

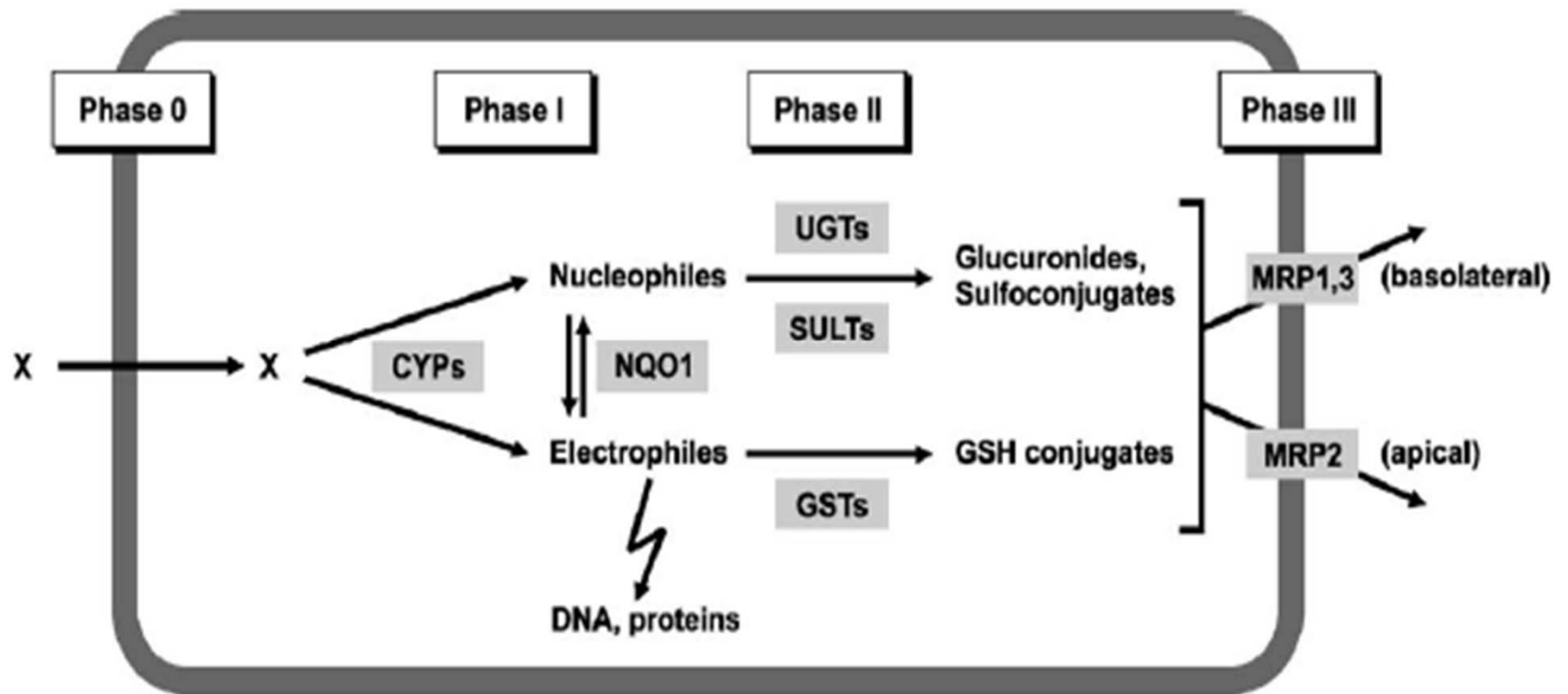
**„Biotransformace“ = metabolismus
cizorodých látek a regulace hladin
biotransformačních enzymů**



ENZYMY METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK

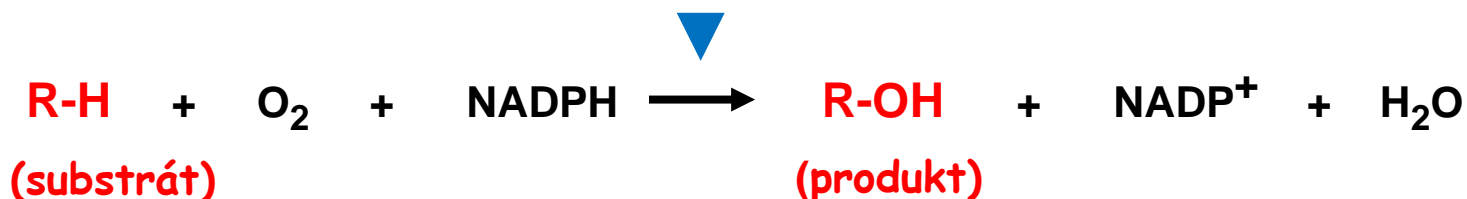
- Enzymy 1. fáze biotransformace xenobiotik, steroidních hormonů a mastných kyselin - monooxygenázy (CYP, AKR, FMO), reduktázy (AKR, NQO), hydrolázy (esterázy, epoxidhydrolázy); další reakce: hydratace, isomerace.
- 2. fáze biotransformace - transferázy (GST, UDPGT, SULF, acetylázy aj.); antioxidantní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

