

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jakub Netolický

Molární poměr cytochromu b_5 k jeho reduktasám ovlivňuje aktivitu cytochromu P450
1A1 vůči Sudanu I

Molar ratio between cytochromu b_5 and its reductases affects activity of cytochrome
P450 1A1 towards Sudan I

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Václava Martínka, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně odcitoval.

V Praze dne 17. 5. 2017

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D.za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při konzultacích a v neposlední řadě za pomoc při zpracovávání této práce.

Abstrakt

Cytochromy P450 jsou evolučně velmi starou skupinou enzymů, která zahrnuje celou řadu isoformů a její zástupce lze najít u živočichů, rostlin, hub, bakterií i některých virů. Patří mezi enzymy katalyzující první fázi biotransformace léčiv, polutantů a jiných xenobiotik. Právě z tohoto důvodu patří mezi jedny z nejvíce zkoumaných enzymů a je snahou zmapovat jeho účinky na xenobiotika a léky.

Cytochrom P450 potřebuje pro svou funkci donory elektronů, mezi hlavní patří NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a cytochrom b₅. Alternativní reduktasou která v tomto procesu také participuje je NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasa, který je schopná redukovat cytochrom b₅. Všechny tyto tři enzymy nacházíme v membránách endoplasmatického retikula, kde spolu přirozeně interagují.

Tato práce se zaměřuje na aktivitu lidského rekombinantního cytochromu P450 1A1 vůči karcinogennímu azobarvivu Sudan I, konkrétně mapuje tvorbu hlavních metabolitů v závislosti na vzájemném poměru cytochromu b₅ k NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktase a také k NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktase.

Klíčová slova: cytochrom P450 1A1, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytochrom b₅, NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasa, Sudan I, HPLC

Abstrakt

Cytochromes P450 are an evolutionary very old group of enzymes. It spread into many isoforms that can be found in animals, plants, fungi, bacteria, and some viruses. They play a major role in the first phase of the biotransformation of drugs, environmental pollutants and other xenobiotics. Also for this reason, they belong among the most researched enzymes.

Cytochrome P450 for its function requires an electron donor, such as NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b₅. The alternative reductase involved in this process is NADH:cytochrome b₅ oxidoreductase, which is able to reduce cytochrome b₅. In a eukaryotic cell, all these membrane proteins are found in the endoplasmic reticulum membrane, where they can naturally interact.

This work evaluates the activity of human recombinant cytochrome P450 1A1 against the carcinogenic azo dye Sudan I, specifically it focuses on mapping the formation of major metabolites in relation to the ratio of cytochrome b₅ to NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase as well as to NADH:cytochrome b₅ oxidoreductase.

Keywords: cytochrome P450 1A1, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase, cytochrome b₅, NADH:cytochrome b₅ oxidoreductase, Sudan I, HPLC

[In Czech]

Obsah

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Seznam použitých zkratek..... | 7 |
| 1. Úvod..... | 8 |
| 1.1. Xenobiotika | 8 |
| 1.2. Biotransformace xenobiotik | 9 |
| 1.3. Cytochrom P450 a mechanismus jeho účinku..... | 10 |
| 1.3.1. Cytochrom 1A1 a 1A2 | 12 |
| 1.4. Cytochrom b ₅ | 13 |
| 1.4.1. Funkce membránového cytochromu b ₅ | 14 |
| 1.5. NADPH:cytochrom P450 reduktasa..... | 15 |
| 1.5.1. Mechanismus funkce NADPH: cytochrom P450 reduktasy..... | 15 |
| 1.6. NADH:cytochrom b ₅ reduktasa..... | 16 |
| 2. Cíle..... | 18 |
| 3. Materiál a metody | 19 |
| 3.1. Použitý materiál a chemikálie | 19 |
| 3.2. Výchozí lidské rekombinantní proteiny připravené Mgr. Janem Milichovským, PhD | 19 |
| 3.3. Přístroje..... | 20 |
| 3.4. Metody..... | 21 |
| 3.4.1. Purifikace cytochromu b ₅ pomocí kapalinové chromatografie..... | 21 |
| 3.4.2. Vyhodnocení frakcí z FPLC..... | 22 |
| 3.4.3. Zahuštění, výměna pufru a zjištění aktuální koncentrace cytochromu b ₅ směsného vzorku frakcí z FPLC | 22 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.4. | Elektroforéza SDS-PAGE | 24 |
| 3.4.5. | Inkorporace cytochromu b ₅ do membrány | 26 |
| 3.4.6. | Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b ₅ a CPR se Sudanu I..... | 28 |
| 3.4.7. | Inkubace systémem CYP 1A1, cytochromu b ₅ a CYB5R se Sudanu I..... | 29 |
| 3.4.8. | Vysokotlaká kapalinová chromatografie..... | 30 |
| 4. | Výsledky | 31 |
| 4.1. | Purifikace cytochromu b ₅ pomocí FPLC..... | 31 |
| 4.2. | Vyhodnocení frakcí po purifikaci pomocí FPLC a stanovení koncentrace směšného vzorku | 32 |
| 4.3. | Elektroforéza SDS-PAGE | 35 |
| 4.4. | Inkorporace cytochromu b ₅ do membrány..... | 35 |
| 4.5. | Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b ₅ a CPR se Sudanu I | 38 |
| 4.6. | Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b ₅ a CYB5R se Sudanu I..... | 42 |
| 5. | Diskuse | 45 |
| 6. | Závěr..... | 48 |
| 7. | Literatura..... | 49 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| APS | peroxosíran amonný |
| BIS | N,N-methylen-bis-akrylamid |
| CPR | NADPH:cytochrom P450 reduktasa |
| CYB5R | NADH:cytochrom b ₅ reduktasa |
| CYP | cytochrom P450 |
| DLPC | 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| FPLC | rychlá kapalinová proteinová chromatografie (z anglického: fast protein liquid chromatography) |
| GSH | Glutathion |
| HPLC | vysokotlaká kapalinová chromatografie (z anglického: high-pressure liquid chromatography) |
| IEX | iontově výměnná chromatografie (z anglického: ion exchange chromatography) |
| MFO | monooxygenasy se smíšenou funkcí (z anglického: mixed function oxidases) |
| MWCO | mezní velikost proteinů, která může membránou projít (z anglického: molecular weight cut-off) |
| NAD⁺ | nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný) |
| NADH | nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný) |
| NADP⁺ | nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný) |
| NADPH | nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný) |
| RPM | otáčky za minutu (z anglického: revolutions per minute) |
| RZ | z něm. slova Reinheitszahl poměr absorbance Soretova pásu hemoproteinu v tomto případě při 413 nm a absorbance při 280 nm |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| v/v | „volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml |
| w/v | „weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml roztoku |

1. Úvod

Cizorodé látky, takzvané xenobiotika, jsou v dnešní době přítomné všude okolo nás. Příjem xenobiotik organismem není žádoucí, nejsou prospěšné pro jeho další vývoj ani funkci a za určitých okolností mohou organismus i poškodovat. Přeměna xenobiotik v organismu se nazývá biotransformace a jejím cílem je přeměnit xenobiotikum na polární produkty, které bude možné vyloučit z organismu [1]. V rámci biotransformace většinou dojde k detoxikaci xenobiotika. U některých látek však může naopak nastat bioaktivace, při které vznikají produkty, které jsou více toxické než parentální molekula. Produkty vzniklé bioaktivací pak např. mohou zapříčinit vznik mutací v DNA, což může vést až ke vzniku zhoubných nádorů. Existují ale také xenobiotika, kterým se člověk vystavuje dobrovolně, jsou pro něj do jisté míry prospěšná, příkladem mohou být léky [2]. Významnými enzymy katalyzujícími první fázi biotransformace jsou cytochromy P450, ty ke své funkci potřebuje vhodné donory elektronů. Na interakce vybraných cytochromů P450 s proteiny, jež slouží, jako jejich donory elektronů se zaměřuje tato práce.

1.1. Xenobiotika

Xenobiotika je možné dělit podle zdrojů nebo jejich chemické povahy. Jako primárním zdrojem xenobiotik se označuje průmysl a jeho produkty. Příklady sekundárních zdrojů jsou pak zemědělství (pesticidy, herbicidy), farmacie (chemoterapeutika, psychotropní látky) a potravinářství (barviva a ochucovadla) [3].

Podle chemické povahy dělíme xenobiotika na polární a nepolární. Mezi polární xenobiotika patří např.: ionty těžkých kovů a oxidy dusíku, uhlíku a síry. Nepolární xenobiotika jsou velmi širokou skupinou, do které patří látky nazývané jako průmyslové a environmentální polutanty, například: aromatické uhlovodíky, polycyklické aromatické uhlovodíky, alifatické uhlovodíky, azobarviva, nitroaromáty, aromatické aminy, a řada dalších [4]. Mezi nepolární xenobiotika můžeme zařadit také léčiva a aditiva potravin [5].

1.2. Biotransformace xenobiotik

Nepolární xenobiotika je nutné transformovat na polárnější deriváty, aby mohly být z organismu vyloučeny. Tento proces se nazývá biotransformace. Biotransformace xenobiotik probíhá u živočichů ve dvou fázích. U rostlin je třetí fáze nazývaná druhou konjugací [6]. Není pravidlem, že xenobiotikum musí projít oběma fázemi.

Při první, derivatizační, fázi biotransformace probíhají reakce oxidační, redukční a v menší míře reakce hydrolytické. Tyto reakce mají za cíl zavedení nebo odhalení hydrofilní skupiny, která obvykle zvyšuje hydrofilitu jen nepatrně. Skupiny, které mohou být zaváděné nebo odkryté v první fázi biotransformace jsou -OH, -NH₂, -SH a -COOH [7]. Oxidační reakce katalyzují oxygenasy se smíšenou funkcí (cytochromy P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasa) a peroxidasy. Redukční reakce katalyzují NADPH:cytochrom P450 reduktasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa) a xanthinoxidasa. Hydrolytické reakce katalyzují esterasy a amidasy [8].

Při druhé, konjugační, fázi biotransformace vznikají v ideálním případě neaktivní hydrofilní sloučeniny, které mohou být následně z těla vyloučeny. Konjugace probíhá s tělu vlastními látkami, takzvanými eobiotiky. Konjugáty vznikají s kyselinou glukuronovou, aktivovaným sulfátem, acetátem, glutathionem, cysteinem a dalšími aminokyselinami jako jsou například glycin, taurin a alanin. Pro rostliny je obvyklá konjugace se sacharidy [7].

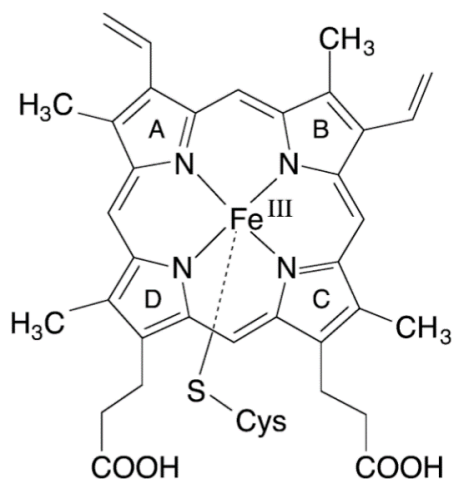
Konjugáty jsou následně vyloučeny z buňky a poté z těla buď v podobě žluči stolicí, nebo močí. Jedná se o tzv. biotransformaci detoxikační. Může však nastat biotransformace aktivační, výsledná sloučenina je toxičtější než její prekurzor. Pozitivně se využívá bioaktivace u léčiv: podáváme prekurzor účinné látky, který je enzymaticky přeměněn na účinnou látku [9].

1.3. Cytochrom P450 a mechanismus jeho účinku

V první fáze biotransformace katalyzují oxidační reakce oxygenasy (monooxygenasy) se smíšenou funkcí (MFO z anglického mixed function oxidases), v kterých jako terminální enzym funguje cytochrom P450, zkráceně CYP. CYP je evolučně velmi starý enzym s řadou isoformem, které můžeme nalézt u živočichů, rostlin, hub, bakterií ale i virů [10].

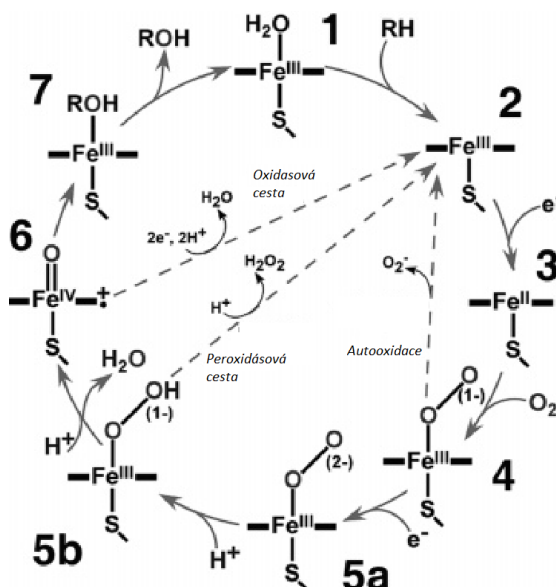
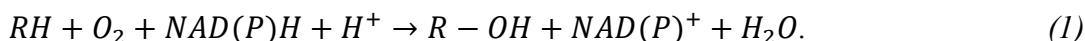
V lidském těle se nachází hlavně v játrech a v menší míře v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách [11]. V eukaryotických buňkách je integrovaný do membrány endoplasmatického retikula nebo do vnitřní membrány mitochondrie, společně s dalšími komponenty monooxygenasového systému se smíšenou funkcí, kterými jsou NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR), cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasa (CYB5R). U prokaryot jsou komponenty systému lokalizované v cytoplasmě [12].

