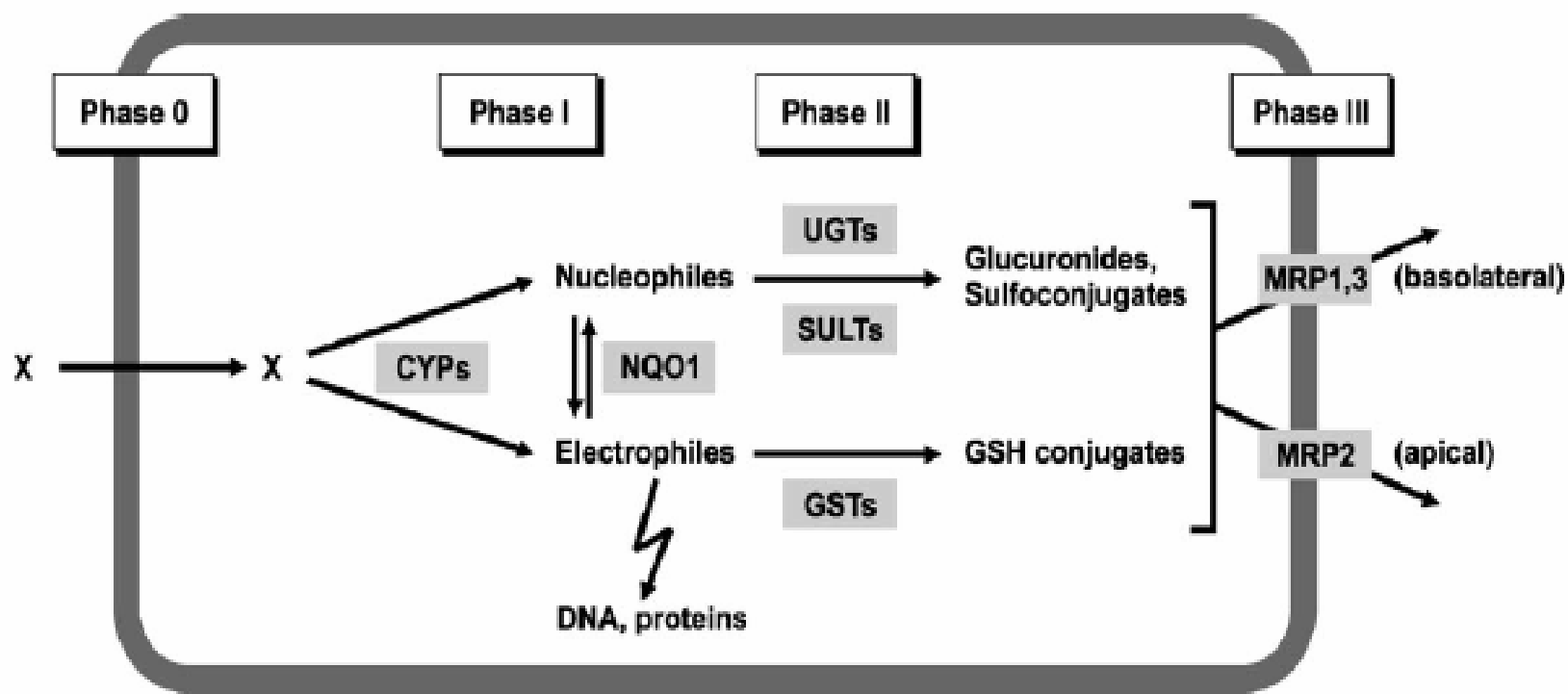


ENZYMY METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK A CHEMICKÝCH REGULÁTORŮ SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE:

- 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

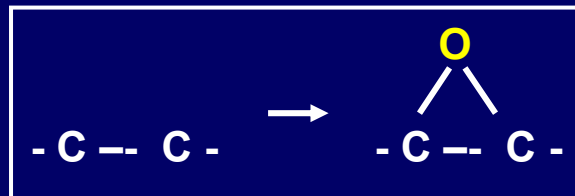
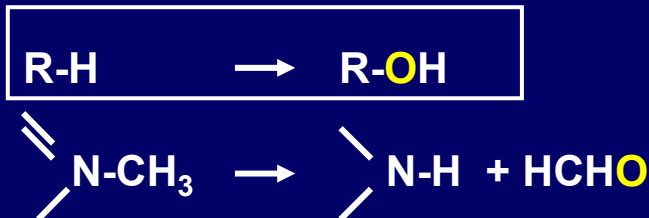
CYP enzymy



(substrát)

(produkt)

- 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:

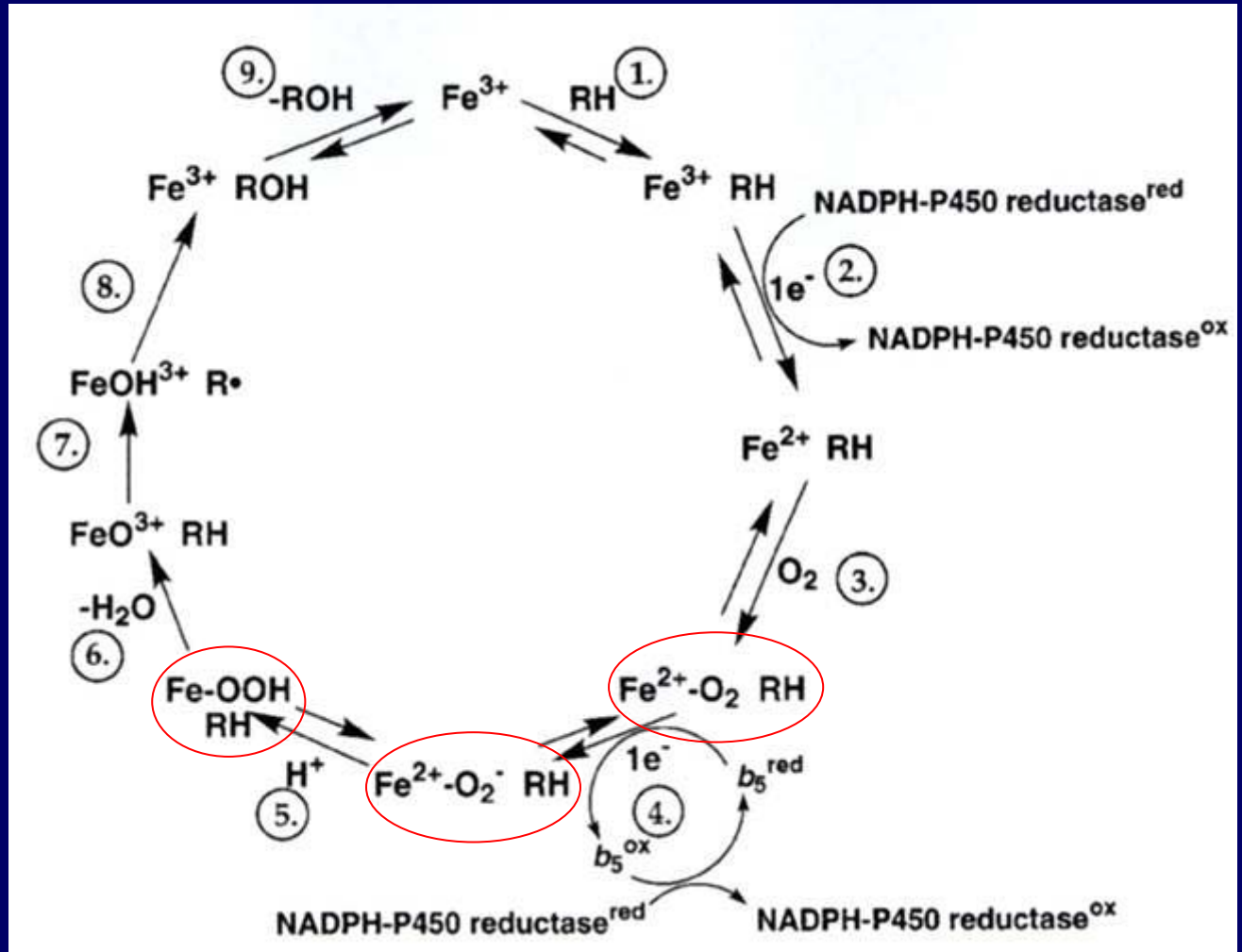
NADPH

NADPH:P450 oxido-
reduktáza

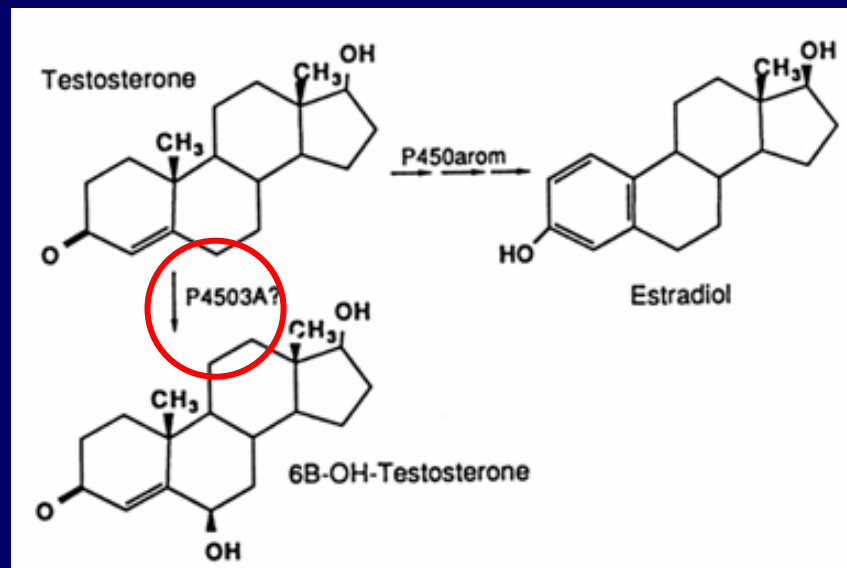
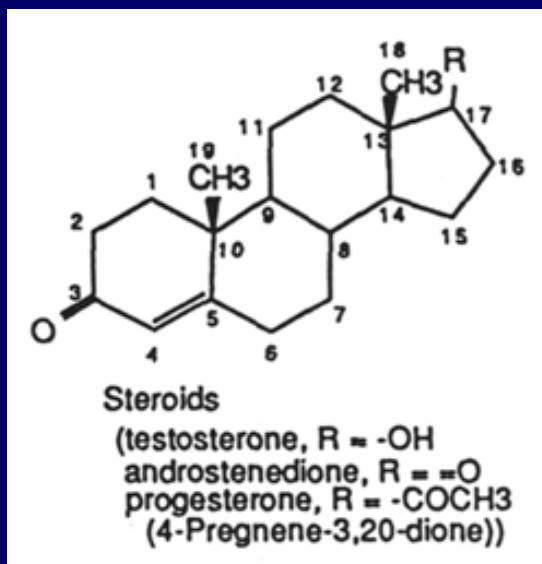
cytochrom P450

substrát RH,
produkt ROH,
(produkce ROS)

Aktivace kyslíku:
ROS = vedlejší
produkty

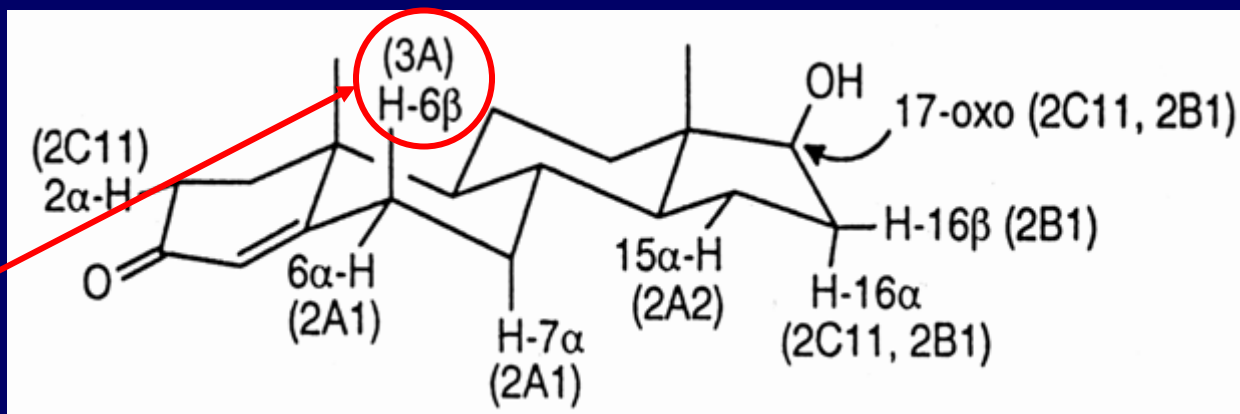


SPECIFICKÉ SUBSTRÁTY CYP ENZYMŮ

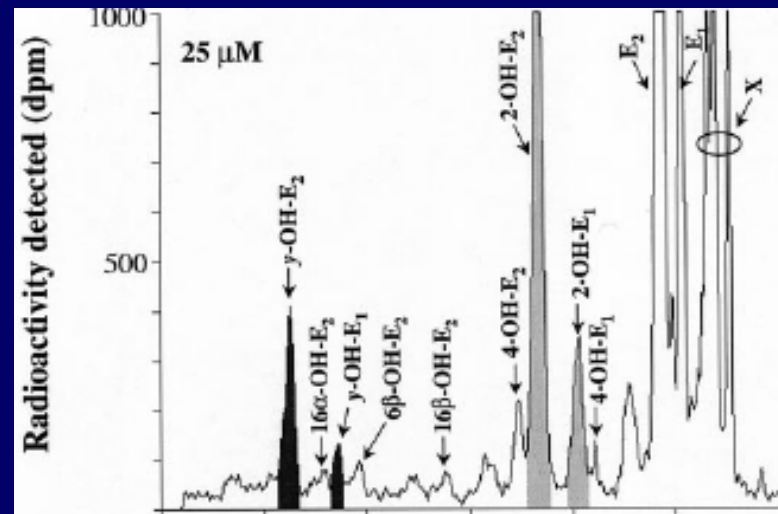
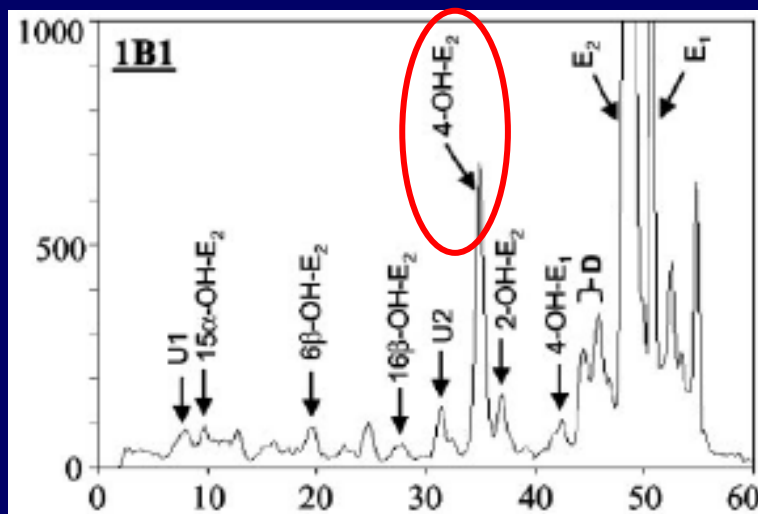
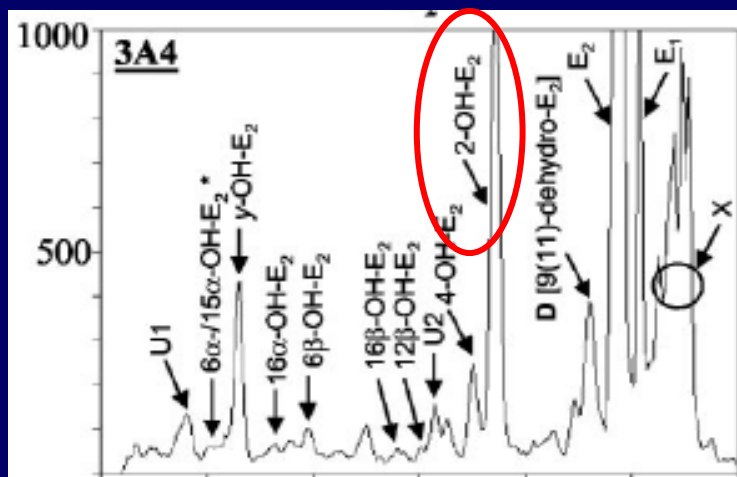
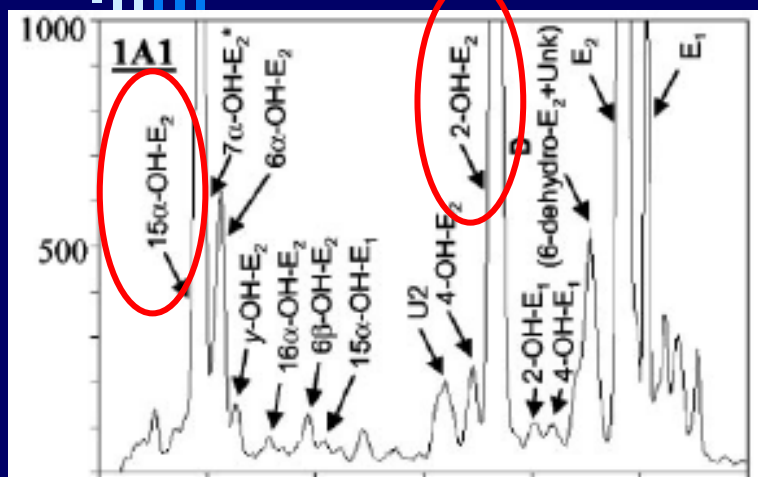


