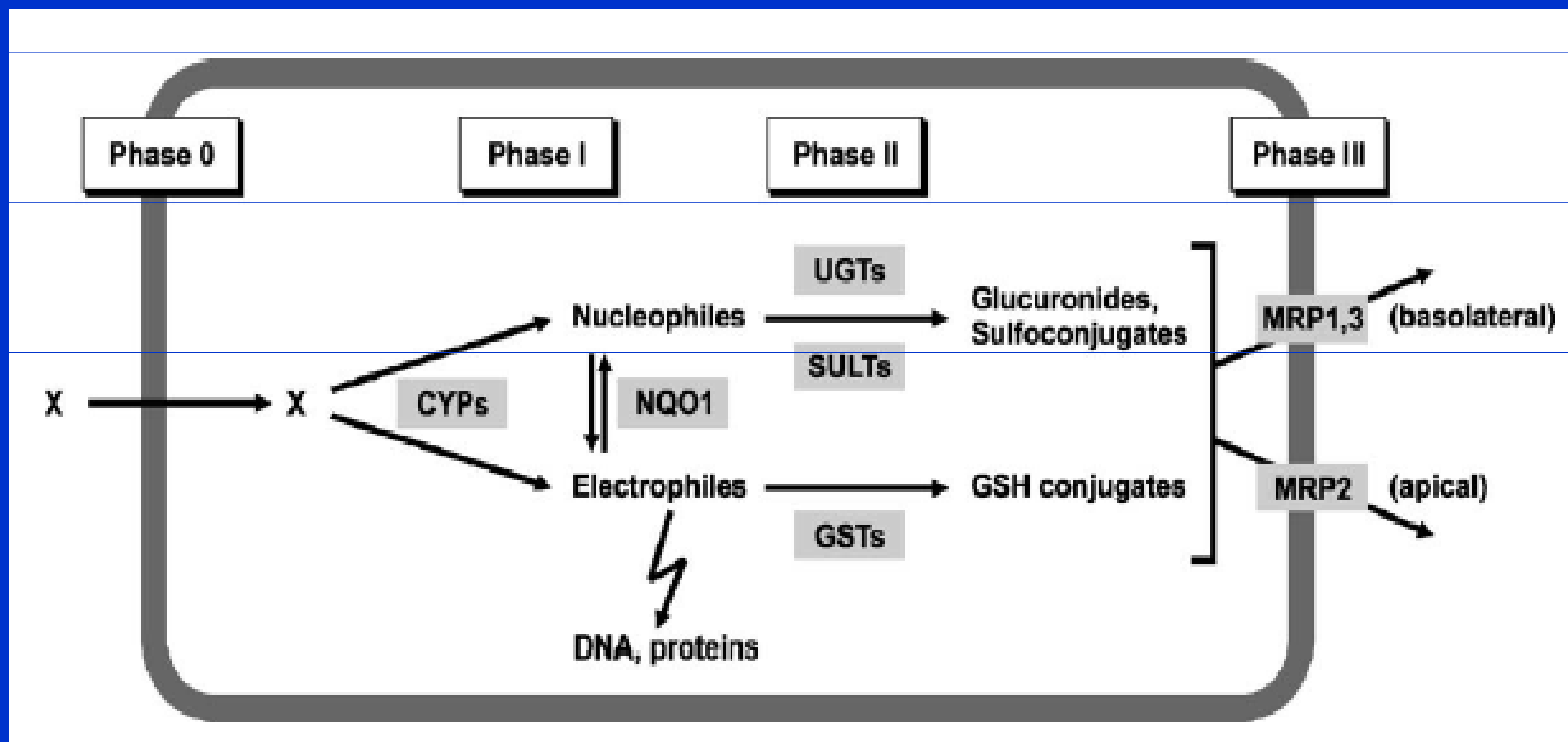


ENZYMY METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK A CHEMICKÝCH REGULÁTORŮ SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE:

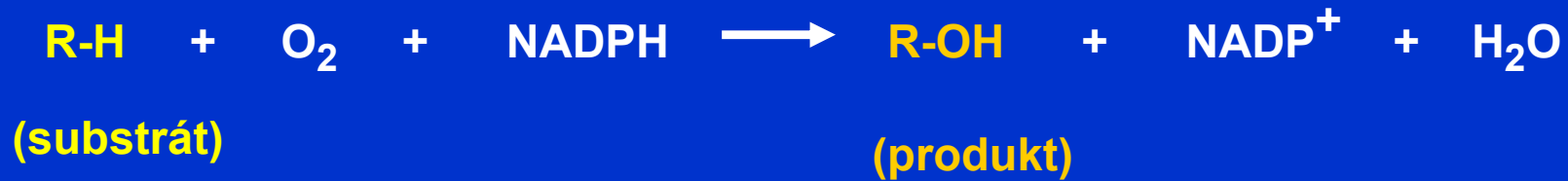
- Enzymy 1. fáze biotransformace xenobiotik, steroidních hormonů a mastných kyselin –
oxygenázy (CYP, AKR, FMO, COX, LOX), reduktázy (AKR, NQO), hydrolázy (esterázy, epoxidhydrolázy).
- 2. fáze biotransformace (GST, UDPGT, SULF aj.).
- 3. fáze biotransformace (ABC transportéry)
- Enzymy signální transdukce:
Proteinkinázy („moduly“ mitogen-aktivovaných proteinkináz ERK, p38, JNK), fosfatázy; další enzymy biotransformace lipidů (fosfolipázy, další enzymy biosyntézy/transformace lipidních signálních molekul – dihydroceramid-desaturáza, sfingomyelináza aj.).

BIOTRANSFORMACE CIZORODÝCH LÁTEK, STEROIDŮ, EIKOSANOIDŮ AJ. ENDOGENNÍCH LÁTEK

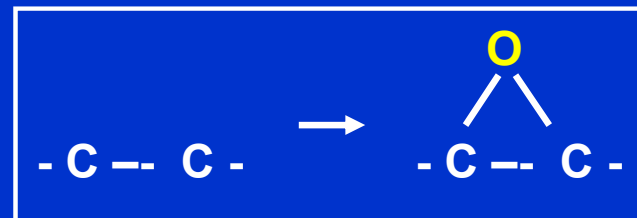
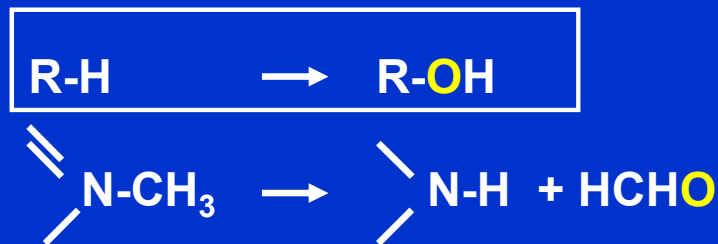


1. FÁZE BIOTRANSFORMACE: monooxygenázové reakce

CYP enzymy



- Přenos elektronů z NADPH na CYP enzym
- Aktivace molekuly kyslíku, „roztržení“ vazby
- Oxidace substrátu (hydroxylace, N-demethylace, epoxidace....)



CYKLUS CYTOCHROMU P450: MONOOXYGENACE A AKTIVACE KYSLÍKU

Přenos elektronů:

NADPH



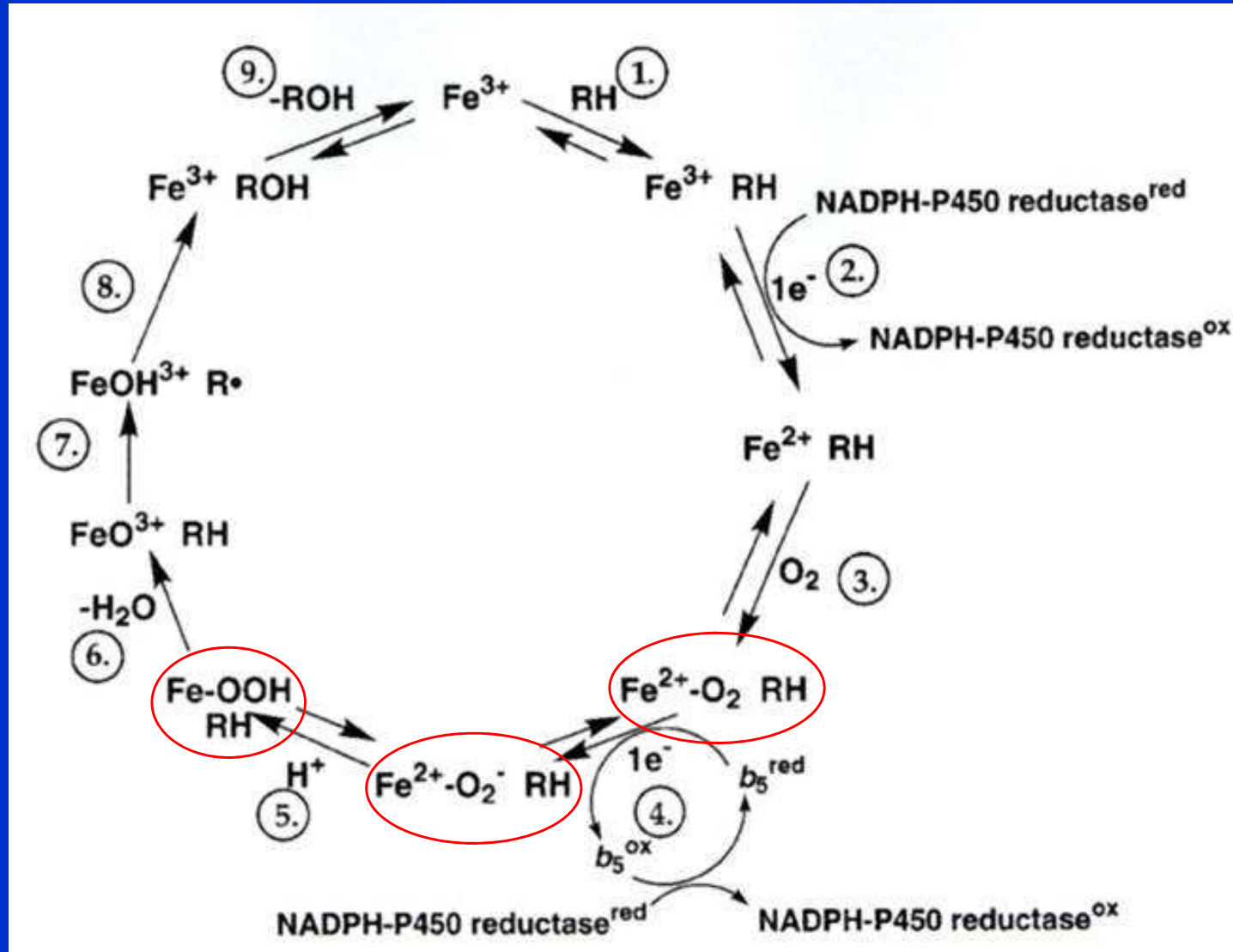
NADPH:P450 oxido-
reduktáza



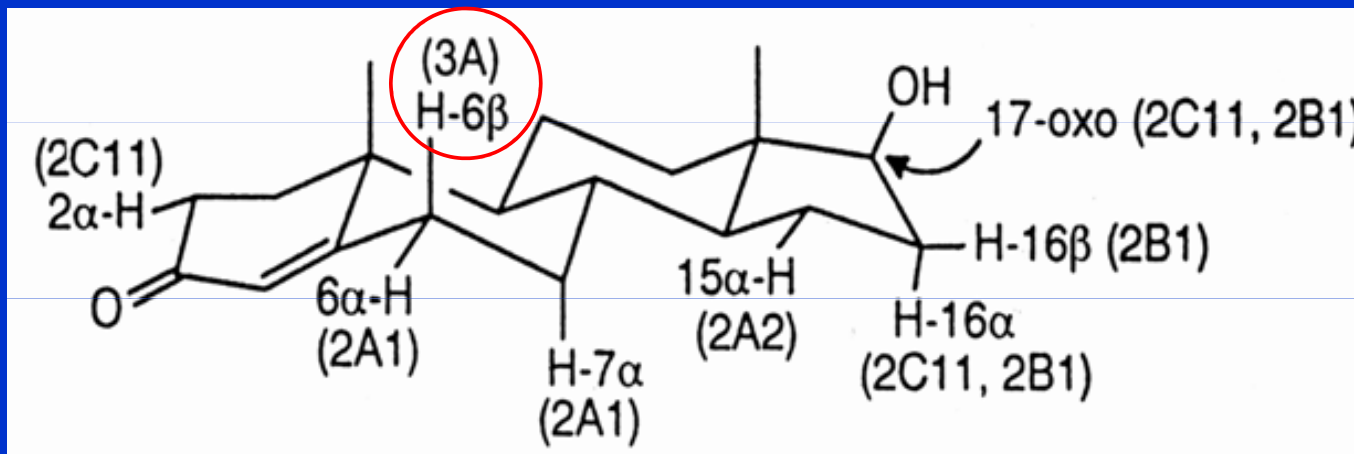
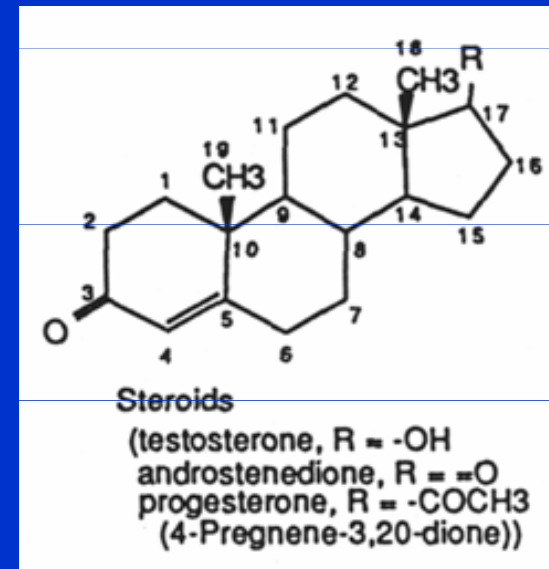
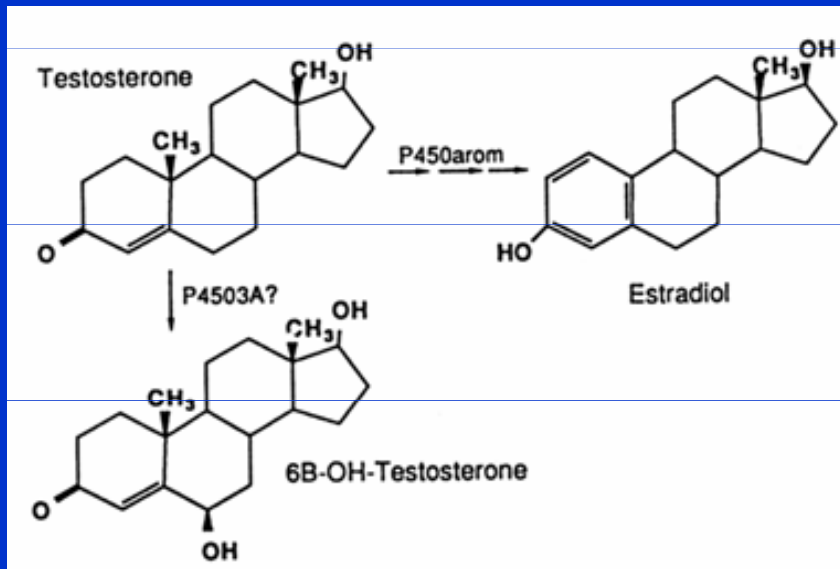
cytochrom P450

(substrát RH,
produkt ROH,
produkce ROS)

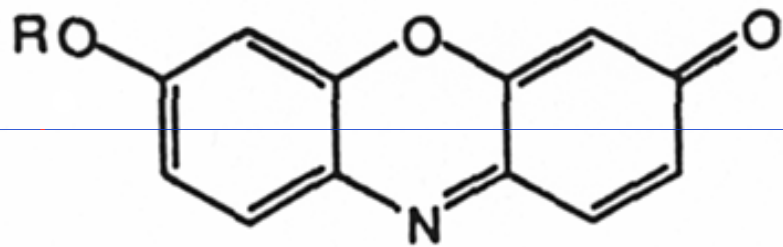
Aktivace kyslíku:
ROS = vedlejší
produkty



SPECIFICKÉ SUBSTRÁTY CYP ENZYMŮ

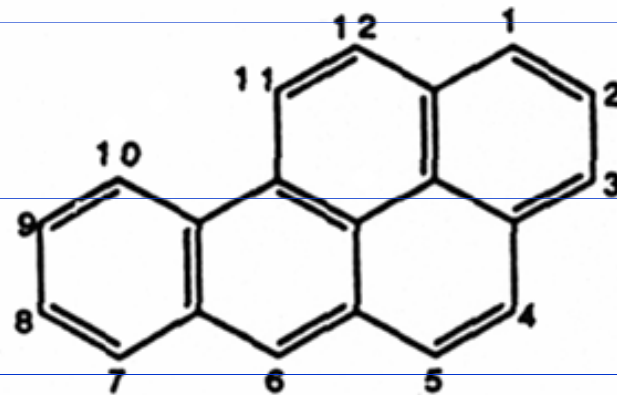


SPECIFICKÉ SUBSTRÁTY CYP1 ENZYMŮ



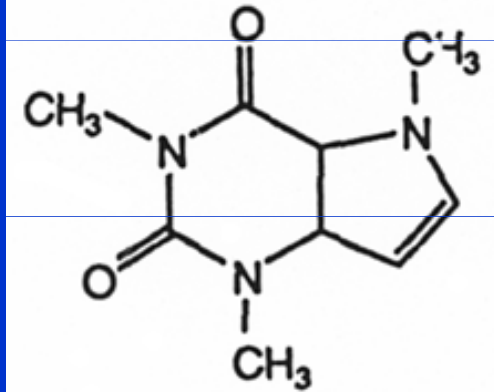
Alkylresorufins
(alkoxyphenoxazones)

EROD / MROD



Benzo[a]pyrene

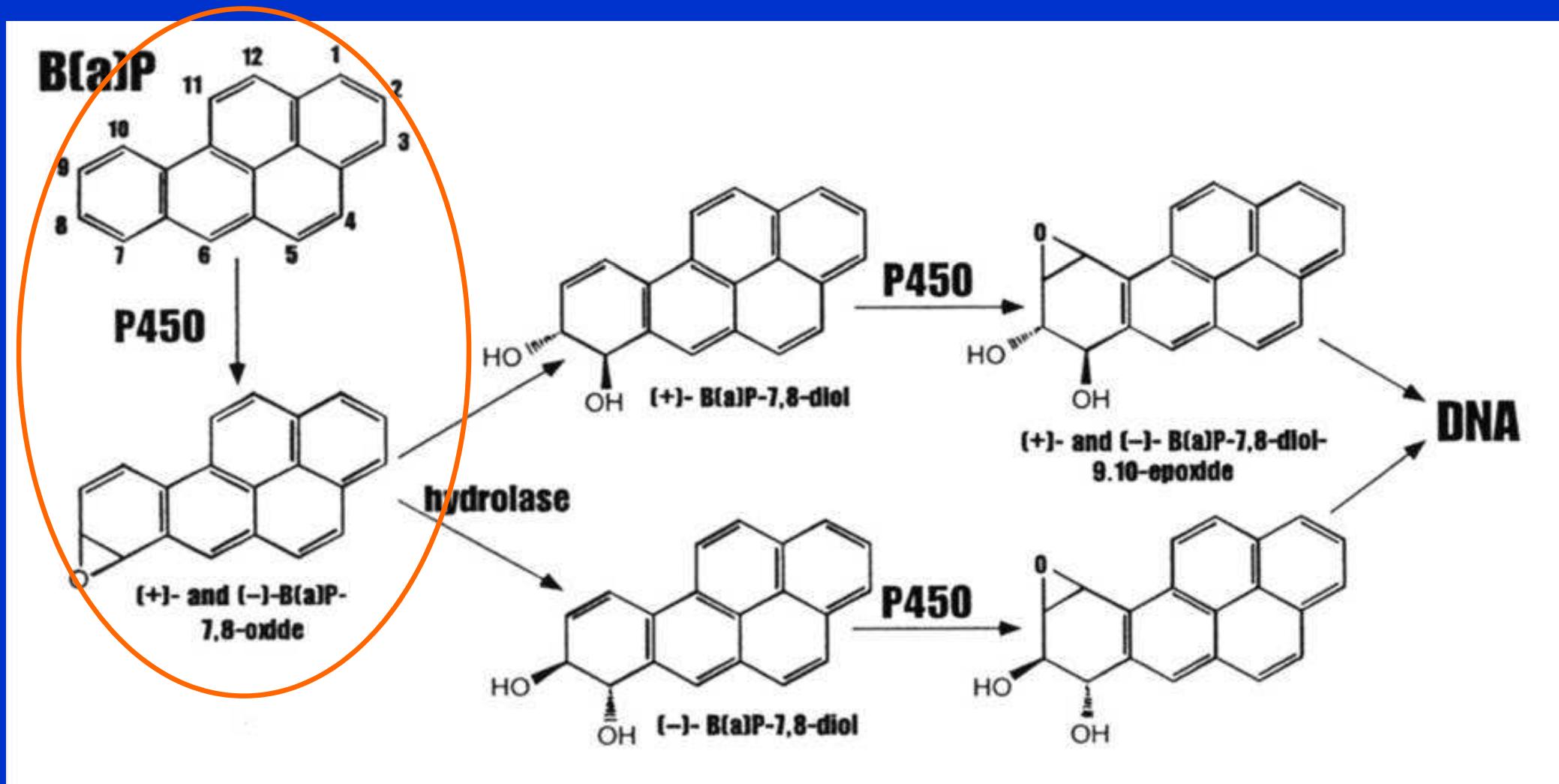
BaP-hydroxyláza



Caffeine
(1,3,7-trimethylxanthine)

