

A decorative graphic at the top of the slide features a grid of light green squares on a slightly darker green background. The grid is contained within a shape that curves upwards on the left and downwards on the right, resembling a stylized leaf or a wave.

Regulace enzymů

Tomáš Pruša

Rev. 0.7

Inhibice

- Látky snižující syntézu enzymu (transkripci E)
- Nedostatek endogenních kofaktorů
 - Nedostatečná výživa
 - Interakce
- Inhibitory enzymů

Inhibice

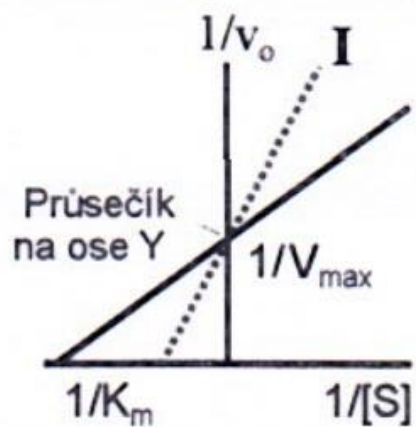
- Ireverzibilní
- Reverzibilní
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní
 - Akompetitivní
 - Smíšené

Inhibice

- Ireverzibilní
- Reverzibilní
 - Kompetitivní (K_M se zvyšuje)
 - Nekompetitivní (K_M se nemění, v_{max} se zmenší)
 - Akompetitivní (K_M i v_{max} se zmenší)
 - Smíšené (mění se poměr K_M a v_{max})

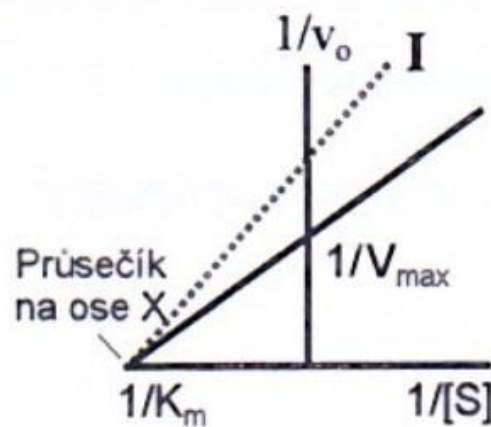
	kompetitivní	nekompetitivní	akompetitivní
Přímé vynesení	<p>v_0 V_{max}</p> <p>K_m K_m' [S], mM</p>	<p>v_0 V_{max} V_{max}'</p> <p>$K_m = K_m'$ [S], mM</p>	<p>V_{max} V_{max}'</p> <p>K_m' K_m [S], mM</p>
	V_{max} nezměněná K_m stoupá	V_{max} klesá K_m nezměněná	Jak V_{max} tak K_m klesá

kompetitivní



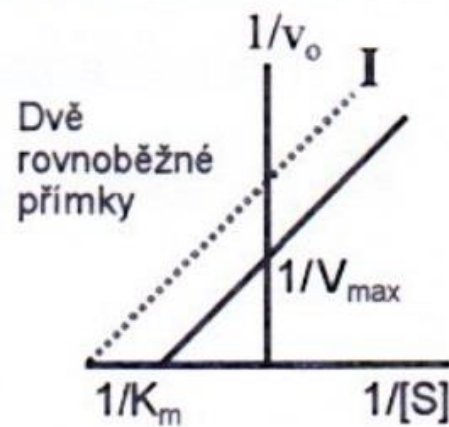
V_{max} nezměněná
 K_m stoupá

nekompetitivní



V_{max} klesá
 K_m nezměněná

akompetitivní



Jak V_{max} tak K_m klesá

Inhibice

- Specifické inhibitory
 - Více u CYP
- Nespecifické inhibitory
 - Těžké kovy (vazba na thiolové skupiny)
 - CO
 - Aminobenzotriazol

Inhibice CYP

- Reverzibilní inhibice
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní (pomalá)
- Ireverzibilní inhibice

