



Wykorzystanie cytochromów w biotechnologii farmaceutycznej

Anna Godawska, Katarzyna Kieć-Kononowicz
Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

The application of cytochromes in pharmaceutical biotechnology

Summary

Cytochromes are enzymes which play very important role in human metabolism. These proteins contain hem as prostetic group. *In vivo* cytochromes are responsible for energy production and drug metabolism. Cytochromes occur in almost all human cells. Many classes of cytochromes are known but only four classes have been used in biotechnology so far. These are cytochrome c, cytochrome P-450, cytochrome b₂ and cytochrome b₅. Cytochrome c and cytochrome P-450 catalyse oxidizing reactions of organic compounds. These reactions are similar to the reactions which occur in human body.

Key words:

cytochromes, pharmaceutical biotechnology.

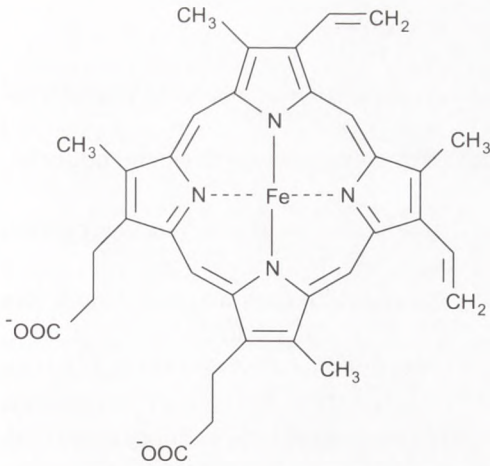
1. Wstęp

Cytochromy są to białka z grupy hemoprotein. Nazwę zawdzięczają jaskrawemu zabarwieniu; wywodzi się ona z j. greckiego (*kytos* oznacza komórkę, *chroma* – barwę). Spełniają zasadniczą funkcję w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym, a jeden z rodzajów odpowiada za metabolizm wielu substancji endo- i egzogennych.

Dla funkcjonowania cytochromu istotnym układem jest hem [1], niebiałkowa grupa prostetyczna. Jest on zbudowany z czterech pierścieni pirolowych połączonych ze sobą grupami metinowymi. W centrum układu znajduje się atom żelaza, który połączony jest z atomami azotu pierścieni pirolowych za pomocą

Adres do korespondencji

Anna Godawska,
Katedra Technologii
i Biotechnologii Środków
Leczniczych,
Collegium Medicum,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków;
e-mail: anka.g@interia.pl

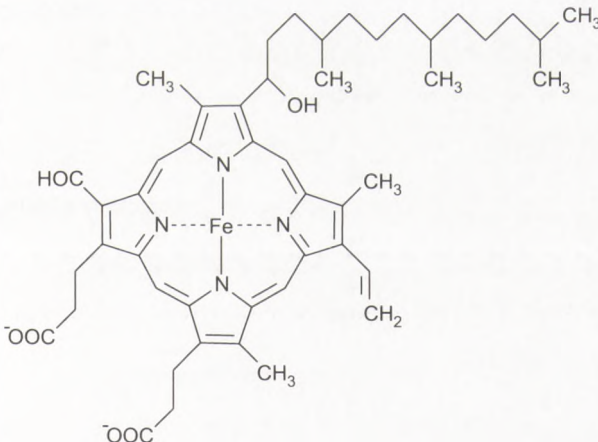


Rys. 1. Protohem [1].

dwóch wiązań kowalencyjnych i dwóch koordynacyjnych. W zależności od rodzaju podstawników przy węglach pierścieni pirolowych, wyróżnia się różne odmiany hemu, z których najczęstsza to protohem (podstawowy składnik hemoglobiny) (rys. 1).

Protohem (żelazoproporfiryna IX) jest grupą prostetyczną obecną w cytochromach b, c i c₁. Struktury hemu występujące w cytochromach a i a₃ różnią się od hemów cytochromów b, c i c₁: grupa formylowa zastępuje jedną z grup metylowych, a łańcuch węglowodorowy (C₁₅) zastępuje jedną z grup winylowych (rys. 2).

Atom żelaza, stanowiący centrum układu hemu odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie cytochromów. Przyjmuje on przenoszony elektron, w wyniku czego przechodzi z trzeciego na drugi stopień utlenienia, a następnie oddaje elektron, powracając do pierwotnego stanu.

Rys. 2. Układ hemu charakterystyczny dla cytochromów a i a₃ [1].

2. Charakterystyka i występowanie cytochromów

Z uwagi na funkcję, jaką pełnią cytochromy w organizmie możemy je podzielić na dwie kategorie:

a) cytochromy stanowiące układ przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym roślin i zwierząt,

b) cytochromy wykazujące właściwości katalityczne w organizmie (cytochrom P-450).

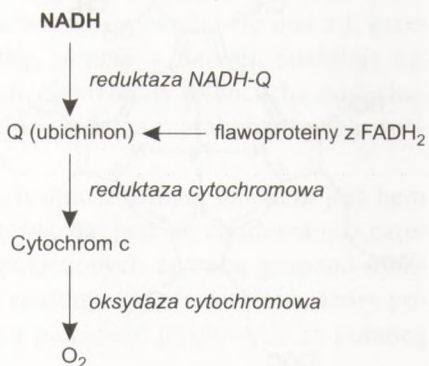
Cytochromy będące przenośnikami elektronów podzielono na podstawie budowy i widma absorpcyjnego na grupy [1], oznaczone małymi literami, np. a, b, c, a w ich obrębie wyróżniono podgrupy, oznaczone dodaniem cyfry arabskiej jako indeks dolny do nazwy grupy, np. a₃, b₅ itd. Cytochromy te w większości przypadków nie wykazują właściwości katalitycznych, zarówno w organizmie jak i poza nim. Odpowiedzialne są za przenoszenie elektronów w łańcuchu oddechowym, w wyniku czego następuje produkcja energii [1].

Elektrony są przenoszone z NADH na O₂ poprzez obecne w łańcuchu oddechowym trzy wielkie kompleksy białkowe:

- reduktazę NADH-Q (kompleks I),
- reduktazę cytochromową (kompleks III),
- oksydazę cytochromową (kompleks IV) (rys. 3).

