznačeno násobkem množství cyt  $b_5$  na popisících horizontální osy.

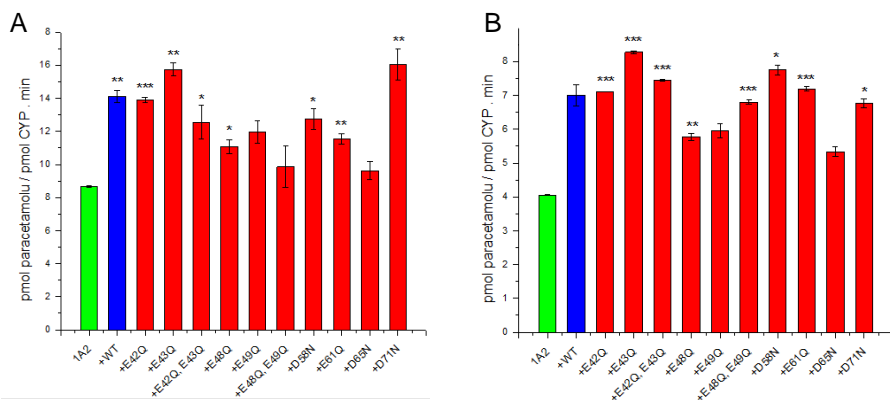




**Obr. 3** Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A2 přítomností přirozené formy cytochromu b<sub>5</sub>

Oranžové sloupce – aktivita vůči Sudanu I; fialové sloupce – aktivita vůči fenacetinu; zelené sloupce – aktivita vůči acetanilidu; modré sloupce – aktivita vůči lidokainu. Molární poměr cyt b<sub>5</sub> vůči CYP1A1 byl různý, což je naznačeno násobkem množství cyt b<sub>5</sub> na popisících horizontální osy.

V případě vlivu mutací cytochromu b<sub>5</sub> lze jako hlavní výsledky označit poznání vlivu mutací tohoto proteinu na aktivitu CYP1A2 v případě reakce s fenacetinem a acetanilidem (Obrázek 4).

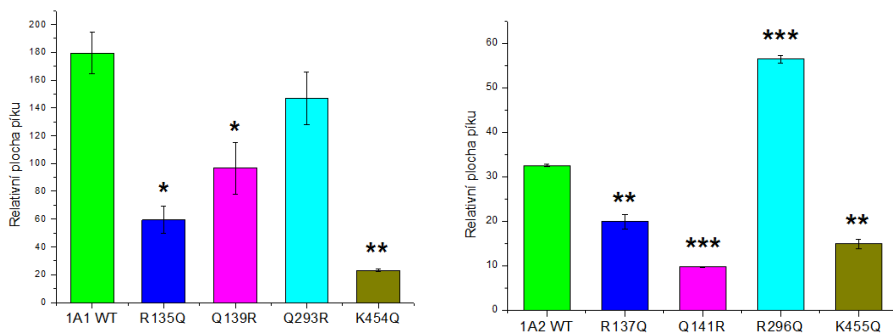


**Obr. 4** Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A2 vůči fenacetinu (A) a acetanilidu (B) v přítomnosti mutantů cytochromu b<sub>5</sub>

Molární poměr CYP1A2 a cyt b<sub>5</sub> byl 1:10.

Z těchto výsledků se jako možná rezidua cytochromu b<sub>5</sub> zapojená do interakce s CYP1A2 jeví aminokyseliny E48, E49 a D65. Z výsledků zjištěných pro CYP1A1 lze jako možnou interakční aminokyselinu označit pouze D65.

V případě sledování ovlivnění modulace cytochromem b<sub>5</sub> pomocí mutantů samotných cytochromů P450 byl zvolen systém s NADPH:cytochrom P450 reduktasou a také systém obsahující pouze cytochrom b<sub>5</sub> a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa. Druhý systém není ovlivněn aktivitou samotné NADPH:cytochrom P450 reduktasy přenášející elektrony i mimo cytochrom b<sub>5</sub> a může tak poskytovat méně zkreslené informace o vlivu mutací na CYP1A1 a CYP1A2. Výsledky přeměny Sudanu I testovanými enzymovými systémy ukazuje obrázek 5.



**Obr. 5 Aktivita mutantů CYP1A1 (A) nebo CYP1A2 (B) rekonstituovaných s CYB5R3 a cyt b<sub>5</sub> vůči Sudanu I**

Molární poměr CYP : cyt b<sub>5</sub> : CYB5R3 byl 1:10:1; v experimentech byl použit NADH jako kofaktor CYB5R3.

Ze získaných výsledků se jako možné aminokyseliny CYP1A1 zapojené do interakce s cytochromem b<sub>5</sub> jeví R135, Q139 a K454. V případě CYP1A2 se může jednat o aminokyseliny R137, Q141R a K455.