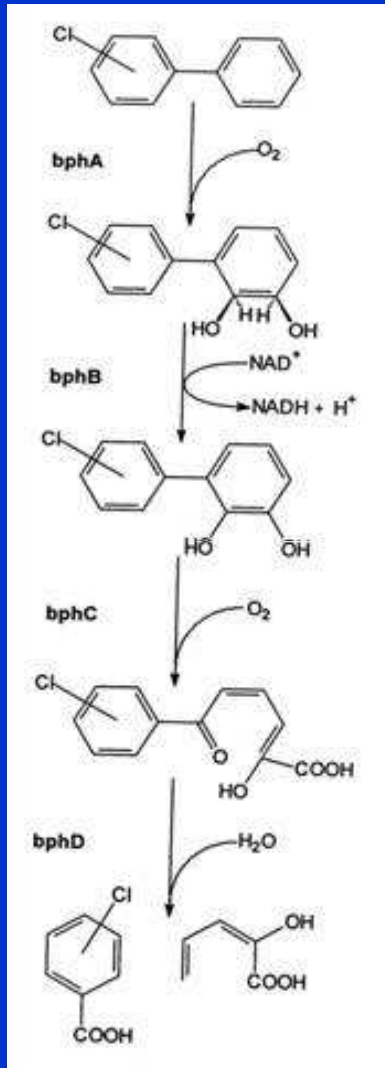
Kofeindemethylázy

ROLE CYP1A1/CYP1A2/CYP1B1 A EPOXIDHYDROLÁZ V METABOLICKÉ AKTIVACI POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



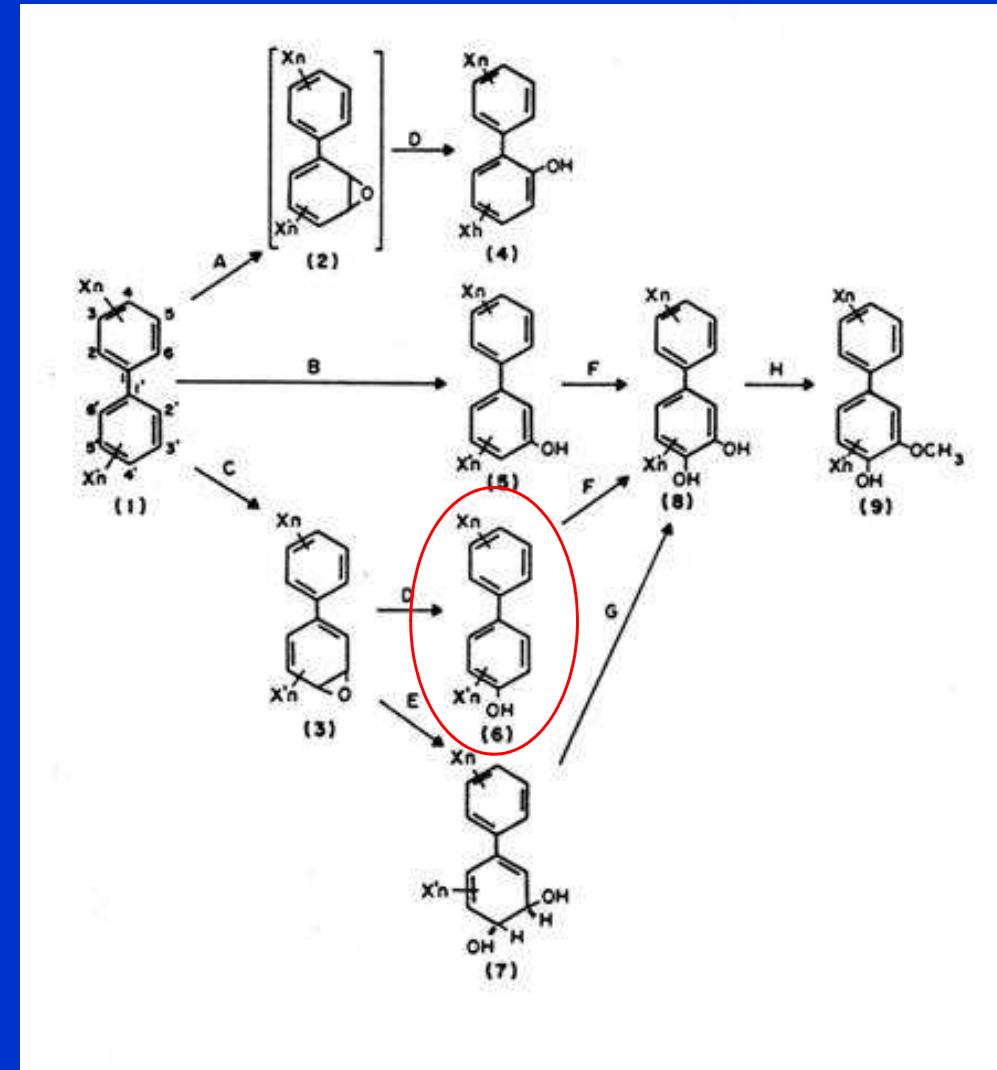
METABOLISMUS POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) – příklad 1. fáze metabolismu persistentních organických sloučenin

Mikrobiální degradace

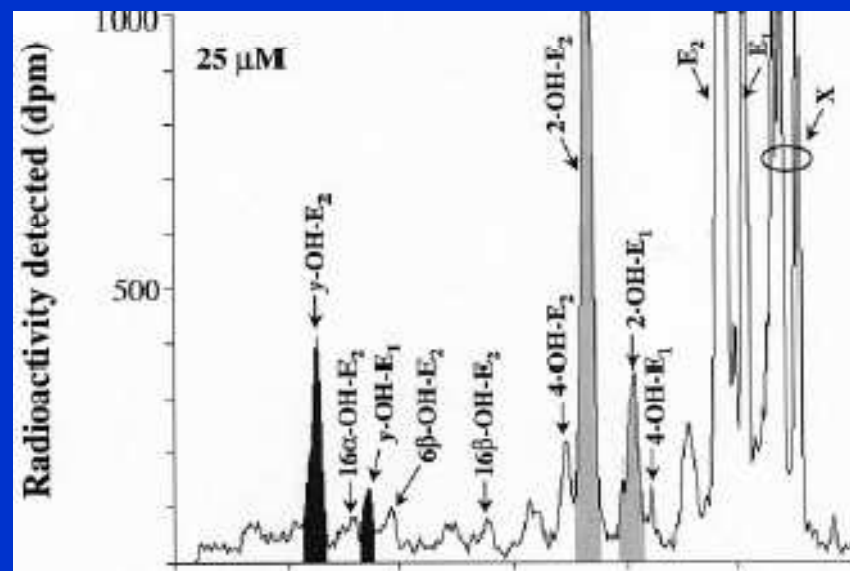
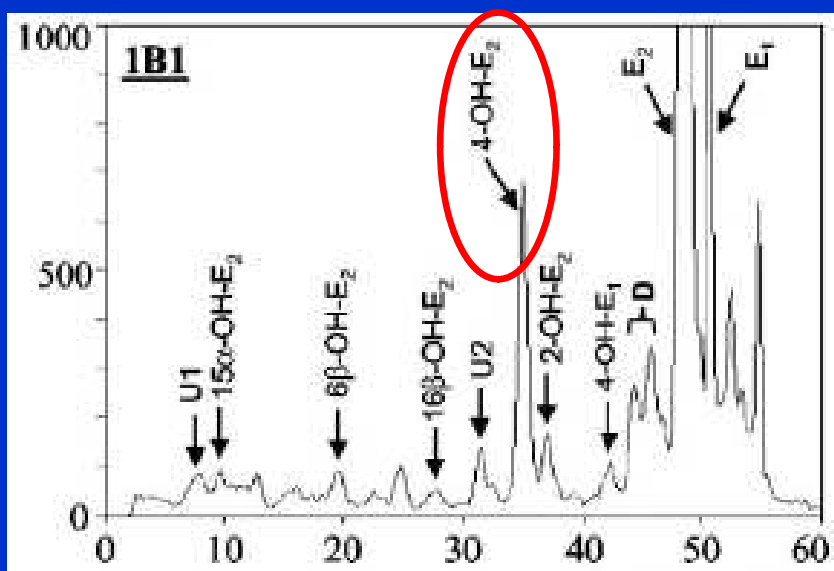
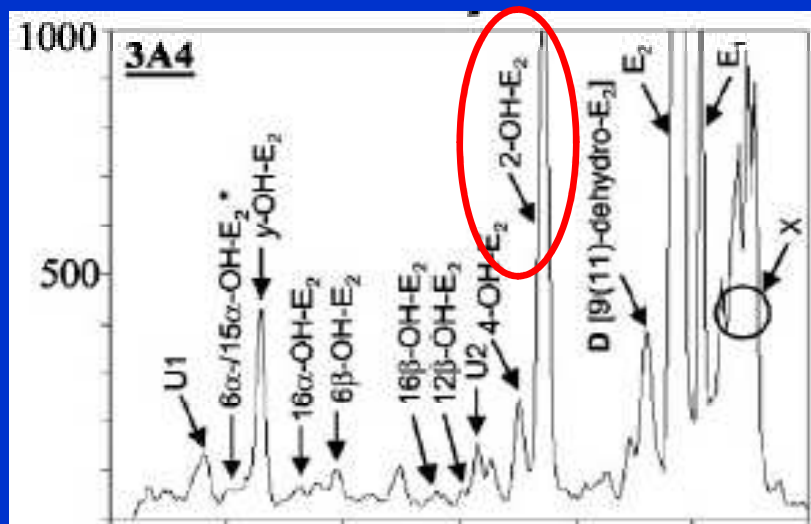
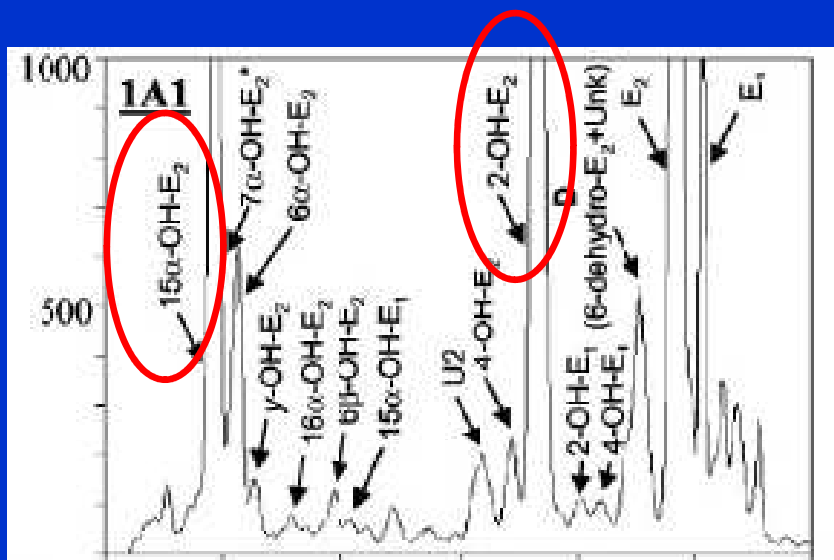


Metabolismus u vyšších živočichů: oxidativní metab. (hl. cesta C, D; alternat. A, D); NIH posun chlóru

Persistetní arom. sloučeniny: Cl v sousedních pozicích



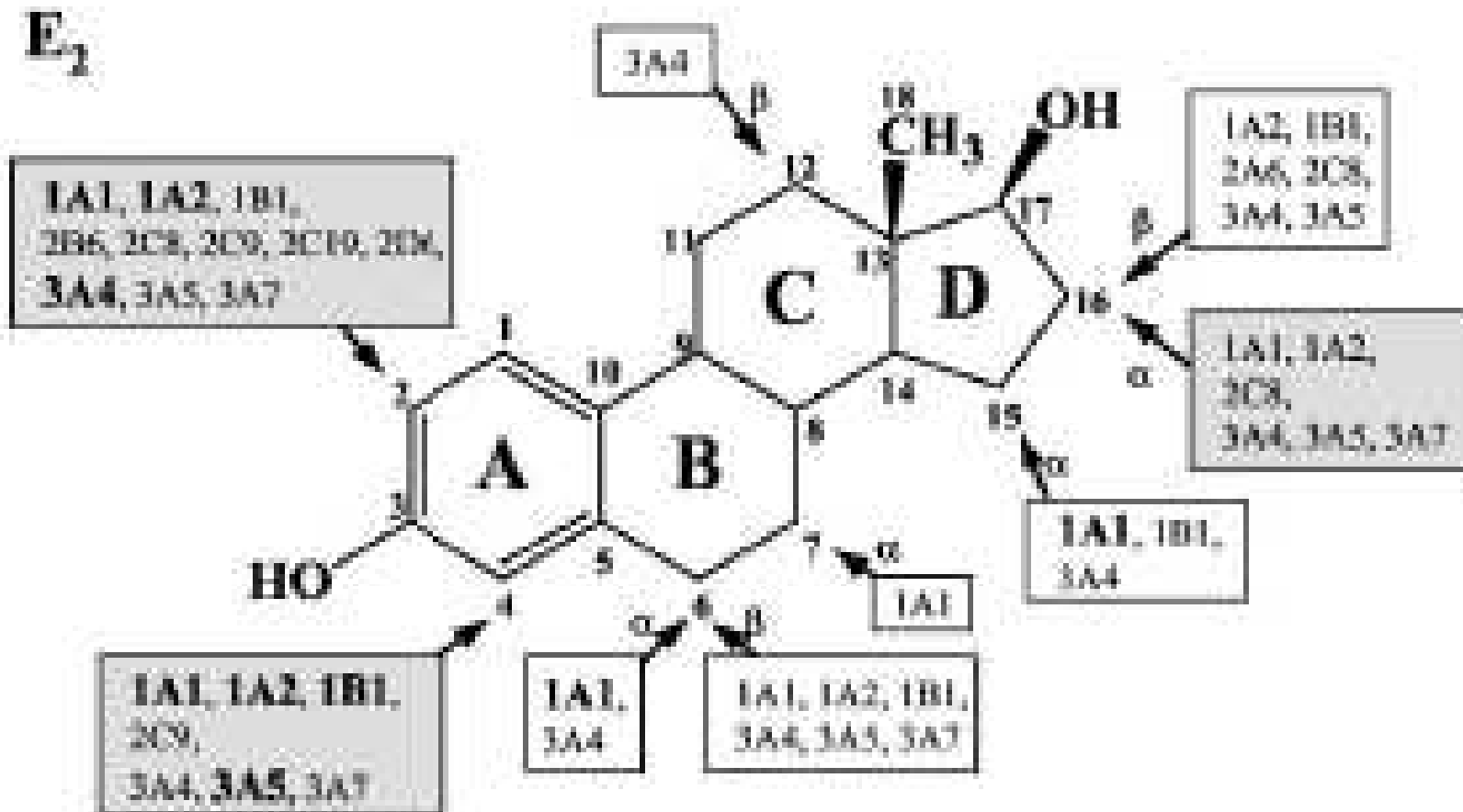
HPLC ANALÝZA HYDROXYLOVANÝCH METABOLITŮ 17beta-ESTRADIOLU (lidské CYP enzymy byly exprimovány v hmyzích buňkách infikovaných baculovirovým expresním systémem)



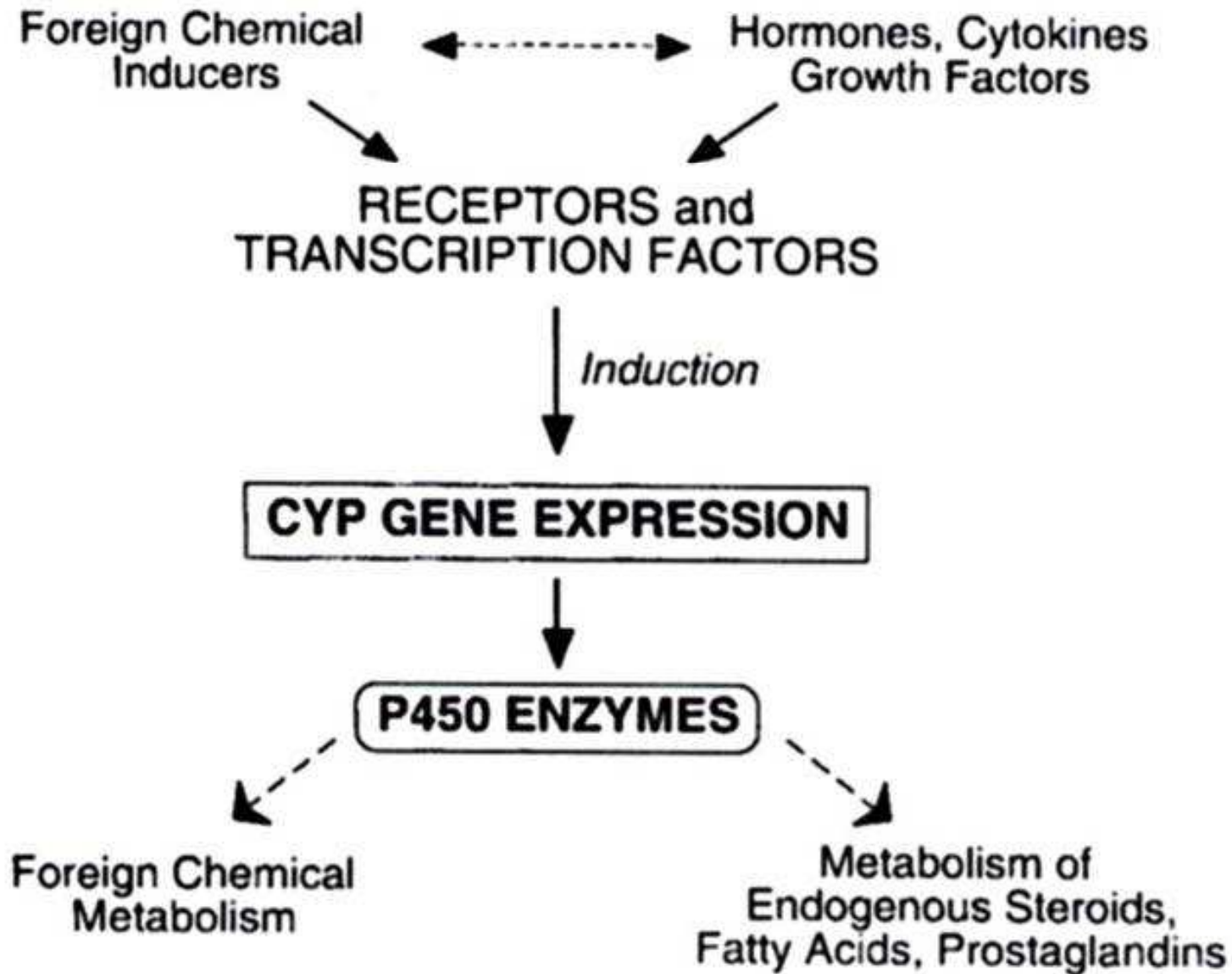
(hydroxylace E2 lidskými jaterními mikrosomy)

(Conney et al., 2001, 2003)