Przepływ elektronów przez te transbłonowe kompleksy powoduje pompowanie protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Dwie z trzech pomp protonowych łańcucha oddechowego mają jako podstawowe elementy cytochromy, są to kompleksy III i IV.

Kompleks III, czyli reduktaza cytochromowa, katalizuje przenoszenie elektronów z ubichinolu (QH₂) na cytochrom c oraz równoczesne przepompowywanie protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. W reduktazie cytochromowej umieszczone są dwa typy cytochromów, określane jako b i c₁. Hem cytochromu c₁, w przeciwieństwie do występującego w cytochromie b, jest z białkiem związany kowalencyjnie. Są to wiązania tioeterowe, które powstają w wyniku połączenia grup hydrosulfidowych dwóch reszt cysteinowych z grupami winylowymi hemu.



Rys. 3. Sekwencja przenośników w łańcuchu oddechowym [1].

Cytochrom b posiada dwie grupy hemowe. Hem b_L , umieszczony blisko cytoplazmatycznej powierzchni błony ma mniejsze powinowactwo do elektronów od hemu b_H , znajdującego się bliżej powierzchni matriksowej. Hemy b_L i b_H znane są również jako b-566 i b-560, ponieważ maksimum absorbowanego przez nie światła wykrywa się przy tych długościach fal [1].

Oksydaza cytochromowa, kompleks IV, katalizuje przeniesienie elektronów z cytochromu c do akceptora końcowego, którym jest tlen cząsteczkowy. Składa się ona z 10 podjednostek. W skład dwóch z nich wchodzi cytochromy. W podjednostce I występuje cytochrom a_3 , a w podjednostce II – cytochrom a.

Cytochromy posiadające właściwości katalityczne w organizmie to ogromna grupa izoenzymów, określaną wspólną nazwą – cytochrom P-450. Zaliczane są one do grupy monoksygenaz. W tej grupie izoenzymów wyróżniamy rodziny określone cyframi arabskimi (np. 1, 2), podrodziny, określane przez dodanie do numeru rodziny dużej litery (np. 1A, 2B), oraz poszczególne izoenzymy, oznaczone dodaniem cyfry arabskiej do numeru podrodziny (np. 1A2, 2B1) [2].

3. Zastosowanie cytochromów w biotechnologii

Wykorzystanie cytochromów w biotechnologii zależy od wykazywanych przez nie właściwości katalitycznych. Cytochromy będące elementami łańcucha oddechowego najczęściej takich właściwości nie wykazują, zarówno w organizmie jak i poza nim. Wyjątek stanowi tu cytochrom c, którego właściwości katalityczne wykryto poza komórką [3]. Dlatego w biotechnologii znalazły zastosowanie: cytochrom b_2 , cytochrom b_5 , cytochrom c i cytochrom P-450.

3.1. Charakterystyka cytochromu b_2

Cytochrom b_2 (EC 1.1.2.3) znalazł zastosowanie w biotechnologii [4]. Określany jest jako dehydrogenaza kwasu mlekowego. Katalizuje reakcje utleniania kwasu mlekowego i innych L-2-monohydroksykwasów karboksylowych. Otrzymywany jest z drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Hansenula anomala*. Jest on fizjologicznym partnerem cytochromu c u drożdży. Znajduje się w przestrzeni międzymbłonowej w mitochondriach. I-rzędowa struktura domeny wiążącej hem (rdzenia cytochromu b_2) jest homologiczna z ssaczym mikrosomalnym cytochromem b_5 .

3.2. Charakterystyka cytochromu b_5

Cytochrom b_5 występuje powszechnie w większości tkanek [5]. Jest obecny w retikulum endoplazmatycznym, w erytrocytach występuje w formie rozpuszczalnej

i jest związany z procesem redukcji methemoglobiny. Bierze udział w wielu reakcjach desaturacji i elongacji kwasów tłuszczowych, biosyntezie plazmalogenu, steroli, reakcjach cytochromu P-450. Mechanizm, jakim cytochrom b_5 wpływa na reaktywność cytochromu P-450 jest słabo poznany. Stwierdzono jedynie, że może on stymulować cytochrom P-450, hamować go lub nie mieć nań wpływu, co zależy od rodzaju izoenzymu cytochromu P-450. Uważa się, że spełnia on podobną funkcję do reduktazy cytochromu P-450. Patten i Koch [6] wykazali, że dodatek lub koekspresja cytochromu b_5 z cytochromem P-450 znacznie zmniejsza utlenianie wolnego NADPH i powstawanie nadtlenu wodoru. Obecność cytochromu b_5 , jak się wydaje, poprawia zatem współdziałanie między niektórymi izoenzymami cytochromu P-450 a reduktazą cytochromu P-450.

3.3. Charakterystyka cytochromu c

3.3.1. Budowa i właściwości cytochromu c

Cytochrom c jest białkiem rozpuszczalnym w wodzie i cechuje się wysoką termostabilnością. Tak jak w przypadku większości peroksydaz, cytochrom c jest inaktywowany przez obecność nadmiaru nadtlenu wodoru lub innych nadtlenuków organicznych. Inaktywacja prowadzi do modyfikacji hemowej grupy prostetycznej. Prawdopodobnie jako produkt końcowy zostaje utworzona werdohemoproteina. Dotychczas nie jest do końca jasny mechanizm procesu inaktywacji [7-12].

Sekwencja aminokwasowa cytochromu c jest podobna we wszystkich organizmach eukariotycznych, w których jest elementem łańcucha oddechowego. W toku ewolucji uległ on niewielkim zmianom, co świadczy o jego istotnej roli dla funkcjonowania organizmów.

Wyróżniono trzy klasy cytochromów, różniące się długością łańcucha białkowego, sposobem połączenia hemu z grupą białkową i jego położeniem oraz ilością grup hemowych (tab. 1).

