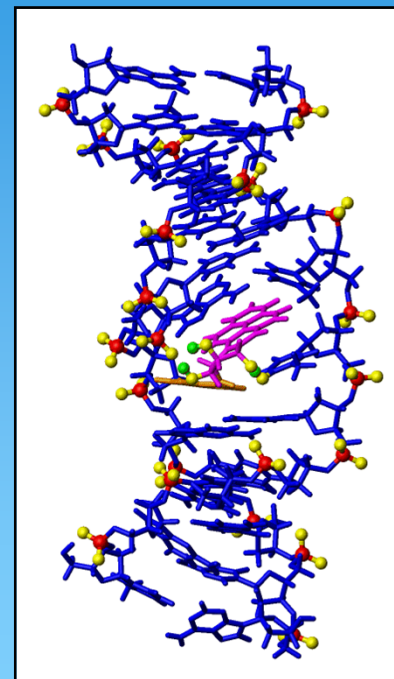
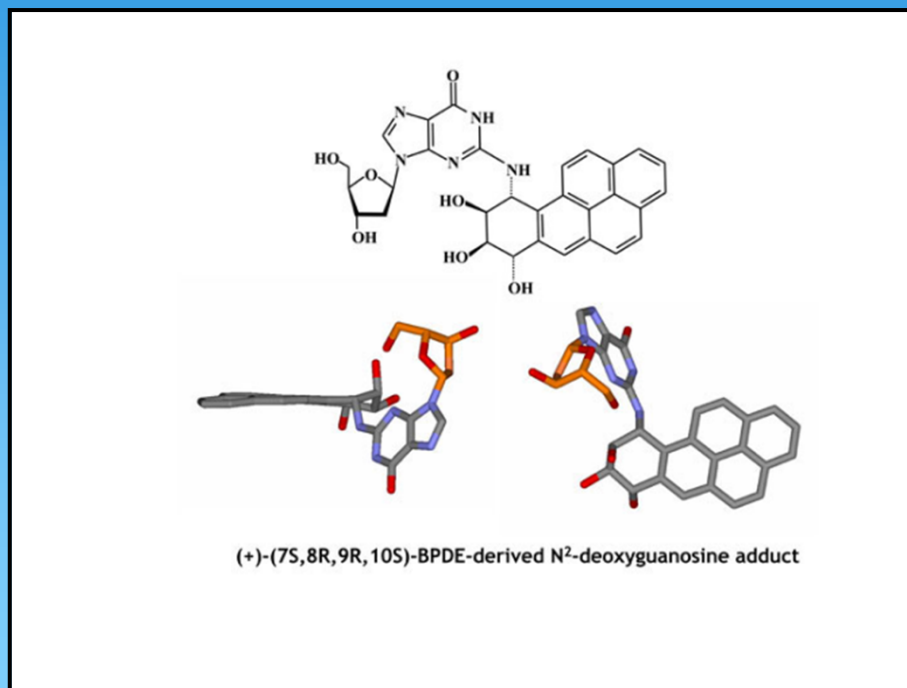


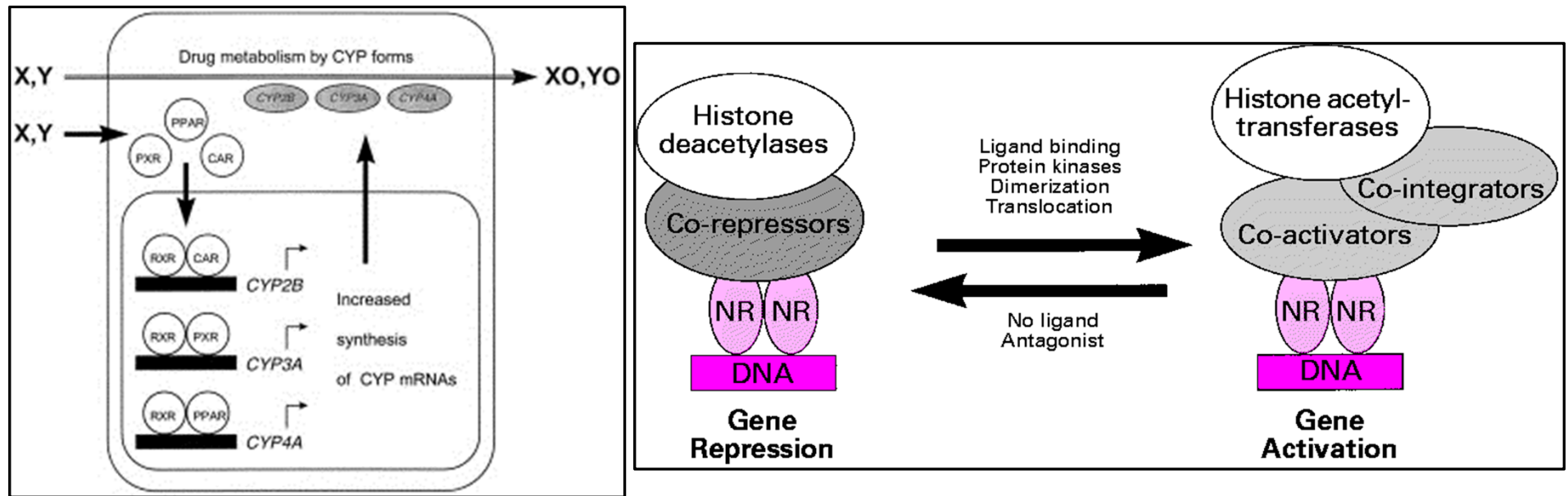
MECHANISMY TRANSKRIPČNÍ REGULACE CYTOCHROMŮ P450 RODINY 1 A JEJICH ÚLOHA V BIOTRANSFORMACI KARCINOGENŮ



Základní koncept (dogma) toxikologie/farmakologie

=

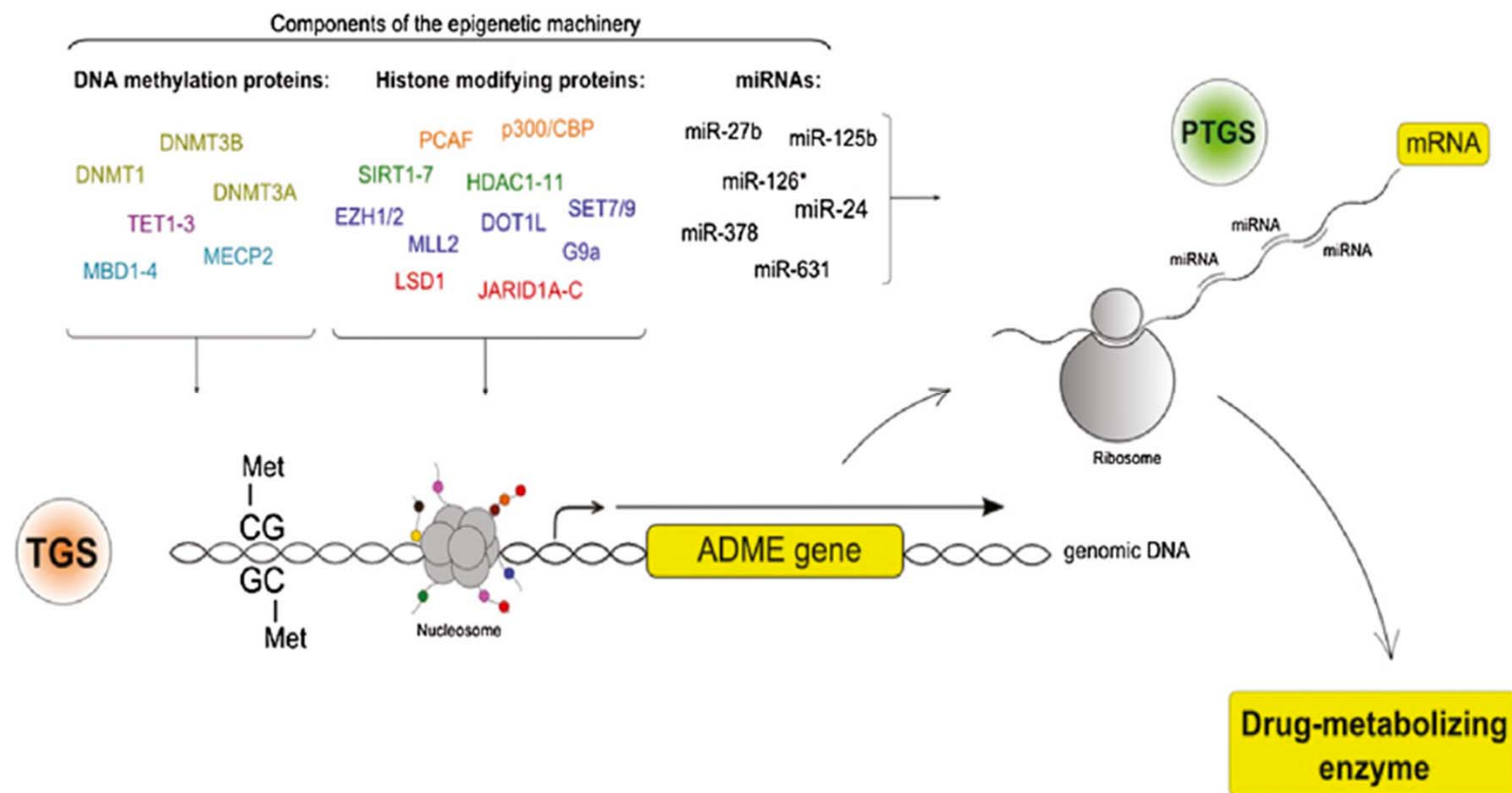
specifické jaderné receptory aktivované xenobiotiky regulují jejich detoxifikaci/bioaktivaci prostřednictvím indukce exprese/aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika



Biochemical Journal (2000) 347, 321-337

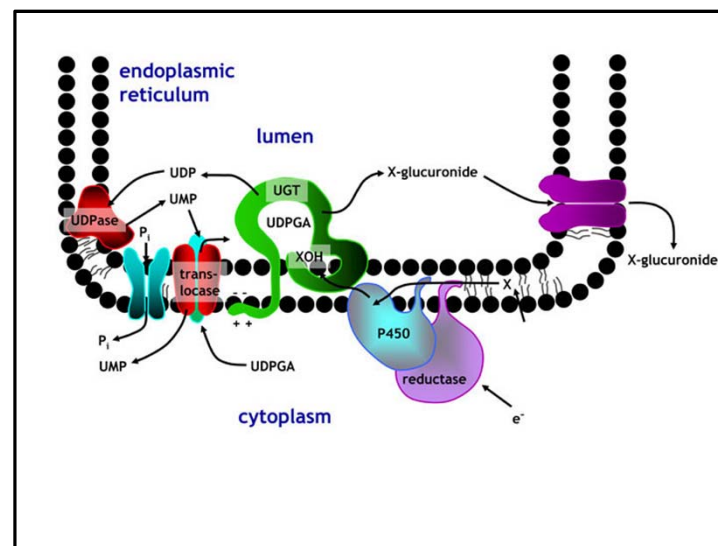
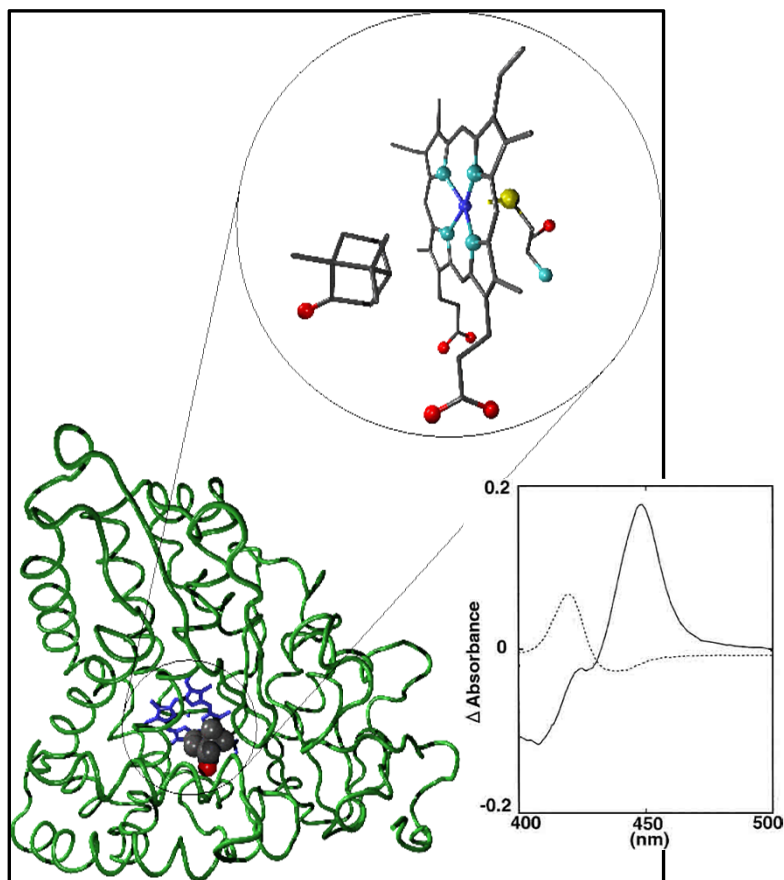
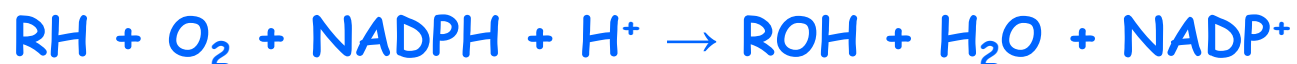
ADME = Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion

Úloha epigenetických mechanismů v regulaci metabolismu a transportu farmak vs. toxicita env. polutantů?



Cytochromy P450 (CYP)

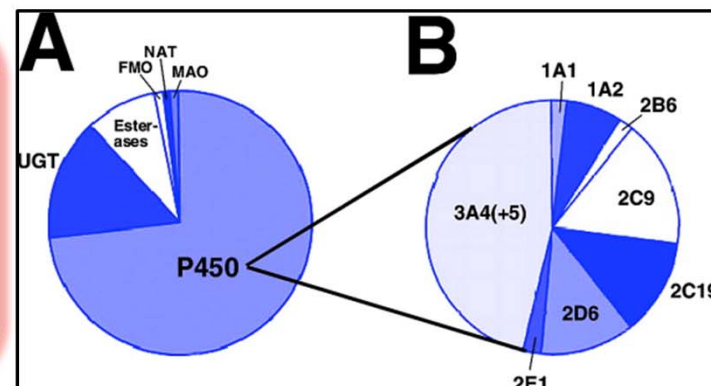
CYPy – velká skupina monooxygenáz, které katalyzují metabolismus řady exogenních a endogenních substrátů v organismu, vč. xenobiotik;



Klasifikace cytochromů P450

Table 2 | Functions of human CYP enzymes

| Family | Number of subfamilies | Number of genes | Substrates/function |
|--------|-----------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CYP1 | 2 | 3 | Metabolism of eicosanoids* and xenobiotics; in addition, CYP1A2 metabolizes melatonin, oestrogen, uroporphyrin and ~24 drugs |
| CYP2 | 13 | 16 | Metabolism of eicosanoids*, xenobiotics and many drugs |
| CYP3 | 1 | 4 | Metabolism of eicosanoids*, xenobiotics and many drugs |
| CYP4 | 6 | 12 | Metabolism of eicosanoids*, xenobiotics and few drugs |
| CYP5 | 1 | 1 | Thromboxane A ₂ synthase |
| CYP7 | 2 | 2 | Cholesterol, bile acid synthesis |
| CYP8 | 2 | 2 | Prostacyclin synthase, bile acid synthesis |
| CYP11 | 2 | 3 | Steroidogenesis |
| CYP17 | 1 | 1 | Steroid 17-hydroxylase, 17/20-lyase |
| CYP19 | 1 | 1 | Oestrogen aromatization |
| CYP20 | 1 | 1 | Expressed in gastrula, neural patterning and somitogenesis, organogenesis, fetus and nasopharynx |
| CYP21 | 1 | 1 | Steroid 21-hydroxylase |
| CYP24 | 1 | 1 | Vitamin D ₃ 24-hydroxylase |
| CYP26 | 3 | 3 | Retinoic acid hydroxylation |
| CYP27 | 3 | 3 | Bile acid biosynthesis, vitamin D ₃ hydroxylations |
| CYP39 | 1 | 1 | 24-hydroxycholesterol 7-hydroxylase |
| CYP46 | 1 | 1 | Cholesterol 24-hydroxylase in the central nervous system |
| CYP51 | 1 | 1 | Lanosterol 14-demethylase |



