

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



Modulace metabolické aktivity ellipticinu složkami monooxygenasového systému

Autoreferát disertační práce

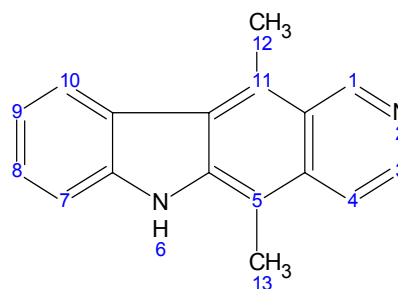
RNDr. Barbora Mrázová

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

ÚVOD

Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido [4,3-*b*] karbazol, *obrázek 1*) patří mezi pyridokarbazoly a společně s některými jeho deriváty se řadí mezi alkaloidy rostlin čeledi *Apocyanaceae*, které vykazují výraznou protinádorovou aktivitu^[15, 21, 24, 31].



Obrázek 1 *Struktura ellipticinu*

Ellipticin byl poprvé izolován v roce 1959 z listů rostliny *Ochrosia elliptica Labil*^[6], ale jeho biologické působení (a některých jeho derivátů) bylo objeveno až v roce 1967, kdy se podařilo ellipticin uměle syntetizovat^[7]. Ellipticin a jeho polárnější deriváty 9-methoxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin jsou ve formě acetátu farmakologicky využívány již od 70. let minulého století. Používají se zejména k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy^[1, 17, 18, 19, 23]. Ellipticin vykazuje také anti-HIV aktivitu. Způsobuje totiž inhibici retrovirové integrasy, proto se zkoumá i jeho možné použití při léčbě AIDS^[24, 32].

Ellipticin je v organismu přeměňován cytochromy P450 až na pět metabolitů: 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu. Uvedené metabolity jsou tvořeny nejen lidskými jaterními mikrosomy, ale rovněž i mikrosomy modelových organismů (potkan a králík)^[34]. Kromě cytochromů P450 participují na metabolismu ellipticinu i peroxidasy, a to za vzniku dvou metabolitů: jednak dimeru ellipticinu, ve kterém jsou dvě molekuly ellipticinu spojeny prostřednictvím N6 pyrrolového kruhu jednoho skeletu ellipticinu a C9 druhého (majoritní produkt) a minoritního produktu, kterým je N²-oxid ellipticinu^[27, 29, 30, 37].

Předpokládaný mechanismus protinádorového účinku ellipticinu je vysvětlován zejména interkalací ellipticinu do molekuly DNA^[2, 4, 8, 19] a inhibicí

topoizomerasy II^[3, 11, 13, 16, 25]. Ellipticin také způsobuje selektivní inhibici fosforylace proteinu p53^[26, 41] a oxidační fosforylaci, což vede k drastickému snížení obsahu ATP v buňce vedoucí k jejímu zániku^[33]. Všechny výše zmíněné mechanismy účinku jsou založeny na nespecifickém působení ellipticinů, což je v rozporu s jejich poměrně úzkou specifitou účinku vůči určitým typům neoplasie.

Nově popsaným mechanismem, který přeměňuje ellipticin v průběhu metabolismu v organismu na farmakologicky účinnější deriváty, je tvorba kovalentních aduktů v DNA. Cílovým deoxynukleosidem modifikovaným aktivovaným ellipticinem v DNA je deoxyguanosin^[38]. Ve všech testovaných systémech^[40] v podmínkách *in vitro* se tvoří minimálně dva adukty s DNA^[34]. Majoritní adukt 1, jehož tvorba je závislá na metabolické aktivaci cytochromy P450, je tvořen 13-hydroxyellipticinem a minoritní adukt 2 vzniká i v nepřítomnosti enzymového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací^[34, 38]. Metabolitem, zodpovědným za tvorbu minoritního aduktu, je 12-hydroxyellipticin, který může také vznikat Polonowskiho přesmykem z N²-oxidu.

K tvorbě kovalentních aduktů ellipticinu s DNA také dochází v plicních fibroblastických buňkách křečka (V-79) transfekovaných lidskými CYP^[12], v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7)^[5], v lidských leukemických buňkách (HL-60 a CCRF-CEM)^[30] a v buňkách neuroblastomů^[28] a glioblastomů^[22]. Ellipticin dále generuje kovalentní adukty *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana exponovaného tomuto protinádorovému léčivu^[36] a v DNA prsního adenokarcinomu potkana^[39].