REGIOSELEKTIVNÍ HYDROXYLACE ESTRADIOLU ISOFORMAMI CYTOCHROMU P450

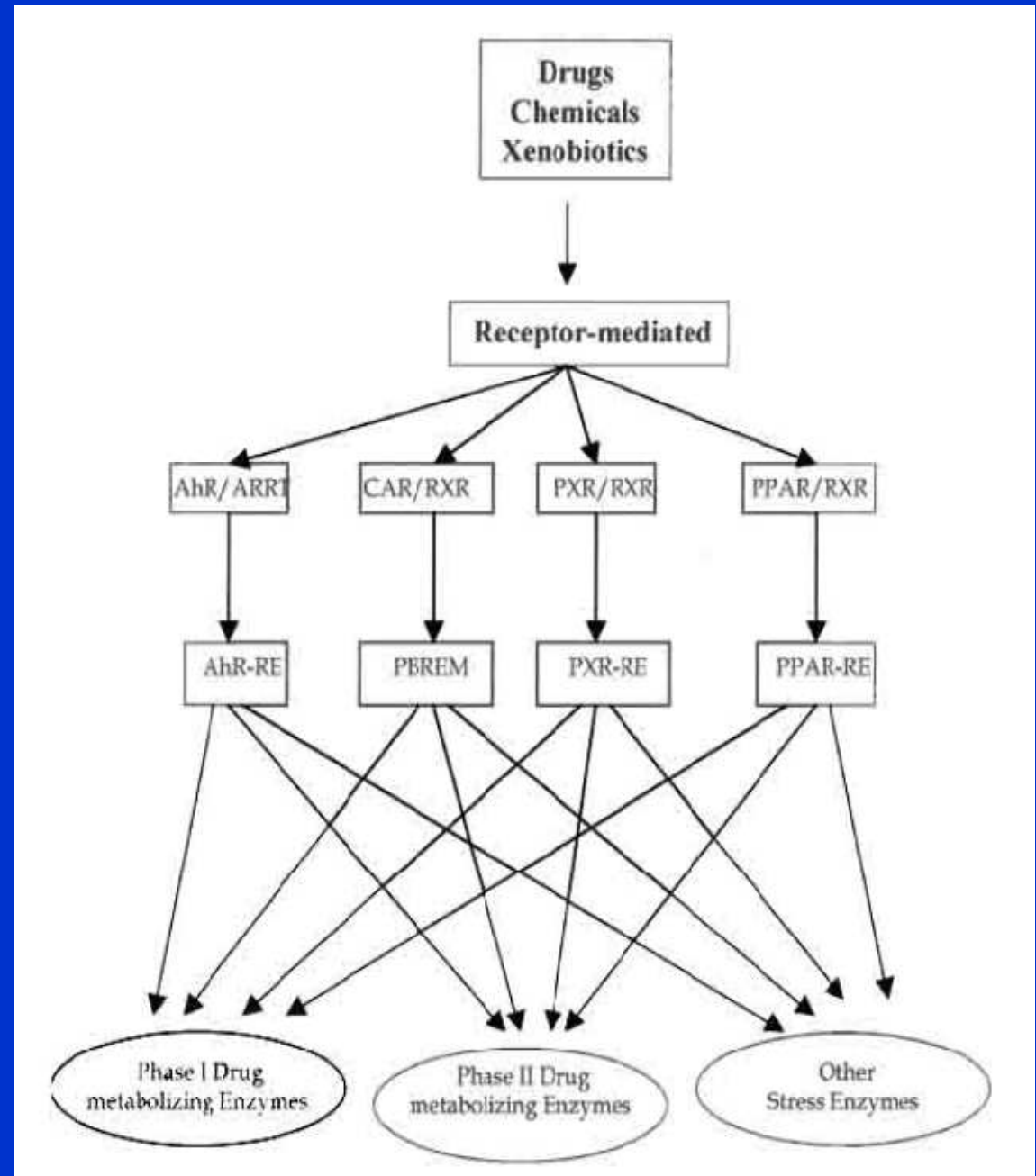


NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY KONTROJUJÍCI EXPRESI CYP PROTEINŮ



XENOBIOTIKA, STEROIDY AJ. LÁTKY INDUKUJÍ VLASTNÍ METABOLISMUS AKTIVACÍ RECEPTORŮ (TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ), KTERÉ KONTROLUJÍ EXPRESI BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ A ABC TRANSPORTÉRŮ

- vazba xenobiotika na receptor (aktivace receptoru)
- dimerizace receptoru
- vazba receptoru na specifické
- responsní elementy v promoterových oblastech cílových genů



NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY

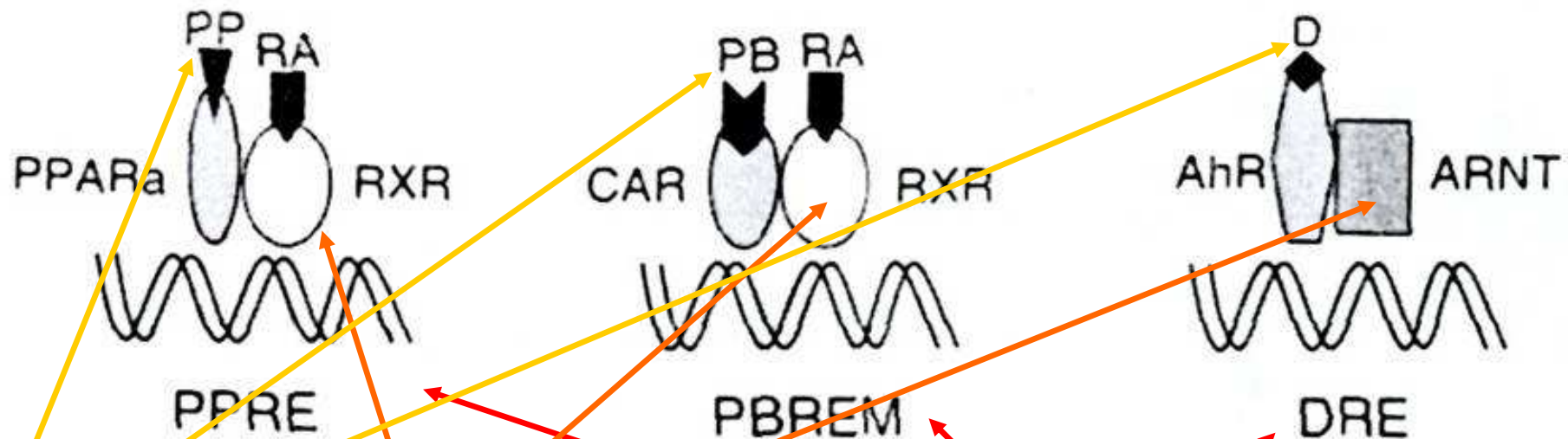
nukleární receptory

cytosolový receptor

a) peroxisome proliferators

b) phenobarbital

c) dioxin



ligand receptoru

dimerizační partner

specif. responsní element v promoterech

NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY KONTROLUJÍCÍ EXPRESI CYP ENZYMŮ

CYP Induction Mediated by Nuclear Receptors

P450 inducing agents	Prototypic responsive rat liver CYPs	Receptor
Polycyclic aromatic hydrocarbons	1A1, 1A2, 1B1	Ah receptor ^a
Phenobarbital	2B1, 2B2	CAR
Dexamethasone	3A1, 3A2, 3A23	PXR
Fibrate drugs	4A1, 4A2, 4A3	PPAR α
Cholesterol	7A1	LXR α
Bile acids ^b	7A1	FXR
Thyroid hormone	P450 reductase	TR

^a PAS transcription family member, not a nuclear receptor.

^b Inhibitors of CYP7A1 transcription.

Nuclear Receptors: Endogenous Ligands and DNA Response Elements in Target CYP Genes

Nuclear receptor	Representative endogenous ligands ^a	AGGTCA-based DNA response element ^b
CAR	Androstanol, androstenol	DR4
PXR	Pregnenolone, corticosterone	DR3, ER6
PPAR α	Linoleic acid, arachidonic acid	DR1
LXR α	24(S)-hydroxycholesterol	DR4
FXR	Chenodeoxycholic acid	IR1
TR	Thyroid hormone	DR4

SEZNAM CYTOCHROMŮ P450 (CYP) ZODPOVĚDNÝCH ZA BIOSYNTÉZU / METABOLISMUS STEROIDŮ A METABOLISMUS XENOBIOTIK

- ❑ CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1: genová exprese regulována **AhR** (indukce dioxiny, PAH; endogenní ligandy?) monooxygenace PAH, estradiolu;
- ❑ CYP2B: exprese regulována **GR/CAR**, indukce steroidy, fenobarbitalem, monooxygenace velké řady xenobiotik, testosteronu aj.
- ❑ CYP2A, CYP2C, CYP2D
- ❑ CYP2E: indukce především stabilizací proteinu (indukují etanol, pyrazol aj.), monooxygenace etanolu, (ω -1)-hydroxylace mastných kyselin
- ❑ CYP3A: exprese regulována **GR/PXR**; indukce dexametazonem aj. steroidy, monooxygenace velké řady xenobiotik (nejdůležitější enzym biotransformace), 6β -hydroxylace testosteronu
- ❑ CYP4A: exprese regulována **PPAR α** , indukce peroxisomálními proliferátory (clofibrate, dialkylestery kyseliny ftalové), ω -hydroxylace mastných kyselin
- ❑ CYP7A, CYP11A, CYP17, CYP19 (aromatáza): enzymy steroidogeneze
- ❑ další důležité CYP metabolismu vitamínu D3 a kyseliny retinové

**REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ:
CYTOSOLOVÝ Ah (aryl hydrocarbon) RECEPTOR**

CYTOSOLOVÉ RECEPTORY: AhR (Aryl hydrocarbon receptor)

AhR kontroluje genovou expresi

biotransformačních enzymů

CYP1A1/1A2/1B1,
UGT, GST, NQO1

regulátorů bun. cyklu /
apoptózy

p27, Bax, ...

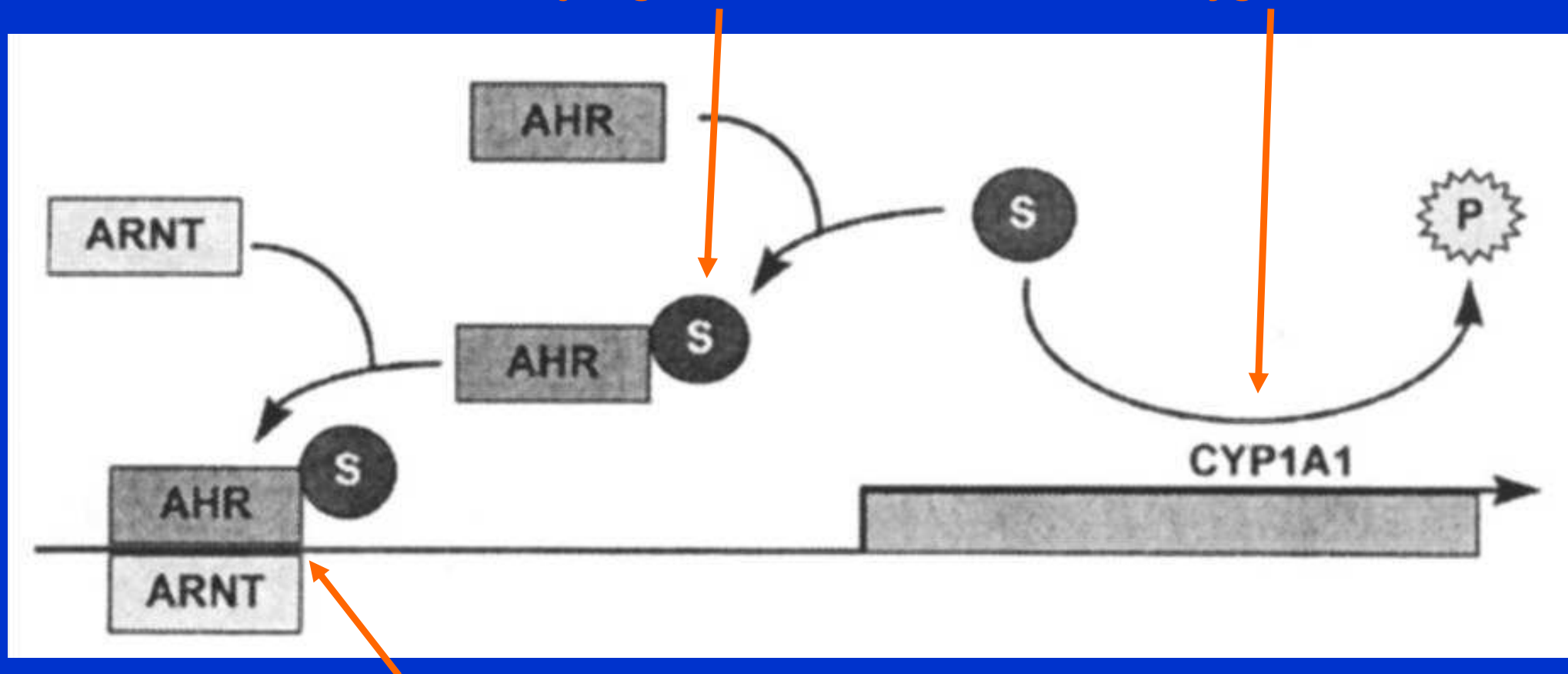
?

přímé interakce (ER?,...)

AKTIVACE Ah RECEPTORU A INDUKCE CYP1A1 SUBSTRÁTEM

substrát S je ligandem AhR

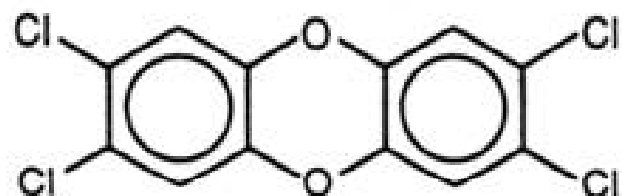
monooxygenázová reakce



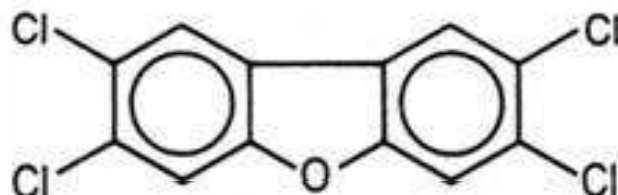
AhR/ARNT nasedá na XRE = DRE = xenobiotic (dioxin) response element

LIGANDY AhR

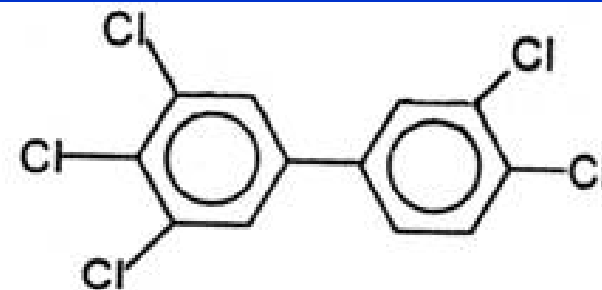
Strukturní podobnost (šířka, výška, molekulární objem, planarita molekuly)



2,3,7,8-tetra-chlorodibenzodioxin
(TCDD)



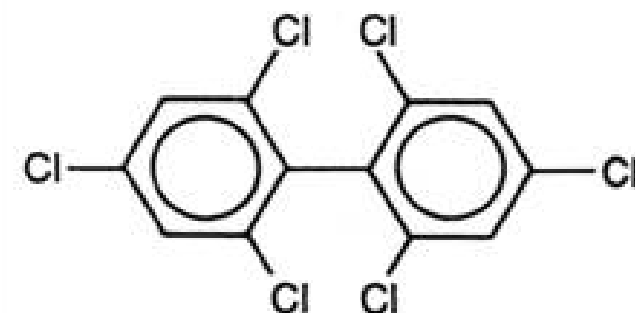
2,3,7,8-tetra-chlorodibenzofuran
(TCDF)



3,4,5,3',4',-pentachlorobiphenyl
(PCB)

**TCDD = nejsilnější agonista AhR
= modelový dioxinový toxikant**

Nekoplanární látky
(např. PCB se dvěma
chlóry v pozici ortho)
nevykazují planární
pozici aromatických jader
a nejsou agonisty AhR



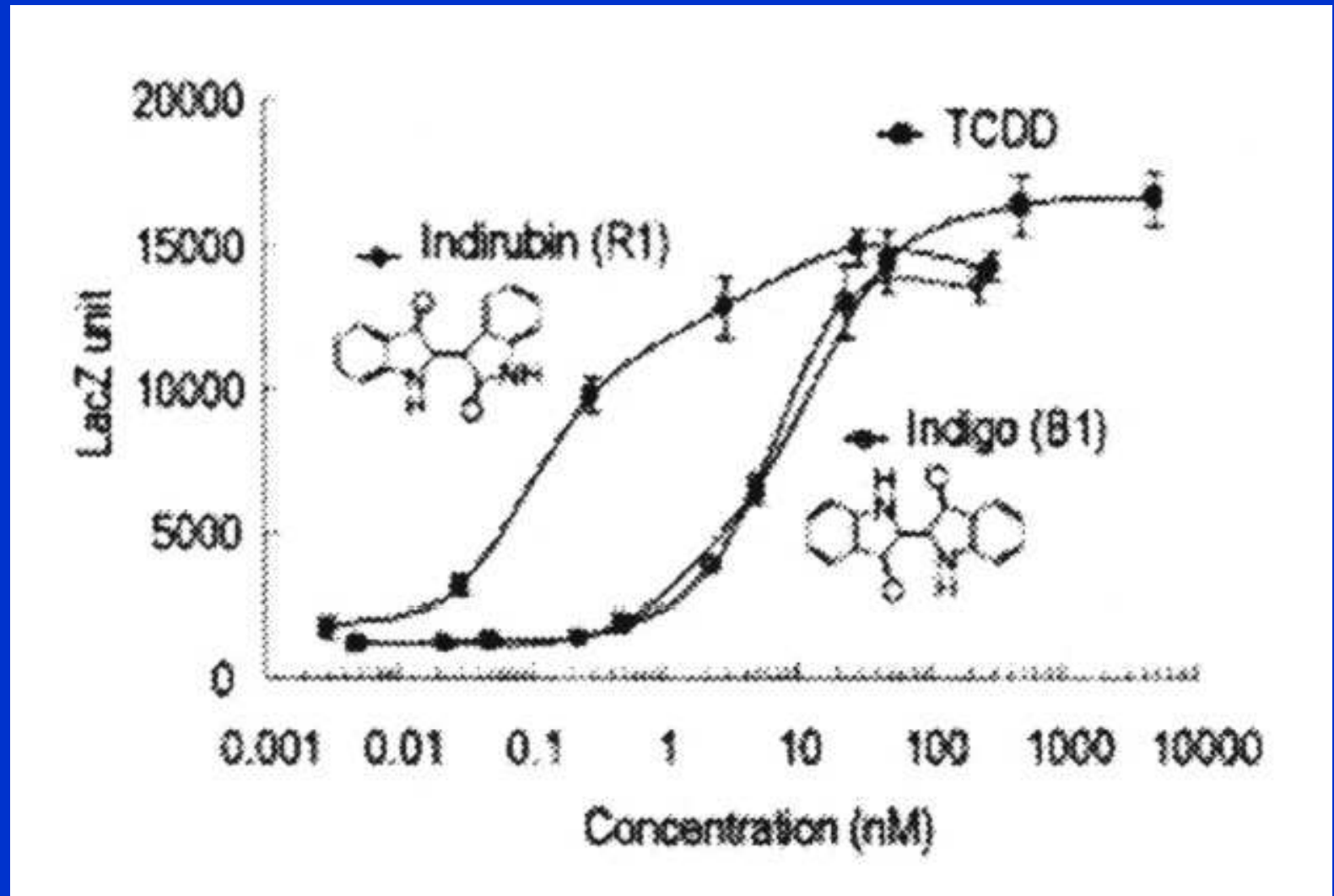
2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl
(Not coplanar)

ENDOGENNÍ AGONISTÉ AhR

dosud nejsou známy (deriváty tryptofanu ?)

Funkce AhR:

nezbytný v řadě
proliferačních a
vývojových
procesů
(viz myší AhR-
deficientní
modely)



AKTIVACE Ah RECEPTORU / AhR-DEPENDENTNÍ GENOVÁ EXPRESE

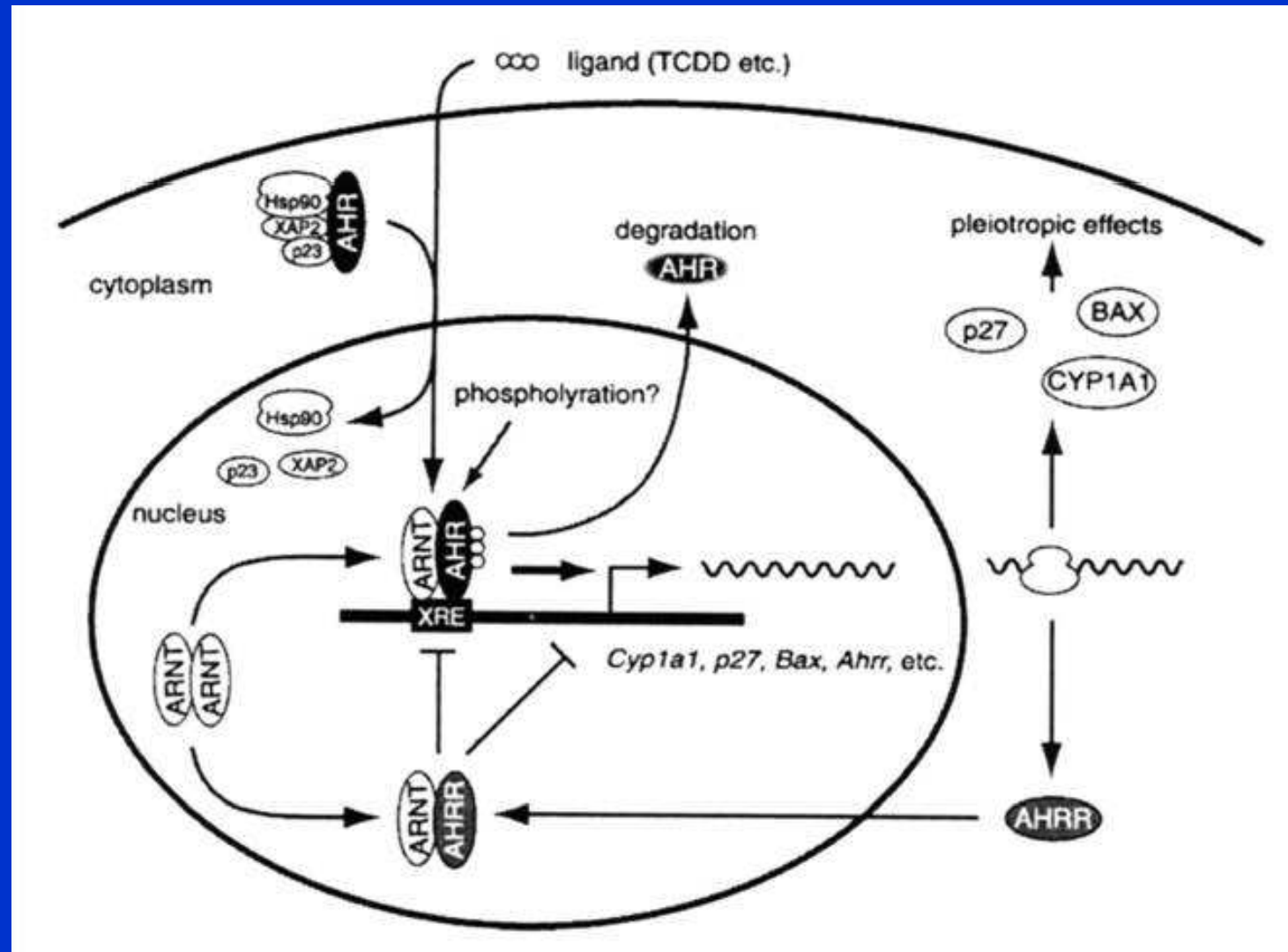
Produkty genové exprese:

- detox./bioaktiv. enzymy
- apoptóza;
- bun. cyklus;
- ?

