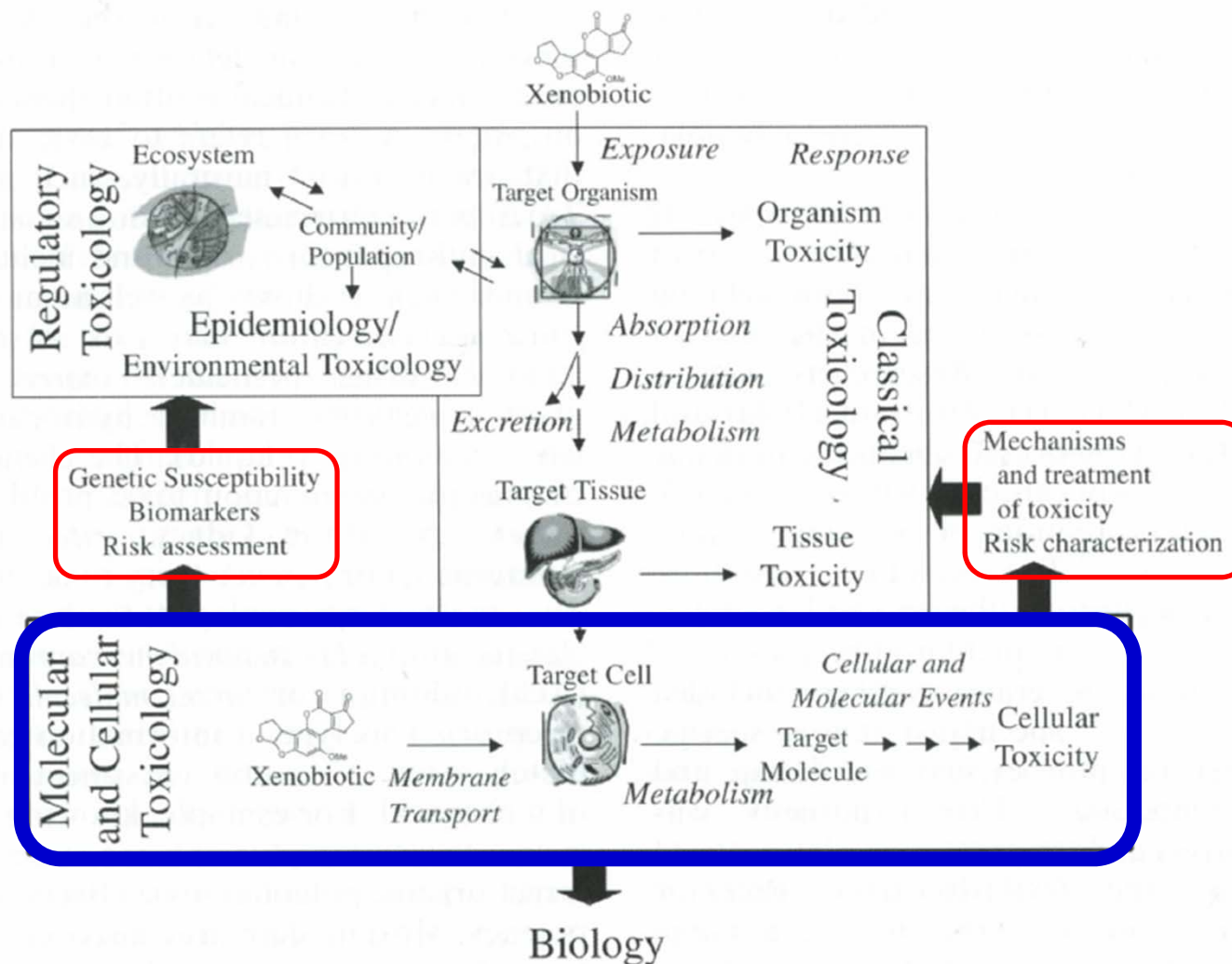


Molekulární toxikologie: Úvod

Molekulární toxikologie: Úvod

- v rámci toxikologických oborů se **molekulární toxikologie** soustředí především na objasnění **škodlivého působení xenobiotik na buněčné a molekulární úrovni**;
- příspěvek nejen k poznání mechanismů toxicity konkrétních chemických látek, ale i **objasnění obecných biologických a fyziologických regulačních mechanismů** na úrovni buněčné, tkáňové i celého organismu; může tak přispět k poznání vzniku a rozvoje nejrůznějších **civilizačních onemocnění**, jako jsou např. nádorová onemocnění, vývojové poruchy, narušení endokrinní regulace apod.;
- **poznání molekulárních mechanismů toxicity** může významným způsobem přispět k **omezení testování na laboratorních zvířatech** – etický rozměr;

Molekulární toxikologie: Úvod



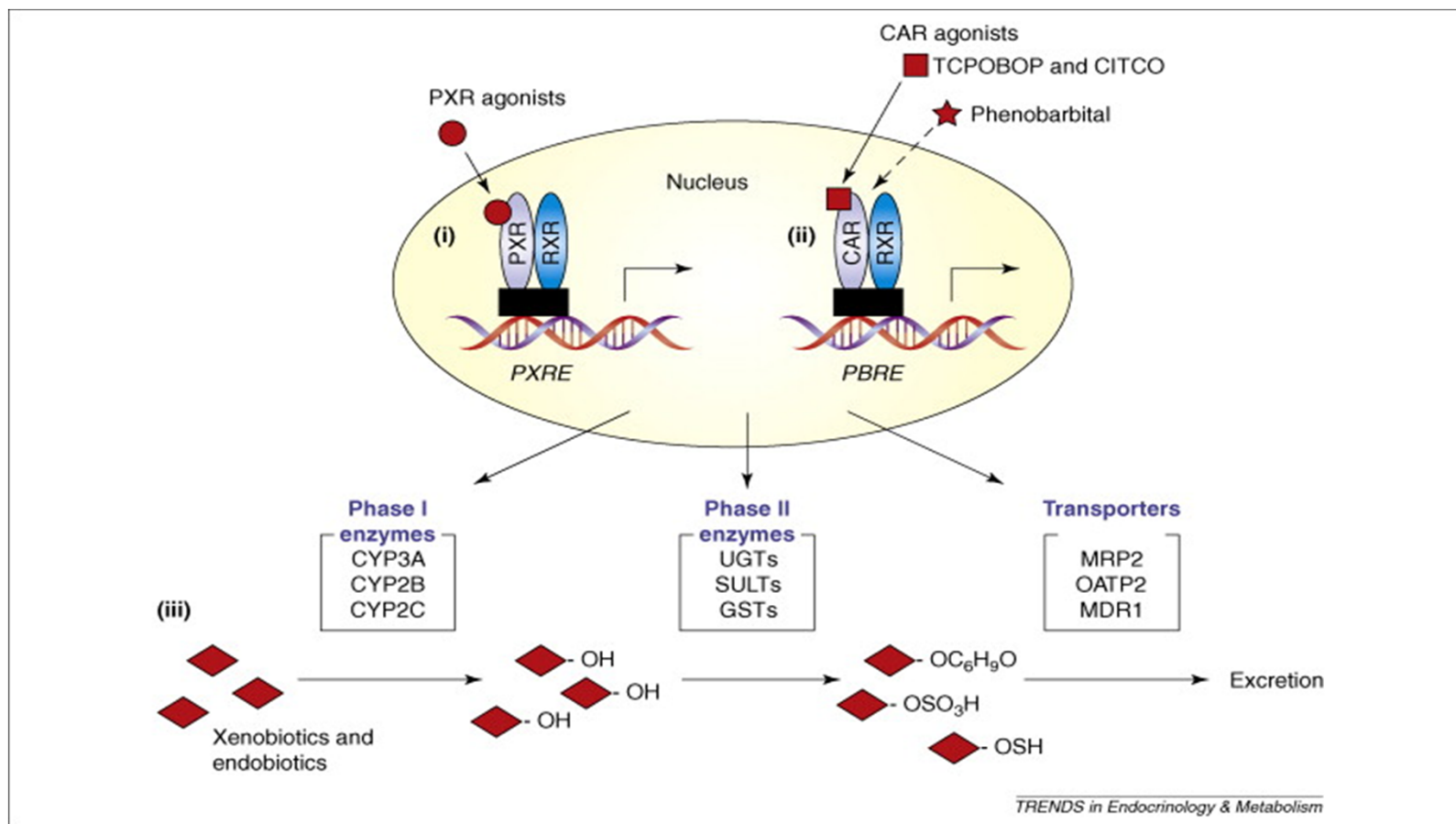
Molekulární toxikologie: Úvod

- interakce se specifickými vnitrobuněčnými receptory; regulace genové exprese;
- transport, metabolismus a exkrece xenobiotik;
- interakce toxických látek s makromolekulami;
- generace oxidativního stresu;
- deregulace vnitrobuněčné signalizace;
- jaký mají tyto procesy dopad na buněčné funkce a procesy zahrnující mezibuněčnou komunikaci, apoptózu, diferenciaci a proliferaci;
- moderní metodické přístupy;

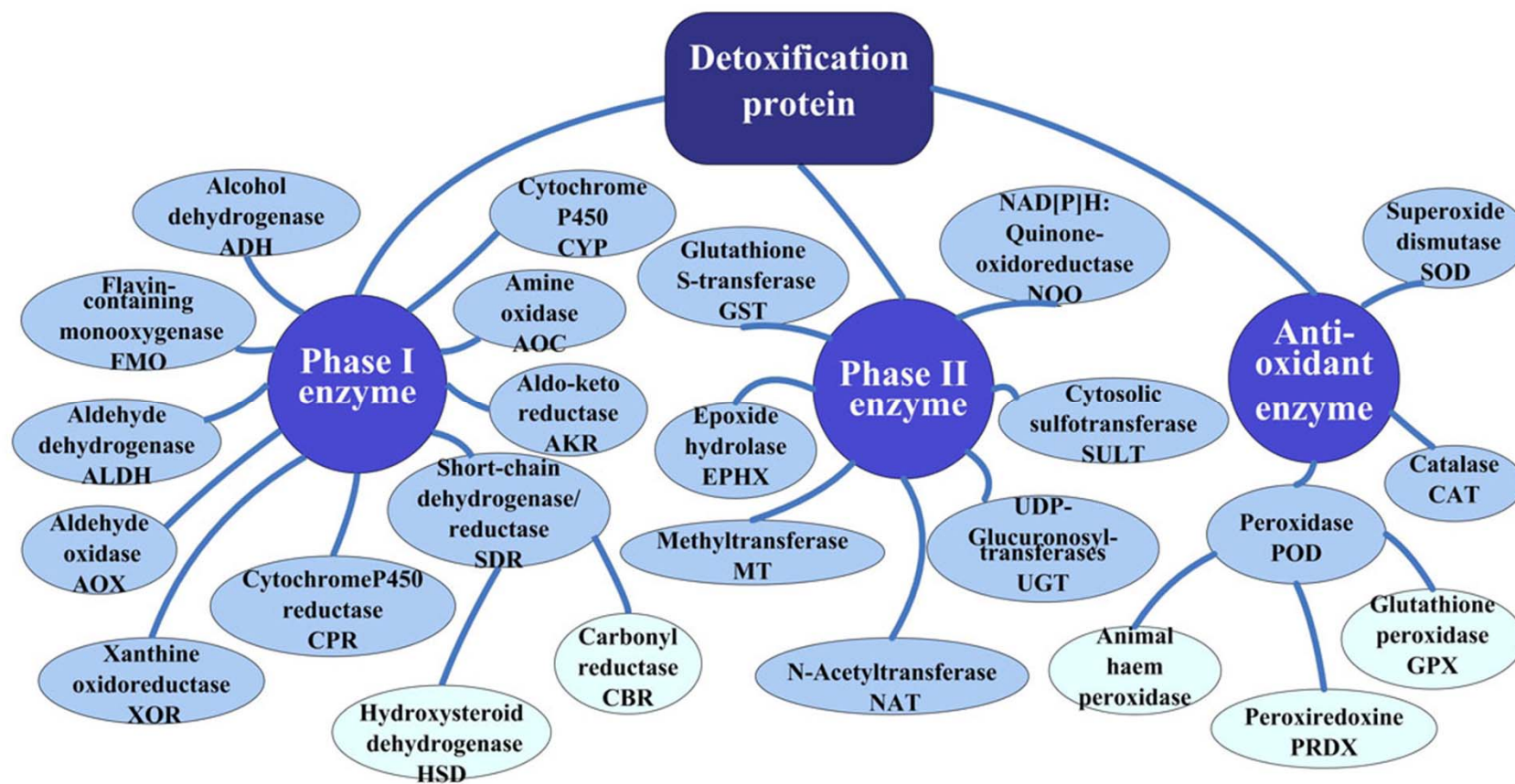
Molekulární toxikologie: Úvod

- teorie „receptoru“ – koncepce vyvíjející se od konce 19. století (C. Bernard, P. Ehrlich, J. Langley, A.J. Clark)
- řada xenobiotik využívá specifických buněčných receptorů;
- **receptor** rozpoznává specifickou látku (**ligand**) a předává tuto informaci v buňce dále; pokud se jedná o receptor, pak sám o sobě nepozmění ligand chemicky a musí prodělat změnu na biochemické úrovni, která následně vede např. ke změně transkripce genu, ovlivní permeabilitu membrány, aktivaci/inaktivaci proteinu apod.

