

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE  
KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium aktivačního a detoxikačního metabolismu  
protinádorového léčiva ellipticinu systémem  
cytochromů P450 *in vitro* a *in vivo***

Doktorská disertační práce

RNDr. Věra Kotrbová

školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2008

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem pracovala samostatně pod vedením školitelky Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

.....  
RNDr. Věra Kotrbová

## PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Prohlašuji, že RNDr. Věra Kotrbová rozhodujícím způsobem (30-90%) přispěla ke vzniku všech 8 článků, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne .....

.....  
Prof. RNDr. Marie Stiborová DrSc.

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za vynikající odborné vedení, všestrannou pomoc a laskavý přístup při vypracovávání této práce. Děkuji také RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. a RNDr. Martinu Dračínskému PhD. za hmotnostní analýzy, NMR měření a syntézu derivátů ellipticinu. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za potřebné rady, pomoc a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Práce byla řešena jako součást grantových vědeckých projektů podporovaných GA ČR (203/06/0329), MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M4635608802) a GA UK (258188)

## OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>4</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>9</b>
1.1 ETIOLOGIE A PATOGENEZE NÁDOROVÉHO PROCESU .....	10
1.2 LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ .....	12
1.2.1 Chemoterapie .....	12
1.2.1.1 Předpoklady pro účinnost chemoterapie v klinické praxi .....	13
1.2.2 Mechanismus účinku konvenčních cytostatik .....	14
1.2.3 Rezistence na cytostatika .....	14
1.3 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK .....	15
1.4 MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM (MFO SYSTÉM) .....	16
1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa .....	17
1.4.2 Cytochrom P450 .....	19
1.4.2.1 Spinové formy cytochromu P450 .....	21
1.4.2.2 Enzymové funkce cytochromu P450 .....	21
1.4.2.2.1 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce .....	22
1.4.2.3 Nomenklatura cytochromů P450 .....	23
1.4.2.4 Variabilita v aktivitě cytochromů P450 .....	25
1.4.2.4.1 Genetický polymorfismus cytochromů P450 .....	25
1.4.2.4.2 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu .....	25
1.4.2.4.3 Regulace cytochromů P450 fosforylací .....	27
1.4.3 Cytochrom b <sub>5</sub> .....	28
1.4.3.1 Fyziologické funkce cytochromu b <sub>5</sub> .....	28
1.4.3.2 Mechanismy působení cytochromu b <sub>5</sub> .....	29
1.4.3.3 Struktura cytochromu b <sub>5</sub> .....	30
1.5 ELLIPTICIN .....	31
1.5.1 Farmakokinetika ellipticinu .....	32
1.5.2 Mechanismy účinku ellipticinu .....	32
1.5.3 Biotransformace ellipticinu .....	33
1.5.4 Tvorba aduktů ellipticinu s DNA .....	34
<b>2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>36</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>38</b>
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE .....	38
3.2 ENZYMOVÉ PREPARÁTY .....	40
3.2.1 Izolace mikrosomů a purifikace mikrosomálních enzymů .....	40
3.3 METODY STANOVENÍ KONCENTRACÍ A AKTIVIT VYBRANÝCH ENZYMŮ ...	42
3.4 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY .....	43
3.4.1 SDS elektroforéza .....	43
3.4.2 Metoda „Western blotting“ .....	43
3.4.3 Agarosová elektroforéza .....	43
3.5 STUDIUM METABOLISMU ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 .....	44

---

3.5.1	Oxidace ellipticinu mikrosomy.....	44
3.5.2	Oxidace ellipticinu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému.....	44
3.6	IZOLACE SYNTETIZOVANÉHO 13-HYDROXYELLIPTICINU .....	45
3.7	PŘÍPRAVA ADUKTU 13-HYDROXYELLIPTICINU S DEOXYGUANOSINEM.....	45
3.8	PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍHO APO-CYTOCHROMU B <sub>5</sub> .....	46
3.8.1	Návrh a syntéza genu pro membránovou formu králíčho cytochromu b <sub>5</sub> ....	46
3.8.2	Transformace kompetentních buněk.....	47
3.8.3	Produkce proteinu .....	47
3.8.4	Purifikace apo-cytochromu b <sub>5</sub> z bakteriálních buněk .....	48
3.8.4.1	Izolace membránové frakce.....	48
3.8.4.2	Solubilizace cytochromu b <sub>5</sub> z membrán.....	48
3.8.4.3	Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B.....	48
3.8.5	Spektrální charakterizace apo-cytochromu b <sub>5</sub> .....	49
3.9	METODA 32P-POSTLABELING .....	49
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>50</b>
4.1	METABOLISMUS ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450.....	50
4.1.1	Metabolismus ellipticinu mikrosomy člověka, potkana, králíka a myši.....	51
4.1.2	Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému ...	56
4.2	AKTIVACE ELLIPTICINU ZA TVORBY ADUKTŮ S DNA <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i> .	58
4.2.1	Izolace a částečná charakterizace aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosinem v DNA .....	60
4.3	CYTOCHROMY P450 AKTIVUJÍCÍ ELLIPTICIN <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i> .....	63
4.4	VLIV CYTOCHROMU B <sub>5</sub> NA OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 1A1 A 1A2.....	64
4.4.1	Mechanismus působení cytochromu b <sub>5</sub> .....	68
4.4.1.1	Příprava apo-cytochromu b <sub>5</sub> .....	69
4.4.1.2	Vliv cytochromu b <sub>5</sub> , apo-cytochromu b <sub>5</sub> a dalších proteinů na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2.....	71
<b>5</b>	<b>SOUHRN A ZÁVĚR.....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>77</b>
	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>87</b>

**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

<b>AC</b>	aceton
<b>AhR</b>	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
<b>Arnt</b>	jaderný heterodimerizační partner Ah receptoru („AhR-nuclear translocator“)
<b>AIDS</b>	syndrom získané imunodeficiencie (acquired immune deficiency syndrome)
<b>BCA</b>	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
<b>BCIP/NBT</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát /nitro blue tetrazolium
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CAR</b>	„constitutive androstane receptor“
<b>CHAPS</b>	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát
<b>CM-Sepharosa CL6B</b>	karboxymethyl-Sepharosa CL6B
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>cyt c</b>	cytochrom c
<b>cyt b<sub>5</sub></b>	cytochrom b <sub>5</sub>
<b>Da</b>	dalton
<b>DDTC</b>	diethyldithiokarbamát
<b>DEAE-Sepharosa CL6B</b>	diethylaminoethyl-Sepharosa CL6B
<b>DLPC</b>	dilauroylfosfatidylcholin
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EC</b>	číselný kód enzymu
<b>EDTA Na<sub>2</sub></b>	ethylendiamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli
<b>EtOH</b>	ethanol
<b>FAD</b> <b>/FADH/FADH<sub>2</sub></b>	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma) /semichinoidní radikál/hydrochinon
<b>FMN</b> <b>/FMNH/FMNH<sub>2</sub></b>	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma) /semichinoidní radikál/hydrochinon
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>HEPES</b>	sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny
<b>HIV</b>	„human immunodeficiency virus“
<b>HPLC</b>	vysokotlaká kapalinová chromatografie („high-pressure liquid chromatography“)
<b>IARC</b>	mezinárodní institut pro výzkum rakoviny („International Agency for

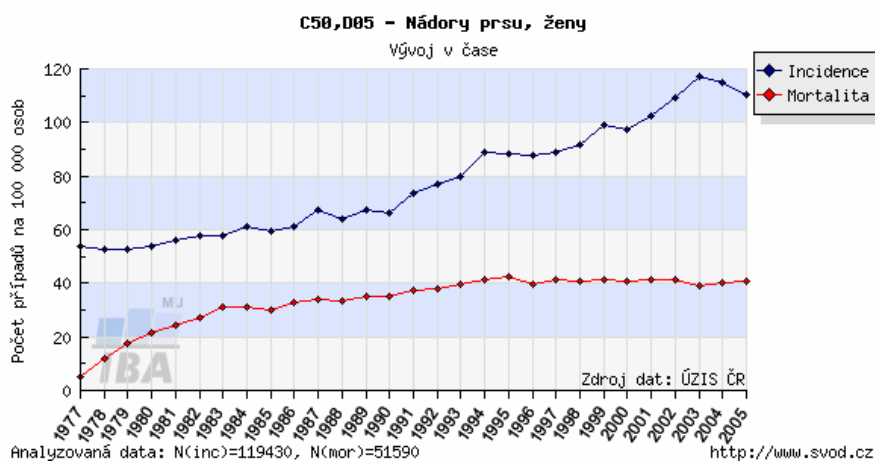
	Research on Cancer“)
<b>IgY</b>	imunoglobulin třídy Y
<b>i. p.</b>	intraperitoneální aplikace
<b>3-IPMDIA</b>	3-isopropenyl-3-methyldiamantan
<b>IPTG</b>	isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid
<b>K</b>	mikrosomy izolované z nepremedikovaných zvířat
<b>M</b>	mol/l
<b>M1-M5</b>	metabolity ellipticinu dle eluce při HPLC
<b>MALDI-TOF</b>	„matrix assisted laser desorption ionization-time of flight“
<b>MFO</b>	systém monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases“)
<b>NaAc</b>	octan sodný
<b>NAD<sup>+</sup> (NADH)</b>	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (redukovaný)
<b>NADP<sup>+</sup> (NADPH)</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
<b>NADPH-GS</b>	NADPH-generující systém
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>NAT</b>	N-acetyltransferasa
<b>PAU</b>	polycyklické aromatické uhlovodíky
<b>PAPS</b>	2' (nebo 3')-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
<b>PB</b>	fenobarbital
<b>PBS</b>	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl - izotonický roztok („Phosphate Buffer with Salt“)
<b>PCN</b>	pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril (5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on-16 $\alpha$ -karbonitril)
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>PPAR</b>	„peroxisome proliferator-activated receptor“
<b>PVDF</b>	polyvinylidenfluorid
<b>PXR</b>	„pregnane X receptor“
<b>RAL</b>	podíl modifikovaných nukleotidů z celkového počtu nukleotidů („relative adduct labelling“)
<b>RH</b>	substrát
<b>RIF</b>	rifampicin
<b>mRNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina („messenger ribonucleic acid“)
<b>ROH</b>	hydroxylovaný produkt
<b>R*OOH</b>	organický peroxid
<b>RPM</b>	počet otáček za minutu
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SOD</b>	superoxid dismutasa
<b>SULT</b>	sulfotransferasa



<b>SXR</b>	„steroid xenobiotic receptor“
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	standardní jednotka enzymové aktivity
<b>UDP</b>	uridindifosfát
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>VIS</b>	oblast vlnových délek viditelného světla
<b>v/v</b>	objemový zlomek
<b>w/v</b>	hmotnostní zlomek
<b>XRE</b>	kosensus sekvence „xenobiotic responsive element“
<b><math>\alpha</math>-NF</b>	$\alpha$ -naftoflavon
<b><math>\beta</math>-NF</b>	$\beta$ -naftoflavon

# 1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

Rakovina je jednou z nejrozšířenějších chorob. Tato nemoc patří mezi nejčastější příčiny úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních a její výskyt stále stoupá. *Obrázek 1* pro ilustraci ukazuje každoročně se zvyšující výskyt nově vzniklých nádorových onemocnění prsu u žen.



## Obrázek 1

Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro diagnózu karcinom prsu v celé populaci  
Převzato z <http://www.svod.cz>

Jeden z faktorů nárůstu incidence onemocnění souvisí se zvyšujícím se věkem lidské populace. Vlivem pokroků ve zdravotnictví a zlepšujících se sociálních podmínek počet starších lidí roste. Doba potřebná k nahromadění kritického počtu genetických změn nutných pro propuknutí rakovinného procesu dosahuje s prodlužujícím se věkem svého optima <sup>(1)</sup>. Nádorová onemocnění však navíc postihují čím dál mladší věkové kategorie, což je dáno zejména většími nároky, které jsou na organismus kladeny. Stres, toxické a karcinogenní látky v životním prostředí, nevhodná strava a životní styl, to vše zapříčiňuje vznik nadměrného počtu iniciovaných nádorových buněk. Imunitní systém oslabený stresem a polutanty pak nemusí být schopen na vzniklou situaci dostatečně efektivně zareagovat <sup>(2)</sup>.

Léčba nádorových onemocnění je komplikována zejména skutečností, že léčbou potřebujeme zcela zničit buňky nikoli cizorodé, jak je tomu například u bakteriálních infekcí, ale tělu vlastní. Nádorové buňky se sice více či méně liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, a proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a eliminovány. Odlišnosti od normálních buněk jsou však buď příliš malé, takže jsou

imunitním systémem ignorovány, nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé „zbraně“ imunitního systému <sup>(2)</sup>.

Přestože u léků používaných v klinické praxi by měl být mechanismus jejich účinku znám, u většiny cytostatik jsou tyto údaje doplňovány dodatečně. Jejich použití se často zakládá na empiricky získaných údajích o terapeutické účinnosti a toxicitě. Mezi protinádorová léčiva s doposud ne zcela objasněným mechanismem a specifitou účinku patří také ellipticin.

## 1.1 Etiologie a patogeneze nádorového procesu

Za kancerogenesi je považován proces transformace nenádorové buňky v nádorovou, následné dělení buněčného klonu včetně další dediferenciace a zvyšování maligního potenciálu dělících se buněk. Dnes je pohlíženo na zhoubné nádory jako na genetické onemocnění. Již koncem šedesátých let byla formulována hypotéza o existenci specifických genů zodpovědných za změny, které vyústí v maligní transformaci buňky. Vznik těchto genů (onkogenů) je podmíněn mutací genů přirozených (protoonkogenů). U člověka bylo v rámci dosud identifikovaných genů nalezeno 902 **protoonkogenů** <sup>(3)</sup>, tedy potenciálně nebezpečných genů kódujících klíčové regulační proteiny (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory, cyklin dependentní kinasy apod.). Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílí také **tumor supresorové geny** (antionkogeny), jejichž produkty potlačují proliferaci normálních somatických buněk a udržují je ve stadiu klidu <sup>(4)</sup>. Mutace v těchto genech pak může rovněž vést k maligní transformaci buňky.

Je známo, že mutace genů vznikají spontánně, ale jejich frekvence je tak nízká (asi  $10^{-6}$  na jedno buněčné dělení), že vzhledem k odhadovanému celkovému počtu buněčných dělení během života (u člověka asi  $10^{16}$ ) by riziko možného vzniku nádoru na podkladě spontánních mutací bylo zanedbatelné. Vedle přirozeně vznikajících chyb při replikaci může být však DNA poškozena také působením vnějších faktorů. Mezi hlavní faktory zvyšující pravděpodobnost vzniku nádorů patří **faktory fyzikální** (radioaktivní, kosmické, UV a Roentgenovo záření; některé druhy velmi jemných pevných částic, například azbestu nebo sloučenin berylia,...), dále **biologické vlivy** (genetické předpoklady a některé viry. Odhaduje se, že zhruba 15 až 20 % případů rakoviny je způsobeno onkoviry), a také **chemické faktory – kancerogeny (karcinogeny)**. Podle jejich mechanismu působení je můžeme rozdělit na karcinogeny genotoxické, které se váží na DNA kovalentní vazbou za

vzniku aduktů a epigenetické karcinogeny, které modifikují DNA nekovalentními vazbami, např. interkalací do její dvoušroubovicové struktury. Další skupinou jsou karcinogeny vyvolávající změny ve struktuře DNA, jako jsou např. jedno a dvouřetězové zlomy či cross-linking. Většina karcinogenů modifikuje DNA teprve až po metabolické aktivaci <sup>(4)</sup>.

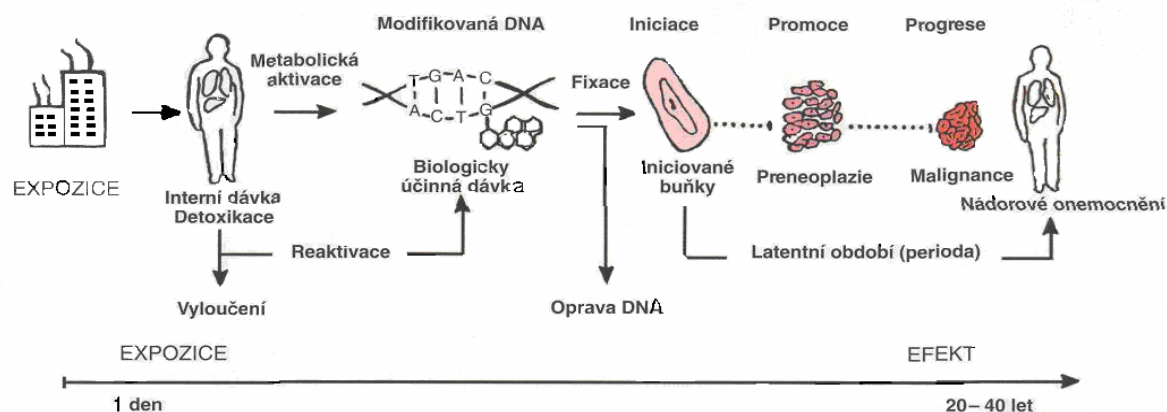
Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (IARC, International Institute for Research on Cancer, <http://www.iarc.fr/>) uvádí již asi 400 prokázaných či potenciálních kancerogenních faktorů vyvolávajících nádorová onemocnění lidského organismu (2008).

Při expozici mutagenům během života by naopak incidence nádorů musela být mimořádně vysoká, pokud by v organismu neexistovaly žádné mechanismy, kterými lze poškozené geny eliminovat nebo opravit.

Buňka, ve které došlo k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor-supresorových genů, přičemž toto poškození DNA nebylo opraveno reparačními enzymy, je označována jako **buňka iniciovaná**. Mutace v určitém kritickém genu přináší iniciovaným buňkám růstovou selekční výhodu. Pokud iniciovanou buňku nezlikviduje ani imunitní systém, dochází v důsledku její expozice faktorům s promočním účinkem k dalšímu zvýšení proliferace buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací a vzniká **benigní nádor**.

**Promoční aktivitu** má kupříkladu cigaretový kouř nebo zvýšený přívod tuků. Promotory na rozdíl od kancerogenů mají schopnost již existující genetické změny prohloubit, ale ne je samostatně vyvolat. Většina promotorů je tkáňově specifická (např. forbolester je specifickým promotorem vzniku nádorů kůže) <sup>(4)</sup>.

Poslední stadium kancerogeneze se nazývá **progrese**. Působením progresoru se pak mění dosud částečně kontrolovatelný růst benigního nádoru na růst nekontrolovatelný, vzniká **maligní nádor**, z něhož odštěpené buňky se mohou dostat krevními nebo lymfatickými cestami do jiných tkání nebo orgánů, kde se mohou usadit a vytvářet dceřiné nádory (**metastázy**). Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přívod živin a kyslíku. Ten musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení (nádorová neoangiogeneze). Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze je znázorněno na *obrázku 2*.



Obrázek 2

Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze <sup>(4)</sup>

## 1.2 Léčba nádorových onemocnění

Ve většině případů nestačí k vyléčení nádorového onemocnění jediná, byť velmi účinná léčebná metoda. Větší naději na úspěch má komplexní přístup, kombinující základní terapeutické metody: chirurgickou léčbu, radioterapii a chemoterapii (včetně terapie hormonální).

Chirurgicky lze odstranit objemný nádor, pokud neprorůstá do vitálně důležitých struktur a je lokalizovaný, ozáření lze pak do jisté míry eliminovat nádor residuální. Diseminovaný nádorový proces však může ovlivnit jedinečně chemoterapie <sup>(5)</sup>. U některých typů nádorů, spíše však ve speciálních případech, se uplatňuje i imunoterapie <sup>(2)</sup>. Léčbou budoucnosti by se mohla stát terapie genová <sup>(5, 6)</sup>.

### 1.2.1 Chemoterapie

Chemoterapie je metoda, která využívá k léčbě nádorových onemocnění účinek chemických sloučenin (cytostatik). Přes významné pokroky, kterých bylo v léčbě nádorů chemoterapií dosaženo, nejsou dnešní možnosti protinádorové terapie zcela uspokojivé. Nádorová onemocnění se vyznačují značnou heterogenitou a nelze tedy nalézt žádné univerzální léčivo, které by fungovalo proti všem typům nádorů. Citlivost nádorů k chemoterapii je pro různá nádorová onemocnění značně rozdílná. Podle toho může být chemoterapie rozdělena do několika kategorií (*obr. 3, str. 13*) <sup>(5, 6)</sup>:

**kurativní chemoterapie**, což je cytostatická léčba podávaná s cílem úplného vyléčení nádorového onemocnění. Jejím předpokladem je vysoká citlivost daného nádoru k chemoterapii.

**paliativní chemoterapie**, kdy je naděje na vyléčení málo pravděpodobná, ale léčbou je možno zlepšit kvalitu života nemocného a prodloužit dobu přežití.

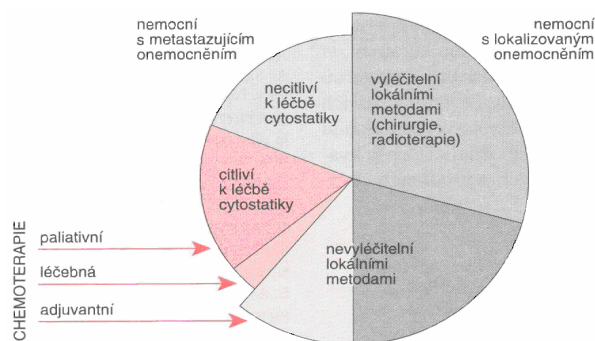
**adjuvantní chemoterapie**, která doplňuje nebo zvyšuje účinnost jiné základní léčebné metody (chirurgická léčba, radioterapie). Jejím cílem je likvidace zbytkové populace nádorových buněk.

**neoadjuvantní chemoterapie**, podání cytostatické léčby před chirurgickým výkonem nebo před radioterapií. Zlepšuje operabilitu nádorů.

### 1.2.1.1 Předpoklady pro účinnost chemoterapie v klinické praxi

Podstatou protinádorového účinku chemoterapie je inhibice buněčné proliferace, popřípadě stimulace apoptosy. Chemoterapie uplatňuje svůj účinek téměř výhradně na buňkách nacházejících se v aktivních fázích buněčného cyklu. Antiproliferační účinky chemoterapie nejsou selektivní, většina v praxi používaných cytostatik působí na všechny proliferující buňky, jak nádorové, tak i normální, zejména krvetvorné, což vysvětluje četné nežádoucí účinky. Cílem je tyto vedlejší účinky maximálně omezit a co nejvíce snížit počet nádorových buněk nebo je zcela odstranit. Není to lehký úkol, protože nádor se klinicky projeví až tehdy, obsahuje-li více než  $10^9$  buněk.

V této době se růst nádoru začíná zpomalovat, neboť přibývá buněk nacházejících se v klidové fázi buněčného cyklu, jejichž citlivost k chemoterapii je omezená. Jednou léčebnou kúrou je možno zničit až 99% nádorových buněk, což ale znamená například pokles jen z  $10^{12}$  na  $10^{10}$  buněk. Současně je ovšem zničeno i 99% normálních proliferujících buněk. Ty mají kratší generační čas a mohou rychleji regenerovat (22 – 24 h u normálních buněk, ve srovnání se 150 h u buněk nádorových). Aby byla regenerace umožněna, je nutno léčbu vždy na určitou dobu přerušit. V tomto období však dochází i k doplnění nádorové populace. S rostoucí velikostí nádoru se původně homogenní klon vlivem mutací stává heterogenní populací, v níž některé klony ztrácejí citlivost k chemoterapii <sup>(6)</sup>.



**Obrázek 3**

Grafické znázornění uplatnění chemoterapie ve vztahu k pokročilosti onemocnění <sup>(5)</sup>

### **1.2.2 Mechanismus účinku konvenčních cytostatik**

Cytotoxický účinek chemoterapeutik používaných v současné době v onkologické praxi lze vysvětlit několika hlavními mechanismy. Jsou to <sup>(5, 6)</sup>:

**Inhibice klíčových enzymů metabolismu**, která vede k poruše biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení. Látky působící tímto mechanismem se zpravidla označují jako antimetabolity (např. analoga kyseliny listové a nukleotidů).

**Přímé poškození struktury nukleových kyselin**, což má za následek alteraci jejich biologických funkcí, hlavně inhibici replikace a transkripce. Ke strukturálnímu poškození nukleových kyselin může dojít například alkylací (*cis*-platina, cyklofosfamid), interkalací (doxorubicin), inhibicí topoisomerasy (tenipozid) či rozštěpením DNA (bleomycin).

**Alterace mikrotubulárního proteinu**. Látky poškozující strukturu a funkci mikrotubulů jsou někdy nazývány jako „mitotické jedy“, protože svůj cytotoxický účinek uplatňují převážně v průběhu mitozy. Alterace mikrotubulů poškodí funkci dělicího vřeténka, které zajišťuje správnou migraci chromosomů k pólům dělicí se buňky (kolchicin, vinkristin, vinblastin, taxany).

Z méně častých mechanismů se uplatňuje **inhibice proteosyntézy a poškození buněčné membrány**.

### **1.2.3 Rezistence na cytostatika**

Jednou z nejzávažnějších komplikací chemoterapie a důvodem jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytostatik. Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již při první léčbě (**přírozená rezistence**). **Získaná rezistence** vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentní, a účinnost cytostatické léčby se snižuje. Mechanismy vzniku rezistence bývají nejčastěji vázány na změny farmakokinetiky či cytokinetiky buněčné populace nebo metabolické a funkční změny buňky. Zvláštním případem je tzv. **zkřížená rezistence**, kdy při ztrátě citlivosti k jednomu léku vzniká současně rezistence na jiné cytostatikum (ať strukturálně příbuzné či nikoliv). Necitlivost některých nádorů k alternativním léčebným režimům, které obsahují nové druhy cytostatik nepoužitých v původní léčbě, se nazývá **mnohočetná (pleiotropní) léková rezistence** („**Multi-Drug Resistance**“, **MDR**). Poprvé byla popsána v roce 1970 <sup>(7)</sup> na plicní buněčné linii izolované z čínského křečka a na buněčné linii myši leukémie P388. Při ní dochází k urychlenému vypuzování cytostatika z buňky. Mnohočetná léková rezistence je rozdělena na **typickou** (klasickou) a **atypickou**.

Typická MDR je zapříčiněna membránovým glykoproteinem, který je produktem *mdr1* genu <sup>(8)</sup>. Tento P-glykoprotein (P-gp) je ATP-dependentní membránová pumpa, která exportuje toxické látky z buňky, čímž snižuje jejich intracelulární koncentraci. P-gp patří do rodiny tzv. transportérových proteinů **ABC** („ATP-binding cassette“). Cíle léčiv, která jsou schopná omezit rezistenci, mohou být buď na úrovni proteinů, nebo na úrovni nukleových kyselin. Možný mechanismus inhibice MDR „efflux“ pumpy může být spojen například s tvorbou supramolekulového komplexu mezi léčivem a regulačním aktivním místem P-glykoproteinu. Některá analoga ellipticinů jsou inhibitory „drug efflux“ pumpy v rezistentní myší T-lymfoidní buněčné kultuře <sup>(9)</sup>. Existuje však celá řada dalších proteinů, jejichž exprese a aktivita je proti nerezistentním buňkám změněna, patří sem např. **MRP** („multidrug related protein“), **TAP** („transporter of antigenic peptides“), **LRP** („lung resistant protein“). Také zvýšená exprese proteinu **Bcl2**, který je silným inhibitorem apoptosy, způsobuje rezistenci. Sice neblokuje průnik cytostatika do buněk, ani poškození DNA, ale buňky nezanikají a po odeznění účinku cytostatika mohou opět proliferovat. Rezistence k chemoterapii se přisuzuje též alteraci genů rodiny **p53** <sup>(5)</sup>.

