



**PRODUKT KOMENZÁLNÍ STŘEVNÍ  
MIKROFLÓRY, BUTYRÁT, MODULUJE  
BIOAKTIVACI A GENOTOXICITU  
POLYAROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ  
V BUŇKÁCH TLUSTÉHO STŘEVA  
PROSTŘEDNICTVÍM INHIBICE HISTON  
DEACETYLÁZ**

**Ondřej Zapletal**

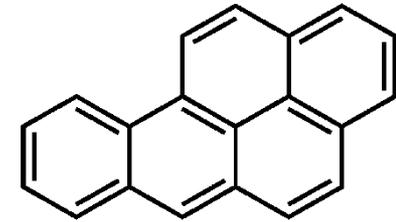
**Oddělení Cytokinetiky BFÚ AVČR, v.v.i.**

# Nádory tlustého střeva a dietární rizikové faktory

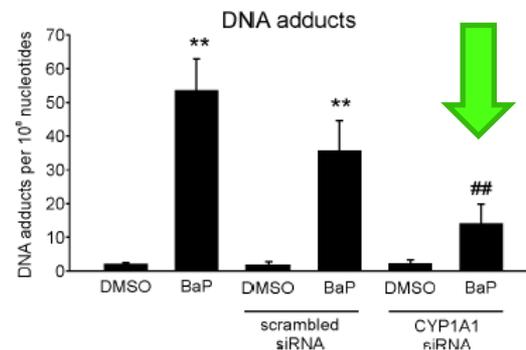
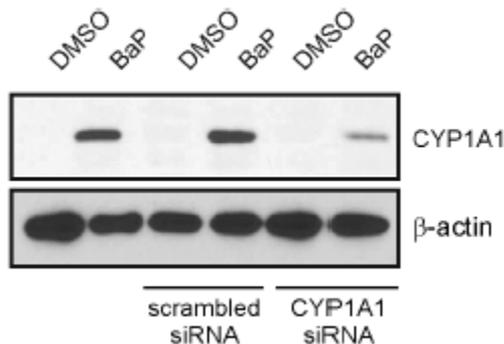
- třetí nejčastější forma nádoru ve „vyspělých“ státech
- dlouhodobý vývoj
- ovlivnitelnost životním stylem, prostředím, dietou
- např. nitrosaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, atd.



# Benzo[a]pyren

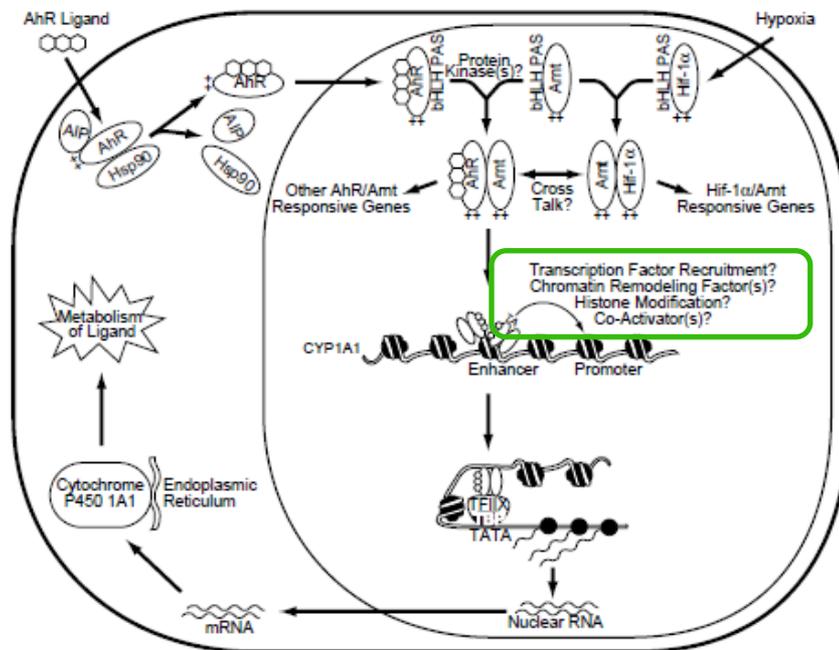


- PAH (polycyklický aromatický uhlovodík)
- spalování organických látek (obsahujících uhlík)
- cigaretový kouř, **grilované maso**
- **lidský karcinogen skupiny 1 (IARC)**
- pro genotoxické/mutagenní účinky je kritickým krokem **bioaktivace**
- **klíčovou úlohu v jeho bioaktivaci v epiteliálních buňkách kolonu hraje pravděpodobně indukce CYP1A1**



# CYP1A1 – regulace exprese

- AhR – transkripční regulátor CYP1A1



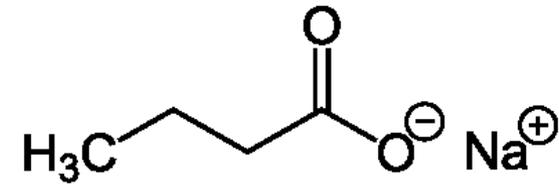
??

Whitlock, 1999

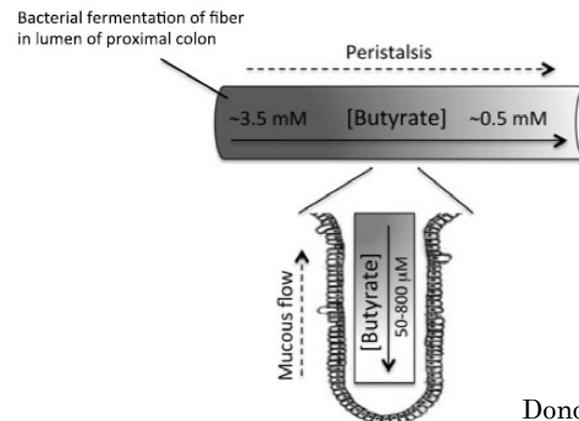
- HDAC1 hraje významnou roli v regulaci myšního ortologu *Cyp1a1*
- vliv inhibitorů HDAC na indukci lidského *CYP1A1* – kontroverzní?
- **epiteliální buňky kolonu jsou vystaveny přirozenému inhibitoru HDAC - butyrátu**



