

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Vojtech Ličko

**Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na aktivitu cytochromů P450**  
Effect of cytochrome b<sub>5</sub> on activity of cytochromes P450

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2020

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

### **Poděkování**

Velmi rád by som sa touto cestou poďakoval svojmu školiteľovi Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za jeho ochotu, trpezlivosť, čas a cenné rady, ktoré mi počas práce venoval. Zároveň ďakujem všetkým kolegyniam a kolegom z laboratória 221 a 219 za vytvorenie veľmi príjemnej atmosféry.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 18-10251S).

## ABSTRAKT

---

Cytochrom  $b_5$  (CYB5) je hemový protein schopný redukce cytochromů P450 (CYP) nebo jiných enzymů. Jeho regulační schopnost však byla rovněž pozorována i v apo formě, tedy bez přítomnosti hemové prostetické skupiny v aktivním centru. CYB5 je schopný přijetí elektronu z cytochrom  $b_5$  reductasy (CYB5R) nebo cytochrom P450 reductasy (CYPOR). Samotná CYPOR je redukována NADPH a je rovněž schopná odevzdání elektronu CYP nezávisle na CYB5. CYB5R je naopak redukována NADH.

Schopnost CYB5 přijmout a odevzdat elektron byla studována *in vitro* na pěti různých substrátech – testosteronu, Sudanu I, aristolochové kyselině I (AAI), ellipticinu a vandetanibu. Tyto substráty byly vybrány podle jejich charakteristických reakcí, jež jsou katalyzovány příslušnými isoformami CYP. Experimenty s těmito substráty byly prováděny v prostředí s rekombinantními CYP připravenými v hmyzích buňkách nebo *E. coli* nebo v prostředí s jaterními mikrosomy izolovanými z různých organismů. Potkani, z nichž byla většina mikrosomů izolována, byly zároveň premedikovány různými induktory CYP. Pro prokázání schopnosti CYB5 redukovat CYP nezávisle na CYPOR byly experimenty prováděny v prostředí s NADH nebo NADPH. Tímto způsobem byla prokázána schopnost CYB5 a CYB5R sloužit jako zdroj elektronů při metabolismu testosteronu (CYP3A4) a Sudanu I (CYP1A1). Vznik metabolitů v prostředí s NADH byl rovněž pozorován při substrátech ellipticinu a vandetanibu. Naopak při substrátu AAI v prostředí s NADH nebyl pozorován vznik žádného metabolitu. V prostředí s NADPH byl CYB5 schopný stimulovat aktivitu CYP při metabolismu testosteronu (CYP3A4), Sudanu I (CYP1A1) a vandetanibu (CYP1A2). Naopak, inhibiční efekt CYB5 v prostředí s NADPH byl pozorován při metabolismu vandetanibu isoformou CYP1A1. Vyšší aktivita CYP v prostředí s NADH oproti NADPH nebyla pozorována v žádném z provedených experimentů. V rámci předkládané diplomové práce byl prokázán vliv CYB5 na aktivitu CYP, přičemž tento vliv závisel na konkrétní isoformě CYP i na daném substrátu.

**Klíčová slova:** cytochrom  $b_5$ , cytochromy P450, benzo[*a*]pyren, ellipticin, vandetanib, aristolochová kyselina, Sudan I

## ABSTRACT

---

Cytochrome b<sub>5</sub> (CYB5) is heme protein capable of reduction of cytochromes P450 (CYP) or some other enzymes. However, his regulative capability was also observed by his apo form, i.e. in absence of heme prosthetic group in the active center. CYB5 can accept electron from cytochrome b<sub>5</sub> reductase (CYB5R) or from cytochrome P450 reductase (CYPOR). CYPOR by itself is reduced by NADPH and is also able to forward electron to CYP independently of CYB5. CYB5R on the other hand is reduced by NADH.

Efficiency of CYB5 to accept and forward an electron was studied *in vitro* with five different substrates – testosterone, Sudan I, aristolochic acid I (AAI), ellipticine and vandetanib. These substrates were chosen considering their characteristic reactions, which are catalyzed by their respective isoforms of CYP. The experiments with these substrates were carried out in the medium with recombinant CYPs prepared in insect cells or *E. coli* or in the medium with hepatic microsomes isolated from different organisms. Rats, from which the majority of these microsomes was isolated, were premedicated by different CYP inducers. The experiments were carried out in medium with NADH or NADPH in order to assess the capability of CYB5 to reduce CYP independently of CYPOR. The capability of CYB5 and CYB5R to act as a source of electrons for metabolism of testosterone (CYP3A4) and of Sudan I (CYP1A1) was assessed by this procedure. The formation of metabolites was also observed in medium with NADH considering the substrates ellipticine and vandetanib. In contrast, there was no metabolite formation observed in medium with NADH considering the substrate AAI. In the medium with NADPH, the CYB5 could stimulate activity of CYP considering the metabolism of testosterone (CYP3A4), Sudan I (CYP1A1) and vandetanib (CYP1A2). Contrarily, inhibitory effect of CYB5 in the medium with NADPH was observed considering the metabolism of vandetanib by CYP1A1. Higher activity of CYP in the medium with NADH in comparison to NADPH was not observed in any of undertaken experiments. The effect of CYB5 on activity of CYP dependent on the respective isoform of CYP as well as the respective substrate was proven in the proposed diploma thesis.

(In Czech)

**Keywords:** cytochrome b<sub>5</sub>, cytochromes P450, benzo[*a*]pyrene, ellipticine, vandetanib, aristolochic acid, Sudan I

## OBSAH

---

Abstrakt .....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratek .....	8
1 Teoretický úvod.....	9
1.1 Biotransformace.....	9
1.2 Biotransformační enzymy .....	10
1.3 Cytochromy P450 .....	11
1.3.1 Rodina CYP1 .....	16
1.3.2 Rodina CYP2 .....	17
1.3.3 Rodina CYP3 .....	18
1.4 Cytochrom b <sub>5</sub> .....	19
1.5 Cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa .....	20
1.6 Ellipticin.....	21
1.7 Testosteron .....	23
1.8 Sudan I .....	24
1.9 Vandetanib .....	25
1.10 Aristolochová kyselina I.....	26
2 Cíl práce.....	28
3 Materiály a metody .....	29
3.1 Použité chemikálie.....	29
3.2 Použité přístroje.....	29
3.3 Vliv CYB5 na oxidaci testosteronu .....	31
3.3.1 Příprava inkubačních směsí .....	31
3.3.2 Stanovení 6β-OH-testosteronu pomocí HPLC.....	31
3.4 Vliv CYB5 na oxidaci Sudanu I.....	32
3.4.1 Příprava inkubačních směsí .....	32
3.4.2 Stanovení metabolitů Sudanu I pomocí HPLC .....	32
3.5 Vliv CYB5 na oxidaci AAI.....	33
3.5.1 Příprava inkubačních směsí .....	33
3.5.2 Stanovení metabolitů AAI pomocí HPLC.....	33
3.6 Vliv CYB5 na oxidaci ellipticinu .....	34
3.6.1 Příprava inkubačních směsí .....	34
3.6.2 Stanovení metabolitů ellipticinu pomocí HPLC .....	34
3.7 Vliv CYB5 na oxidaci vandetanibu .....	35

3.7.1 Příprava inkubačních směsí .....	35
3.7.2 Stanovení N-desmethylvandetanibu pomocí HPLC.....	35
4 Výsledky .....	36
4.1 Testosteron .....	36
4.2 Sudan I .....	38
4.3 Aristolochová kyselina I.....	40
4.4 Ellipticin.....	41
4.5 Vandetanib .....	43
5 Diskuze .....	48
6 Závěr .....	54
Zdroje .....	55

## SEZNAM ZKRATEK

---

AAI	aristolochová kyselina I
AhR	aryl hydrocarbon receptor
BaP	benzo[ <i>a</i> ]pyren
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CYB5	cytochrom b <sub>5</sub>
CYB5R	NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa
CYP	cytochrom P450
CYPOR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. „high performance liquid chromatography“
LBD	ligand vázající doména, z angl. „ligand binding domain“
mAU	milli-absorbance unit
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PB	fenobarbital, z angl. phenobarbital
PCN	pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril
PXR	pregnanový X receptor
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu, z angl. „revolutions per minute“
SRP	z angl. „signal recognition particles“
Sud I	Sudan I
TST	testosteron
VDR	vitamin D receptor



# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

---

## 1.1 Biotransformace

Cizorodé látky přijímá organismus zejména kůží a plícemi. Účinné mechanismy organismu inaktivující tyto cizorodé látky, aby mohly být následně vyloučeny, nazýváme souhrnně biotransformace [1]. Biotransformační procesy jsou analogické procesům inaktivujícím například žlučová barviva nebo steroidní hormony. Chemické změny těchto procesů vedou většinou ke zvýšení hydrofilie látky, jelikož zvýšená rozpustnost ve vodě usnadňuje vylučování ledvinami. Biotransformace probíhají převážně v játrech, ale také ve střevě a ledvinách [1] [2].

Hepatocyt je vybaven množstvím enzymů důležitých pro látkovou přeměnu, ze kterých nejvýznamnější pro metabolismus léčiv jsou enzymy hladkého endoplasmatického retikula. Tyto enzymy katalyzují hydroxylaci a oxidativní štěpení vazby N–C nebo O–C, a proto je označujeme jako hydroxylasy nebo oxidasy se smíšenou funkcí. Významnou složkou těchto enzymových systémů je cytochrom P450 [2].

Při dlouhodobé expozici xenobiotikem může dojít k zmnožení hladkého ER v jaterních buňkách [3]. Molekulární mechanismus tohoto procesu může probíhat přes navázání xenobiotika na nukleární receptor, který reguluje expresi příslušných cytochromů. Enzymová indukce pak urychlí biotransformaci nejen látky, která indukci vyvolala, nýbrž i dalších léčiv [4] [5] [2].

Chemické procesy biotransformace lze kategorizovat do dvou fází. Oxidační, redukční a hydrolytické reakce, které vnášejí nebo odkrývají funkční skupiny na molekule xenobiotika řadíme do první fáze. Reakce, ve kterých dochází ke konjugaci metabolitu z první fáze s jinou ve vodě rozpustnou molekulou, například kyselinou glukuronovou, řadíme do druhé fáze. Je však nutno podotknout, že některé látky nejdřív podléhají reakcím z druhé fáze, a až poté vstupují do první fáze. Jiné látky první fázi biotransformace úplně vynechají a vstupují přímo do druhé fáze [6].

Hydrolytické štěpení v první fázi biotransformace probíhá na éterových, esterových nebo peptidových vazbách. Lze jej ilustrovat na reakci acetylsalicylátu, ze kterého vzniká katalýzou arylesterasou hydrofilní salicylát. Mezi oxidace řadíme hydroxylace, tvorbu epoxidů, dealkylace nebo desaminace. Jako příklad lze uvést oxidaci etanolu na etanal. V rámci redukčních reakcí biotransformace rozeznáváme dehalogenizace nebo redukce karbonyl-, azo-, a nitro-sloučenin. Mezi další kategorie reakcí první fáze biotransformace řadíme metylace a desulfurizace [1] [6].

Nejčastější formou tvorby konjugátů v druhé fázi biotransformace je spojení s již zmíněným glukuronátem. Produktem takové reakce může být O- nebo N-glukuronid. S pomocí

fosfoadenosinfosulfátu neboli PAPS zvaného též aktivní sulfát dochází k vzniku sulfát esterů. Mezi další významné konjugační reakce pak řadíme vazbu na glutathion a vznik amidové vazby s glycinem nebo glutaminem [1] [6].

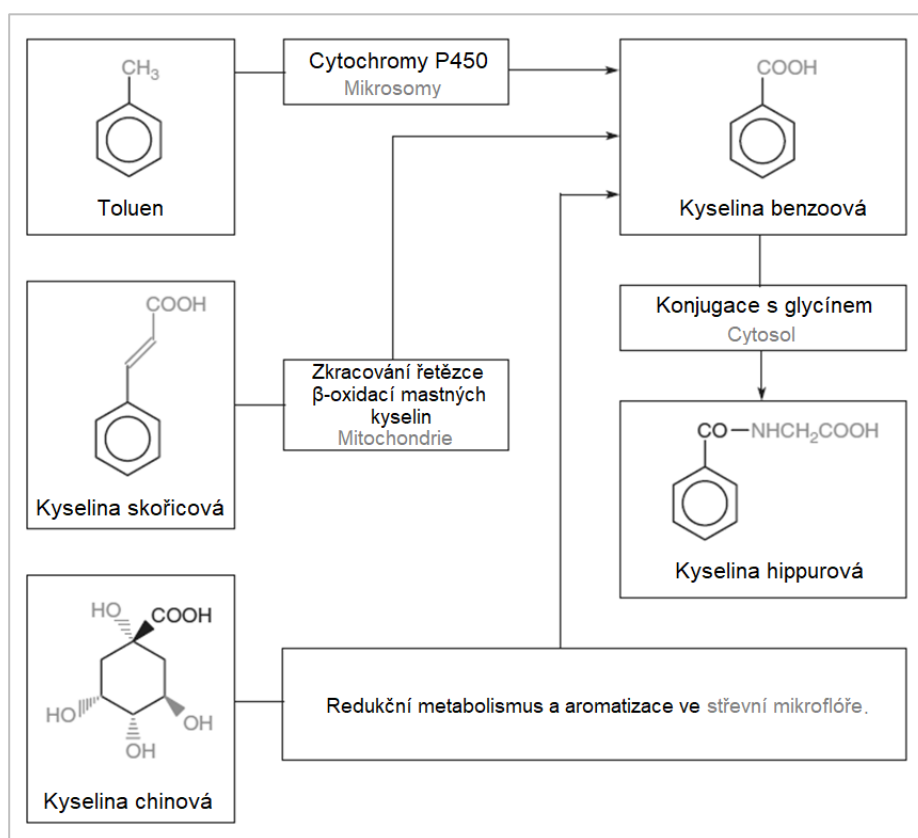
## 1.2 Biotransformační enzymy

Enzymové systémy katalyzující biotransformaci xenobiotik je možné rozdělit do čtyř kategorií, podle typu reakce, kterou katalyzují. Tyto typy reakcí jsou hydrolyza, redukce, oxidace a konjugace. Podrobný přehled enzymových systémů řazených do těchto kategorií je zobrazen v tabulce 1 [7].

**Tabulka 1** Přehled jednotlivých enzymových systémů a jejich lokalizace v rámci buněčných kompartmentů. Převzato a upraveno z [7].

Reakce	Enzym nebo specifická reakce	Lokalizace
Hydrolyza	Karboxylesterasa	Mikrosomy, cytosol, lysosomy, krev
	Alkalická fosfatasa	Plasmatická membrána
	Peptidasa	Krev, lysosomy
	Epoxidhydrólaza	Mikrosomy, cytosol
Redukce	Azo- a nitro- redukce	Mikroflóra
	Redukce karbonylu	Cytosol, mikrosomy, krev
	Redukce disulfidu	Cytosol
	Redukce sulfoxidu	Cytosol
	Redukce chinonu	Cytosol, mikrosomy
	Dihydropyrimidin dehydrogenasa	Cytosol
	Redukční dehalogenace	Mikrosomy
	Dehydroxylace (cytochrom b <sub>5</sub> )	Mikrosomy
	Dehydroxylace (aldehyd oxidasa)	Cytosol
Oxidace	Alkoholdehydrogenasa	Cytosol
	Aldehyddehydrogenasa	Mitochondria, cytosol
	Aldehydoxidasa	Cytosol
	Xantinoxidasa	Cytosol
	Monoaminoxidasa	Mitochondria
	Diaminoxidasa	Cytosol
	Peroxidasa	Mikrosomy, lysosomy, sliny
	Flavin-monooxygenasa	Mikrosomy
	Cytochrom P450	Mikrosomy
Konjugace	UDP-glukuronosyltransferasa	Mikrosomy
	Sulfotransferasa	Cytosol
	Glutathiontransferasa	Cytosol, mikrosomy, mitochondria
	Transaminasa	Mitochondria, mikrosomy
	N-Acetyltransferasa	Mitochondria, cytosol
	Methyltransferasa	Cytosol, mikrosomy, krev

Je nutno zdůraznit, že ne všechny biotransformační reakce jsou katalyzované enzymy v tabulce 1. Některé reakce jsou katalyzované enzymy střevní mikroflóry, nejčastěji anaerobními bakteriemi tlustého střeva [8]. Jiné xenobiotika jsou naopak biotransformovány enzymy podílejícími se na intermediárním metabolismu [7]. Tento princip lze ilustrovat na příkladu metabolismu třech xenobiotik – toluenu, kyseliny skořicové a kyseliny chinové, které jsou metabolizovány na společný produkt kyselinu benzoovou. Všechny tři látky podléhají různým biotransformačním procesům, za vzniku toho samého produktu (viz. Obrázek 1).



**Obrázek 1** Příklad biotransformace xenobiotik různými enzymovými systémy [7].

### 1.3 Cytochromy P450

Jednou z největších a nejvíc funkčně rozmanitých rodin enzymů jsou cytochromy P450 (CYP) [9].

Studie potkaních a prasečích mikrosomálních proteinových frakcí zaznamenaly existenci pigmentu vázaného v membráně s oxidem uhelnatým, vykazujícího absorpční maximum v tzv. Soretovém pásu při 450 nm [10] [11] [12]. Toto absorpční maximum je jedinečnou vlastností

pozorovanou jenom ve čtyřech třídách hemoproteinů, kromě cytochromů P450 jsou to NO synthasy [13], chloroperoxidasy [14] a proteiny H450 [15].

Cytochromy P450 dělíme do rodin a podrodin. Cytochromy P450 vykazující v sekvenci aminokyselin podobnost vyšší než 40 % řadíme do stejné rodiny. CYP vykazující v sekvenci aminokyselin podobnost vyšší než 55 % řadíme do stejné podrodiny. Cytochromy P450 vykazující podobnost vyšší než 97 % považujeme za alely toho samého genu [16].

Funkční rozmanitost mezi jednotlivými členy genové rodiny může vznikat mnoha mechanismy. Mezi nejznámější mechanismy odpovědné za zmnožení a diverzifikaci genových rodin řadíme genovou duplikaci [17].

Fylogenetické analýzy cytochromů P450 naznačují, že se jedná o jedny z evolučně nejrychleji se vyvíjejících genů. Takový atribut odpovídá jejich potřebě rychle přizpůsobit svou odpověď na neustále se měnící toxická xenobiotika. Jednotka evoluční periody neboli čas, za který protein vykáže 1 % změny sekvence aminokyselin, je u cytochromů P450 odhadována na dva až čtyři miliony let [18].

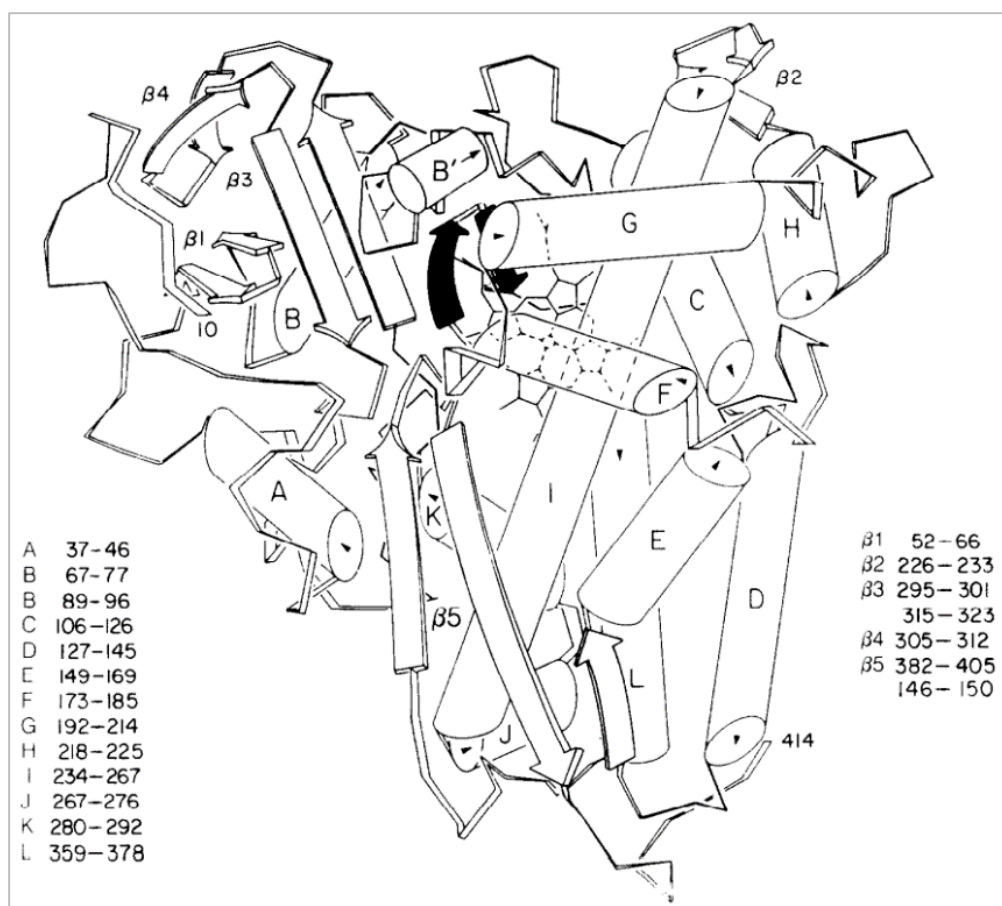
Eukaryotické cytochromy P450 nabývají velikosti řetězce v rozmezí 480 až 560 aminokyselin. Podle jejich lokalizace uvnitř buňky je možno je rozdělit do tří kategorií. Nejvýraznější část eukaryotických CYP je součástí membrány endoplasmatického retikula (mikrosomální CYP) a membrány mitochondrií (mitochondriální CYP). Třetím typem jsou pak cytosolární formy. I když v případě prokaryot je rozpuštění CYP v cytosolu výhradní formou, v případě eukaryot je tento typ extrémně vzácný [19].

Mikrosomální CYP jsou syntetizovány ribozomy vázanými na membráně endoplasmatického retikula a kotranslačně integrovány do membrány [20] [21]. Obsahují tři konzervované sekvenční motivy na svém N-konci: sekvenci signální kotvy, bazickou sekvenci a sekvenci bohatou na prolin. Právě sekvence s mnoha prolinovými zbytky plní nezbytnou úlohu při správném skládání proteinu [22]. Další hydrofobní segmenty na N-konci figurují jako místo pro navázání ribonukleoproteinů SRP (z anglického „signal recognition particles“). Přes SRP je poté docíleno specifické integrace CYP do membrány endoplasmatického retikula. Zároveň tyto terminální sekvence plní funkci membránové kotvy I. typu, čímž je dosaženo cílené orientace části CYP, včetně hemové skupiny a katalytického centra na cytoplasmatické části membrány [23] [24] [25].

Mitochondriální CYP jsou syntetizovány jako velké proteinové prekurzory obsahující sekvenci na svém N-konci, která nese informaci pro import do matrix mitochondrií. Podobný mechanismus pozorujeme i u jiných mitochondriálních proteinů [26] [27] [28]. V matrix je následně sekvence pomocí mitochondriální peptidasy odštěpena za vzniku funkčního enzymu

CYP. Mitochondriální CYP jsou tedy na rozdíl od mikrosomálních skládány post-translačně [29] [30].

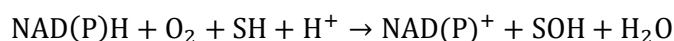
Všechny cytochromy P450 sdílejí společné strukturní rámce. Ty obsahují na C-konci relativně bohaté zastoupení sekundárních struktur  $\alpha$ -helixů a na N-konci pak relativně bohaté zastoupení  $\beta$  skládaných listů. Výrazně konzervovaný motiv se sekvencí (G/A)GX(D/E)T je situován v rámci helixu I (viz. Obrázek 2) v centrální části proteinu. Poslední Thr252 této sekvence se účastní formace místa v proteinu pro navázání atomu kyslíku. V helixu K pak nacházíme absolutně esenciální konzervované sekvence, jejichž jakákoliv mutace vede k úplné ztrátě funkce enzymu. Mezi helixem K a helixem L sdílejí všechny CYP společnou sekvenci FXXGXXXCXG. Tato dekaeptidová smyčka vytváří motiv pro vazbu hemu. Konkrétně cystein je absolutně esenciální, jelikož zde figuruje jako pátý ligand koordinující prostetickou skupinu hemu. Samotný hem je pak vnořen do jádra proteinu, kde je stereospecificky orientován a obklopen helixy I a L [31] [19].



