

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Radek Indra

# **Mechanismus enzymové aktivace karcinogenů a léčiv systémem cytochromů P450**

**Mechanism of enzymatic activation of carcinogens and  
drugs by the system of cytochrome P450**

*Dizertační práce*

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2015



**Prohlášení:**

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

V Praze dne .....

.....

Mgr. Radek Indra



**Prohlášení spoluautorů:**

Prohlašuji, že Mgr. Radek Indra rozhodujícím způsobem (30-90 %) přispěl ke vzniku všech publikací, které jsou přílohami této dizertační práce. Sám provedl většinu experimentů a významně se podílel na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne .....

.....

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.



Rád bych poděkoval své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání velmi zajímavého tématu, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při vypracování této dizertační práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Janu Milichovskému za přípravu rekombinantních enzymů a celému kolektivu laboratoře za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych chtěl poděkovat pracovníkům pracovišť v Londýně a Dundee za přípravu myších modelů.

Tato dizertační práce byla vypracována jako součást grantových projektů GA ČR (P301/10/0356 a 14-8344S), MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505) a grantové agentury UK (UNCE 204025/2012 a GAUK 640712).





# Obsah

Abstrakt.....	12
Abstract.....	13
1 Úvod.....	15
2 Přehled literatury.....	17
2.1 Karcinogenese.....	18
2.2 Biotransformace xenobiotik.....	22
2.2.1 Biotransformace léčiv.....	22
2.2.1.1 Ellipticin a jeho biotransformace.....	23
2.2.1.2 Tvorba kovalentních aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA.....	24
2.2.2 Biotransformace karcinogenů.....	25
2.2.2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	26
2.3 Biotransformační enzymy.....	28
2.3.1 Monooxygenasový systém.....	28
2.3.1.1 Monooxygenasy obsahující cytochrom P450.....	28
2.3.1.2 Flavinové monooxygenasy.....	34
2.3.2 Peroxidasy.....	35
2.3.3 Konjugační enzymy.....	35
3 Cíl dizertační práce.....	37
4 Materiál a metody.....	41
4.1 Použitý materiál a chemikálie.....	42
4.2 Použité metody.....	43
4.2.1 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy.....	43
4.2.2 Oxidace benzo[a]pyrenu rekombinantními cytochromy P450.....	45
4.2.3 Oxidace benzo[a]pyrenu cytochromy P450 v rekonstituovaných systémech....	46
4.2.4 Separace metabolitů benzo[a]pyrenu.....	47

---

4.2.5	Analýzy aduktů testovaných látek s DNA metodou „ <sup>32</sup> P-postlabeling“ .....	48
4.2.6	Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4.....	48
4.2.7	Separace metabolitů ellipticinu.....	48
5	Výsledky.....	51
5.1	Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy.....	52
5.1.1	Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana.....	52
5.1.2	Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy člověka.....	53
5.1.3	Oxidace BaP jaterními mikrosomy geneticky modifikovaných myší [HRN (hepatic reductase null) myši] .....	54
5.1.4	Oxidace BaP mikrosomy myší modifikovaných genem lidského proteinu p53.....	55
5.2	Analýza metabolitů BaP v moči myších modelů s různým statusem genu lidského p53 .....	57
5.3	Oxidace benzo[a]pyrenu rekombinantními cytochromy P450 .....	58
5.3.1	Oxidace benzo[a]pyrenu potkaními rekombinantními cytochromy P450.....	58
5.3.2	Oxidace benzo[a]pyrenu lidskými rekombinantními cytochromy P450 .....	60
5.4	Metabolismus BaP systémy cytochromů P450 za přítomnosti NADH a vliv cyt b <sub>5</sub> na tento metabolismus .....	68
5.4.1	Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana za přítomnosti NADPH a NADH .....	69
5.4.2	Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 za přítomnosti NADPH nebo NADH.....	70
5.5	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA <i>in vitro</i> .....	73
5.5.1	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaními jaterními mikrosomy .....	73
5.5.2	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA jaterními mikrosomy myší s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech (HRN myši).....	76
5.5.3	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA jaterními mikrosomy myší modifikovaných genem lidského proteinu p53 .....	76
5.5.4	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidskými jaterními mikrosomy .....	78

---

5.5.5	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaními a lidskými cytochromy P450 1A1 .....	78
5.5.5.1	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaním cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech <sup>TM</sup> .....	78
5.5.5.2	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaním cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou, cytochromem b <sub>5</sub> a epoxid hydrolasou .....	80
5.5.5.3	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech <sup>TM</sup> .....	83
5.5.5.4	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v membránách E.coli (Bactosomech) .....	85
5.5.5.5	Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidským cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou, cytochromem b <sub>5</sub> a NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasou .....	87
5.6	Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 .....	89
6	Diskuze .....	93
7	Závěr .....	99
	Seznam použitých zkratk .....	103
	Citovaná literatura .....	105
	Přílohy .....	123

# Abstrakt

Environmentální polutant benzo[a]pyren (BaP) je prokazatelným lidským karcinogenem, který se po aktivaci cytochromy P450 (CYP) kovalentně váže na DNA. V rámci dizertační práce byl studován vliv jednotlivých složek systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO), systému lokalizovanému v membráně endoplasmatického retikula, na metabolismus benzo[a]pyrenu a na tvorbu aduktů BaP s DNA. Zaměřili jsme se především na porovnání vlivu cyt b<sub>5</sub> na tento metabolismus a potenciál cyt b<sub>5</sub> sloužit jako donor elektronů v rámci reakčního cyklu cytochromu P450 1A1. Tento vliv byl studován jednak z pohledu tvorby metabolitů BaP, a jednak z pohledu tvorby jeho aduktů s DNA. Byl také studován vliv dvou expresních systémů pro cytochrom P450 1A1 (prokaryotický a eukaryotický), na jeho účinnost v metabolismu BaP.

Vliv cyt b<sub>5</sub> na účinnost monooxygenasového systému byl studován i s další cizorodou látkou, rostlinným alkaloidem ellipticinem, jenž vykazuje protinádorové účinky. Jeho protinádorový efekt, stejně jako vedlejší účinky, závisí na jeho metabolické aktivaci cytochromy P450. Významný z tohoto hlediska je zejména CYP3A4. Ten byl proto použit i v našich experimentech.

Dále byla v práci studována vhodnost laboratorního potkana sloužit jako model metabolického osudu BaP v lidském organismu.

Při studiu metabolismu obou testovaných látek byla k separaci metabolitů použita vysokoúčinná chromatografie (HPLC). Aduktů s DNA vzniklé aktivací BaP byly kvantifikovány metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“.

Ze získaných výsledků sledujících potenciál potkana sloužit jako model metabolického osudu BaP v lidském organismu je zřejmé, že lidské a potkaní jaterní mikrosomy přeměňují BaP na téměř analogické metabolity, s výjimkou tvorby BaP-9-olu, který v případě lidských mikrosomů nebyl tvořen. Metabolity generované potkaním CYP1A1 se od metabolitů tvořených lidským CYP1A1 liší také tvorbou BaP-4,5-dihydrodiolu v potkaním systému. Ostatní metabolity jsou pro enzymy obou organismů shodné. To naznačuje vhodnost laboratorního potkana jako modelového organismu pro studium metabolického osudu BaP u člověka. Enzym epoxidhydrolasa je esenciální pro tvorbu dihydrodiolů BaP a jednoho ze dvou majoritních aduktů tvořených aktivací BaP cytochromem P450 1A1 s DNA. Její absence v prokaryotním expresním systému pro CYP1A1 (Bactosomech) limitovala použití tohoto systému pro studium metabolismu BaP oproti eukaryotnímu expresnímu systému pro tento enzym (Supersomy<sup>TM</sup>). Cyt b<sub>5</sub> stimuloval tvorbu metabolitů BaP katalyzovanou CYP1A1 i aduktů BaP s DNA po aktivaci těmito enzymy. Výsledky získané v dizertační práci prokazují, že redukci CYP1A1 v jeho reakčním cyklu, při kterém je oxidován BaP, může poskytovat elektrony nejen systém NADPH a NADPH:CYP reductasy, ale i systém NADH, NADH: cytochrom b<sub>5</sub> reductasy a cytochromu b<sub>5</sub>. A to v obou redukčních krocích.

Schopnost cyt b<sub>5</sub> poskytovat oba elektrony cytochromu P450 (CYP3A4) byla pozorována i při studiu vlivu cyt b<sub>5</sub> na metabolismus ellipticinu.

# Abstract

An environmental pollutant and a human carcinogen benzo[a]pyrene (BaP) is after its activation with cytochrome P450 (CYP) able to covalently bind to DNA. In the thesis, one of the target was to investigate an influence of individual components of mixed function monooxygenase (MFO) system on metabolism of benzo[a]pyrene and generation of adducts of activated BaP with DNA. The study was particularly focused to increase our knowledge on the effect of cyt b<sub>5</sub> on metabolism of BaP by cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and its potential to serve as a donor of electrons during the reaction cycle of this cytochrome P450. The effect of cyt b<sub>5</sub> on generation of BaP metabolites and adducts of BaP with DNA was investigated. In addition the effect of two different expression systems for cytochrome P450 1A1 (prokaryotic and eukaryotic) was also studied.

The influence of cyt b<sub>5</sub> on oxidation another xenobiotic compound, a plant alkaloid ellipticine that exhibit antitumor activities, was also investigated. Its pharmacological efficiency, as well as side effects depends on its metabolic activation by cytochrome P450. CYP3A4 is very important for ellipticine activation and therefore this enzyme was used in our experiments.

Furthermore, a suitability of rat as a model organism mimicking the metabolic fate of BaP in human was studied.

High performance liquid chromatography (HPLC) was used for separation of metabolites of both compounds. DNA adducts generated by BaP activated by CYPs were analysed by the “<sup>32</sup>P-postlabeling” method.

The results found in a study investigating the potential of rats to serve as a model organism mimicking a metabolic fate of BaP in humans indicate that human and rat microsomes generate almost the same metabolites, with the only exception of a metabolite BaP-9-ol. This metabolite was not formed by human microsomes. Metabolites generated by rat CYP1A1 differ from metabolites generated by human CYP1A1 also by formation of BaP-4,5-dihydrodiol. This metabolite is not formed by human CYP1A1. Other BaP metabolites generated by rat and human CYP1A1 are identical. This finding indicates that rat is a suitable model mimicking metabolism of BaP in human. Epoxide hydrolase was shown to be the essential enzyme for generation of dihydrodiols of BaP and one of the BaP-DNA adducts. Its lack in a prokaryotic expression system for CYP1A1 (Bactosomes) limited this system to be used for a study of the metabolic fate of BaP and preferred the eukaryotic system expressing CYP1A1 (Supersomes<sup>TM</sup>). Cyt b<sub>5</sub> stimulates generation of BaP metabolites and BaP-DNA adduct formation by rat and human CYP1A1. The results found in thesis show that the system of human CYP1A1, NADH, NADH:cytochrome b<sub>5</sub> reductase and cytochrome b<sub>5</sub> is able to metabolize BaP and to generate BaP-DNA adducts. They also demonstrate that NADH in this system can act as a sole electron donor both for the first and the second reduction of CYP1A1 during oxidative activation of BaP *in vitro*.

The ability of cyt b<sub>5</sub> donates both electrons to CYP enzyme was also observed in oxidation of ellipticine by human CYP3A4.



# 1 Úvod

V České republice žije přes 10,5 milionů obyvatel (1). Pro jejich potřebu bylo v roce 2013 distribuováno 268 milionů balení léčiv. Dohled nad léčivy z pohledu jejich registrace, nežádoucích efektů, či klinických testů spadá do kompetence Státního ústavu pro kontrolu léčiv (2). Ten v roce 2013 posuzoval 535 žádostí o novou registraci, 655 žádostí o prodloužení registrace a 413 žádostí spojených s klinickým testováním. Většina žádostí byla podána pro povolení III fáze klinického testování (3). V rámci klinických testů se musí ověřit bezpečnost a účinnost léčivého přípravku. Především se musí zjistit klinické, farmakologické a farmakodynamické účinky a stanovit nežádoucí účinky (2). Pro stanovení všech těchto účinků je potřeba znát metabolický osud léčiva. Léčivo může být enzymově přeměňováno jednak na méně aktivní, či dokonce neaktivní formu, a jednak na formu aktivnější. U některých léčiv je dokonce pro jejich plnohodnotný účinek enzymová aktivace nutná.

Enzymy, které jsou zodpovědné za přeměnu léčiv, jsou současně zodpovědné i za přeměnu dalších cizorodých látek (xenobiotik). Cílem je přeměnit xenobiotikum tak, aby byla usnadněna jeho eliminace z organismu. Bohužel jsou však některé přeměny spojeny se zvýšením toxického efektu, a tím i větším poškozením organismu.

Z obou výše popsaných důvodů je potřeba znát mechanismus, kterým jednotlivé enzymy při aktivaci popřípadě deaktivaci působí. Předkládaná dizertační práce je zaměřena především na poznání oxidace jedné z cizorodých látek vykazujících toxické karcinogenní účinky, benzo[a]pyrenu. V práci byl vliv jednotlivých složek biotransformačního enzymového systému lokalizovaného v membránách endoplasmatického retikula na oxidaci benzo[a]pyrenu. Dalším cílem bylo studium potenciálu laboratorních potkanů sloužit jako modelový organismus pro studium metabolismu benzo[a]pyrenu v lidském organismu. Druhou látkou, jejíž metabolická přeměna byla v předkládané práci studována, bylo protinádorové agens ellipticin.



## **2 Přehled literatury**

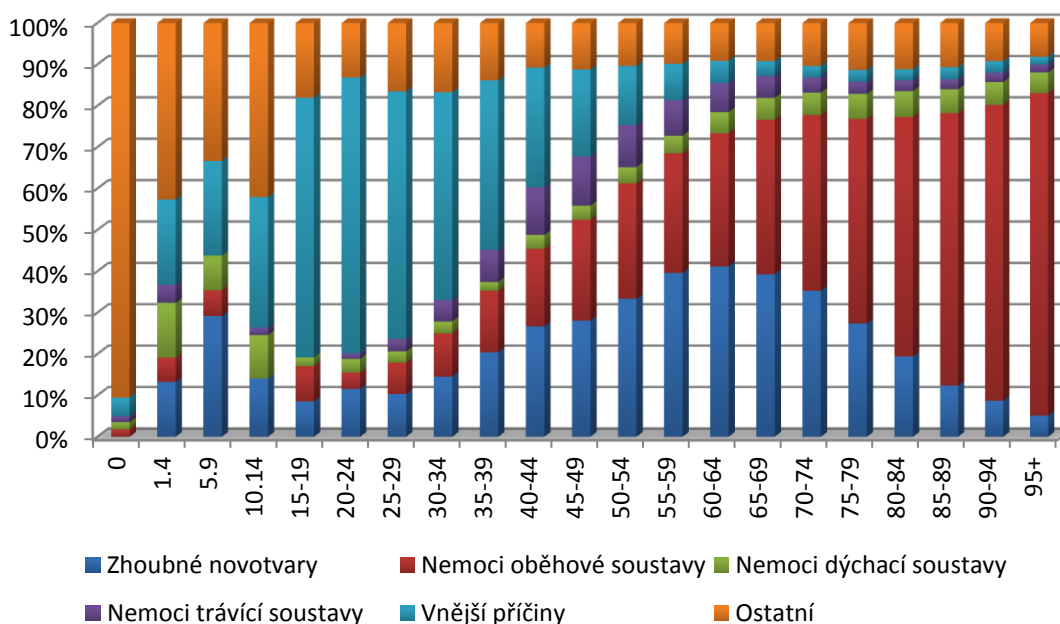
## 2.1 Karcinogenese

Kancerogenese či karcinogenese je proces vzniku nádoru. Jedná se o složitý multifázový proces. První fáze (iniciace) je spojena se změnou genetické informace, kdy dochází k narušení regulačního mechanismu dělení a diferenciaci buňky. Tato změna je základní podmínkou vývoje nádorového procesu. Další fáze se nazývá promoce, po níž následuje fáze progresu. V ní nastává změna z již částečně kontrolovaného růstu na růst plně nekontrolovaný (4; 5).

Podle schopnosti metastazovat pak rozlišujeme dva typy nádorů (4):

1. Nádory nezhoubné (benigní) – nepronikají do jiné tkáně ani nemetastazují
2. Nádory zhoubné (maligní) – pronikají do jiných tkání a metastazují

V České republice umírá každým rokem přes 100 tisíc lidí. Ačkoliv je toto množství v průběhu času relativně stabilní, klesá od 80. let 20. století standardizovaná úmrtnost. Ta mezi lety 1970-2012 klesla o 45,5 % u mužů a o 47,7 % u žen. V souvislosti s poklesem standardizované úmrtnosti můžeme zároveň pozorovat nárůst střední délky života při narození (6). Ve skupině lidí do 45 let jsou hlavním důvodem úmrtí vnější příčiny. Po dosažení tohoto věku se hlavní příčinou stávají zhoubné nádory. Ty zůstávají na prvním místě až do věku 70 let, kdy je nahrazují nemoci oběhové soustavy (Obrázek 1). Ty jsou dlouhodobě hlavní příčinou úmrtí nejen v České republice, ale i v mnoha dalších státech Evropy. Na druhém místě se pak nacházejí právě zhoubné novotvary (1; 6).



**Obrázek 1** Struktura zemřelých podle příčin a věku v České republice v roce 2012. Zdroj: (6)

V průběhu roku 2010 bylo do národního onkologického registru ČR nově nahlášeno více jak 82 tisíc případů zhoubných novotvarů (ZN) a novotvarů *in situ*, z toho téměř 43 tisíc u mužů. Oproti předchozímu roku to představuje zhruba 4% nárůst. Rostoucí počet hlášených případů se dává do souvislosti se stárnutím populace a zlepšením diagnostických metod. Vzrůst incidence, který můžeme pozorovat dlouhodobě, však od druhé poloviny 90. let silně kontrastuje s poklesem standardizované úmrtnosti. Tento pokles můžeme opět vysvětlit především zlepšením diagnostických metod, které umožňují odhalit zhoubný novotvar v dřívějším stadiu, a kvalitnější lékařskou péčí (7).

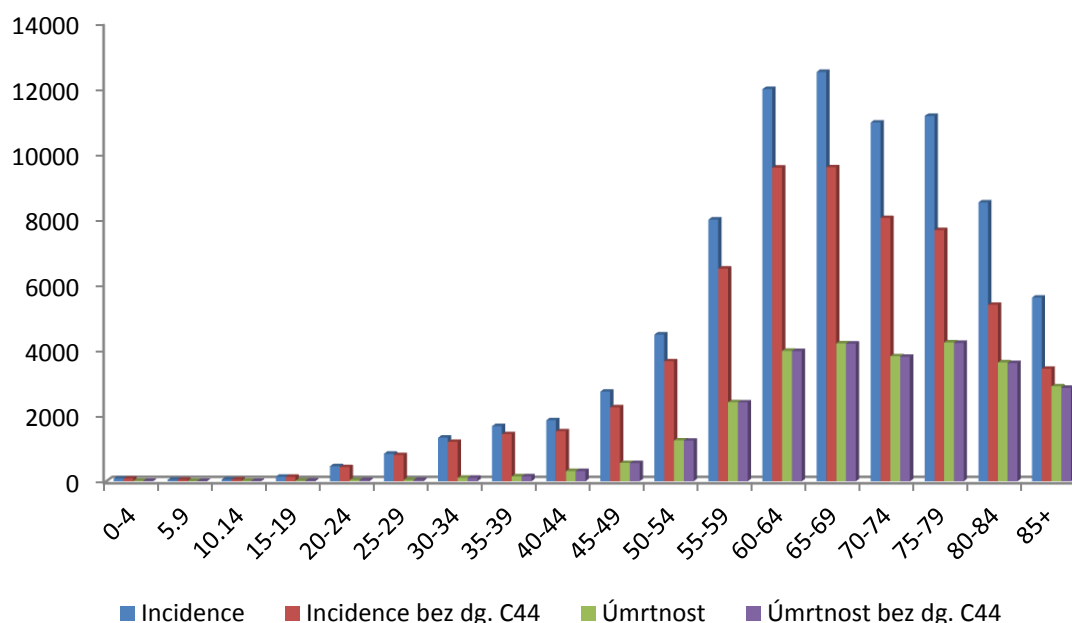
Nejčastějším diagnostikovaným onemocněním je „jiný zhoubný novotvar kůže“ diagnóza C44, který představuje čtvrtinu všech hlášených novotvarů. Vzhledem k velmi nízké úmrtnosti je však často z analýz vyřazován, aby nezkresloval informace o onkologických onemocněních jako celku. Další, hojně se vyskytující diagnózy, představují zhoubný novotvar kolorekta (C18-C21), zhoubný novotvar průdušnice, průdušky a plic (C33-C34), zhoubný novotvar prsu (C50) a prostaty (C61). Tyto diagnózy představují zhruba třetinu nových případů zhoubných novotvarů (7).

Proces vzniku nádoru souvisí s nepříznivou kombinací vnitřních (dědičnost a věk) a vnějších faktorů (faktory životního prostředí). Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny

(IARC) se sídlem v Lyonu klasifikuje faktory životního prostředí, které mohou zvýšit riziko rakoviny, do čtyř skupin (8):

- ❖ 1. Karcinogeny pro člověka 114 faktorů
- ❖ 2A. Pravděpodobně karcinogenní pro člověka 69 faktorů
- ❖ 2B. Potenciálně karcinogenní pro člověka 283 faktorů
- ❖ 3. Neklasifikované jako karcinogenní pro člověka 504 faktorů
- ❖ 4. Pravděpodobně nekarcinogenní pro člověka 1 faktor

Mezi těmito faktory můžeme nalézt chemikálie, komplexní směsi, fyzikální činnosti, biologické činnosti i faktory životního stylu (8; 9). Právě faktory životního stylu jako jsou kouření, obezita či konzumace alkoholu mohou výrazně snížit riziko rakoviny, pokud se těmito rizikovými faktory vyhneme (10). Velmi důležitým faktorem, který souvisí s procesem vzniku nádoru, je věk (Obrázek 2). S věkem se totiž kumuluje působení vnějších mutagenních faktorů a zároveň klesají přirozené obranné mechanismy.



**Obrázek 2** Incidence a úmrtnost na nádorové onemocnění v České republice podle věkových skupin v roce 2010. Zdroj: (7).

Jak je výše uvedeno, je proces karcinogeneze složitý, několikastupňový proces, v jehož rámci dochází ke ztrátě kontroly buněčného cyklu a k nekontrolovanému dělení. Za

normálních okolností je dělení buňky přísně regulovaný proces. Ztráta této regulace je často spojena s mutacemi v protoonkogenech a tumorových supresorových genech (4; 5; 11). Protoonkogeny byly původně identifikovány jako přenesené onkogeny akutních transformujících retrovirů (12). Jedná se o geny zodpovědné za tvorbu růstových faktorů, jejich receptorů, proteinkinás a transkripčních faktorů (Tabulka 1) (13; 14; 12). Mutací genu, jeho amplifikací, či přeuspořádáním se pak následně mění v onkogeny (15; 12). Tumorové supresorové geny představují druhou skupinu regulačních genů. Jsou zodpovědné za potlačení proliferace a udržování klidového stádia (4). Typickým příkladem je gen p53, který je mutován v celé řadě lidských nádorů. Působí několika mechanismy, včetně vazby na transkripční faktory či na změny genové exprese (16; 17).

**Tabulka 1** Biologické funkce buněčných protoonkogenů. Zdroj: (12)

	Protoonkogeny
Růstové faktory	<i>sis, int-2, hst-1</i>
Receptory růstových faktorů s tyrosin-kinázovou aktivitou	<i>erb B, fms, met, neu, ros, trk, ret</i>
Tyrosinkinasy	<i>src, abl, lck, yes</i>
Regulační proteiny v signální transdukci	<i>Ha-ras, K-ras, N-ras, gsp, gip</i>
Serin/threonin kinasy	<i>mos, raf</i>
Jaderné regulační proteiny	<i>myc, myb, fox, c-jun, rel</i>

## 2.2 Biotransformace xenobiotik

Všechny organismy na Zemi jsou v neustálém kontaktu se svým okolím. Jsou tak vystaveny cizím sloučeninám, ať již průmyslovým nebo přírodním, jako jsou např. léky, pesticidy či alkaloidy. Aby mohly organismy v takovémto prostředí přežít, musí udržovat homeostázu. Biotransformace xenobiotik představuje mechanismus udržení homeostázy během expozice cizorodým molekulám (xenobiotikům). Tato biotransformace je prováděna omezeným počtem enzymů se širokou substrátovou specifitou (18). K nejvýznamnějším enzymům zahrnutých v metabolismu xenobiotik patří systémy monooxygenas obsahující cytochromy P450, dále pak flavinové monooxygenasy, hydrolasy, glukuronosyltransferasy a sulfotransferasy (19). Vlastnosti, které umožňují xenobiotikům absorpci, jsou zároveň i ty, které jsou překážkou při jejich eliminaci. Biotransformace proto slouží k překonání této překážky, tedy snížení lipofilního charakteru, a tím ke zvýšení rozpustnosti ve vodě. Bez biotransformace by eliminace a exkrece cizorodých látek mohla být natolik nízká, že by mohlo dojít k zahlcení organismu touto látkou a následně i k jeho smrti (18). Nejdůležitějším orgánem z pohledu biotransformace jsou játra (19).

Reakce katalyzující biotransformaci xenobiotik se dají rozdělit do dvou skupin (18):

- ❖ Reakce I. fáze – zahrnují oxidace, redukce a hydrolýzy. Během těchto reakcí dochází k zavedení nebo odkrytí funkčních skupin (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH či -COOH). Výsledkem je částečné zvýšení hydrofility xenobiotika.
- ❖ Reakce II. fáze – tyto reakce dále zvyšují hydrofilitu xenobiotik. Zahrnují glukuronidace, sulfatace, acetylace, metylace či konjugace s glutathionem. Tyto reakce mohou navazovat na reakce I. fáze, ačkoliv v některých případech reakce I. fáze nemusí být nutné.

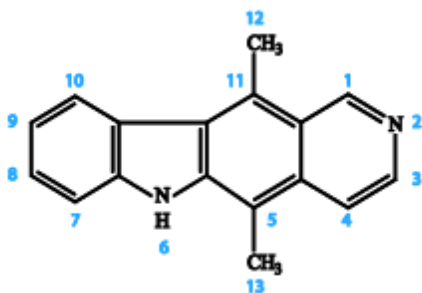
### 2.2.1 Biotransformace léčiv

Léky je možné rozdělit na základě jejich rozpustnosti ve vodě a permeability přes membrány do čtyř kategorií. Biotransformace představuje hlavní cestu eliminace u prvních dvou tříd léčiv. Léky z třetí a čtvrté třídy jsou naopak eliminovány nezměněné (20). Přeměna léčiv (biotransformace) neslouží jen k eliminaci, a tím snížení množství léčiva, ale využívá se i k aktivaci, kdy v důsledku metabolismu dochází k přeměně původně neúčinného léčiva na účinnější formu. Mnohé léky jsou účinné jen pro 50-75 % pacientů. Typickými příklady jsou léky používané k léčení astmatu nebo cukrovky. Jsou však i léčiva s ještě mnohem nižší

efektivitou. Například v oblasti léčby onkologických onemocnění je efektivita jen 25 % (21). Rozdíly mezi pacienty jsou spojeny s mnoha faktory zahrnujícími faktory životního prostředí, či faktory genetické (22). Geneticky dané rozdíly v expresi enzymů metabolizujících léky umožňují rozlišit čtyři fenotypy. Těmito typy jsou ultrarychlý, rychlý, střední a pomalý. Zatímco ultrarychlý typ se vyznačuje velmi rychlou schopností přeměňovat léčiva, a tím snižovat resp. zvyšovat jejich účinek, u pomalého typu je tomu přesně naopak. Pro bezpečnou aplikaci léčiva je tedy potřeba zjistit, který fenotyp se vyskytuje u jednotlivých pacientů. (20). Méně než polovina podané orální dávky je u 40 % běžně užívaných léků dostupná kvůli omezené absorpci a/nebo průchodu játry (22). Cytochromy P450 podrodiny 3A jsou ze všech enzymů metabolizujících léčiva nejdůležitější. Vyskytují se v játrech i v epitelu tenkého střeva, kde mohou představovat až téměř 50 % všech cytochromů P450. Dalším důvodem jejich velkého významu je jejich široká substrátová specifita. Je dokonce pravděpodobné, že participují na metabolismu více jak poloviny terapeuticky účinných látek, které podstupují změnu v rámci oxidace (22).

### **2.2.1.1 Ellipticin a jeho biotransformace**

Ellipticin (Obrázek 3), 5,11-dimetyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol, je rostlinný alkaloid, který byl poprvé izolován v roce 1959 z rostliny *Ochrosia elliptica* čeledi Toješťovitě (Apocynaceae) (23). Spolu s některými svými polárnějšími deriváty vykazuje protinádorové účinky. Ty lze pozorovat vůči nádorům mozku, prsu, tlustého střeva, či plic. 9-hydroxyellipticin byl díky svým protinádorovým vlastnostem použit při léčbě akutní myeloidní leukémie (24). Kromě protinádorových vlastností byl studován i potenciál ellipticinu při léčbě AIDS, neboť u něj byly pozorovány anti-HIV vlastnosti (25; 26). Významnou vlastností hovořící pro použití ellipticinu jako léčiva jsou jeho relativně nízké vedlejší účinky a prakticky nulová jaterní toxicita. Vedlejší účinky zahrnují asi u třetiny pacientů nevolnost a zvracení, u méně než 10 % pacientů se setkáme s hypertenzí. Dalšími vedlejšími účinky jsou sucho v ústech a mykóza jazyka a jícnu (u méně jak 20 % pacientů) a svalové křeče u jedné třetiny pacientů. Většina pacientů po třech měsících léčby také trpěla únavou (27). Jistou nevýhodou však je jeho mutagenita, která u něj byla pozorována (28).



Obrázek 3 Struktura ellipticinu

Ellipticin může v cílové tkáni působit několika mechanismy. Mezi hlavní mechanismy patří:

1. Interkalace do DNA – díky interkalaci dochází k zvýšení superhelikální hustoty DNA (29; 30; 31)
2. Inhibice topoisomerasy II – ellipticin stimuluje reverzibilní tvorbu zlomů v DNA, kdy dochází ke kovalentní vazbě topoisomerasy na 5'-konec štěpené DNA. Ellipticin se váže nejen na DNA, ale i na topoisomerasu, a to bez ohledu na přítomnost molekuly DNA (32; 33)
3. Ovlivnění proteinu p53 – dochází k nárůstu exprese tohoto proteinu, čímž dochází k zvýšení indukce apoptosy (34; 35). Ellipticin také obnovuje transkripční funkci mutantních p53, což vyústí v indukci exprese proteinů genů citlivých na p53 (36; 37). V neposlední řadě ellipticin také inhibuje fosforylaci proteinu p53 (38)
4. Tvorba kovalentních aduktů s DNA (39; 40)

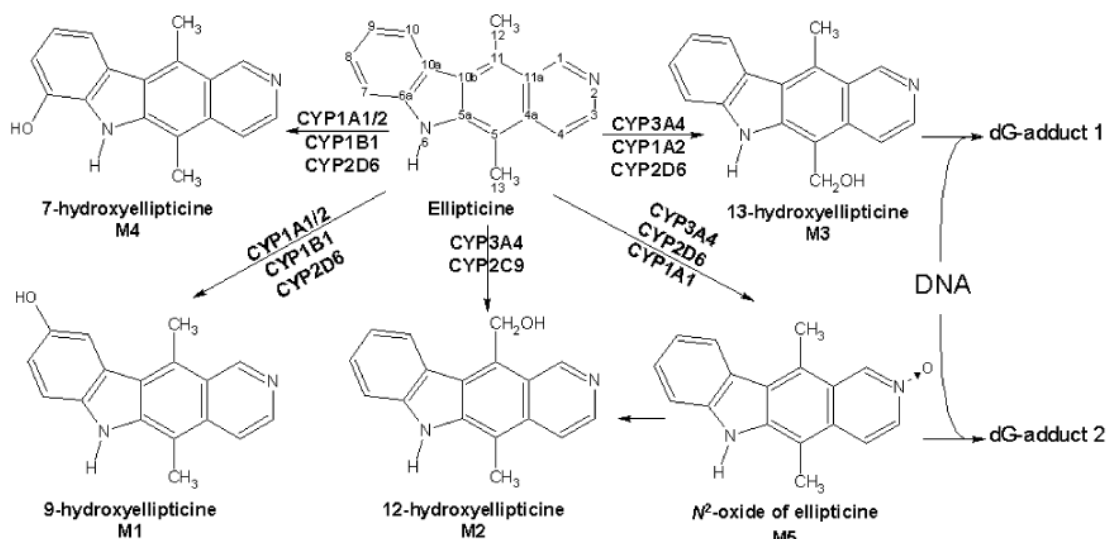
Ellipticin je také schopen spolu s některými svými deriváty interagovat s membránovými lipidy (41; 42; 43). Projevuje se u nich i schopnost inhibovat cytochromy P450 (44; 45; 46; 47). Ellipticin zároveň vykazuje schopnost indukovat expresi cytochromů P450. Konkrétně se jedná o induktor CYP1A1/2 (48; 49). V případě 9-hydroxyellipticinu byl také pozorován jeho inhibiční efekt vůči telomerase (50).

### 2.2.1.2 Tvorba kovalentních aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA

Většina z výše uvedených mechanismů vysvětlujících působení ellipticinu je založena na nescifickém účinku ellipticinu. To je však v silném kontrastu se specifickým účinkem,



který ellipticin v cílové tkáni organismu vykazuje. Tento specifický účinek může být dán rozdílnou enzymovou výbavou organismu. Enzymy schopné biotransformovat ellipticin jsou totiž v různých tkáních zastoupeny v různých množstvích. Mezi enzymy schopné biotransformovat ellipticin patří cytochromy P450 a peroxidasy (51; 52; 53; 54; 55; 56; 39; 40). Cytochromy P450 jsou schopny ellipticin přeměňovat za vzniku až pěti metabolitů (Obrázek 4) (7-hydroxy-; 9-hydroxy-; 12-hydroxy-; 13-hydroxy-ellipticin a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu) (51; 57; 58; 40; 39). První dva ze zmiňovaných metabolitů slouží k detoxifikaci, zbylé tři metabolity představují aktivnější formy a jsou schopny tvořit kovalentní adukty s DNA (53; 52; 59; 39; 40). Majoritní je tvorba dvou aduktů odvozených z 12- resp. 13-hydroxyellipticinu. N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu je pomocí Polonowskiho přesmyku přeměňován na 12-hydroxyellipticin, a tak rovněž přispívá k tvorbě kovalentních aduktů (57; 40; 39). Jeho vznik navíc není podmíněn přítomností biotransformačních enzymů, ale vzniká i oxidací ellipticinu vzdušným kyslíkem (52). Deoxyguanosin je cílovou bází, na kterou se deriváty ellipticinu kovalentně vážou (51; 40; 39). Tvorba těchto kovalentních aduktů je pozorována jak v experimentech *in vitro*, tak *in vivo* (52; 53; 60; 59; 40; 39). Nejdůležitějším lidským jaterním cytochromem P450 zodpovědným za oxidaci ellipticinu je CYP3A4 (61; 52; 39; 40).