Nejefektivnějšími aktivačními enzymy ellipticinu pro tvorbu aduktů s DNA se v rámci lidských a potkaních forem cytochromů P450 ukázaly být zejména CYP3A a CYP1A^[20, 34, 38, 40].

CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu a jeho mechanismu účinku.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

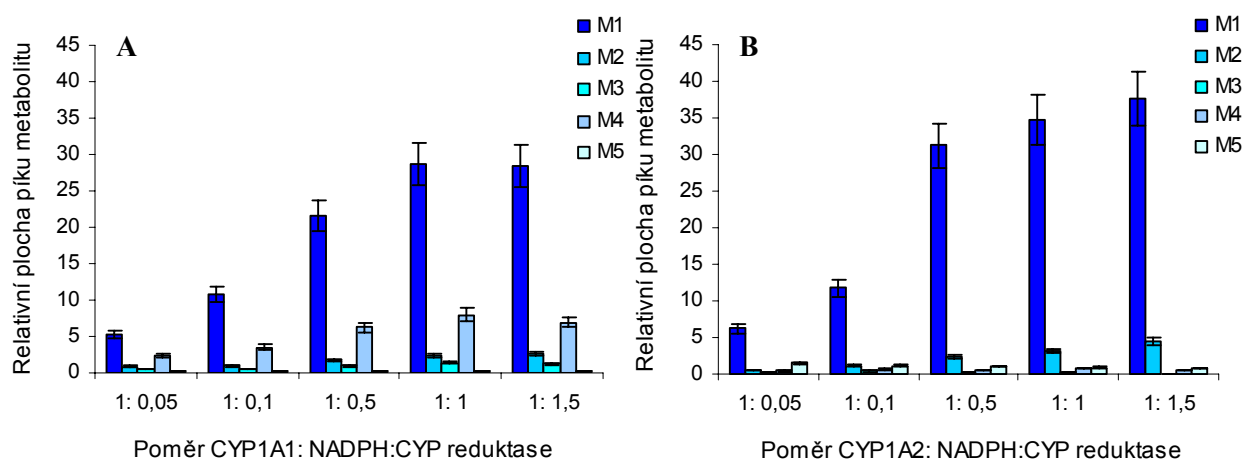
- Studium metabolismu ellipticinu cytochromy P450 podrodiny 1A
- Studium indukčního potenciálu ellipticinu vůči cytochromům P450 1A1/2 v játrech, plicích a ledvinách laboratorního potkana
- Příprava cytochromu b₅ bez hemového kofaktoru (apo-cytochromu b₅)
- Studium vlivu cytochromu b₅ na metabolismus ellipticinu CYP1A1/2
- Studium vlivu apo-cytochromu b₅ a dalších hemových i nehemových proteinů na oxidaci ellipticinu CYP1A1/2
- Studium vlivu cytochromu b₅, jeho apo-formy a dalších proteinů na oxidaci ellipticinu CYP3A4

