UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Mgr. Radek Indra

Mechanismus enzymové aktivace karcinogenů a léčiv systémem cytochromů P450

Autoreferát doktorské dizertační práce

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2015

Abstrakt

Environmentální polutant benzo[a]ypren (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_5 na tento metabolismus a potenciál cyt b_5 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_5 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). Adukty s DNA vzniklé aktivací BaP byly kvantifikovány metodou „^{32}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^{TM}). Cyt b_5 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 reduktasy, ale i systém NADH, NADH: cytochrom b_5 reduktasy a cytochromu b_5. A to v obou redukčních krocích.

Schopnost cyt b_5 poskytovat oba elektrony cytochromu P450 (CYP3A4) byla pozorována i při studiu vlivu cyt b_5 na metabolismus ellipticinu.

1 ÚVOD

1.1 Enzymy biotranformující xenobiotika

Biotransformační procesy probíhající v organismu jsou uskutečňovány řadou enzymů, které lze rozdělit na enzymy I. fáze a II. fáze biotransformace. Z enzymů I. fáze biotransformace xenobitoik jsou nejvýznamnější monooxygenasy membrán endoplasmatického retikula.

1.1.1 Monooxygenasový systém membrán endoplasmatického retikula

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 (1; 2).

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 (1; 2; 3; 4). Dalšími enzymy, se kterými se můžeme v rámci tohoto systému setkat, jsou cytochrom b_5 a jeho reduktasa, NADH:cytochrom b_5 reduktasa (1; 2).

1.1.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) představují širokou a evolučně starou skupinu enzymů, které byly nalezeny v různých organismech od bakterií, přes rostliny až k člověku. Poprvé byly nalezeny 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 (5; 6). Cytochrom P450 není ovšem typickým cytochromem, ale jedná se o hemoprotein, ve kterém je jeden z ligandů iontu železa thiolátová síra (7; 8). Pro tento charakteristický rys je označován jako hemthiolátový protein. Šestým ligandem je molekula vody (9). Většina cytochromů P450 je lokalizována v membránách endoplasmatického retikulu, mitochondriální enzymy představují jen asi 10 % (10).

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. Z 57 genů, které nalezneme v lidském organismu 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 (11).

1.1.1.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný flavoprotein, který se účastní redukce cytochromů P450 (12; 13). Flavoproteinová povaha enzymu souvisí s přítomností FAD a FMN (14; 15). Molekulová hmotnost enzymu je ≈ 78 kDa a obsahuje značné množství kyselých aminokyselin (16; 17). Právě kyselé aminokyseliny jsou zodpovědné za interakci s cytochromy P450 i s cytochromem c (cyt c) (18; 19). Kromě redukce cytochromů P450 je CPR za určitých okolností schopna redukovat cytochrom b_5 (cyt b_5) (20), přenést elektrony na elongasu během elongace mastných kyselin (21) a na cyt c (22) 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 (22).

1.1.1.3 Cytochrom b_5

Cytochrom b_5 je malý (≈ 17 kDa), cylindrický membránový protein, který se skládá z šesti helixů a 5 β-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. Primárně se cyt b_5 účastní biosyntézy lipidů. Je důležitý při desaturacích a elongacích mastných kyselin, biosyntéze cholesterolu či plasmalogenů. Cytochrom b_5 se však také může účastnit reakčního cyklu cytochromů P450 (23).

1.1.1.4 NADH:cytochrom b_5 reduktasa

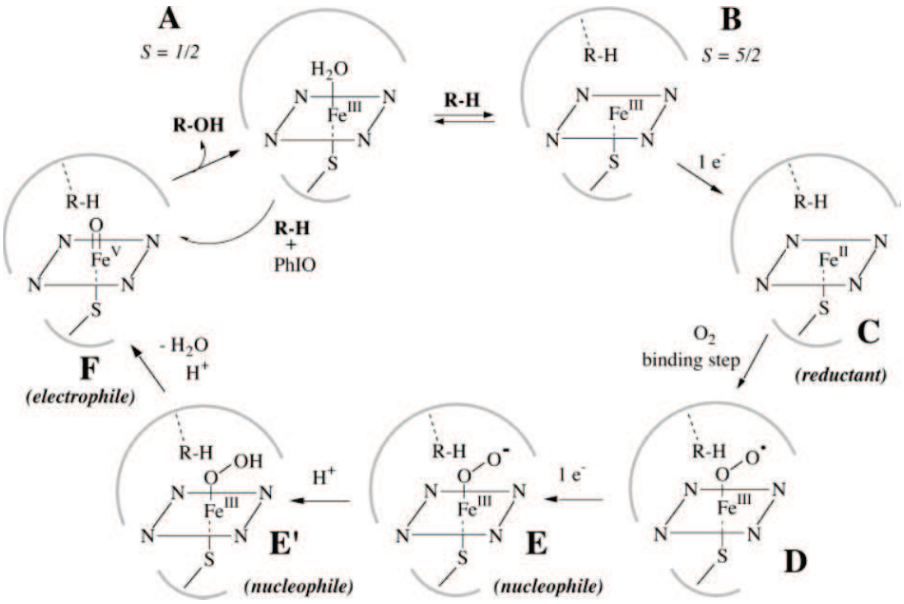
NADH:cytochrom b_5 reduktasa (EC 1.6.2.2) je enzym o molekulové hmotnosti ≈ 35 kDa, který zprostředkovává přenos elektronů z NADH na cytochrom b_5. Jedná se o flavoprotein, o němž je známo, že existuje ve dvou formách, a to v membránově vázané a v solubilní formě. Membránově vázaná forma se vyskytuje 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_5 (24).

1.1.1.5 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:

$$\mathbf{RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ + ROH + H_2O}$$

Reakční cyklus cytochromu P450 (Obrázek 1) 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 vazbě 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 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_5. Pokud elektron není doručen dostatečně rychle, rozpadá se komplex za vzniku superoxidového anionradikálu, jenž je následně přeměněn superoxiddismutasou 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 (1; 2; 25)..



Obrázek 1 *Reakční cyklus cytochromu P450. Zdroj: Meunier* **(25)**

1.2 Benzo[a]pyren

Environmentální polutant a prokazatelný lidský karcinogen benzo[a]pyren ($C_{20}H_{20}$) (BaP) (26) je typickým zástupcem polycyklických aromatických uhlovodíků. Jeho výskyt v životním prostředí souvisí zejména s antropogenní činností. Je vzdušným a průmyslovým polutantem a vyskytuje se ve výfukových plynech. Výskyt v přírodě lze přičíst i tektonické činností a požárům lesů. Jedná se také o jednu ze složek cigaretového kouře.

Benzo[a]pyren je genotoxickým karcinogenem, který je schopen se po metabolické aktivaci kovalentně vázat na DNA (27). Benzo[a]pyren je enzymově přeměňován na celou řadu metabolitů, zahrnujících tvorbu chinonů, dihydrodiolů a fenolů (28; 29; 30; 31; 32). Metabolit BaP-7,8-diol-9,10-epoxid je jedním z reaktivních metabolitů BaP, který tvoří kovalentní adukt s deoxyguanosinem v DNA. Hlavním enzymem účastnícím se metabolické přeměny BaP je cytochrom P450 1A1 (CYP1A1). Na přeměně BaP se kromě CYP1A1 podílí i jiné cytochromy P450. Z nich je významný je především CYP1B1 (33).

1.3 Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimetyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol), je rostlinný alkaloid, který byl poprvé izolován v roce 1959 z rostliny *Ochrosia elliptica* čeledi Toješťovité (Apocynaceace) (34). 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 (35).

Ellipticin může v cílové tkáni působit několika mechanismy. Mezi hlavní mechanismy patří (i) interkalace do DNA, (ii) inhibice topoisomerasy II, (iii) ovlivnění proteinu p53 a (iv) tvorba kovalentních aduktů s DNA V případě 9-hydroxyellipticinu byl také pozorován jeho inhibiční efekt vůči telomerase (36).

Mezi enzymy schopné biotransformovat ellipticin patří cytochromy P450 a peroxidasy (37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44). Cytochromy P450 jsou schopny ellipticin přeměňovat za vzniku až pěti metabolitů (7-hydroxy-; 9-hydroxy-; 12-hydroxy-; 13-hydroxy-ellipticin a N^2-oxid ellipticinu) (37; 45; 46; 44; 43). První dva ze zmiňovaných metabolitů slouží k detoxifikaci, další tři představují aktivnější formy, které jsou schopny tvořit kovalentní adukty s DNA (39; 38; 47; 43; 44). Majoritní je tvorba dvou aduktů odvozených z 12- resp. 13-hydroxyellipticinu. N^2-oxid ellipticinu je pomocí Polonowskiho přesmyku přeměňován na 12-hydroxyellipticin, a tak rovněž přispívá k tvorbě kovalentních aduktů (45; 44; 43). Deoxyguanosin je cílovým deoxynukleosidem, na který se deriváty ellipticinu kovalentně vážou (37; 44; 43).

2 Cíl 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
- Metabolismus benzo[a]pyrenu potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450 a vliv cytochromu b_5 na tento metabolismus
- Metabolismus benzo[a]pyrenu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotním a eukaryotním expresním systému
- Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy na oxidaci benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1
- Studium vlivu cytochromu b_5 na redukci cytochromu P450 v průběhu oxidace benzo[a]pyrenu a ellipticinu
- Studium tvorby kovalentních aduktů benzo[a]pyrenu s DNA po jeho metabolické aktivaci enzymovými systémy metabolizujícími tento karcinogen
- Vliv cytochromu b_5 na tvorbu aduktů s benzo[a]pyrenu s DNA

3 Materiál a metody

Materiál a všechny použité metody užité při vypracování dizertační práce jsou popsány v publikacích, které tvoří přílohy č. 1-5 dizertační práce (viz Seznam publikací 1-5 uvedený v autoreferátu). Zde jsou detailně popsány pouze dvě základní metody, které byly pro vypracování dizertační práce zásadní.

Vysokoúčinná kapalinová chromaograife

Metabolity benzo[a]pyrenu byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC za použití lineárního gradientu 0-100 % mobilní fáze B (85 % acetonitril) během 35 minut s následnou 5 minutovou izokratickou elucí mobilní fáze. Mobilní fáze A 50 % acetonitril. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18 HD, 5 μm, 250 x 4 mm (Macherey Nagel) s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány vztažením jejich plochy k ploše vnitřního standardu (fenacetinu).

Metabolity ellipticinu byly separovány izokratickou elucí mobilní fáze s kyselinou 1-heptansulfonovou (64 % metanol, 5 mM heptansulfonát sodný, 32 mM kyselina octová) s průtokem 0,7 ml/min a detekovány při 296 nm. Separace probíhala na koloně Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4.6 mm, 5 μm (Beckman-Coulter).

Metoda „^{32}P-postlabeling“

Analýzy aduktů testovaných látek s DNA byly provedeny školitelkou, Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou „^{32}P-postlabeling“ postupem detailně popsaným v předchozích pracích (48).