Obrázek 4 Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450. Zdroj: Stiborová (51; 57)

## 2.2.2 Biotransformace karcinogenů

Ze 116 faktorů, které IARC eviduje jako prokázané lidské karcinogeny (8), jsou pouze některé, např. radioaktivní záření, schopny přímo vyvolat změny, vedoucí k iniciaci

nádorového procesu. U zbylých, jmenovitě zbylých chemických karcinogenů je nezbytné, aby došlo k jejich metabolické přeměně na aktivnější látku. Takovéto karcinogeny tak můžeme označit za prokarcinogeny a jejich aktivnější formy za „ultimativní“ neboli koncové karcinogeny. Příkladem takového karcinogenu je třeba benzo[a]pyren, 7,12-dimethylbenzanthracen či aflatoxin B1 (62; 63).

### 2.2.2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou planární molekuly obsahující alespoň dva aromatické kruhy. Vznikají jak přirozenou cestou při požárech či sopečné činnosti, tak i činností člověka v průmyslových procesech. IARC eviduje několik zástupců jako prokazatelných karcinogenů (8). Seznam některých těchto prokazatelných karcinogenů evidovaných IARC nalezneme v Tabulka 2. Vznik rakoviny vlivem polycyklických aromatických uhlovodíků je spojen s tvorbou stabilních kovalentních aduktů s DNA (64). Kromě karcinogenních účinků jsou PAH spojeny také s reprodukční toxicitou, kardiovaskulární toxicitou, potlačováním imunitního systému, či jaterní toxicitou.

**Tabulka 2** Příklady některých PAH a jejich zařazení do skupin na základě klasifikace IARC. Zdroj: (8)

PAH	Skupina	PAH	Skupina	PAH	Skupina
Benzo[a]pyren	1	Benz[a]anthracen	2B	Triphenylen	3
Dibenzo[a,l]pyren	2A	Chrysene	2B	Coronen	3
Dibenz[a,h]anthracen	2A	Anthracen	3	Phenanthren	3

#### 2.2.2.1.1 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren ( $C_{20}H_{20}$ ) (BaP) je typickým zástupcem polycyklických aromatických uhlovodíků. Jeho výskyt v přírodě souvisí např. s tektonickou činností, požáry lesů či průmyslovou výrobou. Jedná se také o jednu ze složek cigaretového kouře. Protože se jedná o prokazatelný lidský karcinogen (8), je jeho koncentrace v ovzduší sledována mnoha institucemi. Roční limitní hodnota je  $1 \text{ ng/m}^3$ , ale byla bohužel překročena na 17,4 % plochy území České republiky. Nejvyšších hodnot je dosahováno v Moravskoslezském kraji na Ostravsku a Karvinsku. Je odhadováno, že více než 50 % obyvatel ČR je vystaveno této nadlimitní koncentraci BaP. Koncentrace v ovzduší se cyklicky mění v průběhu roku a dosahuje maximálních hodnot v zimních měsících v důsledku topné sezony, což souvisí s dalším zdrojem BaP, kterým je nedokonalé spalování paliv (65).

Benzo[a]pyren je enzymově přeměňován na celou řadu metabolitů, zahrnujících tvorbu chinonů, dihydrodiolů a fenolů (66; 67; 68; 69; 70). Hlavním enzymem účastnícím se metabolické přeměny BaP je cytochrom P450 1A1 (CYP1A1). Na přeměně BaP se kromě CYP1A1 podílí i jiné cytochromy P450. Významný je především CYP1B1 (71). Z dalších cytochromů je to např. CYP1A2 (71). Pro tvorbu dihydrodiolů je pak nezbytná přítomnost ještě dalšího enzymu, epoxidhydrolasy. Tím jak vzrůstá množství dihydrodiolů, klesá zároveň množství chinonů a fenolů (66). Mnohé z benzo[a]pyrenových metabolitů vykazují mutagenní účinek vůči řadě mikroorganismů, jako je např. *Salmonella typhimurium*. Přidání epoxidhydrolasy k inkubačním směsím vede k snížení tohoto mutagenního účinku, ale nedokáže jej plně odstranit (72). Benzo[a]pyren je také po metabolické aktivaci schopen se kovalentně vázat na DNA (73). Metabolity BaP BaP-7,8-dihydrodiol a BaP-7,8-diol-9,10-epoxid, v němž je OH-skupina v trans poloze vůči epoxidové skupině (diol-epoxid 2), jsou mnohonásobně aktivnější než BaP při tvorbě adenomů plic u myši. Tyto výsledky naznačují, že diol-epoxid 2 je „ultimativním“ karcinogenem a BaP-7,8-dihydrodiol je karcinogenem „proximálním“ (74).

Benzo[a]pyren má kromě jiného vliv i na cyclooxygenasu 2 (COX-2). Konkrétně dochází k nárůstu exprese její mRNA. Indukce COX-2 je následně spojena s vyšší syntézou prostaglandinu E<sub>2</sub> (75).

## 2.3 Biotransformační enzymy

Biotransformační procesy probíhající v organismu jsou uskutečňovány pomocí celé řady enzymů. Ty můžeme rozdělit na enzymy I. fáze a na enzymy II. fáze analogicky s rozdělením biotransformačních reakcí. Enzymy první fáze biotransformace zahrnují oxidasy, reduktasy a hydrolasy. Enzymy druhé fáze zahrnují různé konjugační enzymy (76).

### 2.3.1 Monooxygenasový systém

Monooxygenasový systém, dříve označovaný jako systém oxidas se smíšenou funkcí, katalyzuje reakce, při nichž se jeden atom biatomické molekuly kyslíku inkorporuje do substrátu a druhý atom je redukován na vodu. Monooxygenasy lze klasifikovat do dvou velkých skupin, a to na monooxygenasy obsahující cytochrom P450 a na flavinové monooxygenasy. Obě skupiny mají značný význam z toxikologického hlediska (19; 77).

#### 2.3.1.1 Monooxygenasy obsahující cytochrom P450

Monooxygenasový systém závislý na cytochromu P450 je systém vícesložkový. Kromě cytochromu P450, jako terminální oxidasy, jsou dalšími nezbytnými složkami NADPH:cytochrom P450 reduktasa a membránové lipidy (19; 77; 78; 79). Dalšími enzymy, se kterými se můžeme v rámci tohoto systému setkat, jsou cytochrom  $b_5$  a jeho reduktasa, NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa (19; 77).

##### 2.3.1.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) představují velmi širokou a evolučně starou skupinu enzymů, které byly nalezeny v různých organismech od bakterií, přes rostliny až k člověku. Z jediného původního genu se v průběhu času vyvinul velký počet odlišných genů. Nejstarší cytochromy P450 sloužily k metabolismu endogenních hydrofobních látek, jsou steroidy a mastné kyseliny. K oddělení enzymů metabolizujících endogenní substráty od enzymů metabolizujících cizorodé látky došlo přibližně před 900 miliony let (80; 81). Poprvé byly pozorovány v padesátých letech 20. století v mikrosomech, když byla zjištěna přítomnost pigmentu schopného vázat v redukovaném stavu oxid uhelnatý. Na základě charakteristického absorpčního maxima tohoto komplexu při 450 nm a jeho hemoproteinové povaze byl nazván cytochrom P450 (82; 83). Cytochrom P450 není ovšem typickým cytochromem, ale jedná se

o hemoprotein, ve kterém je jeden z ligandů iontu železa thiolátová síra (84; 85). Pro tento charakteristický rys je označován jako hemthiolátový protein. Šestáým ligandem je molekula vody (86). Prokaryotní formy tohoto enzymu jsou rozpustné proteiny, v eukaryotních buňkách se jedná o membránově vázané proteiny, které se vyskytují v membránách mitochondrií a endoplasmatického retikula (80; 87). Většina cytochromů P450 je v endoplasmatickém retikulu, mitochondriální enzymy představují jen asi 10 % (88). 29 aminokyselin na N-konci je zodpovědných za zachycení cytochromu P450 v membráně endoplasmatického retikula (89). Mikrosomální cytochromy P450 můžeme dále rozlišit na dvě skupiny podle povahy substrátů, které oxidují. První skupinou substrátů jsou exogenní látky. Druhou skupinu pak představují substráty endogenní (80).

Vzhledem k velkému počtu cytochromů P450 jsou tyto enzymy děleny do genetických rodin a podrodin na základě sekvenční homologie. Proteiny stejné rodiny vykazují více jak 40 % identitu, i když existuje několik výjimek. Savčí sekvence v rámci jedné podrodiny vykazují více jak 55 % podobnost. Při pojmenovávání se používá zkratka CYP (**cytochrome P450**) a číselný kód např. CYP1A1. První číslice představuje rodinu cytochromů P450. Podrodina je označena pomocí písmene. Poslední číslice pak představuje jednotlivé izoenzymy (90). U člověka bylo identifikováno 57 genů kódujících cytochromy P450 a 58 pseudogenů (91).

Z 57 genů, které nalezneme u člověka, je patnáct zahrnuto v metabolismu xenobiotik, čtrnáct se primárně účastní metabolismu sterolů, šest oxiduje vitamíny a devět je zahrnuto v metabolismu mastných kyselin a ekosanoidů (91) (Tabulka 3).

**Tabulka 3** Klasifikace lidských cytochromů P450 na základě hlavních substrátových tříd a substrátů, které přeměňují. Zdroj: (91)

Steroly	1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1
Xenobiotika	1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7
Mastné kyseliny	2J2, 4A11, 4B1, 4F12
Ekosanoidy	4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1
Vitamíny	2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1
Neznámé substráty	2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1, 20A1, 27C1

Cytochromy P450 je možné rekombinantně exprimovat v několika různých organismech a typech buněk (92):

- ❖ Bakterie – bakterie *E. coli* je nejpoužívanější expresní systém pro expresi cytochromů P450. Výhodou oproti dalším systémům je snadná manipulace, kultivace a především absence vlastních cytochromů P450.
- ❖ Kvasinky – expresní hladiny jsou nižší než v bakteriích, protože se však jedná o eukaryotní buňky, je proces exprese a modifikace podobný vyšším eukaryotům.
- ❖ Hmyzí buňky – navzdory obvykle vysokým technickým požadavkům a ceně je možné dosáhnout mimořádně vysoké expresní hladiny. Určitým nedostatkem je nízká přirozená hladina NADPH:cytochrom P450 reduktasy, která musí být z tohoto důvodu „koexprimována.“
- ❖ Savčí buňky – odpadá potřeba „koexprimovat“ reduktasu, ale stále zůstává problém s vysokými technickými požadavky. Dalším nedostatkem je nízká expresní hladina enzymů a dlouhé kultivační časy.

Rekombinantní techniky umožnily studium aktivit specifických forem cytochromů P450 při současné absenci dalších forem, velkokapacitní produkci těchto enzymů pro strukturní studie, či vytváření bioreaktorů užívaných pro chemické syntézy a bioremediace (88).

Eukaryotní cytochromy P450 jsou na rozdíl od prokaryotních cytochromů P450 membránově vázané. Tato skutečnost omezovala po určitou dobu možnost rekombinantně připravovat eukaryotní formy v bakteriích. Tato nepříjemnost byla později překonána změnou sekvence cDNA. Obzvláště důležitá se ukázala oblast několika prvních kodonů (93). Alternativou ke změně enzymové sekvence je vytvoření fúzního proteinu za použití bakteriální signální sekvence. Především bakteriální sekvence „omp“ (outer membrane protein) se jeví jako velmi účinná. Enzymy vykazují aktivitu vůči substrátům, jsou úspěšně začleňovány do membrány a není potřeba měnit jejich nativní strukturu. Ta se pouze prodlouží o bakteriální signální sekvenci (94).

Vzhledem k tomu, že bakteriální buňky postrádají NADPH:cytochrom P450 reduktasu, je třeba ji v procesu rekombinantní exprese dodat. Reduktasa se v experimentech s CYP1B jeví účinnější, pokud je „koexprimována“ společně s cytochromem P450 než pokud je přidána až následovně. Při „koexpresi“ stačí pro plnou aktivitu i poměr mezi reduktasou a CYP menší

než 0,5. Pokud je NADPH:cytochrom P450 reduktasa přidávána až následně, je třeba až osmi molární nadbytek reduktasy (95). „Koexpresi“ je možné provést jedním ze tří způsobů. Zaprvé můžeme reduktasu a CYP exprimovat pod kontrolou dvou samostatných promotorů (96). Druhá možnost představuje využití pouze jednoho promotoru (97). Třetí možnost je reprezentována vytvořením fúzního proteinu (98).

#### 2.3.1.1.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný flavoprotein, který se účastní redukce cytochromů P450 (99; 100). Protože jedna forma CPR spolupracuje se všemi formami cytochromů P450, dochází k vzájemnému soutěžení CYP enzymů o tuto reduktasu (101). Flavoproteinová povaha enzymu souvisí s přítomností FAD a FMN (102; 103). Molekulová hmotnost enzymu je  $\approx 78$  kDa a obsahuje značné množství kyselých aminokyselin (104; 105). Právě kyselá aminokyseliny jsou zodpovědné za interakci s cytochromy P450 i s cytochromem c (cyt c) (106; 107). Kromě redukce cytochromů P450 je CPR za určitých okolností schopna redukovat cytochrom  $b_5$  (cyt  $b_5$ ) (108), přenést elektrony na elongasu během elongace mastných kyselin (109) a na cyt c (110). Přenos elektronů na cyt  $b_5$ , cyt c a cytochrom P450 je přímý a nezávisí na tvorbě superoxidového aniontu v průběhu reakčního cyklu cytochromu P450 (110).

CPR se skládá ze dvou funkčních domén. Menší, N-terminální doména (6 kDa), slouží k ukotvení v membráně endoplasmatického retikula (111). Větší doménu (72 kDa) je možné dále rozdělit na strukturní domény: FMN- a FAD-vazebné domény (112; 113), spojovací doménu a NADP-vázající doménu (113). FAD a FMN se vzájemně nepřekrývají, ale jsou vzájemně v kontaktu díky metylovým skupinám v polohách 7 a 8 izoalloxazinových kruhů (113). FMN je nezbytný pro přenos elektronu mezi reduktasou a cytochromy P450, cytochromem c a cytochromem  $b_5$  (110; 107). FAD-vazebná doména je zodpovědná za příjem elektronů z NADPH (110). CPR bez hydrofobní kotvy vykazuje aktivitu vůči cyt c a některým dalším arteficiálním elektronovým akceptorům, ale není již schopna přenášet elektrony na cytochrom P450. To souvisí se skutečností, že u membránově vázaných elektronových partnerů se uplatňují také hydrofobní interakce mezi membránovými doménami (113).

### 2.3.1.1.3 Cytochrom $b_5$

Cytochrom  $b_5$  je malý ( $\approx 17$  kDa), cylindrický membránový protein, který se skládá z šesti helixů a 5  $\beta$ -řetězců. Ty tvoří dvě domény, z nichž větší obsahuje hem a je lokalizována na cytosolární straně membrány. Menší doména je hydrofobní a slouží k ukotvení enzymu v membráně. Jedná se také o poměrně kyselý protein, neboť u savců 23 z jeho 134 aminokyselin představují aspartát a glutamát. Všech 23 aminokyselin je navíc plně konzervovaných (114). Primárně se cyt  $b_5$  účastní biosyntézy lipidů. Je důležitý při desaturacích a elongacích mastných kyselin, biosyntéze cholesterolu či plasmalogenů. Cytochrom  $b_5$  se také může účastnit reakčního cyklu cytochromů P450 (115).

Mechanismus působení cyt  $b_5$  v rámci reakčního cyklu cytochromů P450 se vysvětluje působením některého z následujících dějů:

- a) Rychlejší přísun druhého elektronu k cytochromu P450. Cytochrom P450 je jednoelektronový akceptor (116), reakční cyklus monooxygenasové reakce však vyžaduje dvě redukce. Elektrony pro druhou redukci může kromě NADPH:cytochrom P450 reduktasy poskytovat i cyt  $b_5$  (117; 118).
- b) Zlepšení propojení cytochromu P450 se substrátem. Dochází ke snížení rozpadu komplexu superoxidového anion radikálu, čímž cytochrom  $b_5$  zvyšuje tvorbu oxygenovaných produktů oproti tvorbě peroxidu vodíku. Předpokládá se, že tento efekt může souviset jednak s dříve zmiňovaným zrychlením přísunu druhého elektronu, a jednak se stabilizací komplexu oxycytochromu P450.
- c) Vznik komplexu schopného přijmout dva elektrony. Cyt  $b_5$  tvoří komplex s cytochromem P450, čímž vzniká dvouelektronový akceptor. Během jedné interakce s NADPH:cytochrom P450 reduktasou tak může daný komplex přijmout oba elektrony.
- d) Změna struktury cytochromu P450 vlivem vazby cyt  $b_5$ . Pro tento mechanismus působení hovoří skutečnost, že i apo-forma cytochromu  $b_5$ , tedy cyt  $b_5$  bez hemu, je schopna zvýšit enzymovou aktivitu cytochromů P450 (119)

### 2.3.1.1.4 NADH:cytochrom $b_5$ reduktasa

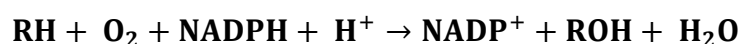
NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa (EC 1.6.2.2) je enzym o molekulové hmotnosti  $\approx 35$  kDa, který zprostředkovává přenos elektronů z NADH na cytochrom  $b_5$ . Jedná se o flavoprotein, o němž je známo, že existuje ve dvou formách, a to v membránově vázané a v solubilní formě.



Membránově vázaná forma se vyskytuje především v endoplasmatickém retikulu, kde se účastní metabolických transformací, takových jako desaturace a elongace mastných kyselin, biosyntéza cholesterolu a reakčního cyklu cytochromu P450. Solubilní forma se účastní redukce methemoglobinu na hemoglobin, přičemž vzniká alternativním „splicingem“, díky čemuž je původ zbytků 26-300 solubilního enzymu stejný jako membránově vázané formy enzymu. Obsahuje několik lysinů, které jsou nezbytné pro interakci s cyt b<sub>5</sub> (120). Tyto lysiny interagují komplementárně s pěti karboxylovými skupinami cyt b<sub>5</sub> (121). Skládá se ze dvou domén, flavin-vazebné domény a pyridin-nukleotid-vazebné domény. Pro vazbu FAD je nezbytný tyrosin (122). Pro efektivní rozpoznání NADH slouží hydroxylová skupina serinu a pozitivní náboj argininu (122).

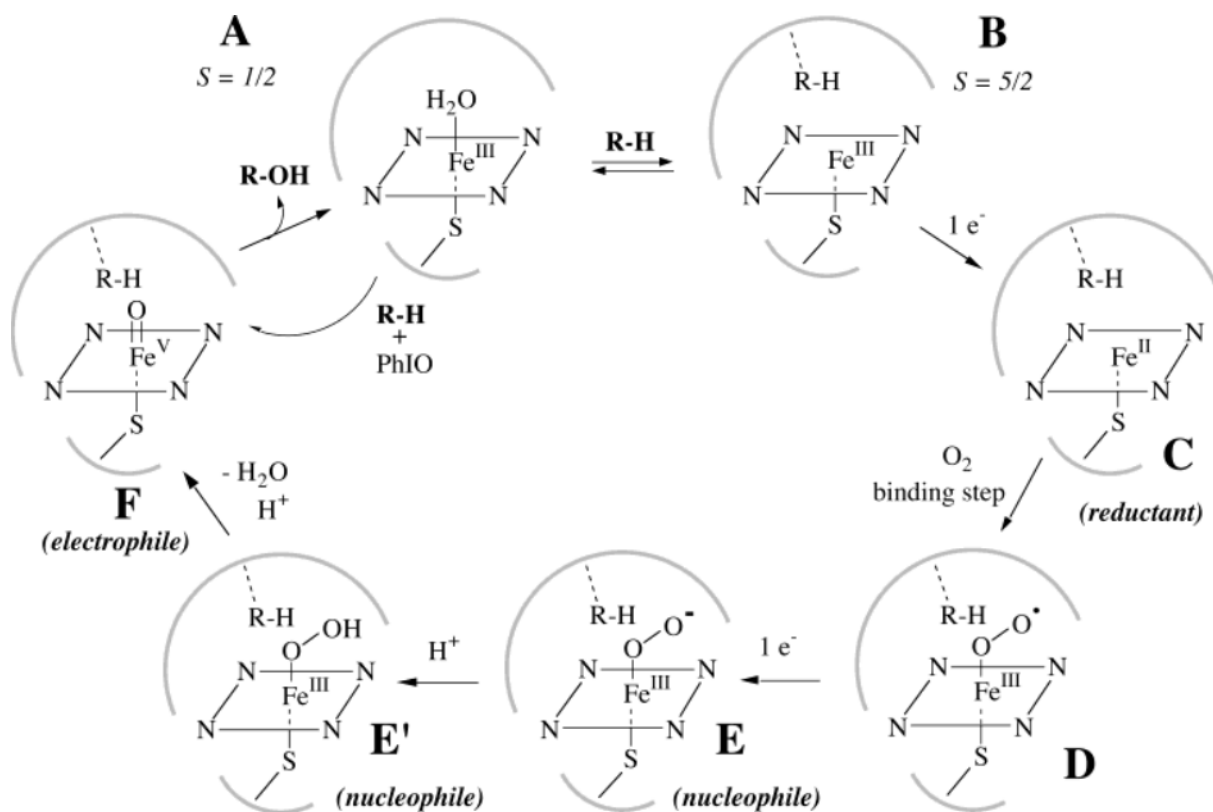
#### 2.3.1.1.5 Reakční cyklus monooxygenas obsahujících cytochrom P450

Monooxygenasové reakce představují reakce, v jejichž rámci dochází k inkorporaci jednoho atomu kyslíku do substrátu za současné redukce druhého kyslíkového atomu na vodu. Celkovou reakci tak můžeme vyjádřit následující rovnicí:



Reakční cyklus cytochromu P450 (Obrázek 5) je několikakrokovým procesem a probíhá uspořádaným mechanismem. V klidovém stavu (A) je hemové železo v nízkospinové ferri formě. Prvním krokem je vazba substrátu do aktivního centra. Po proniknutí substrátu dochází k vytlačení molekuly vody, která představuje šestý ligand a přechodu železa do vysokospinové formy (B). Následně dochází k jednoelektronové redukci pomocí NADPH:cytochrom P450 reduktasy, čímž dochází k přechodu železa z ferri formy na ferro formu. Tento komplex (C) může následně reagovat s molekulou CO za vzniku komplexu, který je zodpovědný za charakteristickou absorpci při 450 nm. Jinou, přirozenou, molekulou, která se může úspěšně vázat ke komplexu, je molekula kyslíku, čímž se hemové železo stává opět hexakoordinované (D). Dalším krokem je druhá redukce, která je pro mnoho cytochromů P450 rychlost určujícím krokem. Elektrony pro tuto redukci mohou být poskytnuty jak NADPH:cytochrom P450 reduktasou, tak cytochromem b<sub>5</sub>. Pokud elektron není doručen dostatečně rychle, rozpadá se komplex za vzniku superoxidového anionradikálu, jenž je následně přeměněn superoxidodismutasou na peroxid vodíku. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci (E) představuje aktivní formu cytochromu P450. Následují dvě protonace, které způsobí štěpení vazby mezi kyslíky a uvolnění molekuly

vody (F). Druhý atom kyslíku je následně přenesen na substrát, čímž dochází k uvolnění substrátu z enzymu a regeneraci molekuly cytochromu P450 (19; 77; 123).



**Obrázek 5** Reakční cyklus cytochromu P450. Zdroj: Meunier (123)

### 2.3.1.2 Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) (EC 1.14.13.8) jsou důležité enzymy NADPH-dependentního oxidačního metabolismu, které obsahují těsně, ale nikoliv kovalentně vázaný FAD (124). Flavinové monooxygenasy jsou lokalizovány v membránách endoplasmatického retikula. Jsou schopny katalyzovat N- a S-oxidační reakce, méně pak C-oxidační reakce (20) a preferenčně provádí hydroxylace terciárních a sekundárních aminů (77). Jsou teplotně labilní, což je možné využít při jejich inaktivaci v případě, že chceme studovat vliv cytochromů P450, jakožto dalšího typu mikrosomálních enzymů participujícího na oxidačním metabolismu (19). Cytochromy P450 mohou být naopak inaktivovány 1% Emulgenem 911, který má minimální efekt na aktivitu FMO (20).

V lidském organismu můžeme nalézt 11 genů tohoto enzymu, přičemž 6 z nich jsou pseudogeny (125). Z pěti exprimovaných lidských FMO označovaných jako FMO1-FMO5, vykazují tři enzymy genetický polymorfismus (124). Všechny geny jsou lokalizovány na

chromozomu 1 (126; 125). FMO1 je exprimována v játrech embrya. Tři dny po narození je množství tohoto enzymu prakticky nedetekovatelné, a je postupně nahrazován FMO3 (127). U dospělého člověka se FMO1 vyskytuje v ledvinách (128). Hlavní flavinovou monooxygenasou v plicích je FMO2 (124).

V prvním kroku katalytického cyklu dochází ke dvouelektronové redukci FAD pomocí NADPH. Redukovaný flavin pak rychle reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxoflavinu. Ten pak může reagovat s nukleofilním substrátem, přičemž dochází k zabudování jednoho atomu kyslíku do substrátu a přeměně druhého atomu kyslíku na vodu (124).

### 2.3.2 Peroxidasy

Peroxidasy představují další významnou skupinu enzymů, jenž je schopna efektivně biotransformovat celou řadu substrátů. Na rozdíl od monooxygenasového systému nevyžadují jako kofaktor NAD(P)H, ale k oxidaci substrátů využívají redukce peroxidu vodíku a lipidových hydroperoxidů (18). Většinou se jedná o hemoglykoproteiny, Železo je v oxidačním stavu +III a je pentakoordinované. Existují však i jiné peroxidasy, kde je porfyrinový skelet pozměněn, nebo dokonce chybí. Podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin, a to na hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy. Peroxidasy se vyskytují ve velkém množství forem (pravděpodobně izoenzymů) (77).

Katalytický cyklus peroxidasy je zahájen vazbou peroxidu na nativní enzym, čímž dochází k aktivaci enzymu. Takto aktivovaný enzym nese aktivovaný kyslík (77).

### 2.3.3 Konjugační enzymy

Xenobiotika obsahující funkční skupiny jako je hydroxyl, amin, epoxid nebo halogen mohou podstoupit konjugační reakce s endogenními metabolity. Výsledkem jsou produkty, které jsou až na vzácné výjimky méně toxické a snadněji exkretované než původní sloučeniny (19).

Konjugační reakce zahrnují glukuronidace, sulfatace, acetylace, metylace, konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami. Glukuronidace jsou katalyzovány UDP-

glukuronosyltransferasami (UGT), jež jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu, a jsou hlavní cestou metabolismu u člověka. Substráty glukuronosyltransferas představují alifatické alkoholy a fenoly, karboxylové kyseliny, primární a sekundární aminy a volné sulfhydrylové skupiny (20; 19). Podobně jako cytochromy P450 jsou UGT řazeny do rodin, přičemž u člověka nalezneme 9 enzymů rodiny UGT1 a 6 enzymů rodiny UGT2 (19). Významnými enzymy jsou také sulfotransferasy (SULT). U člověka nalezneme 5 genů SULT (19). Sulfotransferasy se vyskytují v cytosolu (20). Mnoho endogenních i exogenních látek může být také metylováno metyltransferasami. Rozlišujeme N-, O- a S-metyltransferasy (19), které se vyskytují v endoplasmatickém retikulu i v cytosolu (20).

## **3 Cíl dizertační práce**

Primárním cílem předkládané dizertační práce bylo poznání vlivu jednotlivých složek biotransformačního enzymového systému, lokalizovaného v membráně endoplasmatického retikula obsahujícího cytochrom P450, na oxidaci dvou xenobiotik, environmentálního polutantu a karcinogenu benzo[a]pyrenu a rostlinného alkaloidu s protinádorovými účinky, ellipticinu. Cílem bylo též zjistit, zda experimentální model laboratorního potkana může být vhodným modelem pro studium metabolismu benzo[a]pyrenu v lidském organismu.

V rámci dizertační práce jsme se zaměřili na následující oblasti:

❖ **Metabolismus benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana a člověka**

Cílem této studie bylo poznání metabolismu benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy z kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných různými induktory cytochromu P450. Studován byl vliv takových premedikací na metabolickou přeměnu benzo[a]pyrenu a potenciál tohoto zvířecího modelu jako modelového organismu pro metabolismus benzo[a]pyrenu v lidském organismu.

❖ **Metabolismus benzo[a]pyrenu potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450 a vliv cytochromu b<sub>5</sub> na tento metabolismus**

V rámci této části dizertační práce byl studován metabolismus benzo[a]pyrenu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450. Pozornost byla zaměřena především na cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), jenž se v rámci studie jevil jako enzym v metabolismu BaP nejefektivnější. Byl také studován vliv cytochromu b<sub>5</sub> na tento metabolismus.

❖ **Metabolismus BaP lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotním a eukaryotním expresním systému**

Tato studie sledovala, zda se liší metabolismus benzo[a]pyrenu lidským rekombinantním CYP1A1 exprimovaným v endoplasmatickém retikulu hmyzích buněk (Supersomy<sup>TM</sup>) od metabolismu, který je katalyzován cytochromem P450 1A1 exprimovaným v buňkách *E. coli* (Bactosomy).

❖ **Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy na oxidaci benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1**

V této části dizertační práce jsme se zaměřili na studium vlivu NADPH:CYP reduktasy jako složky biotransformačního enzymového systému membrány endoplasmatického retikula na oxidaci benzo[a]pyrenu. Vliv této reduktasy byl sledován za použití myšího modelu s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech, a v systému CYP1A1 exprimovaného v buňkách *E. coli*.

❖ **Studium vlivu cytochromu b<sub>5</sub> na redukcí cytochromu P450 v průběhu oxidace BaP a ellipticinu**

V této části práce jsme se zaměřili na potenciál cytochromu b<sub>5</sub> poskytovat elektrony pro redukcí cytochromu P450 v jeho reakčním cyklu.

❖ **Studium tvorby kovalentních aduktů BaP s DNA po jeho metabolické aktivaci enzymovými systémy metabolizujícími tento karcinogen**

Vedle studia efektivity různých biotransformačních enzymových systémů metabolizovat benzo[a]pyren byla v rámci práce studována i efektivita uvedených systémů v aktivaci tohoto karcinogenu za tvorby jeho aduktů s DNA.

❖ **Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na tvorbu aduktů benzo[a]pyrenu s DNA**

Cílem bylo odhalit vliv cyt b<sub>5</sub> na metabolickou aktivaci benzo[a]pyrenu vedoucí k tvorbě aduktů s DNA.





## **4 Materiál a metody**

Naprostá většina metod použitých během vypracování této dizertační práce je popsána v publikacích, jež tvoří součást práce a jsou vedeny jako přílohy č. 1-5. Pro větší srozumitelnost jsou však některé z metod spolu s použitým materiálem uvedeny v této kapitole.

#### 4.1 Použitý materiál a chemikálie

**British Drug Houses** (Velká Británie) Sudan I

**Chemopetrol** (*Česká republika*) suchý led

**Fluka** (*Švýcarsko*) dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), etylacetát, metanol, tris(hydroxymetyl)-aminometan (TRIS), tokoferol (vitamin E)

**Lachema Brno** (*Česká republika*) dihydrogenfosforečnan draselný, etylacetát, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, metanol, pentahydrát síranu měďnatého, uhličitan sodný, hydroxid sodný, vinan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,

**Linde** (*Česká republika*) dusík, kapalný dusík, oxid uhelnatý

**Loba Feinchemie** (*Rakousko*) glutathion

**Merck** (*Německo*) acetonitril, etylacetát

**Reanal Budapešť** (*Maďarsko*) glukosa-6-fosfát  $\text{Na}_2$

**Sigma** (*USA*) glukosa-6-fosfát  $\text{Na}_2$ , glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, dimetylsulfoxid (DMSO), fenacetin, nikotinamidadeninnukleotid (NADH), nikotinamidadenindinukleotidfosfát  $\text{NADP}^+$ , nikotinamidadenindinukleotidfosfátvredukvoaný (NADPH), ellipticin, 1-heptansulfonová kyselina, ellipticin, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), benzo[a]pyren, ketokonazol, sodná sůl 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetan-sulfonové kyseliny (HEPES), 3-[(3-cholamidopropyl) dimetylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS)

**Serva** (*Německo*) glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

**Sevapharma, a.s.** (*Česká republika*) hovězí sérový albumin (BSA)

Potkaní a lidské rekombinantní cytochromy P450 exprimované v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* byly získány od společnosti BD Bioscience respektive od společnosti Corning (USA), která odkoupila tuto divizi v roce 2012. Lidské rekombinantní cytochromy P450 exprimované v buňkách *E. coli* byly dodány společností CYPEX (Velká Británie).

Jaterní mikrosomy kontrolních a premedikovaných potkanů byly izolovány na katedře biochemie dle Stiborové (129). Králičí jaterní NADPH:cytochrom P450 reduktasa byla izolována dle Yasukotchiho (130) a králičí cyt b<sub>5</sub> dle Yanga (131). Izolační postupy byly upraveny dle Šulce (132) a Janouchové (133). Králičí NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa byla izolována s úpravami dle Mihara (134; 135). Lidský cytochrom P450 1A1 a lidský cytochrom b<sub>5</sub> použité při rekonstitucích byly také připraveny rekombinantně (heterologní expresí) a následně izolovány na naší katedře, a to ve spolupráci s Mgr. J. Milichovským. Mikrosomální epoxidhydrolasa (mEH) byla izolována v laboratoři z mikrosomů jater potkana, postupem dle (136). Jaterní mikrosomy myši s „knock-outovanou“ NADPH:cytochrom P450 reduktasou byly izolovány z jater dodaných spolupracujícími pracovišti v Londýně a Dundee (Dr. V.M. Arltem, Dr. C.H. Hendersonem a Prof. R.C. Wolfem) na katedře biochemie a jaterní mikrosomy myši geneticky modifikovaných lidským proteinem p53 byly izolovány z jater myši dodaných spolupracujícím pracovištěm v Londýně (v laboratoři Prof. DH Phillipse a Dr. V.M. Arlta v King's Colleague London).

## 4.2 Použité metody

### 4.2.1 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy

Metabolismus benzo[a]pyrenu byl studován za použití jaterních mikrosomů člověka, myši a potkanů. Potkani byly jednak kontrolní (nepremedikovaní) a jednak premedikovaní Sudanem I, benzo[a]pyrenem, pregnenolonkarbonitrilem (PCN) nebo fenobarbitalem (PB) postupy popsány v předchozích pracích (137; 138; 139; 140). V případě myši byly studovány jaterní mikrosomy izolované z kontrolních myši a myši s „knock-outovanou“ („deletovanou“) jaterní NADPH:CYP reduktasou a dále s transgenními a „knock-outovanými“ myšmi pro gen p53. Postup přípravy těchto zvířecích modelů a jejich expozice BaP je popsána v pracích, které tvoří přílohy č. 2 a 4. Koncentrace proteinů v jednotlivých izolovaných jaterních mikrozomech zachycuje Tabulka 4.