VÝSLEDKY A DISKUZE

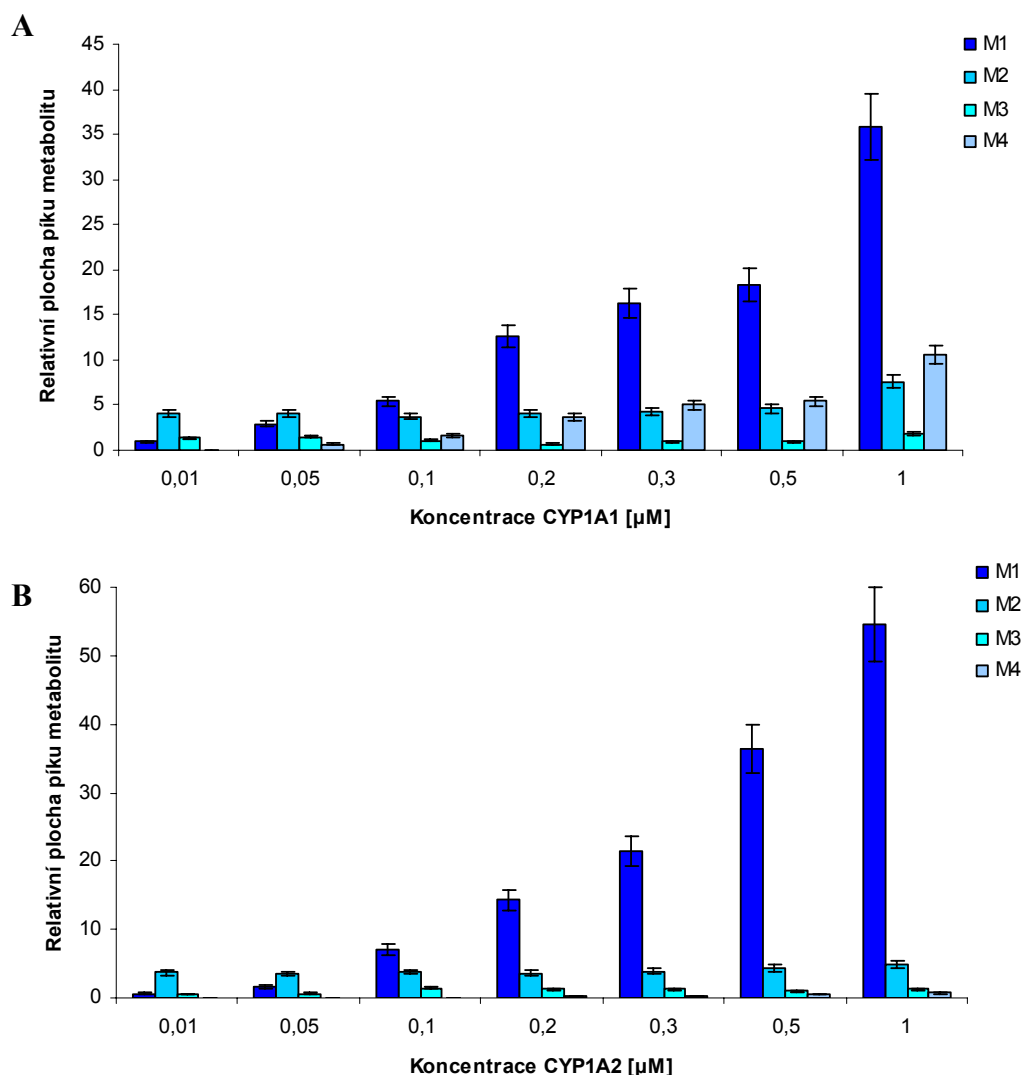
Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti farmakologických účinků protinádorového léčiva ellipticinu a jeho mechanismu působení. Nejdůležitější poznatky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

Změna zastoupení NADPH:CYP reduktasy vůči CYP1A a koncentrace CYP1A v rekonstituovaném systému koreluje s efektivitou přeměny ellipticinu

Vliv jednotlivých složek systému oxidas se smíšenou funkcí na oxidaci ellipticinu katalyzovanou CYP1A byl zkoumán v experimentech *in vitro* v rámci modelového enzymového systému (rekonstituovaného systému). Výsledky ukazují, že jak nárůst poměru NADPH:CYP reduktasy a CYP1A (obrázek 2), ale i zvyšující se koncentrace těchto cytochromů P450 v rekonstituovaném systému (obrázek 3) resultuje v nárůst tvorby zejména 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu, tedy detoxikačních metabolitů. Výsledky tedy odpovídají situaci v oxidaci ellipticinu CYP1A1 a CYP1A2 v lidských, potkaních a králičích mikrosomech^[20, 35].



Obrázek 2 Vliv NADPH:CYP reduktasy na oxidaci ellipticinu katalyzovanou CYP1A1 (A) a CYP1A2 (B) v rekonstituovaném systému. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