BIOTRANSFORMACE CIZORODÝCH LÁTEK A STEROIDŮ, EIKOSANOIDŮ AJ. ENDOGENNÍCH LÁTEK



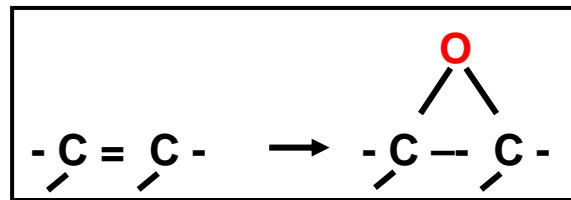
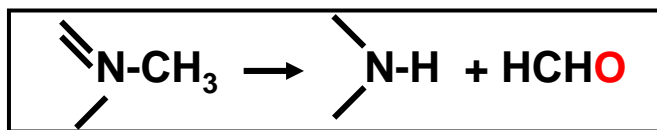
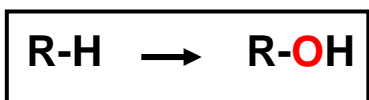
1. FÁZE BIOTRANSFORMACE: monooxygenázové reakce

CYP enzymy

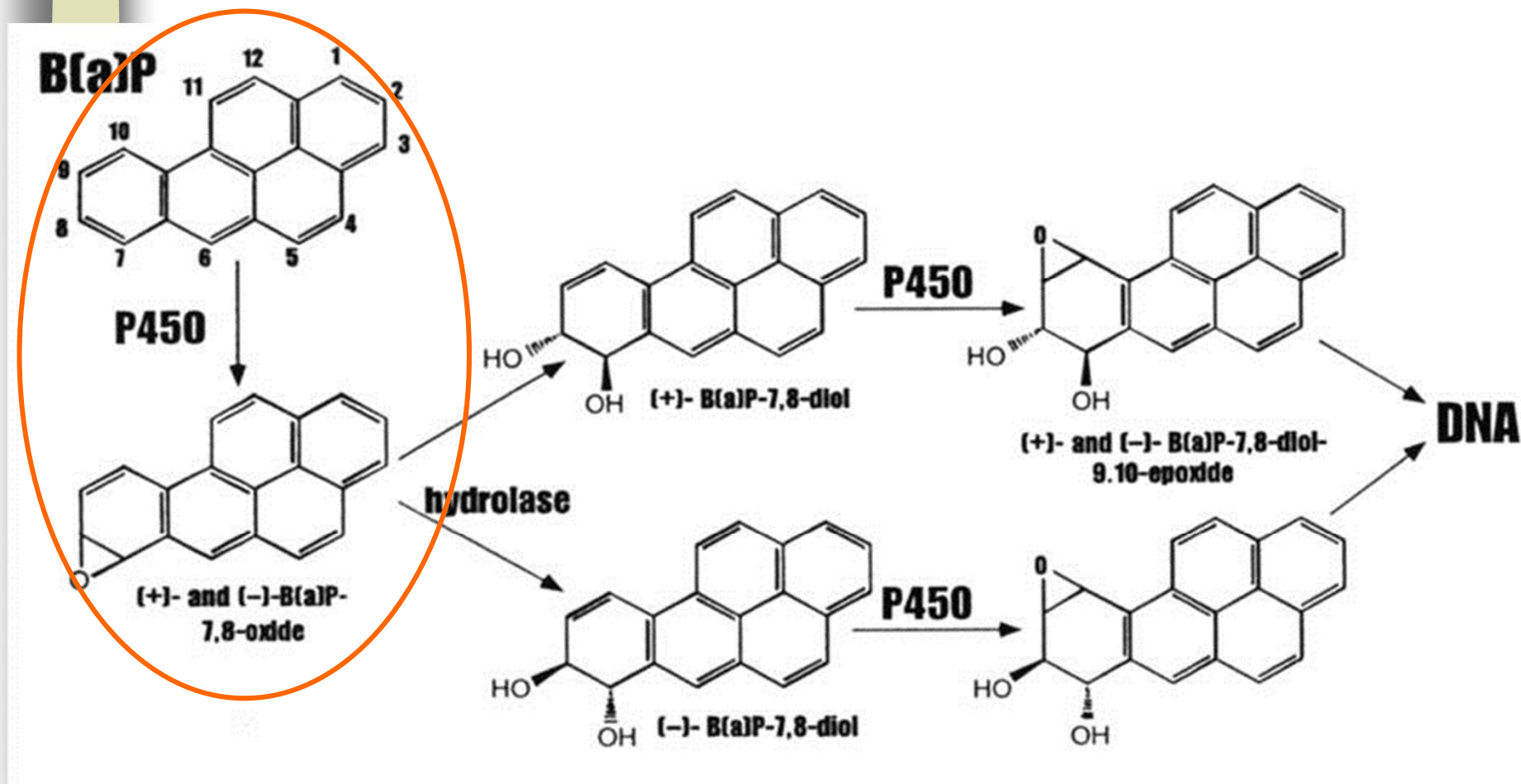


Funkce cytochromů P450 (CYP):