Cytochrom P450 má porfyrinový skelet z části vázaný hydrofobními silami, pátým ligandem porfyrinového železa je sulfhydrylová skupina cysteinu (Obrázek 1). Tato vazba s cysteinem je zodpovědná za silnou absorpci při 450 nm po vzniku redukováného komplexu hemu s oxidem uhelnatým. Díky tomu také enzym získal svůj název. Šestým ligandem v základním stavu hemového železa je atom kyslíku z molekuly vody [13].



Obrázek 1 Vazba hemu se sulfhydrylovou skupinou cysteinu v aktivním centru cytochromu P450. Převzato a upraveno z [13].

Oxidační reakce, kterou katalyzuje CYP, je možné popsat rovnicí (1) celkový průběh reakce viz Obrázek 2.



Obrázek 2 Mechanismus monooxygenace cytochromem P450. Převzato a upraveno [14].

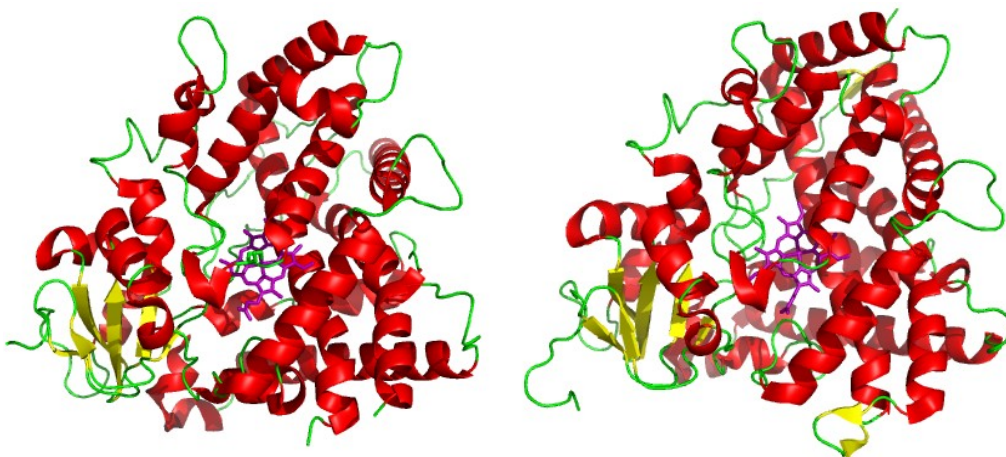
Navázání substrátu na nízkospinovou ferri-formu enzymu (1), což způsobí odstoupení molekuly vody, která je šestým ligandem hemu a změnu na vysokospinovou formu (2). Ta je prvním elektronem redukována na ferro-formu (3), v tomto kroku může dojít k navázání oxidu uhelnatého. Dále se na redukováné železo váže molekula kyslíku a vzniká oxo-ferri komplex (4), což je poslední stabilní intermediát v cyklu. Redukcí dalším elektronem vznikne peroxo-ferri forma (5b), následnou protonací vznikne hydroxoperoxo-ferri forma (5b). Redukce vzdálenějšího kyslíku a hydrolýza vede ke vzniku oxo-ferryl intermediátu (6) a vody. Závěrečným krokem je oxygenace produktu a jeho uvolnění (7). Oxidasová cesta vede od oxo-ferryl intermediátu (6) do základního vysokospinového stavu (2), bez oxygenace substrátu. Peroxidasová cesta vede přes protonaci hydroxyperoxo-ferri formy (5b) za uvolnění vodíku do základního vysokospinového stavu (2). Autooxidace oxo-ferri formy (4) vede opět do základního vysokospinového stavu (2) [15].

1.3.1. Cytochrom 1A1 a 1A2

Názvosloví cytochromů P450 (CYP) je tvořeno podle podobnosti aminokyselinové sekvence. Jsou-li proteiny homologní do 40%, patří do stejné rodiny, tu označuje první číslice (CYP1). Pokud mají proteiny homologii frekvence aminokyselin větší než 55%, patří do stejné podrodiny, která je značená velkým tiskacím písmenem (CYP1A). Poslední číslice udává pořadí v podrodině (CYP1A1) [16].

CYP1A1 a CYP1A2 (Obrázek 3) jsou si velmi podobné enzymy s vysokou homologií primární struktury. V lidském těle se CYP1A1 a CYP1A2 liší ve své lokalizaci. CYP1A1 je zastoupený v játrech v malé koncentraci, jeho koncentrace je vyšší hlavně v kůži, mozku, ledvinách tenkém střevě, placentě a plicích. CYP1A2 se vyskytuje hlavně v játrech. Oba enzymy hrají významnou roli při aktivaci prokarcinogenů [17].

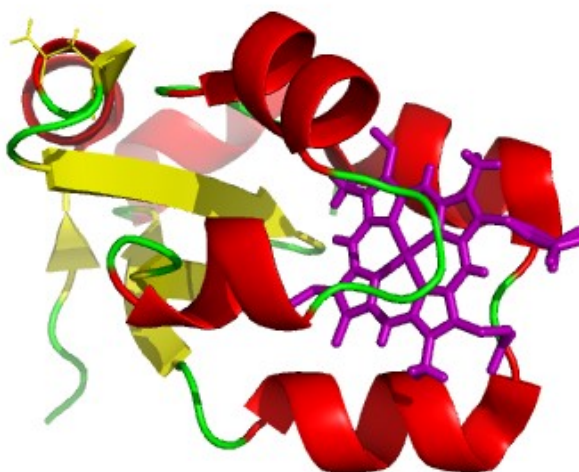
Substrátem pro CYP1A1 je například benzo[a]pyren a další polycyklické uhlovodíky, z léčiv například tamoxifen, který je využíván k léčbě rakoviny prsu. CYP1A2 katalyzuje navíc například oxygenaci heterocyklických a aromatických aminů, které vznikají jako pyrolytické produkty potravin při tepelné úpravě. Participuje také na metabolismu steroidů. Z léčiv je pro CYP1A2 substrátem například paracetamol. Oba enzymy katalyzují aktivaci genotoxických látek z cigaretového kouře [18].



Obrázek 3 CYP1A1 lidský vlevo a CYP1A2 lidský vpravo. Barevně vyznačený α -helix červeně, skládaný list žlutě a hem fialově. Vytvořeno v programu PyMol ze struktury PDB 4I8V pro CYP1A1 podle [19] a 2HI4 pro CYP1A2 podle [20].

1.4. Cytochrom b₅

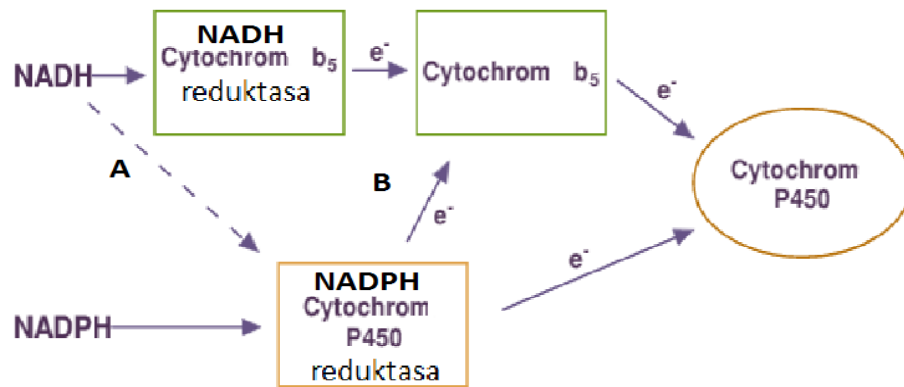
Cytochrom b₅ (Obrázek 4) je malý hemoprotein o molekulové hmotnosti okolo 17 kDa, který se vyskytuje ve třech isoformách. Jedna isoforma je solubilní a dvě jsou membránové. První membránová forma se nalézá na membráně endoplasmatického retikul, druhá na mitochondriální membráně. Solubilní forma je přítomna v červených krvinkách (erytocytech), kde se účastní přeměny methemoglobinu zpět na hemoglobin. Při tomto procesu vystupuje cytochrom b₅ jako donor elektronů [21]. Formy cytochromu b₅ asociované s membránou, jak mitochondriální, tak endoplasmatického retikula, slouží jako donory elektronů pro cytochrom P450. Cytochrom b₅ je tvořen ze dvou domén, hydrofilní N-terminální domény v cytosolu a hydrofobní C-terminální domény, které je zanořena do membrány. Hem je vázaný v cytosolární doméně v hydrofobní kapse, pomocí dvou postranních řetězců histidinu [22].



Obrázek 4 *Struktura solubilního prasečího cytochromu b₅. Barevně vyznačený α -helix červeně, skládaný list žlutě a hem fialově. Vytvořeno v programu PyMol ze struktury PDB 3X35 podle [23].*

1.4.1. Funkce membránového cytochromu b₅

Pro přenos elektronů potřebných pro CYP je cytochrom b₅ redukován pomocí NADPH:cytochrom P450 reductasy (CPR). Bylo zjištěno, že cytochrom b₅ může být redukován i pomocí NADH:cytochrom b₅ reductasy [24]. Schéma přenosu viz Obrázek 5.



Obrázek 5 Přenos elektron potřebných pro oxygenaci substrátu cytochromem P450 na membráně endoplasmatického retikula. Převzato a upraveno z [24].

Horní větev: NADH (redukováný nikotinamidadeninukleotid) je oxidováno na NAD⁺ (oxidovaný nikotinamidadeninukleotid) pomocí NADH:cytochrom b₅ reductasy, elektron je přenesen na cytochrom b₅ a následně na cytochrom P450, který oxiduje substrát.

Dolní větev: NADPH (redukováný nikotinamidadeninukleotidfosfát) je oxidováno za vzniku NADP⁺ (oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát) pomocí NADPH:cytochrom P450 reductasy, elektrony jsou následně přeneseny na cytochrom P450, který oxygenuje substrát.

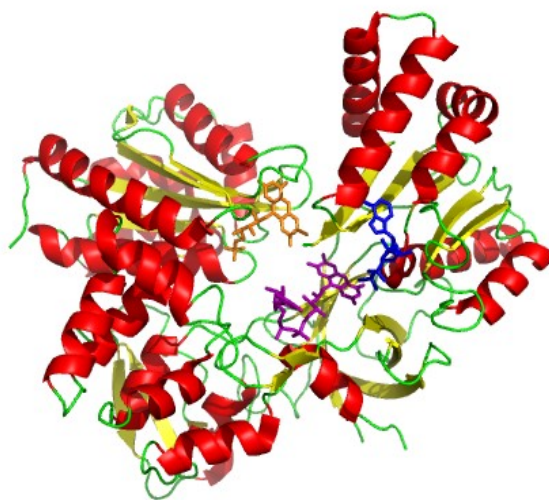
Cesta A: NADH může někdy vystupovat jako substrát pro NADPH:cytochrom P450 reductasu.

Cesta B: Elektrony z NADPH:cytochrom P450 reductasy mohou redukovat cytochrom b₅, který následně redukuje cytochrom P450.

1.5. NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CPR) je flavoprotein asociovaný s membránou endoplasmatického retikula a sloužící jako donor elektronů pro CYP. CPR váže ve své molekule oba flavinové kofaktory FAD (flavinadenindinukleotid) i FMN (flavinmononukleotid), které zprostředkovávají přenos elektronů z NADPH na hemové železo cytochromu P450 [25].

CPR se skládá z hydrofilní a hydrofobní části. Hydrofilní část obsahuje dvě domény, jedna doména obsahuje koenzym FAD a vazebné místo pro NADPH, druhá koenzym FMN. Hydrofobní část váže CPR na membránu. Struktura lidské CPR viz Obrázek 6.

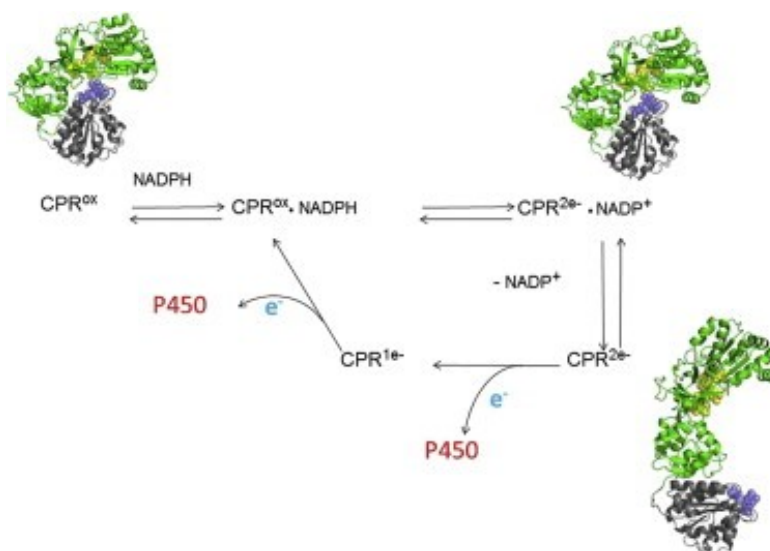


Obrázek 6 Lidská CPR. Barevně vyznačený α -helix červeně a skládaný list žlutě, modře vyznačeno navázané NADPH, fialově FAD a oranžově FMN. Vytvořeno v programu PyMol ze struktury PDB 5FA6 podle [26].