### 1.3 Biotransformace xenobiotik

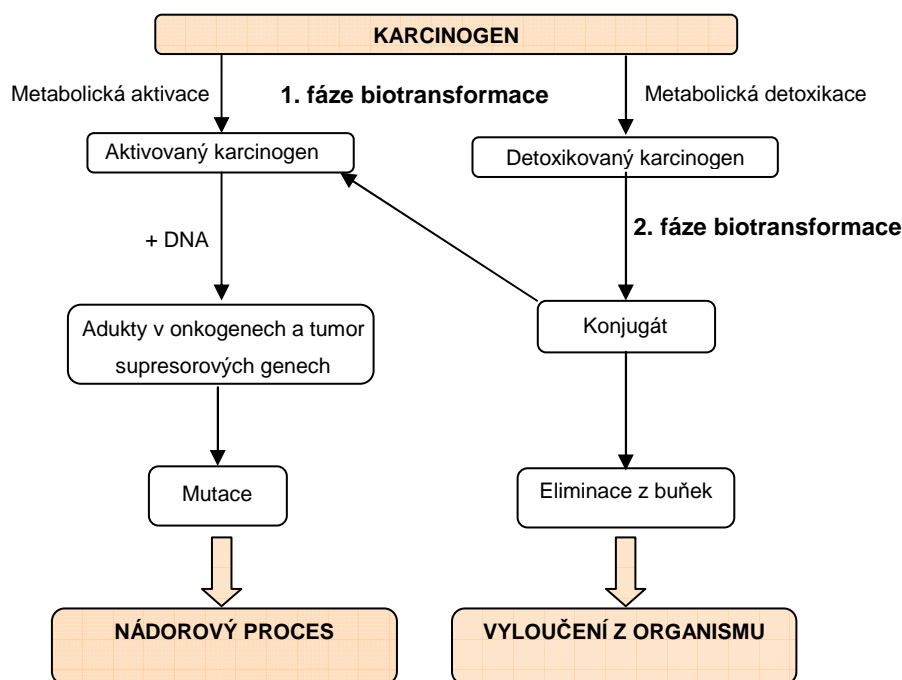
Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních cizorodých látek (xenobiotik), jako jsou např. léčiva, polutanty v životním prostředí, karcinogeny, se uskutečňuje mechanismy označovanými jako **biotransformace**. Látky lipofilního charakteru, které procházejí membránami, se mohou v organismu kumulovat. Nemohou být z těla vyloučeny přímo, ale musí být nejdříve přeměněny na polárnější metabolity snáze se vylučující <sup>(10)</sup>. Tyto hydrofilnější metabolity nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky, ale v závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a na enzymovém systému, který ho v organismu přeměňuje, se naopak může jednat o látky značného biologického významu. Místo **detoxikace** dané látky tedy dochází k její **aktivaci**. Takovou metabolickou aktivaci vyžaduje řada léčiv, ale aktivováno je též 98 % genotoxických kancerogenů (*obr. 4, str. 16*).

V živočišných organismech dochází k biotransformaci xenobiotik ve dvou fázích. V **první fázi**, nazývané **derivatizační**, dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly nebo k demaskování funkčních skupin v molekule již přítomných. To se děje především reakcemi oxidačními, ale i redukčními. Příkladem kancerogenů aktivovaných redukční cestou jsou 2-nitroanisol <sup>(11)</sup>, 1-nitropyren



(12), 1,6-nitropyren (13) či aristolochové kyseliny (14, 15). U některých sloučenin (například esterů a amidů) se pro zvýšení polaritý uplatňují také hydrolytické reakce. Ve **druhé fázi, konjugační**, jsou na reaktivní funkční skupiny vytvořené v derivatizační fázi vázány malé endogenní hydrofilní molekuly (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutathion, cystein, aktivní acetát atd.). Tímto krokem se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly a usnadní se tím její vyloučení z organismu.

I ve druhé fázi biotransformace však může dojít k aktivaci xenobiotika na toxičtější sloučeninu (obr. 4). Tak je tomu např. u konjugátů s aktivním sulfátem vznikajících z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem **sulfotransferas**. Konjugát sulfátu s N-hydroxysloučeninami je v kyselém prostředí močových cest nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (event. karbéniového) iontu, vzniká tedy elektrofil reagující s DNA a proteiny.



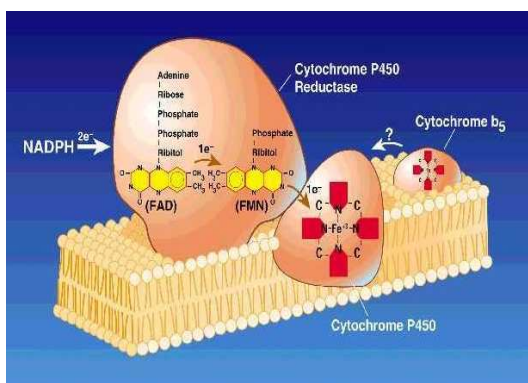
**Obrázek 4**

Metabolická aktivace a detoxikace karcinogenu (16)

## 1.4 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů lokalizovaných na vnější straně endoplasmatického retikula či mitochondrií (obr. 5, str. 17). Tento systém katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík (17). Je též označován jako systém oxidas a oxygenas se

smíšenou funkcí (mixed function oxidases - MFO systém). Má tři základní složky:



**Obrázek 5**

Uspořádání MFO systému v membráně ER

flavoproteinový enzym **NADPH:cytochrom P450 reductasa** (*kapitola 1.4.1.*), která slouží jako dělič elektronového páru, hemthiolátový enzym **cytochrom P450** (*kapitola 1.4.2.*) jako terminální oxidasu a neméně důležitou součástí je též **biologická membrána**. Membránové lipidy způsobují konformační změny cytochromu P450 zvyšující jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450-

NADPH:cytochrom P450 reductasa a jsou „zásobárnou“ uložených substrátů cytochromu P450 <sup>(18)</sup>.

Fakultativně může MFO systém obsahovat také **cytochrom b<sub>5</sub>** (*kapitola 1.4.3*) a **NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasu** <sup>(18)</sup>.

MFO systém může být lokalizován buď na **mitochondriální membráně**, jak je tomu zejména v kůře nadledvin, kde participuje na metabolismu steroidů a mastných kyselin a nebo na vnější straně membrány hladkého i hrubého **endoplasmatického retikula** v orgánech exponovaných látkám cizorodé povahy (játra, ledviny, plíce, GIT, kůže, mozek). Zde se účastní první fáze biotransformace xenobiotik.

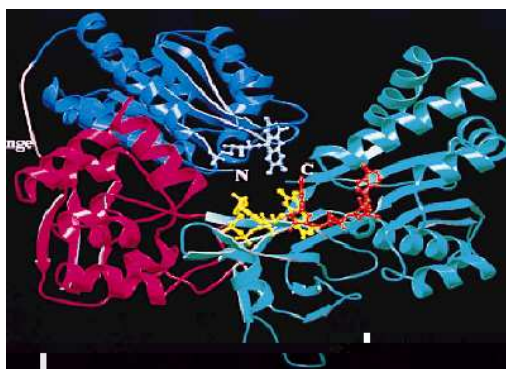
### **1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reductasa**

Enzym NADPH:cytochrom P450 reductasa (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný „žlutý protein“, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 <sup>(19)</sup>. V daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reductasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450. Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b<sub>5</sub>, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další látky <sup>(18)</sup>. NADPH:cytochrom P450 reductasa může být za určitých okolností v MFO systému zastoupena NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasou, které jako donor vodíku slouží NADH.

NADPH:cytochrom P450 reductasa (*obr. 6, str. 18*) má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně <sup>(20)</sup>, a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa) <sup>(21)</sup>.

C-terminální funkční doména (*obr. 6*) se skládá z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény, „spojovací“ struktura umístěná mezi FMN- a FAD- vazebnou doménou pak zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8- methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°. Přenos elektronů mezi flaviny je tedy patrně přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos rychlý <sup>(21)</sup>.

**FAD-vazebná doména** je zodpovědná za (nekovalentní) vazbu NADPH; pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy, kterou se tento koenzym liší od NADH, a způsobují tak neobvykle vysokou selektivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči NADPH.



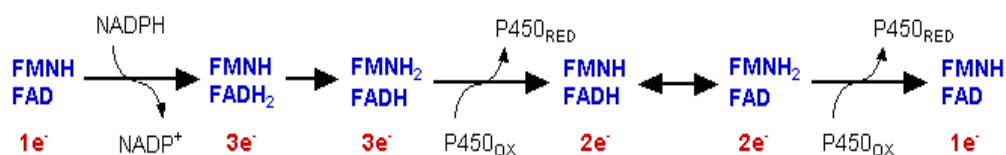
**Obrázek 6**

**C-terminální funkční doména NADPH:cytochrom P450 reduktasy.** Tmavě modře je zobrazena FMN vazebná doména, světle modře FAD vazebná doména, vínově spojovací oblast, bíle FMN, žlutě FAD, červeně NADPH <sup>(21)</sup>

**FMN-vazebná doména** je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu (cytochrom P450, cytochrom c). Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází blízko povrchu enzymu a je tak pro akceptorovou molekulu snadno dostupná.

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se uplatňují také hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450 <sup>(21-23)</sup>.

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin<sup>(24, 25)</sup>. Akceptorem elektronů (respektive atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jednoelektronovou redukcí akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savčí NADPH:cytochrom P450 reduktasy) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH<sub>2</sub> (obr. 7)<sup>(26)</sup>.



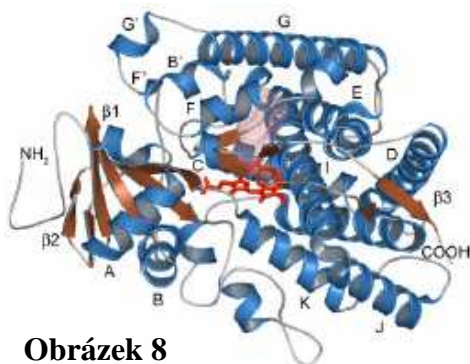
### Obrázek 7

Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reduktasy<sup>(26)</sup>

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je v rámci fylogeneze velmi konzervovaný enzym, vykazující vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci. Kupříkladu lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92%, přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se nachází v N-terminální “kotvící” oblasti a naopak, FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná<sup>(27)</sup>. Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce.

### 1.4.2 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1, obr. 8) je terminální oxidasou MFO systému, zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu<sup>(28)</sup>, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Elektrony potřebné k redukci dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa, případně NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa<sup>(29)</sup>.



### Obrázek 8

Lidský cytochrom P450 1A2<sup>(41)</sup>

Garfinkel s Klingenbergem v roce 1958 objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukcí vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm<sup>(30, 31)</sup>. Hemoproteinový charakter tohoto pigmentu dokázali roku 1964 Omura a Sato. Na základě podobnosti povahy vazby

hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450<sup>(32)</sup>.

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin<sup>(33, 34)</sup>. Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archaebakterií se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódujících cytochromy P450 prokaryotních i eukaryotních organismů<sup>(35)</sup>. V současné době je dle oficiální internetové stránky standardizované nomenklatury cytochromů P450 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) v rámci všech živých organismů známo více než 7700 různých genů a pseudogenů pro enzymové formy cytochromu P450<sup>(36)</sup>, z toho bylo v lidském genomu identifikováno 57 genů a 58 pseudogenů, v *Sacharomyces cerevisiae* 3 geny, 18 v *Streptomyces coelicolor*, 80 v *Caenorhabditis elegans*, 257 v *Arabidopsis thaliana* a, možná trochu překvapivě, žádný gen pro cytochrom P450 v *Escherichia coli*<sup>(37)</sup>.

Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního  $\alpha$ -helixu<sup>(38)</sup>, zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné. I přes značné rozdíly v substrátové specifitě (mohou využívat substráty v rozmezí molekulových hmotností od ethylenu (*Mr* 28) až po cyklosporin A (*Mr* 1201)<sup>(39)</sup> a struktuře, všechny obsahují konzervované sekvence oblastí v blízkosti vazebného místa pro hem.

Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu<sup>(18)</sup>. Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale o **hemthiolátový protein**. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody<sup>(40)</sup>.

První model struktury molekuly cytochromu P450 (konkrétně P450*cam*) byl získán na základě výzkumu monooxygenasového systému bakterie *Pseudomonas putida* již v roce 1987<sup>(41)</sup>. V dnešní době je již známo více než 18 krystalových struktur cytochromů P450 bakterií<sup>(42)</sup> a několik struktur savčích cytochromů P450. Například lidské formy CYP1A2<sup>(43)</sup>, CYP2A6<sup>(44)</sup>, CYP2C8<sup>(45)</sup>, CYP2C9<sup>(46, 47)</sup>, CYP2D6<sup>(48)</sup>, CYP3A4<sup>(49, 50)</sup>.

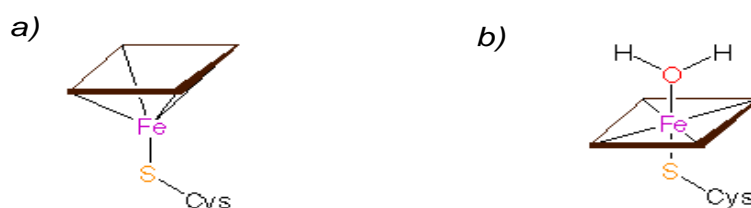
### 1.4.2.1 Spinové formy cytochromu P450

Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách <sup>(51)</sup>:

**Vysokospinová forma** vzniká v případě, že ion železa je v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu (*obr. 9*). Tato forma vykazuje maximum Soretova pásu při 390 nm.

**Nížkospinová forma** (spin 1/2) je charakteristická maximem absorpce při 418 nm. Ion železa je hexakoordinován, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (např. s -OH, -COOH nebo -NH<sub>2</sub> skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu <sup>(18)</sup> či atomem kyslíku z molekuly vody <sup>(40, 51)</sup> a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX (*obr. 9*).

Poměr forem je závislý na izoformě cytochromu P450, pro většinu molekul cytochromu P450 ale platí, že jsou v nízkospinovém stavu. Jejich poměr se značně mění při vazbě substrátu do vazebního místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu obsahu vysokospinové formy. V absorpčním spektru se ukáže nárůst absorpance při 390 nm a pokles při 418 nm - tzv. „**substrátové spektrum**“. Šestým ligandem železa se však může stát i samotný substrát (či nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu), pak registrujeme pokles absorpance při 390 nm a nárůst při 418 až 460 nm (dle heteroatomu), tedy takzvané „**ligandové spektrum**“ <sup>(51)</sup>.



**Obrázek 9**

Struktura hemu cytochromu P450 <sup>(52)</sup>, vysokospinová forma (**a**), nízkospinová forma (**b**)

### 1.4.2.2 Enzymové funkce cytochromu P450

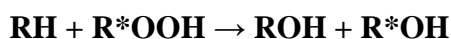
**Oxidasová funkce** - aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce. Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. V aerobních organismech se proto nachází řada proteinů nesoucích prosthetickou

skupinu s kovem nebo flavinem, s jejichž pomocí jsou schopny oxidační potenciál kyslíku využít <sup>(51)</sup>.

**Oxygenasová aktivita** - zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.

**Redukční reakce** - elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K tomu dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, a je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*.

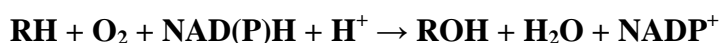
**Peroxidasová aktivita** - místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R\*OOH) nebo peroxid vodíku <sup>(53)</sup>. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů <sup>(54)</sup>. Produktem reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát (ROH):



**Produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a aktivních forem kyslíku** - k tomuto jevu dochází tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová.

#### 1.4.2.2.1 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa <sup>(18)</sup>. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí (kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce):



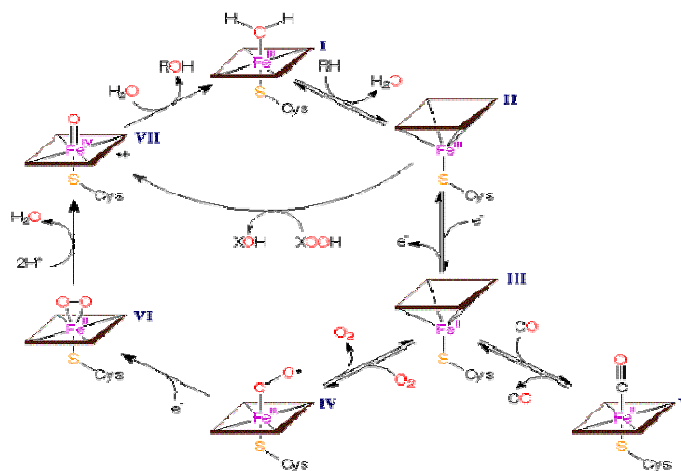
Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a sestává se pravděpodobně z osmi kroků. Schematicky je znázorněn na *obrázku 10, str. 23*.

V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (Fe<sup>III</sup>) a je hexakoordinováno (I). Po vniknutí substrátu (RH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa,



keré zůstane pentakoordinované, a zároveň nastane konformační změna v molekule enzymu (II). Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:CYP reductasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (FeII) a zůstává pentakoordinováno.

Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (III). Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované. Tento nepříliš stabilní komplex je dále redukován NADPH:CYP reductasou nebo NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku



**Obrázek 10**

**Reakční cyklus cytochromu P450** <sup>(50)</sup>, naznačena je i peroxidasová aktivita a tvorba komplexu s oxidem uhelnatým

na peroxidový anion (IV). Vazba kyslíku na formu (III) může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který tvoří ternární ferrokomples cytochrom P450-CO-RH (V). Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukcii je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody (VI), zatímco druhý zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex (VII). Ten je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík.

Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za uvolnění hydroxyderivátu substrátu (ROH) z enzymu. Obnovuje se nativní forma cytochromu P450 <sup>(55)</sup>.

### 1.4.2.3 Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou CYP,



následuje velké písmeno označující podrodinu <sup>(56)</sup>. Jednotlivé isoenzymy jsou pak určeny číslem za písmenem podrodiny.

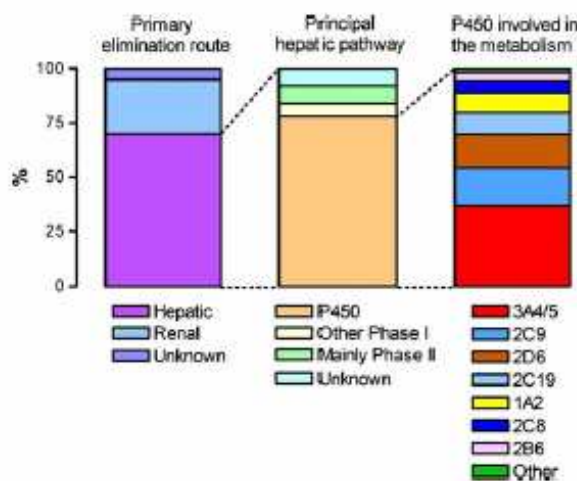
Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 55% <sup>(57)</sup>. Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a spolupracovníky <sup>(58)</sup>.

U člověka byly dosud nalezené formy cytochromů P450 rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin <sup>(42, 59)</sup>. Metabolismu léčiv, respektive xenobiotik, se účastní především cytochromy P450 patřící pouze do tří z těchto rodin: **CYP1, CYP2 a CYP3** (v menší míře též rodina CYP4). Ostatní rodiny participují hlavně na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové, biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin apod. <sup>(60)</sup>. Rozdělení lidských cytochromů P450 dle převažujícího typu substrátu je uvedeno v *tabulce 1*. Mezi 200 nejvíce předepisovanými léky v USA, je jich naprostá většina metabolizována v játrech cytochromy P450. Členové rodiny CYP3A přispívají k metabolismu léčiv nejvíce, asi 37%, následuje CYP2C9 (17%), CYP2D6 (15%), CYP2C19 (10%), CYP1A2 (10%) a CYP2C8 (6%). CYP2B6 a další izoformy (CYP2A6 a CYP2E1) se podílejí na metabolismu asi 4% a 2% léčiv <sup>(59)</sup>. Názorně je vše zobrazeno na *obrázku 11*.

**Tabulka 1**

Rozdělení lidských CYP dle převažujícího typu substrátu <sup>(60)</sup>

<b>Steroly</b>	1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1
<b>Xenobiotika</b>	1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5,
<b>Mastné</b>	2J2, 4A11, 4B1, 4F12
<b>Eikosanoidy</b>	4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1
<b>Vitamíny</b>	2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1
<b>Neznámé</b>	2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1, 20A1, 27C1



**Obrázek 11**

Cesty eliminace pro 200 nejvíce předepisovaných léků v USA podle RxList (<http://www.rxlist.com>, duben 2008) <sup>(59)</sup>

#### 1.4.2.4 Variabilita v aktivitě cytochromů P450

Hlavní zdroje vyvolávající interindividuální variabilitu v aktivitách cytochromů P450 pocházejí z našeho životního prostředí, zahrnují zejména inhibici nebo indukci cytochromů různými xenobiotiky <sup>(61-64)</sup>. Dále to jsou biologické faktory jako např. pohlaví <sup>(65)</sup>, věk, hormonální rovnováha, zdravotní stav jedince (hladovění, diabetes, obezita, vysoký tlak, infekce a záněty)<sup>(66, 67)</sup> a cirkadiální rytmy <sup>(68)</sup>. Neméně významný je také genetický polymorfismus v genech pro cytochromy P450 nebo jejich regulátorech.

##### 1.4.2.4.1 Genetický polymorfismus cytochromů P450

Vrozené změny DNA v kódující či regulační části genu mohou vést k absenci některé formy cytochromu P450, ke změně inducibility nebo k tvorbě formy s pozměněnou katalytickou aktivitou <sup>(51)</sup>. Vyskytuje-li se taková změna u více než 3% populace, hovoříme o genetickém polymorfismu cytochromu P450. U genů kódujících cytochromy P450 s klíčovou fyziologickou funkcí může mít výskyt defektní alely katastrofické následky. U genů pro enzymy přeměňující xenobiotika nemívá variabilita alel přímé patologické důsledky, avšak může způsobit zvýšení citlivosti vůči škodlivým účinkům některých xenobiotik či léčiv.

Nejvýznamnější variabilita vyplývající z genetického polymorfismu byla pozorována u forem CYP2D6 a CYP2C19, dále pak u forem 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4 <sup>(69)</sup>. Aktualizované informace o alelách lidských cytochromů P450 jsou uvedeny na internetové stránce <http://www.imm.ki.se/cypalleles>.

Jednotlivci mohou být podle fenotypu rozděleni do čtyř skupin: na **pomalé metabolisatory**, kteří mají dvě nefunkční alely daného genu, **středně rychlé metabolisatory**, kteří mají nefunkční pouze jednu alelu genu, **rychlé metabolisatory**, kteří mají dvě kopie normálního genu, a **ultrarychlé metabolisatory**, kteří mají tři a více kopií normálního genu <sup>(70, 71)</sup>. S polymorfismy cytochromů P450 jsou nejvíce dávány do souvislosti nádory prostaty <sup>(72, 73)</sup>, prsu <sup>(74-76)</sup>, plic a GIT <sup>(77, 78)</sup>.

##### 1.4.2.4.2 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu

Řada cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci exprese na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlost přepisu DNA do RNA či stabilizaci syntetizované mRNA, a dále o posttranslační regulaci založenou především na stabilizaci molekuly

proteinu daného cytochromu P450. Různé mechanismy uplatňující se při indukci cytochromů P450 xenobiotiky spolu s příklady forem, u kterých se daný mechanismus uplatňuje, jsou uvedeny v *tabulce 2*.

### Tabulka 2

**Mechanismy indukce cytochromů P450.** U indukce způsobené zvýšením transkripce dotyčného genu je uveden také induktorem využívaný intracelulární receptor <sup>(61-64)</sup>.

Mechanismus indukce	Formy CYP takto indukované
Zvýšení transkripce genu	
-cytoplazmatický receptor - <b>AhR</b>	CYP1A1, 1A2, 1B1
-jaderný receptor - <b>CAR</b>	CYP2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19
- <b>PXR, SXR</b>	CYP3A4, 3A5
- <b>PPAR</b>	CYP4A11
Zvýšení rychlosti transkripce	CYP1A2
Stabilizace mRNA	CYP1A1, 2E1, 3A4
Stabilizace enzymu	CYP2E1

#### 1.4.2.4.2.1 Regulace exprese cytochromu P450 pomocí intracelulárních receptorů

Cytochromy P450 genových rodin 1-4 jsou z hlediska metabolismu xenobiotik nejdůležitější. Jejich geny jsou transkripčně aktivovány cizorodými látkami prostřednictvím mechanismů závislých na receptorech.

Receptor označovaný jako **AhR** („aryl hydrocarbon receptor“) patří mezi cytosolární receptory. Jedná se o transkripční faktor participující na indukci CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 a dále některých enzymů druhé fáze biotransformace (glutathion S-transferasa a UDP-glukuronosyltransferasa). Na **AhR** se v cytoplasmě váží chaperonové molekuly, které jej udržují v konformaci schopné vázat ligand. Po vazbě molekuly xenobiotika (ligandu) a disociaci chaperonových molekul přechází **AhR** do jádra, kde tvoří s **Arnt** („AhR-nuclear translocator“) heterodimerní transkripční faktor schopný interakce s **XRE** („xenobiotic responsive element“) v oblasti enhanceru. Funkce promotoru genu pro CYP1A1 je pod kontrolou tohoto enhanceru <sup>(69)</sup>. Typickými ligandy AhR jsou planární, aromatické, hydrofobní látky (polycyklické aromatické uhlovodíky, složky tabákového kouře,  $\beta$ -naftoflavon ( $\beta$ -NF) a další <sup>(79)</sup>.

Mezi jaderné receptory regulující expresi cytochromu P450 patří **CAR** („constitutive androstane receptor“), indukující CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2A6. Xenobiotika

interagující s tímto receptorem jsou např. fenobarbital (PB), rifampicin (RIF), cyklofosfamid aj. Dalším jaderným receptorem je **PXR** („pregnane X receptor“) pro živočišné systémy a jeho lidský homolog, receptor **SXR** („steroid xenobiotic receptor“). Mezi enzymy indukované prostřednictvím těchto receptorů patří CYP3A4 a CYP3A5 a interagujícími látkami jsou například pregnenolon-16 $\alpha$ -karbonitril (PCN), RIF, PB a dexametason. Indukce rodiny cytochromu P450 4A je zprostředkována prostřednictvím dalšího jaderného receptoru **PPAR** („peroxisome proliferator-activated receptor“) <sup>(61, 64)</sup>.

#### 1.4.2.4.3 Regulace cytochromů P450 fosforylací

Regulace cytochromů P450 fosforylací byla poprvé popsána již v roce 1983 <sup>(80)</sup>. Nejčastěji je katalyzována proteinkinásou C nebo cAMP dependentní proteinkinásou A <sup>(81)</sup>. Různé izoformy cytochromů vyžadují odlišné kinasy. K fosforylaci dochází nejen u purifikovaných cytochromů P450, ale rovněž jsou-li přítomny v rekonstituovaném systému, přičemž ostatní složky (NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cytochrom b<sub>5</sub>) jsou fosforylovány jen zanedbatelně <sup>(81)</sup>. I ve více komplexních soustavách, jako jsou například neporušené hepatocyty <sup>(82-84)</sup> nebo živé organismy <sup>(83)</sup>, byla fosforylace cytochromů P450 potvrzena.

Fosforylace ovlivňuje cytochromy P450 z několika hledisek. Jednak může vést ke změně jejich aktivity <sup>(85)</sup>. Snížení aktivity fosforylací je vysvětlováno tím, že místo fosforylace většiny cytochromů P450 leží v blízkosti, nebo se dokonce částečně překrývá, s oblastí vazby NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>, tedy proteinů nezbytných pro jejich funkci <sup>(86-88)</sup>.

Dále má fosforylace vliv na buněčnou lokalizaci cytochromů P450. Fosforylací je aktivován signál na N-konci cytochromů P450, kterým jsou přednostně směřovány do mitochondrií místo do endoplasmatického retikula, snižuje se jejich afinita k SRP („signal recognition particle“) a naopak je posílena afinita k translokačním proteinům mitochondrií (TOM40, TIM44) <sup>(89, 90)</sup>.

U některých izoform cytochromů P450 vede fosforylace ke stimulaci jejich degradace (CYP2E1 <sup>(91)</sup>, CYP3A6 <sup>(92)</sup>).

Fosforylací je patrně ovlivněna i indukce cytochromů P450 přes Ah receptor. Ten je fosforylací aktivován, dochází k jeho přesunu z cytosolu do jádra, ale již nedimerizuje s Arnt jak je tomu při interakci Ah receptoru s jinými ligandy. Dochází tedy k represii promotoru <sup>(93)</sup>.

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

Cytochrom b<sub>5</sub> je membránově vázaný hemoprotein s molekulovou hmotností kolem 17 000 Da, který je schopen přenosu elektronů<sup>(94)</sup>. Je evolučně velmi starý a vyskytuje se jak v živočišné a rostlinné říši, tak i v houbách<sup>(95)</sup>. Původní gen pro cytochrom b<sub>5</sub> prodělal během evoluce v eukaryontech jednu nebo více duplikací s následnou funkční divergencí<sup>(96)</sup>. Jeho primární struktura je velmi konzervovaná. Sekvence cytosolické, hem-vázající domény je u různých druhů savců z více než 80% identická, kdežto C-terminální konec vykazuje mnohem větší heterogenitu<sup>(97, 98)</sup>.

