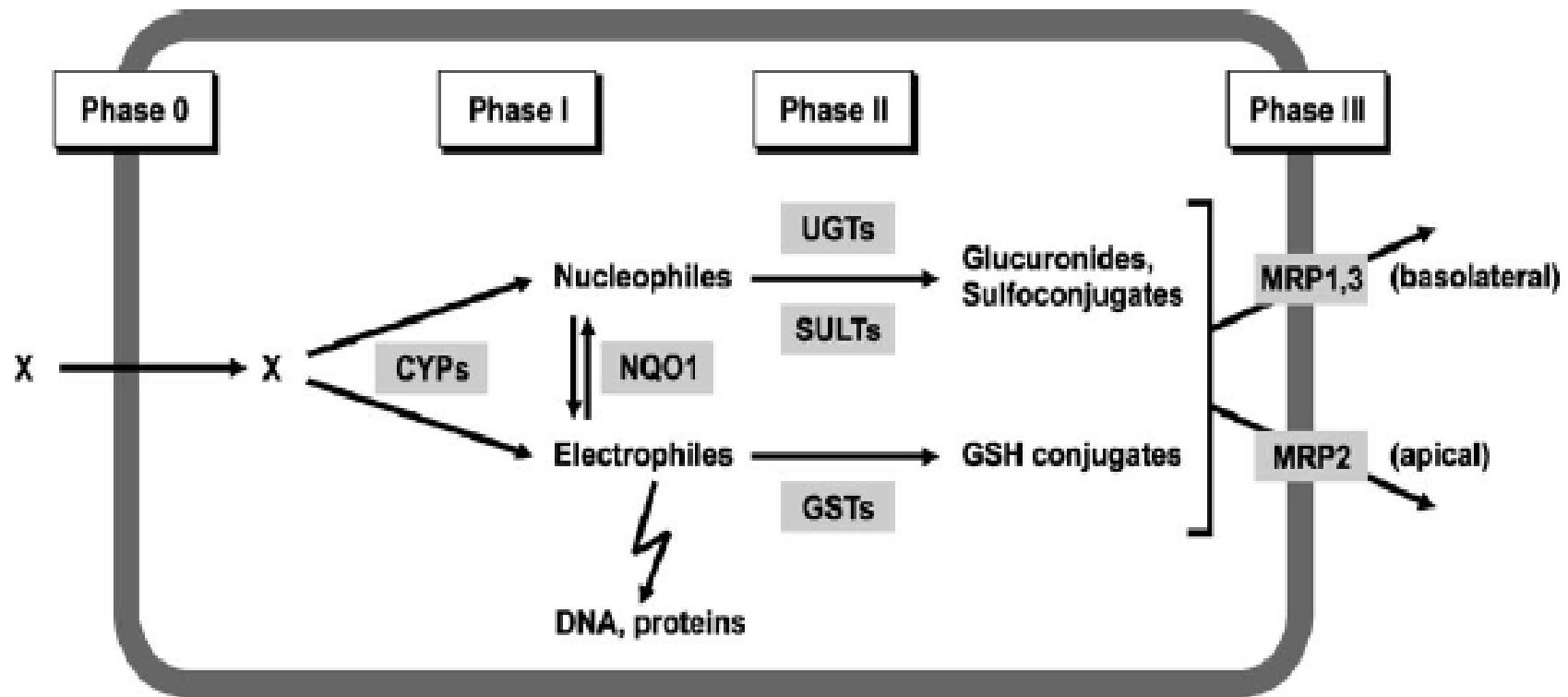


**„Biotransformace“ = metabolismus  
cizorodých látek a regulace hladin  
biotransformačních enzymů**

# ENZYMY METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK

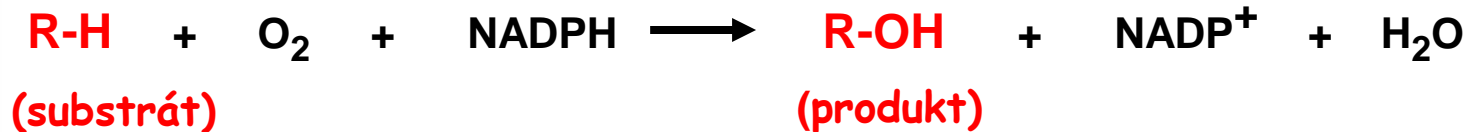
- Enzymy 1. fáze biotransformace xenobiotik, steroidních hormonů a mastných kyselin - monooxygenázy (CYP, AKR, FMO), reduktázy (AKR, NQO), hydrolázy (esterázy, epoxidhydrolázy); další reakce: hydratace, isomerace.
- 2. fáze biotransformace - transferázy (GST, UDPGT, SULF, acetylázy aj.); antioxidantní enzymy (SOD, CAT, GPx, GR).
- 3. fáze biotransformace (ABC transportéry)

# BIOTRANSFORMACE CIZORODÝCH LÁTEK A STEROIDŮ, EIKOSANOIDŮ AJ. ENDOGENNÍCH LÁTEK



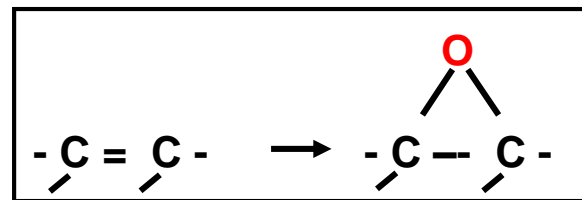
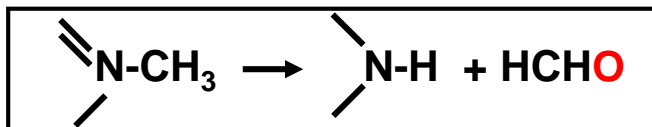
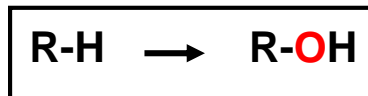
# 1. FÁZE BIOTRANSFORMACE: monooxygenázové reakce

CYP enzymy



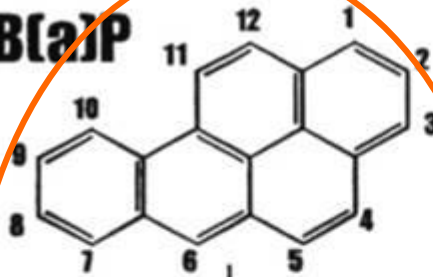
Funkce cytochromů P450 (CYP):

- Nejprve je nutný přenos elektronů z NADPH na CYP enzym (NADPH:P450-oxidoreduktáza)
- Aktivace molekuly kyslíku, „roztržení“ vazby
- Oxidace substrátu (hydroxylace, N-demethylace, epoxidace, dehalogenace...)

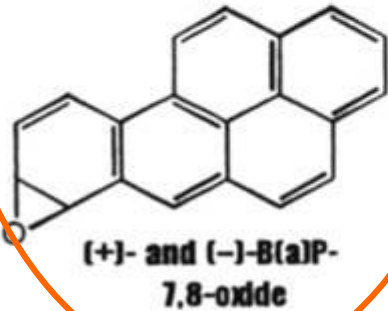


# ROLE CYP1A1/CYP1A2/CYP1B1 A EPOXIDHYDROLÁZ V METABOLICKÉ AKTIVACI POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

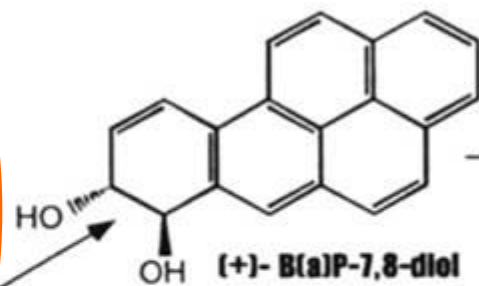
**B(a)P**



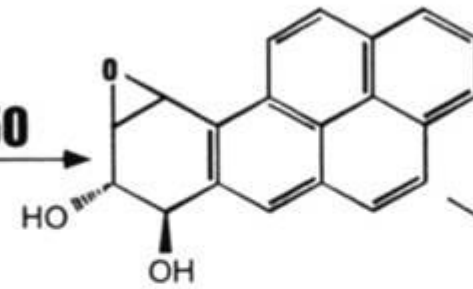
**P450**



**hydrolase**

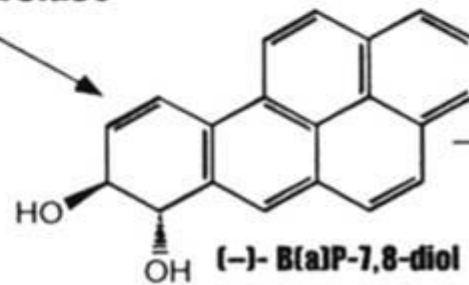


**P450**

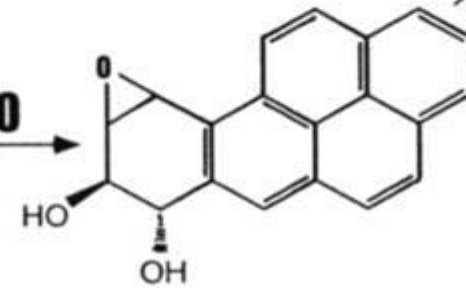


**(+)- and (-)- B(a)P-7,8-diol-9,10-epoxide**

**DNA**



**P450**





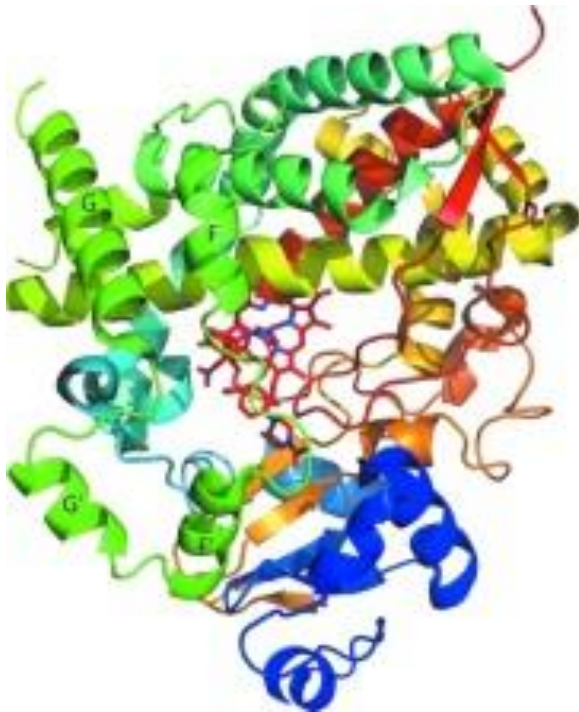
## Seznam nejvýznamnějších cytochromů P450, které jsou zodpovědné za biotransformaci cizorodých látek:

- CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 (metabolizuje polycyklické aromatické uhlovodíky);
- CYP2C9 (metabolizuje nesteroidní antiflogistika a další léčiva), CYP2D6 (beta-blokátory, kodein); CYP2E1 (org. rozpouštědla jako ethanol, benzen, toluen)
- CYP3A4 (metabolizuje asi 30% všech xenobiotik, především léčiv včetně antibiotik);
- CYP4A11 a další CYPs metabolizující mastné kyseliny (CYP4A = PUFA hydroxylázy; CYP2C a CYP2J = PUFA epoxygenázy) a některá xenobiotika.

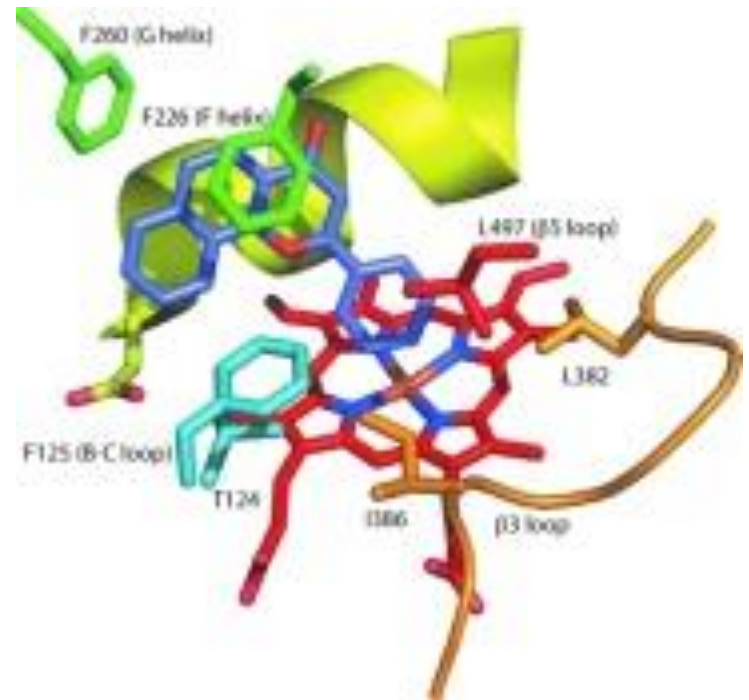
Další desítky CYP enzymů jsou zapojeny do biosyntézy a metabolismu endogenních látek, např. CYP7A (hydroxylace cholesterolu), CYP17 (hydroxylace steroidů), CYP19 (aromatáza - přeměna androgenů na estrogeny).

# Vlastnosti cytochromů P450

Cytochromy P450 = hemoproteiny; v UV-VIS spektru maximum při 450 nm (v redukovaném stavu a navázaný oxid uhelnatý); výjimka mezi enzymy: široká substrátová specifita, různé katalytické aktivity, výskyt nejvíce v játrech, GIT, plicích, ledvinách, ale i v dalších tkáních). Klasifikace podle podobnosti sekvencí: genové rodiny CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 atd., podrodiny CYP1A, CYP1B atd. (cca 60% sekvence), jednotlivé isoformy CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1; polymorfismus.