4 Výsledky a diskuse

Oxidace benzo[a]pyrenu jaterními mikrosomy

Jaterní mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných induktory jednotlivých cytochromů P450 metabolizují benzo[a]pyren až na 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 o neznámé struktuře). V případě lidských jaterních mikrosomů nebyla pozorována tvorba metabolitu o neznámé struktuře a také BaP-9-olu. Další metabolity byly analogické metabolitům tvořeným v potkaních mikrosomech. Totožné metabolity byly pozorovány i v případě jaterních mikrosomů myší s „deletovanou" jaterní NADPH:cytochrom P450 reduktasou, či myší modifikovaných genem lidského proteinu p53. Premedikace obou testovaných skupin myší benzo[a]pyrenem vedla k stimulaci tvorby všech metabolitů BaP.

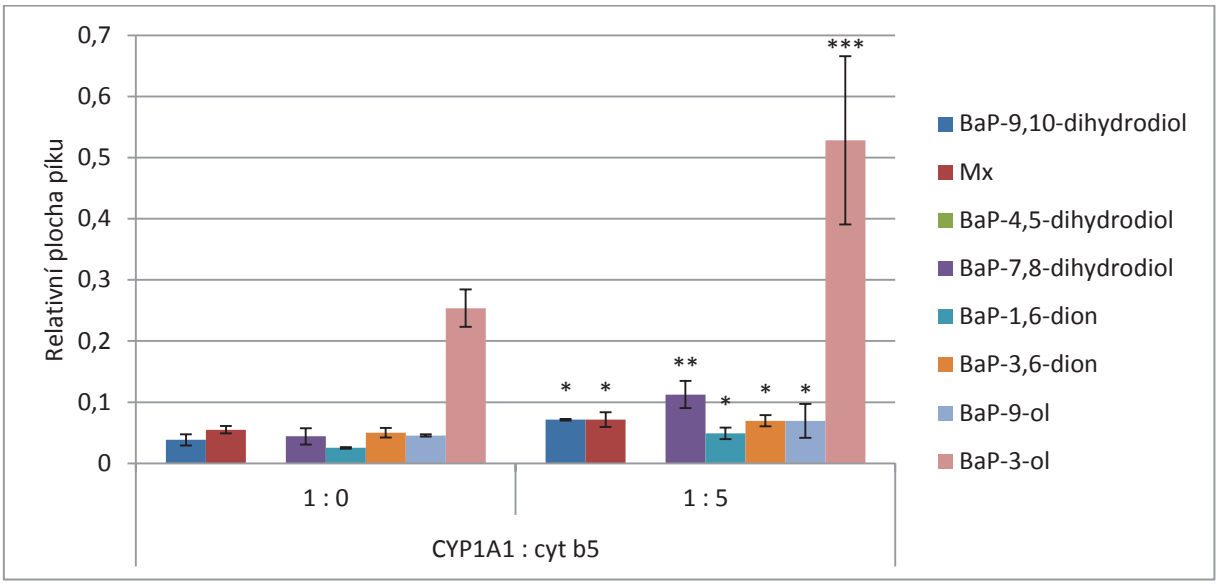
Analýza metabolitů BaP v moči myší modifikovaných genem lidského proteinu p53

Moč myších modelů s různou expresí genu lidského proteinu p53 obsahuje jednotlivé nekonjugované metabolity benzo[a]pyrenu. Jejich množství bylo nejvyšší v případě jednoho z myších modelů modifikovaného genem lidského proteinu p53 [Trp53(+/-)]. Tento výsledek nekoresponduje s pozorováním tvorby metabolitů BaP s jaterními mikrosomy ze stejných zvířat, kde při oxidaci BaP vykazoval systém zvířat Trp53(+/-) prakticky stejnou schopnost tvorby metabolitů jako systém zvířat, které genem lidského proteinu p53 nebyly modifikovány [Trp53(-/-)]. To nasvědčuje skutečnosti, že metabolity BaP jsou buď vylučovány ve formě polárnějších konjugátů nebo k jejich vylučování nedochází močí.

Oxidace benzo[a]yprenu rekombinantními cytochromy P450

Potkaní rekombinantní cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) exprimovaný v hmyzích buňkách (Supersomy^{TM}) tvoří s benzo[a]pyrenem osm metabolitů, stejných s těmi, které byly tvořeny jaterními mikrosomy potkana. Přidání cytochromu b_5 do reakční směsi stimuluje tvorbu jednotlivých metabolitů. Lidský rekombinantní CYP1A1 exprimovaný v hmyzích buňkách (Supersomy^{TM}) generuje metabolity analogické s metabolity tvořenými potkaním CYP1A1 s výjimkou BaP-4,5-dihydrodiolu, jenž v tomto systému nebyl detekován (Obrázek 2). Přítomnost cyt b_5 vede opět ke stimulaci tvorby všech metabolitů BaP. V případě exprese tohoto lidského enzymu v buňkách *E. coli* (Bactosomy) je pozorována tvorba pouze pěti metabolitů. Z metabolitů BaP nejsou tvořeny BaP-9,10-dihydrodiol a BaP-7,8-dihydrodiol. Jejich tvorba je však zprostředkována přidáním epoxidhydrolasy do reakční směsi. Množství

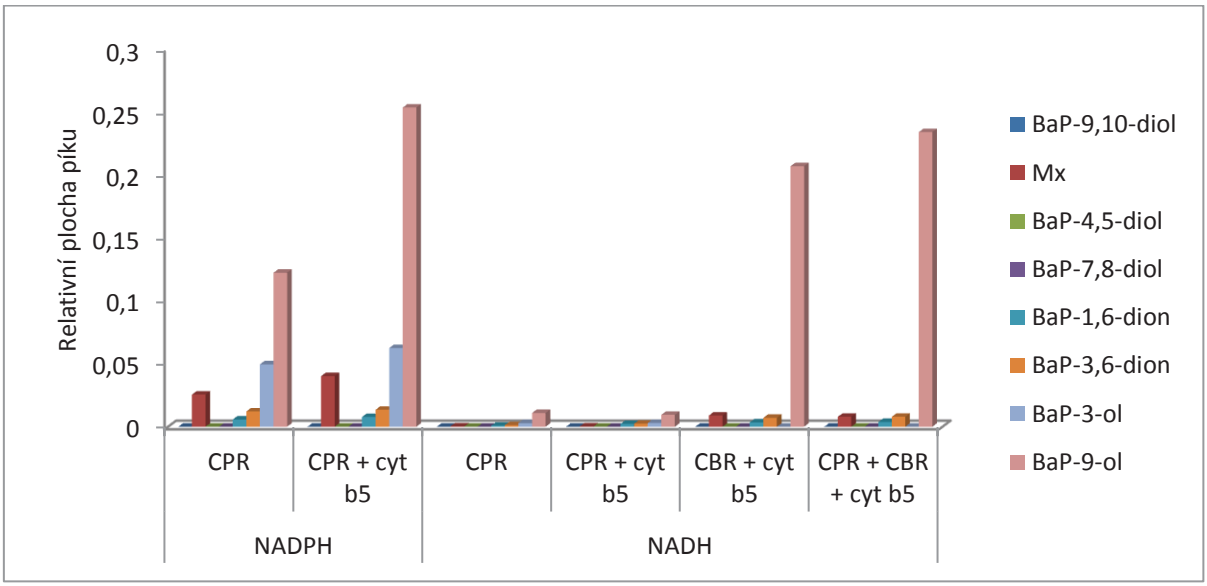
metabolitů BaP tvořených CYP1A1 exprimovaného v buňkách *E. coli* závisí rovněž na molárním poměru NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči cytochromu P450.



Obrázek 2 *Množství metabolitů BaP tvořených lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v Supersomech™ 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 benzo[a]pyrenu systémy cytochromů P450 za přítomnosti NADH a vliv cyt b_5 na tento metabolismus

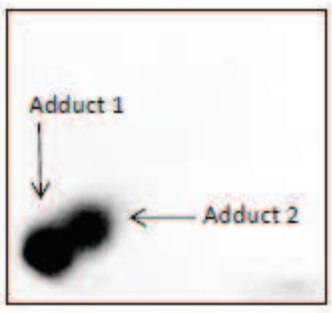
Jaterní mikrosomy potkana metabolizují benzo[a]pyren i za přítomnosti NADH. Množství metabolitů BaP bylo v některých případech dokonce shodné či vyšší než množstvím metabolitů tvořených za přítomnosti koenzymu NADPH:CYP reduktasy, NADPH. V práci jsme zjistili, že NADH je špatným koenzymem této reduktasy (NADPH:CYP reduktasy), ale efektivním koenzymem NADH:cytochrom b_5 reduktasy. Podobně jako metabolismus BaP potkaním CYP1A1, je metabolismus tohoto karcinogenu i lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v systému Supersomů zprostředkován nejen NADPH, ale i NADH. Přidání cytochromu b_5 vedlo ke stimulaci tvorby všech metabolitů BaP. Lidský CYP1A1 exprimovaný v buňkách *E. coli* (Bactosomy) však je za přítomnosti NADH neúčinný (netvoří metabolity BaP za přítomnosti NADH místo NADPH). Pro tvorbu metabolitů v tomto systémů je nezbytná přítomnost NADH:cytochrom b_5 reduktasy a cytochromu b_5. Podobný výsledek byl získán při studiu metabolismu BaP lidským rekombinantním CYP1A1 rekonstituovaným s jednotlivými složkami systému monooxygenas se smíšenou funkcí (Obrázek 3).