Inhibitory CYP

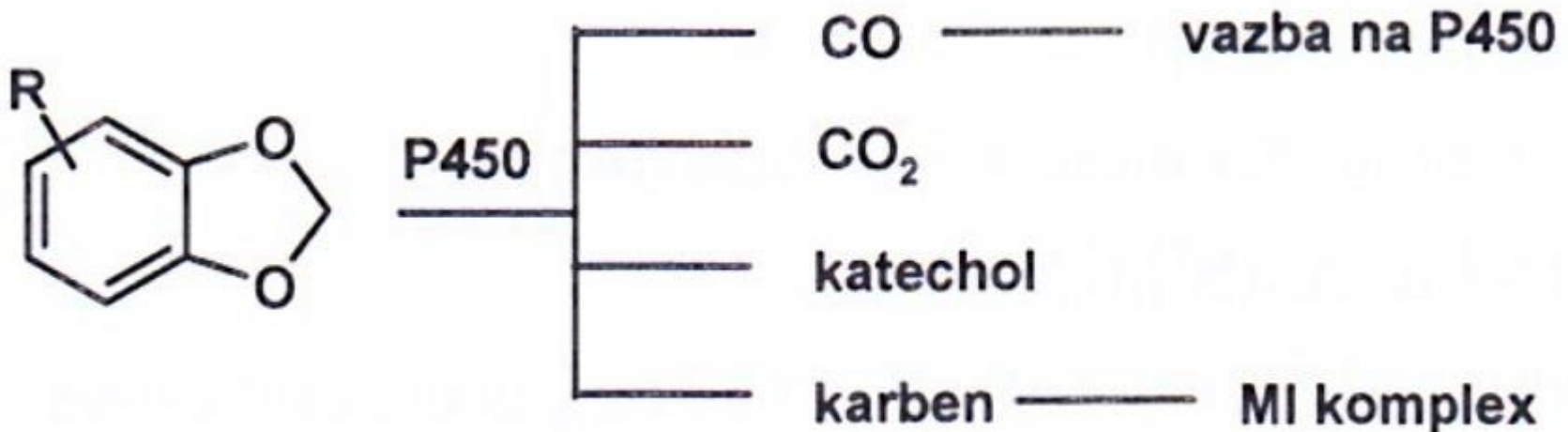
- Reverzibilně vázané na hem
 - Oxid uhelnatý
 - Tvořící kvazi-ireverzibilní komplexy s hemovým Fe
 - Oktylamin
- Ireverzibilně vázané na hem
 - 1-aminobenzotriazol - vazba na 2 dusíky pyrolového jádra, inhibuje cca 80 % aktivity CYP (2B1, 2C11, 3A*), neinhbuje 2A1

Komplexy CYP-metabolit inhibitoru

- Vazba mimo aktivní místo = nekom. inhibice
- Aktivace inhibitoru
- Minimálně 1 průchod CYP
- Benzodioxoly, hydraziny, isosafrol
 - Disociace = obnovení aktivity
- Alkylaminy
 - Syntéza *de novo*

MI komplexy

- Benzodioxol a mtb
 - Inhibice 2B1
 - Delší doba inhibice než reverzibilní inh.



Autokatalytická inaktivace CYP

- Meziprodukty schopné alkylovat CYP
- Inaktivace funkce
- Vazba na apoprotein (ne na hem)
- Syntéza CYP *de novo*
- Olefiny, cyklopropylaminy, chloramfenikol,...

Specifické inhibitory CYP

- Enzym odpovědný za mtb konkrétního léčiva
- Málo studií sledující vztah struktura-aktivita
- Chloramfenikol - acetylace lysinového zbytku v aktivním místě, P450 nemůže přijímat elektrony z NADPH cytochrom P450 reductázy. Má vliv na 2B1, 2C6, 2C11, nemá vliv na 1A1 a 1A2.