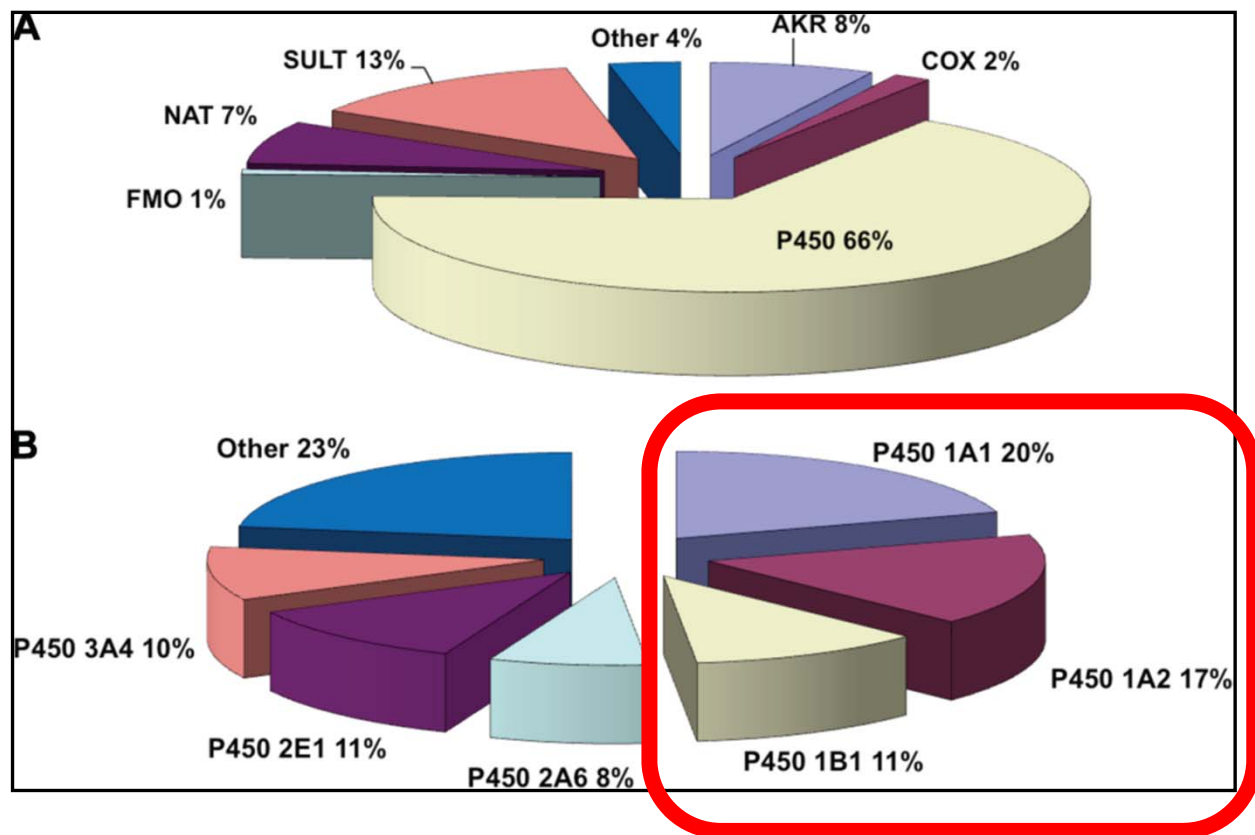
Box 2 | The CYP gene families

Cytochrome P450 (CYP) proteins are arranged into families and subfamilies, which are derived from per cent amino-acid sequence identity. Proteins that have roughly >40% sequence similarity are members of the same gene family, whereas those with >70% similarity are members of the same subfamily. The development and application of this delightfully logical system of nomenclature³ has eliminated the confusion that often plagues the naming of gene families and superfamilies. The fact that there are 20 CYP genes in *Mycobacterium tuberculosis* and seven in *Bacillus subtilis* emphasizes the likelihood that the CYP superfamily existed long before the prokaryote-eukaryote split some 2.1 billion years ago⁶⁵, and the earliest ancestor probably arose around the time that the partial pressure of oxygen increased dramatically on the planet. The CYP51 gene exists in bacteria, plants, fungi and animals, indicating that this was probably the first eukaryotic CYP gene. The human, mouse and rat genomes contain 57, 102 and 87 CYP genes, respectively². Orthologous Cyp genes between the mouse and rat generally show 90–92% sequence similarity, human CYP orthologues of rodent Cyp genes are usually 78–82% similar.

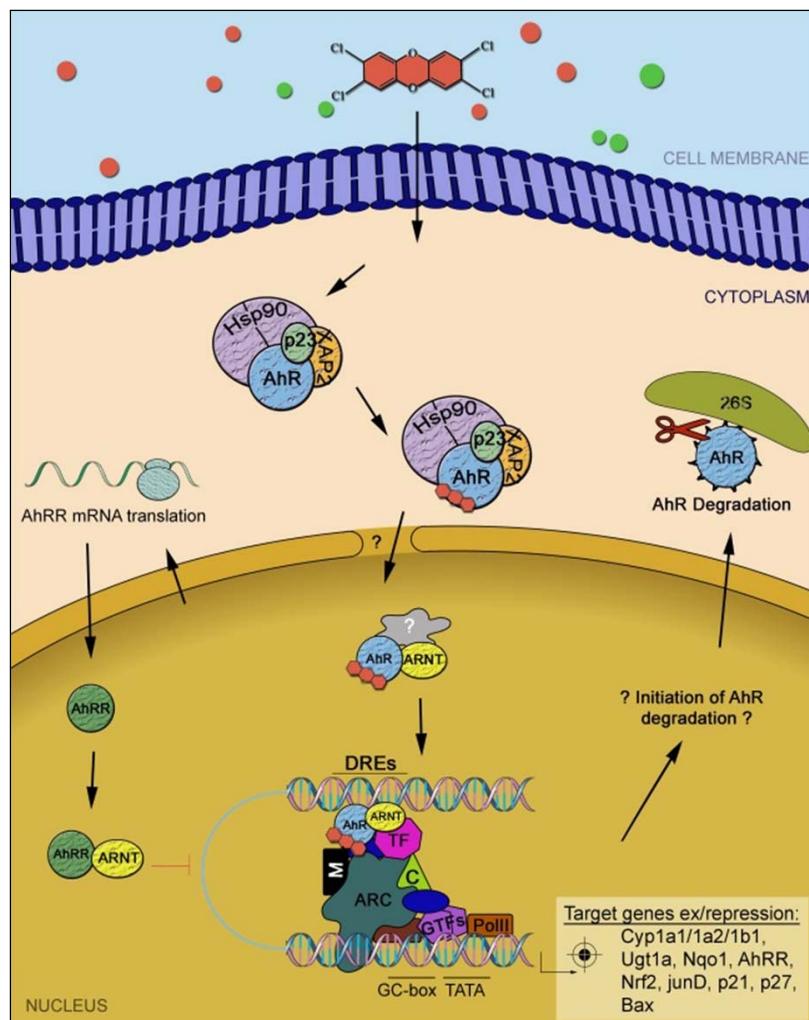
The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis

Daniel W. Nebert and Timothy P. Dalton

Cytochromy P450 rodiny 1 (CYP1) a metabolismus karcinogenů



Exprese CYP1 enzymů je primárně kontrolována AhR
= receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)



=

- transkripční faktor, člen PAS rodiny regulátorů transkripce;
- regulátor metabolismu xenobiotik i bioaktivace promutagenů.

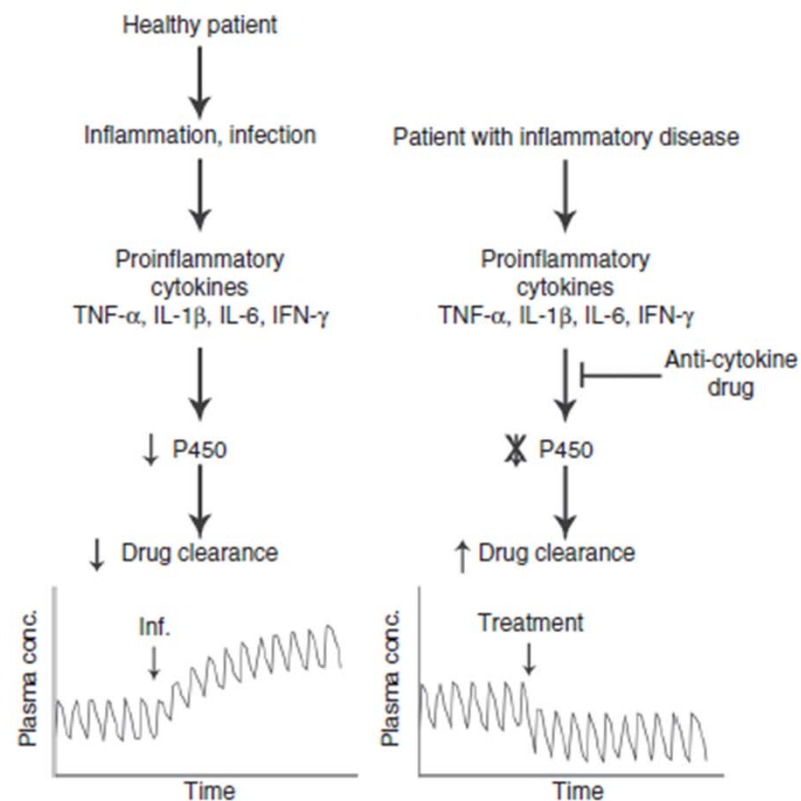
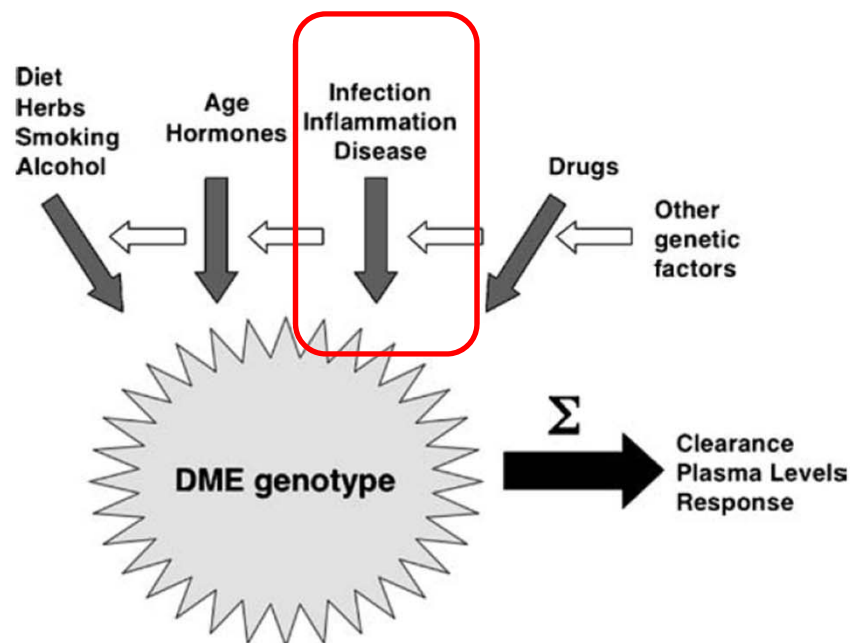
AhR interaguje s řadou signálních drah, které mohou mít velký vliv na odpověď organismu na toxické látky:

- současný obraz úlohy AhR v regulaci enzymů, jako jsou CYP1 je založený na velmi zjednodušených předpokladech a optimalizovaných modelech, kdy jsou buňky (často terminálně diferencované buňky - hepatocyty, nádorové hepatoma linie) kultivovány v „optimálních“ podmínkách;
- co se stane s AhR signalizací v podmínkách specifického mikroprostředí ??
- intenzivní aktivace imunitního systému, jako je např. **chronický/akutní zánět?**
- aktivace **oncogenů** či inaktivace **nádorových supresorů?**
- působení faktorů/signálních drah aktivovaných např. v průběhu vývoje nebo u specifických buněčných populací **-např. působení gradientů morfogenů, regulace kmenových buněk?**
- **epigenetická regulace genů kontrolovaných AhR?**