CYP3A4 s navázaným inhibítorem



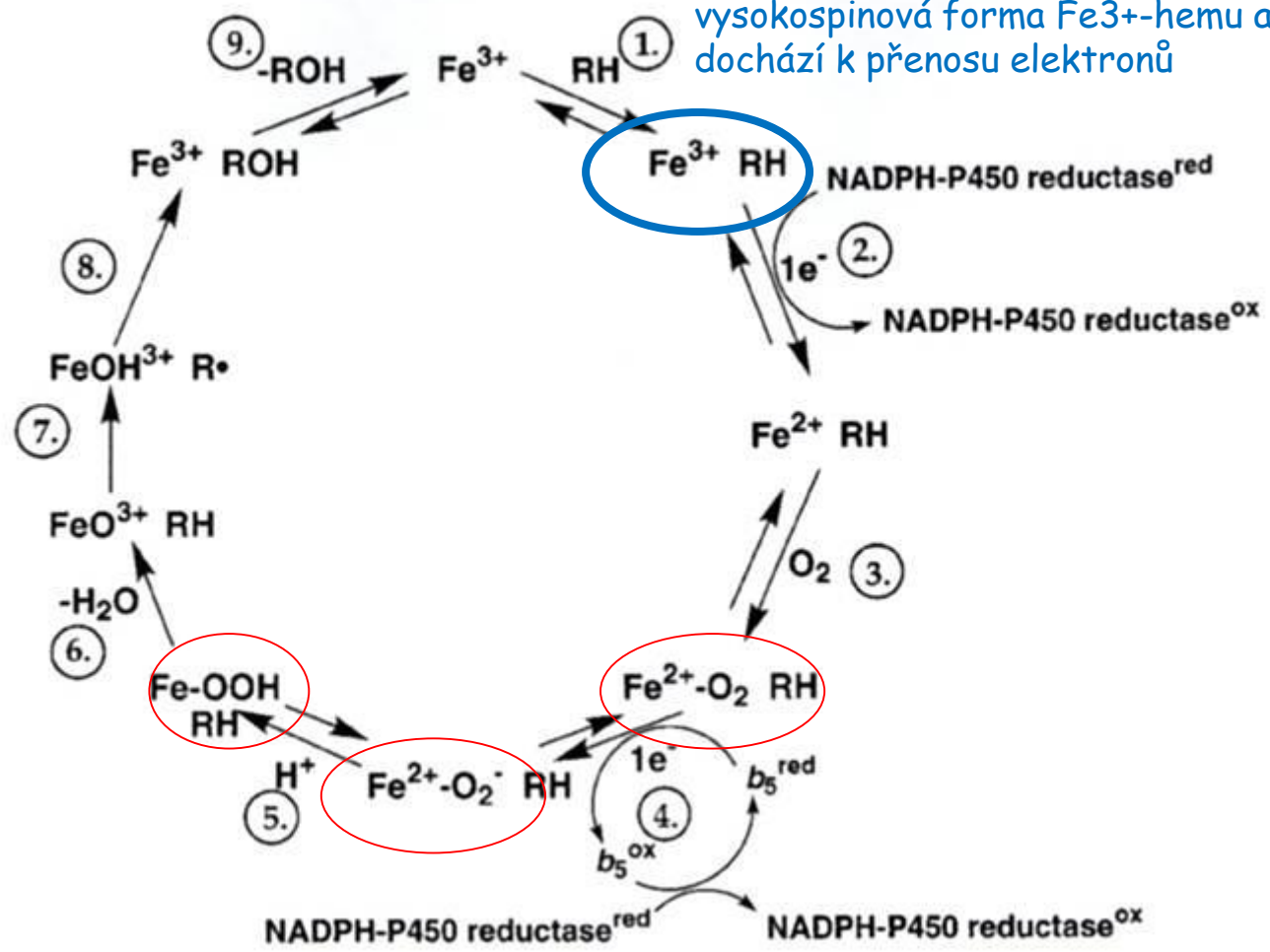
Aktivní místo CYP1A2 s navázaným  $\beta$ -naftoflavonem (modrá barva)

# CYKLUS CYTOCHROMU P450: AKTIVACE KYSLÍKU A MONOOXYGENACE

interakcí se substrátem vzniká vysokospinová forma  $Fe^{3+}$ -hemu a dochází k přenosu elektronů

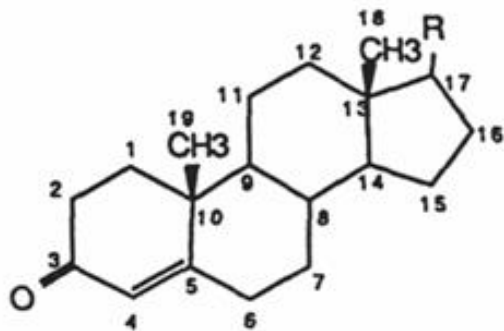
Přenos elektronů:  
 $NADPH$   
 $\downarrow$   
 $NADPH:P450$  oxido-reduktáza  
 $\downarrow$   
 cytochrom P450  
 (substrát RH,  
 produkt ROH,  
 produkce ROS)

Aktivace kyslíku:  
 ROS = vedlejší produkty

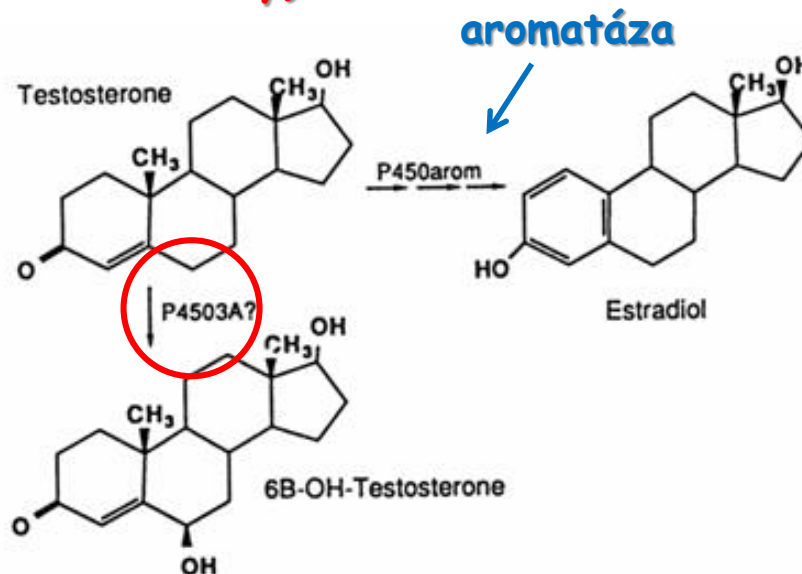




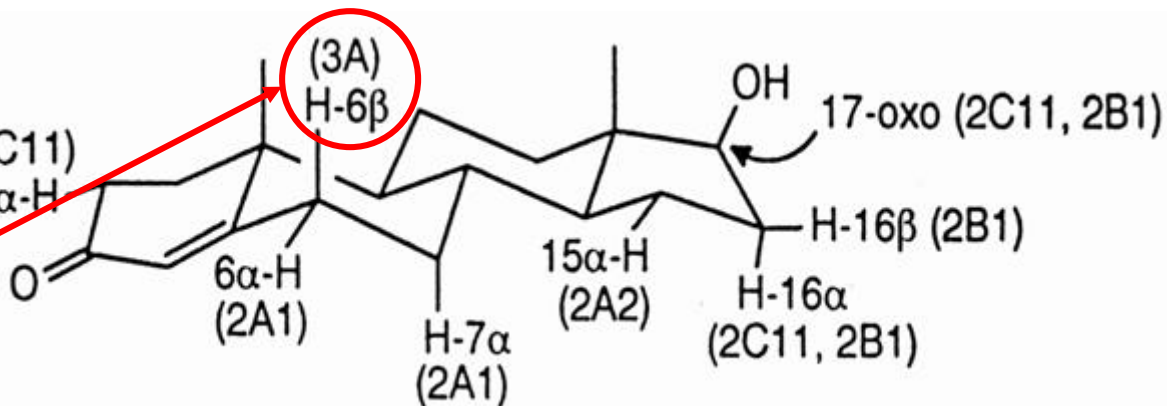
# STEROIDY: substrátová specifita CYP enzymů (s výjimkou aromatázy monooxygenázové reakce inaktivují steroidní hormony)



Steroids  
(testosterone, R = -OH  
androstenedione, R = =O  
progesterone, R = -COCH<sub>3</sub>  
(4-Pregnene-3,20-dione))



Hydroxylace steroidů  
v různých pozicích  
(v závorkách isoformy  
CYP enzymů)



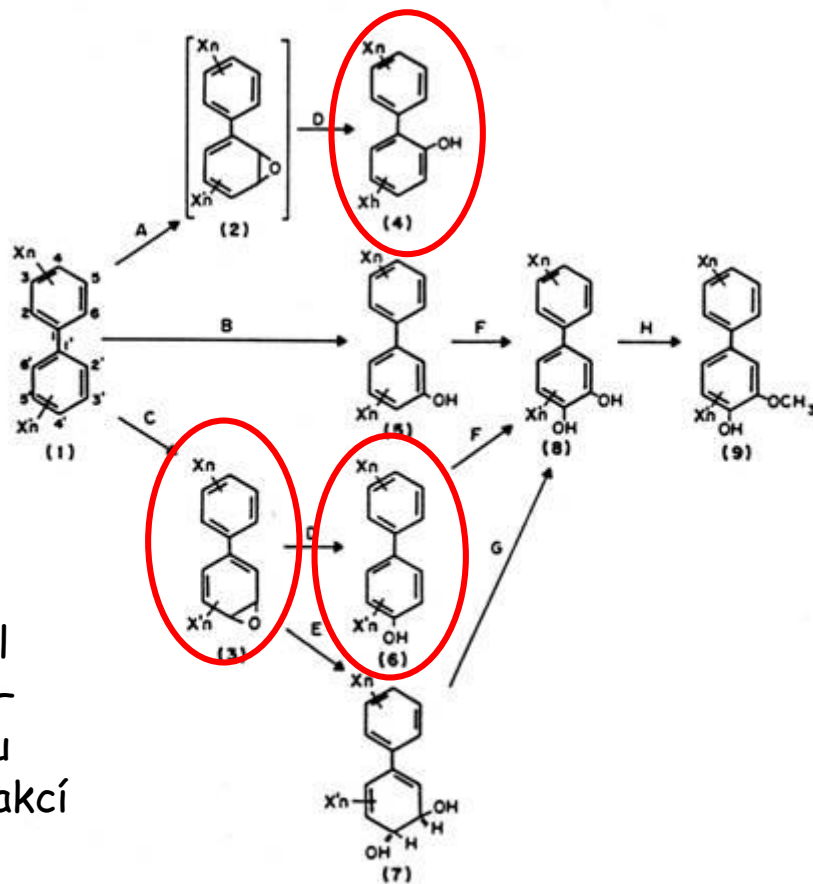
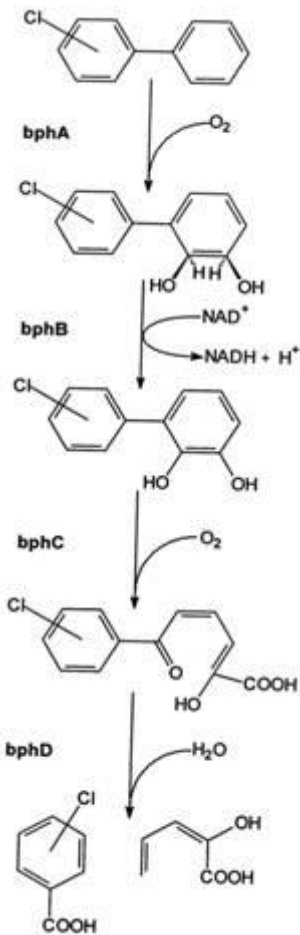
6β-hydroxylace =  
specifická reakce CYP3A

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

Mikrobiální degradace včetně arom. jádra

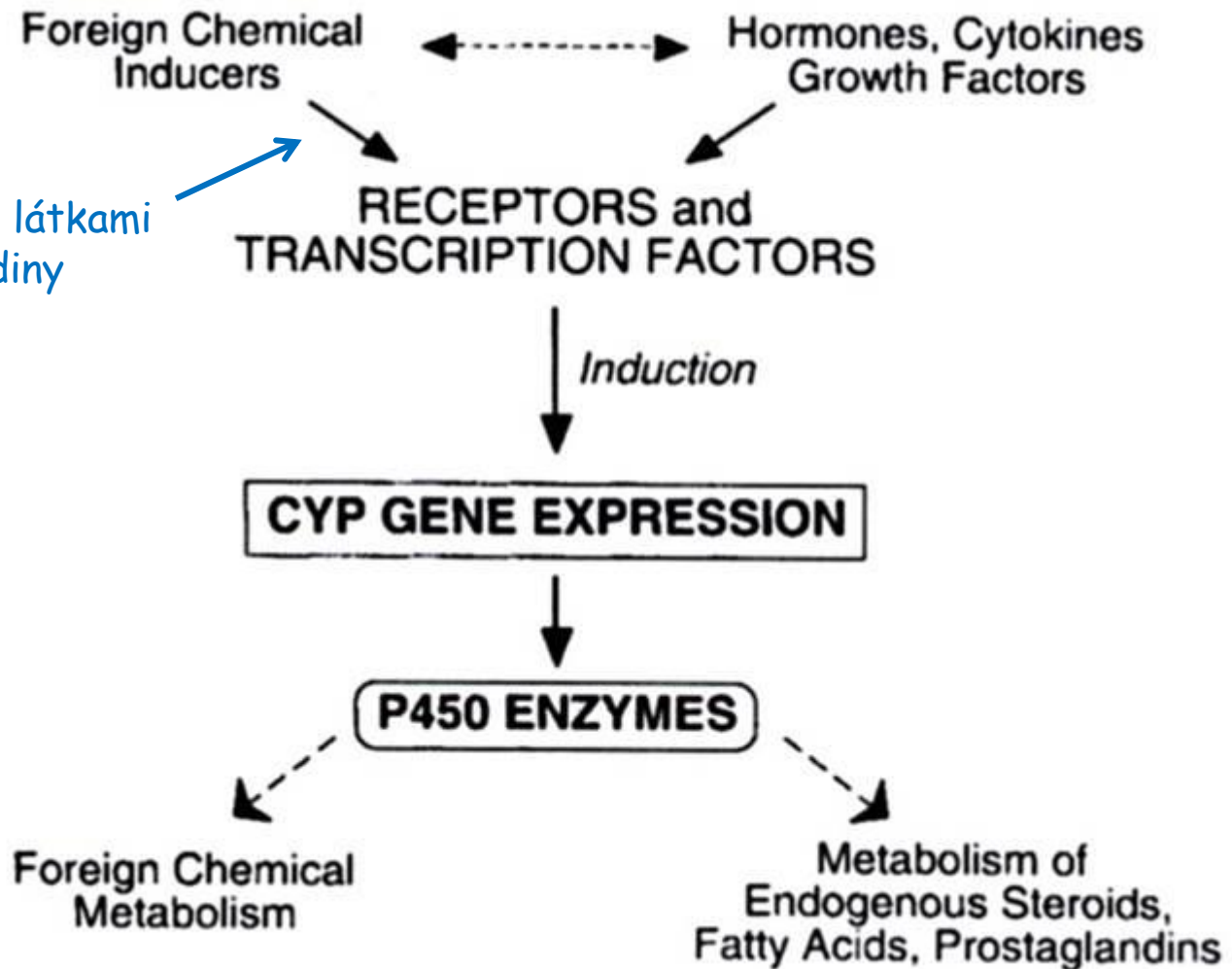
Metabolismus u vyšších živočichů: oxidativní metab. (hl. cesty A-D, C)