U savců se cytochrom b<sub>5</sub> vyskytuje ve třech izoformách lokalizovaných v různých buněčných kompartmentech, v endoplasmatickém retikulu, mitochondriích a erythrocytech<sup>(95)</sup>. Mikrosomální a mitochondriální formy jsou vázány v membráně a jedná se o produkt dvou různých genů<sup>(99, 100)</sup>. Cytochrom b<sub>5</sub> přítomný v červených krvinkách je protein rozpustný a vzniká pravděpodobně posttranslační proteolysou z endoplasmatické formy. Zajímavé je, že translace mikrosomálního cytochromu b<sub>5</sub> probíhá na ribosomech v cytoplasmě, tedy nezávisle na „signal recognition particle“ a až poté je vkládán do membrány endoplasmatického retikula na základě směrovacího signálu, který se nachází na C-konci proteinu<sup>(101-103)</sup>.

#### 1.4.3.1 Fyziologické funkce cytochromu b<sub>5</sub>

O fyziologických funkcích mitochondriálního cytochromu b<sub>5</sub> je toho v současnosti známo jen velmi málo. Nejspíše slouží jako aktivátor androgenese v Leydigových buňkách potkanů<sup>(104)</sup>. Erytrocytární cytochrom b<sub>5</sub> má hlavní význam při redukci nefunkčního methemoglobinu (Fe<sup>+III</sup>) zpět na funkční, kyslík vázající, hemoglobin (Fe<sup>+II</sup>)<sup>(105)</sup>. V endoplasmatickém retikulu je cytochrom b<sub>5</sub> zahrnut v mnoha různých dějích. Podílí se například na desaturaci mastných kyselin<sup>(106, 107)</sup>, biosyntéze cholesterolu<sup>(108)</sup> a plasmalogenů<sup>(95, 109)</sup>, stejně tak jako na rozličných hydroxylačních reakcích katalyzovaných systémem oxidáz se smíšenou funkcí<sup>(110)</sup>. Cytochrom b<sub>5</sub> může obdržet elektron jak od NADH: cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy<sup>(111-113)</sup>, tak i od NADPH: cytochrom P450 reduktasy<sup>(114, 115)</sup> a předávat ho cytochromům P450 nebo jiným enzymům.

### 1.4.3.2 Mechanismy působení cytochromu b<sub>5</sub>

Působení cytochromu b<sub>5</sub> v rámci MFO systému není stále zcela objasněné. Na některé reakce katalyzované cytochromy P450 může působit cytochrom b<sub>5</sub> stimulačně, zatímco na jiné spíše inhibičně, nebo jeho vliv není pozorován vůbec. Jeho efekt závisí nejenom na použitém cytochromu P450, ale i na substrátu reakce a experimentálních podmínkách. Mechanismus, jak cytochrom b<sub>5</sub> může ovlivňovat reakce katalyzované cytochromy P450, je vysvětlován čtyřmi odlišnými způsoby<sup>(98)</sup>:

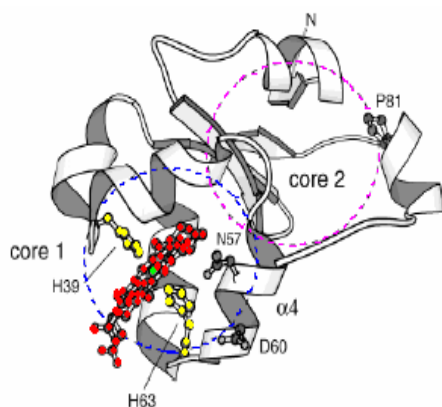
1. První předpokládaný mechanismus zahrnuje přímý přenos elektronu z cytochromu b<sub>5</sub> do monooxygenasového katalytického cyklu. V monooxygenasové reakci cytochromů P450 se zdá být rychlost reakce limitována přijetím druhého elektronu<sup>(116)</sup>, který je třeba k tvorbě aktivovaného molekulárního kyslíku navázaného na cytochrom P450. Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu IV na *obrázku 10, str. 23* a uvolňuje se superoxidový anionradikál místo oxidovaného substrátu.
2. Další možnou variantou tohoto mechanismu je předpoklad, že se cytochrom b<sub>5</sub> chová jako pozitivní modifikátor monooxygenas tak, že snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Přes cytochrom b<sub>5</sub> může druhý elektron rychleji vstoupit do monooxygenasové reakce<sup>(110, 117, 118)</sup>, což zabrání rozpadu komplexu superoxidového aniontu. Vytvoří se tak aktivovaný kyslík, který reaguje se substrátem a tvoří se produkt.
3. Třetí mechanismus je vysvětlován tvorbou komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem b<sub>5</sub>, který je schopen přijmout v jediném reakčním kroku dva elektrony od NADPH:CYP reduktasy. Jedním se redukuje CYP a druhým b<sub>5</sub><sup>(98)</sup>. Normálně by cytochrom P450 musel prodělat dvě oddělené interakce s reduktasou, aby byl dokončen jediný katalytický cyklus. Je-li tvořen navrhovaný komplex cytochromu P450 s cytochromem b<sub>5</sub>, stačí pouze jediná interakce s reduktasou, jelikož druhý redukční ekvivalent je posléze cytochromu P450 poskytnut redukováným cytochromem b<sub>5</sub>, což by zvyšovalo rychlost tvorby aktivovaného kyslíku odstraněním dvojí interakce s reduktasou.
4. Čtvrtý mechanismus předpokládá, že cytochrom b<sub>5</sub> slouží jako efektor bez oxidačně-redukční role v monooxygenasové reakci. To by potvrzovalo stimulaci některých cytochromů P450 nejen cytochromem b<sub>5</sub>, ale i cytochromem b<sub>5</sub> postrádajícím hem

(apo-cytochrom  $b_5$ )<sup>(119, 120)</sup>. Cytochrom  $b_5$  v takovém případě pravděpodobně posiluje rozklad oxygenovaného hemoproteinu na produkty nebo usnadní tok elektronů přes systém nejspíše změnou jeho konformace.

### 1.4.3.3 Struktura cytochromu $b_5$

Cytochrom  $b_5$  je tvořen šesti  $\alpha$ -helixy a pěti  $\beta$ -skládanými listy uspořádanými do dvou domén: větší **N-terminální** hydrofilní globulární doména obsahující hem a **C-terminální** hydrofobní část sloužící k ukotvení cytochromu  $b_5$  v membráně. Obě domény jsou spojeny flexibilním úsekem čítajícím asi 15 aminokyselin, bohatým na prolin. Tento „linker“ poskytuje doméně s hemem dostatečnou pohyblivost k vazbě na různé redoxní partnery, zatímco protein zůstává vázaný v membráně. Bylo zjištěno, že pro správnou interakci je nutný spojovací úsek mající při nejmenším 7 aminokyselin<sup>(121)</sup>.

Struktura solubilní domény potkaního cytochromu  $b_5$  je znázorněna na *obrázku 12*.



**Obrázek 12**

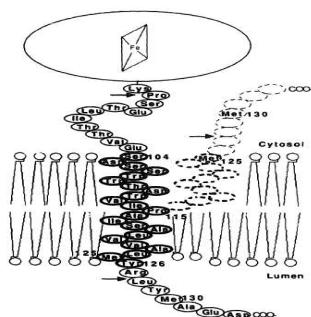
Struktura solubilní domény potkaního cytochromu  $b_5$ . Hydrofobní jádra 1 a 2 jsou naznačena kroužky<sup>(120)</sup>

kdežto jádro 2 je zachováno. Přidá-li se k apo-proteinu kofaktor (hem), indukuje se opět sbalení jádra 1<sup>(122)</sup>.

Interakce cytochromu  $b_5$  s cytochromy P450 a reduktasou jsou zprostředkovány shlukem kyselých aminokyselin umístěných na povrchu proteinu a v blízkosti hemu. Tato skutečnost poukazuje na fakt, že k tvorbě komplexů s cytochromem  $b_5$  jsou využity elektrostatické síly<sup>(86, 127, 128)</sup>.

Přesná topologie C-koncové kotvy také není zcela jednoznačně známa. Jako nejpravděpodobnější se jeví dvě konformace (*obr. 13, str. 31*), první, kde hydrofobní

V molekule holoproteinu tvoří tato doména dvě hydrofobní jádra<sup>(122-125)</sup> *obr. 12*): větší, funkční jádro kolem hemu („core 1“), hemové železo je koordinováno postranními řetězci dvou histidinů (His 39, His 63), jako pátého a šestého ligandu, což zabraňuje jeho přímé interakci s molekulárním kyslíkem<sup>(98)</sup>. Menší jádro („core 2“) je od hemu více vzdálené a má pouze strukturální funkci. Není-li hem v molekule přítomen (apo-forma), je struktura proteinu méně stabilní<sup>(126)</sup>. Dochází k rozvolnění struktury jádra 1<sup>(122-124)</sup>, které se mění na smyčku se 42 zbytky AMK, v roztoku značně neuspořádanou,

**Obrázek 13**

Dvě možné orientace membránové kotvy cyt  $b_5$

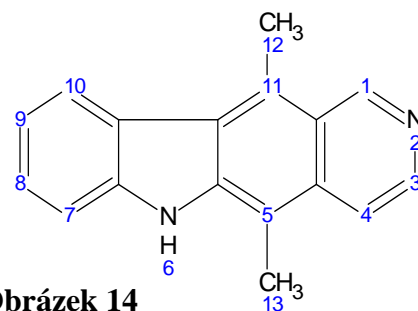
byla membránová kotva odštěpena. Ta je však důležitá pro plnění některých jeho biologických funkcí <sup>(132)</sup>. Rozpustná forma cytochromu  $b_5$  je sice schopna interagovat s některými partnery (cytochrom c) <sup>(95, 121)</sup>, nicméně není schopna vazby na cytochromy P450, nemůže jim tedy ani poskytovat elektrony pro redukci <sup>(130, 133)</sup>.

## 1.5 Ellipticin

Ellipticin (5, 11-dimethyl-6H-pyrido[4, 3-b] karbazol, *obr. 14*) a některé jeho deriváty jsou alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia elliptica*, *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*) vykazující významnou protinádorovou aktivitu <sup>(134-136)</sup>. Byla zjištěna i

jejich anti-HIV aktivita. Zkoumáno je proto i použití ellipticinu při inhibici reversní transkriptasy či integrasy <sup>(9, 137, 138)</sup> v rámci léčby AIDS. Ellipticin byl poprvé izolován v roce 1959 z listů *Ochrosia elliptica Labill* <sup>(139)</sup>.

Ellipticin samotný a jeho polárnější deriváty 9-hydroxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin jsou ve formě acetátu <sup>(140)</sup> užívány již od 70. let (zvláště ve Francii) zejména k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastasemi, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy <sup>(5, 141, 142)</sup>. Výhodou ellipticinu je jednak jeho vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, a také jeho nízké vedlejší účinky, které se projevují asi u třetiny pacientů jen jako nevolnost či zvracení <sup>(143)</sup>. Nefrotoxicita, která je svým mechanismem vzniku podobná *cis*-platině je spíše vzácná <sup>(144)</sup>. Další vedlejší toxické účinky ellipticinu jsou minimální. Hematologická toxicita je dokonce prakticky nulová <sup>(145, 146)</sup>.

**Obrázek 14**  
Struktura ellipticinu



### **1.5.1 Farmakokinetika ellipticinu**

Ellipticin užívaný v klinické praxi je pacientům podáván intravenózně v denní dávce 80 mg/m<sup>2</sup>, tj. asi 2,13 mg/kg, po dobu tří dní. Poločas ellipticinu v organismu se pohybuje v rozmezí 8 - 51 hodin v závislosti na pacientovi.

Chadwick se spolupracovníky v sedmdesátých letech provedl rozsáhlou farmakokinetickou studií ellipticinu s využitím myší, potkanů, psů a opic jako modelových organismů. Ellipticin byl zvířatům podáván intravenózně v dávce 6 mg na 1 kg hmotnosti experimentálního zvířete (vyjímkou byly opice: 3 mg /kg) <sup>(147)</sup>.

Touto studií bylo zjištěno, že ellipticin je rychle, ale nerovnoměrně distribuován do různých orgánů včetně mozku, hematoencefalickou bariéru překonává buď díky své hydrofobicitě na základě pasivní difúze, či využívá dosud neznámých aktivních transportních procesů <sup>(148)</sup>. Rychlost eliminace ellipticinu z krve, orgánová distribuce i exkrece jsou závislé na druhu organismu, kterému byl ellipticin podán <sup>(147)</sup>.

Z těla je ellipticin eliminován zejména fekálně, z 16 % pak renální cestou. Ellipticin je slabá báze (pK = 5,8), v kyselém pH gastrointestinálního traktu je ionizován a nemůže být resorbován buňkami střevní sliznice, takto se vyloučí přibližně 15% z celkové dávky léčiva. Po 24 hodinách dochází u všech sledovaných biologických druhů k prakticky úplnému vyloučení ellipticinu z organismu, ve tkáních se vyskytují jen metabolity ve velice nízké koncentraci <sup>(147)</sup>.

### **1.5.2 Mechanismy účinku ellipticinu**

Protinádorové působení ellipticinu je vysvětlováno několika mechanismy:

**Interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA** <sup>(149-151)</sup>, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interkalace ellipticinu je způsobena slabými reverzibilními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly DNA <sup>(146)</sup>. Vzájemné působení mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě je určující pro orientaci této sloučeniny v DNA <sup>(152)</sup>. Díky své fluorescenci je ellipticin používán i jako modelová interkalační sloučenina <sup>(152, 153)</sup>.

**Inhibice topoisomerasy II.** Ellipticin interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu, který je katalyticky neaktivní a vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA <sup>(154, 155)</sup>.

**Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53** <sup>(156, 157)</sup>, která je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinas. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může vyústit v indukci apoptosy.

**Inhibice oxidační fosforylace.** Interakce ellipticinu a některých jeho derivátů s vnitřní mitochondriální membránou vede k inhibici elektronového transportu (na úrovni cytochrom c oxidasy) a k porušení oxidační fosforylace<sup>(158, 159)</sup>, jež vede ke drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což resultuje v jejich zánik<sup>(160)</sup>.

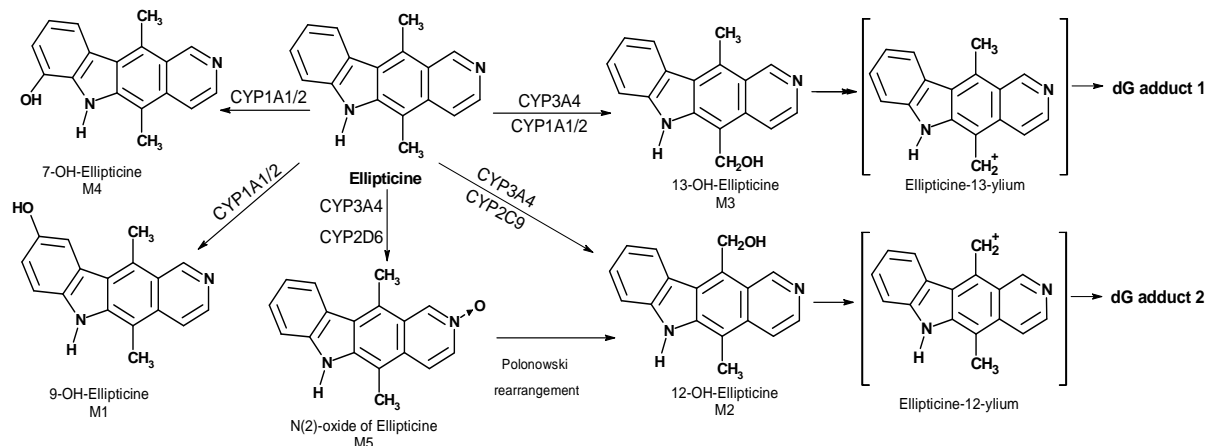
**Inhibice telomerasy**<sup>(145)</sup>, která byla však zatím prokázána pouze v buněčných kulturách, nikoli *in vivo*<sup>(161)</sup>.

Všechny výše zmíněné mechanismy účinku jsou založeny zejména na nespecifickém působení ellipticinů, což je v rozporu s jejich poměrně úzkou specifitou účinku vůči určitým typům neoplasie. Velmi důležitým aspektem pozorovaným při terapii ellipticiny byla navíc individuální variabilita v odpovědi pacientů na podané léčivo, což by mohlo být způsobeno odlišnou výbavou enzymy participujícími na metabolické aktivaci ellipticinu na deriváty terapeuticky ještě více účinné<sup>(162)</sup>. Biotransformace a metabolická aktivace ellipticinu (*kap. 1.5.3*) je proto předmětem výzkumu na katedře biochemie PŘF UK.

Podařilo se odhalit nový mechanismus působení tohoto léčiva, kterým je **tvorba kovalentních aduktů s DNA**. Ellipticin je v průběhu metabolismu v organismu aktivován na farmakologicky účinnější metabolity, které se kovalentně váží na DNA<sup>(162-166)</sup>, může tedy působit jako alkylační činidlo. Tento mechanismus by mohl vysvětlovat jeho vysokou účinnost v protinádorové terapii, jelikož cytostatika kovalentně modifikující DNA jsou jedněmi z nejsilnějších protinádorových agens.

### 1.5.3 Biotransformace ellipticinu

Hlavním místem biotransformace ellipticinu jsou játra, kde je ellipticin přeměňován na pět metabolitů (*obr. 15*). Majoritně vzniká 9-hydroxyellipticin, který je dále konjugován na glukuronát nebo sulfát a vyloučen žlučí<sup>(147, 167)</sup>.



**Obrázek 15**

Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450<sup>(166)</sup>

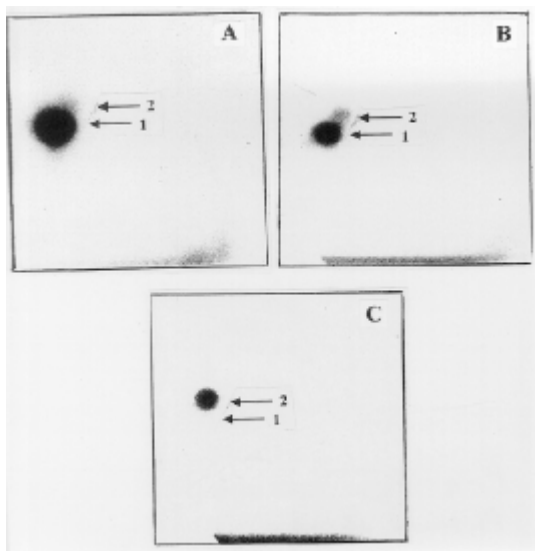
Metabolity 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a  $N^2$ -oxid ellipticinu jsou tvořeny nejen lidskými jaterními mikrosomy, ale rovněž i mikrosomy modelových organismů (potkan a králík).

Ellipticin je aktivován oxidačními reakcemi, katalyzovanými dvěma typy hemových enzymů: cytochromy P450 <sup>(162, 164, 165, 168)</sup> a peroxidasami <sup>(169)</sup>. Oba typy enzymů jsou exprimovány i v cílových nádorových tkáních, pro jejichž léčbu je ellipticin používán <sup>(170-172)</sup>, některé dokonce v množství vyšším než ve tkáni zdravé.

Oxidace ellipticinu peroxidasami probíhá jako jednoelektronová oxidace. Majoritním produktem je dimer ellipticinu. Dvě molekuly ellipticinu se váží prostřednictvím atomu  $N^6$  pyrrolového kruhu a C9 atomu druhé ellipticinové struktury. Minoritním produktem oxidace je ellipticin- $N^2$ -oxid <sup>(169, 173-175)</sup>.

#### 1.5.4 Tvorba aduktů ellipticinu s DNA

V průběhu biotransformace ellipticinu vznikají metabolity schopné kovalentní vazby s DNA. Tento fakt byl potvrzen pomocí dvou nezávislých metod, použitím [ $^3H$ ]ellipticinu a  $^{32}P$ -postlabelingu <sup>(176)</sup>. Detekovány byly minimálně dva adukty ellipticinu s DNA, které vznikaly ve všech testovaných systémech *in vitro* <sup>(162)</sup> (obr. 16). Majoritní adukt (adukt 1, obr. 16), jehož vznik je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů, a minoritní adukt



**Obrázek 16**  
Autoradiografie aduktů v DNA tvořených *in vitro* s ellipticinem aktivovaným jaterními mikrosomy potkana (A), lidskými mikrosomy (B) a bez enzymové aktivace (C). <sup>(162)</sup>

(adukt 2, obr. 16), který vznikal i bez přítomnosti enzymového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací <sup>(162, 168)</sup>.

Ellipticin generuje kovalentní adukty také v plicních fibroblastických buňkách křečka (V-79) transfekovaných lidskými cytochromy P450 <sup>(164)</sup>, *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana exponovaného touto protinádorovou léčivou <sup>(165)</sup> a i v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7) <sup>(163)</sup> a leukemických buňkách (HL-60, CCRF-CEM) <sup>(174)</sup>. V těchto případech vznikají i další minoritní adukty.

Kochromatografií tvořených aduktů pomocí TLC a HPLC bylo zjištěno, že se ve všech případech jedná o tytéž adukty 1 a 2 <sup>(163-165, 168)</sup>.

Cílovým deoxynukleotidem modifikovaným aktivovaným ellipticinem v DNA je deoxyguanosin <sup>(168)</sup>. Jako metabolity zodpovědné za tvorbu kovalentních aduktů byly určeny 13-hydroxyellipticin (M3), který tvoří majoritní adukt 1 vazbou s deoxyguanosinem v DNA, a 12-hydroxyellipticin (M2) s  $N^2$ -oxidem ellipticinu (M5), který Polonowského přesmykem poskytuje 12-hydroxyellipticin (M2), jehož vazbou na DNA vzniká adukt minoritní (adukt číslo 2) <sup>(166)</sup>.

Nejefektivnějšími aktivačními enzymy ellipticinu pro tvorbu aduktů s DNA v *in vivo* podmínkách se v rámci lidských forem cytochromu P450 ukázaly být zejména CYP3A4 a CYP1A1 <sup>(162, 168)</sup>.

## 2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu jako zásadního faktoru determinujícího mechanismus působení a cílový účinek tohoto léčiva. Ellipticin totiž vykazuje selektivní účinek pouze vůči určitým nádorům. Snahou je proto vysvětlit, čím je tato, pro nádorové léčivo užitečná, vlastnost určena. Cílem práce bylo také vysvětlit vyšší farmakologickou účinnost některých cytochromů P450 (CYP1A1/2) v metabolické aktivaci ellipticinu *in vivo* oproti situaci *in vitro*, zjištěnou v předchozích studiích <sup>(165, 166, 168)</sup>. V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

### **Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 jaterních mikrosomů modelových organismů**

V této části práce byla studována metabolická přeměna ellipticinu mikrosomy izolovanými z jater potkanů, králíků a myší. Cílem této studie bylo zjistit, které cytochromy P450 participují na tvorbě jednotlivých metabolitů ellipticinu. Dalším cílem bylo zjistit, zda jsou jaterní mikrosomální systémy modelových živočichů, a které z nich, vhodné jako model simulující oxidaci ellipticinu v lidských játrech. Pro daný cíl bylo ve studii využito inhibitorů cytochromů P450 a také jejich induktorů použitých pro premedikaci modelových organismů potkana a králíka.

### **Metabolismus ellipticinu jednotlivými formami cytochromů P450**

Cílem této části práce bylo poznání efektivity izolovaných cytochromů P450 v oxidaci ellipticinu. Oxidace ellipticinu byla proto studována purifikovanými cytochromy P450 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou v prostředí liposomů, které simulují situaci v membránách endoplasmatického retikula. K provedení těchto experimentů bylo rovněž nutné příslušné enzymy z jater experimentálních zvířat izolovat.

### **Studium indukčního potenciálu ellipticinu vůči cytochromům P450 podrodiny 1A**

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda v jaterní tkáni potkanů vystavených působení ellipticinu dochází ke změnám v obsahu a aktivitách vybraných forem cytochromů P450 (CYP1A1/2). Účelem tedy bylo zjistit, zda ellipticin samotný ovlivňuje vlastní

metabolismus, a to jak detoxikační, jež produkuje metabolity vylučované z organismu, tak i aktivační, který vede k tvorbě kovalentních aduktů s DNA. Záměrem bylo také poznání, zda může být indukční potenciál ellipticinu faktorem určujícím vyšší aktivační efektivitu cytochromů P450 podrodiny 1A pro ellipticin nalezenou *in vivo*.

### **Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu katalyzovanou cytochromy P450 1A1 a 1A2**

Tato studie sledovala, zda je to cytochrom b<sub>5</sub> (fakultativní součást MFO systému), který determinuje směr oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 na detoxikační a aktivační metabolity tohoto léčiva. Cílem této části výzkumu tedy bylo zjistit, zda rozdíly v aktivaci ellipticinu cytochromy P450 podrodiny 1A *in vivo* a *in vitro* mohou být způsobeny také vlivem tohoto proteinu na oba enzymy.

### **Objasnění mechanismu působení cytochromu b<sub>5</sub>**

Vedle vlivu cytochromu b<sub>5</sub> na metabolismus ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 bylo cílem práce i poznání, jakým mechanismem tento protein na oba enzymy působí. K vyřešení této otázky bylo nutné nejprve připravit apo-cytochrom b<sub>5</sub>, tedy cytochrom b<sub>5</sub>, který neobsahuje neproteinovou hemovou složku. Ta je v molekule cytochromu b<sub>5</sub> zodpovědná za přenos elektronů. Takto připravený apo-cytochrom b<sub>5</sub> byl dále použit místo nativního cytochromu b<sub>5</sub> v rekonstituovaném systému cytochromů P450 1A1 a 1A2 s NADPH:CYP reduktasou jako enzymový systém oxidující ellipticin.

### **Příprava a charakterizace majoritního aduktu ellipticinu s DNA tvořeného jeho metabolitem, 13-hydroxyellipticinem, s deoxyguanosinem**

K izolaci aduktu tvořeného reakcí 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem bylo nutné vyvinout metodu vhodnou pro jeho separaci pomocí HPLC, a to za účelem izolace jeho dostatečného množství nutného pro určení jeho struktury.

### 3 MATERIÁL A METODY

Většina metod používaných při vypracování předkládané disertační práce je popsána v publikacích, které tvoří součást práce a jsou uvedeny jako přílohy 1-8. Pro větší přehlednost a detailnější znalost jsou však některé z metod, a také i použitý materiál a chemikálie, uvedeny v této kapitole disertační práce.

#### 3.1 Použitý materiál a chemikálie

##### **BIO-RAD, USA**

hydroxylapatit

##### **Calbiochem, USA**

9-hydroxyellipticin

##### **Duchefa Biochemie, Holandsko**

ampicilin

##### **East Port, Česká republika**

deoxynukleotidtrifosfáty, syntéza oligonukleotidů

##### **Farmakon Olomouc, Česká republika**

fenobarbital sodný

##### **Fermentas, Kanada**

*Pfu* DNA polymerasa

##### **Fluka, Švýcarsko**

akrylamid, dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), ethylacetát, fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 2-merkaptoethanol, methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), protaminsulfát, tokoferol (vitamin E), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Tween 20

##### **Genomed, Německo**

Sety pro purifikaci plasmidové DNA a DNA z agarosového gelu (Jet Quick Gel Extraction Spin Kit, Jet Quick Plasmid Mini a Maxiprep Spin Kit)

##### **Gentest, USA**

N-acetyltransferasa 1/2

##### **Chemopetrol, Česká republika**

suchý led

**Kao Corp., Japonsko**

emulgen 911

**Koch-Light Lab., Velká Británie**

2-merkaptoethanol

**Lachema Brno / Lachner, Česká republika**

aceton, bromfenolová modř, dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogen fosforečnanu sodného, (di)hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, ethylendiamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli (EDTA, chelaton 3), ethanol, ethylacetát, glycerol, hydrogenuhlíčan sodný, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, octan sodný, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, sacharosa, síran měďnatý, uhličitan sodný, vinan sodný

**Linde, Česká republika**

dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý

**Loba Feinchemie, Rakousko**

glutathion, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

**Merk, Německo**

acetonitril, ethylacetát

**Millipore Corp., USA**

Immobilon<sup>TM</sup>- P transfer membrána (PVDF)

**New England Biolabs, USA**

Restrikční endonukleasy Hind III, EcoR I, Nde I, Xho I, plasmid pUC19, T4 DNA ligasa

**Pharmacia, Švédsko**

DEAE-Sepharosa CL6B, CM-Sepharosa CL6B, 2', 5'-ADP-Sepharosa

**Reanal Budapešť, Maďarsko**

glukosa-6-fosfát Na<sub>2</sub>, glycin

**Roche Diagnostic, Německo**

tablety proteasových inhibitorů (Complete mini protease inhibitors)

**Serva, Německo**

coomassie Brilliant Blue R-250, ethidium bromid (EtBr), glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), triton-X-100

**Sevapharma, a.s, Česká republika**



hovězí sérový albumin (BSA)

### **Sigma, USA**

acetylkoenzym A, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA),  $\beta$ -naftoflavon ( $\beta$ -NF), Brij 35, 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), cytochrom c, 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát, 5'-deoxyguanosin, diethyldithiokarbamát (DDTC), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), ellipticin, fenacetin, flavinmononukleotid (FMN), 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), guanosin-5'-monofosfát, sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), 1-heptansulfonová kyselina, hemin, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS), cholát sodný, isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid (IPTG), ketokonazol, králíčí protilátka IgY značená alkalickou fosfatasou, LB medium, LB agar, lidský sérový albumin (HSA), lysozym, myoglobin, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH), nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NADP}^+$ ), pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril (PCN), rifampicin (RIF), standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforesu v prostředí SDS „Wide range“, sulfafenazol, superoxid dismutasa (SOD), tergitol NP-10

### **Stratagene, USA**

Bakteriální kmen *E. Coli* BL-21 (DE3) Gold

### **X Ford Biomedical research INC, USA**

Sulfotransferasa 1A1/2

13-hydroxyellipticin byl syntetizován RNDr. Martinem Dračínským PhD.<sup>(177)</sup>, 7-hydroxyellipticin a  $N^2$ -oxid ellipticinu byly syntetizovány J. Kučkou a Doc. Ing. S. Smrčkem (katedra organické chemie PŘF UK).

