

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE,  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE**

Doktorský studijní program: Biochemie



**METABOLISMUS KARCIINOGENŮ A LÉČIV  
MONOOXYGENASOVÝM SYSTÉMEM**

RNDr. Michaela Moserová

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2011



## Abstrakt

Ellipticin, alkaloid z rostlin čeledi Apocynaceae, vykazuje významný protinádorový a anti-HIV účinek. Je pro-léčivem, jehož farmakologická účinnost a vedlejší genotoxické účinky závisí na metabolické aktivaci cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami (Px). Z toho důvodu bylo cílem disertační práce poznání příspěvku jednotlivých CYP a Px k oxidaci ellipticinu v různých tkáních (játra, plíce a ledviny) laboratorního potkana, který byl vybrán jako vhodný model ilustrující osud ellipticinu v lidském organismu. Dále byly využity mikrosomální systémy myši s „deletovanou“ reduktasou v játrech (HRN<sup>TM</sup>) a myši kontrolní linie (WT) a purifikované enzymy CYP1A1 a 3A4. Sledován byl i vliv cytochromu b<sub>5</sub> na produkci jednotlivých metabolitů (aktivačních a detoxikačních) ellipticinu a tvorba aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA.

Karcinogenní benzo[a]pyren (BaP) je po své aktivaci cytochromy P450 (CYPs) schopný kovalentní vazby na DNA. Sledovali jsme jeho schopnost tvorby aduktů s DNA a indukce enzymů CYP a NADPH:CYP reduktasy (RED) v myších játrech, hlavním orgánu tvorby aduktů BaP s DNA. CYP1A1 je označován za nejdůležitější enzym v metabolické aktivaci BaP. V práci jsme sledovali vliv jednotlivých složek systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systému) na metabolismus BaP. V disertační práci byly využity mikrosomální systémy potkanů kontrolních a premedikovaných induktorem CYP1A1/2, Sudanem I, a purifikovanými enzymy, CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Sledována byla produkce jednotlivých metabolitů BaP (aktivačních a detoxikačních) a tvorba aduktů aktivovaného BaP s DNA.

V obou případech jsme pro separaci metabolitů vzniklých oxidací ellipticinu a/nebo BaP využili HPLC. Adukty vzniklé aktivací těchto dvou sloučenin byly kvantifikovány metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“

Z výsledků získaných při studii osudu ellipticinu v organismu vyplývá, že cytochrom b<sub>5</sub> ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP1A1 a 1A2 ve prospěch aktivačních metabolitů, v případě CYP3A4 je stimulována tvorba 9-hydroxyellipticinu a aktivačního metabolitu, 13-hydroxyellipticinu. V játrech potkanů premedikovaných ellipticinem dochází k nárůstu jak aktivačních metabolitů, tak i aduktů s DNA. Za tuto skutečnost je odpovědný CYP1A1 v komplexu s cytochromem b<sub>5</sub>, které jsou ellipticinem indukovány. V plicní a ledvinné tkáni dochází vlivem CYP1A1 k detoxikaci ellipticinu a zároveň k aktivaci ellipticinu katalyzovaném peroxidasami.

Ze studie sledující metabolismus BaP vyplývá, že BaP je oxidován mikrosomálním systémem potkana i myši na šest metabolitů (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; ?; 3,6-chinon-;1,6-chinon a 3-OH-BaP). V rekonstituovaném systému CYP1A1 s NADPH:CYP reduktasou však vznikají metabolity pouze tři (3,6-chinon-;1,6-chinon a 3-OH-BaP). K nejúčinnější oxidaci BaP dochází při nízké koncentraci NADPH:CYP reduktasy v rekonstituovaném systému s CYP1A1, a to v poměru CYP:RED 1:0.05. Cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje oxidaci BaP cytochromem P450 1A1 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou. Epoxidhydrolasa je esenciálním enzymem pro tvorbu aduktu BaP č. 2, tvořeného ze 7,8,-dihydroxy-9,10-epoxy-BaP. Tento adukt není tvořen v systému, který obsahuje pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasu. V systému bez epoxidhydrolasy je tvořen pouze adukt č. 1, generovaný z jiného metabolitu BaP, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP. Cytochrom b<sub>5</sub> výrazně ovlivňuje tvorbu obou kovalentních aduktů BaP s DNA.

## ÚVOD

### Ellipticin

Ellipticin (5, 11-dimethyl-6*H*-pyrido[4, 3-*b*] karbazol, **Obrázek 1**) a některé jeho deriváty, alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Apocynaceae*, vykazující významnou protinádorovou aktivitu a anti-HIV aktivitu <sup>[1-4]</sup>. Výhodou ellipticinu je jednak jeho vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, a také jeho nízké vedlejší účinky. Až na nefrotoxicitu, která je svým mechanismem vzniku podobná nefrotoxicitě cis-platiny, jsou další vedlejší toxické účinky ellipticinu minimální.

### Mechanismus účinku ellipticinu

Ellipticin vykazuje několik mechanismů účinku jako je:

*Interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA* <sup>[5-8]</sup>, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu.

*Inhibice topoisomerasy II*. Ellipticin interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu, který je katalyticky neaktivní a vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA <sup>[9]</sup>.

*Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53* <sup>[10,11]</sup>.

*Inhibice oxidační fosforylace*, jež vede k drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což vede k jejich zániku <sup>[12]</sup>.

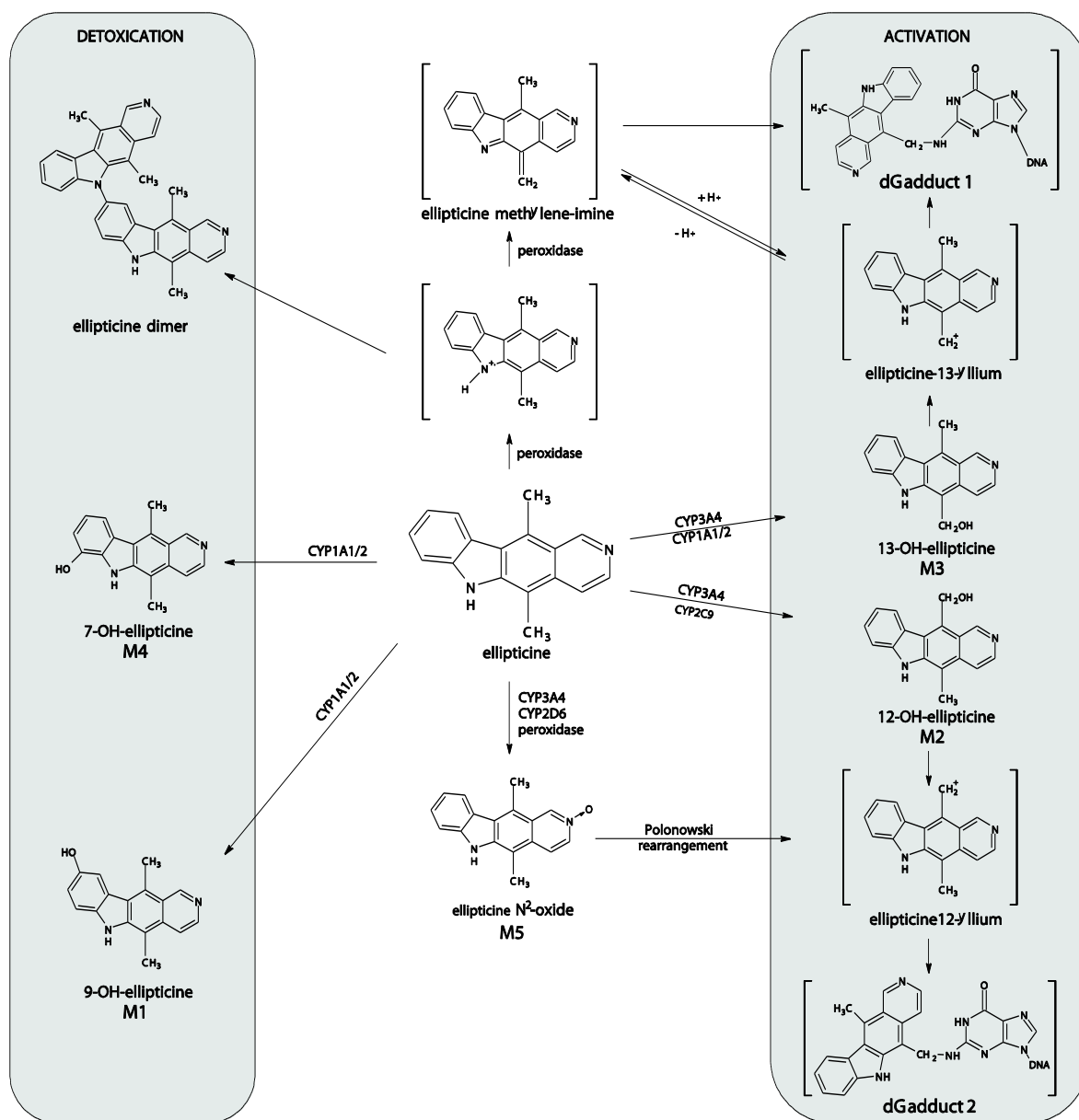
*Inhibice telomerasy* <sup>[13]</sup>.

*Tvorba kovalentních aduktů s DNA*. Ellipticin je v průběhu metabolismu v organismu aktivován na farmakologicky účinnější metabolity, které se kovalentně váží na DNA <sup>[14-17]</sup>.. Může tedy působit jako alkylační činidlo. Tento mechanismus by mohl vysvětlovat jeho vysokou účinnost v protinádorové terapii. Cytostatika kovalentně modifikující DNA jsou jedněmi z nejsilnějších protinádorových agens.

### Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je cytochromy P450 (CYP) oxidován na pět metabolitů, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a *N*<sup>2</sup>-oxidellipticinu (**Obrázek 1**). Tyto metabolity jsou tvořeny jak cytochromy P450

lidských jaterními mikrosomů, tak i enzymy mikrosomů modelových organismů (potkan a králík).



**Obrázek 1** Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy a peroxidasami. Tvorba kovalentních aduktů<sup>[26]</sup> (publikace 8 v seznamu publikací)

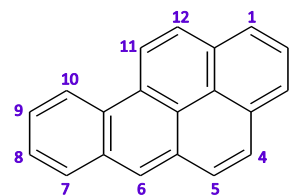
## Tvorba aduktů ellipticinu s DNA

V průběhu biotransformace ellipticinu vznikají metabolity schopné kovalentní vazby s DNA. Detekovány byly minimálně dva adukty ellipticinu s DNA, které vznikaly ve všech testovaných systémech *in vitro* <sup>[14]</sup>. Cílovým deoxynukleotidem modifikovaným

aktivovaným ellipticinem v DNA je deoxyguanosin <sup>[23]</sup>. Jako metabolity, odpovědné za tvorbu kovalentních aduktů, byly určeny 13-hydroxyellipticin (M3), který tvoří majoritní adukt 1 vazbou s deoxyguanosinem v DNA <sup>[16]</sup> (**Obrázek 1**) a *N*<sup>2</sup>-oxid ellipticinu (M5), který je schopen Polonowskiho přesmykem přecházet na 12-hydroxyellipticin (M2), jehož vazbou na DNA vzniká adukt minoritní <sup>[16,18]</sup> (**Obrázek 1**).