## 5. Závěry

- Cytochromy P450 mohou být redukovány v bakterii *Escherichia coli*.
- Aktivační přeměna aristolochové kyseliny 1 cytochromy P450 rodiny 1 je ovlivněna typem aminokyseliny v aktivním centru.
- Cytochrom  $b_5$  stimuluje enzymovou aktivitu CYP1A1 a CYP1A2.
- Aminokyselina D65 na cytochromu  $b_5$  může být zapojeno do interakce s CYP podrodiny 1A.
- Aminokyseliny R135, Q139 a K454 cytochromu P450 1A1 mohou být zapojena do interakce s cytochromem  $b_5$ .
- Aminokyseliny R137, Q141 a K455 cytochromu P450 1A2 mohou být zapojena do interakce s cytochromem  $b_5$ .
- Cytochromy P450 rodiny 1 mohou být v reakci se Sudanem I podporovány jen samotným cytochromem  $b_5$  a NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou 3.

## 6. Použitá literatura

1. Nelson, D. R.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
2. Guengerich, F.P., Munro, A.W.: *J. Biol. Chem.* 288, 17065-17073 (2013)
3. <http://drnelson.uthsc.edu/P450.statsfile.html> (přístup 13.6.2016)
4. Nebert, D.W., Wikwall, K., Miller, W.L.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
5. Jeřábek, P., Martínek, V., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 33, 25-35 (2012)
6. Keilin, D., Hartree, E.F.: *Nature* 164, 254-259 (1949)
7. Fukushima, H., Grinstead, G.F., Gaylor, J.L.: *J. Biol. Chem.* 256, 4822-4826 (1981)
8. Hutlquist, D.E., Passon, P.G.: *Nat. New. Biol.* 229, 252-254 (1971)
9. Schenkman, J.B., Jansson, I.: *Drug. Metab. Rev.* 31, 351-364 (1999)
10. Ito, A., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 243, 5922-4923 (1968)
11. Holmans, P.L., Shet, M.S., Martin-Wixtrom, C.A., Fisher, C.W., Estabrook, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 554-556 (1994)
12. Sergeev, G.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A.: *Biochemistry (Mosc.)* 79, 406-416 (2014)
13. Im, S.C., Waskell, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 144-153 (2011)
14. Shimada, T., Menaugh, R.L., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 207-216 (2005)

15. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F.P., Shimada, T., Nakajima, T., Yokoi, T.: *Protein Expr. Purif.* 24, 329-337 (2002)
16. Palma, B.B., Silva, E., Sousa, M., Urban, P., Rueff, J., Kranendonk, M.: *Pharmacogenet. Genomics* 23, 41-52 (2013)
17. Duarte, M.P., Palma, B.B., Gilep, A.A., Laires, A., Oliveira, J.S., Usanov, S.A., Rueff, J., Kranendonk, M.: *Mutagenesis* 20, 93-100 (2007)
18. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M.: *Biochem. Pharmacol.* 82, 669-680 (2011)
19. Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Ulrichová, J., Simánek, V., Dvořák, Z., Frei, E.: *Toxicology* 302, 233-241 (2012)
20. Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 34, 55-63 (2013)
21. Reddy, V.V., Kupfer, D., Caspi, E.: *J. Biol. Chem.* 252, 2797-2801 (1977)
23. Henderson, C.J., McLaughlin, L.A., Wolf, C.R.: *Mol. Pharmacol.* 83, 1209-1217 (2013)
24. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeisser, H.H., Arlt, V.M.: *Monatsh. Chem.* 147, 847-855 (2016)

## 7. Curriculum vitae

Mgr. Jan Milichovský

Kontakt: jmilichovsky@centrum.cz

Datum narození: 30.9.1986

### Vzdělání:

- |              |  |
|--------------|--|
| 2011 – dosud | Doktorské studium program Biochemie<br>PřF UK v Praze    |
| 2009 – 2011  | Magisterský studijní program Biochemie<br>PřF UK v Praze |
| 2006 – 2009  | Bakalářský studijní program Biochemie<br>PřF UK v Praze  |

### Zaměstnání:

- |                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| 1/2016 – dosud   | Patentový specialista, BTL Industries |
| 1/2013 – 12/2015 | laborant, PřF UK                      |

### Řešené grantové projekty:

- |           |   |
|-----------|---|
| 2013-2016 | Interakce lidských cytochromů P450 1A1 a 1A2<br>s cytochromem b <sub>5</sub><br>Grantová agentura Univerzity Karlovy, |
|-----------|---|

### Jazykové znalosti:

- |                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| Čeština         | rodilý mluvčí        |
| Anglický jazyk: | Certifikát FCE, 2013 |