**Obrázek 2** Vyobrazení cytochromu P450cam. Válce zde figurují jako  $\alpha$ -helixy, šipky pak reprezentují  $\beta$  skládané listy. Obrázek rovněž obsahuje číselné označení aminokyselinových zbytků v rámci dané sekundární struktury. Převzato z [31].

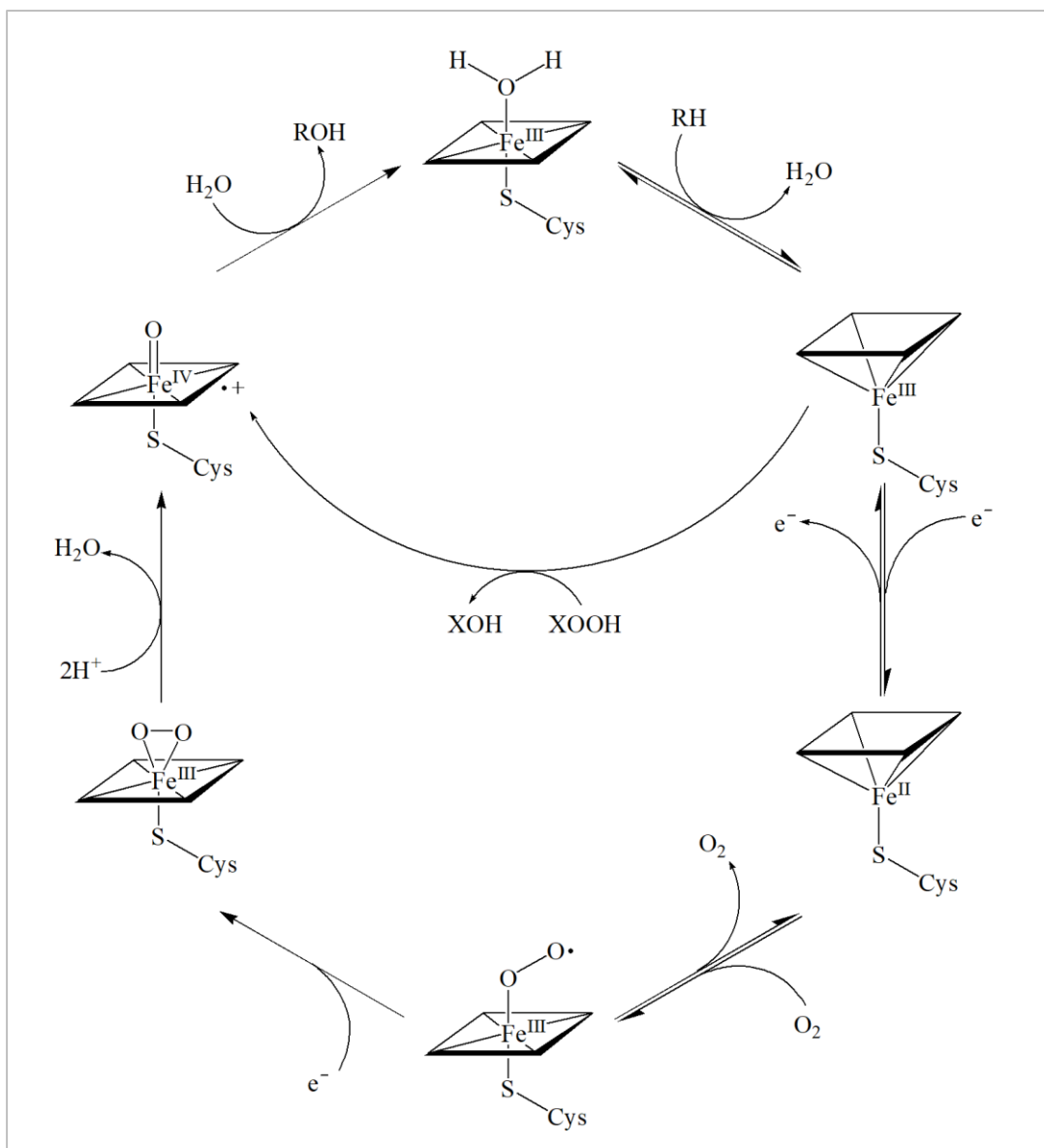
Hemová prostetická skupina je silný chromofor ovlivnitelný různými faktory jako např. oxidačním stavem hemového železa nebo vazbou specifických ligandů. Fundamentálním principem determinujícím spektroskopické vlastnosti hemoproteinu je však spinový stav atomu železa. Ten totiž indikuje, jestli je atom železa koordinován na axiální ligand. Nízko-spinový stav značí, že atom železa je hexakoordinován, zatímco vysokospinový stav železa nastává po odstranění distálního ligandu, čímž se atom dostane do pentakoordinovaného stavu. Při vazbě CO na redukovaný hemoprotein dochází k posunu spinového stavu, což lze spektroskopicky detekovat. Absorpční maximum CO vázaného hemoproteinu je pak determinováno ligandem koordinovaným na atomu železa oproti skupině CO. V případě myoglobinu a mnoha dalších hemoproteinů je tímto ligandem atom dusíku z imidazolového kruhu histidylového zbytku. Absorpční maximum takového železnatého hemu vázaného s oxidem uhelnatým se pak pohybuje kolem hodnoty 420 nm. V případě cytochromů P450 redukovaných oxidem uhelnatým však absorpční maximum nabývá unikátní hodnoty v rozmezí 447 až 452 nm. To je důsledkem přítomnosti neobvyklého axiálního ligandu – deprotonovaného atomu síry z aminokyselinového zbytku cysteinu [32] [33].

Při běžné hydroxylaci katalyzované cytochromem P450 dochází k rozdělení molekulárního kyslíku. Jeden z atomů kyslíku je pak inkorporován do cílové molekuly substrátu a druhý atom je uvolněn jako součást molekuly vody (viz. Obrázek 3). Stechiometrii CYP katalyzované hydroxylační reakce pak lze vyjádřit následující chemickou rovnicí:



Všechny CYP pro svou funkci vyžadují pomocný enzym, který poskytne dva redukční ekvivalenty z elektronového donoru. Tímto pomocným enzymem mohou být různé oxidoreduktasy, jejichž kompatibilita je dána typem cytochromu P450, který se reakce účastní. NADPH a NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasa je elektronový donor a pomocný enzym preferovaný v reakcích mikrosomálních CYP. Cytochrom b<sub>5</sub> může s těmito enzymy synergisticky interagovat za zvýšení efektivity katalýzy [34].

Cytochrom P450 na sebe během jednoho katalytického cyklu naváže substrát a molekulu kyslíku, přijme dva elektrony a dva protony, rozdělí biatomární molekulu kyslíku, naváže jeden atom kyslíku na substrát, a nakonec uvolní molekulu vody a zreagovaný substrát jako reakční produkty. Během tohoto procesu komplex substrát-CYP na sebe váže a reaguje s molekulárním kyslíkem za produkce železnatého komplexu. Vazba mezi dvěma atomy kyslíku je po přijetí dvou protonů přerušena a molekula vody opouští katalytické centrum, čím vzniká katalyticky reaktivní intermediát železa v oxidačním stavu IV. V posledním kroku katalýzy je atom kyslíku navázán na substrát, který posléze opouští katalytické centrum [35] [19].



**Obrázek 3** Katalytický cyklus hydroxylace cytochromu P450. Během navázání substrátu je atom železa v hemu posunut do vyššího spinového stavu, který je spektroskopicky detekovatelný. Vazba substrátu je doprovázena zvýšením redoxního potenciálu, který umožní redukcí atomu železa za tvorby pentakoordinovaného železnatého komplexu. Vazba molekulárního kyslíku na tento komplex pak vede k vzniku nízkospinového hexakoordinovaného komplexu. V přítomnosti oxidačních činidel může dojít k alternativnímu mechanismu, během kterého pentakoordinovaný železnatý komplex tvoří přímo reaktivní intermediát železa v oxidačním stavu IV [19].

Indukce CYP probíhá ve většině případů přes *de novo* syntézu RNA a proteinů, což bylo demonstrováno ve studiích s transkripčními a translačními inhibitory [36]. Indukce mnohých CYP probíhá přes principiálně příbuzný mechanismus, kde ligandem aktivovaný receptor transkripčního faktoru vede ke zvýšené transkripci příslušného CYP. Mezi tyto receptory řadíme zejména pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), arylový uhlovodíkový receptor (AhR) a další [37].

PXR patří do rodiny nukleárních receptorů. Jeho struktura obsahuje DNA vázající doménu a ligand vázající doménu (LBD). PXR je nejvíc příbuzný vitamín D receptoru (VDR) jež se rovněž váže na DNA ve formě heterodimeru s retinoid X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) [37]. Velikost LBD je oproti jiným receptorům výrazně větší, což umožňuje PXR rozeznávat širokou škálu cizorodých látek [38]. Mezi obratlovci je výrazná sekvenční diverzita LBD, což komplikuje použití *in silico* a zvířecích modelů pro predikci lidského PXR ve farmakologii. Paradoxně je však variace genu pro PXR mezi lidskými jednotlivci méně výrazná – jen velmi málo genetických variací PXR způsobuje fenotypické variace jaterního nebo intestinálního metabolismu CYP3A4. Právě tento paradox figuruje jako argument v teorii, že evoluce PXR byla víc ovlivněna selekčním tlakem detoxikace látek endogenních (např. žlučových solí), nežli exogenních (např. polutantů v prostředí) [39].

CAR aktivovaný xenobiotiky se podílí nejen na regulaci CYP ale i enzymů druhé fáze biotransformace jako například uridin difosfo-glukuronosyltransferas (UDPGT), glutathion-S-transferas (GST) a sulfottransferas (SULT) [40]. Podobně jak PXR, i CAR se na DNA váže ve formě heterodimeru s RXR $\alpha$  [41]. Chronické vystavení fenobarbitalu, který je rozeznáván CAR, bylo spojeno s vývojem jaterních tumorů v myších modelech [42].

V přítomnosti ligandu vytváří AhR heterodimer s AhR nukleárním translokátorem (Arnt). Tento dimer rozeznává na DNA xenobiotické responzivní elementy TNGCGTG v zóně proximálního a distálního promotoru *CYP1A* genu [43] [44]. Mezi ligandy jež AhR váže patří například léčivo gastroezofageálního refluxu omeprazol nebo benzo[*a*]pyren a  $\beta$ -naftoflavon [45] [46].

### 1.3.1 Rodina CYP1

Tato rodina obsahuje tři zástupce mikrosomálních cytochromů P450: CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. První dva zástupci, CYP1A1 a CYP1A2, vykazují více než 70% podobnost aminokyselinové sekvence, ale zároveň vykazují v různých tkáních odlišné míry exprese. CYP1A1 je primárně exprimován v extrahepatálních tkáních jako jsou plíce, lymfocyty nebo placenta. V jaterních tkáních je jeho exprese jen na velmi nízké úrovni. Naopak CYP1A2 je primárně exprimován v játrech a v extrahepatálních tkáních je jeho exprese výrazně omezena [47] [19].

CYP1A1 a CYP1A2 jsou inducibilní enzymy odpovědné za metabolismus různých xenobiotik, mezi jinými i za hydroxylaci polycyklických aromatických uhlovodíků, jejichž typickým představitelem je například benzo[*a*]pyrén [48]. Tyto CYP katalyzují N-oxidaci karcinogenních aromatických a heterocyklických aminů, jež jsou součástí cigaretového kouře a zuhelnatělých částí pokrmů. Takové metabolity mají potenciál pro vznik DNA aduktů.



Polymorfismy CYP1A genů s vlivem na jejich transkripční aktivitu proto mohou sloužit jako markery predispozice jedinců pro vznik různých druhů kolorektálních karcinomů nebo rakoviny plic a prostaty [49] [47].

Lokus lidských *CYP1A1* a *CYP1A2* se nachází na chromozomu 15q24.1. Oba geny jsou orientovány proti sobě sdílejíc oblast na svém 5' konci. Tato oblast o délce 23,3 kb figuruje jako obousměrný společný promotor pro oba geny, jež obsahuje vysoké zastoupení xenobiotických responsivních elementů (XRE) [50]. Gen *CYP1A2* vznikl s vysokou pravděpodobností genovou duplikací ze staršího genu *CYP1A1* a je zároveň mladší než gen *CYP1B1*, který vznikl před víc než 420 miliony let. Toto datum je odhadováno z období evoluční divergence živočichů žijících v mořském prostředí a na souši. Zároveň, genomy rybích živočichů obsahují jen geny *CYP1A1* a *CYP1B1*, ale nikoliv gen *CYP1A2* [51].

Funkce AhR jež rozeznává XRE v promotorové oblasti je pro biologický význam podrodiny CYP1A1 nevyhnutelná. V buněčných liniích je totiž naměřené množství mRNA CYP1A1 s výrazně sníženou hladinou AhR (5–10 % oproti kontrolní buněčné linii) v podstatě zanedbatelné [52].

### 1.3.2 Rodina CYP2

U obratlovců je rodina CYP2 obsahující 29 podrodin jedna z největších, nejrozmanitějších a s nejméně konzervovanými nukleotidovými sekvencemi [53] [54]. Typicky mají tyto geny devět exonů a přibližně 1500 párů bází [55]. Mezi lidské isoformy podílející se v nejvýraznější míře na metabolismu cizorodých látek řadíme CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1 [56].

Podrodina *CYP2A* je u lidí primárně exprimovaná v játrech. Isoforma CYP2A6 se podílí na bioaktivaci několika karcinogenních látek, jako například aflatoxinu B1 nebo *N*-nitrosodiethylaminu [47]. *CYP2A6* je inducibilní v primárních kulturách lidských hepatocytů dexamethasonem, fenobarbitalem a rifampicinem [57] [58].

Podrodina *CYP2B* je ve všeobecnosti charakterizována svou inducibilitou fenobarbitalem, zprostředkovanou nukleárními receptory CAR a PXR [59] [60]. *CYP2B1* a *CYP2B2* jsou hlavní zástupci exprimováni u potkanů, v lidských játrech je pak minoritním zástupcem *CYP2B6* [61]. Mezi cizorodé látky, na jejichž metabolismu se CYP2B podílí, patří mimo jiné amfetaminy [62].

*CYP2C* podrodina sestává u lidí ze čtyř vysoce homologních genů: *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* a *CYP2C19*. V lidských játrech tvoří enzymy CYP2C 17–20 % všech jaterních CYP, z nichž hlavním zástupcem je CYP2C9 následován CYP2C8 a CYP2C19 [63]. V primárních

kulturách lidských hepatocytů je transkripce genů *CYP2C8* a *CYP2C9* navýšena v přítomnosti dexamethasonu, rifampicinu a fenobarbitalu [64] [65].

Podrodina *CYP2D* má v lidském genomu jeden lokus s jedním funkčním genem kódujícím isoformu *CYP2D6* [66]. *CYP2D6* tvoří v lidských játrech přibližně 2 % všech CYP. Mezi cizorodé látky, jež metabolizuje, patří například dextromethorphan nebo kodein [5].

Podrodina *CYP2E* obsahuje u většiny organismů jediného zástupce [66]. U lidí je to isoforma *CYP2E1*, která je inducibilní ethanolom nebo acetonem a podílí se na bioaktivaci různých prokarcinogenů, například acetaminofenu nebo alkoholů [67].

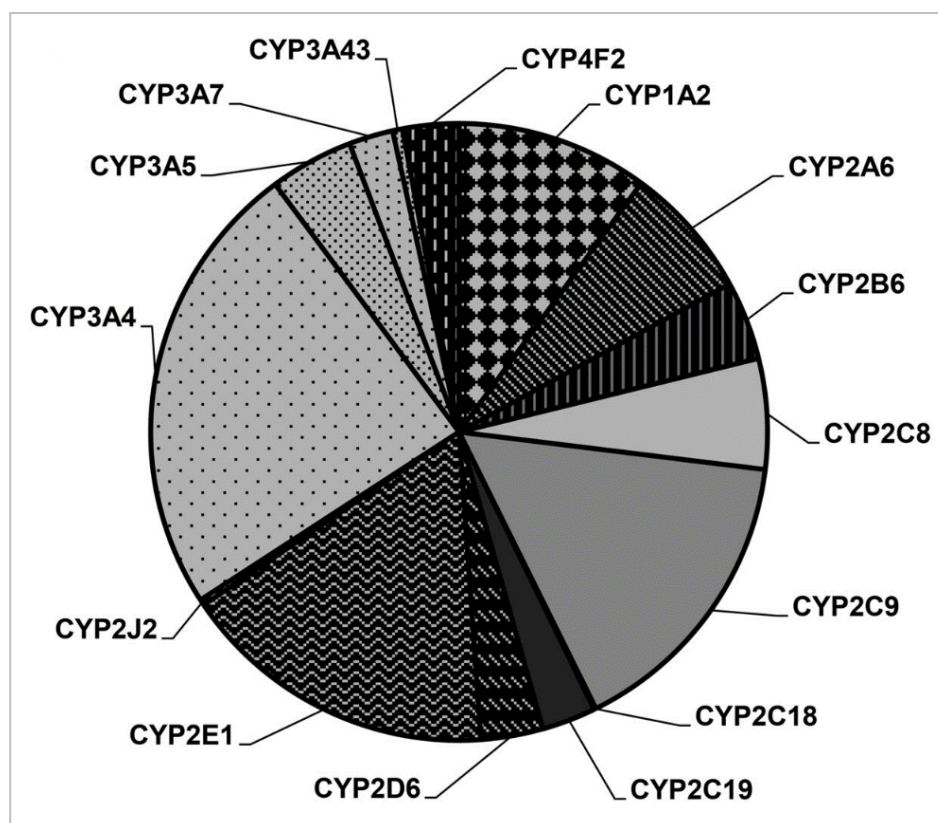
### 1.3.3 Rodina CYP3

Rodina CYP3 se u lidí skládá z jediné podrodiny CYP3A. Tato podrodina obsahuje čtyři funkční geny *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* a *CYP3A43*, jež jsou v lidském genomu lokalizovány na chromozomu 7q22 v oblasti o délce 220 kb [68]. *CYP3A4* je nejvíc exprimována v játrech (viz. Obrázek 4) a v menší míře v tenkém střevě. *CYP3A5* se vyskytuje v extrahepatálních tkáních plic, tlustého střeva, ledvin a hypofýze [69] [70]. Isoforma *CYP3A7* tvoří více než 36 % všech fetálních jaterních CYP, zatímco u dospělého jedince méně než 5 % [71].

*CYP3A4* je u lidí nejvýznamnějším zástupcem cytochromů P450 metabolizujících xenobiotika. Až 60 % všech jaterních CYP je zastoupeno právě touto isoformou. Pozici nejvíc zastoupeného CYP má rovněž i v lidském střevě. *CYP3A4* metabolizuje širokou škálu farmakologicky aktivních látek, mezi nejvýznamnějšími pak nifedipin, makrolidické antibiotikum erytromycin, benzodiazepinové sedativa jako diazepam a midazolam, modulátor imunitního systému cyklosporin nebo antihistaminika astemizol a terfenadin [72] [73].

Dominantní postavení isoformy *CYP3A4* však v lidském organismu není univerzální. Existují významné variability uvnitř populace v rámci exprese *CYP3A5* [74]. Tato variace je způsobená zejména jedno-nukleotidovou substitucí na intronu 3 genu *CYP3A5*, jejíž přímým důsledkem je nesprávný průběh „splicingu“ mRNA a následně translace nefunkčního proteinu *CYP3A5*. Výskyt této alely *CYP3A5\*3* je nejvýraznější v bělošské části populace (více než 95 %) oproti populaci černošské. Různý poměr isoform *CYP3A4* a *CYP3A5* tak může vést k individuálně rozdílným reakcím na to samé xenobiotikum [75] [76].

Regulace indukce *CYP3A4* probíhá v organismu přes PXR a CAR receptory. Mezi prokázané induktory *CYP3A4* řadíme rifampicin a barbituráty [77] [78].



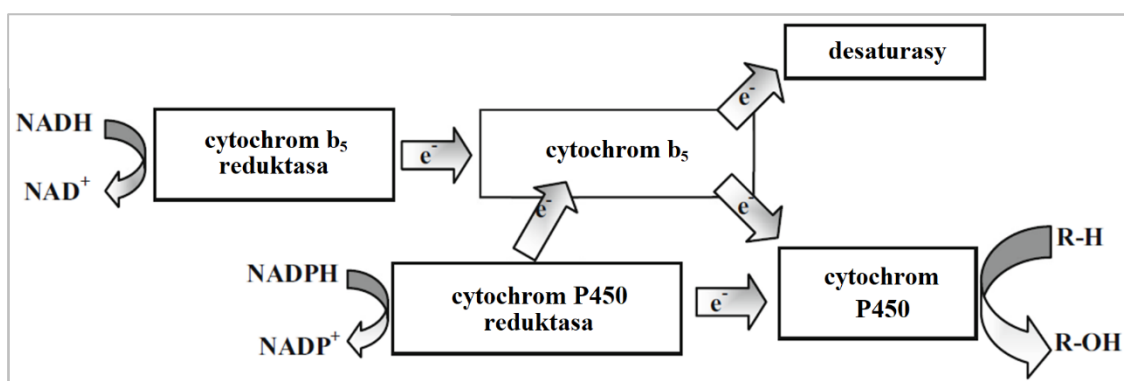
**Obrázek 4** Koláčový diagram vyjadřující poměr v expresi jednotlivých isoform CYP v lidských játrech. Převzato z [79].

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

Cytochrom b<sub>5</sub> (CYB5) je hemový protein schopný přijetí a odevzdání jednoho elektronu [80]. Figuruje v různých biochemických procesech, jako jsou biosyntéza cholesterolu či metabolismus mastných kyselin. Může se účastnit i hydroxylačních reakcí cytochromů P450 [81] [82]. Mikrosomální cytochrom b<sub>5</sub> je integrální membránový protein endoplasmatického retikula lokalizovaný na vnější straně tohoto buněčného kompartmentu [83]. Jeho struktura se skládá ze dvou domén, většího rozpustného hem vázajícího jádra na N-konci a menšího hydrofobního ocásku na C-konci, jež ukotvuje protein do membrány. Flexibilní část řetězce o délce 15 aminokyselin tyto dvě domény spojuje, a tím umožňuje doméně s hemem dostatečnou mobilitu pro vazbu různých redoxních partnerů, zatímco protein zůstává vnořen v membráně [84].

Cytochrom b<sub>5</sub> může přijmout elektron od NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy (CYB5R) nebo od NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CYPOR) [85] [86]. Redukovaný cytochrom b<sub>5</sub> poté poskytuje elektron cytochromům P450 nebo jiným enzymům (viz. Obrázek 5). CYB5 tak vykazuje schopnost stimulovat a inhibovat některé reakce katalyzované CYP [87] [88]. Poskytnutí elektronu z redukovaného CYB5 na CYP je kineticky rychlejší krok než přesun elektronů z CYPOR [89]. Zároveň je jedním z navrhovaných mechanismů funkce cytochromu b<sub>5</sub>

vznik komplexu CYB5 s CYP, který může přijmout dva elektrony z CYPOR v jednom kroku – jeden elektron při redukci CYB5 a druhý elektron při redukci samotného CYP. Tento jednokrokový přesun elektronů by měl za následek celkově rychlejší průběh reakce, jelikož CYP bez přítomnosti CYB5 musí pro dokončení jednoho katalytického cyklu projít dvěma separátními interakcemi s CYPOR [90]. Rovněž byla prokázána schopnost CYB5 poskytnout CYP oba elektrony pocházející z CYB5R, tedy nezávisle na CYPOR [91].



**Obrázek 5** Přesun elektronů mezi jednotlivými komponenty systému oxidas. Převzato z [82].

Interakce cytochromu  $b_5$  s CYP by mohla rovněž indukovat konformační změny proteinu CYP vedoucí k uvolnění produktů z komplexu hemoproteinu. Tato hypotéza byla postulována při studiích, ve kterých byly pozorovány stimulační efekty holoproteinu cytochromu  $b_5$  v apo-formě, tedy proteinu zbaveného hemu, a tudíž neschopného přesunu elektronu [92].