## Benzo[a]pyren

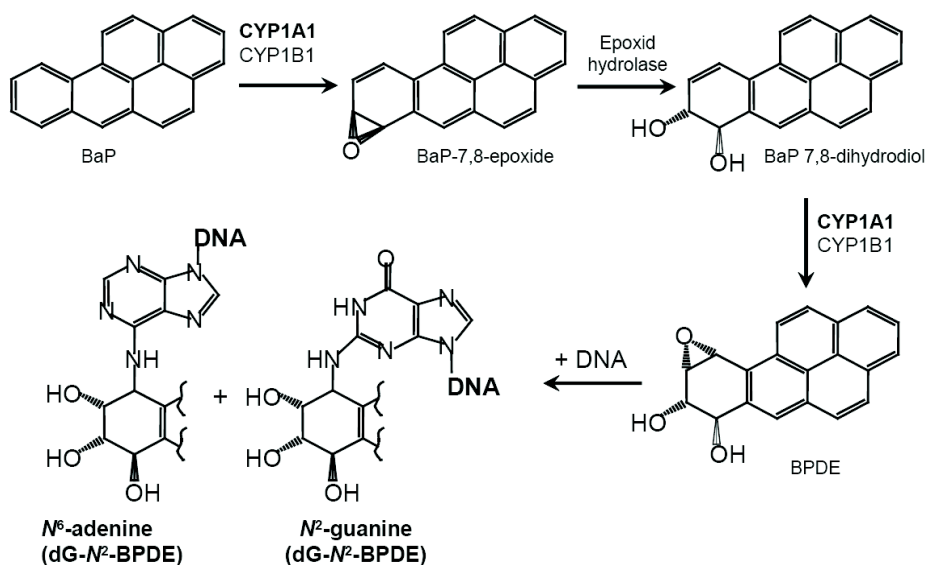
Benzo[a]pyren ( $C_{20}H_{12}$ , BaP), polycyklický uhlovodík s pěti aromatickými kruhy (**Obrázek 2**) BaP je považován za jednu ze složek cigaretového kouře <sup>[19,20]</sup> způsobující rozvoj rakoviny plic u kuřáků <sup>[21]</sup>. Je prokazatelným kancerogenem jak pro hlodavce, tak i pro člověka <sup>[22]</sup>. Benzo[a]pyren, respektive jeho reaktivní metabolit 7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) vytváří kovalentní adukty s DNA *in vivo* i *in vitro* <sup>[23]</sup>.



**Obrázek 2** Struktura benzo[a]pyrenu

### Metabolismus benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů s DNA

Benzo[a]pyren je aktivován oxidačními reakcemi, katalysovanými hemovými enzymy, cytochromy P450. V prvním kroku je benzo[a]pyren oxidován cytochromy P450 1A1 a 1B1 na 7,8-epoxid benzo[a]pyrenu, který je dále přeměněn epoxidhydrolasou na 7,8-dihydroxybenzo[a]pyren. Další reakcí katalyzovanou CYP1A1/1B1 je oxidován na 7,8-dihydroxy-9,10-epoxybenzo[a]pyren tvořící kovalentní adukty s DNA (**Obrázek 2**).



**Obrázek 2** Schéma metabolické aktivace a tvorba aduktů benzo[a]pyrenu s DNA.

## CÍL PRÁCE

Hlavními cíli předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu a kancerogenního benzo[a]pyrenu. Oxidaci ellipticinu na jeho aktivační metabolity můžeme považovat za zásadní faktor determinující mechanismus působení a cílový účinek tohoto léčiva. Ellipticin totiž vykazuje selektivní účinek pouze vůči určitým nádorům. Snahou je proto vysvětlit, čím je tato vlastnost určena. Cílem práce bylo také vysvětlit vyšší účinnost některých cytochromů P450 (CYP1A1/2) v metabolické aktivaci ellipticinu *in vivo* v orgánech potkana a myši zjištěnou v předchozích studiích <sup>[15,24,25]</sup>, oproti situaci *in vitro*. Též oxidaci benzo[a]pyrenu CYP můžeme považovat za první krok aktivace tohoto kancerogenu.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

- Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A1/2 a 3A4
- Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami v mikrosomálních systémech izolovaných z jater, ledvin a plic potkana
- Metabolismus ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem myši
- Příprava a charakterizace majoritního aduktu ellipticinu s DNA tvořeného jeho metabolitem, 13-hydroxyellipticinem, s deoxyguanosinem
- Studium metabolismu benzo[a]pyrenu enzymy jaterního mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí potkana a myši
- Studium metabolismu benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1
- Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidaci benzo[a]pyrenu katalyzovanou cytochromy P450 1A1
- Vliv epoxidhydrolasy na aktivaci benzo[a]pyrenu za tvorby aduktů s DNA cytochromem P450 1A1
- Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na aktivaci benzo[a]pyrenu za tvorby aduktů s DNA cytochromem P450 1A1

## MATERIÁL A METODY

Všechny použité chemikálie byly v čistotě „pro HPLC“ nebo vyšší.

### Vysokoučinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi (HPLC)

Metabolity ellipticinu/benzo[a]pyrenu vzniklé v inkubačních směsích byly separovány a jejich obsah stanoven pomocí HPLC na přístroji Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S) za použití izokratické eluce mobilní fází s kyselinou 1-heptansulfonovou [64% (v/v) methanol; 5 mM kyselina 1-heptansulfonová; 32 mM kyselina octová] nebo gradientem mobilních fází od 50-85% acetonitrilu (v/v). Separace probíhala na koloně Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Beckman-Coulter) nebo Nucleosil® 100-5 C18, 5  $\mu$ m, 250  $\times$  4 mm (Macherey Nagel, Germany) s průtokem mobilní fáze 0.7 ml/min pro ellipticin a 0.6 ml/min v případě BaP. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 313 nm (296 nm) a 254 nm a pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

### Metoda „<sup>32</sup>P-postlabeling“

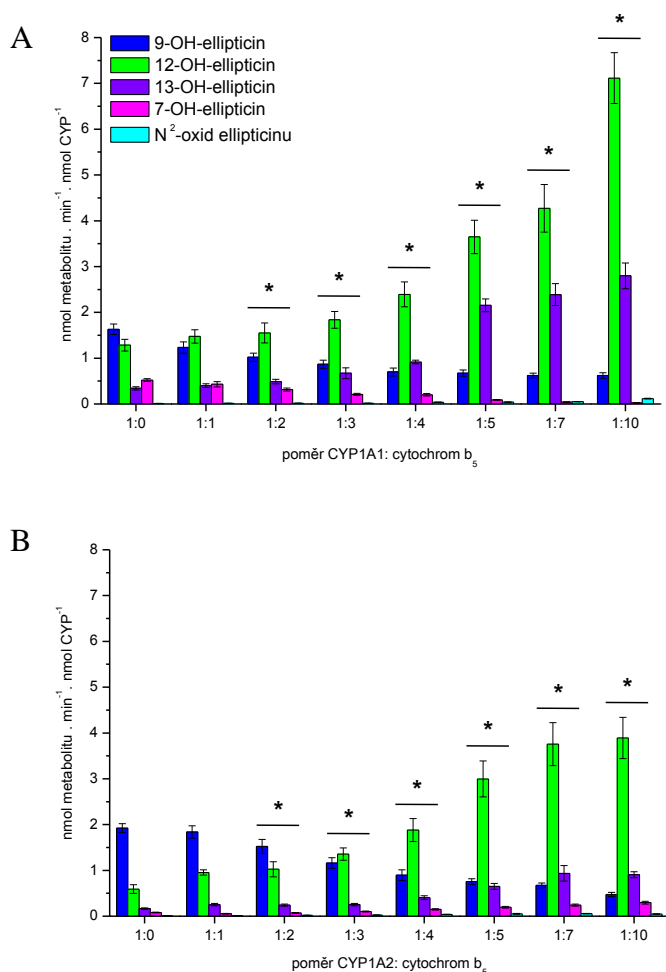
Analýzy aduktů s DNA byly provedeny Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“ [25].



## VÝSLEDKY A DISKUZE

CYTOCHROM  $b_5$  MODULUJE OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 1A1/2 A 3A4

Vlivem cytochromu  $b_5$  dochází ke změně v podílu tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu, tvořených cytochromy P450 1A1 a 1A2, a to ve prospěch aktivačních metabolitů, které vytváří adukty v DNA (**Obrázek 3A,B**). Stimulována je tvorba jak 12-hydroxy-, tak i 13-hydroxyellipticinu. Naopak tvorba detoxikačních metabolitů ellipticinu (9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu) je snížena.



**Obrázek 3** Vliv cytochromu  $b_5$  na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1 (**A**) a 1A2 (**B**); Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření. \* $p < 0.001$  (Studentův  $t$ -test).

V případě CYP3A4, cytochrom  $b_5$  ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP3A4 cestou stimulace tvorby jednotlivých metabolitů, zejména pak za tvorby 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu, tvorba detoxikačního 7-hydroxyellipticinu je naopak snížena.

## ELLIPTICIN MODULUJE SVÉ FARMAKOLOGICKÉ A GENOTOXICKÉ ÚČINKY INDUKČÍ CYP1A1/2 A CYTOCHROMU b<sub>5</sub>

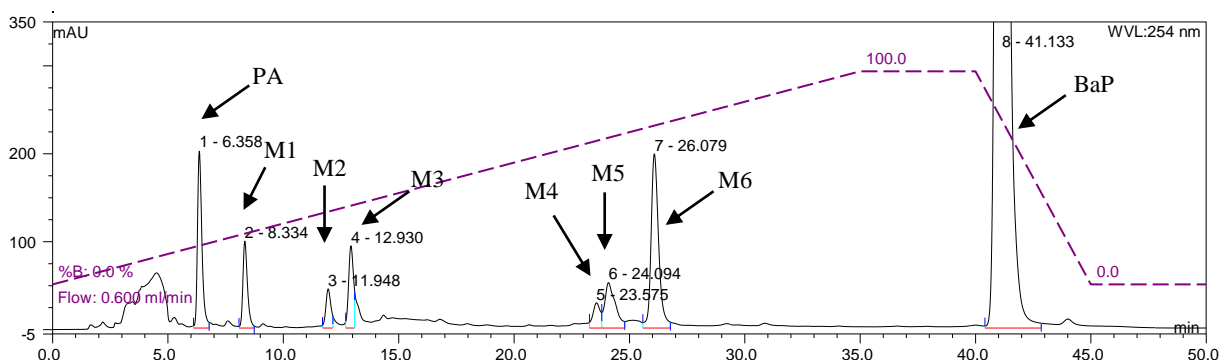
Premedikací samců a samic laboratorního potkana ellipticinem dochází k signifikantnímu zvýšení exprese i katalytické aktivity CYP1A1 a 1A2, a to jak v játrech, tak extrahepatálních orgánech. V játrech navíc dochází vlivem ellipticinu i ke zvýšení exprese cytochromu b<sub>5</sub>.

## OXIDACE ELLIPTICINU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM MYŠÍ S „DELETOVANOU“ NADPH:CYP REDUKTASOU V JÁTRECH (HRN<sup>TM</sup>) A MYŠÍ KOTROLNÍ LINIE (WT)

Ellipticin je myším mikrosomálním systémem oxidován na pět metabolitů, totožných s metabolity tvořenými mikrosomy potkana. Efektivita mikrosomů myši HRN je nižší než myši WT, ale přesto měřitelnou. Premedikace myši induktorem CYP1A1/2, BaP zvyšuje účinnost mikrosomů ve tvorbě detoxikačních metabolitů (7-hydroxy a 9-hydroxyellipticinu).