Jednotlivé inkubační směsi byly připraveny o celkovém objemu 500  $\mu$ l a měly následující složení:

- ❖ 0,25 mg proteinů mikrosomální frakce
- ❖ 50  $\mu$ M benzo[a]pyren (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- ❖ 1 mM  $MgCl_2$ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM  $NADP^+$ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH generující systém (NADPH-GS)), respektive 1 mM NADPH či 1 mM NADH
- ❖ fosfátový pufr (100 mM  $KH_2PO_4$ ; pH 7,4)

Reakce byla iniciována po přidání všech ostatních složek pomocí NADPH-GS respektive NAD(P)H, zamíchána a inkubována v otevřených mikroskumavkách při 37 °C za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) po dobu 20 minut. Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml etylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l 1 mM fenacetinu v metanolu (vnitřní standard). Jednotlivé vzorky byly dvakrát extrahovány etylacetátem intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Důkladné oddělení obou fází bylo provedeno za pomoci 5 minutové centrifugace při 13000 (Centrifuge 5418 Eppendorf). Horní fáze (750  $\mu$ l) byla po každé extrakci odebrána a odpařena do sucha ve vakuové odparce (CentriVap Concentrator, Labconco). Následně byly vysušené vzorky uchovány při teplotě -20 °C do analýzy pomocí HPLC.

**Tabulka 4** Koncentrace proteinů v izolovaných jaterních mikrosomálních frakcích potkanů (A) a myši (B)(K-kontrolní, BaP-premedikované BaP) použitých při experimentech

A	Mikrosomy	Koncentrace proteinů	B	Mikrosomy	Koncentrace proteinů
	Kontrolní	18,9 mg/ml		HRN-K	61,0 mg/ml
	Sudan I	43,0 mg/ml		HRN-BaP	32,0 mg ml
	BaP	32,5 mg/ml		p53+/+ K	8,3 mg/ml
	PB	29,3 mg/ml		p53+/- K	8,4 mg/ml
	PCN	52,8 mg/ml		p53-/- K	7,9 mg/ml
				p53+/+ BaP	6,2 mg/ml
				p53+/- BaP	7,8 mg/ml
				p53-/- BaP	5,7 mg/ml

#### 4.2.2 Oxidace benzo[a]pyrenu rekombinantními cytochromy P450

Při studiu oxidace benzo[a]pyrenu za pomoci rekombinantních cytochromů P450 byly použity cytochromy P450 potkana exprimované v hmyzích buňkách (Supersomy<sup>TM</sup>) a člověka exprimované jednak v hmyzích buňkách (Supersomy<sup>TM</sup>) a jednak v buňkách *E. coli* (Bactosomy, systémy označované jako CYP1A1LR, s nízkou expresí NADPH:CYP reductasy (CYP1A1:CPR 1:04), a CYP1A1R, s expresí tohoto enzymu a CYP1A1 v poměru CYP1A1:CPR 1:0,8). Charakteristiky jednotlivých cytochromů P450 jsou dostupné na webových stránkách jednotlivých dodavatelů.

Jednotlivé inkubační směsi byly připraveny o celkovém objemu 250  $\mu$ l a měly následující složení:

- ❖ 200 nM cytochrom P450
- ❖ 1 mM cytochrom b<sub>5</sub> (koexprimován s jednotlivými typy CYP s výjimkou CYP1A1 a 1B1, kde byl přidáván dodatečně cyt b<sub>5</sub> izolovaný z králičích jater)
- ❖ 50  $\mu$ M benzo[a]pyren (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- ❖ 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS), respektive 1 mM NADPH, či 1 mM NADH
- ❖ fosfátový pufr (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4)

Reakce byla iniciována po přidání všech ostatních složek pomocí NADPH-GS, respektive NAD(P)H, zamíchána a inkubována v otevřených mikrokumavkách při 37 °C za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) po dobu 20 minut. Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml etylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l 1 mM fenacetinu v metanolu (vnitřní standard). Jednotlivé vzorky byly dvakrát extrahovány etylacetátem intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Důkladné oddělení obou fází bylo provedeno za pomoci 5 minutové centrifugace při 13000 (Centrifuge 5418 Eppendorf). Horní fáze (750  $\mu$ l) byla po každé extrakci odebrána a odpařena do sucha ve vakuové odparce (CentriVap Concentrator, Labconco). Následně byly vysušené vzorky uchovány při -20 °C do analýzy pomocí HPLC.

#### 4.2.3 Oxidace benzo[a]pyrenu cytochromy P450 v rekonstituovaných systémech

Při studiu oxidace benzo[a]pyrenu pomocí rekonstituovaného systému lidského cytochromu P450 1A1 byly jednotlivé inkubační směsi byly připraveny o objemech 250  $\mu$ l a měly následující složení:

- ❖ 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml zásobní roztok v chloroformu)
- ❖ 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok; pH 7,4)
- ❖ 0,05 mg/ml CHAPS (0,5 mg/ml zásobní roztok v HEPES pufru)
- ❖ 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok)
- ❖ 200 nM cytochrom P450 1A1
- ❖ 100 nM NADPH:cytochrom P450 reduktasa
- ❖ 0,1 mg/ml cyt b<sub>5</sub>
- ❖ 0,02 mg/ml NADH:cyt b<sub>5</sub> reduktasa
- ❖ 50  $\mu$ M benzo[a]pyren (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- ❖ 1 mM NADPH resp. 1 mM NADH
- ❖ fosfátový pufr (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4)

Nejdříve byl ve skleněných zkumavkách odpařen pod atmosférou dusíku roztok DLPC (simuluje po vytvoření liposomů přirozenou membránu endoplasmatického retikula) v chloroformu. Dále byl do zkumavek přidán detergent CHAPS v HEPES pufru a roztok glutathionu. Směsi byly dvakrát sonikovány po dobu 2 minut. Následně k nim byly přidány enzymy (cytochromy P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cyt b<sub>5</sub>, NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa). Směsi byly inkubovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce (IKA Yellow line OS2 basic, Německo). Tím byly rekonstituované systémy připraveny k použití pro inkubace s BaP.

Reakce byla iniciována po přidání všech ostatních složek pomocí NAD(P)H, zamíchána a inkubována v otevřených mikrozkušavkách při 37 °C za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) po dobu 20 minut. Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml etylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l 1 mM fenacetinu v metanolu (vnitřní standard). Jednotlivé vzorky byly dvakrát extrahovány etylacetátem intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Důkladné oddělení obou fází bylo provedeno za pomoci 5 minutové centrifugace při 13000 (Centrifuge 5418 Eppendorf). Horní fáze (750  $\mu$ l) byla po každé extrakci odebrána a odpařena do sucha ve vakuové odparce

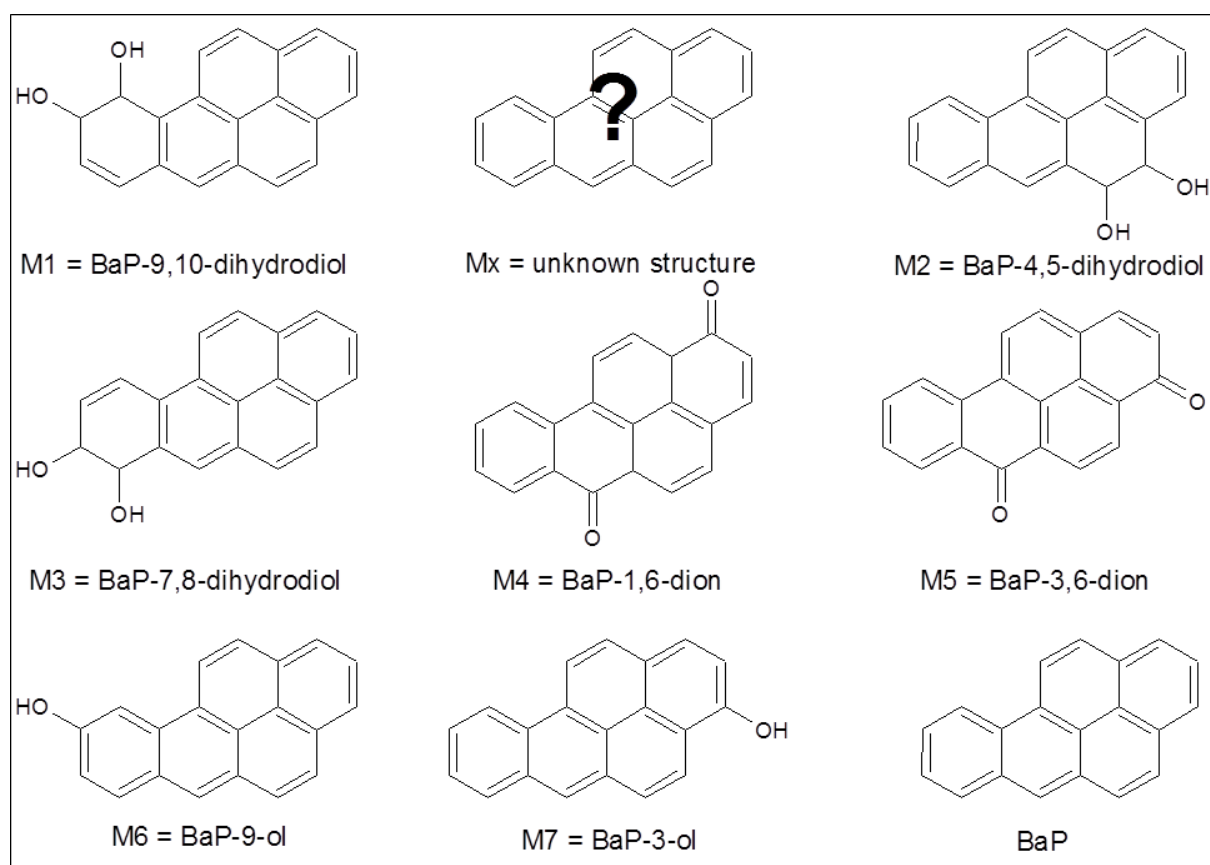
(CentriVap Concentrator, Labconco). Následně byly vysušené vzorky uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analýzy pomocí HPLC.

#### 4.2.4 Separace metabolitů benzo[a]pyrenu

Metabolity benzo[a]pyrenu (Obrázek 6) byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC za použití lineárního gradientu 0-100 % mobilní fáze B během 35 minut s následnou 5 minutovou izokratickou elucí mobilní fáze.

**Mobilní fáze A:** 50 % acetonitril (v/v)      **Mobilní fáze B:** 85 % acetonitril (v/v)

Jednotlivé mobilní fáze byly před použitím sonikovány v ultrazvukové lázni pro odstranění vzduchových bublin. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18 HD, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm (Macherey Nagel) s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány vztahem jejich plochy k ploše vnitřního standardu (fenacetinu).



**Obrázek 6** Struktura metabolitů a parentální molekuly benzo[a]pyrenu

#### 4.2.5 Analýzy aduktů testovaných látek s DNA metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“

Analýzy aduktů testovaných látek s DNA byly provedeny Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“ postupem detailně popsáním v předchozích pracích (141).

#### 4.2.6 Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4

Inkubační směsi o objemu 250  $\mu$ l byly připraveny o následujícím složení:

- ❖ 100 nM cytochrom P450
- ❖ 500 nM cytochrom b<sub>5</sub>
- ❖ 10  $\mu$ M ellipticin (1,25 mM zásobní roztok)
- ❖ fosfátový pufr (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4)
- ❖ 1 mM NADPH resp. NADH

Reakce byla iniciována po přidání všech ostatních složek pomocí NAD(P)H, zamíchána a inkubována v otevřených mikrozkušavkách při 37 °C za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) po dobu 20 minut. Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml etylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l 1 mM fenacetinu v metanolu (vnitřní standard). Jednotlivé vzorky byly dvakrát extrahovány etylacetátem intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Důkladné oddělení obou fází bylo provedeno za pomoci 3 minutové centrifugace při 13000 (Centrifuge 5418 Eppendorf). Horní fáze (750  $\mu$ l) byla po každé extrakci odebrána a odpařena do sucha ve vakuové odparce (CentriVap Concentrator, Labconco). Následně byly vysušené vzorky uchovány při -20 °C do analýzy pomocí HPLC.

#### 4.2.7 Separace metabolitů ellipticinu

Metabolity ellipticinu byly před analýzou rozpuštěny v 25  $\mu$ l metanolu a separovány pomocí HPLC. Složení mobilních fází stejně jako další podmínky chromatografie vyjadřuje Tabulka 5. Mobilní fáze byly před použitím sonikovány pro odstranění vzduchových bublin.



**Tabulka 5** Podmínky HPLC pro separování ellipticinu a jeho metabolitů

Mobilní fáze	64 % metanol, 5 mM heptansulfonát sodný, 32 mM kyselina octová
Kolona	Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Beckman)
Teplota kolony	37 °C
Průtok	0,7 ml/min
Nástřik (aplikace)	20 µl
Detekční délka	296 nm



## **5 Výsledky**

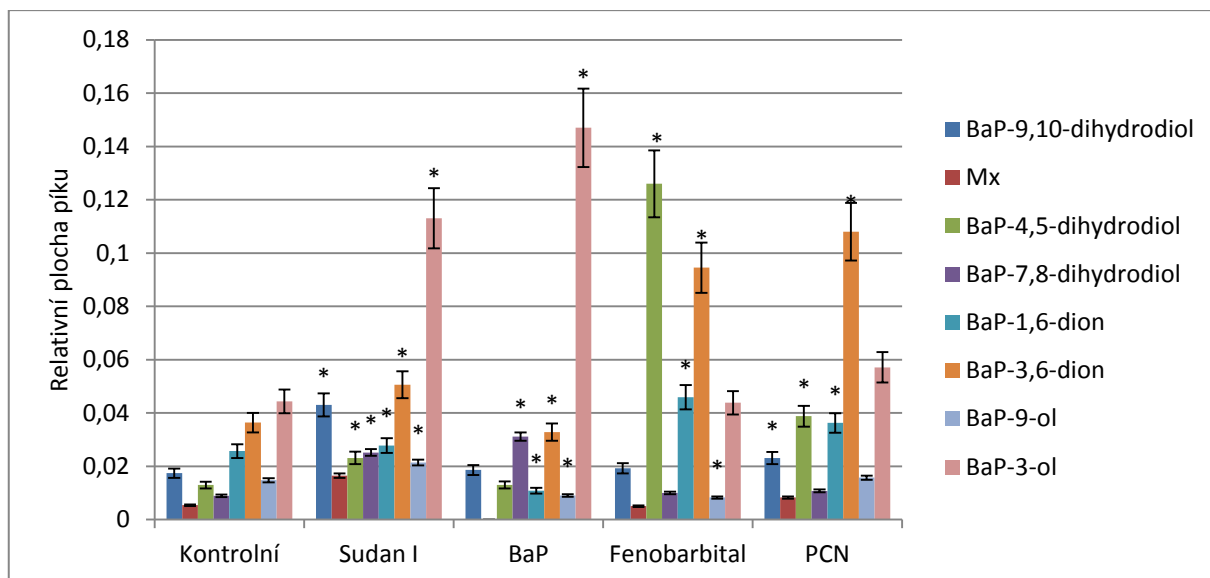
## 5.1 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy

### 5.1.1 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana

Jaterní mikrosomy jsou přirozený systém, který obsahuje všechny složky monooxygenasového systému lokalizované v membráně endoplasmatického retikula. Kromě toho se v mikrosomech vyskytuje také mikrosomální epoxidhydróláza, jež je nezbytná pro tvorbu dihydrodiolů benzo[a]pyrenu (66).

Mikrosomy z potkanů premedikovaných Sudanem I (induktor CYP1A1 (142; 138)) tvoří z BaP BaP-9,10-dihydrodiol ( $M_1$ ), BaP-4,5-dihydrodiol ( $M_2$ ), BaP-7,8-dihydrodiol ( $M_3$ ), BaP-1,6-dion ( $M_4$ ), BaP-3,6dion ( $M_5$ ), BaP-9-ol ( $M_6$ ), BaP-3-ol ( $M_7$ ) a metabolit  $M_x$ , jehož struktura nebyla dosud určena (Obrázek 6). V případě jaterních mikrosomů z kontrolních (nepremedikovaných) zvířat jsou z BaP tvořeny stejné metabolity, ale až v 3-krát menším množství (Obrázek 7). Cytochromy P450 podrodiny 2C jsou zastoupeny v mikrosomech z kontrolních (nepremedikovaných) zvířat a mohou tvořit až 55 % z celkového množství jaterních mikrosomů (143; 144).

Také mikrosomy potkanů premedikovaných vlastním benzo[a]pyrenem (BaP), jež indukuje expresi CYP1A1 (145; 146), fenobarbitalem (PB mikrosomy – indukce podrodiny CYP2B (147)), případně pregnenolonkarbonitrilem (PCN mikrosomy – indukce podrodiny CYP3A) vykazují schopnost oxidovat BaP za vzniku těchto metabolitů (Obrázek 7). Změna v poměru metabolitů však naznačuje, že se na oxidaci BaP mohou podílet i jiné cytochromy P450 než jen CYP1A1, který je „nabohacen“ v mikrosomech potkanů premedikovaných Sudanem I. Převažujícím oxidačním produktem v případě kontrolních mikrosomů a mikrosomů z potkanů premedikovaných Sudanem I a benzo[a]pyrenem je BaP-3-ol (Obrázek 6). V případě mikrosomů potkanů premedikovaných PCN je pozorována tvorba BaP-3,6-dionu jako hlavního oxidačního produktu. Tento metabolit je výrazně tvořen i při katalýze PB mikrosomy, kde je však majoritním oxidačním produktem BaP-4,5-dihydrodiol.

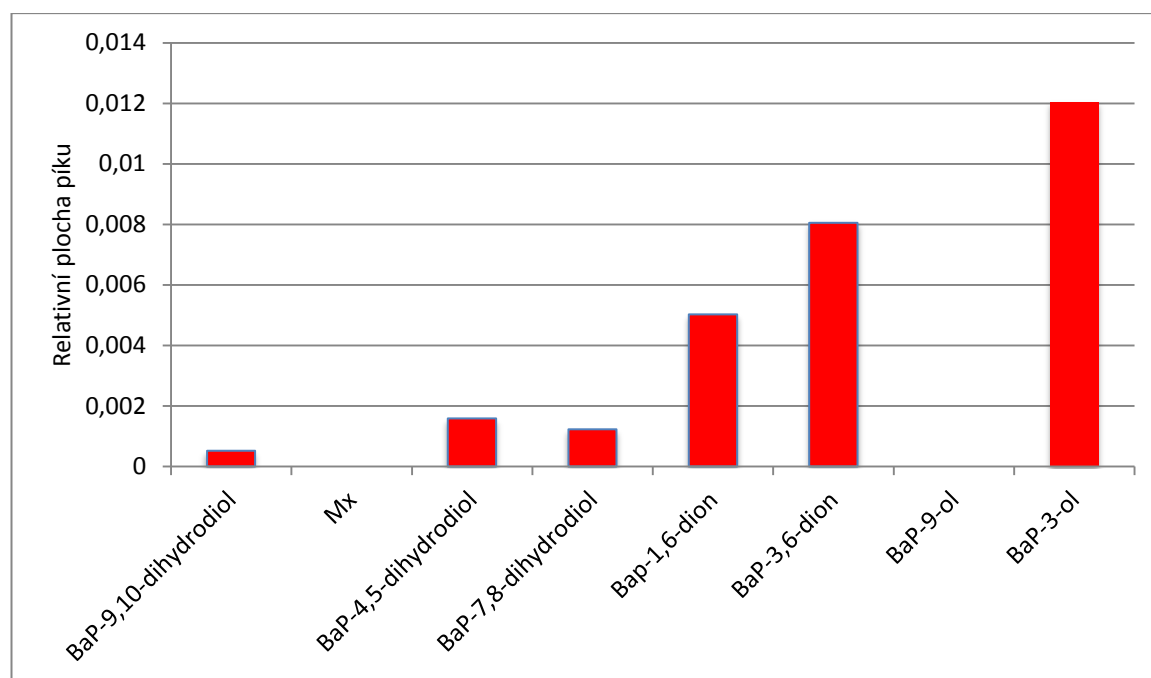


**Obrázek 7** Množství metabolitů tvořených jaterními mikrosomy potkanů. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,001$ , statisticky rozdílná změna množství metabolitů BaP od dat získaných s mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Studentův *t*-test.

Část výsledků prezentovaná v této kapitole je součástí publikace uvedené jako příloha č. 1.

### 5.1.2 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy člověka

Lidské jaterní mikrosomy oxidují BaP na šest metabolitů (Obrázek 8). Tyto metabolity byly identifikovány jako BaP-9,10-dihydrodiol ( $M_1$ ), BaP-4,5-dihydrodiol ( $M_2$ ), BaP-7,8-dihydrodiol ( $M_3$ ), BaP-1,6-dion ( $M_4$ ), BaP-3,6-dion ( $M_5$ ) a BaP-3-ol ( $M_7$ ). Absence metabolitu  $M_6$  (BaP-9-ol) v případě lidských jaterních mikrosomů může souviset s velmi nízkou hladinou exprese CYP1A1 v lidských játrech (148). Tato skutečnost, společně s přítomností metabolitu  $M_2$  (BaP-4,5-dihydrodiolu), naznačuje, že za oxidaci BaP lidskými jaterními mikrosomy jsou zodpovědné i jiné cytochromy P450 než jen CYP1A1, v jehož případě nebyla pozorována tvorba metabolitu  $M_2$  (BaP-4,5-dihydrodiolu), zatímco metabolit  $M_6$  (BaP-3-ol) je při oxidaci BaP lidským rekombinantním cytochromem P450 1A1 tvořen velmi efektivně (viz výsledky uvedené v kap. 5.3.2).



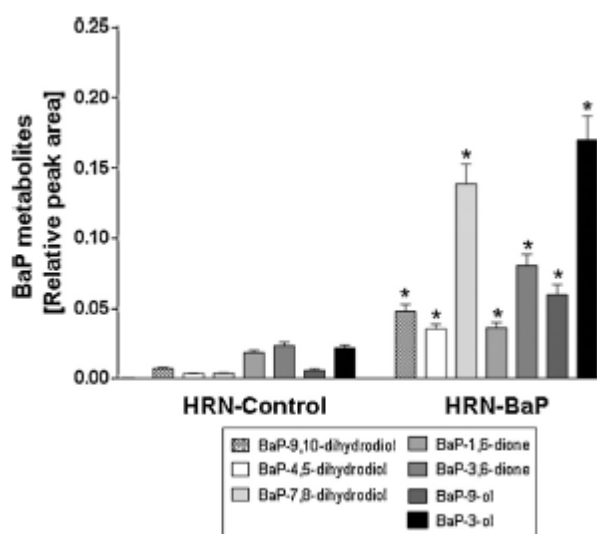
**Obrázek 8** Množství metabolitů tvořených lidskými jaterními mikrosomy. Data v obrázku jsou průměry dvou paralelních měření.

Výsledky prezentované v této kapitole jsou součástí publikace uvedené jako příloha č. 1.

### 5.1.3 Oxidace BaP jaterními mikrosomy geneticky modifikovaných myší [HRN (hepatic reductase null) myši]

Monooxygenasový systém cytochromu P450 je vícesložkový systém, kde je jednou z dalších složek NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR). „Knock-out“ genu této reduktasy u myši je fatální v průběhu embryonálního vývoje, což svědčí o esenciální roli tohoto enzymu v embryonálním vývoji (149). Tato skutečnost zabraňovala vývoji modelových organismů, kde exprese uvedeného enzymu absentovala. Problém s letalitou byl však vyřešen vytvořením myšního Cre/loxP systému, ve kterém byla CPR „deletována“ postnatálně (150; 151). Takovéto myši umožňují studovat funkce cytochromů P450, pro jejichž funkci je CPR esenciální při homeostáze, farmakologii, či chemické toxicitě *in vivo*. Dalším systémem použitým ke studiu metabolismu BaP v předkládané disertační práci byly tedy jaterní mikrosomy izolované z myši, u nichž nebyla CPR exprimovaná v játrech - HRN (hepatic reductase null) myši. Tyto modelové organismy byly připraveny v laboratoři spolupracujícího pracoviště univerzity v Dundee (viz postupy popsání v publikaci, které tvoří přílohu č. 4 disertační práce). Uvedený systém totiž může rozšířit naše znalosti o metabolismu BaP

játerními mikrosomy, v nichž jsou játerní cytochromy P450 prakticky nečinné (152). Při studiu byly použity jak játerní mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) HRN-myší, tak HRN-myší premedikovaných BaP. BaP je metabolizován oběma typy mikrosomů za tvorby sedmi metabolitů (M<sub>1</sub>-M<sub>7</sub>) (Obrázek 9). Nízká úroveň exprese CPR v játrech kontrolních HRN-myší však vede ke tvorbě pouze malého množství těchto metabolitů. Premedikace myší BaP vede k indukci CYP1A1 (145), což následně vede k nárůstu množství jednotlivých metabolitů. Nejvyšší nárůst oxidace BaP byl pozorován v případě metabolitu M<sub>2</sub> (BaP-7,8-dihydrodiolu), kde tento nárůst byl více než 34-násobný. U zbylých metabolitů byl nárůst jejich tvorby podstatně nižší (Obrázek 9).



**Obrázek 9** Množství metabolitů BaP tvořených játerními mikrosomy myší HRN kontrolních a premedikovaných BaP. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) myší HRN (control). Studentův *t*-test.

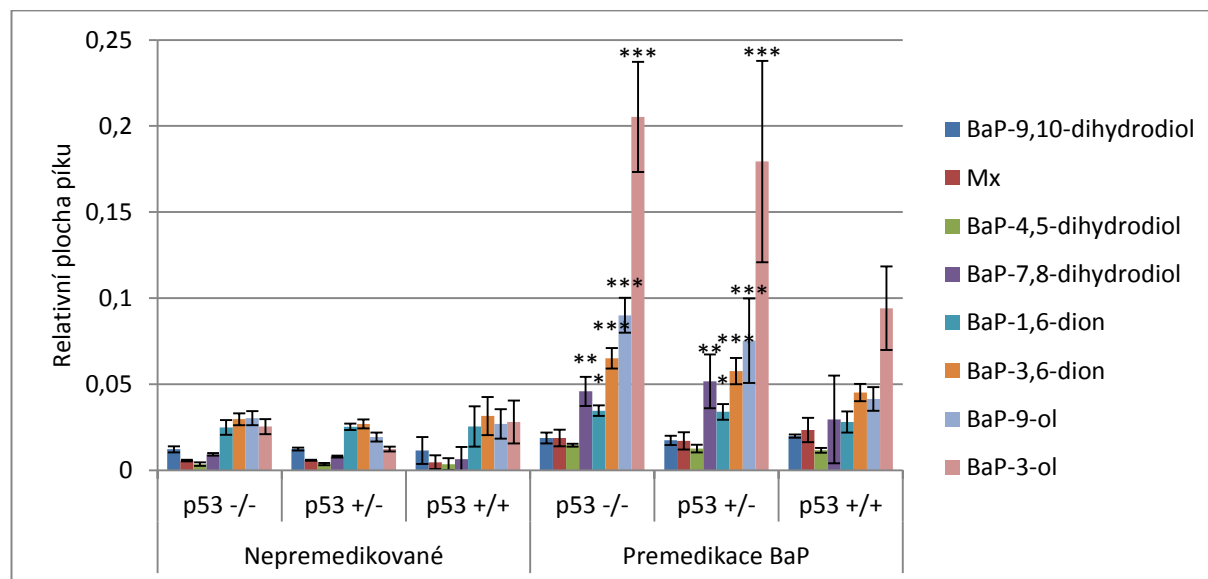
Výsledky prezentované v této kapitole jsou součástí publikace uvedené jako příloha č. 4.

#### 5.1.4 Oxidace BaP mikrosomy myší modifikovaných genem lidského proteinu p53

V této části disertační práce jsme využili mikrosomální systém myší geneticky modifikovaných genem lidského proteinu p53 připravených v laboratoři spolupracovníků v laboratořích Leiden University Medical Centre. A to jak myší kontrolních (nepremedikovaných) tak premedikovaných BaP, vedoucím k indukci cytochromu P450 1A1. Konkrétně byly jako modely užity myší absentující gen p53 [Trp53 (-/-)] a myší s různým

stavem exprese introdukovaného genu lidského proteinu p53. Modely byly Trp53(+/-) exprimující WT lidského genu p53, Trp53(+/-) exprimující heterozygotní gen lidského p53 a Trp53 (-/-) – myši s kompletním „knock-outem“ genu lidského p53. Studie s uvedenými myšimi modely sloužily k poznání, zda exprese tumorového supresorového genu p53 ovlivňuje aktivitu cytochromu P450 1A1. Při srovnání metabolismu BaP jaterními mikrosomy z kontrolních zvířat nehrál statut proteinu p53 (Trp53) žádnou významnou roli. Tvorba metabolitů BaP byla u všech typů zvířat analogická. Situace však byla diametrálně odlišná v případě mikrosomů myši premedikovaných BaP. Premedikace vede k zvýšení tvorby metabolitů (Obrázek 10). Nejvyšší nárůst metabolismu BaP byl pozorován ve tvorbě BaP-7,8-dihydrodiolu, BaP-3,6-dionu, BaP-9-olu a BaP-3-olu, a to v případě Trp53(+/-) a Trp53(-/-). Tyto dva systémy vykazují téměř totožná množství jednotlivých metabolitů. Mikrosomální systém myši Trp53(+/+) je v oxidaci BaP podstatně méně aktivní.

Získané výsledky naznačují, že exprese genu lidského tumorového supresorového genu p53 v užitých myších modelech ovlivňuje aktivitu CYP1A1, která byla v práci sledována prostřednictvím oxidace BaP. Tento předpoklad byl prokázán sledováním exprese proteinu p53 v použitých modelech. Expresse CYP1A1 je nejvyšší v myších modelech TP53(-/-), následován modelem TP53(+/-) a TP53(+/+) (viz výsledky uvedené v publikaci prezentované jako příloha č. 2).



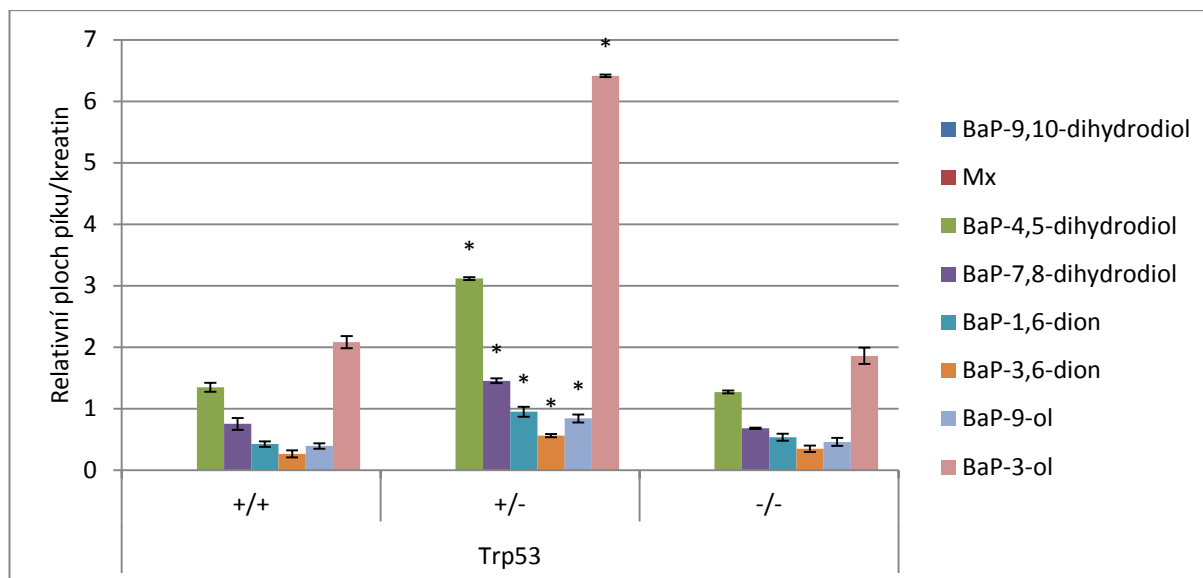
**Obrázek 10** Množství metabolitů BaP tvořených jaterními mikrosomy nepremedikovaných myši a myši premedikovaných BaP. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,005$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných z Trp53(+/+) myši premedikovaných BaP. Studentův t-test.



Část výsledků prezentovaná v této kapitole je součástí publikované práce, které je v dizertační práci uvedena jako příloha č. 2.

## **5.2 Analýza metabolitů BaP v moči myších modelů s různým statusem genu lidského p53**

Moč myších modelů s různou expresí genu lidského tumorového supresoru p53 premedikovaných BaP byla analyzována metodou HPLC za účelem zjištění, zda jsou v ní přítomny metabolity BaP. V rámci analýzy byly stanoveny pouze nekonjugované metabolity BaP, ačkoliv močí mohou být exkretovány i metabolity BaP konjugované ve formě glukosiduronátů nebo sulfátů. Metabolity BaP  $M_1$  a  $M_x$  nebyly v moči zvířat detekovány, vzhledem k polárním látkám v moči eluovaných v počátcích eluce HPLC. Tím byla znemožněna analýza těchto dvou metabolitů. Při analýze moči kontrolních (nepremedikovaných) zvířat nebyl, jak bylo očekáváno, v moči pozorován ani jeden z metabolitů BaP. Naopak některé metabolity BaP u zvířat vystavených BaP byly močí exkretovány. Nejvyšší množství metabolitů BaP bylo nalezeno v případě myši Trp53(+/-), kde toto množství výrazně převyšovalo zbylé dva modely (Obrázek 11). Toto zjištění je pozoruhodné, vzhledem ke skutečnosti, že při studiu oxidace BaP jaterními mikrosomy ze stejných zvířat vykazoval mikrosomální systém zvířat Trp53(-/-) prakticky stejnou schopnost oxidovat BaP jako jaterní systém zvířat Trp53(+/-). To by nasvědčovalo tomu, že metabolity BaP buď nejsou exkretovány močí, nebo dochází ke konjugaci a jejich exkreci v polárnější formě konjugátů.