Hydroxylace steroidů
 v různých pozicích
 (v závorkách isoformy
 CYP enzymů)

6β-hydroxylace =
 specifická reakce CYP3A

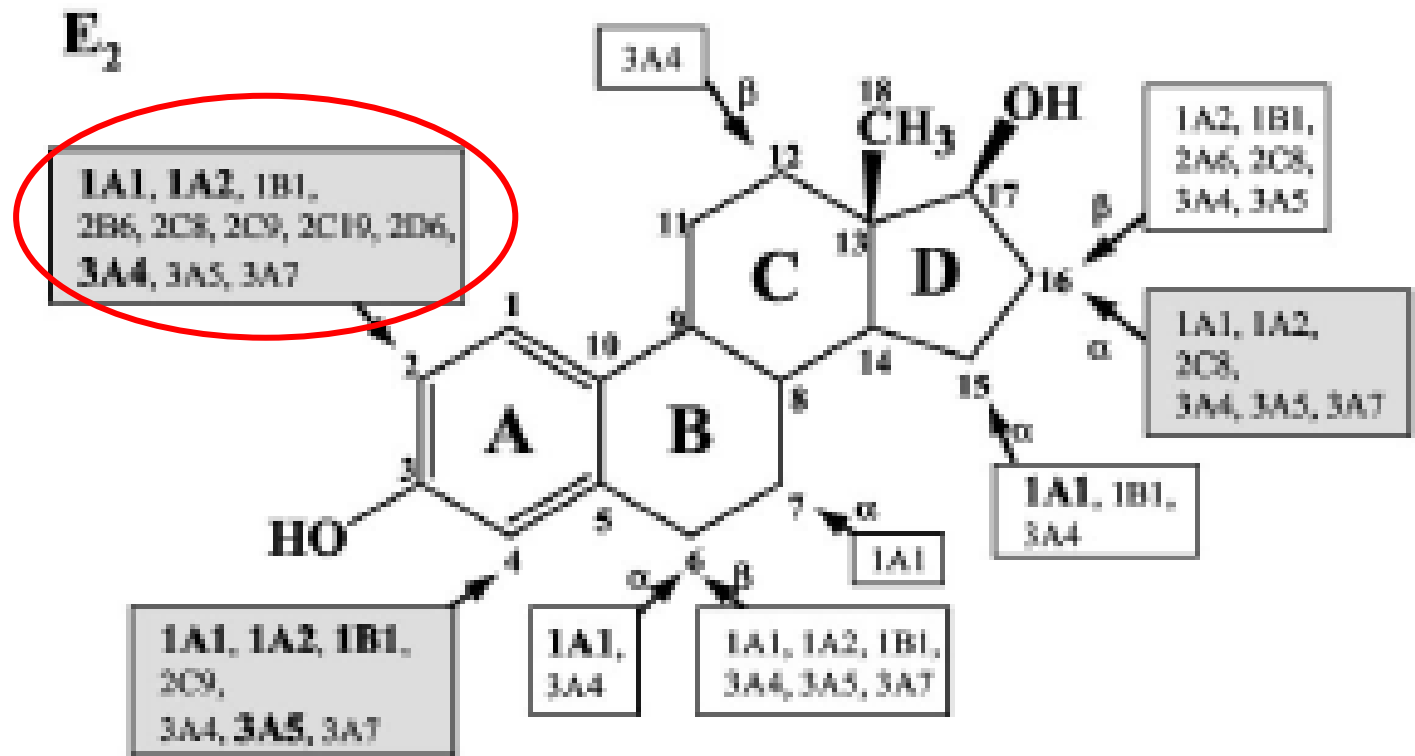


HPLC ANALÝZA HYDROXYLOVANÝCH METABOLITŮ 17β-ESTRADIOLU (lidské CYP enzymy byly exprimovány v hmyzích buňkách infikovaných baculovirovým expresním systémem)

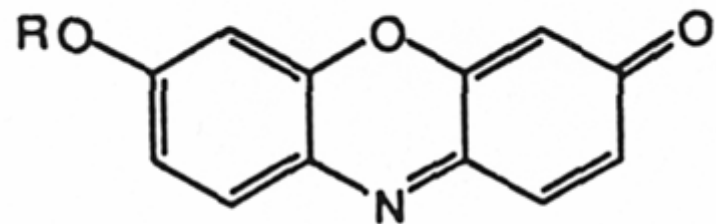


(hydroxylace E2 lidskými jaterními mikrosomy)

REGIOSELEKTIVNÍ HYDROXYLACE ESTRADIOLU ISOFORMAMI CYTOCHROMU P450

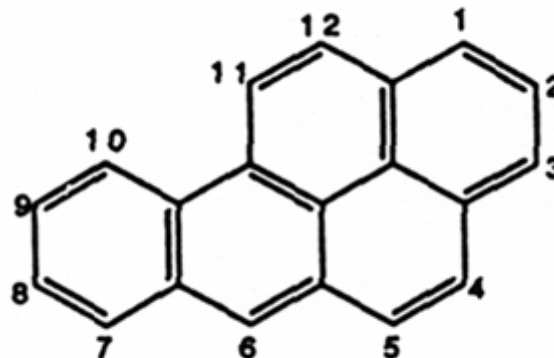


SPECIFICKÉ SUBSTRÁTY CYP1 ENZYMŮ



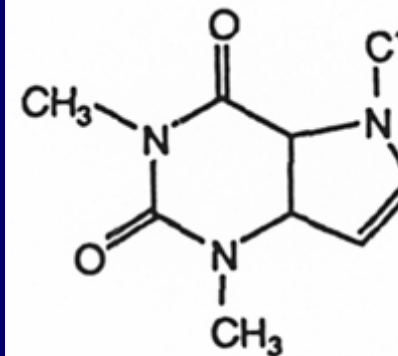
Alkylresorufins
(alkoxyphenoxazones)

EROD / MROD



Benzo[a]pyrene

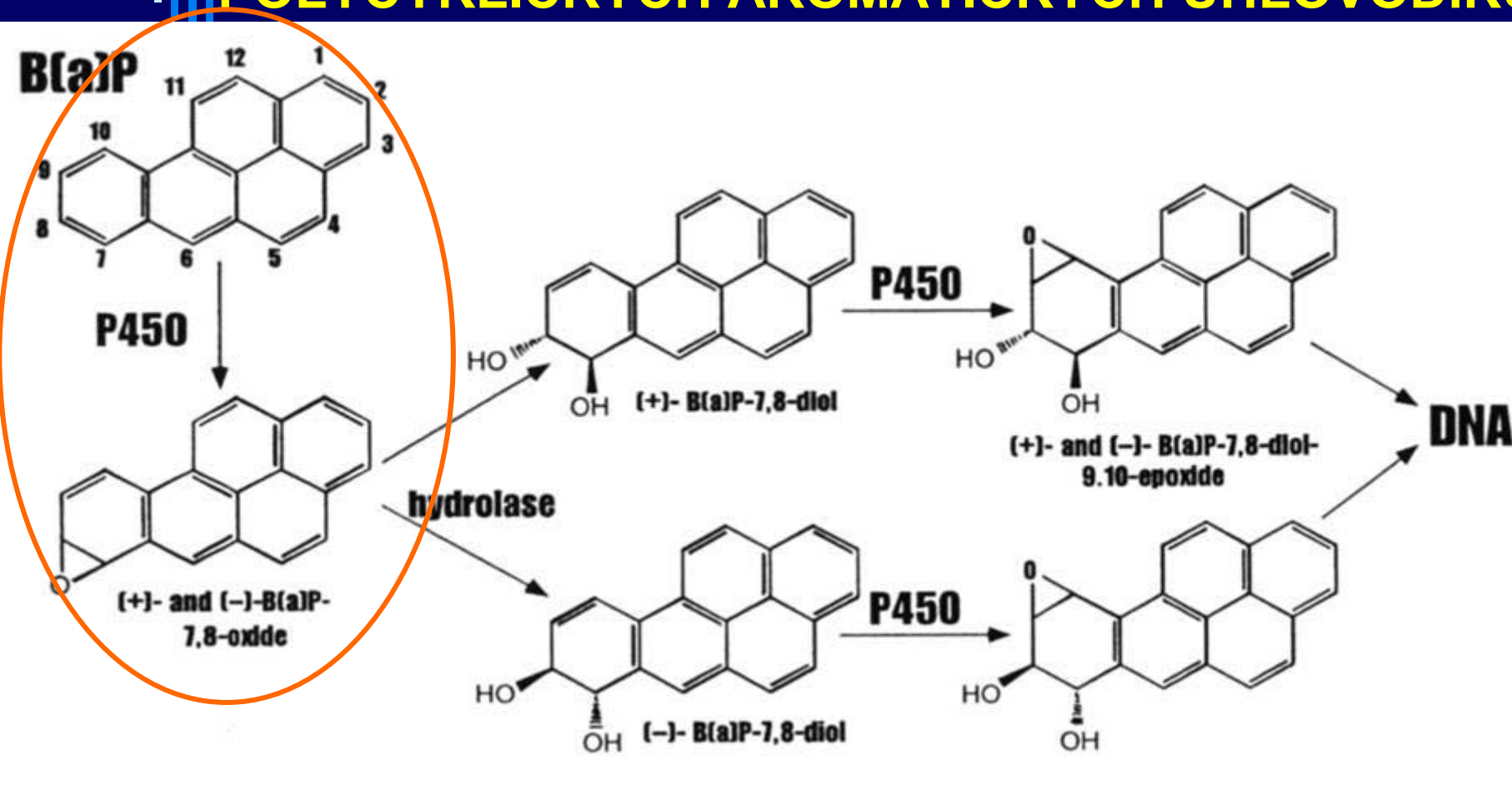
BaP-hydroxyláza



Caffeine
(1,3,7-trimethylxanthine)

Kofeindemethylázy

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

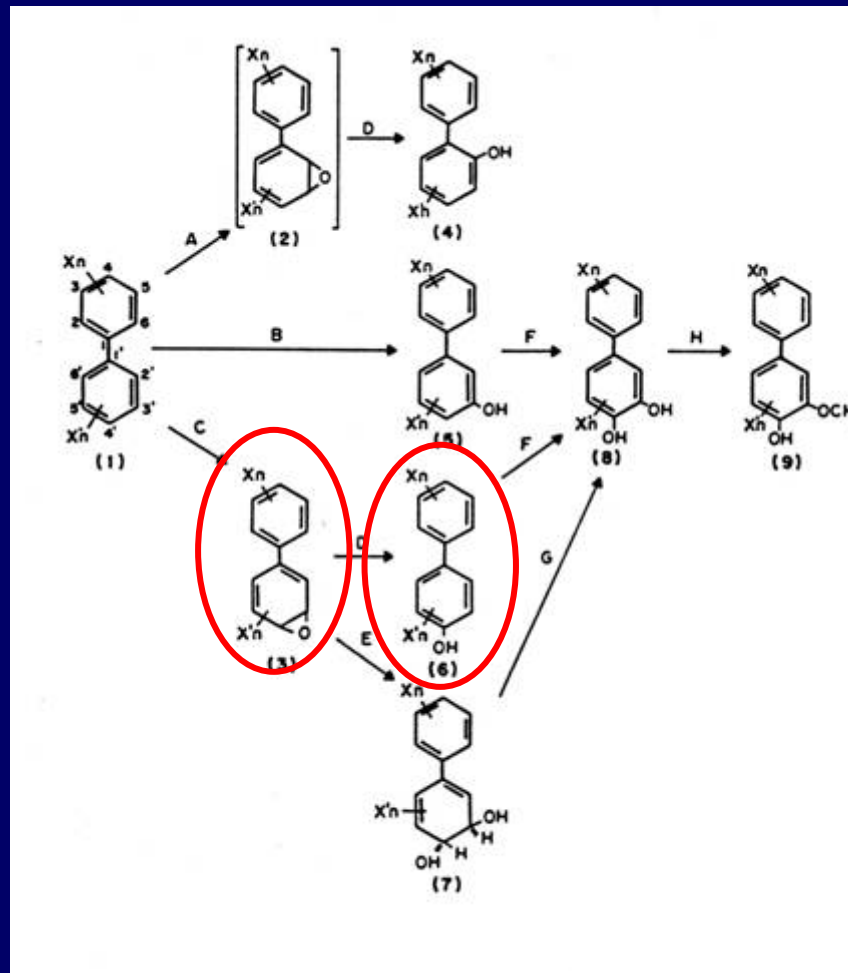
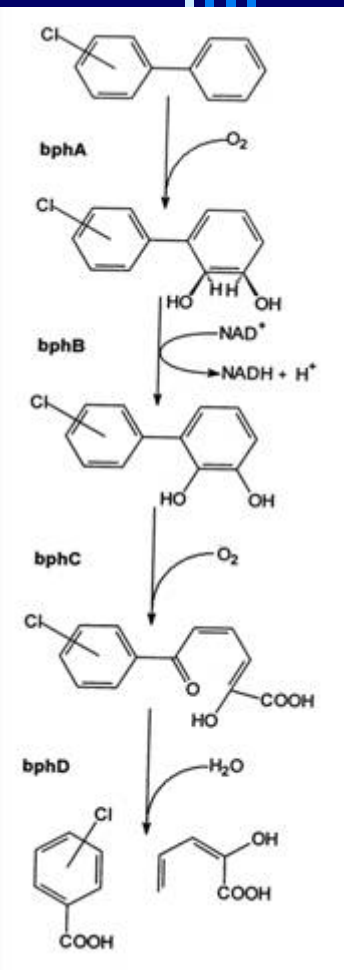


METABOLISMUS POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) – příklad 1. fáze metabolismu persistentních organických sloučenin

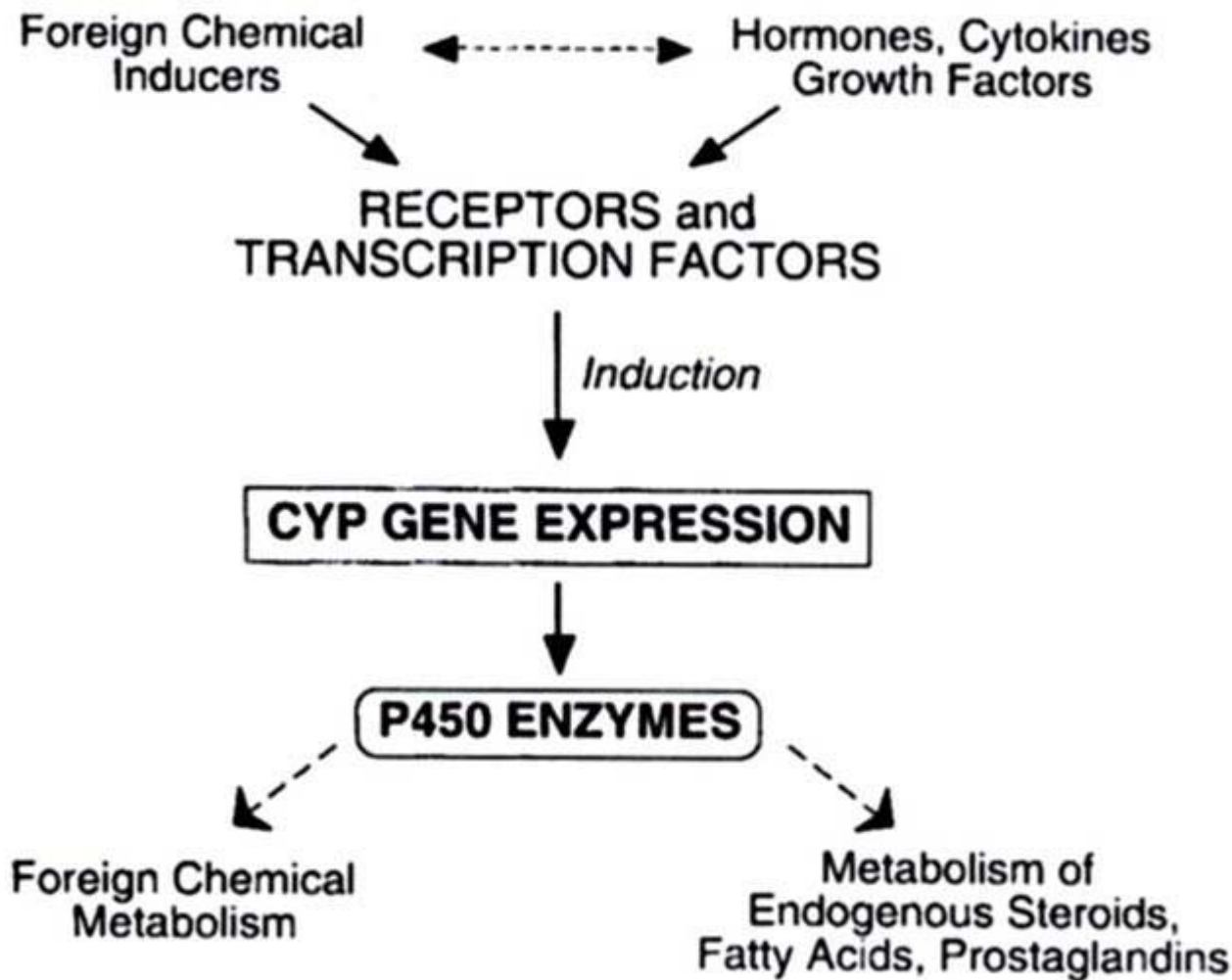
Mikrobiální degradace

Metabolismus u vyšších živočichů: oxidativní metab. (hl. cesta C, D)