Grupą prostetyczną cytochromu c jest hem. Jest on kowalencyjnie związany z białkiem za pomocą wiązań tioeterowych, które powstają na skutek połączenia grup hydrosulfidowych dwóch reszt cysteinowych z grupami winylowymi hemu. Taki sposób połączenia hemu z białkiem jest korzystny, ponieważ nie dochodzi do „utrąty” hemu w obecności rozpuszczalników organicznych, co następuje w przypadku jakiegokolwiek peroksydazy.

Umiejscowienie i rola cytochromu c jest dobrze poznana, jednak sposób, w jaki przenosi on elektrony pomiędzy błonową reduktazą a oksydazą cytochromową pozostaje niejasny – najprawdopodobniej ulega dyfuzji poprzez błonę, oddziałując osobno z reduktazą cytochromową i oksydazą cytochromową [1,3].

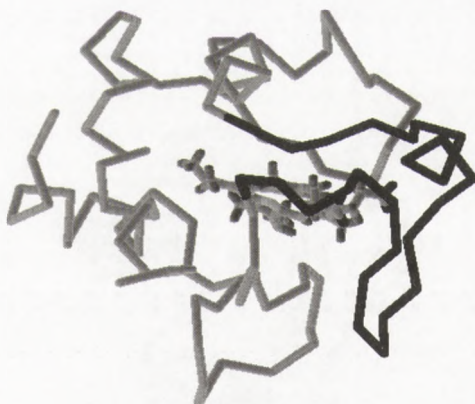
Tabela 1

Klasyfikacja cytochromów c [13]

Klasa	Cechy	Podział	Cechy	Przykłady
I	niski spin, hem połączony koordynacyjnie z histydyną i metioniną,	(a) duży	pętla białkowa zamykająca od dołu szczelinę, w której znajduje się hem (rys. 4)	mitochondrialny cytochrom c (rys. 4) cytochrom c ₂ <i>Pseudomonas</i> cyt. c-551, <i>Chlorobium</i> cyt. c-555 (algowy cyt. c-553)
	hem położony blisko N-końca łańcucha białkowego, 80-120 aminokwasów	(b) mały	brak pętli obecnej w typie (a) (rys. 5)	cytochrom c ₄ , c ₅ <i>Desulfovibrio</i> cyt. c-553 (rys. 5)
II	hem położony blisko C-końca łańcucha białkowego	(a) wysoki spin	hem związany koordynacyjnie jedynie z histydyną	cyt. c' (rys. 6)
		(b) niski spin	hem związany koordynacyjnie z histydyną i metioniną	cyt. c-556
III	cytochromy wielohemowe, hem na 30-40 aminokwasów, hem koordynacyjnie połączony z 2 cząsteczkami histydyny	podstawą są hemy		cyt. c ₃ (3 hemy) cyt. c ₃ (4 hemy) cyt. c ₃ (8 hemów) cyt. c ₇ (3 hemy) (rys. 7)

3.3.2. Właściwości biokatalityczne cytochromu c

W organizmie żywym cytochrom c nie wykazuje aktywności katalitycznej. Jednak *ex vivo* ma zdolność katalizowania reakcji hydroksylacji i oksydacji w obecności nadtlenu wodoru (aktywność peroksydazy). Aktywność ta jest większa w przypadku, gdy enzym jest związany na błonie fosfolipidowej. Najprawdopodobniej wynika



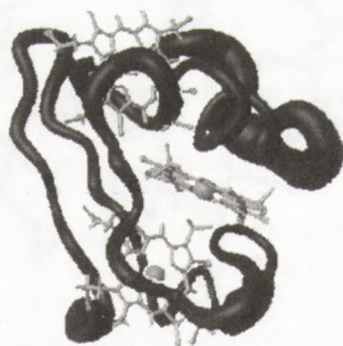
Rys. 4. Mitochondrialny cytochrom c z serca konia (klasa I a). Pętla białkowa zamykająca szczelinę, w której znajduje się hem jest zaznaczona na czarno [13].



Rys. 5. Cytochrom c-553 (klasa I b). Pozostałość po pętli białkowej zamykającej szczelinę, w której znajduje się hem zaznaczono na czarno [13].



Rys. 6. Cytochrom c (klasa II) [13].



Rys. 7. Cytochrom c₇ (klasa III) [13].

to z interakcji między ujemnie naładowaną błoną i dodatnio naładowaną powierzchnią cytochromu. Enzym ten w postaci wolnej lub immobilizowany w obecności wody utlenionej lub jakiegoś organicznego nadtlenu katalizuje reakcje oksydacji (N-, O-demetylacji, S-oksydacji, epoksydacji olefin), które przebiegają podobnie do reakcji oksydacji katalizowanych przez cytochrom P-450. Po raz pierwszy oksydacja węglowodorów przez cytochrom c, przy udziale wody utlenionej, była zauważona przez Akasakę i wsp. [14]. Reakcja ta zachodzi przy udziale immobilizowanego enzymu w rozpuszczalniku organicznym, przy zawartości wody mniejszej niż 5%. Wolny cytochrom c nie jest zdolny do przeprowadzenia tej reakcji. Ostatnio zauważono, że cytochrom c potrafi przeprowadzać reakcje oksydacji policyklicznych aromatycznych węglowodorów w układzie zawierającym 10% acetonitrylu i 1 nM wody utlenionej [15]. Poznano właściwości katalityczne cytochromów pochodzących z różnych źródeł, takich jak zwierzęta, drożdże czy komórki bakterii (tab. 2).