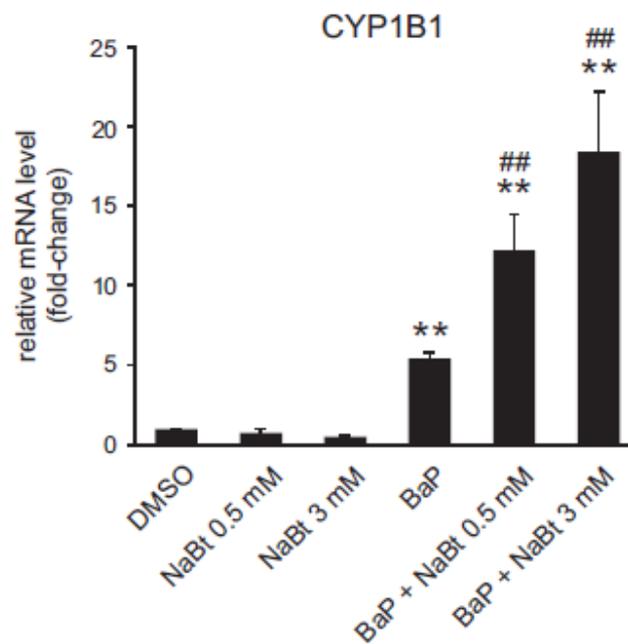
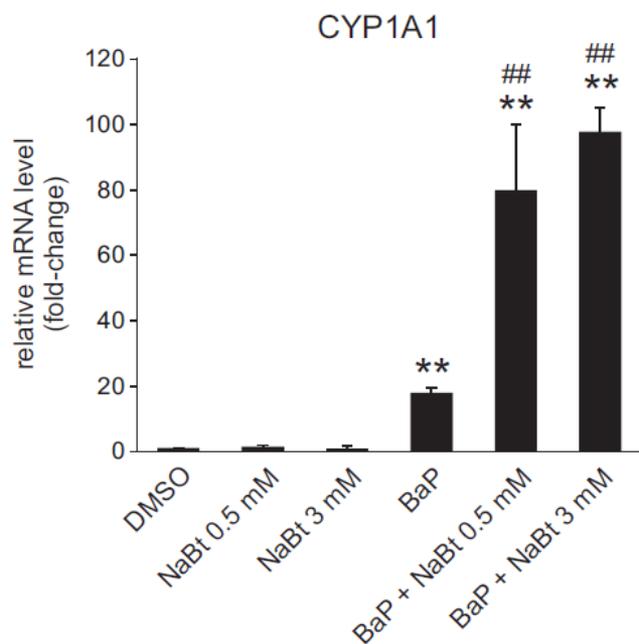
# Butyrát sodný



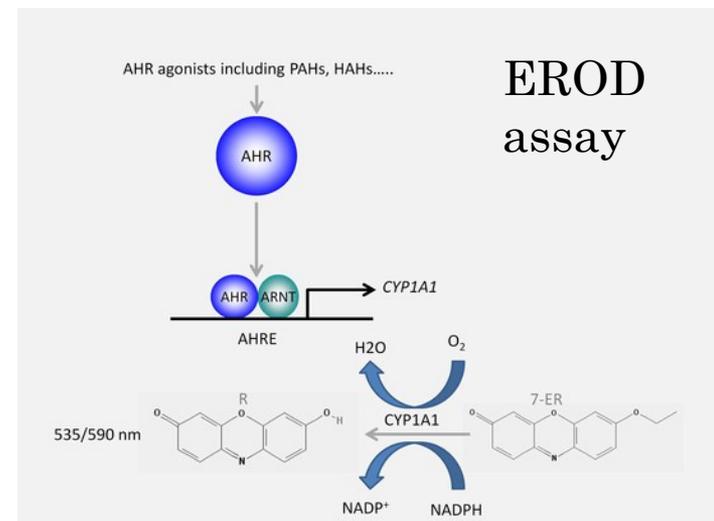
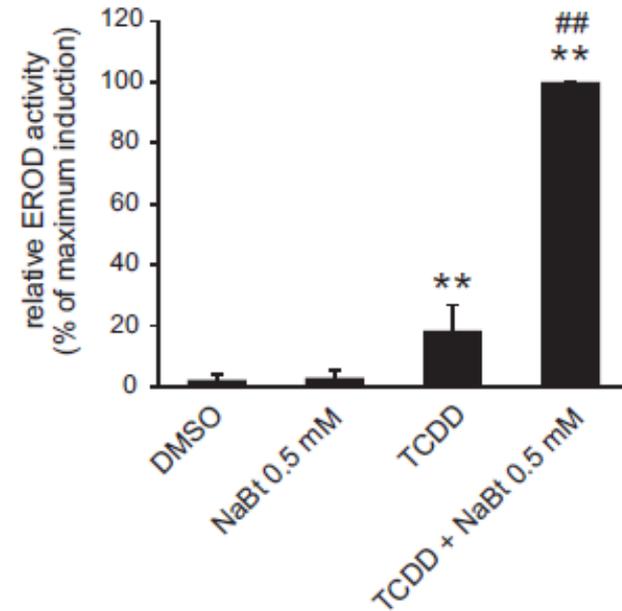
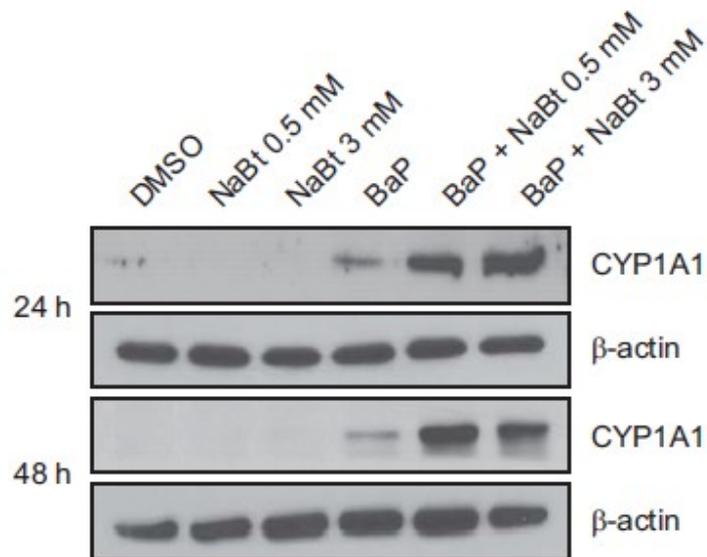
- mastná kyselina s krátkým řetězcem;
- produkován mikrobiální fermentací vlákniny;
- regulace proliferace, diferenciace a apoptózy;
- **inhibitor HDAC;**
- **metabolizován na acetyl-CoA a stimuluje aktivitu HAT;**
- ve vysokých dávkách může aktivovat **Wnt/ $\beta$ -catenin signalizaci** – také modulace této signální dráhy **ovlivňuje expresi CYP1A1;**