## **3.2 Enzymové preparáty**

Samci králíků (činchila velká, 2.5-3.0 kg) a laboratorních potkanů (kmen Wistar, 150-200 g) byli drženi při laboratorní teplotě  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , voda a granulovaná strava jim byly podávány *ad libitum*. Případná premedikace byla zahájena po zhruba týdenní aklimatizaci. 18 hodin před usmrcením byla zvířatům odebrána strava pro snížení hladiny glykogenu v játrech.

### **3.2.1 Izolace mikrosomů a purifikace mikrosomálních enzymů**

Mikrosomy byly z jater zvířat premedikovaných induktory cytochromů P450 a

zvířat nepremedikovaných izolovány frakční centrifugací podle Stiborové a spol. <sup>(178, 179)</sup>. CYP2B2 a CYP2B4 byly izolovány z jaterních mikrosomů potkanů a králíků premedikovaných fenobarbitalem modifikovaným postupem dle Antonovic et al. <sup>(180)</sup>, Anzenbachera a kol. <sup>(181)</sup> a Haugena et al. <sup>(182)</sup>. CYP1A2 byl získán z jaterních mikrosomů králíků premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem dle Saita et al. <sup>(183)</sup> a Haugena et al. <sup>(182)</sup>, CYP3A6 byl purifikován z jaterních mikrosomů králíků premedikovaných rifampicinem dle Yanga et al. <sup>(184)</sup> a CYP2E1 po premedikaci králíků acetonem dle Koopa et al. <sup>(185)</sup> Králičí jaterní NADPH:CYP reduktasa byla izolována dle Yasukotchiho et al. <sup>(186)</sup> a potkaní cytochrom  $b_5$  podle <sup>(187)</sup>. Úpravy izolačních postupů byly prováděny dle disertační práce M. Šulce <sup>(188)</sup> a diplomové práce K. Janouchové <sup>(189)</sup>. Kontrolní skupinu tvořily zvířata nepremedikovaná.

### Tabulka 3

Premedikace zvířat, izolace mikrosomálních frakcí a purifikace mikrosomálních enzymů

Premedikace potkanů	Dávkové schéma	Získané preparáty
<b><math>\beta</math>-naftoflavon</b> ( $\beta$ -NF)	i. p. 60 mg/kg $\beta$ NF (4 mg/ml oleje) po dobu 3 následujících dnů	mikrosomy
<b>fenobarbital</b> (PB)	0.1% roztok v pitné vodě po dobu 6 dnů	mikrosomy CYP2B2
<b>ellipticin</b>	i. p. 6 mg/ml v DMSO a oleji (1:1), 2 dávky 40 mg/kg i. p. 6 mg/ml v DMSO a oleji (1:1), - různá dávková schémata	mikrosomy
<b>pregnenolon-16<math>\alpha</math>- karbonitril (PCN)</b>	intubačně 5 mg/ml PCN v oleji 5 dávek po 1ml v 12 hod intervalech	mikrosomy CYP3A1
<b>ethanol</b>	10% roztok v pitné vodě	mikrosomy
Premedikace králíků	Dávkové schéma	Získané preparáty
<b><math>\beta</math>-naftoflavon</b> ( $\beta$ -NF)	i. p. 80 mg/kg $\beta$ NF (4 mg/ml oleje) po dobu 3 následujících dnů	mikrosomy CYP1A2 NADPH:CYPreduktasa cytochrom $b_5$
<b>fenobarbital</b> (PB)	0.1% roztok v pitné vodě po dobu 10 dnů	mikrosomy CYP2B4, CYP2C3 NADPH:CYPreduktasa cytochrom $b_5$
<b>aceton</b>	2% roztok v pitné vodě po dobu 8 dnů	mikrosomy CYP2E1
<b>rifampicin</b> (RIF)	i. p. 50 mg/kg RIF ve 40 mM NaOH po dobu 3 následujících dnů	mikrosomy CYP3A6, reduktasa

Identifikace produktů izolace byla provedena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Srovnání měřených spekter peptidů s databází NCBIInr (2005/06/01) bylo provedeno

programem ProFound ([http://129.85.19.192/profound\\_bin/webProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/webProFound.exe)). Provedeno RNDr. M. Šulcem, PhD.

Izolované mikrosomální frakce i jednotlivé enzymy byly v alikvotech zmrazeny v kapalném dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Údaje o premedikaci, izolaci mikrosomálních frakcí a purifikaci mikrosomálních enzymů shrnuje *tabulka 3*.

**Myší mikrosomy** byly izolovány Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. postupy popsány v publikaci, která tvoří přílohu disertační práce (*příloha 5*)

**Rekombinantní potkaní CYP1A1** byl purifikován z membrán *Escherichia coli* transfekovaných modifikovanou *CYP1A1* cDNA<sup>(190)</sup> v laboratoři H. W. Strobel (University of Texas, Medical School of Houston, Texas, USA) Doc. Petrem Hodkem (katedra biochemie PřF UK).

**Supersomy<sup>TM</sup>** obsahující různé izoformy a exprimující NADPH:CYP reductasu byly získány z komerčního zdroje (Gentest Corp., Woburn, MA, USA).

### 3.3 Metody stanovení koncentrací a aktivit vybraných enzymů

Koncentrace proteinů byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol.<sup>(191)</sup>, při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí a s hovězím sérovým albuminem (BSA) jako standardem. Intenzita zabarvení, stanovená spektrofotometricky ( $A_{562}$ ), je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Obsah cytochromu P450 v preparátech byl stanoven za využití charakteristické absorpce komplexu tohoto hemthiolátového proteinu v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm<sup>(32)</sup>.

Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy bylo provedeno měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace NADPH. Přírůstek redukovaného cytochromu c se měří při vlnové délce 550 nm<sup>(192)</sup>.

Koncentraci NADPH:CYP reductasy lze stanovit spektrofotometricky. Díky flavinovým koenzymům vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 455 nm<sup>(193)</sup>.

Cytochrom b<sub>5</sub> je protein vykazující absorpční maximum při vlnové délce 413 nm Jeho koncentrace byla stanovena spektrofotometricky z absorpčního spektra s využitím molárního extinkčního koeficientu  $\epsilon_{413} = 117 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ <sup>(194-196)</sup> nebo z diferenčního spektra (dithioničitanem redukované – oxidované, molární extinkční koeficient  $\epsilon_{424-409} = 185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>(195)</sup>.

## 3.4 Elektromigrační metody

### 3.4.1 SDS elektroforéza

**Elektroforéza** mikrosomálních proteinů v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) byla prováděna dle postupu popsaného v práci Laemmliho <sup>(197)</sup> na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 3% zaostřovacího gelu a 10% (případně 7% nebo 15% pro NADPH:CYP reductasu a cytochrom b<sub>5</sub>) separačního gelu. Elektromigrace probíhala ve vertikálním uspořádání při pH 8.3 a při napětí 80 V pro průchod zaostřovacím gelem, které bylo poté zvýšeno na 150 V. Gely byly barveny coomasie brilliant blue.

### 3.4.2 Metoda „Western blotting“

Pro metodu „**Western blotting**“ byl gel po skončení elektroforézy 20 minut inkubován v **transferovém pufru** (0.025 M TRIS, 0.192 M glycin, pH 8.3). Do aparatury byly postupně navrstveny 3 ks chromatografického papíru Whatman 3, PVDF membrána, gel a to vše překryto dalšími 3 ks chromatografického papíru. Membrány byly „smočeny“ dle údajů výrobce a spolu s chromatografickými papíry také předem ponořeny do transferového pufru. Elektropřenos byl prováděn nejprve 10 minut při 0.8 mA/cm<sup>2</sup> gelu, poté 45 minut při 2.0 mA/cm<sup>2</sup> gelu.

Membrána se sorbovanými proteiny byla přes noc blokována v **blokovacím roztoku** (5% sušené mléko v PBS (1.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.134 M NaCl; pH 7.2), 0.3% Triton X-100) při 6°C. **Inkubace se specifickou primární protilátkou** (10 µg/mL blokovacího roztoku) probíhala 120 minut za míchání při laboratorní teplotě a po promytí blokovacím roztokem (5 x 2 minuty) byla membrána vložena do roztoku **sekundární protilátky** (králičí IgG proti kuřecí IgY s navázanou alkalickou fosfatásou, 5 µl/10 ml blokovacího roztoku), kde byla inkubována za shodných podmínek 60 minut. Po promytí v blokovacím roztoku (4 x 2 minuty) a 0.3%-ním Tritonu v PBS (4 x 2 minuty) byla membrána vyvolána roztokem substrátu pro alkalickou fosfatázu (BCIP/NBT) v 10 ml destilované vody. Intenzita zón ilustrujících množství enzymů byla kvantifikována programem ELFOMAN 2.0.

### 3.4.3 Agarosová elektroforéza

Pro dělení fragmentů DNA byla používaná elektroforéza s 1.5% gelem agarosy v TAE pufru (50x konc. 2 M Tris, 1 M acetát, 50 mM EDTA, pH 8.3), který byl rovněž

použit jako pufr elektrodový. Do gelu byl před stuhnutím přidán ethidium bromid v koncentraci 0.5 µg/ml gelu. Elektroforéza probíhala 30 minut při napětí 110 V.

### 3.5 Studium metabolismu ellipticinu cytochromy P450

#### 3.5.1 Oxidace ellipticinu mikrosomy

Pro měření oxidace ellipticinu byly použity mikrosomy zvířat (králík, potkan, myš) premedikovaných induktory CYP, zvířat nepremedikovaných a Supersomy<sup>TM</sup>

Inkubační směs o celkovém objemu 500 µl obsahovala:

- 0.4 µM CYP (0.02-0.1 µM supersomálního CYP)
- 10 µM ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS)
- fosfátový pufr (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4)

Reakce byla startována přidáním 50 µl NADPH-GS, inkubace probíhala 20 minut za stálého třepání (450 RPM) při teplotě 37 °C. Probíhající reakce byla zastavena přidáním 100 µl 2 M NaOH. Následně byl přidán fenacetin (5 µl 1 mM roztoku v methanolu) jako vnitřní standard a směs byla poté extrahována 2 min na „Vortexu“ 2 x 1ml ethylacetátu a centrifugována 5 minut při 3000 RPM (Sanyo Microcentaur MSE). Organická fáze (2 x 750 µl) byla odebrána a odpařena dosucha pomocí vakuové odparky „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou na přístroji Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S) byl odparek rozpuštěn v 25 µl methanolu.

#### **Podmínky pro HPLC:**

<b>kolona</b>	C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Ultrasphere ODS, Beckman Coulter)
<b>mobilní fáze</b>	64 % metanol + 0.005 M heptansulfonová kys. + 0.032 M kys. octová
<b>průtok</b>	0.7 ml/min
<b>teplota</b>	35 °C
<b>detekce</b>	při vlnové délce 296 (313) nm

#### 3.5.2 Oxidace ellipticinu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Rekonstituovaný systém byl připraven tak, že jeho výsledné složení bylo:

- 100 pmol CYP
- 100 pmol NADPH:CYP reductasy

- 0.05 mg/ml CHAPS (0.5 mg/ml v pufru HEPES)
- 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml v chloroformu)
- 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok v H<sub>2</sub>O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H<sub>2</sub>O; pH 7.4)

Pro studium vlivu NADPH:CYP reduktasy na oxidaci ellipticinu bylo do rekonstituovaného systému dáváno 5-150 pmol reduktasy, pro studium vlivu cytochromu b<sub>5</sub> byl tento protein přidáván v množství 0-1000 pmol. Ostatní složky (SOD, HSA, lysozym atd.) byly vždy přidávány v pětinasobném nadbytku proti CYP.

Nejdříve byl ve skleněných zkumavkách odpařen pod atmosférou dusíku roztok DLPC v chloroformu o koncentraci 5 mg/ml tak, aby se na dně a stěnách zkumavky vytvořila vrstvička tohoto lipidu. Dále byly přidány do zkumavek roztoky detergentu CHAPS, glutathionu a pufru HEPES. Směsi byly sonikovány 2 x 3 minuty, což přispívá k snadnější tvorbě liposomů, a poté k nim byly přidány enzymy (CYP, NADPH:CYP reduktasa, cytochrom b<sub>5</sub>) či další složky. Směsi byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce (IKA VX 2, Janke & Kunkel). Tím byly rekonstituované systémy připraveny a použity pro inkubace s ellipticinem.

Postup inkubace a analýza vzorků pomocí HPLC je shodná jako v kapitole 3.5.1.1. Jen v případě kinetických studií byl použit ellipticin o koncentracích 1,25-10 μM.

### 3.6 Izolace syntetizovaného 13-hydroxyellipticinu

Nežádoucí produkty vzniklé při syntéze 13-hydroxyellipticinu, připraveného RNDr. Dračínským, PhD.<sup>(177)</sup>, byly ze směsi odstraněny a žádoucí 13-hydroxyellipticin manuálně „sbírán“ pomocí HPLC za použití lineárního gradientu methanolu (80-100% methanolu během 20 minut) s následnou 10 minutovou isokratickou elucí.

#### Podmínky pro HPLC:

<b>kolona</b>	C-18, 250 x 8 mm (Waltrex, Nucleosil 120-5)
<b>mobilitní fáze A</b>	80% methanol, 0.07 M octan amonný
<b>B</b>	100% methanol, 0.07 M octan amonný
<b>průtok</b>	0.7 ml/min
<b>teplota</b>	35 °C
<b>detekce</b>	při vlnové délce 296 (313) nm

### 3.7 Příprava aduktu 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem

Inkubační směsi byly připravované o celkovém objemu 500 μl a složení:

- 50 μM 13-hydroxyellipticin

- 1 mM deoxyguanosinu nebo 1 mg DNA z telecího brzlíku
- fosfátový pufr (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6.0, 7.4; 8.4)
- za přítomnosti či absence 39 nmol SULT1A1/2 nebo NAT1 a 2 a jejich kofaktorů (2 mM acetyl koenzym A, 100 μM PAPS)

Směsi byly inkubovány 1-24 hodin při 37°C a následně analyzovány pomocí HPLC za použití lineárního gradientu methanol-kyselina octová (0-100% methanol během 70 minut) s následnou isokratickou elucí po dobu 5 minut.

#### Podmínky pro HPLC:

<b>kolona</b>	C18, 250 x 4.6 mm, 5 μm (Ultrasphere ODS, Beckman Coulter)
<b>mobilní fáze A</b>	32 mM kyselina octová (vodný roztok)
<b>B</b>	100% methanol
<b>průtok</b>	1 ml/min
<b>teplota</b>	35 °C
<b>detekce</b>	při vlnové délce 250 a 318 nm

Analýzy DNA aduktů metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling<sup>(176)</sup>“ byly provedeny školitelkou na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu.

### 3.8 Příprava rekombinantního apo-cytochromu b<sub>5</sub>

Pro získání apo-cytochromu b<sub>5</sub> musí být hem z molekuly proteinu efektivně, ale opatrně odstraněn tak, aby byla zachována jeho přirozená konformace. Nejprve jsme testovali extrakci hemu z izolovaného králičího cytochromu b<sub>5</sub> okyseleným acetonem<sup>(120, 198)</sup>, ale většina proteinu denaturovala a precipitovala. Proto jsme přistoupili k heterologní expresi v buňkách *E. coli*.

#### 3.8.1 Návrh a syntéza genu pro membránovou formu králičího cytochromu b<sub>5</sub>

Gen byl nejprve v počítačovém programu DNA 2.0 upraven tak, aby vyhovoval proteosyntetickému aparátu použitých bakterií *Escherichia coli* a byly do něj vneseny místa pro štěpení restrikčními endonukleasami. Celý gen jsme rozdělily na osm oligonukleotidů o přibližně 80 párech bází, které se vzájemně překrývaly oblastí délky asi 18 nukleotidů o teplotě tání vyšší než 50°C. Oligonukleotidy byly připraveny firmou East Port.

Nejprve byly pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) za použití termostabilní DNA polymerasy spojeny oligonukleotidy 2-7. Složení reakční směsi bylo následující:

- 1 μl dNTPs (10 mM)
- 1 μl oligonukleotidy (primery) (20 μM)

- 0,5 µl *Pfu* polymerasy
- 1 µl templát
- 5 µl pufru pro *Pfu* polymerasu (10x konc., obsahující 20 mM MgSO<sub>4</sub>)
- sterilní MQ voda (do celkového objemu 50 µl)

Amplifikace probíhala na thermocycleru Techgene (TECHNE) ve 30 cyklech za těchto

podmínek:	94°C	30 s	rozvolnění DNA
	50°C	30 s	nasedání primerů
	73°C	2 min	polymerace

Následovalo dalších 8 min při 73°C, aby došlo k dokončení polymerace.

V dalším kroku byly jako primery pro PCR reakci použity oligonukleotidy 1 a 8 a jako templát DNA řetězec vzniklý z oligonukleotidů 2-7. Výsledný produkt byl štěpen restričními endonukleasami EcoR I a Hind III a pomocí T4 DNA ligasy zaligován do plasmidu pUC19 naštepěho stejnými enzymy. Takto připravený konstrukt byl použit pro transformaci kompetentních buněk DH5α. Amplifikovaná plasmidová DNA byla z buněk izolována komerčním kitem dle pokynů výrobce a správnost sekvence připraveného genu pro cytochrom b<sub>5</sub> ověřena sekvenováním.

### **3.8.2 Transformace kompetentních buněk**

Kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly ponechány pomalu roztát na ledu. K suspenzi buněk byl přidán plasmid (0,3 µg na 100 µl buněk). Směs byla ponechána 30 min na ledu. Následoval tzv. tepelný šok, kdy byly bakterie na krátkou dobu (30 s) vystaveny působení teploty 42°C ve vodní lázni a ihned poté uloženy na led. Po 1 min bylo k suspenzi přidáno 600 µl sterilního LB média (bez antibiotik) a proběhla inkubace 40 min při 37°C. Poté byly buňky sterilní skleněnou mikrobiologickou hokejkou rozetřeny na Petriho misky s tuhým médiem LB agarem se 100 µg/ml ampicilinu, který slouží jako selekční marker. Na miskách byly ponechány bakterie růst při 37°C přes noc.

### **3.8.3 Produkce proteinu**

Jako expresní vektor byl použit plasmid pET-22b, do kterého byl po naštěpení endonukleasami Nde I a Xho I vnesen gen pro králičí cytochrom b<sub>5</sub>, jenž byl vyštěpen z plasmidu pUC19 stejnými enzymy. Pro produkci byly jako nejvhodnější vybrány buňky *E. coli* BL-21(DE3) Gold, které byly expresním vektorem transformovány. Transformované buňky byly opět vysety na plotny s LB agarem obsahující 100 µg/ml ampicilinu a



ponechány růst přes noc při 37°C. Produkce pak byla prováděna tak, že sterilní LB médium s příslušnými antibiotiky bylo zaočkováno kulturou produkčního klonu a necháno růst při 37°C za třepání 200 RPM. Když optická hustota kultury měřená při vlnové délce 600 nm dosáhla hodnoty okolo 1, bylo do kultury přidáno takové množství IPTG, aby jeho výsledná koncentrace v kultuře byla 0.05 mM. Tím byla syntéza cytochromu  $b_5$  indukována. Kultura byla kultivována další 4 hodiny, poté odstředěna 20 min, 3000 g, 4°C v kvetách o objemu 1 l. Bakteriální pelety byly uschovány při -20°C.

### **3.8.4 Purifikace apo-cytochromu $b_5$ z bakteriálních buněk**

#### **3.8.4.1 Izolace membránové frakce**

Pelety buněk byly po rozmrznutí resuspendovány ve 25 ml fosfátového pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 1 mM EDTA) a do suspenze přidány 2 tablety proteasových inhibitorů (complete mini protease inhibitors). Buňky držené na ledu byly rozbity sonikací pomocí sondy TE 76 ponořené ve vzorku (8 sonikačních cyklů trvajících 2.5 min, 40W s 10 min ochlazením mezi každým cyklem). Zbytky buněk byly odstraněny centrifugací (3000g, 15 min, 4°C). Supernatant byl následně podroben ultracentrifugaci (105 000g, 70 min, 4°C), sediment homogenizován s 25 ml fosfátového pufru (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 1 mM EDTA, 20% glycerol) a ponechán při 4°C, dokud nebyla stanovena koncentrace proteinů.

#### **3.8.4.2 Solubilizace cytochromu $b_5$ z membrán**

Membránová frakce byla ředěna puforem (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 1 mM EDTA, 20% glycerol) na výslednou koncentraci proteinů 4 mg/ml. Získaná suspenze byla míchána na ledu a po kapkách k ní byl přidáván 10% cholát sodný (w/v) a 10% Brij 35 do výsledné koncentrace 1 mg detergentu/mg proteinu. Směs byla ještě další 3 hod míchána. Nerozpustné podíly byly odděleny centrifugací (105 000g, 70 min, 4°C).

Supernatant byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL6B.

#### **3.8.4.3 Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B**

Na ekvilibrovanou kolonu (2.5x20 cm) puforem o složení 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 1mM EDTA, 20% glycerol, 0.6% Brij byl aplikován supernatant rychlostí 1 ml/min, zároveň byly jímány frakce o objemu 7-10 ml a měřena absorbance při 280 nm. Po

nanesení vzorku byla kolona promývána ekvilibračním pufrem až do poklesu absorbance na základní hladinu. Pro eluci cytochromu  $b_5$  byl použit lineární gradient 2 x 300 ml 0-0.4 M KCl v ekvilibračním pufru. Frakce s vysokým obsahem čistého proteinu byly spojeny, zahuštěny ultrafiltrací (Amicon, membrána PM-10, Millipore) a dialyzovány přes noc proti 2 000 ml ekvilibračního pufru.

Detergent Brij 35 byl z preparátu cytochromu  $b_5$  odstraněn rechromatografií na další koloně DEAE-Sepharosy, ekvilibrované pufrem 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 0.1% cholát sodný. Kolona byla nejprve promyta ekvilibračním pufrem (3 x objem nosiče) pro odmytí detergentu a cytochrom  $b_5$  následně eluován izokraticky pufrem o vysoké iontové síle (200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM KCl, pH 7.7, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 0.1% cholát sodný). Cholát sodný byl z preparátu odstraněn dialýzou proti 2000 ml pufru neobsahujícímu žádný detergent (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 20% glycerol). Výsledný preparát byl zahuštěn ultrafiltrací (membrána PM-10, Millipore).

### **3.8.5 Spektrální charakterizace apo-cytochromu $b_5$**

Příprava roztoku heminu a jeho inkorporace do apo-cytochromu  $b_5$  byla upravena podle již dříve publikované práce <sup>(199)</sup>. Vzorek apo-cytochromu  $b_5$  byl tímto roztokem titrován. Nárůst maxima Soretova pásu při 413 nm, indikující obnovení struktury holoproteinu, byl sledován spektrofotometricky. Dále byla měřena spektra oxidovaného a dithioničitanem redukováného (apo-) cytochromu  $b_5$  a redukce (apo-) cytochromu  $b_5$  NADPH:CYP reduktáou v rekonstituovaném systému <sup>(114)</sup>.

## **3.9 Metoda $^{32}\text{P}$ -postlabeling**

Analýzy DNA aduktů byly provedeny školitelkou na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou „ $^{32}\text{P}$ -postlabeling <sup>(176)</sup>“. Detaily jsou popsány v citaci <sup>(176)</sup> a publikacích, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 2, 3, 5-7.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Metabolismus ellipticinu cytochromy P450

Metabolismus ellipticinu byl v předkládané disertační práci studován v podmínkách *in vitro*. V prvním přiblížení byla oxidace ellipticinu sledována za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater laboratorních zvířat, potkana, králíka a myši. Připraveny byly jak mikrosomy kontrolní (z nepremedikovaných zvířat), tak i mikrosomy z jaterních buněk modelových organismů premedikovaných známými induktory izoformy cytochromů P450. Přehled induktorů a izoformy CYP, které jsou těmito látkami v organismech laboratorního potkana a králíka nejvíce indukovány uvádí *tabulka 4*. Výsledky získané v těchto studiích pak byly porovnány s výsledky získanými s mikrosomálními systémy izolovanými z jater člověka.

#### Tabulka 4

Přehled použitých induktorů CYP a izoformy CYP, k jejichž nabohacení dochází

Induktor	izoforma CYP	modelový organismus
$\beta$ -naftoflavon ( $\beta$ -NF)	1A1/2	potkan, králík
Fenobarbital (PB)	2B1/2	potkan
Fenobarbital (PB)	2B4	králík
Ethanol (EtOH)	2E1	potkan
Aceton (AC)	2E1, 2C3	králík
Pregnenolon-16- $\alpha$ -karbonitril (PCN)	3A1/2	potkan
Rifampicin (RIF)	3A6	králík

Po inkubaci 10  $\mu$ M ellipticinu s lidskými, potkaními, králičími a myšími mikrosomy za přítomnosti NADPH generujícího systému bylo pomocí HPLC detekováno pět metabolitů. Ukázka záznamu HPLC metabolitů ellipticinu tvořících se králičími mikrosomy je na *obrázku 17*.

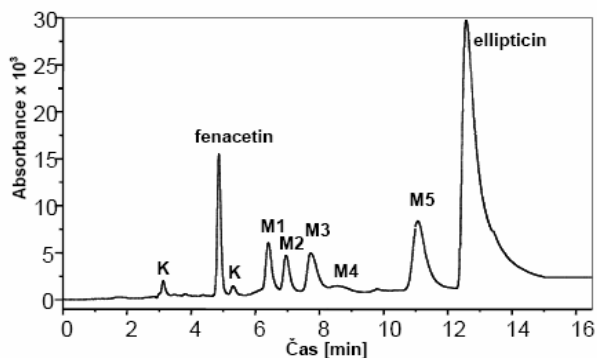
Struktura daných metabolitů byla určena již v předchozích studiích v naší laboratoři pomocí hmotnostní spektroskopie a NMR, jak je popsáno v práci Stiborové a kol. z roku 2004<sup>(166)</sup> a v publikaci tvořící součást této disertační práce (*příloha 1*).

Jedná se o následující metabolity:

**M1:** 9-hydroxyellipticin, **M2:** 12-hydroxyellipticin, **M3:** 13-hydroxyellipticin,

**M4:** 7-hydroxyellipticin, **M5:**  $N^2$ -oxid ellipticinu

Metabolit M2 (12-hydroxyellipticin) může vznikat i přeměnou metabolitu M5 ( $N^2$ -oxid ellipticinu) Polonowského přesmykem.

**Obrázek 17**

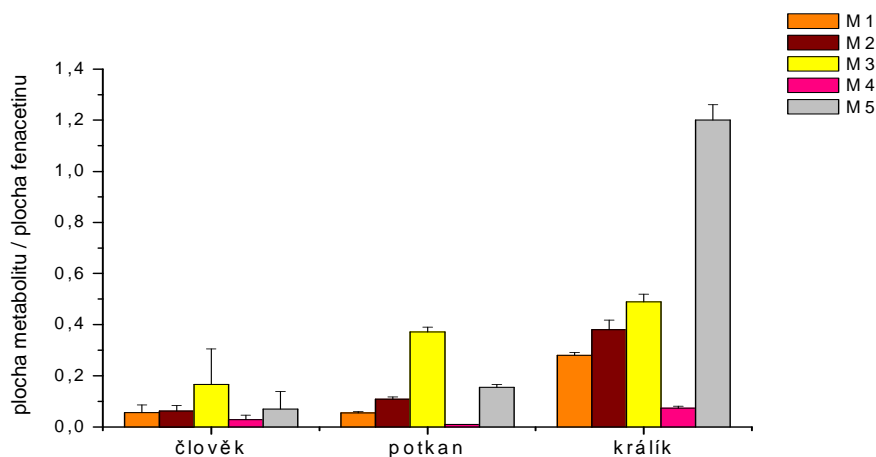
**HPLC separace metabolitů ellipticinu** tvořených kontrolními králíčími mikrosomy. „Píky“ označené písmenem K byly přítomny i v kontrolních inkubacích obsahujících ellipticin a mikrosomy bez NADPH. Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.