Tabela 2

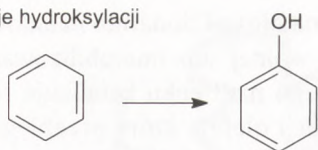
Przykładowe substraty i produkty reakcji katalizowanych przez cytochrom c [3]

Substraty	Produkty	Literatura
Węglowodory aromatyczne		
antracen	9,10-antrachinon	[15]
benzen	fenol	[14]
benzo(a)piren	1,6-benzo(α)pirenodion	[16]
piren	1,8-pirenodion	[15]
Związki heterocykliczne i organiczne związki siarki		
benzotiofen	sulfotlenek benzotiofenu	[17]
karbazol	nieznany	[15]
dibenzotiofen	sulfotlenek dibenzotiofenu	[17]
N-metylokarbazol	N-hydroksymetylokarbazol	[18]
tioanizol	metylofenylosulfotlenek	[18]
Inne substraty		
guajakol	tetraguajakol	[19]
kwas linolenowy	nadtlenek kwasu linolenowego	[20]
luminol	chemiluminescencja	[21]
stilben	epoksyd stilbenu	[18]

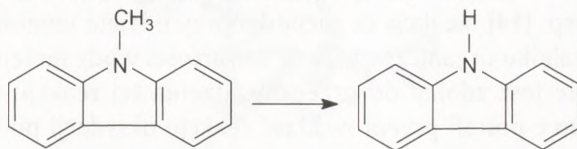
Cytochrom c posiada właściwości, które można wykorzystać w biokatalizie:

- prostetyczna grupa hemowa jest związana z białkiem kowalencyjnie;
- jest aktywny w szerokim zakresie pH [13], np. w przypadku oksydacji dibenzotiofenu pomiędzy pH = 2 a pH = 11; dotychczas nie poznano innego enzymu o takim zakresie aktywności;
- enzym zachowuje aktywność w środowisku o wysokim stężeniu rozpuszczalników organicznych;

Reakcje hydroksylacji



Reakcje N-demetylacji amin aromatycznych i alifatycznych



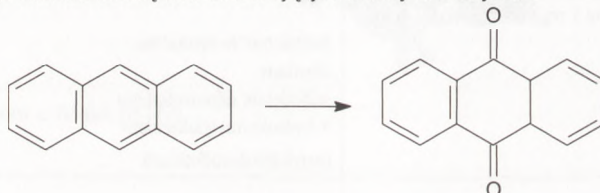
Reakcje epoksydacji



Reakcje S-oksydacji



Reakcje utleniania związków zawierających układy aromatyczne



Rys. 8. Reakcje katalizowane przez cytochrom c.

- jest termostabilny; cytochrom c z serca konia katalizuje reakcje w temperaturze ponad 120°C, przy czym optimum temperaturowe wynosi 80°C;
- jest stosunkowo niedrogi – cena i stabilność są głównymi czynnikami istotnymi dla biokatalizy na większą skalę.

Reakcje katalizowane przez cytochrom c zostały przedstawione na rysunku 8 [3].

3.3.3. Modyfikacja cytochromu c

Obecnie dokonuje się modyfikacji enzymu w celu poprawy jego właściwości fizykochemicznych i biokatalitycznych [3]. Zmiana polega na modyfikacji jego struktury

z wykorzystaniem inżynierii genetycznej, jak i poprzez modyfikację chemiczną. Sekwencja aminokwasowa cytochromu c jest dokładnie poznana. Dzięki temu możliwa jest zmiana struktury I-rzędowej enzymu. Dokonuje się zamiany fenyloalaniny w pozycji 82 na glicynę i cysteiny w pozycji 102 na treoninę. Taka modyfikacja zwiększa 10-krotnie aktywność enzymu [15]. Niektóre modyfikacje mogą doprowadzić do zmiany miejsca aktywnego, a w rezultacie do zmiany powinowactwa enzymu. Pomimo że cytochrom c jest bardzo stabilnym białkiem, można tę właściwość jeszcze zwiększyć. Jego termostabilność może zostać poprawiona przez utworzenie dodatkowych mostków disulfidowych, dzięki wprowadzeniu cysteiny obecnej w specyficznych miejscach białka.

Niekorzystnym zjawiskiem jest inaktywacja cytochromu przez oksydację w obecności wody utlenionej, co stanowi czynnik limitujący dla katalizy na większą skalę. Problem ten jednak można rozwiązać przez ukierunkowaną, punktową mutację. Zmiana aminokwasu w miejscu wrażliwym na inaktywację na inny, bardziej odporny na utlenianie, może doprowadzić do zwiększenia stabilności białka.

Modyfikacja chemiczna polega na podstawieniu wolnych grup aminowych w białku przez glikol polietylenowy (PEG) i zestryfikowaniu wolnych grup karboksylowych grupami metylowymi [19]. Taka zmiana prowadzi do wzrostu termostabilności (głównie dzięki stabilizacji reszt aminowych przez PEG) i ukierunkowania jego działania na związki aromatyczne. Dodatkowo, modyfikacja chemiczna wolnych grup aminowych na powierzchni białka może znacząco zwiększyć rozpuszczalność enzymu w rozpuszczalnikach organicznych. Dzięki temu może to poprawić wydajność katalizy w przypadku związków hydrofobowych.

3.4. Charakterystyka cytochromu P-450

3.4.1. Budowa i właściwości cytochromu P-450

W organizmie człowieka większość procesów metabolizmu leków zachodzi przy udziale ogromnej rodziny izoenzymów określanych wspólną nazwą cytochromu P-450 [1]. Cytochrom P-450 jest hemoproteiną posiadającą jako kofaktor protoporfirynę IX, a jego nazwa pochodzi od maksimum absorpcji przy 450 nm, jakie daje kompleks jego zredukowanej formy z tlenkiem węgla. Cytochrom zakotwiczony jest w błonie retikulum za pomocą dwóch transmembranowych pętli [22]. Miejsce wiązania substratu znajduje się od strony błony retikularnej, natomiast hem ułożony jest równoległe do powierzchni błony. Z cytochromem P-450 związana jest reduktaza cytochromu P-450 zależna od NADPH. Interakcja pomiędzy tymi dwoma molekułami polega prawdopodobnie na powstawaniu licznych, dopełniających się par ładunków. Dla prawidłowego funkcjonowania tego układu stosunek cytochromu P-450 i jego reduktazy powinien wynosić 1:1. Jednak w organizmie człowieka ilość

reduktazy jest 40 razy mniejsza niż cytochromu P-450, dlatego aktywność reduktazy jest czynnikiem limitującym dla wielu reakcji zależnych od cytochromu P-450. Najwięcej cytochromu P-450 znajduje się w wątrobie, ale jego izoenzymy rozmieszczone są niemal we wszystkich organach i tkankach, np. w jelitach (CYP 450 2C i 2D6), w płucach (CYP 450 2E1 i 2F1) czy w mózgu (CYP 450 4B1 i 2E1) [2]. Cytochrom P-450 nie występuje w komórkach mięśni prądkowanych i erytrocytów.