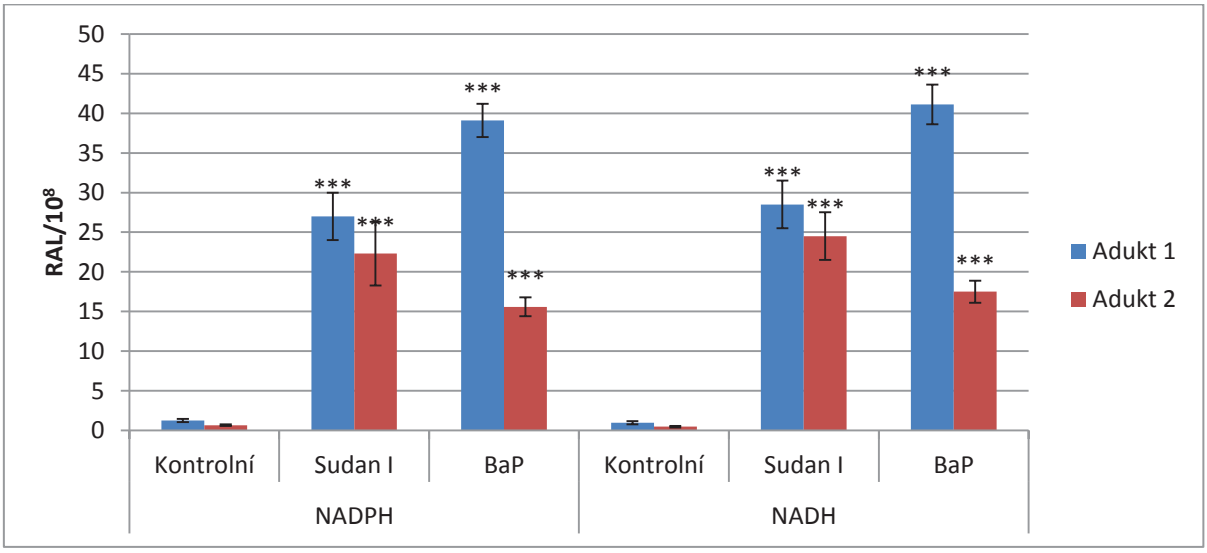
Obrázek 3 *Množství metabolitů BaP generovaných CYP1A1 rekonstituovaným s jednotlivými složkami monooxygenasového cyklu. Data v obrázku jsou průměry dvou paralelních měření.*

Aktivace benzo[a]pyrenu za tvorby aduktů s DNA *in vitro*

Benzo[a]pyren (BaP) je po aktivaci cytochromy P450 schopen se vázat na DNA za tvorby kovalentních aduktů. V systémech obsahujících jaterní mikrosomy potkana (Obrázek 5), člověka, myší s „deleltovanou“ NADPH:cytochrom P450 reduktasou, případně v systému obsahujícímu jaterní mikrosomy myší modifikovaných genem lidského proteinu p53 byly detekovány dva adukty BaP s DNA (Obrázek 4 aObrázek 5). Jedním z aduktů je adukt tvořený z BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE), 10-(deoxyguanosin-N^2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP (dG-N^2-BPDE, adukt 2) (obrázek 4). Dalším aduktem tvořeným v DNA po aktivaci BaP těmito mikrosomy byl detekován adukt generovaný z metabolitu BaP, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP, reakcí s deoxyguanosinem v DNA Získané výsledky odpovídají výsledkům získaným při studiu metabolismu BaP, kde všechny tyto enzymové systémy byly schopné metabolizovat BaP.



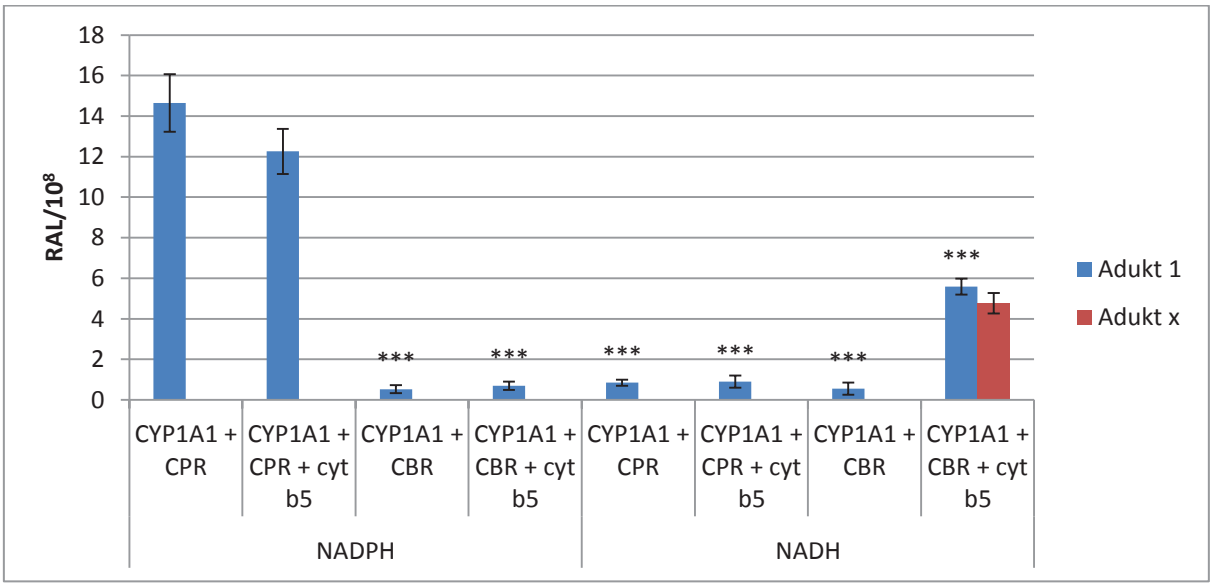
Obrázek 4 *Autoradiografie aduktů BaP s DNA vzniklých jeho aktivací v potkaních jaterních mikrozomech. Adukty aktivovaného BaP s DNA byly analyzovány metodou ^{32}P-postlabeling*



Obrázek 5 *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.*

Epoxidhydrolasa byla prokázána jako nezbytný enzym pro tvorbu aduktu 2 (dG-N^2-BPDE), což odpovídá její funkci při hydrolýze reaktivních epoxidů BaP, tedy i hydrolýze 7,8-epoxidu BaP.

Ativace BaP za použití kofaktoru NADH:cyt b_5 reduktasy, NADH, místo kofaktoru NADPH:CYP reduktasy, NADPH poskytovala analogické výsledky jako v případě studia metabolické přeměny BaP. Všechny enzymové systémy schopné metabolizovat BaP za přítomnosti NADH místo NADPH, byly účinné i při aktivaci tohoto karcinogenu za tvorby aduktů BaP s DNA. Jejich tvorba byla rovněž závislá na přítomnosti dvou enzymů, cytochromu b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasy, jejich přítomnost byla pro účinnost tohoto enzymového systému nezbytná (Obrázek 6).



Obrázek 6 *Tvorba aduktů BaP s DNA aktivovaného lidským CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou (CPR) a NADH:cytochrom b_5 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.*

Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4

Lidský CYP3A4 je jedním z nejefektivnějších cytochromů P450 oxidujících ellipticin. V práci jsme zjistili, že NADH místo NADPH zprostředkovává také oxidaci ellipticinu tímto cytochromem P450 exprimovaným v systému Supersomů, a to zejména za přítomnosti cyt b_5.

5 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 ellipticinu.

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. Nejefektivněji se v metabolismu BaP v obou organismech jeví CYP1A1
- Tvorba dihydrodiolů BaP a aduktu 10-(deoxyguanosin-N^2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP v DNA je závislá na přítomnosti dalšího enzymu exprimovaného v membráně endoplasmatického retikula, epoxidhydrolasy
- Zvyšování koncentrace NADPH:CYP reduktasy 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 reduktasy (poměrech NADPH:CYP reduktasy k cytochromu P450 maximálně 0,5:1).
- Fakultativní složka mikrosomálního monooxygenasového systému, cytochrom b_5, 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 reduktasy, NADH:cyt b_5 reduktasy, 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 DNA. Tato stimulace byla pozorována jednak v myších modelech s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech, a jednak u myší 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 reduktasy, ale i systém NADH, NADH:cytochrom b_5 reduktasy 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.

6 Citovaná literatura

1. **Hodgson, Ernest.** *A textbook of modern toxicology.* New Jersey : John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-26508-X.
2. **Stiborová, Marie; Hudeček, Jiří; Páca, Jan Jr; Martínek, Václav; Páca, Jan.** Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy.* 2004, Sv. 98.
3. **Coon, Minor J, Autor, Anne P a Strobel, Henry W.** Role of phospolipid in electron transfer in a reconstituted liver microsomal enzyme system containing cytochrome P450. *Chem-Biol interactions.* 1971, Sv. 3.
4. **Lu, Anthony Y.H; Kuntzman, Ronald; West, Susan; Jacobson, Martin; Conney, Allan H.** Reconstituted liver microsomes enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrate. *The journal of biological chemistry.* 1972, Vol. 247.
5. **Omura, Tsuneo a Sato, Ryo.** A new cytochrome in liver microsome. *The journal of biological chemistry.* 1962, Sv. 237.
6. —. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The journal of biological chemistry.* 1964, Sv. 239.
7. **Cramer, Stephen P; Dawson, John H; Hodgson, Keith O; Hager, Lowell 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.
8. **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.
9. **Yoshida, Yuzo, Imai, Yoshio a Hashimoto-Yutsudo, Chikako.** 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.

10. **Waterman, Michael R, Jenkins, Christopher M a Pikuleva, Irina.** Genetically engineered bacterial cells and applications. *Toxicology letters.* 1995, Sv. 82/83.
11. **Guengerich, F. Peter.** Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology.* 2008, Sv. 21.
12. **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.
13. **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.
14. **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.
15. **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.
16. **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.
17. **Haniu, Mitsuru; Iyanagi, Takashi; Miller, Philip; Lee, Terry D; Shively, John E.** Complete amino acid sequence of NADPH-cytochrome P450 reductase from porcine hepatic microsomes. *Biochemistry.* 1986, Sv. 25.
18. **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.
19. **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 A resolution. *Protein Science.* 1999, Sv. 8.
20. **Prough, Russell A a Masters, B S S.** The mechanism of cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome c reductase.
21. **Ilan, Zvi, Ilan, Rina a Cinti, Dominick L.** Evidence for a new physiological role of hepatic NADPH:ferricytochrome (P450) oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1981, Sv. 256.
22. **Nisimoto, Yukio 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.
23. **Vergeres, G a Waskell, L.** Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie.* 1995, Sv. 77.
24. **Loverde, A a Strittmatter, P.** The tole of lysyl residues in the structure and reactivity of cytochrome b5 reductase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1968, Sv. 243.
25. **Meunier, Bernard, de Visser, Samuel P a Shaik, Sason.** Mechanism of oxidation reactions catayzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Review.* 2004, Sv. 104.
26. **International Agency for Research on Cancer.** IARC Monographs on the Evalution of Carcinogenic Risks to Human. *International Agency for Research on Cancer.* [Online] [Citace: 24. 2 2015.] http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php.
27. **Gelboin, Harry V.** A microsome-dependent binding of benzo[a]pyrene to DNA. *Cancer research.* 1969, 29.
28. **Holder, Gerald; Yagi, Haruhiko; Dansette, Patrick; Jerina, Donald M; Levin, W; Lu, Anthony 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, 71.
29. **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.
30. **Yang, Shen K, Roller, Peter P a Gelboin, Hary 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, 16.