Persistentní arom. sloučeniny: obsah. Cl v sousedních pozicích – bariéra vzniku epoxidu monooxygenáz. reakcí

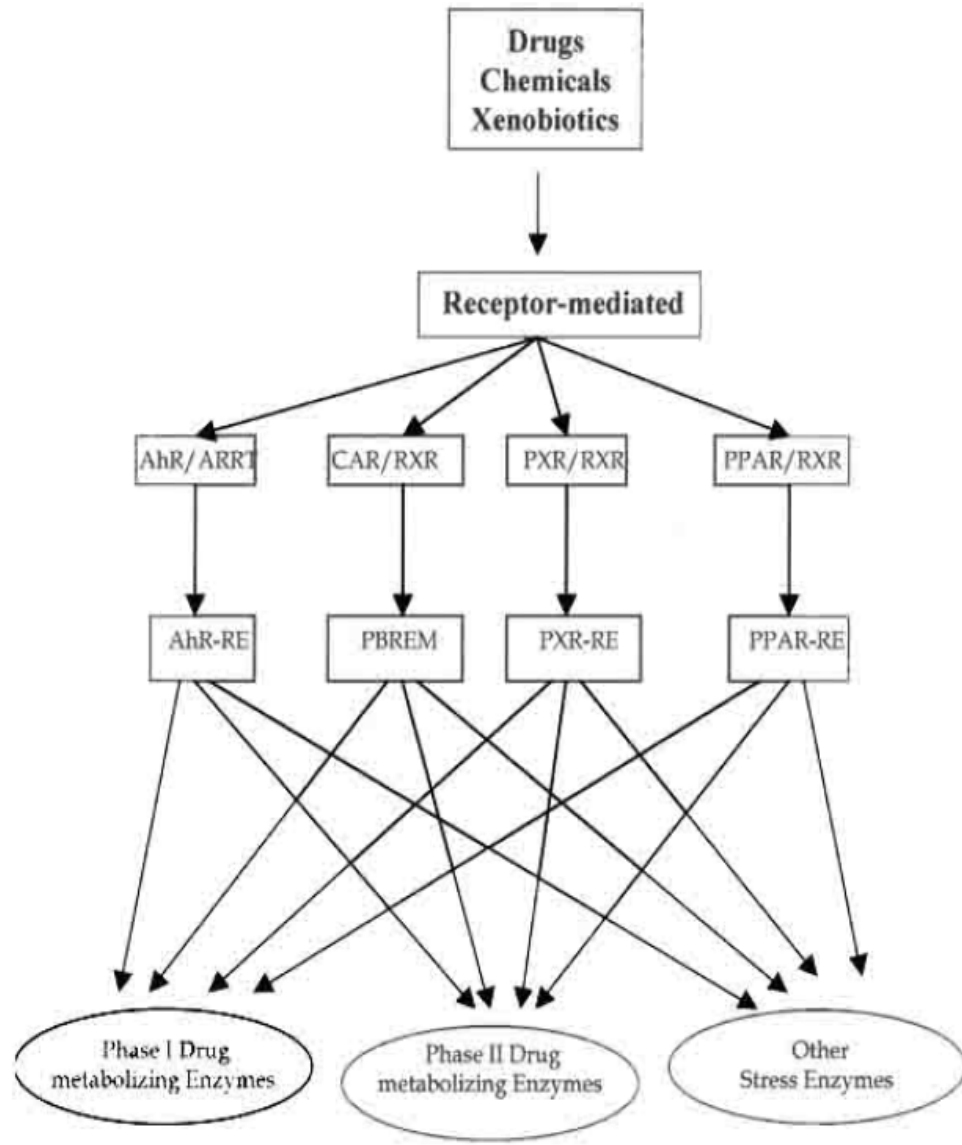


NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY KONTROJUJÍCI EXPRESI CYP PROTEINŮ



**XENOBIOTIKA, STEROIDY AJ.
LÉČIVÉ PŘÍPRAVKY 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

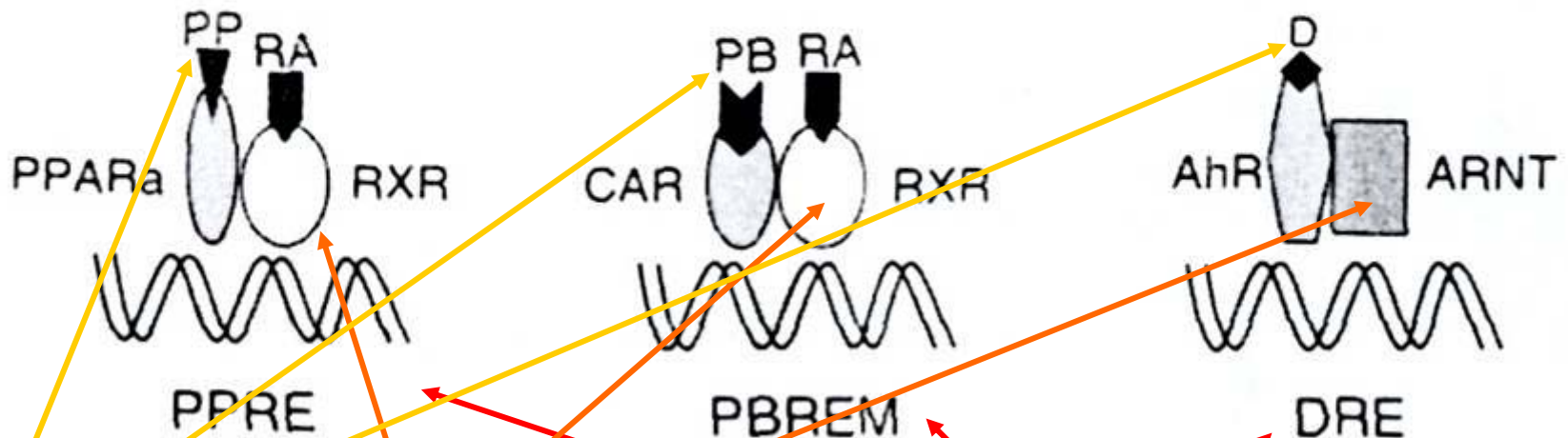
nukleární receptory

cytosolový receptor

a) peroxisome proliferators

b) phenobarbital

c) dioxin



ligand receptoru

dimerizační partner

specif. responsní element v promoterech

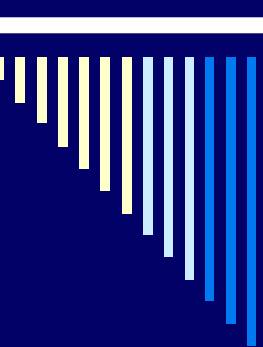
NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY KONTROLUJÍCÍ EXPRESI CYP ENZYMŮ

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

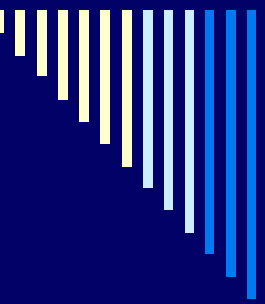
^a PAS transcription family member, not a nuclear receptor.

^b Inhibitors of CYP7A1 transcription.



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

- CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1: genová exprese regulována **AhR** (indukce mykotoxiny, 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), β -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, ...

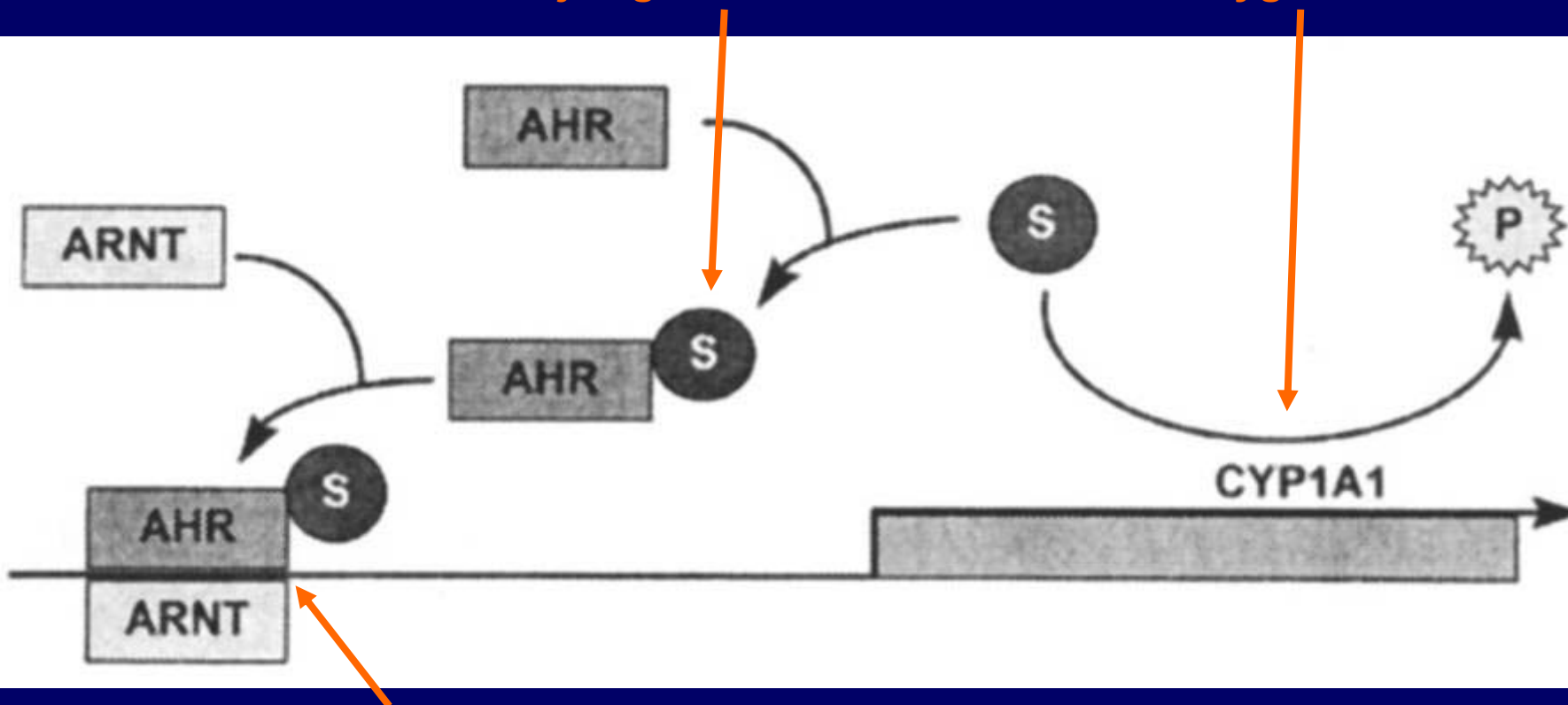
?

přímé interakce (ER?,...)

AKTIVACE Ah RECEPTORU A INDUKCE CYP1A1 SUBSTRÁTEM CYP1A

substrát S je ligandem AhR

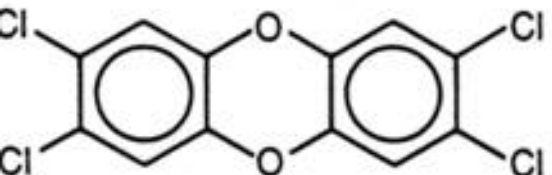
monooxygenázová reakce



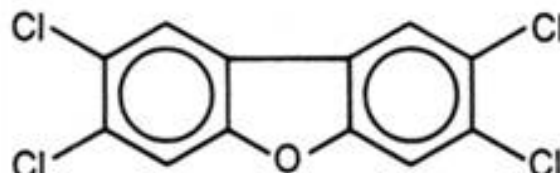
AhR/ARNT nasedá na XRE = DRE = xenobiotic (dioxin) response element

LIGANDY AhR

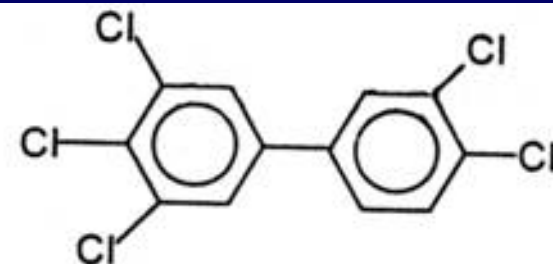
Strukturní podobnost (šířka, výška, molekulární objem, planarita molekuly)



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



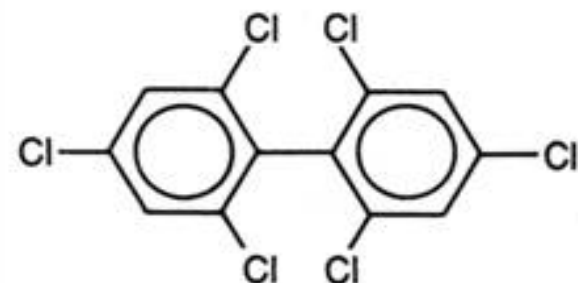
2,3,7,8-tetra-chlorodibenzofuran
(TCDF)



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**



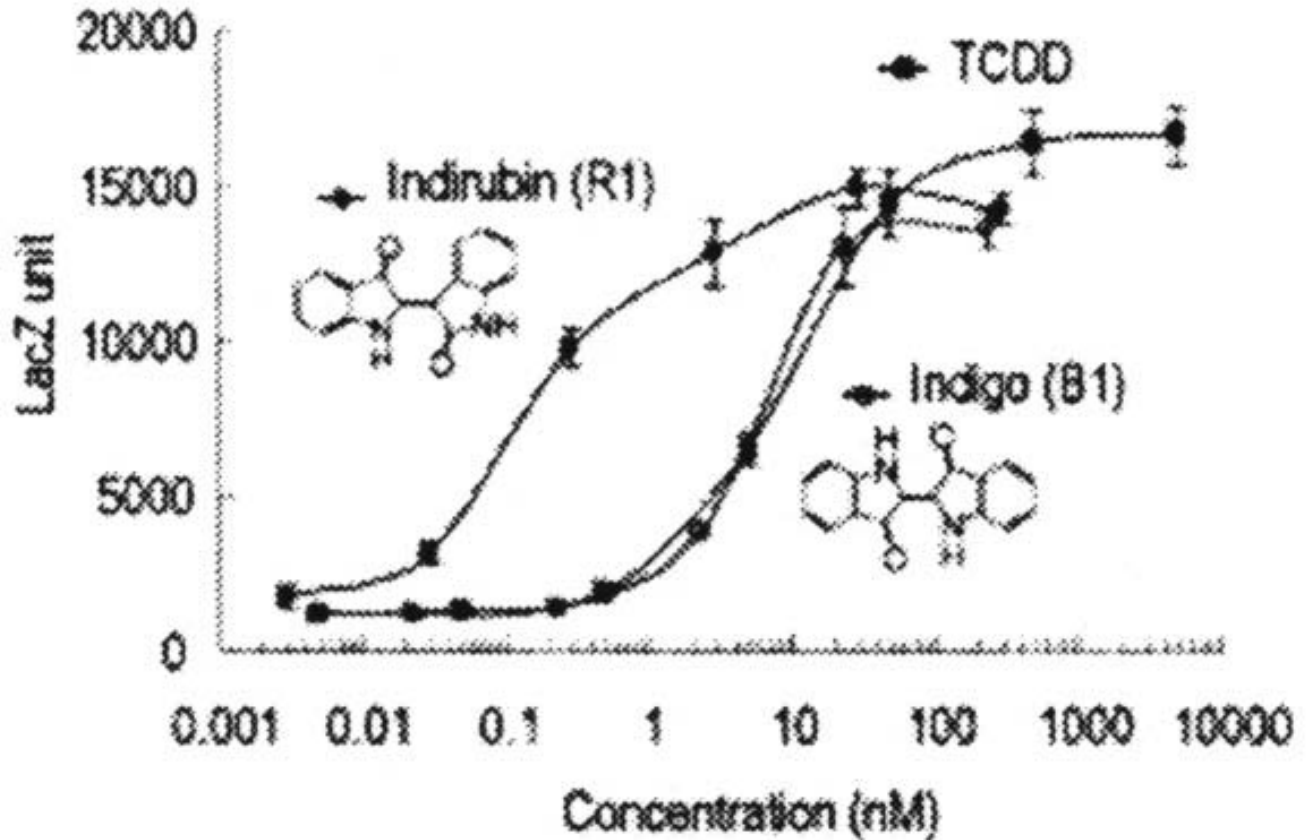
2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl
(Not coplanar)

ENDOGENNÍ AGONISTÉ AhR

dosud nejsou známy (deriváty tryptofanu ?)