Specifické inhibitory CYP

- Makrolidová ATB
 - Erytromycin
 - Tvorba MI komplexů
 - 3A u potkana, 3A4 u člověka
- Naftoflavon
 - Reverzibilní kompetitivní inhibitor
 - CYP 1A a 1A2

Detekce forem CYP

- Jak?

Detekce forem CYP

- Selektivní induktor a inhibitor
- Specifické substráty
- Imunoinhibice
- Western Blotting
- Exprese CYP cDNA (např. kvasinky)

Indukce

- In vivo
- Po určité době po podání
- Zvýšení syntézy CYP
- Specifická
- Substrát izoenzymu, který indukuje

Indukce

- Odpověď buňky na chemický stres
- Indukovatelnost
 - Enzymů 1. fáze biotransformace
 - Enzymů 2. fáze biotransformace
 - Transportních systémů
- Zásah do endogenního mtb a buněč. cyklu

Induktory

- Lipofilní sloučeniny
- Dlouhý biologický poločas
- Málo se metabolizují
- Kumulace
- Opakované podání (není podmínkou)

Receptor

- AhR (aryl hydrocarbon receptor)
- PXR (pregnane X receptor)
- CAR (constitutive androstan receptor)
- PPAR (peroxisome proliferator activated rc)
- GR (glucocorticoid rc)
- VDR (vitamin D rc)

Mechanismus

- Indukce MC typu (PAH) → AhR
- Indukce PB typu → CAR
- Indukce steroidy → PXR, CAR
- Indukce ethanolem
- Indukce klofibrátem → PPAR

AhR (PAH)

- Historicky dobře prozkoumaná
- Indukční odpověď silná
- Interakce s Ah receptorem
- Indukce
 - CYP 1A*, 1B*
 - UGT
 - GST
 - Buněčný cyklus

AhR (PAH)

- Induktory
 - PAHy
 - Dioxiny
 - Flavony, indoly
 - Kofein
 - Benzimidazoly (omeprazol)
 - Bilirubin, prostaglandiny

AhR (PAH)

- Ligandy
 - PAH, polychlorované bifenyly, polychlorované dibenzo-p-dioxiny
 - Metabolity sek. mtb rostlin (flavony)
 - Endogenní (deriváty tryptofanu, kys. arachidonové, bilirubin,...)

AhR (PAH)

- AhR
 - Není to jaderný receptor
 - PAS protein (Per-Arnt-Sim) – stará skupina
 - Regulace odpovědi na rychlé změny okolí
 - HIF-1 α (faktor indukovaný hypoxií)

AhR (PAH)