Cytochrom P-450 składa się z rodzin i podrodzin. Określa się je na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów, które mieszczą się w granicach od poniżej 30 do powyżej 98% [1]. Dotychczas poznano 281 różnych rodzin cytochromu P-450 i 537 podrodzin. Poznano 977 cytochromów u zwierząt, 607 u roślin, 109 u niższych eukariota i 151 u bakterii. Opisano 30 rodzin cytochromu P-450, w tym 10 u ssaków (tab. 3). Z funkcjonalnego punktu widzenia, cytochromy można podzielić na dwie klasy: cytochromy związane z syntezą steroidów i kwasów żółciowych oraz cytochromy metabolizujące głównie ksenobiotyki. Cytochromy związane z metabolizmem steroidów i kwasów żółciowych są proste i zawierają tylko jedną formę. Wszystkie te enzymy są bardzo dobrze zabezpieczone u ssaków, natomiast jeśli chodzi o ich katalityczną aktywność, zachowują raczej sztywną specyficzność substratu i produktu. To mocne zabezpieczenie wynika prawdopodobnie z ich krytycznej roli w syntezie steroidów i kwasów żółciowych. Cytochromy P-450 metabolizujące ksenobiotyki rozwinęły się prawdopodobnie z cytochromów metabolizujących steroidy.

Tabela 3

Rodziny cytochromu P-450 u ssaków, wg Gonzaleza [23]

P-450	Liczba podrodzin	Liczba form	Reakcje
CYP1	1	2	metabolizm ksenobiotyków
CYP2	8	57	metabolizm ksenobiotyków i steroidów
CYP3	2	10	metabolizm ksenobiotyków i steroidów
CYP4	2	10	hydroksylacja kwasów tłuszczowych (ω i ω -1-)
CYP7	1	1	hydroksylacja cholesterolu (7 α)
CYP11	2	3	hydroksylacja steroidów (11 β)
CYP17	1	1	hydroksylacja steroidów (17 α)
CYP19	1	1	aromatyzacja
CYP21	1	1	hydroksylacja steroidów (21)
CYP27	1	1	hydroksylacja cholesterolu (27)

Późniejsze zwiększenie się ich różnorodności związane jest ze zróżnicowaniem świata roślinnego i zwierzęcego. Obecnie trwają poszukiwania specyficznych substratów i selektywnych inhibitorów poszczególnych izoenzymów. W tabeli 4 przedstawiono znane obecnie specyficzne substraty i inhibitory izoenzymów odpowiedzialnych za metabolizm leków i innych ksenobiotyków.

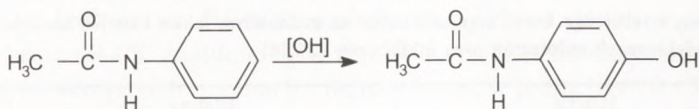
Tabela 4

Główne izoenzymy cytochromu P-450 odpowiedzialne za metabolizm leków i innych ksenobiotyków oraz przykłady ich selektywnych substratów oraz inhibitorów [25,26]

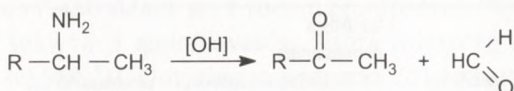
P-450	Substrat	Inhibitor	Induktor
1A1	7-etoksyrezorufina (O-deetylacja) enzym niekonstytutywny	7,8-benzoflawnon	PAH
1A2	fenacetyna (O-deetylacja) kofeina (N3-demetylacja) 7-etoksyrezorufina (O-deetylacja) specyficzny w nieobecności 1A1	furafyllina fluwoksamina 7,8-benzoflawnon selektywny w nieobecności 1A1	palenie papierosów omeprazol
2A6	kumaryna (7-hydroksylacja)	8-metoksypsoralen dietyltykARBAMINIAN	fenobarbital pyrazol
2B1	prazikwantel (4-hydroksylacja)	cymetydyna	
2B6	nikotyna tamoksifen	fluwoksamina paroksetyna	fenobarbital cyklofosfamid
2C8	taksol werapamil kwas arachidonowy	kwercetyna	rifampicyna fenobarbital
2C9	tolbutamid (metyl-hydroksylacja) (S)-warfaryna (7-hydroksylacja) diklofenak (4'-hydroksylacja)	sulfafenazol	barbiturany rifampicyna
2C19	(S)-mefenytoina (4'-hydroksylacja)	teniposid	
2D6	debryzochina (4-hydroksylacja) sparteina (2,3 i 5,6 didehydrosparteina) bufuralol (1'-hydroksylacja) deksstrometorfan (O-demetylacja)	chinidyna, ajmalina fluoksetyna paroksetyna lewomepromazyna tiorydazyna	jak się wydaje nieindukowalny
2E1	chlorkwaszozon (6-hydroksylacja) dimetylnitrozamina (N-demetylacja)	disulfiram 4-metylpirazon dietyltykARBAMINIAN	atenolol
2F1	skatol	nieznany	
3A4	nifedypina (aromatyzacja) erytromycyna (N-demetylacja) testosteron (6β-hydroksylacja)	gestoden troleandomycyna	rifampicyna barbiturany karbamazepina

Powszechnie akceptowany mechanizm reakcji katalizowanej przez cytochrom P-450 wygląda następująco [24]: substrat (lek) wiąże się początkowo z utlenioną formą (Fe^{3+}) cytochromu. Powstanie kompleksu substrat–cytochrom przyspiesza redukcję żelaza cytochromalnego przez NADPH–cytochrom P-450-reduktazę. Zredukowany kompleks cytochromu przyłącza następnie molekułę tlenu, co następuje bardzo szybko. Dostarczenie drugiego elektronu przez reduktazę cytochromu P-450 zależną od NADPH lub przez cytochrom b_5 (i dwóch jonów wodorowych) aktywuje molekułę tlenu, co w efekcie daje utleniony metabolit i wodę oraz zregenerowaną utlenioną formę cytochromu P-450.

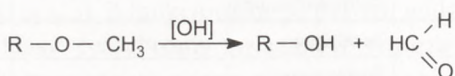
* Hydroksylacja związków aromatycznych i alifatycznych



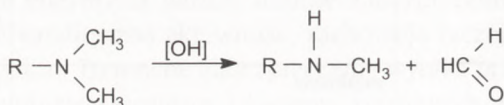
* Deaminacja



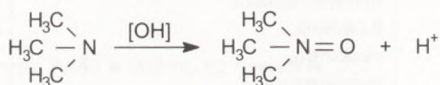
* O-dealkilacja



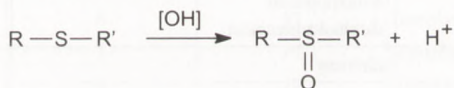
* N-dealkilacja



* N-oksydacja



* Sulfoksydacja



* Epoksydacja alkanów, policyklicznych węglowodorów i halogenków benzenu

* Przekształcanie amin do N-tlenków, hydroksylamin i nitropochodnych

* Dehalogenacja halogenków węglowodorów

Rys. 9. Reakcje katalizowane przez cytochrom P-450 [2,23,25,27].

Cytochrom P-450 ma zdolność katalizowania reakcji prowadzących do powstania produktu łatwiej rozpuszczalnego w wodzie od wyjściowego substratu. W organizmie ludzkim odpowiedzialny jest za metabolizm substancji endo- i egzogennych, mający na celu głównie ich detoksykację i usunięcie. Jednak niektóre reakcje przeprowadzane przez ten enzym powodują efekt wręcz przeciwny, dając produkt metabolizmu o większej toksyczności niż substrat. Reakcje katalizowane przez cytochrom P-450 przedstawiono na rysunku 9.

3.4.2. Możliwości zastosowania cytochromu P-450 w biotechnologii leków

Cytochrom P-450 może pełnić szczególną rolę w otrzymywaniu leków metodami biotechnologicznymi. Funkcja fizjologiczna cytochromu P-450 polega na jego udziale w biosyntezie substancji endogennych oraz metabolizmie związków egzogennych. Możliwości stosowania cytochromu P-450 w biotechnologii wynikają z unikatowych właściwości tej hemoproteiny [27]:

- istnieją liczne formy molekularne cytochromu P-450 różniące się właściwościami katalitycznymi;
- cytochrom P-450 cechuje się niską specyficznością substratową, co stwarza możliwości wykorzystania jako substratów związków o bardzo zróżnicowanej strukturze chemicznej;
- poszczególne formy molekularne cytochromu P-450 cechują się wysoką regio-selektywnością i stereospecyficznością katalizowanych reakcji;
- rozwój biologii molekularnej umożliwił dokonywanie zmian właściwości katalitycznych cytochromu P-450.

Najczęściej wykorzystywanym źródłem cytochromu P-450 są komórki wątroby (hepatocyty) lub izolowane z nich mikrosomy. Coraz częściej jednak metodami inżynierii genetycznej wprowadza się geny odpowiedzialne za syntezę cytochromu P-450 do mikroorganizmów, np. do komórek *E. coli* lub też indukuje się go w różnych mikroorganizmach, stosując odpowiednie pożywki. Gdy źródłem energii dla komórek drożdży jest glukoza, wykrywa się w nich tylko minimalne ilości cytochromu P-450. Dodanie jednak do pożywki wzrostowej etanolu, a następnie galaktozy, w sposób znaczący zwiększa stężenie cytochromu P-450; dochodzi ono do 200 pmoli/mg białka [28]. Ze względu na obecność w komórkach drożdży endogennej oksydoreduktazy zależnej od NADPH cytochromu P-450, która z cytochromem P-450 tworzy funkcjonalny system monoooksygenazy, są one dobrym modelem do badania metabolizmu leków oraz do badań zależności między strukturą cytochromu P-450 a jego właściwościami katalitycznymi.

4. Metody izolowania i oczyszczania cytochromów

Początkowo w badaniach nad właściwościami cytochromów wykorzystywano całe organizmy (zwierzęta laboratoryjne), później izolowane tkanki (np. mikrosomy wątroby szczura). Umożliwiło to poznanie funkcji cytochromów wchodzących w skład łańcucha oddechowego, izoenzymów cytochromu P-450 oraz cytochromów współpracujących z cytochromem P-450.

W celu większej możliwości zastosowania cytochromów w biotechnologii wymagane było dokładne poznanie ich struktury i właściwości, nie tylko w określonych organizmach i tkankach, ale też poza nimi. Stało się to możliwe dzięki wyizolowaniu pojedynczych cytochromów. Dotychczas wyizolowano cytochromy łańcucha od-

dechowego [29], cytochrom b_2 , cytochrom b_5 , cytochrom c i liczne izoenzymy cytochromu P-450. Z punktu widzenia biotechnologii istotna jest możliwość otrzymania czterech ostatnich rodzajów cytochromów.

Pierwsze metody izolowania cytochromów polegały na wyizolowaniu tych białek bezpośrednio z komórek. W ten sposób uzyskuje się cytochrom b_2 , izolując go z mitochondriów dwóch gatunków drożdży: *Saccharomyces cerevisiae* i *Hansenula anomala* [30]. Cytochrom b_5 otrzymuje się z mikrosomów różnych zwierząt, takich jak szczur, kurczak [31], owca czy królik [32].

Cytochrom c , który jest bardzo powszechną proteiną u eukariota, izoluje się z bardzo różnorodnych organizmów – bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. W czystej postaci uzyskano go z *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccus denitrificans* i *Synechocystis* sp. [33,34]. Chociaż cytochrom c w komórce jest elementem łańcucha oddechowego, poza komórką wykazuje odmienne właściwości. Wyizolowanie go z komórki umożliwiło badanie tych cech, które okazały się bardzo korzystne, podobne do właściwości cytochromu P-450.