Funkce AhR:

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

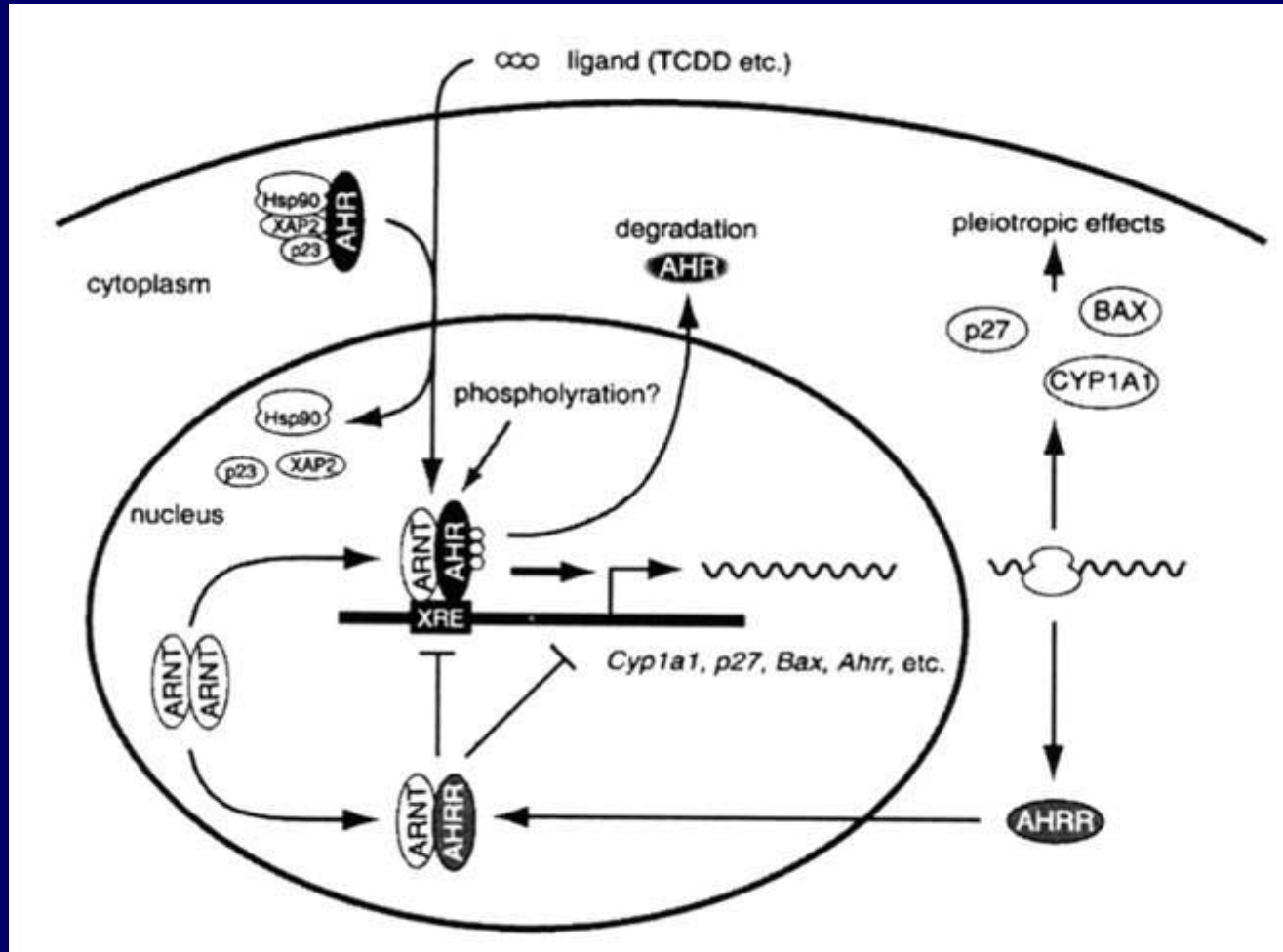


AKTIVACE Ah RECEPTORU / AhR-DEPENDENTNÍ GENOVÁ EXPRESE

produkty genové exprese:
 detox./bioaktiv. enzymy
 apoptóza;
 bun. cyklus;

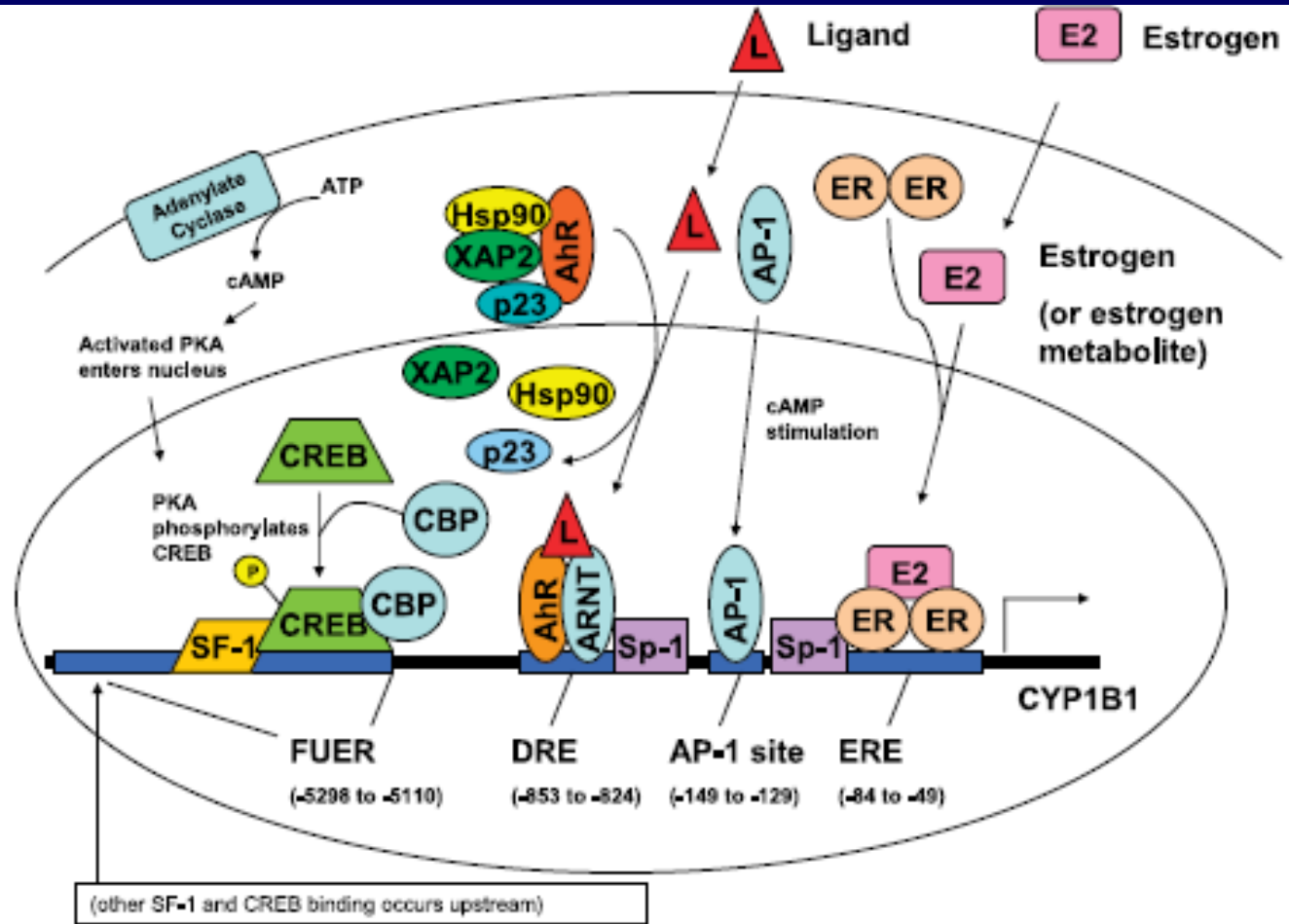
římé interakce AhR
 "cross-talk" s ER, ...)

regulace AhR:
 degradace AhR po
 avázání ligandu
 AHRR = AhR represor



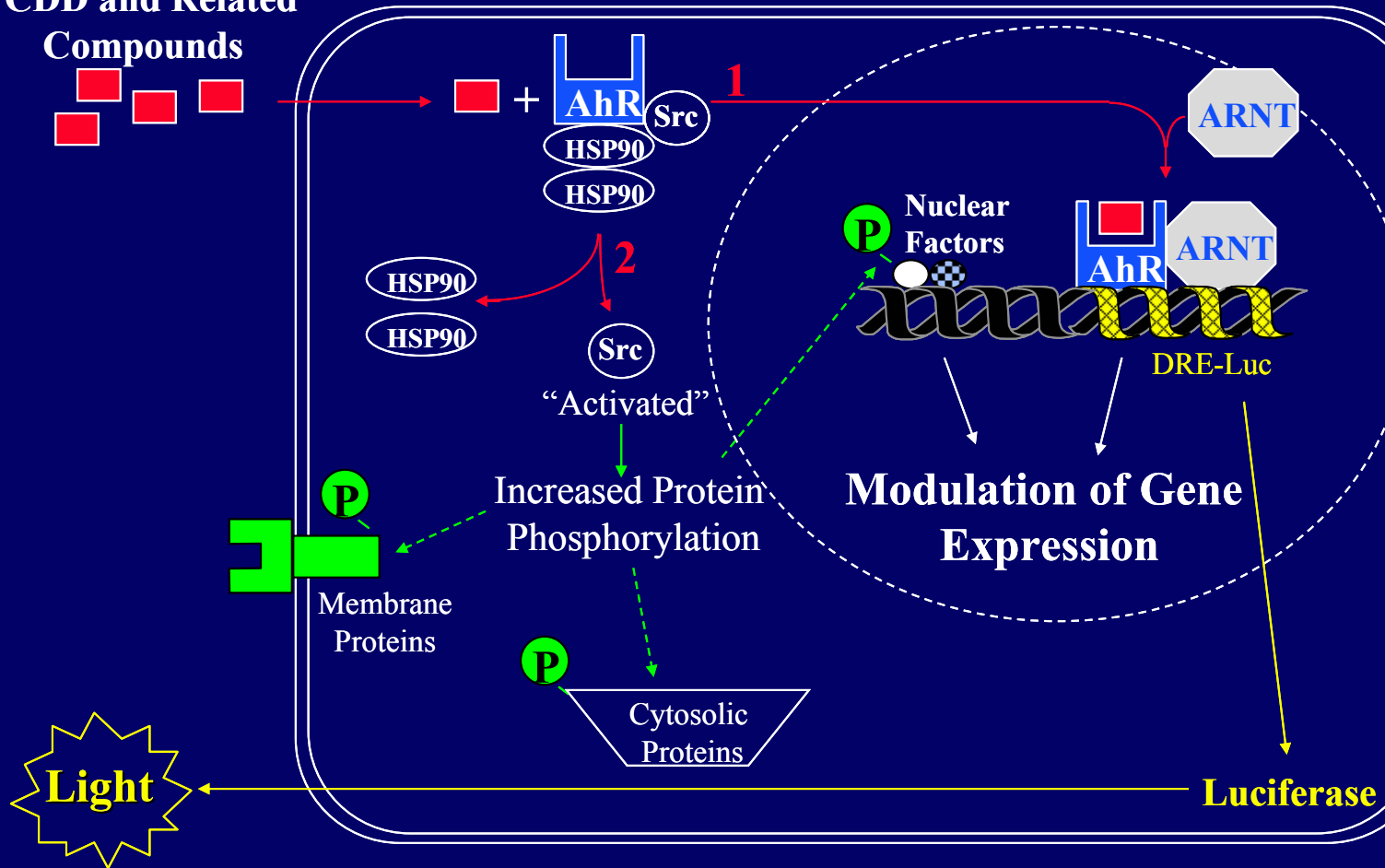
REGULACE CYTOCHROMU P4501B1 (CYP1B1)

DRE =
dioxin
response
element

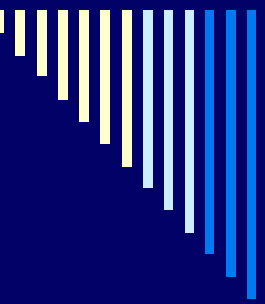


MĚŘENÍ AKTIVACE Ah RECEPTORU (transgenní model - luciferázový reportérový gen)

TCDD and Related
Compounds

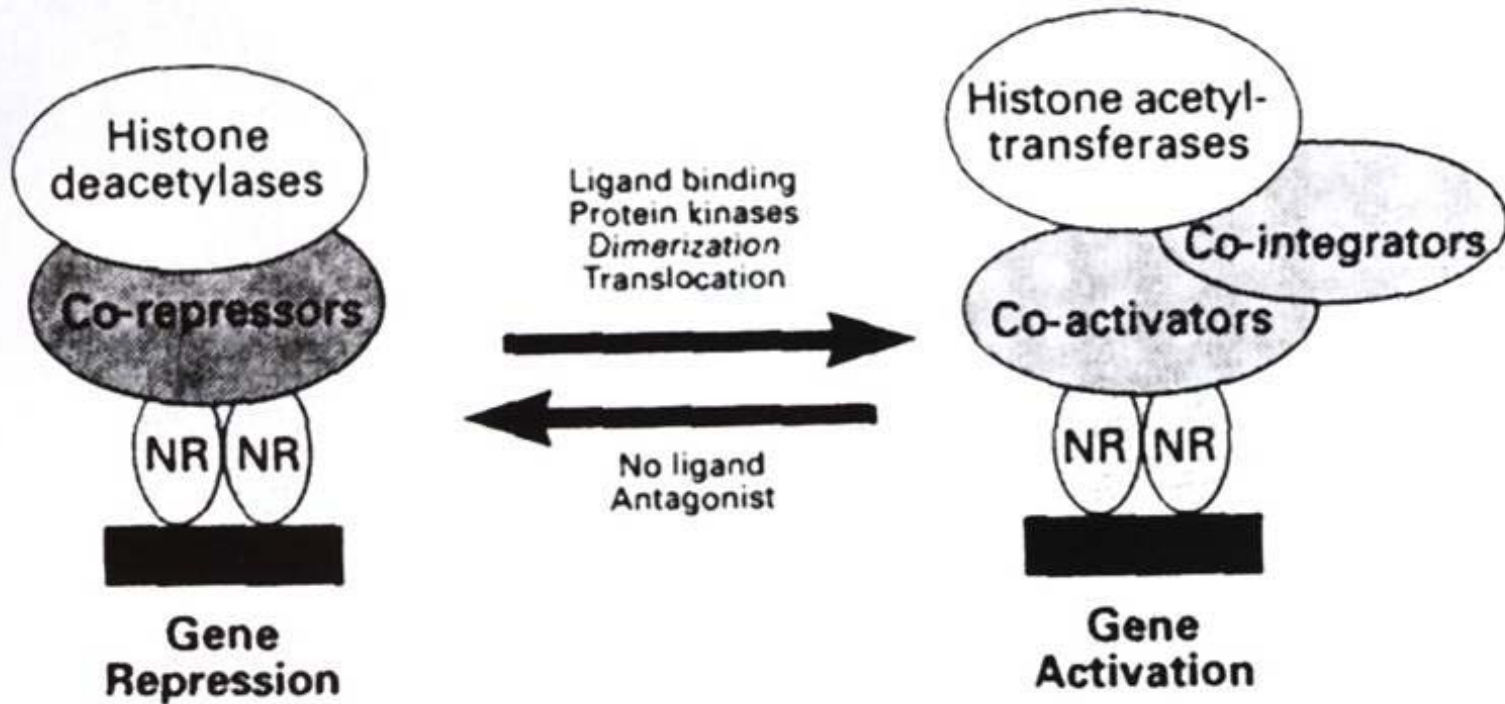


Adapted from Blankenship (1994)



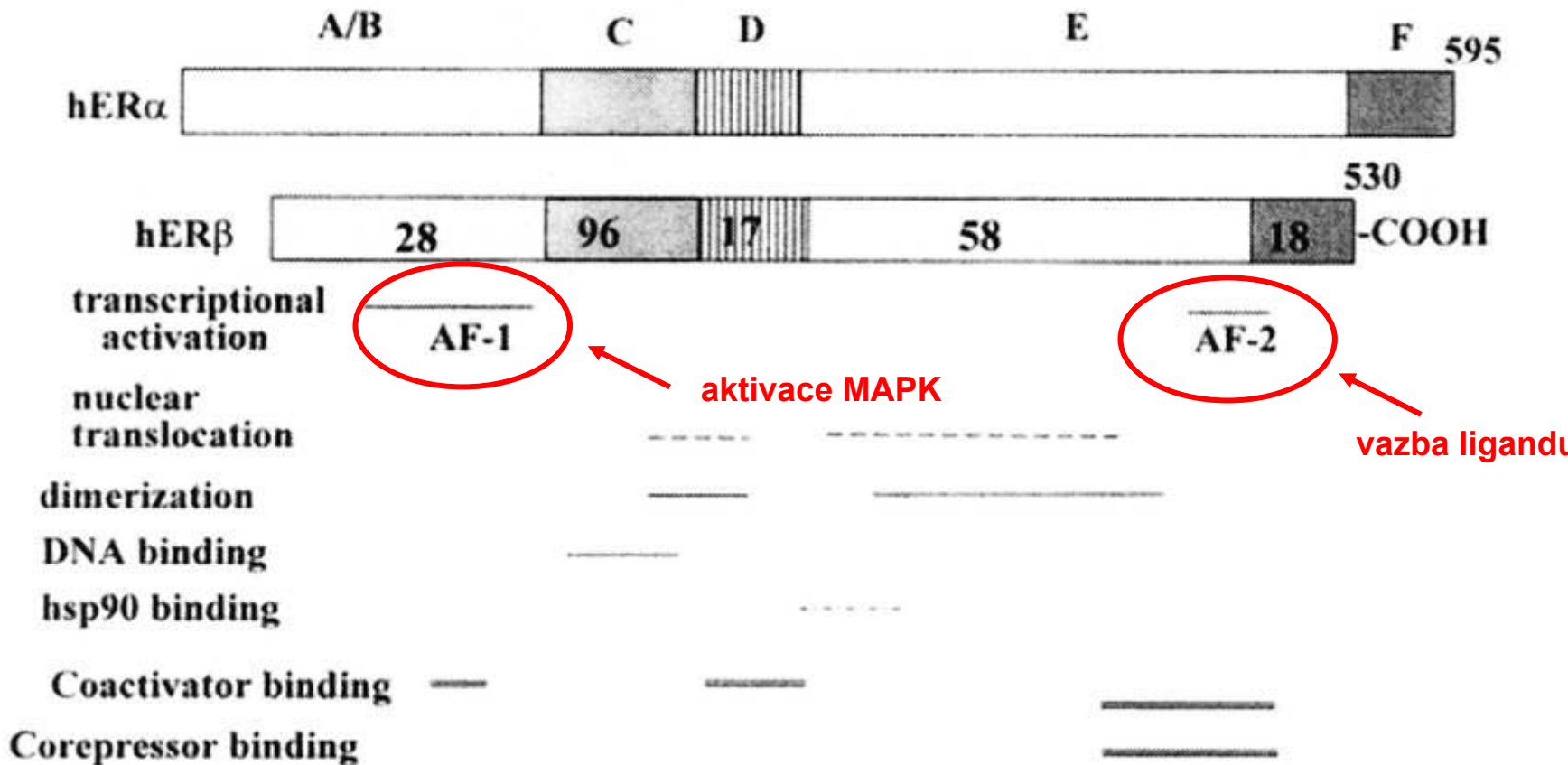
REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ: NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY (NR)