+ Přímé interakce AhR s transkripč. faktory aj. proteiny

Degradace AhR po navázání ligandu

AHRR = AhR represor

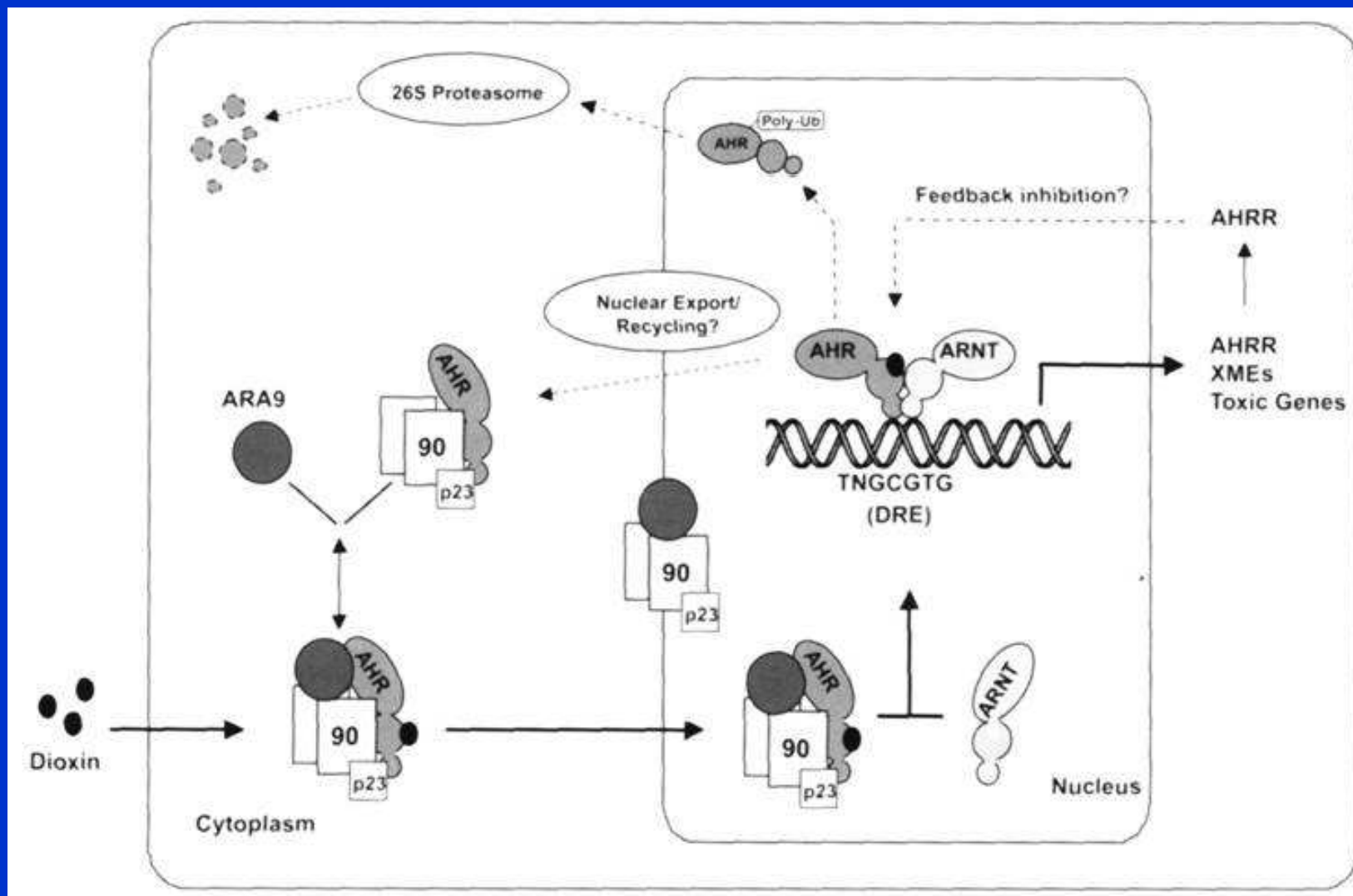


ARYL HYDROCARBON RECEPTOR

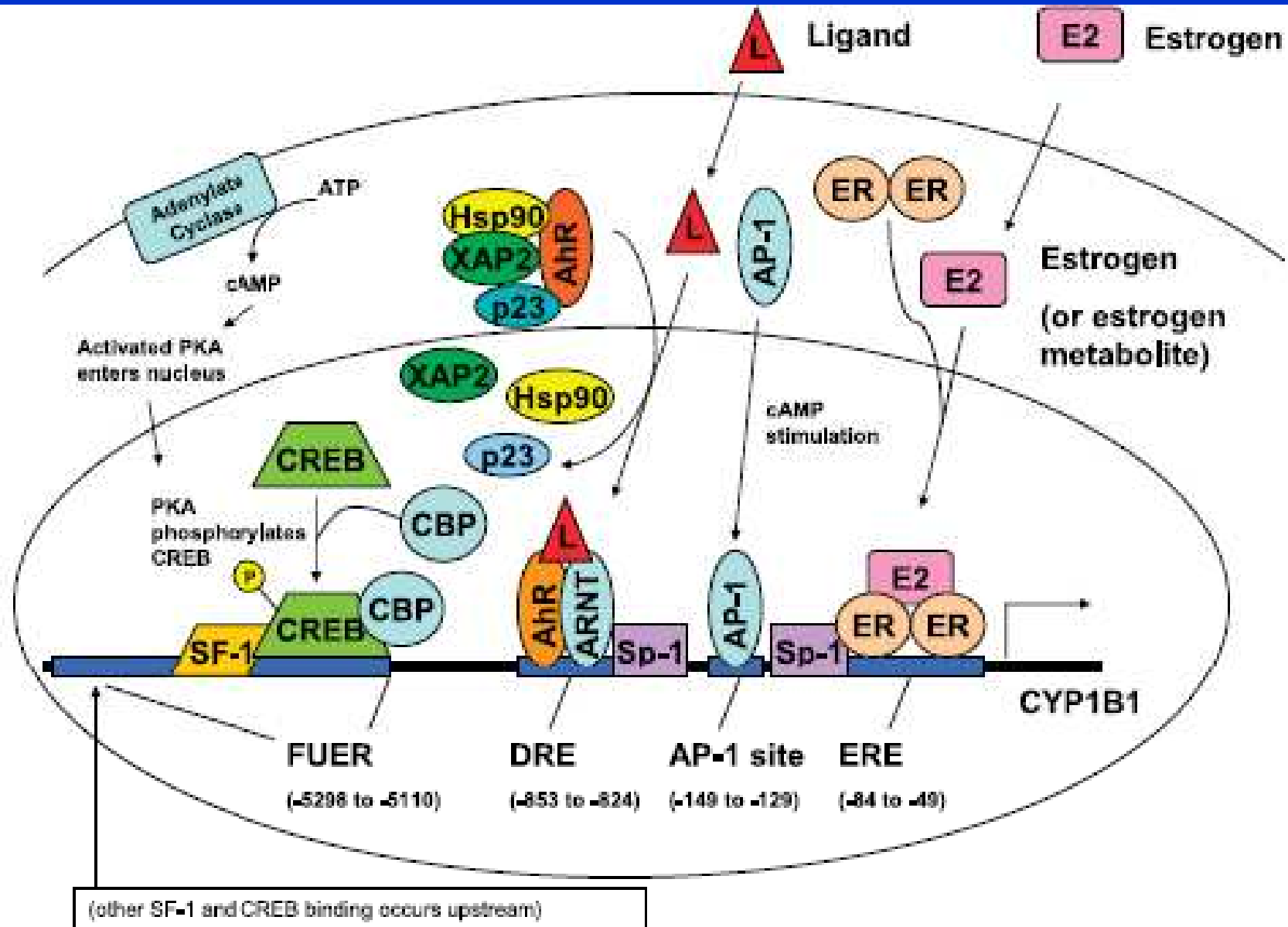
Negativní regulace AhR:
- AhR represor,
- degradace

XME = xenobiotic metabolizing enzymes (CYP, UGT, ALDH...)

„Toxic genes“ = indukce genů, která vede k „dioxinové“ toxicitě

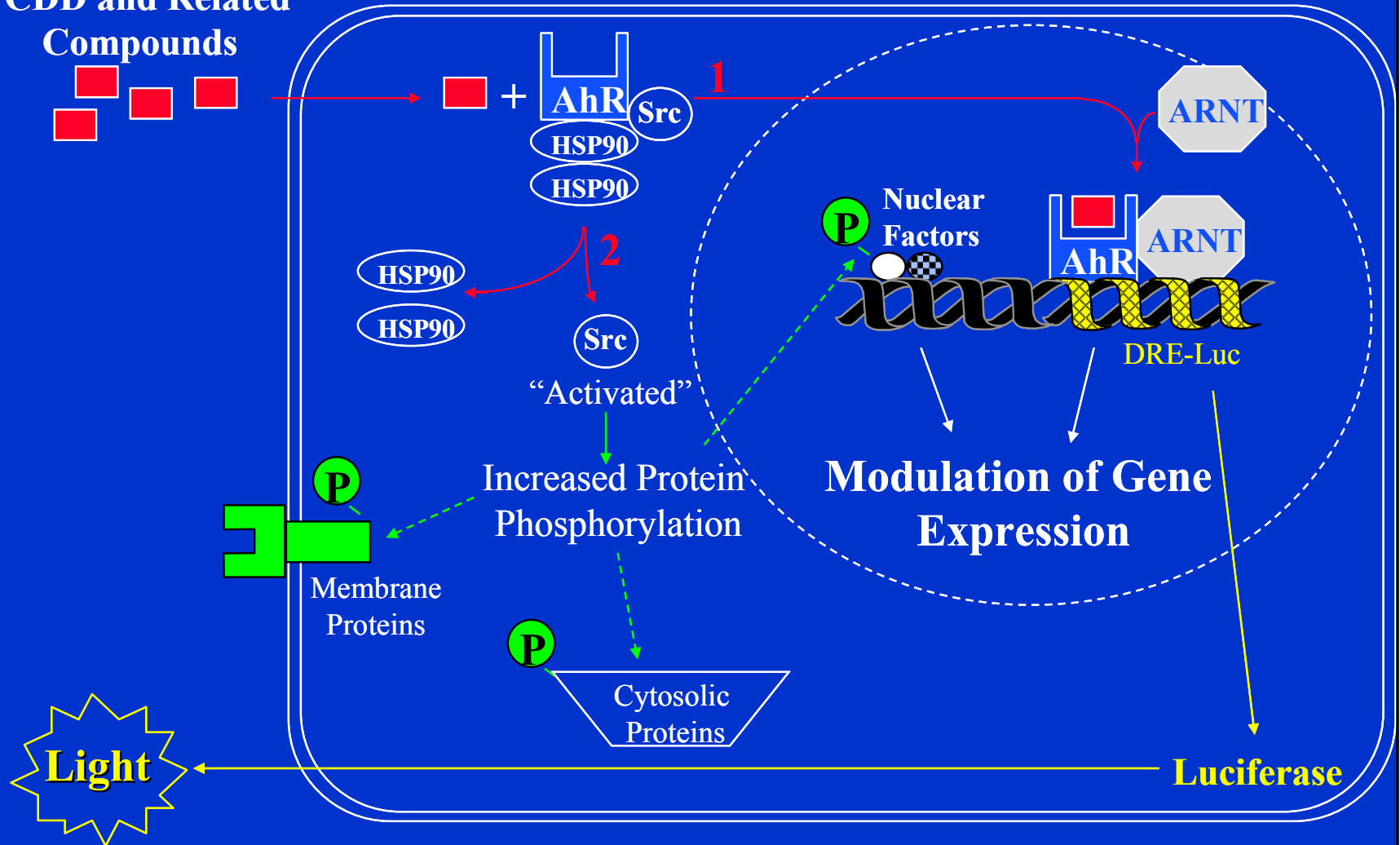


REGULACE CYTOCHROMU P4501B1 (CYP1B1)



MĚŘENÍ AKTIVACE Ah RECEPTORU (transgenní model - luciferázový reportérový gen)

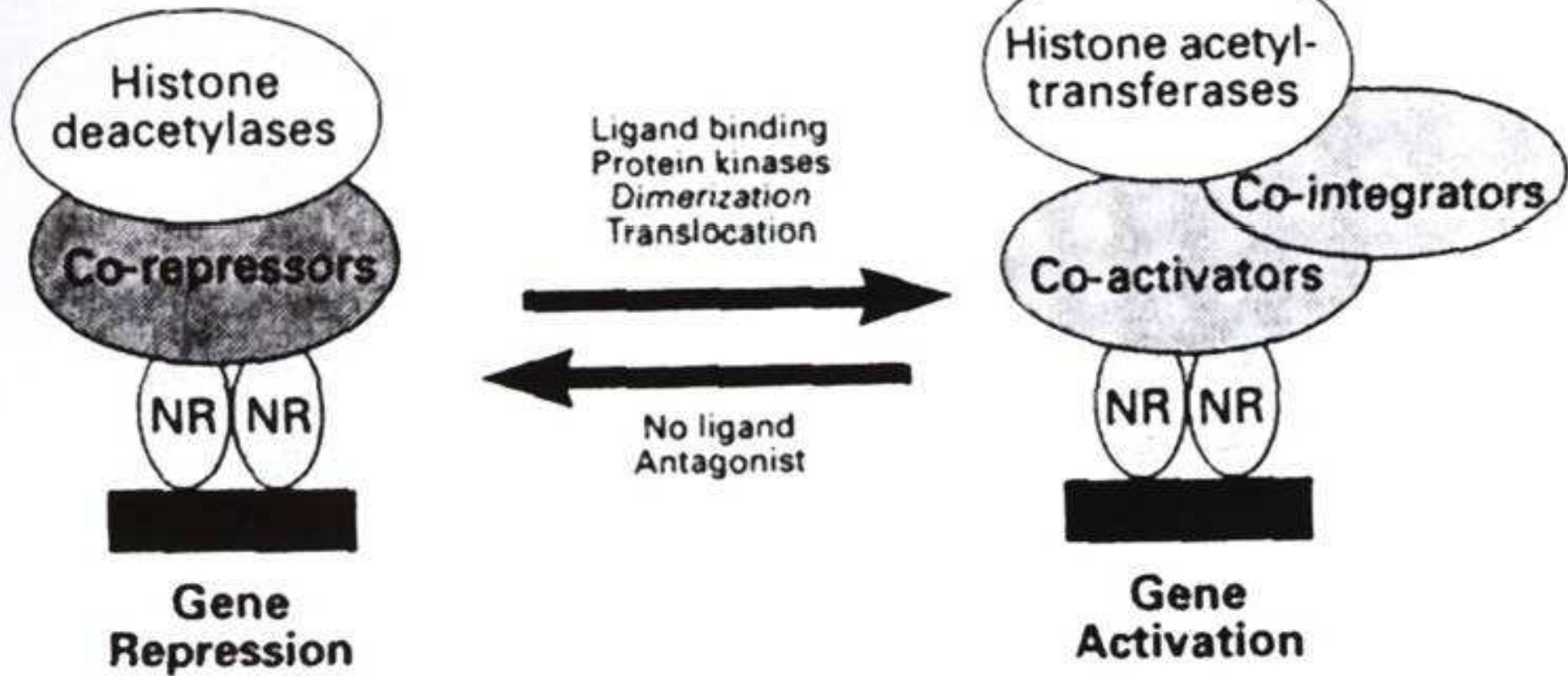
TCDD and Related
Compounds



Adapted from Blankenship (1994)

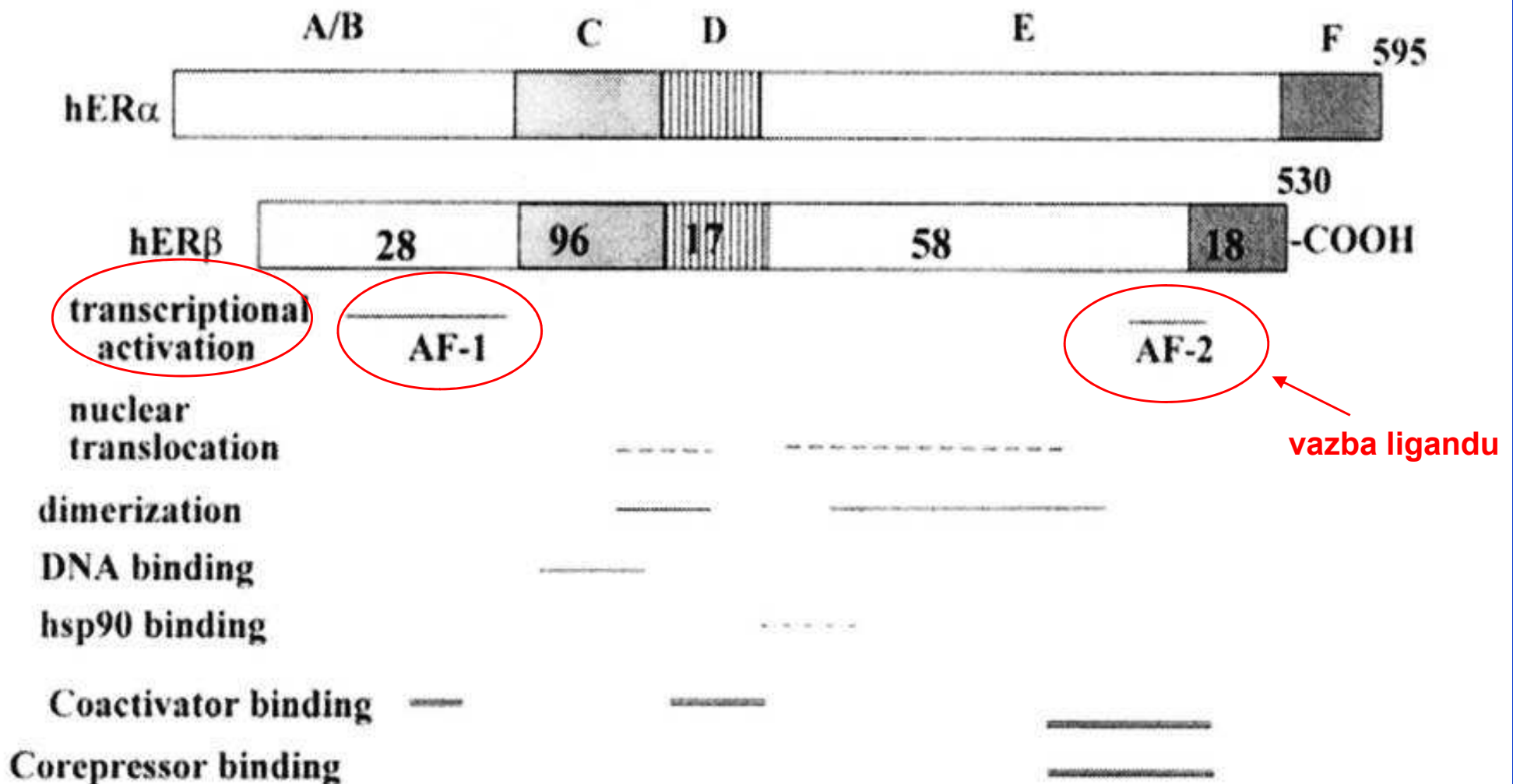
**REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ:
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY**

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY (NR)