Persistentní arom. sloučeniny: obsahují Cl v sousedních pozicích - bariéra vzniku epoxidu monooxygenázovou reakcí



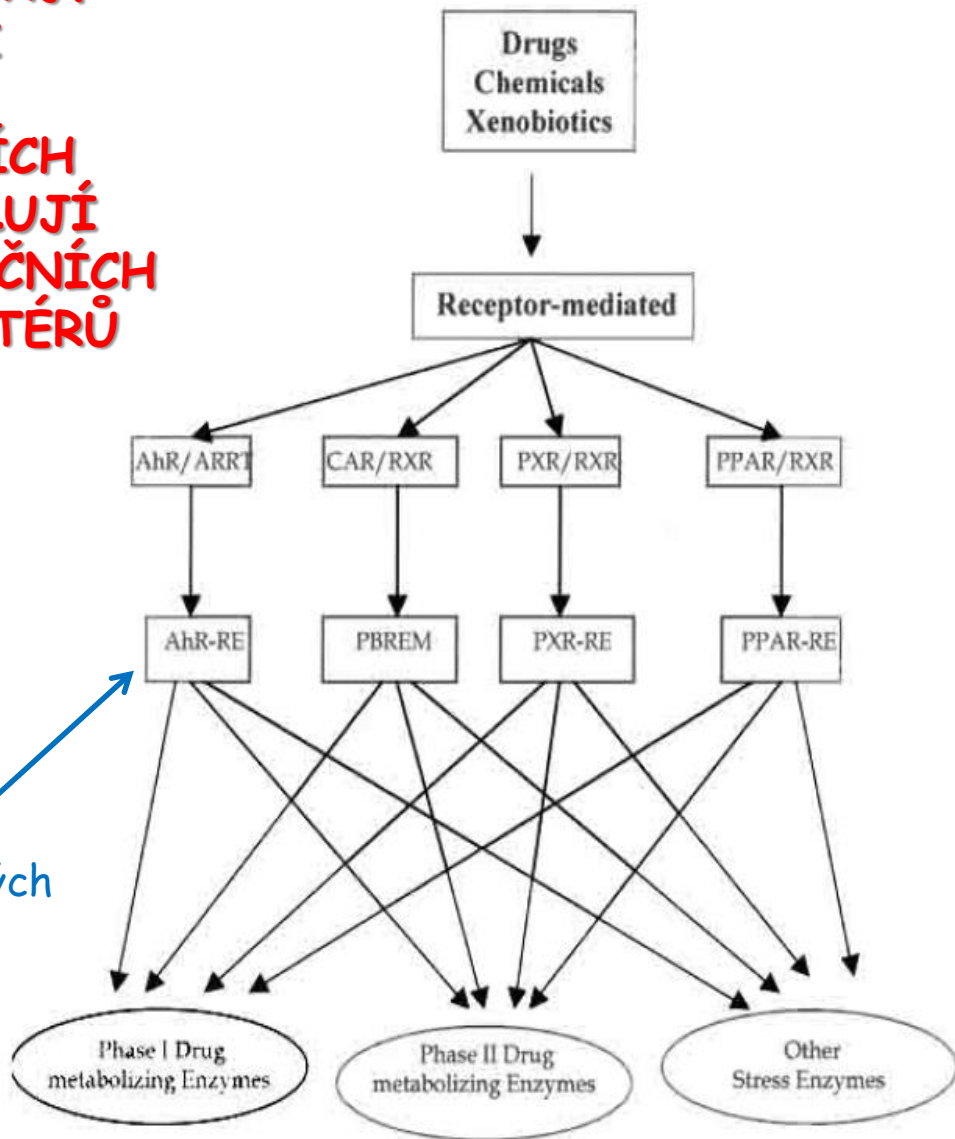
# REGULACE CYPs: nukleární a cytosolové receptory kontrolují expresi CYP proteinů

expozice ciz. látkami indukuje hladiny CYP enzymů



expozice a indukce CYP enzymů ovlivňuje metabolismus endogenních látek!  
(společné enzymy CYP pro biotransformaci cizorodých i endogenních látek)

**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

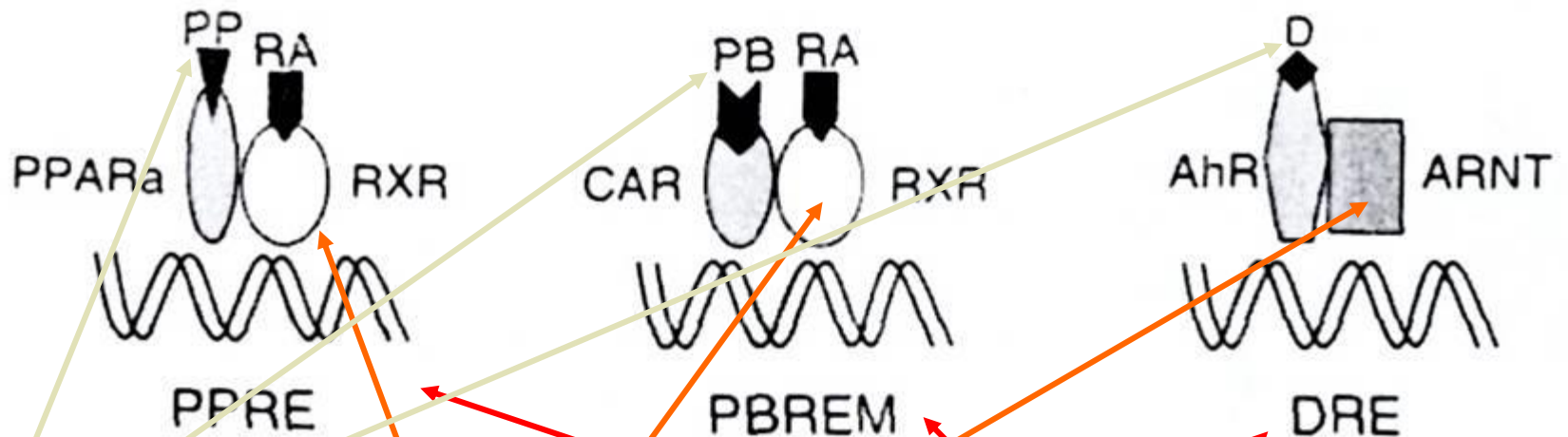
nukleární receptory

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

Cizorodé nebo  
endogenní látky,  
které indukují  
hladiny 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 <sup>a</sup>
Phenobarbital	2B1, 2B2	CAR
Dexamethasone	3A1, 3A2, 3A23	PXR
Fibrate drugs	4A1, 4A2, 4A3	PPAR $\alpha$
Cholesterol	7A1	LXR $\alpha$
Bile acids <sup>b</sup>	7A1	FXR
Thyroid hormone	P450 reductase	TR

<sup>a</sup> PAS transcription family member, not a nuclear receptor.

<sup>b</sup> Inhibitors of CYP7A1 transcription.

# 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, ( $\omega$ -1)-hydroxylace mastných kyselin
- ❑ CYP3A: exprese regulována **GR/PXR**; indukce dexametazonem aj. steroidy, monooxygenace velké řady xenobiotik (nejdůležitější enzym biotransformace),  $6\beta$ -hydroxylace testosteronu
- ❑ CYP4A: exprese regulována **PPAR $\alpha$** , indukce peroxisomálními proliferátory (clofibrate, dialkylestery kyseliny ftalové),  $\omega$ -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**



# AhR (Aryl hydrocarbon receptor)

AhR kontroluje genovou expresi

biotransformačních enzymů  
CYP1A1/1A2/1B1, UGT, GST,  
NQO1, ...

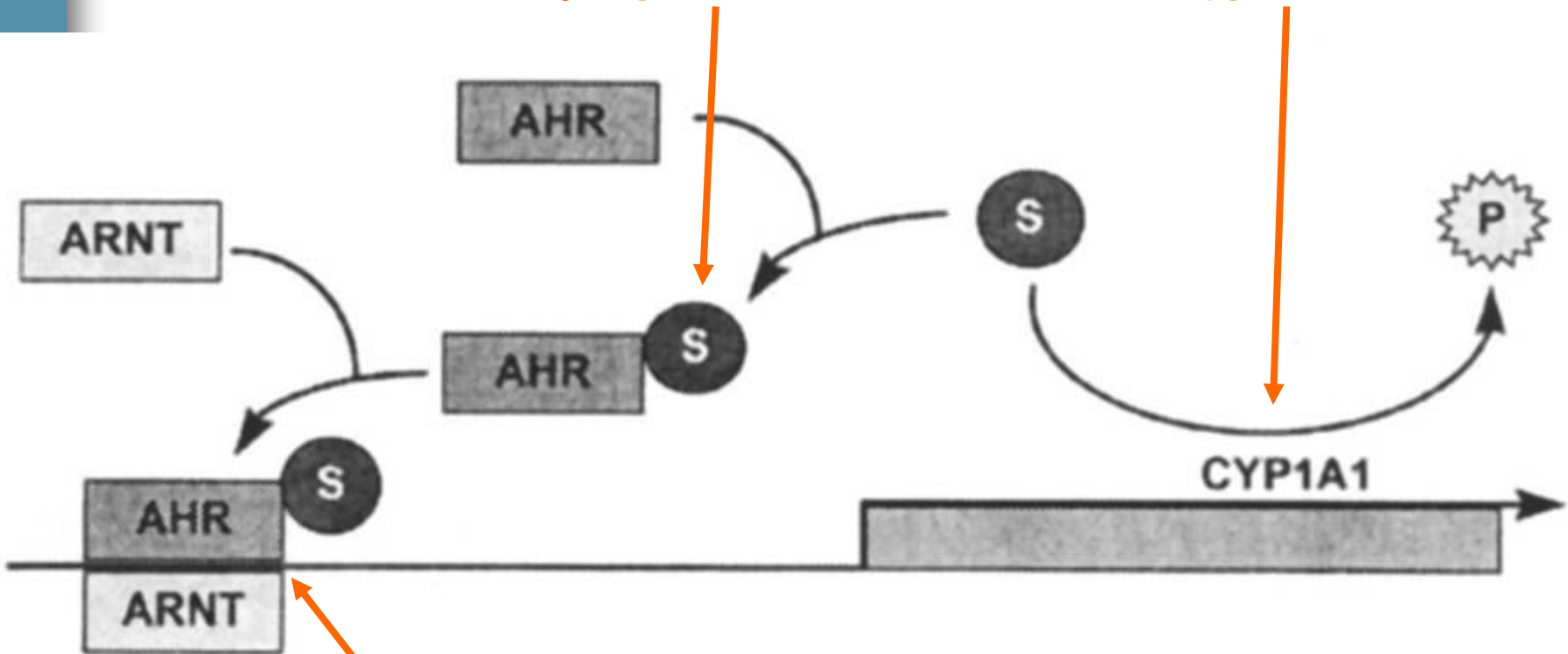
regulátorů bun. cyklu / přímé interakce (ER?,...)  
apoptózy (p27, Bax,...)

**další funkce AhR-dependentní genové exprese**

# AKTIVACE Ah RECEPTORU A INDUKCE CYP1A1 SUBSTRÁTEM CYP1A

substrát S je ligandem AhR

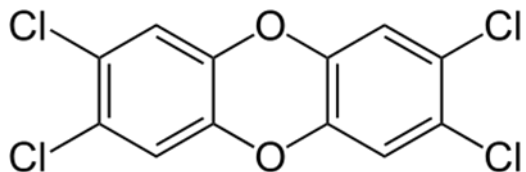
monooxygenázová reakce



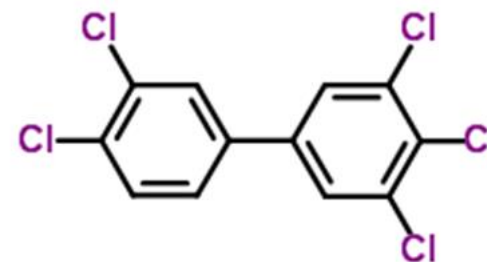
AhR/ARNT nasedá na XRE = DRE = xenobiotic (dioxin) response element

# LIGANDY / INDUKTORY AhR

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

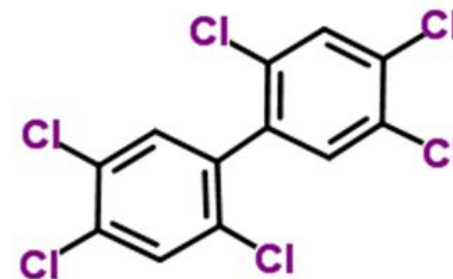


**TCDD = nejsilnější agonista AhR  
= modelový dioxinový toxikant**



**Koplanární PCB  
(podobný dioxinům, agonista AhR)**

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

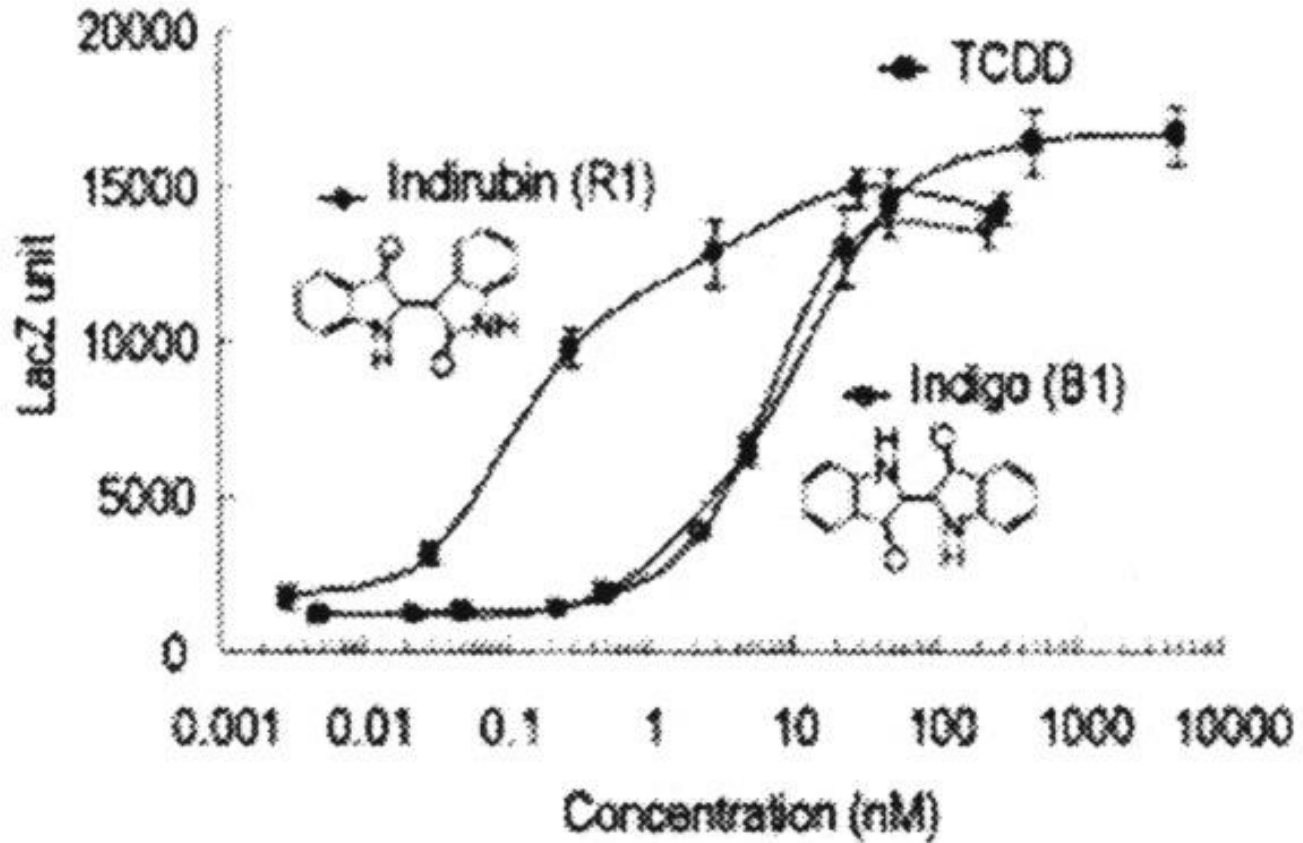


# ENDOGENNÍ AGONISTÉ AhR

dosud nejsou přesně určeny (deriváty tryptofanu ?)