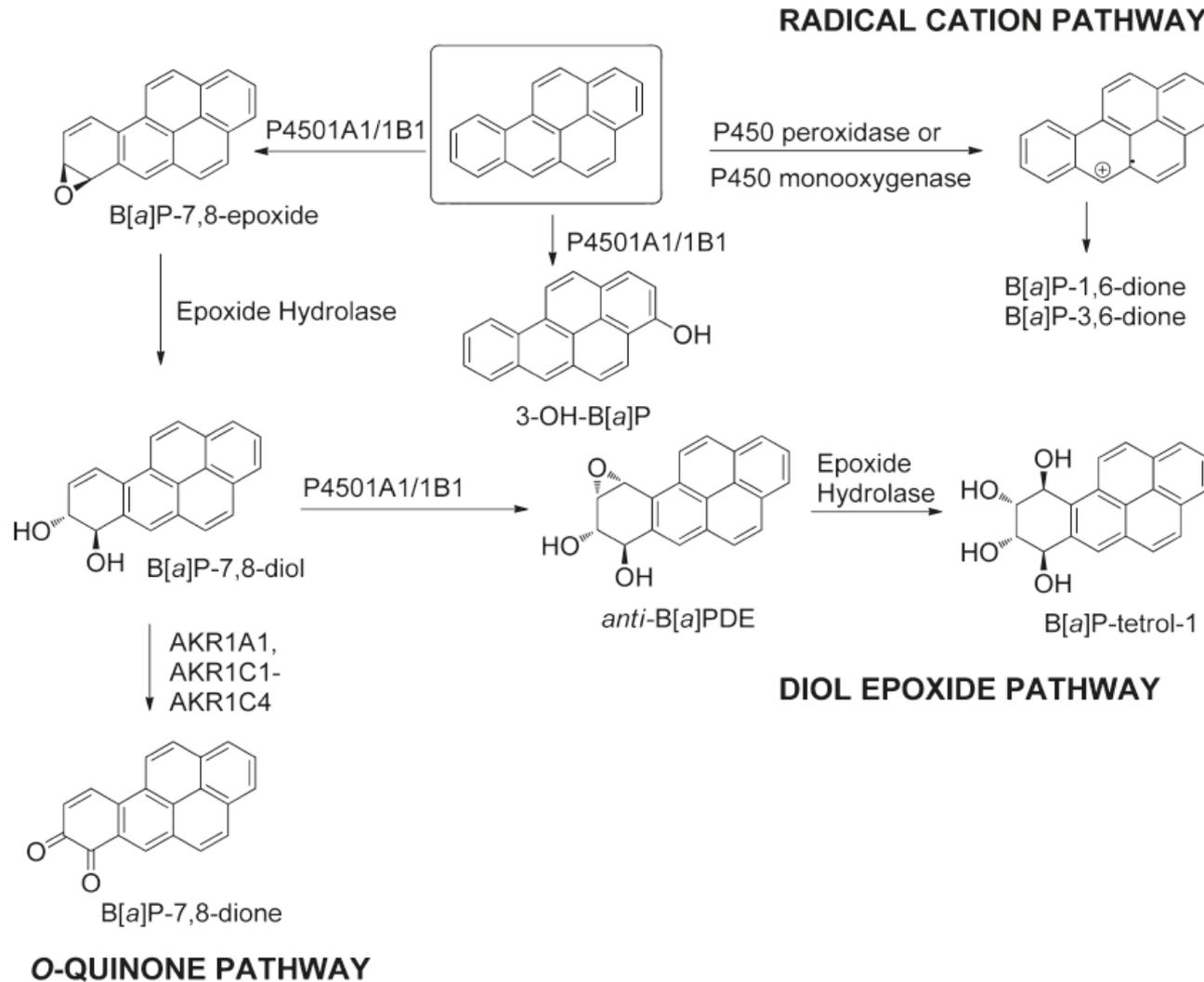
# NaBt posiljuje indukciju CYP1A1 i CYP1B1 mRNA