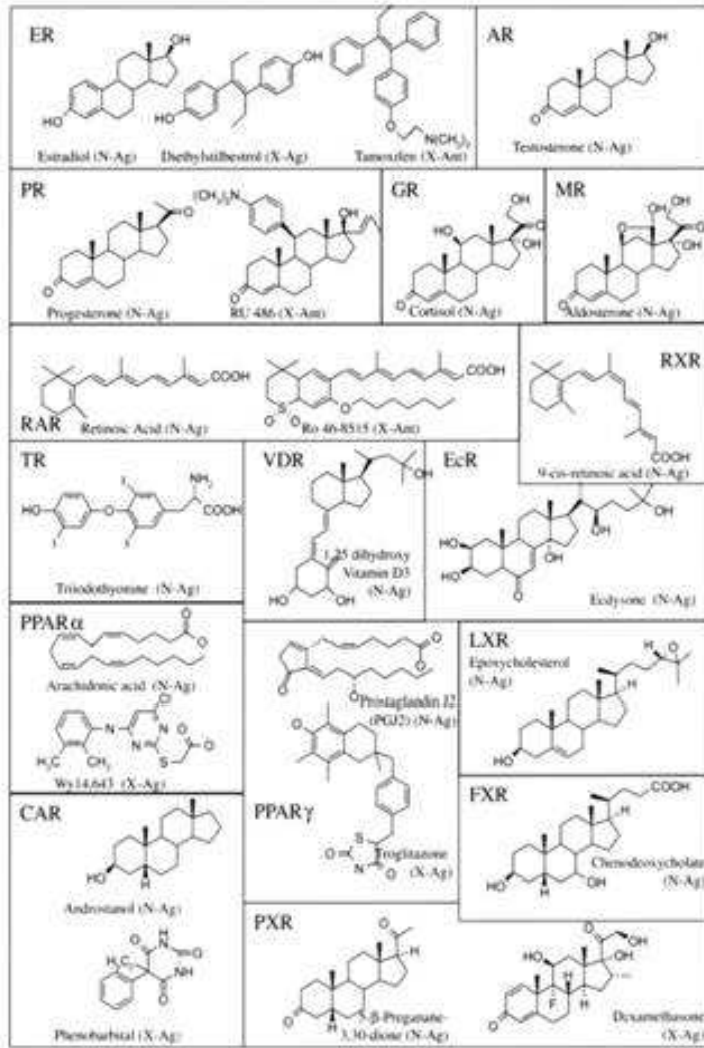
Model for gene activation and gene repression by NRs

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: struktura domén receptorů



NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Nuclear Hormone Receptors



	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
Ligands:	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown

ER α, β
PR
AR
GR
MR

RXR α, β, γ
PPAR α, β, γ
LXR α, β
FXR
PXR/SXR
CAR

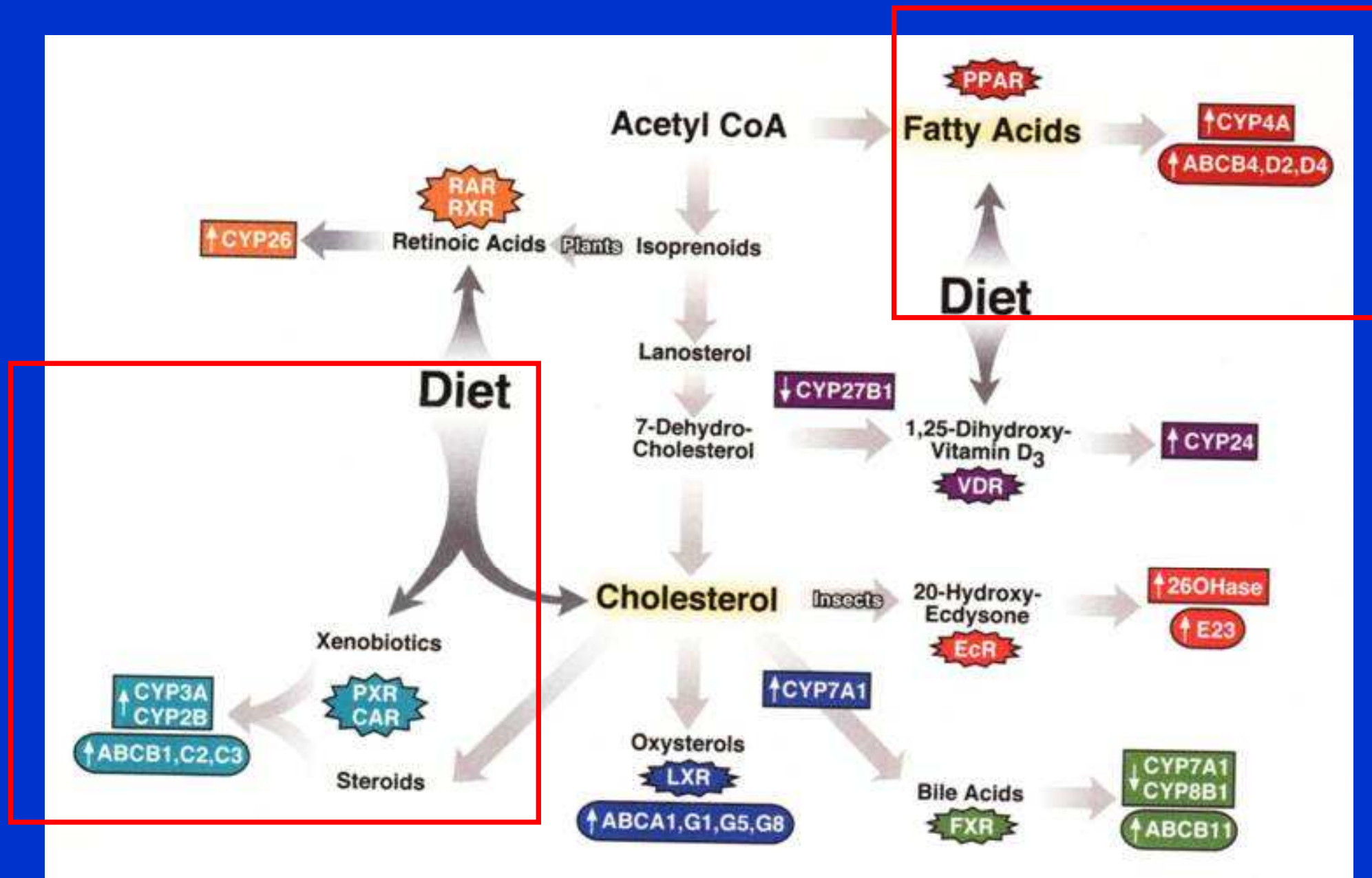
RAR α, β, γ
TR α, β
VDR
EcR

SF-1
LRH-1
DAX-1
SHP
TLX
PNR
NGFI-B α, β, γ
ROR α, β, γ
ERR α, β, γ
RVR α, β, γ
GCNF
TR 2,4
HNF-4
COUP-TF α, β, γ

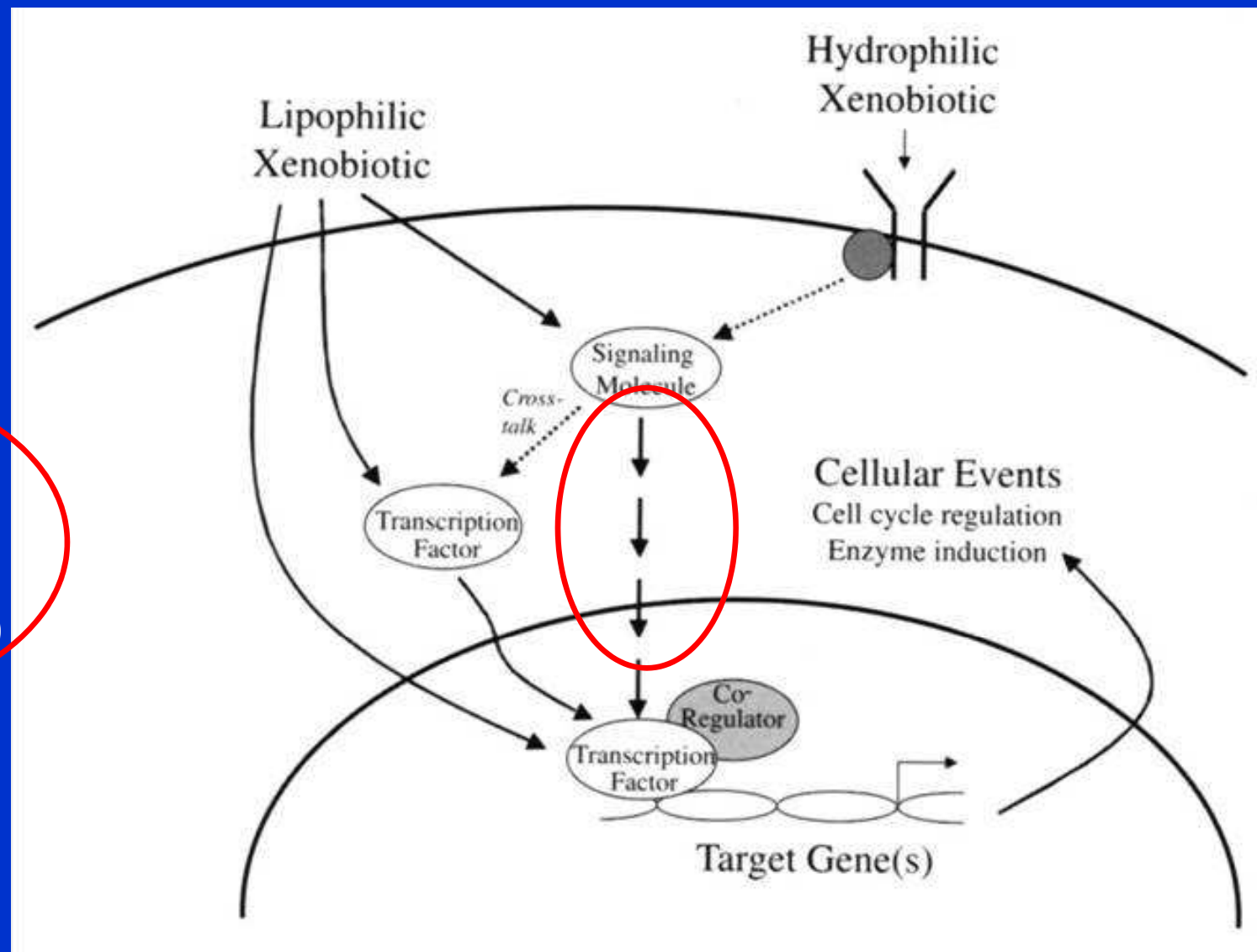
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Nuclear receptor	Ligand	CYP enzyme	Cytosolic binding protein	ABC transporter
Retinoid X receptors*	RXR α,β,γ 9- <i>cis</i> Retinoic acid	-	-	-
Peroxisome proliferator-activated receptors	PPAR α Fatty acids Fibrates	↑ CYP4A1 ↑ CYP4A3	↑ L-FABP	↑ ABCD2, ABCD3 ↑ ABCB4
	PPAR δ Fatty acids Carboprostacyclin	(?)	(?)	(?)
	PPAR γ Fatty acids Eicosanoids Thiazolidinediones	↑ CYP4B1	↑ ALBP/aP2 ↑ H-FABP	(?)
Liver X receptors	LXR α,β Oxysterols	↑ CYP7A1	OSBPs?	↑ ABCA1, ↑ ABCG1, ABCG4 ↑ ABCG5, ABCG8
Farnesoid X receptor	FXR Bile acids	↓ CYP7A1 ↓ CYP8B1	↑ IBABP	↑ ABCB11
Xenobiotic receptors	SXR/PXR Xenobiotics Steroids	↑ CYP3A ↑ CYP2C	(?)	↑ ABCB1, ABCC2
	CAR Xenobiotics Phenobarbital	↑ CYP2B ↑ CYP2C	(?)	↑ ABCC3
Ecdysone receptor	EcR 20(OH)-ecdysone	↑ 26-(OH)ase	Hexamerins	↑ E23
Retinoic acid receptors	RAR α,β,γ Retinoic acids	↑ CYP26A1	↑ CRABPII ↑ CRBPI	(?)
Vitamin D receptor	VDR 1,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$	↑ CYP24 ↓ CYP27B1	(?)	(?)

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY



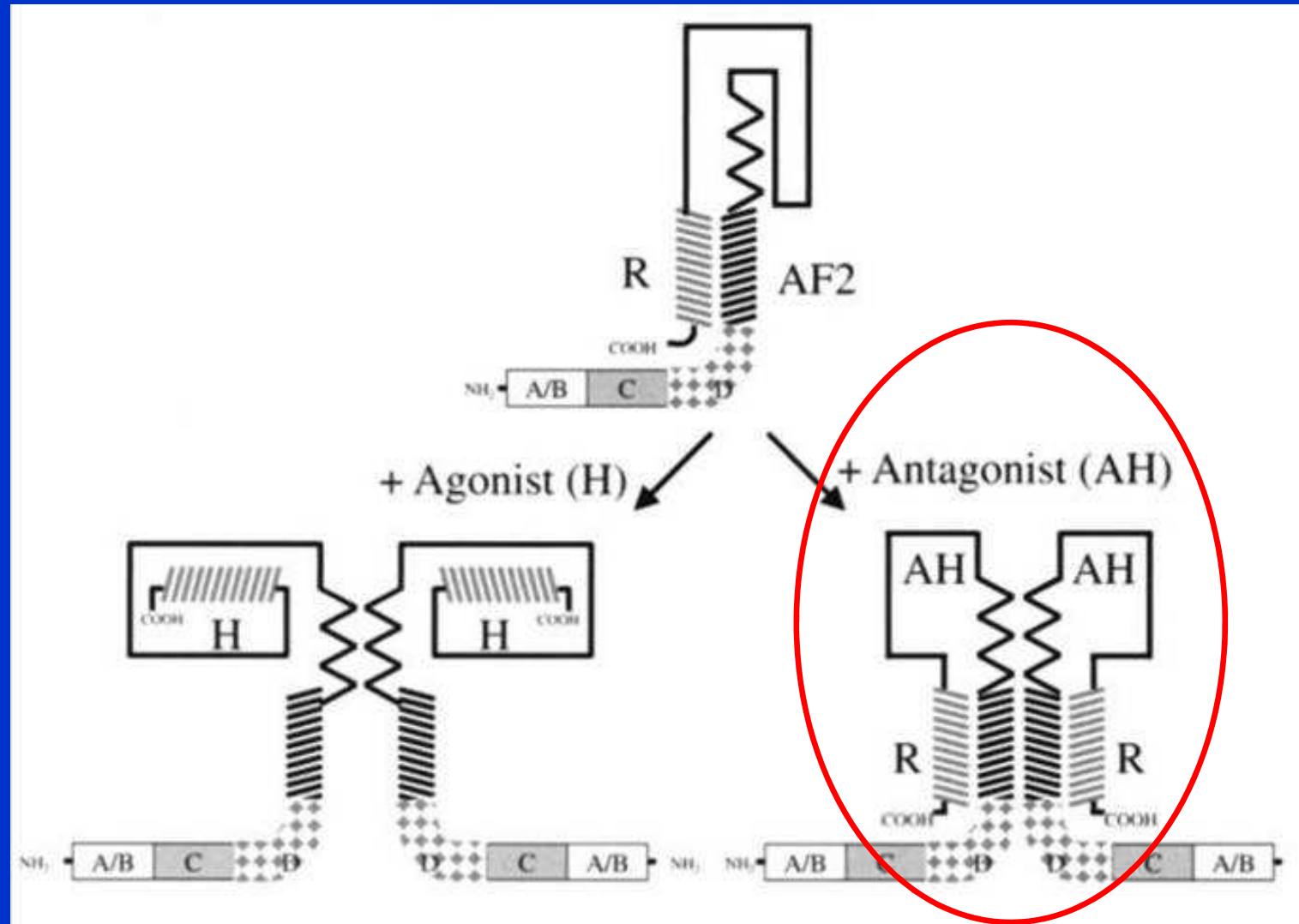
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY



Ligand-independentní
modulace
transkripčního
faktoru (MAPK, PKA,..)

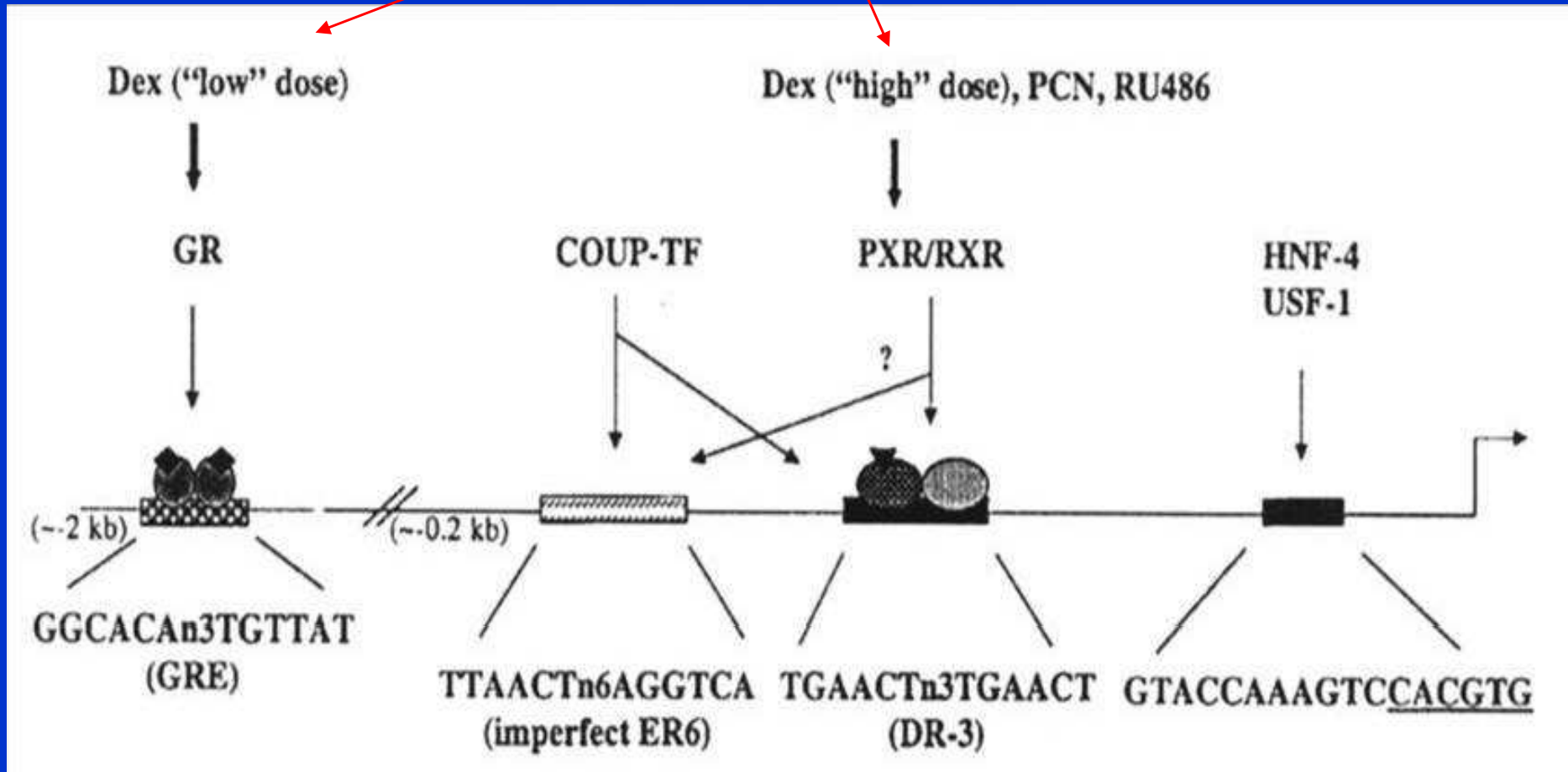
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: vazba antagonistického a agonistického ligandu