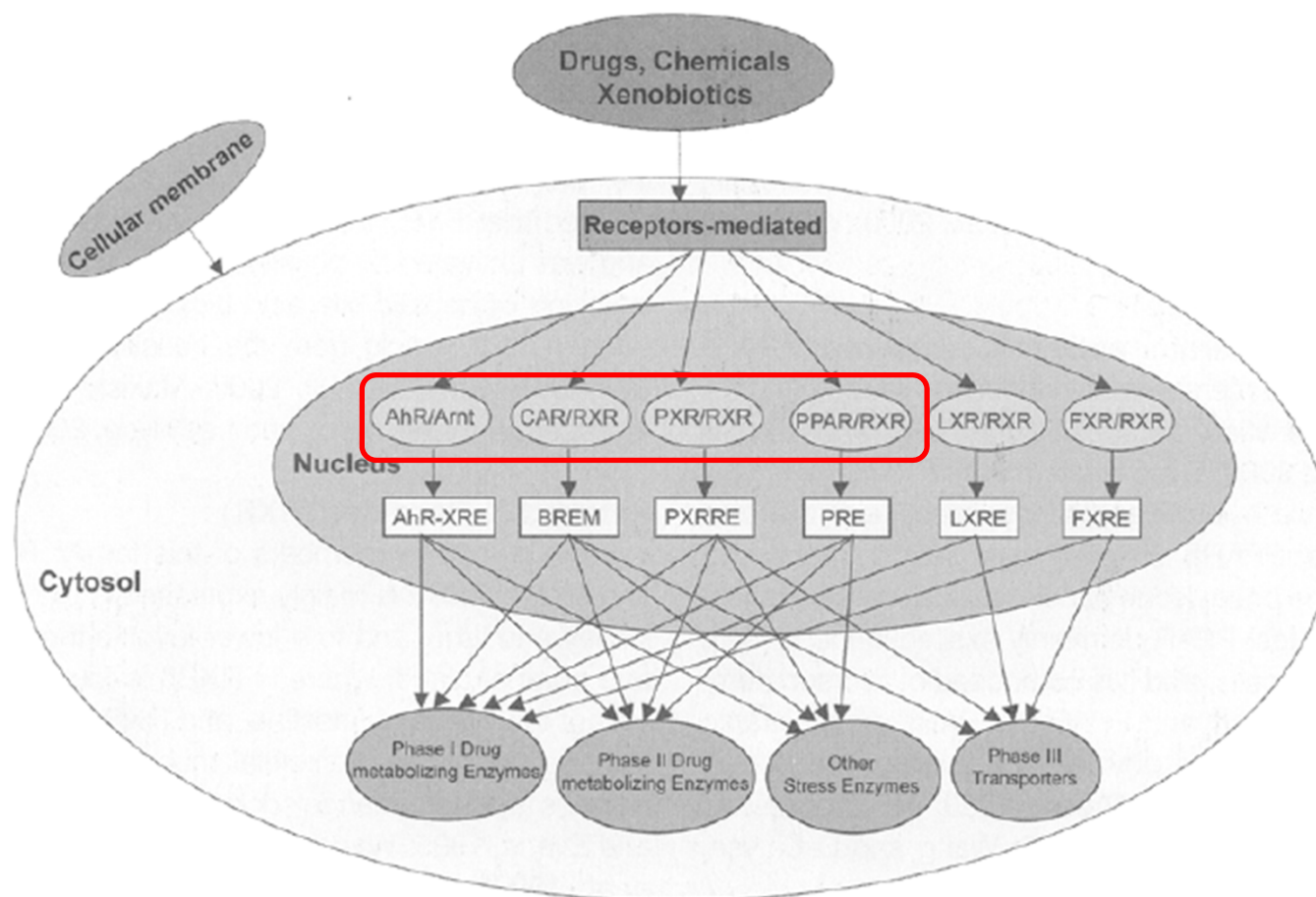
Molekulární toxikologie: Úvod



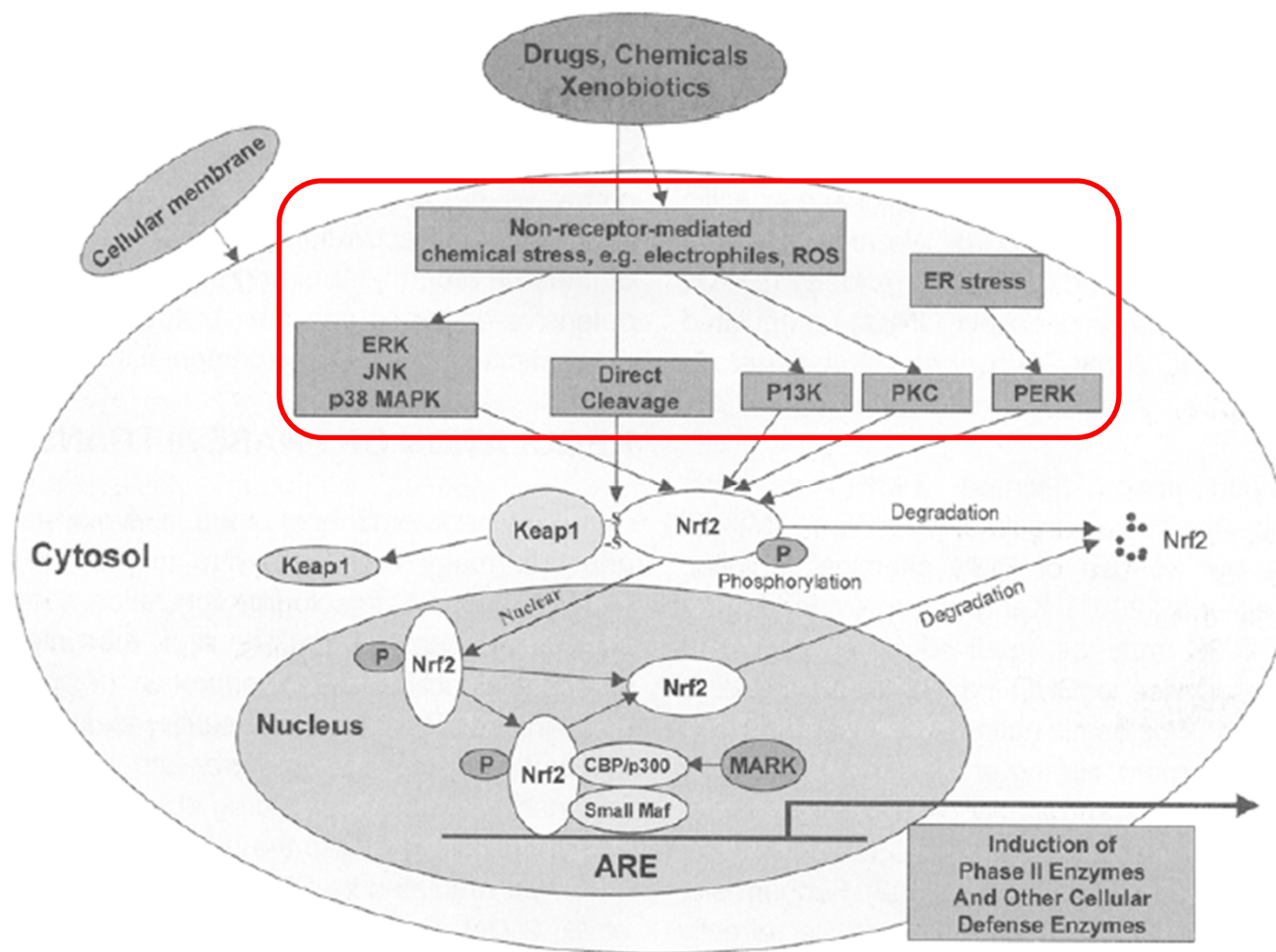
Molekulární toxikologie: Úvod



Molekulární toxikologie: Úvod



Molekulární toxikologie: Úvod



Molekulární toxikologie:
**Ah receptor (AhR; receptor pro
aromatické uhlovodíky)**

Molekulární toxikologie: AhR

Per-Arnt-Sim –nadrodina proteinů PAS

environmentální senzory, které zprostředkovávají transkripční odpověď na různé typy stimulů:

- ✓ cirkadiánní rytmy – vnímání světelných podnětů;
- ✓ vnímání hladiny kyslíku;
- ✓ sensing of toxicants;

- ✓ vývojové regulace – deregulovány v nádorových onemocněních;

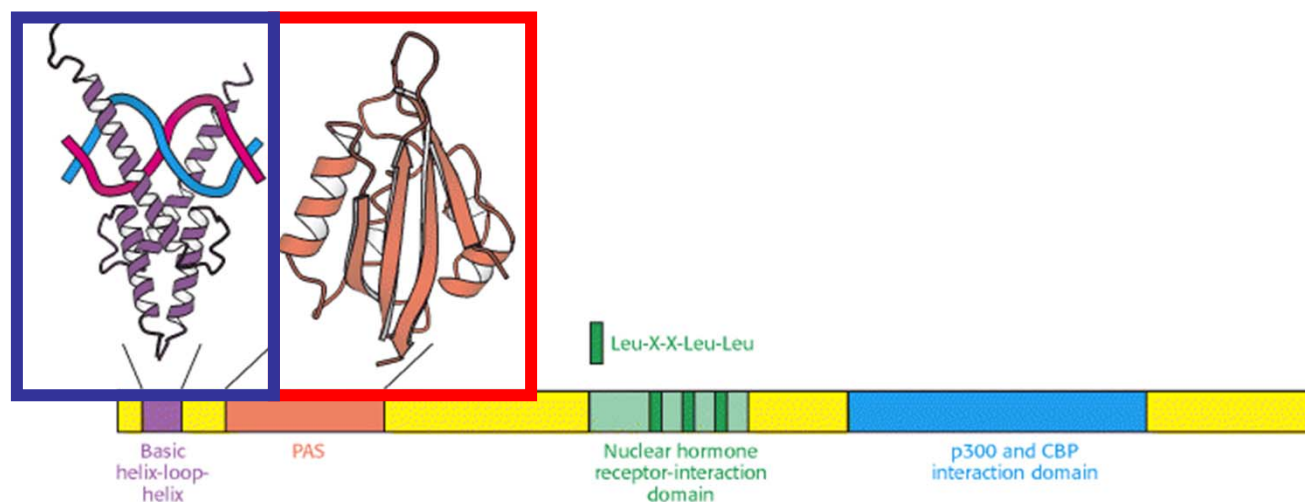
Tyto proteiny umožňují adaptaci na rychlé změny v prostředí.

Molekulární toxikologie: AhR

PAS proteiny jsou součástí širší rodiny basic-helix-loop-helix (bHLH) proteinů:

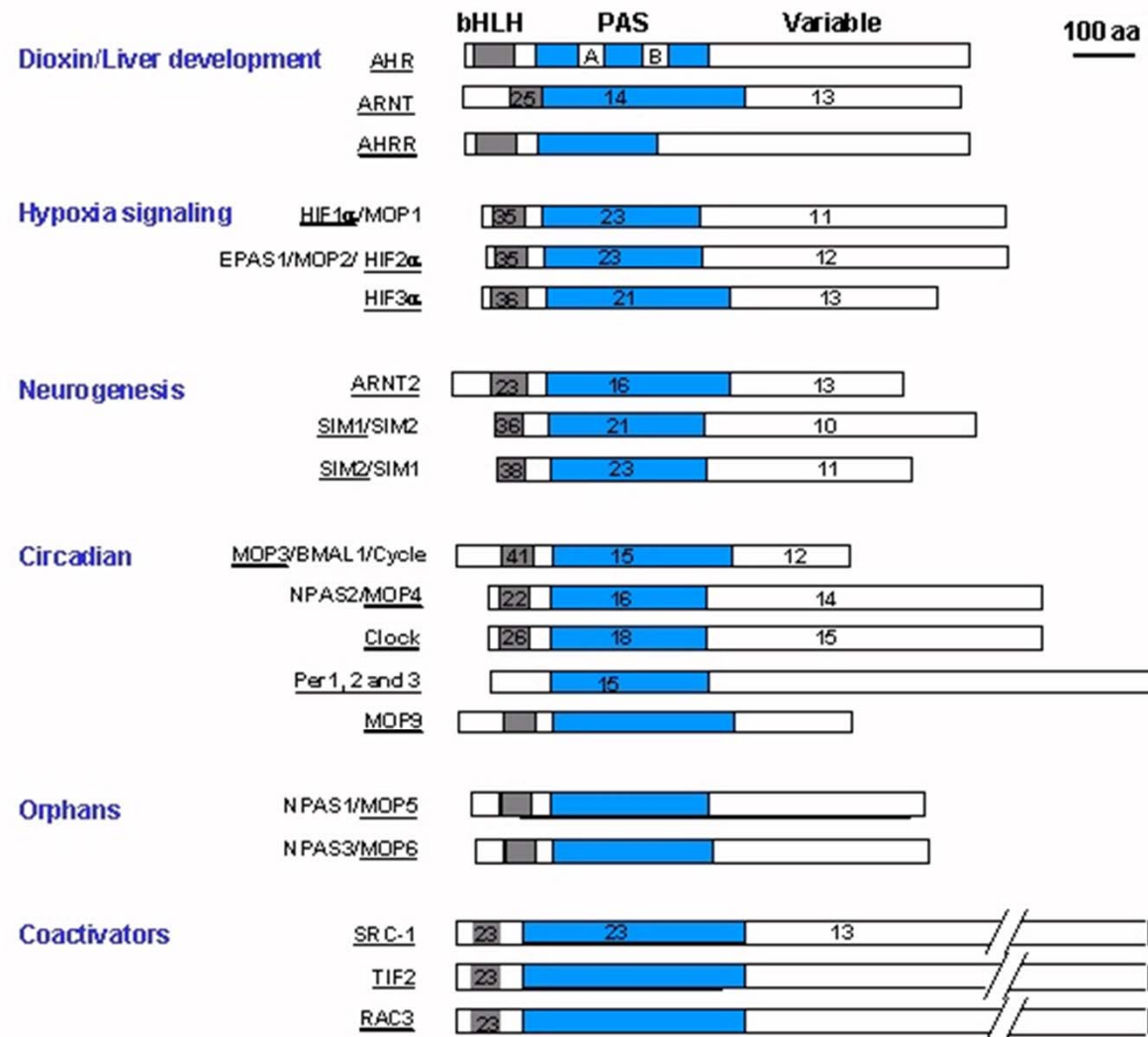
Existují 3 hlavní podskupiny bHLH proteinů:

- (a) pouze s bHLH doménou; nebo ty, kde bHLH doména navazuje na druhou dimerizační doménu:
- (b) doménu leucinových zipů (Zip) nebo
- (c) **PAS doménu**.



PAS proteiny (rodina transkripčních faktorů):

Mammalian PAS Superfamily



Molekulární toxikologie: AhR

PAS doména

PAS oblast obsahuje 2 sousedící opakování ~130 aminokyselin, PAS A and PAS B.

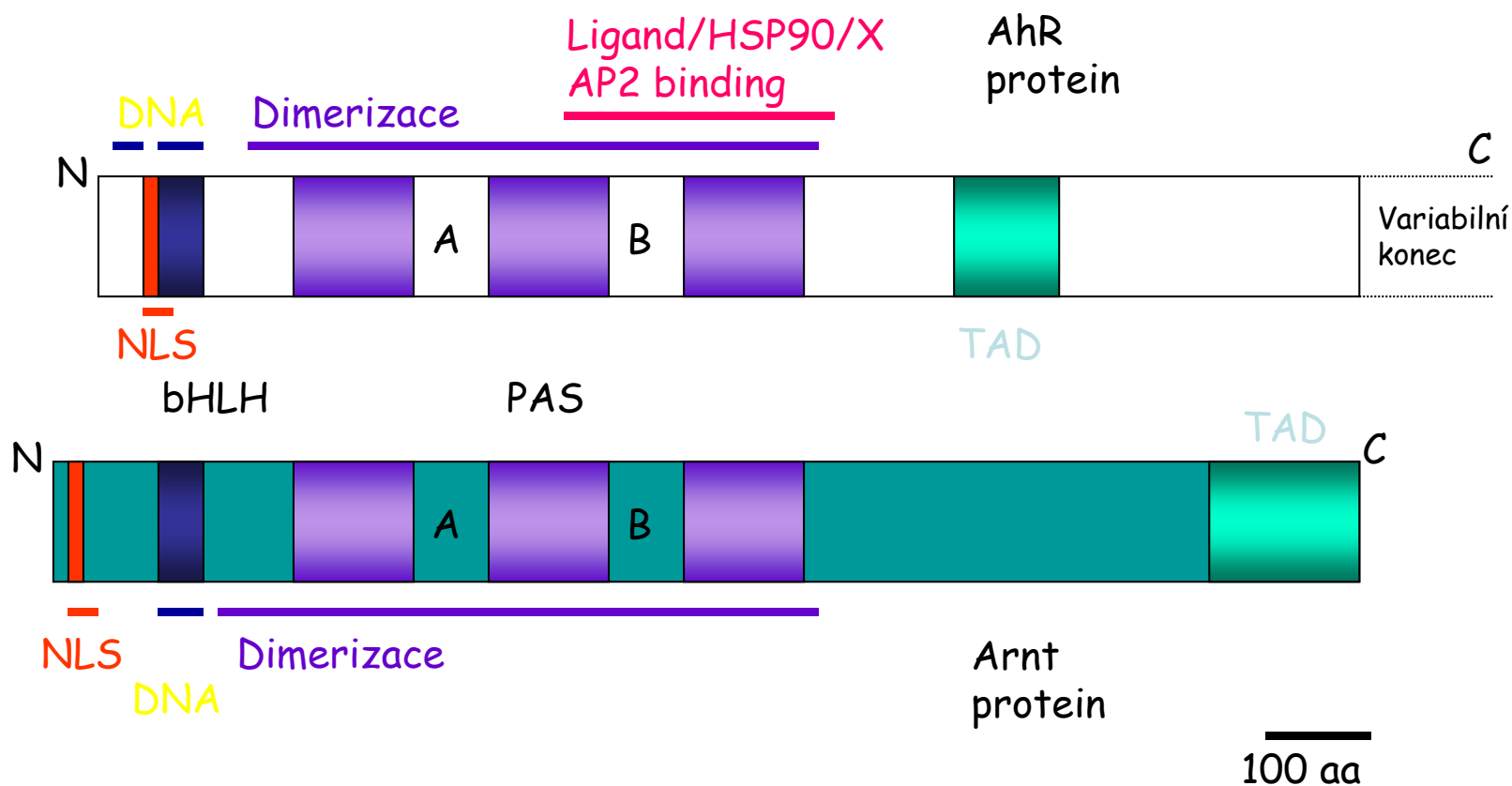
Tato doména je velmi starý signální prostředek, který zůstává zachován v průběhu evoluce. Byla identifikována v proteinech živočichů, bakterií, hub, kvasinek a rostlin:

řada bakterií obsahuje PAS-like proteiny, které detekují světlo a kyslík (Dos, Aer, FixL, PYP);

podobné proteiny vnímají světlo u rostlin (fytochromy PhyA-PhyE, NPH1; faktor interagující s fytochromem - PIF3).

Molekulární toxikologie: AhR

Struktura a funkce domén AhR a ARNT:



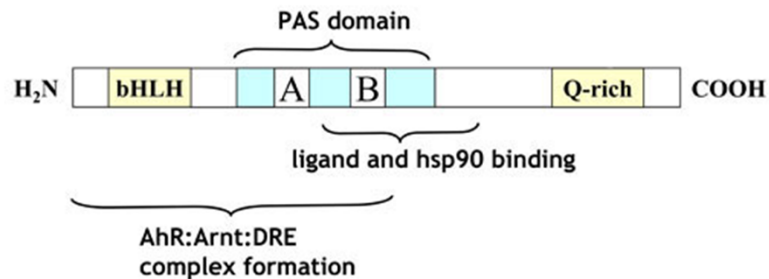
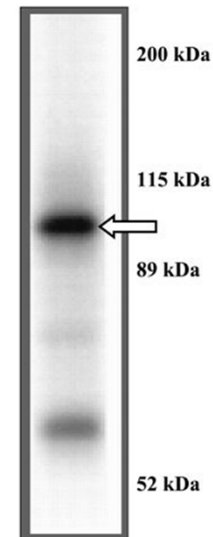
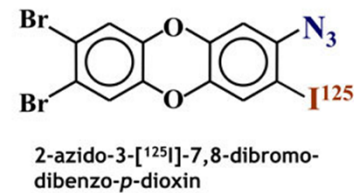
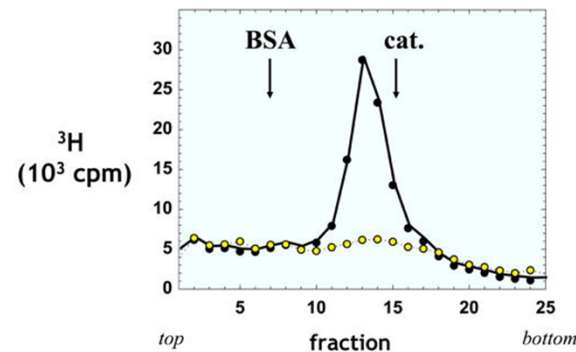
Molekulární toxikologie: AhR

AhR =

- transkripční faktor aktivovaný ligandy;
- zprostředkovává toxicitu řady environmentálních polutantů;
- reguluje metabolizaci xenobiotik a podílí se na bioaktivaci promutagenů.

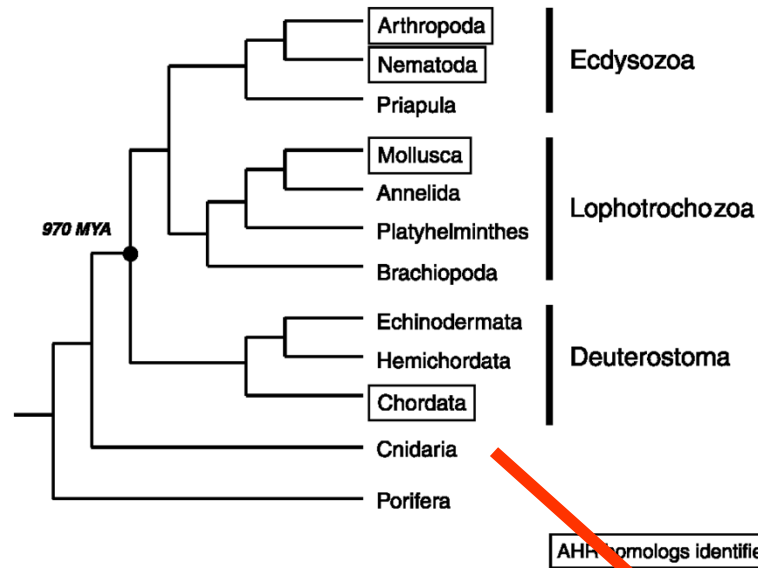
Jak byl objeven AhR?

- různá citlivost inbredních myších kmenů na indukci aktivity enzymů (CYP1A) v jaterních mikrozómech po expozici TCDD a 3-methylcholanthrenu – 60. léta;
- autozomálně dominantní typ dědičnosti;
- izolace unikátního proteinu; klonování genu – 90. léta



Josephy and Mannervik,
Molecular Toxicology,
2nd ed.

Evolve a AhR:

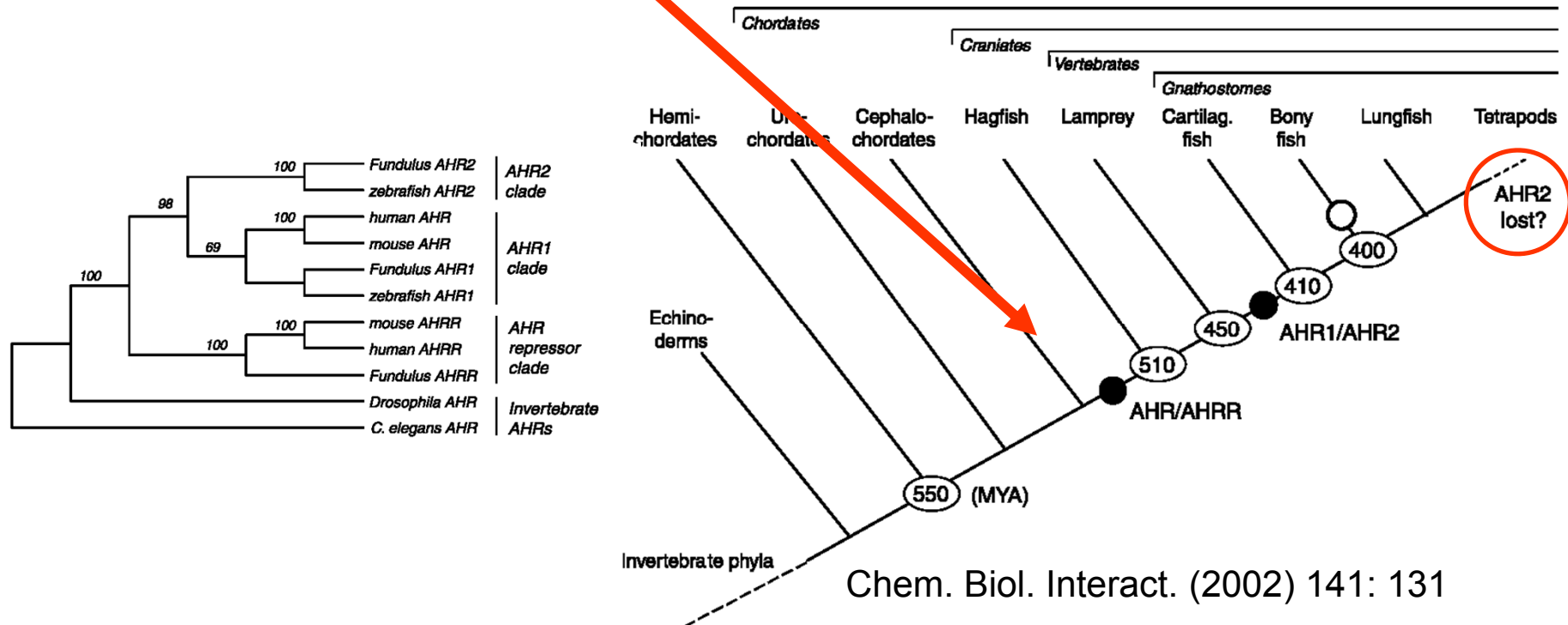


AHR1

AHR2

AHRR

ARNT

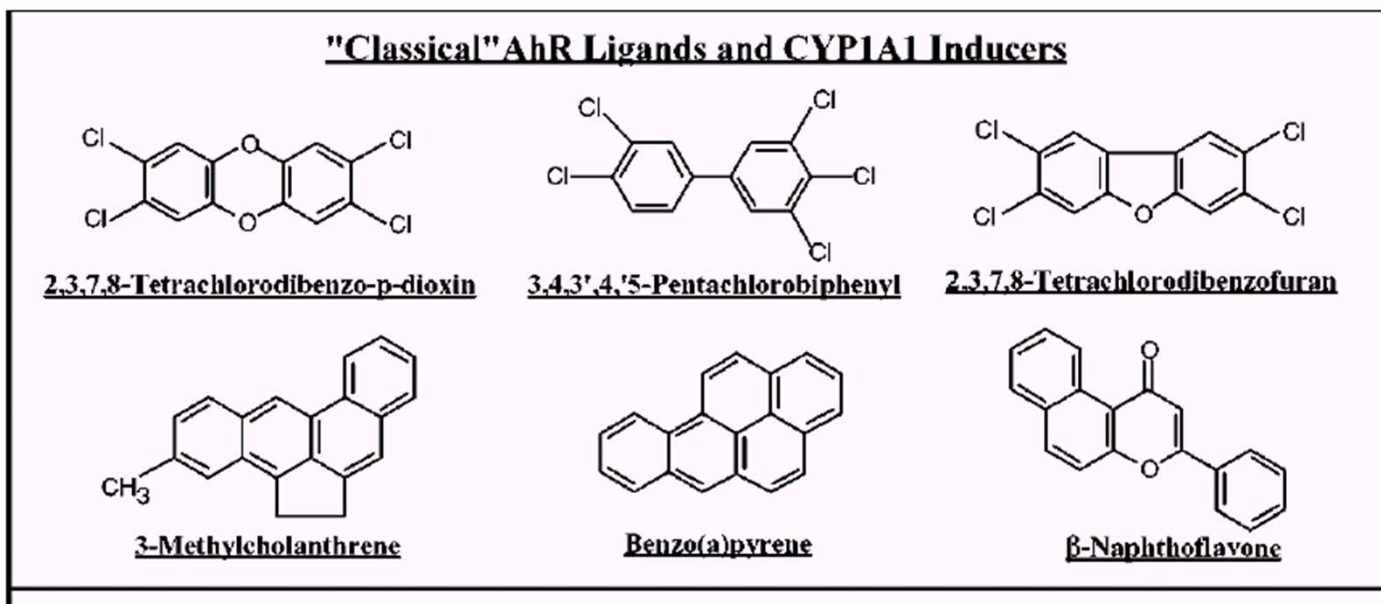


Evolve a AhR:

Organism:	Name:	Ligand-binding:	Physiological function:
Nematodes: <i>Caenorhabditis elegans</i>	AHR-1	No	Neuronal development; Behavioral effects.
Insects: <i>Drosophila melanogaster</i>	Spineless (Ss)	No	Development; Regulation of homeobox genes and dendrite morphology.
Vertebrates:	AhR (AhR1, AhR2)	Yes	Toxicity mechanisms; Liver and kidney development; Neuronal differentiation? Circadian rhythms?

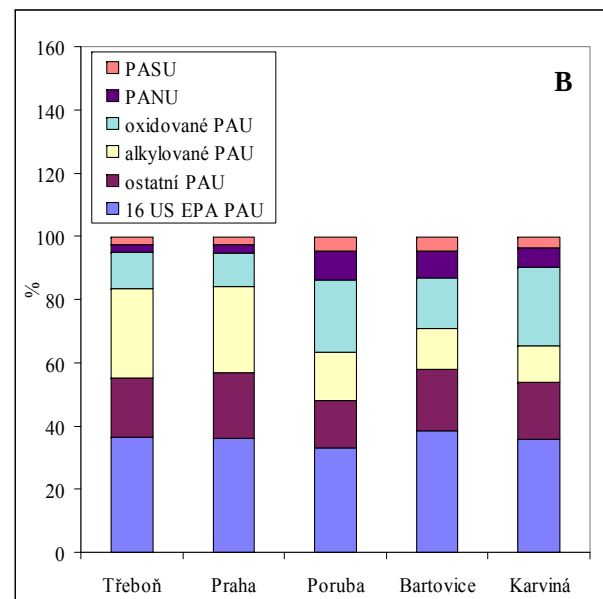
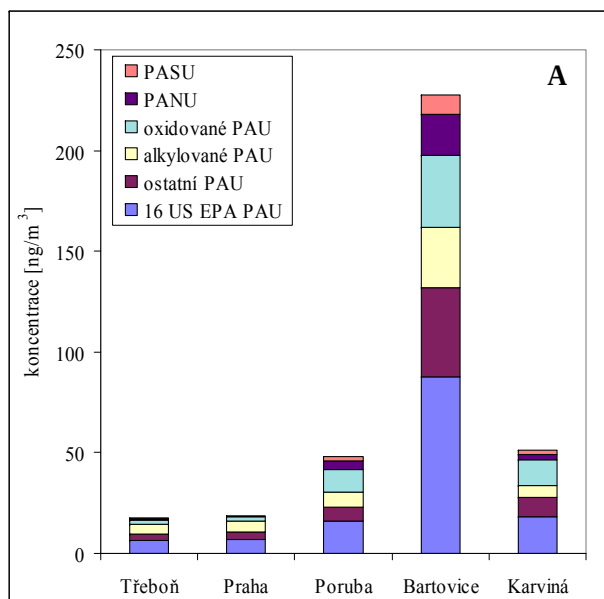
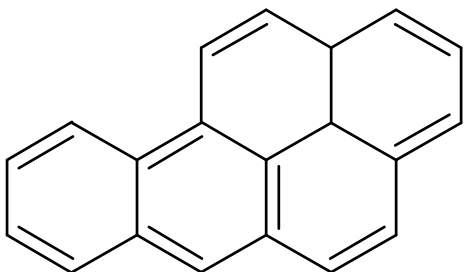
Toxické AhR ligandy:

- polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny, dibenzofurany a bifenyly;
- polycyklické aromatické uhlovodíky;

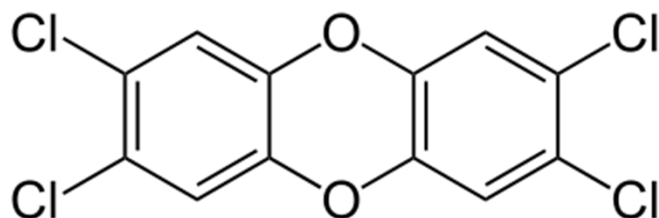


Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)

- vážný regionální problém v ČR –
- doprava; průmyslová výroba;



2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin



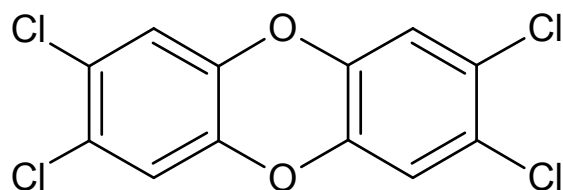
- jedna z nejtoxičtějších látek vznikajících činností člověka;
- modelový zástupce této skupiny, definující jejich toxicitu;

Dioxiny a kontaminace potravin:

Langlebiges Gift

Ein **Dioxin-Skandal** erschüttert Deutschland:

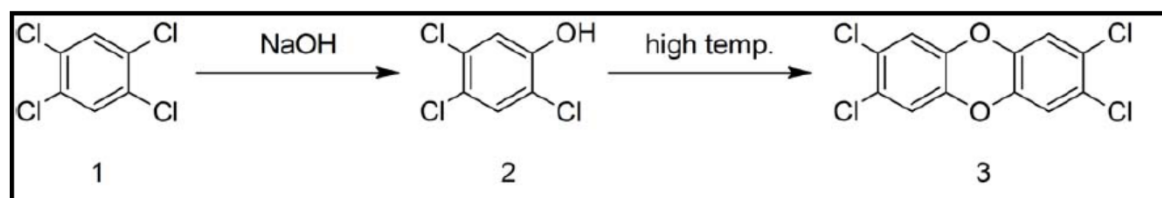
Hühner, Puten und Schweine haben auf deutschen Bauernhöfen vergiftetes Futter gefressen. Ein Futtermittelhersteller hatte technische Fette aus der Diesel-Produktion für Tiernahrung genutzt. Über Eier oder Fleisch nehmen Menschen die Dioxine auf, wo sie sich in Leber und Gewebe einlagern.



Dioxiny a kontaminace potravin:

Seveso - 1976

V červenci 1976 došlo k malé chemické továrně zhruba 15 km severně od Milána k explozi a zamoření okolí 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinem (TCDD)



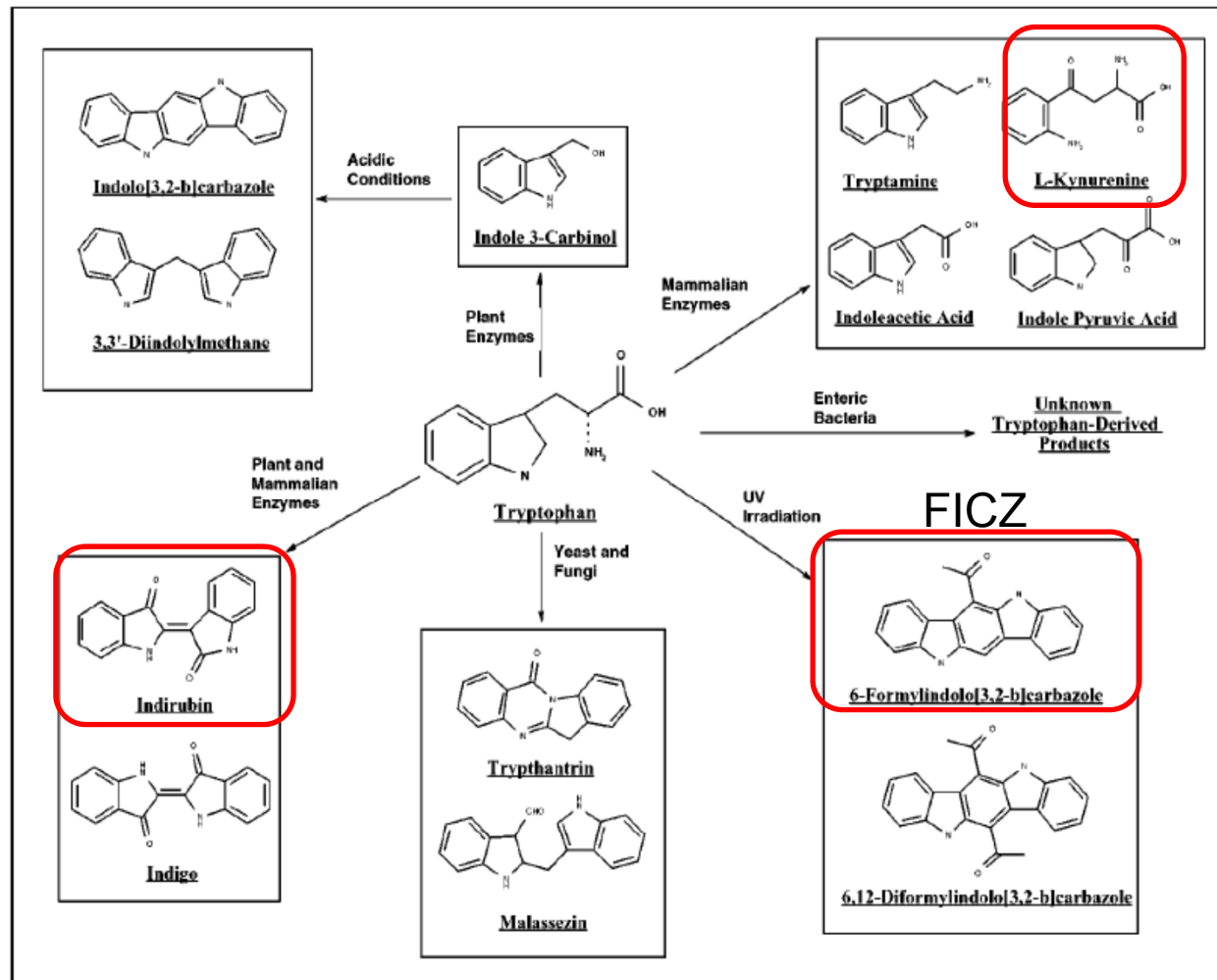
Výroba a používání herbicidů

Vietnam – Agent Orange
Spolana Neratovice – pracovní
expozice



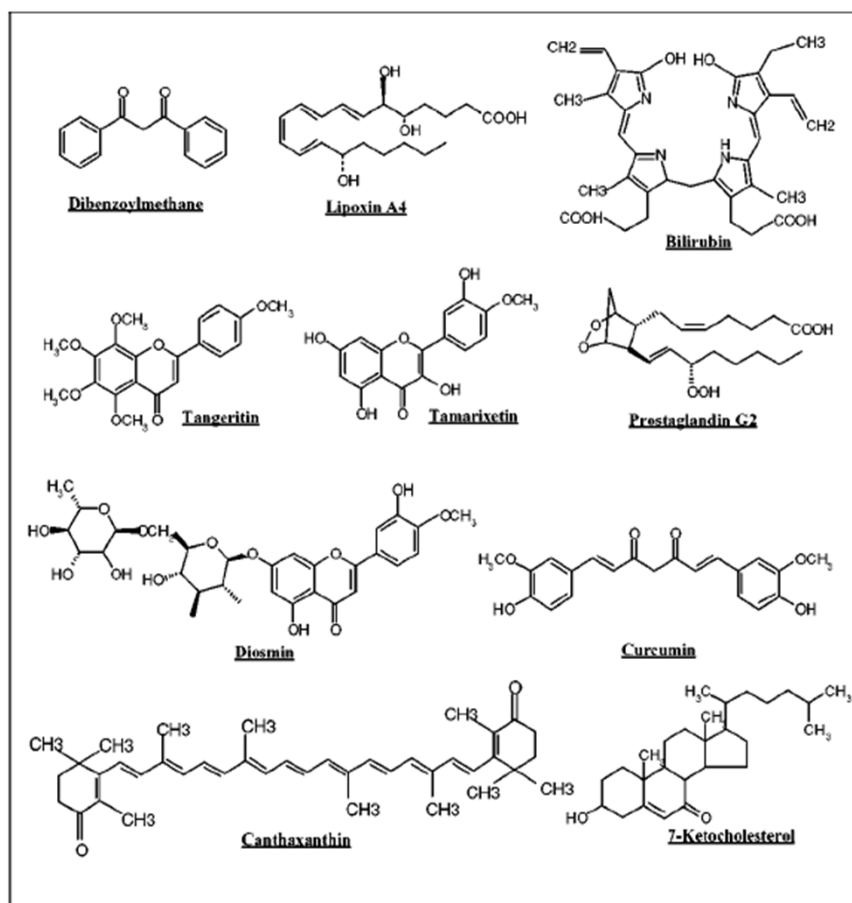
Endogenní a přírodní ligandy AhR???

✓ deriváty tryptofanu;



Jiné přírodní ligandy AhR???

✓ deriváty lipidů a flavonoidy



Toxické účinky dioxinů:

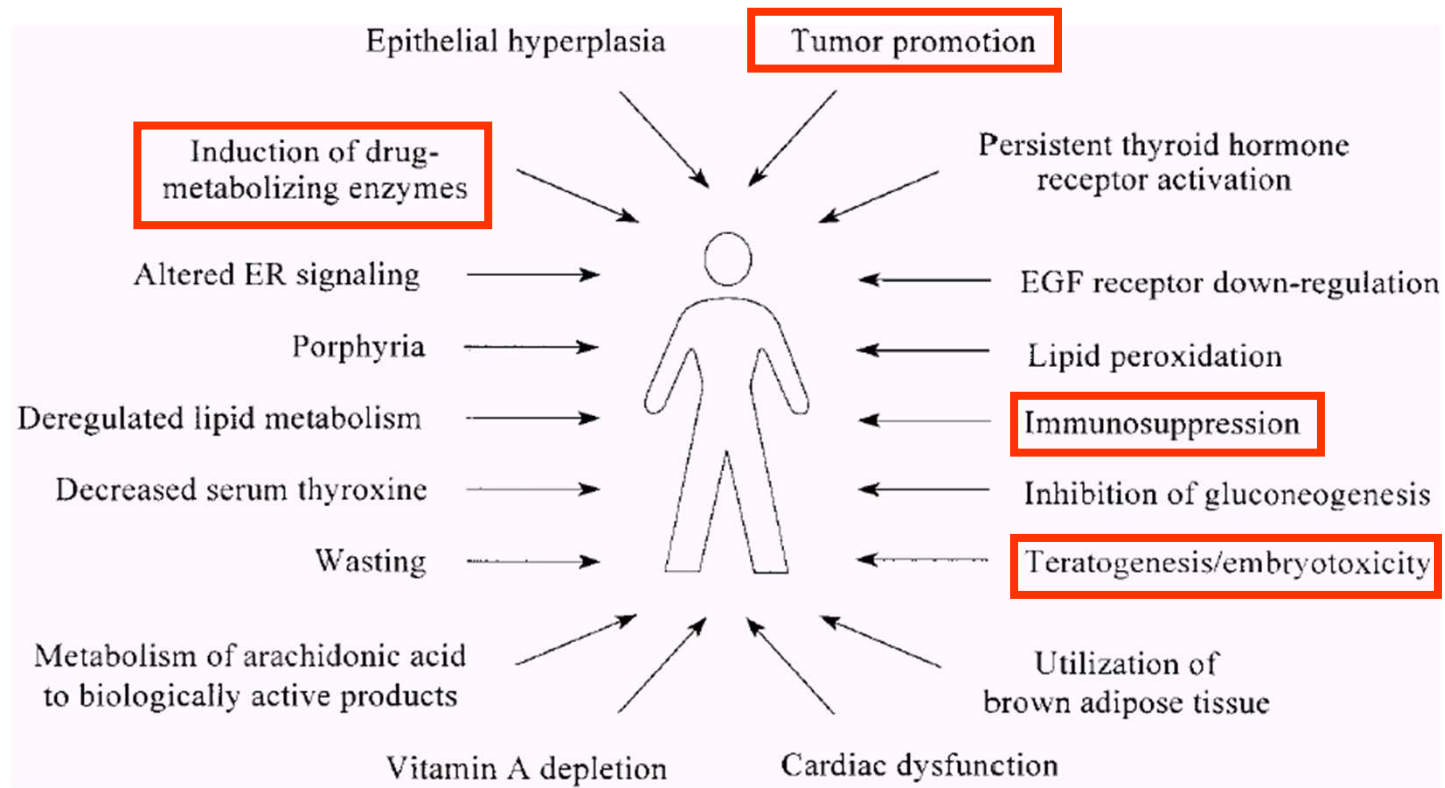
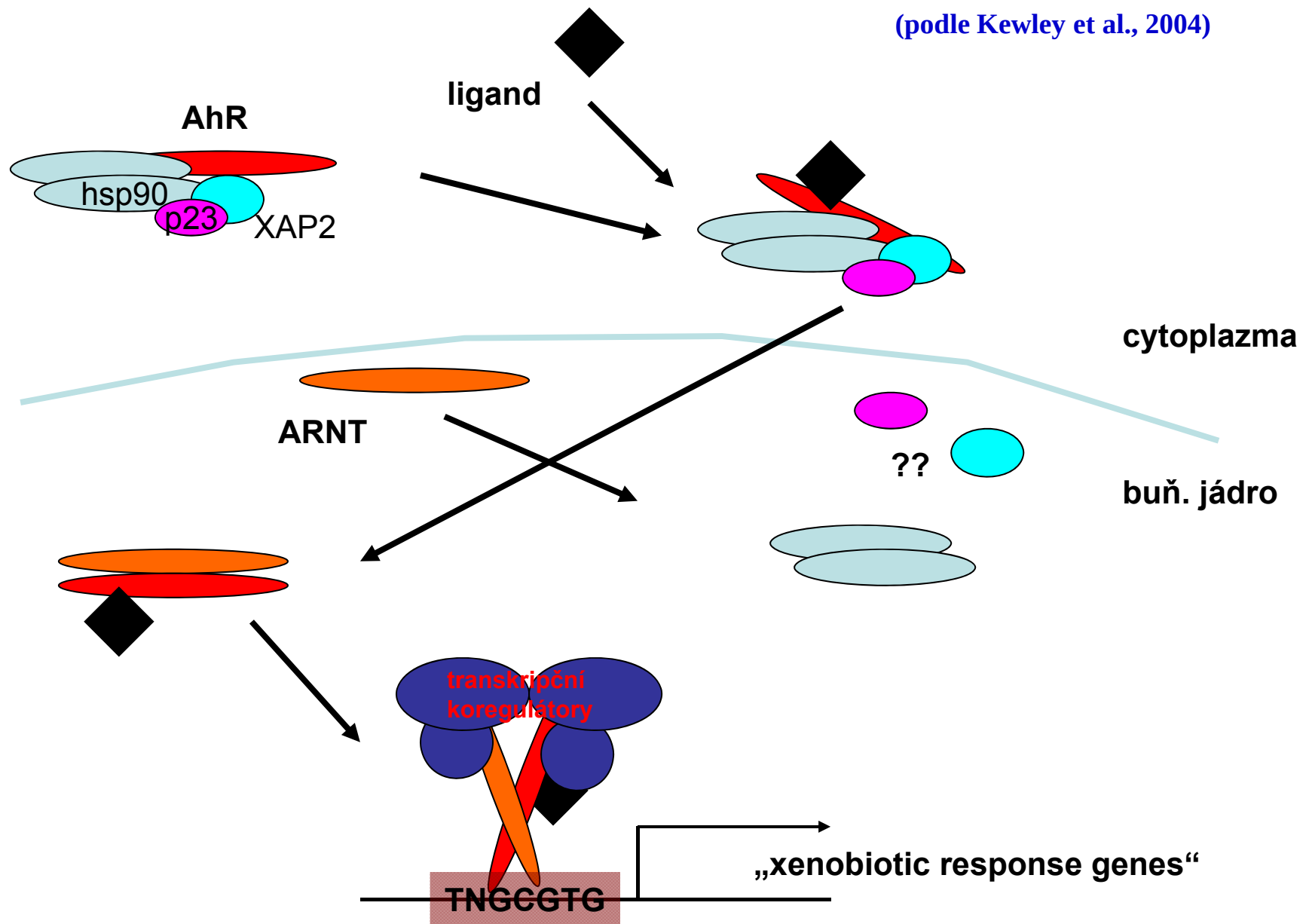


Figure 1 Biological responses to TCDD. A wide variety of cellular processes have been shown to be affected by TCDD.

Aktivace AhR: (podle Kewley et al., 2004)



Aktivace AhR:

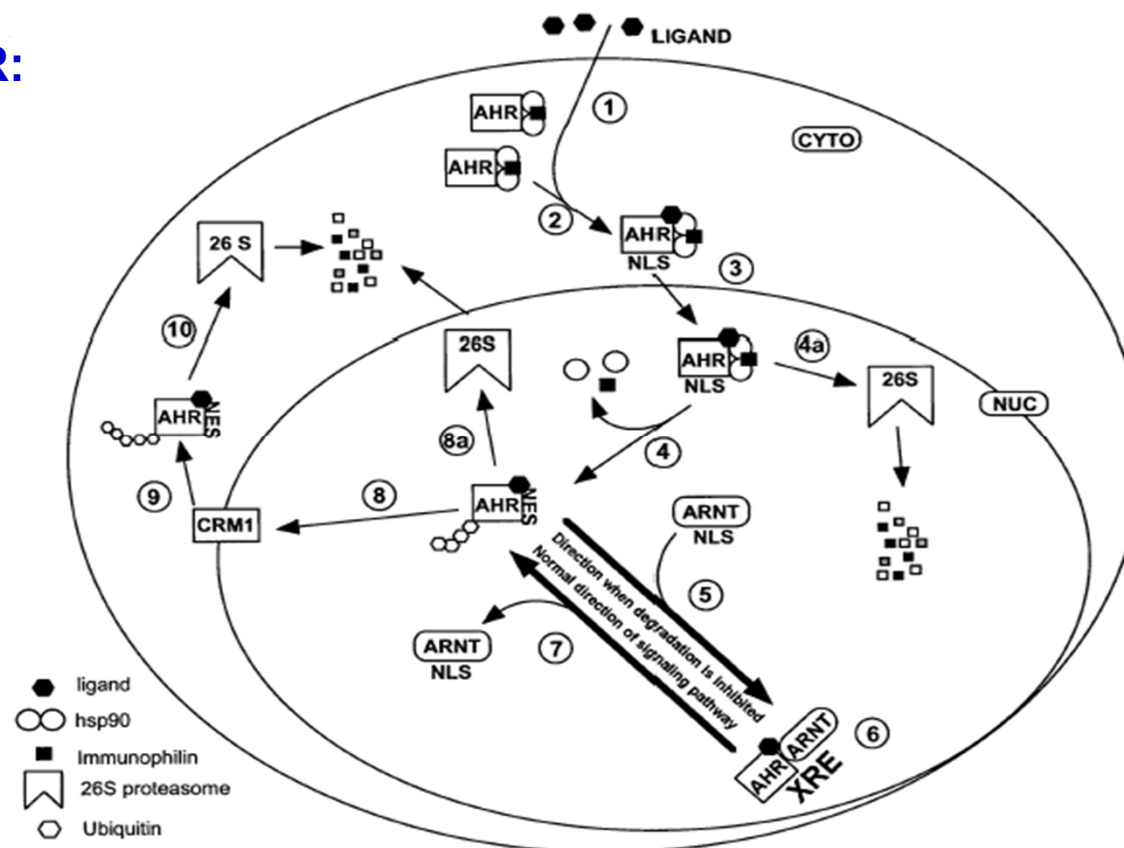
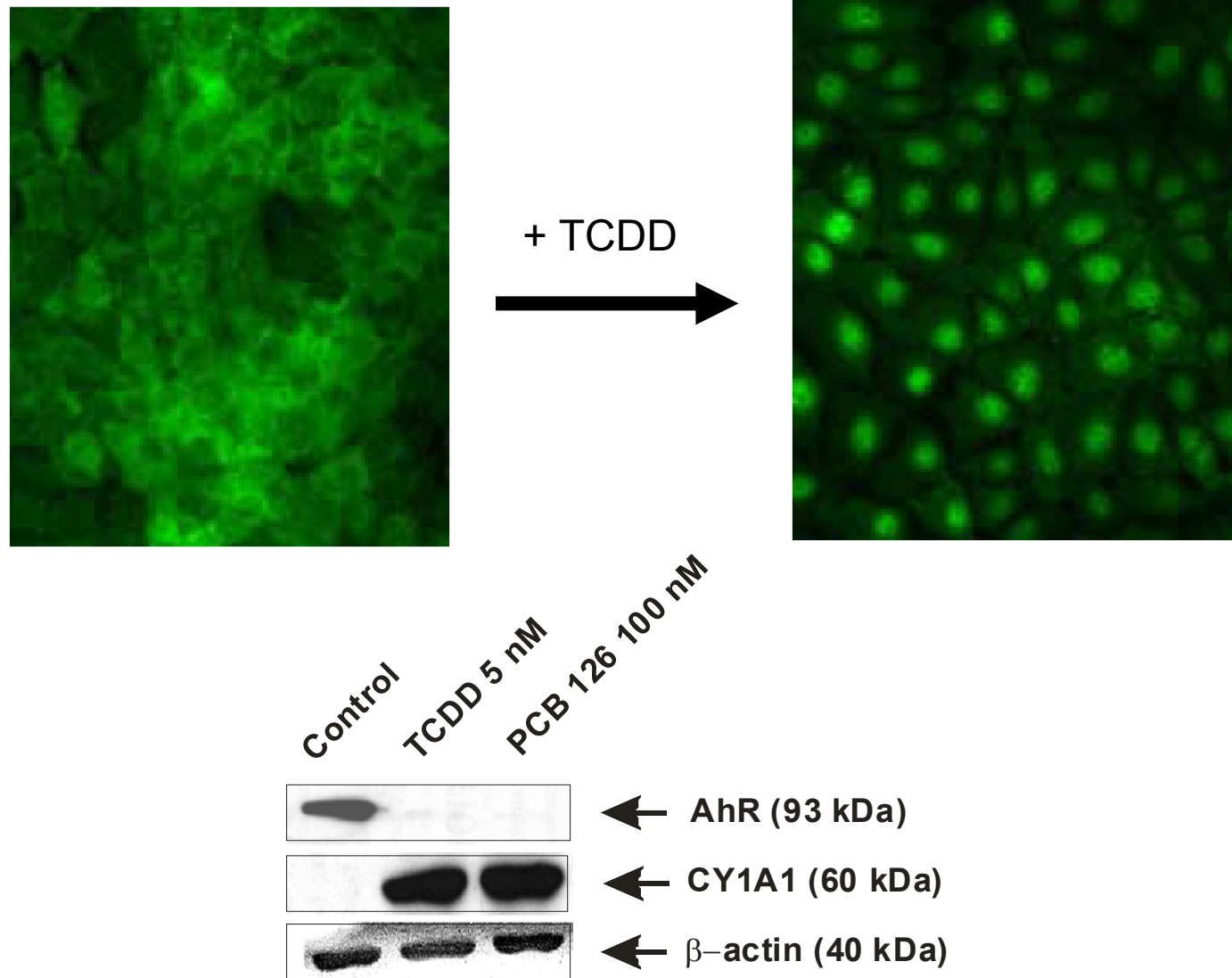


Fig. 1. Model of AHR-mediated signal transduction pathway. (1) Ligand enters cell. (2) Ligand binds to AHR-hsp90-immunophilin complex causing conformational change and exposing the NLS domain. (3) AHR complex is actively imported into the nucleus via NLS and nuclear import receptors. (4a) If receptor complex is in a misfolded conformation, it may be proteolytically degraded. (4) AHR dissociates from hsp90 and immunophilin exposing HLH/PAS domain and NES. (5) AHR dimerizes with ARNT-blocking NES sequence. (6) AHR-ARNT complex binds to XRE regions in DNA. (7) AHR-ARNT complex dissociates from DNA and ARNT exposing NES. (8a) AHR is ubiquitinated in the nucleus and degraded or (8) AHR is exported from nucleus via CRM-1 export receptor. (9) AHR is ubiquitinated in cytoplasm and (10) targeted to 26S proteasome for degradation. Note that the pathway is linear and also note the degradation of the AHR terminal step regardless of whether it occurs within the nucleus or cytoplasm. NLS, nuclear localization signal; CRM-1, chromosome region maintenance protein 1; 26S, 26S proteasome.

Aktivace AhR:



Geny regulované AhR

obsahují v promotorové nebo enhancerové oblasti tzv. xenobiotic response elements (XRE) / dioxin responsive elements (DRE):

- enzymy I. fáze biotransformace - *CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 1B1*;
- enzymy II. fáze biotransformace - *UDP-glucuronosyltransferase, GST-Ya, NADP(H):oxidoreductase*;
- regulátory buněčného cyklu, apoptózy, diferenciace, senescence – *Bax?*, *p27^{Kip1}*, *JunD*, *TGF-β*;
- AhRR.

AhR deficientní myši:

- růstová retardace;
 - narušení vývoje jater a imunitního systému;
 - hromadění retinoidů v játrech;
 - abnormální vaskularizace ledvin a jater;
 - řada efektů v imunitním systému a hematopoéze;
-
- odolné vůči karcinogenním účinkům BaP a teratogenitě TCDD;

Jaterní defekty:

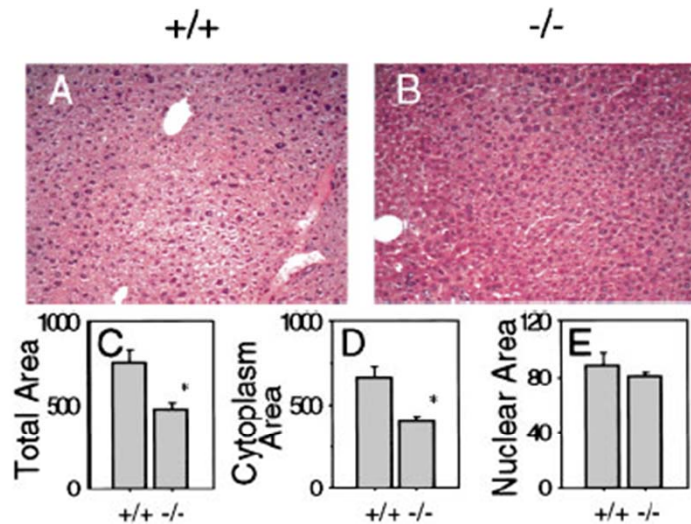
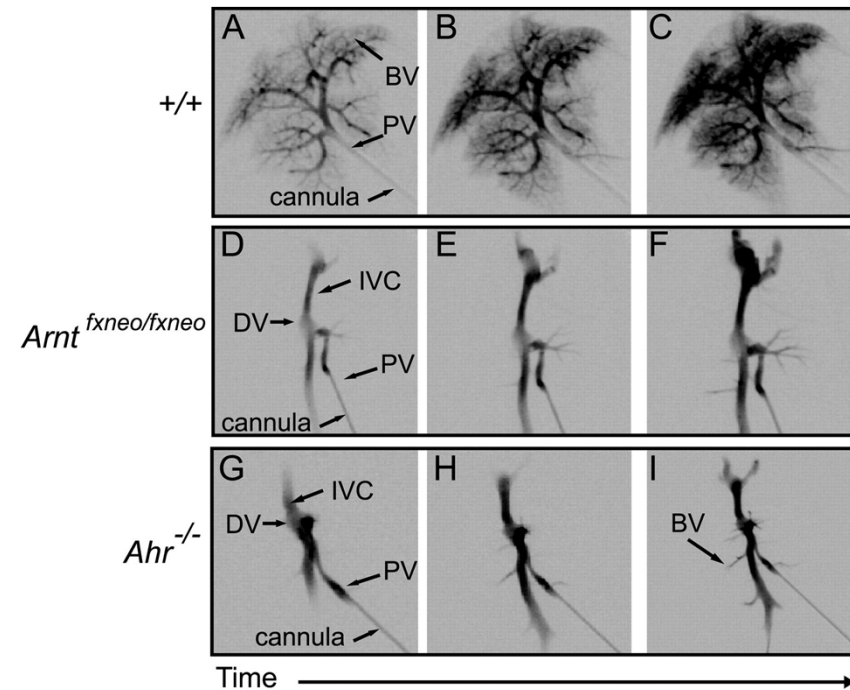


Fig. 1. $Ah^{-/-}$ mice have smaller hepatocytes than wild-type mice. Livers of 1-year-old mice were fixed in formalin, and 6- μ m sections were examined after staining with hematoxylin/eosin. (A and B) Thin sections from wild-type (A) and age-matched Ah knockout (B) mice are shown, and results of morphometric analyses follow. (C) There is a significant decrease in the total area of the hepatocytes of $Ah^{-/-}$ mice. (D and E) Whereas the cytoplasmic area of $Ah^{-/-}$ hepatocytes is significantly decreased (D), the nuclear areas of $Ah^{+/+}$ and $Ah^{-/-}$ hepatocytes are not different (E). Mean and standard errors generated from comparison of six 1-year-old male $Ah^{+/+}$ and six age- and sex-matched $Ah^{-/-}$ mice are shown; asterisks indicate significance ($P < 0.05$).



Walisser et al., *J Biol Chem* 2004;279:16326-31

BaP není karcinogenní v AhR KO myších:

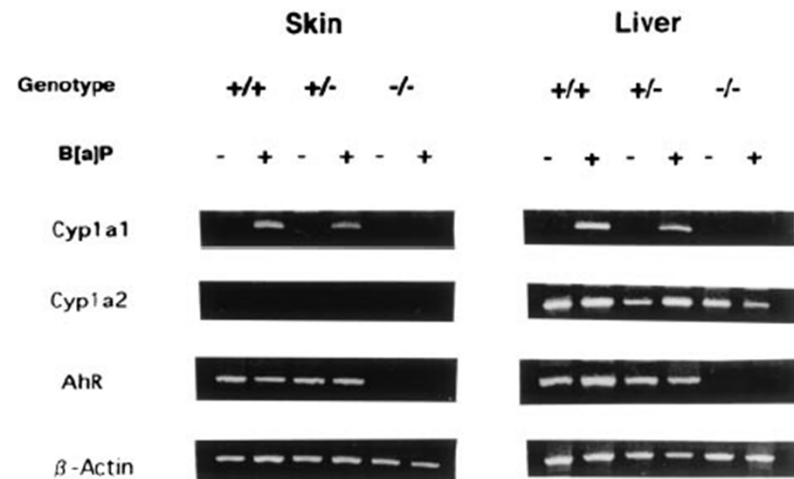


Fig. 1. *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR gene expression in the skin and liver of AhR(+/+), AhR(+/-), and AhR(-/-) mice, with and without B[a]P treatment. One-microgram aliquots of RNA extracted from skin and liver of control and B[a]P-treated mice of the three genotypes were reverse-transcribed and analyzed by PCR using specific primers for the *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR and β -actin genes.

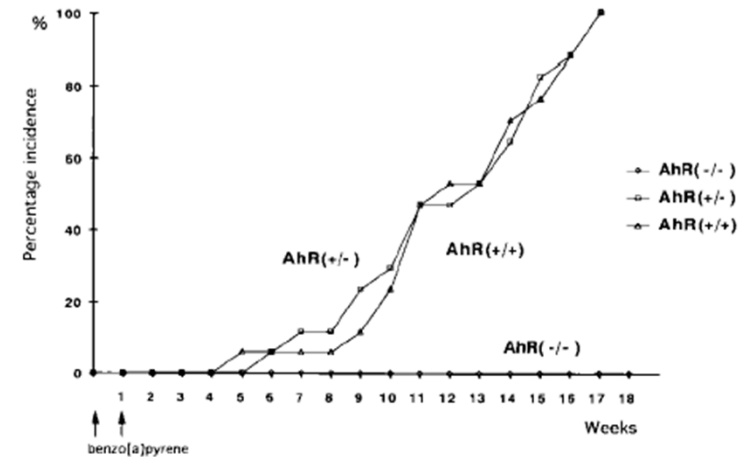


Fig. 2. Subcutaneous tumor induction in wild-type (Δ) and AhR-deficient male mice (+/-, $\square$; -/-, $\circ$) injected with B[a]P.

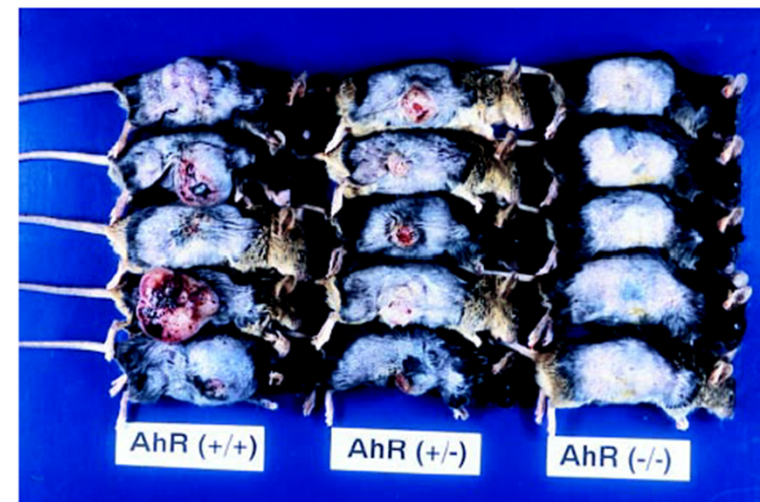
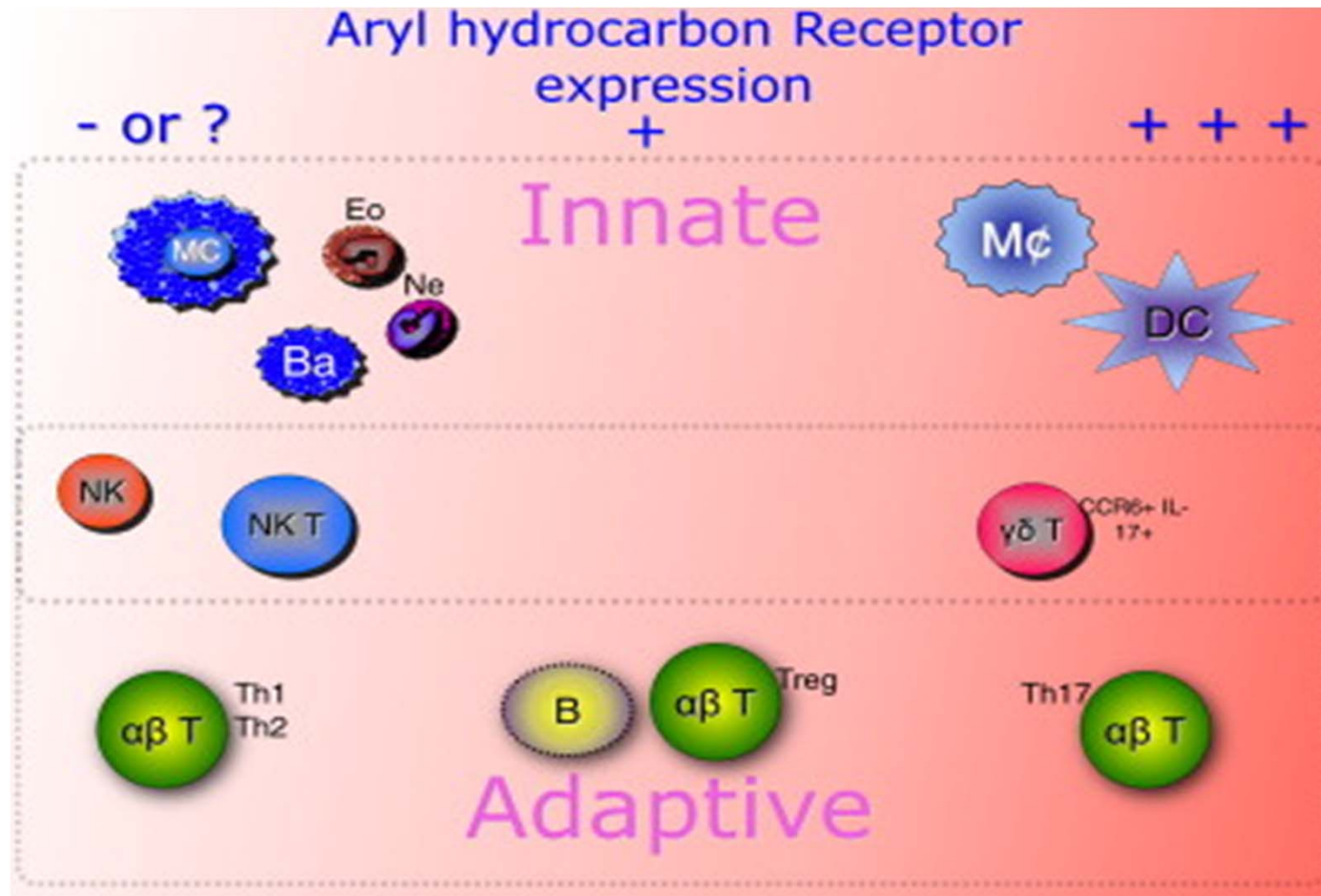
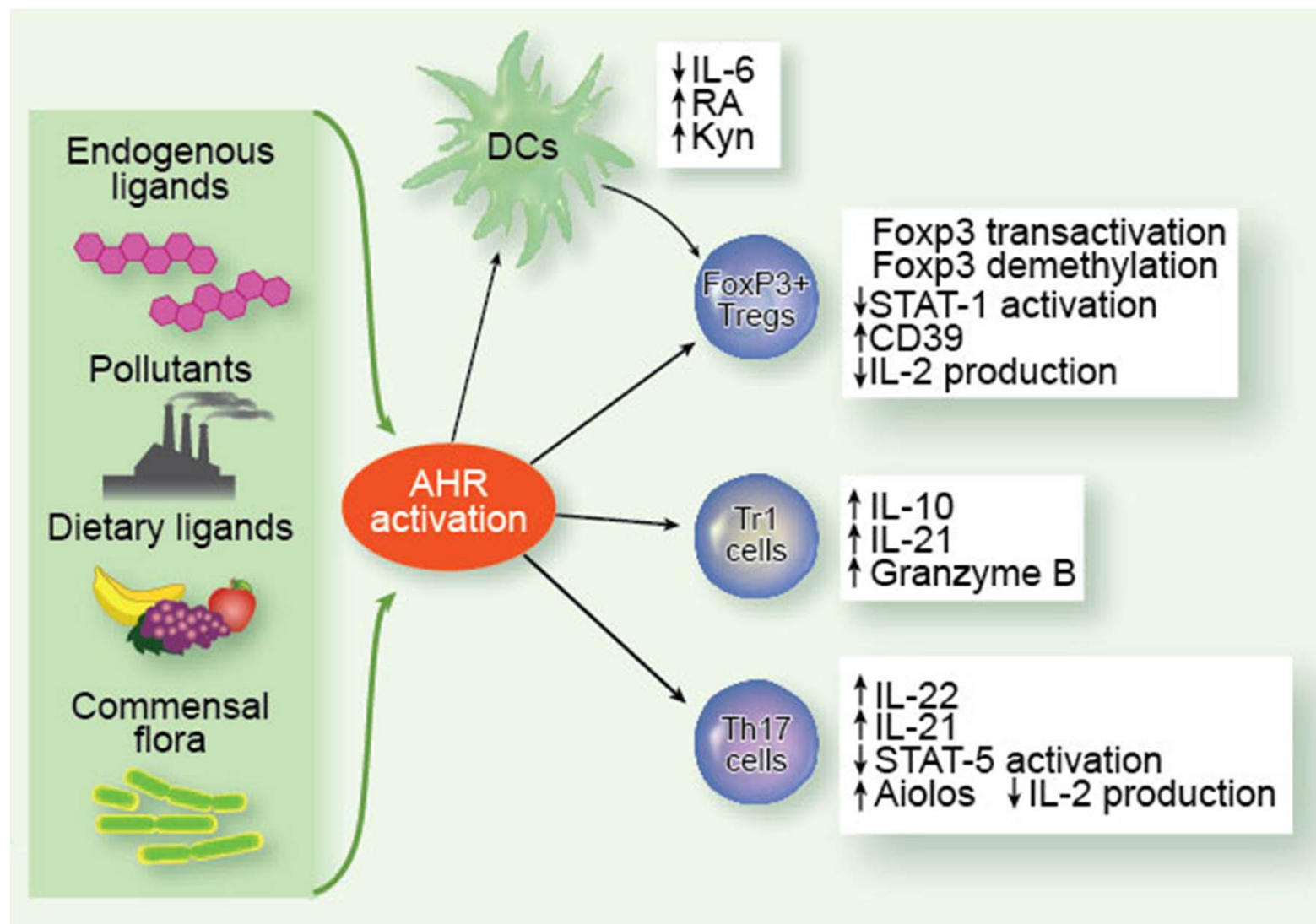


Fig. 3. Gross appearance of flank skins in AhR-wild-type mice (+/+), AhR-heterozygous mice (+/-), and AhR-deficient mice (-/-) injected subcutaneously with B[a]P.

AhR a imunitní systém



AhR a imunitní systém



Koncepce toxických ekvivalentních faktorů (TEF)

- vzhledem k tomu, že látky dioxinového typu mají společný mechanismus účinku – aktivaci AhR, lze předpokládat, že jejich schopnost aktivovat tento receptor je úměrná jejich toxicitě;
- referenční toxikant – TCDD;
- $TEF = EC50 \text{ (daná látka)} / EC50 \text{ (TCDD)}$;
- TEF pro jsou definovány WHO;

$$\text{Toxicita směsi - TEQ} = \sum [C_i] \times TEF_i$$

Toxické ekvivalentní faktory (TEF)

TABLE 1
Summary of WHO 1998 and WHO 2005 TEF Values

Compound	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
Chlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
Chlorinated dibenzofurans		
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003
Non- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaCB (PCB 126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 169)	0.01	0.03
Mono- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB 189)	0.0001	0.00003

Bold values indicate a change in TEF value.

AhR interaguje s řadou dalších proteinů:

TABLE 1. Interactions Between Signal Transduction Pathways and AhR^{a,b}

Interactions	References
→ Direct interactions with AhR	
HSP90	[79]
XAP2	[80–82]
ER, ERR α	[24]
NF κ B (RelA/p65)	[39]
Rb	[44–46]
RIP 140, p300/CBP	[41,51,53]
SRC-1, NCoA-2, pCIP	[41,54]
ERAP 140, SMRT	[49,50]
COUP-TF1	[24]
pp60 ^{src}	[70,71]
tyrosine phosphorylation	[69]
→ Direct interactions with AhR complex proteins ^c	
HIF-1 α , PAS proteins (ARNT)	[32,35]
p300/CBP (ARNT)	[52]
SRC-1, NCoA-2 (ARNT)	[54]
SHP (ARNT)	[78]
AhRR (ARNT)	[20]
ARNT Repressor (ARNT)	[21]
CK2 (XAP2)	[74]
p23 (HSP90)	[76]
XAP2 (HSP90)	[80]
→ Indirect interactions (cross talk) with AhR	
ER	[8,25,29]
hypoxia	[33,36]
NF κ B	[40–42]
PKC	[59–66]
tyrosine kinases/phosphatases	[69,72,73]
c-myc, AP-1, CK2	[72]
TGF- β	[7]
p27 (Kip 1)	[43]
NF-1	[27]
C2-ceramide	[47]

J.R. Petrulis, G.H. Perdew / *Chemico-Biological Interactions* 141 (2002) 25–40

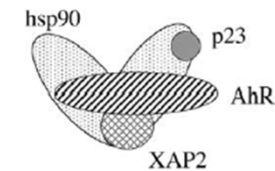


Fig. 4. Model for the arrangement of proteins found in the unliganded AhR complex.

O. Hankinson / *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433 (2005) 379–386

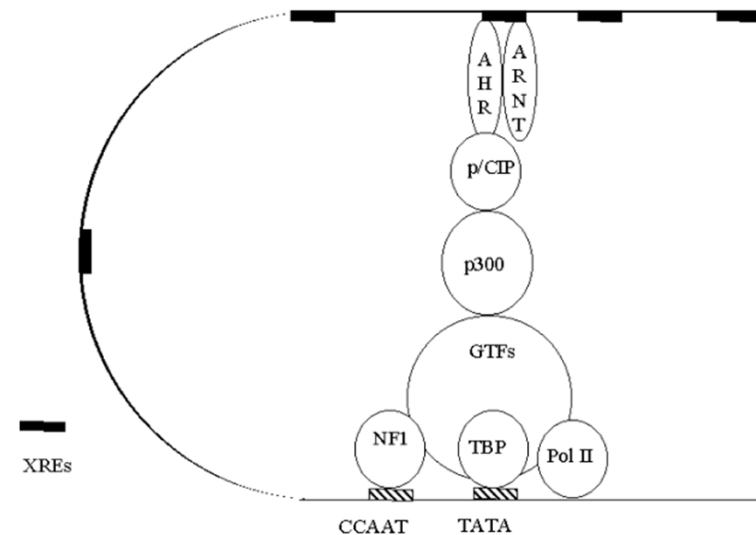


Fig. 3. Hypothetical model of coactivator recruitment at the *Cyp1a1* gene.

AhR-ER α crosstalk

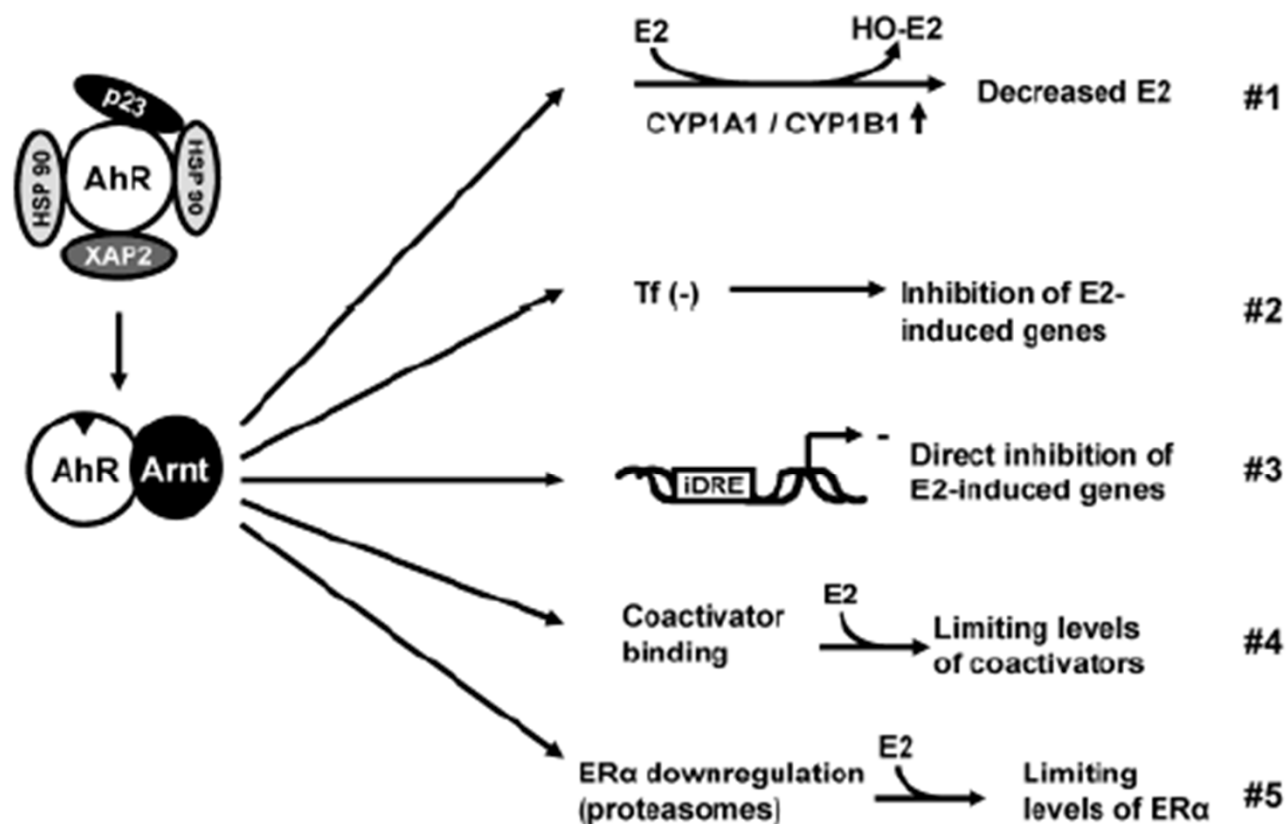
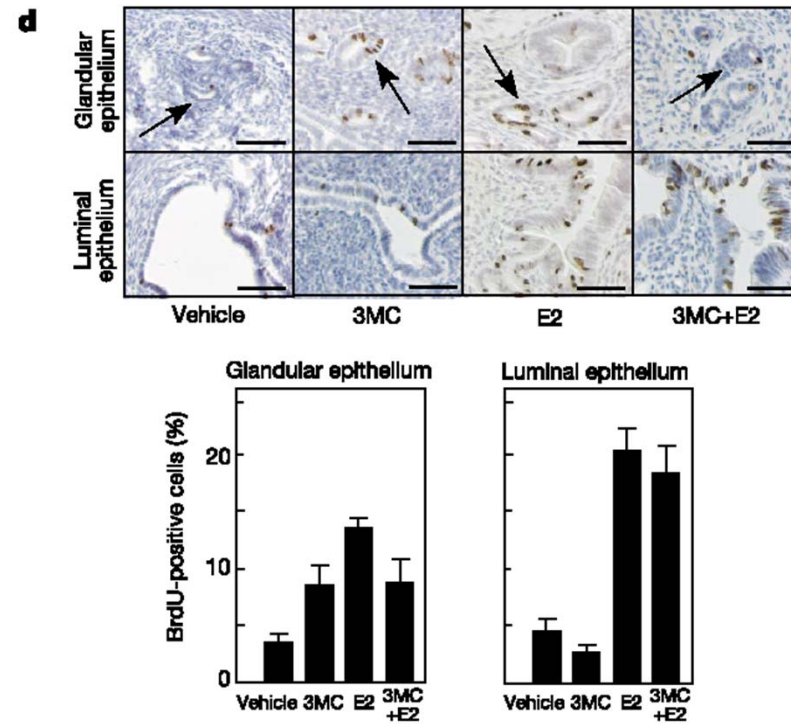
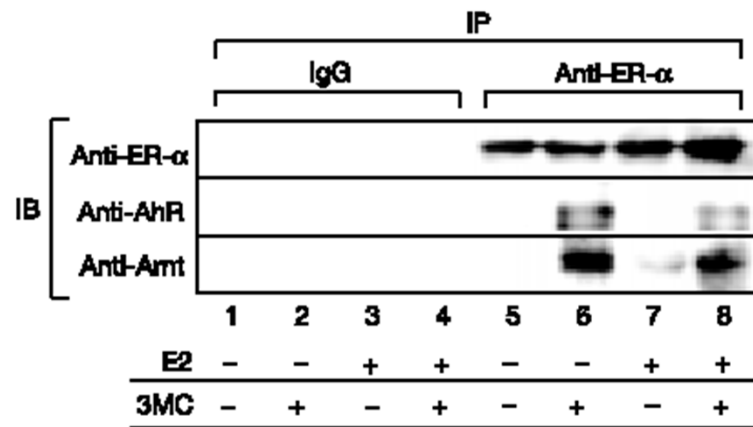


Figure 3. Proposed mechanisms of inhibitory AhR-ER α crosstalk (123-126).

Přímá interakce AhR-ER α ?

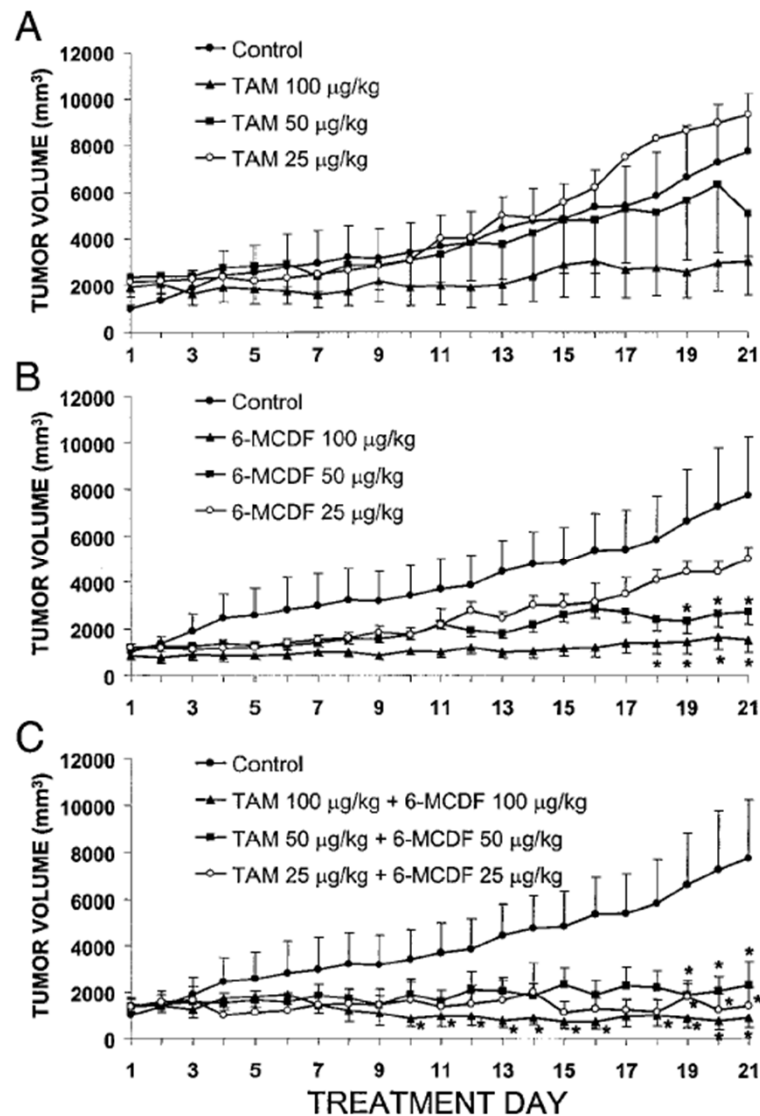
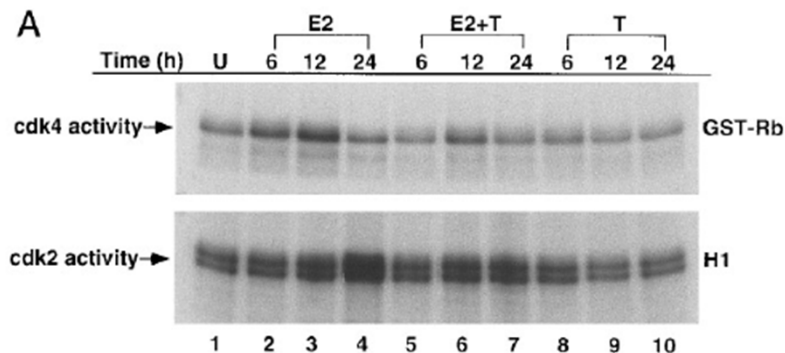


Využití AhR-ER α crosstalk v nádorové terapii?

TABLE I

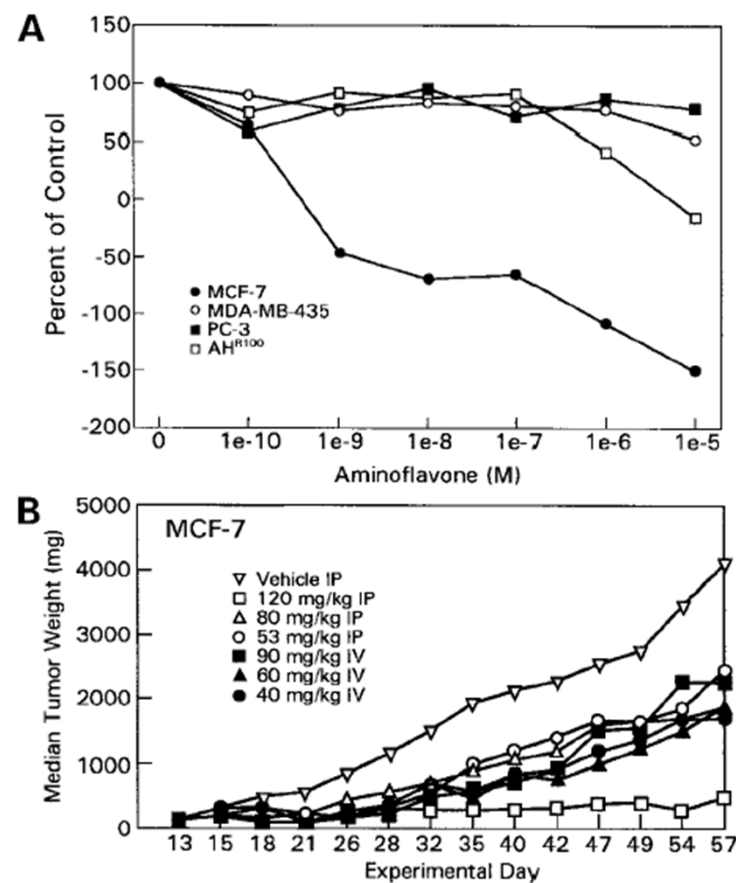
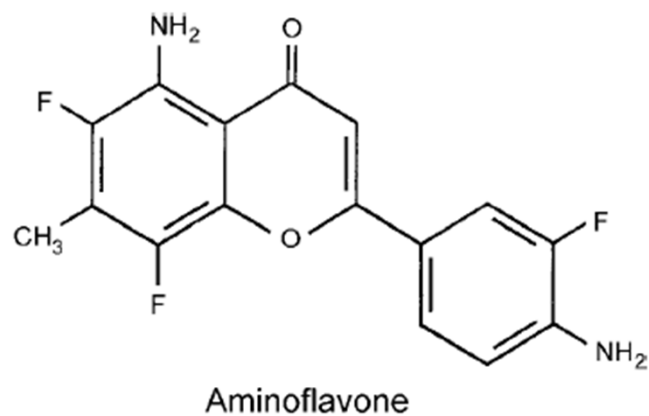
Effects of 17 β -Estradiol and TCDD on Cell Cycle Distribution of MCF-7 Human Breast Cancer Cells^a

Treatment (time, h)	Cell cycle phase (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	89.9 $\pm$ 2.1	4.9 $\pm$ 1.6	5.2 $\pm$ 0.6
E2 (12)	87.7 $\pm$ 2.1	6.0 $\pm$ 1.4	4.4 $\pm$ 0.7
E2 + TCDD (12)	87.2 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.5
TCDD (12)	89.1 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.2
E2 (24)	75.1 $\pm$ 0.6 ^b	23.4 $\pm$ 1.7 ^b	1.5 $\pm$ 1.2
E2 + TCDD (24)	81.0 $\pm$ 1.3 ^c	15.8 $\pm$ 1.8 ^d	3.2 $\pm$ 0.7
TCDD (24)	90.8 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.9

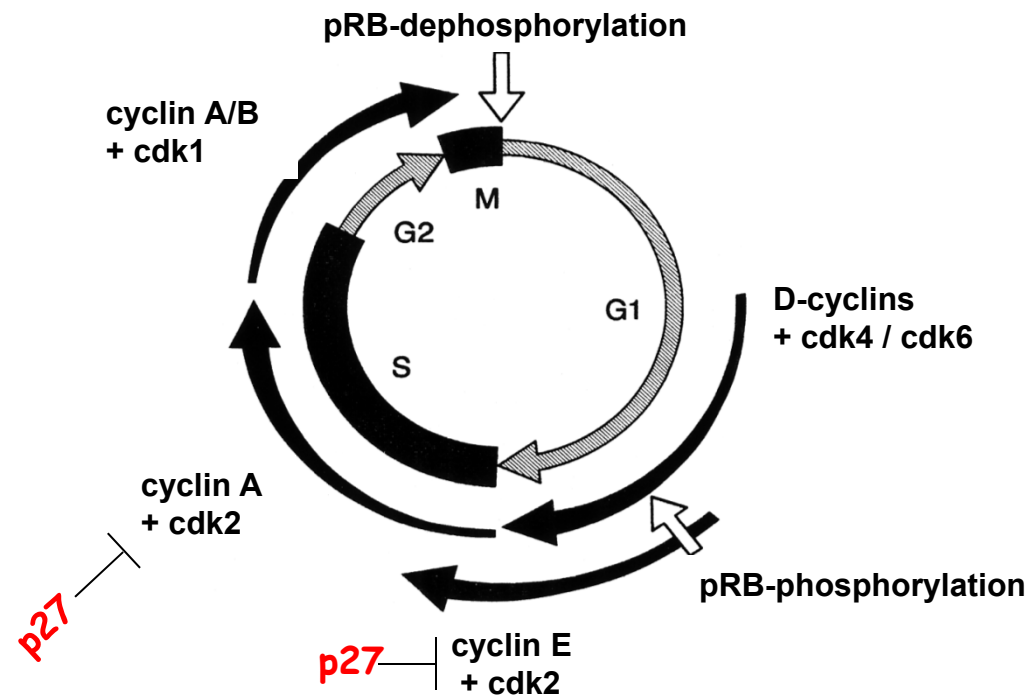


ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 356, 239–248, 1998;
CANCER RESEARCH 61, 3902–3907, 2001

Využití AhR-ER α crosstalk v nádorové terapii?



Úloha AhR v regulaci buněčného cyklu



pRB = retinoblastoma protein
cdk = cyclin-dependent kinase

Úloha AhR v regulaci buněčného cyklu

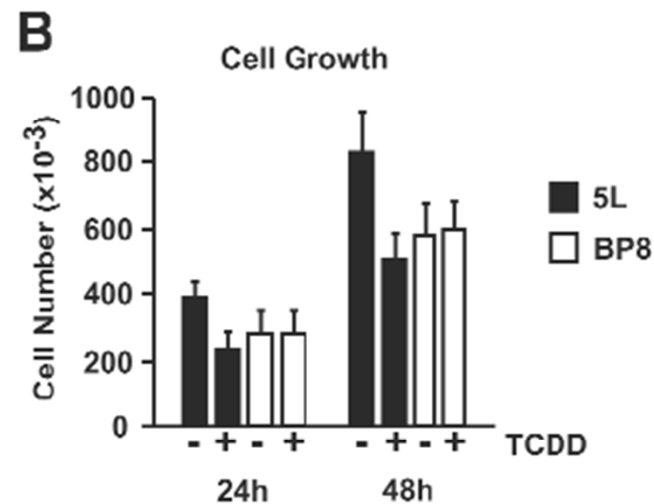
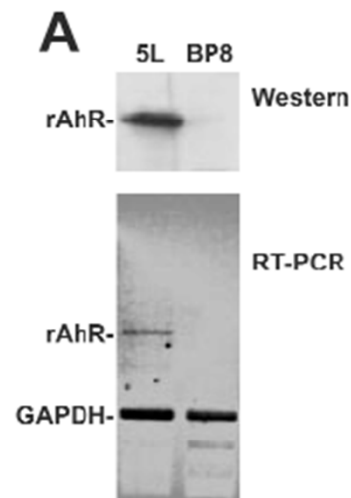
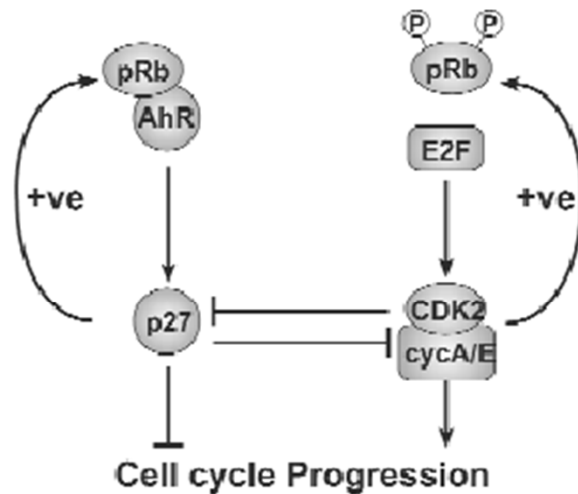
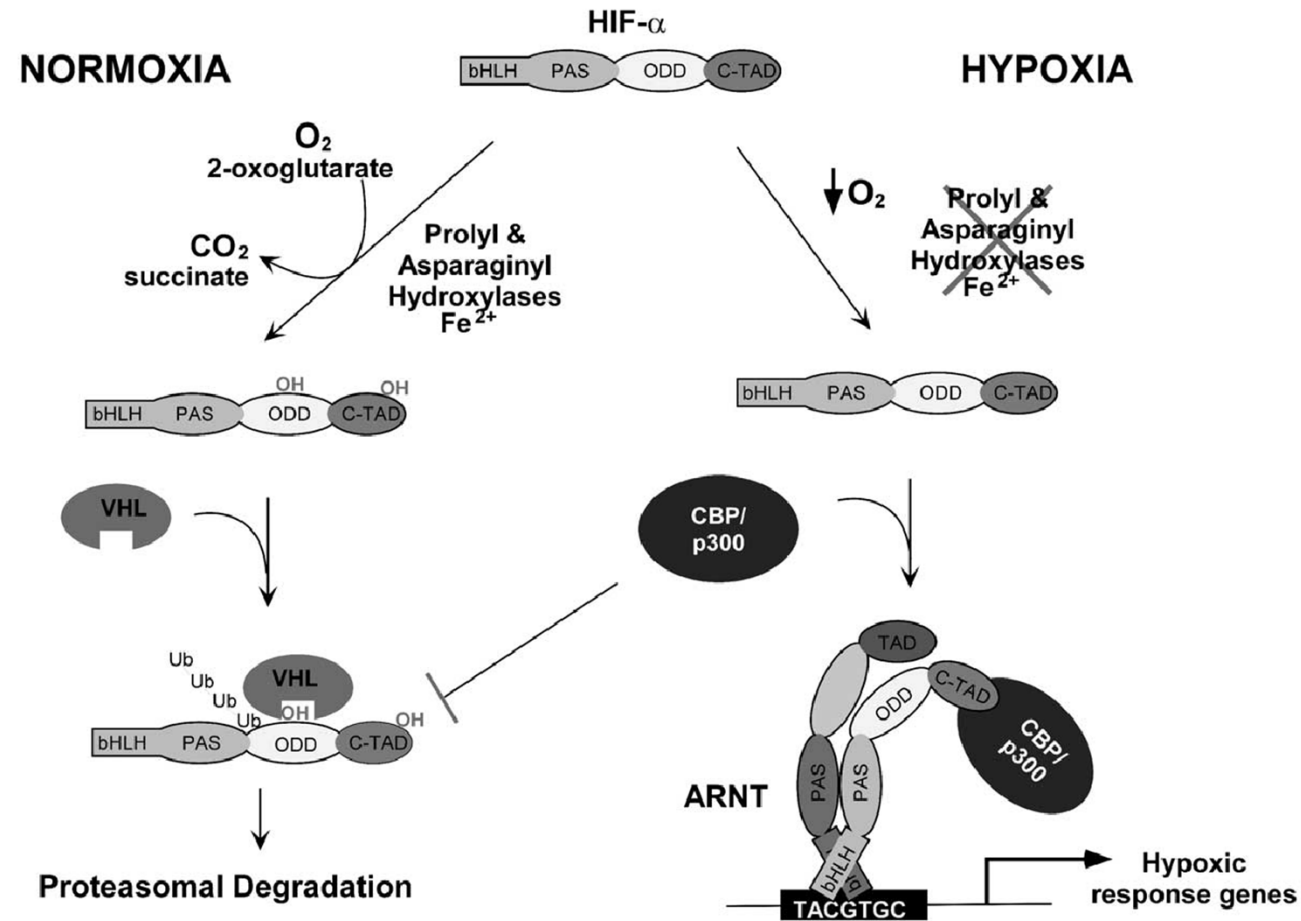


Figure 2.. TCDD induces growth inhibition in rat 5L hepatoma cells.

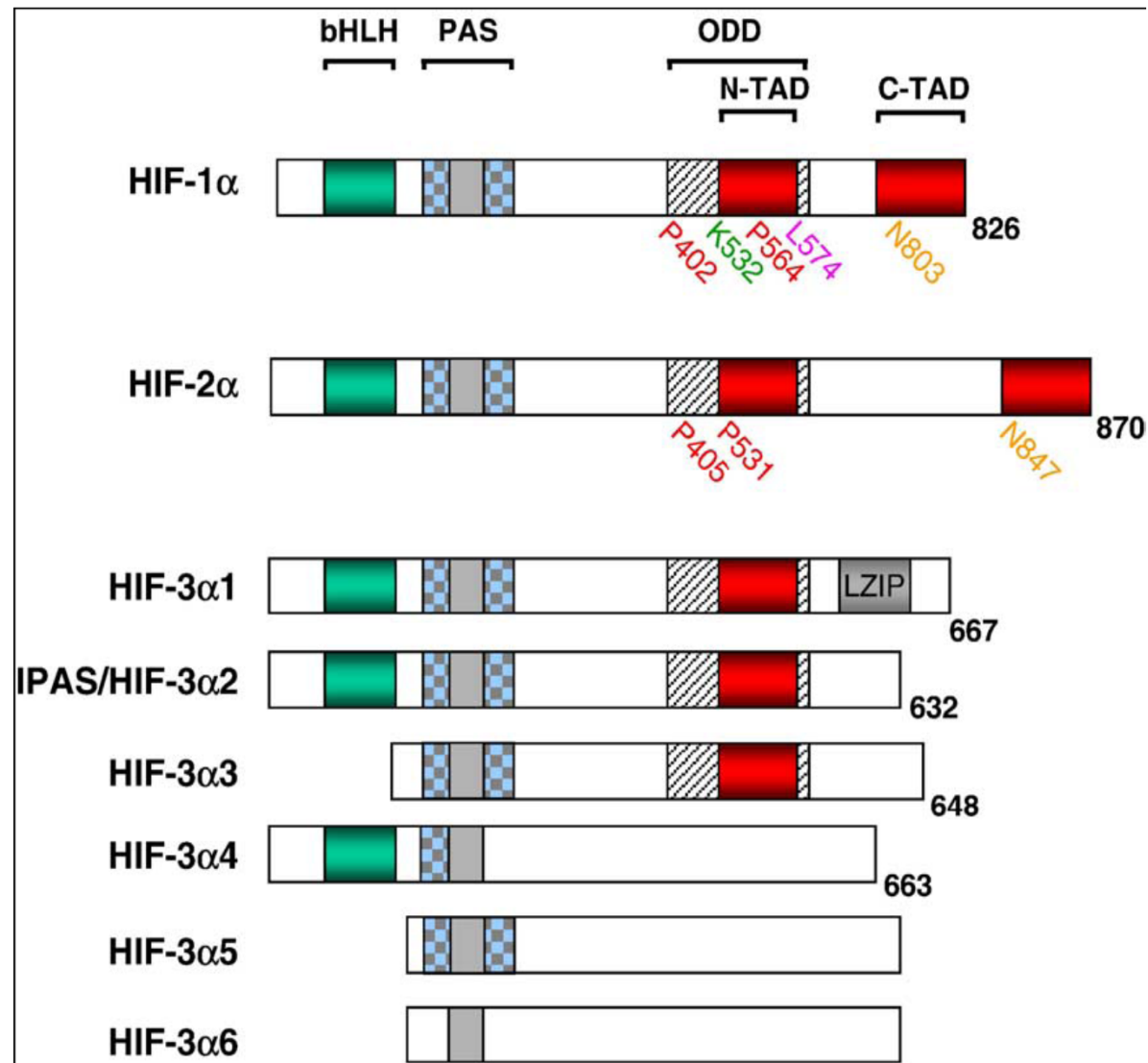
Panel A, total protein from 5L and BP8 cells was fractionated by SDS-PAGE and probed for AhR protein with an anti-AhR antibody (Western). Analysis of AhR expression was also performed by RT-PCR on total RNA from 5L and BP8 cells using primers specific for rat AhR (rAhR) and GAPDH (as a control for RT-PCR).

Panel B, 5L (solid bars) and BP8 (open bars) cells (2×10^5) were grown in the presence of 10 nM TCDD (+) or absence of TCDD (-) for 24h or 48h and counted. The values presented are the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments.

Faktor indukovaný hypoxií – HIF1



HIF podrodina:



Buněčné prostředí mění hladinu HIF:

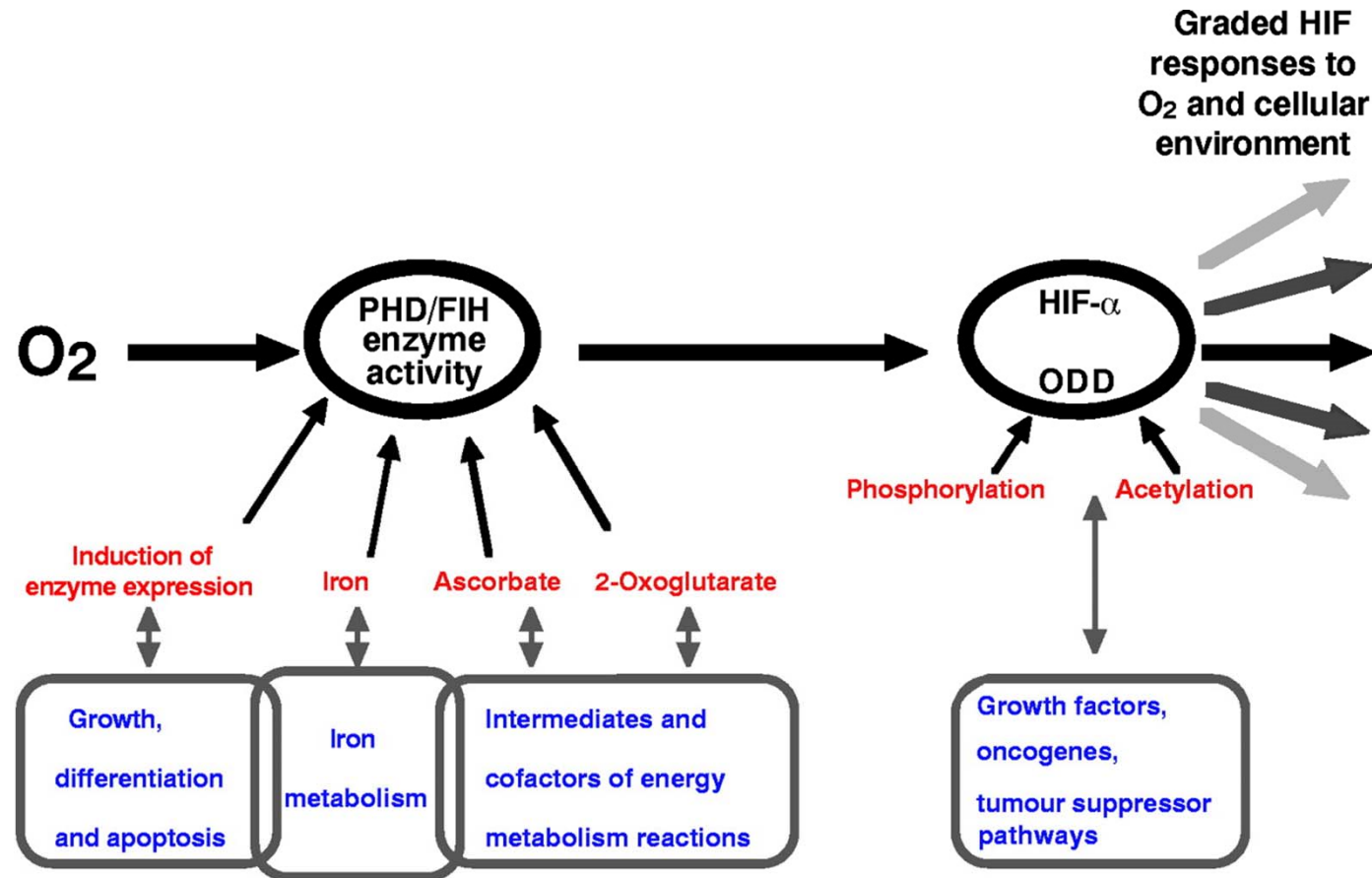
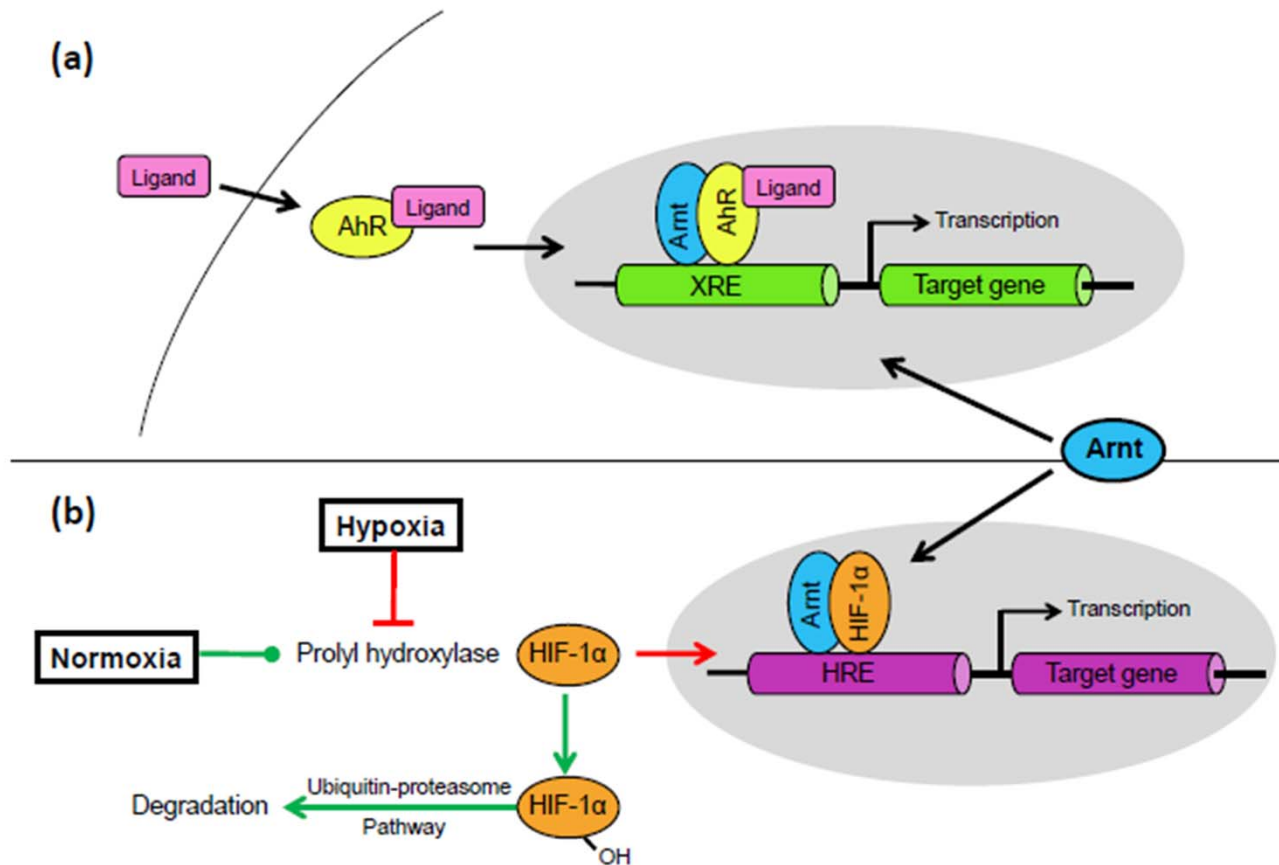


Table 2. HIF-1 target genes.

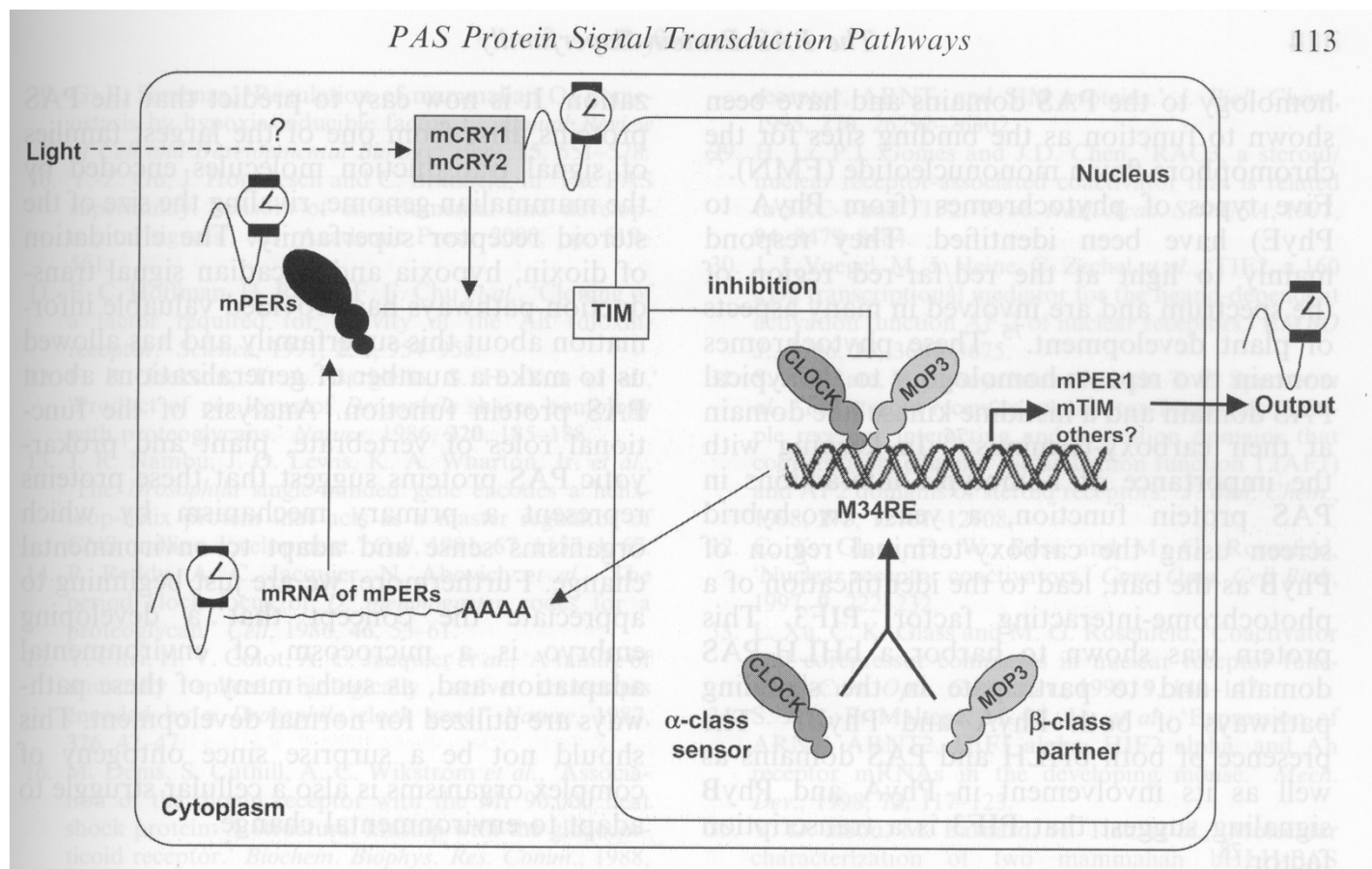
Function	Gene (abbreviation)	Reference
Erythropoiesis/ iron metabolism	Erythropoietin (EPO)	(Semenza et al., 1991)
	Transferrin (Tf)	(Rofls et al., 1997)
	Transferrin receptor (Tfr)	(Bianchi et al., 1999)
	Ceruloplasmin	(Lok and Ponka, 1999)
Angiogenesis	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	(Levy et al., 1995)
	Endocrine-gland-derived VEGF (EG-VEGF)	(LeCouter et al., 2001)
	Leptin (LEP)	(Grosfeld et al., 2002)
	Transforming growth factor-beta3 (TGF- β 3)	(Scheid et al., 2002)
Vascular tone	Nitric oxide synthase (NOS2)	(Melillo et al., 1995)
	Heme oxygenase 1	(Lee et al., 1997)
	Endothelin 1 (ET1)	(Hu et al., 1998)
	Adrenomedullin (ADM)	(Nguyen and Claycomb, 1999)
Matrix metabolism	α 1B-adrenergic receptor	(Eckhart et al., 1997)
	Matrix metalloproteinases (MMPs)	(Ben-Yosef et al., 2002)
	Plasminogen activator receptors and inhibitors (PAIs)	(Kietzmann et al., 1999)
	Collagen prolyl hydroxylase	(Takahashi et al., 2000)
Glucose metabolism	Adenylate kinase-3	(O'Rourke et al., 1996)
	Aldolase-A,C (ALDA,C)	(Semenza et al., 1996)
	Carbonic anhydrase-9	(Wykoff et al., 2000)
	Enolase-1 (ENO1)	(Semenza et al., 1996)
	Glucose transporter-1,3 (GLU1,3)	(Chen et al., 2001)
	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)	(Graven et al., 1999)
	Hexokinase 1,2 (HK1,2)	(Mathupala et al., 2001)
	Lactate dehydrogenase-A (LDHA)	(Semenza et al., 1996)
	Pyruvate kinase M (PKM)	(Semenza et al., 1994)
	Phosphofructokinase L (PFKL)	(Semenza et al., 1994)
	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	(Semenza et al., 1994)
Cell proliferation/ survival	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate-3 (PFKFB3)	(Minchenko et al., 2002)
	Insulin-like growth factor-2 (IGF2)	(Feldser et al., 1999)
	Transforming growth factor- α (TGF- α)	(Krishnamachary et al., 2003)
Apoptosis	Adrenomedullin (ADM)	(Cormier-Regard et al., 1998)
	Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNip3)	(Carrero et al., 2000)
	Nip3-like protein X (NIX)	(Bruick, 2000)

Molecular
Pharmacology Fast
Forward. Published on
August 3, 2006 as
doi:10.1124/mol.106.0
27029

ARNT – základní dimerizační partner – vzájemná kompetice??



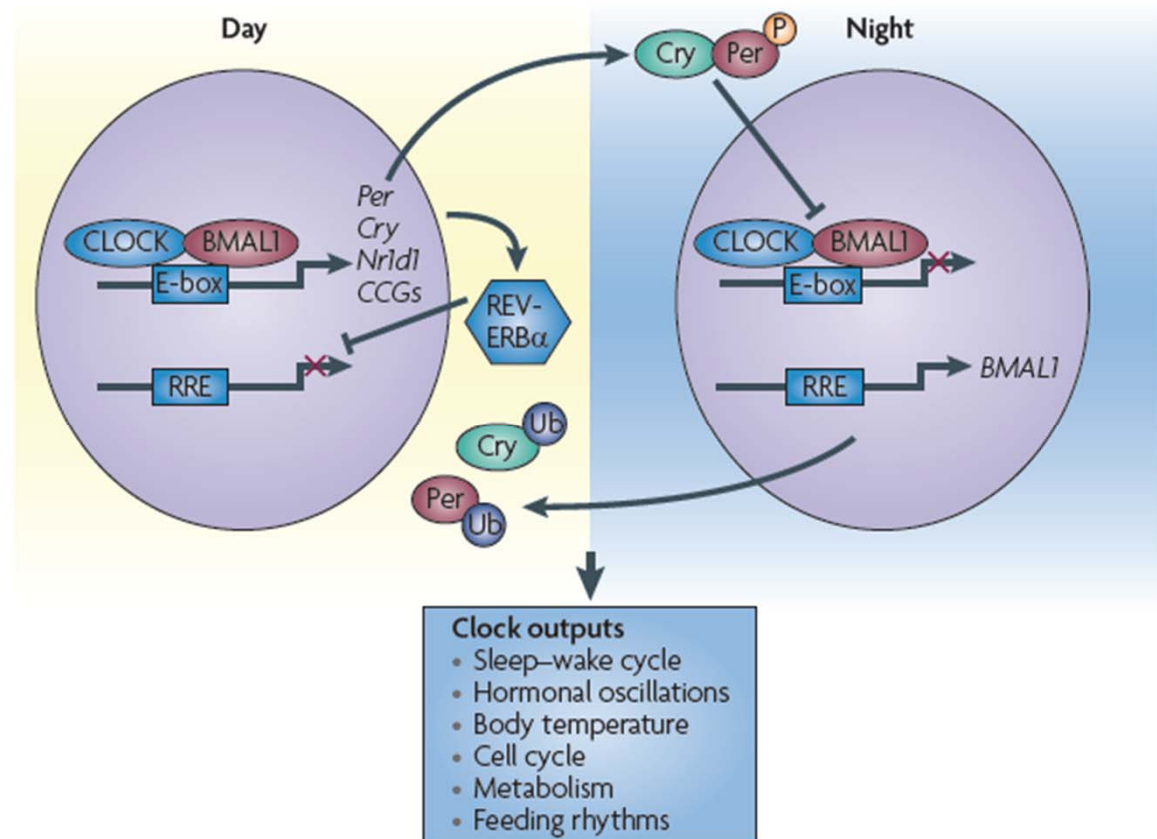
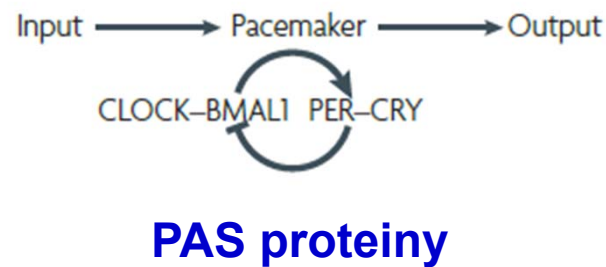
Regulace cirkadiálních rytmů



(Comprehensive Toxicology, vol. 14)

Regulace cirkadiálních rytů

CLOCK/BMAL1 heterodimer kontroluje expresi genů závislou na cirkadiálních rytmech – PER, CRY – zpětněvazebná regulace vlastní exprese;



✓ dochází k interakcím mezi AhR signalizací a regulací cirkadiánních rytmů?? – nezodpovězená otázka;