# NaBt je schopen posílit indukci CYP1A1 proteinu a aktivitu CYP1 enzymů

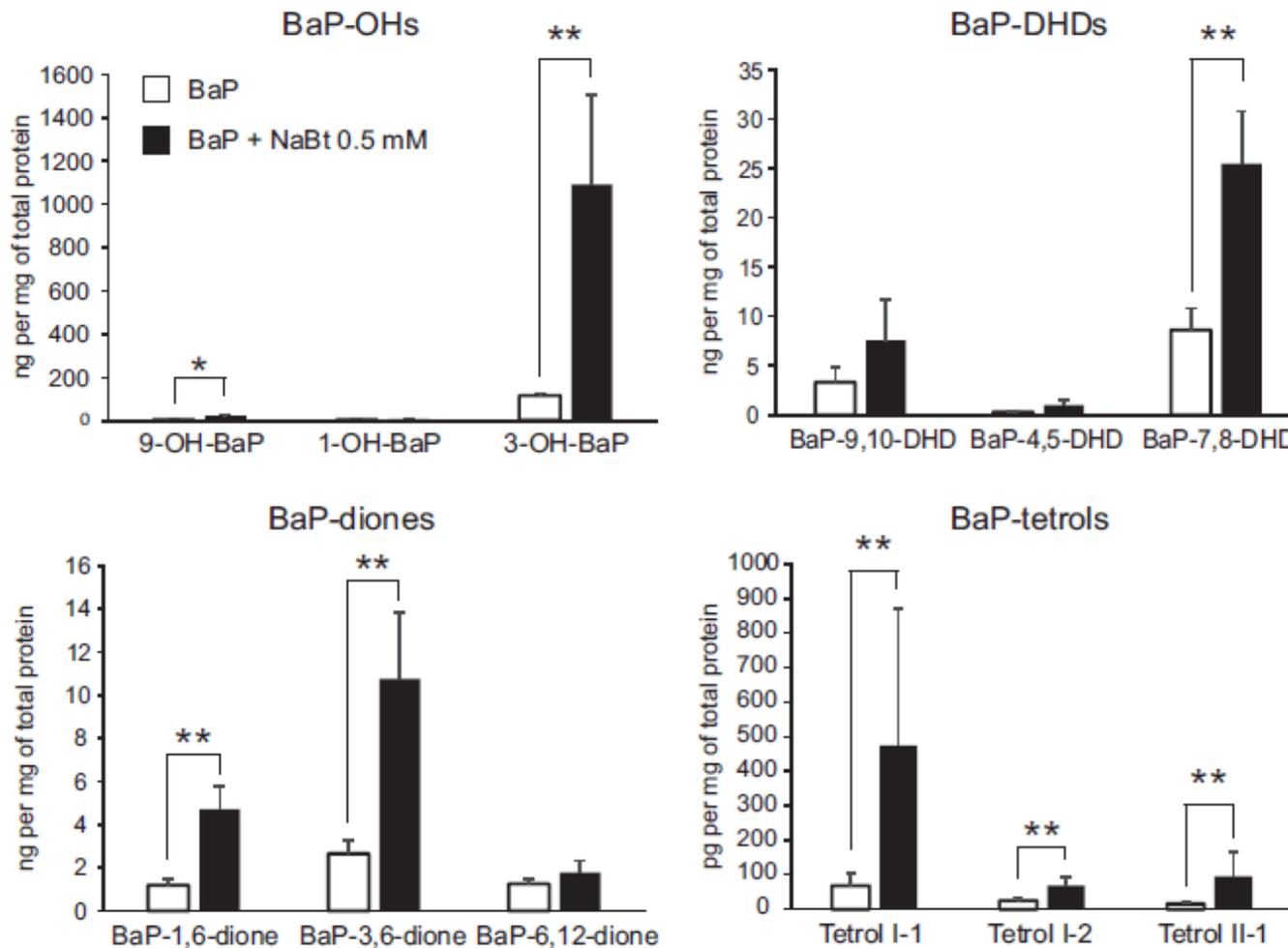


# METABOLISMUS BAP



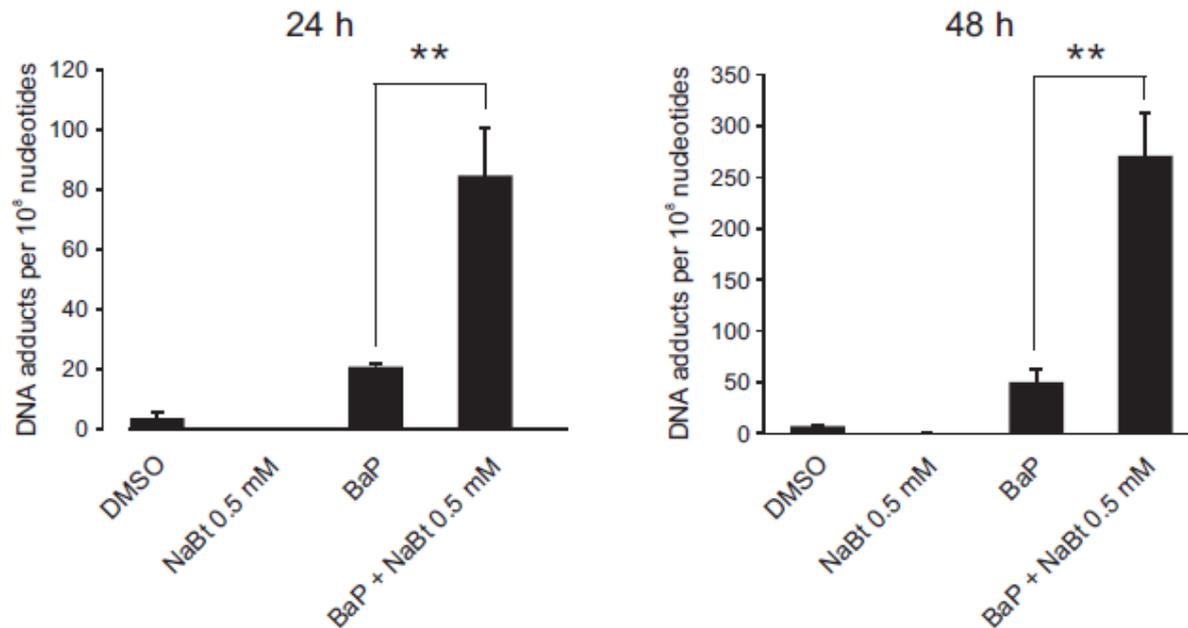
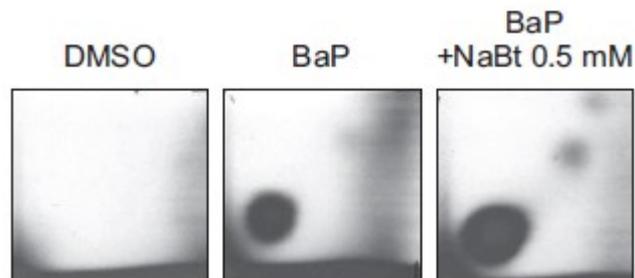
# Kombinace BaP s NaBt vede ke zvýšené tvorbě většiny metabolitů BaP

(spolupráce s VÚVeL – M. Machala, J. Neča)

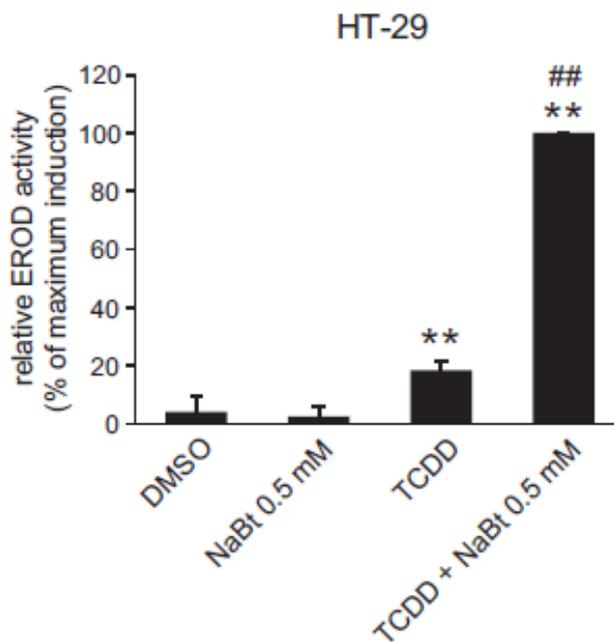
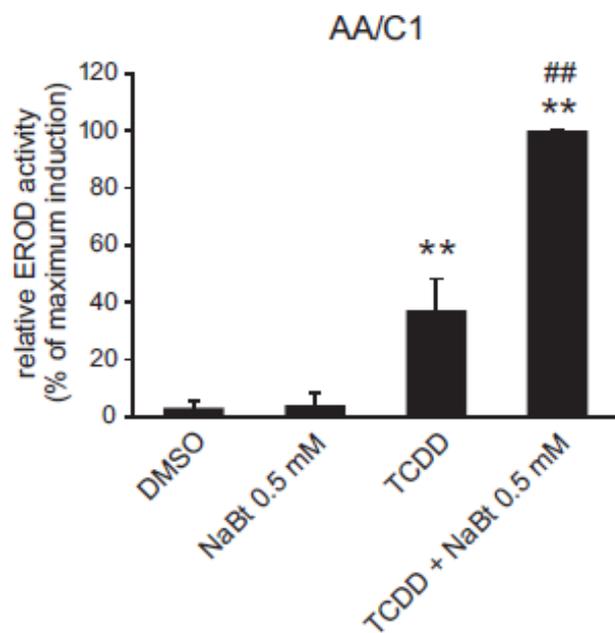


# NaBt je schopen výrazně potencovat tvorbu BPDE-DNA aduktů

(spolupráce s ÚEM AV ČR – J. Topinka)