## OXIDACE BENZO[A]PYRENU JATERNÍM MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM POTKANA

Benzo[a]pyrene je oxidován mikrosomálním systémem potkana na 6 metabolitů (M1-M6) (9,10-dihydroxy-BaP; 4,5-dihydroxy-BaP; M3 = ?; 1,6-BaP chinon; 3,6-BaP chinon; 3-hydroxy-BaP) (**Obrázek 4**).



**Obrázek 4** Chromatografický profil separace metabolitů BaP vzniklých mikrosomálním mikrosomálního systému jater potkana premedikovaného Sudanem I. Detekce při vlnové délce 254 nm. PA = fenacetin.

Mikrosomální systém potkanů premedikovaných induktorem CYP1A1/2, Sudanem I oxiduje BaP s vyšší efektivitou než mikrosomy kontrolních potkanů. Zjištěné výsledky potvrzují, že CYP1A1 jednoznačně participuje na oxidaci BaP. Pro separaci metabolitů

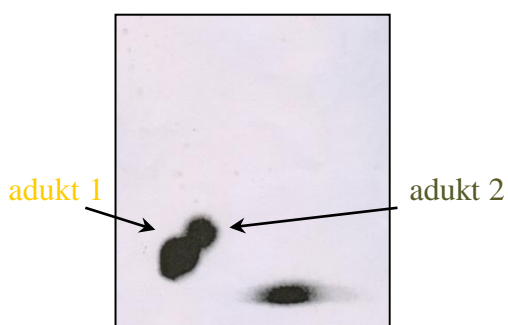
BaP vznikajících účinkem mikrosomálních systémů a purifikovaných enzymů byla vyvinuta nová metoda (**Obrázek 4**).

OXIDACE BENZO[A]PYRENU PURIFIKOVANÝM CYP1A1 JE OVLIVNĚNA MNOŽSTVÍM NADPH:CYP REDUKTASY A CYTOCHROMU  $b_5$  V REKONSTITUOVANÉM SYSTÉMU

CYP1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reduktasou oxiduje BaP pouze na tři metabolity (3,6- a 1,6-chinon- a 3-hydroxy-BaP). Nejúčinnější oxidace BaP byla pozorována při použití nejnižší koncentrace NADPH:CYP reduktasy v rekonstituovaném systému, a to v poměru CYP1A1:RED 1:0.05. Cytochrom  $b_5$  stimuluje oxidaci BaP, při použití nízké koncentrace NADPH:CYP reduktasy v poměru CYP:RED 1:0.1 až do množství 250 pmol cytochrom  $b_5$ . Stejně tak stimuluje i oxidaci BaP při použití vyšší koncentrace NADPH:CYP reduktasy (poměr 1:1), zde dochází k nejúčinnější oxidaci BaP při poměru CYP: cytochrom  $b_5$  1:5.

AKTIVACE BaP ZA TVORBY ADUKTŮ S DNA PURIFIKOVANÝM CYP1A1 JE OVLIVNĚNA MNOŽSTVÍM NADPH:CYP REDUKTASY V REKONSTITUOVANÉM SYSTÉMU

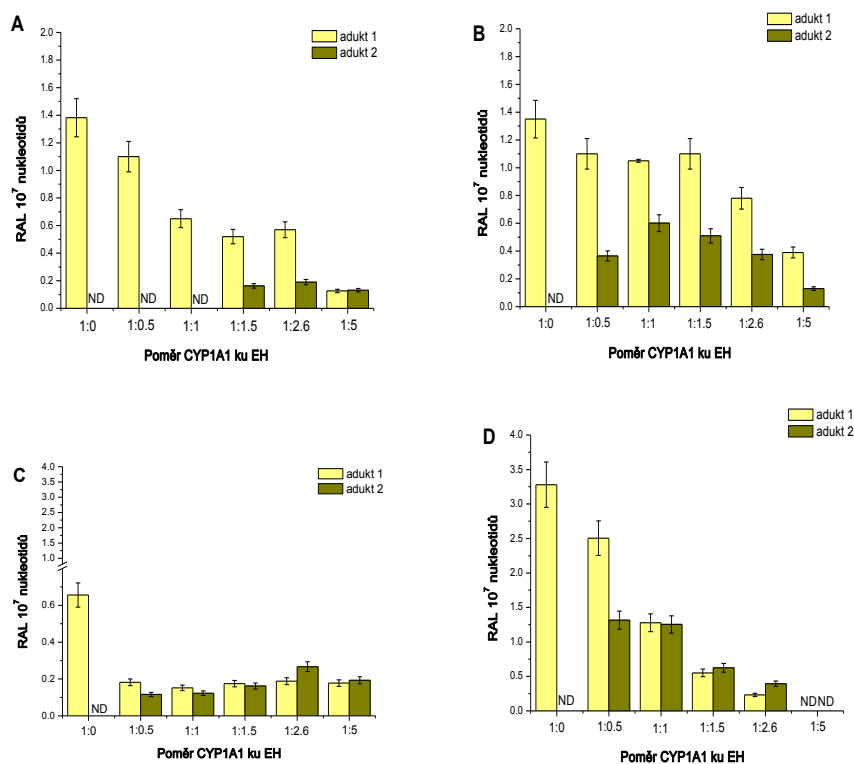
NADPH:CYP reduktasa stimuluje tvorbu aduktu 1 tvořeného z metabolitu BaP 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP s DNA (**Obrázek 6**), nejúčinnější poměr CYP:RED je 1:0.4. Tento výsledek potvrzuje preference nízké koncentrace reduktasy v aktivaci BaP CYP1A1.



**Obrázek 5** Autoradiografie aduktů BaP s DNA vzniklých jeho aktivací v myších jaterních mikrosomech.

## VLIV EPOXIDHYDROLASY NA AKTIVACI BaP CYP1A1

Epoxidhydrolasa je nezbytná pro tvorbu aduktů 2 (**Obrázek 6**), který je generován ze 7,8-diol-9,10-epoxidu BaP.



**Obrázek 6** Vliv cytochromu  $b_5$  na tvorbu aduktů s DNA vznikajících aktivací BaP CYP1A1 rekonstituovaného s NADPH: CYP reduktasou v poměru 1:0.2 (**A,B**) a 1:2 a za přítomnosti epoxidhydrolasy (**C,D**). Cytochrom  $b_5$  byl přítomen v inkubacích, jejichž výsledky jsou uvedeny v panelech **B** a **D**.

CYTOCHROM  $b_5$  STIMULUJE TVORBU ADUKTŮ BaP AKTIVOVANÉHO CYP1A1 S DNA

Vlivem cytochromu  $b_5$  dochází při nízkém množství reduktasy (20 pmol) ke stimulaci tvorby aduktů 1 i 2 tvořených metabolity BaP v DNA (**Obrázek 6**). V případě vyššího množství reduktasy (100 pmol) je tvorba aduktů 2 podpořena přítomností cytochromu  $b_5$  již při nízkých koncentracích. CYP1A1 v poměru CYP: cytochrom  $b_5$  1:1 aktivuje BaP za tvorby obou aduktů v DNA (adukt 1 a 2) v analogickém množství.

**ZÁVĚR**

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti farmakologických účinků protinádorového léčiva ellipticinu a jeho mechanismu působení. Přispívá též k poznání funkce cytochromů P450 a dalších složek systému oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (MFO) v oxidaci studovaného léčiva a stejně tak i studovaného kancerogenu, benzo[a]pyrenu. Rozvíjí tak i obecné biochemické poznatky.

Nejdůležitější poznatky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

- Cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A1/2 a 3A4 ve prospěch aktivačních metabolitů tohoto léčiva
- Ellipticin je mikrosomálními systémy izolovanými z jater potkanů premedikovaných potkanů oxidován především na aktivační metabolity, a to působením CYP1A1. V ledvinách a plicích potkana dochází k aktivaci ellipticinu účinkem peroxidas.
- Ellipticin je oxidován mikrosomálním systémem myši HRN<sup>TM</sup> s nižší efektivitou než myši WT.
- Byl připraven adukt 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem
- Benzo[a]pyren je enzymy jaterního mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí potkana a myši oxidován na šest metabolitů (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; ?; 3,6-chinon-; 1,6-chinon a 3-OH-BaP).
- Benzo[a]pyren je cytochromem P450 1A1 oxidován na metabolity 3,6- a 1,6-chinon- a 3-hydroxy-BaP.
- Cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje oxidaci benzo[a]pyrenu CYP1A1.
- Epoxidhydróláza je esenciální pro vznik aduktu benzo[a]pyrenu s DNA č. 2 tvořeného ze 7,8-diol-9,10-epoxidu BaP.
- Cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje CYP1A1-dependentní aktivaci benzo[a]pyrenu za tvorby dvou aduktů metabolitů tvořenými CYP1A1 s DNA (adukty 1 a 2, generované z 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP a 7,8-diol-9,10-epoxidu BaP).

Předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky. Část těchto poznatků již také byla publikována formou časopiseckých publikací v renomovaných vědeckých periodikách. Takto bylo publikováno 7 prací, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 1-7 (viz seznam vlastních publikací).. Řada dalších poznatků,

vyplývající z výsledků prezentovaných v disertační práci, však byla dosud publikována pouze formou příspěvků na vědeckých kongresech a sympoziích. Pro časopiseckou publikaci jsou nyní připravovány.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 305/09/H008, P301/10/0356), grantovou agenturou Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky (granty MSM0021620808 a 1M0505) a grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant 127208).

**POUŽITÁ LITERATURA**

- [1] Dalton L.K., Demerac, S., Elmes, B. C., Loder, J. W., Swan, J. M., Teitei, T. (1967): *Aust J Chem*, 20 2715-2727.
- [2] Le Pecq J.B., Nguyen Dat X., Gosse C. and Paoletti C. (1974): *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(12), 5078-5082.
- [3] Rouësse J.G., Le Chevalier T., Caille P., Mondesir J.M., Sancho-Garnier H., May-Levin F., Spielmann M., De Jager R. and Amiel J.L. (1985): *Cancer Treat Rep*, 69(6), 707-708.
- [4] Mathe G. (1999): *Biomed Pharmacother*, 53(10), 484-486
- [5] Ashby J., Elliott B.M., Styles J.A. (1980): *Cancer Lett*, 9(1), 21-33
- [6] Bertrand J.R. and Giacomoni P.U. (1985): *Chemioterapia*, 4(6), 445-453.
- [7] DeMarini D.M., Aby-Shakra A., Gupta R., Hendee L.J., Levine J.G. (1992): *Environ Mol Mutagen*, 20(1), 12-18.
- [8] Klener P. (1996): *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha
- [9] Froelich-Ammon S.J., Patchan M.W., Osheroff N. and Thompson R.B. (1995): *J Biol Chem*, 270(25), 14998-15004.
- [10] Ohashi M., Sugikawa E. and Nakanishi N. (1995): *Jpn J Cancer Res.*, 86(9), 819-827.
- [11] Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Gamanuma M., Nakanishi N. and Ohashi M. (1999): *Anticancer Res*, 19(4B), 3099-3108.
- [12] Schwaller M.A., Allard B., Lescot E. and Moreau F. (1995): *J Biol Chem*, 270(39), 22709-22713.
- [13] Auclair C. (1987): *Arch Biochem Biophys*, 259(1), 1-14.
- [14] Stiborova M., Bieler C.A., Wiessler M. and Frei E. (2001): *Biochem Pharmacol*, 62(12), 1675-1684.