1.5.1. Mechanismus funkce NADPH: cytochrom P450 reduktasy

CPR obsahuje dva flavinové koenzymy FAD a FMN, které jsou odpovědné za přenos elektronů na cytochrom P450. Cytochrom P450 potřebuje pro svou aktivitu postupně dodat dva elektrony. Postupný přenos elektronů získaných oxidací NADPH je zprostředkován

FAD a FMN [27]. Při přenosu elektronů hraje hlavní roli isoalloxazinový kruh, což je akceptor či donor elektronů flavinových koenzymů. Díky orientaci a vzájemně blízké poloze je přenos elektronů flavinovými koenzymy velmi rychlý [28]. CPR prochází konformačními změnami při přenosu elektronů z NADPH na CYP. Tyto změny souvisí s přenosem elektronů, mezi FAD a FMN [29]. Schéma viz Obrázek 7.



Obrázek 7 Schéma přenosu elektronů a konformačních změn CPR. Na oxidované CPR se naváže NADPH. Přenesením vodíkového kationtu vznikne CPR·NADP⁺, který je kompaktní, aby mohl proběhnout přenos z FAD na FMN. Disociace NADP⁺ vede k rozšířené konformaci CPR^{2e-}, což usnadňuje přenos na CYP. Při přenosu prvního elektronu se enzym pravděpodobně vrátí do kompaktní stavu, aby umožnil přenos druhého elektronu. Převzato z [29].

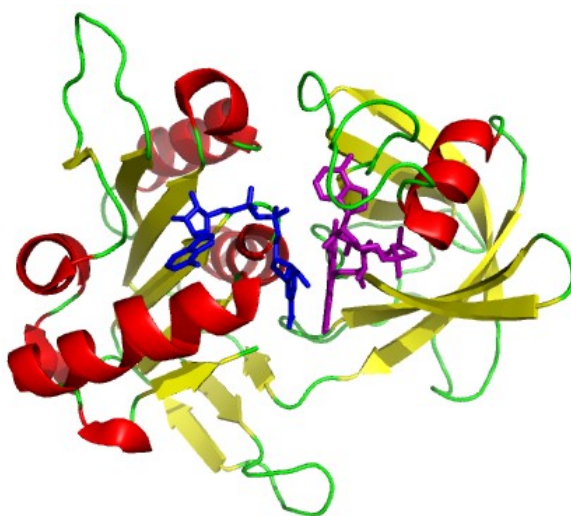
1.6. NADH:cytochrom b₅ reduktasa

NADH:cytochrom b₅ reduktasa (CYB5R) patří mezi flavoproteiny (obsahuje FAD kofaktor) může být přítomná v rozpustné nebo membránové formě. V genomu člověka se nachází čtyři geny kódující tuto reduktasu – CYB5R1, CYB5R2, CYB5R3 a CYB5R4.

CYB5R1 a CYB5R2 se podílí na elongaci a desaturaci mastných kyselin, biosyntéze cholesterolu, metabolismu léčiv. V erythrocytech je zodpovědná za regeneraci methemoglobinu zpět na hemoglobin [30].

CYB5R3 varianta 1 (membránová forma, Obrázek 8) je součástí systému MFO, kde slouží jako donor elektronu pro cytochrom b_5 , který následně přenáší elektron na CYP. Varianta 2 (solubilní forma) se nachází v erythrocytech a je zodpovědná za redukci solubilního cytochromu b_5 který dále zajišťuje redukci methemoglobinu zpět na hemoglobin. Vznikla alternativním sestřihem postrádající N-ternární helix [31].

CYB5R4 je zapojena do drah stresové odpovědi endoplasmatického retikula a hraje rozhodující roli při ochraně pankreatických B-buněk proti nahromaděným reaktivním formám kyslíku [32].



Obrázek 8 Struktura CYB5R z prasečích jater. Barevně vyznačený α -helix červeně a β -skládaný list žlutě, modře vyznačeno navázané NADH a fialově FAD. Vytvořeno v programu PyMol ze struktury PDB 3W2G podle [33].

Z hlediska metabolismu xenobiotik je nejvýznamnější CYB5R3 varianta 1, ta se skládá z části hydrofilní, která obsahuje katalytickou část enzymu a z domény hydrofobní, která váže CYB5R na membránu. Katalytickou část je možné rozdělit na dvě menší domény, N-ternární váže flavinový koenzym FAD a C-ternární váže NADH. Hydrofobní doména zprostředkovává vazbu mezi CYB5R a membránou [34].

2. Cíle

Cílem práce bylo zmapování vlivu vzájemných molárních poměrů proteinových elektronových přenašečů na oxidaci Sudanu I zprostředkovanou lidským rekombinantním cytochromem P450 1A1. V ternárních systémech obsahujících kromě zmíněného cytochromu P450 ještě cytochrom b_5 a jejich reduktasu, kterou byla buď NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa nebo NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasa.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Carl-Roth

CHAPS, Bromfenolová modř

Lach-ner

dihydrogen fosforečnan draselný, chlorid sodný, hydroxid draselný, dichlormethan, ethanol, kyselina octová, ethylacetát

Fuka

dodecylsulfát sodný (SDS),

BIO-RAD

Precision Plus Protein Unstained Standards, peroxosíran amonný

Avanti polar lipids

DLPC (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

Serva

akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 2-erkaptoethanol, Coomassie Brilliant Blue R-250

Sigma

HEPES, GSH (L-glutathion)

BDH laboratory reagent

Sudan Yellow

Penta

Methanol, glycin

3.2. Výchozí lidské rekombinantní proteiny připravené Mgr. Janem Milichovským, PhD

- Cytochrom b₅
- CYB5R
- CPR
- CYP1A1

3.3. Přístroje

| | |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| FPLC | ÄKTA prime plus se smyčkou 2 ml, GE Healthcare |
| Aparatura elektroforéza | Mini-PROTEAN Tetra cell, BIO-RAD |
| Zdroj elektroforéza | PowerPac Basic, BIO-RAD |
| Centrifugy | Hermle Z383K, Hermle Centrifuge 5415 R, Eppendorf EBA 270, Hettich |
| Spektrofotometr | Cary 60 UV-Vis, Agilent |
| Sonifikátor | Elmasonic E30H, Elma |
| Vodní lázeň | Julanbo TW2, Biotech |
| Termoblok | Termomixer compact, Eppendorf |
| HPLC | Agilent 1200 Series s DAD detektorem |
| Vakuová odparka | Acid-Resistant CentriVap Centrifugal Concentrator, Labconco |
| Kolony | HiTrap™ 1 ml Q FF, GE Healthcare Chromolith Performance RP-18e 100mM, zrnitost 4,6 mm |
| Filtr | MILLIPORE Express PLUS velikost pórů 0,22 µm |
| Koncentrátor | Pro Purification System with Ultra-0.5 Device 10 kDa, Amicon |

3.4. Metody

3.4.1. Purifikace cytochromu b₅ pomocí kapalinové chromatografie

Původní preparát cytochromu b₅ bylo nutné purifikovat. Jako první metoda byla vybrána rychlá proteinová chromatografie (FPLC, z angl. Fast Protein Liquid Chromatography). Cytochrom b₅ má isoelektrický bod při pH 4,8. Pro purifikaci byl vybrán fosfátový pufr o pH 6,0. Těmto podmínkám odpovídá použití kolony HiTrap™ 1 ml (Sepharose) Q FF.

Pro ekvilibraci kolony a následnou gradientovou eluci byly připraveny dva pufrы. Pufr A (ekvilibrační) o objemu 250 ml o složení: 30mM KH₂PO₄, 0,3% (w/v) CHAPS. Z pufru A bylo odebráno 100 ml a použito pro přípravu pufru B (eluční), u kterého bylo navíc přidáno NaCl tak aby jeho koncentrací byla 0,5M. Oba pufrы byly následně přefiltrovány přes MILLIPORE Express PLUS o velikosti pórů 0,22 μm.

Vzorky pro nástřik na FPLC byly připraveny smícháním destilované vody a pufru A v poměru 1:1 a následným naředěním zásobního cytochromu b₅ o objemu 100 μl a koncentrací 480μM na celkový objem 1 ml.

Po zapnutí FPLC stanice byly hadičky přístroje promyty destilovanou vodou a oběma pufrы. Poté byla připojena kolona HiTrap™ 1 ml Q FF a promyta destilovanou vodou, pufrы B a pufrы A. Po ustálení absorbance při 280 nm i konduktivity byl průtok zastaven a pomocí jehly s tupým hrotem byl nástříknut vzorek o objemu 1,0 ml. Do sběrače frakcí byly umístěny mikrozkuhavky a nastaveno sbírání frakcí po 1 min a průtoková rychlost 1 ml/min. Poté byl průtok obnoven, nastaven lineární gradient pufru B do 100 % na 30 min a eluát sbírán do mikrozkuhovek po 1 ml.

Po skončení gradientu pufru B a klesnutí absorbance na počáteční hodnotu byl zvýšen průtok na 1,3 ml/min, zastaveno sbírání frakcí a promyta kolona pufrы B a následně reekvilibrována pufrы A. Poté byla kolona promyta destilovanou vodou a skladovacím roztokem 30% (v/v) ethanolem a odpojena.

3.4.2. Vyhodnocení frakcí z FPLC

Podle chromatogramu z FPLC byly určeny frakce, kde se nachází cytochrom b_5 . Na spektrofotometru Cary 60 bylo proměřeno spektrum v oblasti UV-VIS a odečteny hodnoty při vlnové délce 413, 280 a 500 nm. Pro korekci absorbance pozadí byl použit vztah:

$$\Delta A_{413/280} = A_{413/280} - A_{500}, \quad (2)$$

kde $\Delta A_{413/280}$ značí korigovanou absorbanci při vlnové délce 413 nebo 280 nm. Dále byl vypočítaný tzv. RZ faktor podle vztahu:

$$RZ = \frac{\Delta A_{413}}{\Delta A_{280}}, \quad (3)$$

kde ΔA_{413} a ΔA_{280} jsou korekce absorbancí podle vztahu (2). Podle podobnosti RZ faktorů byly vybrány frakce, které byly následně převedeny do jedné zkumavky, čímž vzniknul směsný vzorek.

3.4.3. Zahuštění, výměna pufru a zjištění aktuální koncentrace cytochromu b_5 směsného vzorku frakcí z FPLC

Vybrané frakce obsahující cytochrom b_5 byly přelity do koncentrátoru o 10 000 MWCO (mezní velikost molekul, které mohou membránou projít, z anglického: Molecular weight cut-off). Vzorek byl zahuštěn centrifugací po dobu 3 min na přibližně 1,5 ml. Poté bylo přidáno 5,0 ml pufru A (30mM KH_2PO_4 , 0,3% (w/v) CHAPS). Vzorek byl zahuštěn na 1,0 ml po dobu 3 min. Další zahuštění proběhlo s přidavkem 5 ml fosfátového pufru (pH 7,4, 100mM KH_2PO_4) na objem 1 ml. Nakonec bylo přidáno 5 ml fosfátového pufru o stejném složení a směsný vzorek byl zahuštěn na objem 250 μl . Parametry centrifugace viz Tabulka 1.

Tabulka 1 Parametry centrifugace - zahuštění a výměna pufru.

| | |
|-------------------------------|--------------|
| centrifuga | Hermle Z383K |
| typ rotoru | výkyvný |
| otáček za minutu (RPM) | 4000 |
| teplota | 4 °C |

Koncentrace cytochromu b₅ byla zjišťována pomocí spektrofotometru Cary 60. Nejdříve bylo změřeno spektrum v oblasti UV-VIS zásobního roztoku cytochromu b₅ o známé koncentraci 480 μM. Směsný vzorek připraven zahuštěním frakcí byl naředěn 300,5x. Poté bylo změřeno spektrum a vypočtena korigovaná absorbance při 413 nm pro oba vzorky podle vztahu (2) na straně 22. Výpočet koncentrace byl proveden podle vztahu:

$$c_{vz} = \frac{c_{zás}}{\Delta A_{zás}} * \Delta A_{vz} * \text{ředění}, \quad (4)$$

kde c_{vz} je koncentrace vzorku, $c_{zás}$ je koncentrace zásobního cytochromu b₅, $\Delta A_{zás}$ je korigovaná absorbance zásobního cytochromu b₅, ΔA_{vz} je korigovaná absorbance vzorku a ředění je kolikrát byl vzorek před měřením absorbance zředěn.

Dále byla koncentrace ověřena pomocí korigované absorbance při 280 nm. Extinkční koeficient lidského cytochromu b₅ (P00167) byl predikován pomocí programu ProtParam. Pro výpočet byl využit vztah odvozený z Lambert-Beerova zákona:

$$c = \frac{\Delta A_{280}}{l \cdot \varepsilon} * \text{ředění}, \quad (5)$$

kde c je koncentrace cytochromu b₅, l je šířka kyvety a ε je extinkční koeficient cytochromu b₅ při vlnové délce 280 nm.

3.4.4. Elektroforéza SDS-PAGE

SDS-PAGE je zkratka pro elektroforézu v prostředí polyakrylamidového gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Tato metoda se používá pro dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti.

Skla byla odmaštěna lihem a umístěna do držáků pro nalévání gelů. Správnost složení nalévací aparatury byla zkontrolována pomocí destilované vody. Voda byla ze skel vylita a byl připraven 12% dělicí gel (složení viz Tabulka 2). Připravený gel byl opatrně pipetován mezi skla. Pro vyrovnání hladiny a urychlení tuhnutí byl převrstven destilovanou vodou. Po 20 minutách byla voda vylita a odsáta filtračním papírem. Během tuhnutí dělicího gelu byl připraven 5% zaostřovací gel (složení viz Tabulka 2) a následně pipetován mezi skla. Do zaostřovacího gelu byl umístěn plastový hřeben, který vytvořil jamky pro aplikaci vzorků. Po patnácti minutách bylo sklo vyndáno z držáku a umístěno do elektroforetické aparatury a následně do vaničky. Do vnitřní části aparatury byl nalit elektroodový pufr o složení: 0,025M Tris-HCl (pufr tvořený Tris, pH upraveném pomocí HCl), 0,192M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Poté byl vyndán hřeben a dolit pufr až po okraj aparatury. Vanička byla naplněna po rysku pro objem pufru pro 2 gely.

Tabulka 2 Složení gelů pro SDS-PAGE pro jedno sklo.

| | 12% dělicí gel | 5% zaostřovací gel |
|----------------------------------------------------------|----------------|--------------------|
| Voda [ml] | 1,6 | 1,4 |
| Polymerační roztok (30%w/v akrylamid, 0,8% w/v BIS) [ml] | 2,0 | 0,33 |
| 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) [ml] | 1,3 | 0 |
| 1,5M Tris-HCl (pH 6,8) [ml] | 0 | 0,25 |
| 10% (w/v) SDS [μl] | 50 | 20 |
| 10% (w/v) peroxosíran amonný (APS) [μl] | 50 | 20 |
| TEMED [μl] | 2 | 2 |

Pro přípravu vzorků byl použit 4x koncentrovaný vzorkový pufr (0,25M Tris-HCL, 20% (v/v) 2-merkптоethanol, 40% (v/v) glycerol, 8 (v/v) SDS, 0,012% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8), složení vzorků viz Tabulka 3.

Tabulka 3 Objemy pro přípravu vzorků SDS-PAGE.

| | Vzorek [μl] | Vzorkový pufr [μl] | Destilovaná voda [μl] | Celkový objem [μl] |
|----------------------|--------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Frakce | 10 | 13 | 27 | 50 |
| Směsný vzorek | 1 | 13 | 36 | 50 |

Připravené vzorky byly 20 min povařeny a následně centrifugovány na stolní centrifuze. Do jamek gelu byl mikrostřičkačkou Hamilton aplikován nejdříve standard (Precision Plus Protein Unstained Standards) a dále po 20 μl vzorků vybraných frakcí a 10 μl směsného vzorku. Po aplikaci vzorků byla elektroforetická aparatura připojena ke zdroji, na kterém byl nastaven konstantní proud 200 V po dobu 70 minut.

Po doběhnutí elektroforézy byla aparatura odpojena od zdroje, skla s gelem vyjmuty a opatrně rozlepeny. Gel byl ze skel odlepen, zaostřovací gel, byl odříznut. Dělicí gel byl na 5 hodin vložen do barvicí lázně složené z: 0,25%(w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyseliny octové. Následně byl gel umístěn na míchačce do odbarvovací lázně o složení: 25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová. Po 1 hodině byla odbarvovací lázeň vyměněna a gel byl ponechán již bez míchání v malém množství odbarvovací lázně přes noc. Následující den byla odbarvovací lázeň slita a nahrazena vodou.

3.4.5. Inkorporace cytochromu b₅ do membrány

Pro přípravu 150 µl liposomů bylo pipetováno 30 µl DLPC v CH₂Cl₂ o koncentraci 5 mg/ml do čisté skleněné lahvičky. CH₂Cl₂ bylo odpařeno za laboratorních podmínek. Následně bylo přidáno:

- 15 µl HEPES o koncentraci 500mM (pH 7,4)
- 105 µl destilované vody
- 15 µl CHAPS o koncentraci 0,5 mg/ml
- 15 µl GSH o koncentraci 30 mg/ml

Poté byla lahvička s roztokem sonifikována 3x30 sekund na sonifikátoru Elmasonic E30H.

Pro stanovení vhodné délky inkubace byl zvolen molární poměr cytochromu b₅ ku DLPC 1:179. Nejdříve byl připraven premix liposomů s fosfátovým pufrem. Tento roztok byl rozdělen do čtyř mikrozkuvek a 10 minut preinkubován při teplotě 36 °C na míchačce Termomixer compact. Poté bylo do třech mikrozkuvek přidáno dané množství cytochromu b₅. Následně byly inkubace zastavovány po 5, 10 a 20 minutách, 2 minut schlazeny na ledu a centrifugovány po dobu 2 min. Supernatant byl proměřen na Cary 60. Roztok samotných lipidů ve čtvrté zkumavce byl také inkubován, centrifugován a supernatant proměřen na Cary 60. Parametry centrifugace viz Tabulka 5 na straně 27. Nejvhodnější čas byl použit v následujícím stanovení vhodného molárního poměru cytochromu b₅ ku DLPC.

K vyhodnocení byla použita upravená korekce zákalu způsobeného liposomy. Ta byla odvozena na základě měření bez cytochromu b₅ ve tvaru:

$$\Delta A_{413\text{cor}} = A_{413} - \left(\frac{A_{365} + A_{475}}{2} \right) , \quad (6)$$

kde $\Delta A_{413\text{cor}}$ je korigovaná absorbance při 413 nm (A_{413}). $\Delta A_{413\text{cor}}$ je zmenšena o průměr absorbancí při 365 nm (A_{365}) a při 475 nm (A_{475}).

Následovalo stanovení vhodného molárního poměru cytochromu b_5 :DLPC. Nejdříve byl připraven premix cytochromu b_5 s fosfátovým pufrem a systém s liposomy. Tento roztok byl proměřen na spektrofotometru Cary 60 a rozdělen do mikrozkušavek a nechán 10 minut preinkubovat na míchačce Termomixer compact. Poté byl přidán objem liposomů odpovídající molárnímu poměru. Složení vzorků viz Tabulka 4.

Tabulka 4 Objemy vzorků pro stanovení vhodného molárního poměru cytochromu b_5 a DLPC.

| Molární poměr cytochrom b_5:DLPC | Objem premixu (cytochrom b_5 a 100mM fosfátový pufr) [μl] | Objem liposomů [μl] |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1:0 | 600 | 0 |
| 1:90 | 590,7 | 9,3 |
| 1:179 | 581,7 | 18,3 |
| 1:300 | 562,7 | 37,3 |

Vzorky s přidávanými liposomy byly ponechány inkubovat po dobu 5 min, 2 minut schlazeny na ledu a následně centrifugovány po dobu 2 min za podmínek viz Tabulka 5.

Tabulka 5 Parametry centrifugace interakce cytochromu b_5 s membránou.

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| centrifuga | Centrifuge 5415 R |
| typ rotoru | úhlový |
| otáček za minutu (RPM) | 13 200 |
| čas | 2 min |
| teplota | 4 °C |

Po centrifugaci byly mikrozkušavky opatrně vyndány, byl odebrán supernatant a změřena jeho absorbance na Cary 60.

3.4.6. Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b₅ a CPR se Sudanu I

Bylo pipetováno 52 µl DLPC v CH₂Cl₂ o koncentraci 5 mg/ml do skleněné lahvičky. Za laboratorní teploty bylo CH₂Cl₂ odpařeno. Následně bylo přidáno:

- 26,0 µl HEPES o koncentraci 500mM (pH 7,4)
- 172,1 µl destilované vody
- 26,0 µl CHAPS o koncentraci 0,5 mg/ml
- 26,0 µl GSH o koncentraci 30 mg/ml
- 9,9 µl CYP1A1 o koncentraci 52,7µM

Před přidáním CYP1A1 byla lahvička s roztokem sonifikována 3x30 sekund na sonifikátoru Elmasonic E30H.

Byly připraveny premixy fosfátového pufru (100mM, pH 7,4) s rekonstituovaným systémem CYP1A1. Premixy byly nechány preinkubovat 10 min v 36 °C ve vodním inkubátoru Julanbo TW2. Následně byl přidán cytochrom b₅ v daném poměru a premixy nechány preinkubovat dalších 5 min. Poté byl přidán daný objem CPR a necháno preinkubovat 2 min. Reakce byla startována přidáním koenzymu NADPH o koncentraci 10mM a roztoku Sudanu I v methanolu o koncentraci 5mM. Inkubace probíhala 20 min při 36 °C. Byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a důkladným promícháním na vortexu. Následně byly zkumavky centrifugovány za podmínek viz Tabulka 6.

Tabulka 6 Parametry centrifugace extrakce Sudanu I.

| | |
|-------------------------------|---------|
| centrifuga | EBA 270 |
| typ rotoru | výkyvný |
| otáček za minutu (RPM) | 3000 |
| čas centrifugace | 10 min |

Po centrifugaci bylo odebráno do mikrozkušavek 750 μ l ethylacetátové fáze. Ethylacetát byl za 30 minut odpařen na vakuové odparce Acid-Resistant CentriVap Centrifugal Concentrator při 32 °C.

3.4.7. Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b₅ a CYB5R se Sudanu I

Bylo pipetováno 60 μ l DLPC v CH₂Cl₂ o koncentraci 5 mg/ml do skleněné lahvičky. Za laboratorní teploty bylo CH₂Cl₂ odpařeno. Následně bylo přidáno:

- 30 μ l HEPES o koncentraci 500mM (pH 7,4)
- 198,6 μ l destilované vody
- 30 μ l CHAPS o koncentraci 0,5mg/ml
- 30 μ l GSH o koncentraci 30 mg/ml
- 11,39 μ l CYP1A1 o koncentraci 52,7 μ M

Před přidáním CYP1A1 byla lahvička s roztokem sonifikována 3x30 sekund na sonifikátoru Elmasonic E30H.

Inkubace byly připraveny v různých molárních poměrech cytochromu b₅ a CYB5R. Nejdříve byly připraveny premixy fosfátového pufru (100mM, pH 7,4) s rekonstituovaným systémem CYP1A1 a nechán preinkubovat 12 min v 36 °C ve vodním inkubátoru Julanbo TW2. Poté byl přidán daný objem cytochromu b₅ a ponecháno preinkubovat 5 min. Následně byly premixy rozděleny do inkubačních zkumavek a byl přidán daný objem solubilní CYB5R. Reakce byla startována přidáním koenzymu NADH o koncentraci 10mM a roztoku Sudanu I v methanolu o koncentraci 5mM. Inkubace probíhala 20 min při 36 °C a byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a důkladným promícháním na vortexu. Následně byly zkumavky centrifugovány za podmínek viz Tabulka 6 str. 28.

Po centrifugaci bylo odebráno do mikrozkušavek 750 μ l ethylacetátové fáze. Ethylacetát byl za 30 minut odpařen na vakuové odparce Acid-Resistant CentriVap Centrifugal Concentrator při 32 °C.

3.4.8. Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Po odpaření na vakuové odparce bylo k vzorkům přidáno 100 μ l methanolu, mikrozkušavky byly důkladně zamíchány pomocí vortexu a následně byly krátce stočeny na stolní centrifuze, přeneseny do skleněných lahviček a proměřeny na HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie z anglického: high-pressure liquid chromatography). Metoda měření pomocí HPLC viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Parametry chromatografie na HPLC.

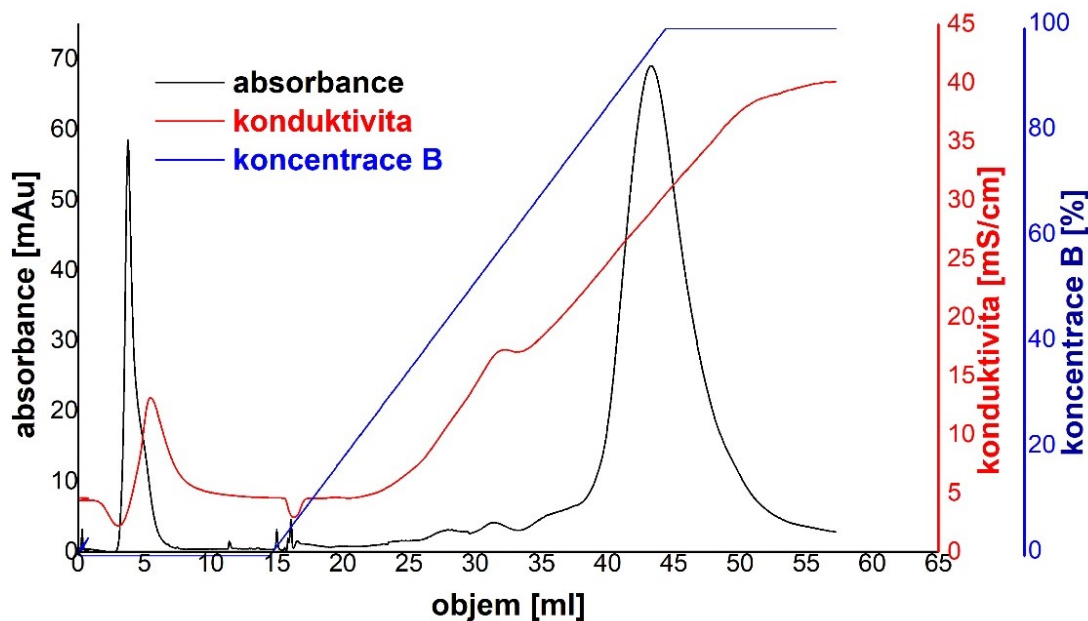
| | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------|
| HPLC | Agilent 1200 Series s DAD detektorem |
| kolona | Chromolith Performance RP-18e 100 mM, zrnitost 4,6 mm |
| mobilitní fáze | 75% methanol |
| nástřik | 40 μ l |
| doba metody | 10 min |
| průtoková rychlost | 1,5 ml/min |
| teplota kolony | 35 °C |
| detekce | 480 nm |

4. Výsledky

4.1. Purifikace cytochromu b₅ pomocí FPLC

Než byly zahájeny pokusy o stanovení aktivity CYP1A1 v ternárním systému obsahujícím různé poměry CYP1A1, cytochromu b₅ a jedné z reduktas, byl nejprve přečištěn preparát lidského rekombinantního cytochromu b₅. Všechny tyto rekombinantní proteiny byly již dříve izolovány pomocí metalo-afinitní chromatografie. Cytochrom b₅ má však poměrně nízkou afinitu k hemu tak je během rychlé exprese často přítomen jako apo-forma, tedy bez hemu [35]. Ten je sice před izolací přidán dodatečně, přesto nelze přítomnost apoformy v takto získaném preparátu vyloučit. Proto byla provedena dodatečná purifikace pomocí iontově výměnné chromatografie (IEX), která je schopna apo- a holo-formu oddělit.

Pro purifikaci bylo zvoleno provedení IEX pomocí rychlé kapalinové proteinové chromatografie, zkráceně nazývané FPLC. Pro eluci cytochromu b₅ byl zvolen gradient iontové síly. pH pufrů bylo zvoleno nad isoelektrickým bodem, čímž byl proteinu udělen záporný náboj a jako stacionární fáze byl použit anex v podobě kolony naplněné Q Sepharosou. Typický chromatogram viz Obrázek 9. Z chromatogramu je patrné, že zařazením purifikačního kroku (IEX) bylo odstraněno nezanedbatelné množství nečistot.



Obrázek 9 Chromatogram purifikace cytochromu b_5 pomocí FPLC.

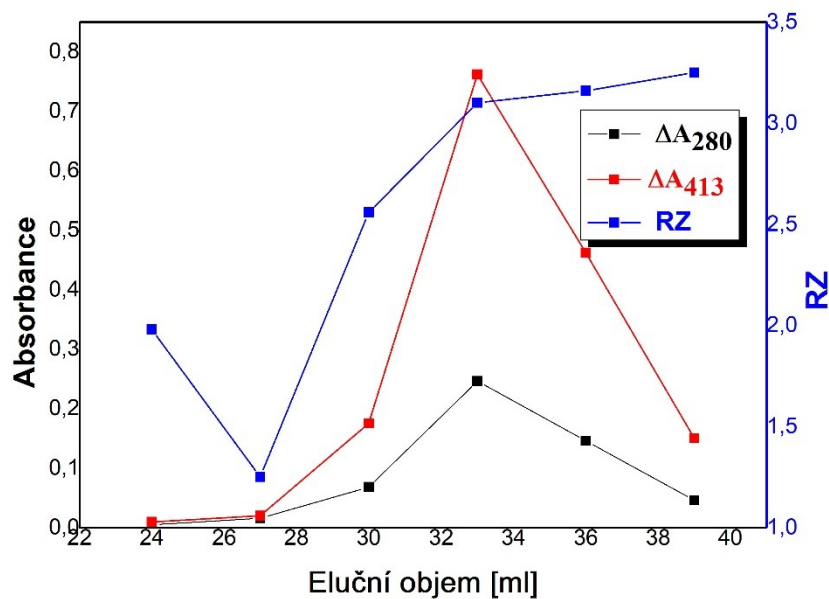
4.2. Vyhodnocení frakcí po purifikaci pomocí FPLC a stanovení koncentrace směšného vzorku

Bylo vybráno několik frakcí podle chromatogramu (Obrázek 9), kde byla detekována vysoká absorbance při vlnové délce 280 nm. Vybrané frakce byly následně spektroskopicky charakterizovány pomocí Cary 60. Tabulka 8 obsahuje hodnoty absorbancí odpovídajících proteinové (280 nm) a hemové složce (413 nm), s jejich pomocí byl pro jednotlivé frakce podle vztahů (2) a (3) (oba vztahy na straně 22) určen faktor RZ. Holoforma by měla vykazovat hodnoty RZ nad 2,5.

Tabulka 8 Vyhodnocení frakcí po purifikaci na FPLC.

| frakce | A_{280} | A_{413} | A_{500} | ΔA_{280} | ΔA_{413} | RZ |
|--------|-----------|-----------|-----------|------------------|------------------|------|
| 24 | 0,00486 | 0,00951 | 0,00012 | 0,00474 | 0,00939 | 1,98 |
| 27 | 0,0172 | 0,0212 | 0,00128 | 0,0159 | 0,0199 | 1,25 |
| 30 | 0,0756 | 0,182 | 0,00737 | 0,0682 | 0,175 | 2,56 |
| 33 | 0,282 | 0,798 | 0,0359 | 0,246 | 0,762 | 3,10 |
| 36 | 0,167 | 0,483 | 0,0207 | 0,146 | 0,462 | 3,16 |
| 39 | 0,0492 | 0,153 | 0,00308 | 0,0461 | 0,150 | 3,25 |

Z hodnot korigovaných absorbancí a vypočteného RZ faktoru byl následně sestaven graf závislosti absorbance resp. RZ faktoru na elučním objemu (Obrázek 10). Frakce s hodnotou RZ faktoru nižší než 2,5 obsahovaly nezanedbatelné množství holoformy cytochromu b_5 a nebyly proto do finálního preparátu zahrnuty.



Obrázek 10 Graf závislosti absorbance na elučním objemu pro jednotlivé vybrané frakce z purifikace pomocí FPLC.

Koncentrace cytochromu b₅ ve finálním preparátu byla stanovena dle korigované absorbance při 413 nm pomocí známé koncentrace původního zásobního vzorku. Naměřené hodnoty viz Tabulka 9.

Tabulka 9 Hodnoty absorbancí potřebné pro určení koncentrace směšného vzorku.

| | A₂₈₀ | A₄₁₃ | A₅₀₀ | ΔA₂₈₀ | ΔA₄₁₃ |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Zásobní vzorek 1mM | - | 0,114 | 0,0386 | - | 0,0754 |
| Směšný vzorek | 0.00331 | 0,0124 | -0.00059 | 0,0390 | 0,0124 |

Koncentrace byla vypočtena podle vztahu (4) na straně 23.

$$c_{vz} = \frac{1}{0,0754} * 0,0124 * 300,5 = 49,4\mu M .$$

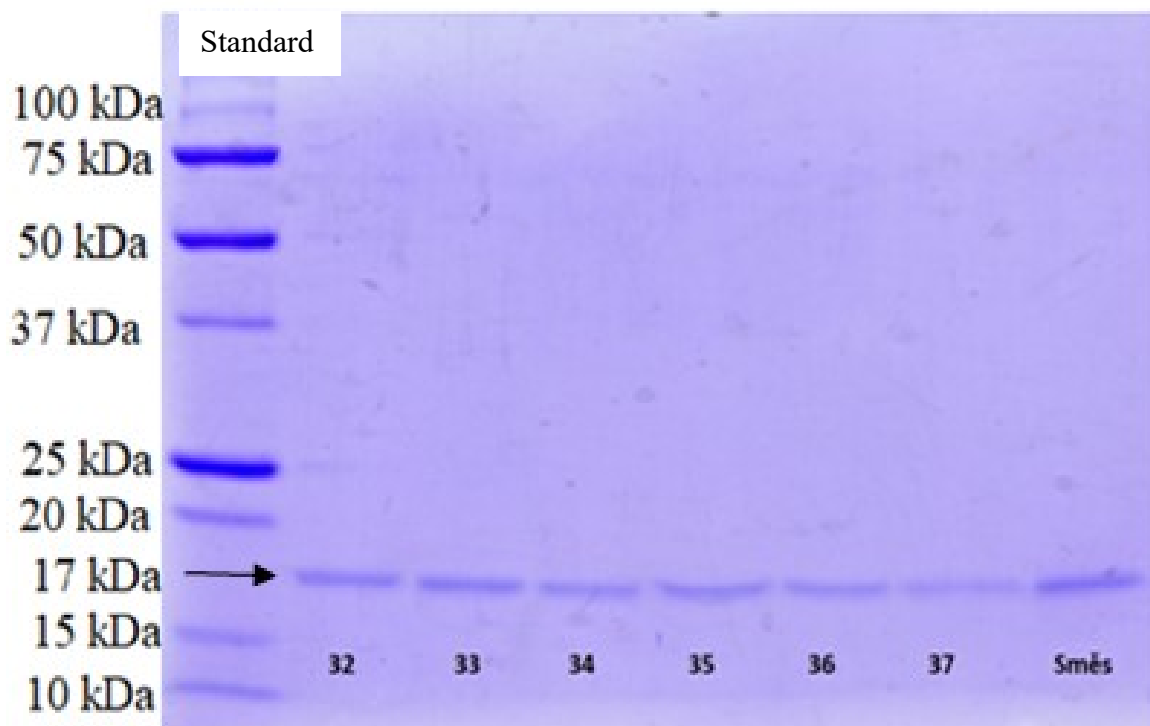
Pro ověření byl paralelně použit nezávislý výpočet koncentrace proteinu z Lambert-Beerova zákona pomocí vztahu (5) na straně 23. Extinkční koeficient lidského cytochromu b₅ (P00167) byl predikován na základě jeho aminokyselinové sekvence pomocí programu ProtParam: $\varepsilon = 29450 M^{-1}cm^{-1}$.

$$c = \frac{\Delta A_{280}}{l \cdot \varepsilon} * \text{\textit{\textacute{redění}}} = \frac{0,00390}{1 \cdot 29450} * 300.5 = 39,8\mu M$$

Změřené hodnoty se liší zhruba o 20% a v dalších experimentech byla používána nižší hodnota tedy 39,8μM.

4.3. Elektroforéza SDS-PAGE

Pro ověření čistoty cytochromu b_5 ve vybraných frakcích a ve směsném vzorku byla zvolena SDS-PAGE elektroforéza. Z gelu (Obrázek 11) je vidět, že ve všech vzorcích se nachází prakticky jen protein o molekulové hmotnosti odpovídající cytochromu b_5 .

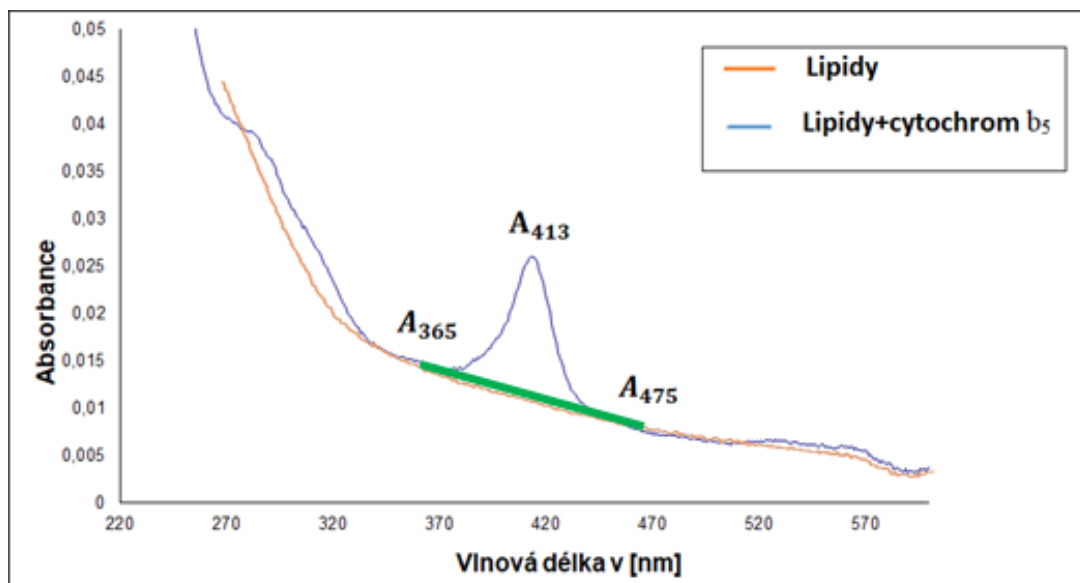


Obrázek 11 Gel elektroforéza SDS-PAGE s vyznačenou molekulovými hmotnostmi standardu a molekulovou hmotností cytochromu b_5 (17 kDa) jsou označeny číslem frakce. Směs je směsný vzorek.

4.4. Inkorporace cytochromu b_5 do membrány

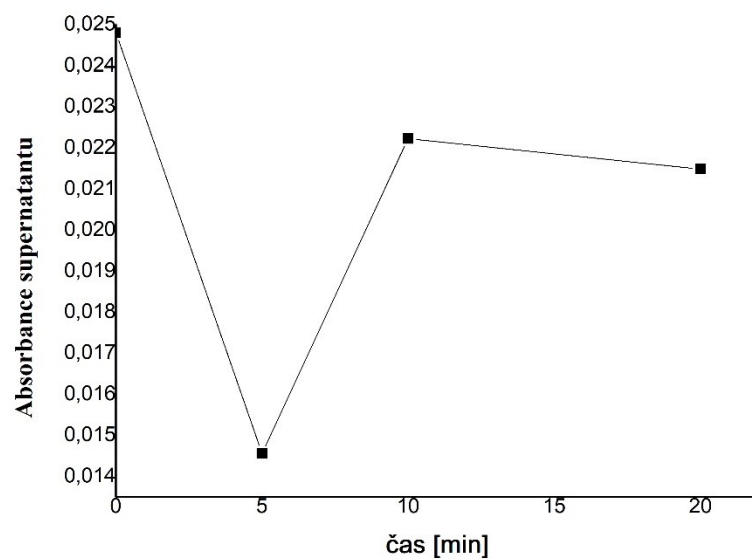
Dále byla ověřena schopnost cytochromu b_5 inkorporovat se za daných podmínek do liposomální membrány. Ohledně inkorporace cytochromu b_5 do membrány byly provedeny dva pokusy, jeden pro určení nejkratšího času potřebného pro inkorporaci cytochromu b_5 do membrány a druhý pro zjištění vhodného rozmezí z hlediska molárního poměru cytochromu b_5 k DLPC.

Nejdříve byly nalezeny podmínky, které umožní rychlé spektroskopické stanovení koncentrace cytochrom b_5 i v přítomnosti proměnlivého množství zákalu (liposomů), způsobujícího rozptyl světla v měřené oblasti. Byl nejprve změřen zásobní roztok liposomů, podle kterého byla nalezena optimální korekce zákalu v dané oblasti kolem 410 nm podle vztahu (6) na straně 26. Spektra pro samotné liposomy a pro liposomy s cytochromem b_5 po 5 minutách inkubace s grafickým zobrazením použité korekce je zobrazeno na grafu (Obrázek 12).



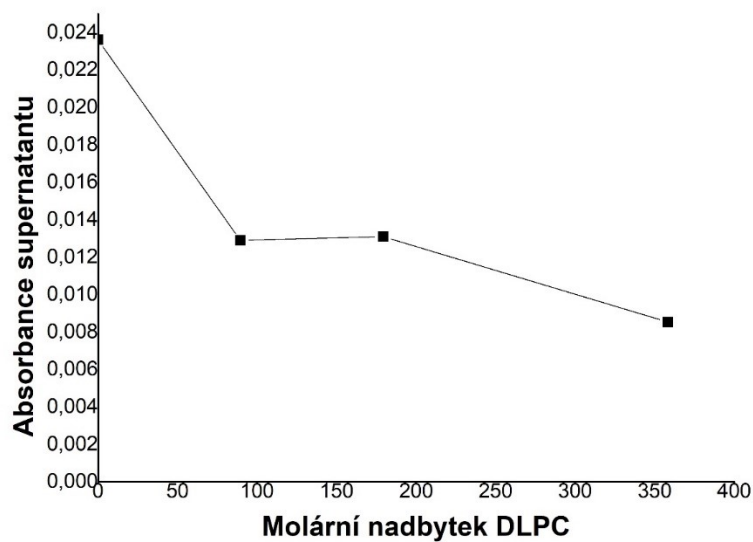
Obrázek 12 Naměřené spektrum pro lipidy bez cytochromu b_5 (oranžové) a pro inkubaci liposomů a cytochrom b_5 (modré s maximem při 413 nm) a vyznačenou korekcí zákalu (zelená přímka) s vyznačenými absorbancemi využitými k jejímu výpočtu.

Pro určení času nezbytného pro inkorporaci byl zvolen molární poměr cytochromu b_5 a DLPC 1:179. Časy inkubace byly 5, 10 a 20 min. Graf závislosti korigované absorbance (podle vztahu (6) na straně 26) na čase je zobrazena v grafu (Obrázek 13). U vyšších časů se absorbance výrazně zvýšila důsledkem přibývajícimu množství cytochromu b_5 v supernatantu, pravděpodobně vlivem vyvazování z membrány. Při delší době inkubace pravděpodobně tedy cytochrom b_5 nezůstává inkorporovaný v liposomech. Pro další pokusy byla zvolena doba inkubace s liposomy 5 min, jako dostačující.



Obrázek 13 Graf závislosti korigované absorbance supernatantu na době inkorporace cytochromu b_5 do membrány.

Po zjištění optimálního času pro inkubaci cytochromu b_5 s liposomy byl proveden pokus s různými molárními poměry cytochromu b_5 a DLPC (Obrázek 14).

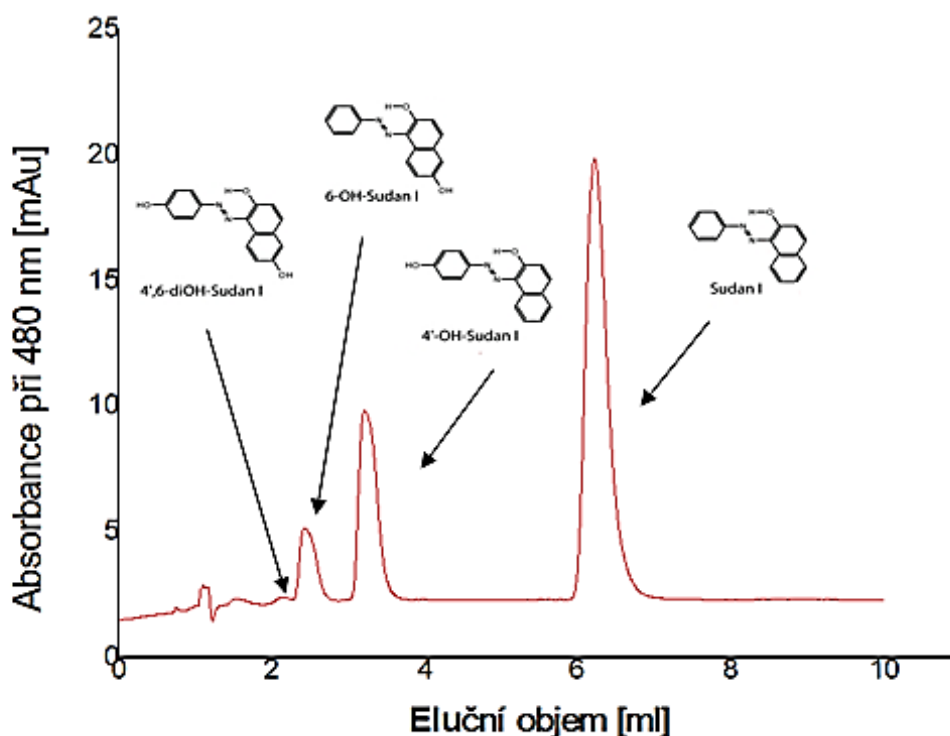


Obrázek 14 Graf závislosti absorbance supernatantu na molárním nadbytku DLPC.

Z uvedeného grafu vyplývá, že i při nejnižším poměru 1:90 se do membrány zabuduje již cca 50% cytochromu b_5 , s dalším přidavkem lipidů pak množství cytochrom b_5 v supernatantu klesá jen pozvolna. Mezi poměry 1:90 až 1:179 je závislost přibližně konstantní. Při nejvyšší koncentraci DLPC pak je v membráně vázáno cca 66% cytochromu b_5 . Následné experimenty byly prováděny za podmínek, kdy poměr dosahoval hodnot 1:8,6 až 1:257.

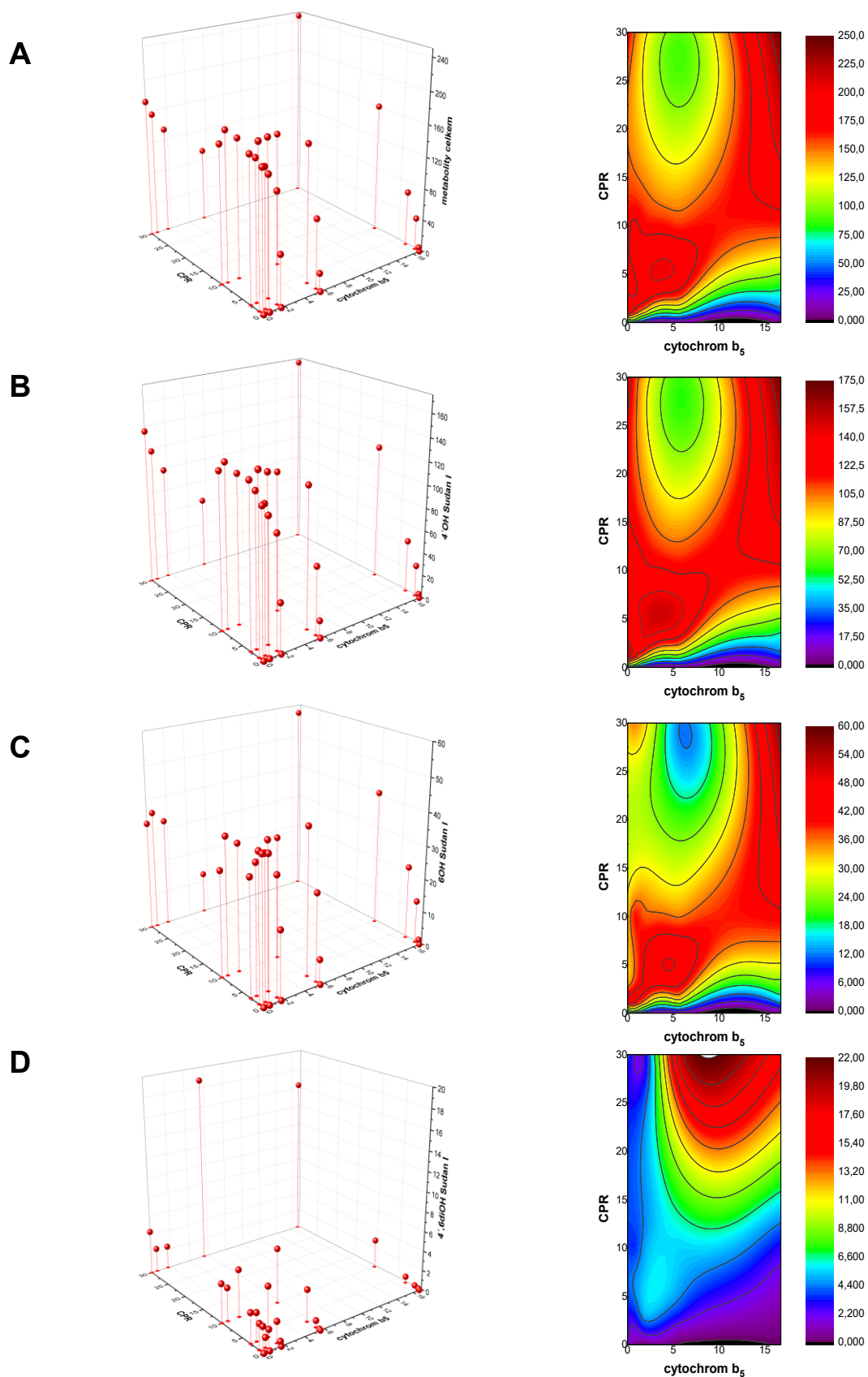
4.5. Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b_5 a CPR se Sudanu I

Pro stanovení hydroxylační aktivity CYP1A1 při různých poměrech CPR a cytochromu b_5 bylo použito azobarvivo Sudan I. Analýza byla provedena pomocí HPLC. Typický chromatogram s označenými píky jednotlivých metabolitů Sudanu I viz Obrázek 15.



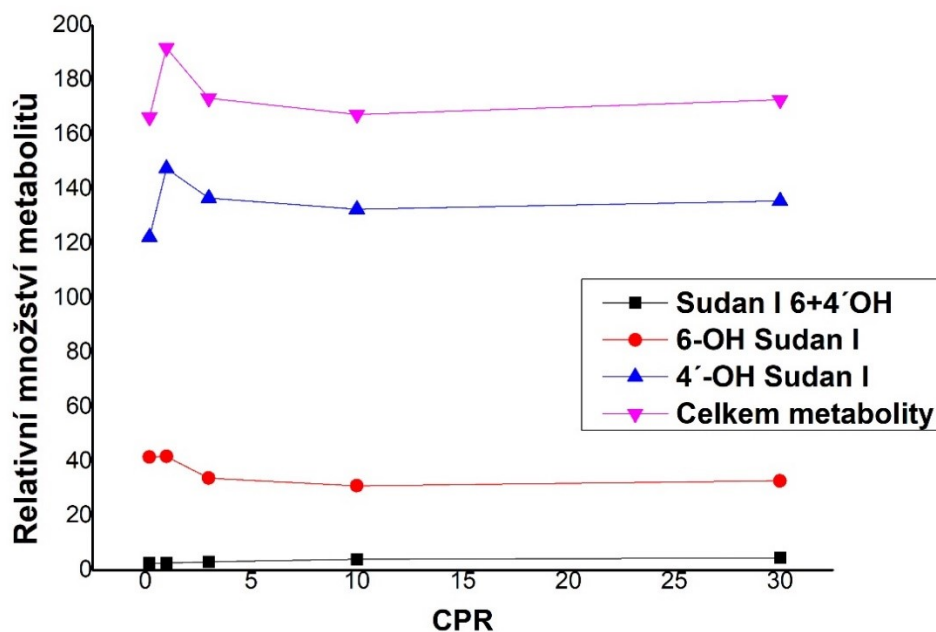
Obrázek 15 Typický chromatogram eluce Sudanu I a jeho metabolitů, vzniklých oxygenací CYP1A1.

Protože ternární systém CYP1A1:CPR:cytochrom b_5 je vůči Sudanu I velmi aktivní, byl zde detekován kromě předpokládaných metabolitů 4'OH Sudanu I a 6OH Sudanu I i dihydroxyderivát 4',6diOH Sudan I. Závislost množství tvořených hydroxyderivátů je prezentována prostřednictvím 3D grafu (Obrázek 16 – levý sloupec) a také po vyhlazení prostřednictvím konturového grafu, na němž je třetí rozměr zobrazen formou barevného gradientu (Obrázek 16 – pravý sloupec). Na těchto grafech je nejvyšší účinnost systému zobrazena červeně a nejnižší fialově. Nejnižší (nulová) účinnost systému je dle očekávání při nulové koncentraci CPR. Nejvyšší je pak u primárních derivátů při nejvyšší koncentraci CPR a cytochrom b_5 . Na první pohled je však patrné, že závislost v prostoru mezi těmito extrémními hodnotami není triviální. Tvar závislosti je u primárních derivátů dosti podobný; vysoké hodnoty aktivity nacházíme při poměru CYP1A1:cytochrom b_5 :CPR 1:5:5. Překvapivé bylo zjištění, že v horní části grafů pro celkový součet metabolitů, 4'OH Sudan I a 6OH Sudan I je vidět lokální minimum při molárním poměru 1:5:25, to je nejhlubší u množství 6OH Sudanu I. Pravděpodobně se však nejedná o inhibici reakce při tomto složení ternárního systému, ale o důsledek přeměny monohydroxy derivátů na dihydroxyderivát 4',6diOH Sudan I, který právě za těchto podmínek vzniká nejrychleji (Obrázek 16D). Vzhledem k vyššímu poklesu koncentrací 6OH Sudanu I, za těchto podmínek lze předpokládat, že dihydroxyderivát vzniká především z něj.



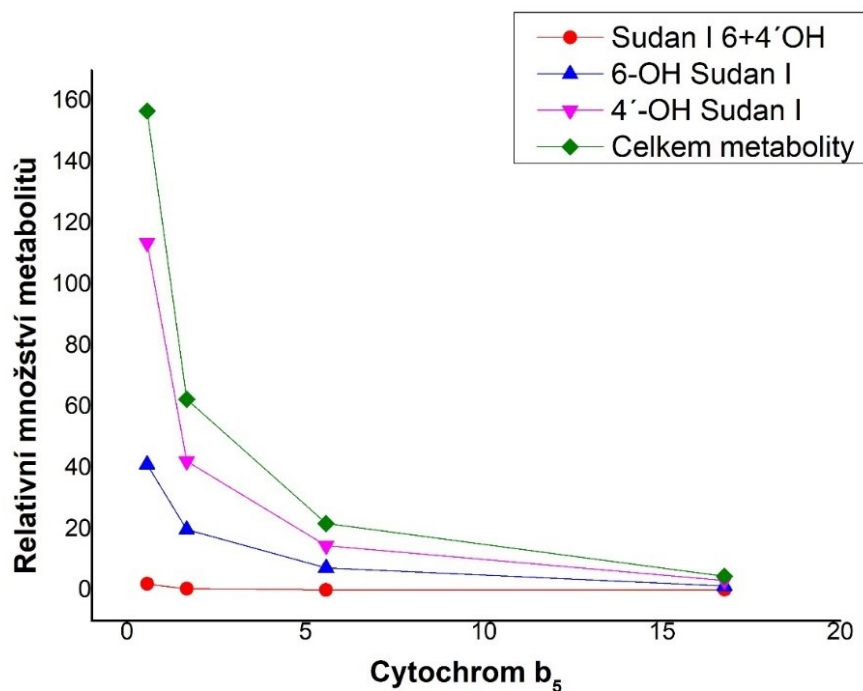
Obrázek 16 Grafy přeměny Sudanu I pro dané poměry cytochromu b_5 a CPR v pořadí: celkový součet metabolitů (A), 4'OH Sudan I (B), 6OH Sudan I (C), 4'+6diOH Sudan I (D). Vlevo 3D grafy a vpravo konturové grafy pro jednotlivé metabolity.

Zajímavé jsou také mezní situace, kdy se množství jedné či druhé proteinové složky blíží nule. Jelikož CPR dokáže redukovat CYP i bez přítomnosti cytochromu b_5 byly do pokusu zařazeny i poměry, s nulovým zastoupením cytochromu b_5 , výsledné hodnoty pro tyto poměry jsou zobrazeny na grafu, viz Obrázek 17. Jak je vidět, bez přítomnosti cytochrom b_5 nemá i velký nadbytek CPR na reakci prakticky, žádný vliv.



Obrázek 17 Graf přeměny Sudanu I pro nulovou koncentraci cytochromu b_5 a zvyšující se koncentraci CPR.

Reakce bez přidání CPR v tomto systému neběží, proto byla testována jen situace, kdy byla CPR zastoupena v pětkrát nižším množství, než je množství CYP1A1 (Obrázek 18). Z tohoto grafu je vidět, že za těchto podmínek cytochrom b_5 hydroxylaci Sudanu I silně inhibuje, při poměru 1:16,7:0,2 pak reakce téměř neběží.

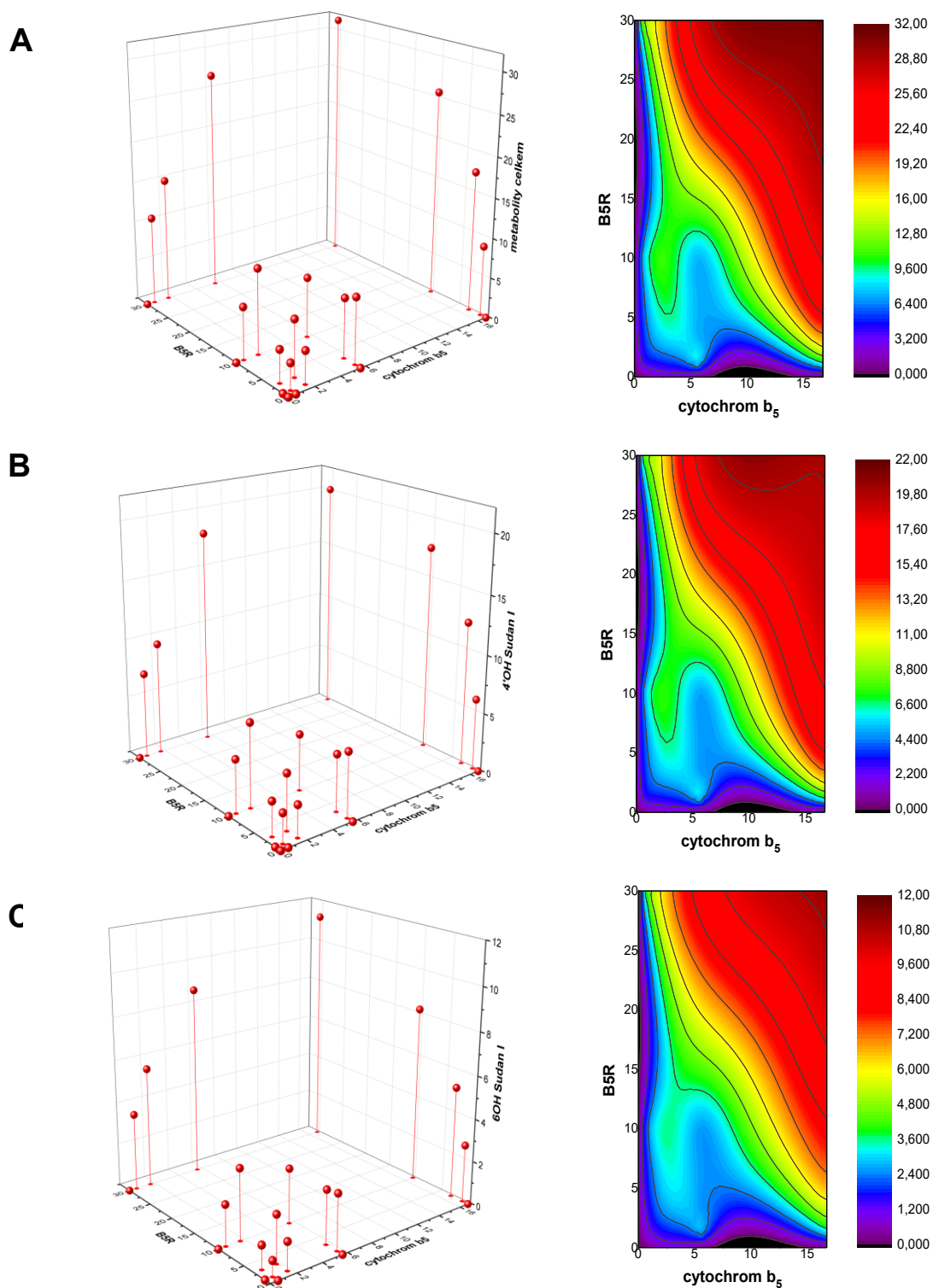


Obrázek 18 Graf přeměny Sudanu I pro malou koncentraci CPR a měnící se koncentraci poměru cytochromu b₅.

4.6. Inkubace systémem CYP1A1, cytochromu b₅ a CYB5R se Sudanu I

Teprve poměrně nedávno byl vyvrácen názor, že CYP potřebuje ke své činnosti vždy CPR, když byl popsán systém, v němž probíhá oxidace benzo[a]pyrenu CYP1A1 i jen za přítomnosti cytochromu b₅ a CYB5R [36]. Ukazuje se, že podobné chování vykazuje tentýž enzymový systém také vůči Sudanu I. Studovaná závislost množství tvořených hydroxyderivátů systémem CYP1A1, cytochrom b₅ a CYB5R je stejně jako v předchozí kapitole prezentována prostřednictvím 3D grafu (Obrázek 19 – levý sloupec) a také po vyhlazení prostřednictvím konturových grafů, na němž je třetí rozměr zobrazen formou barevného gradientu (Obrázek 19 – pravý sloupec). Podobně jako výše je i na těchto grafech nejvyšší účinnost systému zobrazena červeně a nejnižší fialově. Ternární systém CYP1A1, cytochrom b₅ a CYB5R byl proti systému s CPR přibližně 8x méně aktivní. Kvůli pomalejší přeměně Sudanu I nebyl detekován dihydroxyderivát 4'+6diOH Sudan I. Nejnižší (nulová) účinnost systému je při nulové koncentraci nulové koncentrace

reduktasy, ale na rozdíl od systému s CPR i u nulové koncentrace cytochromu b₅. Nejvyšší je pak u primárních derivátů při nejvyšší koncentraci CYB5R a cytochrom b₅. Na grafech pro celkový součet metabolitů i pro jednotlivé hydroxideriváty (Obrázek 19A, B a C) je patrné ploché lokální maximum při poměru CYP1A1:cytochrom b₅:CYB5R 1:3:10. Ale aktivita CYP1A1 vůči Sudanu I dále výrazně roste s rostoucím množstvím cytochromu b₅ a CYB5R zhruba proporcionálně.



Obrázek 19 Grafy přeměny Sudanu I pro dané poměry cytochromu b₅ a CYB5R v pořadí: celkový součet metabolitů (A), 4'OH Sudan I (B), 6OH Sudan I (C). Vlevo 3D grafy a vpravo konturové grafy pro jednotlivé metabolity.

5. Diskuse

Před začátkem pokusů uvedených v této práci bylo provedeno několik zkušebních inkubací s CYP1A1, cytochromem b₅, CPR a Sudanem I jako substrátem. U těchto pokusů byla detekovaná velmi malá přeměna na hydroxyderiváty Sudanu I. Jednalo se o problém s liposomy (resp. DLPC), které byly původně rozpouštěny v chloroformu. Toto rozpouštědlo navzdory deklaraci výrobce obsahovalo cca 5% netěkavé složky (pravděpodobně fosgeny vznikajícího oxidací rozpouštědla vzdušným kyslíkem). Problém byl vyřešen náhradou chloroformu dichlormethanem, který byl použit jako rozpouštědlo pro DLPC ve všech následných pokusech.

Ještě před provedením pokusů s inkorporací cytochromu b₅ do liposomů bylo nutné provést purifikaci zásobního lidského rekombinantního cytochromu b₅ (připraveného dříve Mgr. Janem Milichovským, PhD). Jako vhodná metoda byla použita iontově výměnná chromatografie. Na chromatogramu (Obrázek 9 str. 32) se potvrdila přítomnost nečistot v preparátu, a pravděpodobně i apoformy cytochromu b₅. Zdá se tedy, že samotná purifikace pomocí afinitní chromatografie pro odstranění apoformy nestačí, jelikož tato, stejně jako holoforma, obsahuje HisTag a také se váže na metalo-afinitní kolonu.

Dále byla sledována optimální doba inkorporace (cytochromu b₅ do liposomů Obrázek 13 str. 37), ukázalo se, že přesto, že inkorporace nikdy nebyla úplná, podstatné množství proteinu se za daných podmínek navázalo již za cca 5 minut.

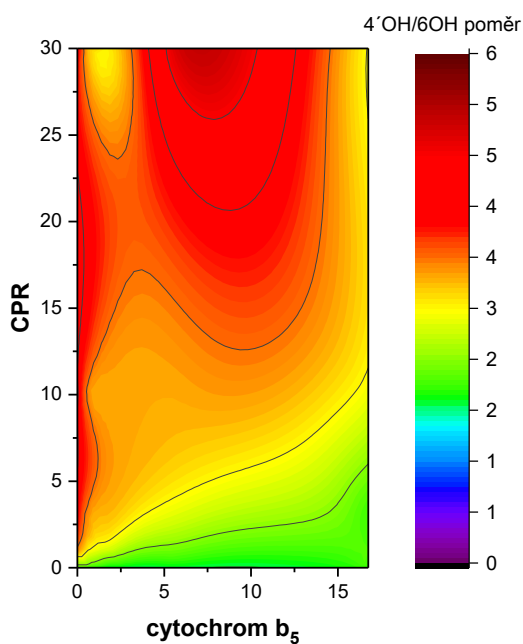
Následně byl proveden pokus, v němž byla sledována inkorporace cytochromu b₅ pro různé molární poměry k DLPC (Obrázek 14 str. 37). Povedlo se stanovit poměry, u kterých byl polovina cytochromu b₅ inkorporovaná do liposomů. Bylo zjištěno, že množství inkorporovaného proteinu je úměrné množství lipidu. Při nejnižším ověřovaném poměru 1:100, byla více než polovina cytochromu b₅ inkorporována. Nicméně v následných experimentech byly neplánovaně používány i ještě vyšší množství cytochromu b₅, kdy bylo dosaženo až poměru cytochrom b₅:DLPC 1:8,6. Pro tento případ nevíme, jaké množství proteinu bylo inkorporováno do membrány. Nicméně z výsledků je patrné, že i tato množství měla na aktivitu stimulační vliv.

Inkubace s různými poměry systému CYP1A1:cytochrom b₅:CPR se Sudanem I jako substrátem (Obrázek 16 str. 40) ukázala, že vliv cytochromu b₅ a CPR na CYP1A1 je komplikovanější, než bylo očekáváno. Za v závislosti na poměrech může cytochrom b₅ reakci stimulovat nemít významný vliv nebo dokonce, za nízké koncentrace CPR, i reakci inhibovat. V metabolických studiích autoři většinou studují chování CYP systému jen při několika molárních poměrech cytochromu b₅ či CPR, výsledkem jsou někdy protichůdné závěry kdy u téhož cytochromu P450 pro různé substráty cytochrom b₅ někdy stimuluje, nemá vliv či dokonce inhibuje reakci [37]. Zde prezentované výsledky však naznačují, že toto je možné i pro jeden a týž substrát a ukazuje se tak, že ve skutečnosti tedy záleží na vzájemném poměru cytochromu b₅ a CPR. Ideální podmínky jsou v tomto případě zhruba v oblasti, kdy se molární poměr těchto elektron donorů pohybuje kolem poměru 5:5 a při jeho rovnoměrném zvyšování má potenciál růst ještě dále. Je-li cytochromu b₅ přidávám do systému s vysokou aktivitou CPR, přídavky cytochromu b₅ nemají na reakci zpočátku výrazný vliv a naopak je-li metabolismus testován za situace, kdy je aktivita CPR nízká, může přidaný cytochromu b₅, pravděpodobně v důsledku kompetice o vazbu na CPR či na CYP1A1, celkovou reakci i znatelně inhibovat (Obrázek 18 na str. 42).

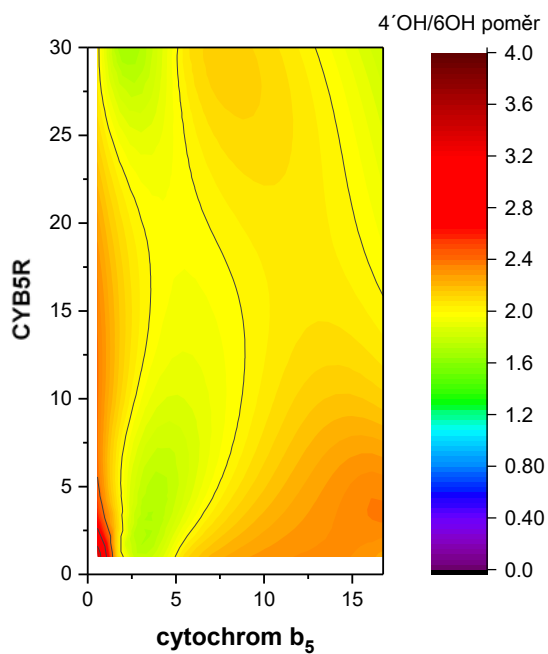
Zajímavým vedlejším poznatkem je zjištění, že přeměna na 4'+6diOH Sudan I probíhá hlavně z monohydroxy derivátu 6OH Sudan I, a to výrazně více než z 4'diOH Sudan I. Tuto zjištění potvrzuje změna poměru 4'OH Sudanu I ku 6OH Sudanu I v závislosti na obsahu CPR a cytochromu b₅ (Obrázek 20 str. 47). Ten by měl být konstantní, pokud se nemění vzájemný poměr metabolitů. Na grafu je však vidět výrazná změna při poměru CYP1A1:CPR:cytochromu b₅ 1:5:25, toto maximum se totiž nápadně shoduje s maximem tvorby 4'+6diOH Sudanu I v témže experimentu (Obrázek 16D str. 40).

Při inkubaci systému CYP1A1:cytochrom b₅:CYB5R se Sudanem I bylo detekováno výrazně menší množství metabolitů, než u předchozího systému s CPR. Kvůli tomu nebyl také detekován ani 4'+6diOH Sudan I. Maximum aktivity nebylo v rozmezí studovaných koncentrací zastíženo, vzhledem k průběhu grafu je možné, že aktivita s rostoucí koncentrací ještě dále poroste (Obrázek 19 str. 44). Na rozdíl od systému s CPR, se zde aktivita projevuje pouze v přítomnosti obou donorů elektronů tedy samotný cytochrom b₅ ale ani samotná CYB5R reakci vůbec nekatalyzují. Také poměr monohydroxyderivátů

4'OH vs. 6OH Sudanu I se ve sledovaném rozmezí koncentrací měnil jen minimálně (Obrázek 21).



Obrázek 20 Konturový graf podílu koncentrací 4'OH Sudanu I vůči 6OH Sudanu I pro jednotlivé poměry CPR.



Obrázek 21 Konturový graf podílu koncentrací 4'OH Sudanu I vůči 6OH Sudanu I pro jednotlivé poměry CYB5R.

6. Závěr

Povedlo se zmapovat vliv vybraných molárních poměrů NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy a NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasy na oxidaci Sudanu I zprostředkovanou lidským cytochromem P450. Studie přispívá k vysvětlení někdy protichůdných tvrzení o stimulačním vlivu cytochromu b_5 na cytochromy P450. Dále bylo zjištěno, že přeměna na 4'+6diOH Sudan I probíhá v systému s CPR hlavně z 6OH Sudan I. Dalším výsledkem bylo ověření podmínek za jakých CYB5R v kombinaci s cytochromem b_5 umožňuje oxidaci Sudanu I lidským CYP1A1.

7. Literatura

1. Kalgutkar, A.S., Gardner, I., Obach, R.S., Shaffer, C.L., Callegari, E., Henne, K.R., Mutlib, A.E., Dalvie, D.K., Lee, J.S., Nakai, Y.:A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **6**, 161–225 (2005)
2. Zuber, R., Anzenbacherova, E., Anzenbacher, P.:Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* **6**, 189–198 (2002)
3. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.:(Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem Listy.* **94**, 913–918 (2000)
4. Stiborová, M.: Biochemie II, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2016)
5. Chhabra, R.S.:Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* **33**, 61–69 (1979)
6. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.:Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem Listy.* **95**, 212–222 (2001)
7. Parkinson, A., Ogilvie, B. W.: Casarett & Doull's Essentials of Toxicology Biotransformation of xenobiotics 2nd ed., McGraw-Hill Medical, New York, str. 133-224 (2010)
8. Stiborová, M., Hudeček, J., Paca, J., Martínek, V., Páca, Jr, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy.* **98**, 876–890 (2004)
9. Testa, B.:Prodrug research: futile or fertile? *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2097–2106 (2004)
10. Statistika cytochrom P450: <http://drnelson.uthsc.edu/P450.stats.Aug2013.png> Přístup 10. 2. 2017
11. Guengerich, F.P.:Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol.* **43**, 7–35 (1997)
12. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R.:Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1770**, 330–344 (2007)
13. Meunier, B., De Visser, S.P., Shaik, S.:Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947–3980 (2004)
14. Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I.:Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* **105**, 2253–2278 (2004)

15. Milichovský, J.:Cílená mutageneze ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a jejich interakčních partnerů: Disertační práce, PŘF UK, katedra biochemie Praha (2016)
16. Nelson, D.R.:Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Proteins Proteomics*. **1814**, 14–18 (2011)
17. Neal, G.:Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* **82**, 861–867 (1995)
18. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.:Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy*. **93**, 229–237 (1999)
19. Walsh, A.A., Szklarz, G.D., Scott, E.E.:Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J. Biol. Chem.* **288**, 12932–12943 (2013)
20. Sansen, S., Yano, J.K., Reynald, R.L., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F.:Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J. Biol. Chem.* **282**, 14348–14355 (2007)
21. Douglas, R.H., Hultquist, D.E.:Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b₅ are identical to segments of microsomal cytochrome b₅. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 3118–3122 (1978)
22. Schenkman, J.B., Jansson, I.:The many roles of cytochrome b₅. *Pharmacol. Ther.* **97**, 139–152 (2003)
23. Hirano, Y., Kimura, S., Tamada, T.:High-resolution crystal structures of the solubilized domain of porcine cytochrome b₅. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 1572–1581 (2015)
24. Porter, T.D.:The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 311–316 (2002)
25. Iyanagi, T.:Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 520–528 (2005)
26. McCammon, K.M., Panda, S.P., Xia, C., Kim, J.-J.P., Moutinho, D., Kranendonk, M., Auchus, R.J., Lafer, E.M., Ghosh, D., Martasek, P.:Instability of the Human Cytochrome P450 Reductase A287P Variant Is the Major Contributor to Its Antley-Bixler Syndrome-like Phenotype. *J. Biol. Chem.* **291**, 20487–20502 (2016)
27. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S.S., Kim, J.-J.P.:Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN-and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 8411–8416 (1997)

28. Oprian, D., Coon, M.:Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. *J. Biol. Chem.* **257**, 8935–8944 (1982)
29. Huang, W.-C., Ellis, J., Moody, P.C., Raven, E.L., Roberts, G.C.:Redox-linked domain movements in the catalytic cycle of cytochrome P450 reductase. *Structure.* **21**, 1581–1589 (2013)
30. Baker, M.A., Krutskikh, A., Curry, B.J., Hetherington, L., Aitken, R.J.:Identification of Cytochrome-b₅ Reductase as the Enzyme Responsible for NADH-Dependent Lucigenin Chemiluminescence in Human Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **73** (2005)
31. Elahian, F., Sepehrizadeh, Z., Moghimi, B., Mirzaei, S.A.:Human cytochrome b₅ reductase: structure, function, and potential applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 134–143 (2014)
32. Zhu, H., Qiu, H., Yoon, H.-W.P., Huang, S., Bunn, H.F.:Identification of a cytochrome b-type NAD (P) H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 14742–14747 (1999)
33. Yamada, M., Tamada, T., Takeda, K., Matsumoto, F., Ohno, H., Kosugi, M., Takaba, K., Shoyama, Y., Kimura, S., Kuroki, R.:Elucidations of the Catalytic Cycle of NADH-Cytochrome b 5 Reductase by X-ray Crystallography: New Insights into Regulation of Efficient Electron Transfer. *J. Mol. Biol.* **425**, 4295–4306 (2013)
34. Elahian, F., Sepehrizadeh, Z., Moghimi, B., Mirzaei, S.A.:Human cytochrome b₅ reductase: structure, function, and potential applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 134–143 (2014)
35. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M.:Preparation of a biologically active apo-cytochrome b₅ via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **66**, 203–209 (2009)
36. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Kopka, K., Philips, D.H., Arlt, V.:NADH: Cytochrome b 5 Reductase and Cytochrome b₅ Can Act as Sole Electron Donors to Human Cytochrome P450 1A1-Mediated Oxidation and DNA Adduct Formation by Benzo[a]pyrene. *Chem. Res. Toxicol.* **29**, 1325–1334 (2016)
37. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F.P., Shimada, T., Nakajima, M.:Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b₅ on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **24**, 329–337 (2002)