- 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





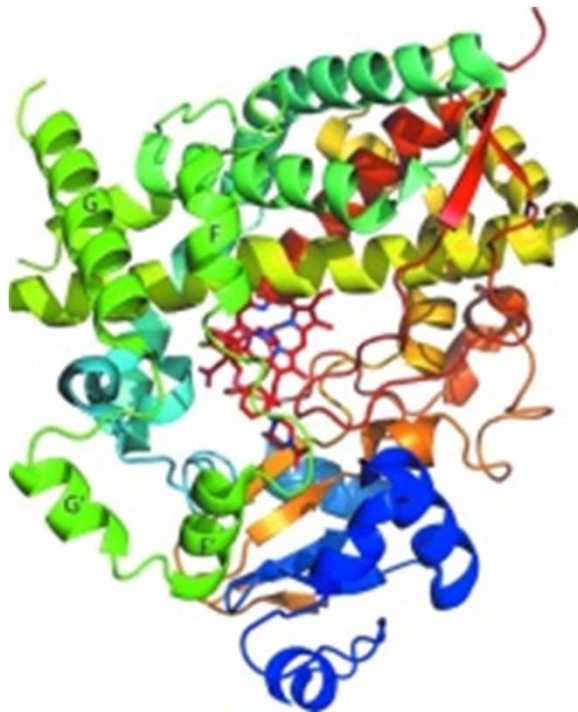
Seznam nejvýznamnějších cytochromů P450, které jsou zodpovědné za biotransformaci cizorodých látek:

- ☛ 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 epoxigenázy) a některá xenobiotika.

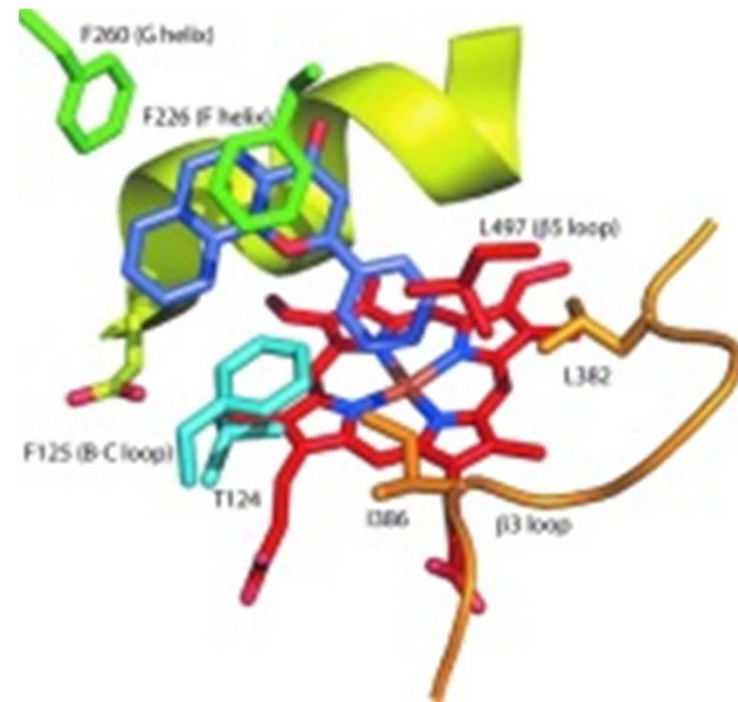
Další desítky CYP enzymů jsou zapojeny do biosyntézy a metabolismu endogenních látek, např. CYP7A (hydroxylace cholesterolu), CYP17 (hydroxylace steroidů), CYP19 (aromatáza - přeměna androgenů na estrogeny).