## **Seznam publikací:**

**1.** Mrízova, I., Moserová, M., **Milichovský, J.**, Šulc, M., Kizek, R., Kubáčková, K., Arlt, VM., Stiborová, M. Heterologous expression of human cytochrome P450 2S1 in Escherichia coli and investigation of its role in metabolism of benzo[a]pyrene and ellipticine, Monatsh. Chem. 2016, 147, 881-888; **IF<sub>2015</sub> = 1,131**

**2.** **Milichovský, J.**, Bárta, F., Schmeiser, HH., Arlt, VM., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V. Active site mutations as a suitable tool contributing to explain a mechanism of aristolochic acid I nitroreduction by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1, Int. J. Mol. Sci. 2016, 17 (2), pii: E213; **IF<sub>2015</sub> = 3,257**

**3.** Culka, M., **Milichovský, J.**, Jeřábek, P., Stiborová, M., Martínek V. Ferrous and ferric state of cytochromes P450 in intact Escherichia coli cells: a possible role of cytochrome P450-flavodoxin interactions, Neuro. Endocrinol. Lett. 2015, 36 (S1), 29-37; **IF<sub>2015</sub> = 0,946**

**4.** Stiborová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., **Milichovský, J.**, Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, HH., Frei, E. Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H: quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I), Chem. Res. Toxicol. 2013, 26 (2), 290-299; **IF<sub>2013</sub> = 4,190**

### **Konferenční příspěvky:**

**1. Milichovský, J.,** Dědič, J., Bláha, J., Stiborová, M., Martínek, V.: Interaction of cytochromes P450 1A1/2 with cytochromes b<sub>5</sub> in liposomes and nanodiscs,. Přednáška, 4<sup>th</sup> International Workshop on Expression, Structure, and Function of Membrane Proteins. Book of Abstracts. Florencie, Itálie, 28.6. – 2.7.2015, str. 53.

**2. Culka, M., Milichovský, J.,** Jeřábek. P., Stiborová, M., Martínek, V.: Ferrous and ferric states of cytochromes P450 in intact Escherichia coli cells – possible role of cytochrome P450-flavodoxin interactions. Poster, Sborník abstraktů příspěvků 20. Mezioborové česko-slovenské toxikologické konference TOXCON 2015, Brno 27.-29.5.2015, s. 39. ISBN 978-80-263-0933-8

**3. Milichovský, J.,** Bárta, F., Schmeiser, H., Stiborová, M., Martínek, V.: Effect of active site mutations on nitroreduction and O-demethylation of carcinogenic aristolochic acid I by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. Poster, XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Sborník příspěvků. Brno 11.11.-12.11.2014. s. 71 (2014). ISBN 978-80-210-7340-1.

**4. Milichovský, J.,** Koberová, M., Stiborová, M., Martínek, V.: Heterologous expression and isolation of NADH: cytochrome b<sub>5</sub> reductase 3. Poster, XVI. Setkání mladých biochemiků a molekulárních biologů. Sborník příspěvků. Brno 11.11-12.11.2014. s 71 (2014) ISBN 978-80-210-7340-1



**5.** Dračínská, H., **Milichovský, J.**, Martínek, V., Svášková, D., Hejduková, Ž., Hodek, P., Frei, E., Stiborová, M.: Induction of cytochromes P450 1A1 and 1A2 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 by carcinogenic azo dye Sudan I. Poster, Sborník příspěvků 17. Mezioborové česko-slovenské toxikologické konference TOXCON 2012, Stará Lesná, Slovenská republika, srpen 2012, *Interdisc. Toxicol.*, **5** (Suppl. 1), 31 (2012). ISSN 1337-6853.

**6. Milichovský, J.**, Stiborová, M., Martínek, V.: Heterologous expression of human CYP1A1/2 in prokaryotic system – effect of N-terminal sequence and codon usage optimization. Poster, Sborník příspěvků. XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. 1.-2. 11. 2011, Brno, p. 103. ISBN 978-80-210-5594-0.

**Charles University in Prague, Faculty of Science**

**Department of Biochemistry**

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. thesis



Site-directed mutagenesis of human cytochromes P450 family 1 and their  
interacting partners

**Mgr. Jan Milichovský**

Supervisor: Doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Prague 2016

## **Abstract**

Cytochromes P450 represent a large group of proteins metabolizing variety of substrates. Many of them are responsible for metabolism of xenobiotics including drugs and chemical carcinogens.

Heme-protein cytochrome  $b_5$  is a single-electron donor cooperating with a NADPH:cytochrome P450 reductase and NADH:cytochrome  $b_5$  reductase 3 enzyme. Cytochrome  $b_5$  can affect the xenobiotic metabolism via modulation of the cytochromes P450 activity.