Antagonisté:
vazba bez
transaktivace



REGULACE GR / PXR / CAR

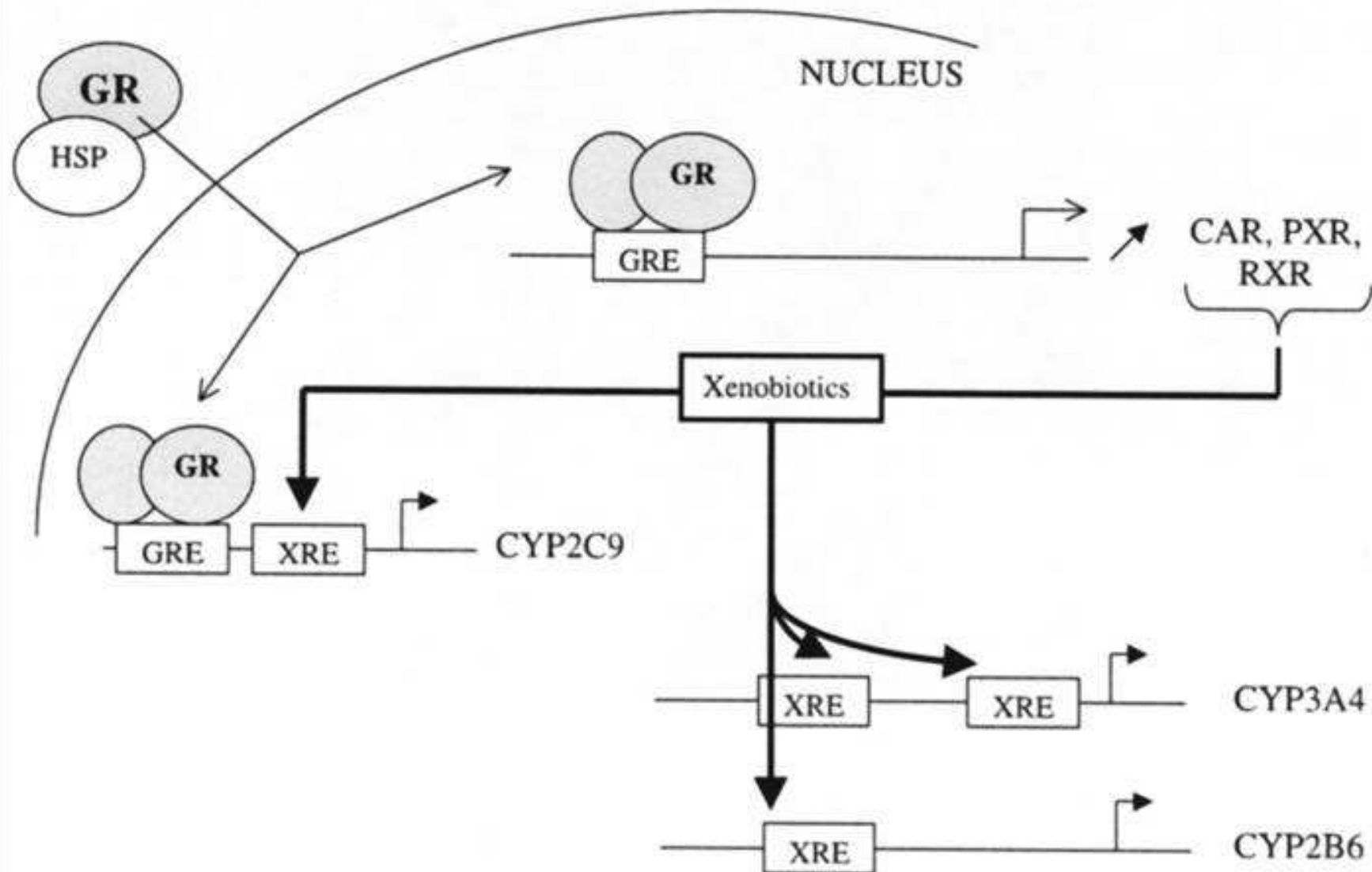
aktivace nízkou vs. vysokou koncentrací ligandu



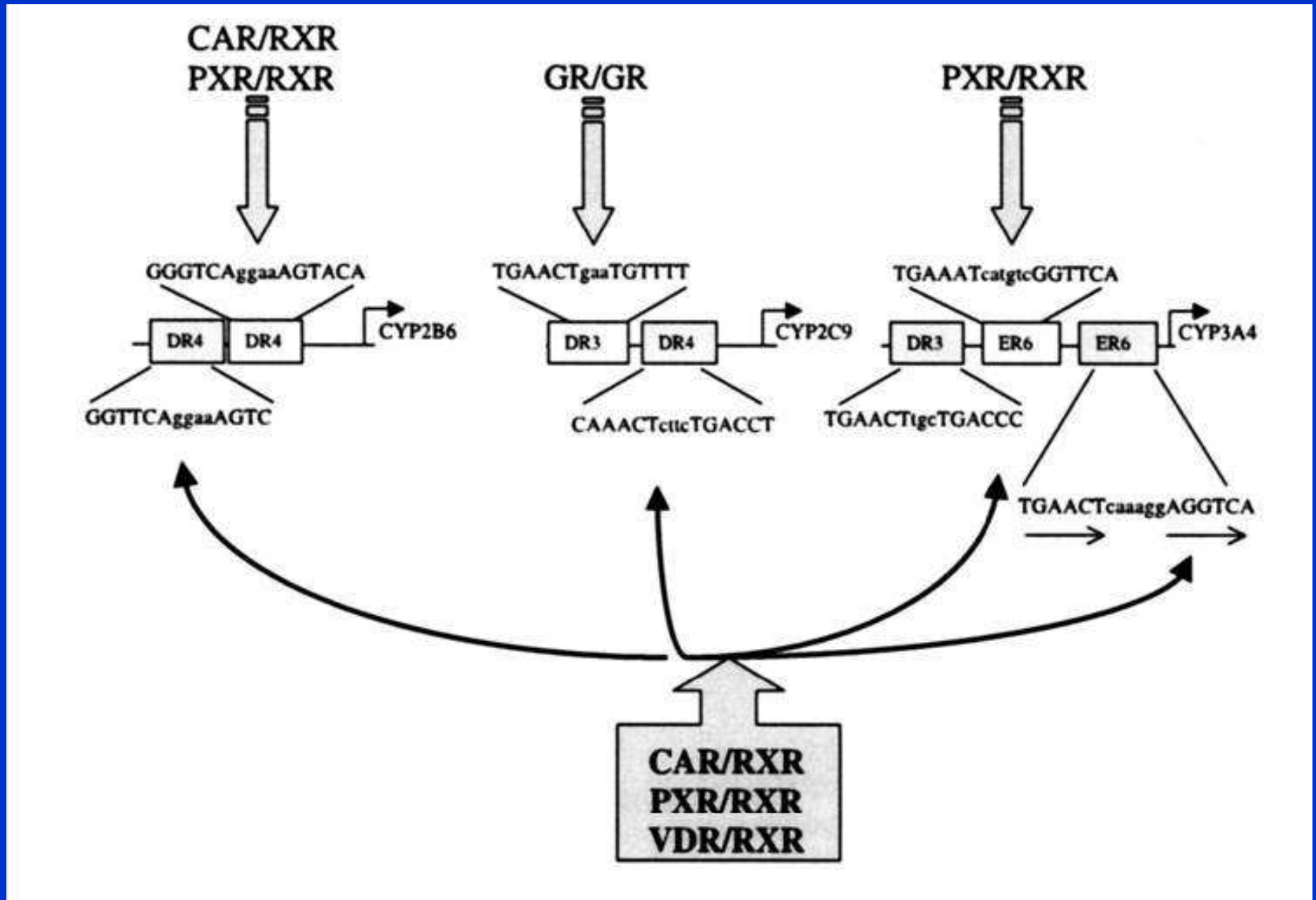
REGULACE GR / PXR / CAR

(více úrovní regulace)

J.M. Pascussi et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1619 (2003) 243–253

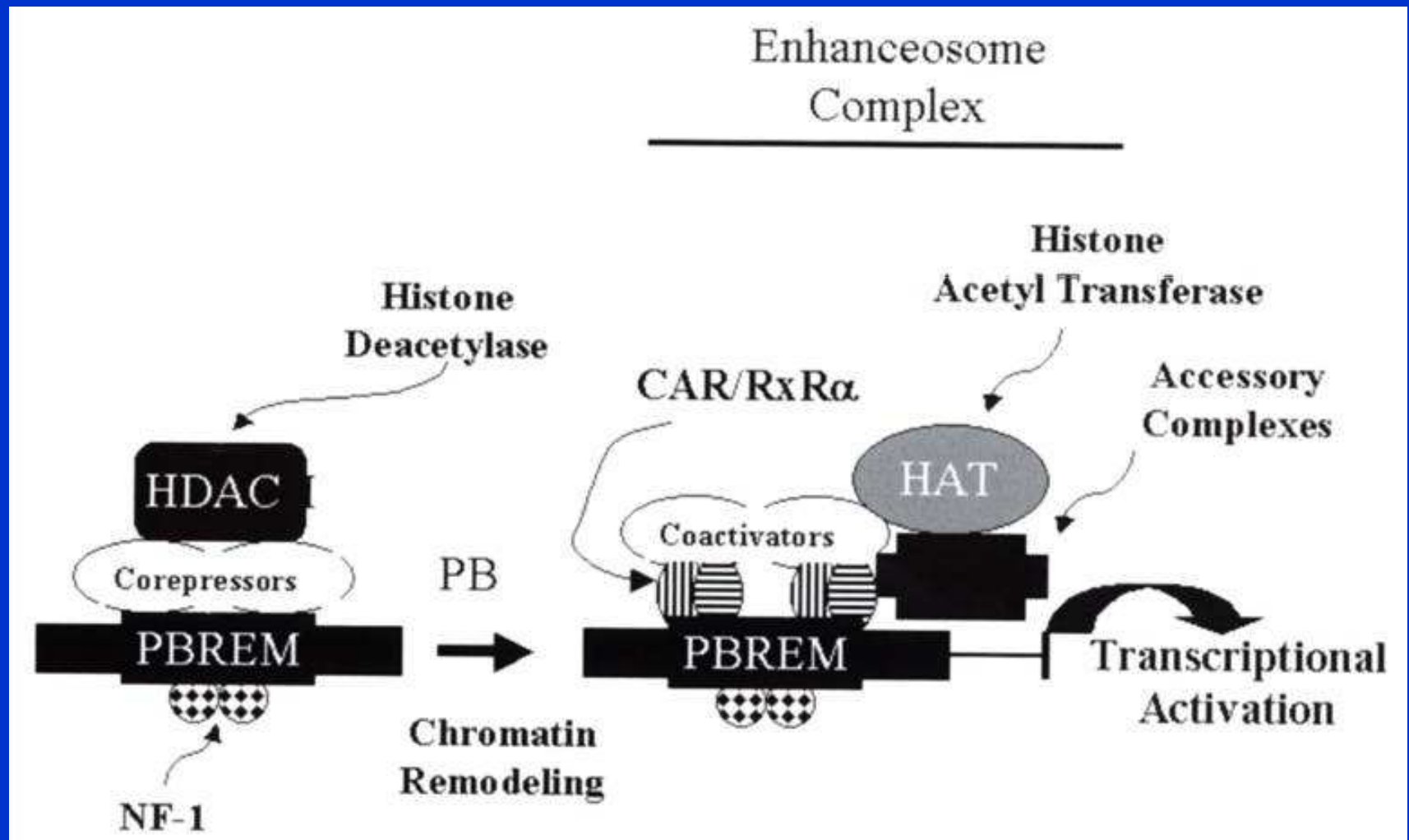


REGULACE GR / PXR / CAR



REGULACE CAR FENOBARBITALEM

Další faktory
modulující
aktivaci
transkripce

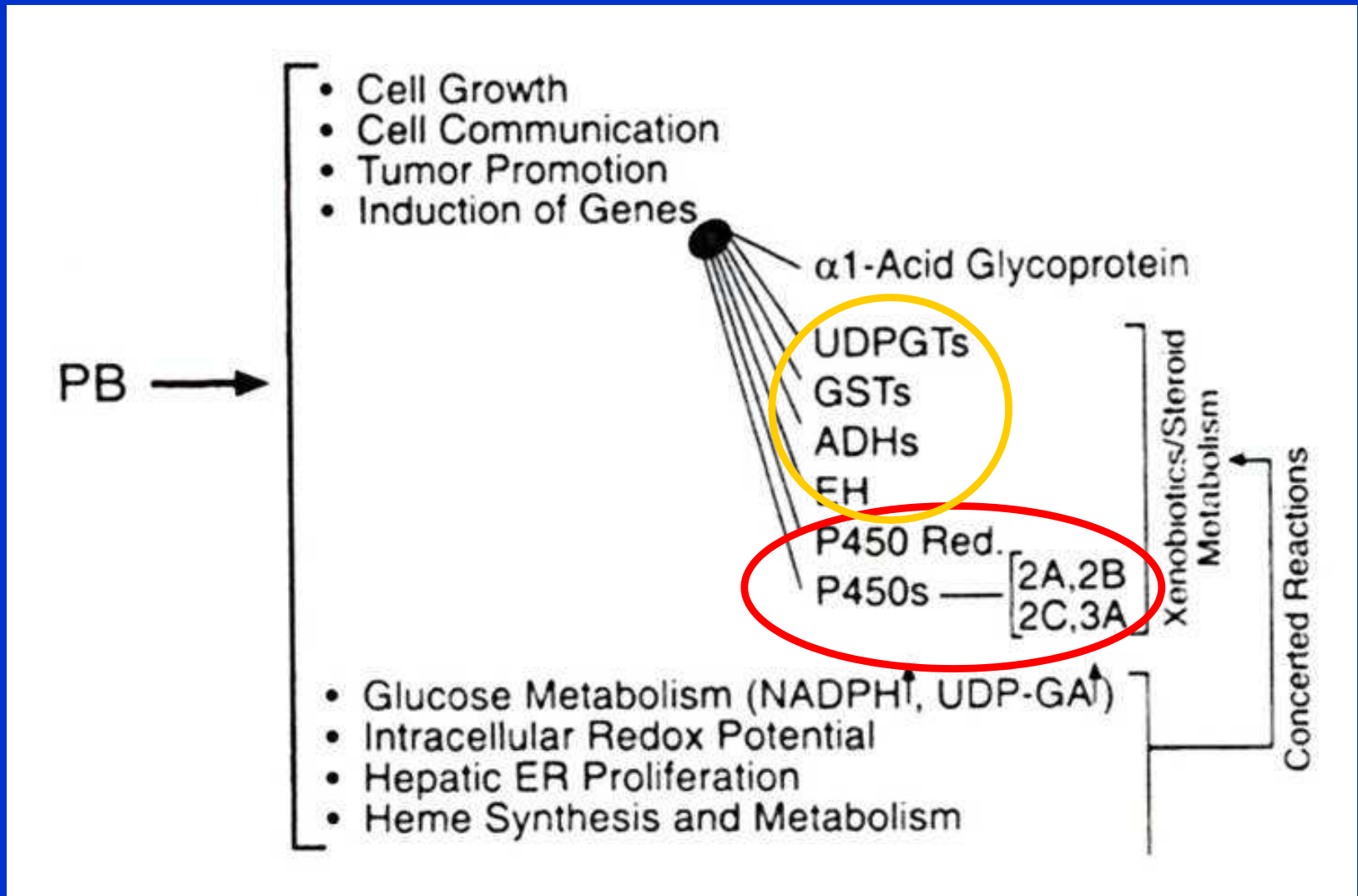


FENOBARBITAL (PB) – AGONISTA CAR A DALŠÍCH PROCESŮ

Biotransformace:

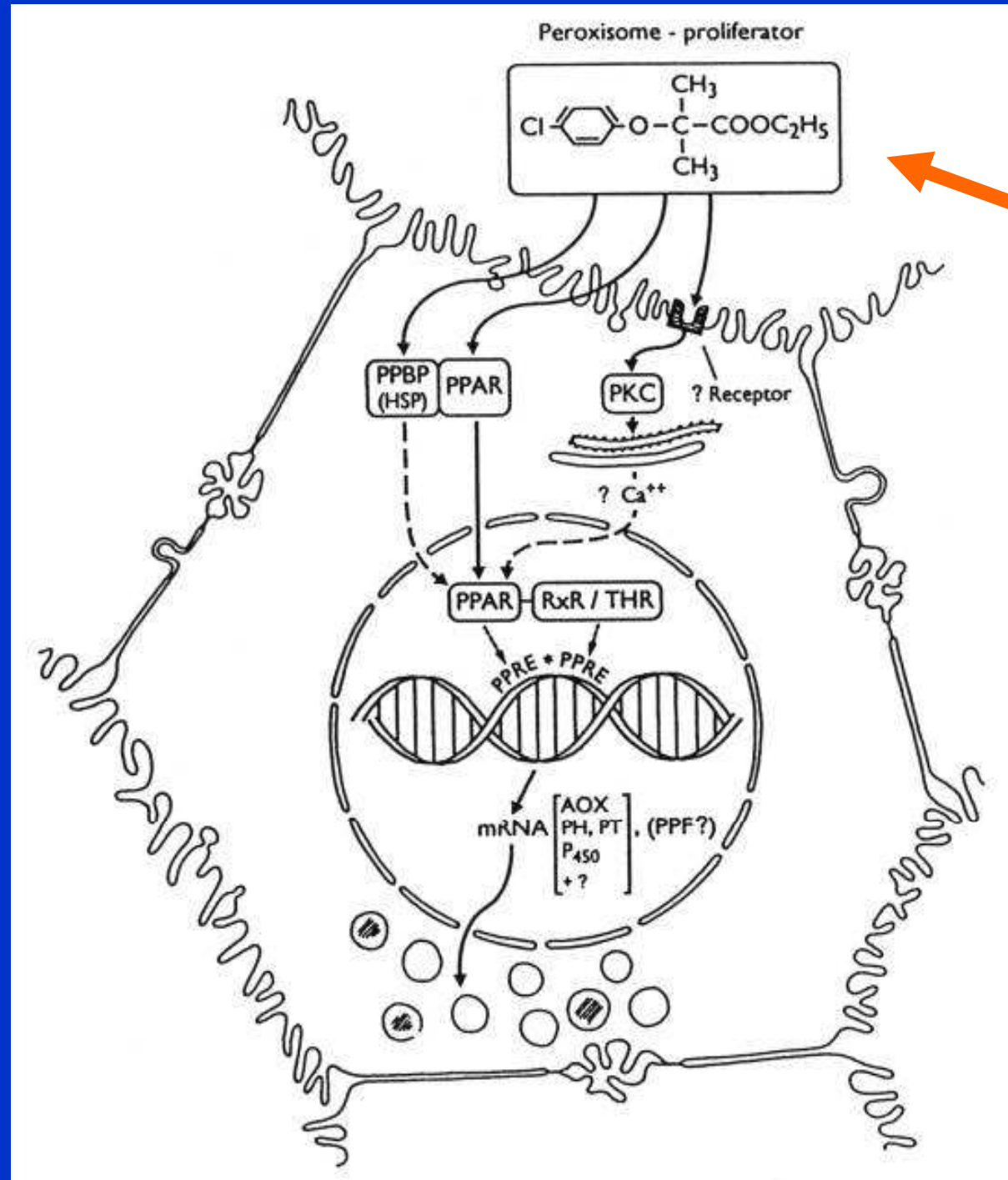
enzymy 1. fáze

enzymy 2. fáze



PPAR α

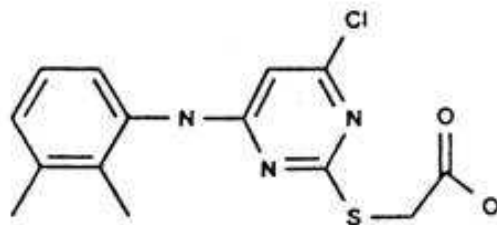
(Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor alpha)
kontroluje expresi CYP4A1 a enzymů metabolismu lipidů



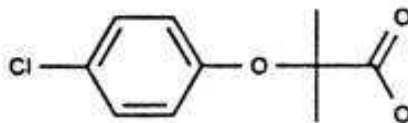
Induktory:
mastné kyseliny,
hypo-
lipidemika
(fibráty),
environ.
látky
(ftaláty)

LIGANDY PPAR α

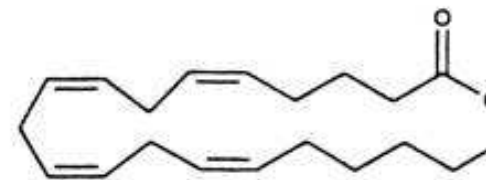
Farmaka
(hypolimidemika)



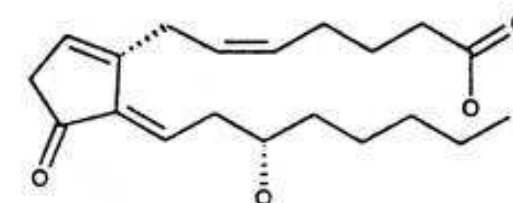
Wy 14,643



Clofibrate

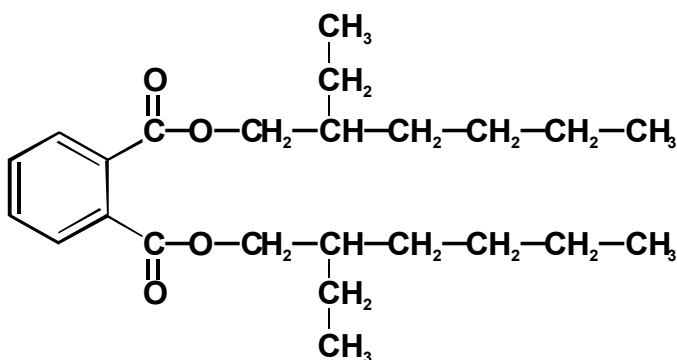


Arachidonic Acid

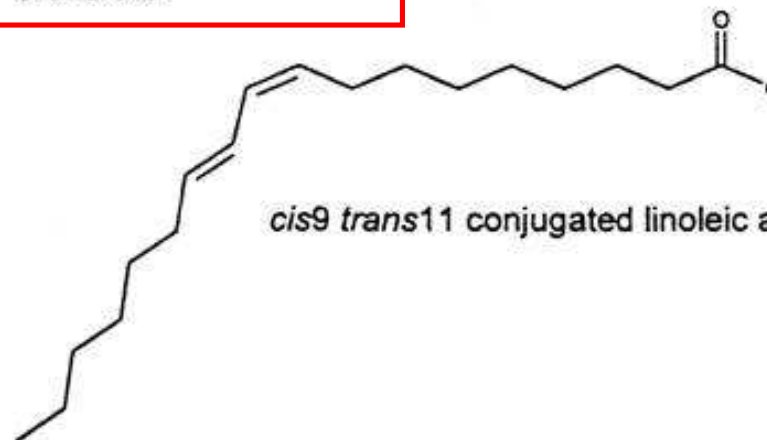


Prostaglandin J2

Environmentální
kontaminanty



Di(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)