## Fyziologické funkce AhR:

nezbytný v řadě procesů vývoje tkání, diferenciace buněk aj. (viz myší AhR-deficientní modely)



# AKTIVACE Ah RECEPTORU / AhR-DEPENDENTNÍ GENOVÁ EXPRESE

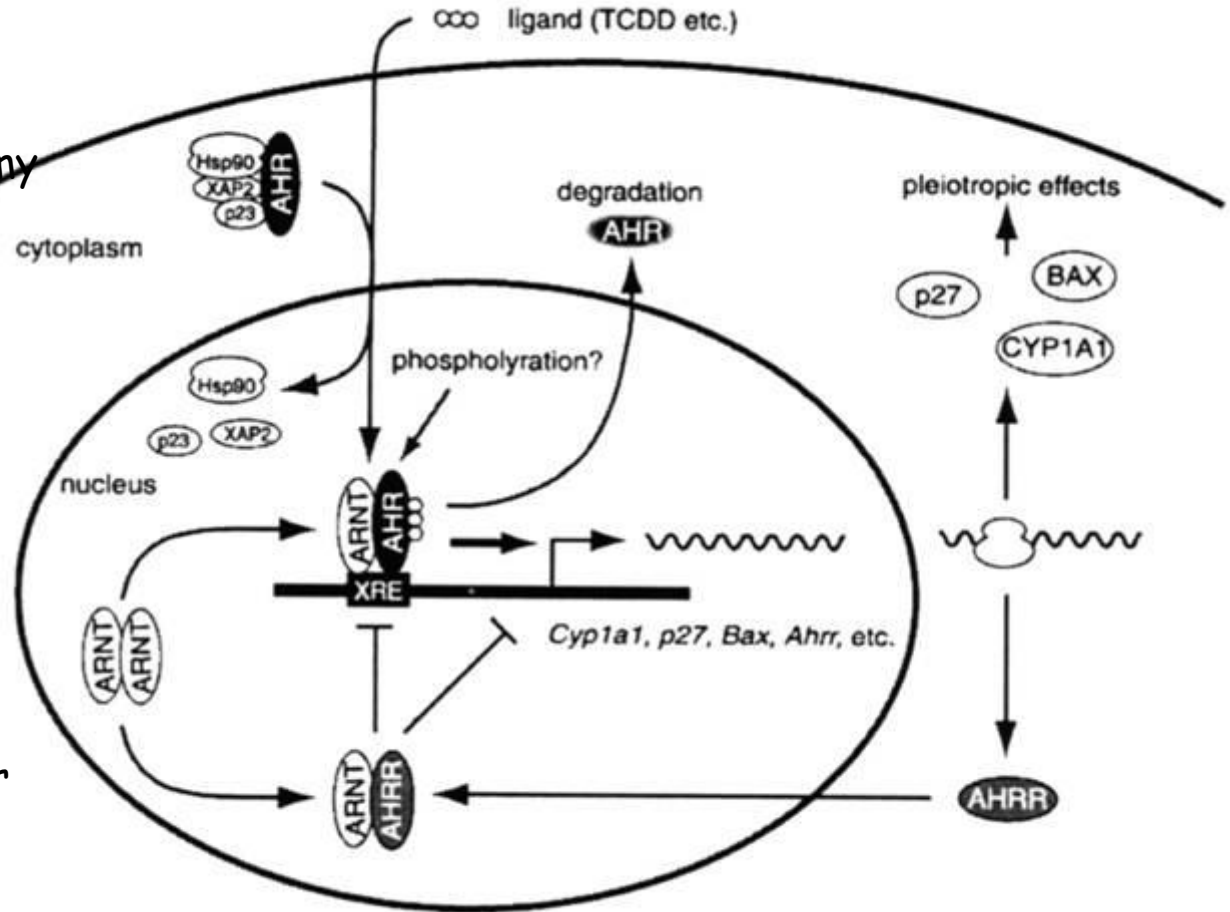
Produkty genové exprese:

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

Přímé interakce AhR („cross-talk“ s ER, ...)

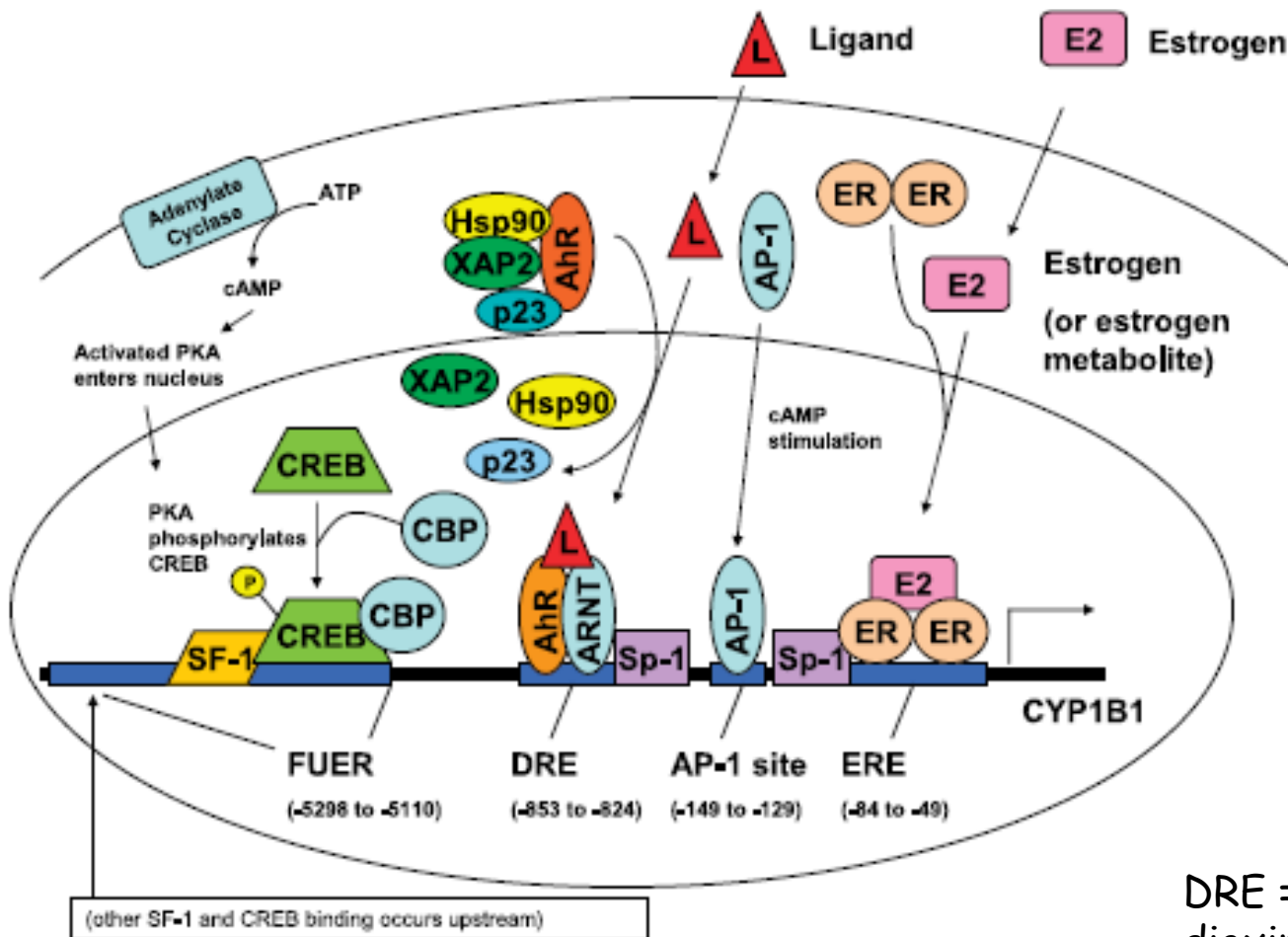
Regulace AhR:

- degradace AhR po navázání ligandu
- AHRR = AhR represor



# REGULACE CYTOCHROMU P4501B1 (CYP1B1)

(je velmi komplexní - několik responsních elementů)



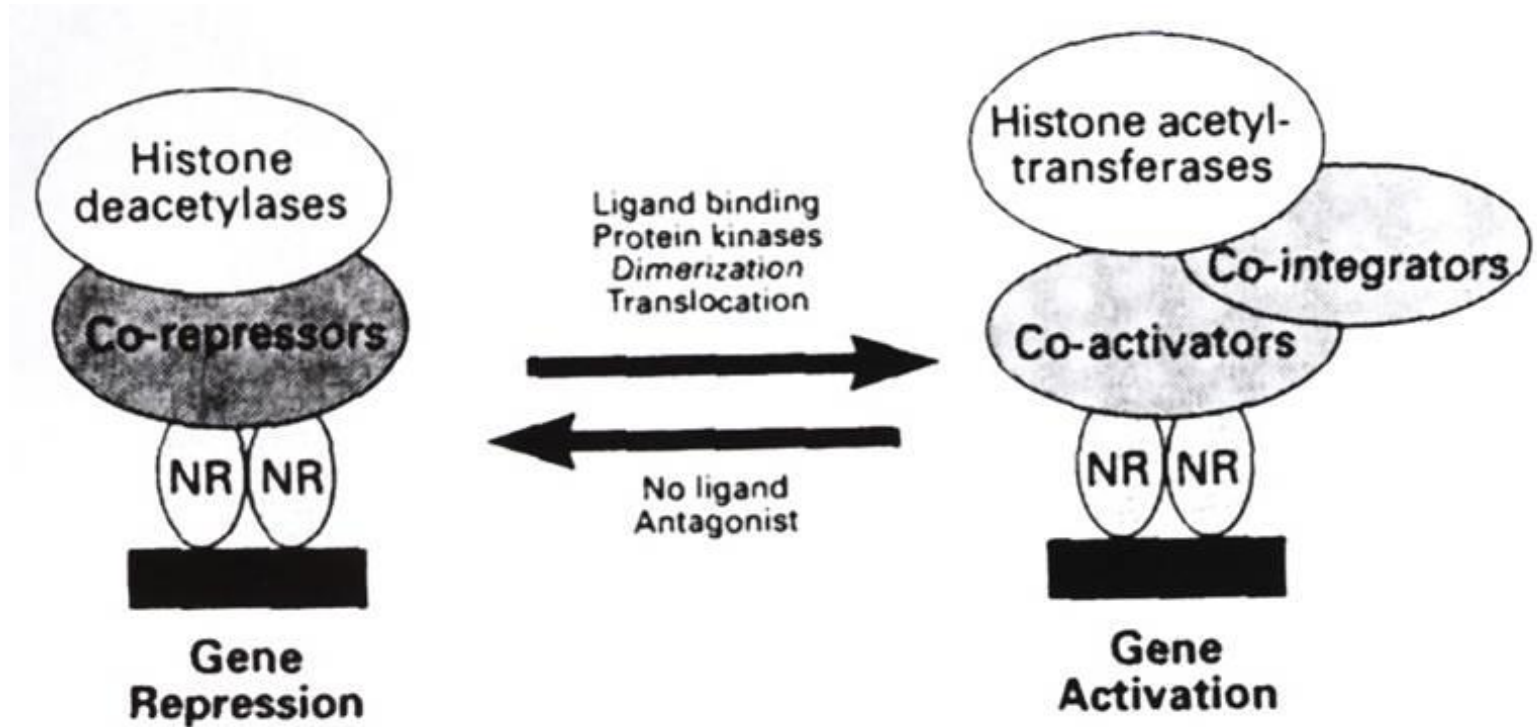
DRE =  
dioxin  
response  
element



# REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ:

## NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

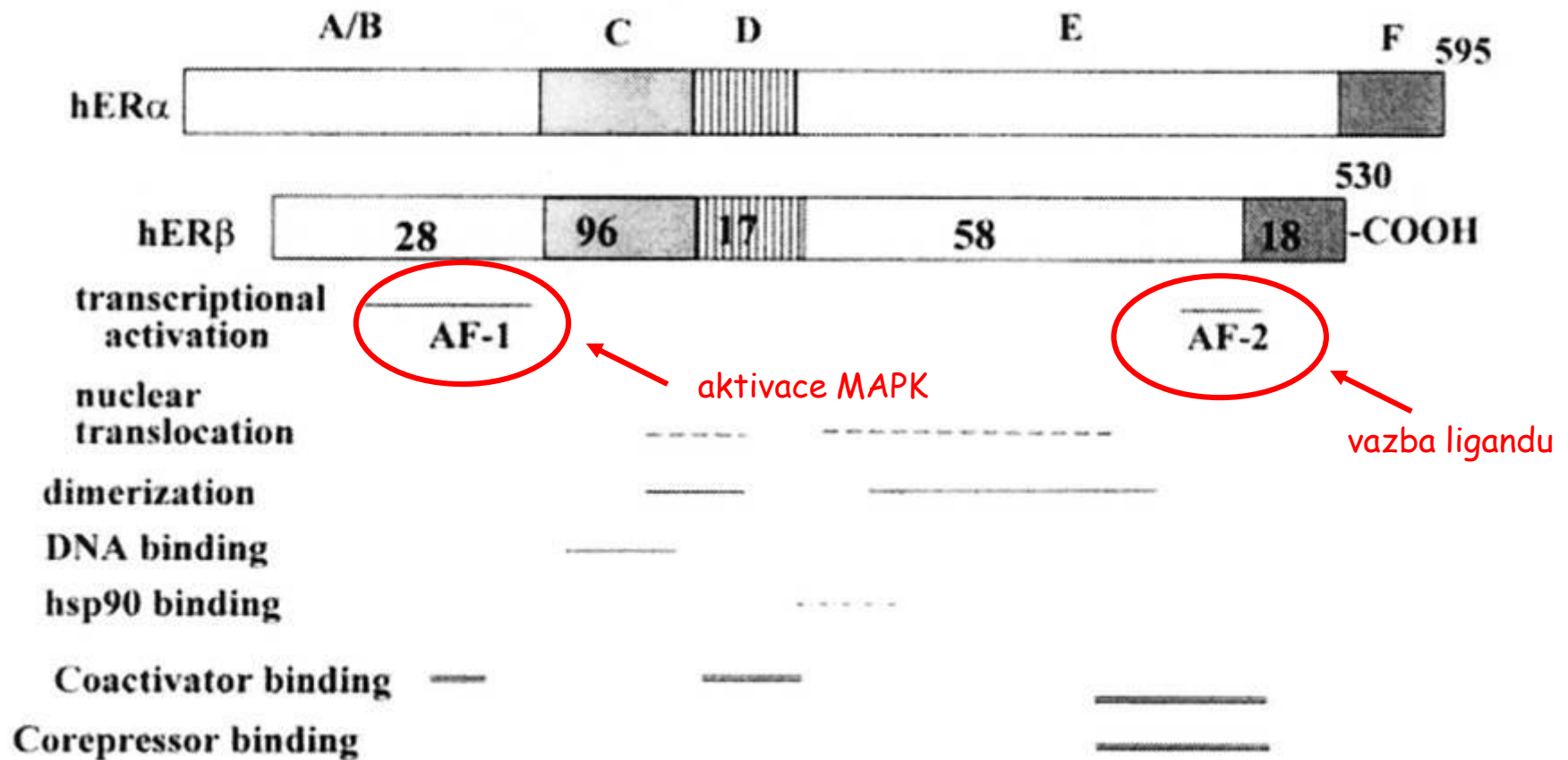
# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY (NR)