#### **4.1.1 Metabolismus ellipticinu mikrosomy jater člověka, potkana, králíka a myši**

Při kvantifikaci tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu bylo zjištěno, že se jejich relativní zastoupení po inkubaci s jaterními mikrosomy liší pro různé biologické druhy (*obr. 18, str. 52*), a je též značně ovlivněno premedikací modelových organismů známými induktory cytochromu P450 (*obr. 19, str. 53*).

Mikrosomy králíka byly v oxidaci ellipticinu nejefektivnější. Hlavním metabolitem je zde  $N^2$ -oxid ellipticinu (M5), který tvoří více než 50% celkového množství všech vznikajících metabolitů, následovaný 13-hydroxyellipticinem (M3). U potkana a člověka je tomu však právě naopak. Zde je majoritním metabolitem 13-hydroxyellipticin (M3), zatímco  $N^2$ -oxid ellipticinu (M5) je tvořen mnohem méně, tvoří jen kolem 20% všech metabolitů. Procentuální zastoupení ostatních metabolitů ellipticinu [9-hydroxyellipticinu (M1), 12-hydroxyellipticinu (M2) a 7-hydroxyellipticinu (M4)] je u těchto organismů srovnatelné, 7-hydroxyellipticin je tvořen jen ve velmi malém množství (2-6%) (*obr. 18*). V případě myších jaterních mikrosomů je tvořen jako majoritní metabolit 9-hydroxyellipticin (M1), následován 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinem. Nejméně je ellipticin tímto systémem oxidován na 7-hydroxyellipticin a  $N^2$ -oxid ellipticinu (*obr. 4 v příloze 5*). Detailně jsou výsledky z těchto studií prezentovány v publikacích uvedených jako *přílohy 1, 3 a 5* disertační práce.

Uvedené mezidruhové rozdíly v metabolismu ellipticinu mohou být zapříčiněny odlišnou hladinou exprese jednotlivých izoforem cytochromu P450 a také jejich rozdílnou katalytickou aktivitou.



### Obrázek 18

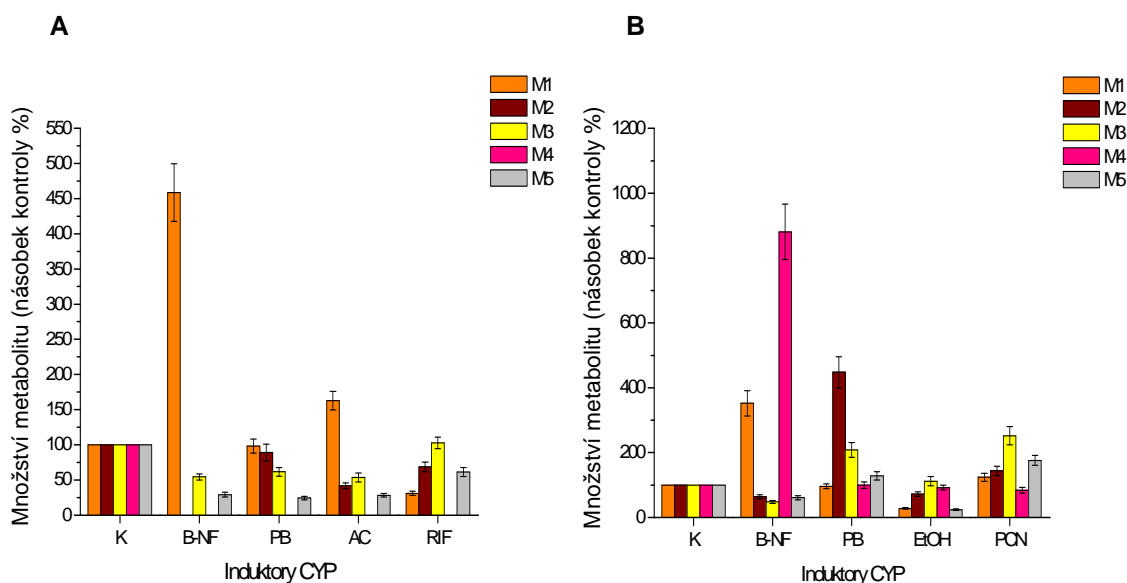
Přeměna elliptycinu jaterními mikrosomálními frakcemi člověka, potkana a králíka (bez premedikace). Hodnoty jsou průměrem nejméně tří nezávislých měření

Pro přesnější určení, které izofomy cytochromu P450 jsou zodpovědné za tvorbu daných metabolitů elliptycinu, byly prováděny podrobnější studie s inhibitory (*Tab. 5*) a induktory cytochromů P450 (*obr. 19*). V případě induktorů byly užity experimenty s modelovými organismy potkana a králíka.

Největší vliv na tvorbu jednotlivých metabolitů elliptycinu a jejich zastoupení měl induktor cytochromů P450 1A1/2,  $\beta$ -naftoflavon. Jeho působením byla stimulována tvorba 9-hydroxyelliptycinu (M1) a 7-hydroxyelliptycinu (M4), a to u obou modelových organismů. Indukce těchto enzymů také nejvíce pozměnila zastoupení jednotlivých metabolitů elliptycinu. Z dalších induktorů cytochromů P450 pak významně ovlivnil zastoupení jednotlivých metabolitů především PCN, induktor podrodiny CYP3A u potkana, který stimuloval tvorbu 13-hydroxyelliptycinu (M3) a  $N^2$ -oxidu elliptycinu (M5). V jaterních mikrosomech potkana premedikovaného induktorem CYP2B, PB, pak docházelo k potenciaci oxidace elliptycinu na 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin. Výsledky experimentů s jednotlivými induktory cytochromů P450 jsou shrnuty v *obr. 19*.

Z výsledků těchto studií vyplývá, že na tvorbě metabolitů 9-hydroxyelliptycinu (M1) potkana a králíka a 7-hydroxyelliptycinu (M4) potkana se v jaterních mikrosomech podílejí zejména cytochromy P450 podrodiny 1A, zatímco metabolity 13-hydroxyellipticin (M3) a  $N^2$ -oxid elliptycinu (M5) jsou u potkana tvořeny cytochromy P450 podrodiny 3A. Tvorba metabolitu 12-hydroxyelliptycinu (M2) je pak zprostředkována hlavně cytochromy podrodiny 2B, ale může vznikat rovněž neenzymově z  $N^2$ -oxidu elliptycinu. U králíka jsou

za tvorbu těchto metabolitů pravděpodobně zodpovědné jiné izoformy CYP, zejména CYP2C3, jak prokázaly studie s izolovanými cytochromy P450 (*kapitola 4.1.2.*).



### Obrázek 19

Vliv premedikace induktory CYP na metabolismus ellipticinu jaterními mikrosomy králíka (A) a potkana (B), Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

Výsledky získané z experimentů využívajících induktory cytochromů P450 byly rovněž potvrzeny studií s inhibitory těchto enzymů. Výsledky jsou shrnuty v *tabulce 5*.

Z uvedených studií vyplývá, že z hlediska oxidace ellipticinu je z použitých experimentálních modelů nejpodobnější situací s lidskými systémy organismus **laboratorního potkana**. Tento model je tedy vhodný i pro studie *in vivo*.

Tento model byl tedy využit pro studium vlivu samotného ellipticinu na expresi některých cytochromů P450. Velmi podstatným poznatkem získaným v těchto studiích bylo zjištění, že ellipticin indukuje expresi dvou enzymů, které participují na jeho metabolismu, jmenovitě CYP1A1 a 1A2, a to v játrech (*obr. 20, str. 55*), ale i extrahepatálních orgánech, ledvinách a plicích laboratorního potkana. Vliv indukce cytochromů P450 se projevuje jak na úrovni zvýšení exprese mRNA, tak i proteinů těchto enzymů. Dochází také ke zvýšení jejich aktivity, ta pak resultuje i ve stimulaci oxidace ellipticinu na jednotlivé metabolity (*obr. 21, str. 55*) a jeho aktivaci vedoucí k tvorbě aduktů s DNA (*obr. 22, str. 56*).

Ellipticin svým indukčním potenciálem tedy přímo moduluje své farmakologické a genotoxické účinky.

**Tabulka 5**

Inhibice metabolismu ellipticinu specifickými inhibitory CYP v lidských, potkaních a králičích mikrosomech

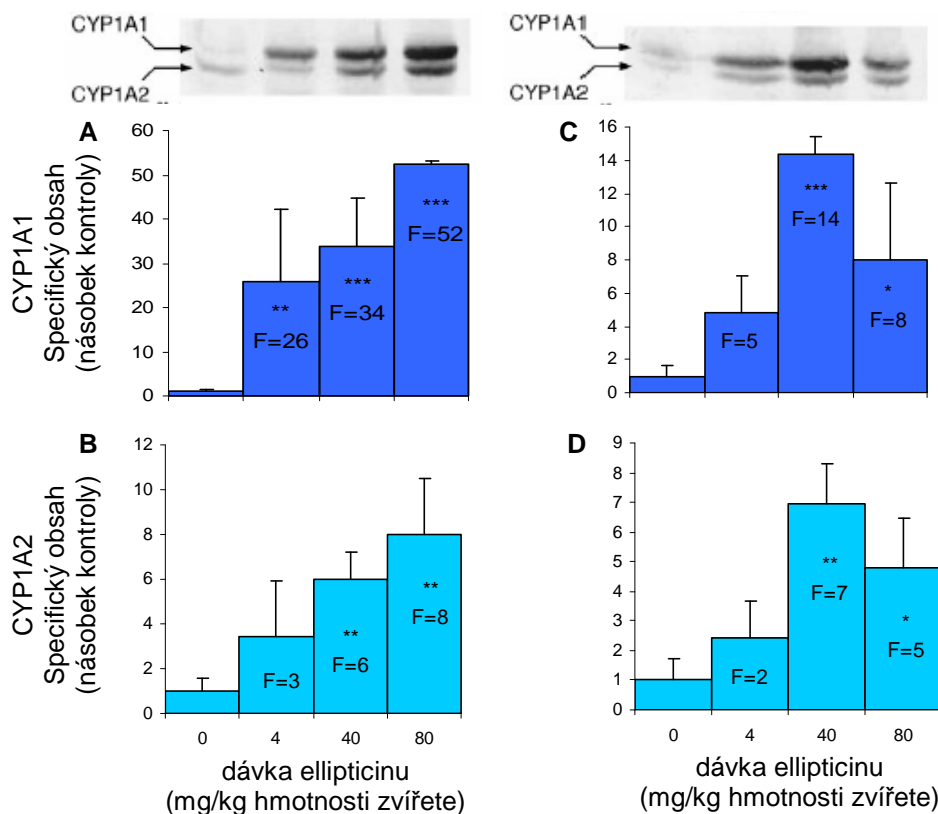
<b>člověk</b>				
<b>Inhibitor CYP</b>	<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>			
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M5</b>
α-NF (CYP1A1/2)	1	25	Stimul.	NI
Furafylin (CYP1A2)	71	NI	95	NI
3-PMDIA (CYP2B1/2)	110	350	270	250
Sulfafenazol (CYP2C)	Interf	210	250	NI
DDTC (CYP2E1)	68	NI	250	70
Ketokonazol (CYP3A1/2)	50	95	10	8
<b>potkan</b>				
<b>Inhibitor CYP</b>	<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>			
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M5</b>
α-NF (CYP1A1/2)	3	28	Stimul.	NI
Furafylin (CYP1A2)	139	NI	NI	NI
3-PMDIA (CYP2B1/2)	93	217	234	100
Sulfafenazol (CYP2C)	Interf.	NI	NI	NI
DDTC (CYP2E1)	66	NI	202	57
Ketokonazol (CYP3A1/2)	51	123	62	1
<b>králík</b>				
<b>Inhibitor CYP</b>	<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>			
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M5</b>
α-NF (CYP1A1/2)	1	20	Stimul.	NI
Furafylin (CYP1A2)	160	NI	NI	NI
3-PMDIA (CYP2B1/2)	NI	268	294	NI
Sulfafenazol (CYP2C)	Interf	NI	NI	NI
DDTC (CYP2E1)	79	NI	250	78
Ketokonazol (CYP3A1/2)	69	NI	989	857

**Interf.** ..... interference píku inhibitoru nebo jeho metabolitu s metabolitem ellipticinu  
**NI**..... .nedošlo k signifikantní inhibici

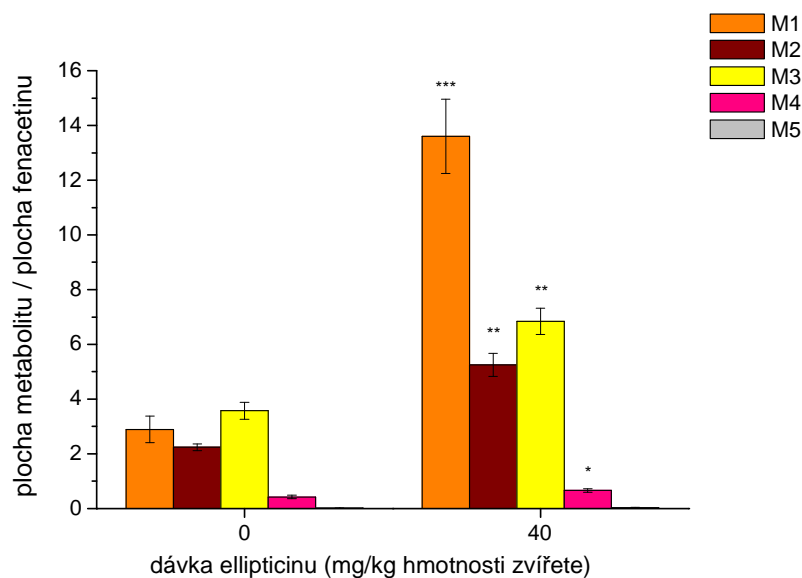
**Stimul.**.....3x (potkan), 5x (člověk) a 1.3x (králík) zvýšení tvorby 9-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a N<sup>2</sup>-oxidu ellipticinu

**α-NF**, α-naftoflavin, **3-PMDIA**, 3-isopropenyl-3-methyldiamantan, **DDTC**, diethyldithiokarbamát

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, SD <10%

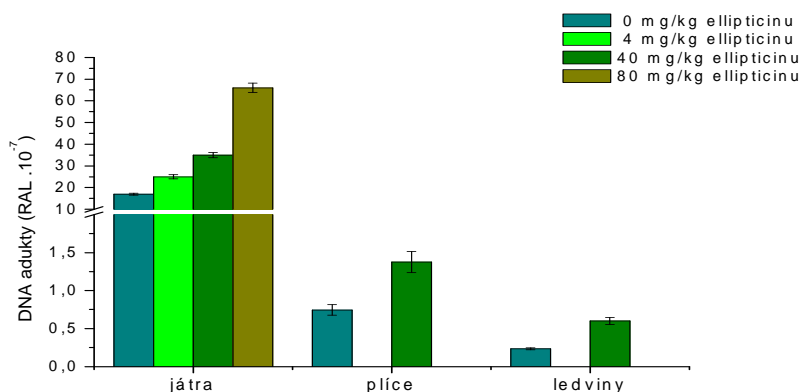
**Obrázek 20**

Indukce proteinu CYP1A1 (A, C) a 1A2 (B, D) v játrech samců (A, B) a samic (C, D) potkanů kontrolních a premedikovaných ellipticinem v dávkách 4, 40 a 80 mg/kg hmotnosti zvířete. Imunoblotty mikrosomálního CYP1A1/2 jsou detekovány protilátkou proti potkanímu CYP1A1. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

**Obrázek 21**

Metabolismus ellipticinů jaterními mikrosomy potkana kontrolního a premedikovaného ellipticinem; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



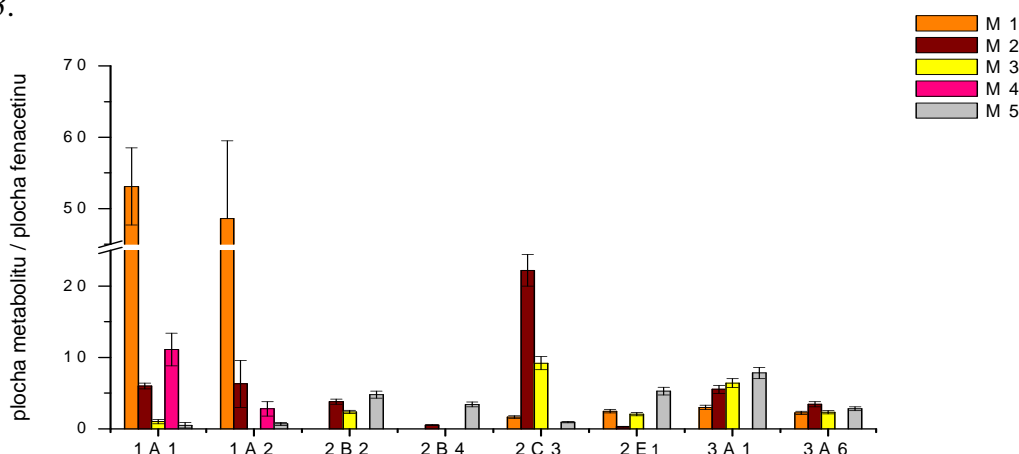
**Obrázek 22**

Tvorba aduktů ellipticinu s DNA po aktivaci mikrosomy izolovanými z jater, plic a ledvin potkanů kontrolních a premedikovaných ellipticinem; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

Detailně jsou výsledky studií oxidace ellipticinu mikrosomálními systémy a indukce cytochromů P450 ellipticinem uvedeny v publikacích tvořících součást disertační práce jako přílohy 1, 2, 3, 5 a 6.

#### 4.1.2 Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Studie oxidace ellipticinu mikrosomálními systémy byla doplněna a jednotlivé izoformy oxidující ellipticin na dané metabolity potvrzeny experimenty zkoumajícími přeměnu ellipticinu jednotlivými purifikovanými formami cytochromu P450, a to v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou. Výsledky přeměny ellipticinu v rekonstituovaných systémech s potkaním rekombinantním CYP1A1, izolovanými potkaními CYP2B4 a 3A1 a králičími formami CYP1A2, 2B4, 2E1, 2C3 a 3A6 ukazuje obrázek 23.

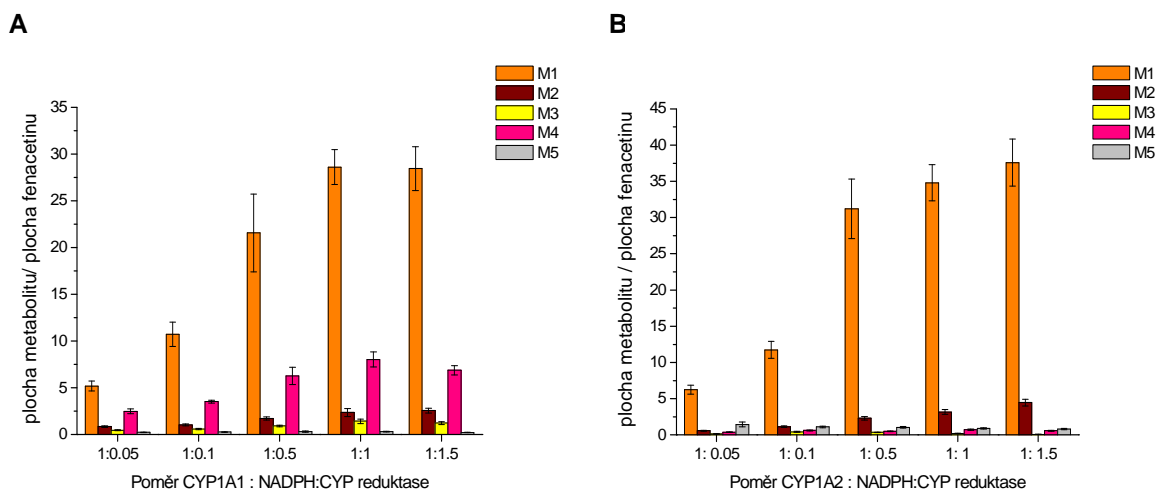
**Obrázek 23**

Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou; Hodnoty jsou průměrem nejméně tří nezávislých měření

Oxidace ellipticinu rekonstituovaným systémem purifikovaných cytochromů P450 a NADPH:CYP reductasy plně potvrdily výsledky z předchozích experimentů. Mezi testovanými enzymy byl ellipticin nejefektivněji oxidován potkaním rekombinantním CYP1A1. Tento enzym katalyzoval zejména tvorbu 9-hydroxyellipticinu (M1) a 7-hydroxyellipticinu (M4), králíčí CYP1A2 pak zejména tvorbu 9-hydroxyellipticinu. CYP3A1 potkana je také velmi účinný v katalýze metabolismu ellipticinu. Jeho působením vzniká především  $N^2$ -oxid ellipticinu a 13-hydroxyellipticin. Na rozdíl od toho, orthologní králíčí CYP3A6 byl v oxidaci tohoto protinádorového léčiva mnohem méně významný. Tyto dva metabolity (13-hydroxyellipticin a  $N^2$ -oxid ellipticinu) jsou tvořeny zejména králíčím CYP2C3, což je jedna z nejvíce exprimovaných izoforem cytochromu P450 v játrech králíka. Ostatní testované izoformy cytochromů P450 (potkaní CYP2B2, králíčí CYP2B4 a CYP2E1) se rovněž podílejí na oxidaci ellipticinu, ale v mnohem menší míře. Detailněji jsou výsledky těchto experimentů uvedeny v publikaci uvedené jako *příloha 2* této práce.

Výsledky získané ve výše uvedených studiích indikují, že purifikované cytochromy P450 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reductasou jsou vhodným modelem simulujícím metabolismus ellipticinu jaterními mikrosomy, a tudíž i vhodným ke studiu aktivačního a detoxikačního metabolismu ellipticinu *in vitro*. Zejména v případě, nejsou-li mikrosomy z některých tkání, např. nádorových, k dispozici.

Schopnost cytochromů P450 v rekonstituovaném systému katalyzovat tvorbu metabolitů ellipticinu je kromě koncentrace CYP závislá také na poměru CYP k NADPH:CYP reductase, a je důležité, aby tento poměr byl optimální. Z tohoto hlediska byly detailně studovány cytochromy P450 1A1 a 1A2. Účinnost oxidace ellipticinu těmito cytochromy P450 rekonstituovanými s NADPH:CYP reductasou se zvyšuje s narůstajícím množstvím NADPH:CYP reductasy do poměru CYP ku reductase 1: 0.5. Další, ale nesignifikantní nárůst byl pozorován za použití poměru CYP: reductase 1: 1 a 1: 1.5 (*obr. 24*). Výsledky těchto studií jsou uvedeny v publikaci, která je součástí disertační práce jako *příloha 4*.

**Obrázek 24**

Efekt NADPH:CYP reduktasy na oxidaci ellipticinu katalyzovanou cytochromy P450 1A1 (A) a 1A2 (B) v rekonstituovaném systému; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

V metabolických studiích s jednotlivými formami cytochromu P450 bylo navíc zjištěno, že za tvorbu detoxikačních metabolitů ellipticinu (9-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin) jsou zodpovědné orthologní formy cytochromů P450 všech testovaných biologických druhů, a to CYP1A1/2. Totéž však nelze říci o metabolitech 13-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a  $N^2$ -oxidu ellipticinu, tedy metabolitech zodpovědných za tvorbu dvou hlavních kovalentních aduktů s DNA nalezených v orgánech potkana a myši vystavených ellipticinu <sup>(165)</sup>. *In vitro* v jaterních mikrosomech králíka je množství těchto reaktivních metabolitů, a také cytochromy P450 katalyzující jejich produkci, odlišné od mikrosomů lidských <sup>(166)</sup>, potkaních a myších. CYP2C3 tvoří tyto metabolity v králičích mikrosomech <sup>(166)</sup> a CYP3A v mikrosomech potkana a člověka <sup>(158, 162, 164)</sup>.

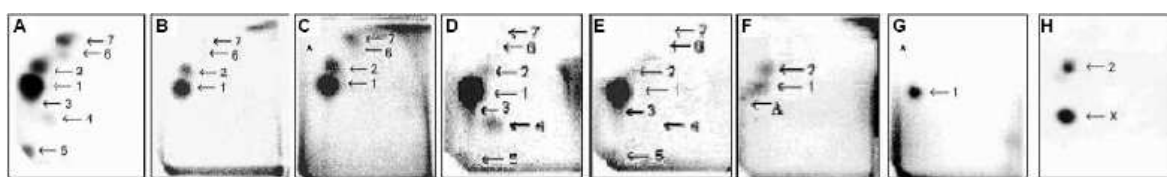
Ze srovnání metabolismu ellipticinu jaterními mikrosomy potkana a králíka s mikrosomy lidskými <sup>(166)</sup> tedy vyplývá, že je oxidace ellipticinu katalyzovaná cytochromy P450 jaterních mikrosomů člověka obdobná jeho metabolismu v jaterních mikrosomech potkana. **Laboratorní potkan** je tedy vhodným modelem simulujícím chování ellipticinu u člověka.

## 4.2 Aktivace ellipticinu za tvorby aduktů s DNA *in vitro* a *in vivo*

Jak již bylo uvedeno v úvodní části této disertační práce, cytochromy P450 aktivují protinádorové léčivo ellipticin na metabolity schopné tvořit adukty s DNA. Tvorba těchto aduktů byla prokázána *in vitro* <sup>(162)</sup>, dále v plicních fibroblastických buňkách křečka (V-79)

transfekovaných lidskými cytochromy P450<sup>(164)</sup>, v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7)<sup>(163)</sup> a leukemických buňkách (HL-60, CCRF-CEM)<sup>(174)</sup>, tak i *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana a myši exponovaných tomuto protinádorovému léčivu<sup>(165)</sup> (obr. 25).

Tvorba aduktů je determinována hladinou exprese cytochromů P450 a NADPH:CYP reductasy. Tyto skutečnosti byly zjištěny nejen ve studiích *in vitro*, ale i *in vivo*. V předkládané disertační práci byl pro studie sledující participaci systému CYP s NADPH:CYP reduktasou využit model myši, které byly deficientní na obsah NADPH:CYP reductasy v játrech (HRN<sup>TM</sup>, příloha 5).



### Obrázek 25

**Autoradiografie aduktů ellipticinu v DNA** tvořených *in vivo* v játrech potkana (A), HRN<sup>TM</sup> (D) a „wild type“ kontrolní (E) myši premedikovaných ellipticinem; *in vitro* s DNA po aktivaci ellipticinu jaterními mikrosomi kontrolních (B) a ellipticinem premedikovaných (C) potkanů a „wild type“ myši (F); *in vitro* s metabolity ellipticinu, 13-hydroxyellipticinem (G) a 12-hydroxyellipticinem (H) bez enzymové aktivace

Detekovány byly minimálně dva adukty ellipticinu s DNA. **Majoritní adukt** (adukt 1, obr. 25), jehož vznik je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů, je tvořen metabolitem ellipticinu, 13-hydroxyellipticinem (M3). Druhým aduktem je **minoritní adukt** (adukt 2, obr. 25), který vzniká jak enzymovou aktivací, tak i bez přítomnosti takového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací<sup>(162, 168)</sup>. Metabolitem zodpovědným za jeho tvorbu je 12-hydroxyellipticin (M2), který je tvořen též z *N*<sup>2</sup>-oxidu ellipticinu (M5) Polonowského přesmykem.

O struktuře těchto aduktů je zatím známa pouze ta skutečnost, že jsou tvořeny zmíněnými metabolity ellipticinu, respektive karbeniovými ionty těchto metabolitů, s deoxyguanosinem v DNA<sup>(168)</sup>. Nicméně, vzhledem k reaktivitě těchto iontů byla struktura obou aduktů již navržena. Předpokládá se, že se jedná o produkty reakce obou karbeniových iontů s exocyklickou amino skupinou deoxyguanosinu (obr. 26).

O izolaci aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem pomocí HPLC a jeho částečnou charakterizaci jsme se pokusili metodami popsány detailně v článku, který tvoří přílohu 7 této disertační práce. Hlavní výsledky dosažené v této studii jsou nastíněny níže.