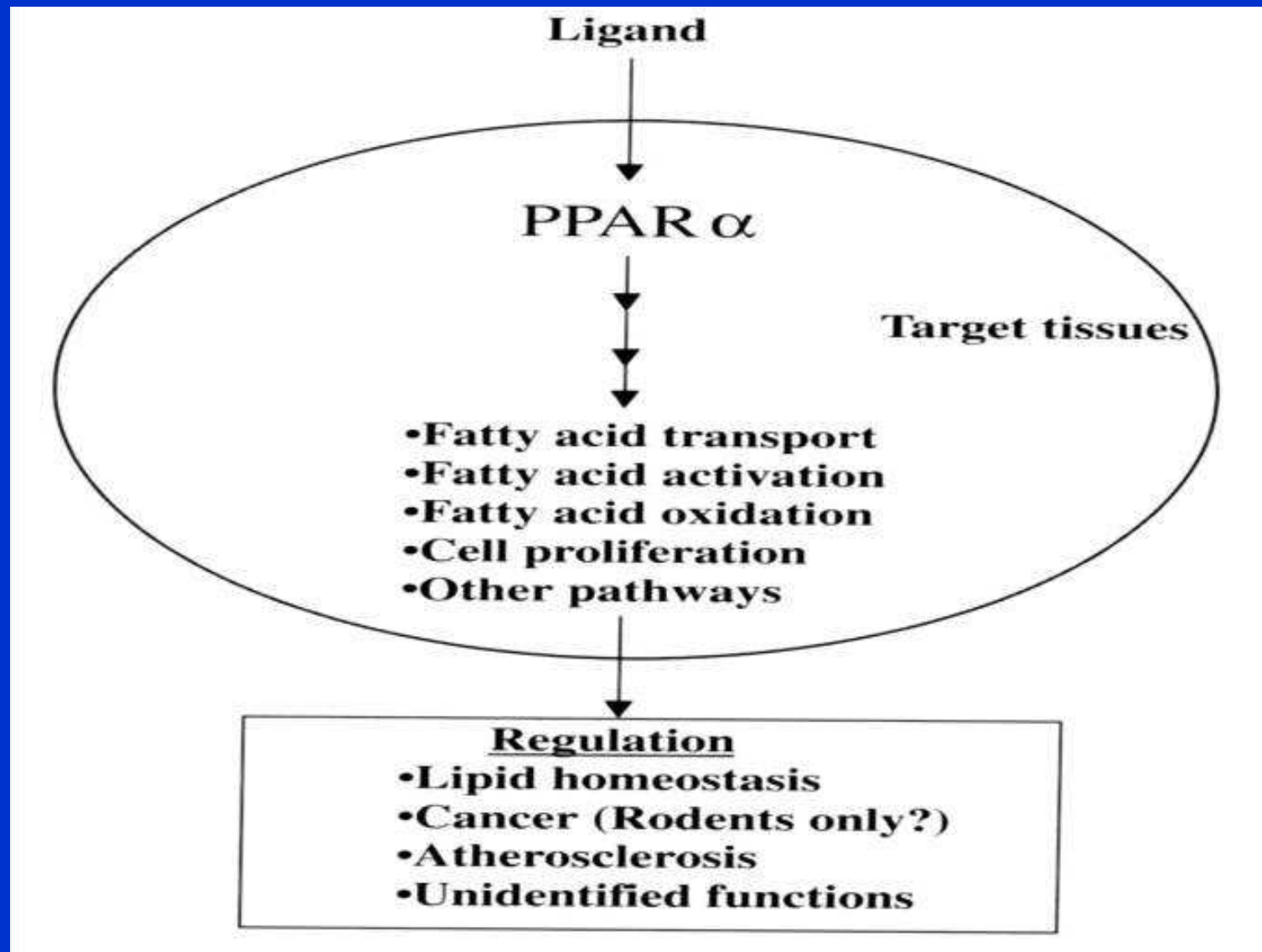


cis9 trans11 conjugated linoleic acid

(Endogenní) lipidy

DŮSLEDKY AKTIVACE PPAR α

Nerovnoměrná
indukce CYP4A
(vedl. produkt: H₂O₂)
a dalších enzymů
(např. CAT)
dependentních
na PPARalfa

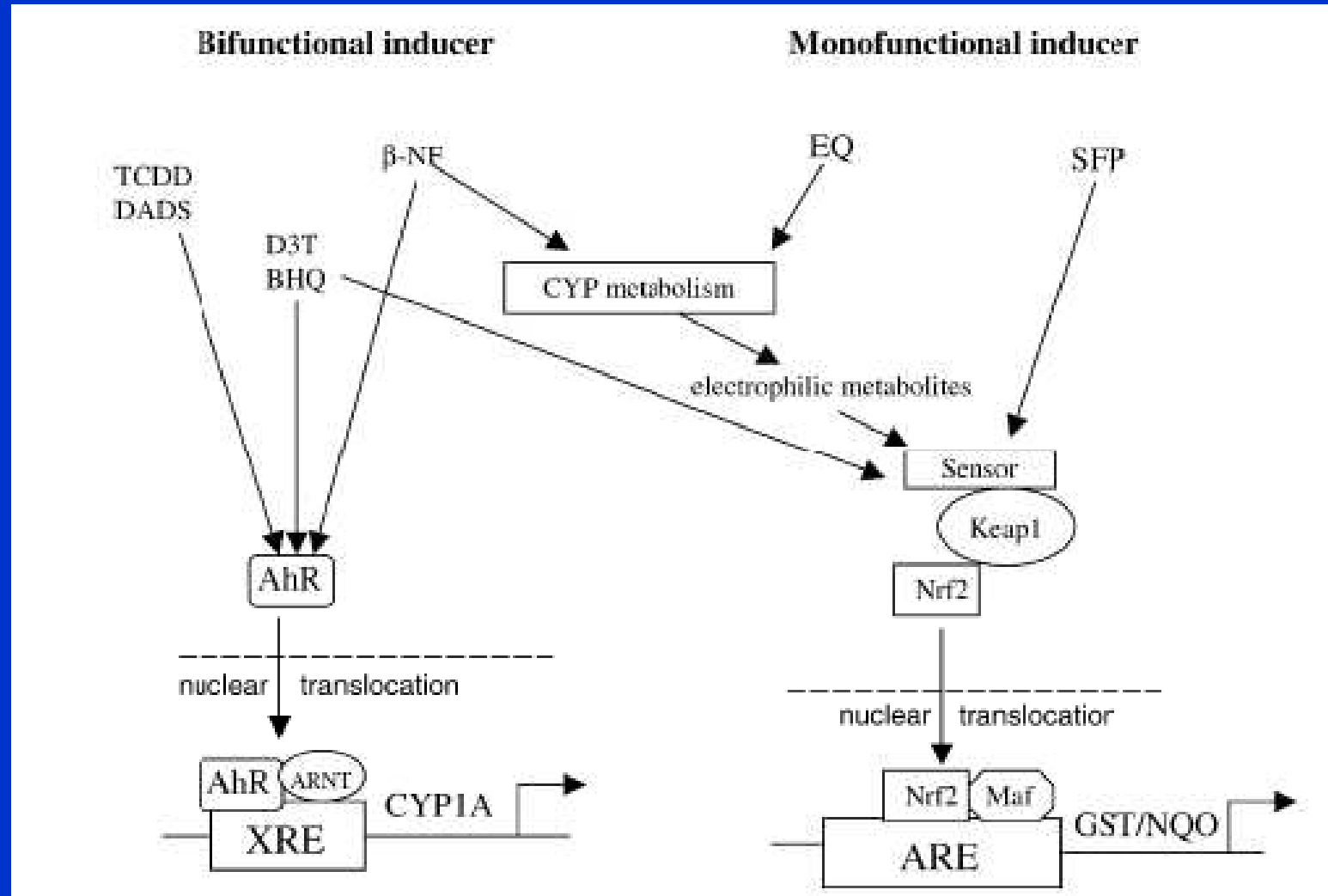


**REGULACE DALŠÍCH ENZYMŮ 1.FÁZE
BIOTRASFORMACE**

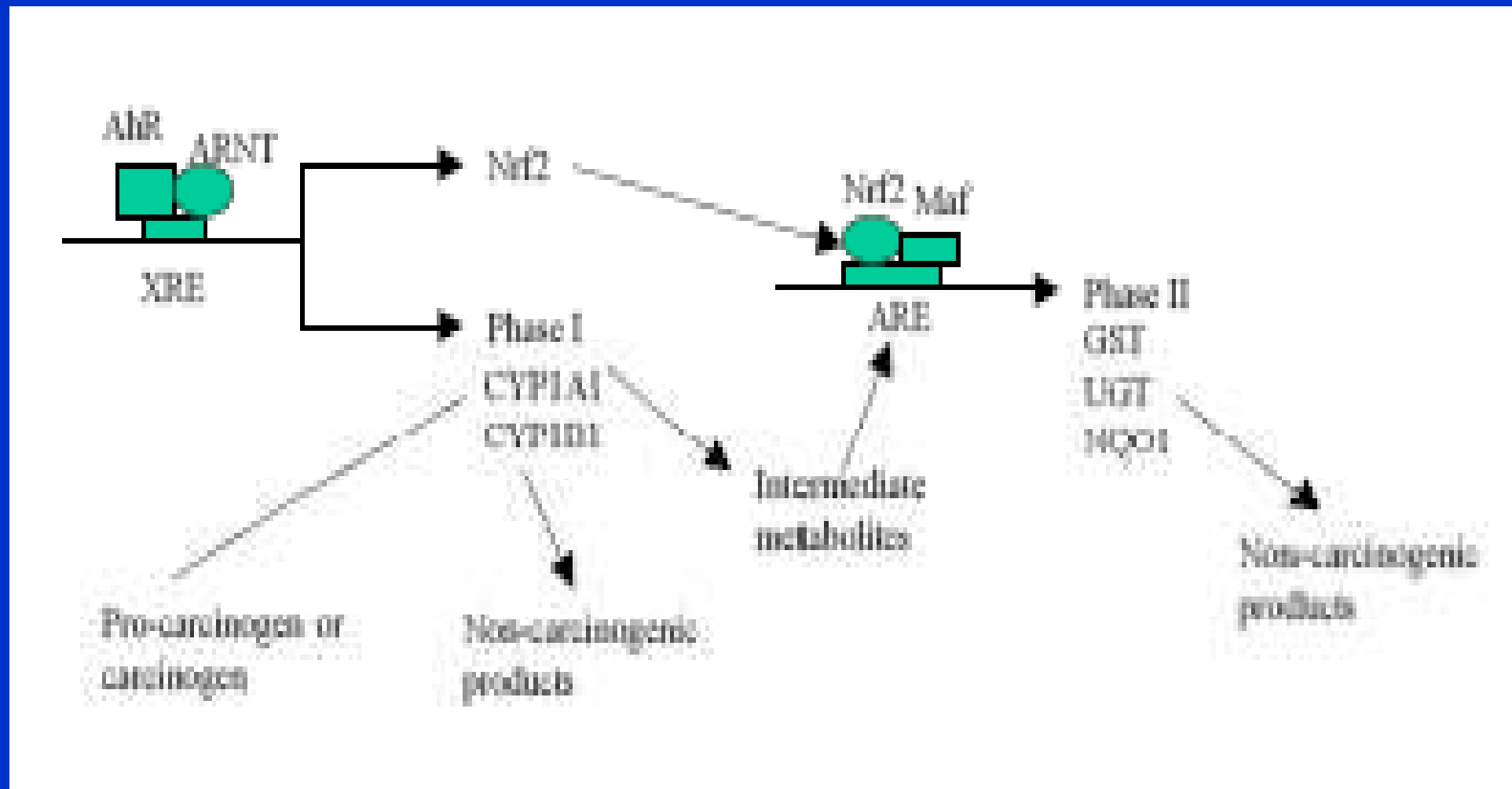
KLASICKÝ POHLED NA INDUKCI GENOVÉ EXPRESE KONTROLOVANOU XRE A ARE

ARE = antioxidant response element

Bifunkční induktory = xenobiotika induk. AhR a Nrf2

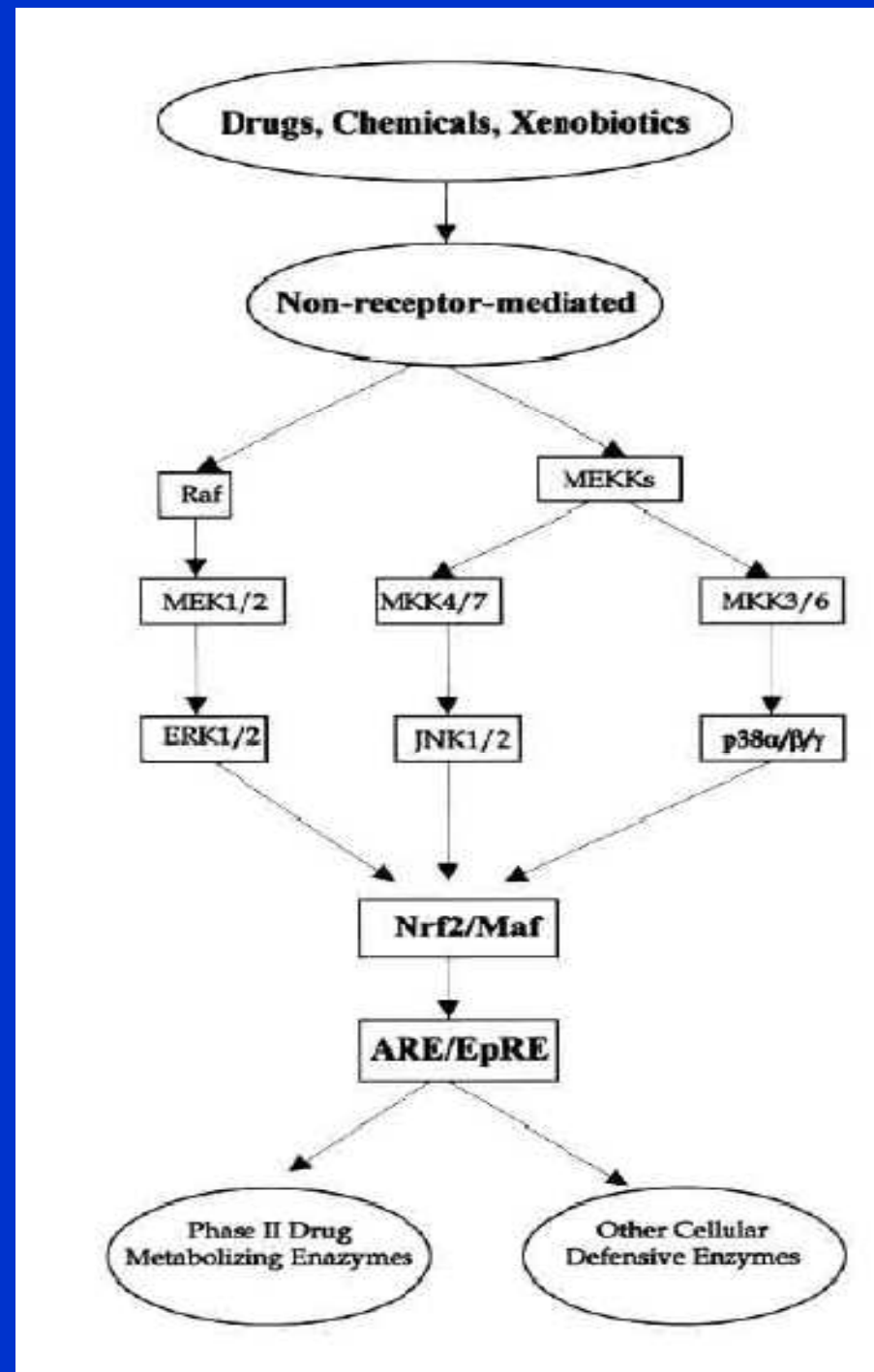


TRANSKRIPČNÍ FAKTOR **Nrf2** JE REGULOVÁN OXIDATIVNÍM STRESEM / ELEKTROFILNÍMI METABOLITY A TAKÉ AKTIVACÍ AhR



INDUKCE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ A REGULÁTORŮ ADAPTAČNÍCH ODPOVĚDÍ MŮŽE BÝT MODULOVÁNA INTRACELULÁRNÍ SIGNÁLNÍ TRANSDUKCÍ

(příklad MAPkináz a indukce enzymů 2. fáze biotransformace, některých enzymů 1. fáze (AKR, NQO) a antioxidačních enzymů; ARE/EpRE = antidační/elektrofilní response element, specifická sekvence DNA v promoterech genů)



ALDOKETOREDUKTÁZY

- většinou monomerní NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktázy
- konvertují **karbonyl** \rightleftharpoons **alkohol**
- dosud 115 enzymů ve 14 „genových rodinách“
- substrátová specifita: cukerné aldehydy; steroidní hormony; prostaglandiny a lipidové aldehydy; chemické karcinogeny (NNK, PAH-*trans*-dihydrodioly, aflatoxindialdehyd)

Příklady lidských AKR:

AKR1A1 (aldehydoreduktáza)

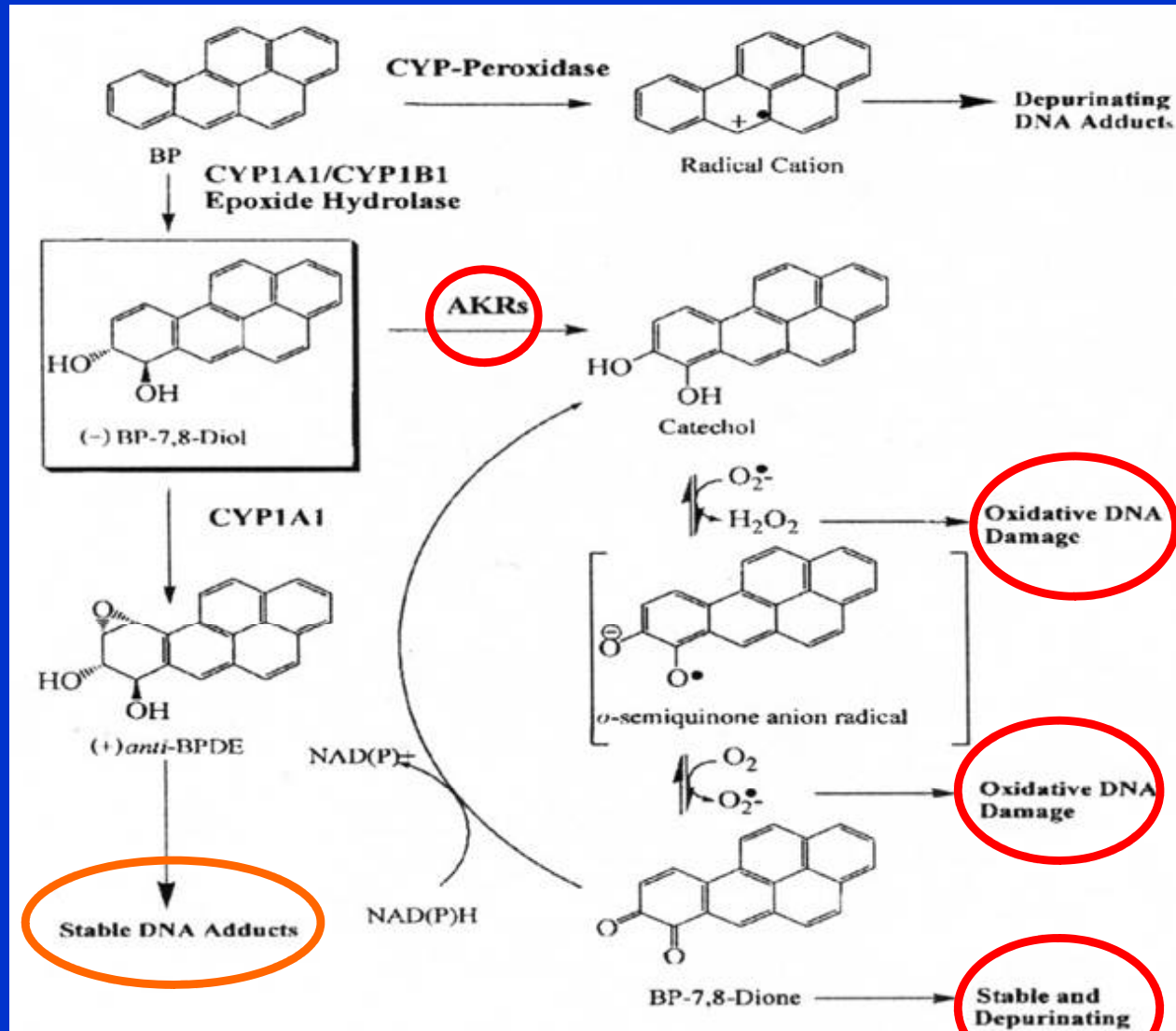
AKR1B1 (aldosareduktáza)