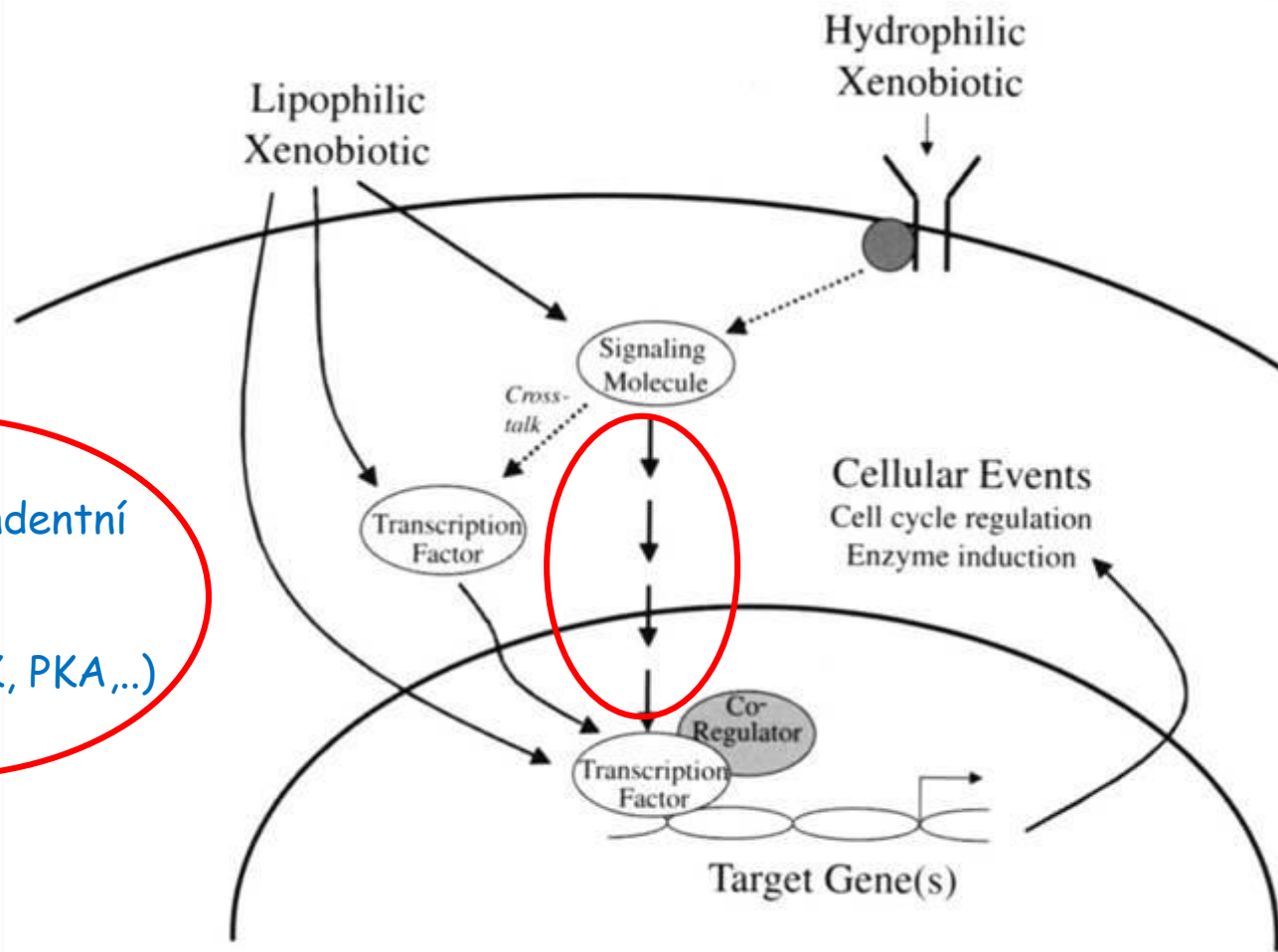
**Model for gene activation and gene repression by NRs**



# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: struktura domén receptorů



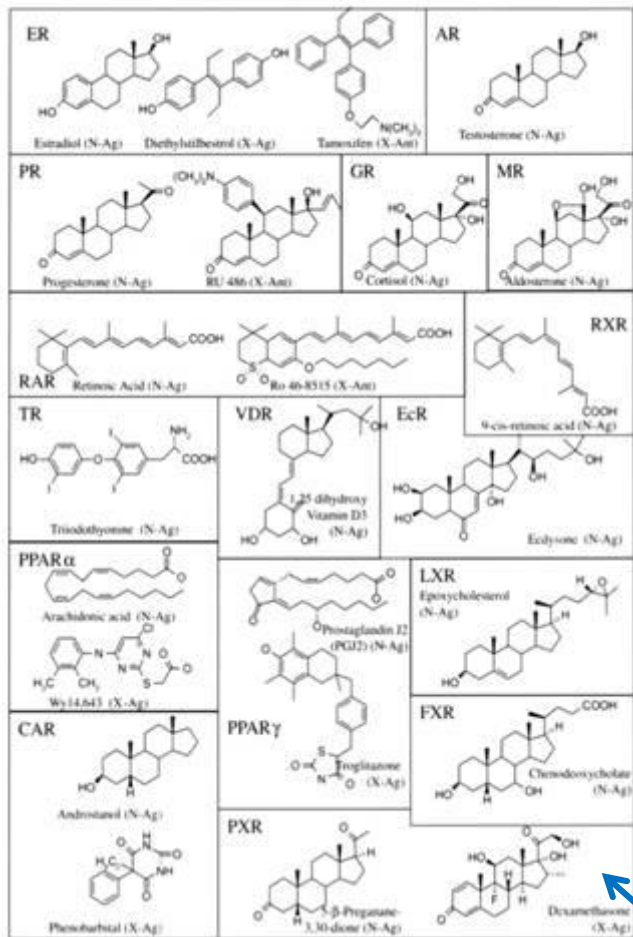
# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY MOHOU BÝT AKTIVOVÁNY TAKÉ PROTEINKINÁZAMI



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

# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY - KLASIFIKACE

Nuclear Hormone Receptors

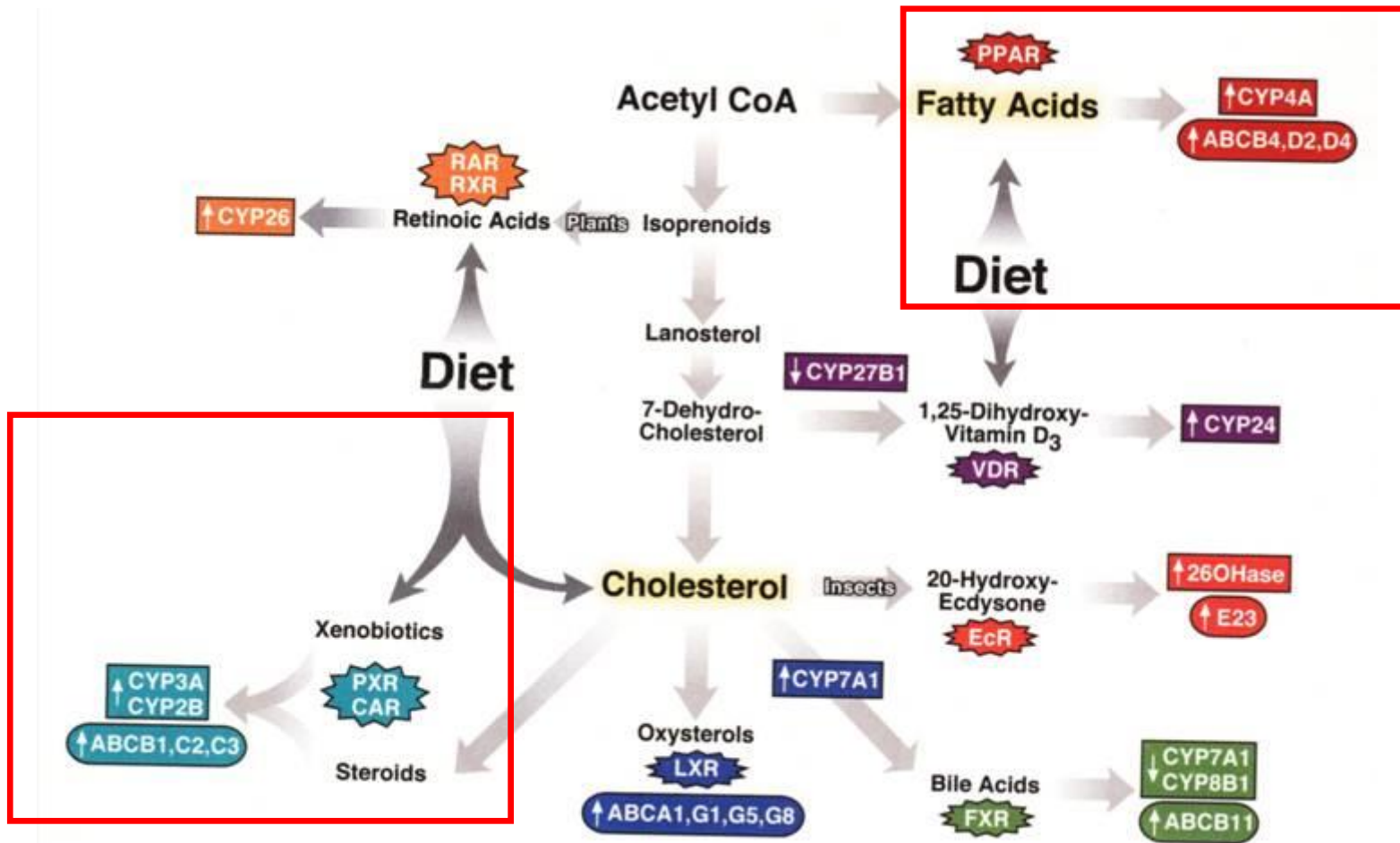


Ligands:	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	<div style="background-color: #000080; color: white; padding: 5px;">                     ER <math>\alpha, \beta</math>                      PR                      AR                      GR                      MR                 </div> <div style="background-color: #800080; color: white; padding: 5px;">                     RAR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      TR <math>\alpha, \beta</math>                      VDR                      EcR                 </div>	<div style="background-color: #FF0000; color: white; padding: 5px;">                     RXR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      PPAR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      LXR <math>\alpha, \beta</math>                      FXR                      PXR/SXR                      CAR                 </div>	<div style="background-color: #000000; color: white; padding: 5px;">                     SF-1                      LRH-1                      DAX-1                      SHP                      TLX                      PNR                      NGFI-B <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      ROR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      ERR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      RVR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      GCNF                      TR 2,4                      HNF-4                      COUP-TF <math>\alpha, \beta, \gamma</math> </div>

Ligandy (agonisté) jaderných receptorů

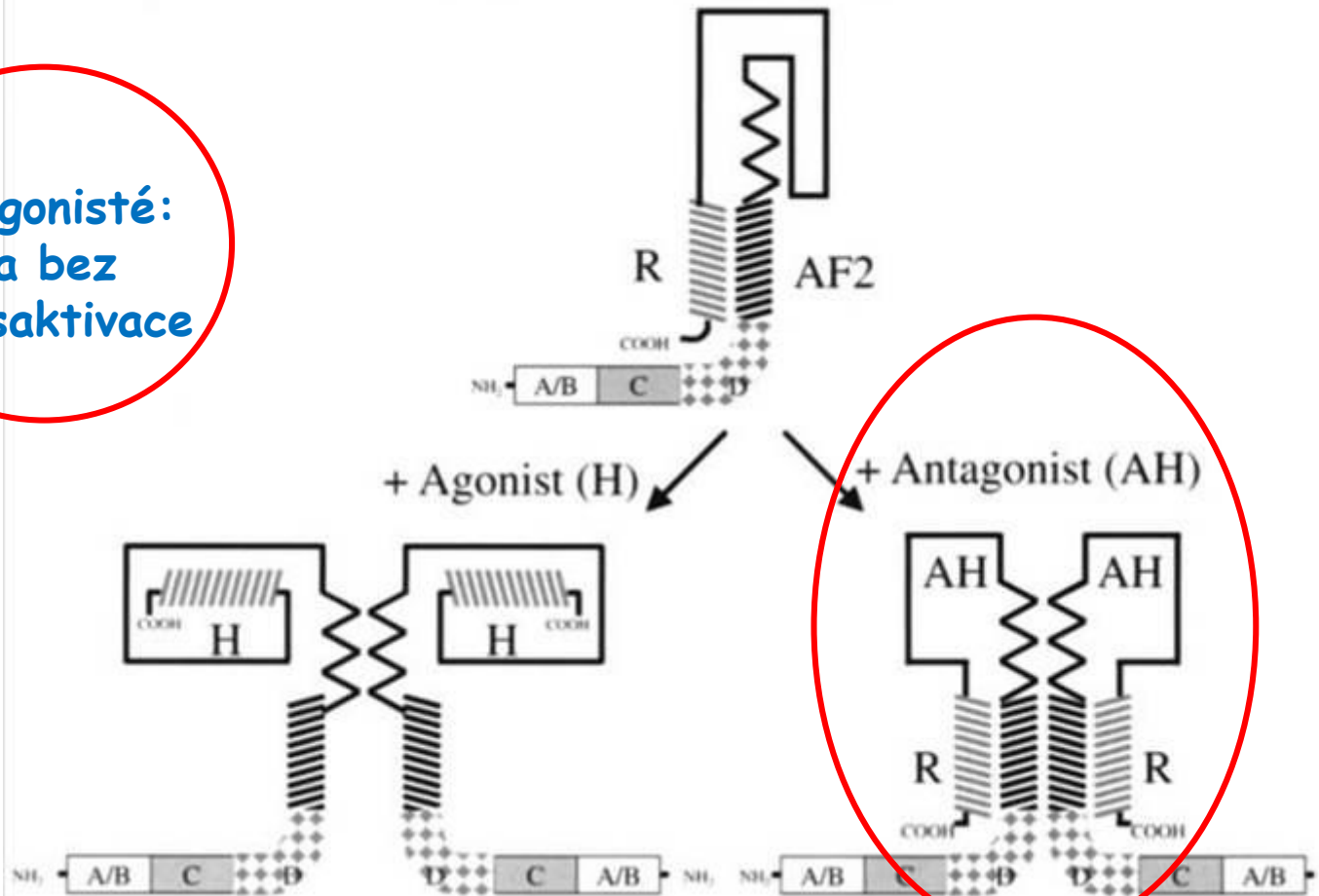
# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