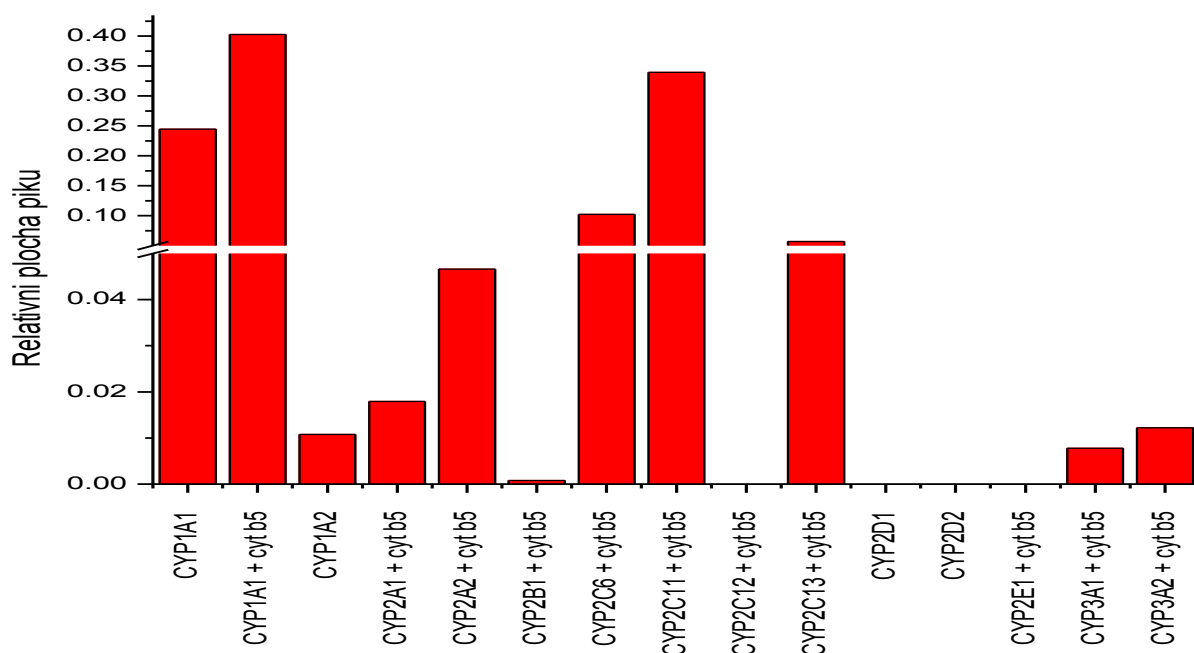
**Obrázek 11** Množství metabolitů BaP detekovaných v moči myších modelů s různou expresí genu lidského tumorového supresoru p53 vystavených působení BaP. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných z Trp53(+/+) myši premedikovaných BaP. Studentův t-test.

Část výsledků prezentovaná v této kapitole je součástí rukopisu publikace, který je v dizertační práci uveden jako příloha č. 2.

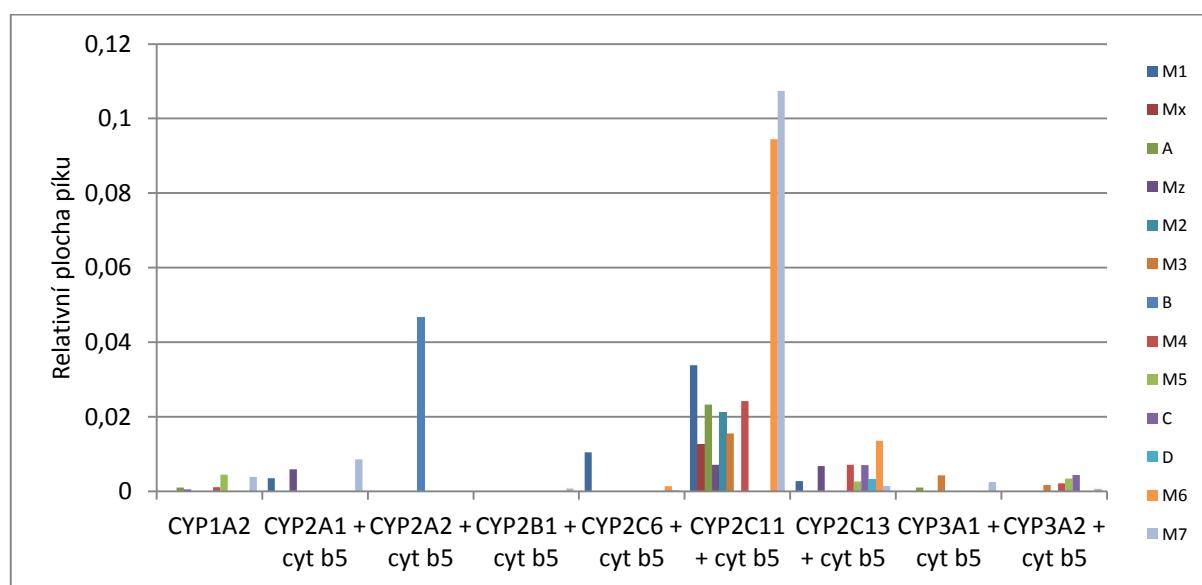
### 5.3 Oxidace benzo[a]pyrenu rekombinantními cytochromy P450

#### 5.3.1 Oxidace benzo[a]pyrenu potkaními rekombinantními cytochromy P450

Na základě rozličných poměrů metabolitů BaP tvořených při jeho metabolismu jaterními mikrosomy z nepremedikovaných potkanů a zvířat premedikovaných induktory různých cytochromů P450 (kapitola 5.1.1) se dá usuzovat, že za metabolismus BaP zodpovídá více druhů cytochromu P450. Pro zjištění participace jednotlivých isoform potkaních cytochromů P450 na tomto metabolismu byly použity rekombinantní cytochromy P450. Užity byly systémy exprimující jednotlivé CYP s CPR, případně i s cyt b<sub>5</sub>, systémy mikrosomů hmyzích buněk transfekovaných *Baculovirem* (Supersomy<sup>TM</sup>).



**Obrázek 12** Celkové množství metabolitů BaP tvořených potkaními cytochromy P450 exprimovanými v hmyzích buňkách (*Supersomy<sup>TM</sup>*). Data v obrázku jsou průměry dvou paralelních měření.



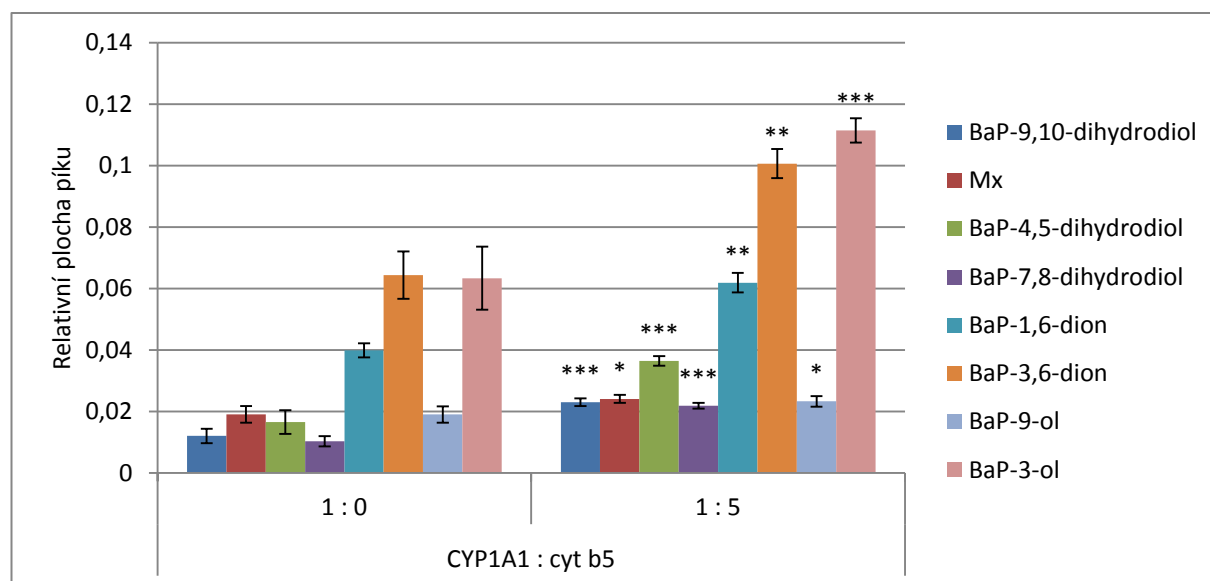
**Obrázek 13** Množství jednotlivých metabolitů BaP tvořených potkaními cytochromy P450 exprimovanými v hmyzích buňkách (*Supersomy<sup>TM</sup>*). Data v obrázku jsou průměry dvou měření. V obrázku nejsou uvedena data zjištěná s CYP1A1, neboť jsou specifikována v obr. 14.

Z testovaných potkaních rekombinantních CYP metabolizují BaP cytochromy P450 1A1, 1A2, 2A1, 2B1, 2A2, 2C6, 2C11, 2C13, 3A1 a 3A2 (Obrázek 12). Z metabolitů BaP jsou tvořeny dihydrodioly, diony a fenoly. Někteřími potkaními CYP vznikají i další metabolity, označované jako (A, B, C a D (Obrázek 13), jejichž struktura nebyla dosud charakterizována

Nejlépe metabolizují BaP potkaní CYP1A1 a CYP2C11 za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> (Obrázek 12 a Obrázek 13).

Potkaní rekombinantní CYP1A1 exprimovaný s CPR v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* (Supersomy<sup>TM</sup>), oxiduje BaP na osm metabolitů: BaP-9,10-dihydrodiol (M<sub>1</sub>), BaP-4,5-dihydrodiol (M<sub>2</sub>), BaP-7,8-dihydrodiol (M<sub>3</sub>), BaP-1,6-dion (M<sub>4</sub>), BaP-3,6-dion (M<sub>5</sub>), BaP-9-ol (M<sub>6</sub>), BaP-3-ol (M<sub>7</sub>) a M<sub>x</sub> (Obrázek 14). Tvorba dihydrodiolů v případě tohoto systému značí, že v těchto systémech je rovněž přítomná mikrosomální epoxidhydróláza.

Přidání cyt b<sub>5</sub> do reakční směsi obsahující potkaní CYP1A1 stimuluje tvorbu všech metabolitů BaP (Obrázek 14). Nejnižší stimulace metabolismu BaP je pozorována u metabolitu BaP-9-olu (M<sub>6</sub>), kde dochází k nárůstu jen o 22 %. Nejvyšší nárůst efektivity metabolismu BaP potkaním CYP1A1 lze pozorovat u BaP-4,5-dihydrodiolu (M<sub>2</sub>), u nějž dochází k nárůstu o 120 %.



**Obrázek 14** Množství metabolitů BaP tvořených potkaním cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup> a vliv cyt b<sub>5</sub> na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s CYP1A1 bez cyt b<sub>5</sub>. Studentův t-test.

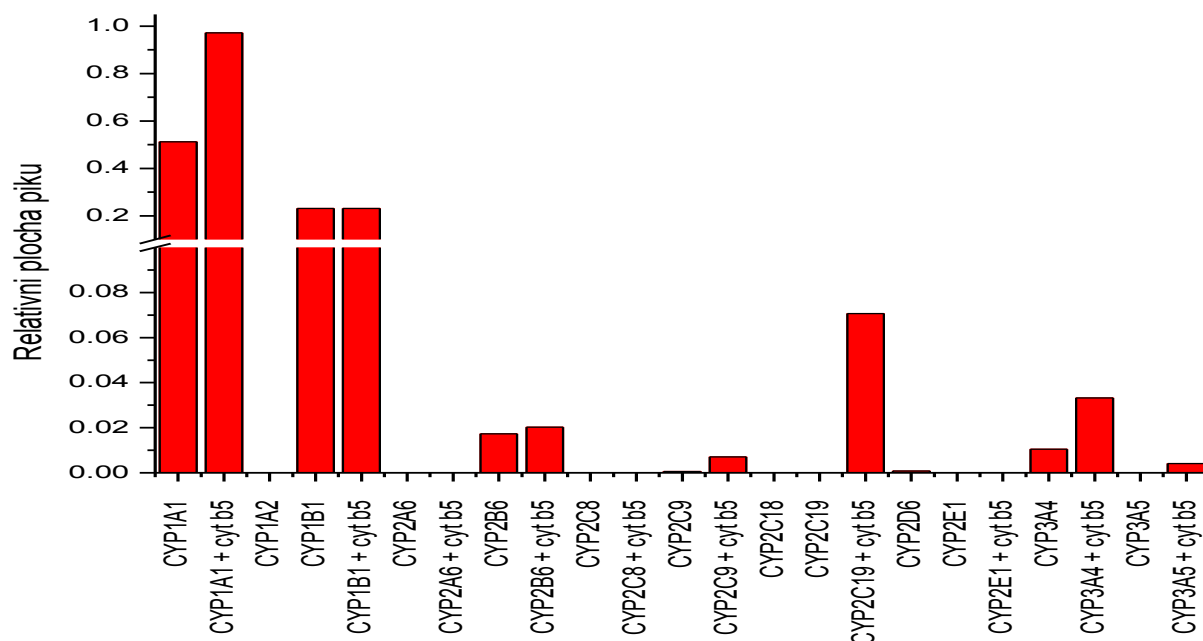
### 5.3.2 Oxidace benzo[a]pyrenu lidskými rekombinantními cytochromy P450

Vzhledem k oxidaci (metabolismu) BaP lidskými jaterními mikrosomy, byl v dalších experimentech sledován podíl jednotlivých lidských CYP na uvedených reakcích. K těmto studiím byly využity lidské rekombinantní CYP exprimované v mikrosomech hmyzích buněk

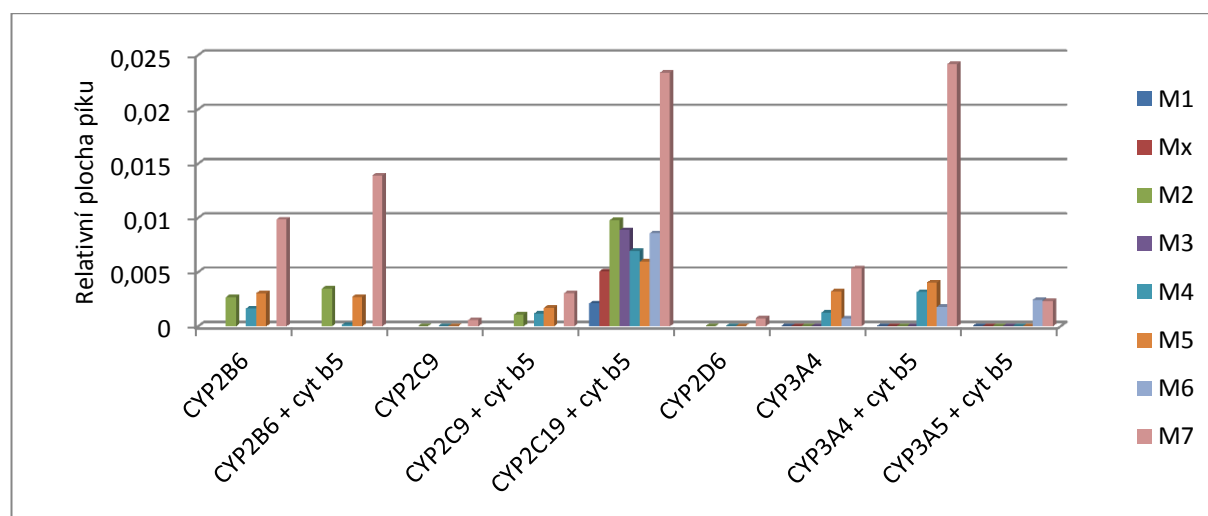
transfekovaných *Baculovirem* (Supersomy<sup>TM</sup>), tedy v analogickém systému použitému pro potkaní rekombinantní CYP. Z testovaných lidských rekombinantních cytochromů P450 metabolizují BaP enzymy CYP1A1, 1B1, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 a 3A5 (Obrázek 15). V případě některých cytochromů P450 jejich účinnost metabolizovat BaP závisela na přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub>. Z metabolitů BaP jsou studovanými lidskými rekombinantními cytochromy P450 tvořeny dihydrodioly, diony a fenoly (Obrázek 16).

Lidský rekombinantní CYP1A1 exprimovaný v Supersomech<sup>TM</sup> metabolizuje BaP na analogické metabolity jako potkaní CYP1A1 s výjimkou BaP-4,5-dihydrodiolu (M<sub>2</sub>), který v tomto systému nebyl detekován. Podobný výsledek byl nalezen v experimentu sledujícím metabolismus BaP lidskými bronchoalveolárními buňkami H358, kde rovněž nebyla pozorována tvorba tohoto metabolitu (153). Uvedené výsledky naznačují, že za tvorbu metabolitu BaP-4,5-dihydrodiolu (M<sub>2</sub>) v případě lidských jaterních mikrosomů (kap.5.1.2) je zodpovědný jiný cytochrom P450. Tím se jeví být cytochromy P450 rodiny 2, u kterých jako jediných ze studovaných lidských cytochromů P450 byla pozorována tvorba metabolitu BaP-4,5-dihydrodiolu (M<sub>2</sub>) (Obrázek 16).

Dále byla naše pozornost zaměřena především na oxidaci BaP cytochromem P450 1A1 (CYP1A1). Množství většiny tvořených metabolitů BaP je v případě lidského CYP1A1 vyšší než v případě potkaního cytochromu P450. Nižší aktivita potkaního CYP1A1 vůči oxidaci BaP lidským CYP1A1 korespondovala nižší aktivitě tohoto enzymu vůči svému markerovému substrátu, Sudanu I (výsledky nejsou uvedeny).



**Obrázek 15** Celkové množství metabolitů BaP tvořených lidskými cytochromy P450 exprimovanými v hmyzích buňkách (*Supersomy<sup>TM</sup>*). Data v obrázku jsou průměry dvou paralelních měření.

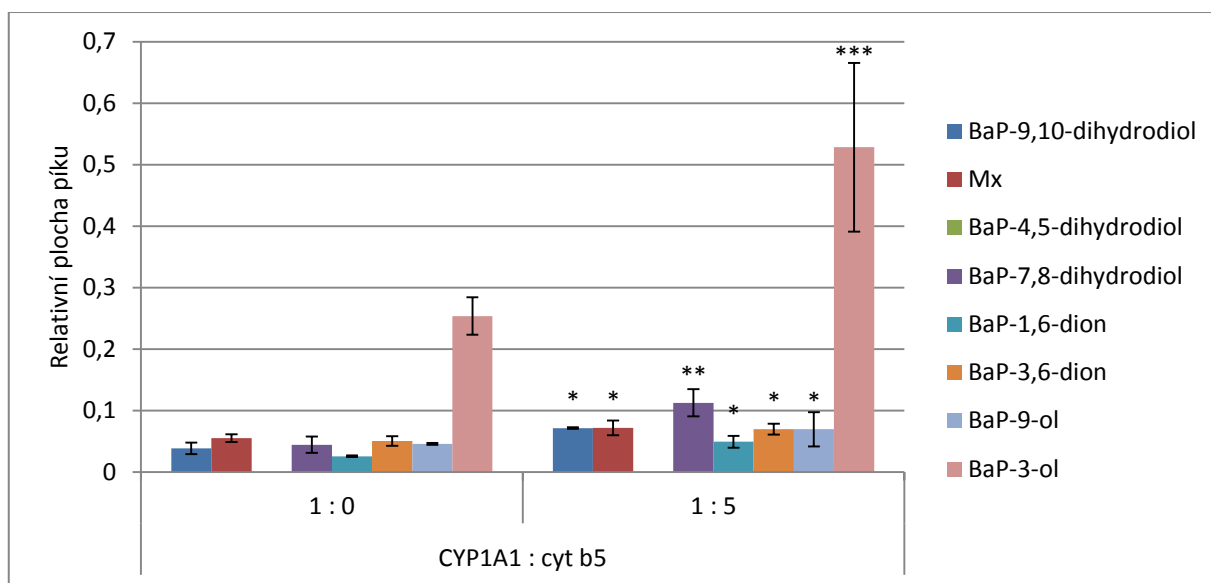


**Obrázek 16** Množství metabolitů tvořených jednotlivými formami lidských cytochromů P450. Data v obrázku jsou průměry dvou paralelních měření. V obrázku nejsou uvedena data zjištěná s CYP1A1 a CYP1B1, neboť jsou specifikována v obr. 17, a obr. 20

Přidání cyt b<sub>5</sub> k systému lidského rekombinantního CYP1A1 vede až k více než dvojnásobnému zvýšení produkce metabolitů BaP. Nejvyšší zvýšení metabolismu BaP bylo pozorováno v případě metabolitů BaP-7,8-dihydrodiolu a BaP-3-olu (Obrázek 17). Stimulační efekt cyt b<sub>5</sub> na lidské cytochromy P450 se vysvětluje alespoň dvěma mechanismy. První mechanismus zahrnuje zvýšení rychlosti donace druhého elektronu v průběhu reakčního cyklu

cytochromu P450. Druhý mechanismus souvisí s alosterickou modifikací enzymu. Protože přidáním cyt  $b_5$  dochází ke zvýšení tvorby všech metabolitů, je možné předpokládat, že za zvýšením této tvorby je zodpovědný nárůst reakční rychlosti, který je pravděpodobně spojený zejména se zvýšením donace druhého elektronu.

Získané výsledky, jež jsou do značné míry analogické výsledkům získaným s potkaním cytochromem P450 1A1, naznačují, že potkaní cytochrom P450 1A1 je vhodným modelem pro zkoumání oxidace BaP lidskou isoformou CYP1A1.



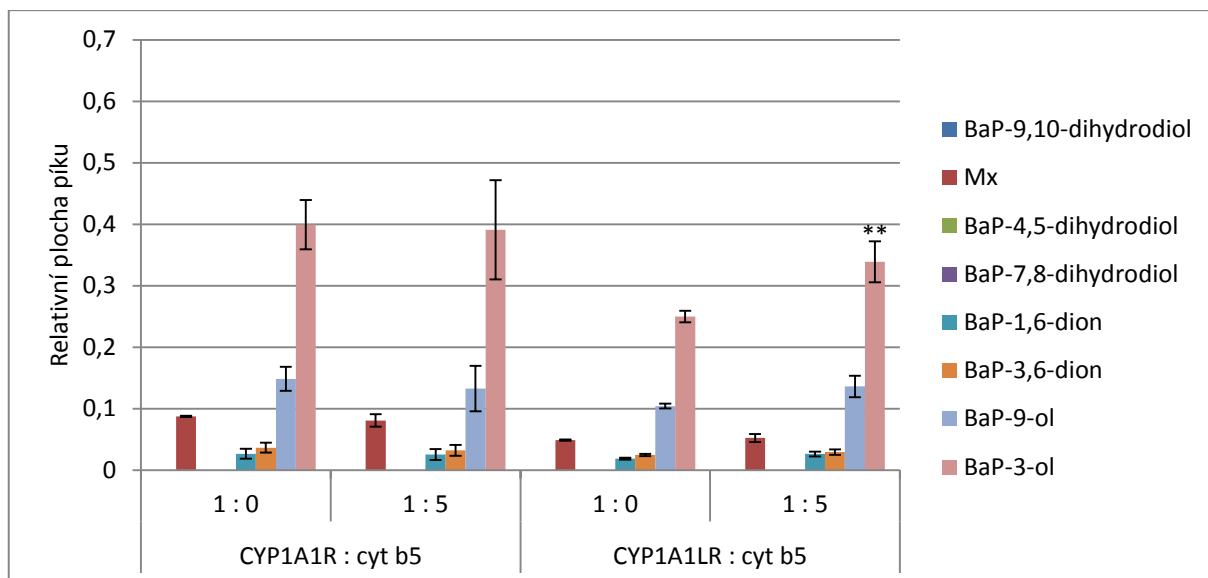
**Obrázek 17** Množství metabolitů BaP tvořených lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup> a vliv cyt  $b_5$  na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s CYP1A1 bez cyt  $b_5$ . Studentův  $t$ -test.

Metabolismus BaP byl rovněž studován lidským rekombinantním CYP1A1 „koexprimovaným“ společně s CPR v membránách prokaryotních buněk *E. coli* (Bactosomy). Tedy v systému membrán prokaryotických buněk, které jsou svými vlastnostmi a expresí různých enzymů odlišné od membrán endoplasmatického retikula (mikrosomů) eukaryotických buněk (Supersomy<sup>TM</sup>). V experimentech byly použity dva systémy prokaryotních membrán, které se lišily v množství exprimované NADPH:CYP reductasy (systém s vyšší hladinou exprese, CYP1A1R (CYP1A1:CPR 1:0,8), a systém s nižší hladinou exprese, CYP1A1LR (CYP1A1:CPR 1:0,4)) (viz kap. 4.2.2). V případě obou systémů byla pozorována jejich efektivita v tvorbě pouze pěti metabolitů BaP (Obrázek 18). Jmenovitě BaP-1,6-dionu, BaP-3,6-dionu, BaP-9-olu, BaP-3-olu a metabolitu o neznámé struktuře,  $M_x$ . V těchto systémech nebyla pozorována tvorba žádného z dihydrodiolů, což značí absenci

dostatečného množství mikrosomální epoxidhydrolasy (mEH) v těchto systémech (Obrázek 18). Rekonstituce CYP1A1LR s mEH, jež byla izolována v naší laboratoři, vedla ke vzniku těchto metabolitů. Jejich přesná kvantifikace však nebyla možná, vzhledem k určitým kontaminujícím látkám, jež byly přítomny v preparátu mEH. Současně se vznikem dihydrodiolů vedla rekonstituce s mEH i k vymizení metabolitu s neznámou strukturou  $M_x$ . Tato skutečnost by nasvědčovala tomu, že se v případě tohoto metabolitu může jednat o jeden z epoxidů BaP, který je, je-li přítomna mEH, následně přeměněn na některý z dihydrodiolů. Této možnosti by nasvědčoval i fakt, že největší množství tohoto metabolitu je tvořeno „bactosomálním“ systémem lidského CYP1A1, kde epoxidhydrolasa není prakticky exprimovaná a naopak jeho nejnižší množství je nalezeno v systému jaterních mikrosomů, kde je mEH přirozeně exprimována. Při testování mutagenity 4 různých epoxidů BaP (154) bylo zjištěno, že jejich poločas života se může značně lišit, takže při dostatečné aktivitě cytochromů P450 a nízké aktivitě mEH může dojít k zachování epoxidových metabolitů či z nich tvořených hydroxylovaných derivátů BaP až do okamžiku analýzy pomocí HPLC. V literatuře se setkáme s několika pracemi, v nichž byl také detekován neznámý metabolit s analogickými vlastnostmi při HPLC (67; 69). Z vlastností tohoto metabolitu na HPLC bylo předpokládáno, že by se mohlo jednat o trihydroxy-BaP (155; 68).

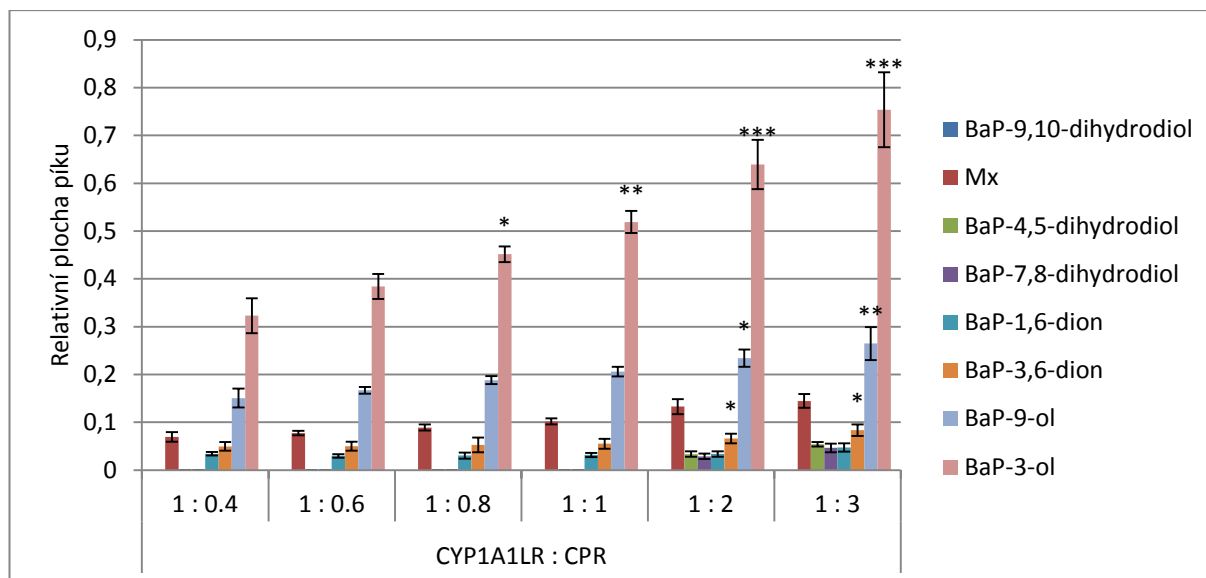
Oproti „Supersomálnímu“ systému obsahujícímu lidský CYP1A1 nebyl u „bactosomálního“ systému prakticky pozorován stimulační vliv cyt  $b_5$  na oxidaci BaP (Obrázek 18). Jedním z důvodů pro tento výsledek může být nesprávná inkorporace cyt  $b_5$  do bakteriální plasmatické membrány. Další možnou příčinou může být i absence NADH:cyt  $b_5$  reduktasy v této membráně. Jedná se totiž o enzym, který rovněž přispívá k funkci cytochromů P450 v mikrosomálním systému eukaryot.





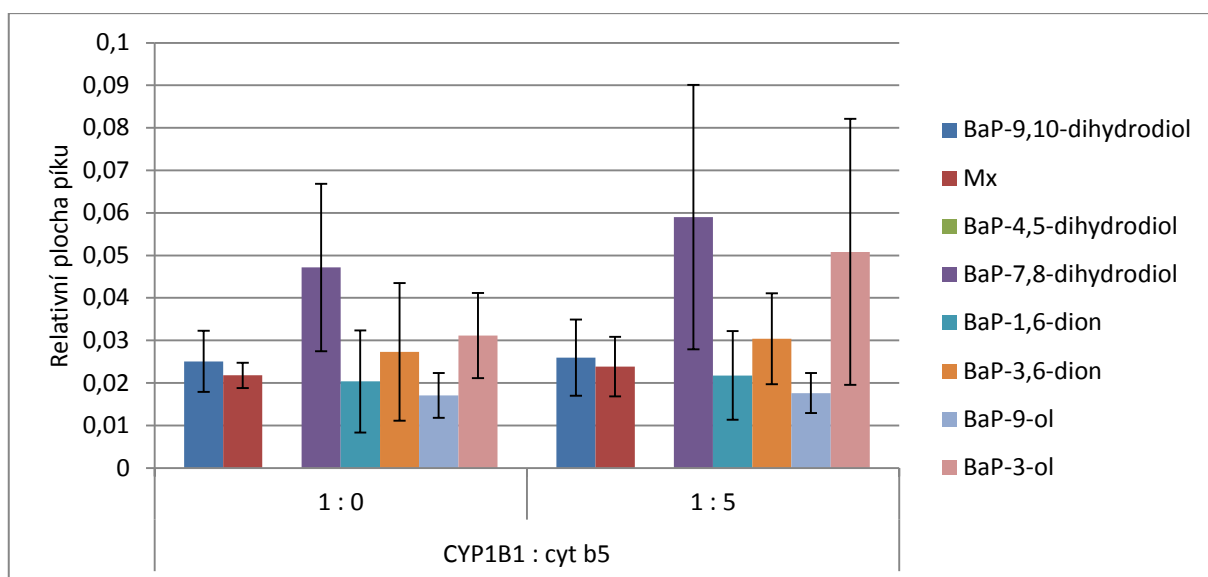
**Obrázek 18** Množství metabolitů tvořených lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v buňkách *E. coli* a vliv cyt b<sub>5</sub> na tento metabolismus. Použité systémy (CYP1A1R a CYP1A1LR) se liší v množství „koexprimované“ NADPH:CYP reduktasy. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\* $P < 0,01$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s CYP1A1 bez cyt b<sub>5</sub>. Studentův t-test.

Systém s vyšší expresní hladinou CPR (CYP1A1R) vykazoval až 1,6-krát vyšší účinnost při oxidaci BaP než systém s nižší hladinou jeho exprese (CYP1A1LR). Tento výsledek nás vedl k dalšímu studiu vlivu CPR na oxidaci BaP tímto systémem. K tomu jsme využili rekonstituci CYP1A1LR se zvyšující se koncentrací externí CPR (Obrázek 19). S rostoucí koncentrací CPR v systému dochází k postupnému nárůstu množství tvořených metabolitů BaP. Tento nárůst je nejvýznamnější v případě metabolitu BaP-3-olu (M<sub>7</sub>). Při vyšších koncentracích CPR je pozorována dokonce i tvorba dvou dihydrodiolů (M<sub>2</sub> a M<sub>3</sub>), což naznačuje určitou, i když nízkou expresní hladinu mEH v bactosomálním systému, a tedy i v inkubačních směsích (Obrázek 19).



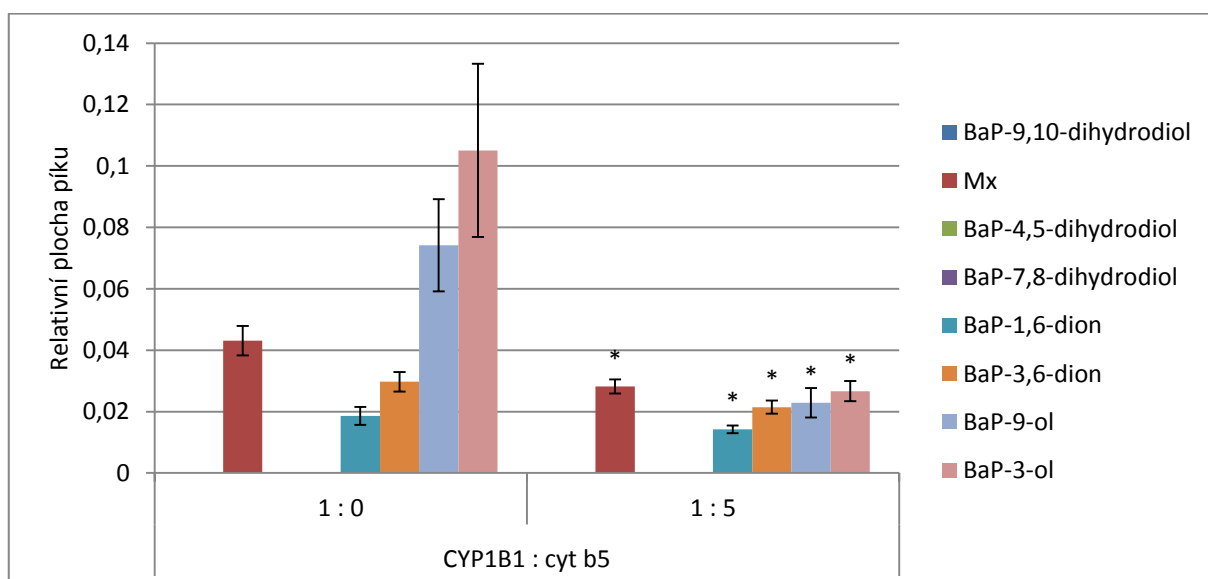
**Obrázek 19** Vliv koncentrace NADPH:CYP reductasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v buňkách *E. coli*. Data v obrázku jsou průměry a standardních odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s CYP1A1 bez přídavku CPR. Studentův *t*-test.