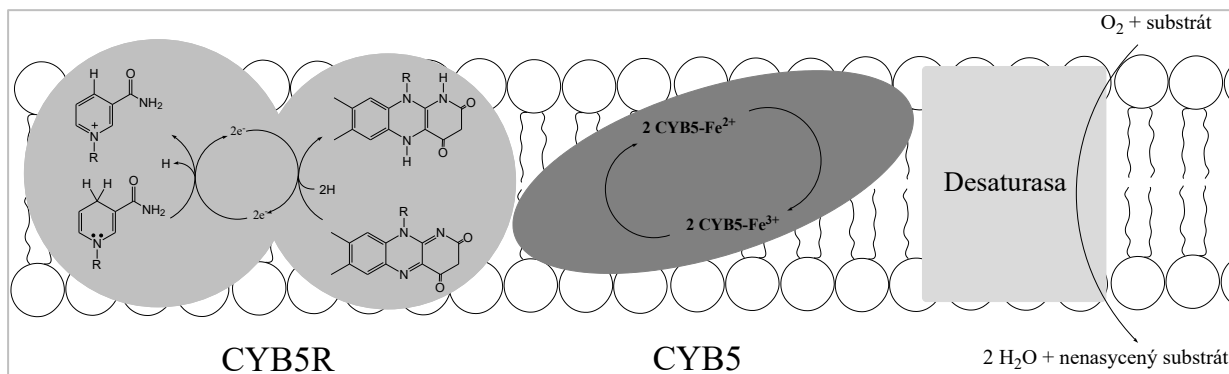
## 1.5 Cytochrom $b_5$ reductasa

Cytochrom  $b_5$  reductasa (EC 1.6.2.2) je flavoproteinový enzym z třídy oxidoreduktas. CYB5R katalyzuje redukci cytochromu  $b_5$  přes svou FAD doménu pomocí elektronu z NADH [93]. Vyskytuje se ve dvou isoformách – mikrosomální amfipatické formě vázané v membráně a solubilní cytoplasmatické formě. Obě varianty jsou kódovány stejným genem ale produktem alternativního splicingu [94]. Cytochrom  $b_5$  reductasa je enzym vyskytující se u většiny eukaryotických organismů, včetně savců, rostlin, ptáků a hmyzu [95].

Mikrosomální forma vázaná v membráně se společně s CYB5 účastní detoxikace a bioaktivace různých xenobiotik, anabolismu cholesterolu nebo prodlužování a desaturace mastných kyselin [96] [97]. Naopak solubilní varianta, vyskytující se hlavně v savcích erythrocytech, plní svou úlohu při redukci methemoglobinu na hemoglobin [98].

Mezi lidskými CYB5R a CYB5 vzniká komplex stabilizovaný elektrostatickými interakcemi lisylových zbytků K42, K126, K163 a K164 v CYB5R a karboxylových zbytků E47, E48, E52, E60 a D64 v CYB5 [99]. Sekvence transferu elektronů v rámci CYB5R/CYB5

komplexu je následující:  $\text{NADH} \rightarrow \text{CYB5R} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow$  redukce dvou CYB5  $\rightarrow$  přesun elektronu na desaturasu, CYP nebo methemoglobin (viz. Obrázek 6). Redukce flavinu je v této řetězové reakci rychlost určující krok [100].



**Obrázek 6** Schématický diagram přesunu elektronů v rámci komplexu CYB5R/CYB5. Isoalloxazinový kruh FAD přijímá dva elektrony z NADH. Konformační změna ve flavinové části enzymu je poté ideální k přístupu hemové skupiny v cytochromu  $b_5$  a jeho následné redukci železitého iontu na iont železnatý. Převzato z [93].

Motiv NADH domény 181GXGXXP186 vytváří plochý povrch polypeptidové kostry, ve které je molekula NADH stabilizována ve správné orientaci [101]. NADH je pro CYB5R preferovaný elektronový donor. Mutace v místě D239T tuto preferenci změnil pro NADPH. Jako důvod pro tuto změnu preference je postulována ztráta záporně nabitého elektrostatického povrchu proteinu [102]. Motiv 92RXY(T/S)XX(S/N)98 pro vazbu flavinů a motiv 125(G/R)XX(S/T)128 pro FAD/FMN selektivitu jsou výrazně konzervované mezi všemi členy rodiny flavoproteinů. Byl prokázán jejich strukturální význam pro interakci flavinového kofaktoru a transferu elektronu v CYB5R [103] [104].

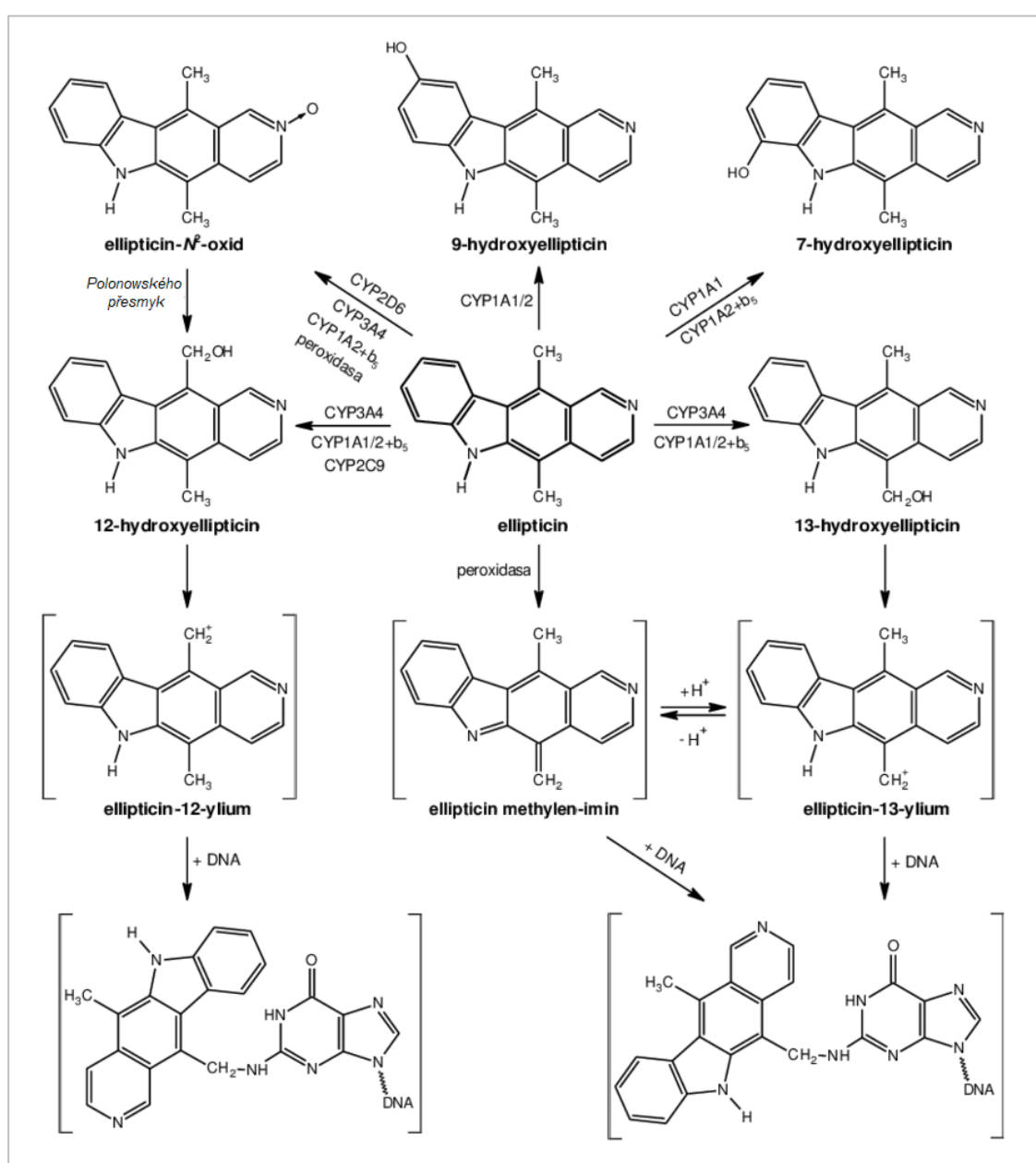
## 1.6 Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol) je alkaloid vyskytující se v rostlinách rodu *Apocyanaceae* a vykazující výrazné protinádorové účinky [105]. Ellipticin a jeho více rozpustné deriváty jako 9-hydroxyellipticin, 2N-methyl-9-hydroxyellipticinium, 2N-methyl-9-chloroellipticinium a 2N-methyl-9-methoxyellipticinium vykazují výsledky při léčbě kostních metastáz rakoviny prsu, sarkomu ledvin, nádorů mozku a myeloblastické leukémie [106] [107]. Hlavním důvodem proč ellipticin a jeho deriváty nabývají výrazný klinický význam je jeho vysoká účinnost proti několika typům rakoviny, relativně nízké toxické vedlejší účinky a žádná hematologická toxicita [108].

CYP metabolizují ellipticin za vzniku pěti produktů – 9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu, 7-hydroxyellipticinu a ellipticin  $N^2$ -oxidu. Isoformy z podrodiny CYP1A produkují převážně metabolity 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin,

které figurují jako detoxikační produkty. Naopak lidský CYP3A4 oxiduje ellipticin na produkty 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin. Tyto reaktivní metabolity disociují za tvorby ellipticin-13-ylum a ellipticin-12-ylum, které jsou schopny vazby na DNA (viz. Obrázek 7) [109] [110] [111]. Poměry metabolitů tvořených CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4 jsou v rekonstituovaných systémech s cytochromem  $b_5$  pozměněny.

Produkce detoxikačních metabolitů 9-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu v přítomnosti CYB5 vykazovala sníženou hladinu nebo žádnou změnu. Naopak množství 12-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu a ellipticin  $N^2$ -oxidu jsou v přítomnosti CYB5 výrazně navýšené, čehož důsledkem je zvýšená tvorba kovalentních aduktů s DNA [113] [114].

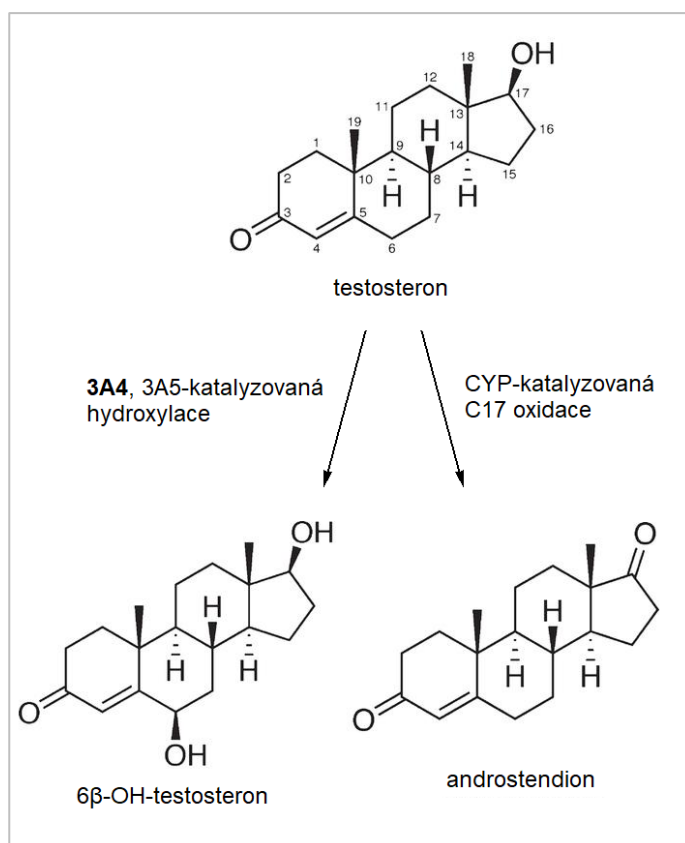


**Obrázek 7** Metabolity ellipticinu tvořené za katalýzy příslušnými CYP. Převzato z [112].

## 1.7 Testosteron

Testosteron je hlavní steroidní hormon primárně sekretovaný ve varlatech mužů a vaječnicích žen, zastupující klíčovou roli v lidském zdraví [113]. Testosteron podléhá monohydroxylacím různými isoformami CYP [114]. V jaterních a střevních mikrosomech potkanů je TST metabolizován isoformou CYP1A1 na 6 $\alpha$ -hydroxytestosteron [115], CYP2A1 na 7 $\alpha$ -hydroxytestosteron [116], CYP3A2 na 6 $\beta$ -hydroxytestosteron [117] a CYP2C11 na 16 $\alpha$ -hydroxytestosteron a 2 $\alpha$ -hydroxytestosteron [118].

Lidská isoforma CYP3A4 v přítomnosti NADPH:CYP reductasy v Supersomech™ metabolizuje TST za vzniku 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu. Účinnost CYP3A4 je při této reakci v přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> ještě výrazně umocněna [119].



**Obrázek 8** Hlavní biotransformační produkt testosteronu 6 $\beta$ -hydroxytestosteron je v lidských játrech tvořen v největším množství isoformou CYP3A4. Tvorba androstendionu a jiných hydroxylačních produktů je katalyzována různými enzymy CYP, obecně ale ve výrazně menší míře než hlavní produkt 6 $\beta$ -hydroxytestosteron. Převzato a upraveno z [120].

CYP se mimo biotransformačních reakcí podílejí i na samotné biosyntéze testosteronu v lidském organismu. Ta vychází z cholesterolu, jež je v mitochondriích Leydigových buněk oxidačně rozštěpen na pregnenolon [121]. Tato reakce je katalyzována CYP11A1, lokalizovaném na vnitřní straně mitochondriální membrány směrem do matrix [122]. V následujícím kroku

dochází opět k oxidačnímu štěpení vazby na uhlíku C17 za vzniku androstenolonu. Reakce je katalyzována CYP17A1 na povrchu endoplasmatického retikula a probíhá ve dvou dílčích krocích. Na C17 dochází v prvním kroku k hydroxylaci, jež je následována rozštěpením vazby mezi uhlíky C17 a C20 lyasovou aktivitou enzymu [123]. Právě tato lyasová aktivita CYP17A1 je regulována cytochromem  $b_5$  [124]. Ve finální části biosyntézy TST dochází k redukci vzniklé oxo skupiny na C17 a oxidaci hydroxy skupiny na C3 za vzniku testosteronu. Tyto dvě reakce již nejsou katalyzovány enzymy CYP [125].

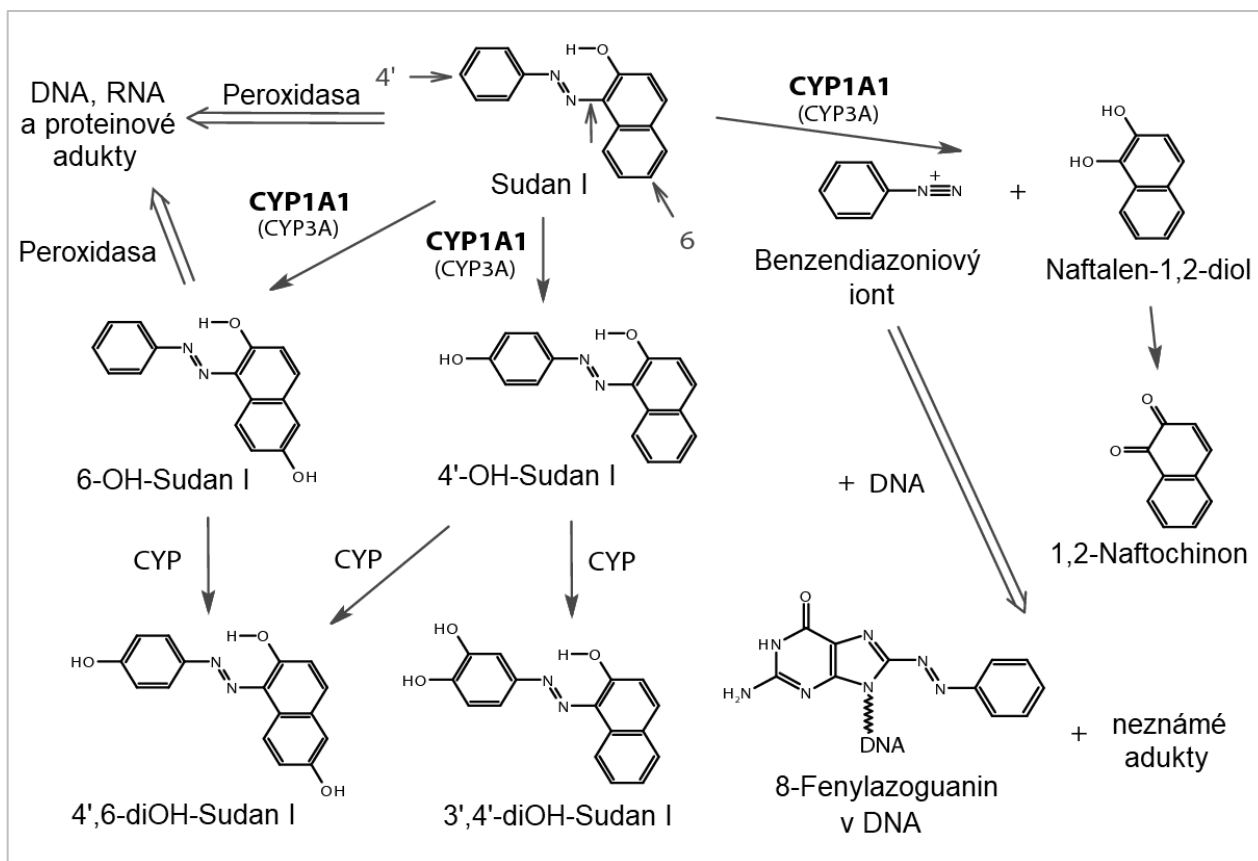
## 1.8 Sudan I

Sudan I je důležitým zástupcem sudanových barviv, které se využívali při barvení textilních výrobků nebo potravin. Součástí jeho chemické struktury je funkční skupina  $-N=N-$ , která ho řadí do skupiny azosloučenin [126].

CYP1A1 a CYP3A králíků a potkanů katalyzují C-hydroxylaci Sudanu I za vzniku 1-[(4'-hydroxyfenyl)azo]-2-naftol. Hydroxylací v poloze 6 vzniká 1-(fenylazo)naftalen-2,6-diol a další hydroxylací pak 4',6-diOH-Sudan I (viz. Obrázek 9). U potkanů byl detekován minoritní metabolit 3,4'-diOH-Sudan I jako produkt oxidace jaterními mikrosomy. Působením CYP1A1 a CYP3A dochází k toxické aktivaci oxidačním štěpením azoskupiny Sudanu I. Produktem takové reakce je benzediazoniový iont, vytvářející 8-(fenylazo)guaninový adukt s DNA [126] [127].

Lidský rekombinantní CYP3A4 katalyzuje rovněž vznik produktů 4'-OH-Sudan I, 6-OH-Sudan I a 4',6-di(OH)-Sudan I. Množství těchto produktů je stimulováno cytochromem  $b_5$  – čtyřnásobný nárůst oproti systému bez tohoto enzymu. Také apo-forma cytochromu  $b_5$ , tedy enzymu neobsahujícího hem, vede k stimulaci tvorby metabolitů, ale tato stimulace je nižší než v případě nativního CYB5. [92].





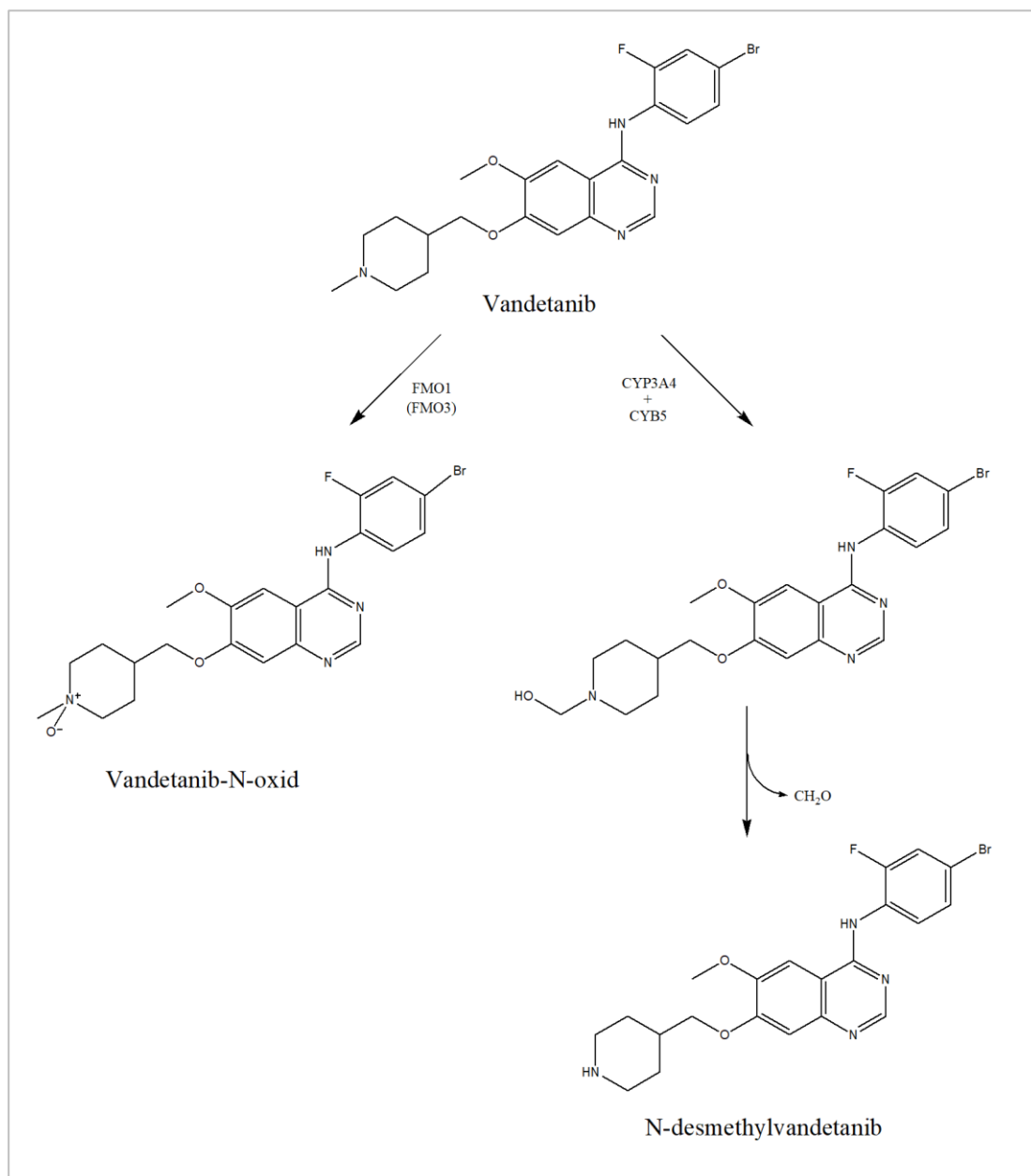
Obrázek 9 Schéma metabolismu Sudanu I. Převzato z [126].

## 1.9 Vandetanib

Vandetanib je chemoterapeutikum řazené do skupiny inhibitorů tyrosinkinasy, využívané na léčbu karcinomů štítné žlázy [128]. Inhibicí receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor 2 (VEGFR-2), receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) a RET tyrosin kinasy je schopen snížit růst tumorů a metastáz u lidí, jelikož se jedná o proteiny sehrávajících roli v signálních dráhách podporujících angiogenezi a růst nádorů [129] [130] [131] [132].

Hlavní metabolity vandetanibu u lidí i experimentálních zvířat jsou N-desmethylvandetanib a vandetanib-N-oxid (viz. Obrázek 10) [133]. Enzymy podílející se na metabolismu vandetanibu jsou cytochromy P450 a flavin monooxygenasy (FMO) [134]. Jako minoritní metabolit byl u lidí detekován konjugát O-desmethylvandetanib glukuronid [135].