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 inhibitorem



Aktivní místo CYP1A2 s navázaným β -naftoflavonem (modrá barva)

CYKLUS CYTOCHROMU P450: AKTIVACE KYSLÍKU A MONOOXYGENACE

Přenos elektronů:

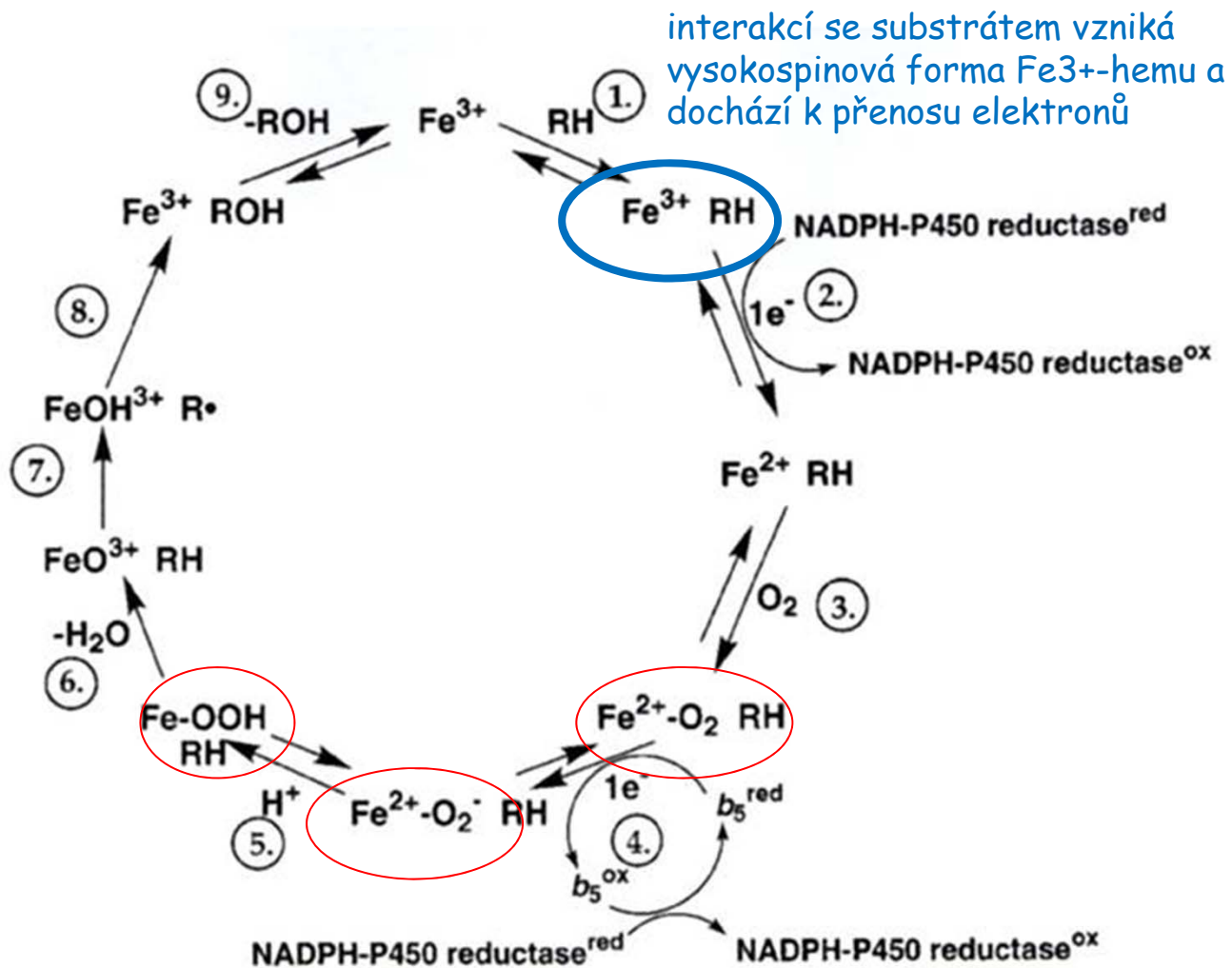
NADPH

↓
NADPH:P450 oxido-
reduktáza

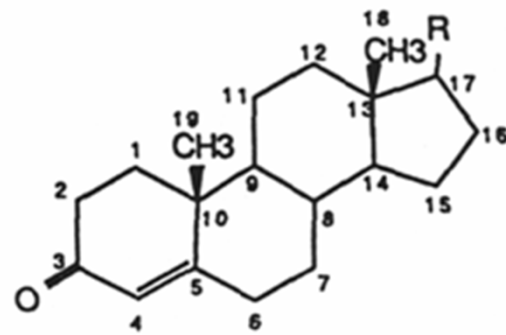
↓
cytochrom P450

(substrát RH,
produkt ROH,
produkce ROS)