Dalším cytochromem P450, který byl podrobněji studován z hlediska jeho efektivity v oxidaci BaP byl cytochrom P450 1B1. V případě použití CYP 1B1 exprimovaného v hmyzích buňkách (Supersomy<sup>TM</sup>) je pozorována tvorba analogických metabolitů jako v případě CYP1A1 (Obrázek 20). Přesto je však v metabolismu BaP mezi těmito dvěma cytochromy P450 několik odlišností. V případě CYP1B1 je nejvíce tvořen metabolit BaP-7,8-dihydrodiol a nikoliv BaP-3-ol. Dalším rozdílem je, že přidání cyt  $b_5$  k tomuto systému neovlivňuje metabolismus BaP (Obrázek 20), který je efektem aktivy CYP1A1 oxidovat BaP (viz výsledky uvedené v Obrázek 17 a Obrázek 20).



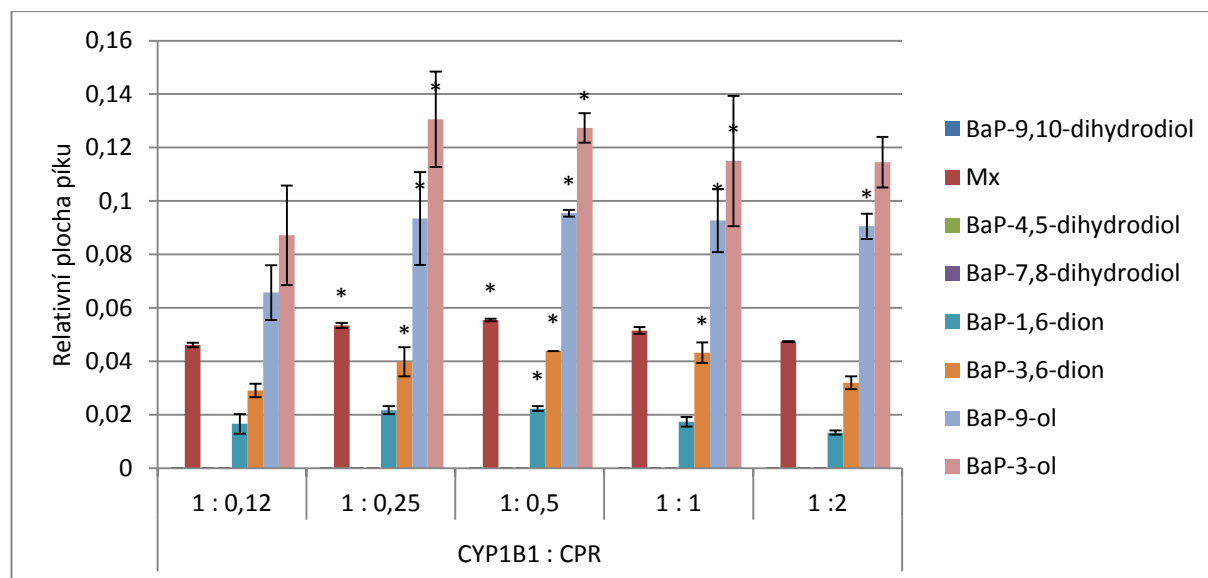
**Obrázek 20** Množství metabolitů BaP tvořených lidským cytochromem P450 1B1 exprimovaným v Supersomech™ a vliv cyt b<sub>5</sub> na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. Rozdíly mezi množstvím metabolitů BaP tvořených za přítomnosti cyt b<sub>5</sub> nebylo statisticky rozdílné od systému bez tohoto proteinu.

V případě CYP1B1 exprimovaného v buňkách *E.coli* vede přidání cyt b<sub>5</sub> dokonce k inhibici tvorby jednotlivých metabolitů BaP (Obrázek 21). Nejvýraznější je pokles v případě BaP-3-olu, kde dochází k poklesu na méně než čtvrtinu původního množství. Důvod vysvětlující tento rozdíl oproti chování systému s cytochromem P450 1A1 není dosud znám.



**Obrázek 21** Množství metabolitů tvořených lidským cytochromem P450 1B1 exprimovaným v buňkách *E. coli* a vliv cyt b<sub>5</sub> na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný pokles množství metabolitů BaP od dat získaných s CYP1B1 bez cyt b<sub>5</sub>. Studentův t-test.

Také v případě sledování vlivu různých koncentrací NADPH:cytochrom P450 reduktasy na metabolismus BaP cytochromem P450 1B1 exprimovaných v Supersomech<sup>TM</sup> můžeme pozorovat rozdílné chování oproti CYP1A1. Dvojnásobné zvýšení koncentrace CPR vede k nárůstu všech tvořených metabolitů BaP. Většina metabolitů pak dosahuje svého maxima při poměru CYP:CPR 1:0,5. Další zvyšování koncentrace CPR pak již vede k snížení metabolismu BaP, i když tento pokles není statisticky významný (Obrázek 22).



**Obrázek 22** Vliv koncentrace NADPH:CYP reduktasy na oxidaci benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v buňkách *E. coli*. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s CYP1B1 bez přídavku CPR. Studentův *t*-test.

Část výsledků prezentovaná v podkapitolách tvořících kapitolu 5.3 je součástí publikovaných prací, které jsou v dizertační práci uvedeny jako přílohy č. 1 a 3.

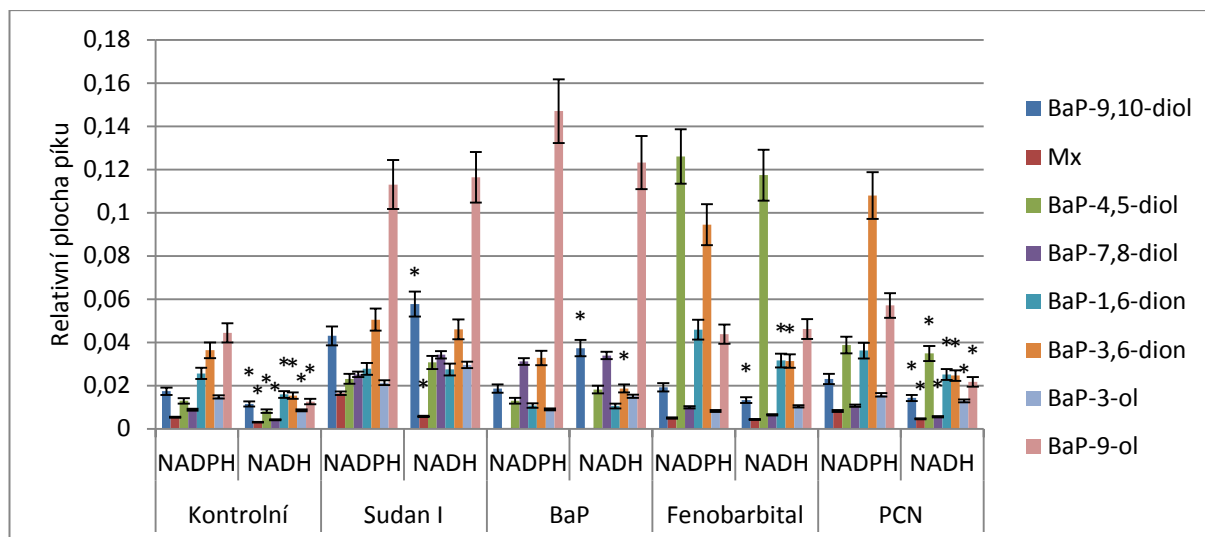
#### 5.4 Metabolismus BaP systémy cytochromů P450 za přítomnosti NADH a vliv cyt $b_5$ na tento metabolismus

Výsledky prezentované v předchozích kapitolách naznačují, že cytochrom  $b_5$  ovlivňuje množství metabolitů BaP tvořených oxidací různými cytochromy P450. Jedním z mechanismů, jímž je vliv cyt  $b_5$  na zvýšení oxidace substrátů cytochromů P450 vysvětlován, je možnost poskytnutí druhého elektronu cytochromu P450 v jeho reakčním cyklu (117). Zajímalo nás však také, zda je možné, aby cyt  $b_5$  poskytoval i elektron pro první redukci cytochromu P450 v jeho reakčním cyklu. Za tímto účelem jsme použili místo kofaktoru CPR

(NADPH) jako donoru elektronů v reakčním cyklu cytochromu P450 1A1 jiný kofaktor, jmenovitě NADH. NADH je koenzymem NADH:cyt b<sub>5</sub> reductasy (CBR) a je velmi špatným koenzymem pro NADPH:cytochrom P450 reductasu (CPR) (viz výsledky uvedené v kapitolách 5.4.2 a 5.5.5.5).

#### **5.4.1 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy potkana za přítomnosti NADPH a NADH**

Prvním systémem použitým pro studium metabolismu BaP za přítomnosti NADH byly jaterní mikrosomy potkana premedikovaného Sudanem I. Jak již bylo uvedené výše, Sudan I působí jako induktor CYP1A1 (142), který je považován za hlavní cytochrom P450 zodpovědný za metabolickou přeměnu benzo[a]pyrenu, což bylo jednoznačně prokázáno v předkládané dizertační práci. Jako kofaktory byly použity jak koenzym CPR (NADPH) a tak i koenzym CBR (NADH). Jaterní potkaní mikrosomy izolované z nepremedikovaných (kontrolních) potkanů a potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), fenobarbitalem (PB), induktorem CYP2B a 2C, a pregnenolonkarbonitrilem (PCN), induktorem CY3A, metabolizovaly BaP jak za přítomnosti NADPH, tak i NADH (Obrázek 23). Navzdory absenci NADPH jako přirozeného koenzymu CPR, byly tedy tyto jaterní mikrosomy schopny za přítomnosti NADH oxidovat benzo[a]pyren za vzniku jeho metabolitů. V případě mikrosomů, kde byly indukovány CYP1A, 2B a 2C, bylo množství tvořených metabolitů BaP dokonce srovnatelné s množstvími produkovanými v přítomnosti kofaktoru NADPH (Obrázek 23). Naopak v případě mikrosomů nepremedikovaných zvířat a zvířat premedikovaných PCN byla jejich efektivita metabolizovat BaP za přítomnosti NADH nižší než za přítomnosti NADPH (Obrázek 23). Získané výsledky signalizují, že vedle CPR, která byla dosud předpokládána za enzym nezbytný pro první redukci cytochromu P450 v jeho reakčním cyklu (Obrázek 5), může být tato redukce katalyzována i enzymem dependentním na NADH.

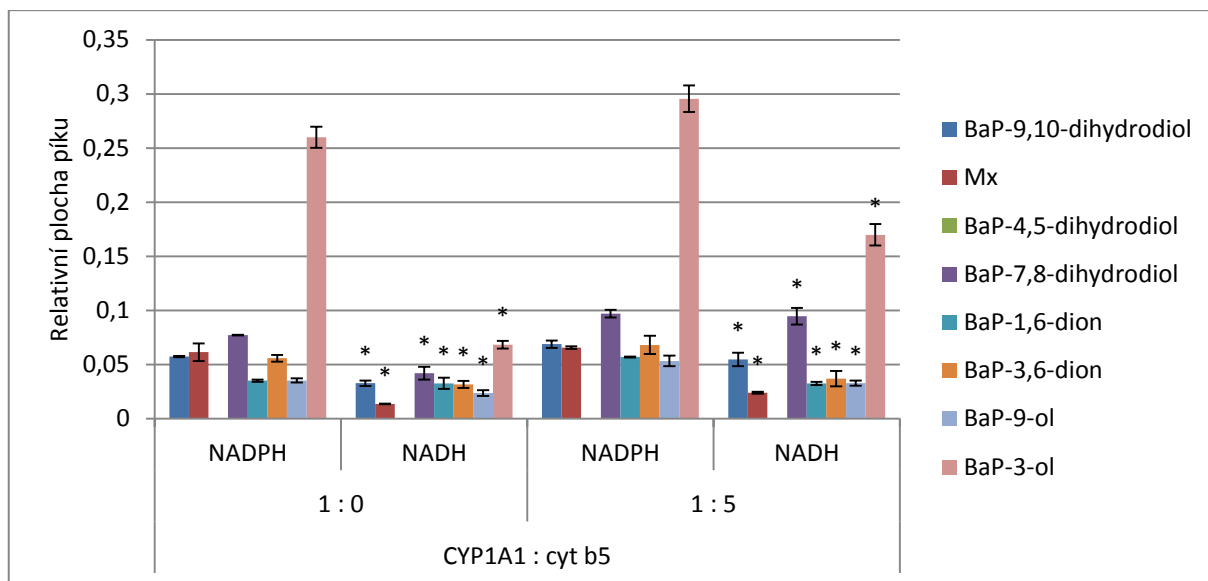


**Obrázek 23** Vliv NADPH a NADH na tvorbu metabolitů BaP generovaných jaterními mikrosomy premedikovaných a nepremedikovaných (kontrolních) potkanů, Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,01$ , statistické rozdíly mezi metabolity tvořenými mikrosomy s NADPH a NADH. Studentův *t*-test.

Iniciace reakce pomocí NADH vedla k praktickému vymizení metabolitu o neznámé struktuře (Mx), který je v jaterních mikrosomech tvořen v nepatrném množství i v případě přítomnosti přirozeného kofaktoru CPR, NADPH.

#### 5.4.2 Oxidace benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 za přítomnosti NADPH nebo NADH

Po pozorované iniciaci oxidace benzo[a]pyrenu pomocí NADH v případě jaterních mikrosomů potkana, byl tento kofaktor použit i pro iniciaci reakce katalyzované lidským cytochromem P450 1A1. V případě „supersomálního“ systému obsahujícího lidský CYP1A1 byla pozorována tvorba metabolitů BaP, a to bez ohledu na použitý redukční ekvivalent. Za přítomnosti NADH však prakticky nedošlo k tvorbě metabolitu s neznámou strukturou (Mx), stejně jako v případě jaterních mikrosomů potkana. Také množství dalších metabolitů BaP bylo nižší než v přítomnosti NADPH. Přidání cyt  $b_5$  vedlo ke stimulaci tvorby jednotlivých metabolitů. Množství metabolitů v tomto případě bylo dokonce srovnatelné s množstvím metabolitů tvořených v případě iniciace reakce pomocí NADPH v systému bez cyt  $b_5$  (Obrázek 24).

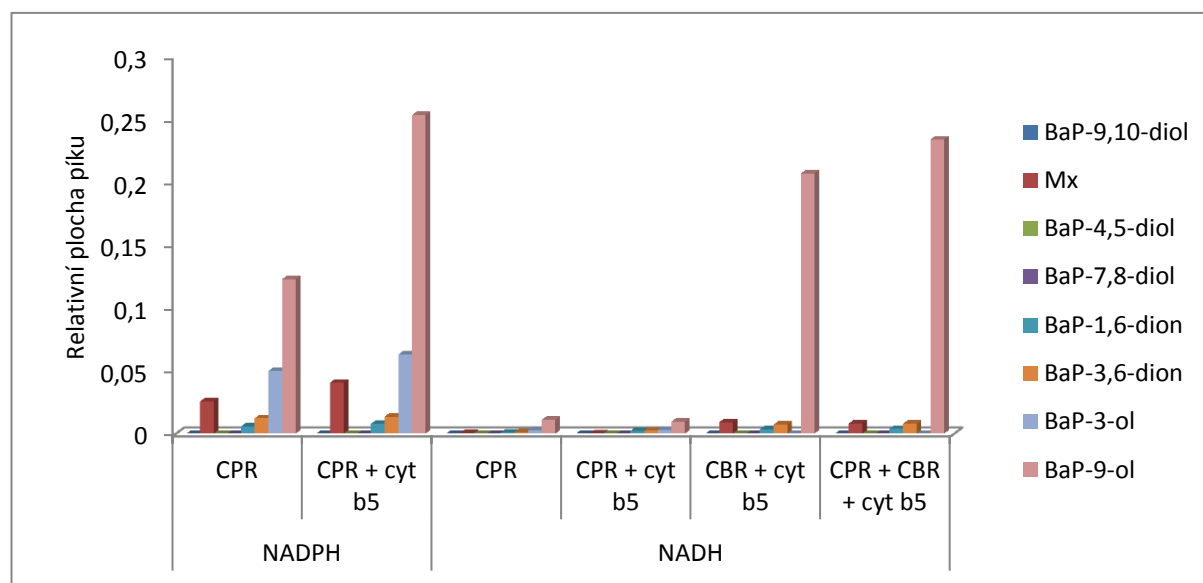


**Obrázek 24** Množství metabolitů BaP tvořených lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup> a vliv cyt b<sub>5</sub> na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a statistické odchylky tři paralelních měření. \*P < 0,001, statistické rozdíly mezi metabolity tvořenými s NADPH a NADH. Studentův t-test.

„Supersomální“ systém lidského CYP1A1 představuje mikrosomy izolované z hmyzích buněk. Jako takový tedy tento systém obsahuje celou paletu enzymů, včetně NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy a cyt b<sub>5</sub>. Oproti tomuto enzymovému systému byl jako další systémem použit „bactosomální“ systém lidského CYP1A1. Jak již bylo uvedeno, tento systém představuje membránovou frakci buněk *E. coli*, v nichž byl rekombinantně exprimován příslušný cytochrom P450 a CPR. Neobsahuje tedy cytochrom b<sub>5</sub>, ani jeho reduktasu. Iniciace oxidace BaP pomocí NADH v tomto případě byla zcela neefektivní. Také přidání cyt b<sub>5</sub> nemělo žádný vliv na oxidaci BaP tímto systémem. Pokud však byl cyt b<sub>5</sub> přidán společně se svojí reduktasou (NADH:cyt b<sub>5</sub> reduktasou), byla tvorba metabolitů BaP pozorována. Stejně jako v případě „Supersomálního“ systému však nebyla pozorována tvorba metabolitu o neznámé struktuře. Přesná kvantifikace množství jednotlivých metabolitů však nebyla možná, a to v důsledku nečistot obsažených v izolované NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktase.

Posledním systémem, se kterým byl testován vliv NADH na iniciaci reakčního cyklu cytochromu P450 1A1, byl rekonstituovaný systém tohoto cytochromu P450 s jednotlivými členy systému oxidas se smíšenou funkcí. Lidský rekombinantní CYP1A1 rekonstituovaný s NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR) vykazoval za přítomnosti NADH pouze nepatrnou schopnost tvořit metabolity BaP za přítomnosti NADH. Množství metabolitů

dosahovalo cca 5 % množství metabolitů, jež bylo tvořeno stejným systémem za přítomnosti NADPH. Ani přidání cytochromu  $b_5$  nemělo žádný pozorovatelný efekt na tvorbu metabolitů BaP tímto systémem (Obrázek 25). V systému s NADH, v němž byla NADPH:cytochrom P450 reduktasa nahrazena NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou (CBR) však došlo k významné tvorbě metabolitů BaP, a to v případě že byl současně přítomen cyt  $b_5$ . Pokud byla v rekonstituovaném systému přítomna jak CPR, tak CBR, došlo k další stimulaci tvorby metabolitů BaP. V případě absence cyt  $b_5$  však tvorba metabolitů BaP nebyla pozorována (Obrázek 25).



**Obrázek 25** Množství metabolitů BaP generovaných CYP1A1 rekonstituovaným s jednotlivými složkami monoxygenasového cyklu. Data v obrázku jsou průměry dvou paralelních měření.

Z výsledků obsažených v této kapitole je patrné, že tvorby metabolitů BaP je možné dosáhnout i v případě nahrazení NADPH, jakožto přirozeného kofaktoru NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR), jiným kofaktorem NADH, a to v případě současné přítomnosti cyt  $b_5$  a NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasy (CBR). Tyto výsledky tak naznačují, že cyt  $b_5$  může v kombinaci s CBR aktivovat reakční cyklus cytochromu P450, a to bez ohledu na (ne)přítomnost CPR. Je tedy možné, že cyt  $b_5$  se může účastnit nejen druhé redukce v rámci reakčního cyklu CYP1A1, jak mu je po léta přisuzováno, ale může participovat i na první redukci tohoto cytochromu P450 v jeho reakčním cyklu.



Výsledky prezentované v této kapitole jsou také ve shodě s pozorováním tvorby aduktů BaP s DNA tvořených jaterními mikrosomy, či některými rekonstituovanými systémy cytochromu P450 1A1 za přítomnosti NADH, jež jsou uvedeny v kapitole 5.5.

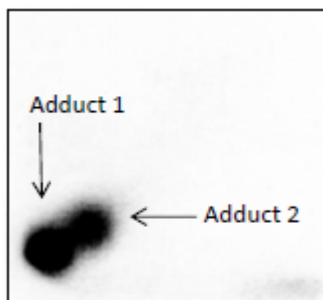
## 5.5 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA *in vitro*

V další části předkládané dizertační práce jsme studovali tvorbu aduktů BaP s DNA. V experimentech jsme pro metabolickou aktivaci BaP používali několik enzymových systémů popsanych v předchozích částech dizertační práce jako systémy metabolizující BaP. Použity byly jaterní mikrosomy laboratorního potkana, různých myších modelů a lidské jaterní mikrosomy. Dále pak potkaní a lidské rekombinantní CYP1A1 exprimované v Supersomech<sup>TM</sup> a membránách *E. coli* (Bactosomech). Použity byly i purifikované enzymy. BaP je po své metabolické aktivaci cytochromy P450, buď samotnými cytochromy P450, nebo ve spolupráci s epoxidhydrolasou schopen kovalentně modifikovat DNA. Vzniklé adukty s DNA byly analyzovány metodou <sup>32</sup>P-postlabeling (viz kapitola 4.2.5).

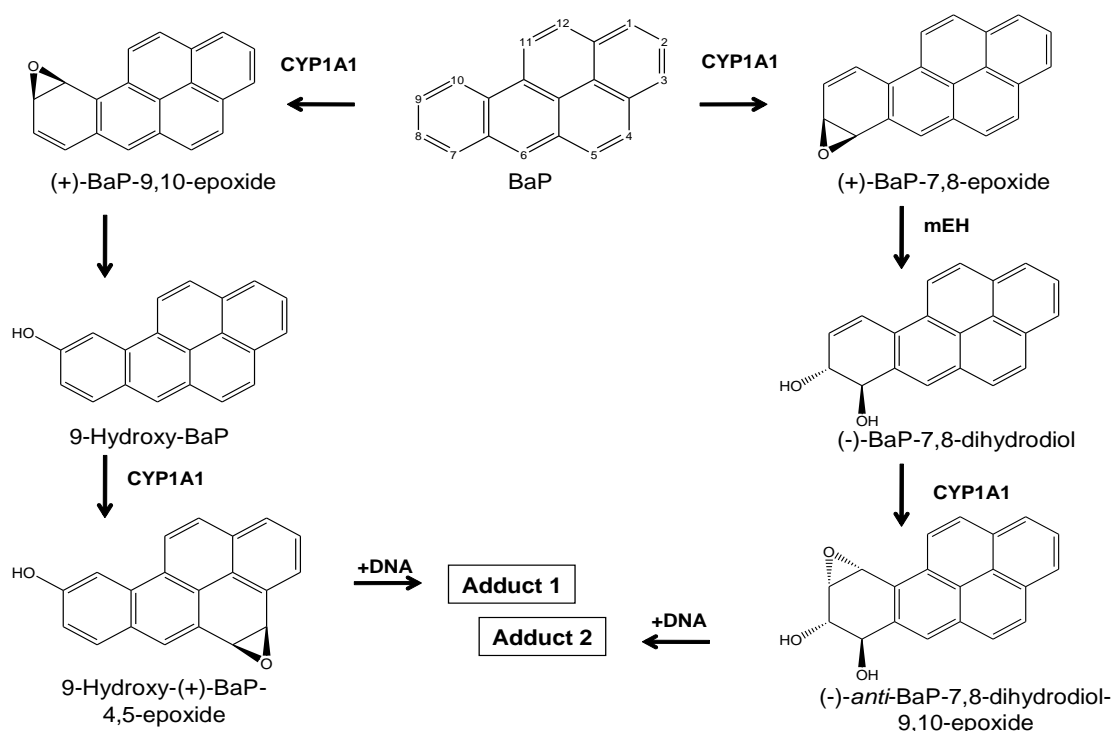
### 5.5.1 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaními jaterními mikrosomy

V experimentech byly testovány jak jaterní mikrosomy potkanů, ve kterých byla indukována exprese CYP1A1, enzymu, který efektivně oxiduje BaP, tak i jaterní mikrosomy potkanů kontrolních. V těch exprese cytochromů P450 nebyla modulována žádným z induktorů těchto enzymů. Pro indukci exprese CYP1A1 byly použity dvě sloučeniny, Sudan I, známý jako silný induktor CYP1A1 (138; 142) a samotný BaP, který CYP1A1 rovněž efektivně indukuje (146; 145).

BaP je metabolicky aktivován všemi testovanými potkaními mikrosomy za tvorby dvou majoritních aduktů s DNA. Jedním z aduktů je adukt tvořený z BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE), 10-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP (dG-N<sup>2</sup>-BPDE, adukt 2) (Obrázek 26 a Obrázek 27). Dalším aduktem tvořeným v DNA po aktivaci BaP jaterními mikrosomy potkana byl detekován adukt generovaný z metabolitu BaP, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP, reakcí s deoxyguanosinem v DNA (Obrázek 26 a Obrázek 27).



**Obrázek 26** Autoradiografie aduktů BaP s DNA vzniklých jeho aktivací v potkaních jaterních mikrozomech. Aduktů aktivovaného BaP s DNA byly analyzovány metodou  $^{32}\text{P}$ -postlabeling



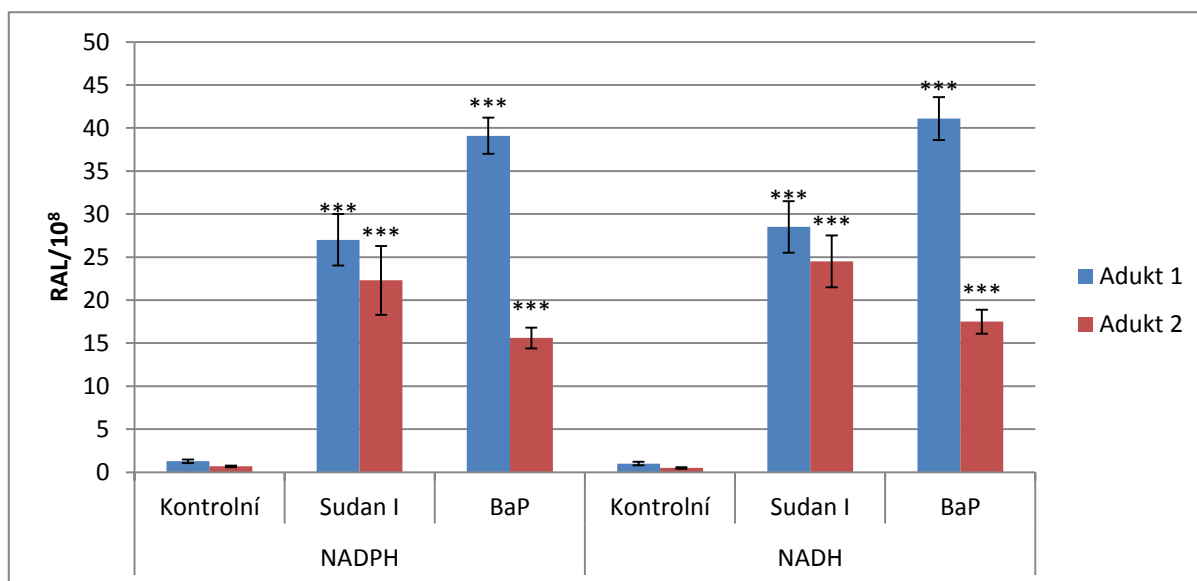
**Obrázek 27** Schéma metabolické aktivace BaP (CYP1A1, cytochrom P450 1A1, mEH, mikrosomální epoxidhydrólaza).

Indukce CYP1A1 Sudanem I a BaP vedla až k 28mi násobnému zvýšení tvorby aduktů z metabolitů BaP s DNA (Obrázek 28). Získané výsledky tedy odpovídají „nabohacení“ mikrosomů cytochromem P450 1A1, jehož exprese byla indukována působením obou látek.

Obecně jsou cytochromy P450 závislé na dodání elektronu z NADPH, katalyzovaná enzymem NADPH:CYP reduktasou (91). Proto jsme se v první fázi výzkumu aktivace BaP

systemem cytochromu P450 zaměřili na poznání efektivitu NADPH jako donoru elektronů přenášených na CYP prostřednictvím této reductasy (Obrázek 28). Nicméně, analogicky s experimenty sledujícími oxidaci BaP enzymovými systémy (viz kapitola 5.4.1), jsme v dalších experimentech sledovali efektivitu i kofaktoru NADH:cytochrom  $b_5$  reductasy, NADH.

Z výsledků uvedených v Obrázek 28 je patrné, že oba kofaktory působí jako donory elektronů pro redukci cytochromů P450 v mikrosomálním systému jater potkana a aktivují BaP za tvorbu aduktů s BaP se srovnatelnou aktivitou. Výsledky napovídají, že nejen NADPH:CYP reductasa, známá jako enzym přenášející elektrony z NADPH na cytochromy P450, ale i další enzym, mikrosomálního monooxygenasového systému, NADH:cytochrom  $b_5$  reductasa, je v přenosu elektronů účinný (v přenosu elektronů z NADH na cytochromy P450). Získané výsledky byly analogické s výsledky zjištěnými v experimentech sledujících metabolismus BaP. BaP je metabolizován jaterními mikrosomy potkana i za přítomnosti NADH místo NADPH (viz kapitola 5.4.1).

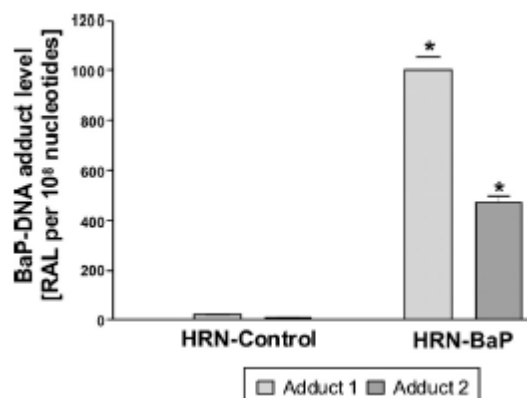


**Obrázek 28** Tvorba aduktů BaP aktivovaného potkaními jaterními mikrosomy kontrolních zvířat, nebo zvířat premedikovaných Sudanem I, respektive BaP. Inkubace probíhaly za přítomnosti buď NADPH nebo NADH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\*\* $P < 0,001$ , signifikantní změny v množství aduktů BaP s DNA oproti tvorbě v kontrolních mikrosomech. Studentův  $t$ -test.

### 5.5.2 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA jaterními mikrosomy myší s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech (HRN myši)

V dalších experimentech jsme sledovali aktivaci BaP jaterními mikrosomy myší linie HRN („hepatic reductase null“), modelu s deletovanou NADPH:CYP reduktasou v játrech. Použity byly jaterní mikrosomy tohoto experimentálního modelu, ve kterém byl CYP1A1 indukován premedikací s BaP (viz postupy popsané v publikaci, které tvoří přílohu č. 4 dizertační práce).

Jaterní mikrosomy obou testovaných modelů aktivují BaP za tvorby aduktů s DNA (aduktů 1 a 2) (Obrázek 29). Enzymy jaterních mikrosomů myšího modelu s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech (HRN myši) premedikovaných BaP byly v aktivaci BaP za přítomnosti NADPH v inkubačních směsích statisticky významně aktivnější, než jaterní mikrosomy myší nepremedikovaných BaP (Obrázek 29). Tyto výsledky prokazují, že v jaterním mikrosomálním systému testovaných myší je NADPH:CYP reduktasa esenciální pro redukci CYP1A1, která je nutná k oxidaci BaP tímto enzymem.



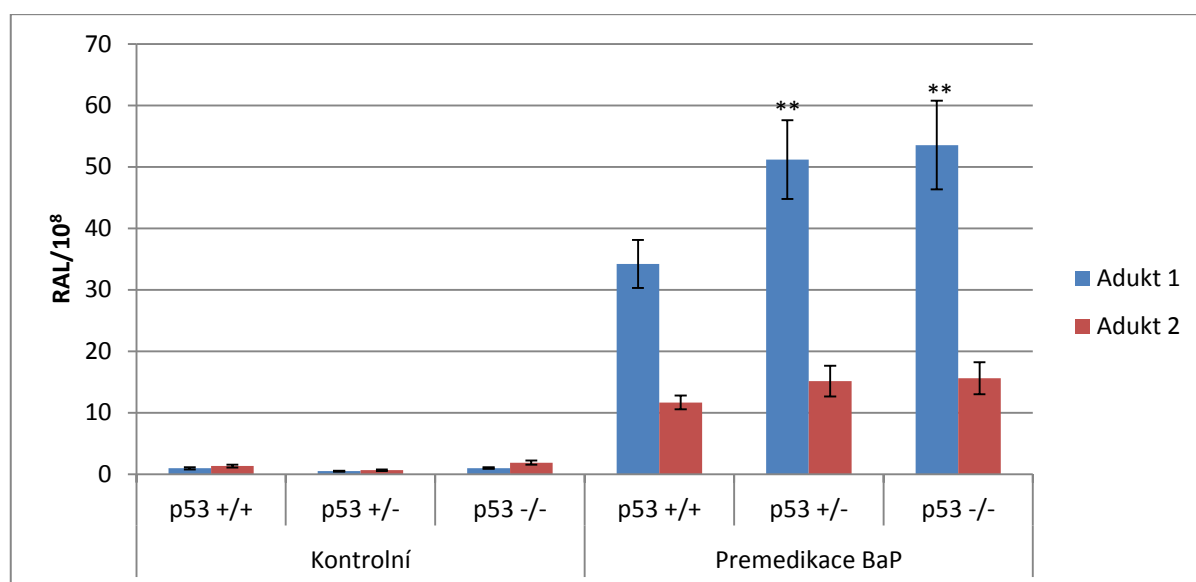
**Obrázek 29** Tvorba aduktů BaP aktivovaného myšími jaterními mikrosomy s DNA (myší modely s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech – HRN – bezpremedikace BaP a exponovaných BaP). Inkubace probíhaly za přítomnosti buď NADPH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \* $P < 0,001$ , statisticky rozdílný nárůst množství metabolitů BaP od dat získaných s mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) myší HRN (control). Studentův t-test.

### 5.5.3 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA jaterními mikrosomy myší modifikovaných genem lidského proteinu p53

Při studiu indukce exprese CYP1A1 bylo v několika laboratořích zjištěno, že exprese CYP1A1 může souviset se stavem exprese tumorového supresorového proteinu p53 (156). V komplexní studii prováděné se zahraničními spolupracujícími laboratořemi (viz výsledky

uvedené v rukopisu publikace uvedeného jako příloha č. 2 dizertační práce) jsme se snažili uvedenou problematiku osvětlit. K tomu bylo nutné i experimenty sledující podíl CYP1A1 na metabolismu BaP a jeho aktivaci za tvorby aduktů s DNA v modelech geneticky modifikovaných genem lidského proteinu p53. V této kapitole práce uvádíme výsledky získané při studiu aktivace BaP jaterními mikrosomy myši s různým stavem introdukovaného genu lidského proteinu p53, experimentů, které byly součástí uvedené komplexní studie.