= „xenosensory“ a „lipidní sensory“  
(aktivace transkripce po expozici xenobiotiky resp. lipidy)



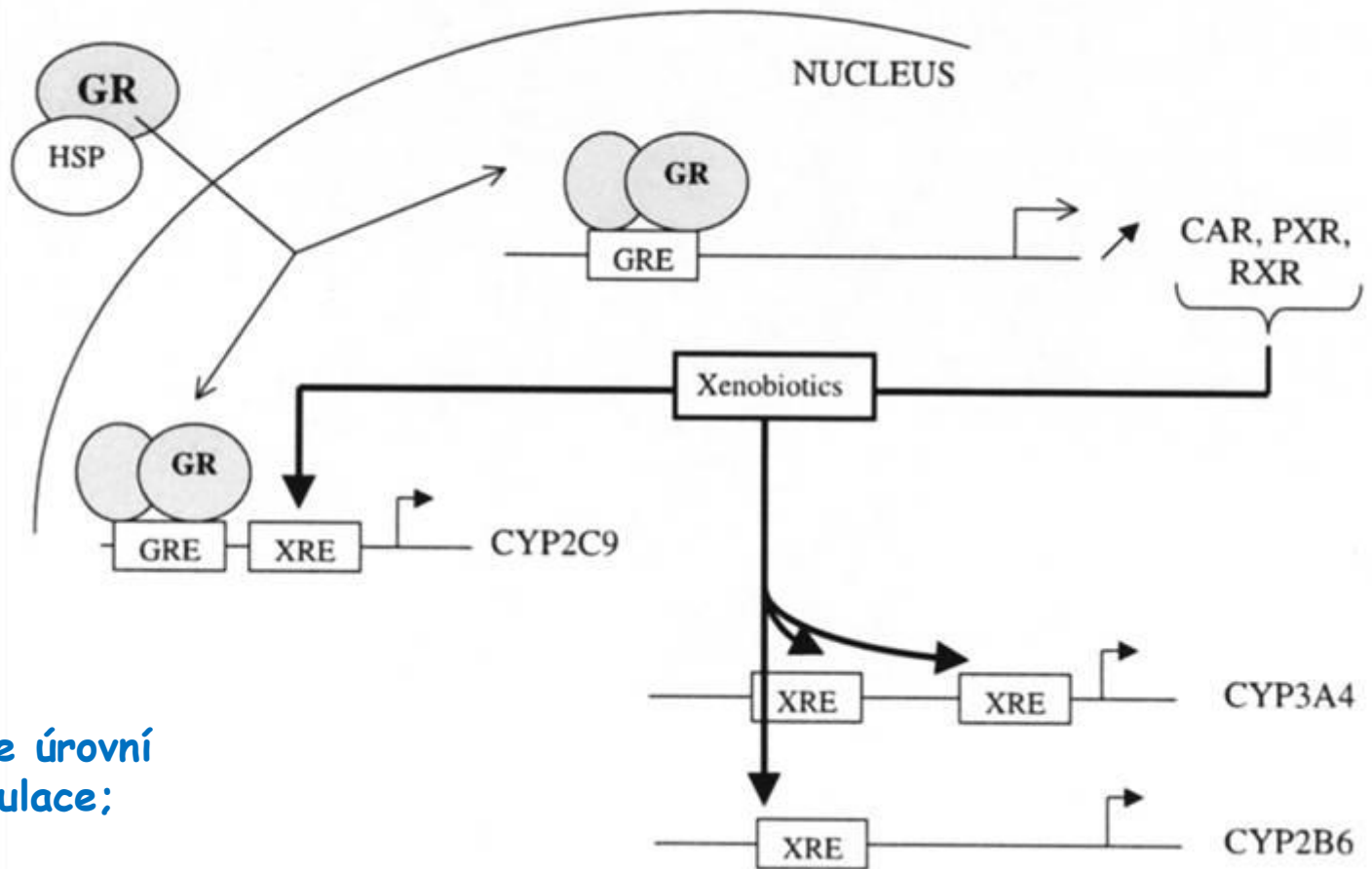
# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: vazba antagonistického a agonistického ligandu

Antagonisté:  
vazba bez  
transaktivace



# REGULACE GR / PXR / CAR

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



Více úrovní  
regulace;

aktivace nízkou  
vs. vysokou  
koncentrací  
ligandu

# FENOBARBITAL (PB) - agonista CAR (a induktor biotransformačních enzymů), ale také indukce metabolismu endogenních látek

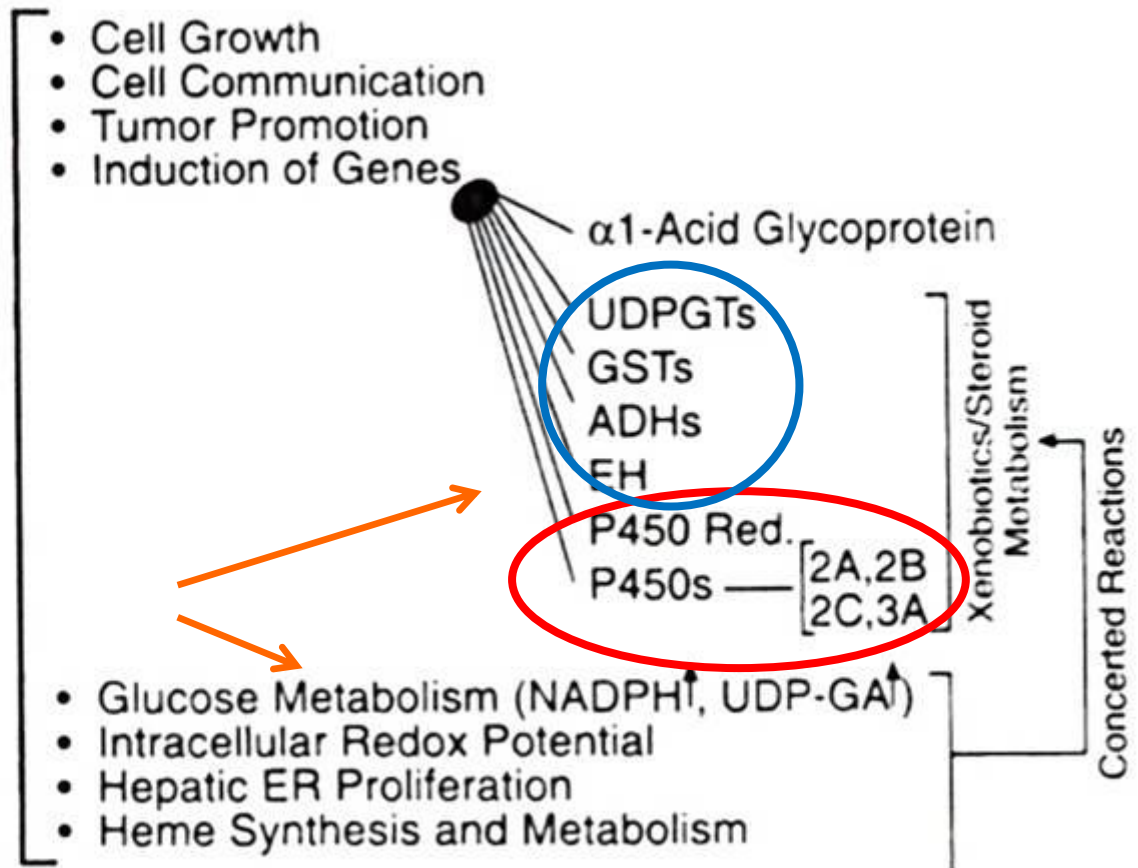
Biotransformace:

enzymy 1. fáze

enzymy 2. fáze

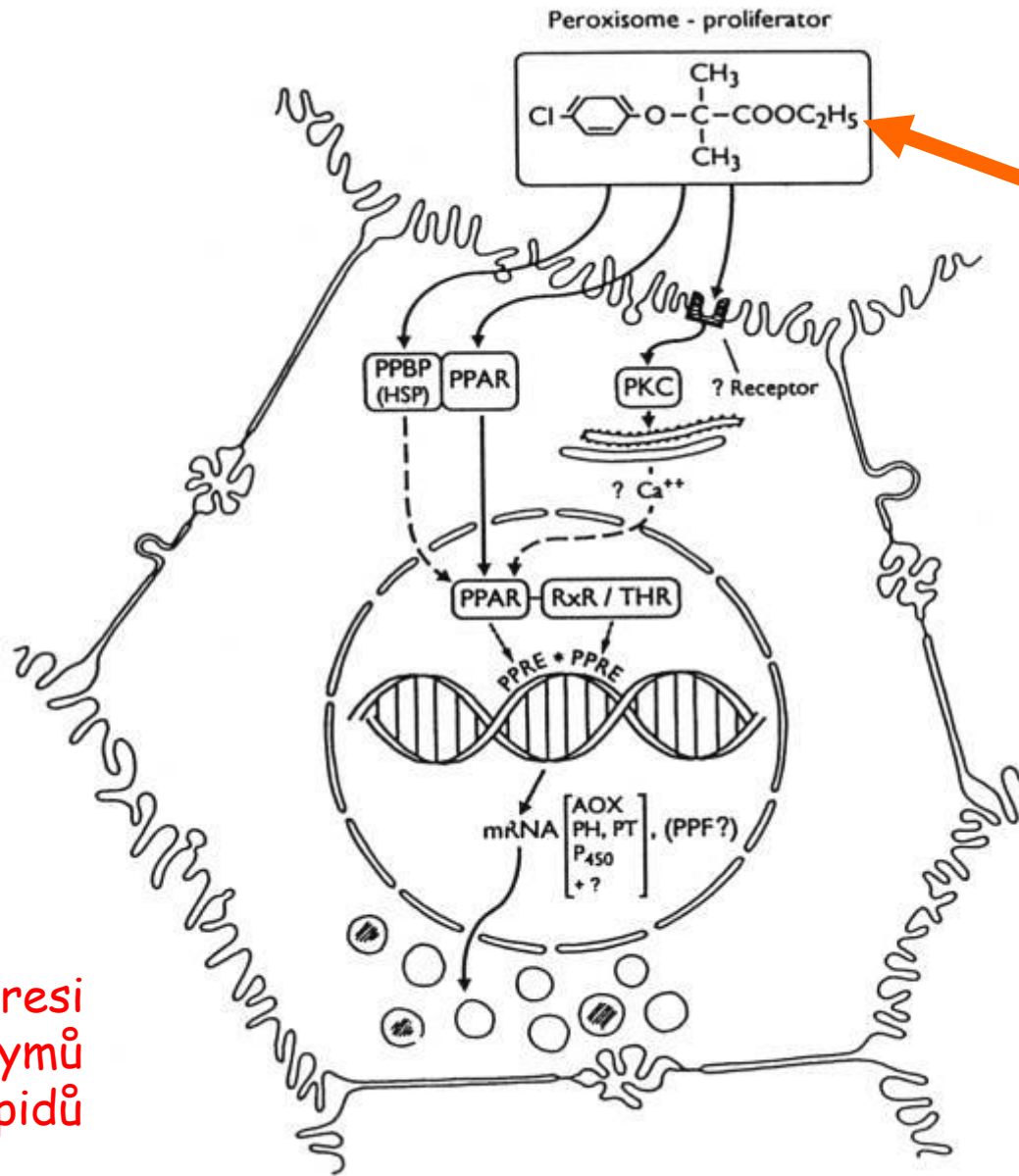
PB →

Modulace endogenního  
metabolismu



**PPAR $\alpha$**   
(Peroxisomal  
Proliferator-  
Activated  
Receptor alpha)

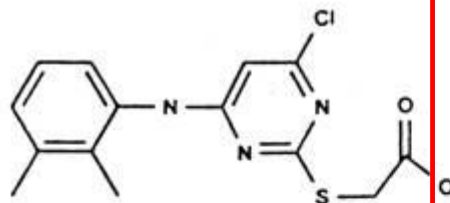
kontroluje expresi  
CYP4A11 a enzymů  
metabolismu lipidů



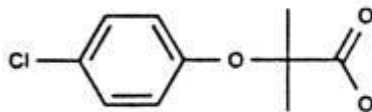


# LIGANDY PPAR $\alpha$

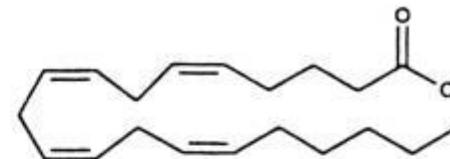
Farmaka  
(hypolimidemika)