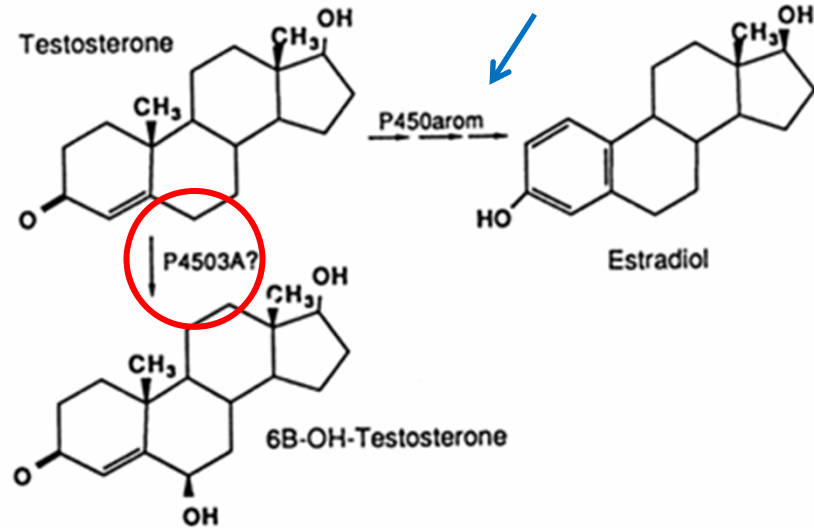
Aktivace kyslíku:
ROS = vedlejší
produkty



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

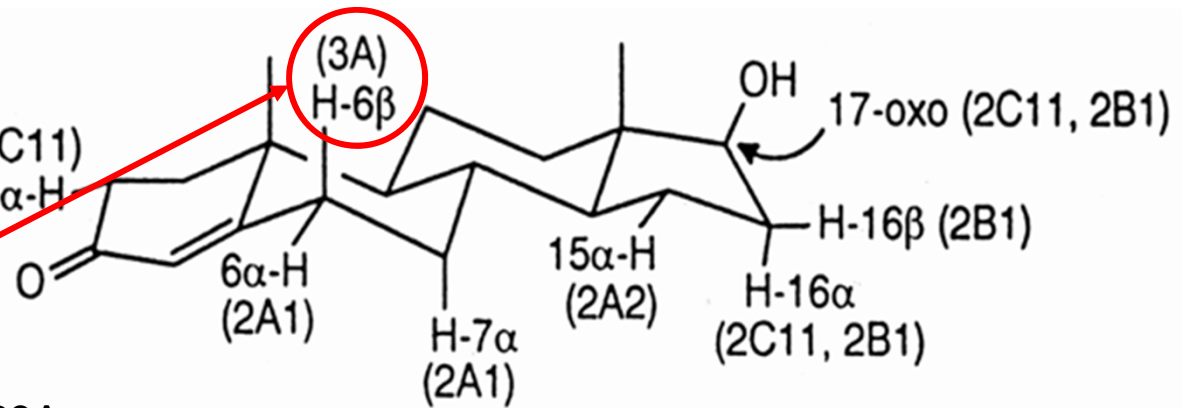


Steroids
(testosterone, R = -OH
androstenedione, R = =O
progesterone, R = -COCH3
(4-Pregnene-3,20-dione))

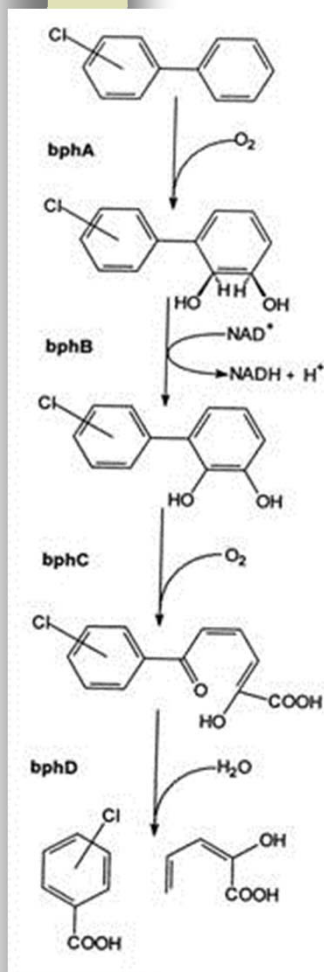


Hydroxylace steroidů
v různých pozicích
(v závorkách isoformy
CYP enzymů)