Z lidských CYP vykazuje nejvyšší aktivitu biotransformace vandetanibu na N-desmethylvandetanib isoforma CYP3A4 zodpovědná za tvorbu až 97,7 % tohoto metabolitu v játrech a v menší míře pak isoformy CYP2D6, CYP1A1, CYP2C8 a CYP3A5. V přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> se aktivita isoformy CYP3A4 v biotransformaci vandetanibu oproti ostatním isoformám ještě zvýší na úroveň 99,6 % [136].



**Obrázek 10** Oxidace vandetanibu enzymy CYP a FMO v přítomnosti CYB5. Převzato a upraveno z [136].

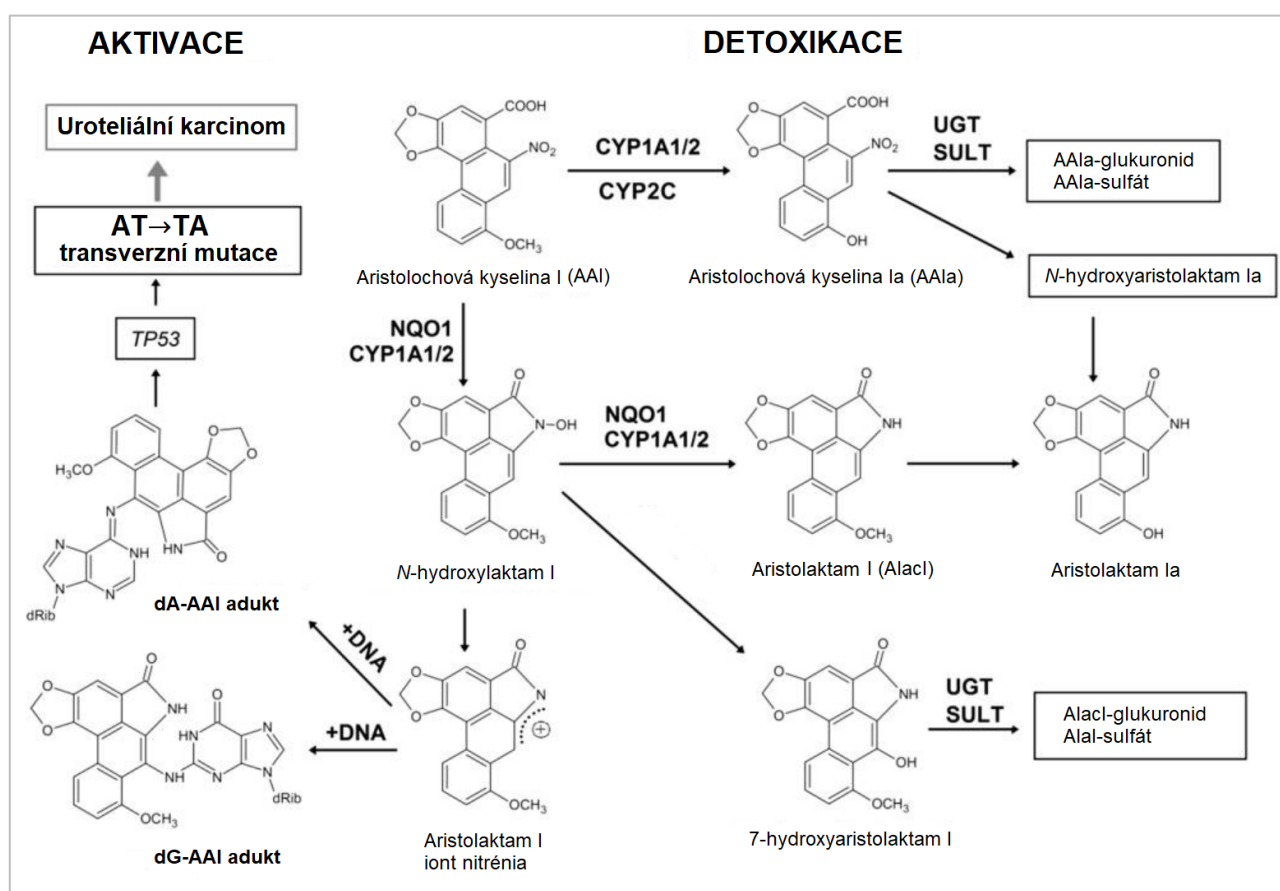
## 1.10 Aristolochová kyselina I

Aristolochová kyselina I je složkou směsi nitrofenanthrenových karboxylových kyselin, která je obsažena v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*) [137]. Pro své protizánětlivé účinky byly tyto rostliny od starověku používány v lidovém léčitelství na asijském kontinentě [138]. AAI je prokazatelným lidským karcinogenem a vykazuje silné nefrotoxické vlastnosti [139] [140] [141].

Cílovou chemickou skupinou aktivačních reakcí na AAI je nitroskupina, jež je redukována za vzniku N-hydroxyaristolaktamu (viz. Obrázek 11) [142]. Aristolaktamy jsou obecně hlavními metabolity aristolochových kyselin během redukční aktivity i oxidační

detoxikace. N-hydroxyaristolaktam je poté aktivován na vysoce reaktivní N-acylnitreniový kationt, jež tvoří adukty zejména s purinovými bázemi DNA [143] [144].

Enzymy, které se podílejí na aktivační biotransformaci AAI jsou NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa a cytochromy P450 [145] [146]. V lidském organismu vykazují nejvyšší efektivitu v redukci AAI isoformy CYP1A1 a CYP1A2 [147] [148]. Naopak demethylace AAI za vzniku 8-hydroxyaristolochové kyseliny I (AAIa) figuruje jako detoxikační reakce. Výrazně méně toxická AAIa je v porovnání s AAI efektivněji exkretována močí [149] [150].



Obrázek 11 Aktivační a detoxikační dráhy aristolochové kyseliny I. Převzato z [151].

## 2 CÍL PRÁCE

---

Úkolem této diplomové práce je studium vlivu cytochromu  $b_5$  a cytochrom  $b_5$  reductasy na aktivitu cytochromů P450, přičemž bylo naším cílem zjistit, zda tyto dva enzymy mohou sloužit jako primární zdroje elektronů pro cytochromy P450. V rámci předkládané diplomové práce byla sledována aktivita lidských nebo potkaních isoformů cytochromů P450 z rodin CYP1, CYP2 a CYP3 *in vitro* v prostředí s cytochromem  $b_5$  a kofaktorem NADPH nebo NADH. Substráty pro toto studium byly Sudan I, aristolochová kyselina I, ellipticin, testosteron a vandetanib.

## 3 MATERIÁLY A METODY

---

### 3.1 Použité chemikálie

Cytochrom b<sub>5</sub> a jaterní mikrosomy byly izolovány v laboratořích katedry biochemie Univerzity Karlovy.

**J.T. Baker, USA**

methanol, acetonitril

**Sigma-Aldrich, USA**

NADPH, NADH, triethylaminacetát, aristolochová kyselina I, fenacetin, ellipticin, testosteron, 6β-hydroxytestosteron

**Lach-Ner, ČR**

dichlormethan, ethylacetát, kyselina octová, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaCl

**LC Laboratories, USA**

vandetanib

**Corning, USA**

Supersomy<sup>TM</sup>

**Cypex, Velká Británie**

Bactosomy<sup>TM</sup>

**British Drug Houses, Velká Británie**

Sudan I

### 3.2 Použité přístroje

**Analytické váhy**

40 SM-200 A Pesa, Švýcarsko

**Automatické pipety**

Eppendorf, Německo

Nichipet EX America, Japonsko

**Centrifugy**

Centrifuga EBA 270 Hettich, výkyvný rotor Hettich, Německo

Spectrafuge<sup>TM</sup>, Mini centrifuga Labnet, Japonsko

Inkubátory

Thermomixer Compact Eppendorf , Německo

Magnetické míchačky

KMO 2 Basic IKA, Německo

Předvážky

KERN EW 600-2M Kern & Sohn GmbH, Německo

System HPLC

AGILENT 1260 Infinity, USA

Thermo Scientific UltiMate 3000, USA

Termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

Předkolona: Nucleosil 100-5 C18

Kolona: Nucleosil 100-5 C18 - 250/4 Macherey-Nagel

Kolona: Hichrom Ultrasphere 5 ODS

Vakuová odparka

CentriVap Benchtop vakuum concentrator LABCONCO, USA

Vortex

Vortex 3 genius IKA, Německo

MS1 minishaker IKA, Německo

VX-200 Lab Vortexer LABNET, USA

### 3.3 Vliv CYB5 na oxidaci testosteronu

#### 3.3.1 Příprava inkubačních směsí

Pro stanovení enzymové aktivity CYP3A4 byla použita reakce přeměny testosteronu na 6 $\beta$ -hydroxytestosteron, která je specifickou reakcí právě tohoto enzymu [152]. Po inkubaci testosteronu s CYP v přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> a NADPH nebo NADH jako kofaktoru CYP a extrakci vytvořených metabolitů bylo analyzováno množství 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu pomocí HPLC. Rovněž byly připraveny a analyzovány kontrolní vzorky neobsahující CYB5 a NADPH resp. NADH.

Každá inkubační směs byla připravena ve třech paralelních vzorcích. Celkový objem každého inkubačního vzorku byl 250  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala:

1. fosfátový pufr (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4)
2. 100 nM CYP (v případě varianty s CYB5 i 500 nM CYB5)
3. 100  $\mu$ M testosteron (2,5  $\mu$ l 10 mM testosteronu v methanolu)
4. 1 mM NADPH resp. NADH (25  $\mu$ l 10 mM vodného roztoku NADPH resp. NADH)

Směs bez NADPH resp. NADH byla preinkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Reakce byla spuštěna pipetováním roztoku NADPH resp. NADH a probíhala v inkubátoru za přístupu vzduchu po dobu 15 minut při 37 °C a třepání při 450 RPM. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 100  $\mu$ l roztoku obsahujícího 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2 M NaCl. Následně bylo do roztoku přidáno 5  $\mu$ l 1mM fenacetinu, který sloužil jako vnitřní standard.

Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml dichlormethanu po dobu 2 minut při 1 400 RPM, vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace po dobu 5 minut při 14 500 RCF. Spodní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkuřavky a odpařena do sucha ve vakuové odparce při 37 °C.

#### 3.3.2 Stanovení 6 $\beta$ -OH-testosteronu pomocí HPLC

Metabolity testosteronu byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC za použití lineárního gradientu 0–100 % mobilní fáze B po dobu 35 minut. Mobilní fáze A byla tvořena 50% (v/v) methanolem, mobilní fáze B obsahovala 75% (v/v) methanol. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4 mm při teplotě 35 °C udržované termostatem. Konstantní průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,6 ml/min. Analyty byly rozpuštěny v 25  $\mu$ l methanolu a nástřik na kolonu činil 20  $\mu$ l. Pro analýzu byl použit HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series. Detektor byl nastaven na měření při čtyřech vlnových délkách: 220,

254, 280 a 313 nm. Testosteron a jeho metabolit 6 $\beta$ -hydroxytestosteron byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány vztahem jejich plochy k ploše vnitřního standardu (fenacetinu). Následné vyhodnocení bylo provedeno za použití kalibrační křivky s rozsahem 10 až 250  $\mu\text{mol/l}$  standardu 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu.

## 3.4 Vliv CYB5 na oxidaci Sudanu I

### 3.4.1 Příprava inkubačních směsí

Pro stanovení enzymové aktivity CYP1A1 byly použity rekombinantní lidské a potkaní CYP1A1. Po inkubaci Sudanu I s CYP v přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> a NADPH nebo NADH jako kofaktoru CYP a extrakci vytvořených metabolitů bylo analyzováno množství jednotlivých produktů reakce pomocí HPLC. Rovněž byly připraveny a analyzovány kontrolní vzorky neobsahující CYB5 a NADPH resp. NADH.

Každá inkubační směs byla připravena ve třech paralelních vzorcích. Celkový objem každého inkubačního vzorku byl 250  $\mu\text{l}$ . Reakční směs obsahovala:

1. fosfátový pufr (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4)
2. 100 nM CYP
3. 100  $\mu\text{M}$  Sudan I (5  $\mu\text{l}$  5 mM Sudan I)
4. 500 nM CYB5 (5  $\mu\text{l}$  39,8  $\mu\text{M}$  CYB5)
5. 1 mM NADPH resp. NADH (25  $\mu\text{l}$  10 mM vodního roztoku NADPH resp. NADH)

Směs bez NADPH resp. NADH byla preinkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Reakce byla spuštěna pipetováním roztoku NADPH resp. NADH a probíhala v inkubátoru za přítomnosti vzduchu po dobu 15 minut při 37 °C a třepání při 450 RPM. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 100  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujícího 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2 M NaCl.

Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátu po dobu 2 minut při 1 400 RPM, vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace po dobu 5 minut při 14 500 RCF. Vrchní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky a odpařena do sucha ve vakuové odparce při 37 °C.

### 3.4.2 Stanovení metabolitů Sudanu I pomocí HPLC

Metabolity Sudanu I byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC po dobu 10 minut. Mobilní fáze byla tvořena 75% (v/v) methanolem. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4 mm při teplotě 35 °C udržované termostatem. Konstantní průtoková



rychlost mobilní fáze byla 0,6 ml/min. Analyty byly rozpuštěny v 45 µl methanolu a nástřik na kolonu činil 40 µl. Pro analýzu byl použit HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series.

## 3.5 Vliv CYB5 na oxidaci AAI

### 3.5.1 Příprava inkubačních směsí

Pro stanovení enzymové aktivity byly použity jaterní mikrosomy z potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB), BaP nebo SudI. Po inkubaci AAI s mikrosomami a NADPH nebo NADH jako kofaktoru CYP a extrakci vytvořených metabolitů bylo analyzováno množství jednotlivých produktů reakce pomocí HPLC. Rovněž byly připraveny a analyzovány kontrolní vzorky neobsahující NADPH resp. NADH, případně AAI.

Každá inkubační směs byla připravena ve třech paralelních vzorcích. Celkový objem každého inkubačního vzorku byl 500 µl. Reakční směs obsahovala:

1. fosfátový pufr (0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4)
2. 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce
3. 10 µM AAI (5 µl 1 mM AAI v destilované vodě)
4. 1 mM NADPH resp. NADH (50 µl 10 mM vodního roztoku NADPH resp. NADH)

Směs bez NADPH resp. NADH byla preinkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Reakce byla spuštěna pipetováním roztoku NADPH resp. NADH a probíhala v inkubátoru za přítomnosti vzduchu po dobu 20 minut při 37 °C a třepání při 400 RPM. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu.

Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátu po dobu 2 minut při 1 400 RPM, vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace po dobu 3 minut při 14 500 RCF. Vrchní organická fáze byla odebrána do čisté mikroskopické vialky a odpařena do sucha ve vakuové odparce při 37 °C.

### 3.5.2 Stanovení metabolitů AAI pomocí HPLC

Metabolity AAI byly separovány a kvantifikovány pomocí metody RP-HPLC po dobu 60 minut. Separace probíhala v gradientovém uspořádání, kdy se měnilo složení mobilní fáze z 80% A a 20% B na konečné složení 40% A a 60% B. Mobilní fázi představovala směs (A) 100 mM triethylaminacetát (pH= 7,0; úprava pH kyselinou octovou) a (B) 80% (v/v) acetonitrilu. Použitá kolona Macherey-Nagel, SRN C18 byla udržována termostatem při teplotě 37 °C. Konstantní průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Analyty byly rozpuštěny v 50 µl methanolu a

nástřík na kolonu činil 25  $\mu$ l. Pro analýzu byl použit HPLC systém UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex (USA).

## 3.6 Vliv CYB5 na oxidaci ellipticinu

### 3.6.1 Příprava inkubačních směsí

Pro stanovení enzymové aktivity byly použity jaterní mikrosomy z kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných PB, BaP, SudI, PCN nebo ethanolem. Po inkubaci ellipticinu s mikrosomy a NADPH nebo NADH jako kofaktoru CYP a extrakci vytvořených metabolitů bylo analyzováno množství jednotlivých produktů reakce pomocí HPLC. Rovněž byly připraveny a analyzovány kontrolní vzorky neobsahující NADPH resp. NADH.

Každá inkubační směs byla připravena ve třech paralelních vzorcích. Celkový objem každého inkubačního vzorku byl 500  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala:

1. fosfátový pufr (0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4)
2. 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce
3. 50  $\mu$ M ellipticin (pipetováno 5  $\mu$ l 5 mM roztoku)
4. 1 mM NADPH resp. NADH (50  $\mu$ l 10 mM vodního roztoku NADPH resp. NADH)

Směs bez NADPH resp. NADH byla preinkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Reakce byla spuštěna pipetováním roztoku NADPH resp. NADH a probíhala v inkubátoru za přítomnosti vzduchu po dobu 10 minut při 37 °C a třepání při 400 RPM. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu.

Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátu po dobu 2 minut při 1 400 RPM, vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace po dobu 3 minut při 14 500 RCF. Vrchní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky a odpařena do sucha ve vakuové odparce při 37 °C.

### 3.6.2 Stanovení metabolitů ellipticinu pomocí HPLC

Metabolity ellipticinu byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC po dobu 15 minut. Mobilní fázi představovala směs 64% (v/v) methanolu, 32 mM kyseliny octové a 5 mM heptansulfátu. Použitá kolona Hichrom Ultrasphere 5 ODS byla udržována termostatem při teplotě 35 °C. Konstantní průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,8 ml/min. Analyty byly rozpuštěny v 25  $\mu$ l methanolu a nástřík na kolonu činil 20  $\mu$ l. Pro analýzu byl použit HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series.

## 3.7 Vliv CYB5 na oxidaci vandetanibu

### 3.7.1 Příprava inkubačních směsí

Pro stanovení enzymové aktivity příslušných isoformů CYP byly použity rekombinantní CYP a jaterní mikrosomy člověka, potkana, myši a králíka. Po inkubaci vandetanibu s mikrosomy a NADPH nebo NADH jako kofaktoru CYP a extrakci vytvořených metabolitů bylo analyzováno množství N-desmethylvandetanibu pomocí HPLC. Rovněž byly připraveny a analyzovány kontrolní vzorky neobsahující NADPH resp. NADH.

Každá inkubační směs byla připravena ve třech paralelních vzorcích. Celkový objem každého inkubačního vzorku při použití rekombinantních CYP byl 250  $\mu$ l. Při použití jaterních mikrosomů byl objem 500  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala:

1. fosfátový pufr (0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4)
2. 100 nM CYP (při použití jaterních mikrosomů 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce)
3. 50  $\mu$ M vandetanib
4. 1 mM NADPH resp. NADH

Směs bez NADPH resp. NADH byla preinkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Reakce byla spuštěna pipetováním roztoku NADPH resp. NADH a probíhala v inkubátoru za přítomnosti vzduchu po dobu 20 minut při 37 °C a třepání při 450 RPM. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 1 ml dichlormethanu.

Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml dichlormethanu po dobu 2 minut při 1400 RPM, vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace po dobu 5 minut při 14500 RCF. Spodní organická fáze byla odebrána do čisté mikroskopické zkumavky a odpařena do sucha ve vakuové odparce při 37 °C.

### 3.7.2 Stanovení N-desmethylvandetanibu pomocí HPLC

N-desmethylvandetanib byl separován a kvantifikován pomocí metody HPLC. Mobilní fáze představovala směs 70 % (0,5% trimethylamin; pH 3) a 30 % acetonitril. Analyty byly rozpuštěny v 25  $\mu$ l methanolu a nástřik na kolonu činil 20  $\mu$ l. Pro analýzu byl použit HPLC systém UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex (USA).

## 4 VÝSLEDKY

---

V předkládané práci jsme se zabývali vlivem cytochromu b<sub>5</sub> a cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy na metabolismus reakcí katalyzovaných cytochromy P450. Za tímto účelem bylo studováno pět substrátů – testosteron, Sudan I, aristolochová kyselina I, ellipticin a vandetanib. Ke studiu byly použity jaterní mikrosomy potkanů a také rekombinantní potkaní a lidské cytochromy P450 exprimované jednak v eukaryotním a jednak v prokaryotním systému.

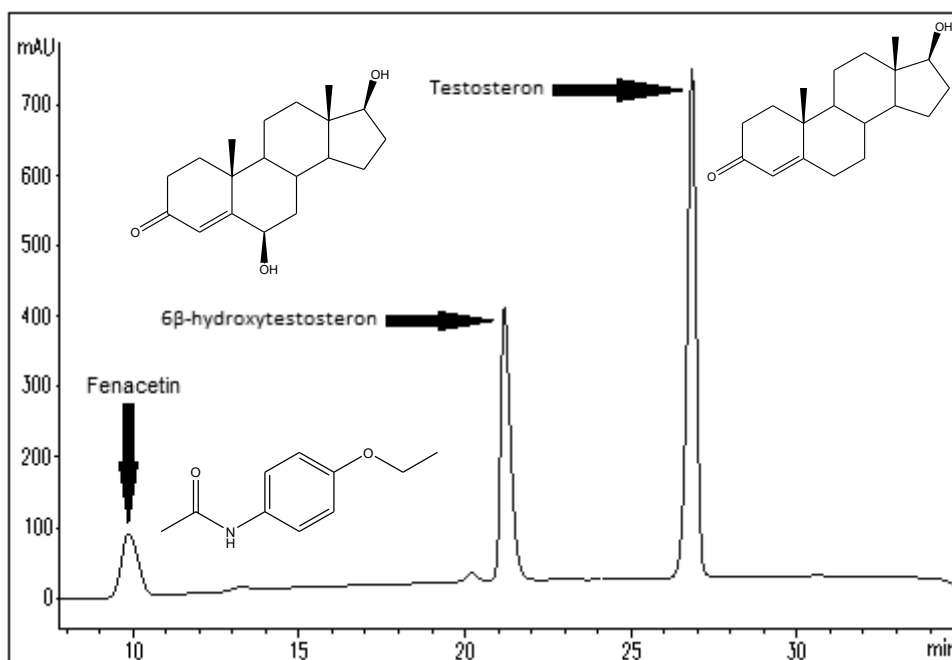
### 4.1 Testosteron

Pro stanovení aktivity CYP3A4 jsme využili metodu 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu, která je specificky katalyzovaná podrodinou CYP3A [119]. Při této redoxní reakci dochází ke vzniku produktu 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu. Metabolity této hydroxylace byly detekovány pomocí metody HPLC s UV detekcí (ukázkový chromatogram viz. Obrázek 12) a získané chromatogramy následně analyzovány (viz. Obrázek 13).