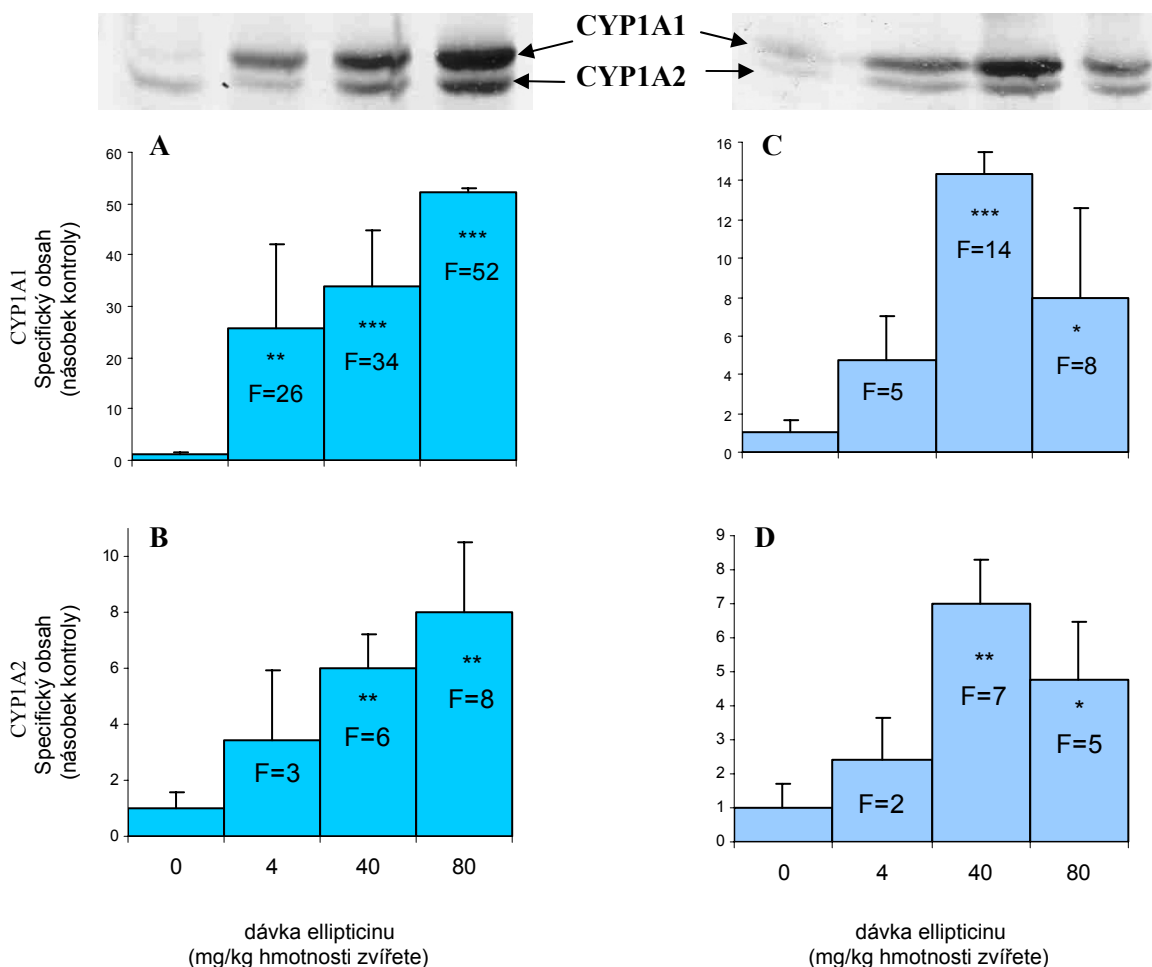


Obrázek 3 Vliv různých koncentrací cytochromů P450 1A1 (A) a 1A2 (B) na oxidaci ellipticinu v rekonstituovaném systému. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

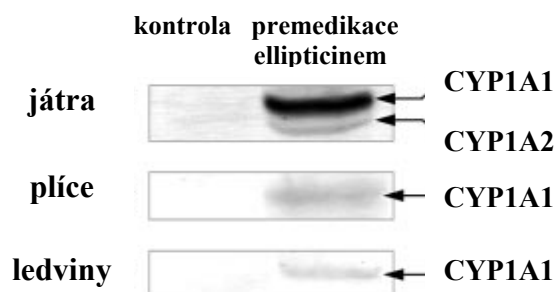
Ellipticin moduluje své farmakologické a genotoxické účinky indukcí CYP1A1/2

Premedikací samců a samic laboratorního potkana ellipticinem dochází k signifikantnímu zvýšení exprese i katalytické aktivity CYP1A1 a 1A2, a to jak v játrech tak extrahepatálních orgánech (obrázek 4 a 5). Vlivem indukce zároveň dochází v průběhu oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy indukovaných zvířat ke zvýšení tvorby aduktů v DNA, která koreluje s nárůstem aktivačních metabolitů, zodpovědných za jejich tvorbu (obrázek 6A). Naopak oxidace