One of the goals of the Ph.D. thesis was to utilize site directed mutagenesis of cytochromes P450 family 1 to elucidate the mechanism of their nitroreductase activity. Another aim was to study the interaction between cytochrome  $b_5$  and cytochromes P450 of the 1A subfamily using site directed mutagenesis on presumed protein-protein contact interface. Another goal was to utilize the combination of theoretical and experimental approaches to explain variance in the reduction state of several human cytochromes P450 heterologously expressed in intact bacterial cells. The results found in the thesis show that nitroreductase activity of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 is mediated by the presence of a particular hydroxyl group in their active centre. Single mutation introducing a hydroxyl group to the specific part of CYP1B1 active site to the active site turned on its artificial nitroreductase activity. Other results identified several amino acids residues located on the contact of cytochrome  $b_5$  with CYP1A1 or CYP1A2. Finally the results of combined theoretical and experimental approaches suggest that the differences in reduction state of human cytochromes P450 heterologously expressed in intact bacterial cells, which can be related to the differences in their interaction with bacterial electron donating protein - flavodoxin.

## **8. Introduction**

### **Cytochromes P450**

Cytochromes P450 (CYPs) are a large group of proteins comprising over 20 000 members. These proteins can be found in most forms of life [1].

CYPs can be divided into several groups according to their partner protein or proteins delivering electrons necessary for their reaction cycle. Such group of electron donors may comprise bacterial soluble proteins or mammalian membrane-bound proteins. Human proteins delivering electrons to the CYPs includes, for example, NADPH:cytochrome P450 reductase (CPR) and/or adrenodoxin in cooperation with NADPH:adrenodoxin reductase [2].

Human DNA codes 57 active genes and 58 highly mutated and non-functional pseudogenes [3]. CYPs of family 1-4 are major enzymes responsible for the xenobiotic metabolism [4]. Family 1 proteins possess an active centre containing a cavity surrounded by aminoacids, which can stabilize the binding of substrate in this cavity. Molecular modeling suggested the possible role of one structural position on the side of the cavity. It was suggested, that the presence of aminoacid possessing a hydroxyl group in this particular position may be important for the nitroreductase activity of CYP1 enzymes [5].

### **Cytochrome b<sub>5</sub>**

Cytochrome b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>) is localized in many tissues and serves as an electron transfer protein involved in many important biochemical reactions including biosynthesis of fatty acids and cholesterol or methemoglobin reduction and cholesterol biosynthesis [6- 8]. This protein can also interact with the CYPs and plays also a role in the xenobiotic metabolism [9]. Its membrane-bound form is localized on the outer side of the endoplasmic reticulum membrane [10].

Cytochrome b<sub>5</sub> is reduced by the CPR or its own partner, NADH:cytochrome b<sub>5</sub> reductase 3 (CYB5R3), and serve as an electron donor to CYP mediated reactions [11, 12]. The effect is extremely dependent on reaction conditions. The presence of the cytochrome b<sub>5</sub> can stimulate, inhibit have no effect on the reaction [13, 14]. The effect of cytochrome b<sub>5</sub> on the cytochromes P450 family 1 is not unambiguously described. The effect was not observed in relation to some substrates, but the stimulation was confirmed for several other substrates [15-20].

### **NADH:cytochrome b<sub>5</sub> reductase 3**

NADH:cytochrome b<sub>5</sub> reductase (CYB5R3) transfers electrons from NADH to cytochrome b<sub>5</sub>. It mediates single electron reduction of ferricytochrome b<sub>5</sub> to ferrocycytochrome b<sub>5</sub>. The membrane-bound form of CYB5R3 plays a role in many important biochemical reactions, for example for cholesterol synthesis [21]. The CYB5R3 in cooperation with cyt b<sub>5</sub> can provide electrons to CYPs and therefore support their catalytic function even without the presence of the CPR [23, 24].

## **9. Aims of the Study**

The main objectives of the doctoral thesis were as follows:

- To investigate the possibility of interaction of human membrane-bound cytochromes P450 with a bacterial flavodoxin and therefore explain the observed presence of the heterologously expressed human CYPs in their reduced form in bacterial cells.
- To elucidate the influence of amino acid mutations in the active site of cytochromes P450 of the family 1 on their nitroreductase activity toward aristolochic acid I.
- To study the influence of the human membrane-bound cytochrome  $b_5$  on the activity of the human membrane-bound cytochromes P450 1A1 and 1A2 in the presence of CPR or CYB5R3,

## **10. Material and Methods**

Materials and used methods are described in publications concerning the research of the dissertation thesis (see Publications 1-4) and the Ph.D. thesis.