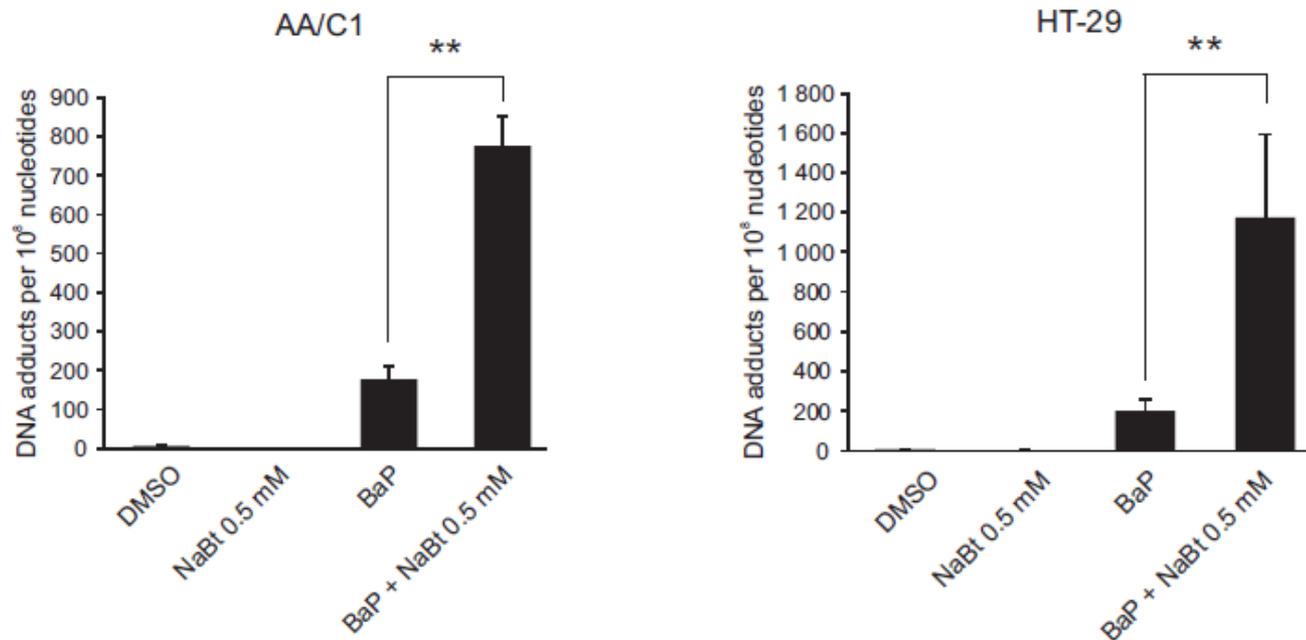


# NaBt zvyšuje ligandem indukovanou aktivitu CYP1 enzymů i u dalších buněčných modelů odvozených od epitelu tlustého střeva



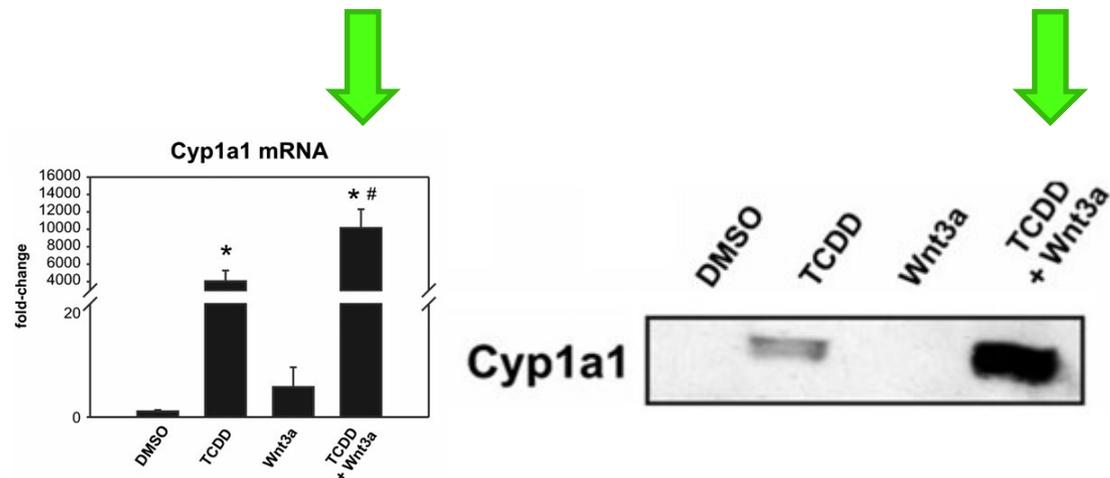
# NaBt je schopen výrazně potencovat tvorbu BPDE-DNA aduktů u buněk HT-29 a AA/C1

(spolupráce s ÚEM AV ČR – J. Topinka)

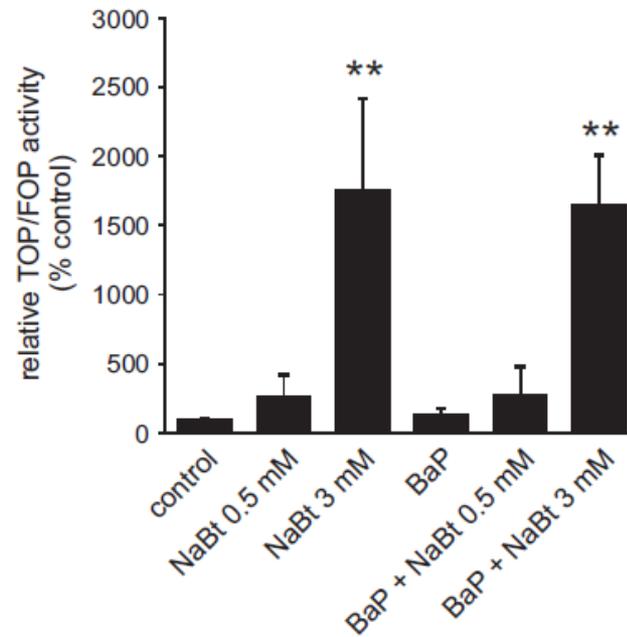
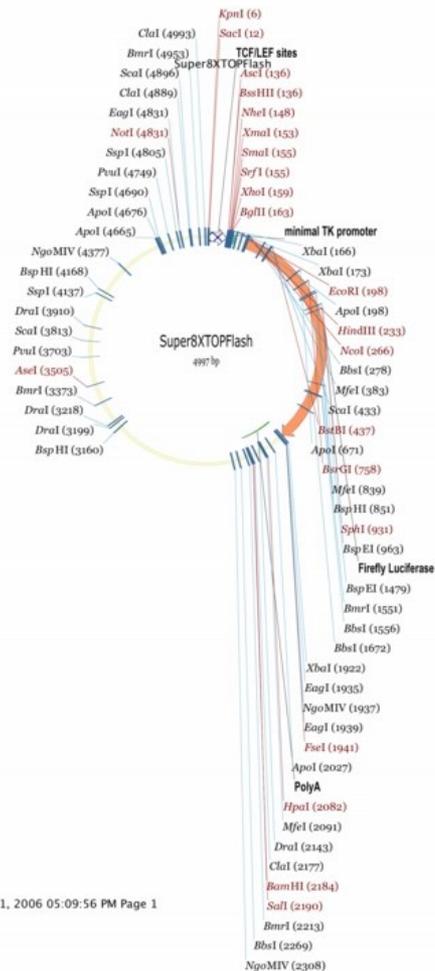