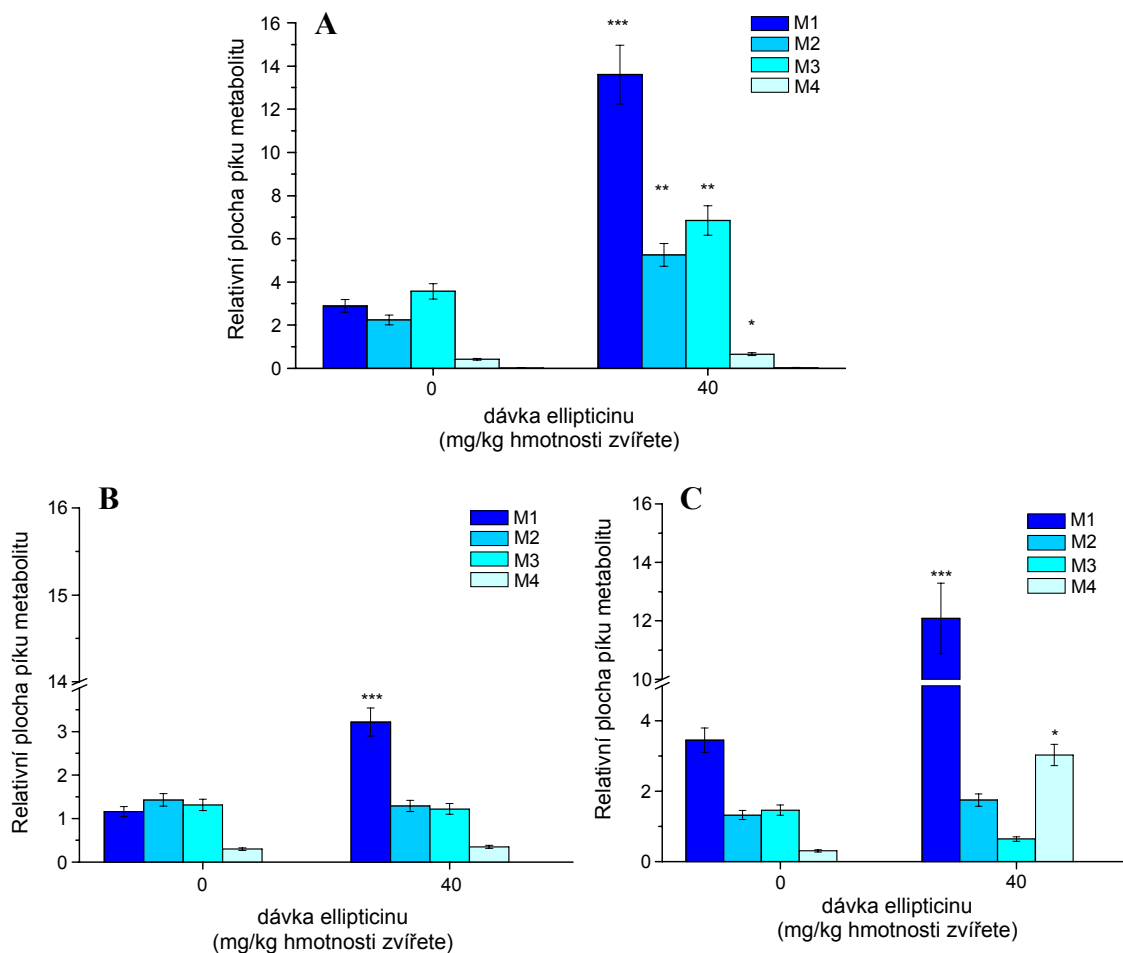
ellipticinu mikrosomy ledvin a plic resultuje především v tvorbu detoxikačních metabolitů, 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu (obrázek 6B,C).



Obrázek 4 Indukce CYP1A1 (A, C) a 1A2 (B, D) v játrech samců (A, B) a samic (C, D) potkanů kontrolních (bez premedikace) a premedikovaných 4, 40 a 80 mg ellipticinu na 1 kg hmotnosti zvířete. Imunoblotty mikrosomálního CYP1A1/2 jsou detekovány kuřecí polyklonální protilátkou proti potkanímu CYP1A1. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student t-test).



Obrázek 5 Imunoblotty mikrosomálních CYP1A1 a 1A2 indukovaných v játrech, plicích a ledvinách samců potkanů kontrolních a premedikovaných ellipticinem v dávce 40 mg/kg hmotnosti zvířete. CYP1A1/2 jsou detekovány kuřecí polyklonální protilátkou proti potkanímu CYP1A1.