31. **Hundley, Stephen G a Freudenthal, 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.
32. **Autrup, Herman; Harris, Curtis C; Trump, Benjamin F; Jeffrey, Alan M.** Metabolism of benzo[a]pyrene and identification of the major benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured human colon. *Cancer research.* 1978, 38.
33. **Kim, James H; Stansbury, Kevin H; Walker, Nigel J; Trush, Michael A; Strickland, Paul T; Sutter, Thomas R.** Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis.* 1998, Sv. 19.
34. **Goodwin, Sidney, Smith, A F a Horning, E C.** Alkaloids of Ochrosia elliptica Labill. 81, 1959.
35. **Ansari, B M a Thompson, E N.** Methoxy-9-ellipticine lactate in refractory acute myeloid leukaemia. *Postgraduate Medical Journal.* 1975, 51.
36. **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.
37. **Stiborová, Marie; Rupertová, Martina; Schmeiser, Heinz H; Frei, Eva.** Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med.* 150, 2006.
38. **Stiborová, Marie; Bieler, Christian A; Wiessler, Manfred; Frei, Eva.** The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology.* 2001, Sv. 62.
39. **Frei, Eva; Bieler, Christian A; Arlt, Volker M; Wiessler, Manfred; Stiborová, Marie.** Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology.* 2002, Sv. 64.
40. **Poljaková, Jitka; Forsterová, Kristina; Šulc, Miroslav; Frei, Eva; Stiborová, Marie.** Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical Papers - Palacky University in Olomouc.* 2005, Sv. 149.
41. **Poljaková, Jitka; Dračínský, Martin; Frei, Eva; Hudeček, Jiří; Stiborová, Marie.** The efect of pH on peroxidase-mediated oxidation of and DNA adduct formation by ellipticine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* 2006, Sv. 71.
42. **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.
43. **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.
44. **Stiborová, M a Frei, E.** Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Current Medicinal Chemistry.* 2014, Sv. 21.
45. **Stiborová, Marie; Sejbal, Jan; Bořek-Dohalská, Lucie; Aimová, Dagmar; Poljaková, Jitka; Forsterová, Kristina; Rupertová, Martina; Wiesner, Jiří; Hudeček, Jiří; Wiessler, Manfred; Frei, Eva.** 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.
46. **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 metabolismof the anticancer drug ellipticine microsomes. *Neuroendocrinology Letters.* 2006, Sv. 27.
47. **Bořek-Dohalská, Lucie, Frei, Eva a Stiborová, Marie.** 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.
48. **Stiborová, M; Rupertová, M; Hodek, P; Frei, E; Schmeiser, H H.** Monitoring of DNA adducts in humans and 32P-postlabelling methods. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* 2004, Sv. 69.

Mgr. Radek Indra

Datum narození: 15. 6. 1987
Adresa: Závodní 1453, 687 25 Hluk
Tel: +420 777 688 003
E-mail: radekindra@seznam.cz

Praxe

7. 2012 – 12. 2012
PřF UK - vědecký pracovník – náplní práce bylo studium enzymů metabolizujících xenobiotika a experimentální práce v laboratoři se studenty bakalářského a magisterského studia

Řešené grantové projekty

2012 – 2014
PřF UK - vedoucí grantového projektu GAUK 640712 - Identifikace cytochromů P450 metabolizujících karcinogenní benzo[a]pyren *in vitro* a *in vivo*

Vzdělání

2011 – dosud **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta – doktorské studium ve studijním programu Biochemie**
Téma dizertační práce: *Mechanismus enzymové aktivace karcinogenů a léčiv systémem cytochromů P450*

2011 – 2014 **Masarykova univerzita, Ekonomicko-správní fakulta, bakalářský studijní program Podniková ekonomika a management**
Téma bakalářské práce: *Optimalizace organizační struktury*

2009 – 2011 **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta – magisterský studijní program v oboru Biochemie**
Téma diplomové práce: *Aktivita cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovaných v eukaryotních a prokaryotních systémech*

2006 – 2009 **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta – bakalářský studijní program v oboru Biochemie**
Téma bakalářské práce: *Vliv cytochromu b_5 na oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu cytochromem P450 3A4*

Jazykové znalosti

Angličtina – držitel First certificate in English

Němčina – držitel Deutsches sprachdiplom

Práce s počítačem

MS Office, Internet, Origin

Seznam publikací

Publikace

1. Stiborová M, **Indra R**, Moserová M, Černá V, Rupertová M, Martínek M, Eckschlager T, Kizek R, Frei E: Cytochrome b_5 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_{2012}=3,667**
2. **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_5 – a comparative study. *Neuro Endocrinology Letters, 34 (Suppl 2): 55-63, 2013*. **IF_{2013}=0,935**
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_5. *Neuro Endocrinology Letters*, 35(Suppl 2): 105-113, 2014. **IF_{2013}=0,935**
4. Stiborová M, Moserová M, Černá V, **Indra R**, Dračínský M, Šulc M, Henderson CJ, Wolf CR, Schmeiser HH, Phillips DH, Frei E, Arlt VM: Cytochrome b_5 and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology*, 318: 1-12, 2014. **IF_{2013}=3,745**

Rukopis zaslaný k publikaci

5. 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(+/+), Trp53(+/-) and Trp53(-/-) mice. Zasláno do časopisu *Archives of Toxicology*. (v revizi) 2015. **IF_{2013}=5,078**

Publikace s plným textem ve sbornících

6. **Indra R**, Moserová M, Kroftová N, Stiborová M: The effect of cytochrome b_5 on an electron-transporting system of cytochrome P450 1A1 in oxidation of benzo[a]pyrene. Sborník příspěvků. XIII Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. 29.5-30.5.2013 Brno, ČR, s. 47–48 (2013). ISBN 978-80-7375-757-1. (Poster)
7. **Indra R**, Moserová M, Arlt VM, Stiborová M: Cytochrome P450 1A1-catalyzed oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene is modulated by NADH and cytochrome b_5. Sborník příspěvků. XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. 3.6-4.6.2014 Brno, ČR, s. 54–56 (2014). ISBN 978-80-210-6842-1. (Poster)
8. Stiborová M, Moserová M, **Indra R**, Hodek P, Frei E, Arlt VM: Oxidation of and DNA adducts formation by benzo[a]pyrene by rat cytochrome P450 1A1 are stimulated by cytochrome b_5 and NADH. Sborník příspěvků. XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. 3.6-4.6.2014 Brno, ČR, s. 103–106 (2014). ISBN 978-80-210-6842-1. (Poster)

Abstrakty

9. **Indra R**, Stiborová M: Comparison of enzymatic activities of cytochromes P450 1A1, 1A2 and 3A4 expressed in prokaryotic and eukaryotic systems. 16th Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2011. 17.5.-20.5.2011 Praha, ČR. *Interdisciplinary toxicology, 4(2), s. A35 (2011)*. ISSN 1337-6853)print) 1337-9569 (on-line) (Poster)
10. **Indra R**, Stiborová M:Aktivita lidského cytochromu P450 1A1 exprimovaného v prokaryotním a eukaryotním systému. XII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků. 29.5.-1.6.2012 Počátky u Pelhřimova, ČR, *Chemické listy*, 106, s. 425 (2012). ISSN 1213-7103, 0009-2770 (printed) (Poster). **IF_{2012}=0,453**
11. **Indra R**, Stiborová M: Activity of human cytochrome P450 1A1 expressed in eukaryotic and prokaryotic systems. XXIII. Sjezd české společnosti pro biochemii a molekulární biologii a slovenské společnosti pro biochémiu a molekulární biológiu. 26.8-29.8.2012 Brno, ČR, s. 132 (2012) ISBN 978-80-86313-344 (Poster)
12. **Indra R**, Moserová M, Šulc M, Stiborová M: Human CYP1A1 oxidized carcinogenic benzo[a]pyrene to different pattern of metabolites than rat CYP1A1. 17th Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2012. 27.8-31.8.2012 Stará Lesná, Slovensko. *Interdisciplinary toxicology*, 5(1), s. 37 (2012). ISSN 1337-6853 (print) 1337-9569 (on-line) (Poster)
13. **Indra R**, Moserová M, Šulc M, Stiborová M: Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat CYP1A1 and its influencing by cytochrome b_5 – A comparative study. 49th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 1.9.-4.9.2013 Interlaken, Švýcarsko, *Toxicology Letters*, 221S, s. 72 (2013). ISSN 0378-4274 (Poster). **IF_{2013}=3,355**
14. **Indra R**, Moserová M, Šulc M, Stiborová M: Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat CYP1A1 and its influencing by cytochrome b_5. 18th Interdisciplinary Czech-Slovak Toxicology Conference TOXCON 2013, 19.6-21.6.2013 Hradec Králové, ČR. *Military Medical Science Letters*, 82(1), s. 12 (2013). ISSN 0372-7025 (Poster)
15. **Indra R**, Moserová M, Arlt VM, Stiborová M: Modulation of cytochrome P450 1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene by NADH and cytochrome b_5. 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 7.9.-10.9.2014 Edinburgh, Velká Británie, *Toxicology letters*, 229S, s. 150 (2014). ISSN 0378-4274 (Poster). **IF_{2013}=3,355**
16. Stiborová M, **Indra R**, Moserová M, Hodek P, Frei E, Arlt VM: DNA adducts formation by benzo[a]pyrene activated with rat cytochrome P450 1A1 is affected by NADPH, NADH and cytochrome b_5. 19th Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2014, 23.9.-26.9.2014 Stará Lesná, Slovensko, *Interdisciplinary toxicology*, 7(1), s. 79-80 (2014). ISSN 1337-6853 (print) 1337-9569 (on-line) (Poster)

Charles University

Faculty of Science

Department of Biochemistry

Mgr. Radek Indra

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

Summary of PhD. Thesis

Supervisor: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2015

Abstract

The environmental pollutant and human carcinogen, benzo[a]pyrene (BaP) is able to covalently bind to DNA after its activation with cytochrome P450 (CYP). In this thesis, one of the targets was to investigate the influence of individual components of mixed function monooxygenase (MFO) system on the metabolism of BaP and the generation of adducts of activated BaP with DNA. The study was particularly focused on increasing our knowledge on the effect of cyt b_5 on the metabolism of BaP by cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and its potential to serve as an electron donor during the reaction cycle of cytochrome P450. The effect of cyt b_5 on the 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_5 on the oxidation of another xenobiotic compound, a plant alkaloid ellipticine, that exhibits antitumor activities, was also investigated. Its pharmacological efficiency, as well as side effect 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, the suitability of using a 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 using the ^{32}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 being the metabolite BaP-9-ol. This metabolite was not formed by human microsomes. Metabolites generated by rat CYP1A1 also differ from metabolites generated by human CYP1A1 by the 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 a rat model is suitable for mimicking metabolism of BaP in humans. Epoxide hydrolase was shown to be the essential enzyme for the generation of dihydrodiols of BaP and one of the BaP-DNA adducts. A major limitation of the prokaryotic expression system for CYP1A1 (Bactosomes) for studying the metabolic fate of BaP, was the absence of epoxide hydrolase. Therefore the eukaryotic system expressing CYP1A1 (Supersomes^{TM}) was preferred. Cyt b_5 stimulates the generation of BaP metabolites and BaP-DNA adduct formation by rat and human CYP1A1. The results found in this thesis show that the system of human CYP1A1, NADH, NADH:cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 is able to metabolize BaP and generate BaP-DNA adducts. They also demonstrate that NADH in this system can act as a sole electron donor for both the first and second reduction of CYP1A1 during oxidative activation of BaP *in vitro*.

The ability of cyt b_5 to donate both electrons to CYP enzymes was also observed in the oxidation of ellipticine by human CYP3A4.

1 Introduction

1.1 Xenobiotic biotransforming enzymes

The reactions catalysed by enzymes metabolising (biotranforming) xenobiotics are classified into two groups, the reaction of the phase I and phase II of biotranformation. Monooxygenases of a membrane of endoplasmatic reticulum are the most important enzymes participating in the phase I reactions.

1.1.1 Monooxygenase system of membrane of endoplasmatic reticulum

The system of monooxygenases, early assigned as a mixed function oxidase system, catalyses the reactions, in which one atom of oxygen is incorporated into a substrate and the second atom is reduced to water. Monooxygenases are classified into two groups, into the monooxygenases containing cytochrome P450 and the monooxygenases containing flavin. Both are very important in toxicology of xenobiotics (1; 2).

The system of monooxygenases having cytochrome P450 as a terminal oxidase (the MFO system) contains at least two other components; the NADPH:cytochrome P450 reductase enzyme and the membrane lipids (1; 2; 3; 4). Another enzyme, NADH:cytochrome b_5 reductase and its protein substrate, cytochrome b_5, serve as facultative components of the MFO system (1; 2).

1.1.1.1 Cytochrome P450

Cytochromes P450 (EC 1.14.14.1) represent a wide and old group of enzymes. They can be found in bacteria, plants, animals and human. They were discovered in 50^{th}, in microsomes. It is a hem-containing protein that binds in its reduced form carbon monoxide and according to absorption maximum of this complex, this enzyme was assigned as cytochrome P450 (5; 6). Cytochrome P450 is unusual hem-containing protein, because the fifth ligand is a SH- group of cysteine (7; 8). It is therefore called as hemthiolate protein. The sixth ligand is the molecule of water (9). Most cytochromes P450 are localized in a membrane of endoplasmatic reticulum. There are only 10 % of cytochromes P450 in mitochondrion (10).

Cytochromes P450 are divided into several families (> 40 % identity) and subfamilies (> 55 % identity) according to sequence homology. There are 57 genes expressing in human to CYP protein that participate in metabolism of xenobiotics, sterols, vitamins, fatty acids or eicosanoids (11).

1.1.1.2 NADPH:cytochrome P450 reductase

NADPH:cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4) is a membrane bound flavoprotein which participate in reduction of cytochrome P450 (12; 13). It contains FAD and FMN (14; 15). Molecular mass is ≈ 78 kDa. The enzyme contains many acidic amino acids (16; 17). These acids are responsible for the interaction with cytochrome P450 and cytochrome c (18; 19). Cytochrome c (20), cytochrome b_5 (21) and elongase (22) are also reduced by this reductase. The transfer of electrons is direct and does not depend on superoxide anion production (22)

1.1.1.3 Cytochrome b_5

Cytochrome b_5 is a small membrane bound protein containing six helices and 5 β-chains. There are two domains in this protein. The first, containing hem, is localized on the cytosolic side of membrane. The second domain is a membrane anchor. A primary task of cyt b_5 is biosynthesis of lipids, especially desaturations and elongations of fatty acids. It is also a facultative component of a cytochrome P450 reaction cycle (23).

1.1.1.4 NADH:cytochrome b_5 reductase

NADH:cytochrome b_5 reductase (EC 1.6.2.2) transfers electrons from NADH to cytochrome b_5. It is a flavoprotein that exists in two forms. One form is a membrane bound form and the other is the soluble form. The membrane form is localised in endoplasmatic reticulum where it participates in elongation and desaturation of fatty acids and a reaction cycle of cytochrome P450. The soluble form, generated by alternative "splicing", reduces methaemoglobin to haemoglobin. It contains some lysines, which are necessary for interaction with cyt b_5 (24).

1.1.1.5 Reaction cycle of monooxygenase containing cytochrome P450

A monooxygenase reaction is the reaction in which one atom of oxygen is incorporated into a substrate and the other is reduced to water. It can be described by the following equation:

$$\mathbf{RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ + ROH + H_2O}$$

A reaction cycle of cytochrome P450 is a multistep process (Fig 1). In the resting state (A) hem iron is in a low spin ferri form. The binding of a substrate to the active centre is the first step. Water is expelled and iron changes this form to high spin (B). One electron reduction by NADPH:cytochrome P450 follows and the iron changes from the ferri form to the ferro form.

This complex (C) can react with an oxygen molecule and iron is again hexacoordinated (D). Second reduction is the next step and also the rate limiting step. Electrons can be provided by NADPH:cytochrome P450 reductase or by cytochrome b_5. Superoxide anion radical is created

if the second electron is not delivered fast enough. This anion radical is transformed to hydrogen peroxide by superoxide dismutase. The complex of cytochrome P450 with biatomic molecule of oxygen after the second reduction (E) represents the active form of cytochrome P450. Then two protonations and breaking of bond of the oxygen molecule follow and a molecule of water is released (F). The second atom of oxygen is transferred to a substrate. The oxidized substrate is released and cytochrome P450 is regenerated (1; 2; 25).

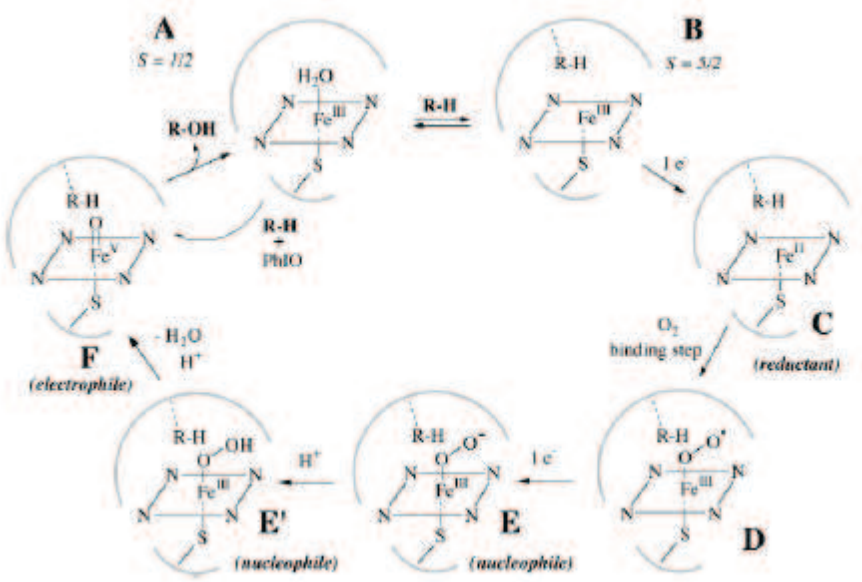


Figure 1 *Reaction cycle of cytochrome P450. Source: Meunier* (25)

1.2 Benzo[a]yprene

The environmental pollutant and human carcinogen benzo[a]pyrene ($C_{20}H_{20}$) (BaP) (26) is a polycyclic aromatic hydrocarbon. It is an air and industrial pollutant and is also a component of exhaust gas. It is also present in cigarette smoke.

Benzo[a]pyren is a genotoxic carcinogen that is able to covalently bind to DNA after its metabolic activation (27). Benzo[a]pyrene is oxidised to many metabolites, containing quinones, dihydrodiols and phenols (28; 29; 30; 31; 32). The BaP metabolite BaP-7,8-diol-9,10-epoxide is a reactive metabolite responsible for generation of DNA adduct with deoxyguanosine. The major enzyme responsible for BaP metabolism is cytochrome P450 1A1 (CYP1A1). Other cytochromes P450, mainly CYP1B1, can also oxidise BaP (33).

1.3 Ellipticine

Ellipticine (5,11-dimetyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol) is a plant alkaloid that was isolated in 1959 from *Ochrosia elliptica* (34). It exhibits antitumor activity against tumour of brain,

breast or lung. An ellipticine metabolite, 9-hydroxyllipticine was used to treat myeloid leukaemia (35).

The mechanisms of ellipticine action included (i) ellipticine intercalation into the double-helical structure of DNA, (ii) inhibition of topoisomerase II, (iii) the effect on p53 protein and (iv) formation of covalent adducts with DNA. The inhibition effect of 9-hydroxyellipticine on telomerase was also found as another mechanism of the ellipticine metabolite action (36).

Cytochromes P450 and peroxidases are able to oxidise ellipticine (37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44). Cytochromes P450 generate up to five metabolites (7-hydroxy-; 9-hydroxy-; 12-hydroxy-; 13-hydroxy-ellipticine a N^2-oxid ellipticine) (37; 45; 46; 44; 43). First two metabolites are the detoxification products, other three metabolites represent more active forms that can form covalent adduct with DNA (39; 38; 47; 43; 44). The major ellipticine-derived DNA adducts are generated by 12- and 13-hydroxyelliticine. N^2-oxid ellipticine is re-rearranged to 12-hydroxyellipticine, and can therefore also participate in generation of one ellipticine-derived covalent adduct (45; 44; 43). Deoxyguanosine is a target deoxynucleoside for covalent binding of these ellipticine metabolites (37; 44; 43).

2 Aims of this study

The primary aim of the thesis was to resolve the role of individual components of the microsomal mixed-function monooxygenase system containing cytochrome P450, in metabolism of xenobiotics. Of them, the environmental pollutant and a human carcinogen benzo[a]pyrene, in addition to the plant alkaloid with antitumor effect, ellipticine, were used as model xenobiotics. Another aim was to investigate whether rats might serve as a suitable animal model mimicking metabolism of a studied carcinogen, benzo[a]pyrene, in humans.

The aims of the thesis are as follows:

- Metabolism of benzo[a]yprene by rat and human liver microsomes
- Metabolism of benzo[a]pyrene by rat and human recombinant cytochromes P450 and the effect of cytochrome b_5 on this metabolism
- Metabolism of benzo[a]pyrene by human cytochrome P450 1A1 expressed in prokaryotic and eukaryotic systems
- The effect of NADPH:cytochrome P450 on oxidation of benzo[a]pyrene by cytochrome P450 1A1
- Study of the effect of cytochrome b_5 on the reduction of cytochrome P450 during oxidation of benzo[a]pyrene and ellipticine
- Study of generation of covalent adducts of benzo[a]pyrene with DNA after its metabolic activation by enzymatic systems metabolizing this carcinogen
- The effect of cytochrome b_5 on generation of adducts of benzo[a]pyrene with DNA

3 Material and methods

Materials and all methods used are described in papers that are the parts of the PhD thesis (supplements 1-5). Here, the only two methods most frequently used in the study are described.

HPLC analyses of BaP and ellipticine metabolites

HPLC analysis of BaP metabolites generated by individual enzyme systems was performed on a Nucleosil® C18 reversed phase column, (250 × 4 mm, 5 μm; Macherey Nagel, Germany) using a Dionex system consisting of a pump P580, a UV/VIS Detector UVD 170S/340S, an ASI-100 Automated Sample Injector, a termobox COLUMN OVEN LCO 101 and an In-Line Mobile Phase Degasser Degasys DG-1210 Dionex controlled with ChromeleonTM 6.11 build 490 software. HPLC conditions were: 50% acetonitrile in HPLC water (*v*/*v*), with a linear gradient to 85% acetonitrile in 35 min, then an isocratic elution with 85% acetonitrile for 5 min, a linear gradient from 85% acetonitrile to 50% acetonitrile in 5 min, followed by an isocratic elution of 50% acetonitrile for 5 min. Detection was by UV at 254 nm. BaP metabolite peaks were collected and analysed by NMR and/or mass spectrometry. The metabolite peak areas were calculated relative to the peak area of the internal standard (phenacetine).

Ellipticine metabolites formed by human CYP3A4 in Supersomes™ were analysed by HPLC. The column used was a 5-μm Ultrasphere ODS (4.6 × 250 mm; Beckman, Fullerton, CA), the eluent was 64% methanol plus 36% of 5 mmol/l heptane sulfonic acid containing 32 mmol/l acetic acid in water with flow rate of 0.8 ml/minute, and detection was at 296 nm. The metabolite peak areas were calculated relative to the peak area of the internal standard (phenacetine).

Detection and quantification of DNA adducts

DNA from incubation mixtures was isolated by a standard phenol-chloroform extraction method. DNA adduct analysis was performed by the nuclease P1 enrichment version of the ^{32}P-postlabelling method, by Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc, in German Cancer Research Center in Heidelberg, as described previously (48). DNA adduct levels (RAL, relative adduct labelling) were calculated from adduct counts per minute (cpm), the specific activity of [γ-^{32}P]ATP and the amount of DNA (pmol) used. Results were expressed as DNA adducts/10^8 normal nucleotides (nt). An external BPDE-modified DNA standard was used to identify BaP-DNA adducts.

4 Results and discussion

Oxidation of benzo[a]pyrene by liver microsomes

Liver microsomes of control (untreated) rats and rats treated with inducers of individual cytochromes P450 metabolised benzo[a]pyrene up to eight metabolites (BaP-9,10-dihydrodiol, BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, BaP-3-ol, BaP-9-ol and a metabolite with unknown structure). BaP-9-ol and a metabolite of unknown structure were not formed by human hepatic microsomes. Other metabolites were analogical to those generated by rat liver microsomes. The same BaP metabolites were also formed by liver microsomes of mice, in which NADPH:cytochrome P450 reductase was deleted in liver, and mice modified by a gene of human protein p53. Treatment of both mouse models with benzo[a]pyrene increased efficiencies of their microsomes to metabolise BaP.

Analysis of metabolite of BaP in urine of mouse modified by gene of human protein p53

Several BaP metabolites were detected in urine of a mouse model modified by a gene of human protein p53 (possessing different expression status of a *p53* gene). Its quantity was the highest in one mouse model [Trp53(+/-)]. This result does not correspond to generation of these BaP metabolites in liver microsomes of these animals in *in-vitro* incubations. Microsomes of Trp53(+/-) mice were almost analogously active to metabolize BaP as those of animals that were not modified by a *p53* gene [Trp53(-/-). This indicates that BaP metabolites are either eliminated in more polar conjugates or are not eliminated by urine.

Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant cytochrome P450

Rat recombinant cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) expressed in microsomes of insect cells (Supersomes^{TM}) oxidises benzo[a]yprene to eight metabolites. The metabolites are the same as those formed by liver microsomes of rats. Addition of cytochrome b_5 to incubation stimulates generation of BaP metabolites. Human recombinant CYP1A1 expressed in microsomes of insect cells (Supersomy^{TM}) generates metabolites analogical to those generated by rat CYP1A1 except that BaP-4,5-dihydrodiol was not formed in this system (Figure 2). Cytochrome b_5 stimulates generation of all BaP metabolites. Only five BaP metabolites were generated by human CYP1A1 expressed in membranes of *E. coli* cells (Bactosomes). Metabolites BaP-9,10-dihydrodiol and BaP-7,8-dihydrodiol were not formed in this system. They were generated only after addition of epoxide hydrolase to the reaction mixture. The amounts of BaP metabolites generated by CYP1A1 expressed in *E. coli* cells depend on a molar ratio of NADPH:cytochrome P450 reductase to cytochrome P450.

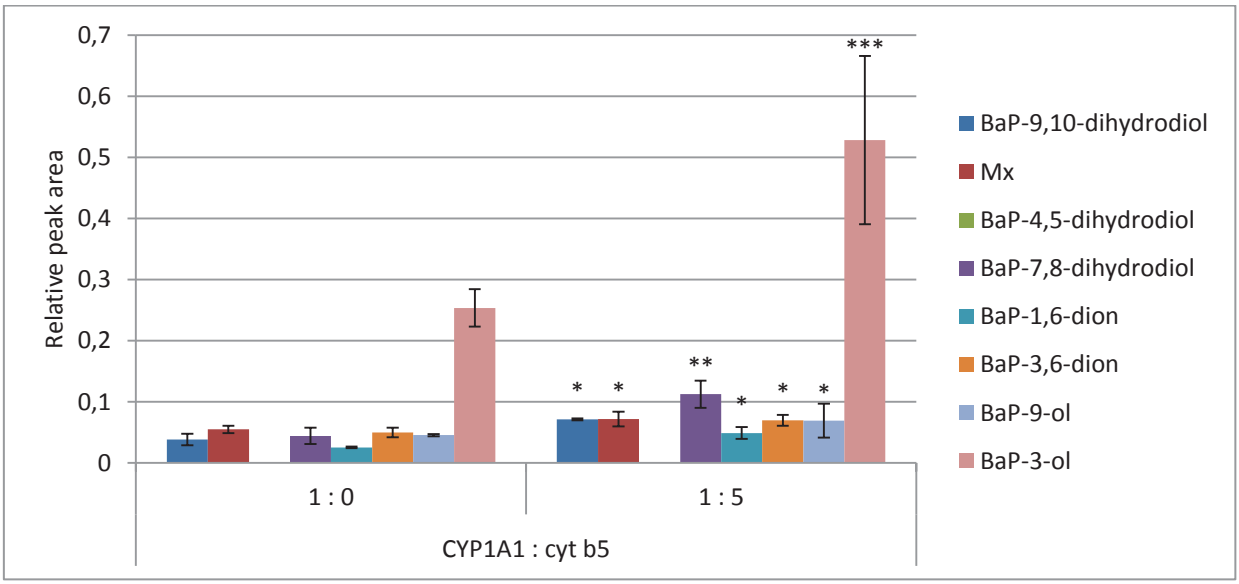


Figure 2 *Amounts of BaP metabolites generated by human cytochrome P450 1A1 expressed in Supersomes™ and the ffect of cyt b_5 on this metabolism. The values are averages and standard deviations of triplicate incubations. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, significant differences in amounts of BaP metabolites formed, as compared to those formed by CYP1A1 without cyt b_5. Student t-test.*

Metabolism of benzo[a]pyrene by systems of cytochrome P450 in the presence of NADH and the effect of cyt b_5 on this metabolism

Rat liver microsomes metabolise benzo[a]pyrene even if NADH is present in incubstions instead of NADPH. The amounts of metabolites formed in the presence of NADH were similar to their amounts generated in the presence of a coenzyme of NADPH:CYP reductase, NADPH. NADH was found to be a worse coenzyme of NADPH:CYP reductase, but is the coenzyme of NADH:cytochrome b_5 reductase. Similar to metabolism of BaP by rat CYP1A1, this carcinogen is also metabolised by human cytochrome P450 1A1 regardless of the presence NADPH or NADH. The addition of cytochrome b_5 to the incubations stimulates generation of all BaP metabolites. Human CYP1A1 expressed in a membranes of *E. coli* does not generate BaP metabolites if cytochrome b_5 and NADH:cytochrome b_5 reductase are not present in the system. Similar results were found when human recombinant CYP1A1 reconstituted with individual components of the mixed function monooxygenase system was used (Figure 3).

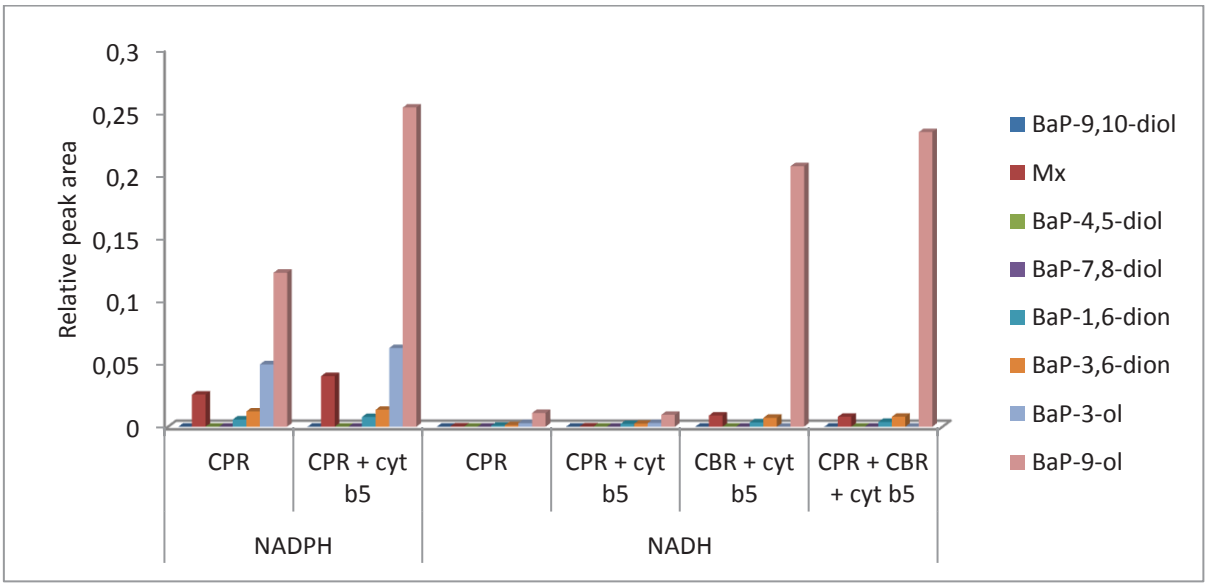


Figure 3 *Amounts of BaP metabolites generated by CYP1A1 reconstituted with individual components of the monooxygenase system. The values are averages of two parallel incubations.*

Activation of benzo[a]pyrene to species forming BaP-DNA adducts *in vitro*

Benzo[a]yprene (BaP) is after its activation able to covalently bind to DNA. Two adducts were formed in systems containing liver microsomes of rat, human, and all mouse models used in a study investigating the metabolism of BaP (Fig 4 and Figure 5). One adduct, the 10-(deoxyguanosin-N^2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP adduct (dG-N^2-BPDE, adduct 2 in Fig 4) is generated from BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE). Another detected adduct is generated from a BaP metabolite 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP. These results correspond to the results found during investigation of BaP metabolism, where all the systems were able to oxidise BaP.

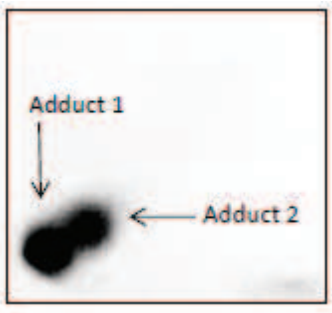


Figure 4 *Autoradiography of BaP-DNA adducs generated by rat liver microsomes. Adducts were analysed by the ^{32}P-postlabeling method.*

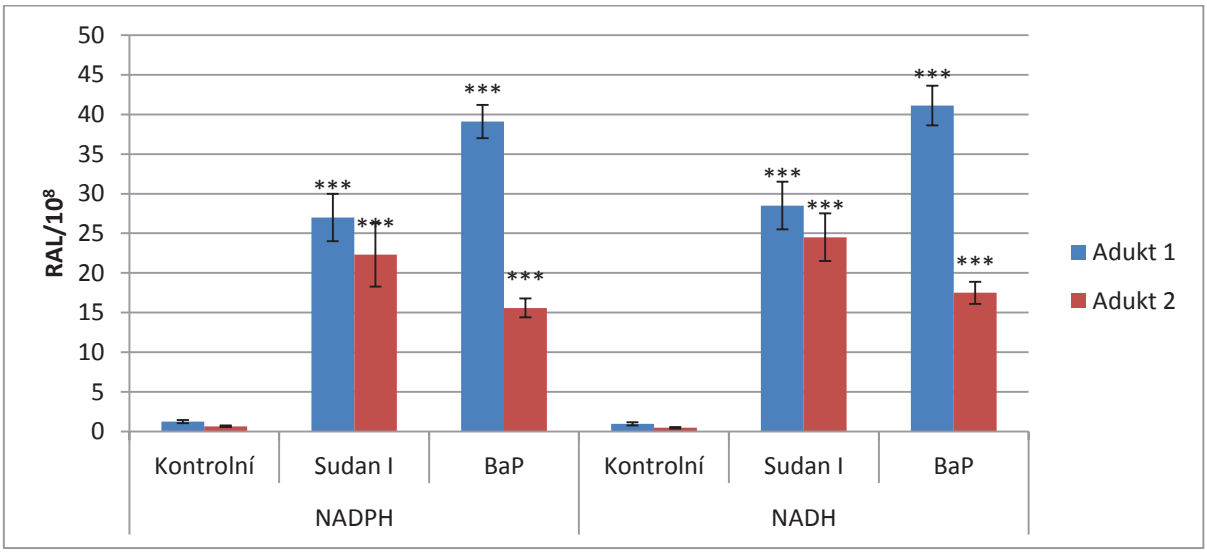
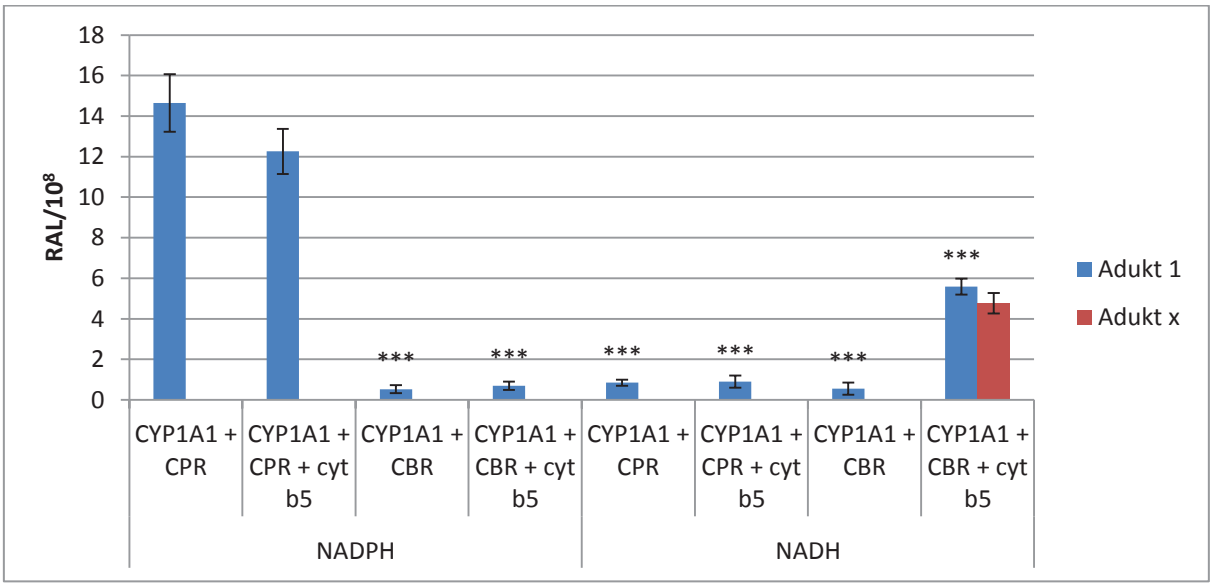


Figure 5 *Levels of BaP-DNA adducts formed by rat liver microsomes of control animals, or animals treated with Sudan I and BaP. Incubations contained either NADPH or NADH. The values are averages and standard deviatians of triplicate incubations. ***P<0,001 significant difference in amounts of BaP-DNA adducts as compared to those generated by control microsomes. Student t-test.*

It was shown that epoxide hydrolase is essential for generation of adduct 2 (dG-N^2-BPDE). This correspond to its function to hydrolyse BaP epoxides

Activation of BaP by microsomal systems in the presence of NADH instead of NADPH provides the results analogical to those found in a study investigating BaP metabolism. Likewise, human CYP1A1 reconstituted with cytochrome b_5 and its reductase, NADH:cytochrome b_5, activated BaP in the presence of NADH to species forming DNA adducts, even though this system was less efficient in formation of BaP-DNA adduct 1 than CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase in the presence of NADPH (Figure 6). Hence, all CYP1A1 enzyme systems that were able to metabolise BaP in the presence NADH instead of NADPH were also effective in activation of this carcinogen to generate BaP-DNA adducts. This process depends on the presence of cytochrome b_5 and NADH:cytochrome b_5 reductase (Fiure 6).



Fiure 6 *Generation of BaP-BaP adducts by human CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase (CPR) or NADH:cytochrome b_5 reductase (CBR) in liposomes. Incubations contained either NADPH or NADH. The values are averages and standard deviations of triplicate incubation. ***P<0,001 significant difference in amounts of BaP-DNA adducts formed by human CYP1A1 in several system as compared to those generated by this CYP reconstituted with NADPH:CYP reductase in the presence of only NADPH. Student t-test.*

Oxidation of ellipticine by cytochrome P450 3A4

Human CYP3A4 is one of the most efficient human CYP oxidizing ellipticine. Also this cytochrome P450 expressed in Supersomes^{TM} is capable of oxidizing ellipticine in the presence of NADH instead of NADPH, particularly in the presence of cyt b_5.

5 Conclusion

Results found in this thesis show that CYP1A1 (oxidative detoxification and activation of BaP) can provide electrons not only with NADPH and NADPH:CYP reductase but also with NADH, NADH:cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 in both reduction steps. The most important results found in the thesis are as follows:

- Microsomes isolated from rat liver metabolise benzo[a]pyrene to eight metabolites (BaP-9,10-dihydrodiol, BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, BaP-3-ol, BaP-9-ol and a metabolite with unknown structure) and activate it to species forming BaP-DNA adducts
- The most effective rat and human cytochrome P450 catalyzing such metabolism of BaP is CYP1A1
- Formation of dihydrodiols of BaP and the 10-(deoxyguanosin-N^2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP adduct depends on the presence of another enzyme of a membrane of endoplasmic reticulum, epoxide hydrolase
- Cytochrome b_5 stimulates metabolism of BaP and formation of BaP-DNA adducts catalyzed by most tested cytochromes P450
- An increase in concentrations of NADPH:CYP reductase added to human CYP1A1 increased BaP metabolism by this enzyme
- Cytochrome b_5 can provide both electrons to reduce cytochrome P450 in its reaction cycle (in both reductions) if its reductase, NADH:cytochrome b_5, is present
- Treatment of mouse and rat experimental models with BaP stimulates their ability to metabolise benzo[a]pyrene and to activate it to form BaP-DNA adducts

The results found in this thesis demonstrate that reduction of CYP1A1 in its reaction cycle, namely in the reactions, where BaP is both detoxified and activated, can be mediated not only by a transfer of electrons from NADPH catalyzed by NADPH:CYP reductase, but also from NADH, by the system of cytochrome b_5 and its reductase, NADH:cytochrome b_5. They demonstrate that NADH in this system can act as a sole electron donor for both the first and second reduction of CYP1A1 during BaP oxidation *in vitro*.

The PhD thesis contains the original scientific results. A part of these results has already been published in four full papers in scientific journals with impact factor. Another paper has been submitted (see List of publications). Further publications containing other results that were presented as posters at congresses and symposiums are now in preparation.

6 Referencies

1. **Hodgson, Ernest.** *A textbook of modern toxicology.* New Jersey : John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-26508-X.
2. **Stiborová, Marie; Hudeček, Jiří; Páca, Jan Jr; Martínek, Václav; Páca, Jan.** Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy.* 2004, Sv. 98.
3. **Coon, Minor J, Autor, Anne P a Strobel, Henry W.** Role of phospolipid in electron transfer in a reconstituted liver microsomal enzyme system containing cytochrome P450. *Chem-Biol interactions.* 1971, Sv. 3.
4. **Lu, Anthony Y.H; Kuntzman, Ronald; West, Susan; Jacobson, Martin; Conney, Allan H.** Reconstituted liver microsomes enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrate. *The journal of biological chemistry.* 1972, Vol. 247.
5. **Omura, Tsuneo a Sato, Ryo.** A new cytochrome in liver microsome. *The journal of biological chemistry.* 1962, Sv. 237.
6. —. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The journal of biological chemistry.* 1964, Sv. 239.
7. **Cramer, Stephen P; Dawson, John H; Hodgson, Keith O; Hager, Lowell 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.
8. **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.
9. **Yoshida, Yuzo, Imai, Yoshio a Hashimoto-Yutsudo, Chikako.** 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.
10. **Waterman, Michael R, Jenkins, Christopher M a Pikuleva, Irina.** Genetically engineered bacterial cells and applications. *Toxicology letters.* 1995, Sv. 82/83.
11. **Guengerich, F. Peter.** Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology.* 2008, Sv. 21.
12. **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.
13. **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.
14. **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.
15. **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.
16. **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.
17. **Haniu, Mitsuru; Iyanagi, Takashi; Miller, Philip; Lee, Terry D; Shively, John E.** Complete amino acid sequence of NADPH-cytochrome P450 reductase from porcine hepatic microsomes. *Biochemistry.* 1986, Sv. 25.
18. **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.
19. **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 A resolution. *Protein Science.* 1999, Sv. 8.
20. **Prough, Russell A a Masters, B S S.** The mechanism of cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome c reductase.

21. **Ilan, Zvi, Ilan, Rina a Cinti, Dominick L.** Evidence for a new physiological role of hepatic NADPH:ferricytochrome (P450) oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1981, Sv. 256.
22. **Nisimoto, Yukio 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.
23. **Vergeres, G a Waskell, L.** Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie.* 1995, Sv. 77.
24. **Loverde, A a Strittmatter, P.** The tole of lysyl residues in the structure and reactivity of cytochrome b5 reductase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1968, Sv. 243.
25. **Meunier, Bernard, de Visser, Samuel P a Shaik, Sason.** Mechanism of oxidation reactions catayzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Review.* 2004, Sv. 104.
26. **International Agency for Research on Cancer.** IARC Monographs on the Evalution of Carcinogenic Risks to Human. *International Agency for Research on Cancer.* [Online] [Citace: 24. 2 2015.] http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php.
27. **Gelboin, Harry V.** A microsome-dependent binding of benzo[a]pyrene to DNA. *Cancer research.* 1969, 29.
28. **Holder, Gerald; Yagi, Haruhiko; Dansette, Patrick; Jerina, Donald M; Levin, W; Lu, Anthony 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, 71.
29. **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.
30. **Yang, Shen K, Roller, Peter P a Gelboin, Hary 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, 16.
31. **Hundley, Stephen G a Freudenthal, 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.
32. **Autrup, Herman; Harris, Curtis C; Trump, Benjamin F; Jeffrey, Alan M.** Metabolism of benzo[a]pyrene and identification of the major benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured human colon. *Cancer research.* 1978, 38.
33. **Kim, James H; Stansbury, Kevin H; Walker, Nigel J; Trush, Michael A; Strickland, Paul T; Sutter, Thomas R.** Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis.* 1998, Sv. 19.
34. **Goodwin, Sidney, Smith, A F a Horning, E C.** Alkaloids of Ochrosia elliptica Labill. 81, 1959.
35. **Ansari, B M a Thompson, E N.** Methoxy-9-ellipticine lactate in refractory acute myeloid leukaemia. *Postgraduate Medical Journal.* 1975, 51.
36. **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.
37. **Stiborová, Marie; Rupertová, Martina; Schmeiser, Heinz H; Frei, Eva.** Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med.* 150, 2006.
38. **Stiborová, Marie; Bieler, Christian A; Wiessler, Manfred; Frei, Eva.** The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology.* 2001, Sv. 62.
39. **Frei, Eva; Bieler, Christian A; Arlt, Volker M; Wiessler, Manfred; Stiborová, Marie.** Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology.* 2002, Sv. 64.
40. **Poljaková, Jitka; Forsterová, Kristina; Šulc, Miroslav; Frei, Eva; Stiborová, Marie.** Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical Papers - Palacky University in Olomouc.* 2005, Sv. 149.
41. **Poljaková, Jitka; Dračínský, Martin; Frei, Eva; Hudeček, Jiří; Stiborová, Marie.** The efect of pH on peroxidase-mediated oxidation of and DNA adduct formation by ellipticine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* 2006, Sv. 71.

42. **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.
43. **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.
44. **Stiborová, M a Frei, E.** Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Current Medicinal Chemistry.* 2014, Sv. 21.
45. **Stiborová, Marie; Sejbal, Jan; Bořek-Dohalská, Lucie; Aimová, Dagmar; Poljaková, Jitka; Forsterová, Kristina; Rupertová, Martina; Wiesner, Jiří; Hudeček, Jiří; Wiessler, Manfred; Frei, Eva.** 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.
46. **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 metabolismof the anticancer drug ellipticine microsomes. *Neuroendocrinology Letters.* 2006, Sv. 27.
47. **Bořek-Dohalská, Lucie, Frei, Eva a Stiborová, Marie.** 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.
48. **Stiborová, M; Rupertová, M; Hodek, P; Frei, E; Schmeiser, H H.** Monitoring of DNA adducts in humans and 32P-postlabelling methods. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* 2004, Sv. 69.

Mgr. Radek Indra

Born: 15. 6. 1987
Address: Závodní 1453, 687 25 Hluk
Phone: +420 777 688 003
E-mail: radekindra@seznam.cz

Practice

7. 2012 – 12. 2012
Charles University, Faculty of science – scientist– study of enzymes metabolizing xenobiotics and laboratory work with students

Grants

2012 – 2014
Leader of grant GAUK 640712 – Identification of cytochrome P450 metabolizing carcinogenic benzo[a]pyrene *in vitro* a *in vivo*

Education

2011 – Now **Charles University in Prague, Faculty of Science – PhD study of Biochemistry**
Topic of PhD thesis: *Mechanism of enzymatic activation of carcinogen and drugs by the system of cytochrome P450*

2011 – 2014 **Masarykova univerzita, Faculty of Economics and Administration – Bc study of Economy and Management**
Topic of thesis: *Optimalization of organization structure*

2009 – 2011 **Charles University in Prague, Faculty of Science – Master study of Biochemistry**
Topic of diploma thesis: *Activity of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 3A4 expressed in eukaryotic and prokaryotic systems*

2006 – 2009 **Charles University in Prague, Faculty of Science – Bc study of Biochemistry**
Topic of thesis: *The effect of cytochrome b_5 on oxidation on anticancer drug ellipticine by cytochrome P450 3A4*

Languages

English – First certificate in English

German –Deutsches sprachdiplom

Work with PC

MS Office, Internet, Origin

List of publications

Publications

1. Stiborová M, **Indra R**, Moserová M, Černá V, Rupertová M, Martínek M, Eckschlager T, Kizek R, Frei E: Cytochrome b_5 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_{2012}=3,667**
2. **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_5 – a comparative study. *Neuro Endocrinology Letters, 34 (Suppl 2): 55-63, 2013.* **IF_{2013}=0,935**
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_5. *Neuro Endocrinology Letters*, 35(Suppl 2): 105-113, 2014. **IF_{2013}=0,935**
4. Stiborová M, Moserová M, Černá V, **Indra R**, Dračínský M, Šulc M, Henderson CJ, Wolf CR, Schmeiser HH, Phillips DH, Frei E, Arlt VM: Cytochrome b_5 and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology*, 318: 1-12, 2014. **IF_{2013}=3,745**

Manuscript prepared for publication

5. 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(+/+), Trp53(+/-) and Trp53(-/-) mice. Zasláno do časopisu *Archives of Toxicology*. (v revizi) 2015. **IF_{2013}=5,078**

Papers in proceedings

6. **Indra R**, Moserová M, Kroftová N, Stiborová M: The effect of cytochrome b5 on an electron-transporting system of cytochrome P450 1A1 in oxidation of benzo[a]pyrene. Sborník příspěvků. XIII Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. 29.5-30.5.2013 Brno, ČR, s. 47–48 (2013). ISBN 978-80-7375-757-1. (Poster)
7. **Indra R**, Moserová M, Arlt VM, Stiborová M: Cytochrome P450 1A1-catalyzed oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene is modulated by NADH and cytochrome b5. Sborník příspěvků. XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. 3.6-4.6.2014 Brno, ČR, s. 54–56 (2014). ISBN 978-80-210-6842-1. (Poster)

8. Stiborová M, Moserová M, **Indra R**, Hodek P, Frei E, Arlt VM: Oxidation of and DNA adducts formation by benzo[a]pyrene by rat cytochrome P450 1A1 are stimulated by cytochrome b_5 and NADH. Sborník příspěvků. XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků. 3.6-4.6.2014 Brno, ČR, s. 103–106 (2014). ISBN 978-80-210-6842-1. (Poster)

Abstracts

9. **Indra R**, Stiborová M: Comparison of enzymatic activities of cytochromes P450 1A1, 1A2 and 3A4 expressed in prokaryotic and eukaryotic systems. 16th Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2011. 17.5.-20.5.2011 Praha, ČR. *Interdisciplinary toxicology, 4(2), s. A35 (2011)*. ISSN 1337-6853)print) 1337-9569 (on-line) (Poster)
10. **Indra R**, Stiborová M:Aktivita lidského cytochromu P450 1A1 exprimovaného v prokaryotním a eukaryotním systému. XII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků. 29.5.-1.6.2012 Počátky u Pelhřimova, ČR, *Chemické listy*, 106, s. 425 (2012). ISSN 1213-7103, 0009-2770 (printed) (Poster). **IF_{2012}=0,453**
11. **Indra R**, Stiborová M: Activity of human cytochrome P450 1A1 expressed in eukaryotic and prokaryotic systems. XXIII. Sjezd české společnosti pro biochemii a molekulární biologii a slovenské společnosti pro biochémiu a molekulární biológiu. 26.8-29.8.2012 Brno, ČR, s. 132 (2012) ISBN 978-80-86313-344 (Poster)
12. **Indra R**, Moserová M, Šulc M, Stiborová M: Human CYP1A1 oxidized carcinogenic benzo[a]pyrene to different pattern of metabolites than rat CYP1A1. 17th Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2012. 27.8-31.8.2012 Stará Lesná, Slovensko. *Interdisciplinary toxicology*, 5(1), s. 37 (2012). ISSN 1337-6853 (print) 1337-9569 (on-line) (Poster)
13. **Indra R**, Moserová M, Šulc M, Stiborová M: Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat CYP1A1 and its influencing by cytochrome b_5 – A comparative study. 49th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 1.9.-4.9.2013 Interlaken, Švýcarsko, *Toxicology Letters*, 221S, s. 72 (2013). ISSN 0378-4274 (Poster). **IF_{2013}=3,355**
14. **Indra R**, Moserová M, Šulc M, Stiborová M: Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat CYP1A1 and its influencing by cytochrome b_5. 18th Interdisciplinary Czech-Slovak Toxicology Conference TOXCON 2013, 19.6-21.6.2013 Hradec Králové, ČR. *Military Medical Science Letters*, 82(1), s. 12 (2013). ISSN 0372-7025 (Poster)
15. **Indra R**, Moserová M, Arlt VM, Stiborová M: Modulation of cytochrome P450 1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene by NADH and cytochrome b_5. 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 7.9.-10.9.2014 Edinburgh, Velká Británie, *Toxicology letters*, 229S, s. 150 (2014). ISSN 0378-4274 (Poster). **IF_{2013}=3,355**
16. Stiborová M, **Indra R**, Moserová M, Hodek P, Frei E, Arlt VM: DNA adducts formation by benzo[a]pyrene activated with rat cytochrome P450 1A1 is affected by NADPH, NADH and cytochrome b_5. 19th Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2014, 23.9.-26.9.2014 Stará Lesná, Slovensko, *Interdisciplinary toxicology*, 7(1), s. 79-80 (2014). ISSN 1337-6853 (print) 1337-9569 (on-line) (Poster)