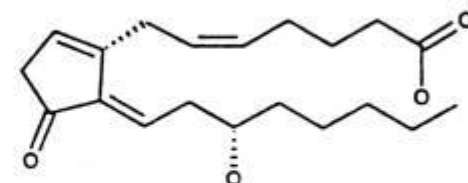
Wy 14,643



Clofibrate

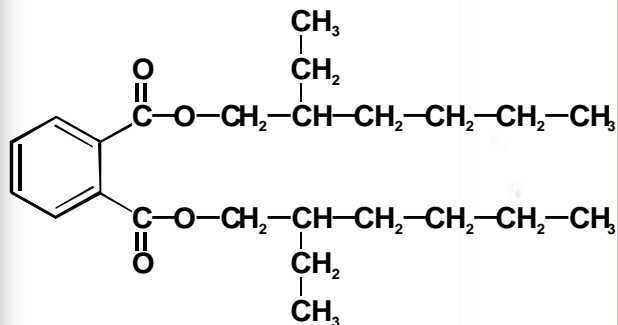


Arachidonic Acid

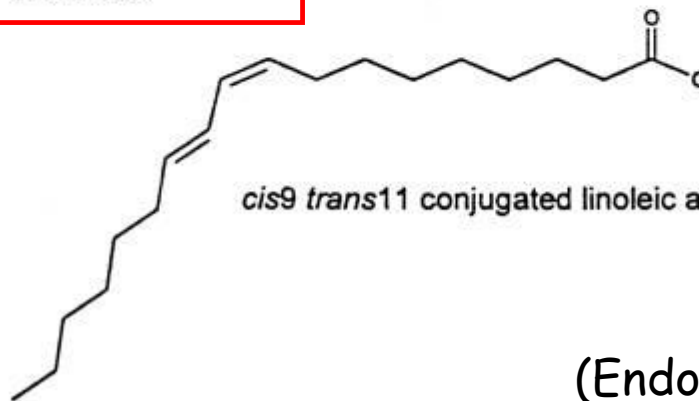


Prostaglandin J<sub>2</sub>

Environmentální  
kontaminanty



Di(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)

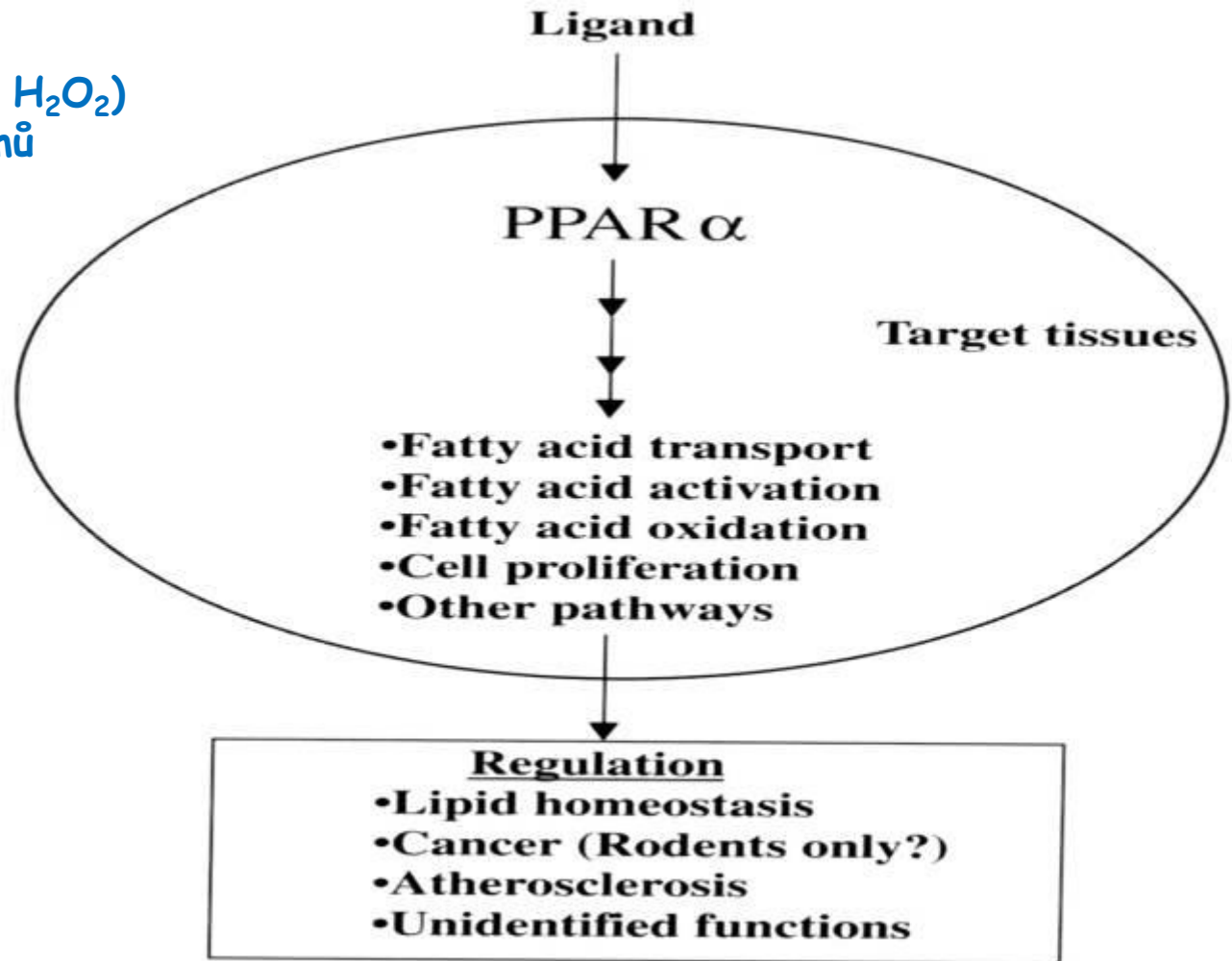


*cis9 trans11* conjugated linoleic acid

(Endogenní) lipidy

# DŮSLEDKY AKTIVACE PPAR $\alpha$

Nerovnoměrná  
indukce CYP4A  
(vedl. produkt: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
a dalších enzymů  
(např. CAT)  
dependentních  
na PPARalfa



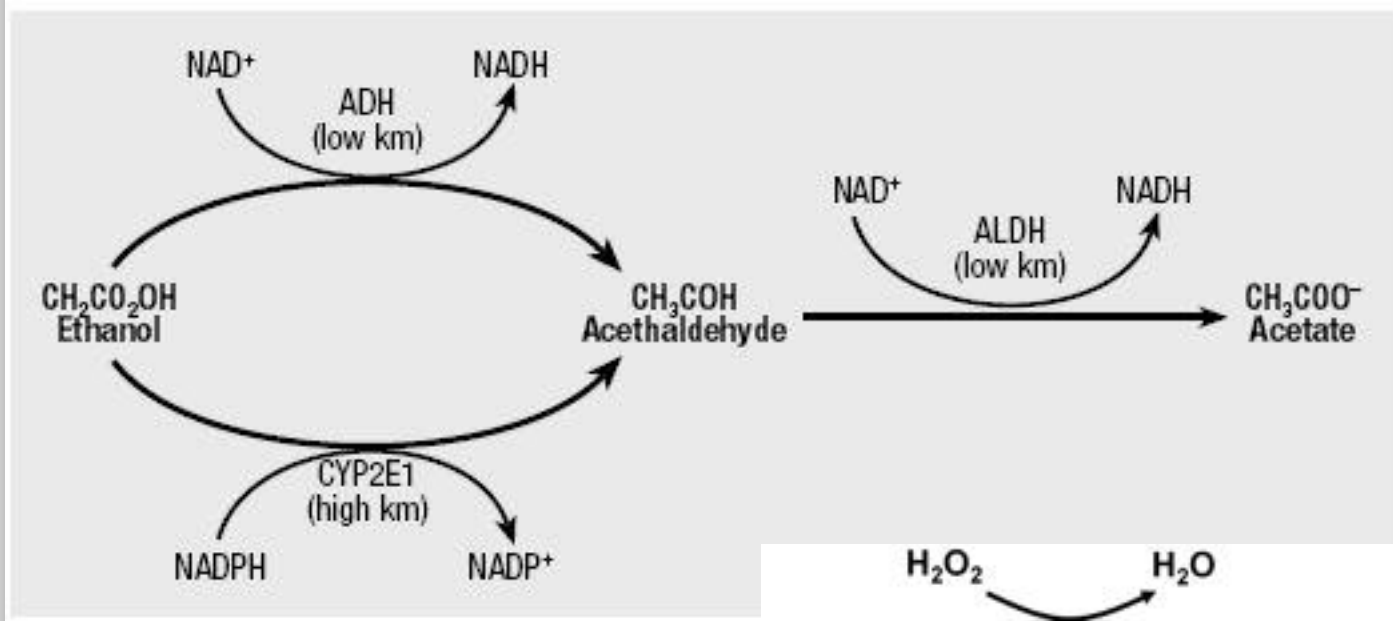


**DALŠÍ ENZYMY 1.FÁZE  
BIOTRASFORMACE A JEJICH  
REGULACE**

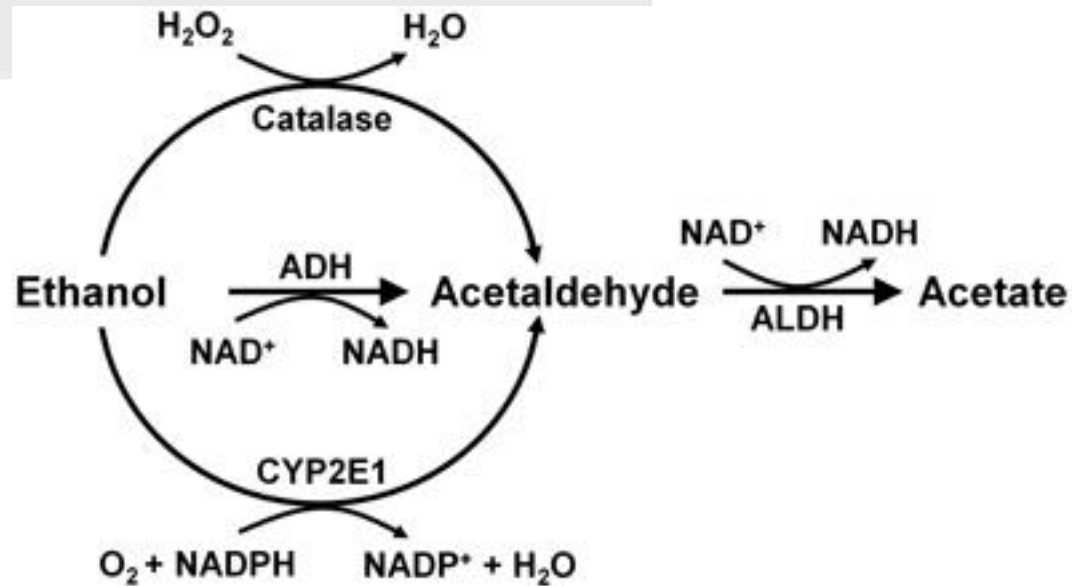
# DALŠÍ ENZYMY 1.FÁZE BIOTRASFORMACE A JEJICH REGULACE

- flavinmonooxygenázy (FAD enzymy, NADPH přímo reaguje s enzymem);
- peroxidázy (hemoproteiny oxidující 2-aminofluoren, PAH, fenoly; radikálové jednoelektronové reakce);
- alkoholdehydrogenázy (koenzym NADH, oxidace prim. a sek. alkoholů);
- aldehyddehydrogenázy (oxidace= detoxikace aldehydů a ketonů);
- aldoketoreduktázy (AKR, oxidační reakce alkoholů - NAD<sup>+</sup>; redukce aldehydů a ketonů na alkoholy za účasti NADPH);
  
- reduktázy xenobiotik (aldoketoreduktázy AKR, dehydrogenázy s krátkým řetězcem SDR, dehydrogenázy se středně dlouhým řetězcem, NADPH/chinonoxidoreduktáza - dvouelektronová redukce chinonů);
  
- hydrolázy (štěpení substrátu za účasti vody; acetylcholinesterázy, karboxyesterázy, epoxidhydrolázy)

# ALKOHOLDEHYDROGENÁZY



Metabolismus etanolu třemi enzymovými systémy



# ALDOKETOREDUKTÁZY

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

Příklady lidských AKR:

AKR1A1 (aldehydoreduktáza)

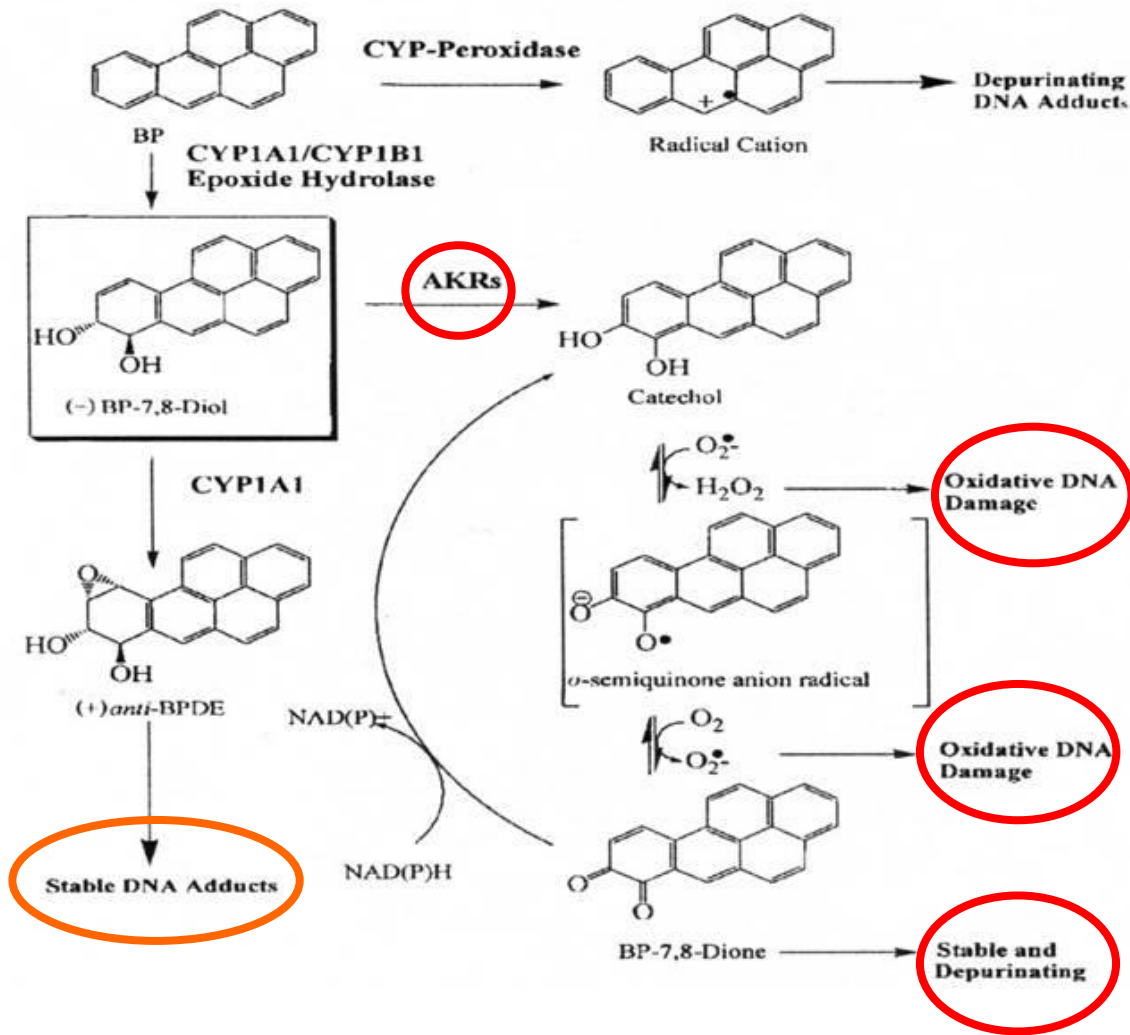
AKR1B1 (aldosareduktáza)