Obrázek 6 *Metabolismus ellipticinu mikrosomy z jater (A), plic (B) a ledvin (C) potkana kontrolního a premedikovaného 40 mg/kg ellipticinu. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student *t*-test).*

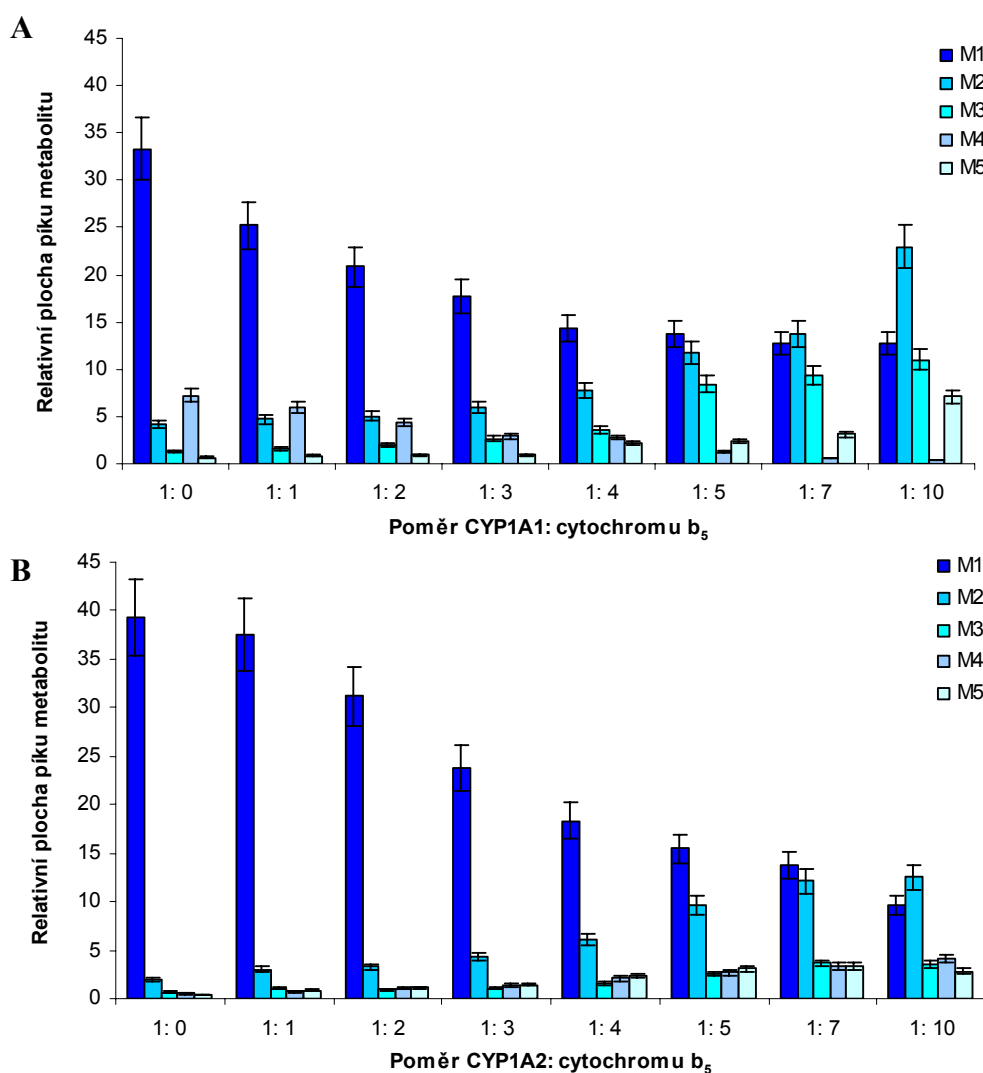
Příprava apo-cytochromu b_5 , cytochromu b_5 bez kofaktoru (hemu)

Z purifikovaného králičího cytochromu b_5 byl připraven apo-cytochrom b_5 bez ireverzibilního poškození jeho struktury. Tento protein je po rekonstituci s hemem biologicky aktivní a vykazuje shodné vlastnosti s nativním cytochromem b_5 .

Cytochrom b_5 ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP1A1/2 a jeho kinetiku

Cytochrom b_5 mění nejen množství jednotlivých metabolitů ellipticinu tvořených CYP1A1 a 1A2, ale i jejich poměrné zastoupení. Konkrétně stimuluje tvorbu aktivačních metabolitů (12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu) a naopak