## 11. Results and Discussion

### 4.1. Reduction of mammalian cytochromes P450 in the intact bacterial cells and potential role of flavodoxin

The reduction of human CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 and CYP2C8 in the bacterial system was monitored spectroscopically. Majority of CYPs was found to be reduced readily, only CYP2C8 was found to be present mostly in the oxidized form (Table 1).

**Tab. 1 Concentration of expressed cytochromes P450 in *Escherichia coli***

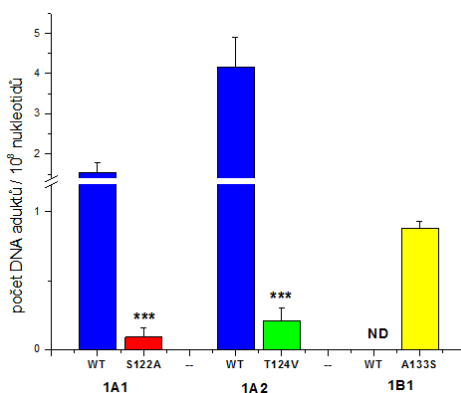
| Protein       | (- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) | (- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) | (+ Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) | (+ Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) |
|---------------|--|--|--|--|
|               | c (P450)<br>nmol/ml                                | „c (P420)“<br>nmol/ml                              | c (P450)<br>nmol/ml                                | „c (P420)“<br>nmol/ml                              |
| <b>CYP1A1</b> | 216,5 ± 14,4                                       | 420,4 ± 64,1                                       | 152,0 ± 15,1                                       | 396,4 ± 43,5                                       |
| <b>CYP1A2</b> | 512 ± 13,5   | 94,3 ± 48,7  | 692,7 ± 31,3                                       | 38,1 ± 53,9  |
| <b>CYP2B6</b> | 150,5 ± 32,3                                       | 423,7 ± 92,4                                       | 118,0 ± 36,4                                       | 242,9 ± 51,6                                       |
| <b>CYP2D6</b> | 49,5 ± 15,1  | 282,9 ± 66,0                                       | 33,7 ± 1,8   | 343,2 ± 42,1                                       |
| <b>CYP2C8</b> | 428,9 ± 131,6                                      | 408,1 ± 318,4                                      | 1294,5 ± 242,3                                     | 54,1 ± 93,6  |

Some proteins were present in higher concentration prior addition of sodium dithionite (e.g. CYP1A1). It might be attributed to the possible inactivation of the active enzyme by the excess of the dithionite and the subsequent elevated production of the reactive oxygen species.

### 4.2. Influence of the polar residue mutation in the active site of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 on their enzymatic activity

The study followed the theoretical study proposing a role of serine and threonine residues for CYP1A1/2 catalyzed nitroreduction of aristolochic acid I.

Mutant forms CYP1A1-S122A, CYP1A2-T124V and CYP1B1-A133S were prepared by heterologous expression. Described mutations resulted in the elimination or addition of the hydroxyl groups in the active centres of evaluated proteins. Enzymatic activities of expressed mutant proteins were verified by their activity toward marker substrates. Even though the activity of the mutant proteins was lower in comparison to natural proteins, the decrease in activity was not so high to prohibit the determination of the nitroreductase activity to aristolochic acid I measured by detection and quantification of DNA adducts (Figure 1).



**Fig. 1 Quantification of formation of DNA adducts with activated aristolochic acid I catalyzed by expressed CYPs present in reconstituted systems**

ND represents “not detected”; Amounts of adducts generated in the reference system containing only CPR were subtracted in order to eliminate the background.

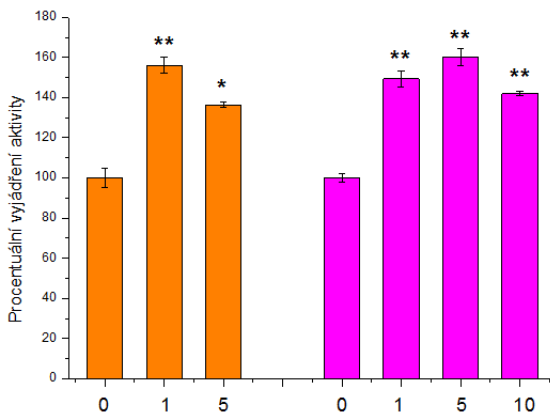
Nitroreductase activity of mutant forms of CYP1A1 and CYP1A2 towards aristolochic acid I was significantly decreased after removal of amino acids containing the important hydroxyl group, mutants S122A (CYP1A1) and T124V (CYP1A2). In contrast, addition of the hydroxyl group into the natural form of CYP1B1 led to significant increase in the nitroreductase activity, which almost reached the activity of natural CYP1A1.