AKR1C1-1C4 (20 α -, 3 α -, 3 α /17 α -, 3 α -HSD)

AKR1D1 (5 β -reduktáza)

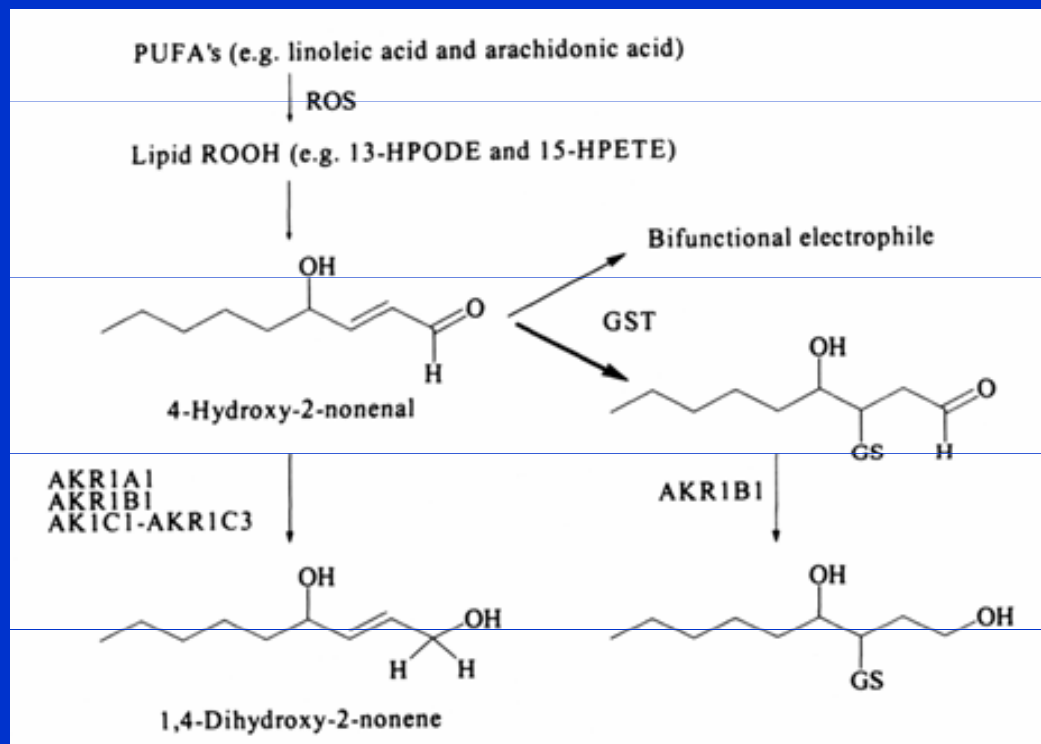
1. fáze biotransformace PAH: účast CYP1A1/1A2/1B1 (monooxygenáza), EH (hydroláza) a AKR (reduktáza)

Detoxikace
versus
bioaktivace



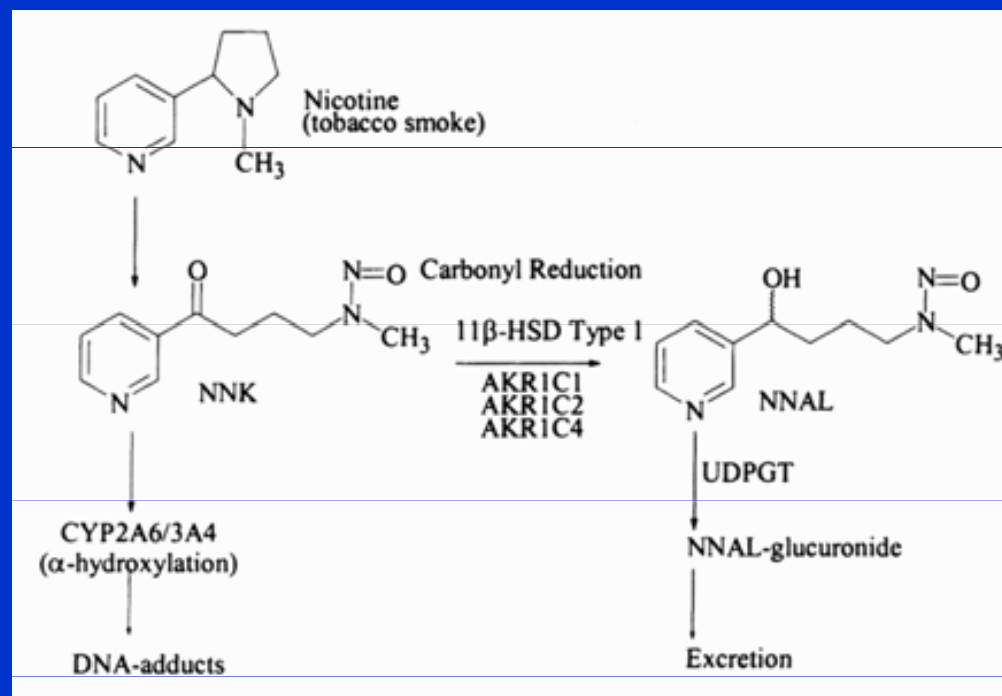
katecholy =
- metabolity PAHs,
- podobně
metabolity
steroidů (E2)

ALDOKETOREDUKTÁZY

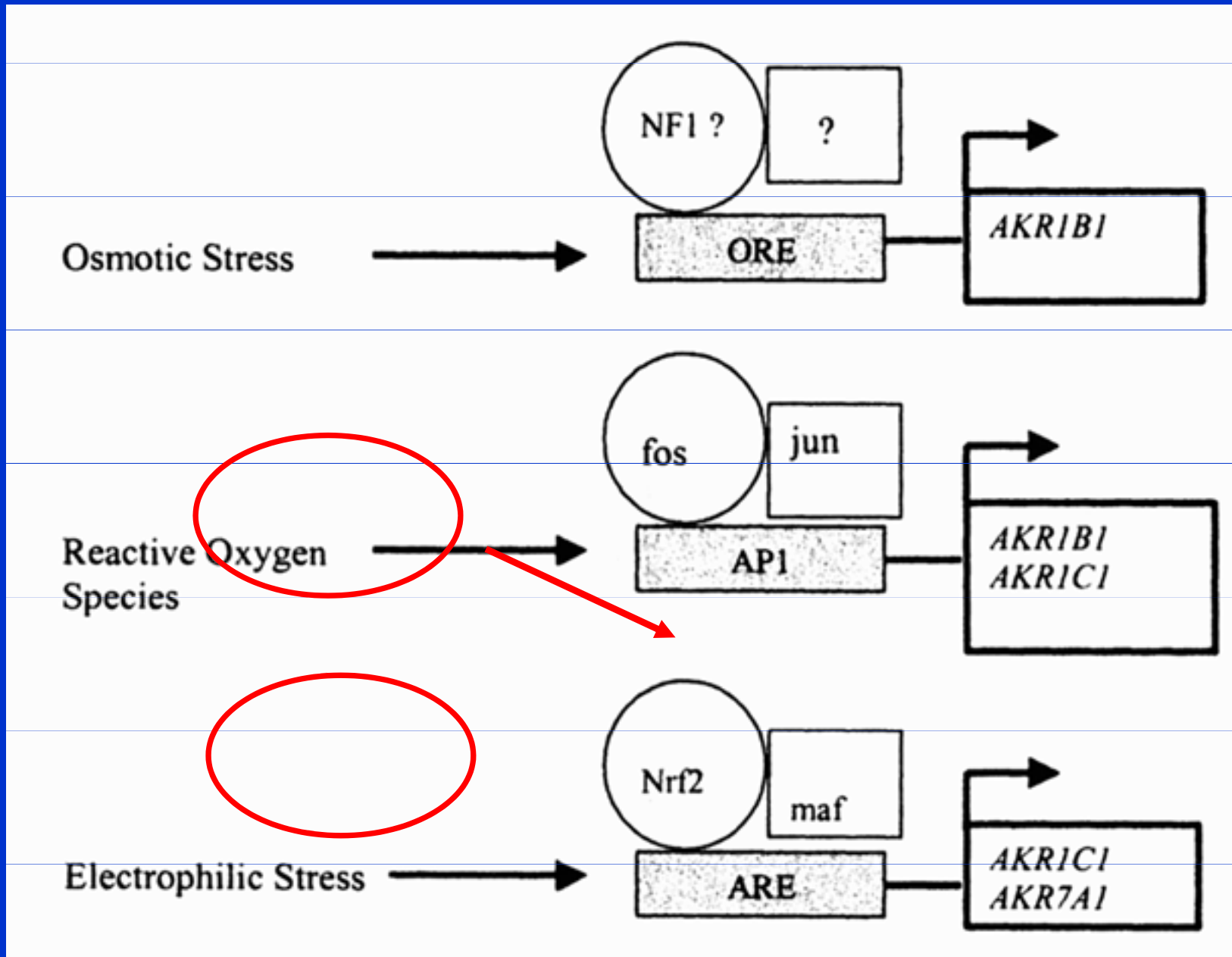


Biotransformace aldehydů
lipidní peroxidace

Detoxikace NNK

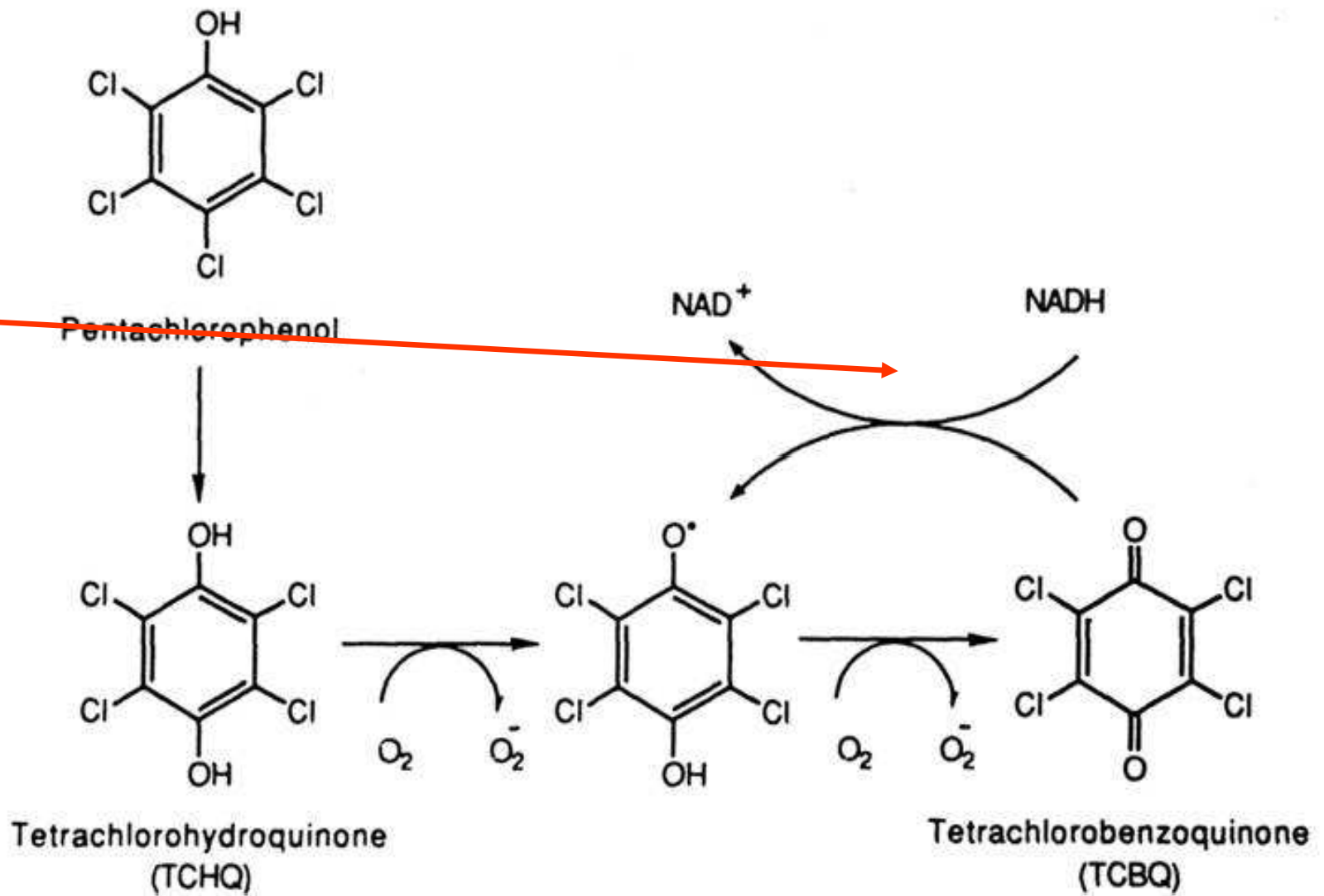


REGULACE ALDOKETOREDUKTÁZ



NQO: NADPH/CHINONOXIDOREDUKTÁZY (DT-DIAFORÁZY)

Kofaktory
NADPH
nebo NADH



EPOXIDHYDROLÁZY

Funkce:

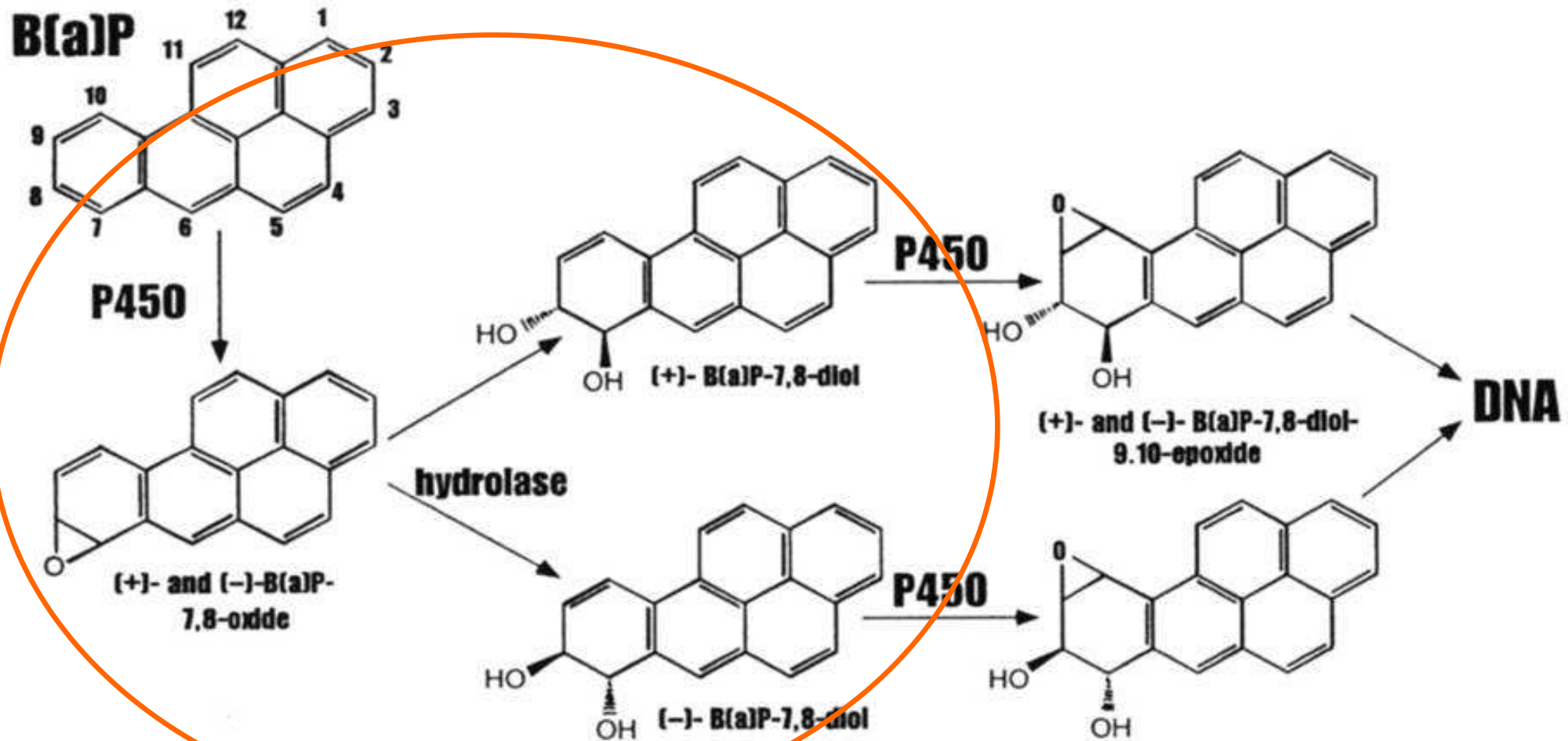
- metabolismus lipidů (epoxidů) v živočišných a rostlinných buňkách
- metabolismus intermediátů xenobiotik s epoxidovou skupinou

celkem 7 forem EH:

- savčí solubilní (cytosolová) EH
- mikrosomální EH
- leukotrien A4 hydroláza
- etc.

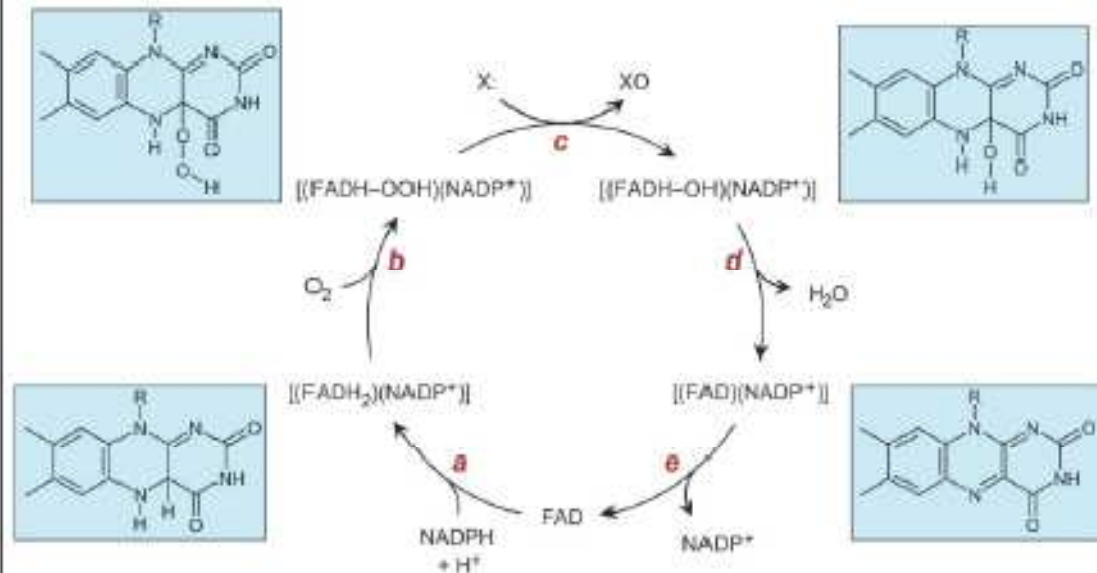
Regulace?

ROLE CYP1A1/CYP1A2/CYP1B1 A EPOXIDHYDROLÁZ V METABOLICKÉ AKTIVACI POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



FLAVINMONOOXYGENÁZY

The catalytic cycle of FMO



Some characteristics of FMO

Isoforms most relevant for drug metabolism	<ul style="list-style-type: none"> • FMO1 (fetal human liver, adult kidney, intestine, liver of nonhuman mammals) • FMO2 (lung) • FMO3 (adult liver)
Substrate characteristics	<ul style="list-style-type: none"> • Soft nucleophiles (basic amines, sulfides, Se- or P-containing compounds) • Favorable: neutral or with single positive charge • Unfavorable: zwitterions, anions, dications
Typical reactions	<ul style="list-style-type: none"> • Formation of <i>N</i>-oxides (aliphatic, heterocyclic amines), <i>S</i>-oxides, <i>Se</i>-oxides, phosphine oxides • No direct dealkylations or deaminations by <i>C</i>-hydroxylation as with CYPs
Typical drug substrates	Albendazole, benzydamine, chlorpheniramine, cimetidine, clindamycin, fenbendazole, itopride, olopatadine, pargyline, ranitidine, sulindac sulfide, thioridazine, xanomeline, zimeldine
Endogenous substrates	Cysteamine, cysteine conjugates, lipoic acid, methionine, trimethylamine (FMO3)

Enzyme subclass and sub-subclass	<i>EC 1.14</i> : Oxidoreductases acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen // <i>EC 1.14.13</i> : With NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one O-atom
Systematic name	<i>N,N</i> -Dimethylaniline,NADPH:oxygen oxidoreductase (<i>N</i> -oxide-forming)
Gene root, isoforms	<i>FMO</i> , five functional human enzymes (FMO1 to FMO5)
Prosthetic group	Flavin-adenine dinucleotide (FAD)
Cofactor	NADPH
Subcellular localization	Membrane of smooth endoplasmic reticulum
Organs (highest levels)	Liver, lungs, kidneys