

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Petra Valášková

Izolace a charakterizace mikrosomální frakce houby *Pleurotus ostreatus* a její
úloha v degradaci 17 α -ethinylestradiolu

Isolation and characterization of microsomal fraction of fungus *Pleurotus ostreatus* and its
role in the degradation of 17 α -ethinylestradiol

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: **RNDr. Věra Černá, Ph.D.**

Konzultant: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky **RNDr. Věry Černé, Ph.D.** a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.05.2012

Podpis

Tato bakalářská práce vznikla za finanční podpory grantu **P503/10/0408** Grantové agentury České republiky.

Poděkování:

Předně bych chtěla poděkovat své školitelce **RNDr. Věře Černé, Ph.D.** hlavně za všestrannou pomoc při experimentální práci, dále za trpělivost, ochotu a čas, který mi během celé spolupráce věnovala. Neméně bych chtěla poděkovat za její cenné rady při sepisování této práce a za snahu mě navést vždy správným směrem. Dále bych chtěla poděkovat **Mgr. Boženě Kubičkové**, která mi vždy ochotně pomáhala, a poradila mi, když jsem to potřebovala, a samozřejmě za čas, který mi během práce věnovala. Mé poděkování patří i **RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D.** také za všestrannou pomoc a za zajištění spolupráce s laboratoří environmentální biotechnologie. Děkuji i celé laboratoři 219 a všem studentům, kteří mi během mé práce ochotně poradili.

Děkuji RNDr. Zdeně Křesinové za možnost měření na HPLC a analýzu GC/MS, RNDr. Kateřině Svobodové, Ph.D. za poskytování a zpracování houbových kultur.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1 Teoretický úvod	11
1.1 Houby	11
1.1.1 Houby bílé hniloby	12
1.1.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> a jeho degradační potenciál	13
1.2 Cytochromy P450.....	14
1.2.1 Systém cytochromů P450 v buňkách hub	18
1.2.2 Modelový organismus <i>P. chrysosporium</i> pro studium houbových CYP.....	21
1.3 Endokrinně disruptivní látky	22
1.3.1 Endogenní a exogenní estrogény.....	22
1.3.2 17 α -ethinylestradiol.....	23
1.3.3 Biodegradace steroidních sloučenin	24
2 Cíl práce	26
3 Materiál a metody	27
3.1 Materiál	27
3.1.1 Použitá houbová kultura.....	27
3.1.2 Chemikálie a rozpouštědla	27
3.1.3 Použité přístroje	27
3.2 Metody	28
3.2.1 Příprava kultivačního media a sterilizace.....	28
3.2.2 Příprava inokula houby <i>P. ostreatus</i>	28
3.2.3 Degradace EE2 houbou <i>P. ostreatus</i> in vivo.....	29
3.2.4 Extrakce EE2	29
3.2.5 Kultivace <i>P. ostreatus</i> pro izolaci mikrosomální frakce	30

3.2.6	<i>Izolace mikrosomální frakce</i>	30
3.2.7	<i>Stanovení koncentrace proteinů</i>	32
3.2.8	<i>Stanovení koncentrace cytochromu P450</i>	32
3.2.9	<i>Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy</i>	33
3.2.10	<i>Degradace EE2 mikrosomální frakcí houby P. ostreatus</i>	34
3.2.11	<i>Identifikace metabolitů EE2</i>	36
3.2.12	<i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	36
3.2.13	<i>Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí</i>	37
4	Výsledky a diskuze	38
4.1	<i>Degradace EE2 houbou P. ostreatus in vivo</i>	38
4.2	<i>Izolace mikrosomální frakce</i>	41
4.3	<i>Charakterizace mikrosomální frakce</i>	42
4.4	<i>Degradace EE2 mikrosomální frakcí houby P. ostreatus</i>	46
4.4.1	<i>Degradace EE2 kontrolní MF, izolace 1</i>	47
4.4.2	<i>Degradace EE2 MF vystavenou působení EE2, izolace 1</i>	49
4.4.3	<i>Degradace EE2 kontrolní MF, izolace 2</i>	50
4.4.4	<i>Degradace EE2 MF vystavenou působení EE2, izolace 2</i>	52
4.5	<i>Identifikace metabolitů EE2</i>	53
5	Souhrn	56
6	Seznam použité literatury	57

Abstrakt

Syntetický hormon 17 α -ethinylestradiol (EE2), který je součástí hormonálních antikoncepčních pilulek, byl identifikován jako hlavní složka tzv. endokrinně disruptivních látek (EDc). EDc jsou látky, které napodobují svým účinkem přirozené hormony. V posledních letech se jejich množství zejména v podzemních a povrchových vodách značně zvyšuje, což má negativní vliv na hormonální systém zejména vodních organismů. Jelikož není snadné tyto látky z životního prostředí běžnými technikami odstranit, hledají se možnosti jejich biodegradace. Slibné biodegradační schopnosti vůči mnoha polutantům vykazují houby bílé hniloby, které v přírodě rozkládají lignin. Tyto houby disponují širokou škálou nespecifických extracelulárních a intracelulárních enzymů, které ve zmíněných degradacích hrají významnou roli.

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium zástupce hub bílé hniloby, houbu *Pleurotus ostreatus*, a zejména degradační potenciál jeho intracelulárních enzymů při biodegradaci EE2.

Nejprve byla ověřena schopnost houby *Pleurotus ostreatus* degradovat EE2 *in vivo*. Během 48 hodinové inkubace došlo k odbourání až 95,5 % EE2. Role cytochromů P450 (CYP) při metabolismu EE2 však tímto experimentem nebyla potvrzena, jelikož inhibitor CYP 1-aminobenzotriazol (1-ABT) nesnižoval účinnost degradace. V další fázi bakalářské práce proto byly degradační experimenty prováděny s mikrosomální frakcí izolovanou z mycelia této houby. Pro izolaci mikrosomů byly připraveny vždy dvě sady kultur a to sada kontrolní a sada exponovaná EE2. Ve všech izolovaných preparátech byla pomocí diferenční spektroskopie s CO detekována aktivní forma CYP s maximem absorbance kolem 450 nm. Prvotní předpoklad, že by vystavením kultury houby *Pleurotus ostreatus* EE2 došlo k indukci CYP zodpovědných za jeho degradaci, nebyl potvrzen, a to ani stanovením specifického obsahu CYP ani degradačními experimenty. Výsledky těchto experimentů nasvědčují tomu, že k odbourávání EE2 mikrosomální frakcí dochází, avšak nezávisle na druhu použitých mikrosomů. 1-ABT v tomto případě degradaci inhiboval z 95 %, což naznačuje, že za metabolismus EE2 v rámci mikrosomální frakce jsou opravdu zodpovědné CYP.

Klíčová slova: 17 α -ethinylestradiol, Biodegradace, *Pleurotus ostreatus*, Cytochromy P450, Mikrosomální frakce

Abstract

A synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE2) which is a component of hormonal contraception pills has been identified as a main component of the endocrine-disrupting compounds (EDc). EDc are substances that mimic natural hormones in their action. Recently their amount especially in the groundwater and the surface water has been increased, which results in a negative impact on the hormonal system especially of aquatic organisms. Since it is not easy to replace these substances from the environment by conventional techniques other possibilities of their biodegradation are examined. White rot fungi, which are able to degrade lignin in nature, have promising biodegradation abilities towards many pollutants. These fungi contain a wide range of non-specific extracellular and intracellular enzymes that play an important role in the degradation.

This bachelor thesis was targeted on the study of a white rot fungus, *Pleurotus ostreatus*, and especially on the degradation potential of its intracellular enzymes in the biodegradation of EE2.

Initially, the ability of fungi *Pleurotus ostreatus* to degrade EE2 *in vivo* was tested. During the 48 hour incubation there was replaced 95,5 % of EE2. However, the role of cytochromes P450 (CYPs) in a metabolism of EE2 was not confirmed in this experiment by reason that an inhibitor of CYP 1-aminobenzotriazole (1-ABT) did not reduce the efficiency of degradation. Therefore in the next period of the bachelor thesis degradation experiments were carried out with a microsomal fraction (MF) isolated from the mycelium of this fungus. Two sets, a control set and an EE2 exposed one, were prepared for isolation of microsomes. The active form of CYP with maximum absorbance about 450 nm was detected in all preparations via the differential spectroscopy with CO. The first assumption that exposure of fungi *Pleurotus ostreatus* to EE2 should led to an induction of CYPs responsible for its degradation has not been confirmed neither providing of a specific CYPs content nor the degradation experiments. The results of these experiments indicate that the degradation of EE2 by microsomal fractions occurs, but independently of the type of microsomes used. In this case 1-ABT was successful to inhibit the 95 % of degradation which suggests that the CYPs are responsible for metabolism of EE2 in the microsomal fraction.

Keywords: 17 α -ethinylestradiol, Biodegradation, *Pleurotus ostreatus*, Cytochrome P450, Microsomal fraction

(In Czech)

Seznam použitých zkratk

1-ABT	1- aminobenzotriazol
A	absorbance
ACN	acetonitril
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	bovine serum albumine; hovězí sérový albumin
BSTFA	<i>N,O</i> -bis (trimethylsilyl) trifluoracetamid
C	cytosol
CPR	NADPH:CYP reduktasa
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EDc	endocrine-disrupting compounds; endokrinně disruptivní látky
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EE2	17 α -ethinylestradiol
EI	elektronová ionizace
EPA	Environmental Protection Agency; Úřad pro ochranu životního prostředí
ER	endoplasmatické retikulum
FAD/FMN	flavinadenindinukleotid/flavinmononukleotid
GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry; plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	high-performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K-K/EE2-K	kontrolní kultivace/ kultivace exponovaná EE2

K-MF/EE2-MF	kontrolní mikrosomální frakce/mikrosomální frakce exponovaná EE2
Lac	lakasa
LiP	lignin peroxidasa
MEG medium	malt-extrakt glukosové medium
MF	mikrosomální frakce
MFO	mixed function oxidase; oxidasy se smíšenou funkcí
MnP	mangan-dependentní peroxidasa
NAD(H)	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
NADP(H)	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
NADPH-GS	NADPH generující systém
NDMA	N-nitrosodimethylamin
NMA	N-nitrosomethylanilin
NOR	NO: reduktasa
p.a.	pro analýzu
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	piperonyl butoxid
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RPM	rotations per minute; otáčky za minutu
TMCS	trimethylchlorsilan
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1 Teoretický úvod

V posledních letech se začíná intenzivněji řešit problém znečištěného prostředí a hledají se nové techniky a postupy, jak nahromaděné nebezpečné kontaminanty ze životního prostředí odstranit. Některé látky byly uvolňovány do prostředí několik desítek let, a to bez detailního prozkoumání jejich často negativního vlivu na své okolí, který se projevil až s odstupem času¹. Velmi závažným problémem je v současnosti ohrožení jakosti podzemních a povrchových vod, kde se vyskytují tzv. endokrinně disruptivní látky (z angl. EDC). Mezi tyto látky patří i ženské hormony - estrogény, přirozené i syntetické, které se do podzemních a povrchových vod dostávají nedostatečným čistícím procesem odpadní vody. Jelikož jsou standardní a technologicky používané čistící postupy (jako je filtrace, koagulace, flokulace a precipitace) v odstranění kontaminantů často neúčinné², jsou čím dál více zkoumány možnosti využití alternativních technik čištění, například tzv. biologická degradace. Velmi vysoká biodegradační schopnost byla objevena u specifického druhu hub.

1.1 Houby

Houby jsou eukaryotní organismy, ale jejich buňka je na pomezí tradičního dělení eukaryotických buněk na buňky živočišné a rostlinné. Buňka hub obsahuje tuhou buněčnou stěnu, což je přibližuje k rostlinné buňce, ale na rozdíl od buněčné stěny rostlin složené z celulózy, je buněčná stěna hub tvořena polysacharidem chitinem. Další odlišnost od rostlinné buňky je absence chloroplastů. Dříve docházelo k mylnému zařazení hub právě do rostlinné říše, ale díky molekulární biologii se prokázalo, že houby mají blízké vývojové předky spíše s živočichy. Ovšem jejich odlišnost od ostatních živočichů, jako je struktura, růst a způsob výživy, je vymezuje natolik, že jim nakonec byla přidělena vlastní taxonomická říše *Houby*, která obsahuje více než 100 000 druhů, které tvoří 25 % veškeré biomasy na Zemi. V současné době, na základě molekulárních studií, zařazujeme zástupce hub do čtyř oddělení nazývaných Chytridiomycety, Zygomycety, Ascomycety a Basidiomycety^{3,4,5}. Mezi Basidiomycety patří většina hub bílé hniloby, které jsou zodpovědné za biodegradaci ligninu, což má v přírodě zásadní význam při koloběhu uhlíku⁶.

1.1.1 Houby bílé hniloby

Houby bílé hniloby jsou velkou a mnohostrannou skupinou organismů, která má potenciál pro oxidační bioremediaci velkého množství toxických chemických látek např. polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), polychlorovaných bifenyly či některých barviv⁷. Bioremediace je technologie, která slouží k odstranění nežádoucích látek z prostředí pomocí mikroorganismů, hub a jiných organismů, např. prvoků⁸. Houby bílé hniloby jsou schopny biodegradace díky nesespecifickému charakteru jejich extracelulárních ligninolytických enzymů⁹. Jedná se zejména o peroxidasy - lignin peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) a oxidasy - lakasa (Lac, EC 1.10.3.2)^{10,11}. Právě tyto enzymy jim umožňují rozkládat lignin a získávat lépe metabolizovatelné složky sacharidů¹², celulosu a hemicelulosu, které slouží jako hlavní zdroje uhlíku pro houbové mycelium¹³. Podle typického bílého vzhledu rozkládajícího se dřeva (Obr. 1), který je dán barvou již zpřístupněné celulosy, jsou tyto organismy nazývané právě houby bílé hniloby¹⁴. Jsou to zatím jediné známé organismy schopné této kompletní mineralizace dřeva¹⁵.



Obr. 1: Typický bílý vzhled rozkládajícího se dřeva napadeného zástupcem hub bílé hniloby, *Phanerochaete chrysosporium* (zvětšeno 5x), převzato z ¹⁶.

Lignin, hlavní složka dřeva, je velmi složitý přírodní polymer, který obsahuje ve své struktuře mnoho jednoduchých C-C vazeb¹⁷. Zmíněné extracelulární ligninolytické enzymy (peroxidasy a oxidasy) rozkládají lignin nesespecifickými oxidačními reakcemi, což má za následek tvorbu aromatických fragmentů. Tyto fragmenty jsou pak metabolizovány intracelulárně, což svědčí o nutnosti zapojení i jiných enzymatických systémů do celkového procesu degradace ligninu. Předpokládá se, že extracelulární i intracelulární enzymatické systémy spolupracují i při degradaci xenobiotik¹⁸.

Nezávislé studie ukázaly, že extracelulární enzymy nemusí být vždy důležité v počáteční fázi oxidace polutantů. Houby bílé hniloby provádějí některé biodegradční reakce i v nepřítomnosti zmíněných extracelulárních peroxidas (tzv. nezávislá degradace, kdy jsou kultury hub udržovány za podmínek, které neumožňují výrobu těchto enzymů) nebo oxidují látky, které nejsou považovány za substráty lignin-peroxidasy a mangan-dependentní peroxidasy¹⁹. Někteří autoři dokázali, že klíčovou roli při degradaci polutantů hrají intracelulární enzymy, zejména, že se může jednat o systém cytochromů P450^{20,21}, který bude zmíněn v kapitole 1.2.

Z hlediska degradace xenobiotik jsou zajímavými zástupci hub bílé hniloby zejména *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* a *Pleurotus ostreatus*, jejichž degradační potenciál související např. s degradací PAU či rozkladem azobarviv byl v literatuře hojně diskutován^{22,23,24,25}. *Phanerochaete chrysosporium* je nejvíce studovaná houba sloužící jako modelový organismus²⁶. V této práci je studována houba *Pleurotus ostreatus* a její vliv na degradaci steroidních sloučenin.

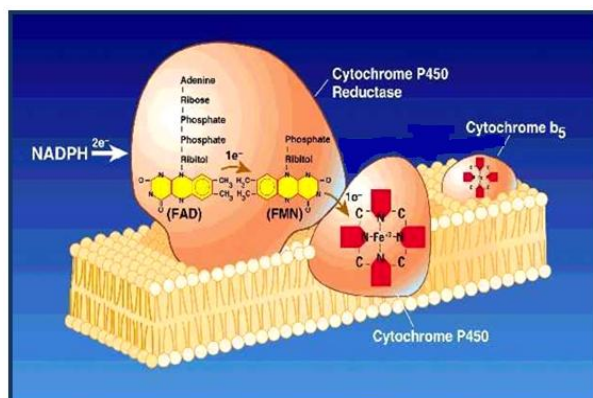
1.1.2 *Pleurotus ostreatus* a jeho degradační potenciál

Hlíva ústříčná (lat. *Pleurotus ostreatus*) je druh dřevokazné ligninolytické houby pocházející z Číny. Patří do řádu *Agaricales*, čeledi *Pleurotaceae* a rodu *Pleurotus*. *P. ostreatus* je v dnešní době komerčně využívanou houbou, zejména kvůli jeho léčebným a preventivním účinkům. Byly diskutovány pozitivní účinky při protinádorové léčbě, snižování hladiny cholesterolu v krvi a snížení hladiny glukosy v krvi, což je připisováno zejména obsaženým β -glukanům^{27,28,29}. Kromě využití této houby v medicíně, se čím dál více zkoumá její degradační potenciál kvůli možnosti aplikace při bioremediaci a zároveň *P. ostreatus* nachází své uplatnění jako alternativní model při studiu metabolismu xenobiotik. Bylo prokázáno, že *P. ostreatus* je schopen úspěšné degradace PAU, včetně fenanthrenu, anthracenu, pyrenu, chrysenu, fluorenu, benzo[*a*]pyrenu, benzo[*a*]anthracenu a benzo[*b*]fluorantenu, za vzniku ve vodě rozpustných produktů a CO₂^{30,31,32}. Některé práce se zabývaly detailnějším zkoumáním jednotlivých degradačních reakcí a jejich meziproductů se zaměřením na zmíněnou roli intracelulárních enzymatických systémů. Degradace pyrenu probíhá za vzniku *trans*-4,5-dihydropyren-4,5-diolu, kdy tento produkt je většinou enantiomer s konfigurací *R,R*. Fenanthren je metabolizován na *trans*-9,10-dihydrofenanthren-9,10-diol (konfigurace *R,R*), anthracen je metabolizován přednostně na *trans*-1,2-

dihydroanthracen-1,2-diol (konfigurace *S,S*) a na 9,10-anthrachinon, fluoren je přeměňován na fluoren-9-on. Studie z roku 1996 poukazuje na vznik výše zmíněných diolů přes předpokládané epoxidové meziprodukty, které nasvědčují tomu, že první krok v biotransformaci PAU je katalyzovaný právě cytochromy P450 a epoxidovými hydrolasami, enzymy participujícími v první fázi biotransformace³³. Zapojení cytochromů P450 v počáteční degradaci PAU potvrzují i novější studie, zároveň se předpokládá, že *P. ostreatus* má potenciál provádět i reakce související s druhou fází biotransformace (zejména konjugace s glutationem, kyselinou glukuronovu, aktivním sulfátem aj.)^{34,35}.