It was shown, that the presence of the conveniently localized hydroxy group is important for nitroreductase activity of CYPs of family family 1 towards aristolochic acid I.

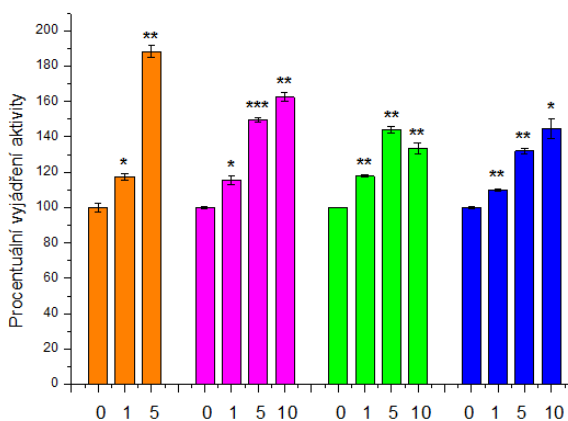
### 4.3. Study of activity of human recombinant cytochromes P450 in reconstitution system

Presence of cytochrome b<sub>5</sub> positively modulated the activity of CYP1A1 (Figure 2) and CYP1A2 (Figure 3) towards all studied substrates (Sudan I, phenacetin, acetanilide and lidocaine).



**Fig. 2 Influence of cytochrome b<sub>5</sub> on metabolic activity of CYP1A1**

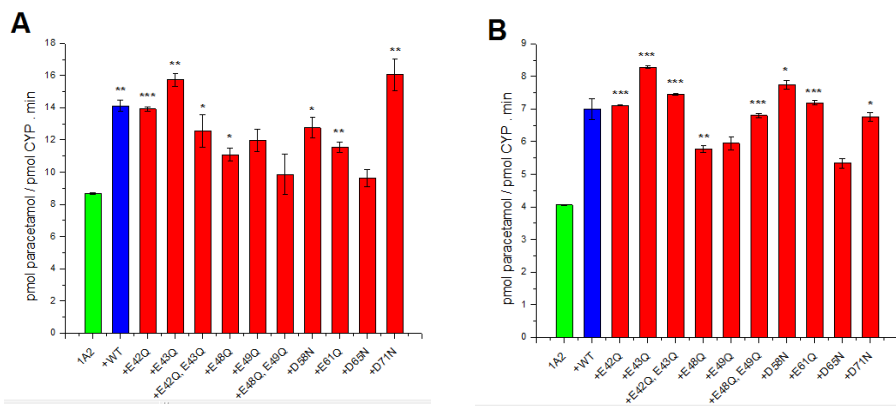
Orange blocks – activity towards Sudan I; purple blocks– activity towards phenacetin. Molar ratio of cyt b<sub>5</sub> towards CYP1A1 was different, as indicated by the horizontal axis description.



**Fig. 3 Influence of cytochrome b<sub>5</sub> on metabolic activity of CYP1A2**

Orange blocks – activity towards Sudan I; purple blocks– activity towards phenacetin; green blocks – activity towards acetanilide; blue block – activity towards lidocaine. Molar ratio of cyt b<sub>5</sub> towards CYP1A2 was different, as indicated by the horizontal axis description.

In case of the influence of mutated forms of cytochrome b<sub>5</sub> on the activity of the CYP family 1, we observed varying effects on the activity of CYP1A2 towards phenacetin and acetanilide (Figure 4).

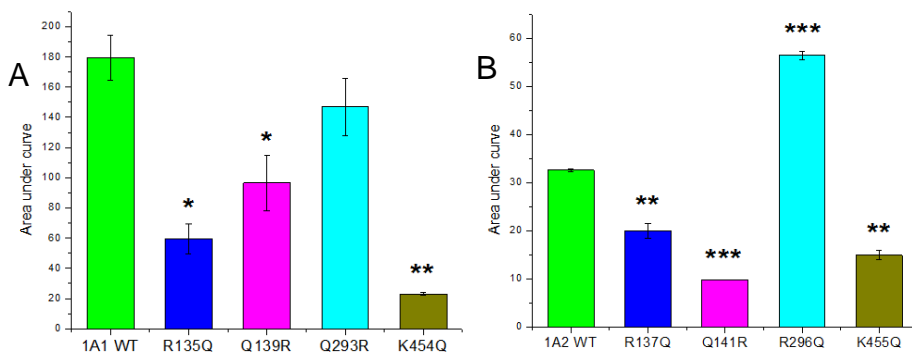


**Fig. 4 Influence of mutated forms of cytochrome b<sub>5</sub> on metabolic activity of CYP1A2 towards phenacetin (A) and acetanilide (B)**

Molar ratio of CYP1A2 and cyt b<sub>5</sub> was 1:10.

These results show that the cytochrome  $b_5$  residues E48, E49 and D65 are important for interaction with CYP1A2. Other set of results for CYP1A1 indicates only the role of D65.

In case of cytochrome  $b_5$  mediated effects on mutant forms of cytochrome P450 1A1/2, the activity towards a variety of substrates was measured in the system containing NADPH:cytochrome P450 reductase or only cytochrom  $b_5$  and NADH:cytochrom  $b_5$  reductase 3. The second mentioned reconstitution system is not influenced by activity of NADPH:cytochrome P450 reductase also affected by the mutations.



**Fig. 5 Activity of mutants CYP1A1 (A) or CYP1A2 (B) reconstituted with CYB5R3 and cyt  $b_5$  towards Sudan I**  
Molar ratio CYP : cyt  $b_5$  : CYB5R3 was 1:10:1; NADH was used as cofactor of CYB5R3.

Results of the Sudan I oxidation (Figure 5) indicate that the possible amino acids of CYP1A1 potentially involved in interaction with cytochrome  $b_5$  are R135, Q139 and K454 and for CYP1A2 amino acids R137, Q141 and K455.

## 12. Conclusion

- Cytochromes P450 interacting with flavodoxin can be reduced in *Escherichia coli* cells.
- The presence of serin or threonin residues in active site of cytochromes P450 family 1 is important for metabolism of aristolochic acid I by these enzymes.
- Cytochrome b<sub>5</sub> stimulate activity of CYP1A1 and CYP1A2 for Sudan I, phenacetin, acetanilide and lidocaine.
- The amino acid D65 of cytochrome b<sub>5</sub> is potentially involved in interaction with CYP subfamily 1A
- Aminoacids R135, Q139 and K454 of cytochrome P450 1A1 can be involved in interaction with cytochrome b<sub>5</sub>
- Aminoacids R137, Q141 and K455 of cytochrome P450 1A2 can be involved in interaction with cytochrome b<sub>5</sub>
- Cytochromes P450 family 1 can be supported solely by cytochrome b<sub>5</sub> and NADH:cytochrome b<sub>5</sub> reductase 3 in their metabolic oxidation of Sudan I

### 13. Literature

1. Nelson, D. R.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
2. Guengerich, F.P., Munro, A.W.: *J. Biol. Chem.* 288, 17065-17073 (2013)
3. <http://drnelson.uthsc.edu/P450.statsfile.html> (přístup 13.6.2016)
4. Nebert, D.W., Wikwall, K., Miller, W.L.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
5. Jeřábek, P., Martínek, V., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 33, 25-35 (2012)
6. Keilin, D., Hartree, E.F.: *Nature* 164, 254-259 (1949)
7. Fukushima, H., Grinstead, G.F., Gaylor, J.L.: *J. Biol. Chem.* 256, 4822-4826 (1981)
8. Hutlquist, D.E., Passon, P.G.: *Nat. New. Biol.* 229, 252-254 (1971)
9. Schenkman, J.B., Jansson, I.: *Drug. Metab. Rev.* 31, 351-364 (1999)
10. Ito, A., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 243, 5922-4923 (1968)
11. Holmans, P.L., Shet, M.S., Martin-Wixtrom, C.A., Fisher, C.W., Estabrook, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 554-556 (1994)
12. Sergeev, G.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A.: *Biochemistry (Mosc.)* 79, 406-416 (2014)
13. Im, S.C., Waskell, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 144-153 (2011)
14. Shimada, T., Menaugh, R.L., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 207-216 (2005)

15. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F.P., Shimada, T., Nakajima, T., Yokoi, T.: *Protein Expr. Purif.* 24, 329-337 (2002)
16. Palma, B.B., Silva, E., Sousa, M., Urban, P., Rueff, J., Kranendonk, M.: *Pharmacogenet. Genomics* 23, 41-52 (2013)
17. Duarte, M.P., Palma, B.B., Gilep, A.A., Laires, A., Oliveira, J.S., Usanov, S.A., Rueff, J., Kranendonk, M.: *Mutagenesis* 20, 93-100 (2007)
18. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M.: *Biochem. Pharmacol.* 82, 669-680 (2011)
19. Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Ulrichová, J., Simánek, V., Dvořák, Z., Frei, E.: *Toxicology* 302, 233-241 (2012)
20. Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 34, 55-63 (2013)
21. Reddy, V.V., Kupfer, D., Caspi, E.: *J. Biol. Chem.* 252, 2797-2801 (1977)
23. Henderson, C.J., McLaughlin, L.A., Wolf, C.R.: *Mol. Pharmacol.* 83, 1209-1217 (2013)
24. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeisser, H.H., Arlt, V.M.: *Monatsh. Chem.* 147, 847-855 (2016)

## 14. Curriculum vitae

Mgr. Jan Milichovský

Contact: jmilichovsky@centrum.cz

Date of birth: 30.9.1986

### Education:

2011 – now                      Ph. D. study, program Biochemistry  
Charles University in Prague, Faculty of Science

2009 – 2011                    Master study, program Biochemistry  
Charles University in Prague, Faculty of Science

2006 – 2009                    Bachelor study, program Biochemistry  
Charles University in Prague, Faculty of Science

### Employment:

1/2016 – now                    Patent specialist, BTL Industries

1/2013 –12/2015                technician, Faculty of Science CU

### Grants:

2013-2016                      Interaction of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 with  
cytochrome b<sub>5</sub>

Grant agency of Charles University

### Language skills:

Czech:                            native speaker

English:                          FCE certificate, 2013

## **Publications:**

- 1.** Mrízova, I., Moserová, M., **Milichovský, J.**, Šulc, M., Kizek, R., Kubáčková, K., Arlt, VM., Stiborová, M. Heterologous expression of human cytochrome P450 2S1 in Escherichia coli and investigation of its role in metabolism of benzo[a]pyrene and ellipticine, *Monatsh. Chem.* 2016, 147, 881-888; **IF<sub>2015</sub> = 1,131**
- 2.** **Milichovský, J.**, Bárta, F., Schmeiser, HH., Arlt, VM., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V. Active site mutations as a suitable tool contributing to explain a mechanism of aristolochic acid I nitroreduction by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1, *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17 (2); **IF<sub>2015</sub> = 3,257**
- 3.** Culka, M., **Milichovský, J.**, Jeřábek, P., Stiborová, M., Martínek V. Ferrous and ferric state of cytochromes P450 in intact Escherichia coli cells: a possible role of cytochrome P450-flavodoxin interactions, *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2015, 36 (S1), 29-37; **IF<sub>2015</sub> = 0,946**
- 4.** Stiborová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., **Milichovský, J.**, Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, HH., Frei, E. Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H: quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I), *Chem. Res. Toxicol.* 2013, 26 (2), 290-299; **IF<sub>2013</sub> = 4,190**



### Conference contributions:

- 1. Milichovský, J., Dědič, J., Bláha, J., Stiborová, M., Martínek, V.:**  
Interaction of cytochromes P450 1A1/2 with cytochromes b<sub>5</sub> in liposomes and nanodiscs, Lecture. Book of Abstracts of the 4th International workshop on expression, structure and function of membrane proteins. 4<sup>th</sup> International Workshop on Expression, Structure, and Function of Membrane Proteins. Book of Abstracts. Florence, Italy, June 28. – July 2. 2015, p. 53.
- 2. Culka, M., Milichovský, J., Jeřábek, P., Stiborová, M., Martínek, V.:**  
Ferrous and ferric states of cytochromes P450 in intact *Escherichia coli* cells – possible role of cytochrome P450-flavodoxin interactions. Poster. Book of Abstracts of the 20. Interdisciplinary Czech and Slovak Toxicological Conference TOXCON 2015, Brno 27.-29.5.2015, s. 39. ISBN 978-80-263-0933-8
- 3. Milichovský, J., Bárta, F., Schmeiser, H., Stiborová, M., Martínek, V.:**  
Effect of active site mutations on nitroreduction and *O*-demethylation of carcinogenic aristolochic acid I by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. Poster. Book of Abstracts. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno 11.11.-12.11.2014. s. 71 (2014). ISBN 978-80-210-7340-1
- 4. Milichovský, J., Koberová, M., Stiborová, M., Martínek, V.:**  
Heterologous expression and isolation of NADH:cytochrome b<sub>5</sub>

reductase 3. Poster. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Book of Abstracts. Brno 11.11.-12.11.2014. s. 71 (2014). ISBN 978-80-210-7340-1

**5.** Dračínská, H., **Milichovský, J.**, Martínek, V., Svášková, D., Hejduková, Ž., Hodek, P., Frei, E., Stiborová, M.: Induction of cytochromes P450 1A1 and 1A2 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 by carcinogenic azo dye Sudan I. Poster. Book of Abstracts of the 17. Interdisciplinary Czech and Slovak Toxicological Conference TOXCON 2012, Stará Lesná, Slovakia, August 2012, *Interdisc. Toxicol.*, **5** (Suppl. 1), 31 (2012). ISSN 1337-6853.

**6.** **Milichovský, J.**, Stiborová, M., Martínek, V.: Heterologous expression of human CYP1A1/2 in prokaryotic system – effect of N-terminal sequence and codon usage optimization. Poster. Book of Abstracts. XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. 1.-2. 11. 2011, Brno, p. 103. ISBN 978-80-210-5594-0.