- [15] Stiborova M., Breuer A., Aimova D., Stiborova-Rupertova M., Wiessler M. and Frei E. (2003): *Int J Cancer*, 107(6), 885-890.
- [16] Stiborova M., Sejbál J., Borek-Dohalska L., Aimova D., Poljakova J., Forsterova K., Rupertova M., Wiesner J., Hudecek J., Wiessler M. and Frei E. (2004): *Cancer Res*, 64(22), 8374-8380.
- [17] Bořek -Dohalská L., Frei E. and Stiborova M. (2004): *Collect Czech Chem Commun*, 69, 603-615.
- [18] Stiborova M., Poljakova J., Ryslava H., Dracinsky M., Eckschlager T. and Frei E. (2007): *Int J Cancer*, 120(2), 243-251.
- [19] Alam S., Conway M.J., Chen H.S., Meyers C. (2008): *J Viro* 82(2), 1053-1058
- [20] Roffo A.H. (1940): *Bull World Health Organ*. 84(6), 497-502
- [21] Cornfield J., Haenszel W., Hammond E.C., Lilienfeld A.M., Shimkin M.B., Wynder E.L. (2009): *Int J Epidemiol*. 38(5), 1175-1191
- [22] Cancer IARC Classification 2010
- [23] Phillips D.H.: Macromolecular adducts as biomarkers of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, v knize *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. (Luch A. ed.) Imperial College Press, London, pp.137–169. (2005)
- [24] Stiborova M., Stiborova-Rupertova M., Borek-Dohalska L., Wiessler M. and Frei E. (2003): *Chem Res Toxicol*, 16(1), 38-47.
- [25] Stiborova M., Rupertova M., Hodek P., Frei E. and Schmeiser H.H. (2004): *Collect Czech Chem Commun*, 69(3), 476-498.
- [26] Poljakova J., Hrebackova J., Dvorakova M., Moserova M., Eckschlager T., Hrabeta J., Gotlicherova M., Kopejtkova B., Frei E., Kizek R. and Stiborova M. (2011): *Neuro Endocrinol Lett*, in press.



## **CURRICULUM VITAE**

### **RNDr. Michaela Moserová**

Narozena 24. května 1983 v Praze

2007 Mgr., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, katedra biochemie  
Téma práce: Studium molekulárního mechanismu protinádorového léčiva ellipticinu

2009 RNDr., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, katedra biochemie

2007- PGS student, Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova v Praze, katedra biochemie,

### Pedagogické aktivity

Od 2007 spoluúčast na :

Praktikum z laboratorní techniky biochemie, katedra biochemie PŘF UK v Praze

Praktikum z laboratorní techniky biochemie pro KATA, katedra biochemie PŘF UK v Praze

### Jazykové znalosti

Angličtina – certifikovaný kurz The Bell School: English for Science (úroveň C1, 2009),  
FCE (úroveň B2, 2010),

Francouzština – mírně pokročilá

### Současný výzkum

- mechanismus tvorby aduktů ellipticinu s nukleovými kyselinami (DNA)
- mechanismu farmakologického účinku protinádorových léčiv
- studium metabolismu benzo[a]pyrenu
- studium exprese enzymů: cytochromu P450 1A1, 3A4, cytochromu b<sub>5</sub>, epoxidhydrólasy, xanthinoxidasy a NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy

### Řešené grantové projekty

Řešitel grantu: GAUK 127208 do roku 2010

Studium reakčního mechanismu cytochromů P450 oxidujících protinádorové léčivo ellipticin

Spoluúčast na řešení grantů GAČR (305/09/H008 a P301/10/0356).

## SEZNAM PUBLIKACÍ

## [PŮVODNÍ ČLÁNKY]

1. Marie Stiborová, Volker M. Arlt, Colin. J. Henderson, C. Roland Wolf, Věra Kotrbová, **Michaela Moserová**, Jiří Hudeček, David H. Phillips and Eva Frei: ROLE OF HEPATIC CYTOCHROMES P450 IN BIOACTIVATION OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE: STUDIES WITH THE HEPATIC NADPH: CYTOCHROME P450 REDUCTASE NULL MOUSE. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226: 318-327, 2008. **IF<sub>2007</sub> = 3.846**
2. **Michaela Moserová**, Věra Kotrbová, Martina Rupertová, Karel Naiman, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Eva Frei and Marie Stiborová: ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ADDUCT FORMED BY 13-HYDROXYELLIPTICINE WITH DEOXYGUANOSINE IN DNA. *Neuro Endocrinol. Letters*, 29(5), 728-732, 2008. **IF<sub>2007</sub> = 1.443**
3. Dagmar Aimová, Jitka Poljaková, Věra Kotrbová, **Michaela Moserová**, Eva Frei, Volker M. Arlt and Marie Stiborová: ELLIPTICINE AND BENZO(A)PYRENE INCREASE THEIR OWN METABOLIC ACTIVATION VIA MODULATION OF EXPRESSION AND ENZYMATIC ACTIVITY OF CYTOCHROMES P450 1A1 AND 1A2. *Interdisc. Toxicol.*, 1(2): 160-168, 2008. **Dosud bez IF**
4. **Michaela Moserová**, Věra Kotrbová, Miroslav Šulc, Eva Frei, Marie Stiborová: ANALYSIS OF BENZO[A]PYRENE METABOLITES FORMED BY RAT HEPATIC MICROSOMES USING HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY: OPTIMIZATION OF THE METHOD. *Interdisc. Toxicol.*, 2(4): 101-106, 2009. **Dosud bez IF**
5. Marie Stiborová, **Michaela Moserová**, Barbora Mrázová, Věra Kotrbová, Eva Frei: ROLE OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE: ADDITIONAL EVIDENCE OF THEIR CONTRIBUTION TO ELLIPTICINE ACTIVATION IN RAT LIVER, LUNG AND KIDNEY. *Neuro Endocrinol. Letters*, 31(Suppl.2):101–110, 2010. **IF<sub>2010</sub>=1.621**
6. Kateřina Levová, **Michaela Moserová**, Věra Kotrbová, Miroslav Šulc, Colin J. Henderson, Roland C. Wolf, David H. Phillips, Eva Frei, Heinz H. Schmeiser, Jan

- Mareš, Marie Stiborová: ROLE OF CYTOCHROMES P450 1A1/2 IN DETOXICATION AND ACTIVATION OF CARCINOGENIC ARISTOLOCHIC ACID I: STUDIES WITH THE NADPH:CYTOCHROME P450 REDUCTASE NULL (HRN) MOUSE MODEL. *TOXICOL SCI.*, 121(1):43-56, 2011. **IF<sub>2010</sub>=5.093**
7. Věra Kotrbová, Barbora Mrázová, **Michaela Moserová**, Václav Martínek, Petr Hodek, Jiří Hudeček, Eva Frei, Marie Stiborová: CYTOCHROME B<sub>5</sub> SHIFTS OXIDATION OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE BY CYTOCHROMES P450 1A1 AND 1A2 FROM ITS DETOXICATION TO ACTIVATION, THEREBY MODULATING ITS PHARMACOLOGICAL EFFICACY. *Biochem Pharmacol.*, 2011 v tisku. **IF<sub>2010</sub>=4.889**
8. Jitka Poljaková, Jana Hrebacková., Marketa Dvořáková, **Michaela Moserová**, Tomas Eckschlager., Jan Hrabeta., Marketa Göttlicherová, Barbora Kopejtková, Eva Frei, Rene Kizek, Marie Stiborová. Anticancer agent ellipticine combined with histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin A, is an effective DNA damage strategy in human neuroblastoma. *Neuro Endocrinol. Lett.*, in press. **IF<sub>2010</sub> = 1.621.**

## [ABSTRAKTY V ČASOPISECH]

1. Aimová D., Poljaková J., Kotrbová V., **Moserová M.**, Frei E., Stiborová M.; ELLIPTICINE AND BENZO(A)PYRENE INCREASE THEIR OWN METABOLIC ACTIVATION VIA MODULATION OF CYP1A1/2 ACTIVITY, *Interdisc. Toxicol.*, 1, 2008, str. 55
2. **Moserová M.**, Kotrbová V., Frei E., Stiborová M.; CHARACTERIZATION OF ADDUCT GENERATED BY ELLIPTICINE METABOLITE 13-HYDROXYELLIPTICINE WITH DEOXYGUANOSINE IN DNA, *Interdisc. Toxicol.*, 1, 2008, str. 100
3. Kotrbová V., **Moserová M.**, Frei E., Stiborová M.; PARTICIPATION OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN ACTIVATION METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN MICE *IN VIVO*, *Chem. Listy*, 102, 2008, str. 381

4. **Moserová M.**, Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Arlt V. M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; IS CYTOCHROME P450 1A1 THE MAJOR ENZYME ACTIVATING BENZO[A]PYRENE *IN VITRO* AND *IN VIVO*?, *Interdisc. Toxicol.*, 2, 2009, str. 127
5. **Moserová M.**, Kotrbová V., Frei E., Stiborová M.; CHARACTERIZATION OF ADDUCT GENERATED BY 13-HYDROXYELLIPTICINE WITH DEOXYGUANOSINE IN DNA, *FEBS J.*, 276, 2009, str. 181
6. **Moserová M.**, Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Arlt V.M., Frei E., Stiborová M.; AKTIVACE A DETOXIKACE BENZO[A]PYRENU CYTOCHROMEM P450 1A1 *IN VIVO* A *IN VITRO*, *Chem. Listy*, 15, 2010, str. 376
7. **Moserová M.**, Šulc M., Arlt V.M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; METABOLIC ACTIVATION OF CARCINOGENIC BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1 IS DICTATED BY COMPOSITION OF THE MIXED-FUNCTION-MONOOXYGENASE SYSTEM *Interdisc. Toxicol.*, 3, 2010, str. A69
8. Mrázová B., Kotrbová V., **Moserová M.**, Frei E., Stiborová M., ROLE OF CYTOCHROMES P4450 AND PEROXIDASES IN METABOLIC ACTIVATION AND DETOXICATION OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN LIVER, LUNG AND KIDNEY, *Interdisc. Toxicol.*, 3, 2010, str. A70
9. **Moserová M.**, Frei E, Arlt V.M., Phillips D.H., Schmeiser H.H., Stiborová M.; METABOLISM OF BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROMES P450, *Interdisc. Toxicol.*, 4, 2011, str. A50

#### [ABSTRAKTY VE SBORNÍCÍCH]

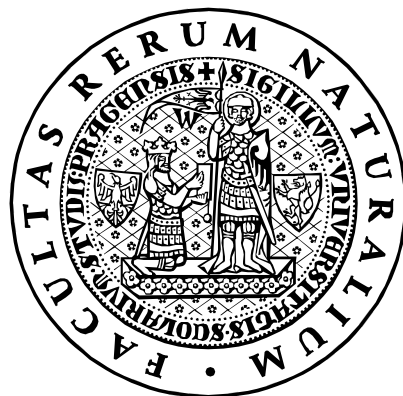
1. Kotrbová V., **Moserová M.**, Rupertová M., Naiman K., Poljaková J., Frei E., Stiborová, M.; STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF DNA ADDUCT GENERATED BY THE ELLIPTICINE METABOLITE 13-HYDROXYELLIPTICINE, Sborník příspěvků XI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, leden 2007, str. 68