1.2 Cytochromy P450

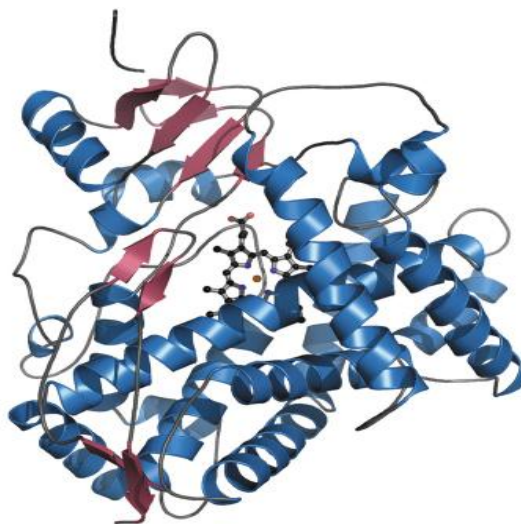
Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) jsou důležité enzymy zapojené do metabolických a biosyntetických procesů a jsou nezbytné pro metabolismus cizorodých látek³⁶. Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny, které patří mezi mikrosomální monooxygenasy se smíšenou funkcí (MFO), kde fungují jako terminální oxidasy. Enzymový systém monooxygenas je vícesložkový (Obr. 2), obsahuje hydroxylasové složky a komponenty umožňující transport elektronů, nedílnou součástí MFO systému je též fosfolipidová membrána, v níž jsou jednotlivé komponenty inkorporovány. CYP pro svou fyziologickou funkci potřebují přítomnost redoxního partnera, kterým je v případě mikrosomálního MFO systému NADPH:CYP reduktasa. Tento flavoproteinový enzym funguje jako dělič elektronového páru, předává tedy postupně elektrony na CYP. Pro druhou redukci CYP může být také využit cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasa³⁷.



Obr. 2: Komponenty MFO systému, převzato z³⁸.

Cytochromy P450 mají vlastní názvosloví, dané různými formami (izoformy CYP), které zařazujeme do genetických rodin a podrodin podle toho, jak moc se shoduje jejich primární struktura, tedy pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Rodiny CYP sdílí více než 40 % aminokyselinové sekvence, do podrodin jsou zařazovány CYP, jejichž primární struktura se shoduje v 55-60 %. První číslo, které následuje po zkratce CYP, značí příslušnost k rodině, následující velká písmena zařazují CYP do podrodiny. Další číslo značí konkrétní enzym, např. CYP2E1^{39,40}. Označení P450 získaly proto, že redukovaná forma tohoto proteinu s navázaným oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum právě při 450 nm⁴¹.

Tyto unikátní proteiny se vyskytují jak u eukaryot, tak i u prokaryot. Eukaryotické CYP jsou lokalizovány zejména v endoplasmatickém retikulu nebo v mitochondriích, kde jsou vázané na membránu prostřednictvím N-terminální domény. Tato doména obsahuje 20-30 hydrofobních aminokyselinových zbytků, které se formují do spirálovité struktury a tvoří membránovou kotvu. Hydrofilní C-terminální doména je orientovaná do cytosolu a je zodpovědná za katalytickou funkci enzymu⁴². V její struktuře převažuje motiv α -helixu a β -skládaného listu (Obr. 3). V průměru obsahují eukaryotické CYP 500-600 aminokyselin⁴³.

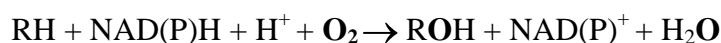


Obr. 3: Schéma struktury lidského cytochromu P4502D6. Modře je zobrazen motiv α -helixu, červeně motiv β -skládaného listu, uprostřed je vidět porfyrinový skelet, převzato ze^{44,45}.

Kromě apoproteinu obsahují CYP ve své struktuře porfyrinový skelet (Fe-protoporfyrin IX typu b). Porfyrinový skelet je částečně vázán hydrofobními silami, ale i prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny aminokyseliny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX, nazývaný proximální). Šestý ligand je molekula vody vázaná prostřednictvím jednoho atomu kyslíku. Díky tomuto uspořádání se CYP výrazně liší od ostatních hemoproteinů a mají odlišné spektrální a katalytické vlastnosti^{40,46}. Strukturální rozmanitost jednotlivých CYP je obrovská (nejvíce variabilní částí je N-terminální kotva a oblasti zodpovědné za vazbu substrátu), ovšem pro tyto enzymy je charakteristické, že obsahují konzervované sekvence F-x-x-G-x-x-x-C-x-G v blízkosti vazebného místa pro hem. Zachování tohoto strukturálního motivu je pravděpodobně důležité pro vazbu hemu, přijímání elektronů a aktivaci molekulárního kyslíku⁴⁷. Prokaryotické CYP se odlišují zejména tím, že jsou rozpustné a kratší (obsahují přibližně 400 aminokyselin)⁴³.

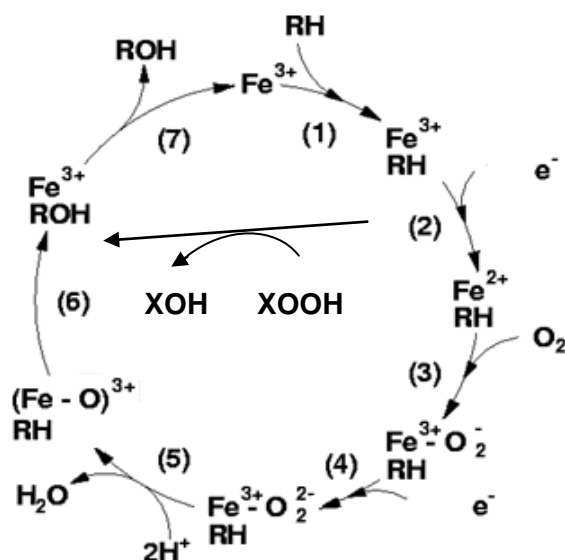
U mikroorganismů hrají CYP důležitou roli zejména v počátečním metabolismu zdrojů uhlíku, jako např. alkanů a jsou komerčně využívány pro biotransformaci steroidních sloučenin a produkci některých léků. Eukaryotní CYP mají své uplatnění zejména v reakcích oxidačních, hydroxylačných, epoxidačních, dealkylačných a dechloračních⁴⁸. Nejvíce prostudovanou skupinou cytochromů jsou zejména savčí CYP, a to díky jejich roli při biotransformaci xenobiotik v organismu⁴⁹. Pokud biotransformací xenobiotik dochází ke snížení toxicity sloučeniny, označujeme tento proces za detoxikaci, což má pro organismus životně důležitý význam. Ovšem někdy může vést biotransformace k produkci metabolitů, jež jsou aktivnější a toxičtější než původní sloučenina, tento proces je pak označován jako aktivace xenobiotik⁵⁰.

Obecná rovnice pro typické reakce zprostředkované CYP je shrnuta v tomto schématu:



NAD(P)H je donor dvou elektronů a substrát (R) je zpravidla nepolární látka, která je pak příslušným enzymem oxidována. Reakce se nazývá monooxygenace, protože tyto enzymy inkorporují pouze jeden ze dvou atomů kyslíku (O₂) do molekuly substrátu a druhý přijme dva protony a je tudíž redukován za vzniku molekuly vody^{40,51}.

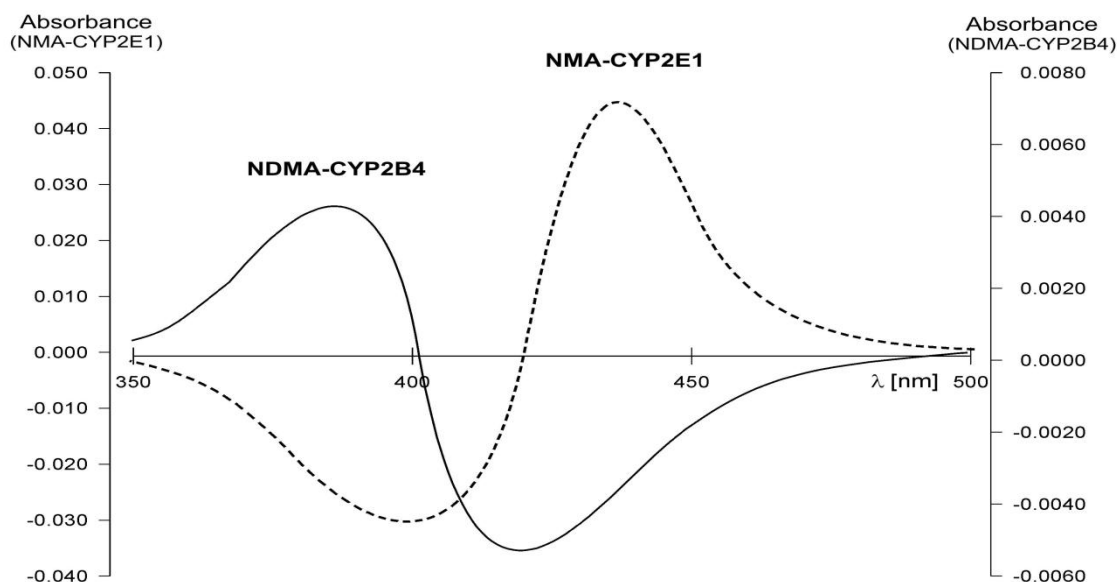
Celkové schéma reakčního cyklu CYP je znázorněno na Obr. 4. Cyklus je zahájen vazbou substrátu (RH) do aktivního místa v blízkosti Fe^{+3} CYP (1), následně dochází k redukci Fe^{+3} na Fe^{+2} (2). Na iont železa se váže molekula O_2 (3) a vzniká nestabilní komplex, který je následně redukován, a dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (4). V dalším kroku se rozštěpí biatomická vazba molekuly kyslíku (O-O), jeden atom kyslíku je redukován a dochází k uvolnění molekuly vody (5). Druhý atom kyslíku zůstane vázán na Fe v hemu za vzniku ferrioxenového komplexu. Vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen odštěpit vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu (6). Poté dochází k rekombinaci vzniklých radikálů a vzniká produkt (ROH) a nativní forma CYP (7). Šipka, která vede ze stavu (2) na stav (6), (Obr. 4), znázorňuje schopnost CYP využívat pro oxidativní reakce peroxidy či peroxokyseliny (XOOH), které jsou donorem kyslíku ^{36,37,50,52}.



Obr. 4: Reakční cyklus cytochromu P450, RH=substrát, ROH=produkt monooxygenace, XOOH peroxosloučenina, XOH=hydroxylovaný produkt reakce, převzato z ⁵³; upraveno dle ³⁶.

Hemové železo v CYP se vyskytuje ve dvou formách, a to buď v pentakoordinované, nebo hexakoordinované. Tyto dvě formy můžeme rozlišit z charakteru jejich diferenčních spekter (Obr. 5, str. 18). Pokud se substrát naváže do aktivního centra CYP, zaniká vazba k šestému ligandu. Toto vazebné místo

může zůstat volné, projeví se to spektrální změnou, kdy dojde ke vzrůstu absorbance při 390 nm a poklesu při 420 nm. Výsledné spektrum se nazývá substrátové. Pokud se ovšem na vazebné místo naváže heteroatom s volným elektronovým párem, dojde naopak k poklesu absorbance při 390 nm a nárůstu v oblasti 420-460 nm, spektrum se nazývá ligandové⁵⁴.



Obr. 5: Spektrální změny způsobené přidáním NDMA k CYP2B4 (plná čára, substrátové spektrum) a NMA k CYP2E1 (čárkovaně, ligandové spektrum) převzato z 55.

1.2.1 Systém cytochromů P450 v buňkách hub

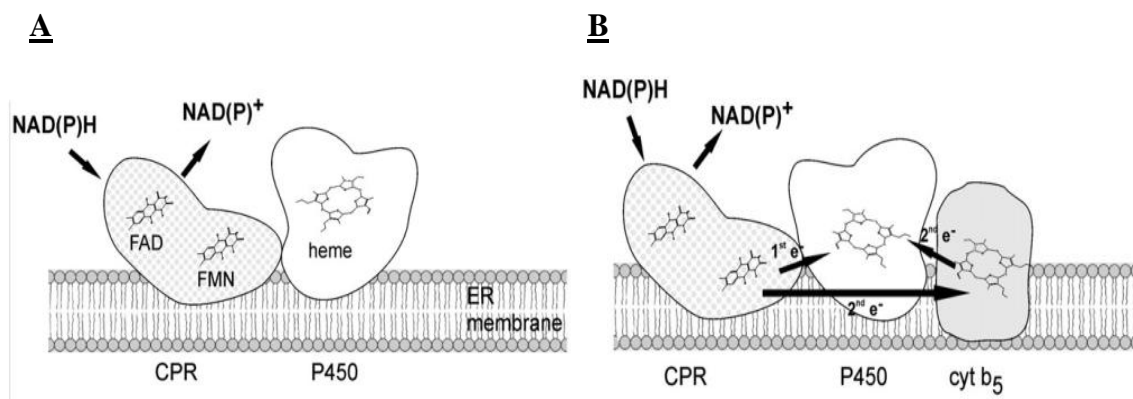
Studium houbových CYP bylo dříve omezeno, a to zejména díky jejich poměrně nízké stabilitě. V poslední době, díky značnému pokroku molekulárních technik (metody klonování a heterologní exprese), dochází k bližšímu prozkoumání těchto enzymů. Projekt sekvenování houbového genomu umožnil nalezení mnoha nových CYP. Doposud bylo identifikováno více než 6000 genů pro houbové CYP⁵⁶, některé z nich představují nové rodiny. Houbové CYP jsou zapojeny do mnoha základních buněčných procesů, participují jak v reakcích biosyntetických (zejména biosyntéza membránových sterolů), tak i v katabolických (využívání specifických zdrojů uhlíku). Poslední studie potvrzují zapojení houbových CYP do oxidace aromatických sloučenin

a hydroxylace alkenů a mastných kyselin⁵⁷. Jak již bylo zmíněno v kapitole o houbách bílé hniloby, předpokládá se zapojení některých houbových CYP i do oxidace xenobiotik, např. toluenu, fenantrenu a benzo[*a*]pyrenu^{34,48}.

Z hlediska proteinů, které se účastní přenosu elektronů na CYP, je systém cytochromů P450 zařazen do 10 tříd, z nichž tři jsou přítomné také v houbách. Tyto tři systémy jsou schematicky zobrazeny na následujících obrázcích.

1. Třída II.

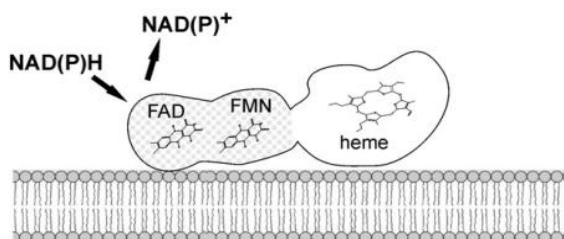
Tato třída CYP je nejběžnější skupina, která se nachází v eukaryotických organismech. Jsou to integrální proteiny, asociované s membránou endoplazmatického retikula (ER). Tento systém je tvořen (kromě cytochromu P450) NADPH:CYP reduktasou (CPR), která obsahuje oba typy flavinových kofaktorů, flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninindinukleotid (FAD). CPR je hlavním redoxním partnerem CYP, katalyzuje přenos obou elektronů na cytochromy P450. (Obr. 6, A). V úvodu o CYP bylo zmíněno, že pro druhou redukci CYP může být využit i cytochrom *b*₅ a cyt *b*₅ reduktasa (Str. 14). Cyt *b*₅ reduktasa v tomto kroku tedy zastoupí CPR (Obr. 6, B)^{58,59,60}.



Obr. 6: Schematické znázornění dvou základních uspořádání (A, B) třídy II mikrosomálních systémů CYP. CPR-NADPH:CYP reduktasa, P450-cytochrom P450, ER-endoplazmatické retikulum, cyt *b*₅-cytochrom *b*₅, převzato z⁶⁰.

2. Třída VIII

Třída těchto fúzních enzymů jsou katalyticky soběstačné flavocytochromy. Obsahují N-terminální hydroxylasovou doménu, která je připojena přes krátký proteinový řetězec (20-30 aminokyselin) k C-terminální doméně obsahující FAD/FMN reduktasovou doménu (Obr. 7).

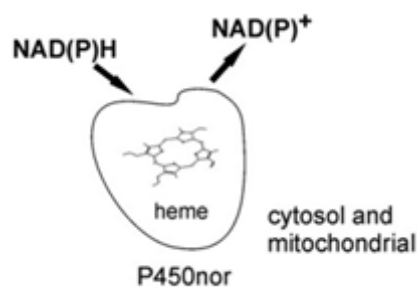


Obr. 7.: Schematické znázornění třídy VIII fúzních houbových a bakteriálních systémů cytochromů P450, převzato z⁶⁰.

Oproti předchozímu systému enzymy třídy VIII neobsahují ve své primární struktuře sekvenci pro membránovou kotvu, což značí, že se nejedná o integrální membránové proteiny, ale proteiny pouze s membránou asociované.

3. Třída IX

Systém těchto enzymů se funkčně liší od typických cytochromů P450. Elektrony jsou přímo přenášeny z NADH/NADPH na CYP bez přítomnosti dalšího redoxního partnera. Katalyzují redukci dvou molekul NO na N₂O, a jelikož jejich primární struktura připomíná NO:reduktasu (NOR), jsou tyto enzymy neformálně nazývané jako P450_{nor} (Obr. 8, str. 21). Tato skupina enzymů byla zařazena do podrodiny CYP55A, která je dále rozdělena na dvě skupiny, podle toho, zda využívají NADH či NADPH jako zdroj elektronů. CYP55A jsou velmi unikátní, z hlediska jejich lokalizace. Jak již bylo řečeno, eukaryotické CYP jsou asociovány s membránou mitochondrií nebo s membránou ER. Ovšem CYP55A jsou rozpustné a jsou lokalizovány převážně v cytosolu, jsou to tedy jediné eukaryotické CYP s touto vlastností⁶⁰.



Obr. 8: Schematické znázornění třídy IX houbových rozpustných systémů cytochromů P450 převzato z⁶⁰.