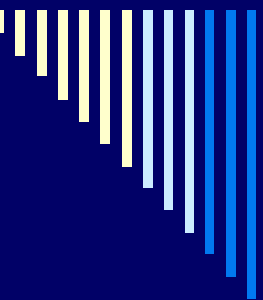


Model for gene activation and gene repression by NRs

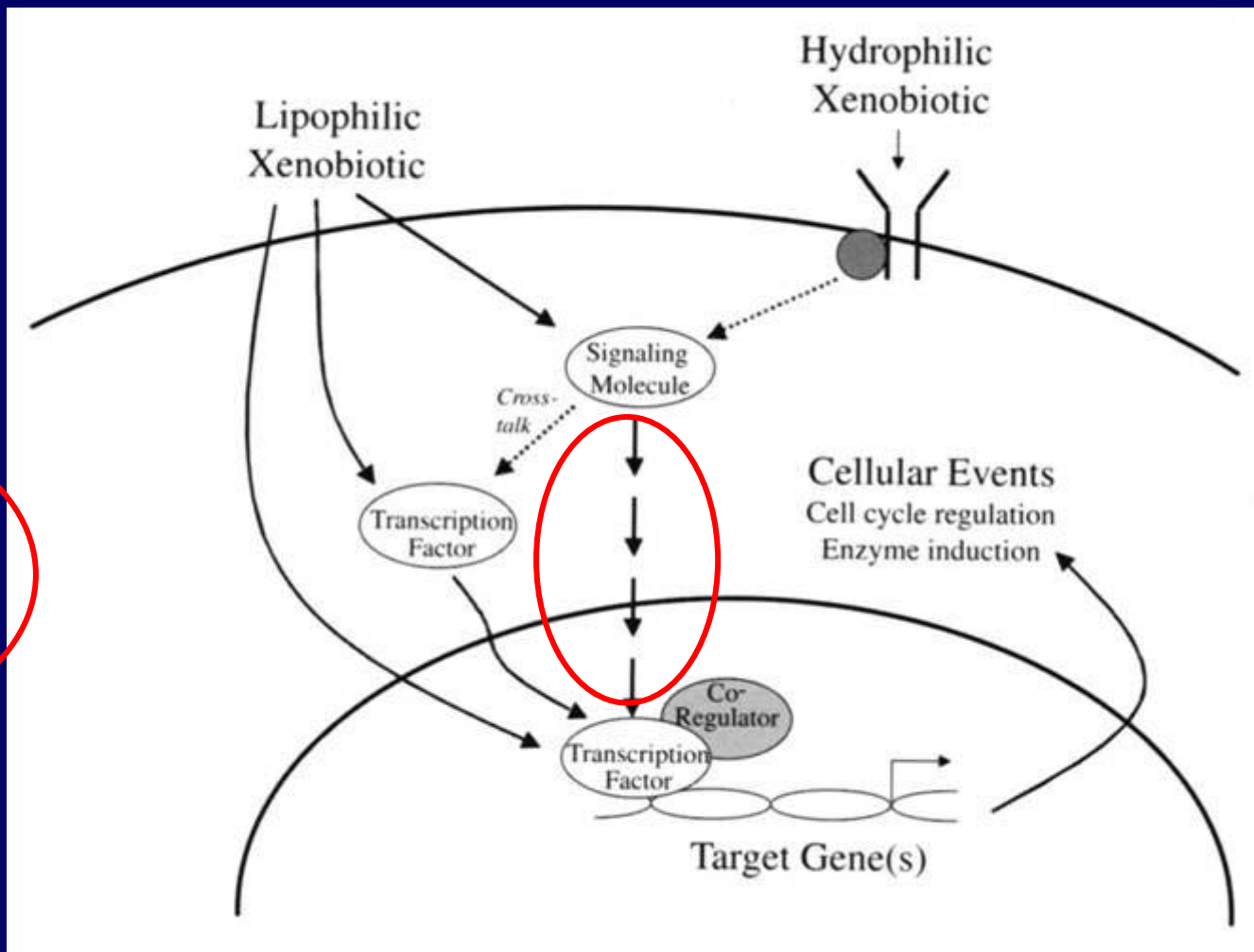
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: struktura domén receptorů



NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

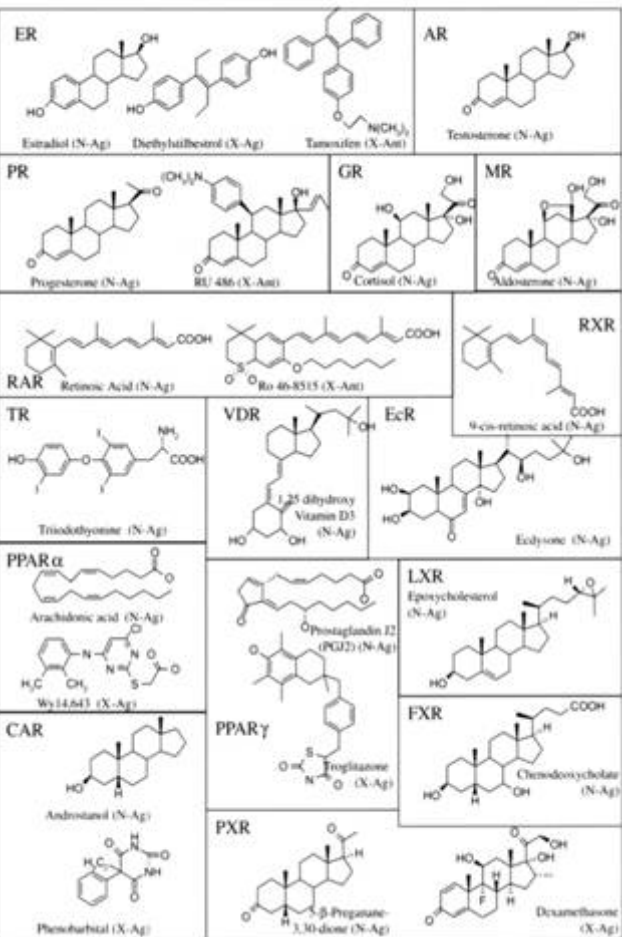


Ligand-independentní
modulace
transkripčního
faktoru (MAPK, PKA,..)



NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Nuclear Hormone Receptors

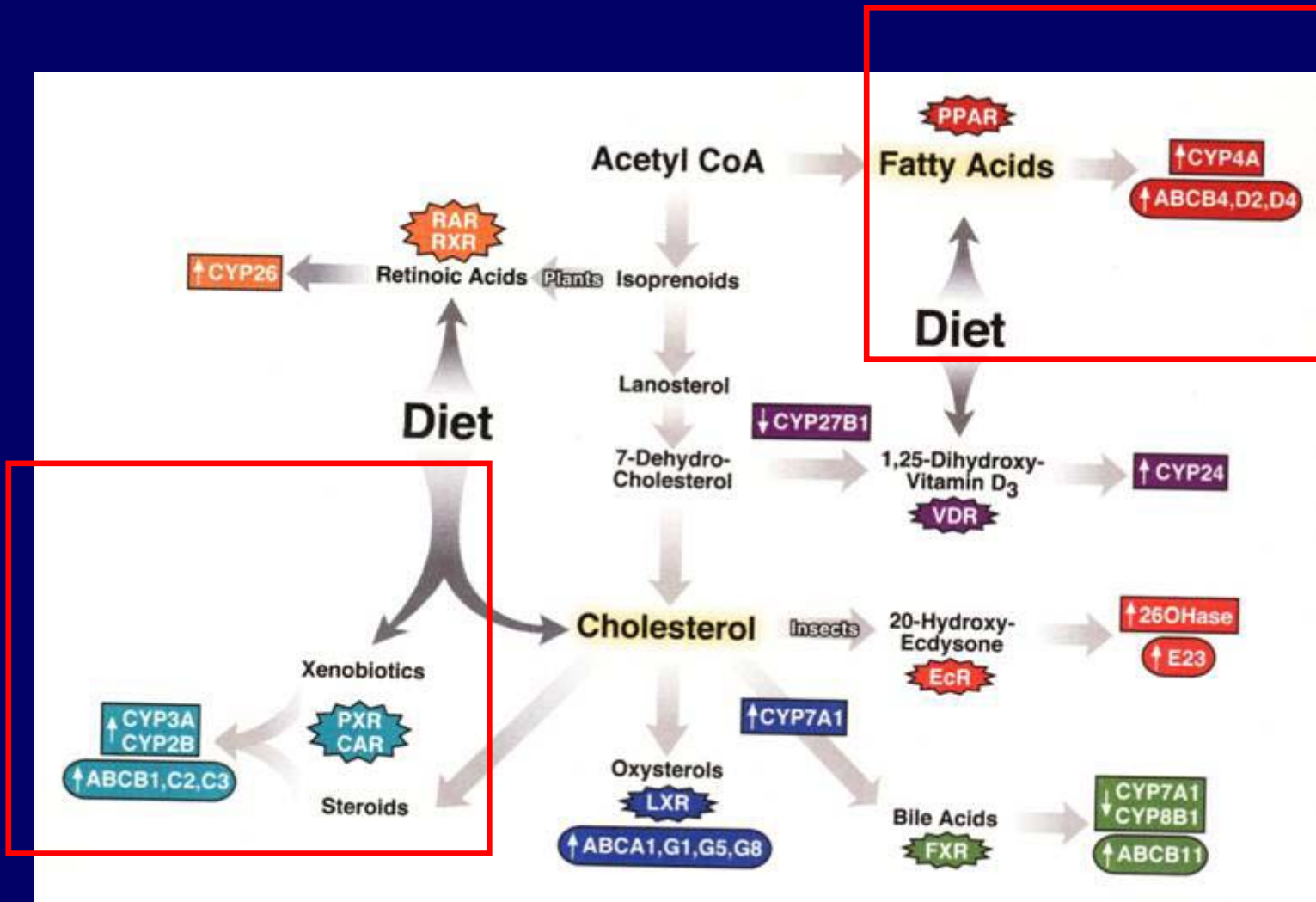


Ligands:	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	<div style="background-color: #0056b3; color: white; padding: 5px;"> ER α, β PR AR GR MR </div>	<div style="background-color: #ff0000; color: white; padding: 5px;"> RXR α, β, γ PPAR α, β, γ LXR α, β FXR PXR/SXR CAR </div>	<div style="background-color: #333; color: white; padding: 5px;"> 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 </div>
	<div style="background-color: #800080; color: white; padding: 5px;"> RAR α, β, γ TR α, β VDR EcR </div>		

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

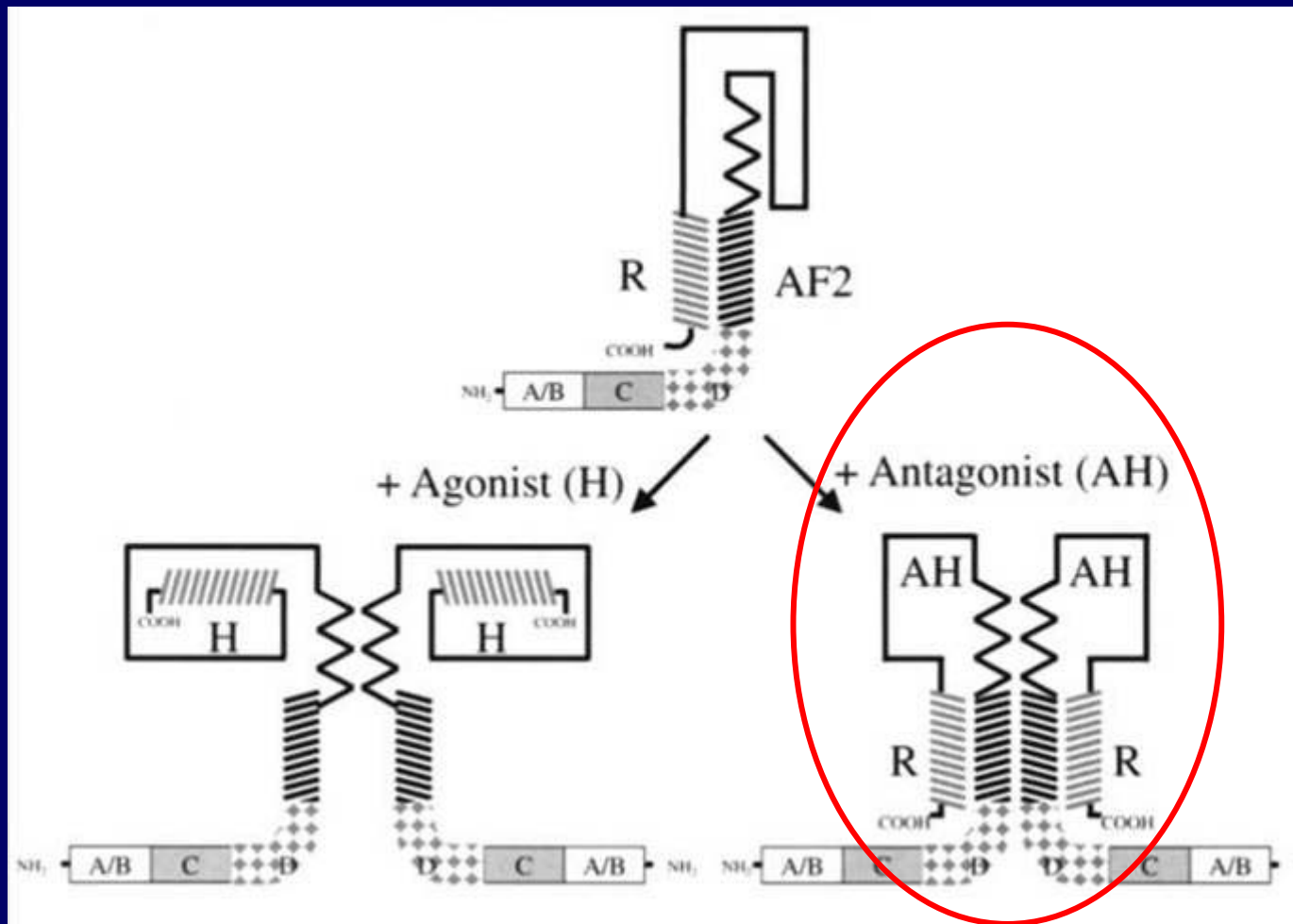
Nuclear receptor	Ligand	CYP enzyme	Cytosolic binding protein	ABC transporter
Retinoid X receptors*	RXR α,β,γ 9- <i>cis</i> Retinoic acid	-	-	-
Peroxisome proliferator-activated receptors	PPAR α Fatty acids Fibrates	↑ CYP4A1 ↑ CYP4A3	↑ L-FABP	↑ ABCD2, ABCD3 ↑ ABCB4
	PPAR δ Fatty acids Carboprostacyclin	(?)	(?)	(?)
	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	↑ CRABP II ↑ CRBP I	(?)
Vitamin D receptor	VDR 1,25(OH) ₂ -vitamin D ₃	↑ CYP24 ↓ CYP27B1	(?)	(?)