6β-hydroxylace =
specifická reakce CYP3A



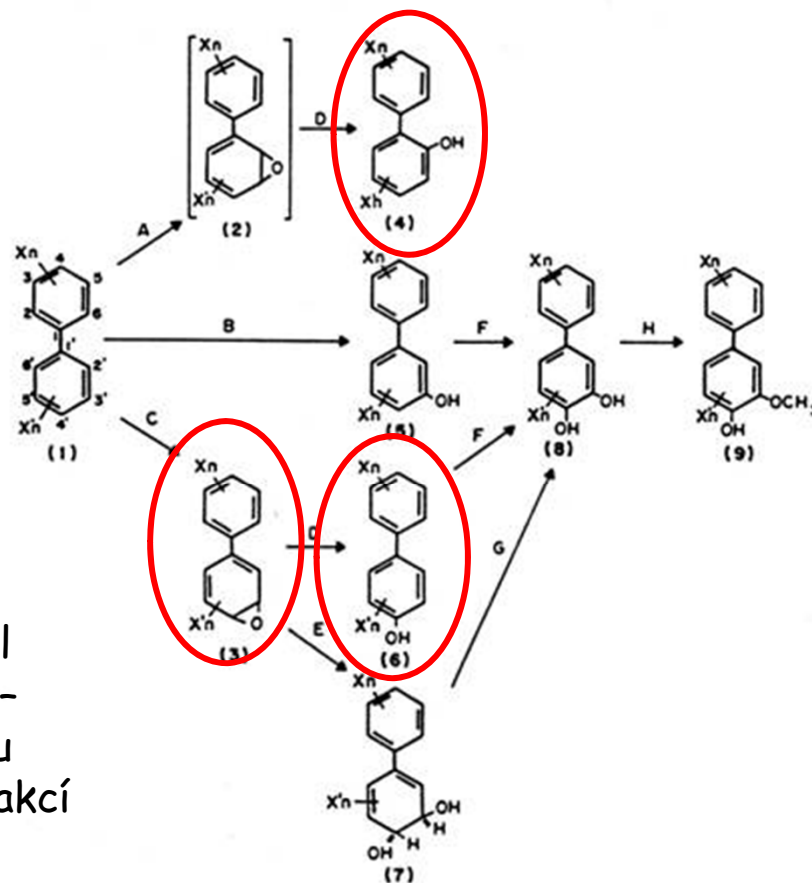
METABOLISMUS POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) - příklad 1. fáze metabolismu persistentních organických sloučenin



Mikrobiální degradace včetně arom. jádra

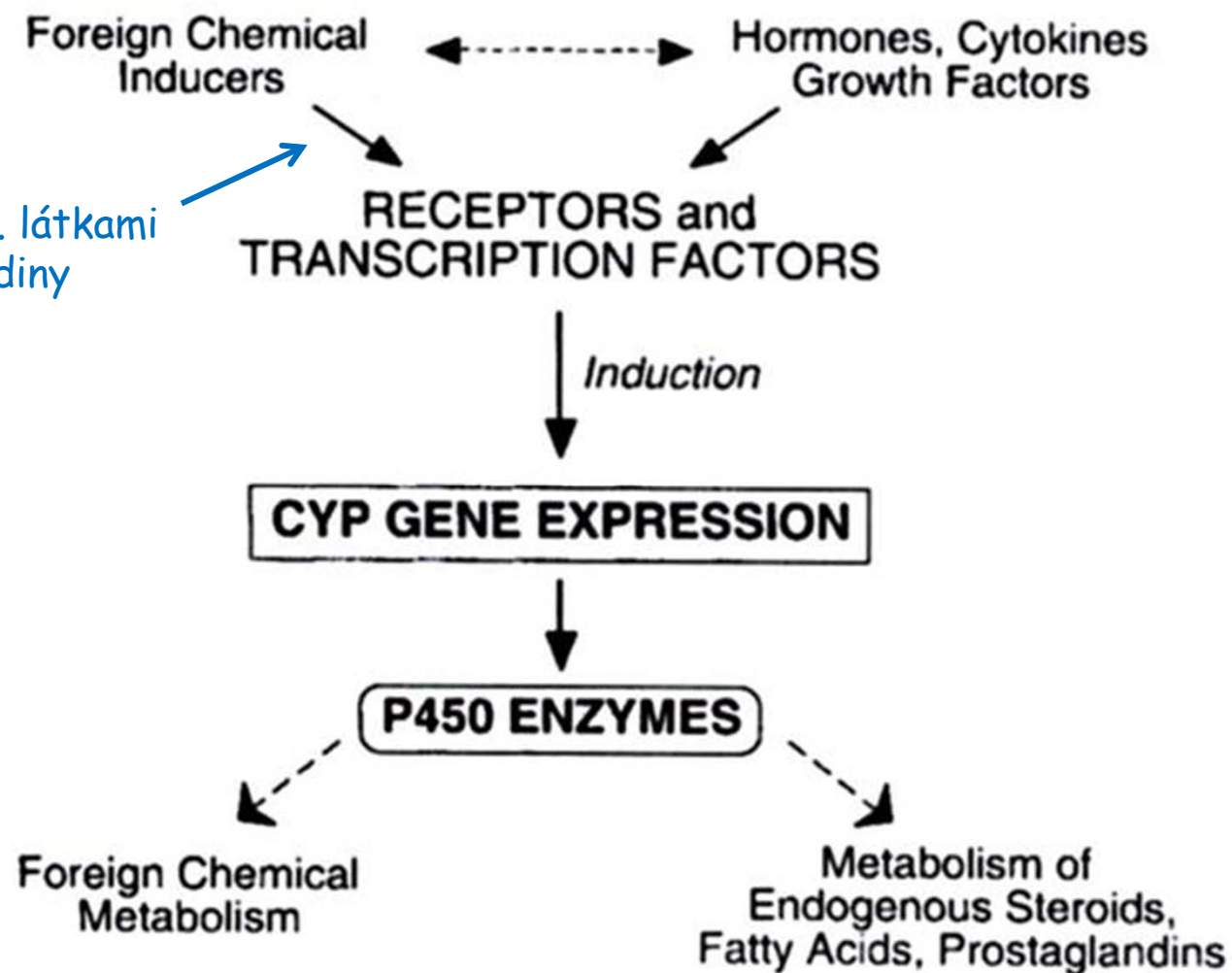
Metabolismus u vyšších živočichů: oxidativní metab. (hl. cesty A-D, C)

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



REGULACE CYPs: nukleární a cytosolové receptory kontrolují expresi CYP proteinů

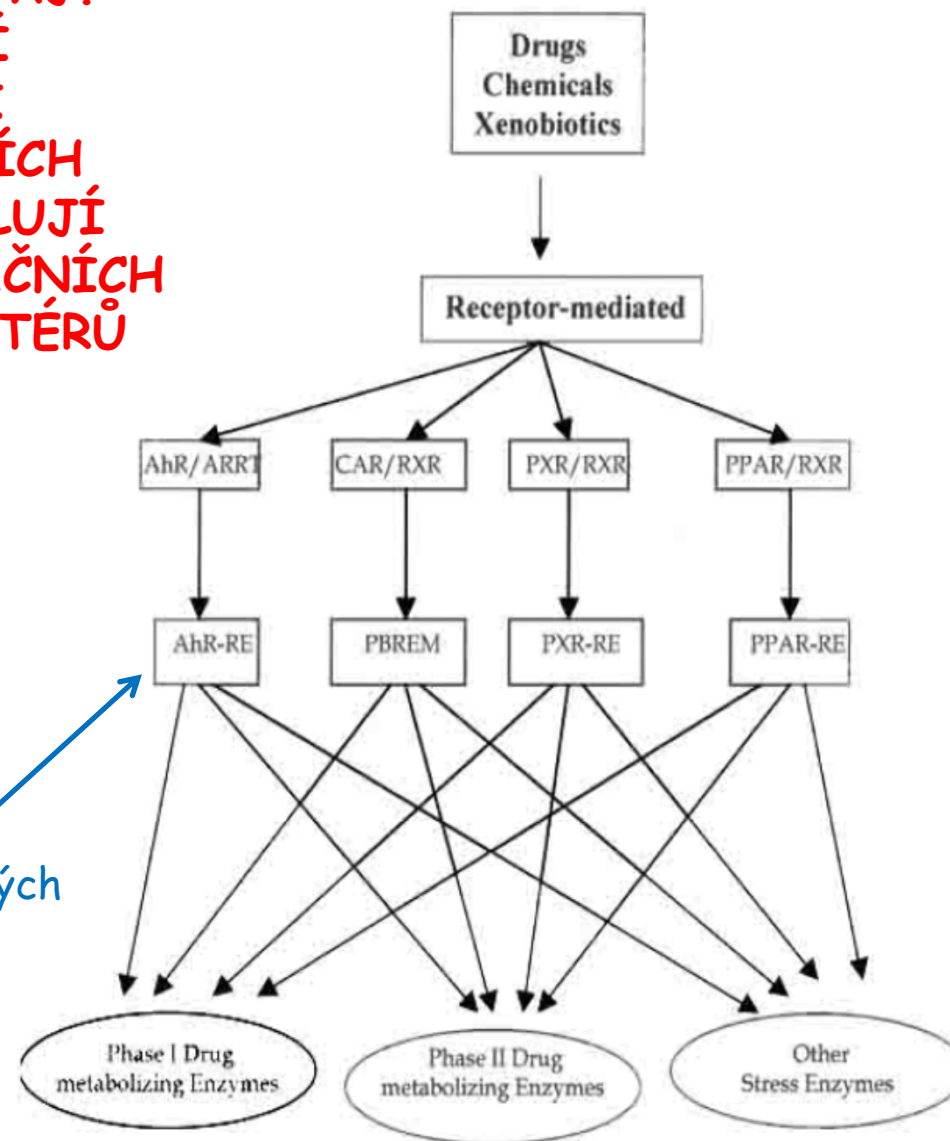
expozice ciz. látkami indukuje hladiny CYP enzymů



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
EXPRESE 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