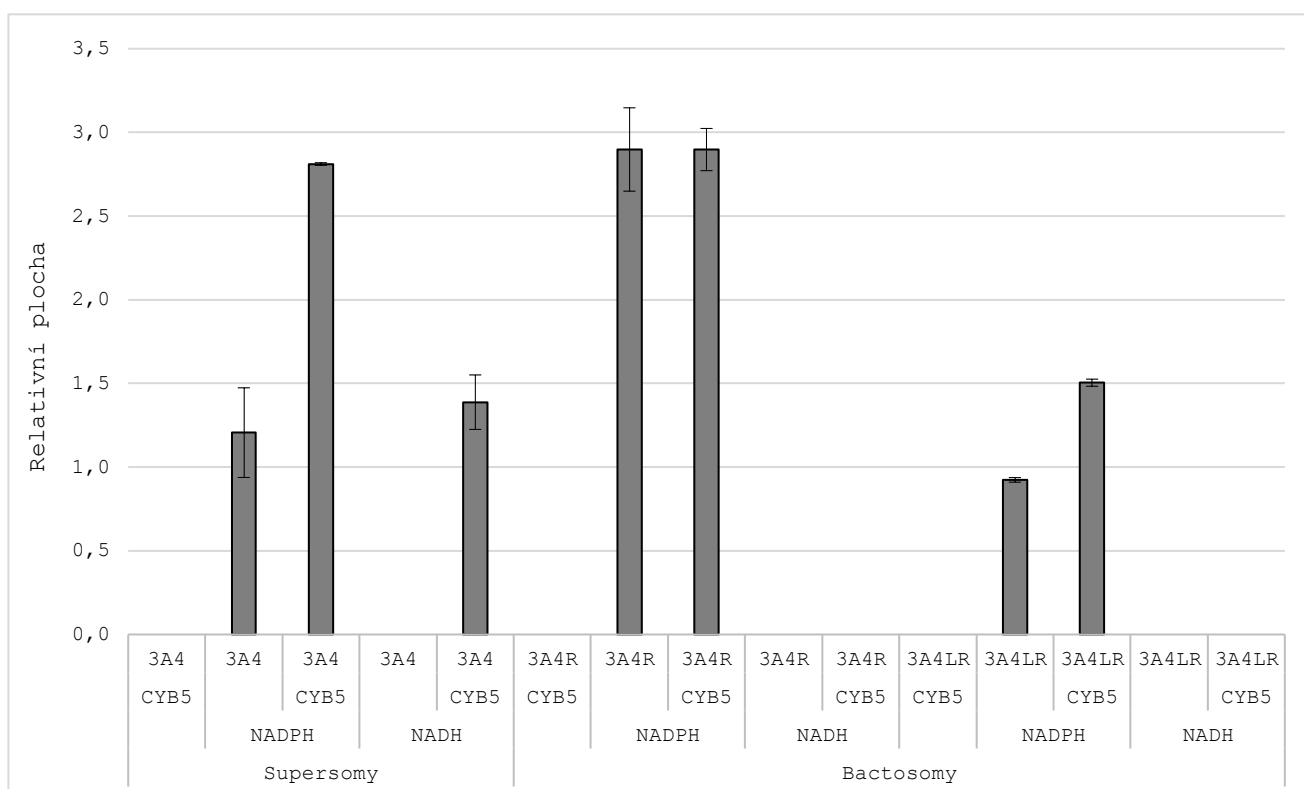
U CYP3A4 exprimovaného v Supersomech dochází v přítomnosti CYB5 k dvojnásobnému nárůstu hladiny 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu při vystavení NADPH oproti systému bez tohoto enzymu. Nahrazení NADPH za NADH vede k snížení tvorby tohoto metabolitu, přičemž v systému bez CYB5 nebyla tvorba 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu pozorována. Nezbytnost přítomnosti kofaktoru (NAD(P)H) ve vzorcích pro průběh reakce byla prokázána pomocí kontrolních vzorků připravených bez kofaktorů, ve kterých nebyla pozorována tvorba žádného metabolitu.

U Bactosomů je v přítomnosti NADPH patrný vliv exprimované reduktasy na oxidaci testosteronu. Systémy s vyšší hladinou reduktasy (CYP3A4R) vykazují vyšší efektivitu přeměny testosteronu než systémy s nižší hladinou reduktasy (CYP3A4LR), a to bez ohledu na přítomnost CYB5 ve vzorcích. V systému CYP3A4R nebyl pozorován žádný vliv CYB5 na aktivitu CYP3A4. Při nižší aktivitě CYPOR je v prostředí s CYB5 pozorován mírný nárůst aktivity CYP3A4. V přítomnosti NADH není v žádném z Bactosomálních systémů pozorována tvorba 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu, na rozdíl od systémů Supersomálních.

Nejvyšší aktivity byly naměřené v Supersomálním systému s NADPH a CYB5, Bactosomálním systému se zvýšenou aktivitou CYPOR s NADPH a CYB5 a v Bactosomálním systému se zvýšenou aktivitou CYPOR s NADPH bez CYB5. Hladiny 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu se v těchto třech vzorcích vzájemně výrazně nelišily.



**Obrázek 12** Ukázkový chromatogram z HPLC analýzy metabolismu testosteronu. Na obrázku jsou vyznačené píky vnitřního standardu fenacetinu, parentální molekuly testosteronu a jeho metabolitu 6β-hydroxytestosteronu.



**Obrázek 13** Množství metabolitu 6β-hydroxytestosteronu jako produktu reakce katalyzované CYP3A4 v prostředí s příslušným kofaktorem a/případně cytochromem b<sub>5</sub>. Supersomy jsou hmyzí mikrosomy obsahující rekombinantní lidské CYP, připravené z hmyzích buněk transfekovaných baculovirem. Bactosomy jsou bakteriální membrány izolované z *E. coli*, rovněž obsahující rekombinantní lidské CYP. V případě Bactosomů jsou označeny symbolem „R“ varianty s přibližně sedmkrát vyšší aktivitou CYPOR oproti analogickým variantám označeným symbolem „LR“ (z angl. „low reductase“). Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

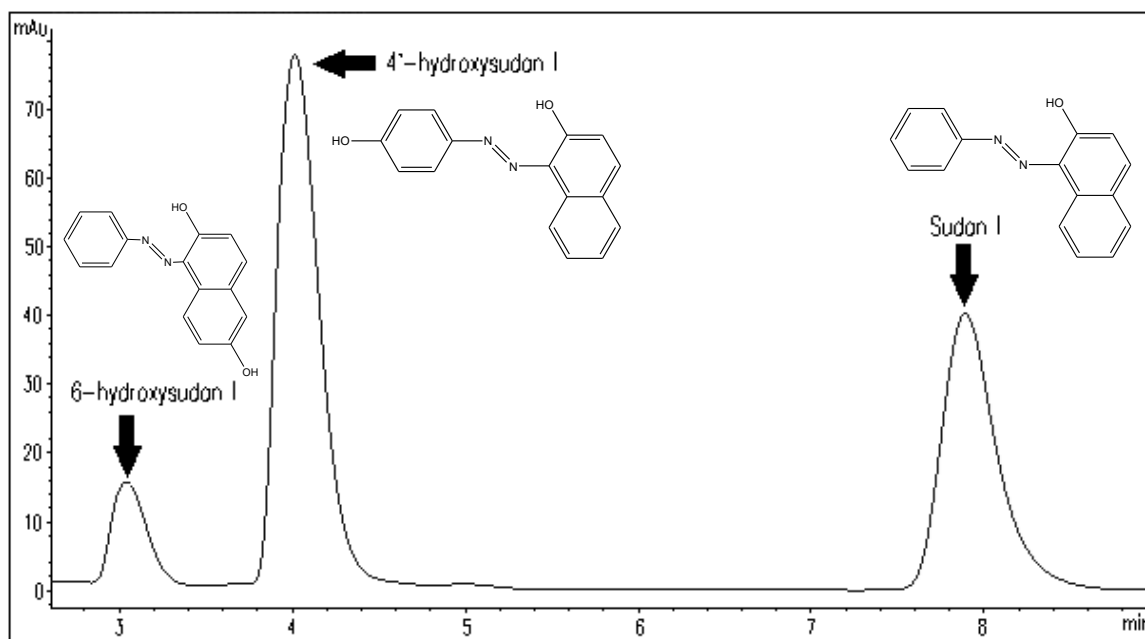
## 4.2 Sudan I

Pro stanovení aktivity CYP1A1 byla využita reakce Sudanu I za vzniku dvou metabolitů 6-hydroxysudanu I a 4'-hydroxysudanu I. Metabolity této hydroxylace byly detekovány pomocí metody HPLC s UV detekcí (ukázkový chromatogram viz. Obrázek 14) a získané chromatogramy následně analyzovány (viz. Obrázek 15 a 16).

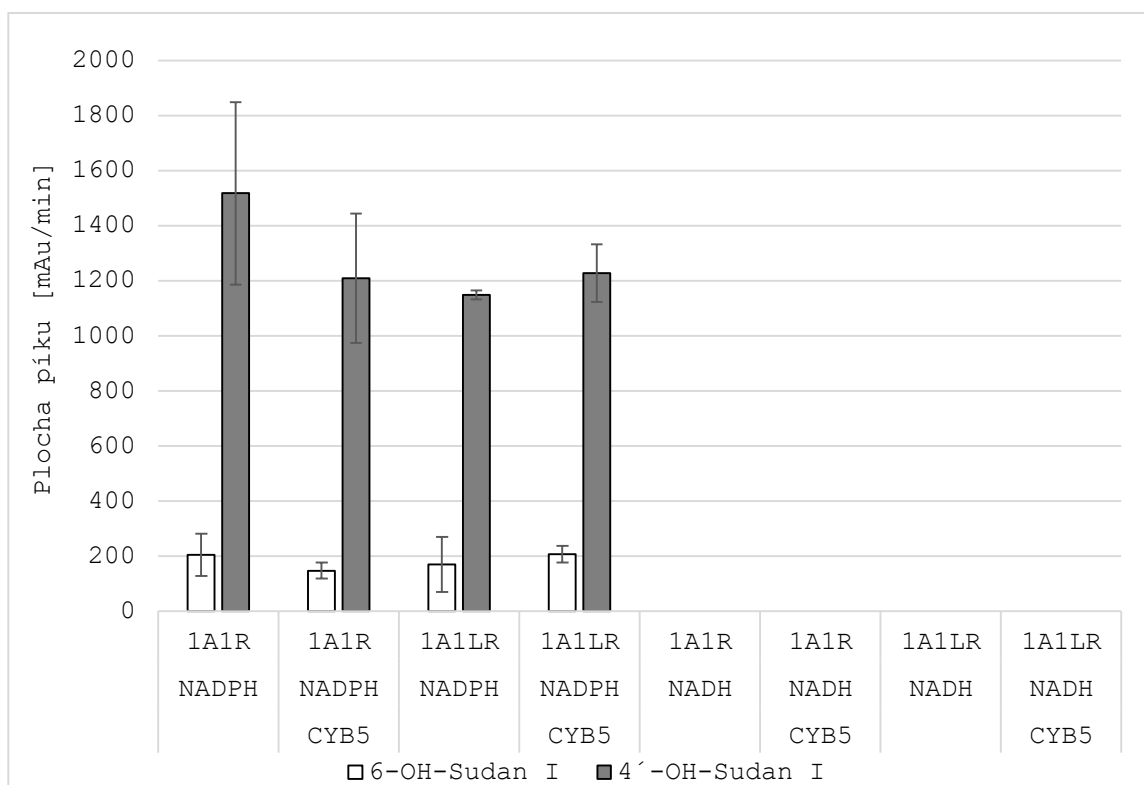
CYP1A1 exprimovaný v Bactosomech nevykazoval při použití kofaktoru NADPH v porovnání se vzorky vystavenými CYB5 významnou změnu aktivity u žádné z připravených variací. Vyšší aktivita CYPOR výrazně neovlivnila aktivitu CYP1A1. Při použití kofaktoru NADH nebyla vůbec pozorována aktivita CYP1A1, a to bez ohledu na aktivitu CYPOR.

CYP1A1 exprimována v Supersomech vykazovala, narozdíl od Bactosomálního systému, aktivitu i při použití kofaktoru NADH. Lidská a potkaní CYP1A1 vykazovala při použití NADPH přibližně pěti násobný nárůst hladiny 4'-hydroxysudanu I oproti variantem s NADH. Zároveň, lidská isoforma vykazovala při použití stejného kofaktoru přibližně 5krát vyšší aktivitu než isoforma potkaní. Vynechání kofaktoru vedlo k úplnému vymizení aktivity lidské i potkaní isoformy.

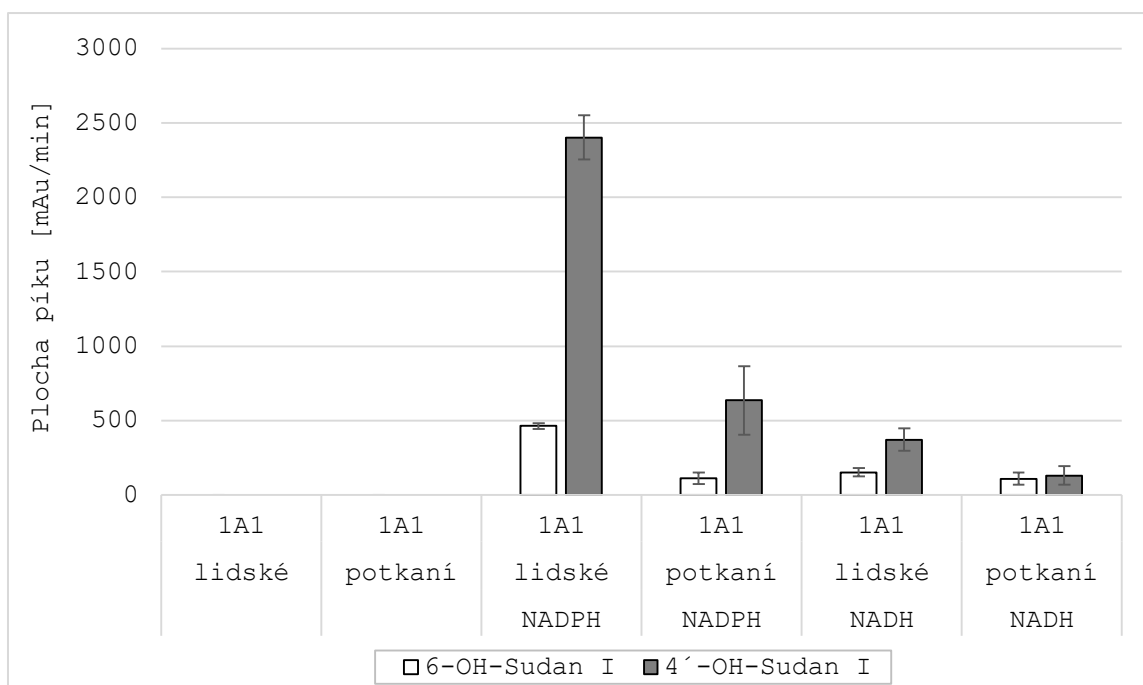
Téměř ve všech vzorcích vznikal 4'-hydroxysudan I v nadbytku oproti druhému metabolitu 6-hydroxysudanu I. Pouze v případě Supersomálního systému s potkaní isoformou CYP1A1 při použití NADH byl poměr hladin obou metabolitů přibližně 1:1.



**Obrázek 14** Ukázkový chromatogram z HPLC analýzy metabolitů Sudanu I. Na obrázku jsou vyznačené píky parentální molekuly Sudanu I a jeho metabolitů 4'-hydroxysudanu I a 6-hydroxysudanu I.



**Obrázek 15** Množství metabolitů 6-hydroxysudanů I a 4'-hydroxysudanů I jako produktů reakce katalyzované lidským CYP1A1 exprimovaným v Bactosomech v prostředí s příslušným kofaktorem a/nebo cytochromem bs. Symbol „R“ reprezentuje varianty s vyšší aktivitou CYPOR oproti analogickým variantám označeným symbolem „LR“ (z angl. „low reductase“). Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

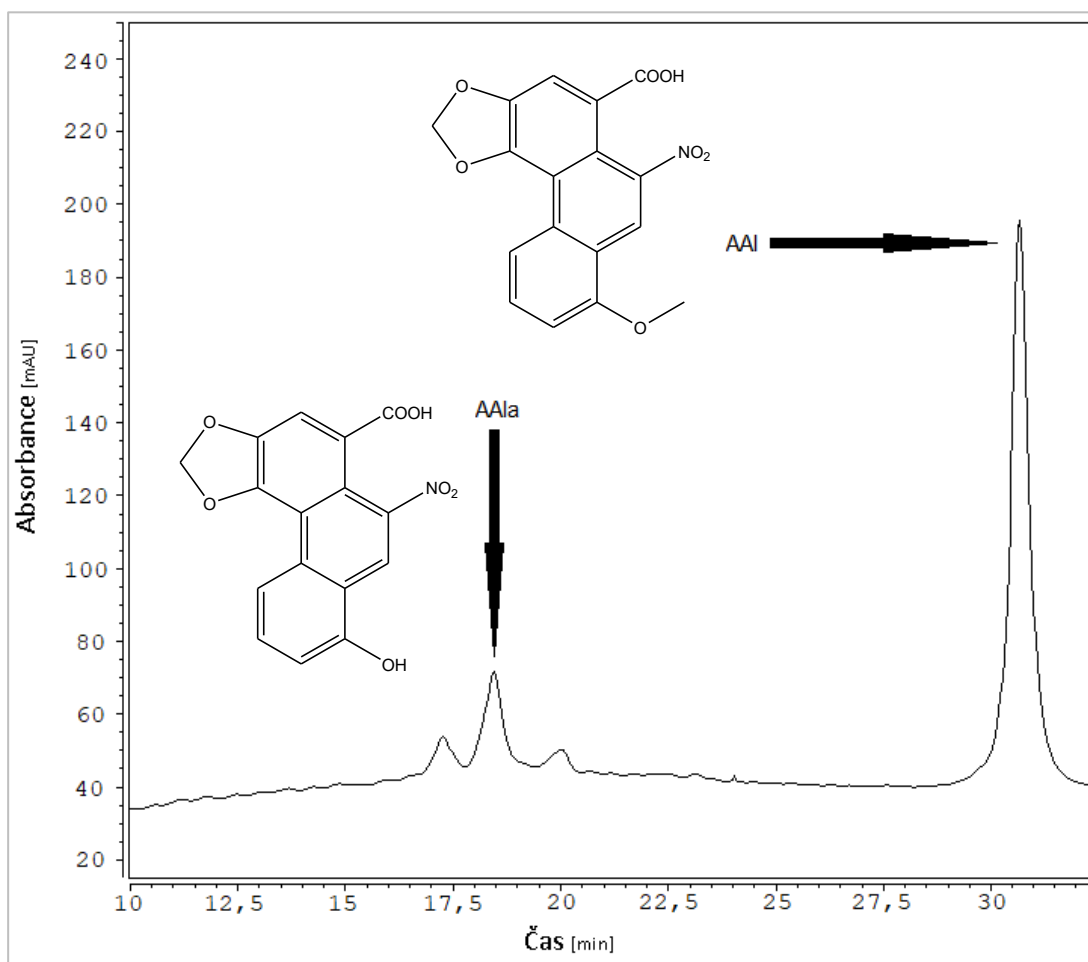


**Obrázek 16** Množství metabolitů 6-hydroxysudanů I a 4'-hydroxysudanů I jako produktů reakce katalyzované lidskými nebo potkaními CYP1A1 exprimovanými v Supersosomech v prostředí s příslušným kofaktorem. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

### 4.3 Aristolochová kyselina I

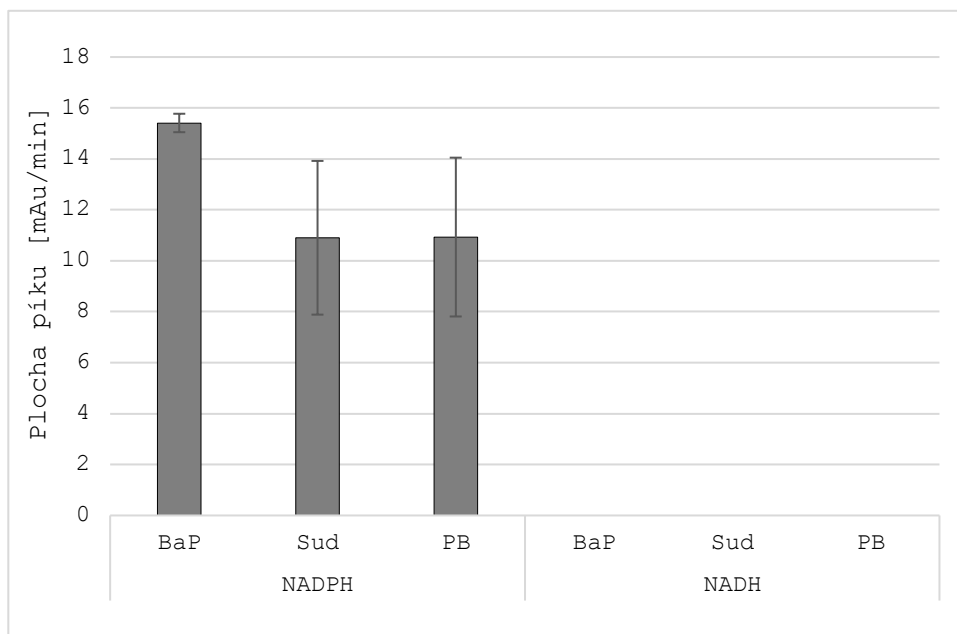
Ke studiu substrátu AAI byly použity jaterní mikrosomy různě premedikovaných potkanů. Pomocí metody HPLC s UV detekcí byl analyzován metabolit AAIA, jež vzniká reakcí katalyzovanou CYP1A1 a CYP1A2 [148]. Množství metabolitu bylo vyhodnoceno ze získaného chromatogramu (ukázkový chromatogram viz. Obrázek 17).

BaP i SudI jsou známými induktory podrodiny CYP1A. PB je induktor podrodiny CYP2B [59], avšak rovněž indukuje i expresi samotného cytochromu b<sub>5</sub> [153]. Při použití kofaktoru NADPH byl pozorován u mikrosomů z potkanů premedikovaných BaP mírný nárůst metabolitu AAIA oproti mikrosomům premedikovaných SudI nebo PB (viz. Obrázek 18). Při studiu metabolismu nebyl při použití kofaktoru NADH pozorován vznik žádného metabolitu AAI, a to navzdory přirozenému výskytu CYB5 i CYB5R v jaterních mikrosomech potkanů.



**Obrázek 17** Ukázkový chromatogram z HPLC analýzy metabolitu aristolochové kyseliny I. Na obrázku jsou vyznačeny píky parentální molekuly AAI a jejího metabolitu AAIA.





**Obrázek 18** Množství metabolitu AA1a jako produktu reakce katalyzované jaterními mikrosomy potkanů vystavených příslušným premedikacím. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

## 4.4 Ellipticin

Ke studiu substrátu ellipticinu byly použity jaterní mikrosomy různě premedikovaných potkanů. Pomocí metody HPLC s UV detekcí bylo studováno několik metabolitů (viz. Obrázek 20) a získané chromatogramy byly následně analyzovány (viz. Obrázek 19). Hydroxylace ellipticinu na 9-hydroxyellipticin je charakteristickou reakcí katalyzovanou CYP1A1 a CYP1A2 [112].

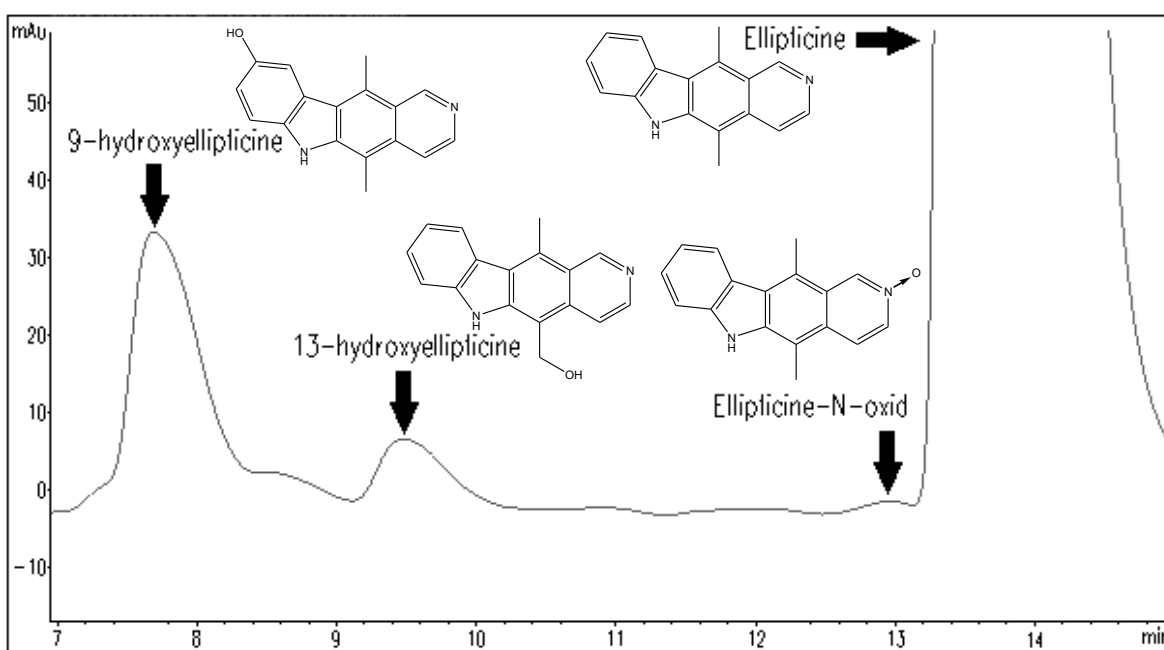
Jak již bylo sděleno, BaP i SudI figurují jako induktory podrodiny CYP1A [48] [154]. V souladu s tím byl nejvýraznější nárůst množství metabolitu 9-hydroxyellipticinu pozorován u potkanů premedikovaných benzo[*a*]pyrenem. Oproti kontrolním potkanům byl rovněž pozorován výrazný nárůst tohoto metabolitu u potkanů premedikovaných Sudanem I.

Pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril (PCN) je agonistou PXR, jež indukuje expresi CYP3A4 [155]. V souladu s tím byl při této premedikaci pozorován nárůst hladiny metabolitu 13-hydroxyellipticinu, jehož vznik katalyzuje zejména podrodina CYP3A (viz. kapitola 1.6). Rovněž premedikace fenobarbitalem, jež je induktorem CYB5, vedla k zvýšené hladině 13-hydroxyellipticinu. Vznik tohoto metabolitu je v přítomnosti CYB5 stimulovaný [112].

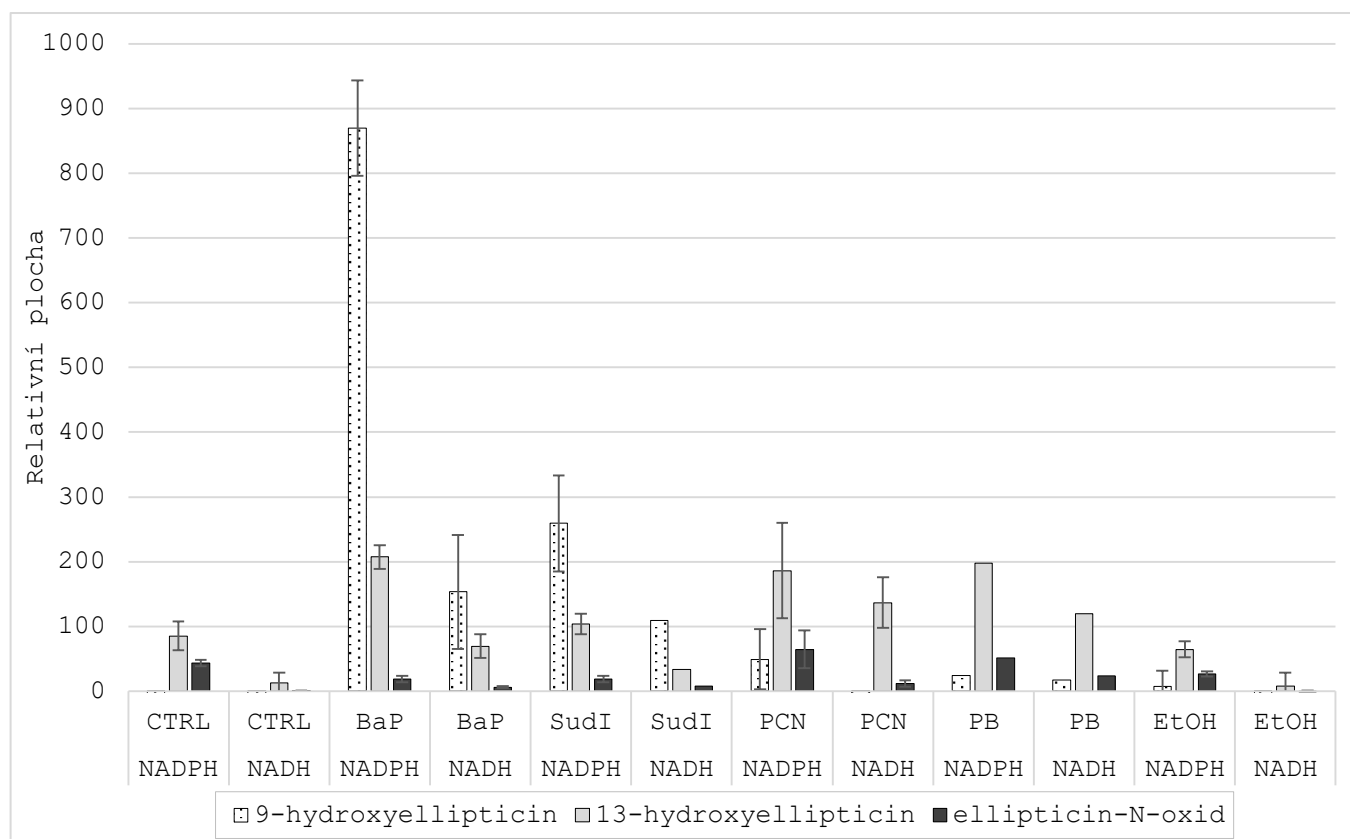
V játrech potkanů premedikovaných ethanollem, jež je induktorem isoformy CYP2E1, rovněž převládá vznik metabolitu 13-hydroxyellipticinu oproti 9-hydroxyellipticinu. Je známo, že CYP2E1 katalyzuje reakci vzniku 13-hydroxyellipticinu. Oproti kontrolním vzorkům se však hladiny metabolitů při premedikaci EtOH výrazně nelišily.

U premedikací BaP a SudI jsme v přítomnosti NADPH pozorovali nárůst hladiny 9-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu oproti variantám vystaveným NADH. V případě potkanů premedikovaných PCN, PB a EtOH jsme v přítomnosti NADPH pozorovali nárůst hladiny 13-hydroxyellipticinu oproti variantám vystaveným NADH. Zvýšená hladina 13-hydroxyellipticinu v přítomnosti NADPH oproti NADH byla rovněž pozorována i ve vzorcích kontrolních mikrosomů.

Vznik metabolitu ellipticin-N-oxidu je katalyzován zejména isoformou CYP2D6, následován CYP3A4. Nejvyšší hladina ellipticin-N-oxidu byla pozorována při premedikaci PCN, jež indukuje expresi CYP3A4 a premedikaci PB, jež indukuje expresi CYP2D6. S kontrolními mikrosomy se však hladiny tohoto metabolitu při premedikacích PCN a PB výrazně nelišily. Při premedikacích BaP i SudI byla naopak hladina tohoto metabolitu oproti kontrolám snížena. Při použití kofaktoru NADH došlo k poklesu tvorby daného metabolitu oproti systémům s NADPH.



**Obrázek 19** Ukázkový chromatogram z HPLC analýzy metabolitů ellipticinu. Na obrázku jsou vyznačeny píky parentální molekuly ellipticinu a jeho metabolitů 9-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu a ellipticin-N-oxidu.

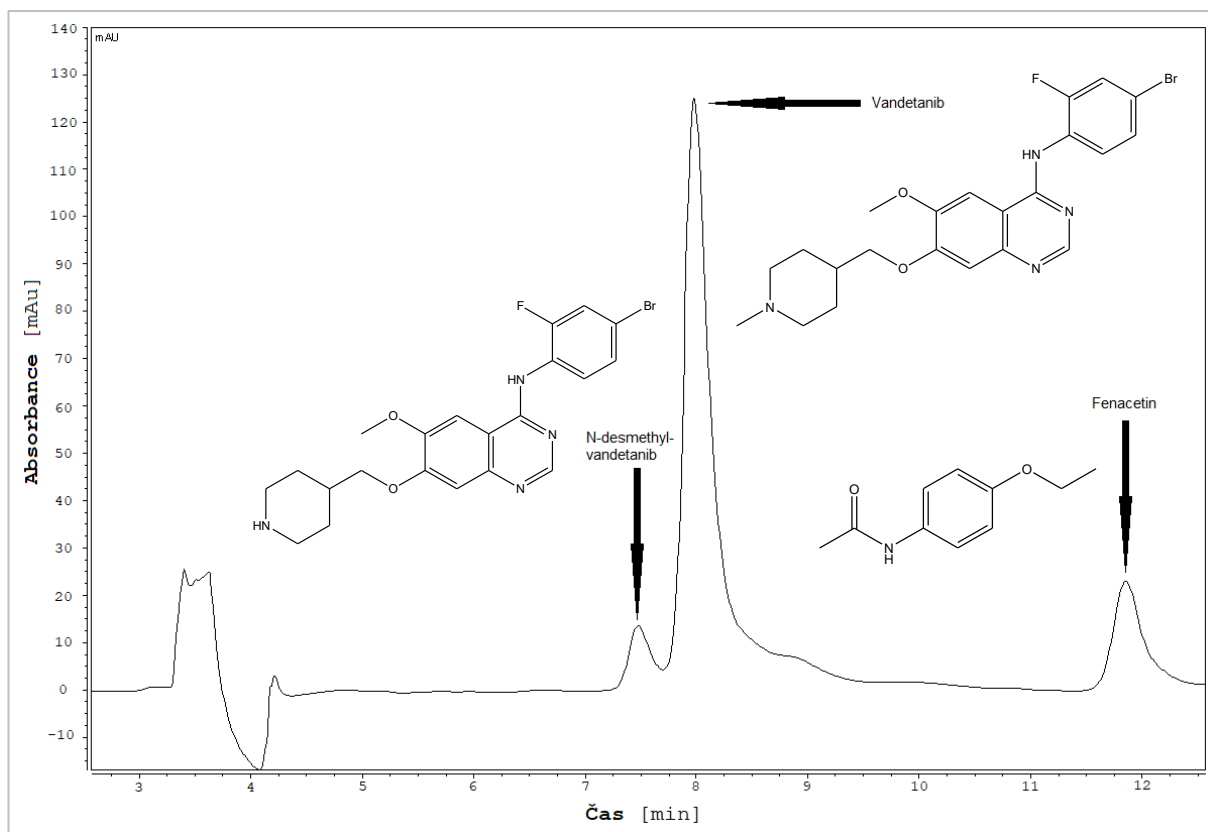


**Obrázek 20** Množství metabolitů 9-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu a ellipticin-N-oxidu jako produktů reakcí katalyzovaných jaterními mikrosomy potkanů vystavených různým induktorům CYP. Experimenty byly prováděny v prostředí s kofaktorem NADPH nebo NADH. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

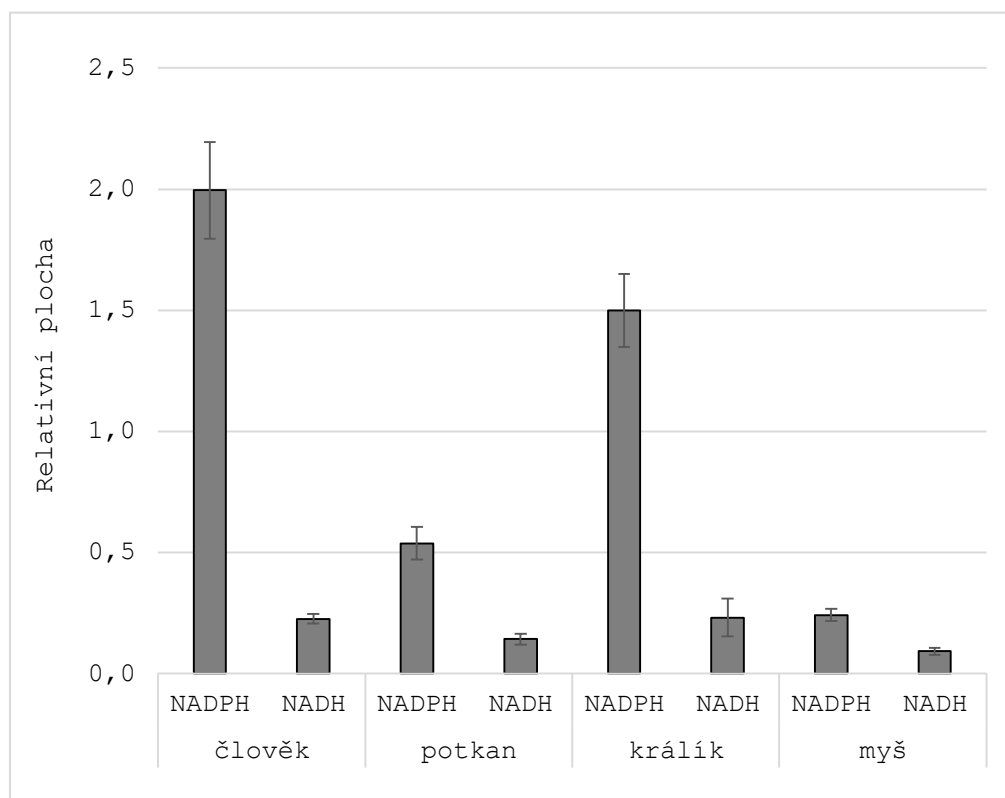
## 4.5 Vandetanib

Pro stanovení aktivity příslušných isoform cytochromů P450 byla využita reakce vandetanibu na N-desmethylvandetanib. Ke studiu byly využity jaterní mikrosomy ze čtyř organismů – člověka, potkana, králíka a myši, a rovněž potkaní rekombinantní CYP exprimované v Supersomech. V Supersomálním systému studované isoformy CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11, CYP2D1, CYP2D2, CYP3A1 a CYP3A2 byly zvoleny na základě experimentu, ve kterém na rozdíl od ostatních isoform vykazovaly aktivitu při metabolismu vandetanibu [156]. Tento experiment však nebyl součástí předkládané diplomové práce. Metabolit N-desmethylvandetanib byl detekován pomocí metody HPLC s UV detekcí (ukázkový chromatogram viz. Obrázek 21).

Ve všech vzorcích jaterních mikrosomů ze všech organismů byla zaznamenána aktivita při vzniku N-desmethylvandetanibu (viz. Obrázek 22). Nejvyšší aktivita byla pozorována u člověka v prostředí s NADPH, následována mikrosomy z králíka rovněž v prostředí s NADPH. Naopak nejnižší aktivita byla zaznamenána u myši v prostředí s NADH. Jaterní mikrosomy vykazovaly v prostředí s NADPH oproti NADH vyšší aktivitu u každého studovaného organismu.



**Obrázek 21** Ukázkový chromatogram z HPLC analýzy metabolitu N-desmethylvandetanibu. Na obrázku jsou vyznačeny píky vnitřního standardu fenacetinu, parentální molekuly vandetanibu a jejího metabolitu N-desmethylvandetanibu.

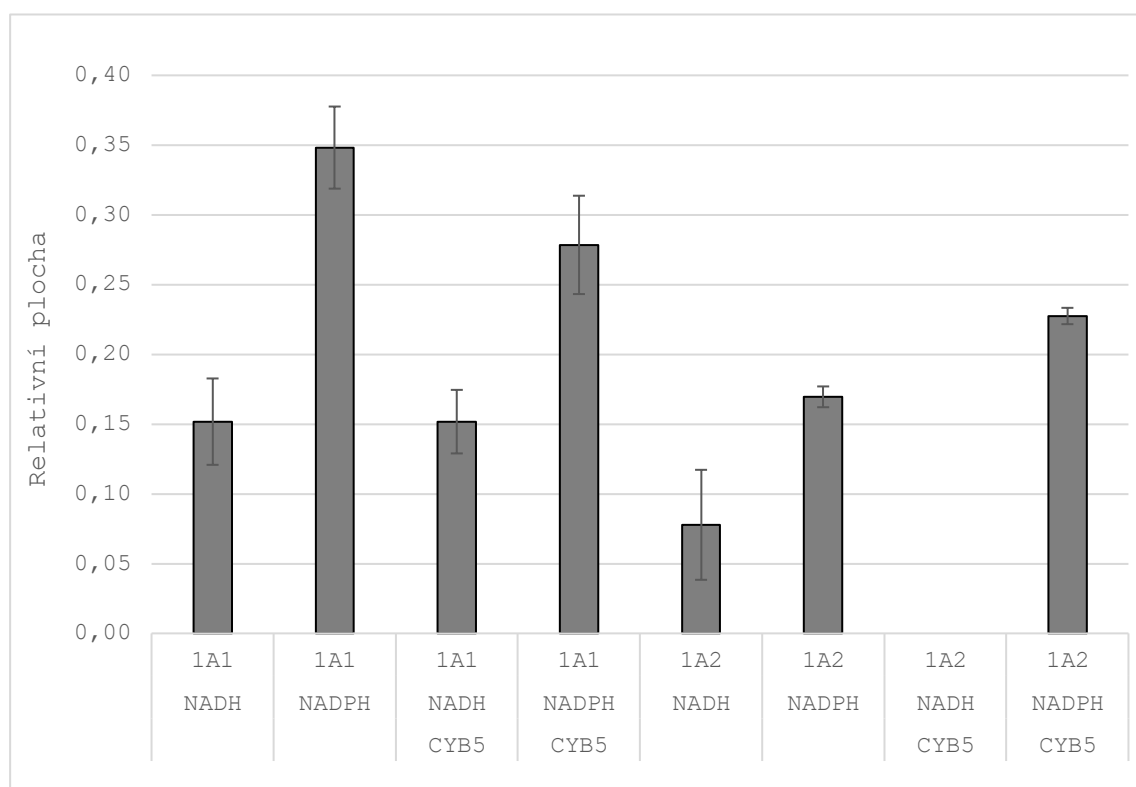


**Obrázek 22** Množství metabolitu N-desmethylvandetanibu jako produktu reakce katalyzované jaterními mikrosomy příslušného organismu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

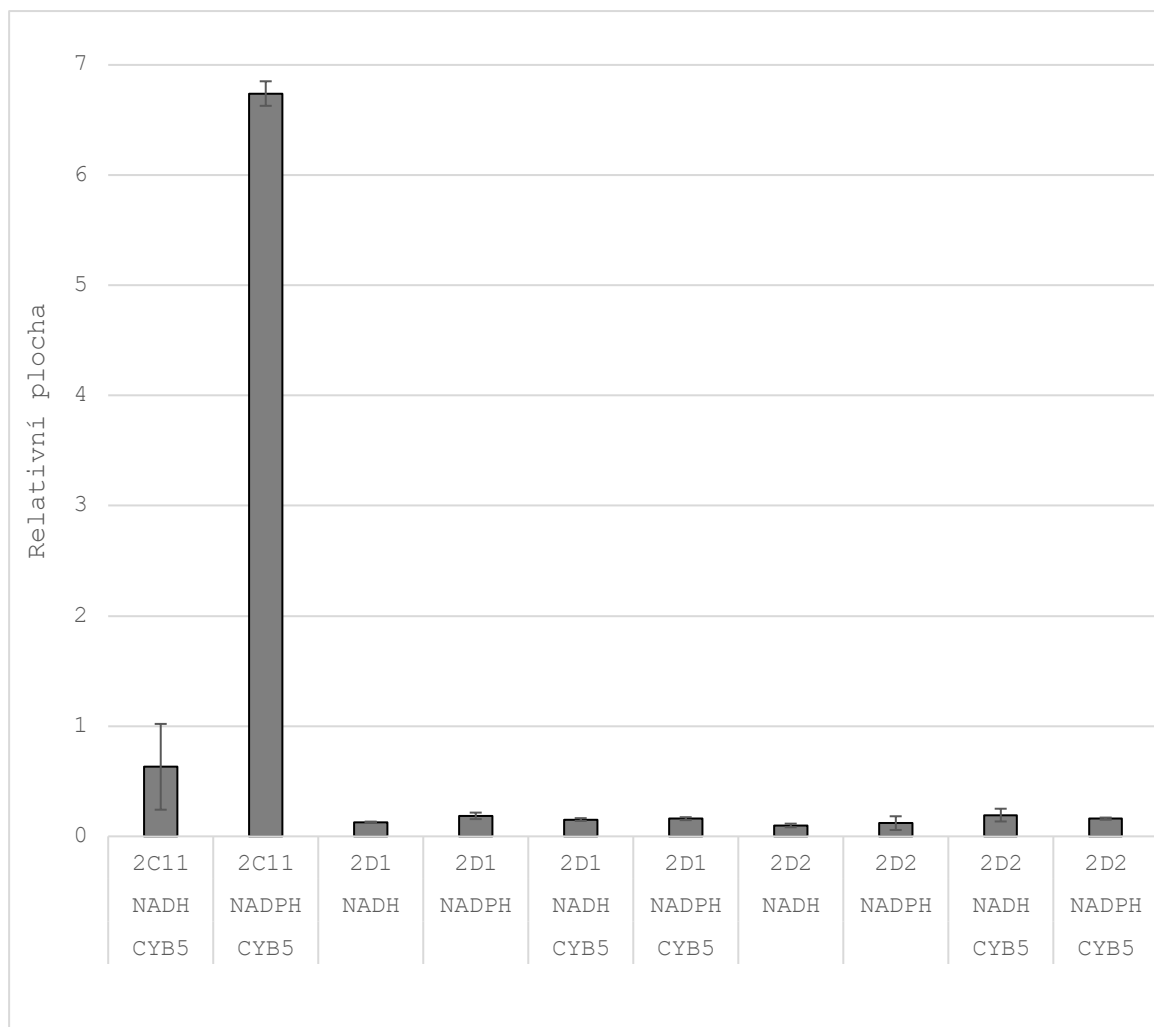
U CYP1A1 (viz. Obrázek 23) byla nejvyšší aktivita pozorována ve vzorcích s NADPH. Ve vzorcích s NADPH a CYB5 vykazoval CYP1A1 mírný pokles aktivity oproti variantě bez CYB5. V prostředí s NADH nebyl pozorován významný rozdíl aktivity v přítomnosti CYB5 oproti variantě bez CYB5. CYP1A1 s NADH vykazoval nižší aktivitu než s NADPH.

U CYP1A2 byla nejvyšší aktivita pozorována ve vzorcích s NADPH a CYB5. CYP1A2 s NADH vykazovala menší aktivitu než s NADPH. V přítomnosti NADH byl pozorován vznik N-desmethylvandetanibu ve vzorcích bez CYB5, přičemž aktivita CYP1A2 úplně vymizela ve variantě s CYB5. CYP1A2 vykazovala obecně nižší aktivitu než isoforma CYP1A1.

Při studiu rodiny CYP2 (viz. Obrázek 24) byla pozorována výrazná aktivita u isoformy CYP2C11 v přítomnosti CYB5 a NADPH oproti všem ostatním isoformám. Tato isoforma však byla exprimována jenom společně s CYB5 (viz. Diskuze). V případě isoformy CYP2C11 v přítomnosti NADPH byla rovněž pozorována víc než sedmkrát vyšší aktivita než v případě vystavení NADH. U isoform CYP2D1 a CYP2D2 nebyl pozorován vliv CYB5 na jejich aktivitu. U těchto dvou isoform nebyl rovněž pozorován rozdíl aktivity v přítomnosti NADPH oproti NADH.

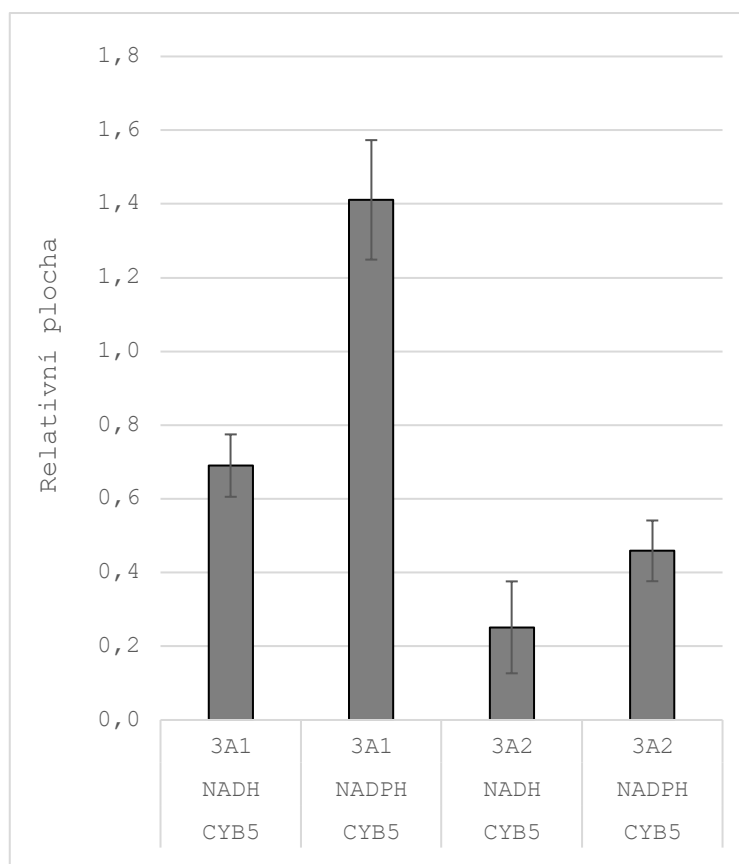


**Obrázek 23** Množství metabolitu N-desmethylvandetanibu jako produktu reakce katalyzované příslušnými isoformami podrodiny CYP1A v prostředí s příslušným kofaktorem a/nebo cytochromem b<sub>5</sub>. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.



**Obrázek 24** Množství metabolitu N-desmethylvandetanibu jako produktu reakce katalyzované příslušnými isoformami rodiny CYP2 v prostředí s příslušným kofaktorem a/nebo cytochromem b<sub>5</sub>. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

Isoformy CYP3A1 i CYP3A2 (viz. Obrázek 25) byly exprimovány jenom společně s CYB5 (viz. Diskuze). CYP3A1 vykazovala obecně v přítomnosti NADPH i NADH vyšší aktivitu než isoforma CYP3A2. CYP3A1 i CYP3A2 vykazovaly v přítomnosti NADPH přibližně dva krát vyšší aktivitu oproti variantě s NADH. V přítomnosti NADPH bylo pozorováno přibližně tři krát vyšší množství metabolitu u isoformy CYP3A1 než u CYP3A2. V přítomnosti NADH byla hladina metabolitu přibližně dva krát vyšší u CYP3A1 než u CYP3A2.



**Obrázek 25** Množství metabolitu N-desmethylvandetanibu jako produktu reakce katalyzované příslušnými isoformami podrodiny CYP3A v přítomnosti CYB5 v prostředí s příslušným kofaktorem. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení.

## 5 DISKUZE

---

Úlohou diplomové práce bylo studovat vliv cytochromu  $b_5$  a cytochrom  $b_5$  reduktasy na aktivitu cytochromů P450 z rodin CYP1, CYP2 a CYP3. Námi použité substráty, pomocí jejichž biotransformačních reakcí byla aktivita CYP sledována, byly testosteron, Sudan I, aristolochová kyselina I, ellipticin a vandetanib.

Funkce CYB5 nebyla dodnes úplně ozřejměná, jelikož závisí jak na substrátu, tak na konkrétní isoformě CYP, se kterou CYB5 interaguje. Je známo, že CYB5 může redukovat CYP závisle na CYPOR (CYB5 je redukován CYPOR) nebo nezávisle na CYPOR (CYB5 je redukován CYB5R) [86]. Jedním z navrhovaných mechanismů je vznik komplexu CYB5 s CYP, což by umožňovalo jedнокrokový přesun elektronů při redukci CYPOR (viz. kapitola 1.4). Zároveň byl navržen i mechanismus allosterické regulace, při kterém by interakce CYB5 s CYP indukovala konformační změnu CYP. V předkládané diplomové práci jsme se zaměřily na schopnost CYB5 poskytnout CYP oba elektrony nezávisle na CYPOR.

V případě substrátu testosteronu byla studována aktivita isoformy CYP3A4. V případě použití isoformy exprimované v hmyzích buňkách (Supersomy) a kofaktoru NADPH vykazovala CYP3A4 enzymovou aktivitu ve všech vzorcích. Zároveň byl zaznamenán přibližně dvojnásobný nárůst aktivity v prostředí s CYB5 oproti variantě bez CYB5. Při použití NADH nevykazovala CYP3A4 aktivitu, až na jednu výjimku, v žádné variantě experimentu. Enzymová aktivita byla v tomto případě zaznamenána jenom při vystavení CYB5 v Supersomech. V případě použití CYP3A4 exprimované v buňkách *E. coli* (Bactosomy) byla zaznamenána jen mírná stimulace aktivity CYP3A4 při koexpresi s CYB5. Tento nárůst byl pozorován ve vzorcích se sníženou aktivitou CYPOR. Ve vzorcích se zvýšenou aktivitou CYPOR dosahovala aktivita CYP3A4 přibližně stejné úrovně bez ohledu na přítomnost CYB5. Z těchto výsledků lze soudit, že i když je CYB5 schopný zvýšit aktivitu CYP, při vyšších koncentracích CYPOR je tento vliv irelevantní. Zároveň byla nejvyšší aktivita naměřena v Supersomálním i Bactosomálním systému s NADPH. Množství metabolitu se v těchto třech vzorcích navzájem výrazně nelišily. Takový výsledek napovídá, že v rámci provedeného experimentu bylo dosaženo maximální rychlosti katalyzované reakce.

Variabilitu vlivu CYB5 na aktivitu CYP3A4 možno vysvětlit rozdílným zastoupením CYB5R. Jak již bylo sděleno, CYB5R vyžaduje v rámci svého katalytického cyklu kofaktor NADH a vyskytuje se mj. v hmyzích organizmech. Lze tedy předpokládat její výskyt i v námi použitých Supersomech. To by vysvětlovalo, proč je aktivita CYP3A4 ovlivněna CYB5 výrazněji ve vzorcích Supersomů, a rovněž proč je jediný případ zaznamenané aktivity CYP3A4 při použití kofaktoru NADH výhradně ve vzorcích Supersomů.



Při použití substrátu Sudanu I byla studována aktivita isoformy CYP1A1. V Bactosomálním systému nebyl vliv CYB5 pozorován v žádné variantě experimentu. Při použití NADH jako kofaktoru nevykazovala isoforma CYP1A1 v tomto případě žádnou aktivitu. Ve studii [91] bylo v případě BaP prokázáno, že přidání CYB5R ke vzorkům umožní přeměnu daného substrátu i v přítomnosti NADH, takže absence aktivity v případě NADH jako kofaktoru souvisí s absencí CYB5R. V Supersomálním systému byla studována potkaní i lidská isoforma CYP1A1. V souladu s výsledky u substrátu testosteronu byla v tomto případě pozorována aktivita i při použití NADH. Opět můžeme předpokládat výskyt CYB5R v Supersomech hmyzích buněk, čehož důsledkem je pozorována aktivita CYP1A1 při použití NADH v Supersomálním systému, na rozdíl od systému Bactosomálního.

V téměř všech variantách provedených experimentů byl pozorován výrazný nadbytek množství vzniklého 4'-hydroxysudanu I oproti 6-hydroxysudanu I. V Bactosomálním systému byl tento nadbytek přibližně šestinásobný, a to ve všech variantách vykazujících aktivitu, nezávisle na vystavení CYB5 nebo vyšší aktivitě CYPOR. V Supersomálním systému s NADPH byla hladina 4'-hydroxysudanu I opět přibližně šestkrát vyšší. Při použití NADH u lidské isoformy CYP1A1 byla hladina 4'-hydroxysudanu I oproti 6-hydroxysudanu I přibližně dvakrát vyšší a u potkaní isoformy se hladiny těchto dvou metabolitů prakticky vyrovnaly.

Z výsledků Bactosomálního systému vyplývá, že průběh reakce Sudanu I katalyzované CYP1A1 není ovlivněn CYPOR. Výsledky Supersomálního systému však napovídají, že přítomnost NADH, jež figuruje jako donor elektronu pro CYB5R, může ovlivňovat průběh katalýzy CYP1A1 ve prospěch vzniku metabolitu 6-hydroxysudanu I.

Je obecně známo, že mezidruhové rozdíly sehrávají v metabolických reakcích CYP významnou roli (viz. kapitola 1.3). Výsledky Supersomálního systému jsou příkladem tohoto fenoménu. V prostředí s NADPH je hladina 4'-hydroxysudanu I i 6-hydroxysudanu I při lidské isoformě přibližně pětkrát vyšší než při isoformě potkaní. Narůst aktivity ve prospěch lidské isoformy je rovněž pozorován i v prostředí s NADH, avšak nikoliv tak výrazný jako při NADPH. Již zmíněný rozdílný poměr metabolitů Sudanu I při použití NADH je dalším příkladem mezidruhových rozdílů CYP. I když obecně byl pozorován relativní nárůst hladiny metabolitu 6-hydroxysudanu I oproti 4'-hydroxysudanu I v lidské i potkaní isoformě, zůstává otázkou, proč u potkaní isoformy došlo k vyrovnání těchto hladin, kdežto u isoformy lidské nikoliv. Bližší objasnění těchto jevů tak zůstává výzvou pro další studium mechanismů katalýzy obou isoform CYP1A1.

V případě substrátu AAI byly pro studium aktivity CYP1A použity jaterní potkaní mikrosomy. V prostředí s NADPH došlo u premedikace BaP k mírnému nárůstu metabolitu AAI oproti premedikacím SudI a PB. Lze předpokládat, že tento nárůst byl způsoben inducibilitou

CYP1A (viz. kapitola 1.3.1). BaP rozeznává receptor AhR, jež indukuje transkripci genů *CYP1A* [157]. Zároveň, výsledky v případě premedikací SudI a PB v prostředí NADPH odpovídají výsledkům z experimentů již provedených v naší laboratoři [158].

Při použití NADH jako kofaktoru nevykazovaly použité mikrosomy žádnou aktivitu. Výsledky metabolismu AAI v prostředí s NADH nejsou v souladu s výsledky získanými při substrátech testosteronu či Sudanu I. Přirozený výskyt CYB5 i CYB5R v hepatocytech potkanů by napovídal analogickému průběhu reakce v prostředí s NADH, jak tomu je v případě studovaných Supersomálních systémů. NADH však v případě metabolismu AAI nebylo schopné nahradit NADPH.

Jak již bylo několikrát zmíněno, redukce CYP pomocí NADH probíhá postupným předáváním elektronu mezi CYB5R a CYB5, což rozšiřuje možnosti vysvětlení našich výsledků. Snížená hladina samotného CYB5 v hepatocytech potkanů není legitimním důvodem pro vymizení schopnosti NADH redukovat CYP, jelikož jsme experimenty provedly mj. i s játry potkanů jež byly premedikovány fenobarbitalem. PB figuruje jako jeden z induktorů CYB5 [153], čemuž odpovídají i naše výsledky ze studia substrátu ellipticinu. Vysvětlení bychom proto měli hledat spíše v dalších krocích této následné katalytické reakce. V případě CYB5R je známa mutace v místě D239T (viz. kapitola 1.5), jejímž přímým důsledkem je změna preference CYB5R z NADH na NADPH [102]. Potenciální jedno-nukleotidový genetický polymorfismus u potkanů však rovněž není legitimním důvodem pro vysvětlení našich výsledků, jelikož NADH při substrátu ellipticinu v jaterních mikrosomech potkanů bylo schopno nahradit NADPH při redukcí CYP.

Důvod vymizení katalytické reakce v prostředí NADH bychom proto měli hledat v samotném cytochromu P450 1A1. Ze studie [148] je známo, že lidské rekombinantní CYP1A exprimované v Supersomech v prostředí s NADPH při koexpresi s CYB5 změnu aktivity nevykazovaly. Je tedy otázkou, jestli samotná reakce CYP1A1 s AAI neprobíhá přes specifický katalytický mechanismus, jež se odlišuje od katalýzy jiných substrátů, a jež probíhá takovým způsobem, že CYP1A1 není schopný přijmout elektron z CYB5. Podpůrným argumentem pro takovou hypotézu je i fakt, že samotné reakce katalyzované CYP1A1 u substrátů Sudanu I a ellipticinu jsou hydroxylace, kdežto metabolit AAIA vzniká demethylací.

V případě substrátu ellipticinu byly pro studium aktivit CYP opět použity jaterní potkaní mikrosomy. Zastoupení 9-hydroxyellipticinu, metabolitu charakteristického pro podrodinu CYP1A, bylo nejvyšší u potkanů premedikovaných BaP. Výrazné navýšení 9-hydroxyellipticinu oproti kontrolním potkanům bylo zaznamenáno i u potkanů premedikovaných Sudanem I. V žádné z provedených variant experimentů nedošlo k vymizení aktivity CYP bez ohledu na premedikaci nebo použitý kofaktor. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky při substrátech

testosteronu a Sudanu I. Je známo, že jaterní mikrosomy potkanů obsahují CYB5 i CYB5R, z čehož lze soudit, že NADH je v jejich přítomnosti schopno částečně nahradit NADPH jako redukční kofaktor.

Výrazný nárůst hladiny 9-hydroxyellipticinu při premedikacích BaP a SudI je způsoben inducibilitou CYP1A1. V případě vzniku 13-hydroxyellipticinu při premedikaci PCN dochází k indukci CYP3A4, která způsobí navýšení 13-hydroxyellipticinu oproti ostatním metabolitům. Při premedikaci PB dochází k indukci CYB5, který figuruje jako koenzym u různých isoform (CYP3A4, CYP1A1/2, CYP2E1 ...) katalyzujících vznik 13-hydroxyellipticinu oproti ostatním metabolitům (viz. kapitola 1.6).

Při premedikaci PB, tedy v prostředí s indukovaným CYB5, byla hladina vzniklého metabolitu 13-hydroxyellipticinu přibližně 1,5-krát vyšší při použití NADPH než při použití NADH. To by mohlo napovídat, že i když bylo NADH schopné umožnit průběh katalýzy CYP, k úplnému nahrazení NADPH nedochází. Zde je však nutné zdůraznit schopnost CYPOR redukovat CYB5 (viz. kapitola 1.4). V takovém případě umožní indukce CYB5 v prostředí s NADPH redukcí CYP pomocí CYPOR i CYB5, ale v prostředí s NADH je redukce CYP možná výhradně přes CYB5. Schopnost NADH „plnohodnotně“ nahradit NADPH při redukcí CYP jsme pozorovaly v experimentu se substrátem testosteronu, u kterého byla aktivita CYP3A4 v Supersomálním systému v prostředí s NADH a CYB5 vyrovnána v porovnání s variantou v prostředí s NADPH ale bez CYB5.

V případě substrátu vandetanibu byla studována aktivita jaterních mikrosomů z různých organismů a různých isoform z rodin CYP1, CYP2 a CYP3. V rámci jaterních mikrosomů z člověka, potkana, králíka a myši, byla ve všech případech zaznamenána aktivita v prostředí s NADH, a zároveň byl pozorován nárůst aktivity v prostředí s NADPH oproti NADH. Výsledky z jaterních mikrosomů tak jsou v souladu s předchozími výsledky. Nárůst aktivity při NADPH prokazuje stimulační vlastnosti CYB5, jež může být redukován CYPOR. Aktivita zaznamenána při NADH odpovídá předpokládanému přirozenému výskytu CYB5 a CYB5R v játrech příslušných organismů, a zároveň prokazuje schopnost CYB5 z části nahradit CYPOR při redukcí CYP.

Nárůst aktivity jaterních mikrosomů mezi jednotlivými organismy byl pozorován v pořadí: myš < potkan < králík < člověk. Podobně jako v případě diskutovaných výsledků substrátu Sudanu I lze i v tomto případě předpokládat roli mezidruhových rozdílů isoform CYP nebo mikrosomálních systémů obecně. V obou případech (Sudanu I i vandetanibu) byla pozorována nejvyšší aktivita u lidských isoform resp. mikrosomů, neboli několika násobný nárůst metabolické aktivity lidských jaterních mikrosomů oproti jaterním mikrosomům z potkana. Vysvětlení příčin těchto mezidruhových rozdílů je mimo rámce předkládané diplomové práce,

Jelikož se jedná o detailní studium katalytického mechanismu a aktivního centra příslušných mikrosomálních enzymů. Jak již bylo zmíněno (viz. kapitola 1.3), mezidruhové rozdíly jsou často důsledkem evolučního tlaku, na který se příslušný druh adaptuje. Proto je zde nutno podotknout, že ani jedna z obou studovaných molekul v různých organismech se přirozeně v prostředí nevyskytuje. Není zde proto legitimní předpokládat adaptaci druhů na konkrétní struktury Sudanu I a vandetanibu, ale spíše adaptaci na motivy struktur organických xenobiotik. Studium takových strukturních motivů, jež jsou preferenčně metabolizovány u příslušných druhů a důvody pro vznik těchto adaptací tak zůstává výzvou zejména pro obory evoluční biologie.

Při CYP1A1 nebyla pozorována stimulace aktivity v prostředí s CYB5. Při této isoformě byl zaznamenán přibližně dvojnásobný nárůst aktivity při použití NADPH namísto NADH. V prostředí s NADPH vykazoval CYP1A1 nižší aktivitu v přítomnosti s CYB5 než ve variantě bez CYB5. Takový výsledek není vůbec v souladu s dosavadními výsledky. Tento fenomén však již byl pozorován u jiných isoform CYP [90]. Byla postulována hypotéza, podle které CYB5 začne při určité hraniční koncentraci soutěžit s CYPOR o vazebné místo na CYP [159]. Za takových podmínek by bylo možno definovat „ideální“ poměr CYB5:CYPOR:CYP, při kterém by CYB5 vykazoval maximální stimulační vlastnosti. Zároveň, při následném navyšování množství CYB5 oproti ostatním složkám systému, by CYB5 začal aktivitu CYP inhibovat.

Při isoformě CYP1A2 v prostředí s NADPH byl pozorován mírný nárůst aktivity při vystavení CYB5, což je trend již pozorován i při ostatních substrátech a jež lze vysvětlit schopností CYPOR redukovat CYB5. Při použití NADH byla pozorována aktivita CYP1A2 ve variantě bez CYB5. Naopak při variantě obsahující CYB5 a NADH došlo k úplnému vymizení aktivity.

V případě isoform CYP2D1 a CYP2D2 nebyl pozorován žádný vliv CYB5 na jejich aktivitu a zároveň žádný vliv použití různých kofaktorů NADH nebo NADPH na jejich aktivitu. Z výsledků v rámci podrodiny CYP2D tedy lze shrnout, že CYB5 ani výměna kofaktorů nemá vliv na jejich aktivitu, a zároveň v jejich případě byla i v prostředí NADH zaznamenána aktivita, jež je oproti ostatním isoformám výrazně nižší. V případě CYP2C11 byl v prostředí s CYB5 zaznamenán řádový nárůst aktivity oproti ostatním isoformám z rodiny CYP2. Zároveň vedlo použití NADPH k přibližně deseti násobnému nárůstu hladiny metabolitu N-desmethylvandetanibu oproti variantě s NADH. Extrémní nárůst aktivity opět dokazuje omezenou schopnost NADH nahrazovat NADPH v redukci CYP.

Při CYP3A1 a CYP3A2 byl pozorován v prostředí s CYB5 přibližně dvojnásobný nárůst aktivity při použití kofaktoru NADPH namísto NADH. Tento trend pozorovaný i při ostatních výsledcích lze opět vysvětlit schopností CYPOR redukovat CYB5. Vliv CYB5 však v případě isoform CYP2C11, CYP3A1 a CYP3A2 z výsledků stanovit nelze, jelikož mikrosomy

s exprimovanými enzymy příslušných isoformů bez CYB5 nebyly v průběhu experimentu dostupné.

## 6 ZÁVĚR

---

V rámci předkládané diplomové práce byl prokázán vliv cytochromu b<sub>5</sub> na aktivitu cytochromu P450, přičemž tento vliv závisel na konkrétní isoformě CYP i na daném substrátu.

### Testosteron

- ❖ Byla prokázána schopnost NADH, CYB5 a CYB5R sloužit jako jediný zdroj elektronů pro CYP3A4.
- ❖ Byl pozorován stimulační efekt CYB5 v prostředí s NADPH u CYP3A4.
- ❖ Byla pozorována vyšší aktivita v prostředí s NADPH oproti NADH.

### Sudan I

- ❖ Byla prokázána schopnost NADH, CYB5 a CYB5R sloužit jako jediný zdroj elektronů pro CYP1A1.
- ❖ Byl pozorován stimulační efekt CYB5 v prostředí s NADPH u CYP1A1.
- ❖ Byla pozorována vyšší aktivita v prostředí s NADPH oproti NADH.
- ❖ Lidská isoforma CYP1A1 vykazovala vyšší aktivitu než isoforma potkaní.

### Aristolochová kyselina I

- ❖ V prostředí s NADH u jaterních mikrosomů potkana nebyl pozorován vznik žádného metabolitu.
- ❖ Nejvyšší aktivitu vykazovaly jaterní mikrosomy z potkanů premedikovaných benzo[*a*]pyrenem.

### Ellipticin

- ❖ Byla pozorována vyšší aktivita v prostředí s NADPH oproti NADH u jaterních mikrosomů potkana.
- ❖ Nejvyšší aktivitu vykazovaly jaterní mikrosomy z potkanů premedikovaných benzo[*a*]pyrenem.
- ❖ 9-hydroxyellipticin převládal u potkanů premedikovaných benzo[*a*]pyrenem a Sudanem I.
- ❖ 13-hydroxyellipticin převládal u kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitrem, fenobarbitalem a ethanolem.

### Vandetanib

- ❖ Byl pozorován stimulační efekt CYB5 v prostředí s NADPH u CYP1A2.
- ❖ Byl pozorován inhibiční efekt CYB5 v prostředí s NADPH u CYP1A1.
- ❖ Byla pozorována vyšší aktivita v prostředí s NADPH oproti NADH u CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11, CYP3A1 a CYP3A2.
- ❖ V prostředí s NADH a CYB5 u CYP1A2 nebyl pozorován vznik žádného metabolitu.
- ❖ Lidské jaterní mikrosomy vykazovaly vyšší aktivitu než jaterní mikrosomy králíka, potkana a myši (v tomto pořadí).

## ZDROJE

1. Klaus–Heinrich KJ Röhm. Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání. Grada Publishing a.s.; 2012. 516 p.
2. Lutz LH Mohr Klaus, Hein. Barevný atlas farmakologie - Překlad 4. anglického, zcela přepracovaného a rozšířeného vydání. Grada Publishing a.s.; 2012. 382 p.
3. Feldman D, Swarm RL, Becker J. Elimination of excess smooth endoplasmic reticulum after phenobarbital administration. *J Histochem Cytochem.* 1980 Sep;28(9):997–1006.
4. Böhm N, Moser B. [Reversible hyperplasia and hypertrophy of the mouse liver induced by a functional charge with phenobarbital]. *Beitr Pathol.* 1976 May;157(3):283–300.
5. Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S, Schneider L. The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab Rev.* 2005;37(3):405–42.
6. Nassar A-E. Biotransformation and Metabolite Elucidation of Xenobiotics: Characterization and Identification. 2010.
7. Parkinson A, Ogilvie BW. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poisons. 2008. p. 161–305. (7).
8. Collins SL, Patterson AD. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Jan;10(1):19–32.
9. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1993 Feb;12(1):1–51.
10. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys.* 1958 Oct;77(2):493–509.
11. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1958 Jun;75(2):376–86.
12. Omura T, Sato R. The carbon monoxide - binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification, and properties. 1964;(239):2379–85.
13. Stuehr DJ, Ikeda-Saito M. Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like hemoproteins that contain a flavin semiquinone radical. *J Biol Chem.* 1992 Oct 15;267(29):20547–50.
14. Griffin BW. Peroxidases in Chemistry and Biology, Vol. II,. In CRC Press, Boca Raton, Florida; 1991. p. 85–137.
15. Kim IC, Deal WC. Isolation and properties of a new, soluble, hemoprotein (H-450) from pig liver. *Biochemistry.* 1976 Nov 2;15(22):4925–30.
16. Nebert DW, Nelson DR. [1] P450 gene nomenclature based on evolution. In: *Methods in Enzymology.* Academic Press; 1991. p. 3–11. (Cytochrome P450; vol. 206).
17. Chothia C. Protein families in the metazoan genome. *Dev Suppl.* 1994;27–33.

18. Nelson DR, Strobel HW. Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol.* 1987 Nov;4(6):572–93.
19. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab.* 2002 Dec;3(6):561–97.
20. Bar-Nun S, Kreibich G, Adesnik M, Alterman L, Negishi M, Sabatini DD. Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980 Feb;77(2):965–9.
21. Sakaguchi M, Mihara K, Sato R. Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Jun;81(11):3361–4.
22. Chen CD, Doray B, Kemper B. A conserved proline-rich sequence between the N-terminal signal-anchor and catalytic domains is required for assembly of functional cytochrome P450 2C2. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Feb 15;350(2):233–8.
23. Sakaguchi M, Mihara K, Sato R. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J.* 1987 Aug;6(8):2425–31.
24. Shimozawa O, Sakaguchi M, Ogawa H, Harada N, Mihara K, Omura T. Core glycosylation of cytochrome P-450(arom). Evidence for localization of N terminus of microsomal cytochrome P-450 in the lumen. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):21399–402.
25. Kusano K, Sakaguchi M, Kagawa N, Waterman MR, Omura T. Microsomal p450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded structure. *J Biochem.* 2001 Feb;129(2):259–69.
26. Ogishima T, Okada Y, Omura T. Presence of a prepiece at the NH<sub>2</sub>-terminal end of pre-cytochrome P-450(SCC) peptide. *J Biochem.* 1984 May;95(5):1525–8.
27. Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y, Okada Y, Sogawa K, Hirose T, Inayama S, Omura T. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Aug;81(15):4647–51.
28. Roise D, Schatz G. Mitochondrial presequences. *J Biol Chem.* 1988 Apr 5;263(10):4509–11.
29. Ou WJ, Ito A, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y, Omura T. Processing-independent in vitro translocation of cytochrome P-450(SCC) precursor across mitochondrial membranes. *J Biochem.* 1986 Nov;100(5):1287–96.
30. Ou WJ, Ito A, Okazaki H, Omura T. Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J.* 1989 Sep;8(9):2605–12.
31. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol.* 1987 Jun 5;195(3):687–700.
32. Watanabe T, Horie S. Studies on P-450. X. On the coordination structure of hemoprotein P-450. *J Biochem.* 1976 Apr;79(4):829–40.
33. Sun Y, Zeng W, Benabbas A, Ye X, Denisov I, Sligar SG, Du J, Dawson JH, Champion PM. Investigations of heme ligation and ligand switching in cytochromes p450 and p420. *Biochemistry.* 2013 Aug 27;52(34):5941–51.



34. Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol*. 2001 Nov;41(11):1149–79.
35. Hryciay EG, Bandiera SM. Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes. *Adv Exp Med Biol*. 2015;851:1–61.
36. Daujat M, Clair P, Astier C, Fabre I, Pineau T, Yerle M, Gellin J, Maurel P. Induction, regulation and messenger half-life of cytochromes P450 IA1, IA2 and IIIA6 in primary cultures of rabbit hepatocytes. CYP 1A1, 1A2 and 3A6 chromosome location in the rabbit and evidence that post-transcriptional control of gene IA2 does not involve mRNA stabilization. *Eur J Biochem*. 1991 Sep 1;200(2):501–10.
37. Tompkins LM, Wallace AD. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(4):176–81.
38. Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Klierer SA, Redinbo MR. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science*. 2001 Jun 22;292(5525):2329–33.
39. Iyer M, Reschly EJ, Krasowski MD. Functional evolution of the pregnane X receptor. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006 Jun;2(3):381–97.
40. Kretschmer XC, Baldwin WS. CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem Biol Interact*. 2005 Aug 15;155(3):111–28.
41. Xu RX, Lambert MH, Wisely BB, Warren EN, Weinert EE, Waitt GM, Williams JD, Collins JL, Moore LB, Willson TM, Moore JT. A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXR $\alpha$  Heterodimer. *Molecular Cell*. 2004 Dec 22;16(6):919–28.
42. Huang W, Zhang J, Washington M, Liu J, Parant JM, Lozano G, Moore DD. Xenobiotic Stress Induces Hepatomegaly and Liver Tumors via the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor. *Mol Endocrinol*. 2005 Jun 1;19(6):1646–53.
43. Jones KW, Whitlock JP. Functional analysis of the transcriptional promoter for the CYP1A1 gene. *Mol Cell Biol*. 1990 Oct;10(10):5098–105.
44. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Aug 15;464(2):207–12.
45. Gonzalez FJ, Yu A-M. Cytochrome P450 and Xenobiotic Receptor Humanized Mice. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:41–64.
46. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:309–34.
47. Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev*. 1994;26(1–2):165–83.
48. Lewis DF, Ioannides C, Parke DV. Molecular modelling of cytochrome CYP1A1: a putative access channel explains differences in induction potency between the isomers benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene, and 2- and 4-acetylaminofluorene. *Toxicol Lett*. 1994 May;71(3):235–43.
49. Nebert DW. The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Crit Rev Toxicol*. 1989;20(3):153–74.

50. Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ. Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*. 2001 Feb;11(1):1–6.
51. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996 Feb;6(1):1–42.
52. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem*. 2004 Jun 4;279(23):23847–50.
53. Nelson DR. Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol*. 1998;107:15–24.
54. Nelson DR. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Jan 1;409(1):18–24.
55. Almeida D, Maldonado E, Khan I, Silva L, Gilbert MTP, Zhang G, Jarvis ED, O'Brien SJ, Johnson WE, Antunes A. Whole-Genome Identification, Phylogeny, and Evolution of the Cytochrome P450 Family 2 (CYP2) Subfamilies in Birds. *Genome Biol Evol*. 2016 Mar 14;8(4):1115–31.
56. Lewis DFV. Homology modelling of human CYP2 family enzymes based on the CYP2C5 crystal structure. *Xenobiotica*. 2002 Apr;32(4):305–23.
57. Dalet-Beluche I, Boulenc X, Fabre G, Maurel P, Bonfils C. Purification of two cytochrome P450 isozymes related to CYP2A and CYP3A gene families from monkey (baboon, *Papio papio*) liver microsomes. Cross reactivity with human forms. *Eur J Biochem*. 1992 Mar 1;204(2):641–8.
58. Donato MT, Viitala P, Rodriguez-Antona C, Lindfors A, Castell JV, Raunio H, Gómez-Lechón MJ, Pelkonen O. CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various *in vivo* inducers. *Drug Metab Dispos*. 2000 Nov;28(11):1321–6.
59. Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5;274(10):6043–6.
60. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol*. 2000 Dec;58(6):1441–50.
61. Mimura M, Baba T, Yamazaki H, Ohmori S, Inui Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Shimada T. Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 1993 Dec;21(6):1048–56.
62. Kumagai Y, Lin LY, Hiratsuka A, Narimatsu S, Suzuki T, Yamada H, Oguri K, Yoshimura H, Cho AK. Participation of cytochrome P450-2B and -2D isozymes in the demethylation of methylenedioxymethamphetamine enantiomers by rats. *Mol Pharmacol*. 1994 Feb;45(2):359–65.
63. Edwards RJ, Adams DA, Watts PS, Davies DS, Boobis AR. Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans. *Biochem Pharmacol*. 1998 Aug 1;56(3):377–87.
64. Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi J-M, Pichard-Garcia L, Vilarem M-J, Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):209–17.

65. Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrère N, Maurel P. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos.* 2001 Mar;29(3):242–51.
66. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SMG, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 2004 Jan;14(1):1–18.
67. Lieber CS. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev.* 1997 Apr;77(2):517–44.
68. Thompson EE, Kuttub-Boulos H, Witonsky D, Yang L, Roe BA, Di Rienzo A. CYP3A Variation and the Evolution of Salt-Sensitivity Variants. *Am J Hum Genet.* 2004 Dec;75(6):1059–69.
69. Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA, Wojnowski L. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics.* 2001 Mar;11(2):111–21.
70. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:389–430.
71. Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T, Kato R, Kanakubo Y. Purification and properties of cytochrome P-450 from homogenates of human fetal livers. *Arch Biochem Biophys.* 1985 Aug 15;241(1):275–80.
72. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Bäärnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4. *J Med Chem.* 1991 Jun;34(6):1838–44.
73. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997 May;29(1–2):413–580.
74. Miao J, Jin Y, Marunde RL, Kim S, Quinney S, Radovich M, Li L, Hall SD. Association of Genotypes of the CYP3A Cluster with Midazolam Disposition In Vivo. *Pharmacogenomics J.* 2009 Oct;9(5):319–26.
75. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmüller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2001 Dec;11(9):773–9.
76. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):383–91.
77. Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: The Xenobiotic-Sensing Receptors. *Steroids.* 2007 Mar;72(3):231–46.
78. Bolt HM. Rifampicin, a keystone inducer of drug metabolism: from Herbert Remmer's pioneering ideas to modern concepts. *Drug Metab Rev.* 2004 Oct;36(3–4):497–509.
79. Achour B, Barber J, Rostami-Hodjegan A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes and their intercorrelations: a meta-analysis. *Drug Metab Dispos.* 2014 Aug;42(8):1349–56.

80. Velick SF, Strittmatter P. The oxidation-reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome. *J Biol Chem.* 1956;221:265–75.
81. Vergères G, Waskell L. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie.* 1995;77:604–20.
82. Porter TD. The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J Biochem Mol Toxicol.* 2002;16(6):311–6.
83. Sobrado P, Goren MA, James D, Amundson CK, Fox BG. A Protein Structure Initiative approach to expression, purification, and in situ delivery of human cytochrome b5 to membrane vesicles. *Protein Expr Purif.* 2008 Apr;58(2):229–41.
84. Clarke TA, Im S-C, Bidwai A, Waskell L. The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b5 in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36809–18.
85. Oshino N, Imai Y, Sato R. A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J Biochem.* 1971 Jan;69(1):155–67.
86. Enoch HG, Strittmatter P. Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem.* 1979 Sep 25;254(18):8976–81.
87. Guengerich FP. Reduction of cytochrome b5 by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Aug 15;440(2):204–11.
88. Chiang JY. Interaction of purified microsomal cytochrome P-450 with cytochrome b5. *Arch Biochem Biophys.* 1981 Oct 15;211(2):662–73.
89. Schenkman JB, Jansson I. Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5. *Drug Metab Rev.* 1999 May;31(2):351–64.
90. Schenkman JB, Jansson I. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther.* 2003 Feb;97(2):139–52.
91. Stiborová M, Indra R, Moserová M, Frei E, Schmeiser HH, Kopka K, Philips DH, Arlt VM. NADH:Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 Can Act as Sole Electron Donors to Human Cytochrome P450 1A1-Mediated Oxidation and DNA Adduct Formation by Benzo[a]pyrene. *Chem Res Toxicol.* 2016 Aug 15;29(8):1325–34.
92. Kotrbová V, Aimová D, Ingr M, Borek-Dohalská L, Martínek V, Stiborová M. Preparation of a biologically active apo-cytochrome b5 via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2009 Aug;66(2):203–9.
93. Elahian F, Sepehrizadeh Z, Moghimi B, Mirzaei SA. Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2014 Jun;34(2):134–43.
94. Pietrini G, Carrera P, Borgese N. Two transcripts encode rat cytochrome b5 reductase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Oct;85(19):7246–50.
95. Mirzaei SA, Yazdi MT, Sepehrizadeh Z. Secretory expression and purification of a soluble NADH cytochrome b5 reductase enzyme from *Mucor racemosus* in *Pichia pastoris* based on codon usage adaptation. *Biotechnol Lett.* 2010 Nov;32(11):1705–11.

96. Rhoads K, Sacco JC, Drescher N, Wong A, Trepanier LA. Individual variability in the detoxification of carcinogenic arylhydroxylamines in human breast. *Toxicol Sci.* 2011 Jun;121(2):245–56.
97. Sangeetha N, Viswanathan P, Balasubramanian T, Nalini N. Colon cancer chemopreventive efficacy of silibinin through perturbation of xenobiotic metabolizing enzymes in experimental rats. *Eur J Pharmacol.* 2012 Jan 15;674(2–3):430–8.
98. Percy MJ, Crowley LJ, Davis CA, McMullin MF, Savage G, Hughes J, McMahon C, Quinn RJM, Smith O, Barber MJ, Lappin TRJ. Recessive congenital methaemoglobinaemia: functional characterization of the novel D239G mutation in the NADH-binding lobe of cytochrome b5 reductase. *Br J Haematol.* 2005 Jun;129(6):847–53.
99. Shirabe K, Nagai T, Yubisui T, Takeshita M. Electrostatic interaction between NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 studied by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Apr 23;1384(1):16–22.
100. Kimura S, Kawamura M, Iyanagi T. Role of Thr(66) in porcine NADH-cytochrome b5 reductase in catalysis and control of the rate-limiting step in electron transfer. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3580–9.
101. Bewley MC, Davis CA, Marohnic CC, Taormina D, Barber MJ. The structure of the S127P mutant of cytochrome b5 reductase that causes methemoglobinemia shows the AMP moiety of the flavin occupying the substrate binding site. *Biochemistry.* 2003 Nov 18;42(45):13145–51.
102. Marohnic CC, Bewley MC, Barber MJ. Engineering and characterization of a NADPH-utilizing cytochrome b5 reductase. *Biochemistry.* 2003 Sep 30;42(38):11170–82.
103. Kimura S, Nishida H, Iyanagi T. Effects of flavin-binding motif amino acid mutations in the NADH-cytochrome b5 reductase catalytic domain on protein stability and catalysis. *J Biochem.* 2001 Oct;130(4):481–90.
104. Marohnic CC, Crowley LJ, Davis CA, Smith ET, Barber MJ. Cytochrome b5 reductase: role of the si-face residues, proline 92 and tyrosine 93, in structure and catalysis. *Biochemistry.* 2005 Feb 22;44(7):2449–61.
105. Dalton L, Demerac S, Elmes B, Loder J, Swan J, Teitei T. Synthesis of the tumour-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-methoxyellipticine, and related pyrido[4,3-b]carbazoles. *Aust J Chem.* 1967;20:2715–27.
106. Acton EM, Narayanan VL, Risbood PA, Shoemaker RH, Vistica DT, Boyd MR. Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors in vitro. *J Med Chem.* 1994 Jul 8;37(14):2185–9.
107. Arguello F, Alexander MA, Greene JF, Stinson SF, Jordan JL, Smith EM, Kalavar NT, Alvord WG, Klabansky RL, Sausville EA. Preclinical evaluation of 9-chloro-2-methylellipticinium acetate alone and in combination with conventional anticancer drugs for the treatment of human brain tumor xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998 Jan;124(1):19–26.
108. Auclair C. Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Nov 15;259(1):1–14.
109. Stiborová M, Sejbál J, Borek-Dohalská L, Aimová D, Poljaková J, Forsterová K, Rupertová M, Wiesner J, Hudeček J, Wiessler M, Frei E. The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8374–80.

110. Kotrbová V, Aimová D, Brezinová A, Janouchová K, Poljaková J, Frei E, Stiborová M. Cytochromes P450 reconstituted with NADPH: P450 reductase mimic the activating and detoxicating metabolism of the anticancer drug ellipticine in microsomes. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Dec;27 Suppl 2:18–22.
111. Stiborová M, Borek-Dohalská L, Aimová D, Kotrbová V, Kukacková K, Janouchová K, Rupertová M, Ryslavá H, Hudeček J, Frei E. Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes - similarity between human and rat systems. *Gen Physiol Biophys.* 2006 Sep;25(3):245–61.
112. Mrízová I, Moserova M, Hodek P, Kizek R, Frei E, Stiborová M. The anticancer drug ellipticine induces cytochromes p450 1a1, 1a2 and 3a, cytochrome b5 and nadph: Cytochrome p450 oxidoreductase in rat liver, kidney and lung. *International Journal of Electrochemical Science.* 2013 Feb 1;8:1586–97.
113. Huang Y, Hu N, Gao X, Yan Z, Li S, Jing W, Yan R. Alterations of testosterone metabolism in microsomes from rats with experimental colitis induced by dextran sulfate sodium. *Chemico-Biological Interactions.* 2015 May 5;232:38–48.
114. Sadakierska-Chudy A, Haduch A, Rysz M, Gołembiowska K, Daniel WA. The role of brain noradrenergic system in the regulation of liver cytochrome P450 expression. *Biochem Pharmacol.* 2013 Sep 15;86(6):800–7.
115. Canistro D, Barillari J, Melega S, Sapone A, Iori R, Speroni E, Paolini M. Black cabbage seed extract affects rat Cyp-mediated biotransformation: Organ and sex related differences. *Food and Chemical Toxicology.* 2012 Aug 1;50(8):2612–21.
116. Whalley PM, Bakes D, Grime K, Weaver RJ. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the separation of hydroxylated testosterone metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 2001 Sep 5;760(2):281–8.
117. Masubuchi Y, Enoki K, Horie T. Down-Regulation of Hepatic Cytochrome P450 Enzymes in Rats with Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis. *Drug Metab Dispos.* 2008 Mar 1;36(3):597–603.
118. Sohlenius-Sternbeck A-K, Orzechowski A. Characterization of the rates of testosterone metabolism to various products and of glutathione transferase and sulfotransferase activities in rat intestine and comparison to the corresponding hepatic and renal drug-metabolizing enzymes. *Chemico-Biological Interactions.* 2004 Jun 30;148(1):49–56.
119. Bořek-Dohalská L, Hodek P, Hudeček J, Stiborová M. Experimental approaches to evaluate activities of cytochromes P450 3A. *Interdiscip Toxicol.* 2008 Sep;1(2):155–9.
120. Herzog N, Katzenberger N, Martin F, Schmidtke K-U, K J-H. Generation of cytochrome P450 3A4-overexpressing HepG2 cell clones for standardization of hepatocellular testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation activity. *Journal of Cellular Biotechnology.* 2015 Jan 1;1(1):15–26.
121. Waterman MR, Keeney DS. Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. *Horm Res.* 1992;38(5–6):217–21.
122. Induction and mitochondrial localization of cytochrome P450scc system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells. *J Cell Biol.* 1990 Oct 1;111(4):1373–81.
123. Hall PF. Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids.* 1986 Oct;48(3–4):131–96.

124. Lee-Robichaud P, Wright JN, Akhtar ME, Akhtar M. Modulation of the activity of human 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b5: endocrinological and mechanistic implications. *Biochem J.* 1995 Jun 15;308(Pt 3):901–8.
125. Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod.* 2018 Jul;99(1):101–11.
126. Stiborová M, Martínek V, Semanská M, Hodek P, Dračinský M, Cvačka J, Schmeiser HH, Frei E. Oxidation of the carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxy-naphthalene (Sudan I) by cytochromes P450 and peroxidases: a comparative study. *Interdiscip Toxicol.* 2009 Sep;2(3):195–200.
127. Martínek V, Stiborová M. Metabolism of Carcinogenic Azo Dye Sudan I by Rat, Rabbit, Minipig and Human Hepatic Microsomes. *Collect Czech Chem Commun.* 2002;67(12):1883–98.
128. Vozniak JM, Jacobs JM. Vandetanib. *J Adv Pract Oncol.* 2012;3(2):112–6.
129. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997 Feb;18(1):4–25.
130. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Jun;31(6):637–43.
131. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep 1;12(17):5018–22.
132. Morgillo F, Martinelli E, Troiani T, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Antitumor Activity of Sorafenib in Human Cancer Cell Lines with Acquired Resistance to EGFR and VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *PLoS One* [Internet]. 2011 Dec 9 [cited 2020 Mar 17];6(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3235154/>
133. Martin P, Oliver S, Kennedy S-J, Partridge E, Hutchison M, Clarke D, Giles P. Pharmacokinetics of vandetanib: three phase I studies in healthy subjects. *Clin Ther.* 2012 Jan;34(1):221–37.
134. AstraZeneca Pty Ltd. Australian Public Assessment Report for vandetanib. In: Caprelsa. Canberra, Australia; 2013. p. 1–73.
135. Attwa MW, Kadi AA, Darwish HW, Amer SM, Al-shakliah NS. Identification and characterization of in vivo, in vitro and reactive metabolites of vandetanib using LC–ESI–MS/MS. *Chem Cent J.* 2018 Sep 24;12.
136. Indra R, Pompach P, Martínek V, Takáčsová P, Vavrová K, Heger Z, Adam V, Eckschlager T, Kopečková K, Arlt VM, Stiborová M. Identification of Human Enzymes Oxidizing the Anti-Thyroid-Cancer Drug Vandetanib and Explanation of the High Efficiency of Cytochrome P450 3A4 in its Oxidation. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 10;20(14).
137. Kumar V, Poonam null, Prasad AK, Parmar VS. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Nat Prod Rep.* 2003 Dec;20(6):565–83.
138. Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MSJ. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2--a global assessment based on bibliographic sources. *J Ethnopharmacol.* 2009 Aug 17;125(1):108–44.
139. Mengs U. Tumour induction in mice following exposure to aristolochic acid. *Arch Toxicol.* 1988;61(6):504–5.

140. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, De Pauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med*. 2000 Jun 8;342(23):1686–92.
141. Cosyns J-P. Aristolochic acid and “Chinese herbs nephropathy”: a review of the evidence to date. *Drug Saf*. 2003;26(1):33–48.
142. Stiborová M, Frei E, Arlt VM, Schmeiser HH. Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutat Res*. 2008 Feb;658(1–2):55–67.
143. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*. 2002 Jul;17(4):265–77.
144. Pfau W, Schmeiser HH, Wiessler M. 32P-postlabelling analysis of the DNA adducts formed by aristolochic acid I and II. *Carcinogenesis*. 1990 Sep;11(9):1627–33.
145. Martinek V, Kubickova B, Arlt VM, Frei E, Schmeiser HH, Hudecek J, Stiborova M. Comparison of activation of aristolochic acid I and II with NADPH:quinone oxidoreductase, sulphotransferases and N-acetyltransferases. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32 Suppl 1:57–70.
146. Stiborová M, Frei E, Sopko B, Sopková K, Marková V, Lanková M, Kumstýrová T, Wiessler M, Schmeiser HH. Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Carcinogenesis*. 2003 Oct;24(10):1695–703.
147. Stiborová M, Frei E, Hodek P, Wiessler M, Schmeiser HH. Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10;113(2):189–97.
148. Stiborová M, Levová K, Bárta F, Shi Z, Frei E, Schmeiser HH, Nebert DW, Phillips DH, Arlt VM. Bioactivation versus detoxication of the urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicol Sci*. 2012 Feb;125(2):345–58.
149. Shibutani S, Bonala RR, Rosenquist T, Rieger R, Suzuki N, Johnson F, Miller F, Grollman AP. Detoxification of aristolochic acid I by O-demethylation: less nephrotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid Ia in rodents. *Int J Cancer*. 2010 Sep 1;127(5):1021–7.
150. Chan W, Cui L, Xu G, Cai Z. Study of the phase I and phase II metabolism of nephrotoxin aristolochic acid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(11):1755–60.
151. Martínek V, Bárta F, Hodek P, Frei E, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M. Comparison of the oxidation of carcinogenic aristolochic acid I and II by microsomal cytochromes P450 in vitro: experimental and theoretical approaches. *Monatsh Chem*. 2017;148(11):1971–81.
152. Maezawa K, Matsunaga T, Takezawa T, Kanai M, Ohira S, Ohmori S. Cytochrome P450 3A5 Gene Expression and Testosterone 6 $\beta$ -Hydroxylase Activity in Human Fetal Membranes and Placenta at Full Term. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2010;33:249–54.
153. Panin LE, Usynin IF. [Induction of cytochrome P-450 and b5 in hepatocyte subpopulations with phenobarbital]. *Biull Eksp Biol Med*. 1986 Jun;101(6):695–7.
154. Dračínská H, Bárta F, Levová K, Hudecová A, Moserová M, Schmeiser HH, Kopka K, Frei E, Arlt VM, Stiborová M. Induction of cytochromes P450 1A1 and 1A2 suppresses formation of DNA adducts by carcinogenic aristolochic acid I in rats in vivo. *Toxicology*. 2016 Feb 17;344–346:7–18.



155. Ma Y, Liu D. Activation of pregnane X receptor by pregnenolone 16  $\alpha$ -carbonitrile prevents high-fat diet-induced obesity in AKR/J mice. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38734.
156. Indra R, Pompach P, Vavrová K, Jáklová K, Heger Z, Adam V, Eckschlager T, Kopečková K, Arlt VM, Stiborová M. Cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase enzymes are responsible for differential oxidation of the anti-thyroid-cancer drug vandetanib by human and rat hepatic microsomal systems. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020 Feb;74:103310.
157. Vázquez-Gómez G, Rocha-Zavaleta L, Rodríguez-Sosa M, Petrosyan P, Rubio-Lightbourn J. Benzo[a]pyrene activates an AhR/Src/ERK axis that contributes to CYP1A1 induction and stable DNA adducts formation in lung cells. *Toxicol Lett*. 2018 Jun 1;289:54–62.
158. Levová K, Moserová M, Kotrbová V, Šulc M, Henderson CJ, Wolf CR, Phillips DH, Frei E, Schmeiser HH, Mareš J, Arlt VM, Stiborová M. Role of Cytochromes P450 1A1/2 in Detoxication and Activation of Carcinogenic Aristolochic Acid I: Studies with the Hepatic NADPH:Cytochrome P450 Reductase Null (HRN) Mouse Model. *Toxicol Sci*. 2011 May 1;121(1):43–56.
159. Bart AG, Scott EE. Structural and functional effects of cytochrome b5 interactions with human cytochrome P450 enzymes. *J Biol Chem*. 2017 Dec 22;292(51):20818–33.