Cytochrom P-450, będący ogromną rodziną izoenzymów bardzo interesujących z uwagi na powszechne występowanie i niepowtarzalne właściwości, znajduje się w mitochondriach bakterii, grzybów i roślin. U zwierząt występuje w wielu różnych tkankach i organach, np. w płucach, mózgu, nabłonku itd. Największe stężenie cytochromu P-450 występuje jednak w mikrosomach wątroby, skąd izoluje się i oczyszcza różne izoenzymy cytochromu P-450 [32]. Możemy je podzielić na trzy grupy:

1) enzymy stale obecne w komórkach, które są nieindukowalne lub słabo indukowalne: 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2D1, 1D2;

2) enzymy stale obecne w komórkach, których ilość znacznie wzrasta w wyniku indukcji za pomocą różnych ksenobiotyków: 1A1, 2A1, 2B2, 2C6, 2E1, 3A2, 4A1;

3) enzymy, które nie występują w komórkach mikrosomów fizjologicznie lub występują w bardzo małej ilości, ale są indukowane za pomocą ksenobiotyków: 1A1, 2B1, 3A1.

Izoenzymy należące do grupy pierwszej izolowane są z mikrosomów zwierząt, którym nie podawano żadnych substancji, w celu indukcji określonego izoenzymu cytochromu P-450. Enzymy zaliczane do pozostałych grup izolowane są z mikrosomów zwierząt, którym w celu zwiększenia stężenia określonego izoenzymu cytochromu P-450 podawano określone ksenobiotyki.

Rodzina izoenzymów cytochromu P-450 jest bardzo rozbudowana. Pojedyncze izoenzymy izoluje się różnymi metodami chromatograficznymi, takimi jak niskociśnieniowa chromatografia cieczowa (LPLC i HPLC), chromatografia cieczowa białek (FPLC), chromatografia jonowymienna (IEC), chromatografia powinowactwa (IMAC), chromatografia interakcji hydrofobowych (HIC).

5. Otrzymywanie cytochromów metodami inżynierii genetycznej

W dobie szybko rozwijającej się inżynierii genetycznej i biotechnologii powstały metody otrzymywania cytochromów w wyniku ekspresji w komórkach bakterii *Escherichia coli* [35], drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i w układzie komórek owadzych i bakulowirusa [36].

Otrzymywanie poszczególnych cytochromów tą metodą stało się możliwe dzięki uzyskaniu cDNA cytochromów. Jest to dwuniciowy fragment DNA, otrzymywany z mRNA za pomocą odwrotnej transkryptazy, zawierający tylko geny kodujące proteiny cytochromów. cDNA jest następnie izolowane i przenoszone do komórek gospodarza, w których ulega ekspresji i dochodzi do produkcji białka. Metoda ta znalazła zastosowanie do otrzymywania cytochromu c [37] oraz izoenzymów cytochromu P-450 [38-40].

Pierwszym gospodarzem do otrzymywania cytochromów były komórki *Escherichia coli*. Proces polega na wprowadzeniu cDNA cytochromu do odpowiedniego wektora, za pomocą którego transformuje się bakterie. Transformowane bakterie hoduje się w celu zwiększenia biomasy i wyprodukowania odpowiedniej ilości białek, a następnie izoluje obecne w komórkach cytochromy. Początkowo ekspresja genów cytochromów była na stosunkowo niskim poziomie. Jednak po kilku latach doświadczeń uzyskano stosunkowo wysoki stopień ekspresji, wykorzystując wektor pCWori⁺ [38] oraz stosując odpowiednie warunki wzrostu.

Najistotniejsza, z punktu widzenia biotechnologii farmaceutycznej, jest możliwość badania metabolizmu leków przy wykorzystaniu cytochromu P-450; dlatego też możliwości jego otrzymania stały się głównym celem badaczy.

Komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* okazały się lepszym systemem do ekspresji genów cytochromów P-450, z uwagi na obecność endogennej reduktazy cytochromu P-450 zależnej od NADPH, która z cytochromem P-450 tworzy funkcjonalny system monoooksygenazy. Wadą tego układu jest słabsze współdziałanie między drożdżową reduktazą cytochromu P-450 a zwierzęcymi cytochromami P-450. Dlatego też metodami inżynierii genetycznej skonstruowano takie szczepy drożdży, które wykazują aktywność wszystkich składników mikrosomalnego systemu monoooksygenaz zależnych od cytochromów P-450. Postępowanie polega na wprowadzaniu w kolejnych pokoleniach kasety cDNA dla cytochromu P-450 połączonego z odpowiednim plazmidem, a następnie plazmidu z kasetą zawierającą cDNA dla reduktazy cytochromu P-450 zależnej od NADPH. W ten sposób komórka drożdży może syntetyzować oba składniki ludzkiego systemu transportu elektronów, a tak uzyskane szczepy mogą być wykorzystywane w biotechnologii leków [41]. Uzyskane proteiny izoluje się także z komórek drożdży. Dlatego też, w celu śledzenia replikacji wprowadzonego genu, a także dla ułatwienia izolacji wyprodukowanych białek, stosuje się markery: adeninowy ADE2 i uracylowy URA3. Wydajność tego procesu wynosi ok. 10-26%, z pewnymi wyjątkami [39].

Obecnie najbardziej rozpowszechnionym systemem ekspresji genów kodujących ludzkie enzymy cytochromu P-450 jest układ komórek owadzych i bakulowirusa.

System ten cechuje duża pojemność insercyjna genomu bakulowirusa, możliwość ekspresji kilku heterologicznych genów z dużą wydajnością biosyntezy białek warunkowana silnymi promotorami: polihedrynowym lub białkiem p10 oraz wysokie prawdopodobieństwo uzyskania aktywnego białka, z uwagi na dobrą obróbkę posttranslacyjną [42].

Otrzymywanie cytochromów tą metodą przebiega w dwóch etapach. W pierwszym następuje przeniesienie cDNA kodującego dany cytochrom na tzw. wektor pośredniczący. W skład tego wektora wchodzi dany insert (cDNA ok. 20 kbp), region promotora (powyżej punktu insercji), obszary poliadenylowe, które wspólnie z promotorem zapewniają wysoki stopień ekspresji wstawionego genu oraz marker, który pozwala zidentyfikować kolonie posiadające wprowadzany gen. Wektor ten jest następnie wprowadzany do komórek owada wcześniej zainfekowanych bakulowirusem. Tam dochodzi do fuzji wprowadzonego cDNA i DNA bakulowirusa. W drugim etapie wyizolowany bakulowirusowy wektor z wprowadzonym cDNA przenosi się do komórek gospodarza. W przypadku otrzymywania izoenzymów cytochromu P-450 są to linie komórkowe High Five z *Trichoplusia ni* (błyszczka kapuściana) lub linia Sf-9 z *Spodoptera frugiperda* (mól bawełniany) [36]. Następnie, po hodowli na odpowiednich pożywkach, izoluje się zsyntetyzowane cytochromy metodami chromatograficznymi, podobnymi jak w przypadku izolowanych z tkanek zwierzęcych.

6. Podsumowanie

Na podstawie dotychczasowych wyników badań, prowadzonych za pomocą różnorodnych metod można dokładniej poznać strukturę cytochromów, a przez to także funkcję, jaką pełnią one w organizmie oraz poza nim. Można też wyjaśnić przebieg niektórych procesów metabolicznych zachodzących w komórkach, m.in. ludzkich, oraz wykorzystać do otrzymywania substancji przydatnych dla człowieka. Rozwój metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej stwarza duże możliwości i perspektywy wykorzystania cytochromów do badań nad substancjami wykazującymi aktywność w organizmie ludzkim. Ekspresja cDNA daje możliwość stworzenia komórek lub też bioreaktora, które zawierałyby pełną baterię enzymów metabolizujących ksenobiotyki.

Literatura

1. Stryer L., (1997), *Biochemia*, PWN, Warszawa, 565-595.
2. Williams D. A., Lemke T. L., (2002), *Foye's Principles of Medical Chemistry*, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 174-233.
3. Vazquez-Duhalt R., (1999), *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 7, 241-249.
4. Capeillere-Blandin C., (1995), *Biochimie*, 77, 516-530.
5. Cooper M. T., Porter T. D., (2001), *Mutat. Res.*, 484, 61-68.
6. Patten C. J., Koch P., (1995), *Arch. Biochem. Biophys.*, 317, 504-513.

7. Arnao M. B., Acosta M., del Rio J. A., Varón R., García-Cánovas F., (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, 1041, 43-47.
8. Hu Z. C., Korus R. A., Venkataramu C. R., Crawford R. L., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 567-574.
9. Mylrajan M., Valli K., Wariishi H., Gold M. H., Loehr T. M., (1990), *Biochemistry*, 29, 9617-9623.
10. Huwiler M., Jenzer H., Kohler H., (1986), *Eur. J. Biochem.*, 158, 609-614.
11. Hiner A. N. P., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., Smith A. T., Arnao M. B., Acosta M., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 234, 506-512.
12. Rodríguez-López J. N., Hernandez-Ruiz J., García-Cánovas F., Thorneley R. N. F., Acosta M., Arnao M. B., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 5469-5476.
13. www.cerm.unitfi.it/CHBIOIN/lez5.htm
14. Akasaka R., Mashino T., Hirobe M., (1994), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 1817-1821.
15. Torres E., Sandoval J. V., Rosell F. I., Mauk A. G., Vazquez-Duhalt R., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 1014-1020.
16. Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 8-12.
17. Vazquez-Duhalt R., Westlake D. W. S., Fedorak P. M., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 494-499.
18. Akasaka R., Mashino T., Hirobe M., (1993), *Arch. Biochem. Biophys.*, 301, 355-360.
19. Fujita A., Senzu H., Kunitake T., Hamachi I., (1994), *Chem. Lett.*, 1219-1222.
20. Tappel A. L., (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, 44, 378-395.
21. Radi R., Thomson L., Rubbo H., Prodanov E., (1991), *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 112-117.
22. Nelson D. R., Strobel H. W., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 6038-6050.
23. Gonzalez F. J., (1992), *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 346-352.
24. Gerber N. C., Sligar S. G., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 8742-8743.
25. Jansen E. H. J. M., de Fluiter P., (1992), *J. Chromatogr.*, 580, 325-330.
26. Wen X., (2002), *In vivo approaches in evaluation and prediction of drug-drug interaction involving the inhibition of cytochrome P450*, praca doktorska, Department of Clinical Pharmacology University of Helsinki.
27. Wrighton S. A., Stevens J. C., (1992), *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 1-21.
28. Urban P., Cullin C., Pompon D., (1990), *Biochimie*, 72, 463-472.
29. Horváth A., Berry E. A., Huang L. S., Maslov D. M., (2000), *Exp. Parasitol.*, 96, 160-167.
30. Cremel G., Waksman A., Pajot P., (1977), *FEBS Lett.*, 74, 239-242.
31. Roos P. H., (1996), *J. Chromatogr.*, (B), 684, 107-131.
32. Arinç E., Çakir D., (1999), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31, 345-362.
33. Sanders C., Lill H., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1459, 131-138.
34. Moir J. W. B., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1430, 65-72.
35. Dong J., Porter T. D., (1996), *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 254-259.
36. Amarneh B., Simpson E. R., (1996), *Mol. Cell Endocrinol.*, 119, 69-74.
37. Sanders C., Lill H., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1459, 131-138.
38. Winters D., Cederbaum A. I., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1156, 43-49.
39. Imaoka S., Yamada T., Hiroi T., Hayashi K., Sakaki T., Yabusaki Y., Funae Y., (1996), *Biochem. Pharmacol.*, 51, 1041-1050.
40. Chen W., Peter R. M., McArdle S., Thummel K. E., Sigle R. O., Nelson S. D., (1996), *Arch. Biochem. Biophys.*, 335, 123-130.
41. Murakami H., Yabusaki Y., Sakaki T., Shibata M., Ohkawa H., (1990), *J. Biochem.*, 108, 859-865.
42. Jones I., Morikawa Y., (1996), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 512-516.