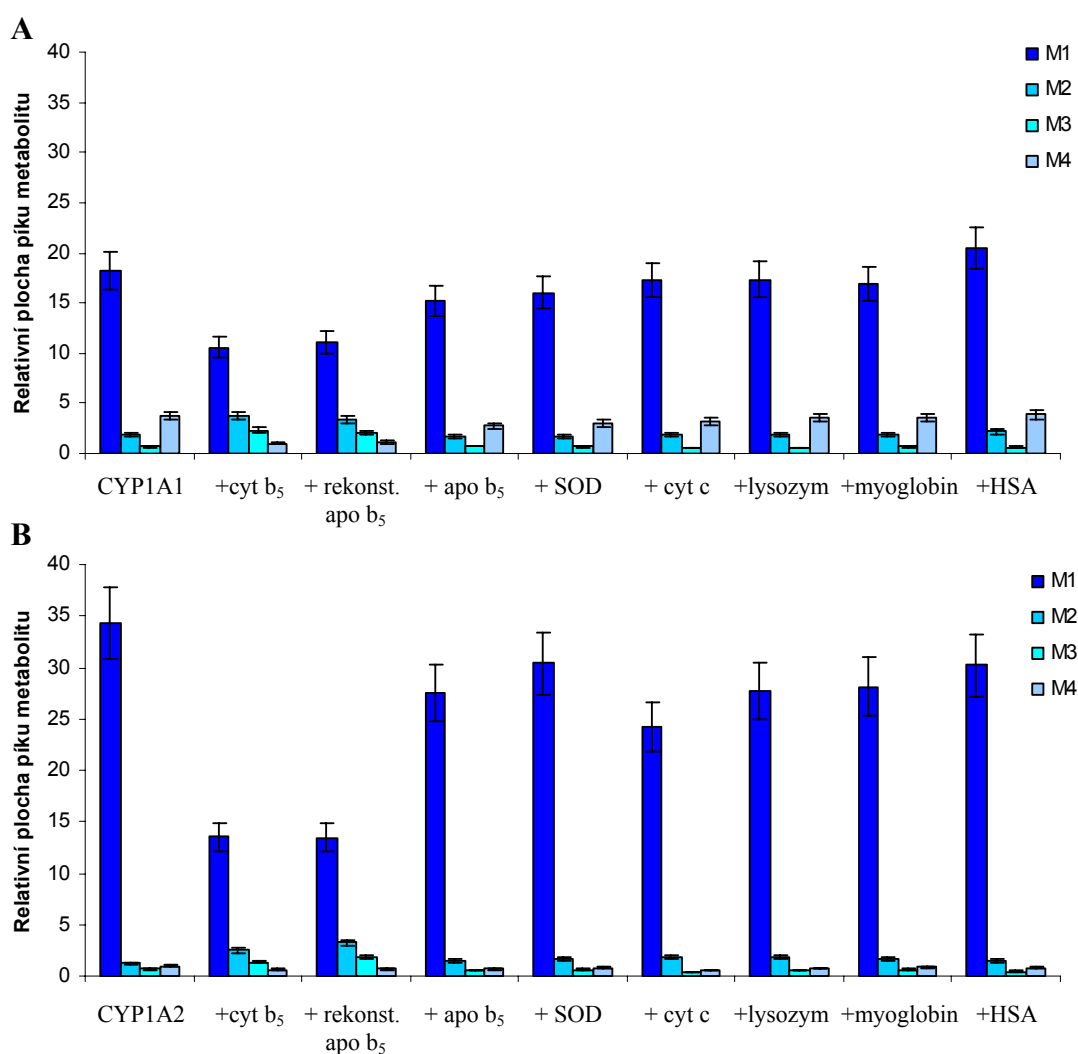
inhibuje produkci detoxikačních metabolitů (obrázek 7). Interakce CYP1A1 s cytochromem b_5 navíc produkuje změnu v kinetice oxidace ellipticinu. Oproti klasické hyperbolické kinetice Michaelis-Mentenové, která je typická pro oxidaci ellipticinu CYP1A1, mění cytochrom b_5 kinetické vlastnosti systému tohoto cytochromu P450 na kinetiku sigmoidální. V případě CYP1A2 tyto změny v kinetice oxidace ellipticinu cytochrom b_5 nevyvolává, její hyperbolický průběh zůstává zachován.