2. Kotrbová V., **Moserová M.**, Aimová D., Frei E., Arlt V. M., Hodek P., Stiborová M.; PARTICIPATION OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN ACTIVATION METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN MICE *IN VIVO*, Sborník příspěvků XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, únor 2008, str. 78
3. **Moserová M.**, Arlt V.M., Phillips D.H., Kotrbová V., Henderson C.J., Frei E., Stiborová M.; ROLE OF CYTOCHROMES P450 IN METABOLIC ACTIVATION OF BENZO(A)PYRENE AND ELLIPTICINE: STUDIES WITH THE HEPATIC NADPH:CYTOCHROME P450 REDUCTASE NULL MOUSE, Sborník příspěvků XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice, září 2008, str. 63
4. **Moserová M.**, Aimová D., Šulc M., Frei E., Arlt V.M., Hodek P., Stiborová M.; BENZO[A]PYRENE INCREASES ITS OWN METABOLIC ACTIVATION *VIA* MODULATION OF CYP1A1/2 ACTIVITY, Sborník příspěvků XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, duben 2009, str. 82
5. **Moserová M.**, Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; IS CYTOCHROME P450 1A1 THE MAJOR ENZYME ACTIVATING BENZO[A]PYRENE *IN VITRO* AND *IN VIVO* ?, Sborník příspěvků XXV. Xenobiochemické sympozium, Mikulov, září 2009, str. 38
6. **Moserová M.**, Kotrbová V., Šulc M., Arlt V.M., Frei E., Stiborová M.; METABOLIC ACTIVATION OF CARCINOGENIC BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1 IS DICTATED BY COMPOSITION OF THE MIXED-FUNCTION-MONOOXYGENASE SYSTEM, Sborník příspěvků XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, duben 2010, str. 66
7. **Moserová M.**, Šulc M., Arlt V.M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; METABOLIC ACTIVATION OF CARCINOGENIC BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1 IS DICTATED BY COMPOSITION OF THE MIXED-FUNCTION-MONOOXYGENASE SYSTEM, Sborník příspěvků XXII. Biochemický sjezd, Martin, Slovenská republika, září 2010, str. 238

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE,  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY**

PhD. Study program: Biochemistry

Summary of PhD. Thesis



**METABOLISM OF CARCINOGENS AND DRUGS BY  
MONOOXYGENASE SYSTEM**

RNDr. Michaela Moserová

Supervisor: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2011



## Abstract

Ellipticine, an alkaloid isolated from Apocynaceae plants, exhibits significant antitumor and HIV activities. Ellipticine is a pro-drug, whose pharmacological and genotoxic effects depend on activation by cytochromes P450 (CYP) and peroxidases (Px) to a reactive species generating DNA adducts. To elucidate contribution of CYPs (and which of them) and Px to ellipticine activation, we used rat and mouse models, mice with deleted gene of NADPH:CYP reductase in the liver, thus absenting this enzyme in the liver (HRN<sup>TM</sup>) and a control mouse line (WT), rats treated with ellipticine, and microsomal systems isolated from the liver of mouse lines and from the liver, kidney and lung of rats. The purified enzymes, CYP1A1 and 3A4, reconstituted with NADPH:CYP reductase were also used. The effect of cytochrome b<sub>5</sub>, a facultative component of the mixed function monooxygenase system, on ellipticine oxidation by CYP1A1 and 3A4 was also investigated. Carcinogenic benzo(a)pyrene (BaP), known to covalently bind to DNA after its activation with CYPs, was investigated for its potential to generate DNA adducts and to induce CYP and NADPH:CYP reductase enzymes in mouse livers. We investigated an influence of each of components of the mixed function oxidases (MFO) system on metabolism of BaP. CYP1A1 is widely accepted to be the most important enzyme activating BaP. In the present study, microsomal systems of rats and mice and purified enzymes CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase were used. We investigated a production of BaP metabolites and BaP-DNA adducts. HPLC separation of metabolites formed by oxidation of ellipticine and/or BaP was performed. For quantification of DNA adducts generated by these compounds, the <sup>32</sup>P-postlabeling method was used. The results found in the study investigating ellipticine metabolism show that cytochrome b<sub>5</sub> affects oxidation of ellipticine by CYP1A1/2, favoring formation of 12-hydroxy- and 13-hydroxyellipticine metabolites implicated in ellipticine–DNA adduct formation, at the expense of 9-hydroxy- and 7-hydroxyellipticine that are detoxication products. In the case of CYP3A4, cytochrome b<sub>5</sub> stimulates formation of 9-hydroxyellipticine and one of the activation metabolites, 13-hydroxyellipticine. We found an increase in activation metabolites of ellipticine and DNA adduct formation in liver microsomes of rats treated with ellipticine. CYP1A1 is induced by ellipticine in the liver, and this feature leads to “switching” of the main enzyme activating ellipticine from CYP3A4 to CYP1A1. In contrast to situation in the liver, ellipticine is detoxicated by CYP1A1 in lung and kidney, whereas is activated by Px in these extrahepatic tissues. The study investigating BaP metabolism shows that BaP is oxidized by hepatic microsomal system of rats and mice; six metabolites (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; ?; 3,6-quinone-; 1,6-quinone and 3-OH-BaP) are formed by these microsomes. However, only three of them, 3,6-quinone-; 1,6-quinone and 3-OH-BaP, are generated by purified CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase. A low concentration of NADPH:CYP reductase in the reconstituted system is sufficient for BaP oxidation, being stimulated by cytochrome b<sub>5</sub>. Two BaP-derived DNA adducts (1 and 2, formed from 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP and 7,8-diol-9,10-epoxy-BaP, respectively) are generated by hepatic microsomes. Epoxide hydrolase is essential for formation of adduct 2, whereas adduct 1 is generated in the system containing only CYP1A1 with reductase. Cytochrome b<sub>5</sub> influences formation of both DNA adducts.



## INTRODUCTION

### Ellipticine

Ellipticine (5, 11-dimethyl-6H-pyrido[4, 3-b] karbazol, **Fig.1**), an alkaloid from *Apocynaceae* plants, exhibits potent antineoplastic and anti-HIV activities. <sup>[1-4]</sup> This agent and some of its derivatives are used in the therapy of breast cancer and leukemia and have multiple cellular targets. The advantages of this drug are high efficiencies against several types of cancer, and its relatively low side effects. Except nephrotoxicity, which is similar to nephrotoxicity of cis-platin.

### Mechanism of ellipticine action

Ellipticine exhibits several mechanisms of its action such as:

*Intercalation to the double-helical structure of DNA* <sup>[5-8]</sup>, resulting from the size and shape of ellipticine molecule.

*Inhibition of topoisomerase II.* Ellipticine interacts with DNA molecules or protein of topoisomerase II to form a ternary complex, which is catalytically inactive and leads to chain breaks in DNA <sup>[9]</sup>.

*Selective inhibition of p53 phosphorylation* <sup>[10,11]</sup>.

*Inhibition of oxidative phosphorylation*, dramatically decreasing ATP levels in cells, which leads to their death <sup>[12]</sup>.

*Inhibition of telomerase* <sup>[13]</sup>.

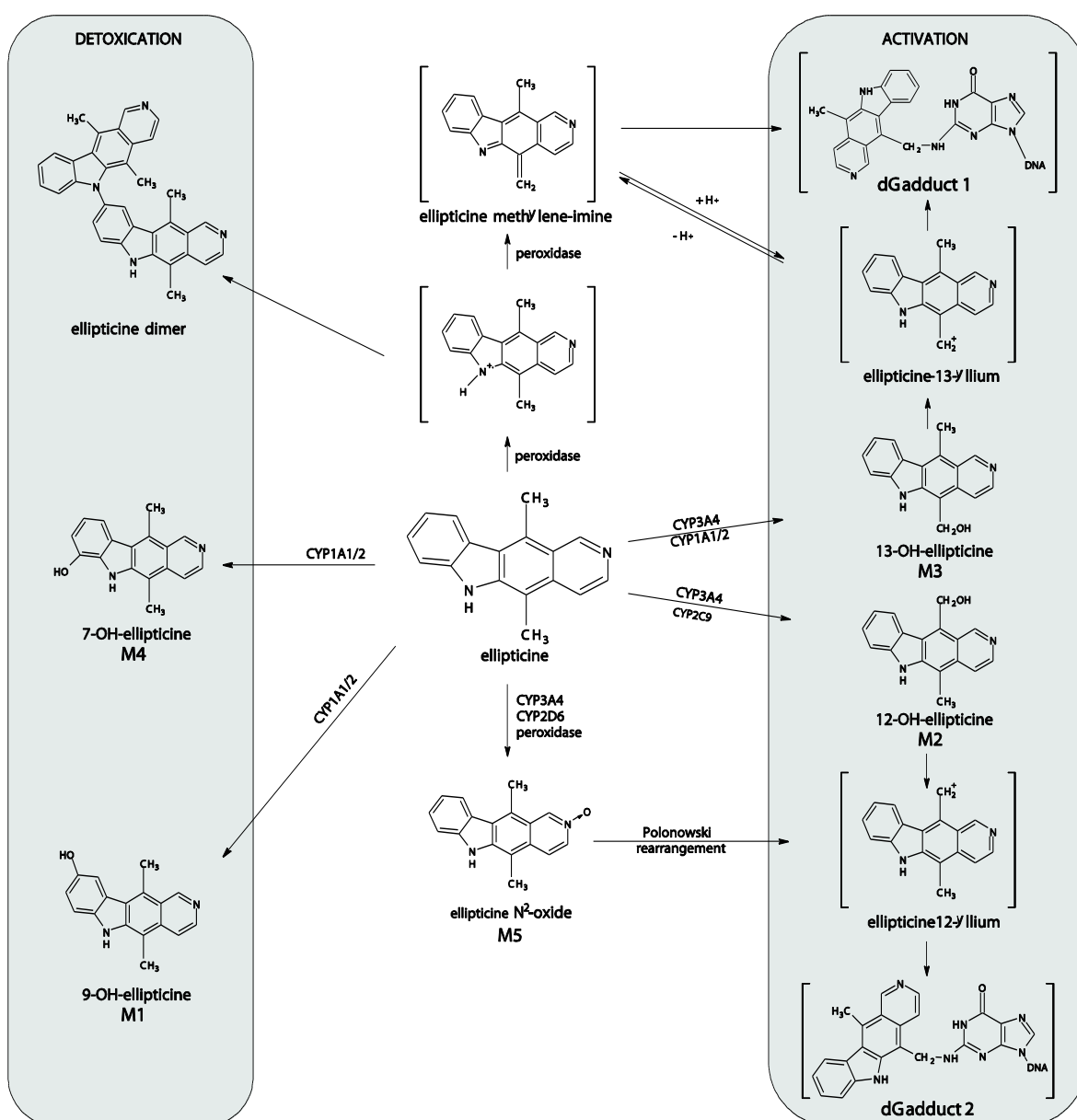
*Formation of covalent DNA adducts.* Ellipticine, after its metabolic activation to the pharmacological more efficient metabolites, covalently binds to DNA <sup>[14-17]</sup>. Therefore, it can act as an alkylation (arylation) agent. This mechanism could explain its high efficiency in cancer therapy.

### Biotransformation of ellipticine

Ellipticine is oxidized by CYP to five metabolites (**Figure 10**); 9-hydroxyellipticine, 12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine, 7-hydroxyellipticine and *N*<sup>2</sup>-oxide of ellipticine. These metabolites are formed by CYPs enzymes of human hepatic microsomes as well as those of microsomes of model organisms, such as rats, rabbits and mice.

## Ellipticine DNA adduct formation

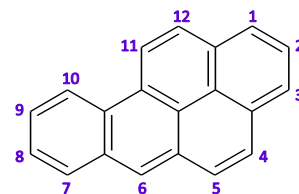
Ellipticine is oxidized by CYP and peroxidase to form covalent DNA adducts. At least two ellipticine DNA adducts were detected in all tested systems *in vitro* [14]. The major adduct 1 is generated by 13-hydroxyellipticine (M3) and the minor adduct 2 is generated by 12-hydroxyellipticine (M2) generated by two reactions; the first is its formation catalyzed by CYPs, the second one is its non-enzymatic generation from N<sup>2</sup>-oxide of ellipticine, by Polonowski rearrangement [16,18].



**Figure 1** Oxidation of ellipticine by human cytochromes P450 and peroxidases<sup>[26]</sup>  
(publication 8 in List of publications)

## Benzo[a]pyrene

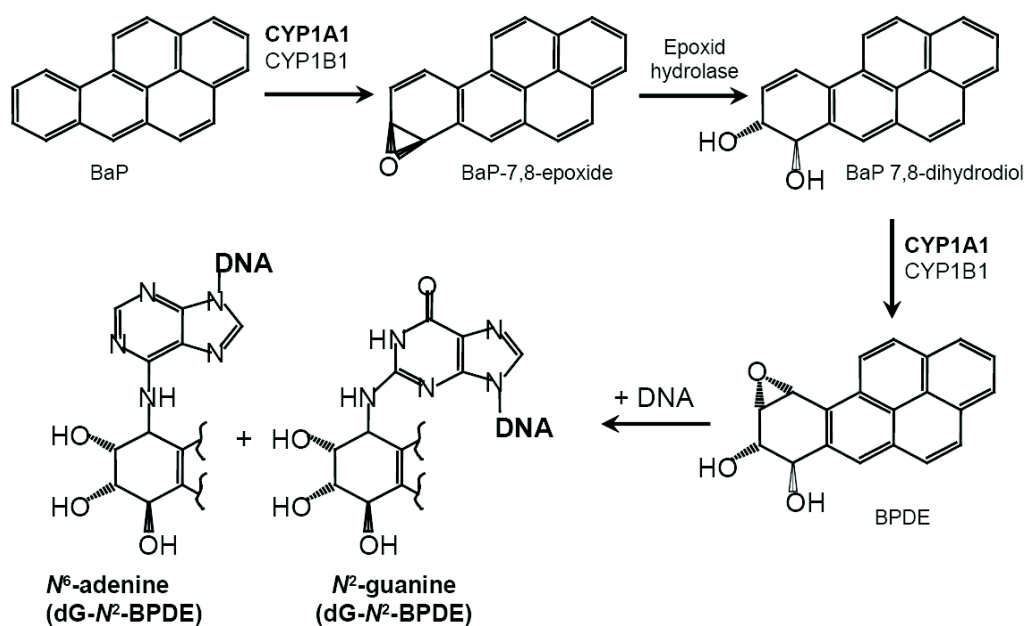
Benzo[a]pyrene ( $C_{20}H_{12}$ ; BaP) is polycyclic hydrocarbon with five aromatic rings (Fig. 2). BaP is known as one of the main components of cigarette smoke [19,20] and is, therefore, considered as one of the leading causes of lung cancer in smokers [21]. BaP is classified as carcinogens for rodents, as well for humans [22]. Benzo[a]pyrene, namely its reactive metabolites, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP and 7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) form covalent adducts with DNA *in vivo* and *in vitro* [23].



**Figure 2** Structure of benzo[a]pyrene

## Metabolism of benzo[a]pyrene

BaP is initially activated by oxidation reaction, catalyzed by cytochromes P450. In the first step, BaP is oxidized by CYP1A1 and 1B1 to one of activation metabolites, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP (**Figure** is not shown), the metabolite generating DNA adducts or to the second metabolite, 7,8-epoxide-BaP. This second metabolite is additionally hydrolyzed by epoxide hydrolase to 7,8-diol BaP that is further oxidized by CYP1A1 or 1B1 to 7,8-diol-9,10-epoxide of BaP. This reactive metabolite generates covalent BaP-DNA adducts (**Figure 3**).



**Figure 3** Scheme of metabolic activation and adduct formation of BaP with DNA

## AIMS OF THIS STUDY

The main objectives of the doctoral thesis were to extend our knowledge on metabolism of anticancer drug ellipticine and carcinogenic benzo[a]pyrene. Oxidation of ellipticine is evaluated to be an essential factor in determining the mechanism of its treatment effect against cancer. Ellipticine exhibits a selective effect only against several types of cancer.

The aim of this work was also to explain higher activities of some cytochromes P450 (CYP1A1/2) in metabolic activation of ellipticine found *in vivo* in several organs of rats and mice found in previous studies, compared with its activation *in vitro* [15,24,25]. In addition, oxidation of benzo[a]pyrene by CYP that is another aim of the thesis is studied to explain the first step in the activation of this carcinogen.

The aims of the present work are as follows:

- To investigate the effect of cytochrome b<sub>5</sub> on oxidation of ellipticine by CYP1A1/2 and 3A4.
- To evaluate contribution of cytochromes P450 and peroxidases present in microsomes isolated from rat liver, lung and kidney to ellipticine metabolism.
- To investigate metabolism of ellipticine by the hepatic microsomal systems of mice.
- To prepare, isolate and characterize the major ellipticine-DNA adduct formed by its metabolite, 13-hydroxyellipticine, with deoxyguanosine.
- To study BaP metabolism by enzymes of liver microsomal systems of rat and mouse.
- To resolve the effect of cytochrome b<sub>5</sub> on BaP oxidation catalyzed by purified cytochrome P450 1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase.
- To investigate activation of BaP to species forming DNA adducts by CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase.
- To elucidate effects of epoxide hydrolase and cytochrome b<sub>5</sub> on activation of BaP by CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase.

## MATERIAL AND METHODS

All chemicals used in the experiments were of analytical purity or better.

### **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

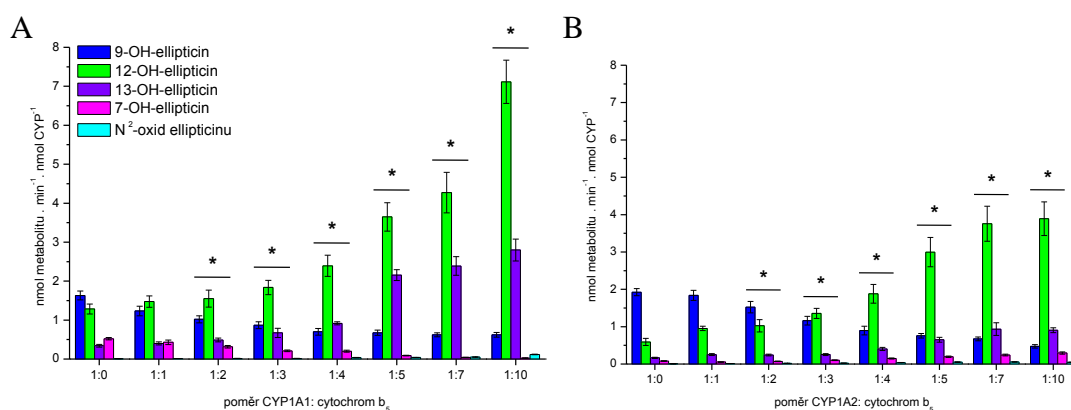
Metabolites of ellipticine or benzo[a]pyrene, formed by their metabolism, were separated and quantified by reverse-phase (RP)-HPLC using Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Isocratic elution using mobile phase containing 1-heptasulphonic acid [64% (v/v) methanol; 5 mM 1-heptansulfonic acid; 32 mM acetic acid] or gradient elution utilizing mobile phase from 50-85 % (v/v) of acetonitrile were performed to separate BaP metabolites. HPLC was performed on the columns Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Beckman-Coulter) or Nucleosil® 100-5 C18, 5 µm, 250 × 4 mm (Macherey Nagel, Germany), mobile phase flow rate 0.7 or 0.6 ml/minute. Metabolites were detected at a wavelength of 313 nm (296 nm) and 254 nm and their area was related to area of peak of internal standard (phenacetine).

### **<sup>32</sup>P-postlabeling technique**

DNA adducts were analyzed by <sup>32</sup>P-postlabeling [25], by Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc, in German Cancer Research Center in Heidelberg.

## CYTOCHROME $b_5$ MODULATES AN OXIDATION OF ELLIPTICINE BY CYTOCHROMES P450 1A1/2 AND 3A4

Cytochrome  $b_5$  affects oxidation of ellipticine by CYP1A1/2, favoring formation of 12-hydroxy- and 13-hydroxyellipticine metabolites implicated in ellipticine–DNA adduct formation, at the expense of 9-hydroxy- and 7-hydroxyellipticine that are detoxication products (**Figure 4A,B**).



**Figure 4** Influence of cytochrome  $b_5$  on ellipticine oxidation by cytochromes P450 1A1 (A) and 1A2 (B); The values are averages and standard deviations of triplicate incubations

In the case of CYP3A4, cytochrome  $b_5$  stimulates oxidation of ellipticine mainly to 13-hydroxy- and 12-hydroxyellipticine. On the contrary, 7-hydroxyellipticine formation is decreased.

## ELLIPTICINE MODULATES ITS OWN PHARMACOLOGICAL AND GENOTOXIC ACTIVITIES BY INDUCTION OF CYP1A1/2 AND CYTOCHROME $b_5$

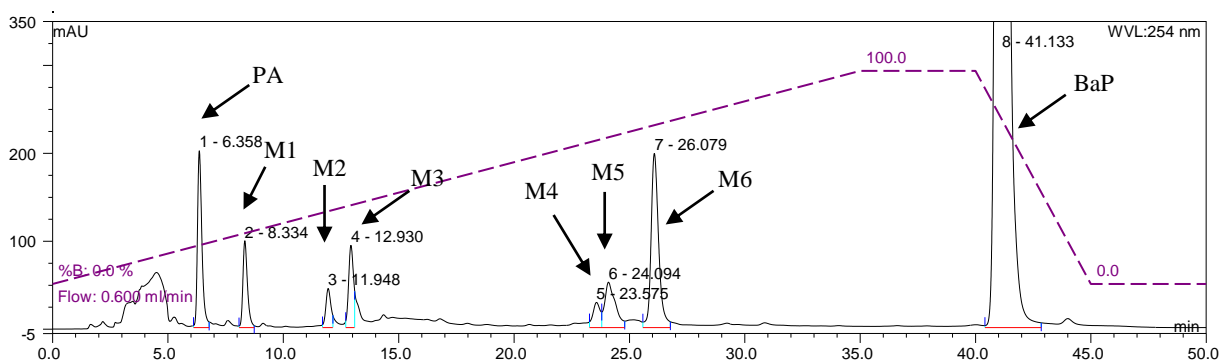
Pretreatment of male and female rats with ellipticine leads to a significant increase in protein levels and catalytic activities of CYP1A1/2, both in the liver and in the extrahepatic organs such as lung and kidney. In addition, expression of cytochrome  $b_5$  is increased by ellipticine in the rat liver.