Úloha DNA metylace a modifikací histonů v regulaci CYP1 enzymů

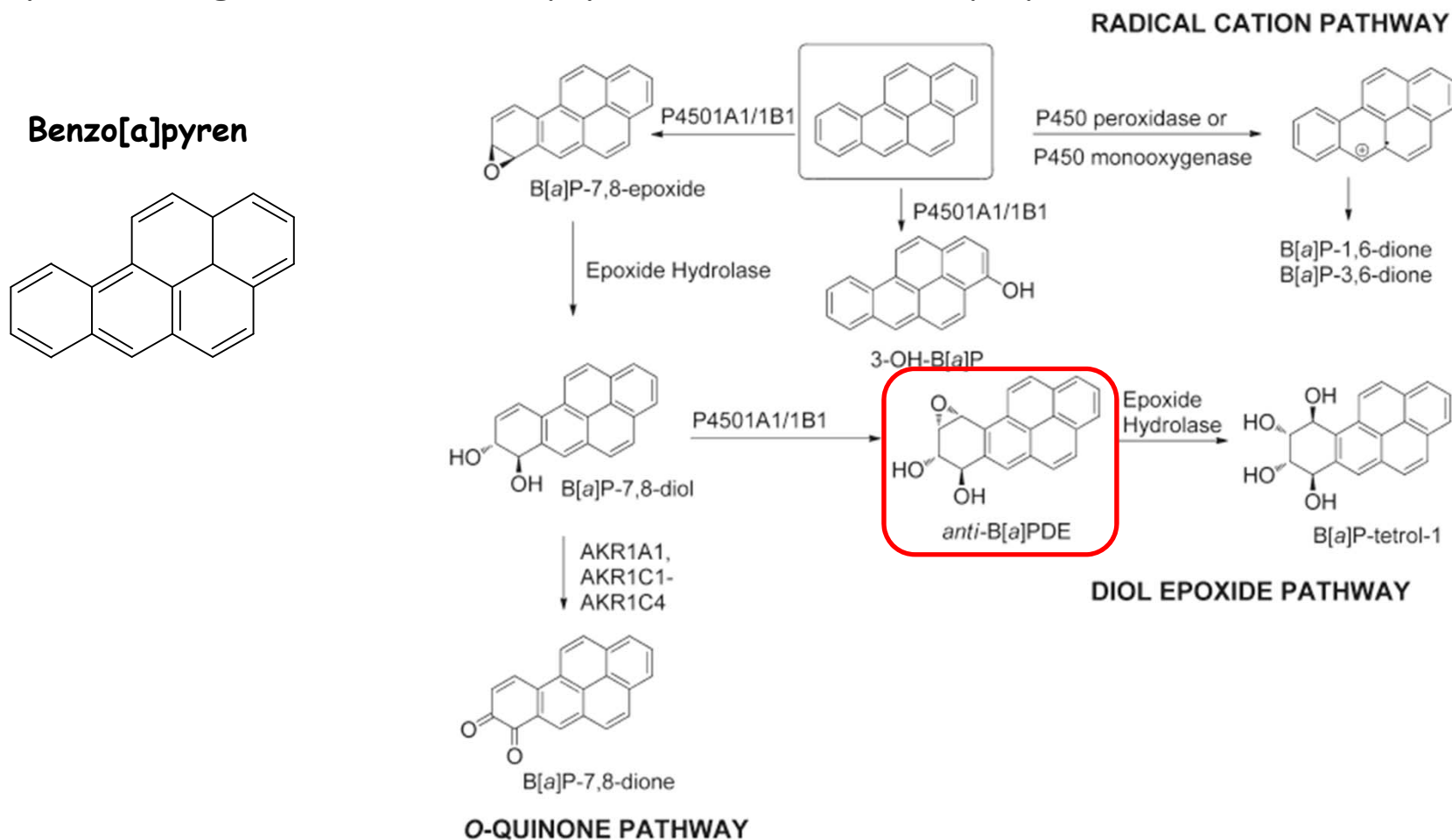
- hypermethylace promotoru *CYP1B1* (kolorektální karcinom, nádory žaludku);
- hypomethylace promotoru *CYP1B1* (nádory prostaty);
- metylace *CYP1B1* lokusu u pacientů s ALL - negativní prognóza;
- hypermethylace promotoru *CYP1A1* u nádorů plic;
- regulace transkripce *CYP1A1* - významná úloha histon acetyltransferas (CBP/p300) a histon deacetylas (HDAC1);
- fosforylace H3 (S10) - prostřednictvím I κ B kinasy α (IKK α) - v oblasti enhanceru *Cyp1a1*;
- metylace H4 (R3) a acetylace H4 (K5) kontrolují iniciaci transkripce *Cyp1a1*;

Jakým způsobem zasahuje do regulace CYP1 genů zánět a zánětlivé mediátory?

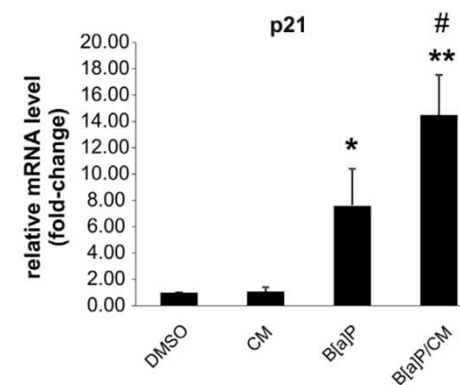
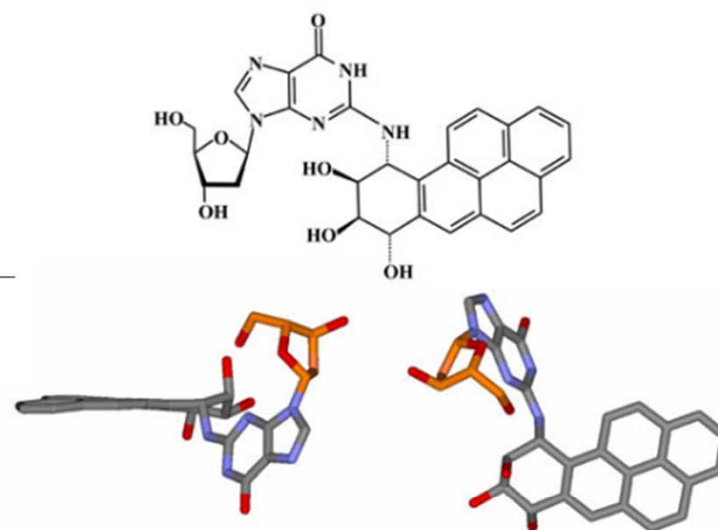
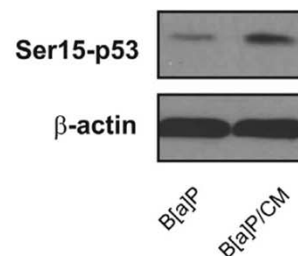
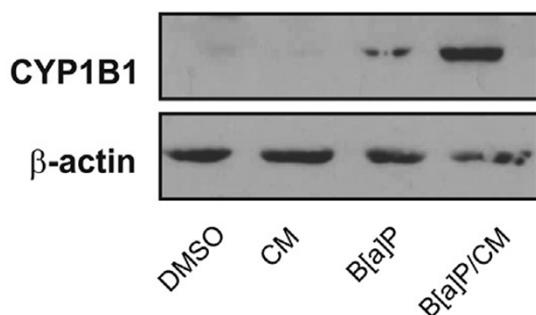
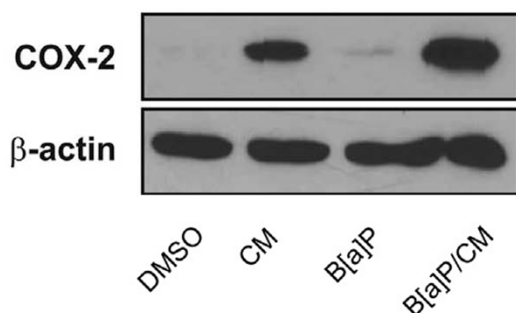
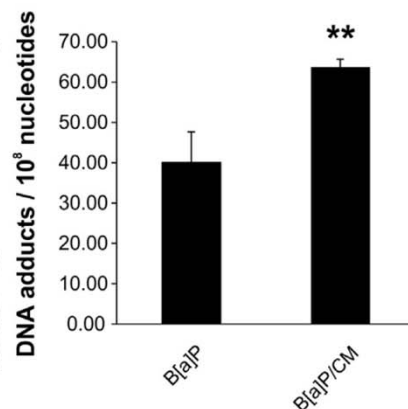
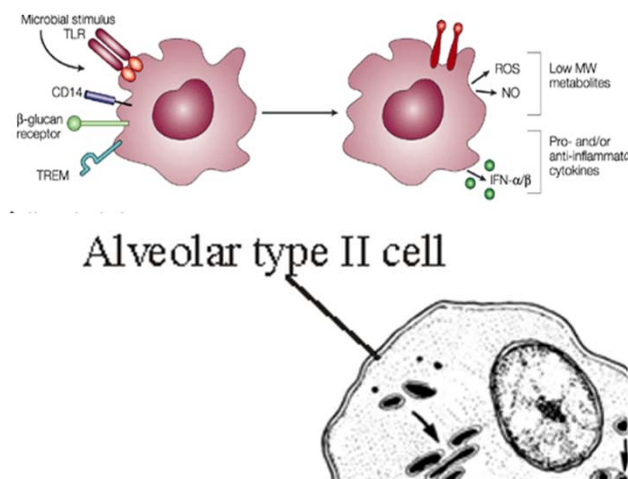


Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) – významná skupina mutagenů a karcinogenů

- benzo[a]pyren (BaP) – lidský karcinogen třídy 1 – významná látka ve znečištěném ovzduší, cigaretovém kouři či kontaminující potraviny;
- pro-mutagen bioaktivovaný primárně CYP1 enzymy;

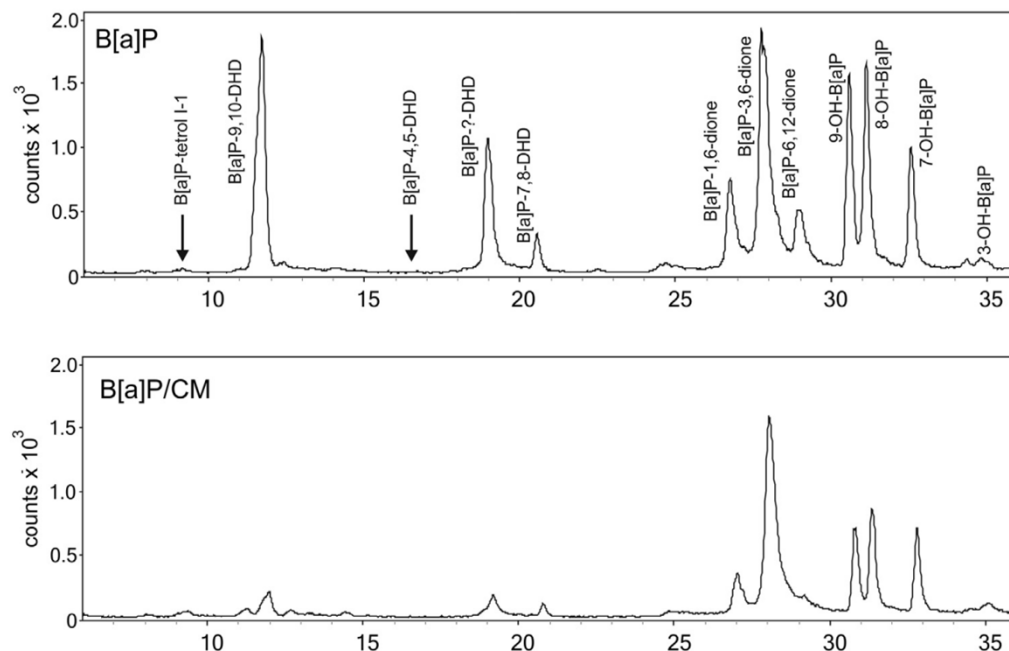


Simulace zánětlivého mikroprostředí posiluje tvorbu DNA aduktů a genotoxické poškození v modelu alveolárních epiteliálních buněk

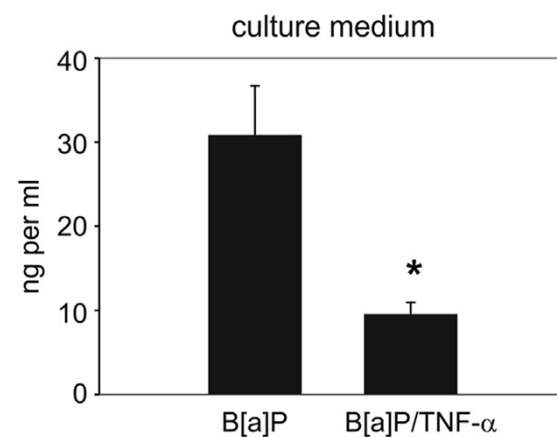
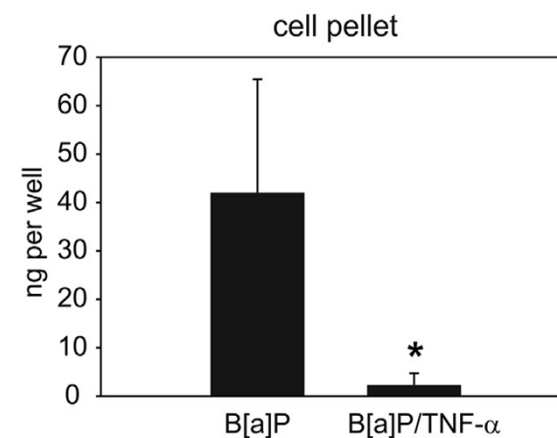


Prozánětlivé cytokiny urychlují metabolizaci BaP v alveolárních epiteliálních buňkách

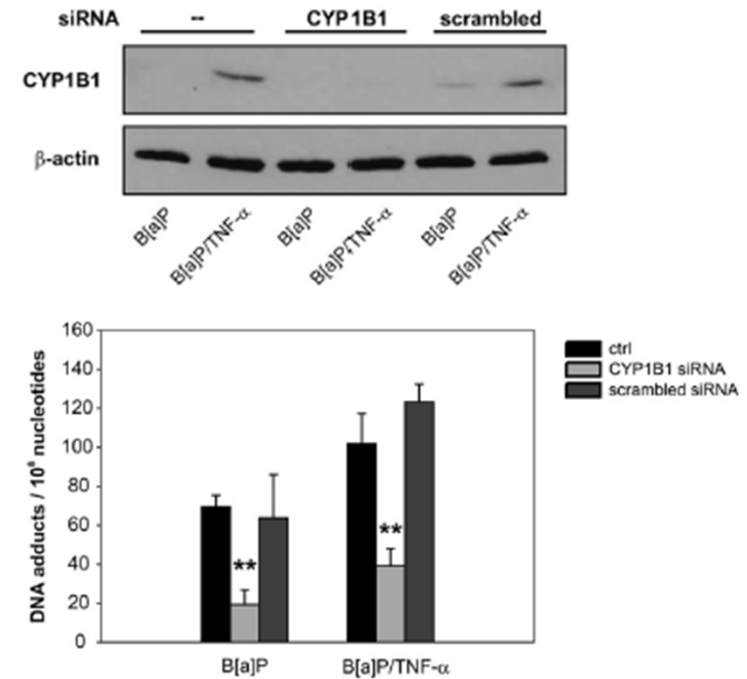
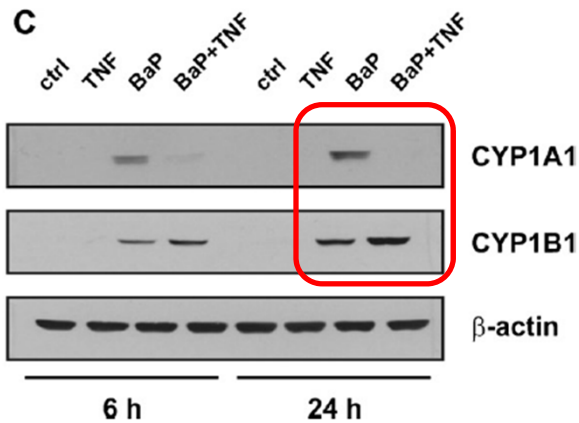
LC-MS/MS profil metabolitů BaP



Hladina BaP



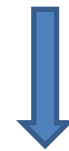
Mohl by CYP1B1 hrát významnou roli v regulaci metabolismu BaP v zánětlivých podmínkách?



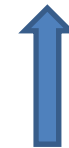
Prozánětlivé
mediátory



CYP1A1



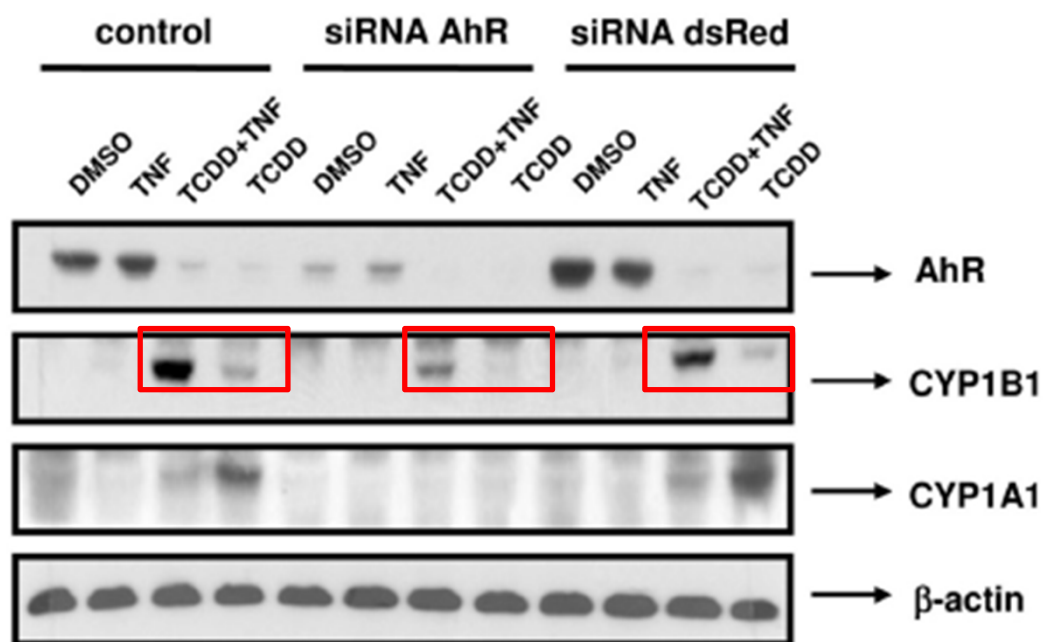
CYP1B1



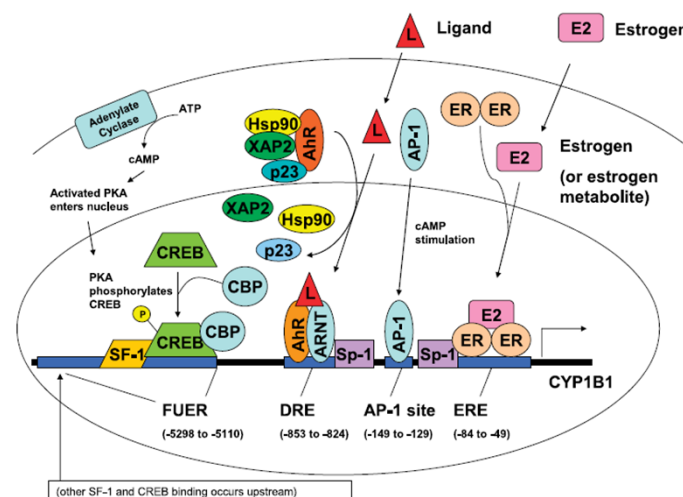
CYP1B1

- enzym přispívající k metabolické aktivaci (bioaktivaci) většiny karcinogenních PAU, vč. BaP;
- vysoká exprese v průběhu embryonálního vývoje - úloha ve vývoji např. očí;
- mutace CYP1B1 → primární vrozený glaukom;
- **výrazně zvýšená exprese v řadě typů nádorů;**
- **možný nádorový biomarker;**
- přispívá k přeměně steroidních hormonů na toxické metabolity;
- významná úloha v metabolismu mastných kyselin a lipidů;
- ***in vivo* - některé studie naznačují že jeho exprese je zvýšená v průběhu zánětu - např. terminální onemocnění jater, refluxní choroba jícnu apod.**

AhR siRNA jen částečně blokuje koordinovanou indukci BaP a prozánětlivým cytokinem

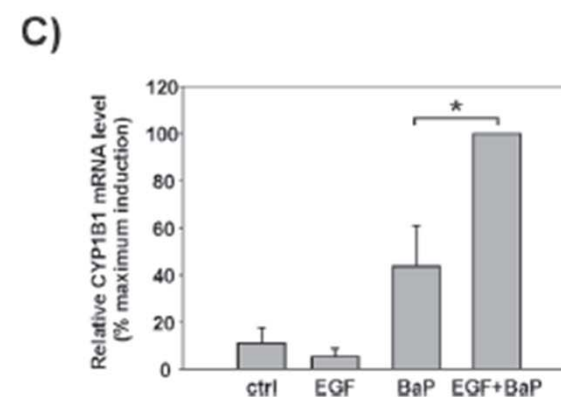
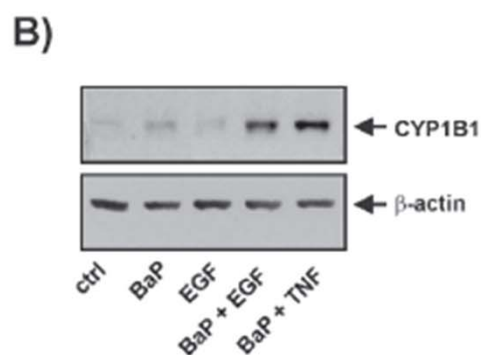
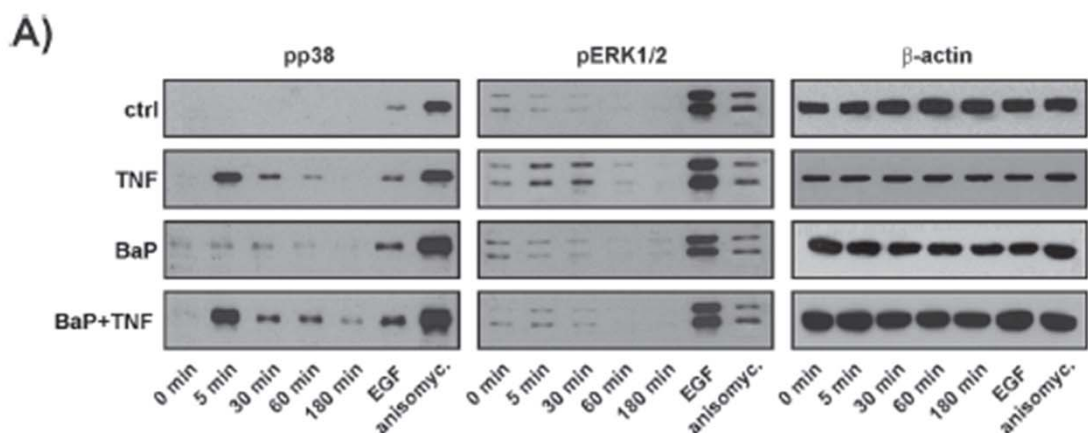
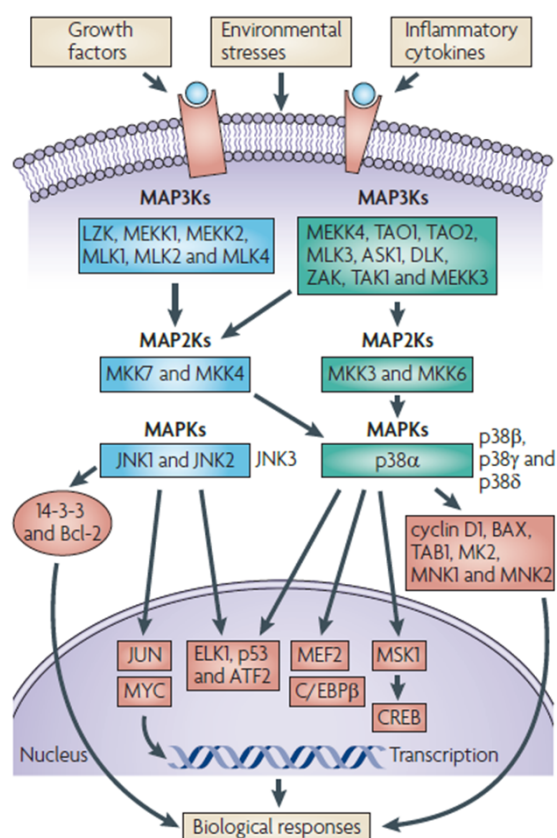


Šmerdová et al., *Carcinogenesis* 2014; 35, 2534–2543



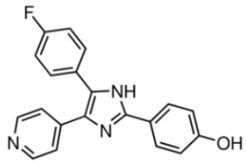
- interakce s dalšími transkripčními regulátory – HIF-1α, NF-κB, estrogení receptory a další jaderné receptory;
- cAMP; protein kinázy;
- miRNA (např. miR27b);
- epigenetické regulátory (methylace DNA);

Potenciální úloha MAP kináz v regulaci CYP1B1 PAU a zánětlivými mediátory

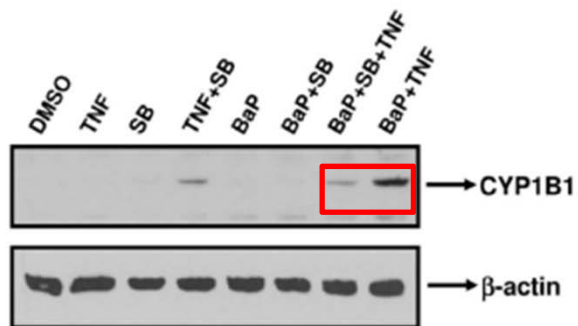


Inhibice p38 MAP kináz blokuje indukci *Cyp1b1* pomocí BaP a prozánětlivého cytokinu v epiteliálních buněčných modelech; p38 MAPK KO snižuje jak bazální hladinu exprese *Cyp1b1*, tak jeho indukci:

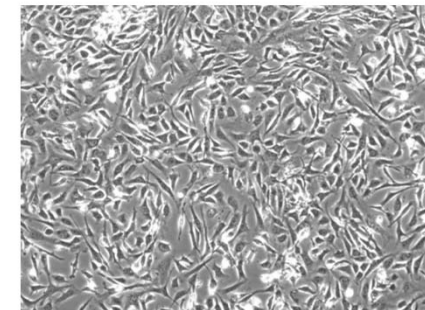
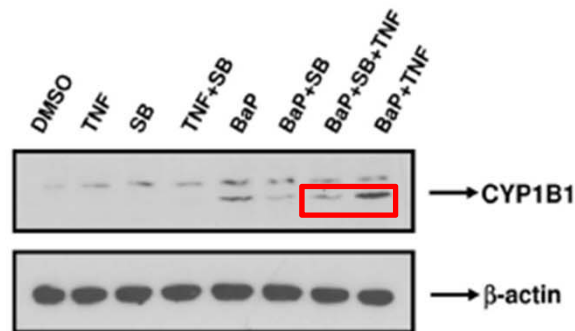
SB202190



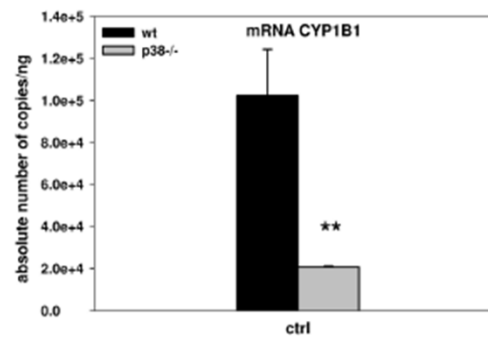
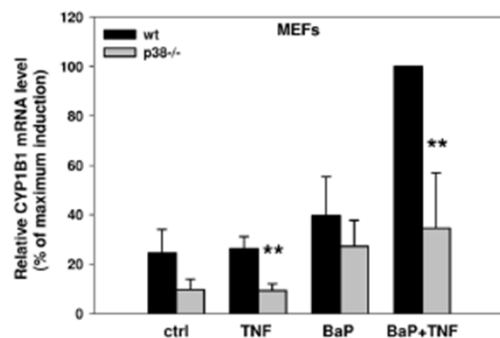
WB-F344



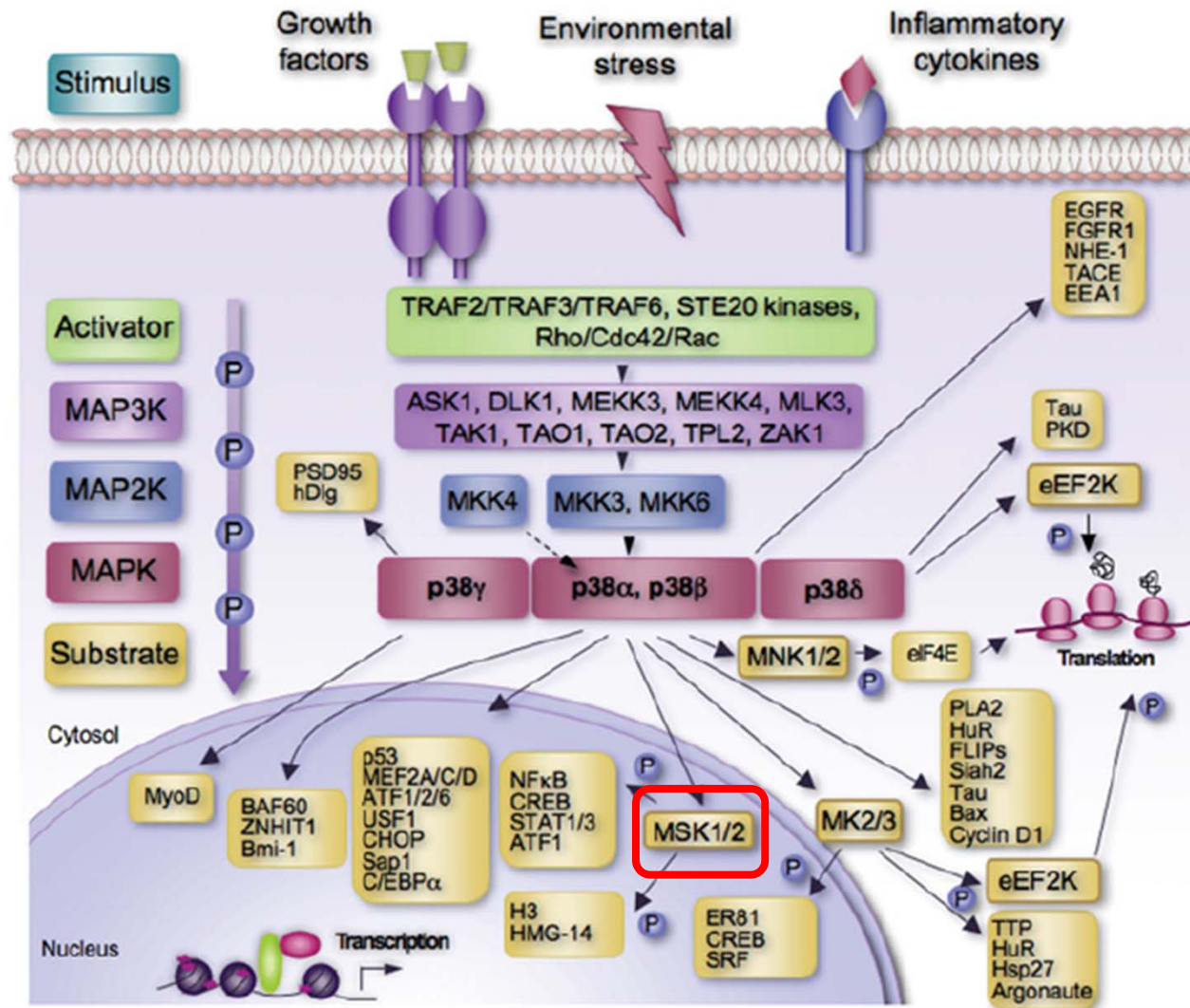
RLE-6TN



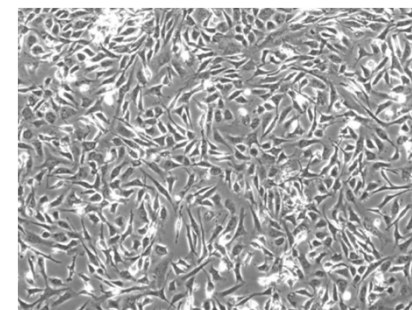
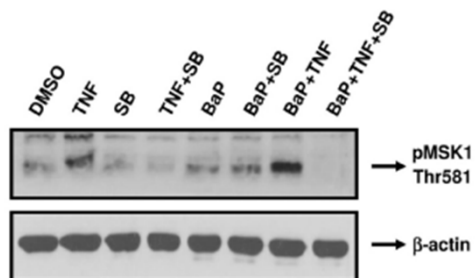
p38 α ^{-/-} myši
embryonální
fibroblasty



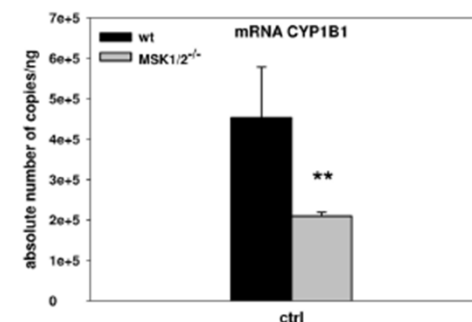
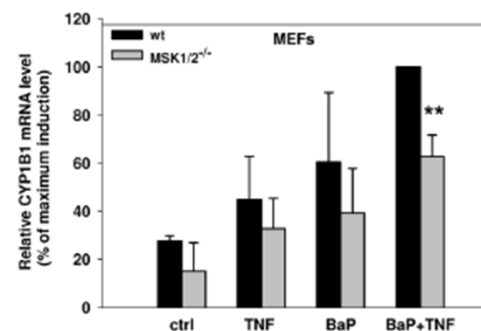
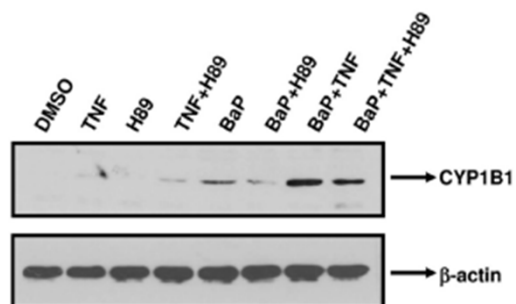
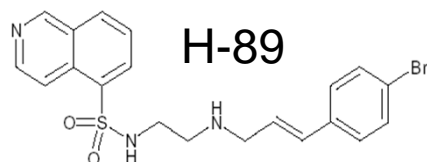
Jaký je mechanismus indukce Cyp1b1 v zánětlivých podmínkách?



Aktivace p38 vede k fosforylaci MSK1; inhibice MSK1/2 blokuje indukcii Cyp1b1; MSK1/2 double KO snižuje jak bazální hladinu exprese *Cyp1b1*, tak jeho indukcii:

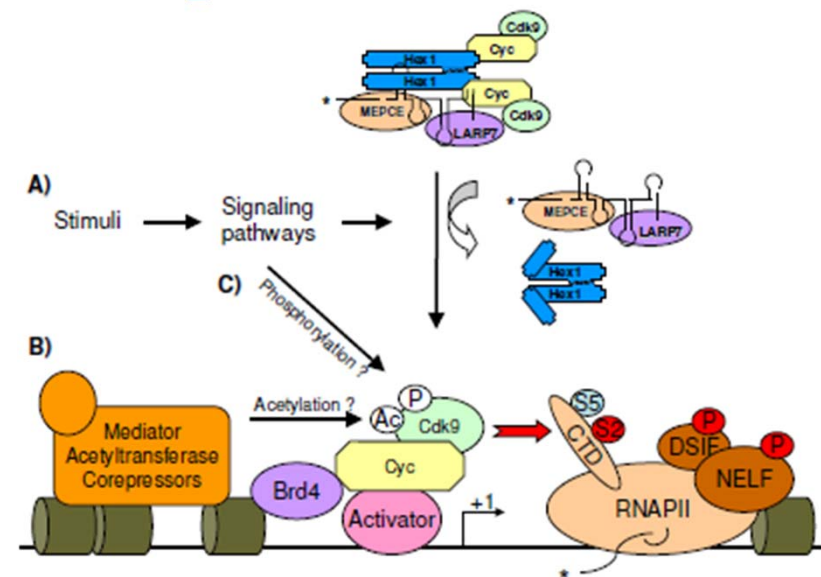
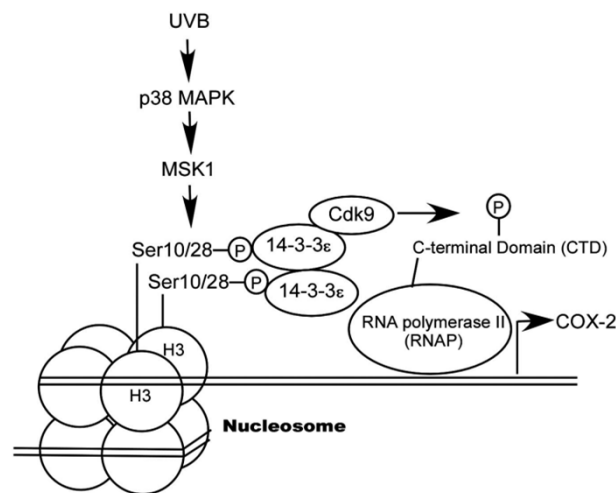
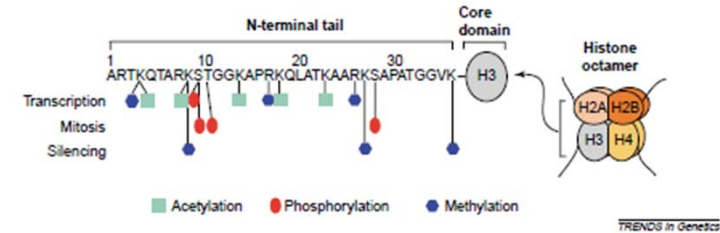


MSK1/2^{-/-} myší
embryonální
fibroblasty

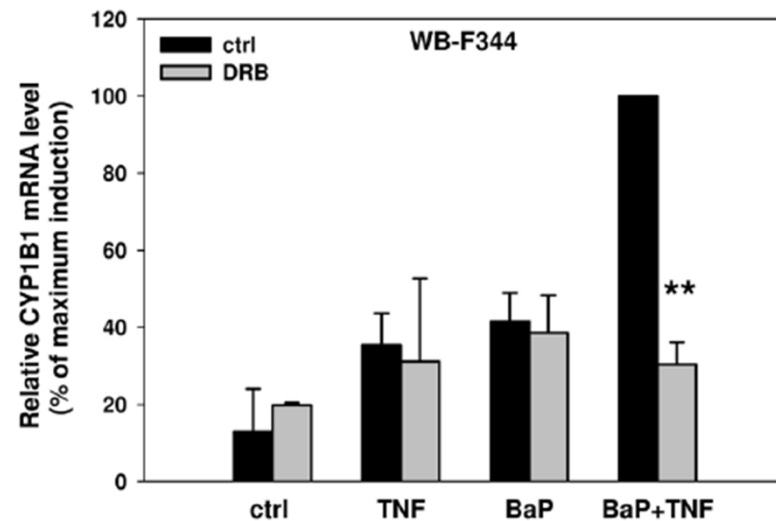
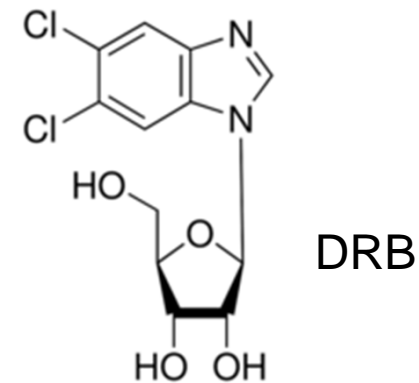


MSK1/2 a regulace transkripce:

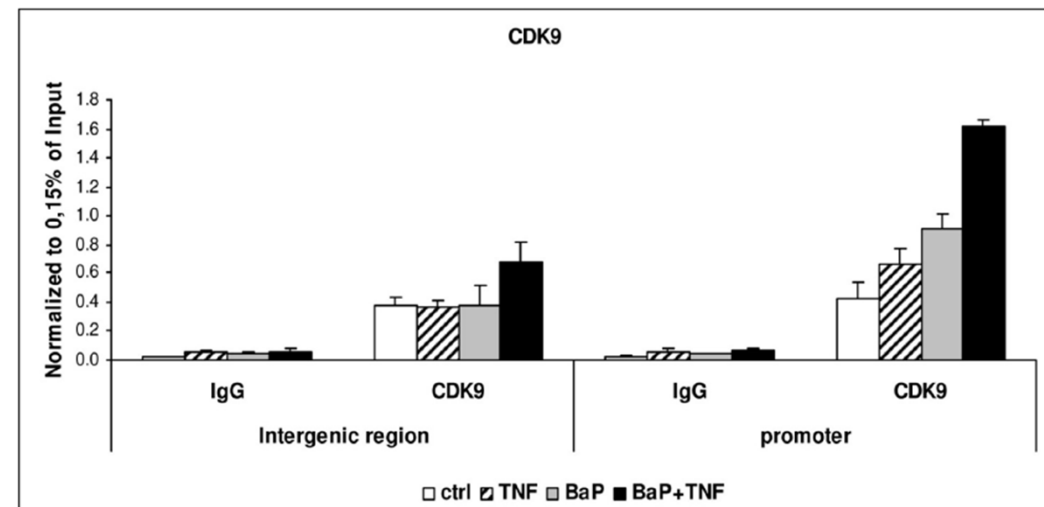
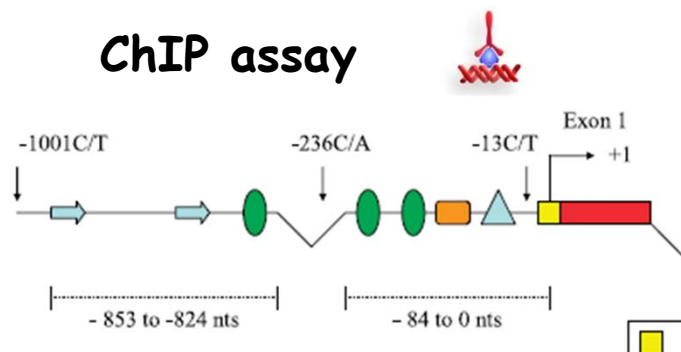
- jaderné kinázy podílející se na regulaci transkripce;
- modulace aktivity transkripčních faktorů (CREB, STAT3, ATF1);
- remodelace chromatinu - fosforylace histonů;
- fosforylace H3 umožňuje vazbu Cdk9, podjednotky pozitivního transkripčního elongačního faktoru b (P-TEFb), do promotoru COX-2, přispívá tak k transkripční elongaci;



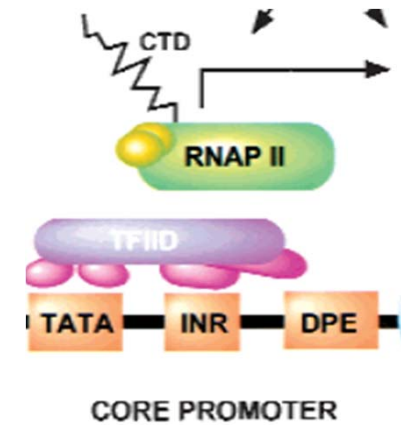
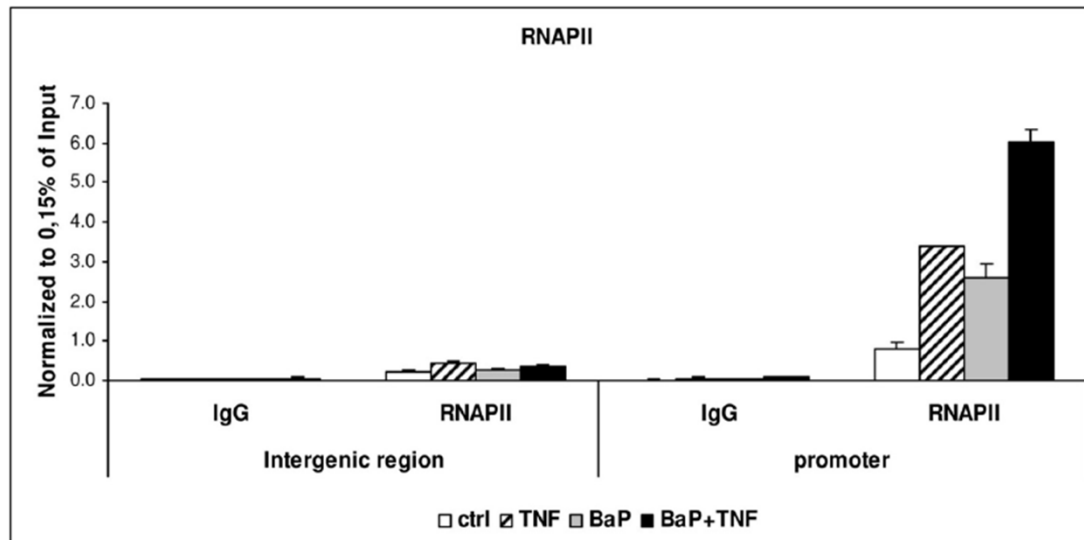
Inhibice Cdk9 blokuje koordinovanou indukci *CYP1B1* pomocí BaP a prozánětlivého cytokinu



BaP a TNF posilují vazbu Cdk9 do oblasti promotoru *CYP1B1*



BaP a TNF posilují vazbu RNA polymerasy II do oblasti promotoru *CYP1B1*



Shrnutí

- **CYP1B1 by mohl hrát významnou roli v metabolismu PAU v průběhu chronické i akutní zánětlivé reakce;**
- **může přispívat k jejich bioaktivaci a genotoxickému působení;**
- **nový typ regulace exprese/aktivity CYP1B1, prostřednictvím signální kaskády p38/MSK1/2, stimulující (prostřednictvím fosforylace histonů) vazbu CDK9 a RNAPII do oblasti promotoru CYP1B1, která přispívá k transkripční elongaci;**
- **aktivace p38 MAP kináz prozánětlivými cytokiny, ale i dalšími mechanismy (např. v nádorových buňkách) může významným způsobem ovlivnit nejen metabolismus exogenních karcinogenů. ale i endogenních substrátů CYP1B1, jako jsou např. estrogeny;**

Zvláštní poděkování patří:

- *L. Šmerdová, J. Svobodová, A. Kozubík, Oddělení cytokinetiky, BFÚ AV ČR, Brno;*
- *M. Machala, J. Kohoutek, J. Neča Oddělení chemie a toxikologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno;*
- *D. Blažek, CEITEC, Brno;*
- *J. Topinka, A. Milcová, J. Schmuczerová, Oddělení genetické ekotoxikologie, Ústave experimentální medicíny AV ČR, Praha;*
- *S. J. Arthur, University of Dundee, UK;*
- *Á. R. Nebreda, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Španělsko;*
- *James E. Trosko, Michigan State University, East Lansing, USA;*

Finanční podpora:

GA ČR (P503/11/1227)

MŠMT (CZ.1.07/2.3.00/30.0030)