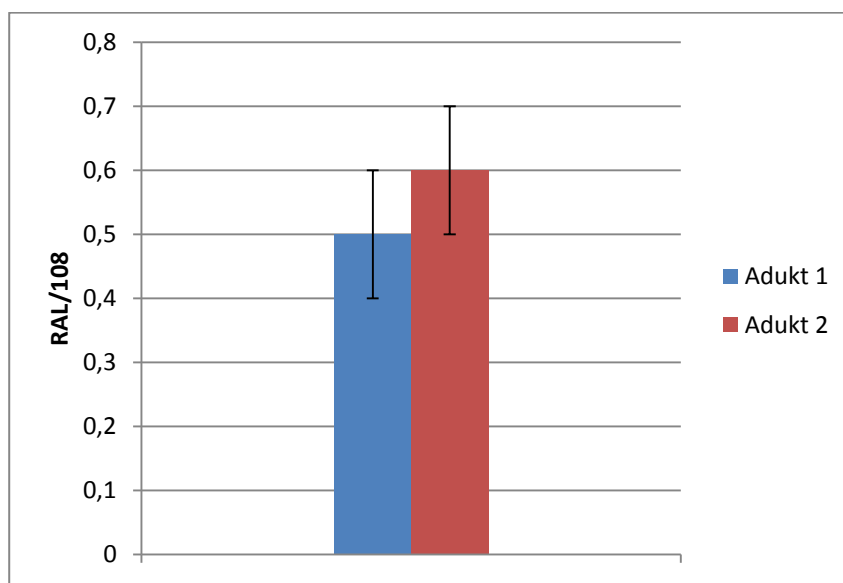
V experimentech byly užity jaterní mikrosomy izolované z testovaných myších modelů, a to jak kontrolních (nepremedikovaných) myši, tak i myši premedikovaných induktorem CYP1A1, BaP. Ze získaných výsledků (Obrázek 30) vyplývá, že také mikrosomy těchto myších linií jsou za přítomnosti kofaktoru NADPH:CYP reductasy, NADPH, účinné v aktivaci BaP za tvorby aduktů s DNA. Oba adukty aktivovaného BaP s DNA (adukt 1 a 2) jsou tvořeny i těmito mikrosomálními systémy. Stav proteinu p53 neměl žádný vliv na aktivaci BaP jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) zvířat. Naopak, po indukci CYP1A1, stav proteinu p53 ovlivňoval aktivaci BaP, zejména tvorbu aduktu 1, generovaného z 9-hydroxy-4,5-epoxidu BaP (Obrázek 30). Získané výsledky přispěly k poznání, že tumorový supresorový protein p53 ovlivňuje aktivaci BaP na metabolity tvořící s DNA (viz výsledky v rukopisu práce uvedené jako příloha č. 2 dizertační práce).



**Obrázek 30** Tvorba aduktů BaP aktivovaného myšími jaterními mikrosomy z kontrolních, respektive premedikovaných zvířat s DNA (myší modely geneticky modifikované genem lidského proteinu p53, myší modely p53+/+, p53 +/- a p53 -/-). Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\*\*P<0,001, signifikantní změny v množství aduktů BaP s DNA tvořených v uvedených mikrosomech (myších modelů p53+/- a p53-/-) oproti tvorbě v mikrosomech myši p53+/+. Studentův t-test.

#### 5.5.4 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidskými jaterními mikrosomy

BaP je metabolicky aktivován i jaterními mikrosomy člověka. V experimentech byly použity mikrosomy z komerčního zdroje (Corning (USA), směsný vzorek z jater více než 60ti lidských jedinců). Aktivací BaP těmito mikrosomy byly opět generovány dva adukty BaP s DNA, adukt 1 a 2 (Obrázek 31). Lidské jaterní mikrosomy však byly méně aktivní než mikrosomy všech testovaných zvířecích modelů. Získané výsledky odpovídají již dříve popsaným poznatkům, prokazujícím, že CYP1A1 jako majoritní enzym aktivující BaP, je v lidských játrech exprimován v extrémně nízkém množství (148; 137).



**Obrázek 31** Tvorba aduktů BaP aktivovaného lidskými jaterními mikrosomy BaP s DNA. Data v obrázku jsou průměry tří paralelních měření. Studentův t-test.

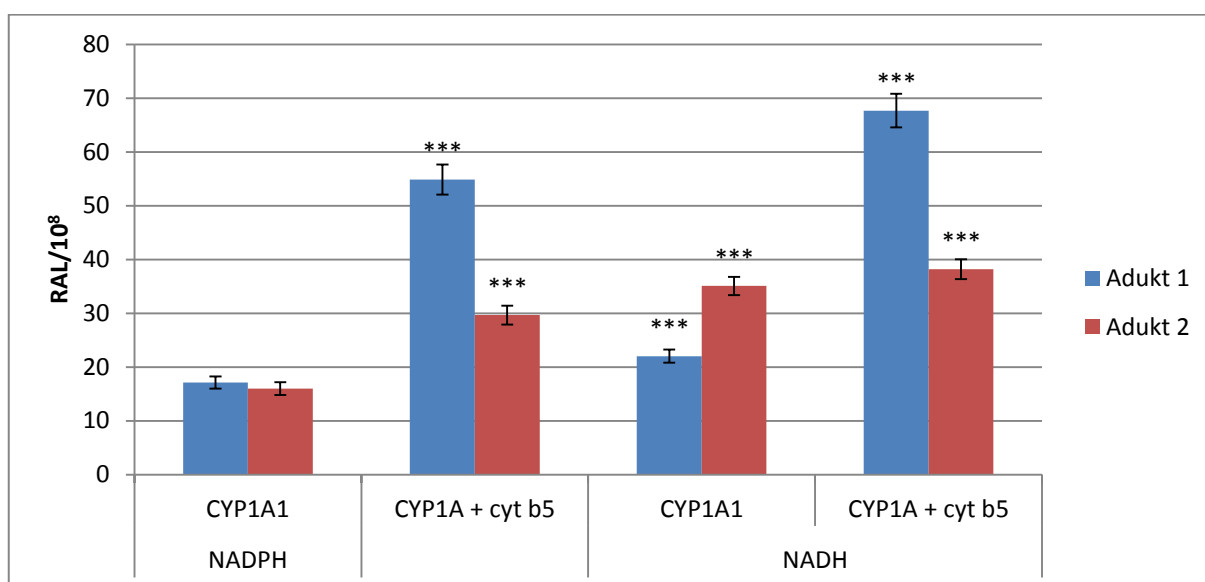
#### 5.5.5 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaními a lidskými cytochromy P450 1A1

##### 5.5.5.1 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaním cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech™

Výsledky získané v experimentech, kde byla testována aktivace BaP jaterními mikrosomálními systémy laboratorního potkana signalizují, že redukce cytochromu P450 1A1 při oxidaci BaP může být zprostředkována nejen elektrony z NADPH přenesenými pomocí NADPH:CYP reductasy, ale i z NADH, přenesenými NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasou. V další části práce jsme proto studovali tuto eventualitu, a to za použití definovaného systému potkaního rekombinantního CYP1A1 exprimovaného v Supersomech™ (viz tato kapitola) a

purifikovaného potkaního rekombinantního CYP1A1 rekonstituovaného s dalšími složkami monoxygenasového mikrosomálního systému (viz kapitola 5.5.5.2). Sledován byl i vliv cytochromu b<sub>5</sub> na účinnost potkaního CYP1A1 aktivovat BaP. „Supersomální“ systém (mikrosomy hmyzích buněk, které byly transfekovány potkaními cytochromy P450) obsahuje vedle potkaního CYP1A1 také další složky mikrosomálního monoxygenasového systému eukaryotních organismů (viz popis produktů firmy Corning (USA)).

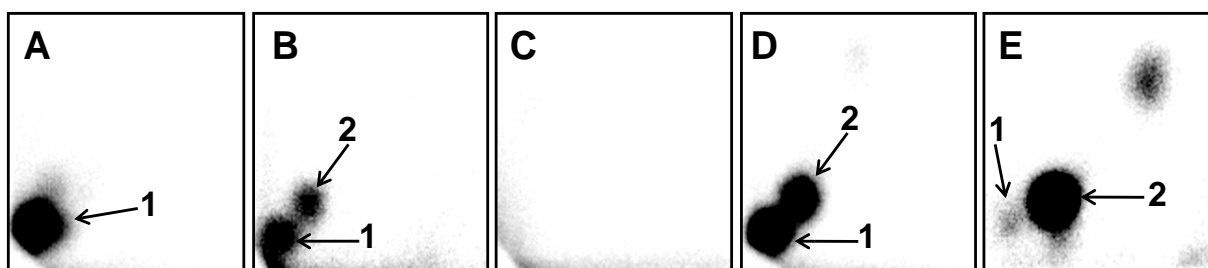
Potkaní rekombinantní CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup> aktivuje BaP za tvorby dvou aduktů (1 a 2) s DNA, aduktů, které byly generovány i dalšími mikrosomálními systémy (Obrázek 27). K aktivaci BaP za tvorby uvedených aduktů dochází nejen za přítomnosti NADPH, ale i NADH. Aktivace BaP byla dokonce vyšší za přítomnosti NADH, než za přítomnosti NADPH (Obrázek 32). Cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje účinnost potkaního CYP1A1 aktivovat BaP, a to jak v systému s NADPH, tak i NADH. Získané výsledky prokazují, že metabolická aktivace BaP potkaním cytochromem P450 1A1 je katalyzována nejen za účasti NADPH jako donoru elektronů přenášených NADPH:CYP reduktasou na cytochrom P450 při jeho dvou redukcích, ale i za účasti NADH jako donoru elektronů přenášených NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou v první i druhé redukci CYP1A1. Výsledky také plně odpovídají výsledkům z experimentů, které sledovaly oxidaci BaP na jeho metabolity, popsané v kapitole 5.3.1. I v tomto případě byl BaP oxidován potkaním CYP1A1 i za přítomnosti NADH. To jsou poznatky, které dosud nebyly v literatuře popsány.



**Obrázek 32** Tvorba aduktů BaP s DNA aktivovaného potkaním CYP1A1 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup>. Inkubace probíhaly za přítomnosti buď NADPH nebo NADH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\*\* $P < 0,001$ , signifikantní změny v množství aduktů BaP s DNA tvořených potkaním CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup> oproti tvorbě v Supersomech<sup>TM</sup> za přítomnosti pouze NADPH. Studentův t-test.

### 5.5.5.2 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA potkaním cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou, cytochromem b<sub>5</sub> a epoxid hydrolasou

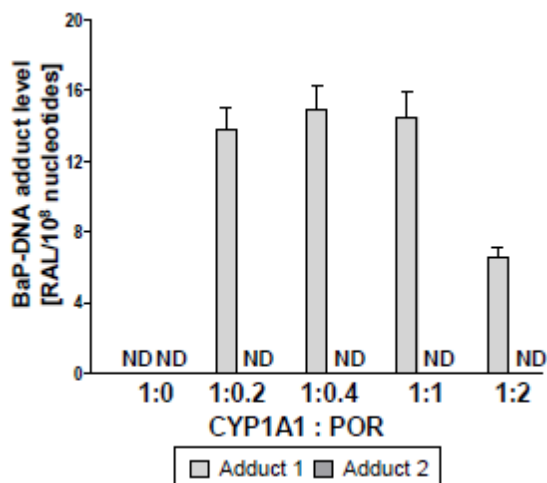
Další část předkládané dizertační práce byla zaměřena na studium aktivace BaP pomocí purifikovaného potkaního CYP1A1 rekonstituovaného v systémech obsahujících další složky monooxygenasového systému, jmenovitě NADPH:CYP reduktasu, cytochrom b<sub>5</sub> a navíc enzym epoxid hydrolasu v prostředí liposomů, simulujících situaci v membráně endoplasmatického retikula. Zde byly v první řadě hledány optimální poměry enzymů v rekonstituovaném systému CYP1A1. Tedy optimální množství NADPH:CYP reduktasy vůči množství CYP1A1. Vzhledem k použité reduktase (NADPH:CYP reduktasa), byl pro aktivaci reakce jako kofaktor užit NADPH. NADH nebyl testován, neboť je pro NADPH:CYP reduktasu velmi špatným kofaktorem (viz výsledky uvedené v Obrázek 25 a Obrázek 41). Potkaní CYP1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reduktasou tvoří z BaP pouze adukt 1 tvořený z 9-hydroxy-4,5-epoxidu BaP (Obrázek 33 a Obrázek 34). To je očekávaný výsledek, neboť pro tvorbu aduktu 2 (dG-N<sup>2</sup>-BPDE) je vedle CYP1A1 nezbytná i hydrolýza metabolitu BaP, 7,8-epoxidu BaP, katalyzovaná epoxidhydrolasou (Obrázek 27).



**Obrázek 33** Autoradiografie aduktů v DNA tvořených BaP po aktivaci s (A), CYP1A1 rekonstitovaným s NADPH:CYP reduktasou NADPH:CYP reduktasou (CYP1A1:reduktasa 1:0.2) za přítomnosti NADPH; (B) CYP1A1 rekonstitovaném s NADPH:CYP reduktasou, mikrosomální epoxidhydrolasou a cytochromem b<sub>5</sub> v poměru 1:0.2:1:3 za přítomnosti NADPH; (C), se stejným rekonstituovaným systémem, ale bez NADPH (kontrolní inkubace); (D), jaterními mikrosomy izolovanými z myši HRN premedikovanými s BaP. E, autoradiografie aduktů tvořených in vivo, v jaterní DNA myši HRN exponovaných BaP. Aduky byly měřeny metodou <sup>32</sup>P-postlabeling. Adukt 1 – tvořený z 9-hydroxy-BaP-4,5-epoxidu s deoxyguanosinem v DNA; Adukt 2 - dG-N<sup>2</sup>-BPDE.

K účinné aktivaci BaP za tvorby aduktu 1 v DNA dochází cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou v poměrech 1:0,2 až 1:1. Naopak zvýšením množství NADPH:CYP reduktasy systému CYP1A1 a této reduktasy až na poměr 1:2 se efektivita rekonstituovaného systému snižuje (Obrázek 34).



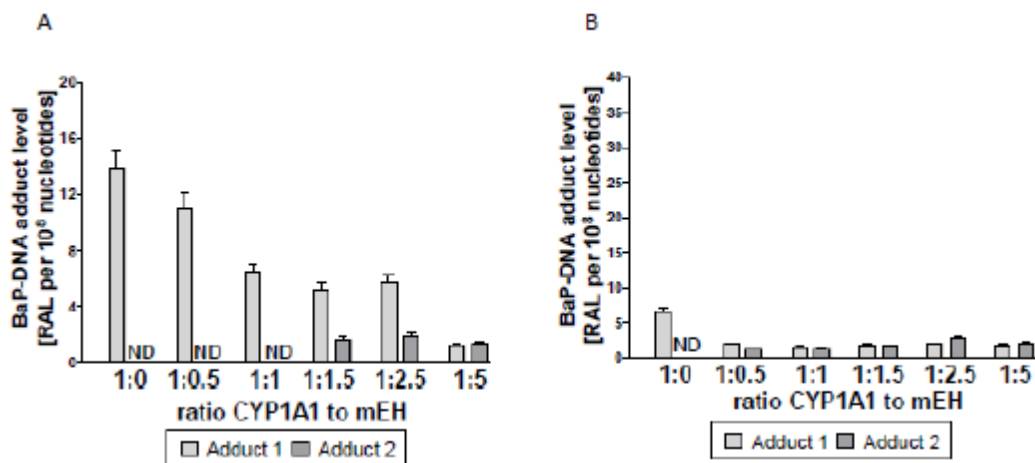


**Obrázek 34** Tvorba aduktu 1 tvořeného v DNA z BaP aktivovaného potkaním CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. Studentův t-test.

V dalších experimentech jsme studovali vliv mikrosomální epoxidhydrolasy na aktivaci BaP potkaním CYP1A1 v rekonstituovaných systémech. Jak je patrné z Obrázek 33 a Obrázek 35, přidání epoxidhydrolasy do rekonstituovaného systému CYP1A1 s NADPH:CYP reduktasou vedlo k tvorbě i aduktu 2, dG-N<sup>2</sup>-BPDE, tvořeného z 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu BaP. V těchto experimentech jsme použili dvě koncentrace NADPH:CYP reduktasy, a to tak, aby enzymy byly v poměru CYP1A1 k NADPH:CYP reduktase 1:0,2 a 1:2. Epoxidhydrolasa byla v rekonstituovaném systému s CYP1A1 v poměru CYP1A1:epoxidhydrolasa 1:0 až 1:5 (1 = 100 pmol CYP1A1) (Obrázek 35).

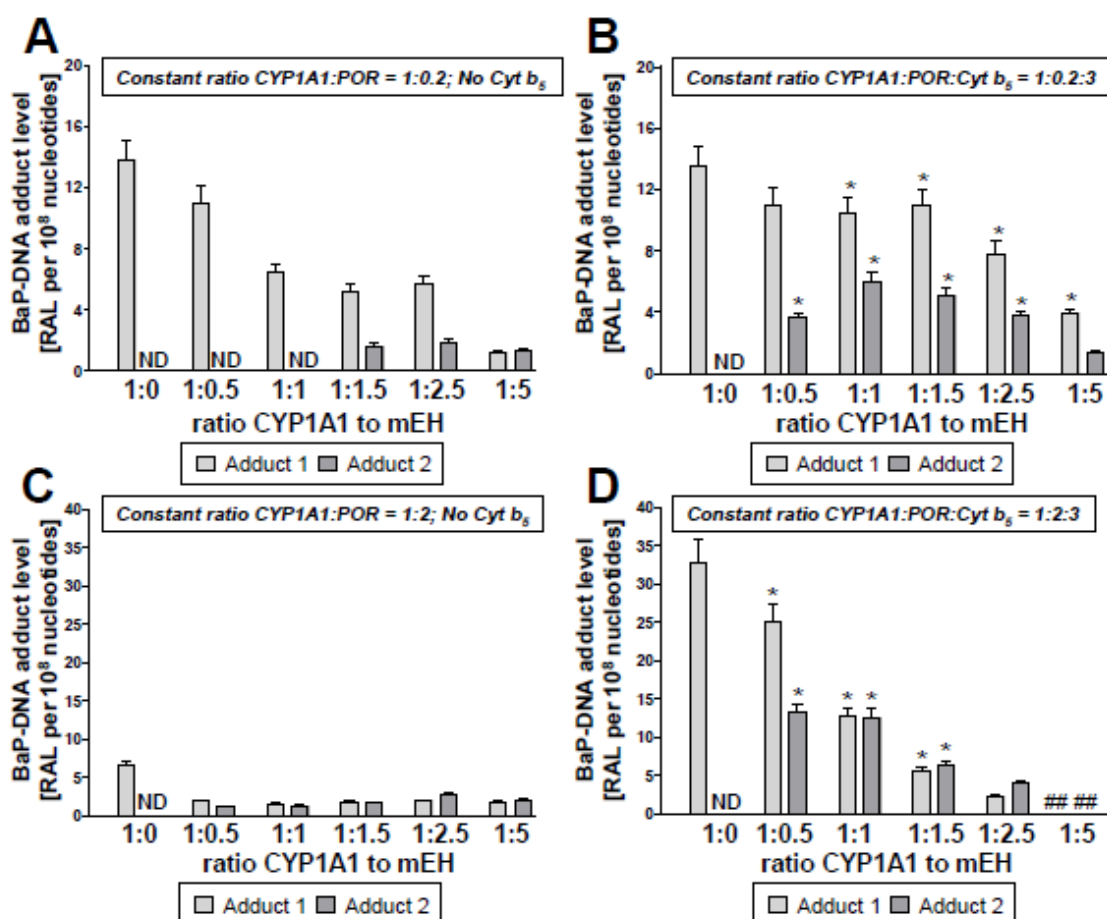
Přítomnost epoxidhydrolasy, za použití vyšší koncentrace NADPH:CYP reduktasy, zvyšuje tvorbu aduktu 2 (dG-N<sup>2</sup>-BPDE) již při nízkých koncentracích tohoto enzymu (epoxidhydrolasy), snižuje však výrazně tvorbu aduktu 1 (Obrázek 35). Za jiného poměru CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasy (1:0,2) je množství tvořeného aduktu 1 rovněž sníženo a ke zvýšení množství aduktu 2 dochází až přidáním epoxidhydrolasy v množství 150 pmol. Za přítomnosti CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasy je tedy tvořen pouze adukt 1, zatímco přítomnost epoxidhydrolasy v systému modifikuje aktivaci BaP ve prospěch tvorby aduktu dG-N<sup>2</sup>-BPDE (Obrázek 35A). Získané výsledky tedy ukazují, že za přítomnosti pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasy je tvořen pouze adukt 1, zatímco přítomnost epoxidhydrolasy v systému modifikuje aktivaci BaP ve prospěch tvorby aduktu dG-N<sup>2</sup>-BPDE. Výsledky prokazují skutečnost, že pro tvorbu aduktu dG-N<sup>2</sup>-BPDE je epoxidhydrolasa esenciálním enzymem, determinujícím hydrolysu 7,8-epoxidu BaP nutného

pro vznik aduktů 2. Metabolit BaP, 7,8-epoxid BaP, je hydrolyzován na 7,8-dihydrodiol BaP, který je oxidován v dalším kroku na BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) a ten reaguje s deoxyguanosinem v DNA za tvorby aduktů dG-N<sup>2</sup>-BPDE (Obrázek 25).



**Obrázek 35** Tvorba aduktů BaP s DNA po aktivaci BaP cytochromem P450 1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reduktasou v poměru 1:0,2 (A) a 1:2 (B) a za přítomnosti epoxidhydrólasy. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. Studentův *t*-test.

Vedle epoxidhydrólasy, ovlivňuje tvorbu obou aduktů BaP s DNA také cytochrom b<sub>5</sub>. Přidání cytochromu b<sub>5</sub> do rekonstituovaného systému cytochromu P450 1A1 rezultovalo v nárůst tvorby obou aduktů BaP s DNA, a to v systému obsahujícím enzymy v poměru CYP1A1 ku NADPH:CYP reduktase 1:2 buď za přítomnosti či při absenci epoxidhydrólasy (Obrázek 36). Avšak množství aduktů 1 v systému, kde enzymy byly v poměru CYP1A1 k NADPH:CYP reduktase 1:0,2 byla téměř identická, a to jak za přítomnosti nebo nepřítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> při absenci epoxidhydrólasy. Naopak přidání cytochromu b<sub>5</sub> do tohoto systému za přítomnosti epoxidhydrólasy zvyšovalo tvorbu obou aduktů BaP s DNA (Obrázek 36A a B). Nejvyšší množství aduktů 1 bylo tvořeno systémem, kde byly přítomny CYP1A1, NADPH:CYP reduktasa a cytochrom b<sub>5</sub> v poměru 1:2:3 (Obrázek 36D). Nejvyšší množství obou aduktů BaP s DNA pak bylo generováno systémem sestávajícím z CYP1A1, NADPH:CYP reduktasy, epoxidhydrólasy a cytochromu b<sub>5</sub> v poměru 1:2:0,5:3 (Obrázek 36D) a dále pak v poměru 1:0,2:1:3 (Obrázek 36B) nebo 1:2:1:3 (Obrázek 36D). Výsledky získané v této studii ilustrují, že CYP1A1 je za vhodných koncentrací epoxidhydrólasy a cytochromu b<sub>5</sub>, a to dokonce za nízkých koncentrací NADPH:CYP reduktasy, schopný účinně aktivovat BaP a tvořit aduktů s DNA.



**Obrázek 36** Vliv cytochromu  $b_5$  na tvorbu aduktů BaP s DNA vznikajících jeho aktivací cytochromem P450 1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reduktasou v poměru 1:0,2 (A, B) a 1:2 a za přítomnosti epoxidhydrólasy (C, D). Cytochrom  $b_5$  byl přítomen v inkubacích, jejichž výsledky jsou uvedeny v panelech B a D. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. Studentův  $t$ -test.

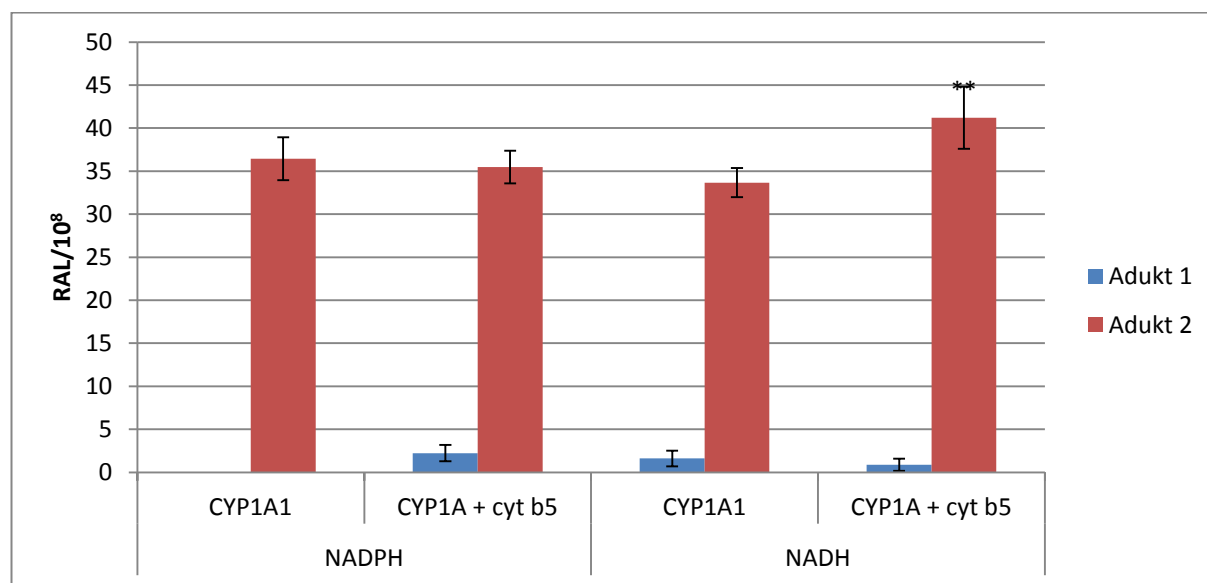
Většina získaných výsledků popsaných v této kapitole je součástí publikace, která je v dizertační práci uvedena jako příloha č. 4. V této publikaci jsou také detailně popsány použité metodické přístupy.

### 5.5.5.3 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup>

V dalších experimentech jsme se zaměřili na sledování účinnosti lidského rekombinantního CYP1A1 exprimovaného v Supersomech<sup>TM</sup>. Experimenty byly prováděny v uspořádání analogickém experimentům s rekombinantním potkaním CYP1A1 (viz kapitola 5.5.5.1). V této části práce jsme opět studovali účinnost kofaktorů obou reduktas přítomných v mikrosomálním monooxygenasovém systému, NADPH jako kofaktoru NADPH:CYP

reduktasy a NADH jako kofaktoru NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy. I zde byl rovněž sledován vliv cytochromu b<sub>5</sub> na účinnost lidského CYP1A1 aktivovat BaP.

Lidský rekombinantní CYP1A1 exprimovaný v Supersomech<sup>TM</sup> aktivuje BaP za tvorby zejména aduktu 2, dG-N<sup>2</sup>-BPDE, zatímco adukt 1 je tvořen buď jako adukt minoritní nebo není generován vůbec (Obrázek 37). A to opět nejen za přítomnosti NADPH, ale i NADH. Množství aduktů BaP s DNA za přítomnosti NADPH či NADH jsou srovnatelná (Obrázek 37). Cytochrom b<sub>5</sub> prakticky neovlivňuje účinnost lidského CYP1A1 aktivovat BaP za tvorby aduktů s DNA za přítomnosti NADPH, a stimuluje tuto účinnost za přítomnosti NADH. Získané výsledky prokazují, že metabolická aktivace BaP lidským cytochromem P450 1A1 je, podobně jako jeho aktivace potkaním CYP1A1, katalyzována nejen za participace NADPH jako donoru elektronů pro cytochrom P450 v jeho dvou redukcích, ale i za účasti NADH jako donoru elektronů přenášených NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou. A to jak v první, tak i druhé redukci CYP1A1. Také tyto výsledky odpovídají výsledkům z experimentů studujících oxidaci BaP na jeho metabolity, popsanych v kapitolách 5.3.2 a 5.4.2.

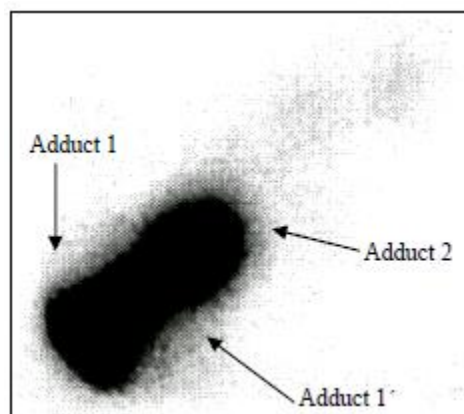


**Obrázek 37** Tvorba aduktů BaP s DNA aktivovaného lidským CYP1A1 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup>. Inkubace probíhaly za přítomnosti buď NADPH nebo NADH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\* $P < 0,01$ , signifikantní změny v množství aduktů BaP s DNA tvořených lidských CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup> oproti tvorbě v Supersomech<sup>TM</sup> za přítomnosti NADPH. Studentův t-test.

#### **5.5.5.4 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v membránách *E.coli* (Bactosomech)**

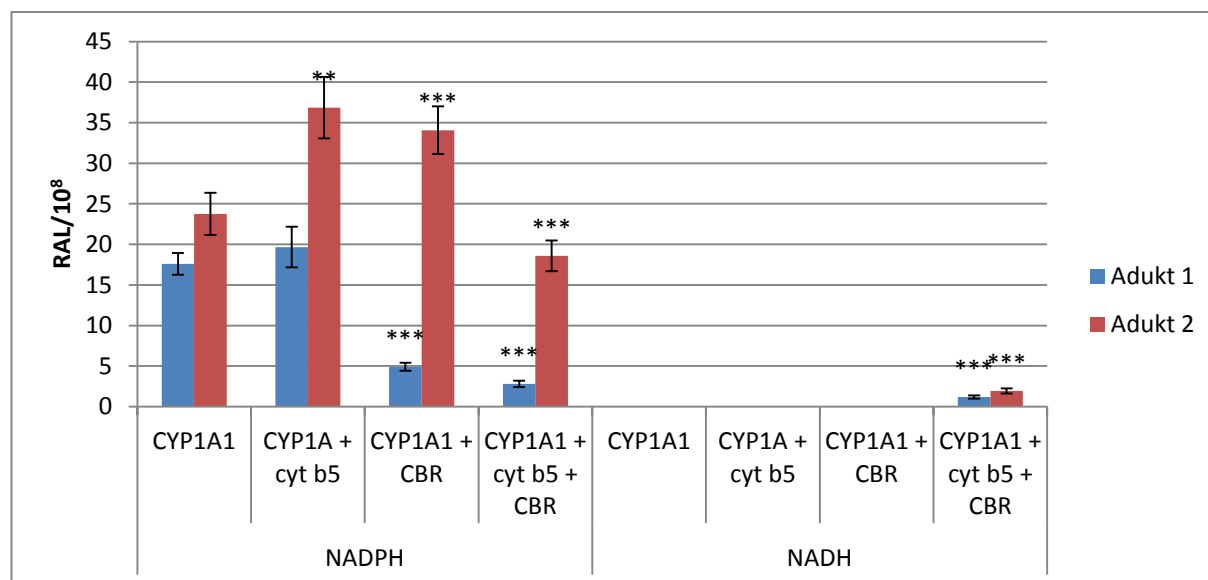
Vzhledem k tomu, že ve studiích sledujících metabolismus BaP byl použit i lidský rekombinantní CYP1A1 exprimovaný v membránách prokaryotního organismu, *E. coli*, studovali jsme účinnost i tohoto systému aktivovat BaP za tvorby aduktů s DNA. Membrány *E. coli* jsou z hlediska přítomnosti enzymů metabolizujících xenobiotika zcela odlišné od membrán endoplasmatického retikula eukaryotních organismů (membrán mikrosomů). Neobsahují ani cytochromy P450, ani jejich reduktasu (NADPH:CYP reduktasu), ani cytochrom  $b_5$  a jeho reduktasu, NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasu, a ani epoxidhydrolasu. Jsou svým složením spíše podobné buněčné membráně eukaryot, která rovněž tyto enzymy neobsahuje. V experimentech testujících aktivaci BaP tímto bakteriálním systémem byly použity membrány *E. coli*, ve kterých byly exprimovány lidský CYP1A1 a lidská NADPH:CYP reduktasa v poměru 1:0,8, a to díky dodání genů obou enzymů (membrány buněk *E. coli* transfekovaných oběma enzymy – systém označovaný jako CYP1A1R). Sledovali jsme opět účinnost kofaktorů obou reduktas schopných redukovat CYP1A1 přítomných v mikrosomálním monooxygenasovém systému (Supersomech<sup>TM</sup>) (viz kapitola 5.5.5.3), NADPH a NADH. I zde bylo také sledováno ovlivnění účinnosti lidského CYP1A1 aktivovat BaP cytochromem  $b_5$ , ale navíc rovněž jeho reduktasou, NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou.

Lidský rekombinantní CYP1A1 exprimovaný v membránách *E. coli* (Bactosomech) aktivuje BaP za přítomnosti NADPH a tvoří alespoň tři adukty s DNA. Majoritně byly tvořeny adukty 1 a 2, generován byl však ještě další adukt separovaný pomocí TLC na PEI-cellulose při analýze aduktů pomocí <sup>32</sup>P-postlabelingu mezi adukty 1 a 2 (označovaný jako adukt 1', Obrázek 38). Cytochrom  $b_5$  zvyšuje efektivitu lidského CYP1A1 v tomto systému, avšak přidání jeho reduktasy, NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasy, izolované v naší laboratoři z jater mikrosomů potkana, snižovalo množství tvořených aduktů BaP s DNA (Obrázek 39). Vysvětlení tohoto jevu je dosud poněkud obtížné. Jedním z vysvětlení může být participace NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasy na jiných reakcích v metabolismu BaP (např. reakcích detoxifikačních), neboť absencí cytochromu  $b_5$ , který je nezbytný pro NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasu, se inhibiční vliv tohoto enzymu snižoval (Obrázek 39). Lze také předpokládat, že inhibice aktivačních reakcí může být způsobena vlivem některých příměsí (např. detergentů) ve finálním preparátu izolované NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasy. Nicméně tyto předpoklady je nutné prokázat dalšími studiemi.



**Obrázek 38** Autoradiografie aduktů v DNA tvořených BaP po aktivaci CYP1A1 exprimovaným v membránách *E. Coli* (Bactosomech).

Na rozdíl od lidské CYP1A1 exprimované v Supersomech<sup>TM</sup>, NADH není kofaktorem systému enzymů exprimovaných v membránách *E. coli*. BaP není aktivován tímto systémem ani za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub>. Pouze systém, do kterého byly přidány preparáty NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy a cytochromu b<sub>5</sub> aktivoval BaP za tvorby aduktů s DNA, ale ve velmi nízké míře (Obrázek 39).