### OXIDATION OF ELLIPTICINE BY HEPATIC MICROSOMAL SYSTEMS OF THE HRN (HEPATIC CYTOCHROME P450 REDUCTASE NULL) MOUSE MODEL AND THE WT MOUSE LINE

Ellipticine is oxidized by mouse hepatic microsomes to five metabolites that are the same as metabolites formed by rat hepatic microsomes (see above). Efficiency of microsomes of HRN mice is lower than those of WT mice, but still detectable. Pretreatment of mice with a CYP1A1/2 inducer, BaP, increased the efficiencies of microsomes of both mouse lines to form detoxication metabolites of ellipticine (7-hydroxy- and 9-hydroxyellipticine).

### OXIDATION OF BENZO[a]PYRENE BY RAT LIVER MICROSOMAL SYSTEMS

BaP is oxidized by the rat hepatic microsomal systems to six metabolites (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; 3,6-quinone-; ?; 1,6-quinone and 3-OH-BaP). Liver microsomes of rats pretreated with an inducer of CYP1A1/2, Sudan I, were more effective in BaP oxidation than microsomes of control rats. This finding indicates that CYP1A1/2 participate in oxidation of BaP rat hepatic microsomes. BaP metabolites were separated by HPLC procedure that was originally developed in this work (*Figure 5* and publication shown in the List of publications as paper 4).



**Figure 5** Chromatographic profile of BaP metabolites formed by the liver microsomal system isolated from rats pretreated with Sudan I. Detection at 254 nm. PA = phenacetine.

### OXIDATION OF BENZO[A]PYRENE BY PURIFIED CYP1A1 IS DEPENDENT ON PRESENCE OF NADPH:CYP REDUCTASE AND CYTOCHROME B<sub>5</sub> IN THE RECONSTITUTED SYSTEM

CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase oxidizes BaP only to three metabolites (3,6-quinone-; 1,6-quinone- and 3-OH-BaP). The most effective BaP oxidation was found in the presence of the lowest concentration of NADPH:CYP reductase in the reconstituted system, in a ratio of CYP to RED of 1:0.05. Cytochrome b<sub>5</sub> stimulates BaP

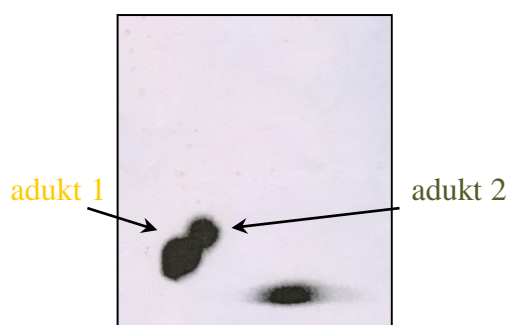
oxidation by CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase; the most efficient BaP oxidation was found in a ratio of CYP to cytochrome b<sub>5</sub> of 1:5.

ACTIVATION OF BaP TO SPECIES FORMING DNA ADDUCTS BY PURIFIED CYP1A1 DEPENDS ON THE PRESENCE OF NADPH:CYP REDUCTASE IN THE RECONSTITUTED SYSTEM

CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase forms the BaP-derived DNA adduct 1 (**Figure 6**), which is generated by 9-hydroxy-4,5-epoxide of BaP. The most efficient activation was found using a ratio of CYP to s RED of 1:0.4.

EFFECTS OF EPOXIDE HYDROLASE ON ACTIVATION OF BaP BY CYP1A1 RECONSTITUTED WITH NADPH:CYP REDUCTASE

Epoxide hydrolase is the essential enzyme for formation of the BaP-derived DNA adduct 2 (**Figure 6**) that is generated in DNA by another BaP metabolite, 7,8-diol-9,10-epoxide of BaP.



**Figure 6** Autoradiographic profile of DNA adduct BaP activated by mouse liver microsomes detected by the <sup>32</sup>P-postlabeling assay

CYTOCHROME b<sub>5</sub> STIMULATES FORMATION BaP-DERIVED DNA ADDUCTS CATALYZED BY CYP1A1 RECONSTITUTED WITH NADPH:CYP REDUCTASE

Cytochrome b<sub>5</sub> stimulates formation of adducts 1 and 2 generated during oxidation of BaP with CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase, both in the presence of low concentrations of reductase (20 pmol) and in the presence of its higher concentration (200 pmol) in the incubation mixture (**Figure 7**).



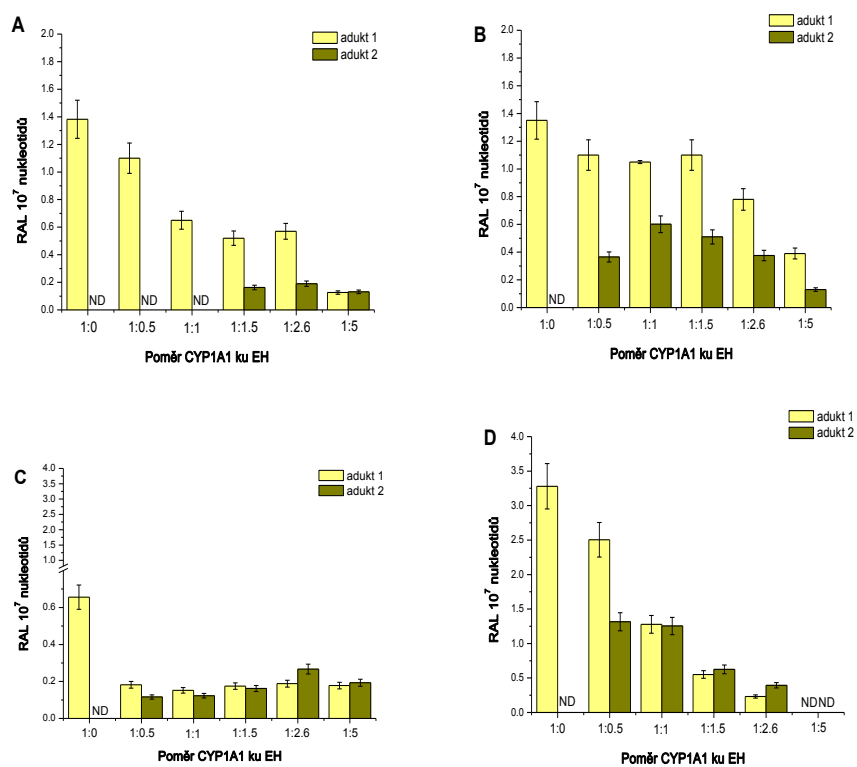


Figure 7 Influence of cytochrome  $b_5$  on DNA adduct formation generated by BaP activated by CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase in a ratio of 1:0.2 (A,B) and 1:2 and in the presence of epoxide hydrolase (C,D). Cytochrome  $b_5$  (300 pmol) was added in incubation mixtures B a D.

## CONCLUSION

The doctoral thesis contributes to our knowledge on the pharmacological effects of anticancer drug ellipticine and the mechanisms of its action. It contributes to understanding the function of cytochromes P450 and other components of mixed function oxidase (oxygenase) (MFO) system in oxidation of the studied drug as well as in oxidation of studied carcinogen, benzo[a]pyrene.

The results found in the thesis can be summarized as follows:

- Cytochrome  $b_5$  modulates oxidation of ellipticine by cytochromes P450 1A1/2 and 3A4 to form more amounts of its activation metabolites.
- Ellipticine is oxidized by microsomes isolated from the liver of rats pretreated with ellipticine to species forming DNA adducts. The results demonstrate that whereas CYP enzymes of 1A and 3A subfamilies are the major enzymes activating ellipticine in rat livers, peroxidases play a significant role in this process in lungs and kidneys.
- Ellipticine is oxidized by hepatic microsomes of mice that have deleted NADPH:CYP reductase in the liver (HRN<sup>TM</sup> mice) with lower efficiencies than by those of WT mice.
- Adduct formed from 13-hydroxyellipticine with deoxyguanosine was synthesized and isolated from the reaction mixture by HPLC.
- Benzo[a]pyrene is oxidized by rat and mouse hepatic microsomes to six metabolites (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; 3,6-quinone-; ?; 1,6-quinone and 3-OH-BaP), whereas only three of them, 3,6-quinone-; 1,6-quinone- and 3-OH-BaP, are generated by purified CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase
- Cytochrome  $b_5$  stimulates oxidation of BaP by CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase.
- Benzo[a]pyrene is activated by CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase to form DNA adduct 1 that is generated by BaP metabolite, 9-hydroxy-4,5-epoxide of BaP.
- Epoxide hydrolase is essential for formation of another BaP-DNA adduct, adduct 2, that is generated by another BaP metabolite, 7,8-diol-9,10-epoxide of BaP.
- Cytochrome  $b_5$  stimulates formation of both BaP-derived DNA adducts generated with CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase

**REFERENCES**

- [1] Dalton L.K., Demerac, S., Elmes, B. C., Loder, J. W., Swan, J. M., Teitei, T. (1967): *Aust J Chem*, 20 2715-2727.
- [2] Le Pecq J.B., Nguyen Dat X., Gosse C. and Paoletti C. (1974): *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(12), 5078-5082.
- [3] Rouësse J.G., Le Chevalier T., Caille P., Mondesir J.M., Sancho-Garnier H., May-Levin F., Spielmann M., De Jager R. and Amiel J.L. (1985): *Cancer Treat Rep*, 69(6), 707-708.
- [4] Mathe G. (1999): *Biomed Pharmacother*, 53(10), 484-486
- [5] Ashby J., Elliott B.M., Styles J.A. (1980): *Cancer Lett*, 9(1), 21-33
- [6] Bertrand J.R. and Giacomoni P.U. (1985): *Chemioterapia*, 4(6), 445-453.
- [7] DeMarini D.M., Aby-Shakra A., Gupta R., Hendee L.J., Levine J.G. (1992): *Environ Mol Mutagen*, 20(1), 12-18.
- [8] Klener P. (1996): *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha
- [9] Froelich-Ammon S.J., Patchan M.W., Osheroff N. and Thompson R.B. (1995): *J Biol Chem*, 270(25), 14998-15004.
- [10] Ohashi M., Sugikawa E. and Nakanishi N. (1995): *Jpn J Cancer Res.*, 86(9), 819-827.
- [11] Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Gamanuma M., Nakanishi N. and Ohashi M. (1999): *Anticancer Res*, 19(4B), 3099-3108.
- [12] Schwaller M.A., Allard B., Lescot E. and Moreau F. (1995): *J Biol Chem*, 270(39), 22709-22713.
- [13] Auclair C. (1987): *Arch Biochem Biophys*, 259(1), 1-14.
- [14] Stiborova M., Bieler C.A., Wiessler M. and Frei E. (2001): *Biochem Pharmacol*, 62(12), 1675-1684.
- [15] Stiborova M., Breuer A., Aimova D., Stiborova-Rupertova M., Wiessler M. and Frei E. (2003): *Int J Cancer*, 107(6), 885-890.
- [16] Stiborova M., Sejbál J., Borek-Dohalska L., Aimova D., Poljakova J., Forsterova K., Rupertova M., Wiesner J., Hudecek J., Wiessler M. and Frei E. (2004): *Cancer Res*, 64(22), 8374-8380.
- [17] Bořek -Dohalská L., Frei E. and Stiborova M. (2004): *Collect Czech Chem Commun*, 69 603-615.
- [18] Stiborova M., Poljakova J., Ryslava H., Dracinsky M., Eckschlager T. and Frei E. (2007): *Int J Cancer*, 120(2), 243-251.