Obrázek 7 Vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu katalyzovanou CYP1A1 (A) a 1A2 (B). CYP1A1/2 a NADPH:CYP reductasa byly použity v ekvimolárním množství (1:1). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

Cytochrom b_5 (ne však jeho apo-forma) mění oxidaci ellipticinu CYP1A1/2

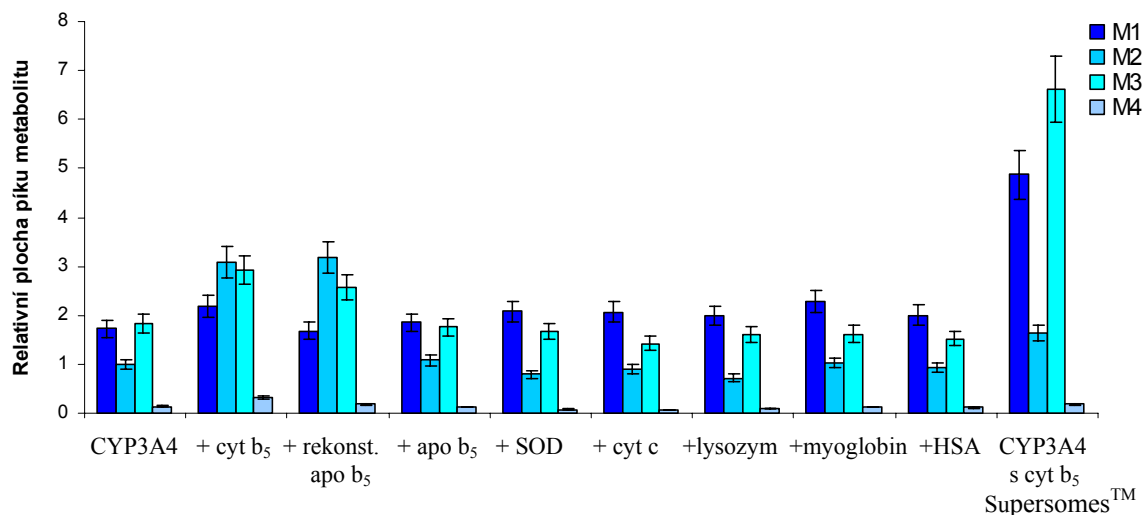
Porovnáním výsledků vlivu apo-cytochromu b_5 a různých proteinů na oxidaci ellipticinu CYP1A1/2 s vlivem nativního cytochromu b_5 je zřejmé, že pouze cytochrom b_5 s inkorporovaným hemem ve svém aktivním centru ovlivňuje oxidaci ellipticinu (obrázek 8). Cytochrom b_5 působí nejen jako přenašeč druhého elektronu na cytochrom P450, ale vzhledem ke skutečnosti, že cytochrom b_5 mění i zastoupení všech pěti metabolitů ellipticinu, nejen jejich množství, přispívá nejspíš i ke konformační změně CYP1A1 i 1A2.



Obrázek 8 Vliv cytochromu b_5 , jeho apo-formy a dalších proteinů na oxidaci ellipticinu katalyzovanou CYP1A1 (A) a 1A2 (B). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

Cytochrom b_5 potencuje v oxidaci ellipticinu CYP3A4 zejména tvorbu aktivačních metabolitů

Lidský i purifikovaný králičí cytochrom b_5 působí v oxidaci ellipticinu CYP3A4 stimulačně na tvorbu jednotlivých metabolitů, zejména pak tvorbu 13-hydroxy- a následně 12-hydroxyellipticinu (obrázek 9). Tyto výsledky korelují s nárůstem tvorby dvou aduktů DNA s ellipticinem. Zejména pak s nárůstem tvorby majoritního aduktu 1, který je generován ze 13-hydroxyellipticinu. Interakce CYP3A4 s cytochromem b_5 nemění klasickou hyperbolickou kinetiku oxidace ellipticinu jako v systému s CYP1A1/2, ale zrychluje tvorbu všech metabolitů. Preferenční tvorba 13-hydroxyellipticinu odpovídá nejčastějšímu vazebnému uskupení dle modelu struktury CYP3A4. Cytochrom b_5 tedy podporuje oxidaci ellipticinu CYP3A4 přenosem elektronů, přesto se ovšem nedá vyloučit allosterická modulace CYP3A4 prostřednictvím tohoto proteinu.



Obrázek 9 Vliv cytochromu b_5 , jeho apo-formy a dalších proteinů na oxidaci ellipticinu katalyzovanou lidským CYP3A4. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

Předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky. Část těchto výsledků již také byla publikována formou časopiseckých publikací ve vědeckých periodikách. Takto byly publikovány 4 práce, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 1-4. Dvě další práce jsou k zaslání do časopisu k publikaci připravovány (viz rukopisy publikací uvedených jako přílohy 5 a 6).

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (granty 203/06/0329, 305/09/H008 a P301/10/0356), grantovou agenturou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (granty MSM0021620808, 1M0505 a RP MSMT 14/63) a grantovou agenturou Univerzity Karlovy (granty 258188 a 1272080).