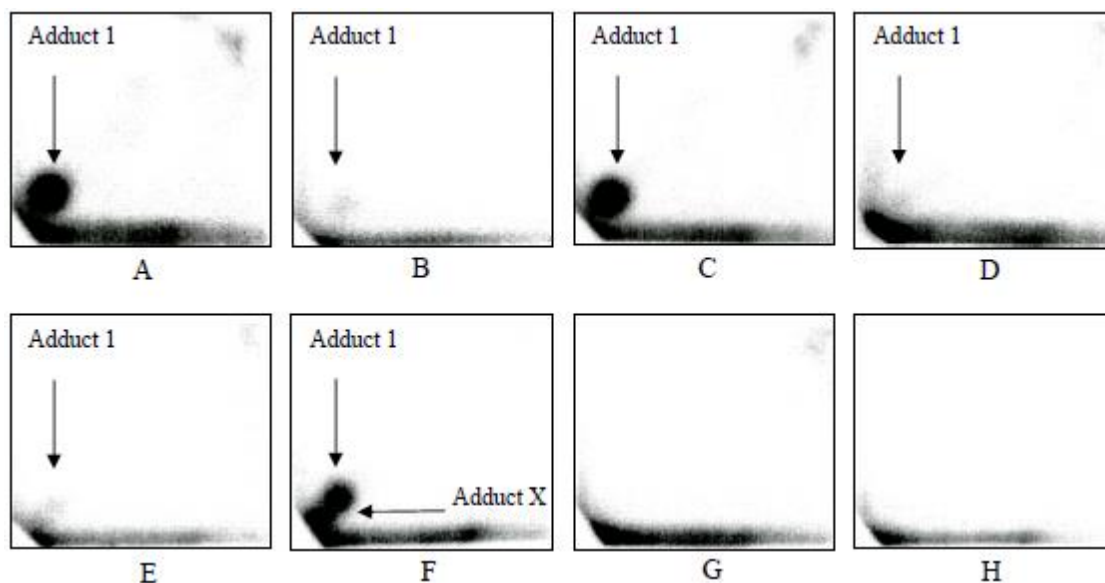


**Obrázek 39** Tvorba aduktů BaP s DNA aktivovaného lidským CYP1A1 exprimovaným v membránách *E.coli* (Bactosomech). Inkubace probíhaly za přítomnosti buď NADPH nebo NADH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\* $P < 0,001$  \*\*\* $P < 0,001$ , signifikantní změny v množství aduktů BaP s DNA tvořených lidským CYP1A1 v Bactosomech oproti tvorbě v Bactosomech za přítomnosti NADPH. Studentův *t*-test.

#### **5.5.5.5 Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA lidským cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou, cytochromem b<sub>5</sub> a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou**

Výsledky uvedené v předchozích částech dizertační práce silně napovídají pro skutečnost, že NADPH:CYP reduktasa není esenciální složkou mikrosomálního monooxygenasového systému. Výsledky signalizují, že oba redukční kroky v reakčním cyklu cytochromu P450 při oxidaci studovaného karcinogenu, BaP, mohou být nahrazeny systémem sestávajícím z cytochromu b<sub>5</sub>, jeho reduktasy, NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy a NADH. Proto jsme se ve finální části výzkumu sledujícího oxidační aktivaci BaP za tvorby aduktů s DNA zaměřili na prokázání tohoto jevu. V experimentech jsme pro aktivaci BaP použili purifikovaný lidský rekombinantní CYP1A1 rekonstituovaný buď s NADPH:CYP reduktasou nebo s NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou a cytochromem b<sub>5</sub> v prostředí liposomů. Testována byla účinnost kofaktorů obou reduktas, NADPH a NADH.

Lidský CYP1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reduktasou v liposomech aktivoval BaP za přítomnosti NADPH za tvorby aduktu 1, generovaného z 9-hydroxy-4,5-epoxidu BaP (Obrázek 40 a Obrázek 41). Ten je rovněž tvořen i potkaním CYP1A1 v rekonstituovaném systému (Obrázek 33A). Potkaní a lidské CYP1A1 jsou v aktivaci BaP prakticky stejně účinné (Obrázek 34 a Obrázek 41). Za přítomnosti NADH místo NADPH, množství tohoto aduktu v uvedeném systému bylo více než o jeden řád nižší než za přítomnosti NADPH. Tyto výsledky prokazují, že NADH je pro NADPH:CYP reduktasu velmi špatným koenzymem a NADH tedy nemůže nahrazovat NADPH při funkci této reduktasy.



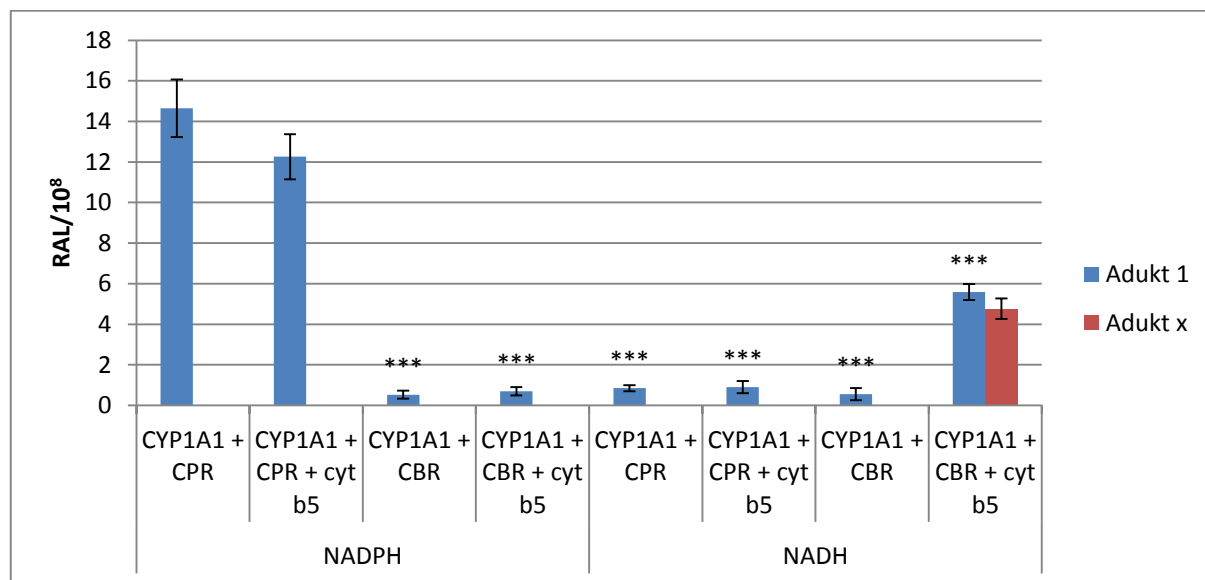
**Obrázek 40** Autoradiografie aduktů v DNA tvořených BaP po aktivaci s (A) CYP1A1 + CPR + NADPH, (B) CYP1A1 + CPR + NADH, (C) CYP1A1 + CPR + cyt b<sub>5</sub> + NADPH, (D) CYP1A1 + CPR + cyt b<sub>5</sub> + NADH, (E) CYP1A1 + CBR + cyt b<sub>5</sub> + NADPH, (F) CYP1A1 + CBR + cyt b<sub>5</sub> + NADH, (G) CYP1A1 + CBR + NADPH, (H) CYP1A1 + CBR + NADH

Lidský CYP1A1 rekonstituovaný s NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou a cytochromem b<sub>5</sub> aktivoval BaP za přítomnosti NADH za tvorby stejného aduktu, generovaného z 9-hydroxy-4,5-epoxidu BaP. Naopak NADPH byl neúčinným kofaktorem tohoto systému a nemůže tedy nahradit úlohu NADH v katalýze NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy (Obrázek 41). To jsou unikátní výsledky, plně prokazující, že systém NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy s cytochromem b<sub>5</sub> je za přítomnosti NADH jako koenzymu této reduktasy účinný jak v první, tak i druhé redukci lidského CYP1A1 v jeho reakčním cyklu. Je zajímavé, že vedle aduktu 1, je systém složený z lidského CYP1A1 rekonstituovaného s NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou a cytochromem b<sub>5</sub> tvořen ještě další adukt, který vykazuje ještě hydrofobnější vlastnosti než adukt 1. Je eluovaný pomocí TLC na PEI-cellulose těsně v blízkosti startu chromatografie (Obrázek 40). Jeho struktura je dosud neznámá. Cytochrom b<sub>5</sub> je pro aktivaci BaP enzymovým, systémem obsahujícím lidský cytochrom P450 1A1 esenciální (Obrázek 40 a Obrázek 41). To je zcela pochopitelný výsledek, neboť jako substrát NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy je pro funkci tohoto enzymu nezbytný. Naopak, tento mikrosomální protein (cyt b<sub>5</sub>) účinnost rekonstituovaného systému lidského CYP1A1 s NADPH:CYP reduktasou aktivaci BaP prakticky neovlivňoval, a to ani za přítomnosti NADPH ani NADH (Obrázek 41).

Získané výsledky odpovídají výsledkům nalezeným při studiu aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA systémy potkaního a lidského CYP1A1 exprimovaného v Supersomech<sup>TM</sup>.



Uvedené výsledky tak plně prokazují zcela nový poznatek, demonstrující, že NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa je se svým substrátem cytochromem b<sub>5</sub> a koenzymem NADH efektivní v přenosu elektronů na CYP1A1 jak v první, tak i druhé redukci reakčního cyklu tohoto cytochromu P450 a může tak plně zastoupit NADPH:CYP reduktasu v tomto procesu.



**Obrázek 41** Tvorba aduktů BaP s DNA aktivovaného lidským CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou (CPR) a NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou (CBR) v liposomech. Inkubace probíhaly za přítomnosti buď NADPH nebo NADH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. \*\*\*P<0,001, signifikantní změny v množství aduktů BaP s DNA tvořených lidským CYP1A1 oproti tvorbě tímto enzymem s CPR za přítomnosti pouze NADPH. Studentův t-test.

## 5.6 Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4

Dalším xenobiotikem, které bylo v rámci vypracování dizertační práce studováno, byl rostlinný alkaloid ellipticin. Ellipticin je podobně jako benzo[a]pyren metabolicky přeměňován cytochromy P450 na své metabolity, přičemž nejaktivnější se v tomto případě jeví CYP3A4. Ten je schopen přeměňovat ellipticin za vzniku 5 metabolitů, jmenovitě 7-, 9-, 12- a 13-hydroxyellipticinu a N<sup>2</sup>-oxidu ellipticinu.

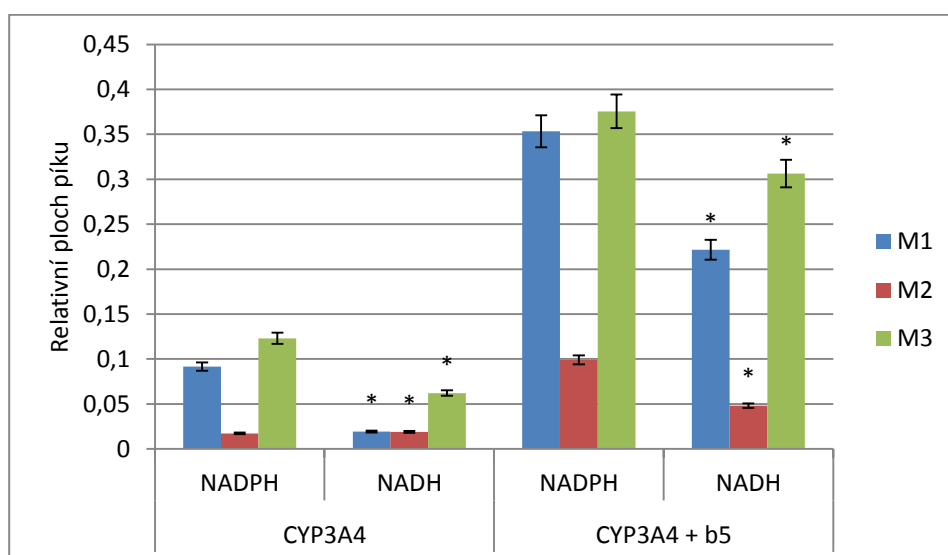
Řada studií se zabývá vlivem cyt b<sub>5</sub> na cytochrom P450 3A4. Jedním z popsáných mechanismů vlivu cyt b<sub>5</sub> na CYP3A4 je změna struktury tohoto cytochromu P450 (viz výsledky uvedené v publikaci, které tvoří součást dizertační práce jako příloha č. 5). Za účelem studia tohoto mechanismu bylo zjišťováno, zda i apo-forma cyt b<sub>5</sub> bude v ovlivnění oxidace ellipticinu CYP3A4 účinná. Na základě získaných výsledků je zřejmé, že pro stimulaci oxidace ellipticinu CYP3A4 je nezbytná přítomnost hemu a Fe iontu. Dalším mechanismem vysvětlujícím stimulaci oxidace ellipticinu CYP3A4 je zvýšení rychlosti

donace druhého elektronu (viz výsledky uvedené v publikaci, které tvoří součást dizertační práce jako příloha č. 5).

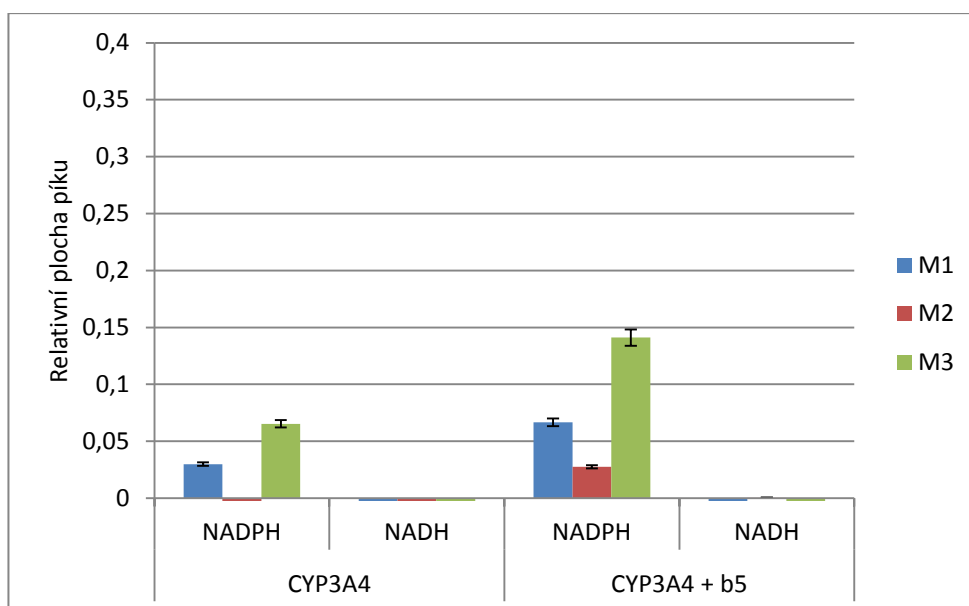
Vzhledem ke schopnosti cyt  $b_5$  stimulovat tvorbu metabolitů benzo[a]pyrenu za iniciace NADH, zajímalo nás též, zda bude tento efekt pozorován i při oxidaci ellipticinu.

Obdobně jako v případě oxidace benzo[a]pyrenu byl metabolismus ellipticinu cytochromem P450 3A4 nejprve zkoumán v eukaryotním expresním systému (Supersomy<sup>TM</sup>). Reakce byla iniciována jednak pomocí NADPH, a jednak NADH. Tvorba metabolitů byla pozorována bez ohledu na použitý iniciační systém (Obrázek 42). V případě „koexprimace“ cyt  $b_5$  došlo ke stimulaci tvorby všech metabolitů ellipticinu. NADPH se v obou případech jevil jako kofaktor efektivnější pro reakci, i když v případě „koexprimace“ CYP3A4 s cyt  $b_5$  došlo k zmenšení rozdílu mezi vlivem NADPH a NADH.

Dalším použitým systémem použitým pro sledování oxidace ellipticinu CYP3A4 byl tento enzym exprimovaný v prokaryotním systému (Bactosomy). Tento systém byl méně účinný v oxidaci ellipticinu na jeho metabolity než systém eukaryotní. Podobně jako v případě eukaryotního systému dochází k nárůstu množství metabolitů po přidání cyt  $b_5$  v případě iniciace reakce pomocí NADPH. Iniciace reakce pomocí NADH, stejně jako v případě oxidace BaP, nebyla účinná, a to jak v případě nepřítomnosti, tak i v případě přítomnosti cyt  $b_5$  (Obrázek 43).



**Obrázek 42** Množství metabolitů BaP ellipticinu tvořených lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaným v Supersomech<sup>TM</sup> a vliv cyt  $b_5$  na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. Studentův *t*-test.



**Obrázek 43** Množství metabolitů BaP ellipticinu tvořených lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaným v membránách buněk *E. coli* (Bactosomy) a vliv cyt  $b_5$  na tento metabolismus. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. Studentův *t*-test.

Část výsledků prezentované v této kapitole je součástí publikace uvedené jako příloha č. 5.



## **6 Diskuze**

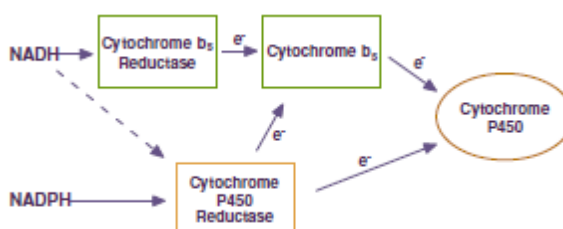
Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem metabolismu (biotransformace) cizorodých látek (xenobiotik) a poznáním mechanismu účinku majoritního enzymového systému, který tento metabolismus katalyzuje. Z xenobiotik byli studováni dva zástupci: environmentální polutant a lidský karcinogen benzo[a]pyren (BaP) a rostlinný alkaloid s protinádorovými účinky, ellipticin. Z enzymů metabolizujících xenobiotika byl studován systém monooxygenas obsahující cytochrom P450 (CYP) jako terminální oxidasu, který je lokalizován v membránách endoplasmatického retikula (v mikrosomech). Cílem bylo poznání metabolitů obou studovaných cizorodých látek a zejména poznání mechanismu participace jednotlivých složek studovaného biotransformačního enzymového systému na oxidaci obou xenobiotik. Cílem bylo rovněž zjistit, zda jeden z použitých experimentálních zvířecích modelů (laboratorní potkan) může být vhodným modelem pro studium metabolismu jednoho ze studovaných xenobiotik, benzo[a]pyrenu, v lidském organismu.

Výsledky získané v dizertační práci potvrzují již dříve zjištěná data, že mikrosomální systémy obsahující cytochromy P450 metabolizují obě testované látky (39; 40; 51; 68; 70; 71; 69). BaP je mikrosomálními systémy použitými v našich experimentech metabolizován za tvorby svých hydroxylovaných derivátů, dionů a dihydrodiolů. Vzniká až osm metabolitů (BaP-9,10-dihydrodiol, BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-3-ol, BaP-9-ol a metabolit s dosud neurčenou strukturou). Tyto výsledky prokazují, že použité mikrosomální systémy obsahují vedle systému cytochromů P450 též enzym epoxidhydrolasu. Tedy enzym, který hydrolyzuje epoxidy BaP, primárně tvořené cytochromy P450, na dihydrodioly. Tvořené metabolity přispívají jak k metabolické detoxikaci BaP (zejména BaP-3-ol), tak k aktivaci BaP. Ta je zodpovědná za iniciaci nádorových procesů tvorbou aduktů s DNA [z metabolitů je to především BaP-7,8-dihydrodiol, tvořící dále 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, (BPDE), jež generuje nejvýznamnější adukt BaP s DNA, 10-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP (dG-N<sup>2</sup>-BPDE)]. Tvorba tohoto aduktu byla při vypracovávání disertační práce skutečně prokázána. Je generován testovanými mikrosomálními systémy (viz obrázky 26-33,35-40). Dalším metabolickým prekursorem BaP zodpovědným za tvorbu aduktů s DNA je BaP-9-ol, tvořící po další oxidaci cytochromy P450 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP, který reakcí s deoxyguanosinem generuje adukt v DNA (adukt 1, viz obrázky 26-41). Uvedené metabolity BaP, rovněž jako i adukty tohoto karcinogenu s DNA byly tvořeny také lidskými jaterními mikrosomy a mikrosomy jater dvou myších modelů. Jednoho, u kterého byl deletován gen pro NADPH:CYP reduktasu v játrech, a druhého, který byl geneticky modifikován introdukcí genu lidského tumorového supresoru,

proteinu p53, a to jaterními mikrosomy myši po jejich vystavení BaP. Ten v játrech a dalších orgánech těchto modelů indukuje CYP1A1.

V komplexní studii prezentované v dizertační práci, využívající řady experimentálních přístupů s různými enzymovými systémy, byly identifikovány cytochromy P450, které jsou v metabolismu BaP neúčinnější. Užity byly jaterní mikrosomy zvířecích modelů, laboratorního potkana a myši, v nichž byla modulována exprese jednotlivých cytochromů P450 jejich induktory, lidské jaterní mikrosomy, mikrosomy hmyzích buněk transfekovaných různými cytochromy P450 potkana a člověka (Supersomy<sup>TM</sup>), membrány buněk *E. coli*, v nichž byl exprimován lidský CYP1A1 a rekombinantní purifikované potkaní a lidské cytochromy P450 1A1 rekonstituované s dalšími složkami mikrosomálního systému v liposomech. Z cytochromů P450 potkana a člověka byl jako neúčinnější enzym oxidující BaP prokázán CYP1A1, následovaný lidským CYP1B1. Z potkaních cytochromů P450 jsou v oxidaci BaP vedle CYP1A1 rovněž účinné cytochromy P450 podrodiny 2C.

Detailní studie se systémy, ve kterých byl CYP1A1 buď indukován nebo heterologně exprimován, pak přinesla zásadní poznatky zpřesňující a rozšiřující dosud obecně přijímaný mechanismus reakčního cyklu cytochromu P450 v mikrosomálním enzymovém systému. V něm bylo dříve celou řadou studií prokázáno, že cytochrom P450 musí být redukován dvěma po sobě následujícími nezávislými jednoelektronovými redukcemi na komplexy, jež výsledně participují na aktivaci biatomické molekuly kyslíku. Jeho jeden atom je pak inkorporován do molekuly substrátu a druhý je redukován na vodu. Za donor elektronů v obou těchto redukcích byl jednoznačně prokázán koenzym NADPH:CYP reductasy, NADPH. V druhé redukcí cytochromu P450 však může elektron dodat i NADH, koenzym systému enzymu NADH:cytochrom  $b_5$  reductasy a jejího substrátu cytochromu  $b_5$  (viz např. (123) (Obrázek 44)). Tento mechanismus byl také přijímán jako jedno z vysvětlení stimulační aktivity cytochromu  $b_5$  na oxidaci určitých substrátů některými cytochromy P450 (114-119).



**Obrázek 44** Schéma transportu elektronů na cytochrom P450 v endoplasmatickém retikulu. Zdroj: Porter (158)

Užitím enzymových systémů obsahujících CYP1A1 (lidský a potkaní CYP1A1) bylo však v dizertační práci jednoznačně prokázáno, že reakční cyklus tohoto cytochromu P450 může probíhat i bez NADPH:CYP reductasy a jejího koenzymu, NADPH. Tento unikátní výsledek, který dosud nebyl v literatuře popsán, byl prokázán celou řadou experimentů. Enzymové systémy jaterních mikrosomů laboratorního potkana, ve kterých byla indukována exprese CYP1A1 a systémy Supersomů<sup>TM</sup> s exprimovaným potkaním a lidským CYP1A1 byly analogicky katalyticky aktivní jak za přítomnosti NADPH, tak za přítomnosti NADH místo NADPH. A to jak v metabolismu BaP na jeho metabolické produkty (Obrázek 23 a Obrázek 24), tak i v aktivaci tohoto karcinogenu za tvorby aduktů s DNA (dG-N<sup>2</sup>-BPDE, adukt 2 a adukt tvořený v DNA z metabolitu BaP, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP, adukt 1, obrázek 26). V případě potkaního a lidského CYP1A1, exprimovaných v Supersomech<sup>TM</sup>, byla navíc aktivita tohoto enzymu stimulována přidáním cytochromu b<sub>5</sub>. Tyto výsledky silně napovídají skutečnosti, že NADPH:CYP reductasa a její koenzym, NADPH, nejsou esenciální pro metabolismus BaP studovanými enzymovými systémy. Fakultativní složky mikrosomálního monooxygenasového systému, cytochrom b<sub>5</sub> a jeho reductasa, NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasa, mohou exklusivně zprostředkovat přenos elektronů z NADH na CYP1A1 v jeho reakčním cyklu místo NADPH:CYP reductasy a jejího koenzymu NADPH. Plně prokázány pak byly tyto skutečnosti za použití purifikovaného lidského rekombinantního cytochromu P450 1A1 rekonstituovaného buď s NADPH:CYP reductasou či NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasou a cytochromem b<sub>5</sub>. Lidský CYP1A1 rekonstituovaný s NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reductasou a cytochromem b<sub>5</sub> v liposomech simulujících prostředí membrán endoplasmatického retikula oxidoval za přítomnosti NADH BaP na jeho hydroxylované metabolity BaP-3-ol a BaP-9-ol, diony BaP-1,6-dion a BaP-3,6-dion a metabolit s dosud neznámou strukturou. Dihydrodioly BaP v tomto systému nebyly tvořeny, vzhledem k absenci epoxidhydrolasy. Přidáním tohoto enzymu však jejich tvorba byla vyvolána. Analogické výsledky byly zjištěny za použití rekonstituovaného rekombinantního CYP1A1 i v tvorbě aduktů BaP s DNA. V uvedeném rekonstituovaném systému byl tvořen pouze adukt 1, generovaný z 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP, který je produktem oxidace BaP cytochromem P450, bez účasti epoxidhydrolasy. Přidání tohoto enzymu (epoxidhydrolasy) do rekonstituovaného systému pak tvorbu aduktu dG-N<sup>2</sup>-BPDE (aduktu 2) zprostředkovalo.

V experimentech použitých při vypracování dizertační práce byl kromě výše uvedených enzymových systémů použit i systém lidského cytochromu P450 1A1 exprimovaného v membránách *E. coli* (Bactosomy). Výsledky získané za použití tohoto enzymového systému, kde CYP1A1 byl exprimován v prokaryotním systému, signalizují, že



není optimální pro metabolické studie *in vitro*. Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách disertační práce, membrány *E. coli* jsou z hlediska přítomnosti enzymů metabolizující xenobiotika zcela odlišné od membrán endoplasmatického retikula eukaryotních organismů (membrán mikrosomů). Neobsahují totiž ani cytochromy P450, ani další složky mikrosomálního monooxygenasového systému, NADPH:CYP reductasu, cytochrom  $b_5$  a jeho reductasu, NADH:cytochrom  $b_5$  reductasu, rovněž jako epoxidhydrolasu. Bactosomální systémy použité v experimentech obsahovaly heterologně exprimovaný lidský CYP1A1 a jeho reductasu, NADHP:CYP reductasu. Byly proto také aktivní v oxidaci BaP a jeho metabolické aktivaci za tvorby aduktů s DNA pouze v omezené míře. Jako funkční se projevil pouze NADPH, NADH metabolismus BaP nezprostředkoval. Až přidání NADH:cytochrom  $b_5$  reductasy a cytochromu  $b_5$  byl BaP za přítomnosti NADH metabolizován. Při analýze aduktů BaP s DNA byl kromě aduktů 1 a 2 nalezen i další adukt, který nebyl generován v žádném systému eukaryotických systémů (potkaní, lidské a myší mikrosomy, CYP1A exprimovaný v mikrosomech hmyzích buněk, Supersomech<sup>TM</sup>). Jeho tvorba je dosud poněkud obtížně vysvětlitelná. Je známo, že v bakteriálních buňkách (*E. coli*) je exprimován též malý bakteriální protein flavodoxin (157). Jedná se o protein, který může redukovat cytochromy P450 exprimované v tomto mikroorganismu. Jeho přítomnost tak může zodpovídat za tvorbu dalších metabolických intermediátů BaP tvořících uvedený adukt s DNA. Tento předpoklad je však nutné prokázat dalšími studiemi.

Výsledky získané v dizertační práci naznačují, že potkaní zvířecí model je vhodným modelem pro studie sledující oxidaci benzo[a]pyrenu v lidském organismu. Metabolity generované jaterními mikrosomy potkana a člověka se v metabolismu BaP lišily minimálně a tvorba dvou aduktů aktivovaného BaP s DNA byla totožná.

Získané výsledky plně naplnily cíle dizertační práce. Detailně byl poznán metabolismus lidského karcinogenu BaP cytochromy P450 na jeho detoxikační a aktivační metabolity, určen byl i cytochrom P450 1A1 jako enzym mikrosomálního monooxygenasového systému, který je v tomto metabolismu nejúčinnější. Model laboratorního potkana byl identifikován jako vhodný pro sledování metabolického osudu BaP v lidském organismu. Zcela zásadní jsou pak výsledky popisující nový mechanismus oxidace BaP katalyzované lidským a potkaním CYP1A1 v reakčním cyklu tohoto enzymu. Získaná data jednoznačně prokazují, že pro redukcí cytochromu P450 1A1 v jeho reakčním cyklu při oxidaci BaP není esenciální NADPH:CYP reductasa, ale že může být plně zastoupena systémem NADH:cytochrom  $b_5$  reductasy s jejím substrátem cytochromem  $b_5$  a koenzymem NADH. Takové výsledky byly

prokázány i pro oxidaci druhého studovaného xenobiotika, protinádorového léčiva ellipticinu, dalším cytochromem P450, lidským CYP3A4.

## **7 Závěr**

Předkládaná dizertační práce přispívá k rozšíření poznatků o funkci jednotlivých složek monooxygenasového enzymového systému lokalizovaného v membráně endoplasmatického retikula v jeho reakčním cyklu. Dále pak rozšiřuje naše znalosti o metabolické přeměně dvou xenobiotik, karcinogenu benzo[a]pyrenu (BaP) a protinádorového léčiva elliptycinu.

Nejdůležitější poznatky, které byly zjištěny v průběhu vypracování dizertační práce, jsou následující:

- ❖ Jaterní mikrosomy izolované z experimentálního modelu laboratorního potkana metabolizují benzo[a]pyren na osm metabolitů (BaP-9,10-dihydrodiol, BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-9-ol, BaP-3-ol a na metabolit o dosud neznámé struktuře). Tyto mikrosomy také aktivují BaP za tvorby aduktů tohoto karcinogenu s DNA
- ❖ Lidské jaterní mikrosomy generují stejné metabolity benzo[a]pyrenu jako potkaní jaterní mikrosomy, s výjimkou metabolitu BaP-9-olu, jenž nebyl v lidském mikrosomálním systému detekován. Dalším rozdílem byla absence tvorby metabolitu BaP o neznámé struktuře lidskými mikrosomy.
- ❖ Existuje několik cytochromů P450, které jsou schopné oxidovat benzo[a]pyren alespoň na jeden z jeho metabolitů, a to jak v případě potkaních, tak i lidských cytochromů P450. Nejeftektivněji se v metabolismu BaP v obou organismech jeví CYP1A1
- ❖ Tvorba dihydrodiolů BaP a aduktu 10-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP v DNA je závislá na přítomnosti dalšího enzymu exprimovaného v membráně endoplasmatického retikula, epoxidhydrólasy
- ❖ Zvyšování koncentrace NADPH:CYP reductasy vůči množství CYP1A1 má stimulační efekt na oxidaci BaP tímto cytochromem P450. V případě CYP1B1 je stimulační efekt pozorovatelný u některých metabolitů pouze při nízkých koncentracích NADPH:CYP reductasy (poměrech NADPH:CYP reductasy k cytochromu P450 maximálně 0,5:1).
- ❖ Fakultativní složka mikrosomálního monooxygenasového systému, cytochrom b<sub>5</sub>, má u většiny testovaných cytochromů P450 stimulační efekt na jejich účinnost oxidovat BaP a tvořit adukty tohoto karcinogenu s DNA

- ❖ Cytochrom  $b_5$  může za přítomnosti své reductasy, NADH:cyt  $b_5$  reductasy, poskytovat oba elektrony v reakčním cyklu cytochromu P450 (v obou redukcích tohoto enzymu)
- ❖ Premedikace myších experimentálních modelů BaP vede ke stimulaci schopnosti oxidovat benzo[a]pyren a tvořit jeho adukty s DA. Tato stimulace byla pozorována jednak v myších modelech s „deletovanou“ NADPH:CYP reductasou v játrech, a jednak u myši geneticky modifikovaných genem lidského proteinu p53.

Výsledky získané v dizertační práci prokazují, že redukci CYP1A1 v jeho reakčním cyklu, při kterém je oxidačně detoxikován i aktivován BaP, může poskytovat elektrony nejen systém NADPH a NADPH:CYP reductasy, ale i systém NADH, NADH:cytochrom  $b_5$  reductasy a cytochromu  $b_5$ . A to v obou redukčních krocích.

Předkládaná dizertační práce přináší originální výsledky, z nichž část již byla publikována formou 4 časopiseckých publikací ve vědeckých periodikách s impaktním faktorem. Jedna publikace je k publikaci zaslaná. Tyto práce jsou v předkládané práci vedeny jako přílohy č. 1-5. Mnohé z výsledků však byly doposud prezentovány jen formou příspěvků na vědeckých kongresech a sympóziích. Tyto výsledky jsou v současné době připravovány pro další časopisecké publikace.



# Seznam použitých zkratk

≈ .....	přibližně
AIDS .....	akutní imunodeficitní syndrom
BaP .....	benzo[a]pyren
BCA .....	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchinová kyselina
BSA .....	hovězí sérový albumin
CHAPS .....	3-[(3-cholamidopropyl) dimetylamonium]-1-propansulfonát
COX-2 .....	cyclooxygenasa 2
CPR .....	NADPH:cytochrome P450 reduktasa
CBR .....	NADH:cytochrom b <sub>5</sub> reduktasa
CYP .....	cytochrom P450
cyt .....	cytochrom
dg .....	diagnóza
DLPC .....	dilauroylfosfatidylcholin
DMSO .....	dimetylsulfoxid
DNA .....	deoxyribonukleová kyselina (deoxynucleic acid)
FAD .....	flavinadenindinukleotid
FMN .....	flavinmononukleotid
FMO .....	flavinové monooxygenasy
GS .....	generující systém
HEPES .....	sodná sůl 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetan-sulfonové kyseliny

HIV .....	lidský imunodeficitní virus
HRN .....	hepatic reductase null
IARC.....	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International agency for research of cancer)
M <sub>Y</sub> .....	metabolit Y
mEH.....	mikrosomální epoxidhydróláza
mRNA.....	messenger ribonukleová kyselina
NADH.....	nikotinamidadeninukleotid
NADPH.....	nikotinamidadeninukleotid fosfát
PAH .....	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB .....	fenobarbital
PCN.....	pregnenolonkarbonitril
SULT .....	sulfotransferáza
TRIS.....	tris(hydroxymetyl)-aminometan
UGT .....	UDP-glukuronosyltransferázy



## **Citovaná literatura**

1. **Český statistický úřad.** *Statistická ročenka České republiky 2013.* Praha : Český statistický úřad, 2013. ISBN 978-80-250-2386-0.
2. **Česká republika.** Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. *Sbírka zákonů.*
3. **Státní ústav pro kontrolu léčiv.** Výroční zpráva 2013. Praha : Státní ústav pro kontrolu léčiv.
4. **Stiborová, M a Mikšanová, M.** Molekulární mechanismus kancerogeneze. *Živa.* 4, 1999.
5. **Barrett, J Cl.** Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives.* 1993, Sv. 100, stránky 9-20.
6. **Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.** *Zemřelí 2012.* Praha : Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013. ISBN 978-80-7472-043-7.
7. **Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.** *Novotvary 2010 ČR.* Praha : Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013. ISBN 978-80-7472-034-5.
8. **International Agency for Research on Cancer.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. *International Agency for Research on Cancer.* [Online] [Citace: 24. 2 2015.] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
9. **Minamoto, T, Mai, Mi a Ronai, Z.** Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1999, Sv. 20, 4, stránky 519-527.
10. **Danaei, G; Hoom, S Vr; Lopez, A D; Murray, C J L; Ezzati, M.** Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005, Sv. 366, 9499, stránky 1784-1793.
11. **Kopnin, B P.** Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry.* 2000, Sv. 65, 1, stránky 5-33.
12. **Anderson, M W; Reynolds, S H; You, M; Maronpot, R M** Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives.* 1992, Sv. 98, stránky 13-24.
13. **Adamson, Eileen D.** Oncogenes in development. *Development.* 1987, Sv. 99, stránky 449-471.

14. **Wasylyk, B; Wasylyk, C; Flores, P; Begue, A; Leprince, D; Stehelin, D.** The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature*. 1990, Sv. 346, stránky 191-193.
15. **Nishimura, S a Sekiya, T.** Human cancer and cellular oncogenes. *Biochemical journal*. 1987, Sv. 243, 2, stránky 313-327.
16. **Muller, P A J a Vousden, K H.** p53 mutations in cancer. *Nature cell biology*. 2013, Sv. 15, stránky 2-8.
17. **Levine, A J, Momand, J a Finlay, C A.** The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991, Sv. 351, 6326, stránky 453-456.
18. **Parkinson, Andrew.** Biotransformation of xenobiotics. 2001.
19. **Hodgson, Ernest.** *A textbook of modern toxicology*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-26508-X.
20. **Parkinson, Andrew; Ogilvie, Brian W; Paris, Brandy L; Hensley, Tiffini N; Loewen, Greg J.** Human biotransformation. *Biotransformation and metabolite elucidation of xenobiotics*. 2010.
21. **Spear, B B, Heath-Chiozzi, M a Huff, J.** Clinical application of pharmacogenetics. *Trends in molecular medicine*. 2001, Sv. 7, 5, stránky 201-204.
22. **Wilkinson, G R.** Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England journal of medicine*. 2005, 352, stránky 2211-2221.
23. **Goodwin, S, Smith, A F a Horning, E C.** Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *Journal of the American Chemical Society*. 1959, Sv. 81, 8, stránky 1903-1908.
24. **Ansari, B M a Thompson, E N.** Methoxy-9-ellipticine lactate in refractory acute myeloid leukaemia. *Postgraduate Medical Journal*. 1975, Sv. 51, stránky 103-105.
25. **Fesen, M R; Kohn, K W; Leteurte, F; Pommier, Y.** Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, Sv. 90, stránky 2399-2403.
26. **Mathé, G; Triana, K; Pontiggia, P; Blanquet, D; Hallard, M; Morette, C** Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed,

enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combinations with other HIV1 virostatics. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 1998, Sv. 52, stránky 391-396.

27. **Paoletti, C; Le Pecq, J B; Dat-Xuong, N; Garnier, H; Amiel, J L; Rouesse, J.** Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137). *Cancer Chemo-and Immunopharmacology*. místo neznámé: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1980.

28. **DeMarini, D M; Cros, S; Paoletti, C; Lecointe, P; Hsie, A W.** Mutagenicity and cytotoxicity of five antitumor ellipticines in mammalian cells and their structure-activity relationships in Salmonella. *Cancer Research*. 1983, Sv. 43, stránky 3544-3552.

29. **Kohn, Kurt W; Waring, Michael J; Glaubiger, Daniel; Friedman, Charles A.** Intercalative binding of ellipticine to DNA. *Cancer research*. 1975, Sv. 35, stránky 71-76.

30. **Canals, A; Purciolas, M; Aymamí, J; Coll, M.** The anticancer agent ellipticine unwinds DNA by intercalative binding in an orientation parallel to base pairs. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*. 2005, Sv. 61, stránky 1009-1012.

31. **Chu, Y a Hsu, M-T.** Ellipticine increases the superhelical density of intracellular SV40 DNA by intercalation. *Nucleic acids research*. 1992, Sv. 20, 15, stránky 4033-4038.

32. **Froelich-Ammon, S J; Patchan, M W; Osheroff, N; Thompson, R B.** Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme drug interactions by fluorescence spectroscopy. *The journal of biological chemistry*. 1995, Sv. 270, 25, stránky 14998-15004.

33. **Tewey, K M; Chen, G L; Nelson, E M; Liu, L F.** Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984, Sv. 259, stránky 9182-9187.

34. **Kuo, Y-C; Kuo, P-L; Hsu, Y-L; Cho, C-Y; Lin, C-C.** Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life sciences*. 2006, Sv. 78, stránky 2550-2557.

35. **Kuo, P-L; Hsu, Y-L; Chang, C-H; Lin, C-C.** The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Letters*. 2005, Sv. 223, 2, stránky 293-301.
36. **Peng, Y; Li, C; Chen, L; Sebti, S; Chen, J.** Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene*. 2003, Sv. 22, stránky 4478-4487.
37. **Mizumoto, Kazuhiro; Sato, Norihiro; Kusumoto, Masahiro; Niiyama, Hideaki; Maehara, Naoki; Nishio, Shoko; Li, Zhang; Ogawa, Takahiro; Tanaka, Masao.** Diverse effects of 9-hydroxyellipticine on the chemosensitivity of human pancreatic cancer cells harboring p53 mutations. *Cancer Letters*. 2000, Sv. 149, 1-2, stránky 85-94.
38. **Ohashi, M, Sugikawa, E a Nakanishi, N.** Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Cancer science*. 1995, Sv. 86, stránky 819-827.
39. **Stiborová, M, Rupertová, M a Frei, E.** Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, Sv. 1814, stránky 175-185.
40. **Stiborová, M a Frei, E.** Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. 2014, Sv. 21, 5, stránky 575-591.
41. **El Mashak, E M, Paoletti, C a Tocanne, J F.** Interactions between ellipticine and some derivatives and phospholipids in model membranes. *FEBS Letters*. 1979, Sv. 107, 1, stránky 155-159.
42. **Terce, F, Tocanne, J-F a Lannelle, G.** Interactions of ellipticine with model or natural membranes. *European Journal of Biochemistry*. 1982, Sv. 125, stránky 203-207.
43. **Terce, F, Tocanne, J-F a Laneelle, G.** Localization of ellipticine derivatives interacting with membranes. *European Journal of Biochemistry*. 1983, Sv. 133, stránky 349-354.
44. **Lesca, P; Rafidinarivo, E; Lecointe, P; Mansuy, D.** A class of strong inhibitors of microsomal monooxygenases: the ellipticines. *Chemico-biological interactions*. 1979, Sv. 24, 2, stránky 189-197.

45. **Guenthner, T M, Kahl, G F a Nebert, D W.** NADPH:cytochrome P450 reductase: preferential inhibition by ellipticine and other type II compounds having little effect on NADPH:cytochrome c reductase. *Biochemical pharmacology*. 1980, Sv. 29, 1, stránky 85-95.
46. **Lesca, P, Beaune, P a Monsarrat, B.** Ellipticines and human liver microsomes: spectral interaction with cytochrome P450 and hydroxylation. Inhibition of aryl hydrocarbon metabolism and mutagenicity. *Chemico-biological interactions*. 1981, Sv. 36, 3, stránky 299-309.
47. **Aimová, D a Stiborová, M.** Antitumor drug ellipticine inhibits the activities of rat hepatic cytochromes P450. *Biomedical Papers - Palacky University in Olomouc*. 2005, Sv. 149, 2, stránky 437-440.
48. **Cresteil, T a Lesca, P.** Enhancement of DNA binding, mutagenicity and carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons after induction of cytochrome P450 by ellipticines in rats and mice. *Chemico-biological interactions*. 1983, Sv. 47, 2, stránky 145-156.
49. **Aimová, D; Dlouhá, T; Frei, E; Stiborová, M.** Anticancer drug ellipticine acts as an inducer of CYP1A1/2 and potentiates its own pharmacological efficiency. *Cytochrome P*. 2003, Sv. 450, stránky 133-138.
50. **Sato, Norihiro; Mizumoto, Kazuhiro; Kusumoto, Masahiro; Niiyama, Hideaki; Maehara, Naoki; Ogawa, Takahiro; Tanaka, Masao.** 9-hydroxyellipticine inhibits telomerase activity in human pancreatic cancer cells. *FEBS Letters*. 1998, Sv. 441, 2, stránky 318-321.
51. **Stiborová, M; Rupertová, M; Schmeiser, H H; Frei, E.** Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med*. 2006, Sv. 150, 1, stránky 13-23.
52. **Stiborová, M; Bieler, C A; Wiessler, M; Frei, E.** The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology*. 2001, Sv. 62, stránky 1675-1684.
53. **Frei, E; Bieler, C A; Arlt, V M; Wiessler, M; Stiborová, M.** Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology*. 2002, Sv. 64, stránky 289-295.

54. **Poljaková, J; Forsterová, K; Šulc, M; Frei, E; Stiborová, M.** Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical Papers - Palacky University in Olomouc*. 2005, Sv. 149, 2, stránky 449-453.
55. **Poljaková, J; Dračínský, M; Frei, E; Hudeček, J; Stiborová, M.** The effect of pH on peroxidase-mediated oxidation of and DNA adduct formation by ellipticine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2006, Sv. 71, 8, stránky 1169-1185.
56. **Stiborová, M; Poljaková, J; Ryšlavá, H; Dračínský, M; Eckschlager, T; Frei, E.** Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *International Journal of Cancer*. 2007, Sv. 120, 2, stránky 243-251.
57. **Stiborová, M; Sejbál, J; Bořek-Dohalská, L; Aimová, D; Poljaková, J; Forsterová, K; Rupertová, M; Wiesner, J; Hudeček, J; Wiessler, M; Frei, E.** The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochrome P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide. *Cancer Research*. 2004, Sv. 64, stránky 8374-8380.
58. **Kotrbová, Věra; Aimová, Dagmar; Březinová, Anna; Janouchová, Kateřina; Poljaková, Jitka; Hodek, Petr; Frei, Eva; Stiborová, Marie.** Cytochrome P450 reconstituted with NADPH:P450 reductase mimic the activating and detoxicating metabolism of the anticancer drug ellipticine microsomes. *Neuroendocrinology Letters*. 2006, Sv. 27, stránky 18-22.
59. **Bořek-Dohalská, L, Frei, E a Stiborová, M.** DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine and its hydroxy derivatives in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Collection of Czechoslovak chemical communications*. 2004, Sv. 69, 3, stránky 603-615.
60. **Stiborová, M; Breuer, A; Aimová, D; Stiborová-Rupertová, M; Wiessler, M; Frei, E.** DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by <sup>32</sup>P postlabeling. *International Journal of Cancer*. 2003, Sv. 107, 6, stránky 885-890.
61. **Stiborová, Marie; Stiborová-Rupertová, Martina; Bořek-Dohalská, Lucie; Wiessler, Manfred; Frei, Eva.** Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species

covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. *Chemical Research in Toxicology*. 2003, Sv. 16.

62. **Buters, J T M; Sakai, S; Richter, T; Pineau, T; Alexander, D L; Savas, U; Doehmer, J; Ward, J M; Jefcoate, C R; Gonzalez, F J.** Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, Sv. 96, 5, stránky 1977-1982.

63. **Autrup, H.** Carcinogen metabolism in cultured human tissues and cells. *Carcinogenesis*. 1990, Sv. 11, 5, stránky 707-712.

64. **Melendez-Colon, V J; Luch, A; Seidel, A; Baird, W M.** Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis*. 1999, Sv. 20, 10, stránky 1885-1891.

65. **Český hydrometeorologický institut.** *Český hydrometeorologický institut*. [Online] [Citace: 17. 11 2014.]

66. **Holder, G; Yagi, H; Dansette, P; Jerina, D M; Levin, W; Lu, A Y H; Conney, A H.** Effects of inducers and epoxide hydrase on the metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes and a reconstituted system: analysis by high pressure liquid chromatography. *Proc. Nat. Acad. Scie*. 1974, Sv. 71, 11, stránky 4356-4360.

67. **Hundley, Stephan G a Freundenthal, Ralph I.** High-pressure liquid chromatography analysis of benzo[a]pyrene metabolism by microsomal enzymes from rhesus liver and lung. *Cancer research*. 1977, 37.

68. **Yang, S K, Roller, P P a Gelboin, H V.** Enzymatic mechanism of benzo[a]pyrene conversion to phenols and diols and an improved high-pressure liquid chromatographic separation of benzo[a]pyrene derivatives. *Biochemistry*. 1977, Sv. 16, 16, stránky 3680-3687.

69. **Hundley, Stephen G a Freundenthal, Ralph I.** A comparison of benzo[a]pyrene metabolism by liver and lung microsomal enzymes from 3-methylcholanthrene-treated rhesus monkey and rats. *Cancer research*. 1977, 37.

70. **Autrup, H; Harris, C C; T, Benjamin F; Jeffrey, A M.** Metabolism of benzo[a]pyrene and identification of the major benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured human colon. *Cancer research*. 1978, Sv. 38, stránky 3689-3696.



71. **Kim, J H; Stansbury, K H; Walker, N J; Trush, M A; Strickland, P T; Sutter, T R.** Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*. 1998, Sv. 19, 10, stránky 1847-1853.
72. **Wood, A W; Levin, W; Lu, A Y H; Yagi, H; Hernandez, O; Jerina, D M; Conney, A H.** Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene derivatives to mutagenic products by highly purified hepatic microsomal enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1976, Sv. 251, stránky 4882-4890.
73. **Gelboin, H V.** A microsome-dependent binding of benzo[a]pyrene to DNA. *Cancer research*. 1969, Sv. 29, stránky 1272-1276.
74. **Kapitulnik, J; Wislocki, P G; Levin, W; Yagi, H; Jerina, D M; Conney, A H.** Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo[a]pyrene which indicate that (+-)-trans-7b,8a-dihydroxy-9a,10a-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. *Cancer research*. 1978, Sv. 38, stránky 354-358.
75. **Kelley, D J; Mestre, J R; Subbaramaiah, K; Sacks, P G; Schantz, S; Tanabe, T; Inoue, H; Ramonetti, J T; Dannenberg, A J.** Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1997, Sv. 18, 4, stránky 795-799.
76. **Vermes, A, Guchelaar, H J a Koopmans, R P.** Individualization of cancer therapy based on cytochrome P450 polymorphism: a pharmacogenetic approach. *Cancer Treatment Review*. 1997, Sv. 23, 5-6, stránky 321-339.
77. **Stiborová, M; Hudeček, J; Páca, J Jr; Martínek, V; Páca, J.** Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy*. 2004, Sv. 98, stránky 876-890.
78. **Coon, M J, Autor, A P a Strobel, H W.** Role of phospholipid in electron transfer in a reconstituted liver microsomal enzyme system containing cytochrome P450. *Chem-Biol interactions*. 1971, Sv. 3, 4, stránky 248-250.
79. **Lu, A Y H; Kuntzman, R; West, S; Jacobson, M; Conney, A H.** Reconstituted liver microsomes enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrate. *The journal of biological chemistry*. 1972, Vol. 247, pp. 1727-1734.
80. **Nelson, D R a Strobel, H W.** Evolution of cytochrome P450 proteins. 1987, Sv. 4, 6, stránky 572-593.

81. **Gonzales, F J.** Molecular genetics of the P450 superfamily. *Pharmacology & therapeutics*. 1990, Sv. 45, 1, stránky 1-38.
82. **Omura, T a Sato, R.** A new cytochrome in liver microsome. *The journal of biological chemistry*. 1962, Sv. 237, 7, stránky 2370-2378.
83. **Omura, T a Sato, R.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The journal of biological chemistry*. 1964, Sv. 239, 4, stránky 1375-1376.
84. **Cramer, S P; Dawson, J H; Hodgson, K O; Hager, L P.** Studies on the the ferric form of cytochrome P450 and chloroperoxidase by extended X-ray absorption fine structure. Characterization of the Fe-N and Fe-S distances. *Journal of the american chemical society*. 1978, Sv. 100, 23, stránky 7282-7290.
85. **Chang, C K a Dolphin, D.** Carbon monoxide binding to pentacoordinate mercaptide-heme complexes: Kinetic study on models for cytochrome P450. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1976, Sv. 73, 10, stránky 3338-3342.
86. **Yoshida, Y, Imai, Y a Hashimoto-Yutsudo, C.** Spectrophotometric examination of exogenous-ligand complexes of ferric cytochrome P450. Characterization of the axial ligand trans to thiolate in the native ferric low spin form. *J. biochemistry*. 1982, Sv. 91, 5, stránky 1651-1659.
87. **Edwards, R J; Murray, B P; Singleton, A M; Boobis, A R.** Orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*. 1991, Sv. 30, 1, stránky 71-76.
88. **Waterman, M R, Jenkins, C M a Pikuleva, I.** Genetically engineered bacterial cells and applications. *Toxicology letters*. 1995, Sv. 82-83, stránky 807-813.
89. **Ahn, K, Szczesna-Skopura, E a Kemper, B.** The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmic reticulum. *The journal of biological chemistry*. 1993, Sv. 268, stránky 18726-18733.
90. **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.** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996, Sv. 6, 1, stránky 1-42.

91. **Guengerich, F. P.** Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*. 2008, Sv. 21, 1, stránky 70-83.
92. **Schroer, K, Kittelmann, M a Lütz, S.** Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis. *Biotechnology and bioengineering*. 2010, Sv. 106, 5, stránky 699-706.
93. **Barnes, H J, Arlotto, M P a Waterman, M R.** Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in Escherichia coli. *Proceedings of the national agency of sciences*. 1991, Sv. 88, 13, stránky 5597-5601.
94. **Pritchard, M P; Ossetian, R; Li, Dongtao N; Henderson, C J; Burchell, B; Wolf, C R; Friedberg, T.** A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in Escherichia coli using bacterial signal peptides: expression of CYP3A4, CYP2A6 and CYP2E1. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997, Sv. 345, 2, stránky 342-354.
95. **Shimada, T; Tsumura, F; Gillam, E M.J; Guengerich, F P; Inoue, K.** Roles of NADPH:P450 reductase in the O-deethylation of 7-ethoxycoumarin by recombinant human cytochrome P450 1B1 variants in Escherichia coli. *Protein expression and purification*. 2000, Sv. 20, 1, stránky 73-80.
96. **Blake, J A R; Pritchard, M; Ding, S; Smith, G C M; Burchell, B; Wolf, C R; Friedberg, T.** Coexpression of a human P450 (CYP3A4) and P450 reductase generates a highly functional monooxygenase system in Escherichia coli. *FEBS letters*. 1996, Sv. 397, 2-3, stránky 210-214.
97. **Dong, J a Porter, T D.** Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in Escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996, Sv. 327, 2, stránky 254-259.
98. **Fisher, C W; Shet, M S; Caudle, D L; Martin-Wixtrom, C A; Estabrook, R W.** High-level expression in Escherichia coli of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-540 reductase flavoprotein. *Pros. Natl. Acad Sci*. 1992, Sv. 89, 22, stránky 10817-10821.
99. **Masters, B S S; Baron, J; Taylor, W E; Isaacson, E L; LoSpalluto, J.** Immunochemical studies on electron transport chains involving cytochrome P450. *The Journal of Biological Chemistry*. 1971, Sv. 246, stránky 4143-4150.

100. **Schacter, B A; Nelson, E B; Marver, H S; Masters, B S S.** Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972, Sv. 247, stránky 3601-3607.
101. **Li, D N; Pritchard, M P; Hanlon, S P; Burchell, B; Wolf, C R; Friedberg, T.** Competition between cytochrome P450 isozymes for NADPH-cytochrome P450, oxidoreductase affects drug metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999, Sv. 289, 2, stránky 661-667.
102. **Masters, B S S; Kamin, H; Gibson, Q H; Williams, C H.** Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrom c reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1965, Sv. 240, 2, stránky 921-931.
103. **Vermilion, J L a Coon, M J.** Highly purified detergent-solubilized NADPH-cytochrome P450 reductase from phenobarbital-induced rat liver microsomes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974, Sv. 60, 4, stránky 1315-1322.
104. **Knapp, J A, Dignam, J D a Strobel, H W.** NADPH-cytochrome P450 reductase. Circular dichroism and physical studies. *The Journal of Biological Chemistry*. 1977, Sv. 252, stránky 437-443.
105. **Haniu, M; Iyanagi, Takashi; M, Philip; Lee, T D; Shively, J E.** Complete amino acid sequence of NADPH-cytochrome P450 reductase from porcine hepatic microsomes. *Biochemistry*. 1986, Sv. 25, 24, stránky 7906-7911.
106. **Shen, A L a Kasper, Ch B.** Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *The Journal of Biological chemistry*. 1995, Sv. 270, stránky 27475-27480.
107. **Zhao, Q; Modi, S; Smith, G; Paine, M; McDonagh, P D; Wolf, C R; Tew, D; Lian, L-Y; Roberts, G C K; Driessen, H P C.** Crystal structure of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 Å resolution. *Protein Science*. 1999, Sv. 8, 2, stránky 298-306.
108. **Prough, R A a Masters, B S S.** The mechanism of cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome c reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1974, Sv. 165, 1, stránky 263-267.

109. **Ilan, Z, Ilan, R a Cinti, D L.** Evidence for a new physiological role of hepatic NADPH:ferricytochrome (P450) oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981, Sv. 256, 19, stránky 10066-10072.
110. **Nisimoto, Y a Edmondson, D E.** Effect of KCl on the interactions between NADPH:cytochrome P450 reductase and either cytochrome c, cytochrome b5 or cytochrome P450 in octyl glucoside micelles. *The European Journal of Biochemistry*. 1992, Sv. 204, 3, stránky 1075-1082.
111. **Kida, Y; Ohgiva, S; Mihara, K; Sakaguchi, M.** Membrane topology of NADPH-cytochrome P450 reductase on the endoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998, Sv. 351, 2, stránky 175-179.
112. **Porter, T D a Kasper, Ch B.** Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985, Sv. 82, 4, stránky 973-977.
113. **Wang, M; Roberts, D L; Paschke, R; Shea, T M; Masters, B S S; Kim, J-J P.** Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, Sv. 94, 16, stránky 8411-8416.
114. **Schenkman, J B a Jansson, I.** The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology & therapeutics*. 2003, Sv. 97, 2, stránky 139-152.
115. **Vergeres, G a Waskell, L.** Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie*. 1995, Sv. 77, 7-8, stránky 604-620.
116. **Peterson, J A; White, R E; Yasukochi, Y; Coomes, M L; O'Keeffe, D H; Ebel, R E; Masters, B S S; Ballou, D P; Coon, M J.** Evidence that purified liver microsomal cytochrome P-450 is a one-electron acceptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1977, Sv. 252, stránky 4431-4434.
117. **Noshiro, M, Ullrich, V a Omura, T.** Cytochrome b5 as electron donor for oxy-cytochrome P-450. *European Journal of Biochemistry*. 1981, Sv. 116, 3, stránky 521-526.

118. **Bonfils, C, Balny, C a Maurel, P.** Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome b5 to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2\*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981, Sv. 256, stránky 9457-9465.
119. **Yamazaki, H; Nakamura, M; Komatsu, T; Ohyama, K; Hatanaka, N; Asahi, S; Shimada, N; Guengerich, F P; Shimada, T; Nakajima, M; Yokoi, Tsuyoshi.** Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2002, Sv. 24, 3, stránky 329-337.
120. **Loverde, A a Strittmatter, P.** The role of lysyl residues in the structure and reactivity of cytochrome b5 reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1968, Sv. 243, stránky 5779-5787.
121. **Dailey, H A a Strittmatter, P.** Modification and identification of cytochrome b5 carboxyl groups involved in protein-protein interaction with cytochrome b5 reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979, Sv. 254, 12, stránky 5388-5396.
122. **Kimura, S, Nishida, H a Iyanagi, T.** Effects of flavin-binding motif amino acid mutations in the NADH-cytochrome b5 reductase catalytic domain on protein stability and catalysis. *Journal of Biochemistry*. 2001, Sv. 130, 4, stránky 481-490.
123. **Meunier, B, de Visser, S P a Shaik, S.** Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Review*. 2004, Sv. 104, 9, stránky 3947-3980.
124. **Krueger, S K a Williams, D E.** Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005, Sv. 106, 3, stránky 357-387.
125. **Hernandez, D; Janmohamed, A; Chandan, P; Phillips, I R; Shephard, E A.** Organization and evolution of the flavin-containing monooxygenase genes of human and mouse: identification of novel gene and pseudogene cluster. *Pharmacogenetics*. 2004, Sv. 14, 2, stránky 117-130.
126. **McCombie, R R; Dolphin, C T; Povey, S; Phillips, I R; Shephard, E A.** Localization of human flavin-containing monooxygenase genes FMO2 and FMO5 to chromosome 1q. *Genomics*. 1996, Sv. 34, 3, stránky 426-429.

127. **Koukouritaki, S B; Simpson, P; Yeung, C K; Rettie, A E; Hines, R N.** Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) development expression. *Pediatric Research*. 2002, Sv. 51, stránky 236-243.
128. **Phillips, I R; Dolphin, C T; Clair, P; Hadley, M R; Hutt, A J; McCombie, R R; Smith, R L; Shephard, E A.** The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man. *Chemico-Biological Interactions*. 1995, Sv. 96, 1, stránky 17-32.
129. **Stiborová, M; Frei, E; Schmeiser, H H; Hradec, J.** Mechanism of formation and <sup>32</sup>P-postlabeling of DNA adducts derived from peroxidative activation of carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I). *Carcinogenesis*. 1990, Sv. 11, 10, stránky 1843-1848.
130. **Yasukochi, Y, Peterson, J A a Masters, B S S.** NADPH-cytochrome c (P-450) reductase. Spectrophotometric and stopped flow kinetic studies on the formation of reduced flavoprotein intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979, Sv. 254, 15, stránky 7097-7104.
131. **Yang, M X a Cederbaum, A I.** Fractionation of liver-microsomes with polyethylene-glycol and purification of NADH-cytochrome b5 oxidoreductase and cytochrome b5. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994, Sv. 315, 2, stránky 438-444.
132. **Šulc, M.** Metabolismus karcinogenních N-nitrosaminů isoenzymy CYPT v modelových organismech (rostlina, bezobratlý a obratlovec). *Dizertační práce*. Praha : PřF UK, 2002.
133. **Janouchová, K.** Studium vlivu cytochromu b5 na aktivitu cytochromu P450 2C3. *Diplomová práce*. Praha : PřF UK, 2004.
134. **Mihara, K a Sato, R.** Partial purification of NADH-cytochrome b5 reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *The Journal of Biochemistry*. 1972, Sv. 71, 4, stránky 725-735.
135. **Mihara, K a Sato, R.** Purification and properties of the intact form of NADH-cytochrome b5 reductase from rabbit liver microsomes. *The Journal of Biochemistry*. 1975, Sv. 78, 5, stránky 1057-1073.

136. **Ariyoshi, N; Tanaka, M; Ishii, Y; Oguri, K.** Purification and characterization of dog liver microsomal epoxide hydrolase. *The Journal of Biochemistry*. 1994, Sv. 115, 5, stránky 985-990.
137. **Stiborová, M; Martínek, V; Rýdlová, H; Hodek, P; Frei, E.** Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Research*. 2002, Sv. 62, 20, stránky 5678-5684.
138. **Stiborová, M; Dračínská, H; Martínek, V; Svášková, D; Hodek, P; Milichovský, J; Hejduková, Ž; Brotánek, J; Schmeiser, H H; Frei, E.** Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H:quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Chemical Research in Toxicology*. 2013, Sv. 26, 2, stránky 290-299.
139. **Stiborová, M; Stiborová-Rupertová, M; Bořek-Dohalská, L; Wiessler, M; Frei, E.** Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in human. *Chemical Research in Toxicology*. 2003, Sv. 16, 1, stránky 38-47.
140. **Hodek, P; Koblihová, J; Kizek, R; Frei, E; Arlt, V M; Stiborová, M.** The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013, Sv. 36, 3, stránky 989-996.
141. **Stiborová, M; Rupertová, M; Hodek, P; Frei, E; Schmeiser, H H.** Monitoring of DNA adducts in humans and <sup>32</sup>P-postlabelling methods. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2004, Sv. 69, 3, stránky 476-498.
142. **Refat, N A G A; Ibrahim, Z S; Moustafa, G G; Sakamoto, K Q; Ishizuka, M; Fujita, S.** The induction of cytochrome P450 1A1 by sudan dyes. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2008, Sv. 22, 2, stránky 77-84.
143. **Nedelcheva, V a Gut, I.** P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica*. 1994, Sv. 24, 12, stránky 1151-1175.
144. **Rolsted, K; Kissmeyer, A-M; Rist, G M; Hansen, S H.** Evaluation of cytochrome P450 activity in vitro, using dermal and hepatic microsomes from four species and two



keratinocyte cell lines in culture. *Archives of Dermatological Research*. 2008, Sv. 300, 1, stránky 11-18.

145. **Aimová, D; Poljaková, J; Kotrbová, V; Moserová, M; Frei, E; Arlt, V M; Stiborová, M.** Ellipticine and benzo[a]pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Interdisciplinary Toxicology*. 2008, Sv. 1, 2, stránky 160-168.

146. **Arlt, V M; Stiborová, M; Henderson, C J; Thiemann, M; Frei, E; Aimová, D; Singhs, R; da Costa, G G; Schmitz, O J; Farmer, P B; Wolf, C R; Phillips, D H.** Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*. 2008, Sv. 29, 3, stránky 656-665.

147. **Kawamoto, T; Sueyoshi, T; Zelko, I; Moor, R; Washburn, K; Negishi, M.** Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Molecular and Cellular Biology*. 1999, Sv. 19, 9, stránky 9318-6322.

148. **Stiborová, M; Martínek, V; Rýdlová, H; Koblas, T; Hodek, P.** Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human liver. *Cancer Letters*. 2005, Sv. 220, 2, stránky 145-154.

149. **Shen, A L, O'Leary, K A a Kasper, C B.** Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, Sv. 277, stránky 6536-6541.

150. **Henderson, C J; Otto, D M E; Carrie, D; Magnuson, M A; McLaren, A W; Rosewell, I; Wolf, R.** Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, Sv. 278, stránky 13480-13486.

151. **Le, Y a Sauer, B.** Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Molecular Biotechnology*. 2001, Sv. 17, 3, stránky 269-275.

152. **Henderson, C J, Pass, G J a Wolf, C R.** The hepatic cytochrome P450 reductase null mouse as a tool to identify a successful candidate entity. *Toxicology Letters*. 2006, Sv. 162, 1, stránky 111-117.

153. **Jiang, H; Gelhaus, S L; Mangal, D; Harvey, R G; Blair, I A; Penning, T M.** Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 2007, Sv. 20, 9, stránky 1331-1341.
154. **Wood, A W; Wislocki, P G; Chang, R L; Levin, W; Lu, A Y H; Yagi, H; Hernandez, O; Jerina, D M; Conney, A H.** Mutagenicity and cytotoxicity of benzo[a]pyrene benzo-ring epoxides. *Cancer Research*. 1976, Sv. 36, 9, stránky 3358-3366.
155. **Daniel, F B; Schut, H A J; Sandwich, D W; Schenck, K M; Hoffmann, C O; Patrick, J R; Stoner, G D.** Interspecies comparisons of benzo(a)pyrene metabolism and DNA-adduct formation in cultured human and animal bladder and tracheobronchial tissues. *Cancer Research*. 1983, Sv. 43, 10, stránky 4723-4729.
156. **Wohak, L E; Kraus, A M; Kucab, J E; Stertmann, J; Ovrebo, S; Seidel, A; Phillips, D H; Arlt, V M.** Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53 dependent mechanism. *Archives of Toxicology*. 2014, stránky 1-14.
157. **Jenkins, C M; Pikuleva, I; Kagawa, N; Waterman, M R.** Escherichia coli flavodoxin speharose as an affinity resin for cytochrome P450 and use to identify a putative cytochrome P450c17/3b-hydroxysteroid dehydrogenase interation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997, Sv. 347, 1, stránky 93-102.
158. **Porter, T D.** The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2002, Sv. 16, 6, stránky 311-316.

# Přílohy

**Příloha 1**

**Indra R**, Moserová M, Šulc M, Frei E, Stiborová M

**Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat cytochrome P450 1A1 and its influencing by cytochrome b<sub>5</sub> – a comparative study**

*Neuro Endocrinology Letters*, 34(Suppl 2): 55-63, (2013). **IF<sub>2013</sub>=0,935**

**Příloha 2**

Krais AM, Speksnijder EN, Melis JPM, **Indra R**, Moserová M, Godschalk RW, van Schooten FJ, Seidel A, Kopka K, Schmeiser HH, Stiborová M, Phillips DH, Luijten M, Arlt VM

**The impact of p53 on DNA damage and metabolic activation of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene: effects in Trp53(+/+), Trp(+/-) and Trp53(-/-) mice**

*Archives of Toxicology*, 2015 (v revizi). **IF<sub>2013</sub>=5,078**

**Příloha 3**

**Indra R**, Moserová M, Kroftová N, Šulc M, Martínková M, Adam V, Eckschlager T, Kizek R, Arlt VM, Stiborová M

**Modulation of human cytochrome P450 1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene by NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b<sub>5</sub>**

*Neuro Endocrinology Letters*, 35(Suppl 2): 105-113, (2014) **IF<sub>2013</sub>=0,935**

**Příloha 4**

Stiborová M, Moserová M, Černá V, **Indra R**, Dračínský M, Šulc M, Henderson C.J, Wolf C.R, Schmeiser H.H, Phillips D.H, Frei E, Arlt V.M

**Cytochrome b<sub>5</sub> and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions**

1. *Toxicology*, 318: 1-12, (2014). **IF<sub>2013</sub>=3,745**

## **Příloha 5**

Stiborová M, **Indra R**, Moserová M, Černá V, Rupertová M, Martínek M, Eckschlager T, Kizek R, Frei E

**Cytochrome b<sub>5</sub> increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N,O-acetyltransferases.**

*Chemical research in toxicology*, 25(5): 1075-1085, (2012). **IF<sub>2012</sub>=3,667**