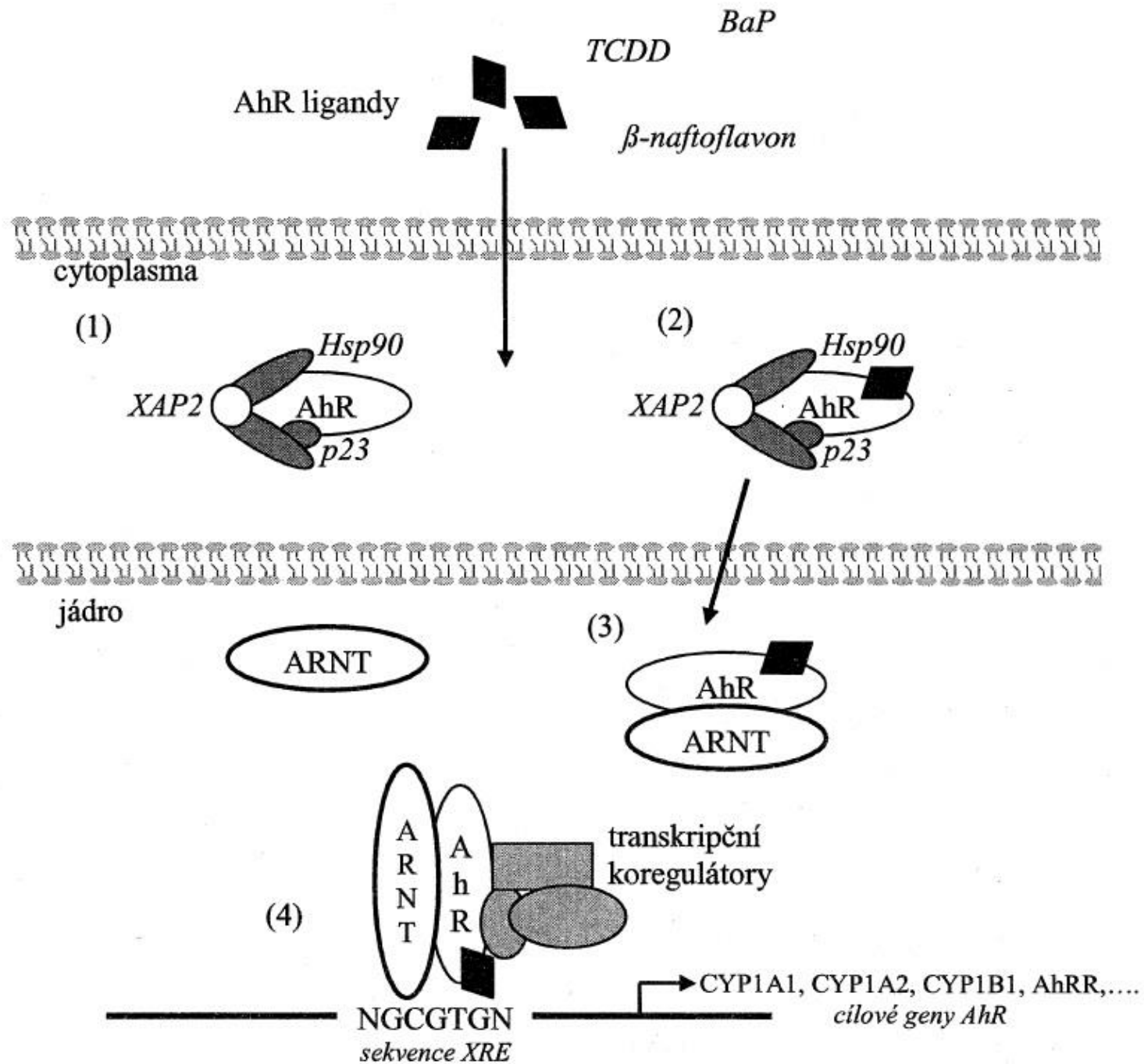
- 3 domény
 - bHLH
 - Basic helix-loop-helix
 - Vazba na DNA
 - PAS
 - Vazba ligand AhR
 - TAD
 - Transaktivační doména
 - Glutaminové rezidua (transkripce)

AhR (PAH)

- Transkripční faktor
- Aktivovaný specifickými ligandy
- Reguluje expresi cílových genů

AhR (PAH)

- Inaktivní – cytoplazma
- Komplex proteinů Hsp90, XAP2 a p23
- Po vazbě ligandu na inaktivní komplex dojde ke změně konformace
- AhR+ligand jde do jádra
- Spojí se s ARNT (AhR nuclear translocator)
- Vazba na cílové regulační oblasti genů
- Aktivace transkripce



AhR (PAH)

- Cílová sekvence – xenobiotické responzivní elementy (XRE/DRE)
- ARNT se neváže jen na Ahr, ale i na HIF-1 α

AhR (PAH)

- Regulace rodiny CYP1*
 - CYP 1A1, 1A2, 1B1
 - 1A1 – exprese – biomarker kontaminace životního prostředí AhR ligandy

AhR (PAH)

- Produkty – aktivní elektrofilní sloučeniny
- Benzo[*a*]pyren
 - Ligand AhR
 - Mtb CYP1 → stabilní adukt na DNA
 - Mutagen, karcinogen
 - Cigaretový kouř, ovzduší
- Dlouhodobá aktivace AhR → dioxinová toxicita

AhR (PAH)