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY



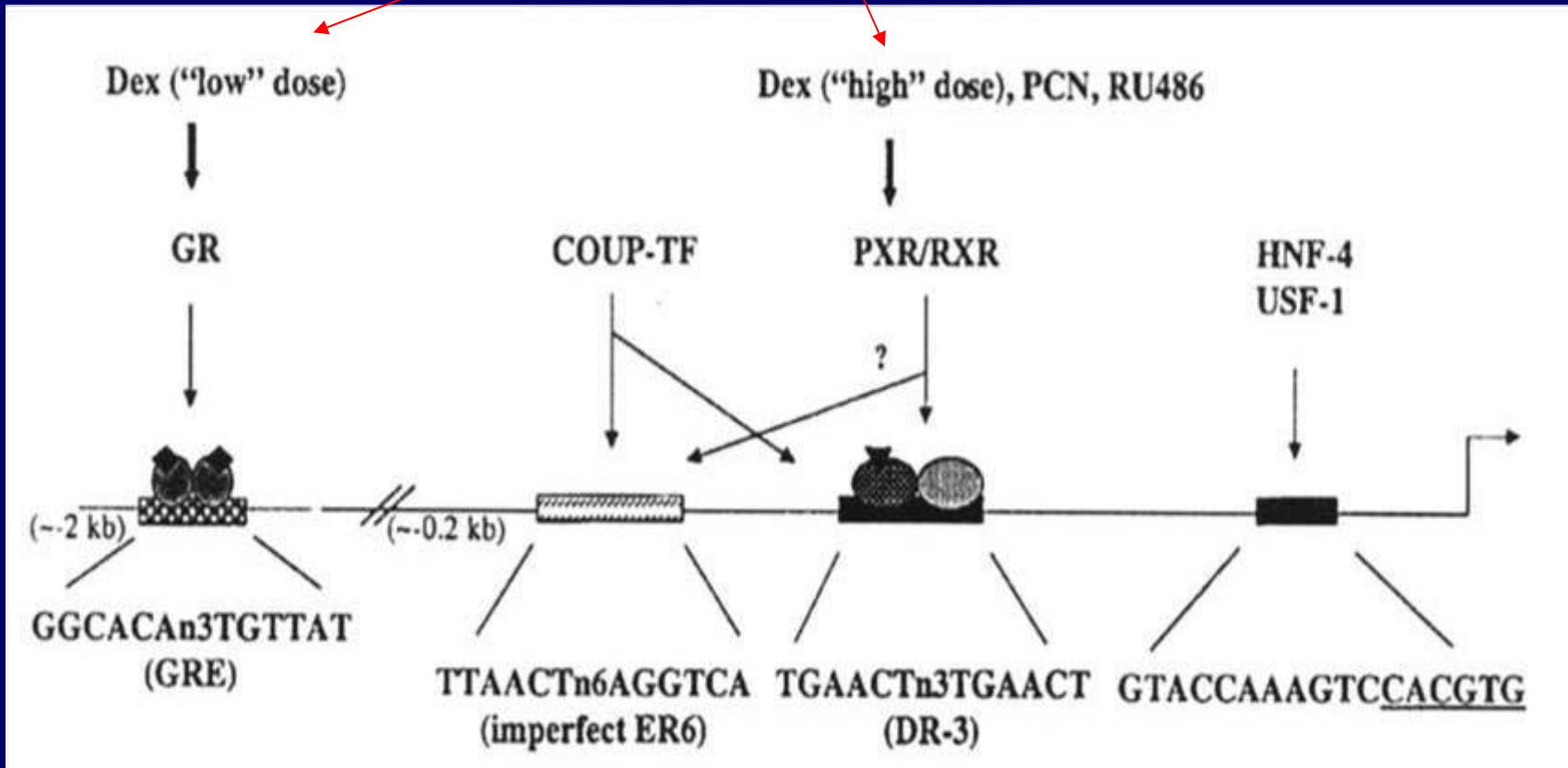
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: vazba antagonistického a agonistického ligandu

Antagonisté:
vazba bez
transaktivace



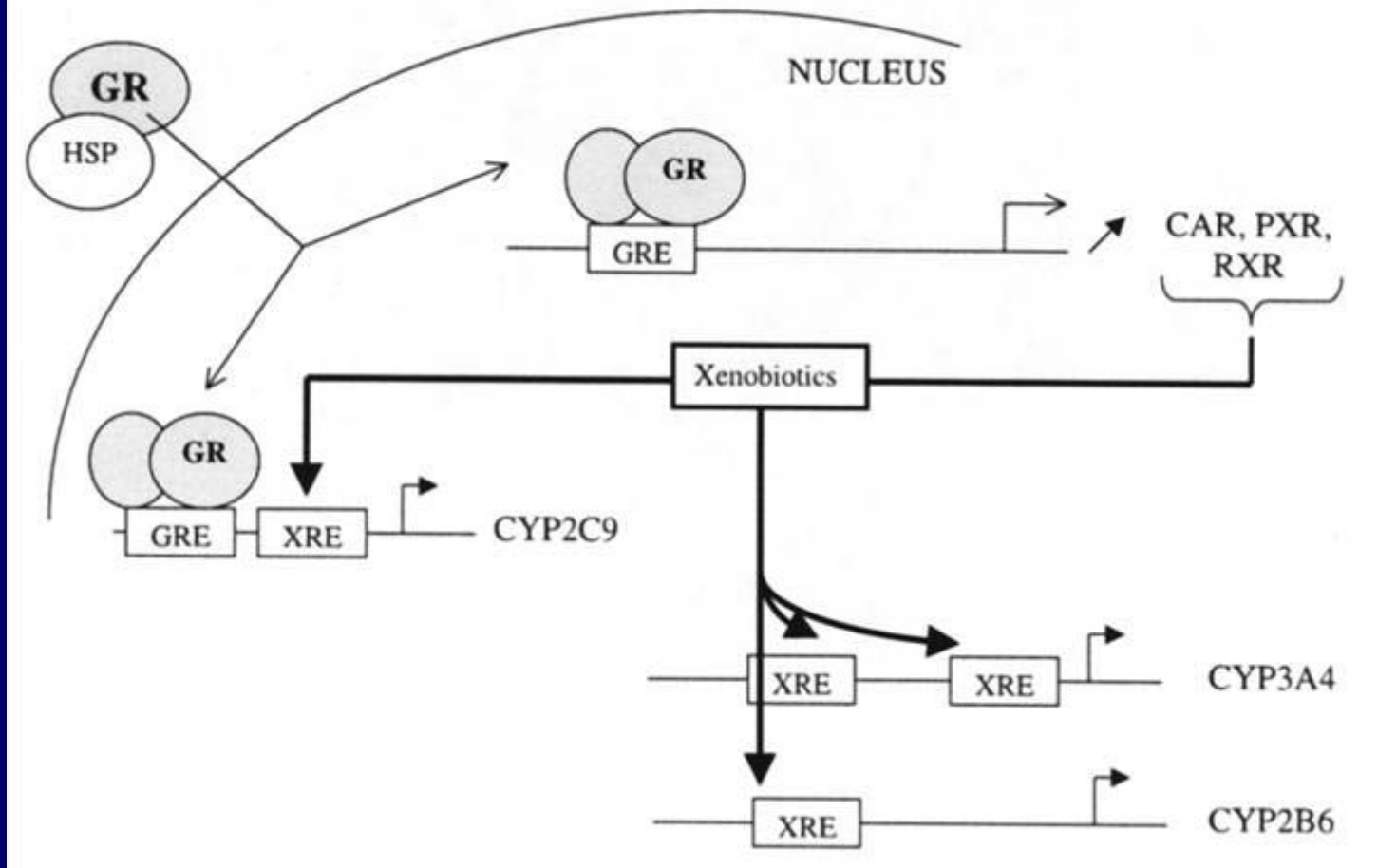
REGULACE GR / PXR / CAR

aktivace nízkou vs. vysokou koncentrací ligandu



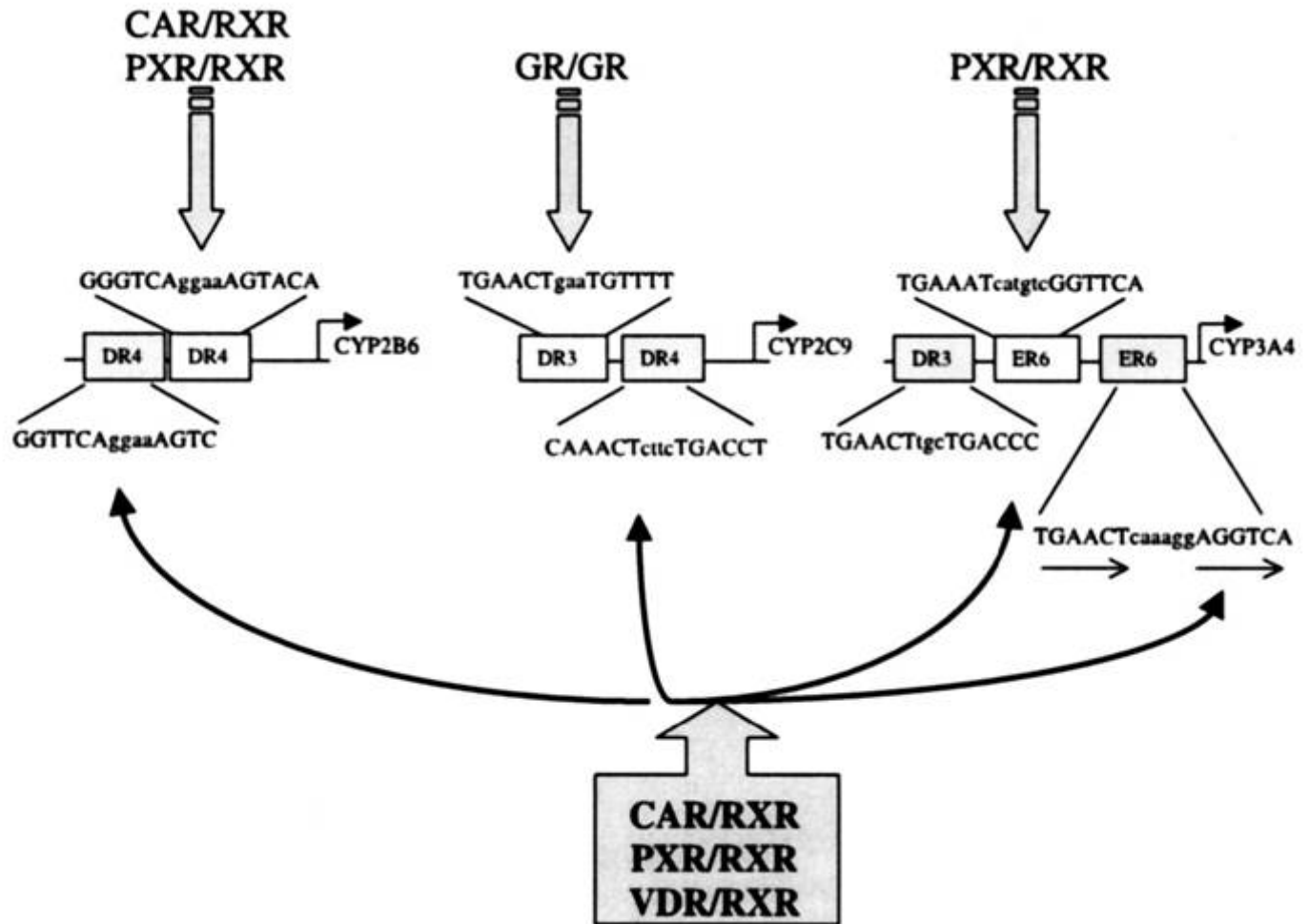
REGULACE GR / PXR / CAR

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



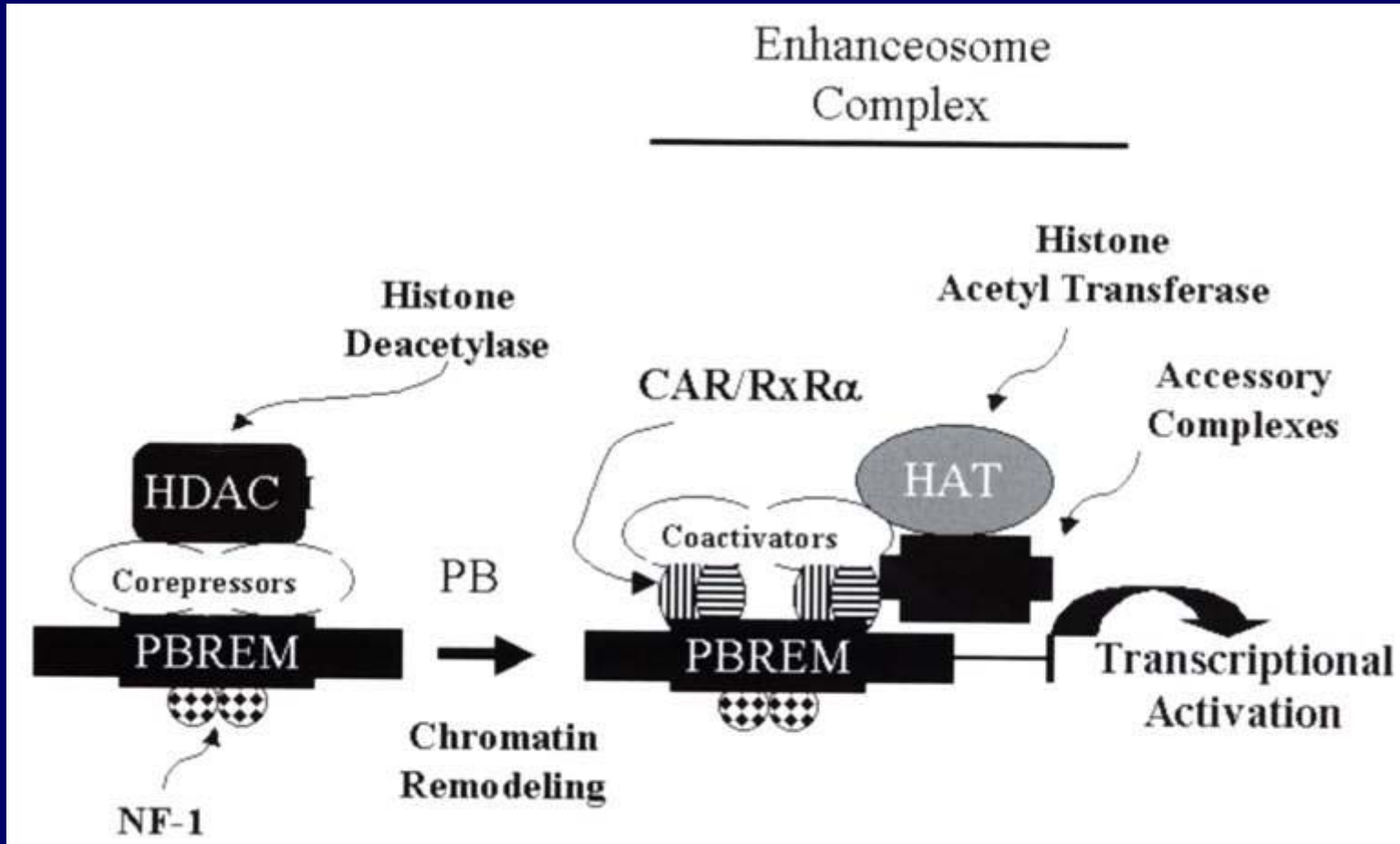
více úrovní
regulace

REGULACE GR / PXR / CAR



REGULACE CAR FENOBARBITALEM

Další faktory
modulují
aktivaci
transkripce

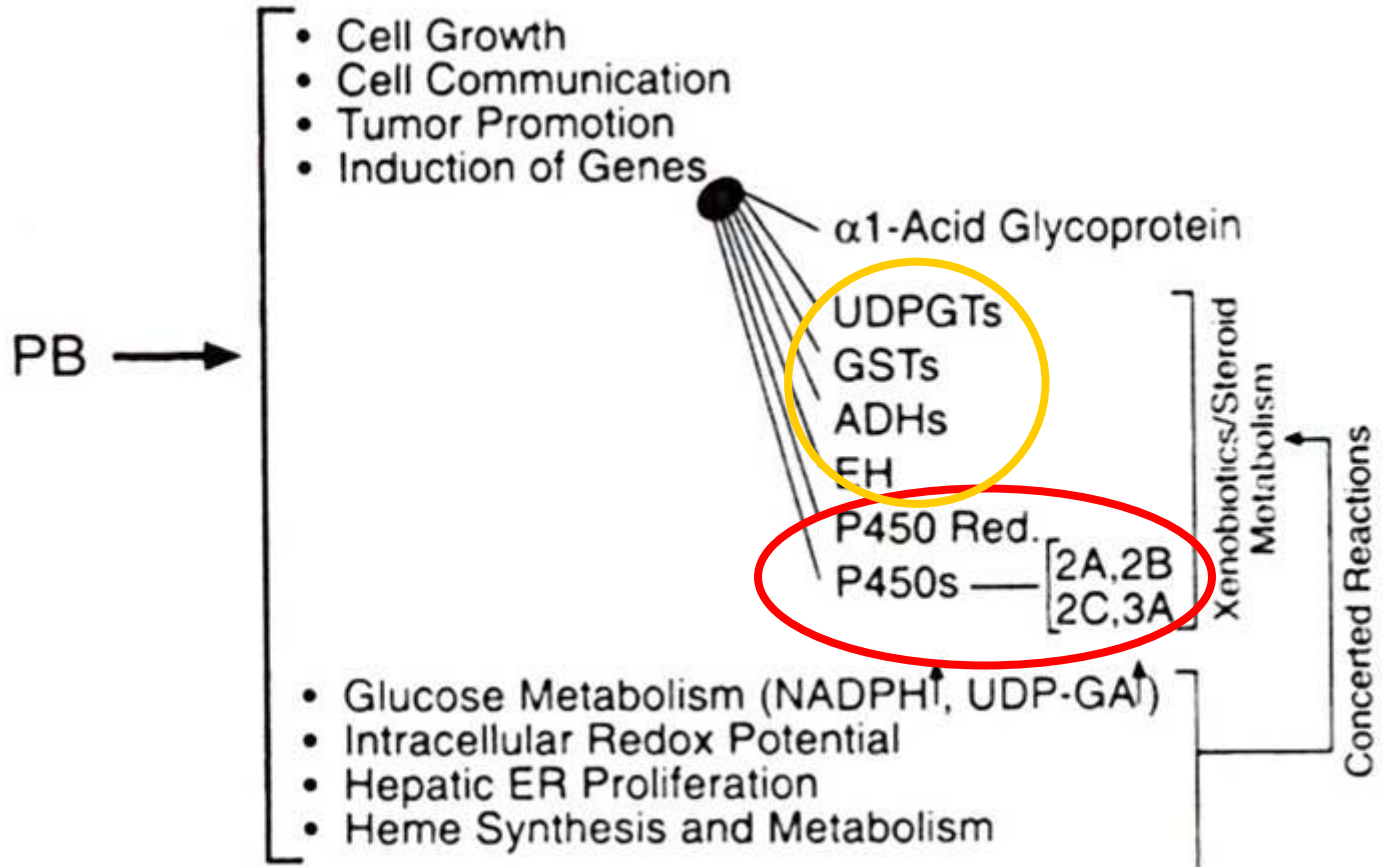


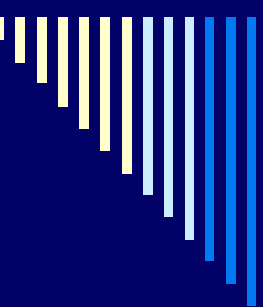
FENOBARBITAL (PB) – AGONISTA CAR A DALŠÍCH PROCESŮ

iotransformace:

enzymy 1. fáze

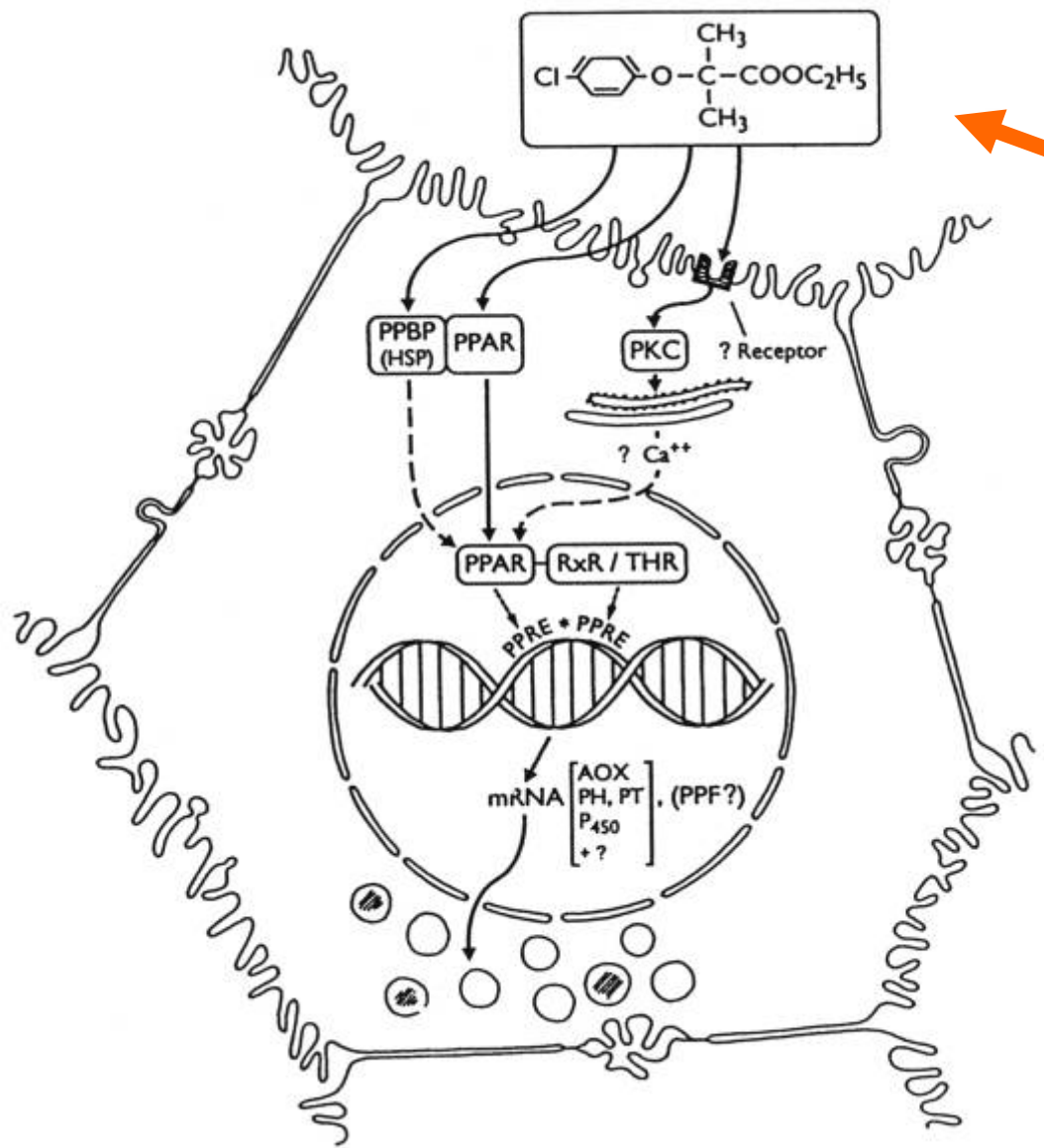
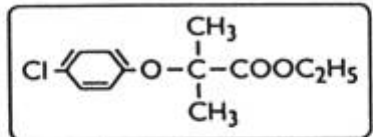
enzymy 2. fáze





PPAR α
Peroxisomal
roliferator-
ctivated
Receptor alpha)
ontroluje expresi
YP4A1 a enzymů
metabolismu
pidů

Peroxisome - proliferator

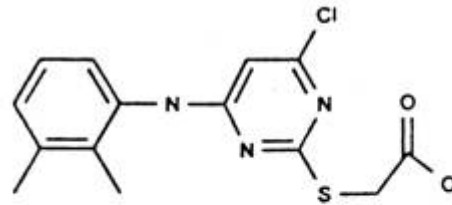


Induktory:
mastné
kyseliny,
hypo-
lipidemika
(fibráty),
environ.
látky
(ftaláty)

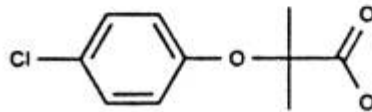


LIGANDY PPAR α

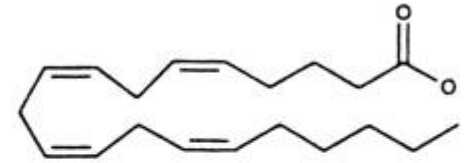
Farmaka
(hypolimidemika)



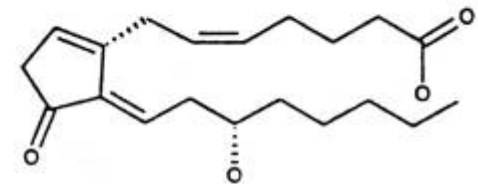
Wy 14,643



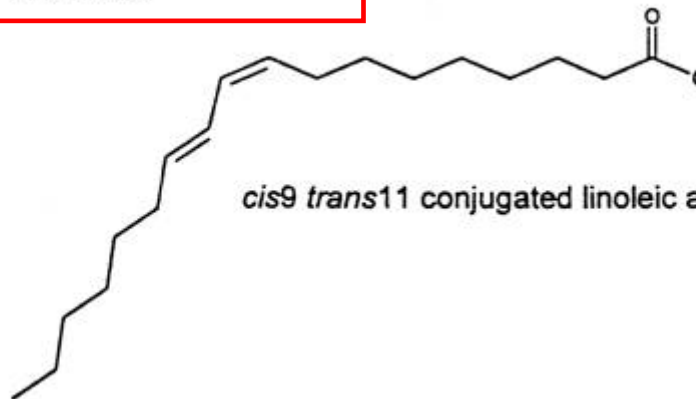
Clofibrate



Arachidonic Acid



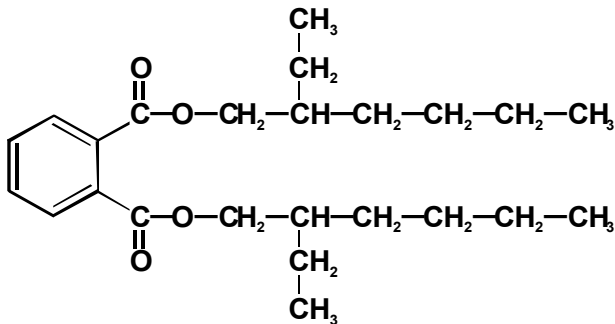
Prostaglandin J2



cis9 trans11 conjugated linoleic acid

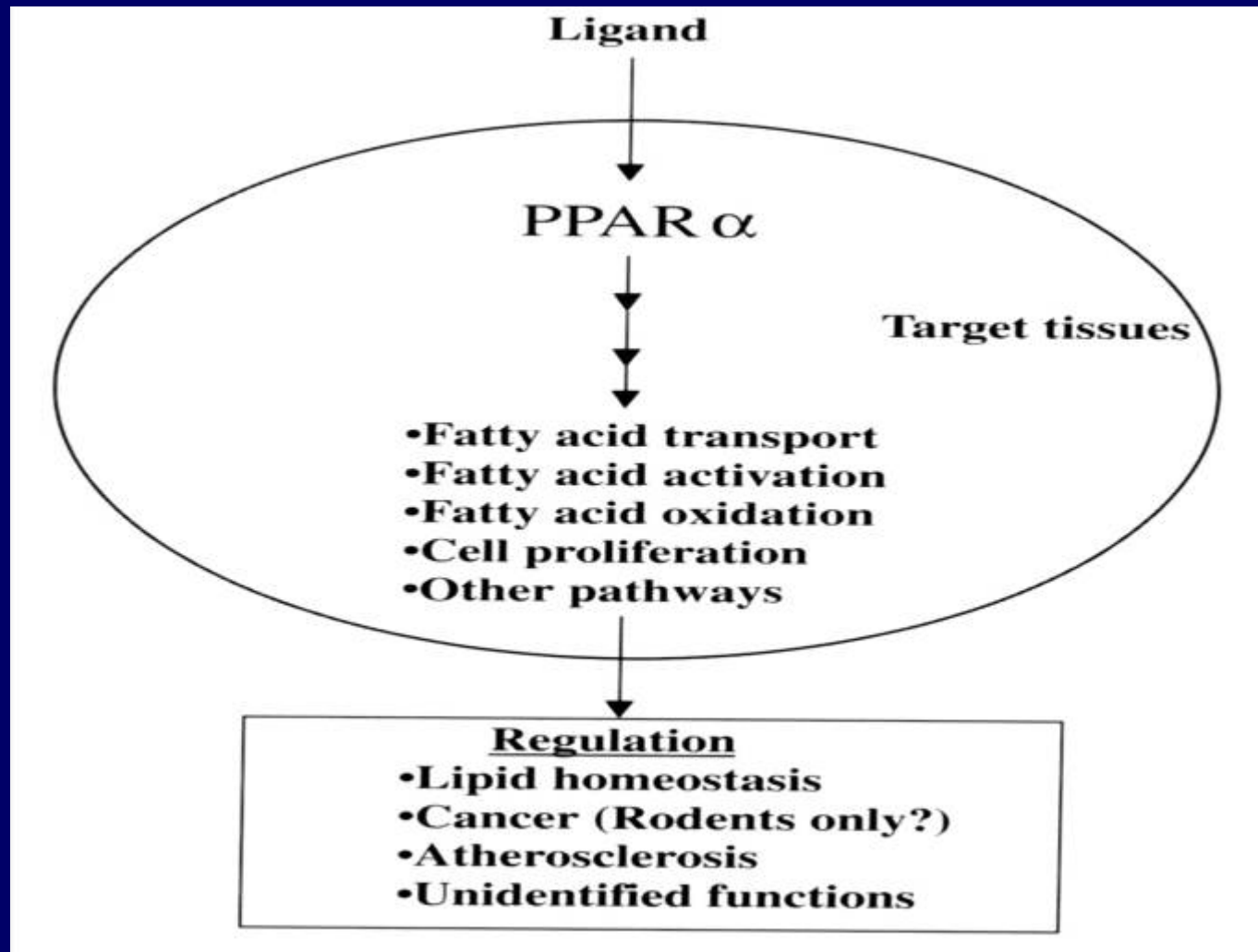
(Endogenní) lipidy

Environmentální
kontaminanty



Di(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)

DŮSLEDKY AKTIVACE PPAR α



erovnoměrná
dukce CYP4A
(redl. produkt: H₂O₂)
dalších enzymů
(apř. CAT)
dependentních
a PPARalfa



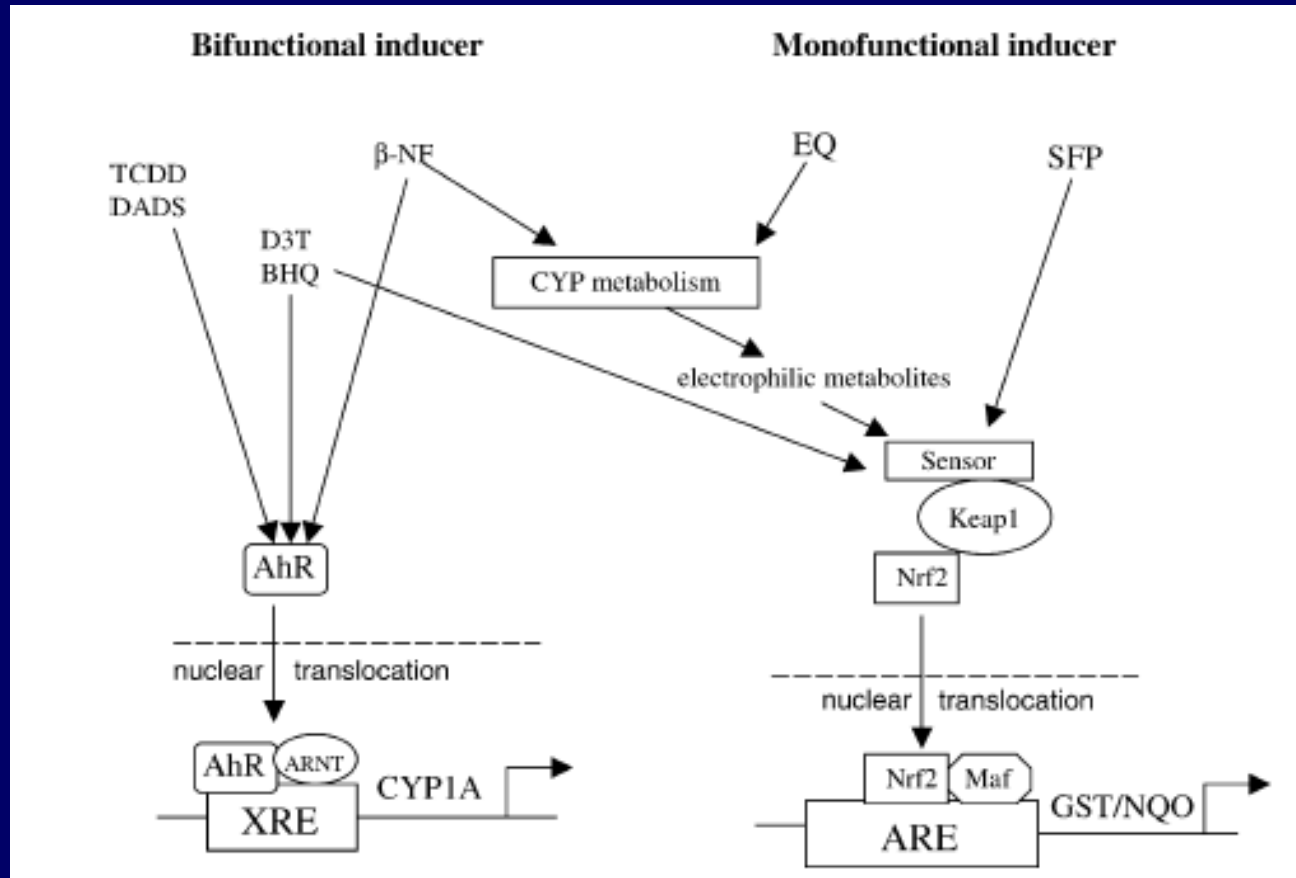
REGULACE DALŠÍCH ENZYMŮ 1.FÁZE BIOTRASFORMACE

KLASICKÝ POHLED NA INDUKCI GENOVÉ EXPRESE KONTROLOVANOU XRE A ARE

ARE = antioxidant response element

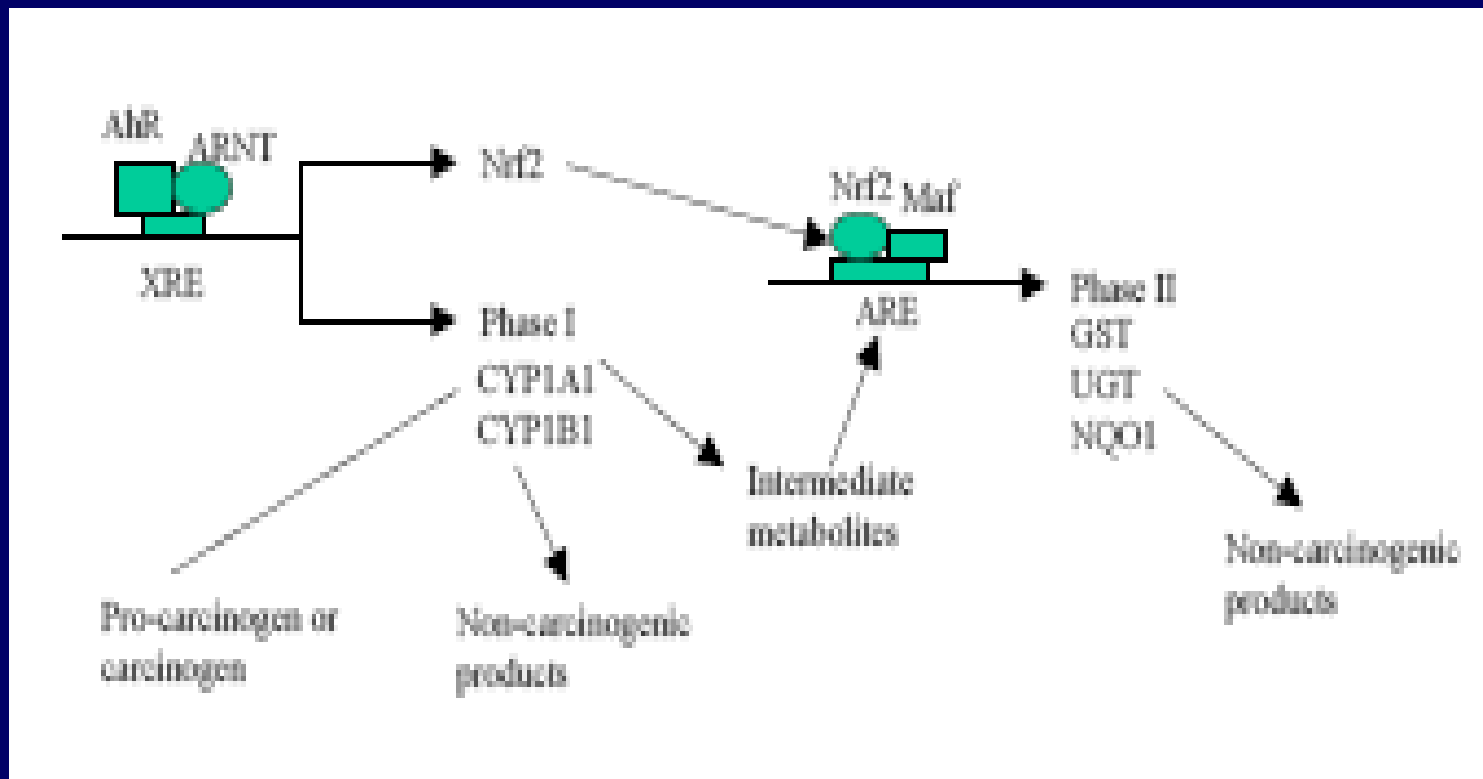
bifunkční induktory xenobiotika induk. AhR a Nrf2