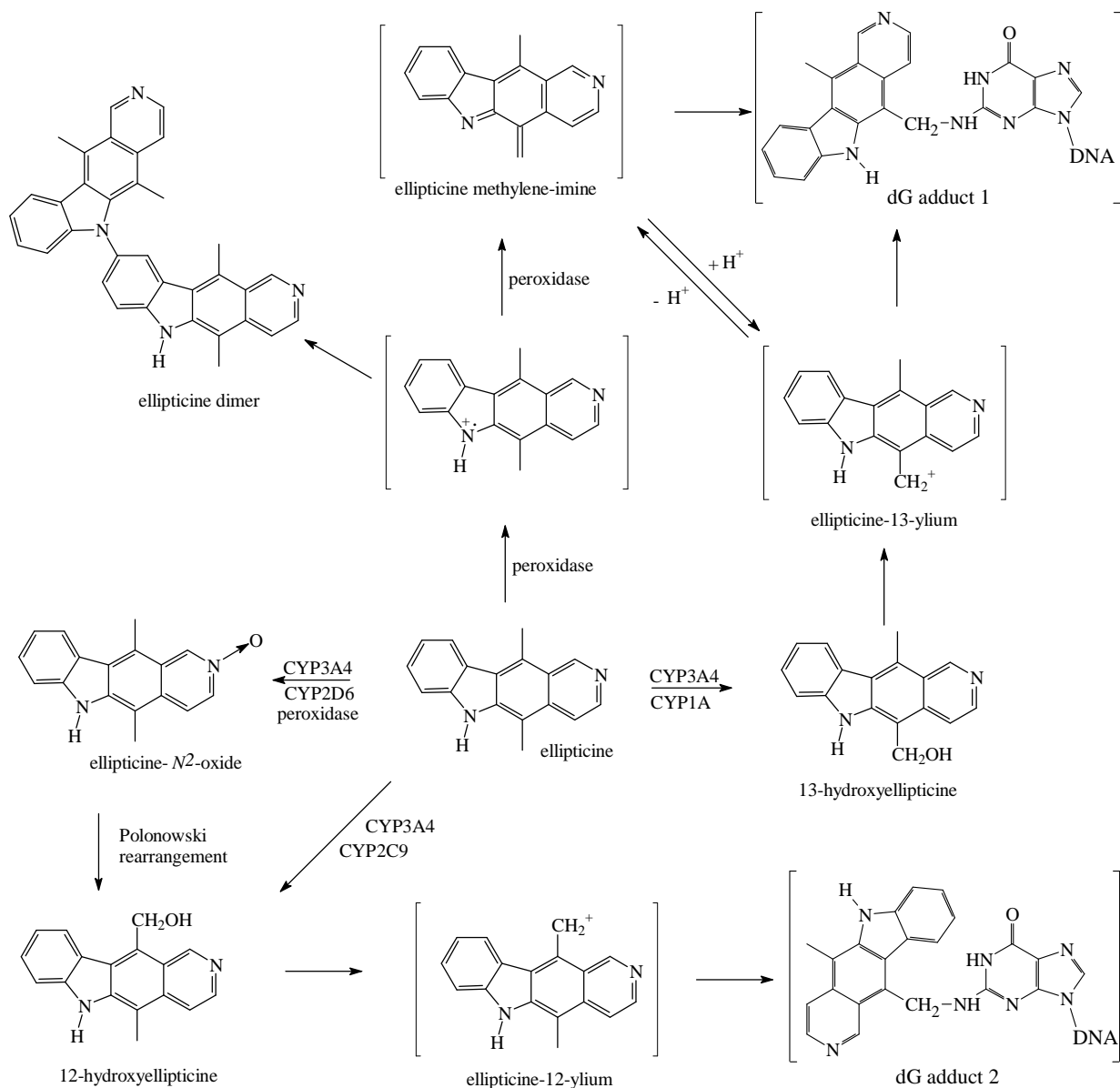
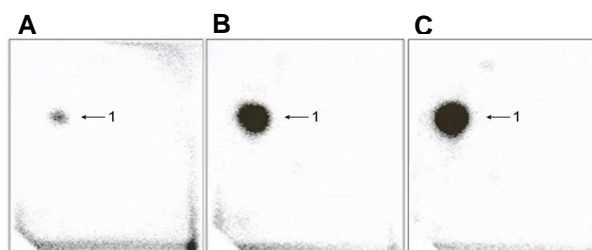
**Obrázek 26**

Schéma metabolické aktivace ellipticinu působením lidských CYP a peroxidas znázorňující vznikající metabolity a předpokládaný mechanismus tvorby aduktů s DNA (Příloha 5)

#### 4.2.1 Izolace a částečná charakterizace aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosem v DNA

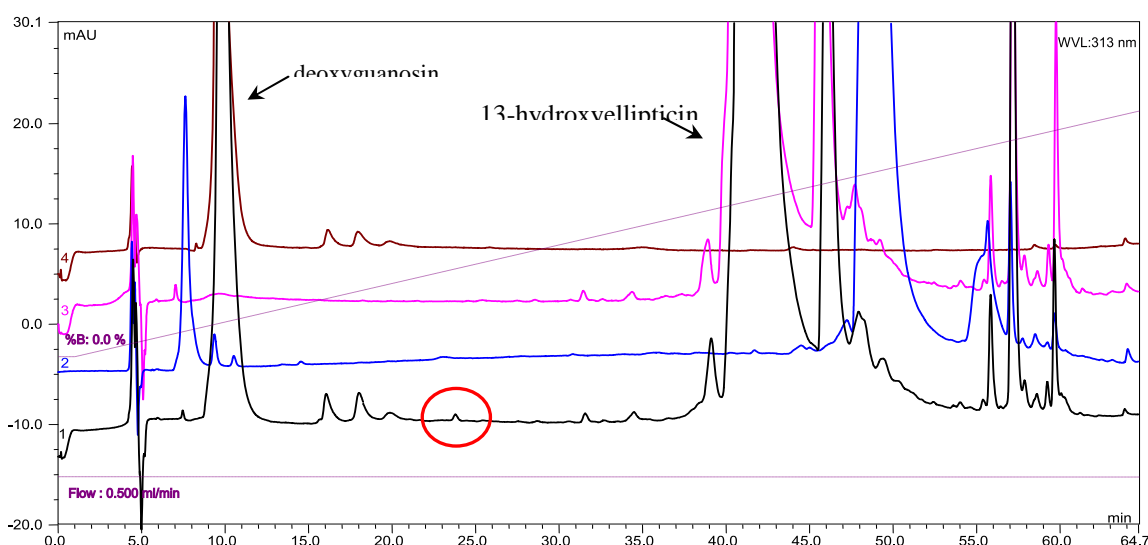
K izolaci aduktu tvořeného reakcí 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosem byla vyvinuta originální metoda jeho separace pomocí HPLC, vedoucí zejména k oddělení aduktu, eluovaného v retenčním čase 23.8 min, od dalších nezreagovaných součástí (13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosu) inkubační směsi (viz kapitola 3.7 a příloha 7).

Deoxyguanosinový adukt tvořený v DNA reakcí s 13-hydroxyellipticinem byl nejdříve detekován a kvantifikován metodou „ $^{32}\text{P}$ -postlabeling“ (obr. 27). Jak je z obrázku 27 patrné, tvorba aduktu z 13-hydroxyellipticinu v DNA je závislá na pH. Při pH 6.0 bylo detekováno pouze malé množství vznikajícího aduktu, zatímco zvýšení pH mělo za následek nárůst tvorby tohoto aduktu, k největšímu nárůstu došlo při hodnotě pH 8.4. Tato závislost byla potvrzena i pomocí HPLC, která je metodou mnohem méně citlivou. Proto byl adukt vznikající z 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu detekován pouze jako malý „pík“, a to za pH 8.4 (obr. 28).



**Obrázek 27**

Autoradiografie DNA aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem v závislosti na pH, analyzované metodou  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. (A) pH 6.0; (B) pH 7.4; (C) pH 8.4



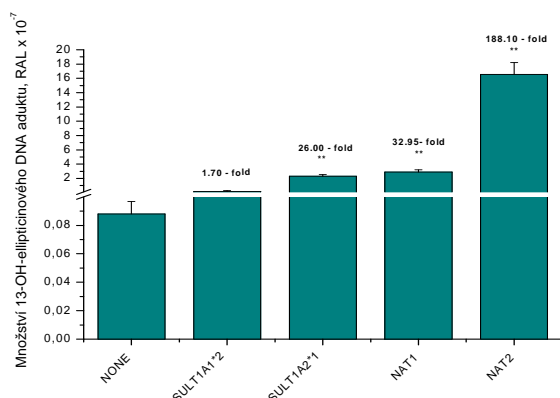
**Obrázek 28**

**HPLC aduktu vzniklého inkubací 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 a 8.4.**

1) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 8.4; 2) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4; 3) 13-hydroxyellipticin; 4) deoxyguanosin.

Množství tvořeného aduktu 13-hydroxyellipticinu s DNA výrazně roste také v přítomnosti konjugačních enzymů (sulfotferasy, *SULT* a *N*-acetyltransferasy, *NAT*) a jejich kofaktorů (*PAPS*, acetyl CoA) (obr. 29). Tato skutečnost může mít i fyziologický význam, neboť tyto

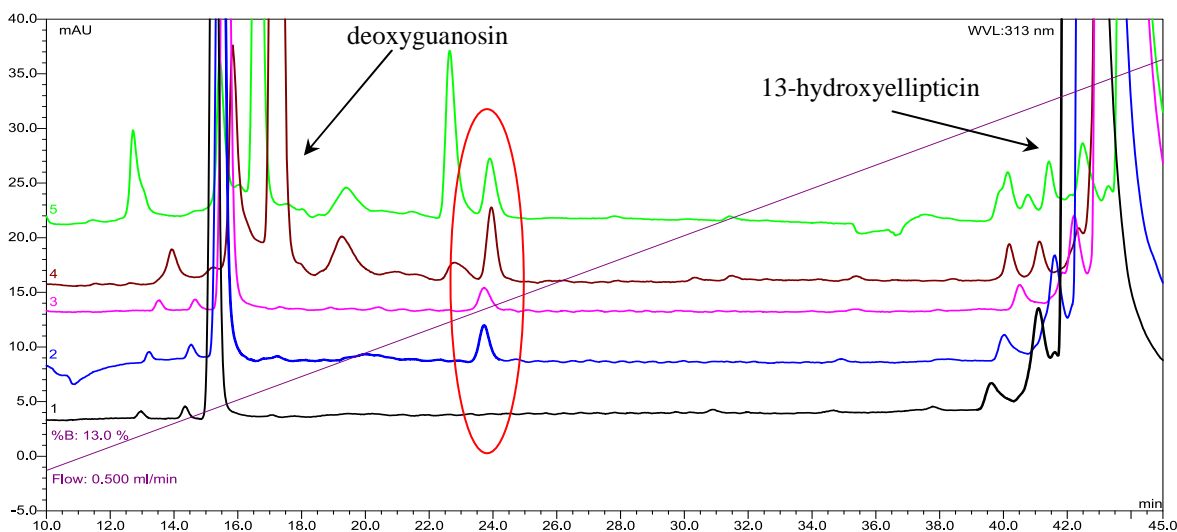
konjugační enzymy jsou rovněž exprimovány v cílových nádorových buňkách léčby ellipticinem např. lidský karcinom prsu. Stimulace tvorby aduktu 13-hydroxyellipticinu s DNA konjugací na sulfát či acetát by proto mohla vést ke zvýšení farmakologické účinnosti ellipticinu. Tento nárůst byl rovněž pozorován pomocí HPLC (obr. 30). Zvýšení tvorby uvedeného aduktu za tvorby



konjugátů se sulfátem a acetátem navíc potvrzují hypotézu o jeho struktuře, jako produktu reakce karbeniového iontu 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem. Sulfát a acetát 13-hydroxyellipticinu totiž tvoří zmíněný karbeniový ion mnohem snáze než 13-hydroxyellipticin samotný.

### Obrázek 29

Efekt SULT1A1/2 a NAT1 a 2 na tvorbu aduktu 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem vDNA; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření



### Obrázek 30

HPLC aduktu vzniklého inkubací 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 v přítomnosti SULT1A1/2 nebo NAT1 a 2 a jejich kofaktorů PAPS a acetyl-CoA.

- 1) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4;
- 2) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 v přítomnosti PAPS a SULT1A1;
- 3) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 v přítomnosti PAPS a SULT1A2;
- 4) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 v přítomnosti acetyl-CoA a NAT1;
- 5) inkubace 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 v přítomnosti acetyl-CoA a NAT2.

Získané výsledky a také poznatky o tvorbě aduktů ellipticinu s DNA po jeho aktivaci peroxidasami <sup>(175)</sup> plně potvrzují předpoklad, že majoritní adukt je tvořen z reaktivního

karbéniového iontu (ellipticin-13-ylia), který je produktem rozpadu 13-hydroxyellipticinu. Jak již bylo uvedeno výše, nejpravděpodobnější reakcí tohoto reaktivního intermediátu je reakce s jedním z nukleofilních center na deoxyguanosinu, jmenovitě s externí NH<sub>2</sub> skupinou guaninu v DNA (*obr. 26, str. 60*). Tomuto předpokladu odpovídají také výsledky ze studia vlivu pH na tvorbu uvedeného aduktu. Bylo zjištěno, že pokles pH vede ke snížení tvorby aduktu. Nižší pH vede k protonaci NH<sub>2</sub> skupiny guaninu v DNA, což zapříčiňuje snížení jeho nukleofilicity, která je nezbytná pro vazbu ellipticin-13-ylia na tuto skupinu. Také výsledky dalších experimentů odpovídají tomuto předpokladu. Již dříve zmíněná tvorba konjugátů 13-hydroxyellipticinu se sulfátem či acetátem usnadňuje rozpad na ellipticin-13-ylum. Jeho vyšší produkované množství pak resultuje ve zvýšení tvorby aduktu.

Získané výsledky jsou slibné pro přípravu aduktu v množství, která budou dostatečná pro jeho další charakterizaci pomocí MS a NMR.

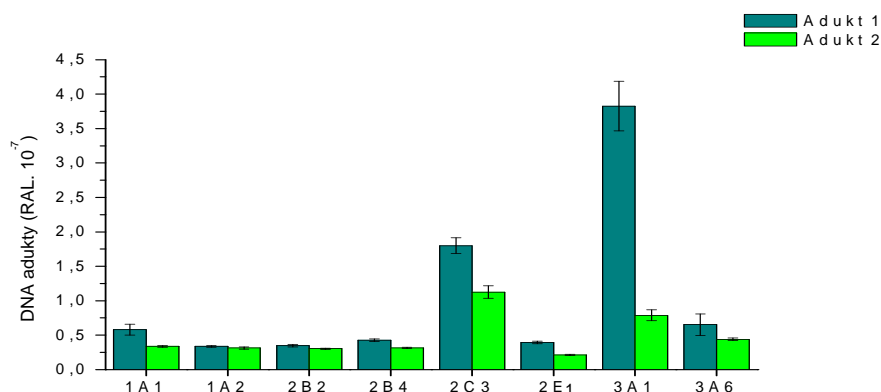
### 4.3 Cytochromy P450 aktivující ellipticin *in vitro* a *in vivo*

Z cytochromů P450 jsou nejúčinnějšími enzymy aktivujícími ellipticin za tvorby výše uvedeného majoritního aduktu ellipticinu s DNA *in vitro* lidský CYP3A4<sup>(166)</sup> a potkaní CYP3A1 (*obr. 31*). V experimentech *in vivo* se však ukázala významnost nejenom cytochromů P450 podrodiny CYP3A pro tento proces<sup>(165)</sup>. V případě experimentů s modelovým organismem potkana byly totiž nalezeny jako významné enzymy participující na tvorbě aduktů ellipticinu s DNA také cytochromy P450 podrodiny 1A<sup>(165)</sup>. Ty jsou ovšem v aktivaci ellipticinu v rekonstituovaném systému *in vitro* mnohem méně účinné než CYP3A (*obr. 31*). Podílejí se naopak zejména na tvorbě detoxikačních metabolitů ellipticinu, 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu (*obr. 23, str. 56*). Příčiny této pozorované nesrovnalosti jsme se proto snažili vysvětlit dalšími studiemi.

Jednou z příčin výše uvedené diskrepance by mohl být fakt uvedený v kapitole 4.1.1. Tedy, že ellipticin je schopen indukovat cytochromy P450 podrodiny 1A. Indukce CYP1A1 a 1A2 v játrech a extrahepatálních tkáních (plíce, ledviny) totiž vede k potenciaci nejen tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu (*obr. 21, str. 55*), ale i tvorby aduktů s DNA (*obr. 22, str. 56*). Jak již bylo zmíněno výše, tímto způsobem tedy ellipticin samotný ovlivňuje svou vlastní biologickou aktivitu. Detaily studie indukčního potenciálu ellipticinu na CYP1A1/2 v organismu laboratorního potkana a jeho vliv na potenciaci jeho



biologického účinku jsou uvedeny v publikacích, které tvoří *přílohy 3 a 6* této disertační práce.



### Obrázek 31

Aktivace ellipticinu izolovanými cytochromy P450 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou. Měřeno metodou <sup>32</sup>P-postlabeling; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

Dalším možným vysvětlením rozdílného podílu jednotlivých cytochromů P450 na aktivaci ellipticinu *in vitro* a *in vivo* může být přítomnost dalších proteinů v membráně endoplasmatického retikula a jejich vliv na tento proces *in vivo*. Jedním z kandidátních proteinů je cytochrom b<sub>5</sub>, který je fakultativní součástí MFO systému. V několika případech byl totiž jeho vliv na reakce katalyzované cytochromy P450 prokázán <sup>(200-202)</sup>.

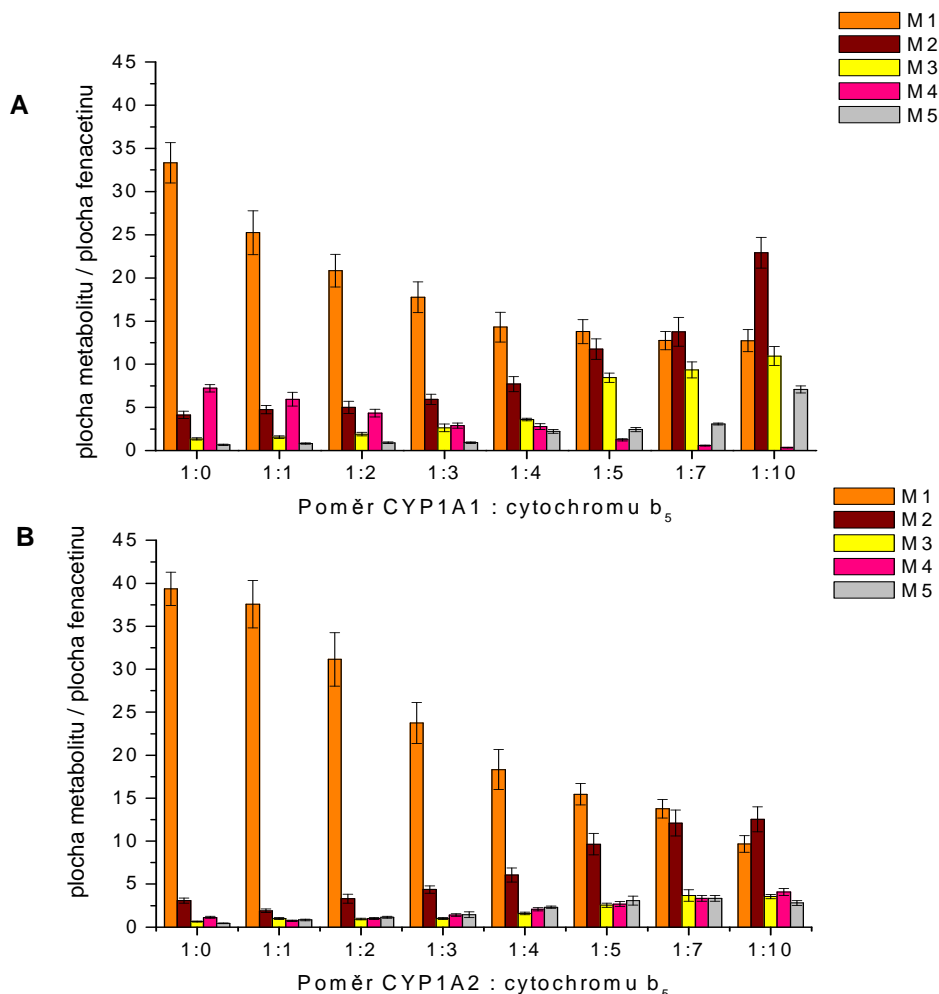
## 4.4 Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1 a 1A2

V další části disertační práce byl sledován vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidační aktivaci ellipticinu purifikovaným CYP1A1 a 1A2 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou. V experimentech byl použit izolovaný potkaní rekombinantní CYP1A1 a jaterní králičí CYP1A2. Cytochrom b<sub>5</sub> byl izolován rovněž z jater králíka.

Nejdříve jsme sledovali vliv rozdílných koncentrací cytochromu b<sub>5</sub> na tvorbu jednotlivých metabolitů ellipticinu. Cytochrom b<sub>5</sub> byl přidáván k CYP1A v rekonstituovaném systému v poměru (CYP: cyt b<sub>5</sub>) 1:1 až 1:10. Dosažené výsledky ilustruje *obrázek 32*.

V experimentech bylo zjištěno, že vlivem zvyšujícího se množství cytochromu b<sub>5</sub> v systémech obou cytochromů P450 dochází k významné změně v podílu tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu. To je unikátní zjištění, které dosud nebylo v literatuře popsáno. Dosud je známo, že cytochrom b<sub>5</sub> sice ovlivňuje (stimulačně či inhibičně <sup>(200-203)</sup>)

oxidaci různých substrátů, nebylo však popsáno, že se zásadně mění spektrum produktů oxidace těchto substrátů.



**Obrázek 32**

Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1 (A) a 1A2 (B); Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

Tendence těchto změn je pro oba cytochromy P450 podrodiny 1A srovnatelná. Jmenovitě je snížena tvorba 9-hydroxyellipticinu (M1) a v případě CYP1A1 i tvorba 7-hydroxyellipticinu (M4), tedy metabolitů detoxikačních, neboť jsou po konjugaci ve druhé fázi biotransformace z organismu vylučovány<sup>(145)</sup>. Naopak stimulační efekt cytochromu b<sub>5</sub> byl pozorován na vznik 12-hydroxyellipticinu (M2), 13-hydroxyellipticinu (M3) a N<sup>2</sup>-oxidu ellipticinu (M5) (obr. 32). Tedy metabolitů, které zodpovídají za tvorbu kovalentních DNA aduktů. Cytochrom b<sub>5</sub> tak tedy výrazně stimuluje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 na farmakologicky významné deriváty. Tento poznatek byl potvrzen i sledováním tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou <sup>32</sup>P-postlabeling.

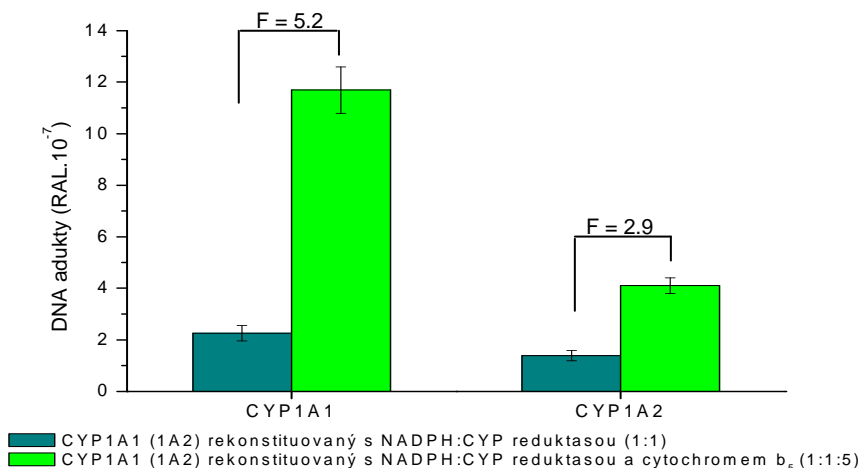
Cytochrom  $b_5$  v systému CYP1A1 a 1A2 rekonstituovaných s NADPH:CYP reduktasou zvyšoval množství vznikajících aduktů s DNA (tab. 6, obr. 33).

### Tabulka 6

Vliv cytochromu  $b_5$  na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA aktivovaného cytochromy P450 1A1 a 1A2 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou

Enzymový systém	DNA adukty (RAL . $10^{-7}$ )		
	Adukt 1	Adukt 2	Součet
CYP1A1 + NADPH:CYP reduktasa (1:1)	1.50 ± 0.2	0.76 ± 0.1	2.26 ± 0.3
CYP1A1 + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom $b_5$ (1:1:5)	9.89 ± 0.6	1.80 ± 0.3	11.69 ± 0.9
CYP1A2 + NADPH:CYP reduktasa (1:1)	0.89 ± 0.1	0.50 ± 0.1	1.39 ± 0.2
CYP1A2 + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom $b_5$ (1:1:5)	3.50 ± 0.2	0.60 ± 0.1	4.20 ± 0.3

100 pmol CYP1A1/2 bylo rekonstituováno se 100 pmol NADPH:CYP reduktasy v absenci či přítomnosti 500 pmol cytochromu  $b_5$ . 100  $\mu$ M ellipticin, 1 mM NADPH, 1 mg DNA a 0.1 M fosfátový pufr, pH 7.4 byly použity v inkubačních směsích. DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí a adukty ellipticinu s DNA analyzovány pomocí metody  $^{32}$ P-postlabeling; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření



### Obrázek 33

Vliv cytochromu  $b_5$  na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA aktivovaného cytochromy P450 1A1 a 1A2 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou; Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

Získané výsledky jednoznačně vysvětlují dříve nalezenou rozdílnost účinnosti cytochromů P450 1A1 a 1A2 oxidovat ellipticin na metabolity tvořící adukty s DNA *in vitro* a *in vivo*. Je nanejvýš pravděpodobné, že výsledky prokazující vysokou účinnost

cytochromů P450 1A v aktivaci ellipticinu *in vivo* vyplývají z vlivu cytochromu b<sub>5</sub>, který je v přirozeném systému membrán endoplasmatického retikula v organismu přítomen a ovlivňuje tak katalytickou účinnost cytochromů P450. Pro potvrzení těchto výsledků *in vivo* jsou připravovány experimenty s živočišnými modely, u nichž je eliminována exprese cytochromu b<sub>5</sub> v játrech.

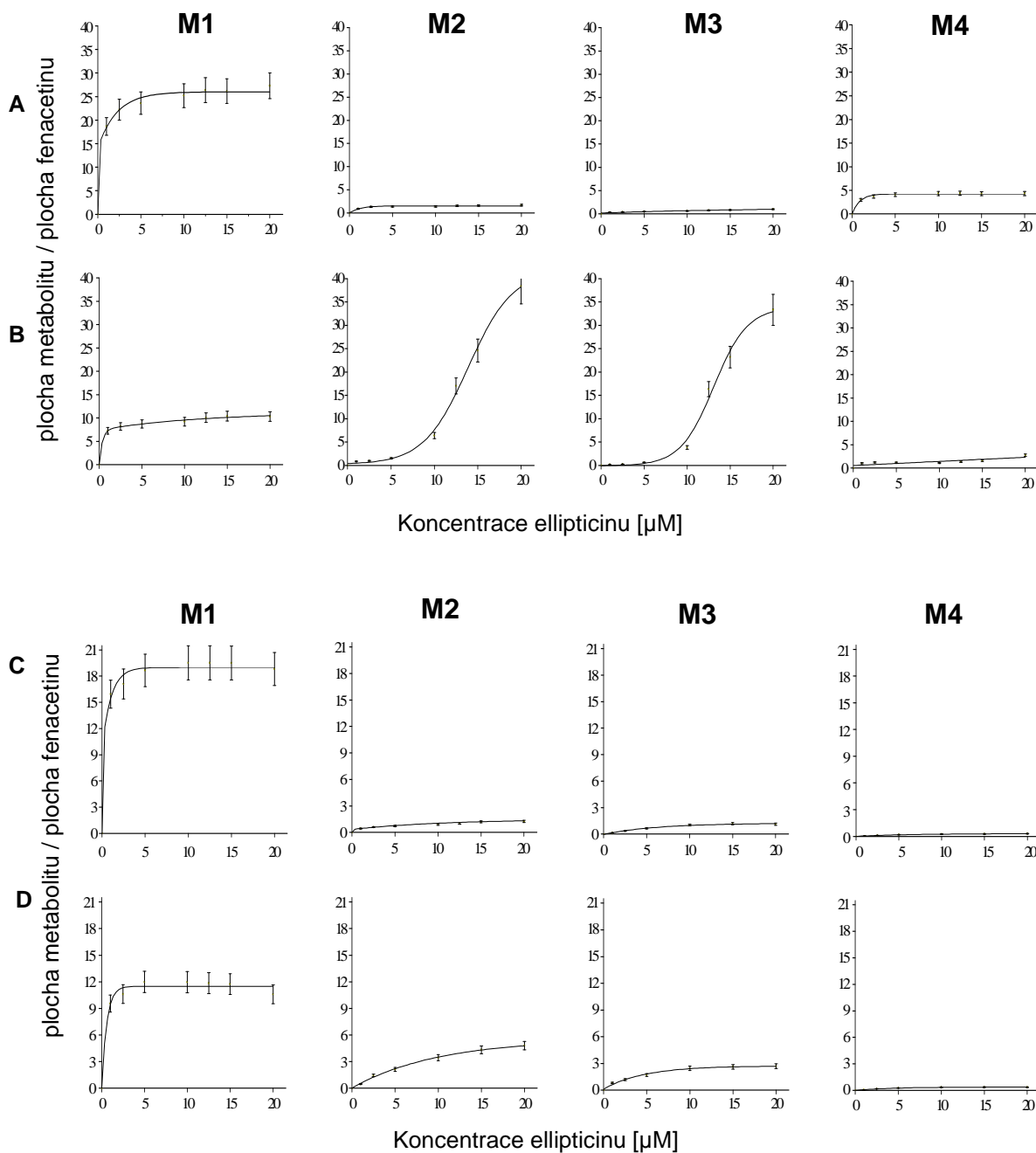
V další etapě studia vlivu cytochromu b<sub>5</sub> na přeměnu ellipticinu katalyzovanou cytochromy P450 1A1/2 byla sledována kinetika těchto enzymově katalyzovaných reakcí.