AKR1C1-1C4 (20 $\alpha$ -, 3 $\alpha$ -, 3 $\alpha$ /17 $\alpha$ -, 3 $\alpha$ -HSD)

AKR1D1 (5 $\beta$ -reduktáza)

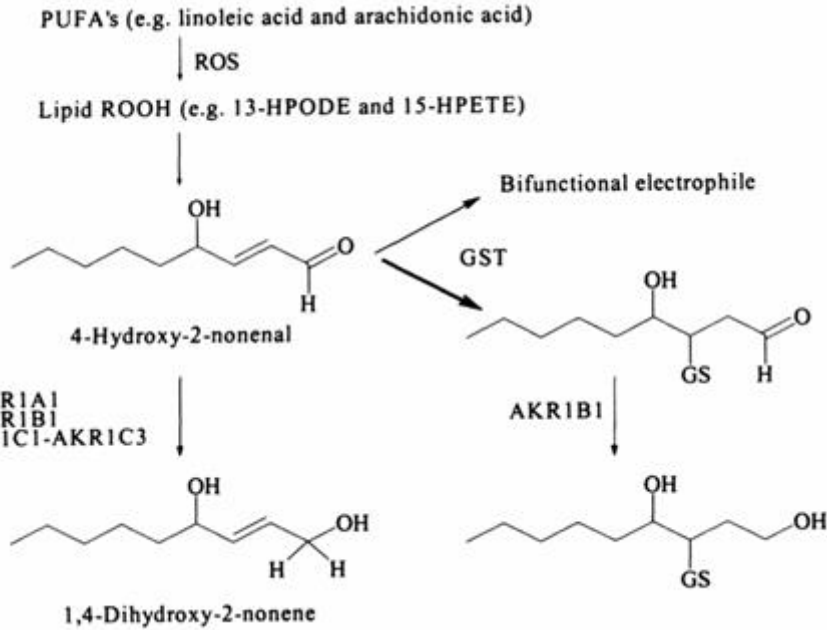
# 1. fáze biotransformace PAH: účast CYP1A1/1A2/1B1 (monooxygenace), EH (hydroláza) a AKR (reduktáza)

Detoxikace  
versus  
bioaktivace



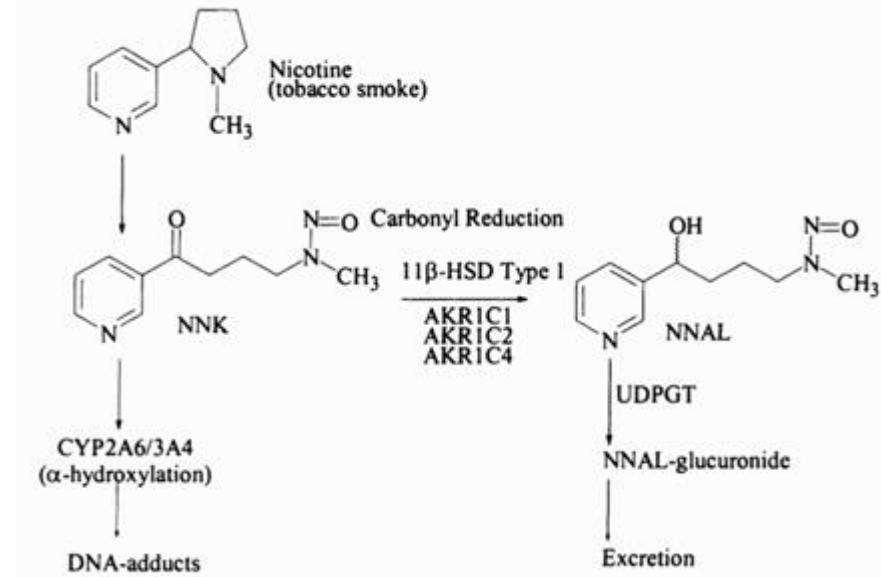
katecholy =  
- metabolity PAHs,  
- podobně  
metabolity  
steroidů (E2)

# ALDOKETOREDUKTÁZY



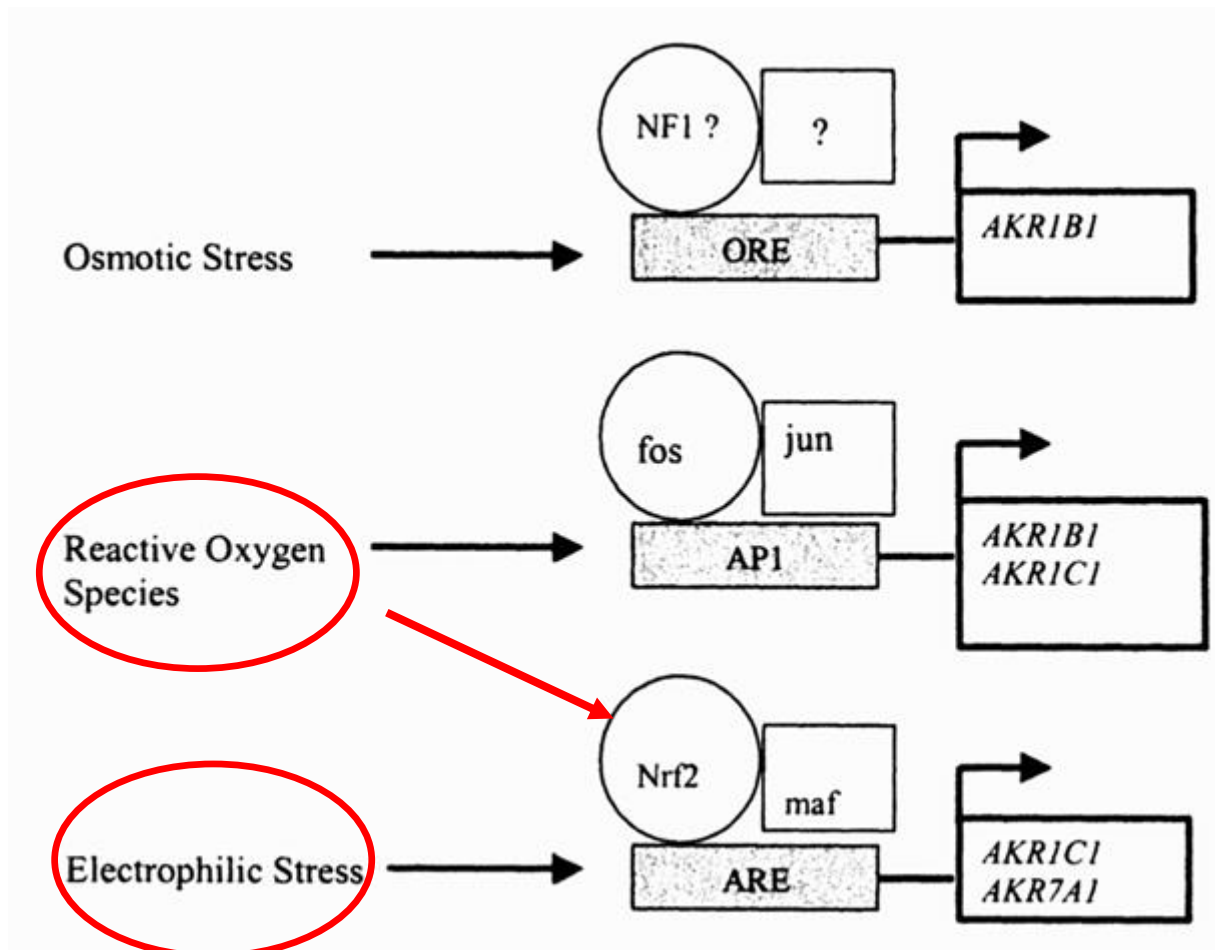
Biotransformace aldehydů  
lipidní peroxidace

Detoxikace NNK





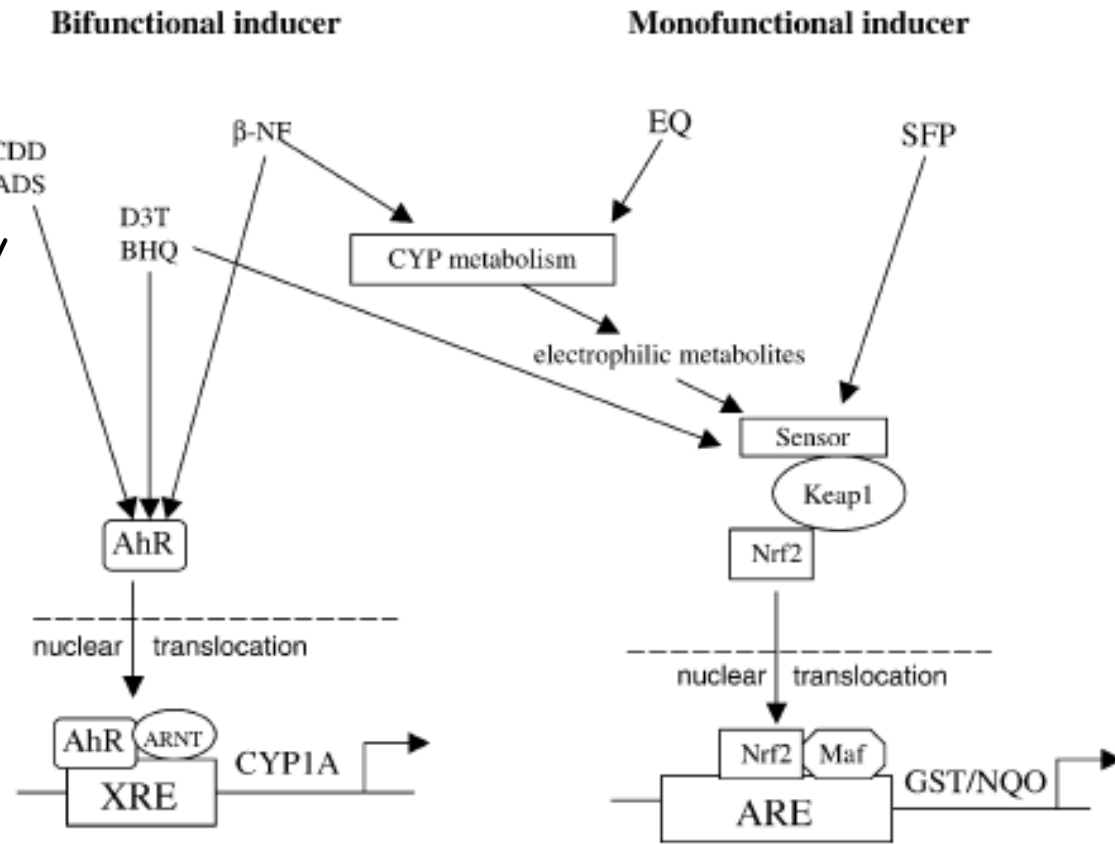
# REGULACE ALDOKETOREDUKTÁZ



# KLASICKÝ POHLED NA INDUKCI GENOVÉ EXPRESE KONTROLOVANOU XRE A ARE: transkr. faktor Nrf2 je indukován reaktivními metabolity a ox. stresem

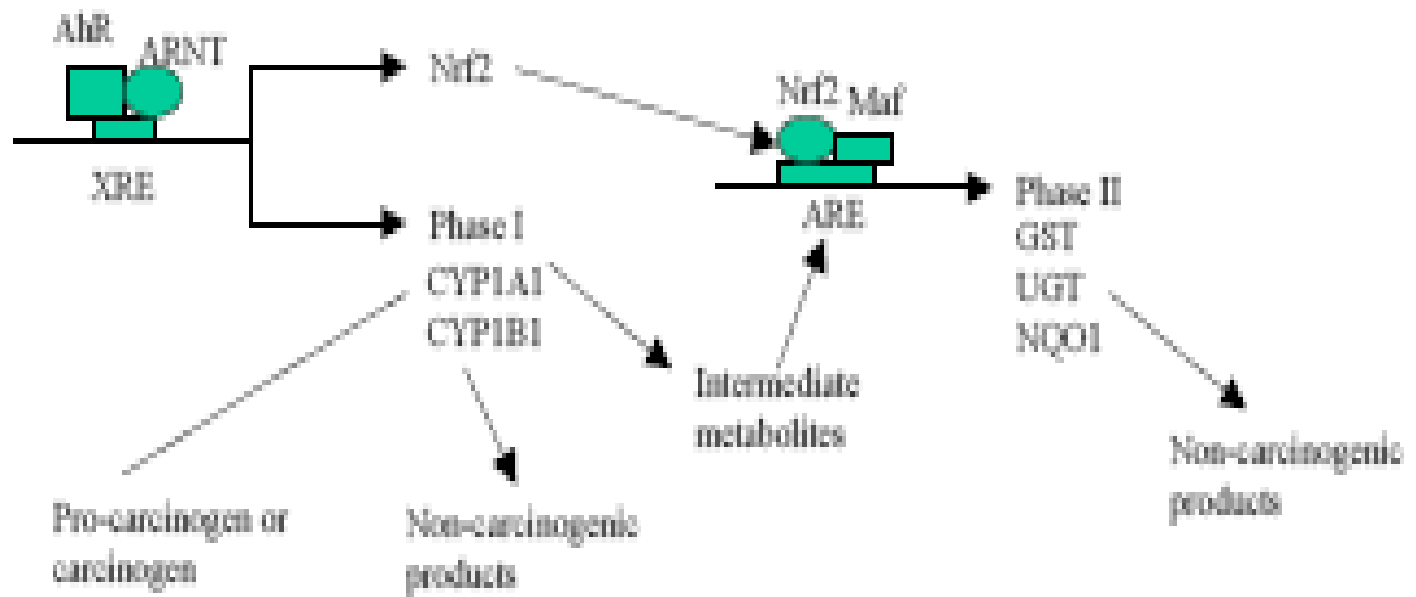
Bifunkční induktory  
= xenobiotika  
aktivující  
AhR a Nrf2

NQO; GST a další  
enzymy 2. fáze  
biotransformace



XRE = xenobiotic (dioxin) response element;  
ARE = antioxidant response element

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



# 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 POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

