



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Propojení pracovišť v oblasti translační medicíny a medicínální chemie v ČR  
reg. číslo: CZ.1.07/2.4.00/17.0015

Ve dnech 25.4. 2012 – 21. 10. 2012 jsem se zúčastnil stáže v laboratoři prof. Guengeriche, na Ústavu biochemie Lékařské fakulty Vanderbilt University v Nashville, Tennessee, USA. Prof. Guengerich patří mezi přední světové vědce v oblasti studia cytochromů P450, enzymů, které hrají roli především v metabolismu léčiv, ale také v aktivaci prokarcinogenů a v neposlední řadě i v syntéze a metabolismu látek endogenních, zejména látek steroidní a lipidové povahy.

Moje experimentální práce byla zaměřena na studium funkce orfanních cytochromů P450. Ve srovnání s cytochromy P450 metabolizujícími primárně léčiva nebyla úloha těchto orfanních cytochromů P450 v lidském organismu doposud zcela objasněna. Můj zájem byl soustředěn na enzym CYP2U1. V první fázi jsem se snažil exprimovat modifikovaný gen pro CYP2U1 v buňkách různých kmenů bakterie *E. coli*, následně tento enzym z buněk izolovat a purifikovat za použití chromatografické separace využívající speciální sorbent s nikelnatými ionty.

Purifikovaný enzym jsem pak využil v experimentech necílené analýzy neboli metabolomiky. Principem necílené analýzy, která je vhodná pro hledání endogenních substrátů orfanních CYP, je inkubace purifikovaného enzymu s tkáňovým extraktem (v mém případě se jednalo o tkáňový extrakt kravského mozku a lidských jater), reakční směs je následně podrobena analýze využívající spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) a výstupní data jsou analyzována za pomoci metabolomických softwarů. Dále jsem při studiu funkce CYP2U1 využil metodu inkubace enzymu a tkáňového extraktu v přítomnosti dvou různých izotopů kyslíku. Na základě uvedených experimentů jsem zjistil, že CYP2U1 se podílí na metabolismu *N*-acylserotoninů, konkrétně *N*-arachidonoylserotoninu.

Výsledky LC/MS analýzy naznačily, že CYP2U1 je nejen zodpovědný za metabolické přeměny v řetzcích mastných kyselin, jak již bylo zjištěno dříve, ale také zřejmě hraje roli i v metabolických přeměnách na indolovém jádře. Pomocí preliminární cílené analýzy bylo následně zjištěno, že CYP2U1 katalyzuje také oxidativní přeměnu serotoninu a jeho dalších

*Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*

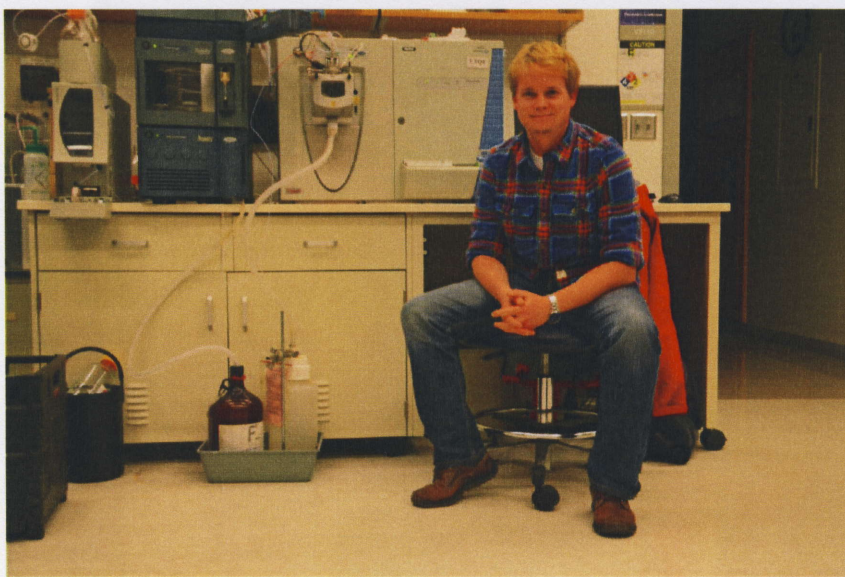


## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Propojení pracovišť v oblasti translační medicíny a medicínální chemie v ČR  
reg. číslo: CZ.1.07/2.4.00/17.0015

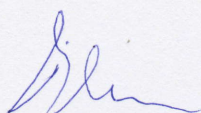
strukturálních analogů. Dalším zajímavým odhalením je fakt, že se CYP2U1 podílí na metabolismu bioaktivního metabolitu paracetamolu – sloučeniny *p*-aminophenolu s arachidonovou kyselinou, který je zajímavý z hlediska schopnosti tlumit bolest. Míru přeměn uvedených substrátů katalyzovaných CYP2U1, zejména *N*-arachidonoylserotoninu, je třeba dále kvantifikovat. K tomu bude zapotřebí inkubací CYP2U1 s radioaktivně značenými substráty a následné zjištění základních parametrů charakterizujících příslušné enzymatické reakce.

Závěrem bych rád zdůraznil fakt, že tato stáž byla pro mě velmi přínosnou z hlediska mé další výzkumné práce. Měl jsem možnost seznámit se s řadou nových technik zejména z oblasti metabolické analýzy a enzymologie, při své experimentální práci jsem často využil různých typů hmotnostních spektrometrů a osvojil si tak práci s nimi a v neposlední řadě se v průběhu stáže zvýšila úroveň mé odborné angličtiny. Do budoucna je plánována publikace z výsledků mé experimentální práce v laboratoři prof. Guengeriche a zároveň není vyloučena možnost další spolupráce zejména v oblasti studia funkcí cytochromů P450.



Zpráva vyhotovena dne 21.10. 2012.

Mgr. Michal Šiller, Ph.D.



*Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*