GST = enzym 2. fáze biotransformace

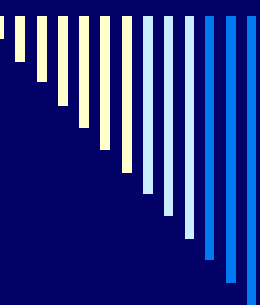


Miao et al., Biochem. Pharmacol., 2004

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



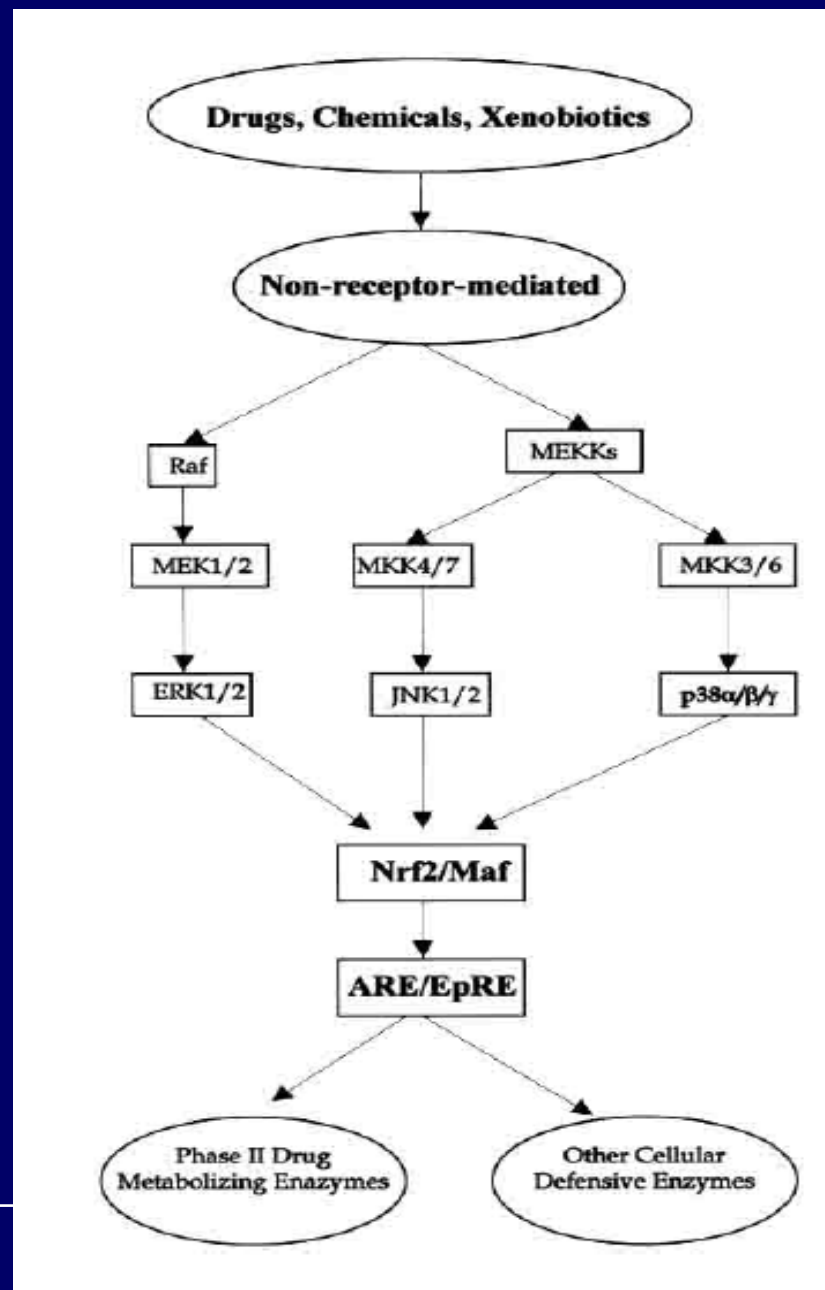
Miao et al., JBC, 2005



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 antioxidantních enzymů;

ARE/EpRE = antioxidantní/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)

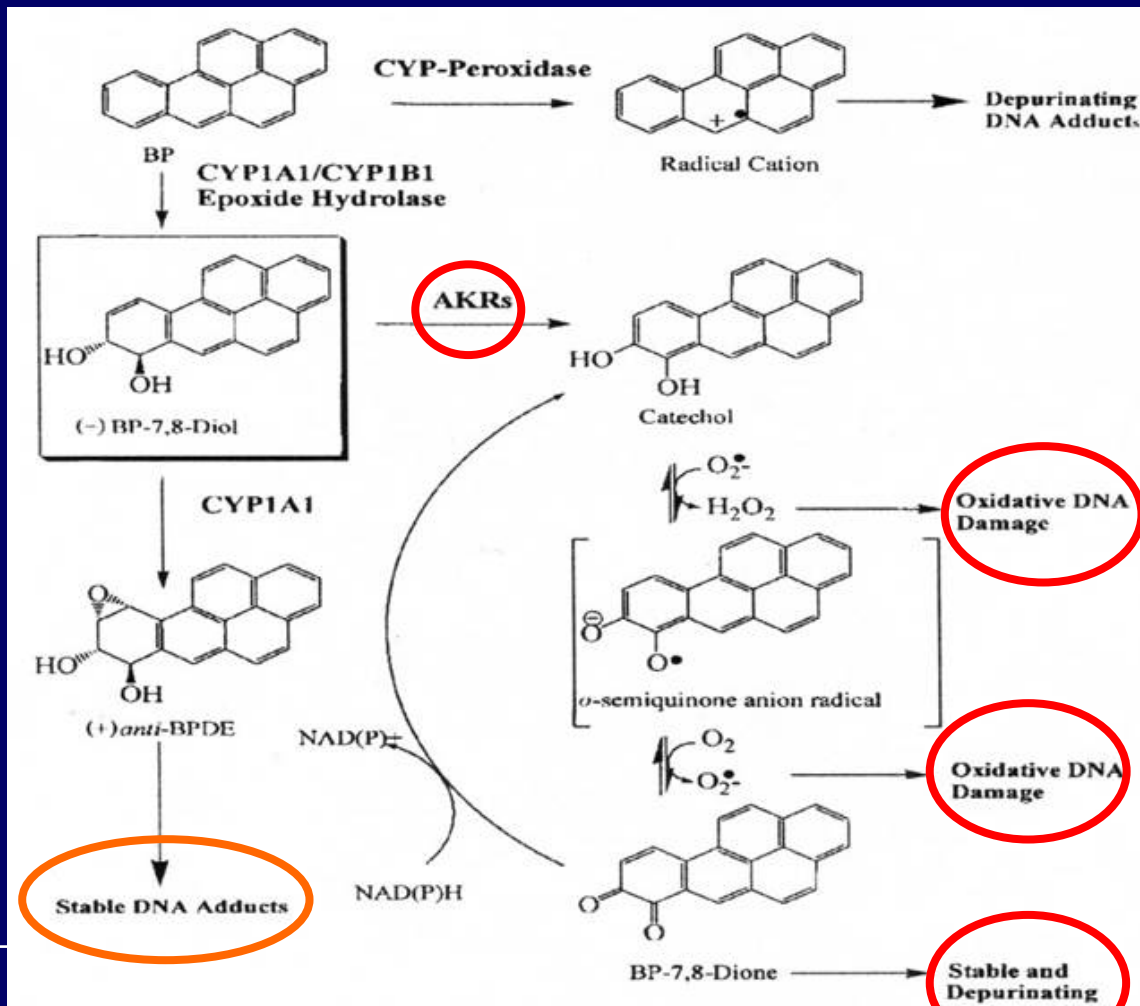
AKR1C1-1C4 (20α -, 3α -, $3\alpha/17\alpha$ -, 3α -HSD)

AKR1D1 (5β -reduktáza)



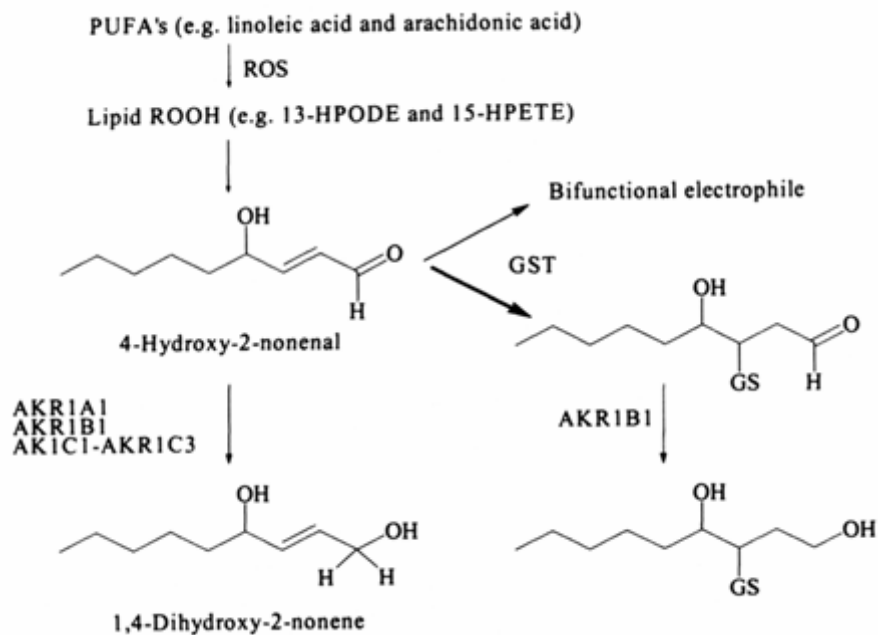
1. fáze biotransformace PAH: účast CYP1A1/1A2/1B1 (monooxygenace), EH (hydroláza) a AKR (reduktáza)

Detoxikace
versus
bioaktivace



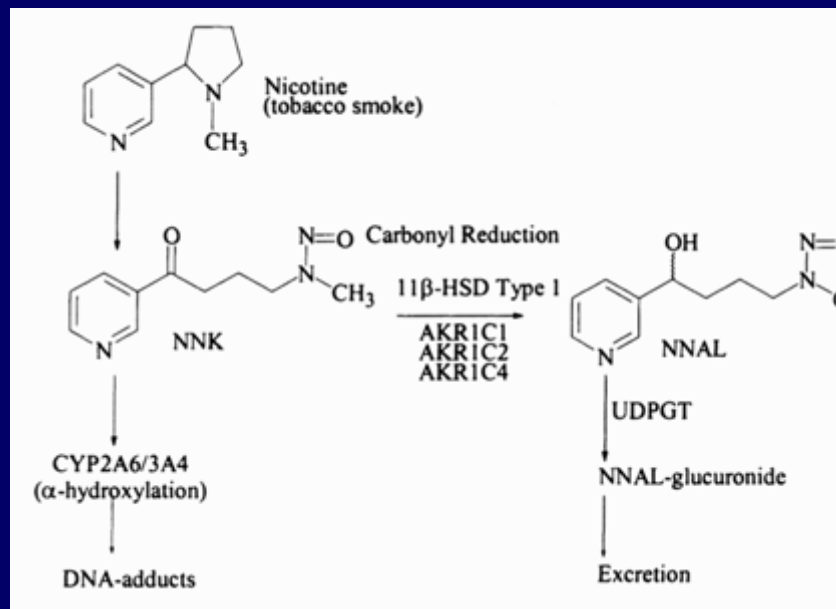
katecholy =
- metabolismy PAH
- podobně
metabolity
steroidů (E2)

ALDOKETOREDUKTÁZY

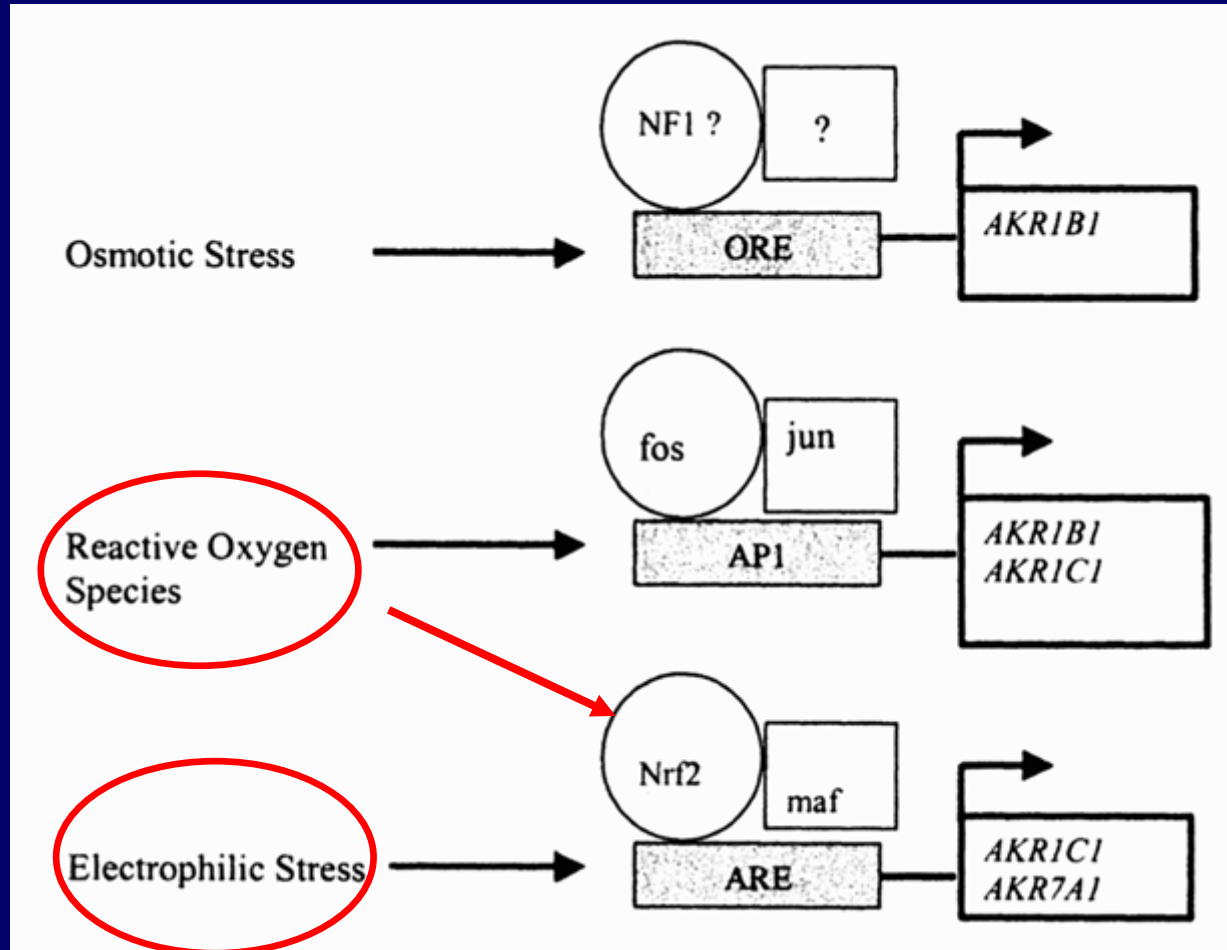


Detoxikace NNK

Biotransformace aldehydů
lipidní peroxidace



REGULACE ALDOKETOREDUKTÁZ





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