- [19] Alam S., Conway M.J., Chen H.S., Meyers C. (2008): *J Viro* 82(2),1053-1058
- [20] Roffo A.H. (1940): *Bull World Health Organ.* 84(6), 497-502
- [21] Cornfield J., Haenszel W., Hammond E.C., Lilienfeld A.M., Shimkin M.B., Wynder E.L. (2009): *Int J Epidemiol.* 38(5),1175-1191
- [22] Cancer IARC Classification 2010
- [23] Phillips D.H.: Macromolecular adducts as biomarkers of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, v knize *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* (Luch A. ed.) Imperial College Press, London, pp.137–169. (2005)
- [24] Stiborova M., Stiborova-Rupertova M., Borek-Dohalska L., Wiessler M. and Frei E. (2003): *Chem Res Toxicol*, 16(1), 38-47.
- [25] Stiborova M., Rupertova M., Hodek P., Frei E. and Schmeiser H.H. (2004): *Collect Czech Chem Commun*, 69(3), 476-498.
- [26] Poljakova J., Hrebackova J., Dvorakova M., Moserova M., Eckschlager T., Hrabeta J., Gotlicherova M., Kopejtkova B., Frei E., Kizek R. and Stiborova M. (2011): *Neuro Endocrinol Lett*, in press.

**CURRICULUM VITAE****RNDr. Michaela Moserová**

Born - May 24<sup>th</sup> 1983 in Prague

2007 Mgr., Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Biochemistry; Topic of Diploma Thesis: Study of molecular mechanism of anticancer drug ellipticine

2009 RNDr., Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Biochemistry

2007- PhD. student, Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Biochemistry

**Pedagogical activities**

Since 2007 - participation in:

Practical course in biochemistry laboratory techniques, Department of Biochemistry, Charles University in Prague

Practical course in biochemistry laboratory techniques for KATA, Department of Biochemistry, Charles University in Prague

English – certified course The Bell School: English for Science (C1, 2009), First Certificate of English (B2, 2010)

French – intermediate

**Contemporary Research**

- mechanism of ellipticine-derived DNA adduct formation
- mechanism of pharmacological action of anticancer drugs, especially of ellipticine
- study of metabolism of carcinogenic compound benzo[a]pyrene
- study of enzyme expression : cytochrome P450, cytochrome b<sub>5</sub>, epoxide hydrolase, xanthine oxidase a NAD(P):quinone oxidoreductase

**Grants:**

GAUK - 127208 to the year 2010

Study of Reaction Mechanism of Cytochrome P450 Oxidizing Anticancer Drug Ellipticin

Participation in the grants of GAČR (305/09/H008 and P301/10/0356)

## SELECTED PUBLICATIONS

## [ORIGINAL PAPERS]

1. Marie Stiborová, Volker M. Arlt, Colin. J. Henderson, C. Roland Wolf, Věra Kotrbová, **Michaela Moserová**, Jiří Hudeček, David H. Phillips and Eva Frei: Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH: cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226: 318-327, 2008. **IF<sub>2007</sub> = 3.846**
2. **Michaela Moserová**, Věra Kotrbová, Martina Rupertová, Karel Naiman, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Eva Frei and Marie Stiborová: Isolation and partial characterization of the adduct formed by 13-hydroxyellipticine with deoxyguanosine in DNA. *Neuro Endocrinol. Letters*, 29(5), 728-732, 2008. **IF<sub>2007</sub> = 1.443**
3. Dagmar Aimová, Jitka Poljaková, Věra Kotrbová, **Michaela Moserová**, Eva Frei, Volker M. Arlt and Marie Stiborová: Ellipticine and benzo(a)pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Interdisc. Toxicol.*, 1(2): 160-168, 2008. **No IF**
4. **Michaela Moserová**, Věra Kotrbová, Miroslav Šulc, Eva Frei, Marie Stiborová: Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method. *Interdisc. Toxicol.*, 2(4): 101-106, 2009. **No IF**
5. Marie Stiborová, **Michaela Moserová**, Barbora Mrázová, Věra Kotrbová, Eva Frei: Role of cytochromes P450 and peroxidases in metabolism of the anticancer drug ellipticine: additional evidence of their contribution to ellipticine activation in rat liver, lung and kidney. *Neuro Endocrinol. Letters*, 31(Suppl.2):101–110, 2010. **IF<sub>2010</sub>=1.621**
6. Kateřina Levová, **Michaela Moserová**, Věra Kotrbová, Miroslav Šulc, Colin J. Henderson, Roland C. Wolf, David H. Phillips, Eva Frei, Heinz H. Schmeiser, Jan Mareš, Marie Stiborová: Role of cytochromes P450 1A1/2 in detoxication and activation of carcinogenic aristolochic acid I: studies with the NADPH:cytochromo

P450 reductase null (HRN) mouse model. *Toxicol Sci.*, 121(1):43-56, 2011.  
**IF<sub>2010</sub>=5.093**

7. Věra Kotrbová, Barbora Mrázová, **Michaela Moserová**, Václav Martínek, Petr Hodek, Jiří Hudeček, Eva Frei, Marie Stiborová: Cytochrome b<sub>5</sub> shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem Pharmacol.*, 2011 in press. **IF<sub>2010</sub>=4.889**
8. Jitka Poljakova, Jana Hrebackova., Marketa Dvořáková, **Michaela Moserova**, Tomas Eckschlager., Jan Hrabeta., Marketa Göttlicherova, Barbora Kopejtkova, Eva Frei, Rene Kizek, Marie Stiborova. Anticancer agent ellipticine combined with histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin A, is an effective DNA damage strategy in human neuroblastoma. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2011 in press. **IF<sub>2010</sub> = 1.621.**

#### [ABSTRACTS IN JOURNALS]

1. Aimová D., Poljaková J., Kotrbová V., **Moserová M.**, Frei E., Stiborová M.; ELLIPTICINE AND BENZO(A)PYRENE INCREASE THEIR OWN METABOLIC ACTIVATION VIA MODULATION OF CYP1A1/2 ACTIVITY, *Interdisc. Toxicol.*, 1, 2008, p. 55
2. **Moserová M.**, Kotrbová V., Frei E., Stiborová M.; CHARACTERIZATION OF ADDUCT GENERATED BY ELLIPTICINE METABOLITE 13-HYDROXYELLIPTICINE WITH DEOXYGUANOSINE IN DNA, *Interdisc. Toxicol.*, 1, 2008, p. 100
3. Kotrbová V., **Moserová M.**, Frei E., Stiborová M.; PARTICIPATION OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN ACTIVATION METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN MICE *IN VIVO*, *Chem. Listy*, 102, 2008, p. 381
4. **Moserová M.**, Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Arlt V. M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; IS CYTOCHROME P450 1A1 THE MAJOR ENZYME ACTIVATING BENZO[A]PYRENE *IN VITRO* AND *IN VIVO* ?, *Interdisc. Toxicol.*, 2, 2009, p. 127

5. **Moserová M.**, Kotrbová V., Frei E., Stiborová M.; CHARACTERIZATION OF ADDUCT GENERATED BY 13-HYDROXYELLIPTICINE WITH DEOXYGUANOSINE IN DNA, *FEBS J.*, 276, 2009, p. 181
6. **Moserová M.**, Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Arlt V.M., Frei E., Stiborová M.; AKTIVACE A DETOXIKACE BENZO[A]PYRENU CYTOCHROMEM P450 1A1 *IN VIVO* A *IN VITRO*, *Chem. Listy*, 15, 2010, p. 376
7. **Moserová M.**, Šulc M., Arlt V.M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; METABOLIC ACTIVATION OF CARCINOGENIC BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1 IS DICTATED BY COMPOSITION OF THE MIXED-FUNCTION-MONOOXYGENASE SYSTEM *Interdisc. Toxicol.*, 3, 2010, p. A69
8. Mrázová B., Kotrbová V., **Moserová M.**, Frei E., Stiborová M., ROLE OF CYTOCHROMES P4450 AND PEROXIDASES IN METABOLIC ACTIVATION AND DETOXICATION OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN LIVER, LUNG AND KIDNEY, *Interdisc. Toxicol.*, 3, 2010, p. A70
9. **Moserová M.**, Frei E, Arlt V.M., Phillips D.H., Schmeiser H.H., Stiborová M.; METABOLISM OF BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROMES P450, *Interdisc. Toxicol.*, 4, 2011, p. A50

#### [ABSTRACTS IN PROCEEDINGS]

1. Kotrbová V., **Moserová M.**, Rupertová M., Naiman K., Poljaková J., Frei E., Stiborová, M.; STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF DNA ADDUCT GENERATED BY THE ELLIPTICINE METABOLITE 13-HYDROXYELLIPTICINE, Sborník příspěvků XI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, leden 2007, p. 68
2. Kotrbová V., **Moserová M.**, Aimová D., Frei E., Arlt V. M., Hodek P., Stiborová M.; PARTICIPATION OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN ACTIVATION METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN MICE *IN VIVO*, Sborník příspěvků XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, únor 2008, p. 78



3. **Moserová M.**, Arlt V.M., Phillips D.H., Kotrbová V., Henderson C.J., Frei E., Stiborová M.; ROLE OF CYTOCHROMES P450 IN METABOLIC ACTIVATION OF BENZO(A)PYRENE AND ELLIPTICINE: STUDIES WITH THE HEPATIC NADPH:CYTOCHROME P450 REDUCTASE NULL MOUSE, Sborník příspěvků XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice, září 2008, p. 63
4. **Moserová M.**, Aimová D., Šulc M., Frei E., Arlt V.M., Hodek P., Stiborová M.; BENZO[A]PYRENE INCREASES ITS OWN METABOLIC ACTIVATION VIA MODULATION OF CYP1A1/2 ACTIVITY, Sborník příspěvků XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, duben 2009, p. 82
5. **Moserová M.**, Kotrbová V., Aimová D., Šulc M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; IS CYTOCHROME P450 1A1 THE MAJOR ENZYME ACTIVATING BENZO[A]PYRENE *IN VITRO* AND *IN VIVO* ?, Sborník příspěvků XXV. Xenobiochemické sympozium, Mikulov, září 2009, p. 38
6. **Moserová M.**, Kotrbová V., Šulc M., Arlt V.M., Frei E., Stiborová M.; METABOLIC ACTIVATION OF CARCINOGENIC BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1 IS DICTATED BY COMPOSITION OF THE MIXED-FUNCTION-MONOOXYGENASE SYSTEM, Sborník příspěvků XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, duben 2010, str. 66
7. **Moserová M.**, Šulc M., Arlt V.M., Phillips D.H., Frei E., Stiborová M.; METABOLIC ACTIVATION OF CARCINOGENIC BENZO[A]PYRENE BY CYTOCHROME P450 1A1 IS DICTATED BY COMPOSITION OF THE MIXED-FUNCTION-MONOOXYGENASE SYSTEM, Sborník příspěvků XXII. Biochemický sjezd, Martin, Slovenská republika, září 2010, p. 238