- Produkty – aktivní elektrofilní sloučeniny
- Benzo[*a*]pyren
 - Ligand AhR
 - Mtb CYP1 → stabilní adukt na DNA
 - Mutagen, karcinogen
 - Cigaretový kouř, ovzduší
- Dlouhodobá aktivace AhR → dioxinová toxicita

Nukleární receptory

- PXR, CAR, GR
- Transkripce je regulována
 - Transkripčními faktory a nukl. receptory
 - Epigenetická regulace
 - Stabilizace/degradace mRNA
 - Degradace proteinu proteasomem

Nukleární receptory

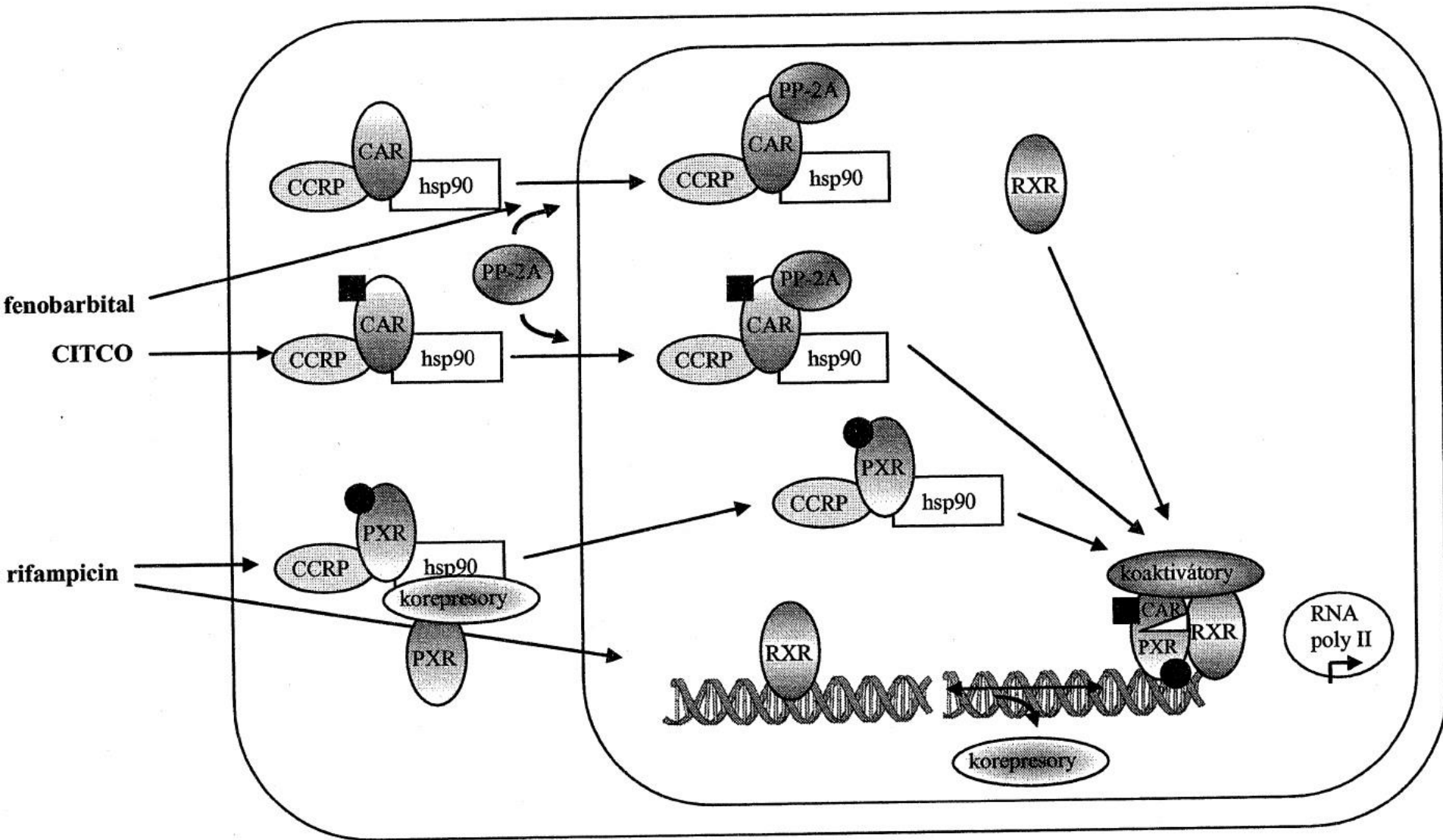
- Aktivují transkripční kaskádu spouštějící expresi cílových genů v jádře
- Ligandem je často xenobiotikum
 - Up-regulace
 - Fylogenetická ochrana