# Wnt/ $\beta$ -catenin signalizace a AhR

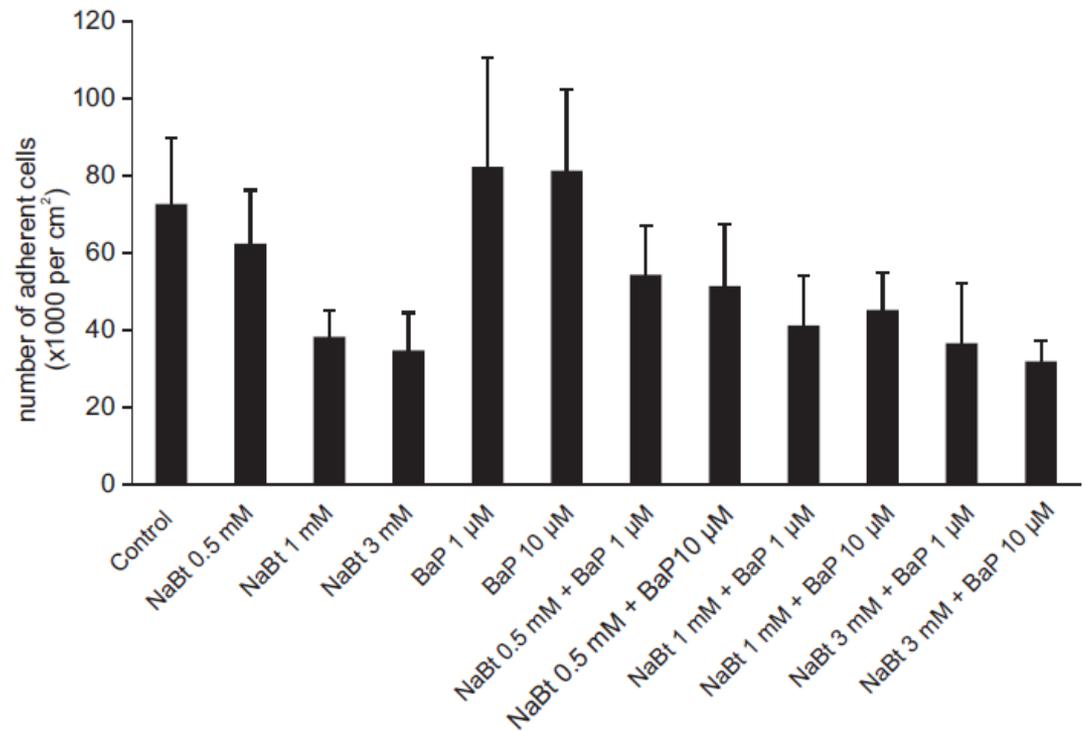
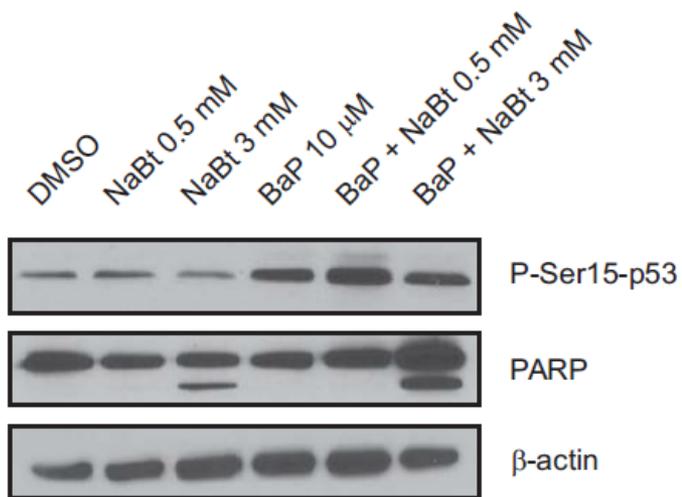
- Wnt/ $\beta$ -catenin může zvýšit expresi *AhR* - *AhR* je cílovým genem CTNNB1;
- Wnt3a posiluje expresi *CYP1A1* indukovanou modelovým AhR ligandem TCDD;
- naopak aktivovaná AhR signalizace může potlačit Wnt/ $\beta$ -catenin signalizaci;



# Vyšší koncentrace NaBt aktivuje Wnt/ $\beta$ -catenin signalizaci (TOP/FOP assay)



# Vyšší koncentrace NaBt zároveň indukuje buněčnou smrt u buněčného modelu nádoru kolonu HCT116

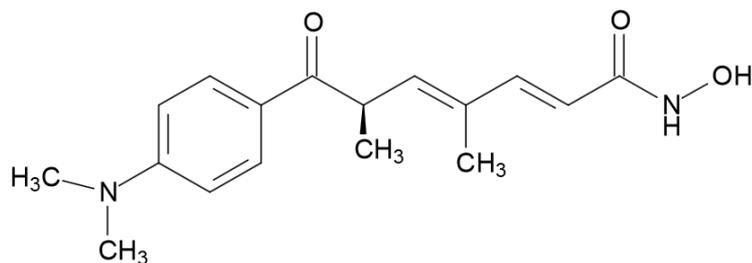


- **zvýšená indukce CYP1A1 nesouvisí s aktivací Wnt/ $\beta$ -kateninové dráhy;**
- **funguje NaBt primárně jako HDAC inhibitor?**



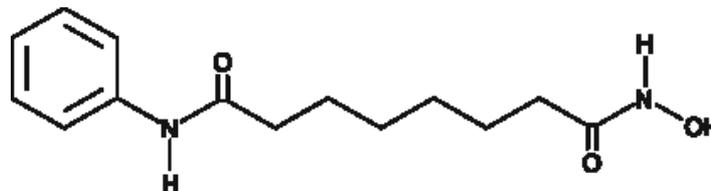
## Trichostatin A

- inhibitor HDAC tříd I a II
- bacteria *Streptomyces hygroscopicus*
- nádorové buňky – apoptóza
- normální buňky – nízká toxicita

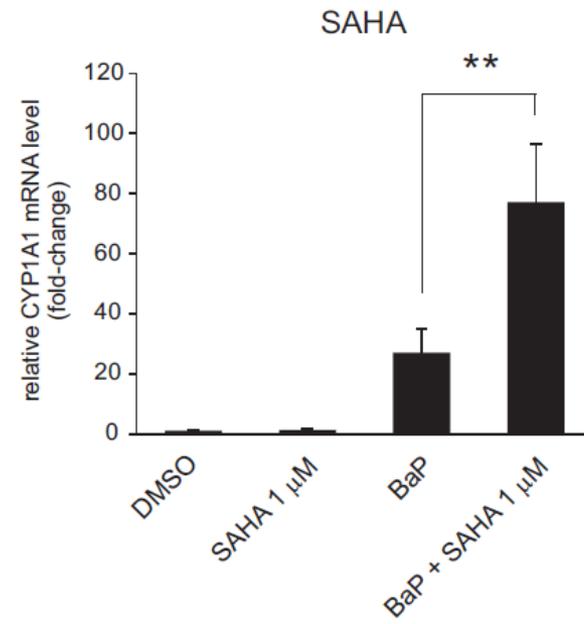
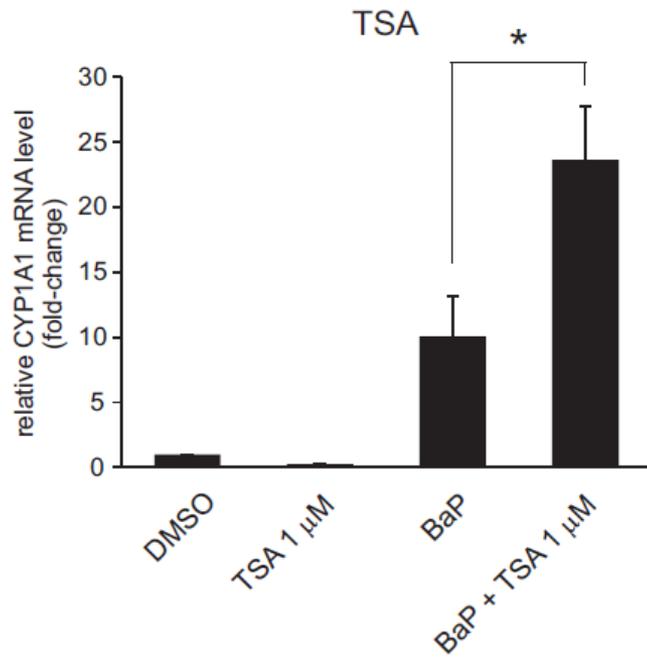


## Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid - SAHA)

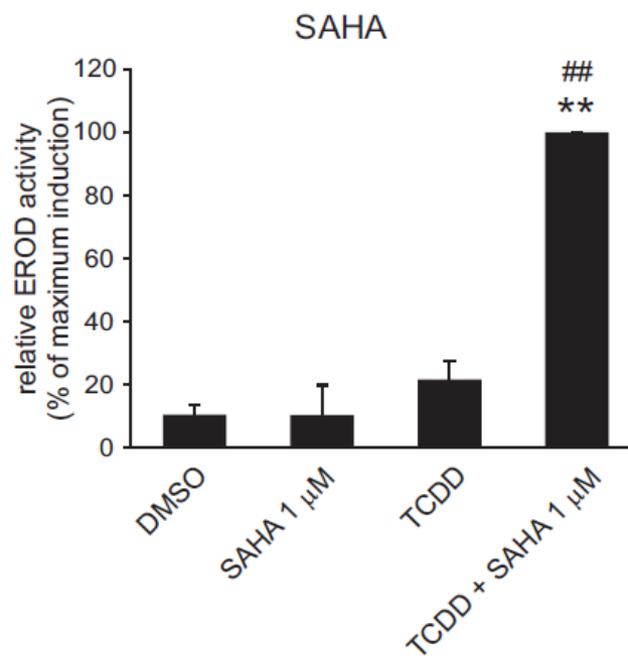
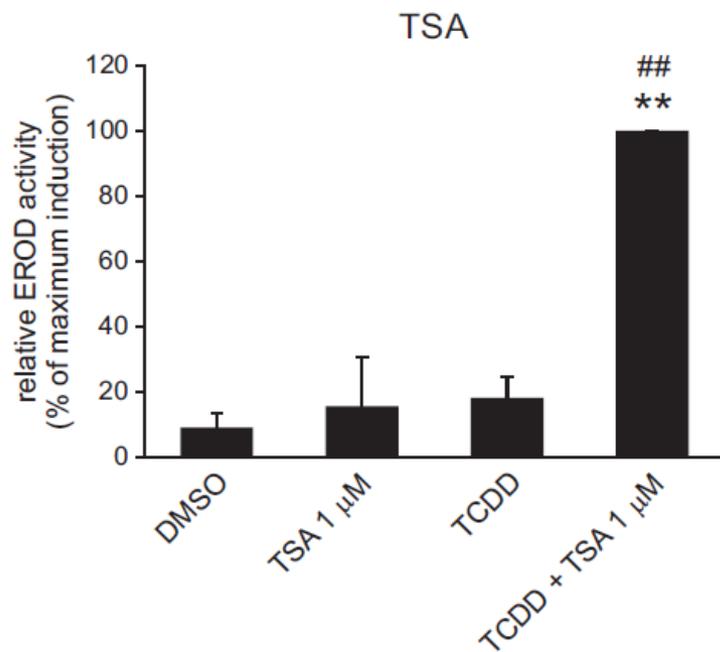
- inhibitor HDAC tříd I a II
- používán pro léčbu cutaneous T-cell lymphoma, v klinických testech pro další typy nádorů;



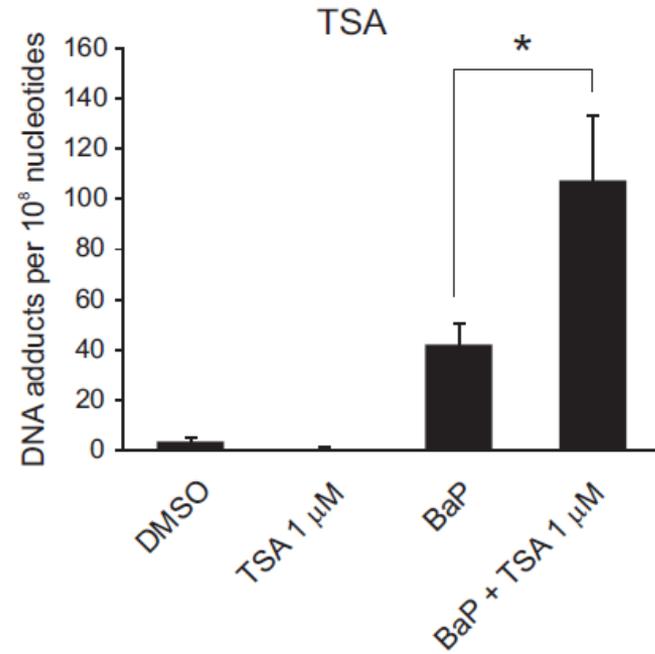
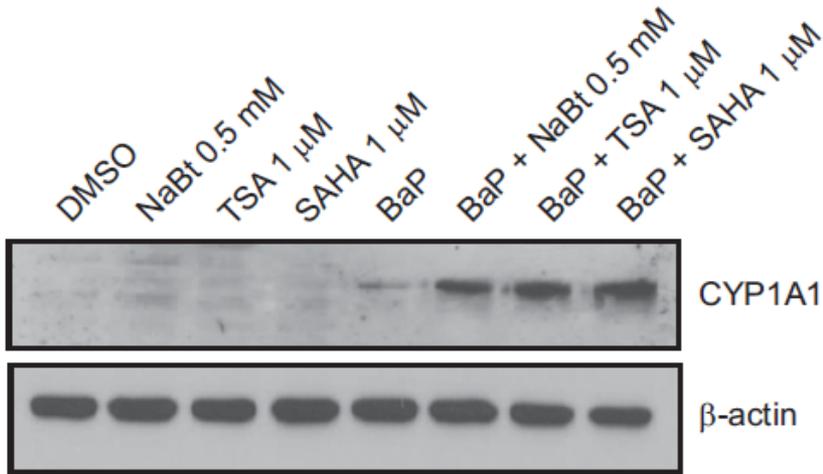
# Inhibitory HDAC podporují indukci CYP1A1 mRNA