Kinetika enzymové oxidace ellipticinu cytochromy podrodiny 1A bez přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> v rekonstituovaném systému vykazovala klasickou hyperbolickou závislost odpovídající kinetice dle Michaelis-Mentenové (*obr. 34*). Hillův koeficient *n* (*tab. 7 a příloha 4*) byl roven nebo blízký hodnotě 1. Za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> v rekonstituovaném systému však došlo v případě CYP1A1 ke změně v charakteru kinetické křivky pro vznik 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu. Tato závislost vykazuje sigmoidální průběh (*obr. 34*). Hodnota Hillova koeficientu se blížila hodnotě 2 (*tab. 7*), což indikuje pozitivní kooperativitu vazby ellipticinu na enzym. Cytochrom b<sub>5</sub> v rekonstituovaném systému s CYP1A2 charakter kinetických závislostí prakticky neměnil pro žádný z metabolitů. Závislost byla více či méně stále hyperbolická. Došlo však ke zvýšení rychlosti tvorby 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu (*tab. 7*). Kinetika oxidace ellipticinu na N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu nebyla vyhodnocována vzhledem k nestabilitě tohoto metabolitu.

### Tabulka 7

Kinetické parametry oxidace ellipticinu cytochromy P4501A1/2 za absence a v přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub>

CYP1A1			CYP1A1 + b <sub>5</sub>		
Metabolity	<i>n</i>	V <sub>max</sub> [min <sup>-1</sup> ]	Metabolity	<i>n</i>	V <sub>max</sub> [min <sup>-1</sup> ]
<b>M1</b>	1.01	1.34	<b>M1</b>	0.63	0.50
<b>M2</b>	0.91	0.08	<b>M2</b>	1.73	2.50
<b>M3</b>	0.89	0.06	<b>M3</b>	2.31	2.25
<b>M4</b>	0.98	0.22	<b>M4</b>	0.44	0.18
CYP1A2			CYP1A2 + b <sub>5</sub>		
Metabolity	<i>n</i>	V <sub>max</sub> [min <sup>-1</sup> ]	Metabolity	<i>n</i>	V <sub>max</sub> [min <sup>-1</sup> ]
<b>M1</b>	1.01	1.00	<b>M1</b>	1.10	0.61
<b>M2</b>	1.03	0.06	<b>M2</b>	1.15	0.33
<b>M3</b>	1.08	0.10	<b>M3</b>	1.40	0.18
<b>M4</b>	1.03	0.02	<b>M4</b>	1.15	0.03

**Obrázek 34**

Kinetika oxidace ellipticinu katalyzovaná potkaním rekombinantním cytochromem P450 1A1 za absence cytochromu  $b_5$  (A), za přítomnosti cytochromu  $b_5$  (B) a králičím cytochromem P450 1A2 za absence cytochromu  $b_5$  (C), za přítomnosti cytochromu  $b_5$  (D); Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

#### 4.4.1 Mechanismus působení cytochromu $b_5$

Jak již bylo zmíněno v úvodu disertační práce, není mechanismus působení cytochromu  $b_5$  na reakce katalyzované cytochromy P450 dosud jednoznačně objasněn.

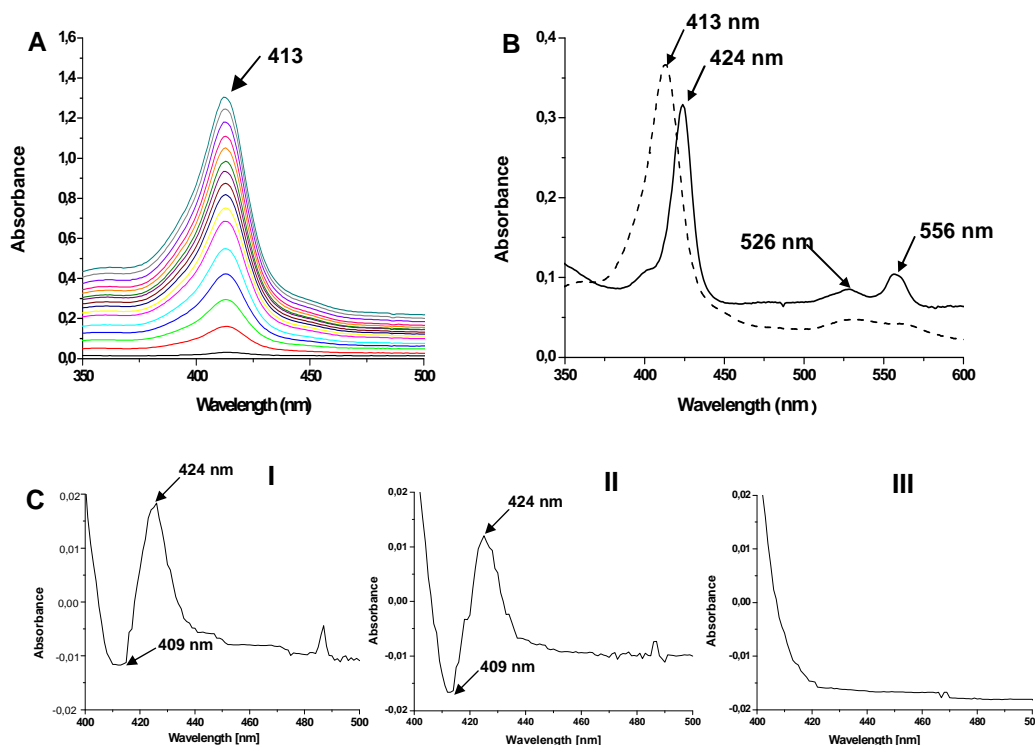
Záleží jak na izoformě CYP, se kterou cytochrom  $b_5$  spolupracuje, tak na jeho substrátu. Dosud byly navrženy čtyři mechanismy, kterými může cytochrom  $b_5$  ke stimulaci reakcí katalyzovaných cytochromy P450 přispívat (viz kapitola 1.4.3.2.). K objasnění, zda cytochrom  $b_5$  ovlivňuje oxidaci ellipticinu prostřednictvím přenosu elektronů nebo pouze změnou konformace cytochromu P450, je nezbytné posoudit nejen efekt nativního cytochromu  $b_5$  na oxidaci tohoto léčiva, ale i cytochromu  $b_5$ , u něhož je odstraněna neproteinová (hemová) složka. Tedy apo-cytochromu  $b_5$ . Tento protein totiž není přenosu elektronů schopen. V další části výzkumu jsme se proto zaměřili na přípravu apo-cytochromu  $b_5$ .

#### 4.4.1.1 Příprava apo-cytochromu $b_5$

Pro získání apo-cytochromu  $b_5$  musí být hem z molekuly proteinu efektivně, ale opatrně odstraněn tak, aby byla zachována jeho přirozená konformace. Nejprve jsme testovali extrakci hemu z purifikovaného králíčího cytochromu  $b_5$  okyseleným acetonem (120, 198). V tomto případě však většina proteinu denaturovala a precipitovala. Proto jsme přistoupili k přípravě apo-cytochromu  $b_5$  pomocí heterologní exprese v buňkách *E. coli*. Experimentální podmínky této exprese jsou podrobně popsány v kapitole 3.8. Výsledky jsou též uvedeny v rukopisu práce připravené k publikaci, která tvoří přílohu 8 této disertace.

V první fázi této části výzkumu jsme připravili gen pro membránovou formu králíčího cytochromu  $b_5$  z komerčně syntetizovaných oligonukleotidů. Dále pak expresní vektor z plasmidu pET-22b, kterým byly pro produkci transformovány buňky *E. coli* Bl-21 (DE3) Gold. Produkci proteinu apo-cytochromu  $b_5$  po indukci kultury v 0.5 l LB media IPTG a následnou purifikací ionexovou chromatografií na DEAE-Sepharose CL6B jsme získali dostatečné množství proteinu, který měl, po opětovném dodání hemu k apo-cytochromu  $b_5$  titrací roztokem heminu (obr. 35A), identické vlastnosti jako nativní cytochrom  $b_5$  (izolovaný z jater králíka). Takto získaný protein apo-cytochromu  $b_5$  vykazuje stejnou elektroforetickou pohyblivost při SDS-PAGE v 15% gelu (obr. 36), charakteristická spektra v oxidovaném stavu s maximální absorbcí Soretova pásu při 413 nm a v redukované formě (působením dithioničitanu) při 424, 526 a 556 nm jako nativní cytochrom  $b_5$  (obr. 35B). Purifikovaný rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  rekonstituovaný s hemem na nativní cytochrom  $b_5$  je také redukovatelný NADPH:CYP reduktasou v rekonstituovaném systému po přidání NADPH, obdobně jako nativní králíčí cytochrom

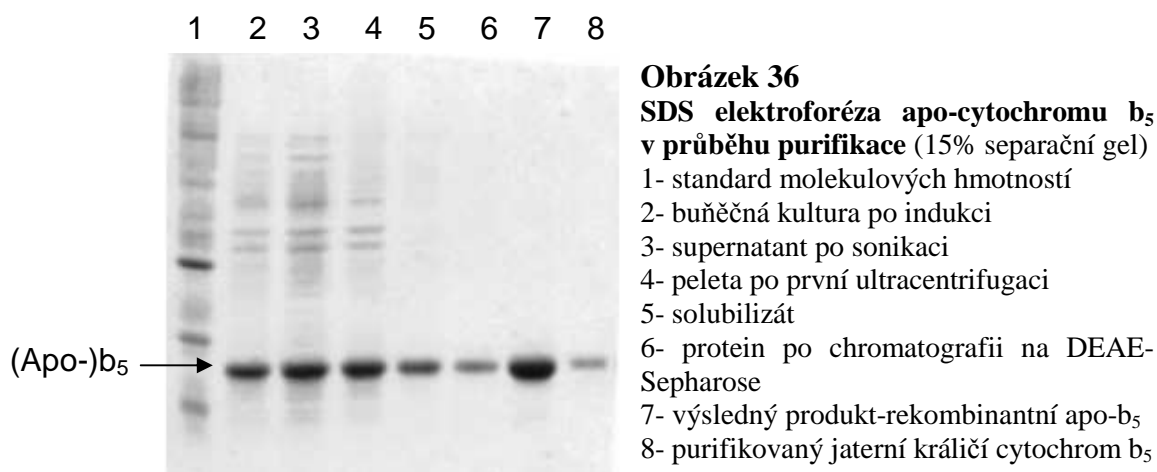
$b_5$  (obr. 35C). Nalezena totiž byla analogická diferenční spektra apo-cytochromu  $b_5$  rekonstituovaného s heminem a izolovaného králičího cytochromu  $b_5$  (mezi oxidovanými a redukovanými formami obou cyt  $b_5$ ), ale ne heminu samotného (obr. 35C).



**Obrázek 35**

**Spektrální charakterizace rekombinantního apo-cytochromu  $b_5$ .** (A) Titrace apo- $b_5$  heminem; (B) spektrum oxidované (čárkovaně) a redukované formy (plná čára) (apo)- $b_5$ ; (C) Diferenční spektra (mezi oxidovanými a redukovanými formami cyt  $b_5$ ) purifikovaného rekombinantního cytochromu  $b_5$  (I), purifikovaného králičího cytochromu  $b_5$  (II) a heminu (III)

Získané výsledky naznačují, že připravený rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  je ve své nativní konformaci. Během purifikační procedury nedošlo tedy k ireverzibilnímu poškození jeho proteinové struktury.



**Obrázek 36**

**SDS elektroforéza apo-cytochromu  $b_5$  v průběhu purifikace (15% separační gel)**

- 1- standard molekulových hmotností
- 2- buňková kultura po indukci
- 3- supernatant po sonikaci
- 4- peleta po první ultracentrifugaci
- 5- solubilizát
- 6- protein po chromatografii na DEAE-Sepharose
- 7- výsledný produkt-rekombinantní apo- $b_5$
- 8- purifikovaný jaterní králičí cytochrom  $b_5$

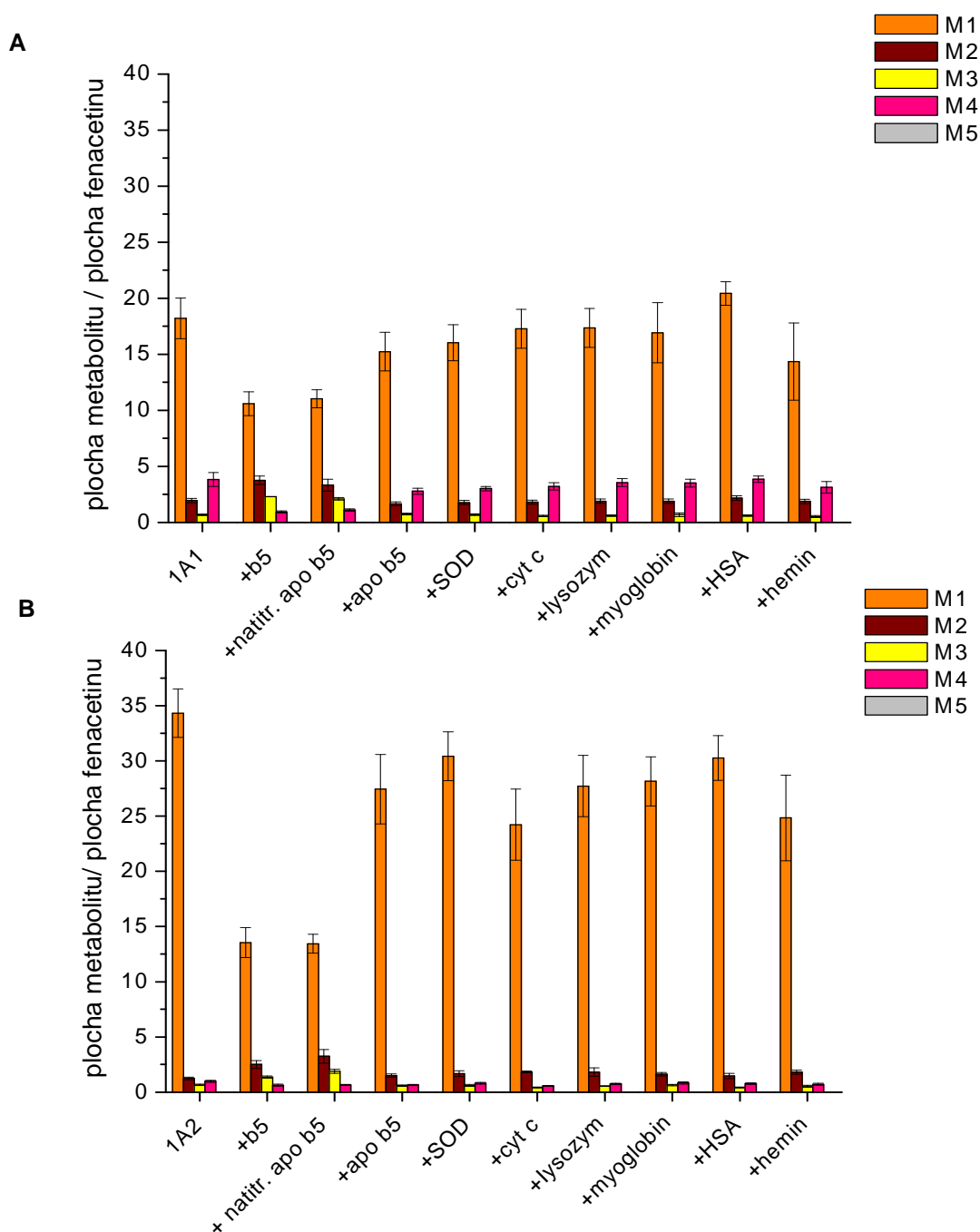
Apo-cytochrom  $b_5$  byl dále využit místo nativního cytochromu  $b_5$  v rekonstituovaném systému cytochromů P450 1A1 a 1A2 s NADPH:CYP reduktasou. Takto připravený enzymový systém byl pak použit pro studium oxidace ellipticinu.

#### **4.4.1.2 Vliv cytochromu $b_5$ , apo-cytochromu $b_5$ a dalších proteinů na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2**

Kromě cytochromu  $b_5$  a apo-cytochromu  $b_5$  byl na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 zkoumán vliv i dalších látek. Jmenovitě proteinů superoxid dismutasy (SOD), cytochromu c (cyt c), lysozymu, myoglobinu, lidského sérového albuminu (HSA) a dále pak heminu. Všechny tyto látky byly do rekonstituovaného systému přidávány v pětinasobném poměru vůči CYP, tedy v poměru analogickém, v jakém byl přidáván nativní cytochrom  $b_5$ .

Výsledky jsou uvedeny na *obrázku 37*. Zjistili jsme, že na metabolismus ellipticinu má signifikantní vliv pouze nativní cytochrom  $b_5$ . Jak bylo zmíněno v *kapitole 4.4*, vlivem cytochromu  $b_5$  dochází ke změně poměru metabolitů ellipticinu, a to ve prospěch metabolitů aktivačních, tvořících adukty s DNA. Apo-cytochrom  $b_5$  a ostatní proteiny, ať už ty, které obsahují porfyrinový skelet (cyt c, myoglobin) či proteiny bez této struktury, vliv na oxidaci ellipticinu cytochromů P450 1A1 a 1A2 prakticky nevykazují. Oxidaci ellipticinu signifikantně neovlivňuje ani hemin, tedy sloučenina obsahující porfyrinový skelet samotný. Naopak apo-cytochrom  $b_5$  po rekonstituci s hemem („natitrování“ heminem) ovlivňoval metabolismus ellipticinu obdobným způsobem jako nativní cytochrom  $b_5$ . Tato skutečnost tedy potvrzuje výše uvedené výsledky v tom, že připravený rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  je po purifikaci skutečně ve své přirozené konformaci.



**Obrázek 37**

Vliv cytochromu  $b_5$ , apo-cytochromu  $b_5$  a dalších látek na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1 (A) a 1A2 (B); Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření

Získané výsledky jednoznačně ukazují, že přítomnost hemové struktury v cytochromu  $b_5$  je esenciální pro ovlivnění oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1/2. Tato skutečnost by naznačovala, že cytochrom  $b_5$  podporuje reakci oxidace ellipticinu prostřednictvím přenosu elektronů. Zarážející je však fakt, že působením cytochromu  $b_5$  nedochází jen k jednoduché stimulaci oxidace ellipticinu na jeho metabolity. Dochází ke změně v zastoupení jednotlivých oxidačních produktů ellipticinu, ke snížení tvorby 9-

hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu a k nárůstu 13-hydroxy-, 12-hydroxyellipticinu a  $N^2$ -oxidu ellipticinu. V případě CYP1A1 je dokonce cytochromem  $b_5$  významně ovlivněna i kinetika oxidace ellipticinu. Uvedené změny v oxidaci ellipticinu a v její kinetice lze tedy obtížně vysvětlit pouhým efektivnějším přenosem elektronů. Lze tedy předpokládat, že tato změna oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 resultuje i z konformačních změn proteinů obou enzymů po interakci s cytochromem  $b_5$ , která vede k odlišné vazbě ellipticinu do jejich aktivního centra. Jmenovitě k takové vazbě ellipticinu, která zpřístupňuje atak kyslíku na uhlíky 12 a 13 či na dusík 2 ellipticinového skeletu. O jaké změny se jedná, zůstává otevřenou otázkou.

Další otázkou je také skutečnost, zda zpřístupnění uhlíků 12 a 13 molekuly ellipticinu pro atak kyslíku v aktivním centru CYP1A1 není dáno i vazbou další molekuly ellipticinu na protein tohoto enzymu po jeho interakci s cytochromem  $b_5$ . Tento fakt je totiž signalizován pozitivní kooperativitou v kinetice tvorby 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu cytochromem P450 1A1 po interakci s cytochromem  $b_5$ .

Vysvětlení výše uvedených otázek bude předmětem dalšího výzkumu v naší laboratoři.

## 5 SOUHRN A ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti farmakologických účinků protinádorového léčiva ellipticinu a jeho mechanismu působení. Přispívá též k poznání funkce cytochromů P450 a dalších složek systému oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (MFO) v oxidaci studovaného léčiva. Rozvíjí tak i obecné biochemické poznatky. Nejdůležitější poznatky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

### **Vhodným modelovým organismem pro studium metabolismu ellipticinu je laboratorní potkan**

Přeměna ellipticinu jaterními mikrosomálními frakcemi potkana, králíka a myši byla sledována *in vitro* a porovnána s metabolismem ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem člověka. V rámci těchto experimentů bylo zjištěno, že poměrné zastoupení jednotlivých metabolitů je u různých druhů různé. Lidské a potkaní enzymové systémy přeměňovaly ellipticin obdobně. Majoritně na 13-hydroxyellipticin, dále se tvořily s klesající efektivitou  $N^2$ -oxid ellipticinu, 12-hydroxy-, 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin. Přeměna ellipticinu enzymovými systémy králíka a myši se jevila kvantitativně jako zcela odlišná. Majoritním metabolitem tvořeným králíčími mikrosomy byl  $N^2$ -oxid ellipticinu, mikrosomy myši neefektivněji tvořily 9-hydroxyellipticin.

### **Identifikovány byly izoformy cytochromů P450 zodpovědné za tvorbu jednotlivých metabolitů ellipticinu**

Při studiu izoform cytochromů P450 tvořících jednotlivé metabolity ellipticinu byly jako modelové enzymové systémy použity mikrosomální frakce potkanů a králíků premedikovaných známými induktory jednotlivých forem cytochromu P450. Zkoumán byl i vliv specifických inhibitorů cytochromů P450. V dalším přiblížení byly použity též jednotlivé izolované či rekombinantní živočišné cytochromy P450 rekonstituované s NADPH:CYP reduktasou. Získané výsledky pak byly porovnány s výsledky nalezenými pro oxidaci ellipticinu cytochromy P450 člověka. Zjistili jsme, že detoxikační metabolity ellipticinu (9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin) jsou v obou biologických druzích tvořeny zejména CYP1A1 a 1A2. Tyto cytochromy P450 oxidují ellipticin na oba metabolity i v lidském organismu. Cytochromy P450 katalyzující tvorbu metabolitů, které generují

adukty v DNA (13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin), jsou v organismu potkana a králíka odlišné. V případě potkana je za jejich vznik zodpovědný zejména CYP3A1, obdobně jako orthologní lidský CYP3A4, kdežto účinnost orthologního CYP3A6 v organismu králíka, je mnohem nižší. Zde je za vznik těchto metabolitů zodpovědný zejména CYP2C3.

### **Ellipticin ovlivňuje svůj farmakologický a genotoxický potenciál indukcí CYP1A1/2**

Vystavení organismu laboratorního potkana ellipticinu (i.p.) vede k signifikantnímu zvýšení exprese i aktivity CYP1A1 a 1A2 v játrech i extrahepatálních orgánech. Ellipticin tedy působí jako účinný induktor těchto enzymů. Vlivem této indukce dochází též k významnému zvýšení oxidace ellipticinu a tvorby jeho aduktů s DNA.

### **Cytochrom b<sub>5</sub> moduluje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2**

Vlivem cytochromu b<sub>5</sub> dochází ke změně v zastoupení jednotlivých metabolitů ellipticinu, tvořených cytochromy P450 1A1 a 1A2, a to ve prospěch metabolitů tvořících adukty v DNA. Zvýšena je tvorba jak 12-hydroxy-, tak i 13-hydroxyellipticinu. Naopak detoxikační metabolity ellipticinu (9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin) jsou generovány v množství mnohem menším.

### **Cytochrom b<sub>5</sub> ovlivňuje kinetiku oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1/2**

Cytochrom b<sub>5</sub> v rekonstituovaném systému CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasy mění kinetiku oxidace ellipticinu na 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin ze závislosti hyperbolické na sigmoidální. Hodnota Hillova koeficientu se pro uvedené oxidace působením cytochromu b<sub>5</sub> zvýšila až na hodnotu 2, signalizující pozitivní kooperativitu. V rekonstituovaném systému CYP1A2 s NADPH:CYP reduktasou zůstává působením cytochromu b<sub>5</sub> hyperbolický charakter kinetiky oxidace ellipticinu zachován, dochází pouze ke zvýšení rychlosti tvorby 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu.

### **Heterologní expresí v buňkách *E. coli* byl připraven rekombinantní apo-cytochrom b<sub>5</sub>**

Apo-cytochrom b<sub>5</sub> připravený heterologní expresí v buňkách *E. coli* má po rekonstituci s heminem identické vlastnosti jako nativní cytochrom b<sub>5</sub>. Originálně vyvinutým postupem byl tedy získán apo-cytochrom b<sub>5</sub> v nativní konformaci.

**Cytochrom b<sub>5</sub> ovlivňuje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 jak potenciací přenosu elektronů v oxidasovém (MFO) systému, tak i změnou konformace enzymů**

Užitím připraveného apo-cytochromu b<sub>5</sub> pro oxidaci ellipticinu v systémech cytochromů P450 1A1 a 1A2 rekonstituovaných s NADPH:CYP reduktasou a porovnáním výsledků s daty studií s nativním cytochromem b<sub>5</sub> přispělo k osvětlení mechanismu působení tohoto proteinu na oba enzymy. Hemový kofaktor cytochromu b<sub>5</sub> je pro ovlivnění oxidace ellipticinu (zastoupení jednotlivých metabolitů) cytochromy P450 1A1/2 esenciální. Cytochrom b<sub>5</sub> tedy podporuje oxidační reakce prostřednictvím přenosu elektronů. Mechanismus, kterým cytochrom b<sub>5</sub> tuto oxidaci ovlivňuje se však zdá být komplexnější. Nedochozí totiž jen k prostému zvýšení tvorby všech metabolitů, ale je změněn i jejich vzájemný poměr. Cytochrom b<sub>5</sub> tedy nejspíše přispívá i ke změně konformace obou těchto cytochromů P450.

**Byla vyvinuta originální metoda HPLC pro izolaci aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosinem v DNA**

Reakcí 13-hydroxyellipticinu s DNA vzniká deoxyguanosinový adukt, jehož struktura není dosud známa. Množství aduktu vznikajícího s DNA (nebo deoxyguanosinem) je totiž tak nízké, že po izolaci pomocí nově vyvinuté separace HPLC nedostačovalo pro jeho detailní strukturní charakterizaci. Získané výsledky však napovídají, že se jedná o adukt vzniklý reakcí karbeniového iontu tvořeného z 13-hydroxyellipticinu (ellipticin-13-ylia) s exocyklickou amino skupinou deoxyguanosinu. Zjistili jsme, že konjugace 13-hydroxyellipticinu s aktivním sulfátem a acetyl CoA za účasti sulfotransferas a *N*-acetyltransferas vede k produkci vyššího množství tohoto aduktu. Získané výsledky jsou tedy slibné pro jeho přípravu v množství dostatečném pro další strukturní charakterizaci.

Jak je z výše uvedeného přehledu patrné, předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky. Část těchto poznatků již také byla publikována formou časopiseckých publikací v renomovaných vědeckých periodikách. Takto bylo publikováno 7 prací, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 1-7. Jedna práce je k zaslání do časopisu k publikaci připravena (viz rukopis publikace uvedený jako příloha 8). Řada dalších poznatků, vyplývajících z výsledků prezentovaných v disertační práci, však byla dosud publikována pouze formou příspěvků na vědeckých kongresech a sympoziích. Pro časopiseckou publikaci jsou nyní připravovány.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- (1) Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie*, Brno (2002)
- (2) Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2002)
- (3) Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al.: *Science*, 291, 1304-51 (2001)
- (4) Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa*, 4, 146-8 (1999)
- (5) Klener, P.: *Klinická onkologie*, Galén, Praha (2002)
- (6) Klener, P.: *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha (1996)
- (7) Biedler, J. L., Riehm, H.: *Cancer Res*, 30, 1174-84 (1970)
- (8) Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., Cwiertka, K.: *Klinická onkologie* (2002)
- (9) Sharples, D., Hajos, G., Riedl, Z., Csanyi, D., Molnar, J., Szabo, D.: *Arch Pharm (Weinheim)*, 334, 269-74 (2001)
- (10) Menn, J. J.: *Environ. Health Persp.*, 27, 113 (1987)
- (11) Stiborova, M., Frei, E., Schmeiser, H. H.: *Collect Czech Chem Commun*, 62, 971-80 (1997)
- (12) Howard, P. C., Beland, F. A.: *Biochem Biophys Res Commun*, 104, 727-32 (1982)
- (13) Djuric, Z., Fifer, E. K., Yamazoe, Y., Beland, F. A.: *Carcinogenesis*, 9, 357-64 (1988)
- (14) Stiborova, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H. H.: *Carcinogenesis*, 23, 617-25 (2002)
- (15) Stiborova, M., Hajek, M., Frei, E., Schmeiser, H. H.: *Gen Physiol Biophys*, 20, 375-92 (2001)
- (16) Stiborova, M.: *Chem Listy*, 96, 784-91 (2002)

- 
- (17) Coon, M. J.: *Nutr Rev*, 36, 319-28 (1978)
- (18) Gut, I., Soucek, P., Hodek, P.: *Pracovní lékařství*, 1, 15-20 (1992)
- (19) Schacter, B. A., Nelson, E. B., Marver, H. S., Masters, B. S.: *J Biol Chem*, 247, 3601-7 (1972)
- (20) Kasper, C. B.: *J Biol Chem*, 246, 577-81 (1971)
- (21) Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., Kim, J. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8411-6 (1997)
- (22) Nadler, S. G., Strobel, H. W.: *Arch Biochem Biophys*, 261, 418-29 (1988)
- (23) Tamburini, P. P., Schenkman, J. B.: *Mol Pharmacol*, 30, 178-85 (1986)
- (24) Oprian, D. D., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 257, 8935-44 (1982)
- (25) Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 256, 266-77 (1981)
- (26) <http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm>.
- (27) <http://www.expasy.ch/>.
- (28) Reid, T. M., Morton, K. C., Wang, C. Y., King, C. M.: *Environ Mutagen*, 6, 705-17 (1984)
- (29) Taniguchi, H., Imai, Y., Sato, R.: *Arch Biochem Biophys*, 232, 585-96 (1984)
- (30) Garfinkel, D.: *Arch Biochem Biophys*, 77, 493-509 (1958)
- (31) Klingenberg, M.: *Arch Biochem Biophys*, 75, 376-86 (1958)
- (32) Omura, T., Sato, R.: *J Biol Chem*, 239, 2379-85 (1964)
- (33) Nebert, D. W., Nelson, D. R., Feyereisen, R.: *Xenobiotica*, 19, 1149-60 (1989)
- (34) Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W.: *Pharmacogenetics*, 6, 1-42 (1996)
- (35) Stiborova, M., Hudecek, I., Hodek, P., Frei, E.: *Chem Listy*, 93, 229-37 (1999)
- (36) Redlich, G., Zanger, U. M., Riedmaier, S., Bache, N., Giessing, A. B., Eisenacher, M., Stephan, C., Meyer, H. E., Jensen, O. N., Marcus, K.: *J Proteome Res* (2008), 10.1021/pr800231w
- (37) Guengerich, F. P.: *Mol Interv*, 3, 194-204 (2003)
- (38) Edwards, R. J., Murray, B. P., Singleton, A. M., Boobis, A. R.: *Biochemistry*, 30, 71-6 (1991)
- (39) Isin, E. M., Guengerich, F. P.: *Biochim Biophys Acta*, 1770, 314-29 (2007)
- (40) Felsted, R. L., Chu, A. E., Chaykin, S.: *J Biol Chem*, 248, 2580-7 (1973)
- (41) Poulos, T. L., Finzel, B. C., Howard, A. J.: *J Mol Biol*, 195, 687-700 (1987)
- (42) <http://www.drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>.

- (43) Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *J Biol Chem*, 282, 14348-55 (2007)
- (44) Yano, J. K., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *Nat Struct Mol Biol*, 12, 822-3 (2005)
- (45) Schoch, G. A., Yano, J. K., Wester, M. R., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *J Biol Chem*, 279, 9497-503 (2004)
- (46) Wester, M. R., Yano, J. K., Schoch, G. A., Yang, C., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *J Biol Chem*, 279, 35630-7 (2004)
- (47) Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D., Jhoti, H.: *Nature*, 424, 464-8 (2003)
- (48) Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Lewis, C. J., Tennant, M. G., Modi, S., Eggleston, D. S., Chenery, R. J., Bridges, A. M.: *J Biol Chem*, 281, 7614-22 (2006)
- (49) Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J., Jhoti, H.: *Science*, 305, 683-6 (2004)
- (50) Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F.: *J Biol Chem*, 279, 38091-4 (2004)
- (51) Guengerich, F. P.: *Cytochrome P450* (Ortiz De Montellano, P. R., ed.) Plenum Press, New York, (1995)
- (52) <http://www.bioinf.leeds.ac.uk/promise/>.
- (53) Anari, M. R., Khan, S., Jatoe, S. D., O'Brien, P. J.: *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 305-10 (1997)
- (54) Dahl, A. R., Hadley, W. M.: *Toxicol Appl Pharmacol*, 67, 200-5 (1983)
- (55) Stiborova, M., Hudecek, J., Paca Jr., J., Martinek, V., Paca, J.: *Chem listy*, 98, 876 (2004)
- (56) Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., et. al.: *DNA Cell Biol*, 12, 1-51 (1993)
- (57) Spatzenegger, M., Jaeger, W.: *Drug Metab Rev*, 27, 397-417 (1995)
- (58) Nebert, D. W., Nelson, D. R., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., et. al.: *DNA*, 8, 1-13 (1989)
- (59) Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M.: *Anal Bioanal Chem*, 392, 1093-108 (2008)
- (60) Guengerich, F. P.: *Chem Res Toxicol*, 21, 70-83 (2008)
- (61) Berthou, F.: Course "Use of mechanistic toxicology in risk assessment of environmental chemicals", F. d. M., Universidad de Chile, Ed., Santiago de Chile. (2001)



- (62) Chirulli, V., Longo, V., Marini, S., Mazzaccaro, A., Fiorio, R., Gervasi, P. G.: *Life Sci*, 76, 2535-46 (2005)
- (63) Pascussi, J. M., Vilarem, M. J.: *Med Sci (Paris)*, 24, 301-5 (2008)
- (64) Waxman, D. J.: *Arch Biochem Biophys*, 369, 11-23 (1999)
- (65) Cotreau, M. M., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J.: *Clin Pharmacokinet*, 44, 33-60 (2005)
- (66) Aitken, A. E., Richardson, T. A., Morgan, E. T.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 123-49 (2006)
- (67) Shimamoto, Y., Kitamura, H., Hoshi, H., Kazusaka, A., Funae, Y., Imaoka, S., Saito, M., Fujita, S.: *Arch Toxicol*, 72, 492-8 (1998)
- (68) Levi, F., Schibler, U.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 593-628 (2007)
- (69) Whitlock, J. P., Jr.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 103-25 (1999)
- (70) Nedelcheva, V., Gut, I.: *Xenobiotica*, 24, 1151-75 (1994)
- (71) Rodriguez-Antona, C., Ingelman-Sundberg, M.: *Oncogene*, 25, 1679-91 (2006)
- (72) Sobti, R. C., Onsory, K., Al-Badran, A. I., Kaur, P., Watanabe, M., Krishan, A., Mohan, H.: *DNA Cell Biol*, 25, 287-94 (2006)
- (73) Yang, J., Wu, H. F., Zhang, W., Gu, M., Hua, L. X., Sui, Y. G., Zhang, Z. D., Zhou, J. W., Wang, X. R., Zou, C., Qian, L. X.: *Front Biosci*, 11, 2052-60 (2006)
- (74) Brodie, A., Sabnis, G., Jelovac, D.: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102, 97-102 (2006)
- (75) Setiawan, V. W., Cheng, I., Stram, D. O., Giorgi, E., Pike, M. C., Van Den Berg, D., Pooler, L., Burtt, N. P., Le Marchand, L., Altshuler, D., Hirschhorn, J., Henderson, B. E., Haiman, C. A.: *Cancer Res*, 66, 12019-25 (2006)
- (76) Wegman, P., Elingarami, S., Carstensen, J., Stal, O., Nordenskjold, B., Wingren, S.: *Breast Cancer Res*, 9, R7 (2007)
- (77) Tsukino, H., Kuroda, Y., Qiu, D., Nakao, H., Imai, H., Katoh, T.: *Int J Cancer*, 100, 425-8 (2002)
- (78) Zhang, K. L., Ma, J. X., Chen, X. Y., Sun, Y., Kong, Q. Y., Liu, J., Li, H.: *Oncol Rep*, 12, 1335-40 (2004)
- (79) Fuhr, U.: *Clin Pharmacokinet*, 38, 493-504 (2000)
- (80) Pyerin, W., Wolf, C. R., Kinzel, V., Kubler, D., Oesch, F.: *Carcinogenesis*, 4, 573-6 (1983)
- (81) Oesch-Bartlomowicz, B., Oesch, F.: *Anal Bioanal Chem*, 392, 1085-92 (2008)
- (82) Bartlomowicz, B., Waxman, D. J., Utesch, D., Oesch, F., Friedberg, T.: *Carcinogenesis*, 10, 225-8 (1989)
- (83) Koch, J. A., Waxman, D. J.: *Biochemistry*, 28, 3145-52 (1989)
- (84) Pyerin, W., Taniguchi, H.: *Embo J*, 8, 3003-10 (1989)

- 
- (85) Oesch-Bartlomowicz, B., Oesch, F.: *Arch Biochem Biophys*, 409, 228-34 (2003)
- (86) Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y. T., Vakser, I. A., Loew, G., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 273, 17036-49 (1998)
- (87) Epstein, P. M., Curti, M., Jansson, I., Huang, C. K., Schenkman, J. B.: *Arch Biochem Biophys*, 271, 424-32 (1989)
- (88) Omata, Y., Sakamoto, H., Robinson, R. C., Pincus, M. R., Friedman, F. K.: *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 1090-5 (1994)
- (89) Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Mullick, J., Sepuri, N. B., Otvos, L., Pain, D., Avadhani, N. G.: *Embo J*, 18, 5494-504 (1999)
- (90) Robin, M. A., Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Sepuri, N. B., Gordon, D. M., Pain, D., Avadhani, N. G.: *J Biol Chem*, 277, 40583-93 (2002)
- (91) Eliasson, E., Mkrtchian, S., Ingelman-Sundberg, M.: *J Biol Chem*, 267, 15765-9 (1992)
- (92) Eliasson, E., Mkrtchian, S., Halpert, J. R., Ingelman-Sundberg, M.: *J Biol Chem*, 269, 18378-83 (1994)
- (93) Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E., Oesch, F.: *A Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9218-23 (2005)
- (94) Velick, S. F., Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 221, 265-75 (1956)
- (95) Vergeres, G., Waskell, L.: *Biochimie*, 77, 604-620 (1995)
- (96) Lederer, F.: *Biochimie*, 76, 674-692 (1994)
- (97) Hanlon, M. R., Begum, R. R., Newbold, R. J., Whitford, D., Wallace, B. A.: *Biochem J*, 352, 117-24 (2000)
- (98) Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Pharmacol Ther*, 97, 139-52 (2003)
- (99) Slaughter, S. R., Hultquist, D. E.: *J Cell Biol*, 83, 231-9 (1979)
- (100) Sobrado, P., Goren, M. A., James, D., Amundson, C. K., Fox, B. G.: *Protein Expr Purif*, 58, 229-41 (2008)
- (101) Bendzko, P., Usanov, S. A., Pfeil, W., Ruckpaul, K.: *Acta Biol Med Ger*, 41, K1-K8 (1982)
- (102) Mitoma, J., Ito, A.: *Embo J*, 11, 4197-203 (1992)
- (103) Rachubinski, R. A., Verma, D. P., Bergeron, J. J.: *J Cell Biol*, 84, 705-16 (1980)
- (104) Ogishima, T., Kinoshita, J. Y., Mitani, F., Suematsu, M., Ito, A.: *J Biol Chem*, 278, 21204-11 (2003)
- (105) Hultquist, D. E., Passon, P. G.: *Nat New Biol*, 229, 252-4 (1971)
- (106) Lee, T. C., Baker, R. C., Stephens, N., Snyder, F.: *Biochim Biophys Acta*, 489, 25-31 (1977)
- (107) Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M. J., Setlow, B., Redline, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 4565-9 (1974)

- (108) Grinstead, G. F., Gaylor, J. L.: *J Biol Chem*, 257, 13937-44 (1982)
- (109) Paltauf, F., Prough, R., Masters, B., Johnson, J.: *J Biol Chem*, 249, 2661-2662 (1974)
- (110) Hildebrandt, A., Estabrook, R. W.: *Arch Biochem Biophys*, 143, 66-79 (1971)
- (111) Iyanagi, T.: *Biochemistry*, 16, 2725-30 (1977)
- (112) Shirabe, K., Nagai, T., Yubisui, T., Takeshita, M.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1384, 16-22 (1998)
- (113) Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 240, 4481-7 (1965)
- (114) Enoch, H. G., Strittmatter, P.: *J Biol Chem*, 254, 8976-81 (1979)
- (115) Guengerich, F. P.: *Arch Biochem Biophys*, 440, 204-11 (2005)
- (116) Guengerich, F. P., Ballou, D. P., Coon, M. J.: *Biochem Biophys Res Commun*, 70, 951-6 (1976)
- (117) Reed, J. R., Hollenberg, P. F.: *J Inorg Biochem*, 97, 265-75 (2003)
- (118) Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Drug Metab Rev*, 31, 351-64 (1999)
- (119) Auchus, R. J., Lee, T. C., Miller, W. L.: *J Biol Chem*, 273, 3158-65 (1998)
- (120) Yamazaki, H., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Shimada, T., Guengerich, F. P.: *J Biol Chem*, 271, 27438-44 (1996)
- (121) Clarke, T. A., Im, S. C., Bidwai, A., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 279, 36809-18 (2004)
- (122) Davis, R. B., Jr., Lecomte, J. T.: *Biopolymers*, 90, 544-55 (2008)
- (123) Falzone, C. J., Mayer, M. R., Whiteman, E. L., Moore, C. D., Lecomte, J. T.: *Biochemistry*, 35, 6519-26 (1996)
- (124) Mukhopadhyay, K., Lecomte, J. T.: *Biochemistry*, 43, 12227-36 (2004)
- (125) Wang, L., Cowley, A. B., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D. R.: *Proteins*, 67, 293-304 (2007)
- (126) Pfeil, W.: *Protein Sci*, 2, 1497-501 (1993)
- (127) Strittmatter, P., Hackett, C. S., Korza, G., Ozols, J.: *J Biol Chem*, 265, 21709-13 (1990)
- (128) Tamburini, P. P., White, R. E., Schenkman, J. B.: *J Biol Chem*, 260, 4007-15 (1985)
- (129) Vergeres, G., Ramsden, J., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 270, 3414-22 (1995)
- (130) Vergeres, G., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 267, 12583-91 (1992)
- (131) Ozols, J.: *Biochim Biophys Acta*, 997, 121-30 (1989)
- (132) Mulrooney, S. B., Meinhardt, D. R., Waskell, L.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1674, 319-326 (2004)
- (133) Chiang, J. Y.: *Arch Biochem Biophys*, 211, 662-73 (1981)

- (134) Le Pecq, J. B., Nguyen Dat, X., Gosse, C., Paoletti, C.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 5078-82 (1974)
- (135) Mathe, G., Triana, K., Pontiggia, P., Blanquet, D., Hallard, M., Morette, C.: *Biomed Pharmacother*, 52, 391-6 (1998)
- (136) Rouesse, J. G., Le Chevalier, T., Caille, P., Mondesir, J. M., Sancho-Garnier, H., May-Levin, F., Spielmann, M., De Jager, R., Amiel, J. L.: *Cancer Treat Rep*, 69, 707-8 (1985)
- (137) Mathe, G.: *Biomed Pharmacother*, 53, 484-6 (1999)
- (138) Mathe, G., Morette, C., Hallard, M., Pontiggia, P., Blanquet, D., Hage, F.: *Acta Pharmacol Sin*, 23, 1-15 (2002)
- (139) Goodwin, S., Smith, A. F., Horning, E. C.: *J Am Chem Soc*, 81, 1903-1908 (1959)
- (140) Le Pecq, J. B., Gosse, C., Nguyen Dat, X., Paoletti, C.: *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 281, 1365-7 (1975)
- (141) Acton, E. M., Narayanan, V. L., Risbood, P. A., Shoemaker, R. H., Vistica, D. T., Boyd, M. R.: *J Med Chem*, 37, 2185-9 (1994)
- (142) Juret, P., Tanguy, A., Girard, A., Le Talaer, J. Y., Abbatucci, J. S., Dat, Y., Le Pecq, J. B., Paoletti, C.: *Nouv Presse Med*, 8, 1495-8 (1979)
- (143) Paoletti, C., Le Pecq, J. B., Dat-Xuong, N., Juret, P., Garnier, H., Amiel, J. L., Rouesse, J.: *Recent Results Cancer Res*, 74, 107-23 (1980)
- (144) Fillastre, J. P., Moulin, B., Godin, M., Josse, S.: *Pathol Biol (Paris)*, 34, 1013-28 (1986)
- (145) Auclair, C.: *Arch Biochem Biophys*, 259, 1-14 (1987)
- (146) Mondesir, J. M., Bidart, J. M., Goodman, A., Alberici, G. F., Caille, P., Troalen, F., Rouesse, J., Bohuon, C., Gralla, R. J., Einzig, A. I., and et al.: *J Clin Oncol*, 3, 735-40 (1985)
- (147) Chadwick, M., Silveira, D. M., Platz, B. B., Hayes, D.: *Drug Metab Dispos*, 6, 528-41 (1978)
- (148) Vistica, D. T., Kenney, S., Hursey, M. L., Boyd, M. R.: *Biochem Biophys Res Commun*, 200, 1762-8 (1994)
- (149) Ashby, J., Elliott, B. M., Styles, J. A.: *Cancer Lett*, 9, 21-33 (1980)
- (150) Bertrand, J. R., Giacomoni, P. U.: *Chemioterapia*, 4, 445-53 (1985)
- (151) DeMarini, D. M., Abu-Shakra, A., Gupta, R., Hendee, L. J., Levine, J. G.: *Environ Mol Mutagen*, 20, 12-8 (1992)
- (152) Singh, M. P., Hill, G. C., Peoc'h, D., Rayner, B., Imbach, J. L., Lown, J. W.: *Biochemistry*, 33, 10271-85 (1994)
- (153) Chu, Y., Hsu, M. T.: *Nucleic Acids Res*, 20, 4033-8 (1992)
- (154) Fosse, P., Rene, B., Le Bret, M., Paoletti, C., Saucier, J. M.: *Nucleic Acids Res*, 19, 2861-8 (1991)

- (155) Froelich-Ammon, S. J., Patchan, M. W., Osheroff, N., Thompson, R. B.: *J Biol Chem*, 270, 14998-5004 (1995)
- (156) Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N.: *Jpn J Cancer Res*, 86, 819-27 (1995)
- (157) Sugikawa, E., Hosoi, T., Yazaki, N., Gamanuma, M., Nakanishi, N., Ohashi, M.: *Anticancer Res*, 19, 3099-108 (1999)
- (158) Dodin, G., Andrieux, M., Kabbani, H. A.: *European Journal of Biochemistry*, 193, 697-700 (1990)
- (159) Hagg, M., Berndtsson, M., Mandic, A., Zhou, R., Shoshan, M. C., Linder, S.: *Mol Cancer Ther*, 3, 489-97 (2004)
- (160) Schwaller, M. A., Allard, B., Lescot, E., Moreau, F.: *J Biol Chem*, 270, 22709-13 (1995)
- (161) Perry, P. J., Gowan, S. M., Read, M. A., Kelland, L. R., Neidle, S.: *Anticancer Drug Des*, 14, 373-82 (1999)
- (162) Stiborova, M., Bieler, C. A., Wiessler, M., Frei, E.: *Biochem Pharmacol*, 62, 1675-84 (2001)
- (163) Bořek -Dohalská, L., Frei, E., Stiborova, M.: *Collect Czech Chem Commun*, 69, 603-15 (2004)
- (164) Frei, E., Bieler, C. A., Arlt, V. M., Wiessler, M., Stiborova, M.: *Biochem Pharmacol*, 64, 289-95 (2002)
- (165) Stiborova, M., Breuer, A., Aimova, D., Stiborova-Rupertova, M., Wiessler, M., Frei, E.: *Int J Cancer*, 107, 885-90 (2003)
- (166) Stiborova, M., Sejbal, J., Borek-Dohalska, L., Aimova, D., Poljakova, J., Forsterova, K., Rupertova, M., Wiesner, J., Hudecek, J., Wiessler, M., Frei, E.: *Cancer Res*, 64, 8374-80 (2004)
- (167) Branfman, A. R., Bruni, R. J., Reinhold, V. N., Silveira, D. M., Chadwick, M., Yesair, D. W.: *Drug Metab Dispos*, 6, 542-8 (1978)
- (168) Stiborova, M., Stiborova-Rupertova, M., Borek-Dohalska, L., Wiessler, M., Frei, E.: *Chem Res Toxicol*, 16, 38-47 (2003)
- (169) Poljakova, J., Forsterova, K., Sulc, M., Frei, E., Stiborova, M.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149, 449-53 (2005)
- (170) El-Rayes, B. F., Ali, S., Heilbrun, L. K., Lababidi, S., Bouwman, D., Visscher, D., Philip, P. A.: *Clin Cancer Res*, 9, 1705-9 (2003)
- (171) Murray, G. I., Weaver, R. J., Paterson, P. J., Ewen, S. W., Melvin, W. T., Burke, M. D.: *J Pathol*, 169, 347-53 (1993)
- (172) Williams, J. A., Phillips, D. H.: *Cancer Res*, 60, 4667-77 (2000)
- (173) Poljakova, J., Dracinsky, M., Frei, E., Hudecek, J., Stiborova, M.: *Collect Czech Chem Commun*, 71, 1169-1185 (2006)
- (174) Poljakova, J., Frei, E., Gomez, J. E., Aimova, D., Eckschlager, T., Hrabeta, J., Stiborova, M.: *Cancer Lett*, 252, 270-9 (2007)

- (175) Stiborova, M., Poljakova, J., Ryslava, H., Dracinsky, M., Eckschlager, T., Frei, E.: *Int J Cancer*, 120, 243-51 (2007)
- (176) Stiborova, M., Rupertova, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H. H.: *Collect Czech Chem Commun*, 69, 476-498 (2004)
- (177) Dracinsky, M., Sejbal, J., Rygerova, B., Stiborova, M.: *Tetrahedron Letters*, 48, 6893-6895 (2007)
- (178) Stiborova, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M.: *Chem Res Toxicol*, 8, 489-98 (1995)
- (179) Stiborova, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M., Hradec, J.: *Carcinogenesis*, 11, 1843-8 (1990)
- (180) Antonovic, L., Hodek, P., Smrcek, S., Novak, P., Sulc, M., Strobel, H. W.: *Arch Biochem Biophys*, 370, 208-15 (1999)
- (181) Anzenbacher, P., Sipal, Z., Hodek, P.: *Biomed Biochim Acta*, 43, 1343-9 (1984)
- (182) Haugen, D. A., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 251, 7929-39 (1976)
- (183) Saito, T., Strobel, H. W.: *J Biol Chem*, 256, 984-8 (1981)
- (184) Yang, C. S., Tu, Y. Y., Koop, D. R., Coon, M. J.: *Cancer Res*, 45, 1140-5 (1985)
- (185) Koop, D. R., Morgan, E. T., Tarr, G. E., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 257, 8472-80 (1982)
- (186) Yasukochi, Y., Peterson, J. A., Masters, B. S.: *J Biol Chem*, 254, 7097-104 (1979)
- (187) Yang, M. X., Cederbaum, A. I.: *Arch Biochem Biophys*, 315, 438-44 (1994)
- (188) Šulc, M.: *Disertační práce*, PŘF UK, Praha (2002)
- (189) Janouchová, K.: *Diplomová práce*, PŘF UK, Praha (2004)
- (190) Saito, T., Strobel, H. W.: *J Biol Chem*, 256, 984-988 (1981)
- (191) Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: *Anal Biochem*, 175, 231-7 (1988)
- (192) Sottocasa, G. L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, A.: *J Cell Biol*, 32, 415-38 (1967)
- (193) Vermilion, J. L., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 253, 2694-704 (1978)
- (194) Burchell, A.: *Biochem J*, 226, 339-41 (1985)
- (195) Estabrook, R. W., Werringloer, J.: *Methods Enzymol*, 52, 212-20 (1978)
- (196) Strittmatter, P., Velick, S. F.: *J Biol Chem*, 221, 253-64 (1956)
- (197) Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680-5 (1970)
- (198) Cinti, D. L., Ozols, J.: *Biochim Biophys Acta*, 410, 32-44 (1975)
- (199) Mulrooney, S. B., Waskell, L.: *Protein Expr Purif*, 19, 173-8 (2000)
- (200) Canova-Davis, E., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 259, 2541-6 (1984)

- (201) Stiborova, M., Martinek, V., Schmeiser, H. H., Frei, E.: *Neuro Endocrinol Lett*, 27, 35-9 (2006)
- (202) Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L.: *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 499-506 (2005)
- (203) Zhang, H., Hamdane, D., Im, S. C., Waskell, L.: *J Biol Chem*, 283, 5217-25 (2008)

## PŘÍLOHY

### *Příloha 1*

Marie Stiborová, Lucie Bořek-Dohalská, Dagmar Aimová, Věra Kotrbová, Kateřina Kukačková, Kateřina Janouchová, Martina Rupertová, Helena Ryšlavá, Jiří Hudeček and Eva Frei: **Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes-similarity between human and rat systems.** *Gen. Physiol. Biophys.*, 25: 245-61, 2006. **IF<sub>2006</sub> = 0.771**

### *Příloha 2*

Věra Kotrbová, Dagmar Aimová, Anna Březinová, Kateřina Janouchová, Jitka Poljaková, Petr Hodek, Eva Frei and Marie Stiborová: **Cytochromes P450 reconstituted with NADPH: P450 reductase mimic the activating and detoxicating metabolism of the anticancer drug ellipticine in microsomes.** *Neuro Endocrinol Lett.*, 27(2): 18-22, 2006. **IF<sub>2006</sub> = 0.924**

### *Příloha 3*

Dagmar Aimová, Lucie Svobodová, Věra Kotrbová, Barbora Mrázová, Petr Hodek, Jiří Hudeček, Radka Václavíková, Eva Frei and Marie Stiborová: **The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochromes P450 1A1 and 1A2, thereby modulating its own metabolism.** *Drug. Metab. Dispos.*, 35: 1926-34, 2007. **IF<sub>2007</sub> = 3.907**

### *Příloha 4*

Barbora Mrázová, Věra Kotrbová, Miroslava Kořínková, Lucie Svobodová, Jiří Hudeček, Petr Hodek, René Kizek, Eva Frei and Marie Stiborová: **Kinetics of ellipticine oxidation by cytochromes P450 1A1 and 1A2 reconstituted with NADPH: cytochrome P450 reductase.** *Chem. Listy*, 101: 237-239, 2007. **IF<sub>2007</sub> = 0.683**

### *Příloha 5*

Marie Stiborová, Volker M. Arlt, Colin. J. Henderson, C. Roland Wolf, Věra Kotrbová, Michaela Moserová, Jiří Hudeček, David H. Phillips and Eva Frei: **Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the**



---

**hepatic NADPH: cytochrome P450 reductase null mouse.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226: 318-327, 2008. **IF<sub>2007</sub> = 3.846**

*Příloha 6*

Dagmar Aimová, Jitka Poljaková, Věra Kotrbová, Michaela Moserová, Eva Frei, Volker M. Arlt and Marie Stiborová: **Ellipticine and benzo(a)pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2.** *Interdisc. Toxicol.*, 1(2): 160-168, 2008. **Dosud bez IF**

*Příloha 7*

Michaela Moserová, Věra Kotrbová, Martina Rupertová, Karel Naiman, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Eva Frei and Marie Stiborová: **Isolation and partial characterization of the adduct formed by 13-hydroxyellipticine with deoxyguanosine in DNA.** *Neuro Endocrinol. Letters*, 29(5), 2008, v tisku. **IF<sub>2007</sub> = 1.443**

*Příloha 8*

Věra Kotrbová, Dagmar Aimová, Marek Ingr, Lucie Bořek-Dohalská, Marie Stiborová: **Preparation of apo-cytochrome b<sub>5</sub> by its heterologous expression in *Escherichia coli***  
Rukopis v přípravě