Nukleární receptory

- PXR a CAR
 - Aktivace nízkomolekulárními slouč., léčivy, endogenními steroidy
 - Senzory endo i exogenních toxických látek
 - Regulace CYP450 3A4
 - Orphan – neznáme fyziol. ligand

Nukleární receptory

- Ligand+Rc – vazba v promotorové části cílového genu
- Transkripční aktivace (mRNA)
- Uvolnění korepresorů
- Navázání koaktivátorů
- Rozvolnění histony-DNA



Nukleární receptory

- Lokalizace
 - Játra, tenké a tlusté střevo, ledviny, plíce

PB

- Indukce phenobarbitalem
- Zvýšení transkripce mRNA
- Indukce nižší než u PAH

- Aktivace transkripce bez vazby na nukleární receptor

PB

- Regulace
 - CYP 2B, epoxidhydrolasa, NADPH-cyt.P450-redukbsa
 - GST, UGT, sulfotransferasa
 - P-glykoprotein, MRP2, OATP2
- Induktory:
 - Barbituráty, chlorpromazin, clotrimazol, PCB, pesticidy

Indukce steroidy a makrolidy

- Indukce transkripce m-RNA i posttranskripčních změn
- Zvýšená stabilita mRNA i enzymu

Indukce steroidy a makrolidy

- **Induktory**

- Rifampicin, dexamethason, phenobarbital
- Některé steroidní hormony
- Syntetické i endogenní glukokortikoidy
- Makrolidová antibiotika

- **Regulace:**

- CYP 3A1 (u potkana), CYP 3A4 (u člověka), CYP 2C
- Sulfotranzferáza (alkohol a žluč. kyseliny)
- GST
- P-glykoprotein, MRP2, OATP2

Indukce etanolem

- Dlouhodobé podávání etanolu (zvýšení mtb)
- Jednorázově (komp. inhibice)
- CYP 2E1
- Zvýšení aktivity 2E1
 - Exprese genu není ovlivněna
 - Stabilizace mRNA (diabetes)
 - Stabilizace bílkovinné molekuly - posttranslační modifikace

Indukce klofibrátem

- CYP 4A*
- Vazba na PPAR
- Vazba na PXR receptor (tvorba dimeru)
- Aktivace transkripce

Indukce redukčních enzymů

- Aldo/keto reductázy
- Induktory jsou jiné látky než CYP (doxorubicin,...)
- Vazba na ARE (antioxidant responsive elements)
- Rezistence, kardiotoxicita

Shrnutí indukce

- 3 mechanismy
 - Aktivace transkripce (většina)
 - Stabilizace mRNA (1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E1, 3A*)
 - Stabilizace proteinů (2E1, 3A*)

Shrnutí indukce

- Výsledky
 - Zrychlení metabolismu
 - Snížení účinku
 - Tkáňová toxicita

Tkáňová toxicita

- Paracetamol
 - Běžné dávky
 - Glukuronidace, sulfatace (95 %)
 - Konjugace s glutationem (5 %)
 - Vysoké dávky
 - Glukuronidace, sulfatace – saturace
 - Dostatek GSH – malá hepatotoxicita
 - Aktivace CYP 1A2 (acetylbenzosemichinon)
 - Výsledek:
 - Nižší účinek, vyšší toxicita (biotransformace)

Děkuji za pozornost