# Inhibitory HDAC podporují indukci CYP1 aktivity



# Inhibitory HDAC podporují indukci CYP1A1 proteinu; TSA podporuje tvorbu DNA aduktů



# Vliv NaBt na asociaci HDAC1 s regulačními oblastmi CYP1A1?

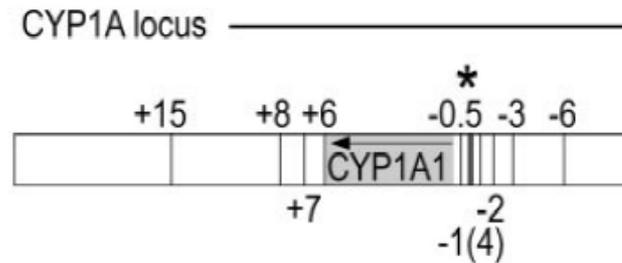
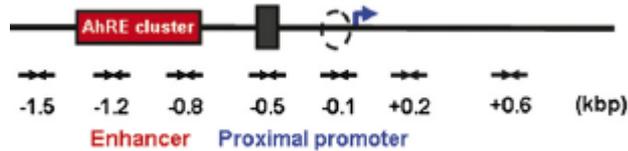
(spolupráce s VÚVeL – J. Kohoutek)

- detailní studie regulace myšního *Cyp1a1* (Schnekenburger et al., *BBA* 1769 (2007) 569–578) naznačuje, že **HDAC1 umožňuje histonovou acetylaci** spojenou s transkripční aktivací tohoto genu – může být inhibice či vyloučení HDAC1 molekulárním mechanismem zodpovědným za akce NaBt?? – detekce pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP);
- **HDAC1** (pozorované vyloučení jak z enhancerové tak z promotorové oblasti myšního *Cyp1a1* během aktivace transkripce)
- asociace **RNA pol II** s promotorem *CYP1A1*;

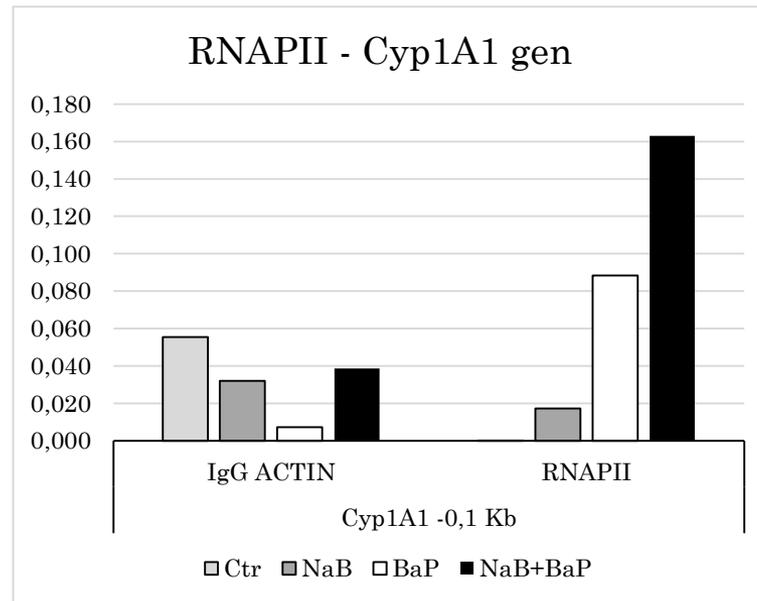
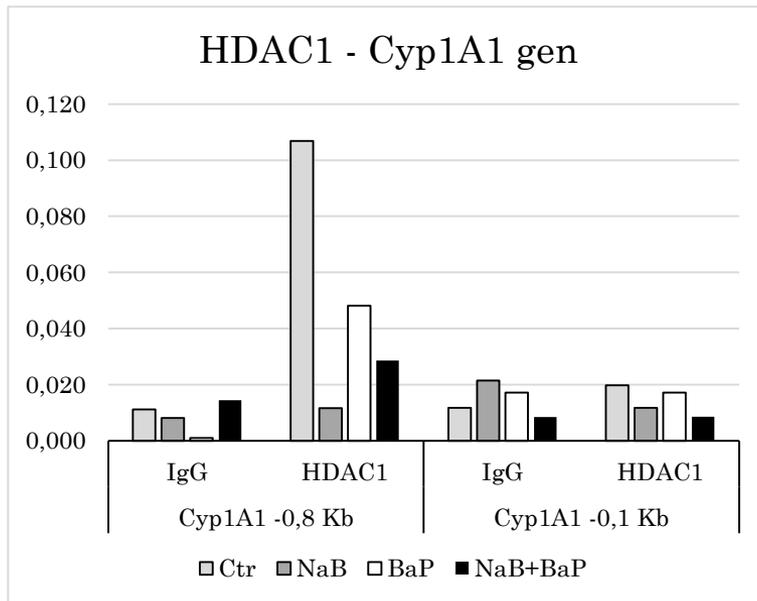


# NaBt vylučuje HDAC1 z promotoru *CYP1A1*

(spolupráce s VÚVeL – J. Kohoutek)



Předběžný experiment sledující enhancerovou (-0.8 kb) a promotorovou (-0.1 kb) oblast lidského *CYP1A1*



# Závěry

- ko-treatment buněk prostřednictvím NaBt a BaP posiluje indukci exprese a aktivity CYP1A1, produkci hlavních metabolitů BaP a tvorbu BPDE-DNA aduktů;
- podobné efekty byly potvrzeny na buněčných liniích AA/C1 a HT-29;
- účinky NaBt nesouvisejí s aktivací Wnt/ $\beta$ -katenin signalizace; transkripční aktivita TCF (závislá na  $\beta$ -kateninu) je indukována pouze vysokými dávkami NaBt (3 mM); ovšem ta také indukuje apoptózu;
- inhibitory HDAC (TSA a SAHA) podobně jako NaBt posilují indukci exprese/aktivitu enzymů rodiny CYP; kombinace BaP s TSA zvyšuje tvorbu stabilních BPDE-DNA aduktů;
- účinky NaBt jsou tedy spojeny s inhibicí aktivity HDAC, což vede ke zvýšené indukci CYP1A1 a bioaktivaci BaP;
- předběžné výsledky naznačují, že NaBt snižuje vazbu HDAC1 v enhancerové oblast lidského *CYP1A1* a posiluje vazbu RNA polymerázy II do promotorové oblasti tohoto genu;
- produkty mikrobiálního metabolismu mohou významně ovlivnit bioaktivaci a genotoxicitu dietárních karcinogenů v buňkách tlustého střeva;
- in vivo relevance??



# Poděkování

doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

Mgr. Markéta Kabátková, Ph.D.

Mgr. Zuzana Tylichová

prof. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.

a všem kolegům z OC

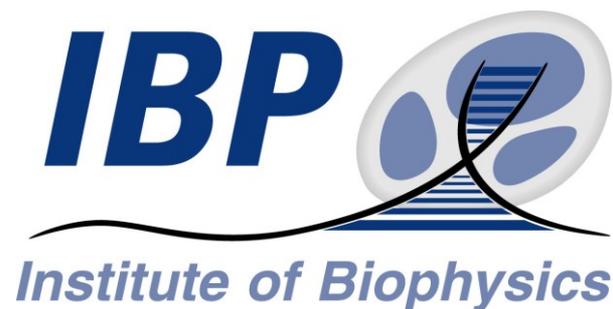
Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D.

RNDr. Jiří Neča

RNDr. Miroslav Machala, CSc.

Ing. Jan Topinka, DrSc.

Mgr. Alena Milcová





**DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST**