

Received: 2011.04.08
Accepted: 2011.06.01
Published: 2011.06.17

Systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 w badaniach *in vitro* metabolizmu leków

Expression systems of cytochrome P450 proteins in studies of drug metabolism *in vitro*

Monika Pawłowska, Ewa Augustin

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Streszczenie

Białka cytochromu P450 to najważniejsze enzymy biorące udział w metabolizmie większości stosowanych w klinice leków, odpowiedzialne za ich aktywację lub detoksykację. Niektóre z dróg metabolizmu leku mogą być jednak odpowiedzialne za jego podwyższoną toksyczność. Nowe systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 w komórkach ssaków, w tym człowieka, projektowane są w celu poznania roli metabolizmu w mechanizmie działania potencjalnych, jak i stosowanych w klinice leków, zarówno na poziomie molekularnym, jak i komórkowym. Mogą też służyć do badania wpływu badanych związków na aktywność i ekspresję enzymów metabolizujących. Szczególne znaczenie, zwłaszcza w badaniach potencjalnych chemioterapeutyków, mają ludzkie nowotworowe linie komórkowe wykazujące nadekspresję izoenzymów cytochromu P450. W badaniach nad metabolizmem i toksycznością leków najczęściej stosowaną linią komórkową jest ludzka linia HepG2 wyprowadzona z nowotworu wątroby. Ze względu jednak na niski poziom enzymów metabolizujących w tych komórkach, opracowano linię komórkową Hep3A4, która charakteryzowała się podwyższoną ekspresją izoenzymu CYP3A4. Stabilną nadekspresję izoenzymów cytochromu P450 uzyskano również w komórkach kolejnej linii wyprowadzonej z ludzkiego nowotworu wątroby, HepaRG oraz w komórkach linii IGROV-1, wywodzących się z nowotworu jajnika, a także dwóch linii wyprowadzonych z nowotworu okrężnicy: Caco-2 i LS180. W pracy przedstawiono dotychczas opracowane systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 – modele: bakteryjny, drożdżowy, owadzi i ssaczy, w tym ludzki, z uwzględnieniem ich zalet i wad pod kątem przydatności do badań podstawowych, jak i wykorzystania na skalę komercyjną.

Słowa kluczowe:

cytochrom P450 • ekspresja • linia komórkowa • metabolizm leków • transfekcja

Summary

Cytochrome P450 proteins are the most important enzymes involved in metabolic activation or detoxification of various drugs used in clinical practice. However, some drug metabolism pathways may be responsible for their increased toxicity. New expression systems of cytochrome P450 proteins in mammalian cells, including human, are designed to explore the influence of metabolism on the cellular and molecular mechanisms of action of potential drugs and those used therapeutically. They can also be used to study the effect of tested compounds on activity and expression of metabolizing enzymes. Human tumor cell lines with overexpression of cytochrome P450 isoenzymes are of particular importance, especially in studies of potential chemotherapeutics. The HepG2 cell line, derived from human liver cancer, is the most commonly used in studies on drug metabolism and toxicity. However, due to the low level of metabolizing enzymes in these cells, the Hep3A4 cell line with overexpression of CYP3A4 isoenzyme was developed. The stable overexpression of cytochrome P450 isoenzymes was also obtained in other human cancer cell

lines, including hepatoma HepaRG cells, ovarian cancer IGROV-1 cells, colon cancer Caco-2, and LS180 cells. This review describes currently developed bacterial, yeast, insect and mammalian (including human) cytochrome P450 protein expression systems, in terms of their advantages and disadvantages in the context of their suitability for basic research and use on a commercial scale.

Key words: cytochrome P450 • expression • drug metabolism • cell line • transfection

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=948845>

Word count: 4315

Tables: –

Figures: 1

References: 75

Adres autorki: dr Ewa Augustin, Katedra Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, ul. G.Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: ewa.augustin@pg.gda.pl

Wykaz skrótów: **ARE** – sekwencja DNA będąca induktorem syntezy enzymów metabolizujących (antioxidant redox element); **Caco-2**, **LS180** – ludzkie komórki nowotworu okrężnicy (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells; intestinal human colon adenocarcinoma cells); **CHL** – nieśmiertelne komórki płuc chomika chińskiego (immortalize chinese hamster lung cells); **CHO** – komórki jajnika chomika chińskiego (chinese hamster ovary); **COS-1** – nieśmiertelne komórki nerki afrykańskiej małpy zielonej (immortalize monkey kidney cells); **CYP** – izoenzymy cytochromu P450 (cytochrome P450 superfamily); **HEK293** – ludzkie komórki embrionalne nerki (human embryonic kidney cells); **HepG2** – ludzkie komórki nowotworu wątroby (human hepatoma cells); **Hep3A4** – komórki nowotworu wątroby o podwyższonej ekspresji izoenzymu CYP3A4 (human hepatoma cells overexpressing CYP3A4); **HepaRG** – ludzkie komórki nowotworu wątroby (human hepatoma cells); **HLM** – ludzkie mikrosomy pochodzące z wątroby (human liver microsomes); **IGROV-1** – ludzkie komórki nowotworu jajnika (human ovarian cancer cells); **LLC-PK1** – świńskie komórki nabłonkowe (pig kidney epithelial cells); **MCF-7/ARE** – ludzkie komórki raka piersi z podwyższoną ekspresją sekwencji ARE (human breast adenocarcinoma cells overexpressing ARE); **V79** – fibroblasty pochodzące z płuc chomika chińskiego (chinese hamster lung fibroblast).

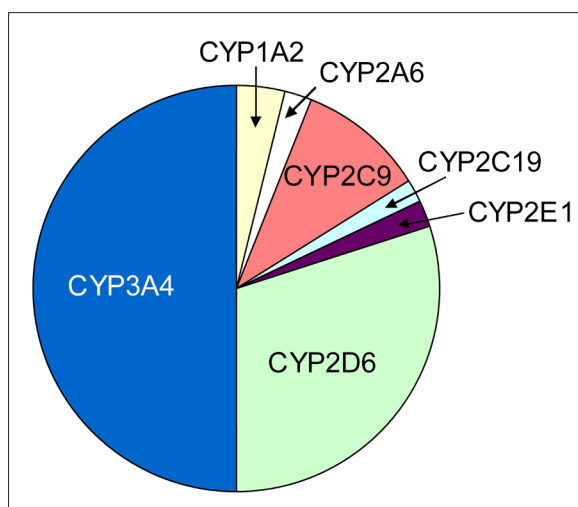
WPROWADZENIE

W organizmie większość stosowanych leków ulega przemianom metabolicznym prowadzącym do ich aktywacji lub detoksykacji. Metabolizm aktywacyjny może spowodować przejście proleku do jego aktywnej postaci terapeutycznej lub będzie odpowiedzialny za wywołanie lub zwiększenie działania toksycznego. Z kolei przemiany detoksykacyjne mogą być odpowiedzialne za zmniejszenie efektów toksycznych, lecz także za osłabienie działania terapeutycznego. Z tego powodu badanie metabolizmu leków oraz aktywności i ekspresji enzymów metabolizujących leki odgrywa główną rolę w określeniu ich właściwości terapeutycznych. W ramach tych badań należy również uwzględnić wzajemne interakcje lek–lek oraz różnice genetyczne (np. polimorfizm) poszczególnych pacjentów. Interakcje lek–lek obserwowane w terapii wielolekowej wynikają z możliwości modulacji poziomu i ekspresji białek enzymatycznych przez jeden z leków, co powoduje zmianę metabolizmu innych stosowanych leków [40]. Natomiast w wyniku polimorfizmu genów, ekspresja białek metabolizujących może być różna u każdego pacjenta. Mamy więc do czynienia ze skomplikowanymi procesami regulacji aktywności enzymatycznej i ekspresji genów

enzymów metabolizujących, które wpływają na końcowy efekt działania leku [35,67].

Głównymi enzymami zaangażowanymi w metabolizm leków, zarówno aktywacyjny jak i detoksykacyjny, są białka cytochromu P450. Uważa się, że są one odpowiedzialne za transformację niemal 75% stosowanych w leczeniu chemioterapeutyków [26]. Białka cytochromu P450 tworzą dużą nadrodzinę enzymów zawierających w swej strukturze grupę hemową. Są one zaangażowane w oksydacyjny metabolizm wielu różnorodnych pod względem swej budowy i właściwości związków endogennych, takich jak steroidy i kwasy tłuszczowe oraz egzogennych, do których należą związki ksenobiotyczne: leki, toksyny i związki kancerogenne. Enzymy cytochromu P450 katalizują różne reakcje chemiczne, np.: monooksygenacja, peroksydacja, redukcja, dealkilacja, epoksydacja lub dehalogenacja. Reakcje te prowadzą do powstania pochodnych bardziej polarnych, które mogą być bezpośrednio usunięte z organizmu lub dalej być wiązane przez enzymy II fazy metabolizmu. Do tej pory w organizmie człowieka zidentyfikowano 17 grup izoenzymów cytochromu P450 (CYP), kodowanych przez 57 genów funkcjonalnych i 58 pseudogenów. Stwierdzono, że jedynie trzy główne grupy





Ryc. 1. Udział izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie leków (na podstawie [68], zmodyfikowano)

izoenzymów CYP zaangażowane są w metabolizm leków i ksenobiotyków: CYP1, CYP2 oraz CYP3 [55,74,75]. Są one odpowiedzialne za oksydacyjny metabolizm 78% leków przyjmowanych przez człowieka. Izoformami CYP, które najczęściej biorą udział w transformacjach związków są: CYP1A2 (4%), CYP2A6 (2%), CYP2C9 (10%), CYP2C19 (2%), CYP2E1 (2%), CYP2D6 (30%) i CYP3A4 (50%) (ryc. 1) [26,54,55]. Pozostałe grupy izoenzymów odpowiadają za metabolizm związków endogennych, odgrywając istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. Przypuszcza się, że produkty pseudogenów mogą spełniać funkcje regulacyjne podobnie jak RNAi [55].

Wobec powyższych faktów, komórkowe systemy ekspresji cytochromów P450 kilku ważnych podrodzin: CYP1A2, CYP2C19 i CYP3A4 odgrywają główną rolę w badaniach wpływu leków na aktywność enzymatyczną innych leków, a także wpływu poziomu ekspresji enzymów metabolizujących na przebieg innych procesów ważnych dla życia komórki. Zastosowanie komórek o stabilnej lub przejściowo zmiennej ekspresji cytochromów P450 jest szczególnie istotne w badaniach związków przeciwnowotworowych, w których jednym z kierunków badań jest terapia indywidualna poszczególnych pacjentów różniących się osobniczym poziomem ekspresji i aktywności enzymów metabolizujących.

Istnieje kilka systemów *in vitro* stosowanych do badania metabolizmu leków i ich wpływu na ekspresję enzymów metabolizujących. W praktyce stosuje się: mikrosomy wyizolowane z ludzkiej wątroby (human liver microsomes HLM), frakcję cytosolową oraz frakcję S9 ludzkiej wątroby, a także hepatocyty, głównie pierwotne ludzkie hepatocyty. Każdy z tych systemów ma jednak swoje wady. Najlepsze wyniki osiąga się wykorzystując pierwotne hepatocyty, które w pełni pozwalają odtworzyć szlaki biotransformacji, jakim podlega lek w organizmie chorego. Jednak krótki czas życia oraz genetyczna niestabilność pierwotnych hepatocytów (spadek ekspresji enzymów CYP) uniemożliwiają prowadzenie badań w szerszym zakresie. Z kolei w wyizolowanych komórkach wątroby lub mikrosomach nie zawsze dochodzi do ekspresji wszystkich enzymów metabolizujących lub ich poziom jest zbyt niski, by efektywnie badać ich rolę [31]. Powszechnym stało się

zatem stosowanie stabilnych linii komórek nowotworowych [24,60].

Najczęściej stosowanymi liniami komórkowymi otrzymanymi z ludzkich nowotworów są: linia HepG2, wyprowadzona z nowotworu wątroby, linia IGROV-1, wyprowadzona z nowotworu jajnika oraz dwie linie wyprowadzone z nowotworu okrężnicy: Caco-2 i LS180 [6]. Jednak poziom ekspresji izoenzymów cytochromu P450 w tych komórkach, zwłaszcza w HepG2, jest stosunkowo niski [66]. Od niedawna coraz częściej stosowaną linią komórkową w badaniach nad metabolizmem i toksycznością leków jest linia HepaRG [36]. Została ona wyprowadzona z komórek wątroby chorej na raka wątroby i charakteryzuje się wysoką ekspresją najważniejszych izoenzymów cytochromu P450 (CYP1A2, 2B6, 2D6, 2E1, 3A4) oraz enzymów zaangażowanych w II fazę metabolizmu leków i białek transportujących z rodziny ABC [24,36].

Otrzymano również komórki nowotworowe, w których uzyskano nadekspresję białek cytochromu P450 [24]. Niżej przedstawiono opracowane i opisane dotychczas w literaturze modele komórkowe, w których udało się osiągnąć nadekspresję białek CYP: bakterie, drożdże, komórki owadów oraz komórki ssaków, w tym ludzkie [55].

PIERWSZE MODELE KOMÓRKOWE O STABILNEJ EKSPRESJI LUDZKICH BIAŁEK CYP

Do badania metabolizmu leków wygodnym modelem są rekombinantowe izoenzymy cytochromu P450. Otrzymuje się je stosując modele komórkowe jako systemy ekspresyjne, do których należą: bakterie, drożdże, komórki owadów oraz ssaków.

Pierwszymi modelami komórkowymi, jakie posłużyły do otrzymania rekombinantowych enzymów cytochromu P450, były komórki bakteryjne. Później zastosowano również komórki drożdżowe i owadzie. Wadą tych systemów jest to, że w nieco inny sposób niż w komórkach ludzkich przebiegają w nich procesy transkrypcji, translacji oraz potranslacyjna modyfikacja białka. Ponadto poziom pozostałych enzymów metabolizujących leki jest również inny bądź zmieniony. Niekiedy należy wprowadzić do nich dodatkowe geny, których brak jest w transfekowanym systemie ekspresyjnym [55]. Mimo wielu niedoskonałości bakteryjnych modeli komórkowych, z powodzeniem przeprowadzono na nich wiele badań dotyczących metabolizmu leków i co więcej, w dalszym ciągu stosuje się je do izolacji rekombinantowych enzymów cytochromu P450 oraz UDP-glukuronylotransferaz [31].

BAKTERIE

Escherichia coli jest szczepem bakterii, który najczęściej służy jako model komórkowy do transfekcji. Inny gatunek bakterii, który stosuje się jako system ekspresyjny to *Salmonella typhimurium* [37]. Dzięki zastosowaniu bakteriofagów – wirusów atakujących bakterie, do komórek tych bakterii można łatwo wprowadzać różne rodzaje wektorów o silnych promotorach. Cały proces transfekcji komórek, aż do osiągnięcia stabilnej ekspresji wprowadzanego białka, jest stosunkowo szybki – trwa około 3 miesięcy i jest również mało kosztowny [54]. Podobnie utrzymanie

hodowli komórkowej nie wymaga wysokich nakładów finansowych. Komórki rosną szybko w zawiesinie o dużej gęstości i w standardowych mediach hodowlanych [27,30], do której należy jedynie dodać prekursor hemu, niezbędny do katalitycznej aktywności białek cytochromu P450 [73]. Izolację i oczyszczanie białek CYP można przeprowadzić w łatwy sposób [27]. Główną wadą tego systemu ekspresyjnego jest to, że potranslacyjna modyfikacja białek cytochromu P450 przebiega inaczej niż w komórkach ludzkich. Wymagana jest tutaj modyfikacja N-terminalnej sekwencji białka (zwiększenie zawartości par AT) [23,73]. Modyfikacja ta zapobiega formowaniu się drugorzędowych struktur, co również zwiększa rozpuszczalność białek [23]. Podczas hodowli komórek należy zapewnić odpowiednią temperaturę i pH w celu inkorporacji hemu i prawidłowego fałdowania się białka. Z kolei do osiągnięcia katalitycznej aktywności białek cytochromu P450 w bakteriach, niezbędne jest wprowadzanie dodatkowych wektorów z genami kodującymi białka odpowiedzialne za transfer elektronów – reduktazę cytochromu P450 oraz cytochrom b5. Wykazano również, że ekspresja białek CYP w komórkach *E. coli* zachodzi lepiej przy zapewnieniu niższego stężenia tlenu (poniżej 1%) podczas hodowli [63], a aktywność katalityczna izoenzymów jest wyższa przy dodatku egzogennej reduktazy cytochromu P450 [71]. Komórki bakterii posłużyły jako system ekspresji następujących ludzkich białek cytochromu P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 [23, 71].

DROŹDŻE

Komórki drożdży, to kolejny system ekspresyjny, w którym udało się uzyskać stabilną i bardzo wydajną ekspresję ludzkich białek cytochromu P450. Gatunki, które poddaje się transfekcji to: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* lub *Yarrowia lipolytica* (też należący do rodzaju *Saccharomyces*). Drożdżowy model ma więcej zalet niż opisany wcześniej system bakteryjny. Proces transfekcji przebiega tutaj również szybko (około 3 miesiące), a hodowla komórek oraz izolacja rekombinantowego białka nie sprawiają większej trudności. Synteza białka, jego fałdowanie i usytuowanie w błonie przebiegają identycznie jak w komórkach ssaków. Dzięki endogennej błonowej sekwencji kotwiczącej białko zostaje zintegrowane z retikulum endoplazmatycznym. Co więcej, nie jest wymagana modyfikacja N-terminalnej sekwencji cDNA kodującego białko, jak w systemie bakteryjnym. Mikrosomy otrzymane z drożdży są bogate w enzymy cytochromu P450 [12]. Główną wadą drożdżowego systemu ekspresyjnego jest to, że w tych komórkach ekspresja endogennych białek transferu elektronów, czyli reduktazy cytochromu P450 oraz cytochromu b5 zachodzi na zbyt niskim poziomie, by doszło do katalitycznej aktywacji białek CYP. Podobnie jak w systemie bakteryjnym, również do komórek drożdży wprowadza się dodatkowy plazmid kodujący te białka. Niezbędne jest także wzbogacenie podłoża hodowlanego w prekursor hemu [12].

Mimo wielu zalet drożdże, w porównaniu do bakterii, są mniej powszechnym modelem komórkowym wykorzystywanym do ekspresji ludzkich białek cytochromu P450. Przyczyną tego może być to, iż hodowla bakterii oraz ich transfekcja jest mniej skomplikowana oraz wymaga

mniejszych nakładów finansowych niż hodowla drożdży. Ponadto bakterie nie mają endogennych enzymów cytochromu P450, a ekspresja rekombinantowych CYP-ów zachodzi na wyższym poziomie niż w drożdżach [1,58]. Co więcej, w przeciwieństwie do komórek drożdży, komórki bakterii można zastosować do produkcji rekombinantowych ludzkich białek cytochromu P450 na dużą skalę preparatywną, zarówno w badaniach biooksydacyjnych, jak i w produkcji metabolitów [30]. Wiele zespołów naukowych na świecie stosuje ten model ekspresyjny także do badania metabolizmu leków. W komórkach drożdży osiągnięto ekspresję m.in. następujących ludzkich białek CYP: CYP1A1 [72], CYP1A2 [28], CYP2A6, CYP2B6 [72], CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 [50,72], CYP2D6 [72], CYP2E1 [29] oraz CYP3A4 [1,12,50,72].

KOMÓRKI OWADZIE

Model ekspresyjny owadzi jest nieco mniej powszechny w produkcji mikrosomów bogatych w białka cytochromu P450 niż wcześniej przedstawione systemy: bakteryjny i drożdżowy. W odróżnieniu od systemów bakteryjnego i drożdżowego, komórki owadów nie mogą być wykorzystane na skalę preparatywną, a jedynie analityczną. Zalety stosowania komórek owadzi są podobne jak w przypadku komórek drożdżowych. Gen kodujący białka cytochromu P450 wprowadza się z użyciem bakulowirusa, a jego inkorporacja zachodzi w prawidłowym miejscu we wnętrzu komórki gospodarza. Sama transfekcja jest łatwa i szybka – trwa 2-3 mies. Komórki owadzie, które najczęściej używa się do transfekcji to: *Spodoptera frugiperda* (Sf9) lub *Trichoplusia ni* (T.ni). W komórkach owadzi ekspresja białka przebiega podobnie jak w komórkach ludzkich, stąd nie jest wymagana modyfikacja sekwencji cDNA [44]. Poziom ekspresji białek cytochromu P450 jest analogiczny jak we wcześniej opisanych systemach [8]. Co więcej, komórki owadzie są pozbawione endogennych białek cytochromu P450, a to zwiększa skuteczność badań nad metabolizmem leków w tym systemie [31]. Podobnie jak w systemie bakteryjnym i drożdżowym, główną wadą modelu komórkowego opartego na bakulowirusie jest niski poziom endogennych enzymów transferu elektronów, np. reduktazy cytochromu P450. Problem ten rozwiązano wprowadzając do komórki owadziej drugi wektor niosący gen tego enzymu lub tworząc jeden podwójny wektor, zawierający izoenzym i reduktazę cytochromu P450 [15]. Do pożywki hodowlanej dodaje się prekursor hemu, lecz mimo to, w części populacji komórek owadzi może brakować apoproteiny w strukturze hemu [64]. Korzekwa i wsp. jako pierwsi opracowali komórki owadzie z ludzkimi białkami cytochromu P450 [8]. Z kolei firma Gentest (Woburn, USA) stworzyła komórki owadzie z następującymi ludzkimi białkami cytochromu P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A5, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2E1 [38,51]. Handlowa nazwa tych mikrosomów to Supersome™.

SSACZE MODELE KOMÓRKOWE O PODWYŻSZONEJ EKSPRESJI BIAŁEK CYTOCHROMU P450

Pierwsze komórki ssacze o podwyższonej ekspresji białek cytochromu P450 opracowano w 1986 r. w USA, pod kierunkiem M. Watermana [25]. Model komórkowy jaki poddano transfekcji to nieśmiertelne komórki



nerki pochodzące od afrykańskiej małpy zielonej o nazwie COS-1. W genomie tych komórek znajduje się materiał genetyczny małpiego wirusa SV40, dzięki czemu łatwiej ulegają one transformacji tym właśnie wirusem. Od tamtej pory udało się stworzyć wiele innych ssaczych, w tym ludzkich, linii komórkowych o podwyższonej ekspresji białek cytochromu P450.

Główną zaletą każdego systemu ssaczego jest to, że powstające w nim białko ma budowę taką jak w komórce ludzkiej. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy pozwalają na odpowiednie umiejscowienie białek cytochromu P450 w retikulum endoplazmatycznym. Są tam obecne enzymy odpowiedzialne za transfer elektronów, a także te biorące udział w II fazie metabolizmu. Dzięki temu można badać transformację leków, ich toksyczność i wpływ na procesy zachodzące w komórce. Nie jest wymagana dodatkowa transfekcja komórek wektorami zawierającymi geny kodujące reduktazę cytochromu P450 oraz cytochromu b5 [55], chociaż niektóre badania dowodzą, że dla lepszego funkcjonowania izoenzymów cytochromu P450 korzystne jest wprowadzenie egzogennej reduktazy [19,24]. Dzięki ludzkim transgenicznym liniom komórkowym można dokładnie śledzić pojedyncze reakcje przeprowadzane przez konkretny enzym. Pozwala to określić wpływ danego białka CYP na biotransformację leku i różnice w cytotoksyczności powstających metabolitów. Transgeniczne linie są przydatne w izolacji właściwych aktywnych metabolitów, do określenia ich struktury, charakterystyki farmakologicznej i możliwych interakcji lek-lek [31].

Obecnie stosowane metody transfekcji wykorzystują różne wirusy, m.in.: SV40 – do transfekcji komórek COS-1 czy CHO (nieśmiertelne komórki jajnika chomika chińskiego), wirus krowianki – do komórek HepG2 (ludzki nowotwór wątroby) lub wirus Epsteina-Barr – do ludzkich limfocytów B. Te ostatnie komórki stały się dobrym systemem do przemysłowej produkcji białek cytochromu P450 [55].

Tworzenie ssaczych systemów ekspresyjnych białek cytochromu P450 jest najtrudniejszą metodą spośród wszystkich opisanych wyżej modeli. Cały proces transfekcji trwa około 6 miesięcy, a jego koszty są stosunkowo wysokie, głównie ze względu na utrzymanie hodowli komórek (wysoka cena podłoża hodowlanych i odczynników do podtrzymania nadekspresji), co jest niewątpliwie wadą tego systemu ekspresyjnego [31,55]. Większość z opracowanych transgenicznych linii komórkowych jest jednak równie prosta w hodowli jak linie macierzyste, z których powstały [24]. Poziom ekspresji białek cytochromu P450 jest w ssaczym modelu komórkowym dużo niższy niż w systemach opisanych wcześniej. Z tego względu ssacze komórki nie są stosowane do produkcji izoenzymów na skalę komercyjną [55]. Poziom białek cytochromu P450 w transfekowanych liniach jest jednak wystarczająco wysoki, by można przeprowadzać na nich badania metabolizmu w warunkach laboratoryjnych.

KOMÓRKI COS

Jak już wspomniano wyżej, komórki COS były pierwszą ssaczą linią komórkową o podwyższonej ekspresji izoenzymów cytochromu P450. Najczęściej wykorzystuje się dwie linie: COS-1 i COS-7. Stosując te komórki udało się

stworzyć linię o zwiększonej ekspresji 17- α -hydroksylazy cytochromu P450 [25]. Pojawiło się również kilka doniesień na temat nadekspresji innych hydroksylaz cytochromu P450.

KOMÓRKI V79

Pierwsza publikacja przedstawiająca zastosowanie komórek chomika chińskiego jako systemu ekspresyjnego białek cytochromu P450 ukazała się w 1988 r. [20]. Komórki linii V79 to fibroblasty płuc chomika chińskiego, które zastosowano ze względu na łatwą i powszechnie wykonywaną w tych komórkach modyfikację genetyczną. Dodatkowo komórki te wprawdzie nie wykazują aktywności enzymatycznej cytochromu P450, lecz mają endogenną reduktazę cytochromu P450. Komórki V79 transfekowano za pomocą wektora pSV2 pozostającego pod kontrolą promotora wirusa SV40. Pierwsza linia rekombinantowa wykazywała ekspresję szczyrowego izoenzymu P-450IIB1 [20]. W następnych latach opracowano linie komórkowe V79 z ekspresją wielu ludzkich izoenzymów cytochromu P450, takich jak: CYP1A1 [42], CYP1B1 [41], CYP2D6 [5] i CYP3A4, CYP3A5 [52], CYP2E1 [47], które są stosowane w wielu laboratoriach.

KOMÓRKI CHO

Zespół T. Friedberga z Uniwersytetu w Dundee w Szkocji wykorzystał do transfekcji izoenzymami CYP również inny typ komórek chomika chińskiego – komórki linii CHO, wywodzące się z nieśmiertelnych komórek jajnika. Komórki te są powszechnie stosowane w przemyśle jako system ekspresyjny do produkcji wielu rodzajów białek, dzięki możliwości ich łatwej transfekcji.

Wspomniano wcześniej, że w komórkach ssaczych są obecne enzymy transferu elektronów. Wydawało się jednak, że mała aktywność metaboliczna białek cytochromu P450 wprowadzanych do komórek może wynikać z niewystarczającej ilości reduktazy, która przywraca równowagę do reakcji przeprowadzanych przez cytochrom P450. Z tego też względu postanowiono zwiększyć jej pulę wprowadzając egzogenną reduktazę [19]. Pierwsza opracowana transgeniczna linia komórkowa CHO wykazywała koekspresję ludzkiego izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 i NADPH reduktazy cytochromu P450 [19]. Opracowano również linie komórkowe wykazujące pojedynczą nadekspresję reduktazy cytochromu P450 lub izoenzymu CYP3A4. Stworzono także analogiczny system ekspresyjny w komórkach CHO dla izoenzymu CYP2D6 [61]. Wspomniane linie są nadal powszechnie stosowane [10,48]. W innych ośrodkach naukowych opracowano komórki CHO z nadekspresją następujących ludzkich izoenzymów cytochromu P450: CYP1A1 [3], CYP1A2 [49], CYP2A6, CYP2A13 [34].

KOMÓRKI CHL

Unieśmiertelnione komórki płuc chomika chińskiego – linia CHL, to kolejny przykład zastosowania tych komórek jako systemu ekspresyjnego białek cytochromu P450 [32]. Komórki CHL transfekowane były plazmidem pSR metodą koprecypitacji z fosforanem wapnia. Tutaj również, oprócz izoenzymów cytochromu P450, do komórek

wprowadzano dodatkowo reduktazę cytochromu P450 pochodzącą od świnki morskiej. W ten sposób uzyskano komórki CHL z koekspresją reduktazy cytochromu P450 z następującymi ludzkimi izoenzymami: CYP1A2, CYP2E1 [57], CYP3A4 [11, 32], CYP3A7 [32].

KOMÓRKI LLC-PK1

Kolejny model ekspresyjny białek cytochromu P450 to komórki LLC-PK1 – świńskie komórki nabłonkowe nerki, do których wprowadzono gen kodujący ludzki izoenzym CYP3A4. Komórki te wybrano do transfekcji ze względu na wysoką ekspresję białka oporności wielolekowej P-glikoproteiny (MDR1). Dzięki temu można było badać interakcje, jakie zachodzą między aktywnością białka CYP3A4 a MDR1. Za pomocą adenowirusa AdV, używając kilku różnych wektorów lub wirusa Epsteina-Barr z wektorem p220.2 z silnym promotorem wirusa CMV, wprowadzono do komórek LLC-PK1 gen *CYP3A4* [13,59], uzyskując bardzo wysoką i stabilną nadekspresję ludzkiego izoenzymu CYP3A4.

LUDZKIE LINIE Z NADEKSPRESJĄ BIAŁEK CYTOCHROMU P450

Dotąd opracowano niewiele ludzkich, w tym nowotworowych linii komórkowych wykazujących nadekspresję izoenzymów cytochromu P450. Ponieważ wiele z poszukiwanych obecnie nowych chemioterapeutyków ma oddziaływać specyficznie na komórki nowotworowe, wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu właśnie modeli linii nowotworowych. Najwięcej białek cytochromu P450 znajduje się w wątrobie. Powszechnie dostępna i stosowana linia wywodząca się z ludzkich komórek nowotworowych wątroby, HepG2 charakteryzuje się, jak już wyżej wspomniano, niskim poziomem i aktywnością enzymów metabolizujących, zwłaszcza izoenzymu CYP3A4 [66]. Stąd konieczne stało się poszukiwanie innych modeli i ich modyfikacja [24].

KOMÓRKI LIMFOBLASTYCZNE B

Pierwsza ludzka linia komórkowa wykazująca nadekspresję białek cytochromu P450 została wywodząca się z limfoblastów B [25]. Komórki limfoblastyczne B, zaprojektowane jako AHH⁻¹ TK^{+/+}, to nienowotworowe, nieprzyklejające się komórki, w których w łatwy sposób zachodzi replikacja wprowadzonych do chromosomów wektorów zawierających *origin* replikacji dla wirusa Epsteina-Barr. Komórki te zawierają pojedyncze kopie genów kinazy tymidynowej i fosforybozylotransferazy hipoksantynowej, dzięki czemu stały się idealne do badań toksykologicznych. Dodatkowo w komórkach AHH⁻¹ TH^{+/+} znajduje się odpowiedni poziom reduktazy cytochromu P450 i cytochromu b5 wspomagających katalityczne działanie cytochromu P450. Do genomu transfekowanej komórki może zostać włączonych 5–40 kopii obcego cDNA. W związku z różną liczbą kopii DNA wprowadzanych białek cytochromu P450 rekombinantowe komórki limfoblastów B są niejednorodne, a cały proces transfekcji, aż do osiągnięcia stabilnej linii, jest długotrwały i żmudny [14].

Wykorzystując wyżej przedstawioną technikę, opracowano komórki limfoblastów B o podwyższonej ekspresji następujących ludzkich izoenzymów: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1

i CYP3A4. Do komórek wprowadzono dodatkowo gen kodujący mikrosomalną hydroksylazę epoksydową. Udało się otrzymać komórki wykazujące nadekspresję nie tylko pojedynczego białka cytochromu P450, lecz również ich kombinacji [14]. Komórki te służą zarówno jako źródło mikrosomów [62], jak i model komórkowy, na którym prowadzi się badania metabolizmu ksenobiotyków [4].

KOMÓRKI AD-293 (HEK293)

Linia wywodząca się z ludzkich komórek embrionalnych nerki, HEK293 to popularna nienowotworowa ludzka linia komórkowa, szeroko stosowana jako system ekspresyjny białek cytochromu P450. Z czasem zmodyfikowano tę linię, zwiększając jej właściwości adherentne, tworząc linię AD-293. Dzięki obecności genu *E1* adenowirusa komórki linii AD-293, podobnie jak HEK293, łatwo ulegają modyfikacjom genetycznym. Do transfekcji wykorzystuje się zatem wektory powstałe na bazie adenowirusów pozbawionych genu *E1*, np. pAd, pMT2 czy pSVL [9].

W 1997 r. przeprowadzono pierwsze doświadczenia na rekombinantowej linii AD-293 [43], która wykazywała stabilną nadekspresję izoenzymów CYP3A4 oraz CYP3A7. Do transfekcji wykorzystano plazmidy pMT2 mające w swojej sekwencji geny kodujące wspomniane białka cytochromu P450. Jako czynnik selekcyjny wprowadzono do nich gen kodujący genetycynę G418. Do wprowadzenia wektora zastosowano metodę precypitacji z fosforanem wapnia. W późniejszych latach opracowano kolejne stabilne linie AD-293 o nadekspresji różnych ludzkich izoenzymów cytochromu P450, takich jak: CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9. Ponownie stworzono linie komórkowe z nadekspresją białek CYP3A4 i CYP3A7, a także CYP3A5, tym razem w koekspresji z reduktazą cytochromu P450. Podwójną nadekspresję uzyskano dzięki wprowadzeniu drugiego plazmidu z cDNA kodującego reduktazę przy zastosowaniu analogicznej metody [56]. Stworzono również linię komórkową HEK293 o podwójnej nadekspresji ludzkiego izoenzymu CYP2B1 i reduktazy cytochromu P450. Jako wektora użyto plazmid pMVCV, a jako czynnika selekcyjnego genetycynę [45].

KOMÓRKI Caco-2

Zróznicowane ludzkie komórki nowotworowe nabłonka odbytu Caco-2, to jedna z najpopularniejszych ludzkich linii nowotworowych stosowana do badania leków – ich wchłaniania, transportu do wnętrza komórki oraz metabolizmu. W bazach danych można znaleźć stosunkowo największą publikacji opisujących doświadczenia wykonane na tej linii komórkowej. Ze względu jednak na niski poziom endogennych białek cytochromu P450, podjęto próbę wprowadzenia dodatkowych kopii genów poszukiwanych enzymów [46]. Po raz pierwszy dwie transgeniczne linie Caco-2 opisano w 1996 r.: z nadekspresją izoenzymu CYP2A6 oraz CYP3A4. Rolę wektora pełnił plazmid p220.2 z *origin* replikacji dla wirusa Epsteina-Barr zawierający cDNA wspomnianych enzymów pozostających pod kontrolą promotora wirusa cytomegalii. Oprócz sekwencji kodujących białka cytochromu P450, plazmidy te zawierały gen oporności na higromycynę B, dzięki czemu w łatwy sposób można było wyselekcjonować komórki rekombinantowe. Do wnętrza komórek wektory wprowadzono za



pomocą elektroporacji [16]. Stosując wyżej opisaną technikę uzyskano stabilną nadekspresję izoenzymów CYP2A6 i CYP3A4 w ludzkich nowotworowych komórkach Caco-2. W porównaniu do limfoblastów B, komórki Caco-2 charakteryzują się nieco niższą aktywnością CYP3A4. Ze względu na brak stabilności cech związanych z transportem leków do wnętrza komórki, wspomniana linia komórkowa nie jest już obecnie tak powszechnie stosowana [7,17]. Dostępna jest również linia Caco-2 z nadekspresją izoenzymu CYP3A4, do wytworzenia której wykorzystano metodę przedstawioną dla systemu komórek LLC-PK1, gdzie wektorem był adenowirus AdV [59].

KOMÓRKI HEPG2

Do badań metabolizmu i toksyczności leków przez długi czas stosowano ludzkie komórki nowotworowe wątroby HepG2. Ze względu jednak na stosunkowo niski poziom izoenzymów cytochromu P450, a zwłaszcza CYP3A4 [66], komórki tej linii zmodyfikowano, wprowadzając do nich sekwencje cDNA kodujące białka cytochromu P450. Pierwszą opracowaną transgeniczną linią komórkową HepG2 była linia E47, wykazująca stabilną i wysoką nadekspresję izoenzymu CYP2E1 [69]. Do transfekcji zastosowano plazmid pCl-neo z promotorem wirusa cytomegalii. W swojej sekwencji wektor ten zawierał gen kodujący enzym CYP2E1 oraz gen oporności na genetycyne, który został wykorzystany jako czynnik selekcyjny do izolacji rekombinantowych komórek. Wektor wprowadzono za pomocą metody z zastosowaniem lipofektaminy. Dla linii E47 opracowano także linię odnośnikową z tzw. wektorem zerowym – komórki C34, gdzie do komórek HepG2 wprowadzono wektor pozbawiony jakiegokolwiek białka. Dzięki temu, przy porównywaniu wyników toksyczności eliminowano wpływ samego procesu transfekcji komórek [69]. Kolejną opracowaną linią komórkową, Hep3A4, charakteryzowała się podwyższoną ekspresją izoenzymu CYP3A4. cDNA kodujący białko CYP3A4 wprowadzono do komórek HepG2 analogicznie jak przy tworzeniu komórek E47 [22]. Opisane wyżej linie są szeroko stosowane przez różne laboratoria na całym świecie [39,70].

Wykorzystując inną metodę transfekcji, a mianowicie stosując wektor pcDNA3.1 zawierający gen oporności na genetycyne jako marker selekcyjny, opracowano kilka linii komórkowych HepG2 z nadekspresją następujących białek CYP: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2E1 oraz 3A4. Wektor wprowadzono do komórek HepG2 dzięki lipofektaminie. Skonstruowano również tzw. linię kontrolną, do której wprowadzono pusty wektor pcDNA3.1 [33].

Ciekawą strategię czasowej transfekcji komórek HepG2 egzogennymi białkami cytochromu P450 przedstawiła grupa naukowców z Hiszpanii. Opracowali oni adenowirusy zawierające w swym materiale genetycznym odpowiednie ludzkie izoenzymy cytochromu P450. Wektory te bardzo szybko wnikały do wnętrza komórek wątroby, gdzie ich DNA ulega ekspresji. Nadekspresja białek CYP utrzymuje się w komórkach przez 3–4 dni. Proces transfekcji jest mało skomplikowany i szybki, choć należy go powtarzać przy każdym kolejnym doświadczeniu. W ten sposób otrzymano adenowirusy z następującymi ludzkimi izoenzymami cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C9 i CYP3A4 [21].

KOMÓRKI 1847

Kolejny przykład zastosowania ludzkich nowotworowych linii komórkowych do ekspresji białek cytochromu P450 to linia wywodząca się z komórek nowotworowych jajnika o nazwie 1847 [2]. Wybrano te komórki ze względu na obecność klonu opornego na działanie palitakselu, w którym w naturalny sposób doszło do nadekspresji białka oporności wielolekowej P-glikoproteiny. Transfekcji poddano komórki linii dzikiej o niskiej ekspresji genu *MDR1*, a także linii wykazującej nadekspresję. Do komórek wprowadzono gen kodujący izoenzym CYP3A4 oraz reduktazę cytochromu P450. Zastosowana metoda transfekcji była analogiczna, jak opisana wyżej przy tworzeniu linii CHO-HR-3A4 [19]. Dzięki takiemu modelowi komórek można było badać oddziaływanie między białkami oporności wielolekowej a izoenzymem CYP3A4, których ekspresja jest ze sobą powiązana przez wspólny czynnik jądrowy, PXR [2].

KOMÓRKI MCF-7/ARE

Ciekawą i obiecującą ludzką nowotworową linią komórkową do badania wpływu białek cytochromu P450 na metabolizm i toksyczność chemioterapeutyków jest linia wywodząca się z komórek raka piersi, MCF-7 wykazująca podwyższoną ekspresję sekwencji ARE (antioxidant redox element) oraz czynnika 2 NF-E2 zależnego od p45 (Nrf2). Elementy ARE, to sekwencje DNA znajdujące się w obrębie promotora, funkcjonujące jako induktory ekspresji białek. Za indukcję białek odpowiada czynnik Nrf2. Badania wykazały, że przy podwyższonej ekspresji białka Nrf2 zachodzi indukcja ekspresji enzymów metabolizujących zawierających w sekwencji promotora element ARE. Dzięki takiemu mechanizmowi przede wszystkim zwiększa się poziom enzymów eliminujących reaktywne formy tlenu (ROS). Może również dojść do stymulacji ekspresji białek cytochromu P450. Wzrost indukcji ekspresji zależnej od elementu ARE można w komórkach linii MCF-7/ARE w łatwy sposób sprawdzać, dzięki obecności lucyferazy, której aktywność w tym przypadku jest zależna od poziomu czynnika Nrf2. Linia MCF-7/ARE stała się bardzo przydatnym modelem komórkowym do badania toksyczności leków przeciwnowotworowych [65].

W związku z tym, że w komórkach linii MCF-7/ARE w ułatwiony sposób dochodzi do ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm leków, komórki te wybrano do transfekcji genami kodującymi białka cytochromu P450. Izoenzymy, których nadekspresję udało się osiągnąć w omawianej linii komórkowej to: CYP1A1, CYP2A6, CYP2D6 oraz CYP3A4 w koekspresji z reduktazą cytochromu P450. Opracowano również linię, która jednocześnie wykazuje nadekspresję wszystkich wymienionych pięciu białek cytochromu P450. Zastosowanie tej linii komórkowej pozwala odróżnić toksyczność chemioterapeutyków zależną od funkcjonowania samej komórki oraz toksyczność wynikającą z aktywności enzymów cytochromu P450 [18].

PODSUMOWANIE

W procesie opracowywania nowych leków oraz ich wdrażania do kliniki niezbędne jest poznanie metabolizmu, jakiemu podlega proponowany związek. Różne szlaki biotransformacji mogą bowiem prowadzić do powstawania

metabolitów bardzo toksycznych dla organizmu i wywoływać niebezpieczne działanie. Dodatkowo, znajomość aktywnych postaci chemioterapeutyków okazać się może przydatna w projektowaniu nowych leków lub ulepszeniu już istniejących. Wiedza o metabolizmie danego leku może być również pomocna w przewidywaniu oddziaływań między stosowanymi jednocześnie chemioterapeutykami w terapiach wielolekowych.

W powyższych badaniach wykorzystywane są m.in. opisane w niniejszej pracy modele komórkowe stosowane jako systemy ekspresyjne białek cytochromu P450. Dzięki wspomnianym liniom komórkowym wykazano lub potwierdzono, że za metaboliczną aktywację irinotekanu [56], R-ifosfamidu [10] lub eliptycyny [53] odpowiada izoenzym CYP3A4. Dowiedziono, że popularny lek, jakim jest paracetamol (APAPM) powoduje spadek aktywności izoenzymu CYP3A4, co może mieć poważne konsekwencje przy stosowaniu kilku leków jednocześnie [22]. Dzięki transgenicznemu liniom komórkowym sprawdzono wpływ polimorfizmu izoenzymu CYP2D6 na metabolizm

kilku często stosowanych w klinice leków, m. in. tamoksyfenu, imipraminy czy buparalolu oraz związków będących w badaniach klinicznych. Wykazano, że właściwości katalityczne danej postaci polimorficznej CYP2D6 zależały od rodzaju substratu. Zatem zdolności metaboliczne pacjenta z określonym allelem genu CYP2D6 zmieniają się w zależności od stosowanego leku [5]. Z kolei mikrosomy bogate w izoenzym CYP2D6 otrzymane z transgenicznych komórek limfoblastycznych B zastosowano do badań nad metabolizmem pochodnych amfetaminy [62]. Linie komórkowe z nadekspresją izoenzymu CYP3A4 i białka oporności wielolekowej P-glikoproteiny posłużyły zaś do badania wzajemnych korelacji między wspomnianymi dwoma białkami, których ekspresja zależna jest od jednego wspólnego czynnika jądrowego. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 są bardzo przydatne do badania metabolizmu leków powszechnie stosowanych, a także tych wprowadzanych do kliniki. Stanowią bowiem czasami jedyną alternatywę dla badań roli cytochromu P450 w szlakach metabolizmu leków u chorych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Andrews J., Abd-Ellah M.F., Randolph N.L., Kenworthy K.E., Carlile D.J., Friedberg T., Houston J.B.: Comparative study of the metabolism of drug substrates by human cytochrome P450 3A4 expressed in bacterial, yeast and human lymphoblastoid cells. *Xenobiotica*, 2002; 32: 937–947
- [2] Baron J.M., Goh L.B., Yao D., Wolf C.R., Friedberg T.: Modulation of P450 CYP3A4-dependent metabolism by P-glycoprotein: implications for P450 phenotyping. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 296: 351–358
- [3] Bendaly J., Zhao S., Neale J.R., Metry K.J., Doll M.A., States J.C., Pierce W.M Jr., Hein D.W.: 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline-induced DNA adduct formation and mutagenesis in DNA repair-deficient chinese hamster ovary cells expressing human cytochrome P4501A1 and rapid or slow acetylator N-acetyltransferase 2. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007; 16: 1503–1509
- [4] Bodreddigari S., Jones L.K., Egner P.A., Groopman J.D., Sutter C.H., Roebuck B.D., Guengerich F.P., Kensler T.W., Sutter T.R.: Protection against aflatoxin B1-induced cytotoxicity by expression of the cloned aflatoxin B1-aldehyde reductases rat AKR7A1 and human AKR7A3. *Chem. Res. Toxicol.*, 2008; 21: 1134–1142
- [5] Bogni A., Monshouwer M., Moscone A., Hidestrand M., Ingelman-Sundberg M., Hartung T., Coecke S.: Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. *Toxicol. In Vitro*, 2005; 19: 621–629
- [6] Brandon E.F., Bosch T.M., Deenen M.J., Levink R., Van Der Wal E., Van Meerveld J.B., Bijl M., Beijnen J.H., Schellens J.H., Meijerman I.: Validation of *in vitro* cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (Caco-2, LS180) cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006; 211: 1–10
- [7] Budzinski J.W., Foster B.C., Trudeau V.L., Drouin C.E., Bafi-Yeboah N., Arnason J.T.: The interaction of selected phytochemicals, HIV drugs, and commercial-source herbal teas and capsules with human cytochrome P450 3A4 and p-glycoprotein. *Pharm. Biol.*, 2008; 46: 53–65
- [8] Buters J.T., Korzekwa K.R., Kunze K.L., Omata Y., Hardwick J.P., Gonzalez F.J.: cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug Metab. Dispos.*, 1994; 22: 688–692
- [9] Catalog information „AD-293 cells” Stratagene – An Agilent Technologies Company
- [10] Chen C.S., Jounaidi Y., Waxman D.J.: Enantioselective metabolism and cytotoxicity of R-ifosfamide and S-ifosfamide by tumor cell-expressed cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.*, 2005; 33: 1261–1267
- [11] Chen J., Yang X.X., Huang M., Hu Z.P., He M., Duan W., Chan E., Sheu F.S., Chen X., Zhou S.F.: Small interfering RNA-mediated silencing of cytochrome P450 3A4 gene. *Drug Metab. Dispos.*, 2006; 34: 1650–1657
- [12] Cheng J., Wan D., Gu J., Gong Y., Yang S., Hao D., Yang L.: Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: Application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s *in vitro*. *Protein Expr. Purif.*, 2006; 47: 467–476
- [13] Crespi C.L., Fox L., Stocker P., Hu M., Steimel D.T.: Analysis of drug transport and metabolism in cell monolayer systems that have been modified by cytochrome P4503A4 cDNA-expression. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000; 12: 63–68
- [14] Crespi C.L., Langenbach R., Penman B.E.: Human cell lines, derived from AHH-1 TK+/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology*, 1993; 82: 89–104
- [15] Crespi C.L., Penman B.W.: Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug–drug interactions. *Adv. Pharmacol.*, 1997; 43: 171–188
- [16] Crespi C.L., Penman B.W., Hu M.: Development of Caco-2 cells expressing high level of cDNA-derived cytochrome P4503A4. *Pharm. Res.*, 1996; 13: 1635–1641
- [17] Cummins C.L., Jacobsen W., Christians U., Benet L.Z.: CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004; 308: 143–155
- [18] Ding S., Vardy A., Elcombe C.R., Wolf C.R.: An *in vitro* model for the prediction of chemical metabolism and toxicity. *Toxicology*, 2009; 262: 23
- [19] Ding S., Yao D., Burchell B., Wolf C.R., Friedberg T.: High levels of recombinant CYP3A4 expression in chinese hamster ovary cells are modulated by coexpressed human P450 reductase and hemin supplementation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997; 348: 403–410
- [20] Doehmer J., Dogra S., Friedberg T., Monier S., Adesnik M., Glatt H., Oesch F.: Stable expression of rat cytochrome P-45011B1 cDNA in chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 5769–5773
- [21] Donato M.T., Hallifax D., Picazo L., Castell J.V., Houston J.B., Gomez-Lechó M.J., Lahoz A.: Metabolite formation kinetics and intrinsic clearance of phenacetin, tolbutamide, alprazolam, and midazolam in adenoviral cytochrome P450-transfected HepG2 cells and comparison with hepatocytes and *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.*, 2010; 38: 1449–1455
- [22] Feerman D.E., Melnikov Z., Zhang J.: The paradoxical effect of acetaminophen on CYP3A4 activity and content in transfected HepG2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002; 398: 109–117
- [23] Gillam E.M.: Engineering cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, 2008; 21: 220–231
- [24] Gomez-Lechon M.J., Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V.: Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Curr. Drug. Metab.*, 2008; 9: 1–11
- [25] Gonzalez F.J., Korzekwa K.R.: Cytochromes P450 expression systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1995; 35: 369–390



- [26] Guengerich F.P.: Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity AAPS J., 2006; 8: E101–E111
- [27] Guengerich F.P., Martin M.V.: Purification of cytochromes P450: products of bacterial recombinant expression systems. *Methods Mol. Biol.*, 2006; 320: 31–37
- [28] Guo Y., Breeden L.L., Fan W., Zhao L.P., Eaton D.L., Zarbl H.: Analysis of cellular responses to aflatoxin B1 in yeast expressing human cytochrome P450 1A2 using cDNA microarrays. *Mutat. Res.*, 2006; 593: 121–142
- [29] Hanioka N., Yamamoto M., Tanaka-Kagawa T., Jinno H., Narimatsu S.: Functional characterization of human cytochrome P450 2E1 allelic variants: *in vitro* metabolism of benzene and toluene by recombinant enzymes expressed in yeast cells. *Arch. Toxicol.*, 2010; 84: 363–371
- [30] Hanlon S.P., Friedberg T., Wolf C.R., Ghisalba O., Kittelmann M.: Recombinant yeast and bacteria that express human P450s: bioreactors for drug discovery, development, and biotechnology. W: *Modern Biooxidation: Enzymes, Reactions and Applications*, red.: R.D. Schmid, V.B. Urlacher. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany, 2007, 231–252
- [31] Hariparsad N., Sane R.S., Strom S.C., Desai P.B.: *In vitro* methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol. In Vitro*, 2006; 20: 135–153
- [32] Hashimoto H., Nakagawa T., Yokoi T., Sawada M., Itoh S., Kamataki T.: Fetus-specific CYP3A7 and adult-specific CYP3A4 expressed in chinese hamster CHL cells have similar capacity to activate carcinogenic mycotoxins. *Cancer Res.*, 1995; 55: 787–791
- [33] Hashizume T., Yoshitomi S., Asahi S., Uematsu R., Matsumura S., Chatani F., Oda H.: Advantages of human hepatocyte-derived transformants expressing a series of human cytochrome p450 isoforms for genotoxicity examination. *Toxicol. Sci.*, 2010; 16: 488–497
- [34] He X.Y., Tang L., Wang S.L., Cai Q.S., Wang J.S., Hong J.Y.: Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 2A13, an enzyme predominantly expressed in human respiratory tract. *Int. J. Cancer*, 2006; 118: 2665–2671
- [35] Ingelman-Sundberg M., Sim S.C., Gomez A., Rodriguez-Antona C.: Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, 2007; 116: 496–526
- [36] Josse R., Aninat C., Glaize D., Dumont J., Fessard V., Morel F., Poul J.M., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A.: A long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.*, 2008; 36: 1111–1118
- [37] Kamataki T.: Genetic polymorphism of CYP2A6 and tobacco-related cancer risk: from the establishment of genetically engineered *Salmonella* to large scale epidemiology. *Genes Environ.*, 2006; 28: 77–83
- [38] Kazui M., Nishiyama Y., Ishizuka T., Hagihara K., Farid N.A., Okazaki O., Ikeda T., Kurihara A.: Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab. Dispos.*, 2010; 38: 92–99
- [39] Koch O.R., Fusco S., Ranieri S.C., Maulucci G., Palozza P., Larocca L.M., Cravero A.A., Farre' S.M., De Spirito M., Galeotti T., Pani G.: Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage. *Lab. Invest.*, 2008; 88: 750–760
- [40] Kumar G.N., Surapaneni S.: Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med. Res. Rev.*, 2001; 21: 397–411
- [41] Kushman M.E., Kabler S.L., Ahmad S., Doehmer J., Morrow C.S., Townsend A.J.: Cytotoxicity and mutagenicity of dibenzo[a,h]pyrene and (\pm)-dibenzo[a,h]pyrene-11,12-dihydrodiol in V79MZ cells co-expressing either hCYP1A1 or hCYP1B1 together with human glutathione-S-transferase A1. *Mutat. Res.*, 2007; 624: 80–87
- [42] Kushman M.E., Kabler S.L., Ahmad S., Doehmer J., Morrow C.S., Townsend A.J.: Protective efficacy of hGSTM1-1 against B[a]P and (+) or (–)-B[a]P-7,8-dihydrodiol cytotoxicity, mutagenicity, and macromolecular adducts in V79 cells coexpressing hCYP1A1. *Toxicol. Sci.*, 2007; 99: 51–57
- [43] Lacroix D., Sonnier M., Moncion A., Cheron G., Cresteil T.: Expression of CYP3A in the human liver: evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur. J. Biochem.*, 1997; 247: 625–634
- [44] Lee C.A., Kost T.A., Serabjit-Singh C.J.: Recombinant baculovirus strategy for coexpression of functional human cytochrome P450 and P450 reductase. *Methods Enzymol.*, 1996; 272: 86–95
- [45] Lengler J., Omann M., Duvier D., Holzmüller H., Gregor W., Salmons B., Gunzburg W.H., Renner M.: Cytochrome P450 reductase dependent inhibition of cytochrome P450 2B1 activity: implications for gene directed enzyme prodrug therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 72: 893–901
- [46] Li J., Hidalgo I.J.: The evolving role of the Caco-2 cell model to estimate intestinal absorption potential and elucidate transport mechanisms. W: *The Process of New Drug Discovery and Development*, Second Edition, red. C.G. Smith, J.T. O'Donnell. Informa Healthcare, USA 2006, 161–186
- [47] Liu Y., Glatt H.: Human cytochrome P450 2E1 and sulfotransferase 1A1 coexpressed in chinese hamster V79 cells enhance spontaneous mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2010; 51: 23–30
- [48] Lu H., Chen C.S., Waxman D.J.: Potentiation of methoxymorpholinyl doxorubicin anti-tumor activity by P450 3A4 gene transfer. *Cancer Gene Ther.*, 2009; 16: 393–404
- [49] Metry K.J., Zhao S., Neale J.R., Doll M.A., States J.C., McGregor W.G., Pierce W.M. Jr., Hein D.W.: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine-induced DNA adducts and genotoxicity in chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human CYP1A2 and rapid or slow acetylator N-acetyltransferase 2. *Mol. Carcinog.*, 2007; 46: 553–563
- [50] Narimatsu S., Yonemoto R., Saito K., Takaya K., Kumamoto T., Ishikawa T., Asanuma M., Funada M., Kiryu K., Naito S., Yoshida Y., Yamamoto S., Hanioka N.: Oxidative metabolism of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 1377–1385
- [51] Pearce R.E., Lu W., Wang Y., Utrecht J.P., Correia M.A., Leeder J.S.: Pathways of carbamazepine bioactivation *in vitro*. III. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2,3-dihydroxycarbamazepine. *Drug Metab. Dispos.*, 2008; 36: 1637–1649
- [52] Peng F.C., Chang C.C., Yang C.Y., Edwards R.J., Doehmer J.: Terretrems B and C metabolism in human liver microsomes: major role of CYP3A4 and CYP3A5. *Toxicology*, 2006; 218: 172–185
- [53] Poljaková J., Frei E., Gomez J.E., Aimová D., Eckschlager T., Hrabeta J., Stiborová M.: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. *Cancer Lett.*, 2007; 252: 270–279
- [54] Pritchard M.P., McLaughlin L., Friedberg T.: Establishment of functional human cytochrome P450 monooxygenase systems in *Escherichia coli*. *Meth. Mol. Biol.*, 2006; 320: 19–29
- [55] Purnapatre K., Khattar S.K., Saini K.S.: Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs. *Cancer Lett.*, 2008; 259: 1–15
- [56] Santos A., Zanetta S., Cresteil T., Deroussent A., Pein F., Raymond E., Vernillet L., Risse M.L., Boige V., Gouyette A., Vassal G.: Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 2012–2020
- [57] Sawada M., Kamataki T.: Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutat. Res.*, 1998; 411: 19–43
- [58] Schroer K., Kittelmann M., Lutz S.: Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010; 106: 699–706
- [59] Schuetz G.: Creation of polarized cells coexpressing CYP3A4, NADPH cytochrome P450 reductase and MDR1/p-glycoprotein. *Pharm. Res.*, 2000; 17: 803–810
- [60] Sharma S.V., Haber D.A., Settleman J.: Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer.*, 2010; 10: 241–253
- [61] Smith G., Mode S., Pillai I., Lian L.Y., Sutcliffe M.J., Pritchard M.P., Friedberg T., Roberts G.C., Wolf C.R.: Determinants of the substrate specificity of human cytochrome P-450 CYP2D6: design and construction of a mutant with testosterone hydroxylase activity. *Biochem. J.*, 1998; 331: 783–792
- [62] Staack R.F., Maurer H.H.: Metabolism of designer drugs of abuse. *Curr. Drug. Metab.*, 2005; 6: 259–274
- [63] Vail R.B., Homann M.J., Hanna I., Zaks A.: Preparative synthesis of drug metabolites using human cytochrome P450s 3A4, 2C9 and 1A2 with NADPH-P450 reductase expressed in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005; 32: 67–74
- [64] Venkatakrishnan K., Von Moltke L.L., Greenblatt D.J.: Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of *in vitro* models. *J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 41: 1149–1179

- [65] Wang X.J., Hayes J.D., Wolf C.R.: Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of Nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, 2006; 66: 10983–10994
- [66] Westerink W., Schoonen W.: Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro*, 2007; 21: 1581–1591
- [67] Wilkinson G.R.: Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 2211–2221
- [68] Wiśniewska A., Mazerska Z.: Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych. *Postępy Biochem.*, 2009; 55: 259–271
- [69] Wu D., Cederbaum A.I.: Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1. *Methods Mol. Biol.*, 2008; 447: 137–150
- [70] Wu D., Wang X., Zhou R., Cederbaum A.: CYP2E1 enhances ethanol-induced lipid accumulation but impairs autophagy in HepG2 E47 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 402: 116–122
- [71] Yamazaki H., Nakamura M., Komatsu T., Ohya K., Hatanaka N., Asahi S., Shimada N., Guengerich F.P., Shimada T., Nakajima M., Yokoi T.: Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein. Expr. Purif.*, 2002; 24: 329–337
- [72] Yasuda K., Ikushiro S., Kamakura M., Ohta M., Sakaki T.: Metabolism of sesamin by cytochrome P450 in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 2010; 38: 2117–2123
- [73] Yun C.H., Yim S.K., Kim D.H., Ahn T.: Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*. *Curr. Drug Metab.*, 2006; 7: 411–429
- [74] Zanger U.M., Turpeinen M., Klein K., Schwab M.: Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008; 392: 1093–1108
- [75] Zhou S.F., Liu J.P., Chowbay B.: Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab. Rev.*, 2009; 41: 89–295

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