1.2.2 Modelový organismus *P. chrysosporium* pro studium houbových CYP

Phanerochaete chrysosporium je v poslední době nejvíce a nejpodrobněji studovaná houba bílé hniloby kvůli detailnějšímu pochopení fyziologie a biochemie biodegradčních procesů, se zaměřením na roli houbových CYP. *P. chrysosporium* je první zástupce z oddělení basidiomycet, u kterého došlo k osekvenování celého genomu⁶¹. Sekvenování ukázalo, že tato houba nese téměř 154 genů, které kódují cytochromy P450 a jeden gen kódující CPR. Do této doby nebylo v celé houbové říši nalezeno tolik CYP jako u *P. chrysosporium* a tyto objevené CYP byly zařazeny do 12 rodin a 23 podrodin cytochromů P450. Nalezené CYP patří pouze do třídy II^{62,63,64}. Nejnovější studie se zabývají podrobnějším popisem identifikovaných CYP. Nalezený CYP65A2 vykazuje hydroxylační aktivitu a je začleněn do metabolismu PAU (dibenzo-*p*-dioxinu, bifenyly a naftalenu)⁶⁵. CYP50C a CYP142C katalyzují hydroxylaci flavonových barviv a jejich enzymatické vlastnosti jsou blízké savčím CYP⁶⁶. CYP, které patří do podrodiny CYP53A, se uplatňují při hydroxylaci benzoové kyseliny⁶⁷.

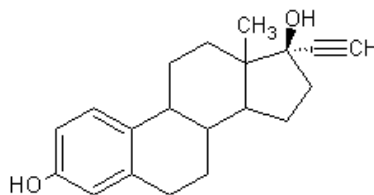
Sekvenování také ukázalo tandemové uskupení genů pro CYP a jejich značnou genovou rozmanitost. Tato obrovská rozmanitost genů pro CYP je v souladu s vysokou metabolickou poptávkou (zmiňovaná biodegradace dřeva) a schopností adaptace na změny prostředí u této skupiny hub a je předpokladem pro umožnění degradace polutantů⁶⁴. *P. chrysosporium* degraduje např. dioxiny, herbicidy, pesticidy, ropné uhlovodíky, některé detergenty, PAU a polychlorované bifenyly^{68,69,70,71,72}.

1.3 Endokrinně disruptivní látky

EDc jsou široce rozšířené environmentální kontaminanty definované (podle EPA, Environmental Protection Agency) jako exogenní látky napodobující přirozené hormony, jež jsou v těle zodpovědné za reprodukci, vývoj nebo chování živočichů⁷³. Tyto látky tedy narušují přirozenou činnost žláz a působí i při extrémně nízké koncentraci (ng. l⁻¹), což se projevuje negativním vlivem na organismy ve svém okolí. Mezi EDc patří např. bisfenol A, alkylfenoly (4-nonylfenol) a estrogenní steroidy (17β-estradiol, ethinylestradiol)^{74,75}.

1.3.1 Endogenní a exogenní estrogeny

Endogenní estrogeny, syntetizované v tělech živočichů, jsou organické sloučeniny, které patří do skupiny steroidů. Steroidy obsahují společný strukturní základ, a to tetracyklický systém nazývaný gonan⁷⁶. Mnohé steroidy působí v lidském těle jako hormony. Mezi pět základních tříd steroidních hormonů patří progestiny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny a zmíněné estrogeny⁷⁷. Endogenní estrogeny jsou např. 17β-estradiol, estron či estriol. V dnešní době již bylo připraveno mnoho syntetických steroidů v souvislosti s hledáním nových léků. Nejznámějším syntetickým steroidem odvozeným od estradiolu je ethinylestradiol⁷⁶, jehož struktura je znázorněna na Obr. 9. Exogenní estrogeny jsou látky, které nejsou přirozenou součástí endokrinního systému, ovšem vykazují estrogenní aktivitu. Tyto environmentální estrogeny se vážou na estrogenní receptory (receptory pro endogenní hormony) a dochází k jejich aktivaci či inaktivaci, což má za následek narušení přirozeného metabolismu hormonů. Jsou známy dva typy estrogenních receptorů, a to α a β. Přirozený hormon 17β-estradiol a syntetický 17α-ethinylestradiol (EE2) se vážou na receptory α a dochází tedy ke kompetici o toto vazebné místo. Některé studie uvádějí přednostní vazbu EE2 před přirozeným 17β-estradiolem, což má samozřejmě negativní účinky⁷⁰.



Obr. 9: 17α-ethinylestradiol, vytvořeno v programu ChemSketch.

1.3.2 17 α -ethinylestradiol

Syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) je aktivní složkou antikoncepčních pilulek a hormonálních doplňků. Do antikoncepčních pilulek se přidává EE2 místo estradiolu kvůli optimální absorpci, jelikož samotný estradiol je perorálně neaktivní⁷⁸. Množství EE2 v jedné antikoncepční pilulce kolísá v rozsahu 15-50 μg ⁷⁹. EE2 byl identifikován jako jedna z hlavních endokrinně disruptivních látek vyskytujících se v povrchových vodách⁸⁰, kam se dostane po průchodu běžným procesem v čističkách odpadních vod. V Tab. 1 jsou udány koncentrace EE2 a vybraných estrogenů detekované v odtocích z různých čistíren odpadních vod⁷³.

Tab. 1: Koncentrace vybraných estrogenů detekované v odtocích čistíren odpadních vod (ČOV).

Estrogeny	Koncentrace v odtocích sledovaných ČOV [ng. l ⁻¹]				
	V. Británie	Francie	Itálie	Švédsko	Kanada
Estron	1-80	4,3-7,2	5-30	5,8	< ms-48
Estradiol	1-50	4,5-7,2	3-8	1,1	< ms-64
EE2	< ms-7	2,7-4,5	x	4,5	< ms-42
Nonylfenol	< ms-5400	x	1120-2235	840	80-15000

ms-mez stanovení, x-hodnoty nejsou k dispozici⁷³

Syntetický EE2 je v těle metabolizován na konjugáty s kyselinou glukuronovou a tyto konjugáty jsou posléze vyloučeny ženskou močí ven z organismu. Při zpracování splaškové vody pak mohou být konjugáty aktivovány kalem, kdy dochází k hydrolýze konjugátu glukuronidasou, a tím pádem ke vzniku opět aktivního estrogenu a kyseliny glukuronové. Glukuronidasa je produkována mikroorganismy obsaženými v kalu, jako příklad lze uvést známou bakterii *Escherichia coli*. Touto zpětnou aktivací pak syntetické estrogenu negativně působí na organismy ve svém okolí, zejména na hormonální systém vodních živočichů, a to i při velmi nízkých koncentracích a i velmi dlouhou dobu po uvolnění do životního prostředí⁸¹. Vlivem zvýšené koncentrace EE2 ve vodě dochází např. u samců k produkci vitellogeninu, což je fosfolipoprotein, který slouží jako prekurzor bílkovin vaječného žloutku, tudíž se za normálních okolností vyskytuje pouze u samic⁸². U lidí mohou zvýšené koncentrace těchto látek stimulovat růst buněk karcinomu prsu či narušit spermatogenezi⁸³. Vzhledem ke

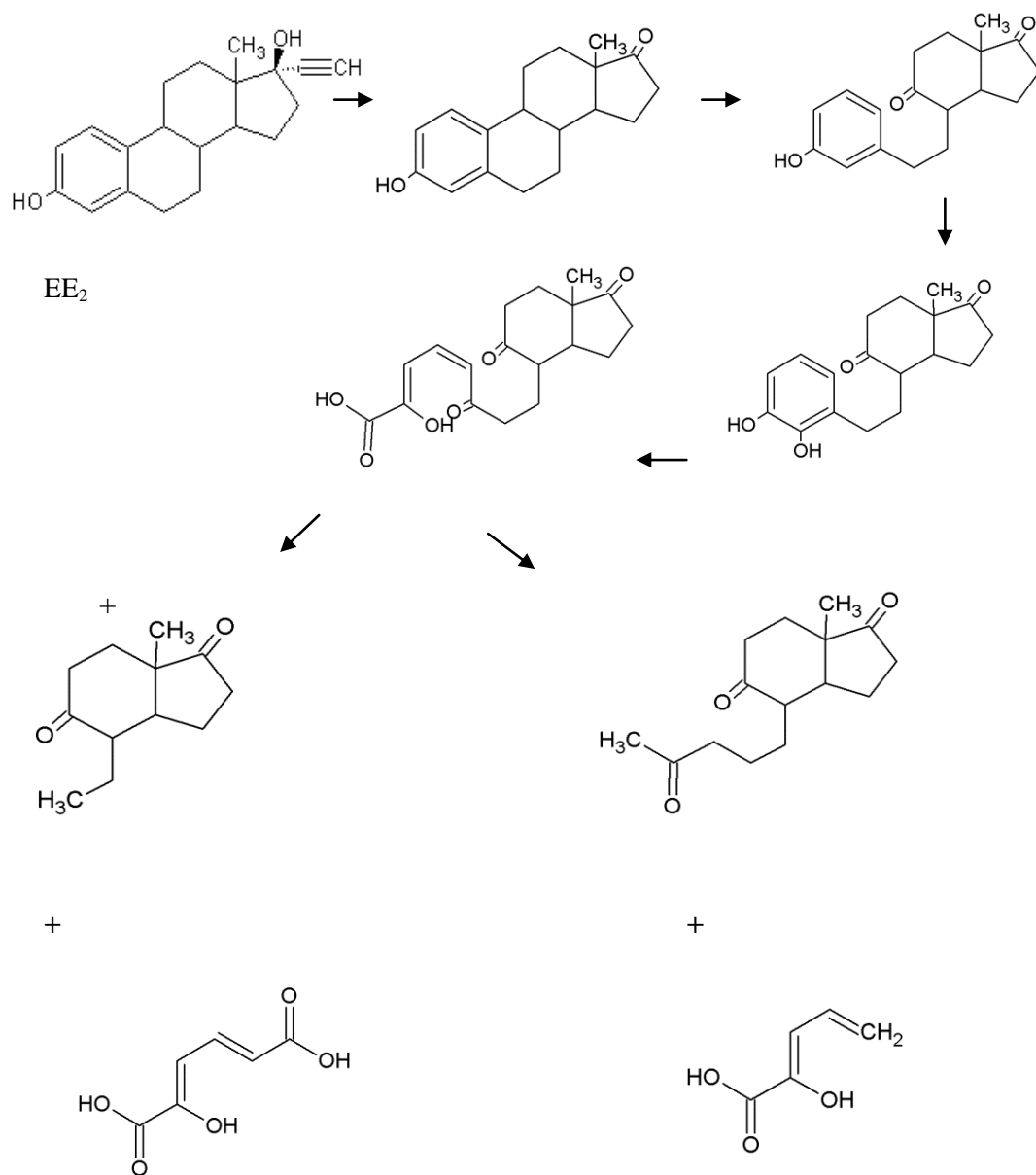
škodlivým účinkům EE2 a EDc obecně a velké obtížnosti odstranění těchto látek z odpadních vod, je snaha mnohých vědců zaměřena na vývoj a výzkum nových metod biodegradace, které by mohly tento problém částečně vyřešit.

1.3.3 Biodegradace steroidních sloučenin

Degradace přirozených estrogenů (estron, estradiol) probíhá u savců převážně v játrech. Nejprve dochází k hydroxylaci steroidní molekuly na různých pozicích kruhů. Následná glukuronidizace (reakce s kyselinou glukuronovou) nebo sulfatace vede ke zvýšení rozpustnosti metabolitu a snadnému vyloučení z organismu. Takto lze získat až 50 různých metabolitů, které jsou exkretovány ženskou močí⁸⁴.

Zatím byl nalezen jen malý počet mikroorganismů úspěšně degradujících EE2. Schopnost degradovat EE2 byla objevena zejména u bakterií oxidujících amoniak, a dokonce několika kmenů řas. Za zmínku stojí bakterie *Rhodococcus zopfii* a *Rhodococcus equi*, izolované z čističek odpadních vod, které jsou schopné odstranit až 100 mg. l⁻¹ EE2 během 24 hodin⁸⁵. Dalším kmenem bakterií schopným degradovat EE2 je např. *Sphingobacterium* JCR5, který metabolizuje až 87 % EE2, který jim slouží jako jediný zdroj uhlíku a energie. Na základě výsledků získaných z analýzy hmotnostního spektra byla navržena katabolická dráha degradace EE2 zmíněným kmenem JCR5. Tato předpokládaná dráha je uvedena na Obr. 10, str. 25⁸⁶.

Velmi slibnou alternativou degradace EE2 se jeví aplikace hub bílé hniloby. Jedním z kandidátních organismů je i studovaná houba *Pleurotus ostreatus*. Z výsledků studie Cajthamla a kol. z roku 2009⁷⁴, zabývající se testováním degradačního potenciálu sedmi hub bílé hniloby, vyplývá, že nejúčinnější degradace EE2 byla zjištěna u hub *Irpex lacteus* a *Pleurotus ostreatus*, které byly schopny kompletně odstranit EE2 o koncentraci 10 mg. l⁻¹ již během prvních tří dnů kultivace v tekutém mediu. Ačkoliv došlo k úplnému odstranění EE2, byla v kulturách nadále detekována zbytková estrogení aktivita, což poukazuje na možnost tvorby estrogeních metabolitů v průběhu degradace⁸⁷.



Obr. 10: Předpokládaná katabolická dráha degradace EE2 kmenem bakterií JCR5, vytvořeno v programu ChemSketch, upraveno dle⁸⁶.

2 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo zjistit, zda se cytochromy P450 houby *Pleurotus ostreatus* účastní degradace endokrinně disruptivní látky 17 α -ethinylestradiolu, a tím tedy přispět k objasnění mechanismu tohoto procesu, který není dosud znám. Pro úspěšné dosažení daného cíle bylo dále nutné:

- Izolovat mikrosomální frakci houby *Pleurotus ostreatus*, a to v dostatečném množství.
- Charakterizovat získanou mikrosomální frakci.
- Prokázat degradaci 17 α -ethinylestradiolu *in vivo* a degradaci *in vitro* s použitím izolované mikrosomální frakce, a to v uspořádání bez nebo s použitím inhibitoru cytochromu P450.
- Případně identifikovat produkty degradace 17 α -ethinylestradiolu.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použitá houbová kultura

Houbová kultura *Pleurotus ostreatus* byla poskytnuta Mikrobiologickým ústavem, Akademie věd České republiky v Praze. Pro všechny pokusy byl použit kmen *P. ostreatus* 3004 ze sbírky CCBAS.

3.1.2 Chemikálie a rozpouštědla

Chem-Lab, Belgie: Acetonitril (ACN)

Chromservis, ČR: Ethylacetát (pro HPLC)

Lachema, ČR: EDTA Na₂, Na₂S₂O₄, Na₂CO₃, (H₂O), NaHCO₃, Vínan sodno–draselný

Lach:ner, ČR: KH₂PO₄, Sacharosa

Oxoid, USA: Malt-extrakt Broth

Penta, ČR: Agar, Glycerol (bezvodý), KOH, Na₂HPO₄ · 12 H₂O, NaOH, Methanol

Roche, Švýcarsko: Inhibitory proteas (tablety Complete protease inhibitor)

Sevapharma a.s., ČR: Hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA: 1-aminobenzotriazol, 17 α -ethinylestradiol, Dimethylsulfoxid

(DMSO) \geq 99,5 %, DTT, NADPH,

N,N-Dimethylformamid (proHPLC) \geq 99,99 %, PMSF

Poz. Všechny chemikálie byly p.a., pokud není uvedeno jinak

3.1.3 Použité přístroje

Analytické váhy 40 SM-200 A

Pesa, Švýcarsko

Analytické váhy AE 240

Mettler, Švýcarsko

Autokláv Falcon

LTE Scientific LTD, Velká Británie

Automatické pipety (sada)

Biohit, Finsko

Automatický CO₂ inkubátor IR1500

Flow Laboratories, Německo

Centrifuga K 23	Janetzki, Německo
Centrifuga K 24	Janetzki, Německo
GC/MS	Bruker, Německo
Homogenizátor Ultra-Turrax T18	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Německo
HPLC UV system	Waters, USA
Inkubátor Orbi-Safe	Gallenkamp, Velká Británie
Minishaker MS 1	IKA Labortechnik, Německo
Microplate BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
pH metr Lavat	p-Lab, a.s., ČR
pH/ORP metr HI 2211	Hanna instruments, USA
Předvážky 440-35 N	Kern, Německo
Rotor 45 Ti, 70 Ti	Beckman Coulter, USA
Speedvac DNA 110	Savant , USA
Spektrofotometr Specord M 40	Carl Zeiss Jena, Německo
Sonikátor UC 005AJ 1	Tesla, ČR
Třepačka LT 2	Votice, ČSR
Ultra centrifuga LE-80 K	Beckman Coulter, USA
Vakuová odparka RVO 200 A	Ingos, ČR

3.2 Metody

3.2.1 Příprava kultivačního media a sterilizace

MEG medium: 1% (w/v) glukosa, 0,5% (w/v) Malt-extrakt Broth, rozpuštěno v 1000 ml deionizované vody

Kultivační medium MEG bylo připraveno vždy bezprostředně před sterilizací, která probíhala v uzavřených Erlenmayerových baňkách vlhkou parou pod tlakem v autoklávu (121°C, 25 minut, 0,15 kPa).

3.2.2 Příprava inokula houby *P. ostreatus*

Inokulum pro tekuté kultury houby *P. ostreatus* bylo připraveno v 250 ml Erlenmayerových baňkách, které obsahovaly 20 ml tekutého MEG média, do kterého

byly aplikovány tři agarové disky o průměru 8 mm s myceliem. Agarové disky byly vyříznuté z Petriho misek porostlých 7 denní houbovou kulturou. Takto připravené kultury byly ponechány růst v temnu, stacionárně, při 28° C po dobu 7 dní. Poté byly kultury homogenizovány pomocí Ultra-Turrax T25 za sterilních podmínek a získaný homogenát byl ihned použit při všech očkování kultur jako inokulum. Inokulum bylo vždy připravené RNDr. Kateřinou Svobodovou, Ph.D.

3.2.3 Degradace EE2 houbou *P. ostreatus* in vivo

Bylo připraveno 40 Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml s 20 ml MEG media. Vše bylo předem sterilizováno (kapitola 3.2.1). Do každé baňky bylo přidáno takové množství inokula *P. ostreatus*, aby jeho obsah v tekuté kultuře činil 5 % (v/v). Kultivace probíhala v temnu, stacionárně, za aerobních podmínek při 28 °C, 7 dní. Deset baněk bylo následně podrobena sterilizaci vlhkou parou pod tlakem v autoklávu (25 minut při 120 °C) a tato sada byla použita jako negativní kontrola degradace. Zbylé baňky byly rozděleny na dvě sady. Do obou sad byl přidán roztok EE2 v DMSO o koncentraci 13 338 ppm (45 mM) do výsledné koncentrace 10 ppm (0,034 mM). Do druhé sady byl navíc přidán inhibitor CYP 1-ABT o koncentraci 20 121 ppm (150 mM) do výsledné koncentrace 45 ppm (0,34 mM). Sady s EE2 a 1-ABT byly připraveny v tripletech, negativní kontroly v dubletech. Všechny baňky byly ponechány dále inkubovat v temnu, stacionárně, při 28 °C. Reakce byla zastavena v časových intervalech 0 h, 1h, 6 h, 24 h a 48 hodin přidáním ethylacetátu po předchozí homogenizaci. EE2 byl ethylacetátem extrahován (kapitola 3.2.4) a jeho množství detekováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (kapitola 3.2.12).

3.2.4 Extrakce EE2

Všechny narostlé kultury byly nejprve zhomogenizovány (Ultra-Turrax T18) a poté bylo do každé baňky přidáno 200 µl 1 M HCl. Homogenát byl převeden do uzavíratelné baňky (pyrex) o objemu 100 ml. Extrakce byla provedena v pěti krocích. V prvním kroku byla provedena extrakce 20 ml ethylacetátu třepáním po dobu 15 minut. Baňky byly poté umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně a poté ponechány stát při laboratorní teplotě, dokud nedošlo k oddělení fází. Poté byla odebrána vrchní

organická fáze skleněnou stříkačkou do uzavíratelné srdcovité baňky. Další extrakce byly provedeny stejným způsobem, ovšem nově s 10 ml ethylacetátu a třepáním po dobu 10 minut. Po pátém odběru byl obsah baňky s odebranou organickou fází zahuštěn na vakuové odparce RVO 200 A (teplota lázně 40°C, tlak 800 hPa) na finální objem 2 ml. Koncentrovaný extrakt byl přesušen přes kolonku s bezvodým Na₂SO₄ a eluován 3 x 3 ml ethylacetátu do předem zvážené vialky. Finální extrakt byl zvážen a analyzován pomocí HPLC (kapitola 3.2.12). Výsledky z HPLC analýzy byly přepočteny na výtěžek EE2 v µg určeného z přesného objemu extraktu.

3.2.5 Kultivace *P. ostreatus* pro izolaci mikrosomální frakce

Byly připraveny vždy dvě sady kultur. Jedna sada označovaná jako kontrolní (K-K), která nebyla vystavena působení EE2 a druhá sada exponovaná EE2 (EE2-K). Každá sada byla připravena v 60 Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml. Do každé baňky bylo přidáno 90 ml MEG média a sterilně pipetováno inokulum houby *P. ostreatus* v takovém množství aby jeho obsah v tekuté kultuře činil 5 % (v/v).

U sady EE2-K byl do každé baňky s médiem a inokulem *P. ostreatus* přidán zásobní roztok EE2 v DMSO o koncentraci 6000 ppm (20,3 mM) do finální koncentrace 10 ppm (0,034 mM). Kultivace probíhala 14 dní v temnu, stacionárně za aerobních podmínek, při 28° C.

3.2.6 Izolace mikrosomální frakce

Mikrosomy jsou malé kousky membrány, které vznikají při frakcionaci buněk, kdy dochází k narušení sítě ER. Mikrosomy jako takové vznikají tedy uměle a v buňkách se obecně nevyskytují. Právě v těchto útvarech je lokalizováno velké množství cytochromů P450⁴⁵.

Pufir mixovací (pufir M), pH 7,2: 100 mM *KH₂PO₄*; 100 mM *Na₂HPO₄*; 12 *H₂O*; 16% (v/v) *Glycerol*; 250 mM *Sacharosa*; 1,5 mg/ml *BSA*; 0,77 mg/ml *DTT* v *d H₂O*; 0,37 mg/ml *EDTA*; 0,04 mg/ml *PMSF* v *CH₃OH*; 2 M *NaOH* (úprava pH)

Pufir uchovávací (pufir U) pH 7,2: 50 mM KH_2PO_4 ; 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 25 % (v/v) *Glycerol*, 2 M *NaOH* (*úprava pH*)

Mikrosomální frakce (MF) houby *P. ostreatus* byla izolována diferenční centrifugací dle postupu³⁵, který byl částečně modifikován. Izolace MF probíhala při 4 °C v chlazené místnosti. Po 14 dnech kultivace byla narostlá houbová kultura přefiltrována přes nylonovou tkaninu. V kultivační tekutině byl v případě EE2 kultur zjišťován obsah EE2 pomocí HPLC, pro izolaci MF bylo zpracováváno pouze mycelium. Veškeré mycelium bylo promyto dostatečným množstvím pufiru M a opět přefiltrováno. Takto promyté mycelium bylo zmrazeno tekutým dusíkem a po částech rozdrceno v třecí misce s tloučkem na jemný prášek. Pro větší účinnost homogenizace bylo do misky přidáno malé množství křemelinového prášku. Takto rozdrcené mycelium bylo převedeno do 400 ml pufiru M, do kterého byly nejprve přidány 2 tablety inhibitoru proteas, a homogenizováno homogenizátorem dle Pottera-Elvehjema.

Získané homogenáty byly odstředěny 10 minut při 3 000 RPM (centrifuga K-23, 4 °C) ve výkyvném rotoru 4 x 70 ml. Supernatant byl uchován v chladu a vzniklá peleta byla opět zmrazena tekutým dusíkem, rozetřena v třecí misce a podrobena homogenizaci s 200 ml pufiru M a dále zpracována za stejných podmínek.

Spojené supernatanty byly dále centrifugovány 20 minut při 13 000 RPM (centrifuga K-24, 4 °C) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml. Supernatant byl z kyvety pečlivě odlit bez kontaminace lehce sedlou vrstvou mitochondrií.

Takto získaný supernatant byl podroben ultracentrifugaci trvající 75 minut při 45 000 RPM (Beckman, úhlový rotor Ti 45, 4 °C). Získaný supernatant je cytosol, který byl uložen při -80 °C.

Peleta byla homogenizována se zhruba 40 ml pufiru U a z homogenní suspenze byla připravena finální mikrosomální frakce ultracentrifugací trvající 75 minut při 60 000 RPM (Beckman, rotor Ti 70, 4 °C). Mikrosomální sediment byl resuspendován se 4 ml pufiru U a rehomogenizován. Tento finální mikrosomální preparát byl zmrazen tekutým dusíkem a uložen v mrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.2.7 Stanovení koncentrace proteinů

Činidlo A, pH 11,25: 2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{H}_2\text{O})$; 0,95 % (w/v) NaHCO_3 ; 0,4 % (w/v) NaOH ; 0,16% (w/v) *vínan sodno-draselný*

Činidlo B: 4 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Koncentrace proteinů v mikrosomální (MF) i cytosolární (C) frakci byla stanovena pomocí metody BCA⁸⁸. Z izolovaného materiálu byly připraveny vždy tři vzorky, tj. 25x, 50x a 100x zředěný roztok MF a 5x, 10x a 20x zředěný roztok C, ředěno destilovanou vodou. Stanovení bylo provedeno pomocí komerčního setu *Microplate BCA Protein Assay Kit*. Dle návodu bylo do mikrotitrační destičky pipetováno vždy 9 μl příslušného vzorku, standardu či slepého vzorku, kterým byla destilovaná voda. Ke každému vzorku bylo přidáno 260 μl činidla, které bylo připraveno bezprostředně před použitím, a to rozpuštěním bicinchoninové kyseliny (BCA) v 50 dílech roztoku A tak, aby výsledná koncentrace v 51 dílech byla 1% (w/v). Poté byl přidán 1 díl činidla B. Kalibrační přímka byla vytvořena pomocí standardů sérového hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/ml. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 30 minut, při 37 °C v inkubátoru (IR 1500). Následně byla změřena absorbance proteinů při 562 nm pomocí čtečky mikrotitračních destiček a automaticky vyhodnocena příslušná koncentrace proteinů pomocí programu KIM 32.

3.2.8 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Pufir pro stanovení CYP pH 7,5: 100 mM KH_2PO_4 ; 2 % (v/v) *Glycerol*; 2 M KOH (*úprava pH*)

Ke stanovení koncentrace CYP je využíváno charakteristické absorpce komplexu CYP v redukovaném stavu s CO při 450 nm⁴¹. Mikrosomy byly vhodně naředěny pufrem pro stanovení CYP na celkový objem 2 ml. Cytochrom P450 byl zredukován přidáním 14 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Následně byl vzorek rozdělen po 1 ml do dvou maskovaných semimikrokyvet o optické dráze 1 cm a byla změřena základní linie. Obsah vzorkové kyvety byl 1 minutu probubláván CO a poté bylo proměřeno diferenční spektrum v rozsahu 400-490 nm na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M 40. Měření bylo po 2 minutách a promíchání obou kyvet zopakováno. Ze získaných spekter byla vypočítána koncentrace cytochromu P450

s použitím hodnoty molárního extinčního koeficientu $\epsilon_{450-490}$ $0,091 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, koncentrace inaktivní formy P420 byla vypočítána s použitím hodnoty molárního extinčního koeficientu $\epsilon_{420-490}$ $0,110 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a z rozdílu absorbance mezi 450 a 490 nm podle vzorce:

$$c_{\text{CYP450}} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{450-490} \cdot l} \cdot \text{ředění } [\mu\text{M}] \quad c_{\text{CYP420}} = \frac{A_{420} - A_{490}}{\epsilon_{420-490} \cdot l} \cdot \text{ředění } [\mu\text{M}]$$

l - optická dráha [cm]

V případě, že absorbance na konci spektra měla rostoucí charakter, byla koncentrace CYP vypočítána za použití hodnoty absorbance minima místo hodnoty absorbance při 490 nm.

3.2.9 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Pufř pH 7,5: 0,3 M KH_2PO_4 ; 0,5 mg/ml *Cytochrom c*; 1 mM *EDTA*; 2 M *KOH* (úprava pH)

Princip této metody je, že se měří rychlost redukce cytochromu *c*, za současné oxidace NADPH. Daný přírůstek redukovaného cytochromu *c* se měří při vlnové délce 550 nm⁸⁹. Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy byla měřena na dvoupráskovém spektrofotometru Specord M 40. Proměřeny byly MF ze všech izolací. Vzorek MF byl vhodně naředěn pufřem na celkový objem 2 ml tak, aby nárůst absorbance byl lineární alespoň po dobu 1 minuty. Do dvou maskovaných semimikrokyvet bylo pipetováno po 1 ml naředěného vzorku s pufřem obsahujícího cytochrom *c* a nejprve byla proměřena základní linie. Poté bylo do vzorkové kyvety přidáno 10 μl 10 mM NADPH (nastartování reakce), obsah kyvety byl promíchán a po dobu 90 sekund byl proměřován nárůst absorbance při 550 nm. Následně byla vypočítána aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy ze směrnice závislosti absorbance při 550 nm na čase, s použitím hodnoty molárního absorpčního koeficientu cytochromu *c* $\epsilon = 21,01 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$, podle vzorce:

$$a_{\text{red}} = \frac{sm}{\epsilon_{\text{cytc}} \Delta t \cdot l} \cdot \text{ředění [nmol}_{\text{cytc}}/\text{min.ml}]$$

a_{red} -aktivita NADPH:cytochrom P450reduktasy, sm -směrnice závislosti absorbance na čase, ϵ_{cytc} -molární absorpční koeficient cytochromu c , l - optická dráha [cm]

3.2.10 Degradace EE2 mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus*

Pufir fosfátový pH 7,2: 50 mM KH_2PO_4 ; 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 2 M $NaOH$ (úprava pH)

Pro stanovení degradačního potenciálu mikrosomální frakce vůči EE2 byly použity jak mikrosomy izolované z kultur *P. ostreatus* vystavené působení EE2 (EE2-MF), tak mikrosomy kontrolní (K-MF). V prvotních experimentech bylo množství MF v inkubačních směsích přepočteno na koncentraci CYP. Výsledná koncentrace složek v inkubační směsi o výsledném objemu 200 μ l byla následující:

- 50 nM CYP
- 4 ppm (13,5 μ M) EE2 (zásobní roztok EE2 v DMSO 2000 ppm-6,8 mM)
- 1 mM PMSF a 1 mM DTT (přidáno do zásobního roztoku EE2 v DMSO)
- NADPH-GS (1 mM $NADP^+$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 10 mM $MgCl_2$, 1U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)
- Pufir fosfátový pH 7,2

Kvůli minimalizaci případných chyb, způsobených pipetováním, byly jednotlivé inkubační směsi připraveny z premixů. Objem jednotlivých premixů byl přepočítán na počet vzorků, vždy s malou rezervou. Jako negativní kontroly byly použity mikrosomy vařené v pufru na vodní lázni (vař. MF), další směs obsahovala MF probubláné 1 minutu CO (CO MF). Inkubační směsi byly připraveny vždy v paralelních vzorcích. Reakce byla zahájena přidáním 20 μ l NADPH-GS k 180 μ l daného premixu. Inkubace probíhala za mírného třepání (300 RPM), při 28 °C v různých časových intervalech, a to 1h , 3h , 6h a 24h. Reakce byla následně stopována přidáním 100 μ l ACN. Po zastavení reakce byly vždy směsi 5 minut sonikovány, poté 10 minut centrifugovány

při 6 000 RPM a pro analýzu pomocí HPLC byl odebrán pouze supernatant (kapitola 3.2.12).

Pro další degradační experimenty s MF *P. ostreatus* byl předchozí postup mírně modifikován. S ohledem na nepříliš vysokou reprodukovatelnost stanovení CYP v MF bylo množství MF v inkubaci přepočítáno na koncentraci proteinů. Jelikož není znám vliv látek PMSF a DTT na aktivitu houbových CYP, byly tyto látky z inkubační směsi zcela vynechány a také byla zvolena vyšší počáteční koncentrace EE2 v inkubační směsi, a to 6 ppm (0,0204 mM). Jelikož byla dále zkoumána degradační schopnost nejen celé MF, ale zejména CYP, byl do směsi (MF+1-ABT) přidán inhibitor CYP, 1-ABT, a to v desetinásobném nadbytku ppm oproti EE2. Navíc byl degradační experiment ještě rozšířen o vzorky, které neobsahovaly NADPH-GS (Bez NADPH) a které tedy měly sloužit k odhalení závislosti degradační reakce na NADPH. Jako negativní kontroly byly opět použity mikrosomy inaktivované povařením v pufru (vař. MF). Výsledná koncentrace složek inkubační směsi o výsledném objemu 200 μ l je uvedena v Tab. 2. Inkubace probíhala za stejných experimentálních podmínek jako výše.

Tab. 2: Složení inkubačních směsí pro druhou sérii degradačních testů.

<i>Premix/</i> Inkubační směs	A	B	C	D
c _{prot.}	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml
EE2 v DMSO	6 ppm (0,0204 mM)	6 ppm (0,0204 mM)	6 ppm (0,0204 mM)	6 ppm (0,0204 mM)
1-ABT	-	60 ppm (0,45 mM)	-	-
NADPH-GS	1 mM	1 mM	1 mM	-
Pufr fosfátový 50 mM, pH 7,2				

Premix: A- MF, B- MF+1-ABT, C- MF inaktivovaná povařením, D-Bez NADPH, c_{prot.}-koncentrace proteinů, NADPH-GS (1 mM NADP⁺, 10 mM glukosa-6-fosfát, 10 mM MgCl₂, 1U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

3.2.11 Identifikace metabolitů EE2

Pufir fosfátový pH 7,2: 50 mM KH_2PO_4 ; 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 2 M $NaOH$
(úprava pH)

Pro kvalitativní stanovení a identifikaci metabolitů vzniklých degradací EE2 byly použity mikrosomy izolované z kultur pěstovaných s 10 ppm EE2, z první série izolace. Jako negativní kontroly degradace EE2 mikrosomální frakcí byly použity inkubační směsi jednak bez NADPH-GS a jednak s MF inaktivovanou povážením ve vodní lázni. Inkubační směsi o celkovém objemu 500 μ l byly připraveny v dubletech o následujícím složení:

- 0,5 μ M CYP
- 4 ppm (13,5 μ M) EE2 (zásobní roztok EE2 v DMSO 2000 ppm-6,8 mM)
- NADPH-GS (1 mM $NADP^+$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 10 mM $MgCl_2$, 1U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)
- Fosfátový pufir

Reakce byla zahájena přidáním NADPH-GS. Inkubace probíhala 3 h za mírného třepání (300 RPM) při 28 °C. Po třech hodinách byla reakce zastavena přidávkem 0,5 ml ethylacetátu. Poté byla směs 60 sekund promíchána na vortexu a centrifugována 5 minut při 6 000 RPM (centrifuga K-23) pro lepší oddělení fází. Horní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky a extrakce byla zopakována ještě dvakrát, stejným způsobem. Organická fáze byla odebírána do stejné mikrozkušavky. Odebraný extrakt byl odpařen do sucha (SpeedvacDNA 110, střední rychlost). Pro následnou analýzu byly vzorky rozpuštěny v ethylacetátu, derivatizovány a podrobeny analýze pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (kapitola 3.2.13).

3.2.12 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vzorky, pro stanovení obsahu EE2, které neobsahovaly ACN, byly před analýzou nejprve tímto rozpouštědlem naředěny (40:60 v/v) a analyzovány pomocí HPLC s UV detekcí (Alliance, Waters 2695 Separations Module, Waters, Milford USA) za použití izokratické eluce mobilní fází, kterou byl 75 % (v/v) ACN v destilované vodě. EE2 byl separován na koloně Kinetex C18 (150 mm x 4 mm, velikost částic kolony 2,6 μ m, předkolona C18) s průtokem 0,3 ml. min^{-1} při teplotě 35 °C. Detekce probíhala při 280

nm, nástřik vzorku činil 10 μ l a detekční limit EE2 byl 0,6 ppm. Obsah EE2 v analyzovaném vzorku byl automaticky vyhodnocen z kalibrační přímky standardů EE2.

3.2.13 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro kvalitativní analýzu metabolitů EE2 pomocí GC/MS bylo nejprve nutné připravené ethylacetátové extrakty derivatizovat, což zlepší jejich převod do plynné fáze.

Derivatizace:

K 3 ml vzorku bylo přidáno 200 μ l *N, N*-Dimethylformamidu a vzorky byly odpařeny pod proudem N_2 na výsledný objem 200 μ l. Poté bylo ke směsi přidáno 200 μ l derivatizačního činidla BSTFA+TMCS v poměru 99:1 (*N, O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid+trimethylchlorsilan) a vzorky byly inkubovány při 70°C po dobu 30 minut a následně odpařeny na finální objem 200 μ l. Před vlastní analýzou bylo ke vzorkům, přidáno 800 μ l ethylacetátu.

Analýza vzorku:

Analýza metabolitů byla prováděna metodou GC (Bruker) s hmotnostním kvadrupólovým detektorem (Bruker SQ mass detektor). Látky byly separovány na koloně DB-5MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) o délce 30 m a vnitřním průměru 0,25 mm. Teplotní program analýzy trval nejprve 1 minutu při 60 °C a poté stoupala teplota o 25 °C/min až do teploty 120 °C a následně rychlostí 2,5°C/min až do finální teploty 240°C po dobu 30 minut. Nosným plynem bylo helium (čistota 99,99%) s konstantním průtokem 1 ml/min. Nástřik činil 1 μ l vzorku a analyty byly ionizovány EI při 70 eV. Proměřen byl celkový iontový proud v rozsahu 150-600 m/z.

Vlastní analýza vzorků byla provedena na Mikrobiologickém Ústavu, AV, ČR v.v.i., v Praze, a to RNDr. Zdenou Křesinovou.

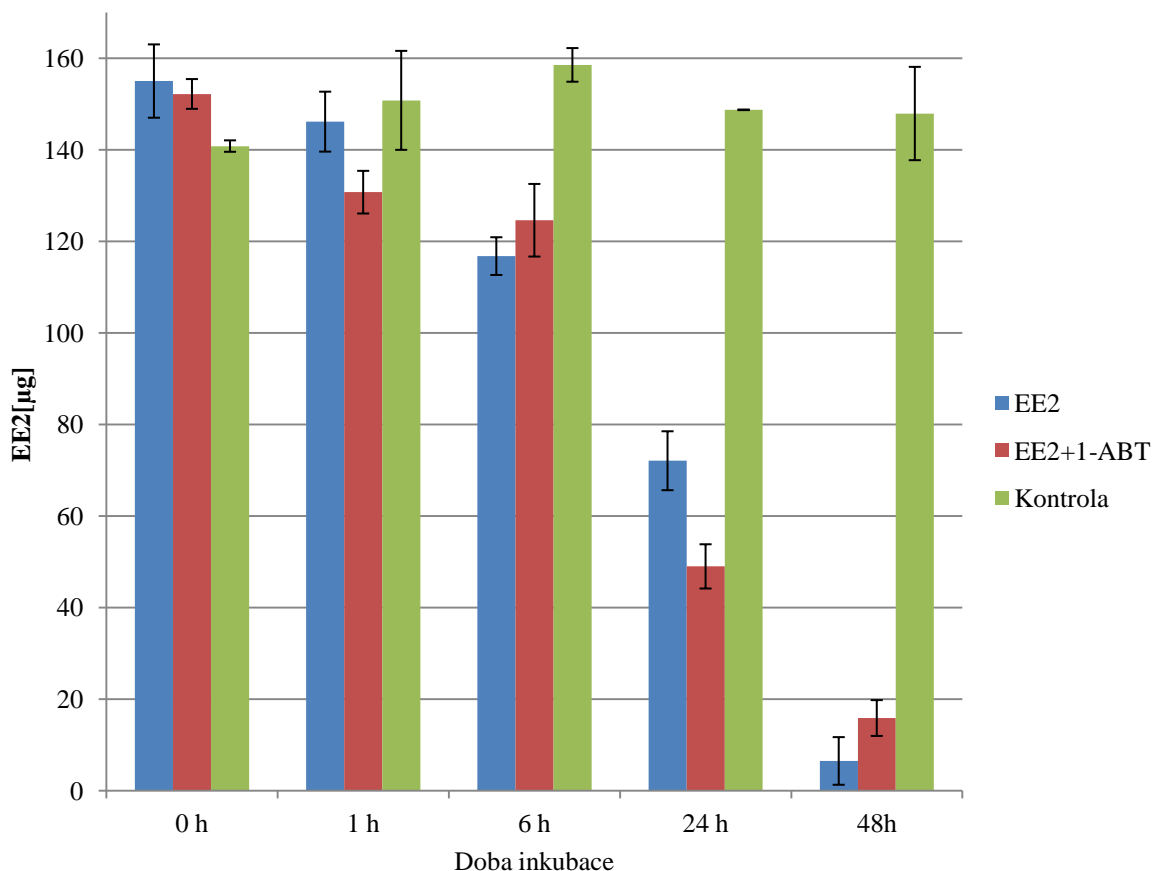
4 Výsledky a diskuze

4.1 Degradace EE2 houbou *P. ostreatus in vivo*

Degradační potenciál *P. ostreatus* vůči různým xenobiotikům včetně EE2 byl již v několika studiích potvrzen^{30,33,34,74,87}, ovšem mechanismus degradace není dosud znám, ani nejsou známy klíčové enzymové systémy zapojené do tohoto procesu. Z nalezených a identifikovaných metabolitů, což jsou často deriváty EE2 hydroxylované na různých pozicích steroidního kruhu (RNDr. Zdena Křesinová, ústní sdělení) lze usuzovat, že při degradačním procesu budou zapojeny houbové CYP, jelikož produkce hydroxyderivátů při monooxygenaci xenobiotik je typická reakce právě pro CYP. Vzhledem k tomuto poznatku a dílčímu cíli práce pokusit se zjistit, zda jsou CYP zapojeny do některého z degradačního kroku EE2, byl v inkubačních směsích použit inhibitor CYP 1-ABT. Původním plánem při experimentu degradace EE2 *in vivo* bylo použití piperonyl butoxidu (PB) jako inhibitoru CYP, který je také ve většině prací zabývajících se degradací xenobiotik houbovými CYP používán^{19,21}. Z výsledků laboratoře katedry Biochemie však vyplývá, že PB vykazuje inhibiční vlastnosti nejenom vůči CYP, ale i vůči celé řadě peroxidas (RNDr. Markéta Martínková, Ph.D., ústní sdělení). Je tedy vysoce pravděpodobné, že by mohl inhibovat i houbové peroxidasy včetně LiP a MnP, které jsou houbou *P. ostreatus* (a houbami bílé hniloby obecně) sekretovány do media^{18,19,35,49,62}, což bude rozvedeno níže.

Při degradačním experimentu byly v této práci použity, kromě zmíněného inhibitoru 1-ABT, inkubační směsi exponované EE2 a negativní kontroly, připravené dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.3. Negativní kontroly, což byly kultury inaktivované sterilizací v autoklávu, sloužily k porovnání účinnosti degradace EE2 houbou *P. ostreatus*. V těchto vzorcích nebyl v žádném čase inkubace pozorován úbytek EE2. Lze tedy říci, že zde k degradaci opravdu nedochází a že usmrcené kultury houby *P. ostreatus* jsou vhodnou negativní kontrolou. Jak je patrné z grafu (Obr. 11, str. 39) po první hodině inkubace nebyl pozorován výrazný úbytek EE2 ve směsi obsahující pouze EE2, ve směsi s inhibitorem (EE2+1-ABT) je snížení o 13 % vzhledem k negativní kontrole. Po šesti hodinách už je vidět statisticky významný úbytek EE2 ve směsi bez inhibitoru, a to o 26,5 % vzhledem k negativní kontrole. Množství detekovaného EE2 ve směsi s inhibitorem je po šesti hodinách inkubace

vzhledem ke směrodatné odchylce srovnatelné (úbytek o 21,5 %) s množstvím detekovaným EE2 ve směsi bez inhibitoru.



Obr. 11: Degradace EE2 kulturou *P. ostreatus in vivo* a vliv přidavku inhibitoru CYP, 1-ABT. EE2- kultura *P. ostreatus* vystavená působení EE2, EE2+1-ABT- kultura *P. ostreatus* exponovaná EE2 s přidavkem 1-ABT, Kontrola- kultura *P. ostreatus* usmrcená sterilizací v autoklávu.

V čase 24 hodin je již prokazatelný úbytek EE2, kdy bylo ve směsi s EE2 detekováno 48,5 % z původního množství a ve směsi s inhibitorem dokonce 33 %. Po 48 hodinách inkubace dochází ke snížení až o 95,5 % v inkubační směsi bez inhibitoru. U směsi s inhibitorem je pokles srovnatelný, tedy o 90 %. Kultury vystavené působení EE2 i kultury vystavené působení EE2 a zároveň působení inhibitoru 1-ABT vykazovaly tedy časovou závislost degradace v experimentech *in vivo*.

Počáteční množství EE2 v kultuře o objemu 20 ml bylo 10 ppm, což odpovídá 200 µg. Jak je vidět z grafu (Obr. 11), nebylo při zpracování vzorků k analýze získáno celé

původní množství EE2. Po extrakci (kapitola. 3.2.4) a analýze pomocí HPLC (kapitola 3.2.12) bylo ve všech směsích (a to včetně 0h inkubace) detekováno maximálně kolem 140-155 μg EE2. Ke ztrátám dochází nejenom během samotného procesu extrakce, ale z části může docházet i k sorpci EE2 na proteiny obsažené v inkubační směsi.

Výsledky tohoto experimentu ověřily schopnost degradace EE2 kulturou houby *P. ostreatus in vivo*^{74,87}, ovšem inhibitor 1-ABT byl v inhibici degradace neúčinný. Z toho lze usuzovat, že by se CYP pravděpodobně na degradaci EE2 nemusely podílet vůbec a degradace by byla zprostředkována ligninolytickými enzymy (LiP, MnP, Lac) sekretovanými *P. ostreatem* do media nebo enzymy asociovanými s myceliem, což by mohlo vysvětlovat degradaci i ve směsi s 1-ABT, jelikož inhibiční vliv vůči peroxidasám nebyl u 1-ABT prokázán^{18,19,35,49,62}.

Jelikož se degradace v této metodě stanovuje jen jako úbytek EE2 v inkubační směsi, lze tvrdit, že degradace může být zahájena jinými enzymy (extracelulárními, intracelulárními, které 1-ABT neinhibuje), v další části procesu degradace EE2 mohou již být CYP zapojeny, což však tato metoda neodhalí. Proto se provádí experiment, kterým by se mohlo odhalit, zda se CYP účastní některého z kroků degradace, a to kvalitativní analýza a identifikace případných metabolitů pomocí GC/MS. Pokud by ve směsi s EE2 a zároveň i ve směsi s EE2+1-ABT byly nalezeny stejné produkty degradace, tak by se CYP pravděpodobně degradace nezúčastnily a byla by potvrzena výše zmíněna domněnka. Pokud by se ovšem kvalitativně metabolity lišily, svědčilo by to o zapojení CYP. Degradace EE2 by byla dále zprostředkována zmíněnými extracelulárními enzymy, ovšem ve směsi s 1-ABT by byly CYP inhibovány, tudíž by metoda GC/MS odhalila případné rozdílné produkty ve směsi s inhibitorem a ve směsi bez inhibitoru. Výsledky tohoto experimentu nejsou bohužel zařazeny v rámci této bakalářské práce, protože zatím nejsou dokončeny.

Diskutovat lze i samotnou účinnost 1-ABT. Jelikož zatím nejsou detailně popsány všechny rodiny CYP *P. ostreatus*, je možné, že použitý 1-ABT nebyl k inhibici vhodný, tedy že dané isoformy CYP účinně neinhibuje, což je v případě lidských isoform prokázáno. Studie z roku 2009, která se zabývá vlivem 1-ABT na různé isoformy lidských CYP, poukazuje na to, že ačkoliv byly CYP vystaveny působení

1-ABT, byla u některých isoformů naměřena zbytková enzymová aktivita, která se u různých isoformů CYP lišila. Např. u CYP2C9 dosahovala zbytková aktivita až 60%, u ostatních CYP se pohybovala kolem 20%⁹⁰. Inhibitor 1-ABT byl ovšem již použit k úspěšné inhibici houbových CYP, a to konkrétně i v případě *P. ostreatus*³⁰, takže se tato možnost jeví jako nejméně pravděpodobná.

Jelikož *in vivo* degradační experiment neposkytl jednoznačné výsledky ohledně role CYP, bylo přistoupeno k dalším experimentům již jen s MF, ve které jsou CYP majoritně obsaženy.

4.2 Izolace mikrosomální frakce

Pro další studium úlohy houbových CYP při degradaci EE2 bylo nejprve nutné izolovat MF z mycelia houby *P. ostreatus*, ve které jsou CYP majoritně zastoupeny⁴⁶. Proto byla další část této bakalářské práce zaměřena na izolaci mikrosomálních frakcí, kontrolních (K-MF) i exponovaných EE2 (EE2-MF), a jejich charakterizaci. Na rozdíl od většiny autorů, kteří se ve své práci zabývali izolací mikrosomální frakce z mycelia hub bílé hniloby^{14,20,48,68} a kteří používali k rozrušení buněčných stěn zejména rozemletí pomocí homogénizátoru Virtis 45 blender^{20,35,85}, byl na základě zkušeností z laboratoře katedry Biochemie⁹¹ zvolen postup se zmrazením mycelia v kapalném dusíku a následně mechanické rozetření v třecí misce s tloučkem³⁴. Jelikož se běžně izolací z mycelia získává velmi malé množství mikrosomů s nízkým obsahem CYP (v případě této práce bylo pro izolaci MF použito 60 Erlenmayerových baněk se 14-denní kulturou *P. ostreatus* a ve finále bylo získáno v průměru 0,24 nmol/mg specifického obsahu CYP viz níže), nebyl tento proces dále optimalizován. Nicméně výtěžky MF se jeví jako dostatečné k dalším degradačním experimentům.

V rámci této bakalářské práce byly provedeny 4 izolace, dvakrát byly izolované K-MF a dvakrát EE2-MF. Výsledky a charakterizace jednotlivých frakcí jsou uváděny zvlášť a jsou rozděleny na dvě části nazývané izolace 1 a izolace 2. U izolace 1 K-MF bylo zpracováno jen poloviční množství materiálu z důvodu poruchy ultracentrifugy (postup izolace viz kapitola 3.2.6). Polovina materiálu byla tedy zpracována a použita k charakterizaci získané K-MF, druhá polovina byla v polovině izolace zamrazena a zpracována byla až po opravě ultracentrifugy. Postup izolace tedy nebyl u této části materiálu standardní, a tudíž nebyla tato MF použita k dalším stanovením. Pro

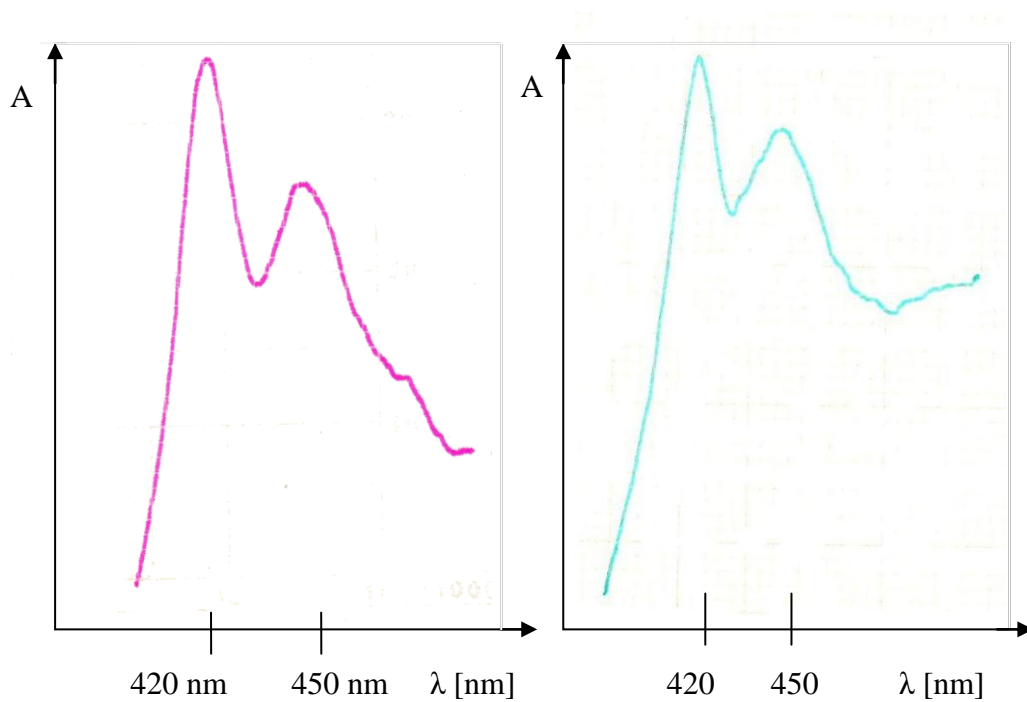
stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy již nebylo dostatek materiálu z této K-MF, proto výsledky u této frakce chybí (kapitola 4.3) a jsou udány výsledky naměřené ze zásobní K-MF*, která ovšem nebyla izolována v rámci této bakalářské práce. K-MF* byla tedy charakterizována pouze stanovením zmíněné aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy a stanovením koncentrace proteinů.

4.3 Charakterizace mikrosomální frakce

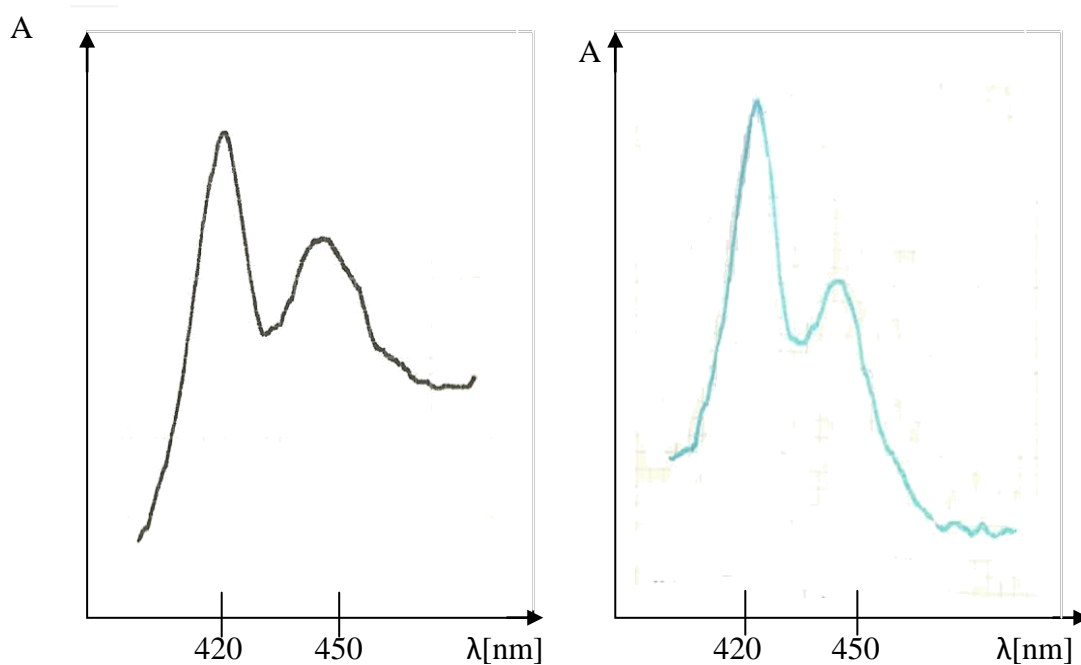
Pro charakterizaci MF bylo nutné proměřit parametry jako je koncentrace CYP, koncentrace proteinů a aktivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Charakterizace byla provedena stanovením specifických obsahů.

Jednou z hlavních charakteristik je specifický obsah CYP v MF. Pro jeho výpočet bylo nutné určit koncentraci CYP (z diferenčního CO spektra, kapitola 3.2.8) i koncentraci proteinů (fotometrické stanovení, kapitola 3.2.7). Postup stanovení CYP byl optimalizován. Sledován byl vliv času na redukci CYP a kvalitu získaného spektra, jelikož redukce může probíhat velmi pomalu. Již po 5 minutách redukce nedocházelo k výraznějším změnám v naměřených výsledcích. Samotné měření není příliš přesné, i když bylo prováděno v uspořádání, kdy kyveta se vzorkem byla umístěna co nejbližší detektoru. Měření komplikovala zejména přílišná turbidita vzorku, a i přes snahu optimálního naředění a řádného promíchání stanovovaného vzorku před každým měřením nemohlo být zabráněno případné sedimentaci mikrosomů. V rámci jednoho vzorku byla tedy provedena nejméně 4 měření, u kterých pak byly stanovené hodnoty zprůměrovány a udána směrodatná odchylka, která je právě z důvodů komplikace měření poměrně vysoká. Ukázky naměřených reprezentativních spekter pro každou izolaci (K-MF i EE2-MF) jsou uvedeny na Obr. 12 a Obr. 13 (str. 43).

Na Obr. 12 a 13 (str. 43) je vidět, že ve všech spektrech bylo pozorováno maximum kolem 450 nm, byla tedy detekována aktivní forma cytochromu P450. Přesná hodnota maxima se pohybovala kolem 448 ± 1 nm. Tento poznatek svědčí o tom, že byly pravděpodobně detekovány jiné formy CYP, v literatuře uváděné jako formy 447-452 (právě podle absorbance světla v rozmezí vlnových délek 447-452 nm)⁴¹.



Obr. 12: Vybraná diferenční CO spektra z izolace 1. Vlevo je zobrazeno spektrum naměřené v EE2-MF (růžové spektrum), vpravo spektrum naměřené v K-MF (modře).



Obr. 13: Vybraná diferenční CO spektra z izolace 2. Vlevo je zobrazeno spektrum naměřené v EE2-MF (černé spektrum), vpravo spektrum naměřené v K-MF (modře).

Aktivní forma CYP se velmi snadno přeměňuje na formu inaktivní, kdy dochází ke strukturní změně, což se projeví posunem absorpčního maxima komplexu redukované formy s CO z 450 nm na 420 nm. Pík kolem 420 nm byl pozorován u všech MF. Ze získaných spekter byla dále vyhodnocována nejenom koncentrace P450, ale i P420.

Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byla stanovena fotometricky a je uvedena spolu s vyhodnocenou koncentrací CYP v Tab. 3, kde jsou uvedené i všechny ostatní charakteristiky včetně vypočítaného specifického obsahu u všech MF. Celkově se podařilo získat u všech frakcí aktivní formu CYP, tudíž je metoda izolace MF dobře reprodukovatelná.

Tab. 3: Charakterizace izolovaných mikrosomálních frakcí.

MF/ Charakteristika	Izolace 1		Izolace 2	
	K-MF	EE2-MF	K-MF	EE2-MF
C_{P450} [$\mu\text{mol/l}$]	1,45 \pm 0,21	2,45 \pm 0,27	1,56 \pm 0,31	0,87 \pm 0,17
C_{P420} [$\mu\text{mol/l}$]	1,48 \pm 0,45	3,09 \pm 0,29	1,69 \pm 0,58	1,11 \pm 0,22
$C_{P450+P420}$ [$\mu\text{mol/l}$]	2,93 \pm 0,66	5,54 \pm 0,55	3,25 \pm 0,81	1,98 \pm 0,37
$C_{\text{prot.}}$ [mg/ml]	19,67 \pm 1,48	20,49 \pm 2,11	10,82 \pm 1,10	8,59 \pm 1,14
V[ml]	2,00	3,00	6,80	7,80
Výt. prot. [mg]	39,34	61,47	73,57	67,00
Sp.o. P450 [nmol/mg]	0,07	0,12	0,14	0,10
Sp.o. P420 [nmol/mg]	0,08	0,15	0,16	0,13
Sp.o. P450+P420 [nmol/mg]	0,15	0,28	0,30	0,23

C_{cyp} - koncentrace cytochromu při dané vlnové délce, $C_{\text{prot.}}$ - koncentrace proteinů stanovená metodou BCA, V- finální objem izolované MF, Výt. prot.- celkový výtěžek proteinů, Sp. o.- specifický obsah

Počáteční předpoklad byl, že v kultuře vystavené působení EE2, který by měl být CYP degradován, by mohlo dojít k indukci expresi těch CYP, které se degradace účastní, jak již bylo v literatuře popsáno u jiných substrátů CYP^{40,92}. Pro posouzení indukce bylo nutné stanovit nejenom specifický obsah aktivní formy P450, ale i specifický obsah P450+P420, jelikož při izolaci MF a následnou nešetrnou manipulací se vzorky se totiž může CYP poškodit (přeměnit se na inaktivní formu P420).

U MF z izolace 1 by specifický obsah CYP nasvědčoval tomu, že by předpoklad o indukci mohl být správný. V K-MF byl stanoven specifický obsah P450 0,07 nmol/mg a u EE2-MF 0,12 nmol/mg (Tab. 3, str. 44). U obou frakcí byl zachován poměr P450 : P420, který je roven téměř 1 : 1. Zato specifický obsah součtu P450+P420 vyšel u EE2-MF téměř dvojnásobně vyšší, než u K-MF (0,28 : 0,15 nmol/mg).

Pro potvrzení uvedeného předpokladu o indukci byly charakterizovány MF z izolace 2, která byla kultivována za stejných podmínek jako izolace 1. Očekávalo se, že pokud bude docházet k indukci, bude opět specifický obsah P450 i P450+P420 vyšší u MF exponovaných EE2 než u K-MF a nejlépe s výraznějším navýšením. Ovšem výsledky plynoucí z Tab. 3 (str. 44) tuto domněnku nepotvrdily. V tomto případě byl u K-MF stanoven vyšší specifický obsah P450, než u EE2-MF, a to 1,4 x vyšší. U obou MF je poměr P450 : P420 specifického obsahu opět téměř totožný. Poměr specifického obsahu součtu P450+P420 se neshoduje s výsledkem z izolace 1, nedošlo tedy k jeho navýšení u EE2-MF.

Ze získaných výsledků vyplývá, že k indukci CYP, které by se mohly účastnit degradace EE2, nedochází. Nebyl tedy shledán vliv přídatku EE2 u MF izolované z kultury vystavené působení této látky.

Jak je vidět v Tab. 3 (str. 44), výtěžky proteinů jsou u všech izolovaných MF srovnatelné, tudíž, jak již bylo uvedeno výše, byla metoda izolace úspěšná. U K-MF z izolace 1 se zdá být výtěžek nižší, patrně to souvisí s tím, že u K-MF byla zpracována jen polovina materiálu z kultivace (kapitola 4.2), tudíž je i množství proteinů téměř poloviční, tedy 61,47 : 39,34 mg (EE2-MF : K-MF).

Dalším parametrem, který byl v rámci charakterizace MF vyhodnocován, bylo stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2, z důvodu polovičního množství získané MF nezbyl již dostatek materiálu K-MF k provedení stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy. Toto stanovení bylo tedy provedeno s jinou K-MF, zde uvedenou jako K-MF*, u které byla stanovena koncentrace proteinů $14,86 \pm 1,12$ mg/ml. Označení ostatních MF se nemění. Měření bylo provedeno s každou MF nejméně 3x, v Tab. 4 jsou uvedeny opět průměrné hodnoty, se směrodatnou odchylkou.

Specifická aktivita je u všech MF srovnatelná, kromě hodnoty 0,019 naměřené u EE2-MF z izolace 2. Tento výsledek nasvědčuje opět možnosti poškození této frakce během izolace.

Tab. 4: Aktivita NADPH:cytochrom P450 reductasy v izolovaných MF

MF/ Charakteristika	Izolace 1			Izolace 2.	
	K-MF	K-MF*	EE2-MF	K-MF	EE2-MF
$a_{red.}$ [$\mu\text{mol}_{cyt}/\text{min.ml}$]	-	$0,34 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,01$
$asp_{red.}$ [$\mu\text{mol}_{cyt}/\text{min.mg}$]	-	0,023	0,023	0,023	0,019

a_{red} - aktivita NADPH: cytochrom P450 reductasy, asp_{red} - specifická aktivita

Celkově se podařilo stanovit NADPH:cytochrom P450 reductasu ve všech frakcích, vypadá to tedy, že houbové CYP *P. ostreatus* by mohly být zařazeny do třídy II. (viz. str. 19). Jelikož charakteristika MF byla úspěšná a v získaných frakcích byly CYP stanoveny, bylo dále přistoupeno k vlastním degradačním experimentům pomocí MF, tedy k degradaci *in vitro*.

4.4 Degradace EE2 mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus*

Degradace EE2 na úrovni mikrosomální frakce byla sledována ve všech izolovaných MF zvlášť. Metodika degradačních experimentů je stále ve fázi optimalizace, jak ve složení jednotlivých degradačních směsí, tak ve fázi přípravy pro analytické vyhodnocení. Reprodukovatelnost jednotlivých stanovení nebyla příliš vysoká a navíc byly degradační experimenty prováděny vždy s určitou změnou

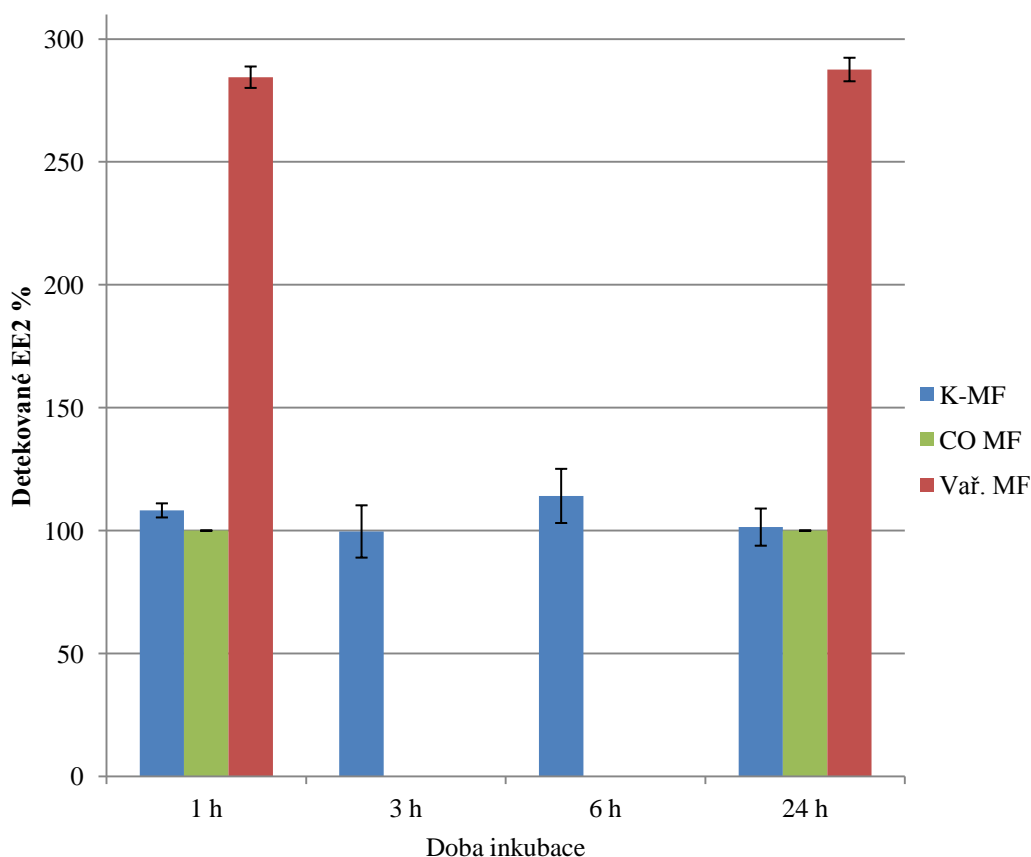
v experimentálních podmínkách, proto jsou výsledky uvedeny pro každý degradační pokus odděleně.

4.4.1 Degradace EE2 kontrolní MF, izolace 1

Degradační experimenty s K-MF z izolace 1 byly provedeny dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.10. Jelikož se při degradaci *in vivo* (kapitola 4.1) ukázalo, že kultura inaktivovaná povařením je vhodná negativní kontrola, byla použita i jako kontrola při degradaci MF *in vitro*. Oproti degradaci *in vivo* byla nově přidána další negativní kontrola, a to mikrosomy inhibované CO. Degradace byla sledována ve stejných časových intervalech, jako při degradaci *in vivo*. Negativní kontroly byly podrobeny (týká se to všech degradačních experimentů prováděných s MF z izolace 1) inkubaci pouze po dobu 1 hodiny a 24 hodin, tedy vždy na počátku dané inkubace a na konci. Je to z důvodu velké spotřeby materiálu, který byl zpracován při předchozí charakterizaci MF, a v rámci jedné izolace nezbylo tedy již dostatečné množství izolovaných mikrosomů, aby mohly být i negativní kontroly vystaveny celému časovému úseku inkubace. Ovšem vzhledem k předpokladu, že u negativních kontrol k žádné degradaci nedochází, což následující experimenty potvrdily, lze říci, že srovnání jen vzhledem k počátečnímu a konečnému množství EE2 v negativních kontrolách se jeví jako dostačující.

Hodnoty detekovaného EE2 v jednotlivých směsích se původně měly vztahovat k negativní kontrole, což v tomto případě měly být mikrosomy inaktivované povařením (Vař- MF). Jak je patrné z grafu (Obr. 14, str. 48) došlo zde patrně k chybě při přípravě premixu a do směsi, která byla inaktivována povařením, bylo omylem přidáno dvojnásobné množství roztoku EE2 v DMSO. Experiment byl tedy vztažen k množství EE2 detekovaného v mikrosomech inhibovaných CO (CO MF). Tato negativní kontrola CO MF sloužila k odhalení, zda mají CYP podíl na degradaci EE2 *in vitro*. Inhibice CYP CO je v literatuře hojně popsána⁴¹, ovšem nevýhoda je, že se CO může vázat i na jiné hemoproteiny obsažené také v MF, které by se teoreticky také mohly podílet na metabolismu EE2. Ovšem z výsledků degradace EE2 u Vař. MF a CO MF, které budou uvedeny níže (Obr. 15, str. 49) je patrné, že obě negativní kontroly jsou srovnatelné, tudíž by nemělo vadit, že je degradace v tomto případě vztažena k jiné negativní kontrole, než u ostatních experimentů.

Jak je vidět z grafu (Obr. 14) u kontrolních mikrosomů (K-MF) nebyla prokázána žádná degradace EE2. Hladiny detekovaného EE2 v jednotlivých časových úsecích jsou srovnatelné a pohybují se na stejné úrovni (100%) jako hodnoty detekované u negativní kontroly, CO-MF.

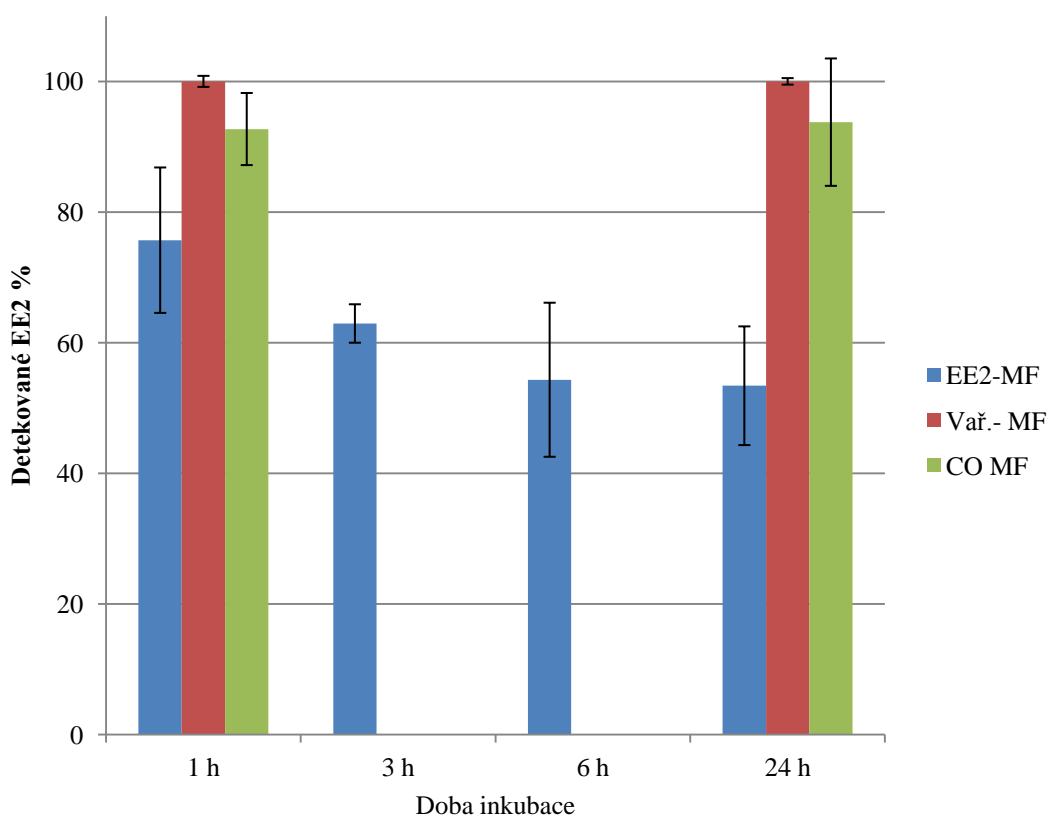


Obr. 14: Degradace EE2 kontrolní mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus*, izolace 1. K-MF-kontrolní mikrosomy, CO MF-mikrosomy inhibované CO, Vař. MF- mikrosomy inaktivované povařením.

Z výsledků tohoto prvního degradačního experimentu vyplynulo, že ve směsi K-MF nedošlo během sledované inkubace k výraznému poklesu koncentrace detekovaného EE2, tudíž zde K-MF neprokázaly schopnost metabolizovat EE2. Další degradační experiment byl tedy proveden s EE2-MF a experiment byl prováděn za stejných podmínek.

4.4.2 Degradace EE2 MF vystavenou působení EE2, izolace 1

Výsledky degradačních experimentů s EE2-MF z izolace 1 jsou uvedeny na následujícím grafu (Obr. 15). Tentokrát jsou již detekované hodnoty EE2 v jednotlivých směsích vztaženy k negativní kontrole (MF inaktivované povařením), kde nebyla prokázána žádná degradace během experimentu. U MF inhibované CO nebyla opět prokázána degradace EE2 analogicky jako u K-MF. U MF vystavené působení EE2 (EE2-MF) došlo k degradaci EE2 a zároveň degradace vykazovala časově závislý trend vzhledem k negativním kontrolám. Po 1 hodině je vidět pokles o 24,3 % (oproti Vař. MF), po 3 hodinách se toto množství EE2 snížilo o dalších 12,7 %. Po šesti hodinách došlo ke snížení o 46 %, což je srovnatelné s množstvím EE2 zbylým po 24 hodinách inkubace (snížení o 46,5 %).



Obr. 15: Degradace EE2 mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus* exponovanou EE2 z izolace 1. EE2-MF- mikrosomy vystavené působení EE2, Vař.MF-vařené mikrosomy (negativní kontrola), CO MF-mikrosomy inhibované CO.

V tomto experimentu byla pozorována časová závislost degradace EE2, a to MF vystavenou působení EE2. To, že je v případě EE2-MF degradace mnohem efektivnější, než v případě K-MF, by mohlo být způsobeno zmíněnou indukci exprese enzymů, které se podílejí na degradaci EE2. Jelikož však nelze vyvodit obecný závěr pouze ze dvou degradačních experimentů byly provedeny další degradační experimenty s MF pocházející z izolace 2. U těchto degradačních experimentů s MF nebyl do jednotlivých směsí přidáván PMSF a DDT, zároveň byl přidán premix s inhibitorem 1-ABT a premix bez NADPH a to z důvodů uvedených v kapitole 3.2.10.

4.4.3 Degradace EE2 kontrolní MF, izolace 2

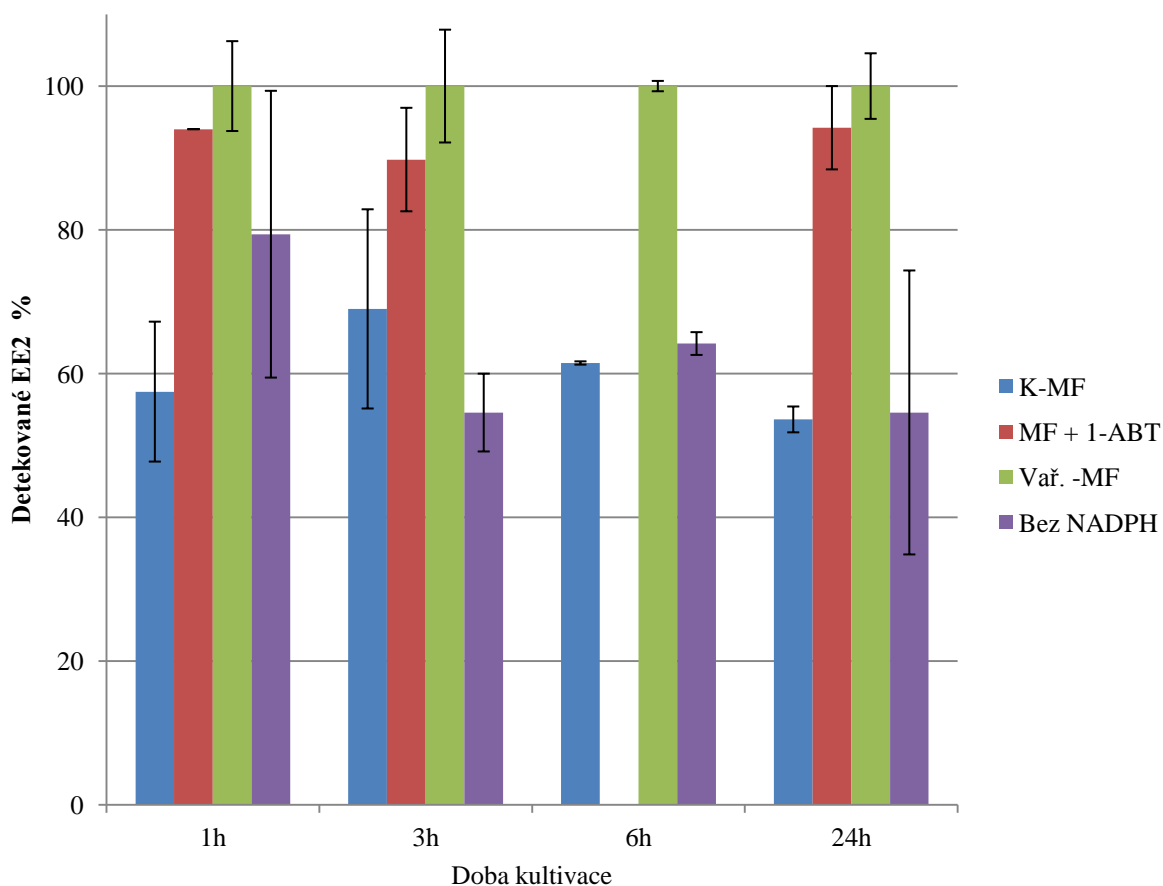
Degradační experimenty s K-MF získanou z izolace 2 byly provedeny opět podle podmínek uvedených v kapitole 3.2.10. U negativní kontroly již byla degradace sledována ve všech časech inkubace jako degradace *in vivo* (kapitola 4.1). Výsledné hodnoty detekovaného EE2 ve všech směsích jsou vztaženy vzhledem k negativní kontrole, zde vařeným mikrosomům (Vař. MF).

Jak je patrné z grafu (Obr. 16, str. 51) u K-MF tentokrát došlo k degradaci EE2, ovšem časová závislost vzhledem k negativním kontrolám nebyla prokázána. Množství EE2 analyzovaného v této inkubační směsi bylo po 1 hodině a po 24 hodinách inkubace analogické, tedy na hranici 55 % z množství detekovaného u Vař.-MF. Pozorovaná nezávislost degradace EE2 K-MF na čase může být způsobena tím, že enzymy obsažené v MF nevydrží v daných experimentálních podmínkách aktivní déle než hodinu a poté denaturují, tudíž dále nedochází k degradaci EE2. Vliv na nestálost enzymů může mít i to, že v těchto inkubačních směsích nebyl přítomen PMSF a DTT. Tyto látky chrání enzymy před degradací (PMSF inhibuje serinové proteasy) a oxidačním poškozením (DTT).

U nově přidané směsi s inhibitorem 1-ABT nebyla prokázána degradace EE2. Z grafu (Obr. 16, str. 51) je patrné, že v případě MF je inhibitor efektivní (oproti inhibici v podmínkách *in vivo*). Sice nedošlo k 100% inhibici, po 1 hodině a po 24 hodinách inkubace došlo ke snížení množství EE2 shodně o 6% vzhledem k negativní kontrole (Vař. MF), ovšem vzhledem k K-MF je inhibice prokazatelná. Množství EE2

zbylé ve směsi po 6 hodinách inkubace s MF+1-ABT zde není uvedeno vzhledem k technickým problémům s tímto vzorkem během analýzy.

Prvotním předpokladem této práce bylo zapojení houbových CYP do některého z kroků degradace EE2. Z dosavadních výsledků degradačních experimentů prováděných s touto MF vyplývá, že by se CYP mohly procesu degradace EE2 zúčastnit, jelikož došlo k jejich inhibici 1-ABT.



Obr. 16: Degradace EE2 kontrolní mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus* získané z izolace 2. K-MF-kontrolní MF, MF+1-ABT- MF vystavená účinku inhibitoru 1-ABT, Vař.-MF- MF inaktivovaná povařením (negativní kontrola), Bez NADPH-MF bez přidání NADPH-GS.

U směsi bez NADPH-GS (Bez NADPH) byla také pozorována degradace EE2, která je nezávislá na čase inkubace. CYP obecně pro svou funkci potřebují přítomnost

koenzymu NADPH^{36,37,40}, ovšem ze získaných výsledků vyplývá, že za daných experimentálních podmínek nebyla sledována závislost degradace na přídávku tohoto koenzymu. Tento výsledek je srovnatelný s výsledkem diplomové práce Bc. Linhartové, která poukazuje na existenci i neobvyklých forem houbových CYP, které mají donor elektronu (NADPH) vázaný na jednu z proteinových domén⁹³. Zbytkové množství NADPH může být také přítomno přímo v izolovaných mikrosomech.

Celkově výsledky získané z výše uvedeného experimentu jsou oproti výsledkům získaných z izolace 1 (K-MF) rozdílné a nedají se tudíž porovnat. Analogicky jako u izolace 1 i zde byl další degradační experiment proveden s EE2-MF.

4.4.4 Degradace EE2 MF vystavenou působení EE2, izolace 2

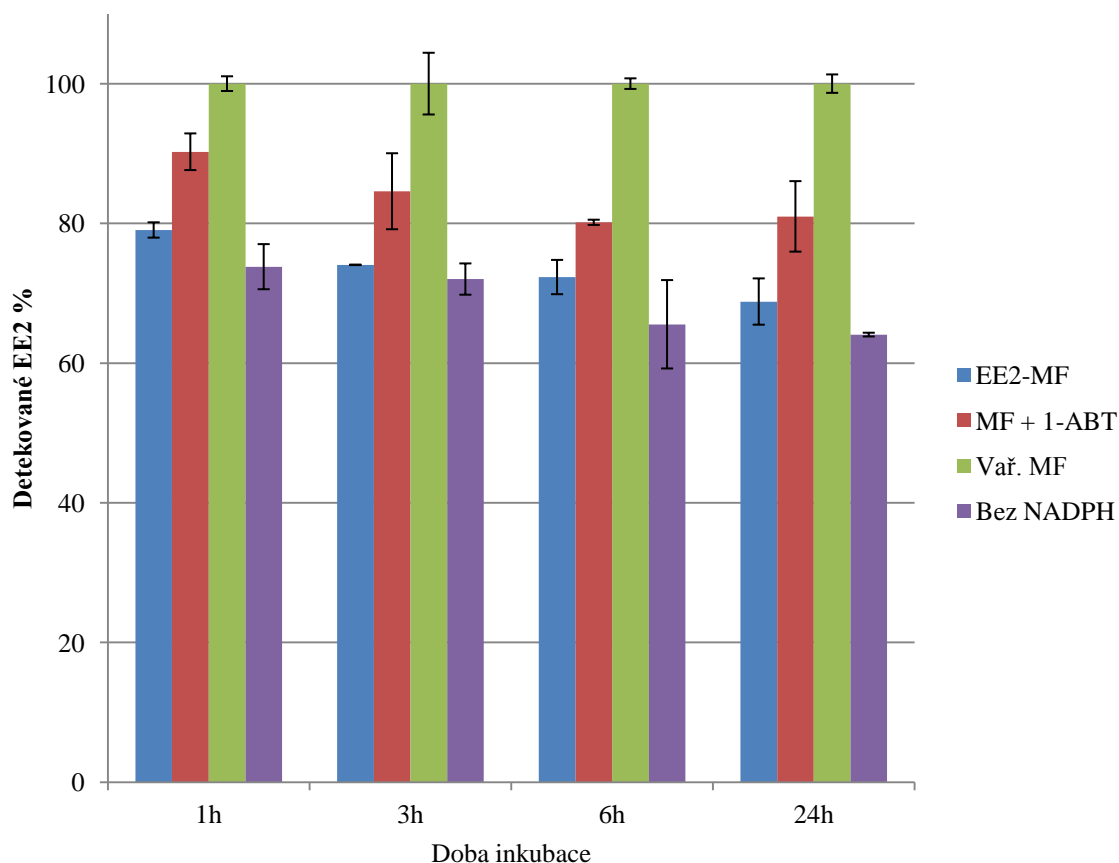
Hodnoty EE2 detekované ve všech směsích jsou opět vztaženy vzhledem k negativní kontrole (MF inaktivovaná poškozením), kde nedocházelo k degradaci EE2.

Graf (Obr. 17, str. 53) ukazuje, že u EE2-MF byla prokázána degradace EE2, časová závislost degradace v porovnání s degradací provedenou EE2-MF z izolace 1 je zde nepatrná. Z charakteristiky této konkrétní EE2-MF (nižší aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy, nízký specifický obsah aktivní formy P450) a z porovnání výsledků s EE2-MF z izolace 1, se zdá být pravděpodobné, že by mohlo dojít k poškození kýžených CYP, a to při izolaci či během následné manipulace se získaným materiálem.

Směs s inhibitorem 1-ABT nevykazovala časovou závislost degradace. Opět nedošlo k 100% inhibici, množství zbylého EE2 v této směsi se pohybovalo kolem 85 %. Toto snížení může být dáno tím, že i když byl inhibitor 1-ABT přidán do směsi v desetinásobném nadbytku oproti EE2 (kapitola 3.2.10), nemuselo být toto množství pro inhibici všech CYP dostatečné. Závislost účinnosti inhibice na koncentraci 1-ABT nebyla zkoumána-

Degradace EE2 byla pozorována i ve směsi bez NADPH-GS stejně jako u předchozího experimentu s K-MF.

Obecně lze konstatovat, že k degradaci EE2 na úrovni mikrosomální frakce v degračních experimentech dochází, jak v K-MF, tak v EE2-MF, nicméně výsledky získané z jednotlivých dílčích experimentů jsou obtížně reprodukovatelné, na což může mít vliv i nehomogenita analyzovaných vzorků, což by mohlo být do budoucna vyřešeno extrakcí směsí ethylacetátem před vlastní analýzou (kapitola 3.2.12).

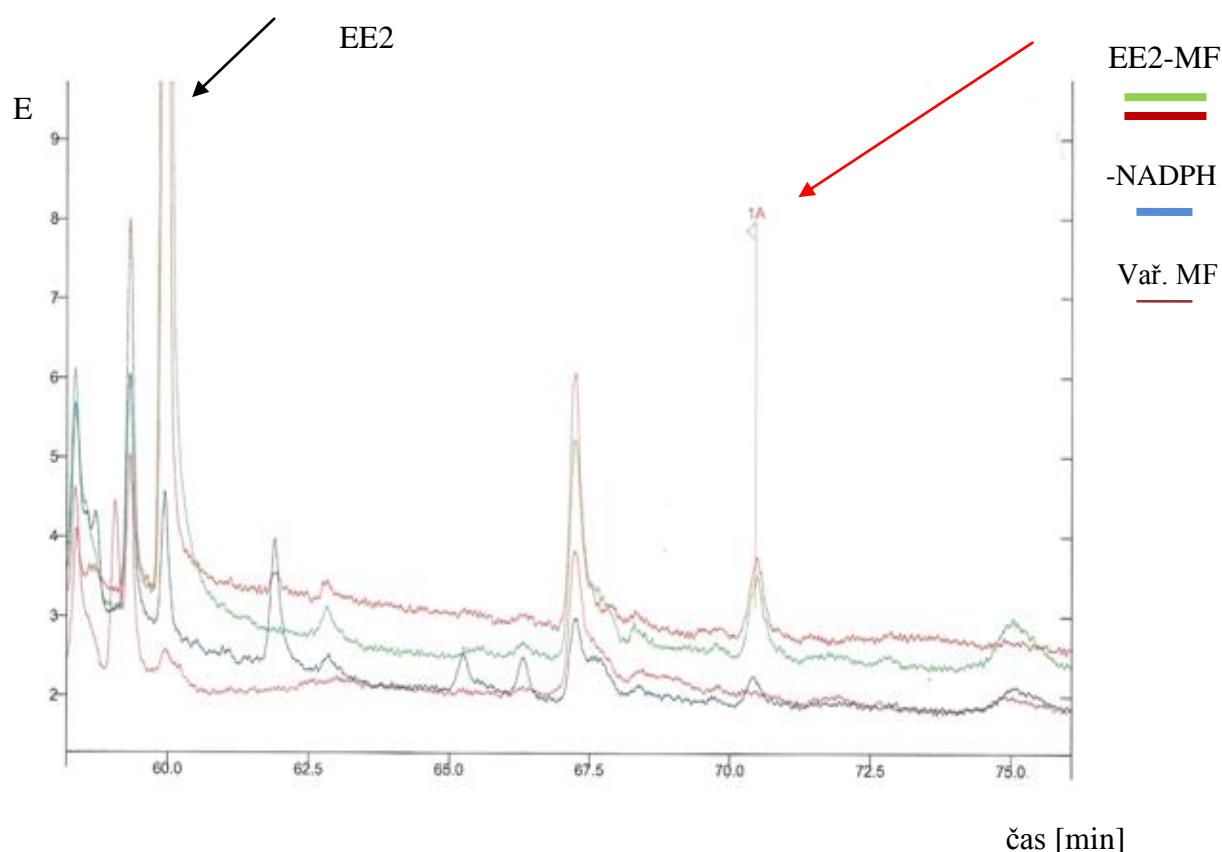


Obr. 17: Degradace EE2 mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus* exponovanou EE2 z izolace 2. EE2-MF-MF exponovaná EE2, MF+1-ABT- MF vystavená působení inhibitoru 1-ABT, Vař.MF- MF inaktivována povařením (negativní kontrola), Bez NADPH-inkubační směs bez NADPH-GS.

4.5 Identifikace metabolitů EE2

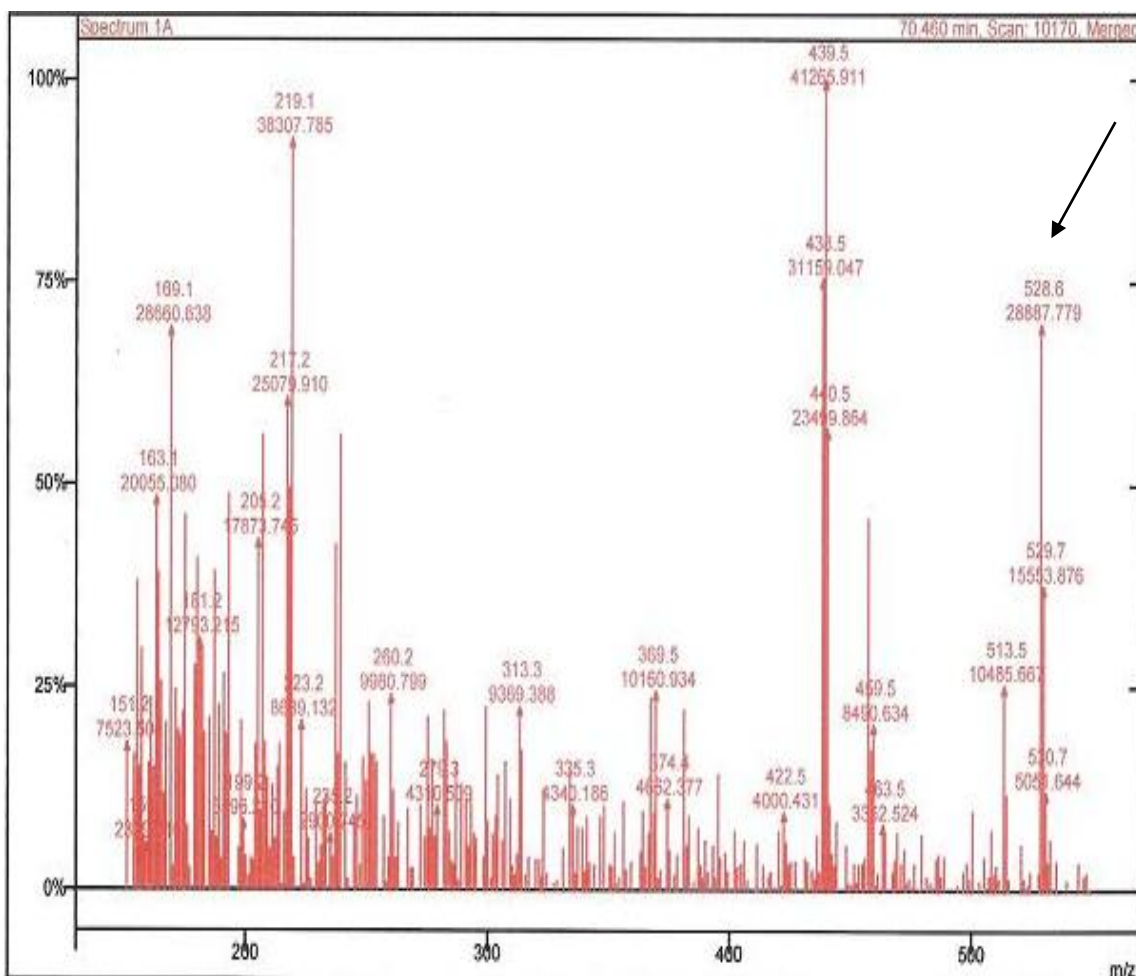
Pro kvalitativní stanovení metabolitů EE2 byly použity ethylacetátové extrakty inkubačních směsí s MF připravenou dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.4

a derivatizované podle podmínek uvedených v kapitole 3.2.13. Na základě hmotnosti a fragmentační analýzy z GC/MS byl v inkubační směsi obsahující EE2MF+EE2 navržen jeden metabolit (Obr. 19, str. 55). Na chromatogramu (Obr. 18) je zobrazen pík, který odpovídá EE2 (kolem 60 minuty analýzy). Tento pík je ve směsi EE2+MF velmi dobře patrný, došlo zde tedy k účinné extrakci zbylého EE2 z inkubační směsi. V negativní kontrole, což byla MF inaktivovaná povařením, však zřejmě nedošlo k extrakci EE2 nebo mohl být vzorek špatně derivatizován a nemuselo dojít k přechodu do plynné fáze. Otázkou tedy zůstává, zda by i v této negativní kontrole byl patrný pík odpovídající metabolitu, kdyby zde proběhla extrakce EE2 se stejnou účinností. U směsi bez NADPH je také vidět pík, který by mohl odpovídat metabolitu (Obr. 18), ale i zde je vidět, že nedošlo k extrakci EE2 se stejnou účinností.



Obr. 18: Chromatogram z analýzy EE2. Na ose x je zobrazen časový úsek, kde byl metabolit předpokládán, červená šipka označuje metabolit (1A), černá šipka pík odpovídající EE2 (EE2). Na ose y je zobrazen elektrický signál. EE2-MF- směs MF exponovaná EE2, -NADPH- směs bez přídavku NADPH-GS, Vař. MF- MF inaktivovaná povařením.

Z výsledků MS vyplývá (Obr. 19), že by se pravděpodobně mohlo jednat o hydroxylovaný derivát EE2 na některé z pozic steroidního kruhu (RNDr Zdena Křesinová, ústní sdělení). Metabolit svojí hmotností odpovídá produktu degradace EE2 po derivatizaci, jedná se tedy o trimethylsilyl derivát. Metodu MS došlo tedy k potvrzení předpokládaného metabolitu.



Obr. 19: Ukázka získaného hmotnostního spektra vzorku obsahující MF vystavenou působení EE2. Černá šipka značí předpokládaný metabolit.

Pozn. Vlastní analýza GC/MS byla provedena RNDr. Zdenou Křesinovou.

5 Souhrn

Výsledky dosažené v této bakalářské práci lze shrnout následovně:

- Schopnost ligninolytické houby *P. ostreatus* degradovat 17 α -ethinylestradiol *in vivo* byla v rámci bakalářské práce potvrzena. Inhibitor cytochromů P450 1-ABT neměl na průběh degradace znatelný vliv.
- Metoda izolace mikrosomální frakce houby *P. ostreatus* byla optimalizována. Rozrušení buněčné stěny hub pomocí zmrazení v kapalném dusíku a mechanického roztření je vhodnou technikou k získání aktivních cytochromů P450, které byly detekovány ve všech izolovaných preparátech.
- Degradace 17 α -ethinylestradiolu *in vitro* mikrosomálním systémem houby *P. ostreatus* byla pozorována a jeví se nezávislá na druhu použité mikrosomální frakce, tedy kontrolní či exponovanou EE2. V těchto experimentech inhibitor 1-ABT snižoval účinnost degradace, což nasvědčuje tomu, že v případě mikrosomální frakce se na degradaci této látky opravdu podílí cytochromy P450.
- Pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byl navržen možný metabolit 17 α -ethinylestradiolu vzniklý degradací mikrosomální frakcí *P. ostreatus*.
- Úlohu cytochromů P450 v procesu degradace 17 α -ethinylestradiolu se nepodařilo plně objasnit. Patrně se na tomto procesu podílí více enzymových systémů.

6 Seznam použité literatury

- ¹ Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T.: Léčiva – „nový“ enviromentální polutant. Chem. Listy 103, 540-547 (2009)
- ² Křesinová, Z., Svobodová, K., Cajthaml, T.: Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. Chem. Listy 103, 200-207 (2009)
- ³ Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Eukaryontní buňka, v knize Základy buněčné biologie (překlad z anglického originálu), Espero Publishing, Ústí nad Labem, str. 27 (1998)
- ⁴ Campbell, N.A., Reece, J.B.: Houby, v knize Biologie (překlad z anglického originálu) Computer Press a.s, Brno, str. 616-619 (2006)
- ⁵ Nordness, M.E., Zacharisen, M.C., Fink, J.N.: Toxic and other non-IgE-mediated effects of fungal exposures. Curr. Allergy Asthma Rep. 3, 438-446 (2003)
- ⁶ Pointing, S.B.: Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 20-33 (2001)
- ⁷ Cameron, M. D., Timofeevski, S., Aust, S.D.: Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 751-758 (2000)
- ⁸ Watanabe, K.: Microorganisms relevant to bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 237-241 (2001)
- ⁹ Asgher, M., Bhatti, H.N., Legge, R.L.: Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. Biodegradation 19, 771-783 (2008)
- ¹⁰ Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G.: Copper induction of laccase isoenzymes on the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 66(3), 920-924 (2000)

- 11 Siripong, P., Oraphin, B., Sanro, T., Duanporn, P.: Screening of fungi from natural sources in Thailand for degradation of polychlorinated hydrocarbons. *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 5(4), 466-472 (2009)
- 12 Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M., Rogalski, J.: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27, 175-185 (1999)
- 13 Baldrian, P., Valášková, V, Merhautová, V, Gabriel, J.: Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res. Microbiol.* 156, 670-676 (2005)
- 14 Ning, D., Wang, H., Ding, Ch., Lu, H.: Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. *Biodegradation* 21, 889-901 (2010)
- 15 Kirk, TK., Farrell, R.L.: Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505 (1987)
- 16 <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Whiterot.jpg>, staženo dne 20.4.2012 v 14:35
- 17 Warrilow, A., Ugochukwu, C., Lamb, D., Kelly, D., Kelly, S.: Expression and characterization of CYP51, the ancient sterol 14-demethylase activity for cytochromes P450 (CYP), in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Lipids* 43, 1143-1153 (2008)
- 18 Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyō, R., Arisawa, A., Sakaki, T., Tsunekawa, H., Johdo, O., Ichinose, H., Wariishi, H.: Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of versatile monooxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 118-123 (2011)
- 19 Subramanian, V., Yadav, J.S.: Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(17), 5570-5580 (2009)

- 20 Mougín, Ch., Laugero, Ch., Asther, M., Chaplain, V.: Biotransformation of s-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 49, 169-177 (1997)
- 21 Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y.W., Yadav, J.S.: Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 492-497 (2010)
- 22 Novotný, Č., Cajthaml, T., Svobodová, K., Šušla, M., Šašek, V.: *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential. *Folia Microbiol.* 54(5), 375-390 (2009)
- 23 Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrá, M., Caminal, G., Vicent, T.: Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water res.* 38(8), 2166-2172 (2006)
- 24 Heinfling, A., Bergbauer, M., Szewzyk, U.: Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Tremetes Versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 261-266 (1997)
- 25 Baborová, P., Möder, M., Baldrian, P., Cajthamlová, K., Cajthaml, T.: Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157, 248-253 (2006)
- 26 Higson, F.K.: Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 122, 111-154 (1991)
- 27 Holubová, J.: Analýza vybraných látek z houby *Pleurotus ostreatus* chromatografickými metodami: Diplomová práce Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, Ústav potravinářského inženýrství, str. 11 (2009)
- 28 Kyung-Ho, M., Lee, G., Lee, S., Gwag, J., Kim, T., Kong, W., Seo, K., Lee, G., Park, Y.: Development and characterization of new microsatellite markers for the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(9), 851-857 (2009)

- 29 Bobek, P., Ozdín, L., Galbavý, Š.: Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutr.* 14(3), 282-286 (1998)
- 30 Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman., J.P., Cerniglia, C.E: Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2547-2553 (1996)
- 31 Baldrian, P., Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud, F., Zdražil, F.: Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6), 2471-2478 (2000)
- 32 Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E.: Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1), 292-295 (1996)
- 33 Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E.: Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2554-2559 (1996)
- 34 Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E.: Enzymatic mechanism involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7), 2495-2501 (1997)
- 35 Cajthaml, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, Č., Šašek, V., Mougín, C.: Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 53(4), 289-294 (2008)
- 36 Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 737-747 (2001)
- 37 Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Martínek, V., Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004)

- 38 Kotrbová, V.: Studium aktivačního a detoxikačního metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu systémem cytochromů P450 *in vitro* a *in vivo*: Doktorská disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 17 (2008)
- 39 Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D.: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12(1), 1-51 (1993)
- 40 Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 93, 229-237 (1999)
- 41 Omura, T., Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239(7), 2370-2378 (1964)
- 42 Nelson, D.R., Strobel, H.W.: On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins. *J. Biol. Chem.* 263(13), 6038-6050 (1988)
- 43 Degtyarenko, K.N: Structural domains of P450-containing monooxygenases systems. *Protein Eng.* 8, 737-747 (1995)
- 44 Rowland, P., Blaney, F.E., Smyth, M.G., Jones, J.J., Leydon, V.R., Oxbrow, A.K., Lewis, C.J., Tennant, M.G., Modi, S., Eggleston, D.S., Chenery, R.J., Bridges, A.M.: Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* 281(11), 7614-7622 (2006)
- 45 <http://www.esrf.eu/Industry/UsersAndScience/Publications/Highlights/2006/SB/SB09>, staženo dne 21.4.2012 v 12:30
- 46 Devlin, T.M: Functions of proteins, v knize *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. Sixth edition, Wiley-Liss publication, Hoboken, Kanada, str. 413-415 (2006)
- 47 Nazir, K.H.M.N.H., Ichinose, H., Wariishi, H.: Molecular characterization and isolation of cytochrome P450 genes from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Arch. Microbiol.* 192, 395-408 (2010)

- 48 Maspahy, S., Lamb, D.C., Kelly, S.L.: Purification and characterization of a benzo[*a*]pyrene hydroxylase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 326-329 (1999)
- 49 Kullman, S.W., Matsumura, F.: Identification of a novel cytochrome P-450 gene from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7), 2741-2746 (1997)
- 50 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)
- 51 van den Brink, H.J.M., van Gorcom, R.F.M., van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt., P.J.: Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 23, 1-17 (1998)
- 52 Coon M. J., Ding, X., Pernecky S. J., Vaz, A.D.N.: Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6, 669-673 (1992)
- 53 <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html>, staženo dne 21.4.2012 v 21:30
- 54 Bořek-Dohalská, L.: Studium cytochromů P450 a jejich participace na oxidaci protinádorového léčiva elipticinu: Doktorská disertační práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 23 (2002)
- 55 Šulc, M., Hodek, P., Stiborová, M.: The binding affinity of carcinogenic N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylaniline to cytochromes P450 2B4, 2E1 and 3A6 does not dictate the rate of their enzymatic N-demethylation. *Gen. Physiol. Biophys.* 29, 175-185 (2010)
- 56 <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>, staženo dne 22.4.2012 v 13:43
- 57 Kullman, S.W., Matsumura, F.: Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2), 593-600 (1996)

- 58 Syed, K., Kattamuri, Ch., Thompson, T.B., Yadav, J.S.: Cytochrome b5 reductase–cytochrome b5 as an active P450 redox enzyme system in *Phanerochaete chrysosporium*: Atypical properties and *in vivo* evidence of electron transfer capability to CYP63A2. Arch. Biochem. Biophys. 509, 26-32 (2011)
- 59 Lah, L., Kraševc, N., Trontelj, P., Kolem, R.: High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: Cytochrome P450 systems. Fungal Genet. Biol. 45, 446-458 (2008)
- 60 Črešnar, B., Petrič., Š.: Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. Biochim. Biophys. Acta 1814, 29-35 (2011)
- 61 Ruiz-Dueñas, F.J., Fernández, E., Martínez, M.J, Martínez, A.T.: *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: An *in silico* analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. C. R. Biol. 334, 795-805 (2011)
- 62 Chigu, N.L., Hirose, S., Nakamura, Ch., Teramoto, H., Ichinose, H., Wariishi, H.: Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 1907-1916 (2010)
- 63 Subramanian, V., Doddapaneni, H., Syed, K., Yadav, J.S.: P450 redox enzymes in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Gene transcription, heterologous expression, and activity analysis on the purified proteins. Curr. Microbiol. 61, 306-314 (2010)
- 64 Doddapaneni, H., Chakraborty, R., Yadav, J.S: Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering. BMC Genomics 6(92), 1471-2164 (2005)
- 65 Kasai, N., Ikushiro, S., Hirose S., Arisawa A., Ichinose, H., Wariishi H., Ohta, M., Sakaki, T.: Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 387, 103-108 (2009)

- ⁶⁶ Kasai, N., Ikushiro, S., Hirose S., Arisawa A., Ichinose, H., Uchida, Y., Wariishi H., Ohta, M., Sakaki, T.: Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3'-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biochem.* 147(1), 117-125 (2010)
- ⁶⁷ Matsuzaki, F., Wariishi, H.: Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 387-393 (2004)
- ⁶⁸ Ning, D., Wang, H., Zhuang, Y.: Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation* 21, 297-308 (2010)
- ⁶⁹ Bumpus, J.A., Aust, S.D.: Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(9), 2001-2008 (1987)
- ⁷⁰ Reddy, C.A.: The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 320-328 (1995)
- ⁷¹ Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S.L.: Evidence for cytochrome P450 and P450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 51-55(1996)
- ⁷² Yadav, J.S., Loper, J.C.: Cytochrome P450 oxidoreductase gene and its differentially terminated cDNAs from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* 37, 65-73 (2000)
- ⁷³ Kujalová, H., Sýkora, V., Pitter, P.: Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chem. Listy* 101, 706-712 (2007)
- ⁷⁴ Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M.: Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745-750 (2009)

- 75 Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T.: Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation* 21, 681-689 (2010)
- 76 McMurry, J.: Biomolekuly: Lipidy, v knize *Organická chemie*, (překlad z anglického originálu), Vutium, Brno, str. 1045-1047 (2007)
- 77 Berg, J.M, Tymoczko, J.L., Stryer, L.: *Biochemistry*, Sixth edition, W.H. Freeman and Company, New York , str. 749 (2007)
- 78 Hoffmann, H., Moore, C., Zimmermann, H., Elger, W., Schwarz, S., Gräser, T., Oettel, M.: Approaches to the replacement of ethinylestradiol by natural 17 β -estradiol in combined oral contraceptives. *Exp. Toxicol. Pathol.* 50, 458-464 (1998)
- 79 Unzeitig, V: Aktivita hormonů a jejich vliv na organismus uživatelky kombinované orální kontracepce (COC). *Moderní gynekologie a porodnictví*, 14(1), 3-10 (2005)
- 80 Svobodová, K., Cajthaml, T.: New in vitro reporter gene bioassays for screening of hormonal active compounds in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 839-847 (2010)
- 81 Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M.: Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plant-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81-90 (1999)
- 82 Irwin, L.K., Gray, S., Oberdorster, E.: Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquat. Toxicol.* 55, 49-60 (2001)
- 83 Svobodová, K., Plačková, M., Novotná, V., Cajthaml, T.: Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two *in vitro* yeast assays. *Sci. Total Environ.* 407, 5921-5925 (2009)

- 84 Gerhard, M.: Steroids, v knize *Biochemical Pathways: An Atlas of biochemistry and molecular biology*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, str. 94 (1999)
- 85 Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H., Omura, H.: Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus eaii* isolates from activated sludges in wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70(9), 5283-5289 (2004)
- 86 Haiyan, R., Shulan, J., Ahmad, N., Dao, W., Chengwu, C.: Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere* 66, 340-346 (2007)
- 87 Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K., Řezanka, T.: Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol. *Environ. Pollut.* 157, 3325-3335 (2009)
- 88 Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85 (1985)
- 89 Sottocasa, G.I., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, H.: An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 32(2), 415-438 (1967)
- 90 Linder, C.D., Renaud, N.A., Hutzler, J.M.: Is 1-aminobenzotriazole an appropriate *in vitro* tool as a nonspecific cytochrome P450 inactivator? *Drug metab. Dispos.* 37(1), 10-13 (2009)
- 91 Vilímková, L., Páca, J., Kremláčkoá, V., Páca, J., Stiborová, M.: Isolation of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase from *Candida tropicalis* yeast. *Interdiscip. Toxicol.* 1(3-4), 225-230 (2008)
- 92 Šiller, M.: Role cytochromů P450 a dalších enzymů metabolismu léčiv v biotransformaci dvou syntetických derivátů cytokininů: Kandidátská disertační práce LF UP Olomouc, ústav farmakologie, str. 36 (2010)

- ⁹³ Linhartová, L.: Biodegradace polychlorovaných bifenyků pomocí ligninolytických hub a jejich enzymů: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 47,67 (2010)