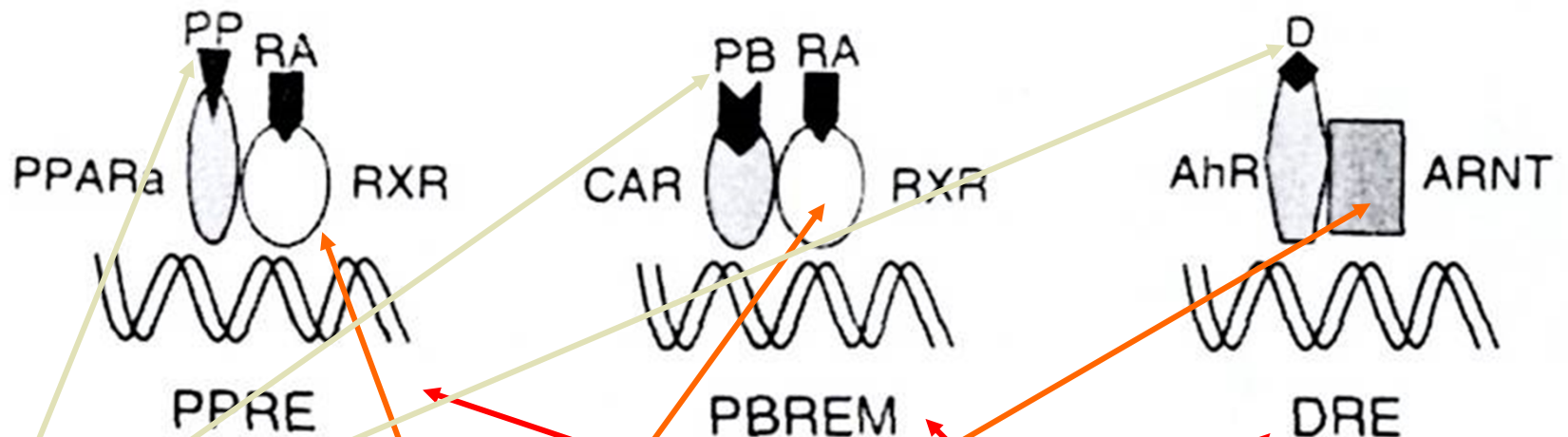
nukleární receptory

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

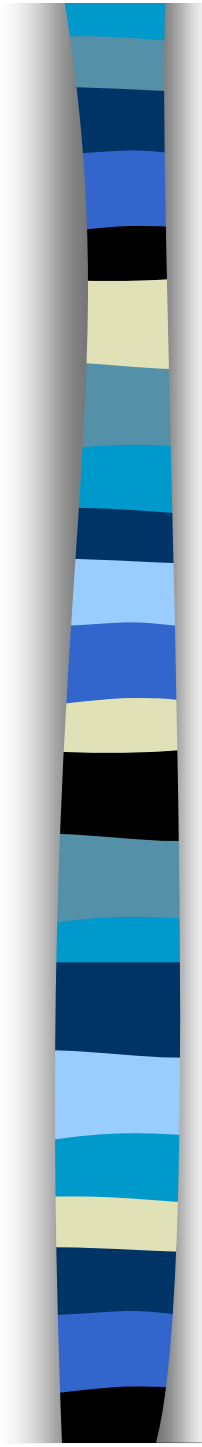
Cizorodé nebo
endogenní látky,
které indukují
hladiny CYP
enzymů

CYP Induction Mediated by Nuclear Receptors

P450 inducing agents	Prototypic responsive rat liver CYPs	Receptor
Polycyclic aromatic hydrocarbons	1A1, 1A2, 1B1	Ah receptor ^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

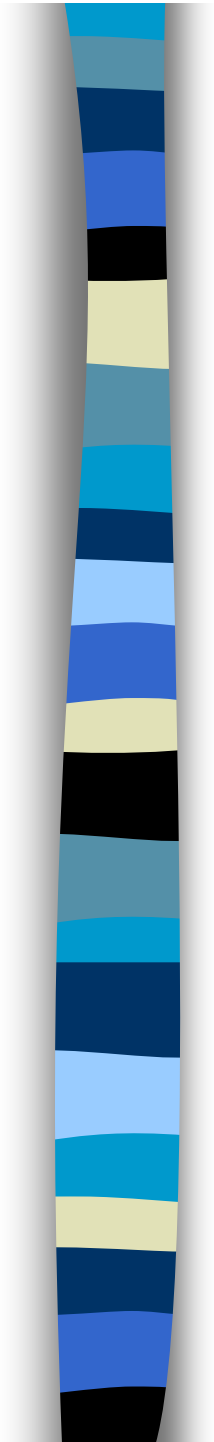
^a PAS transcription family member, not a nuclear receptor.

^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 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

AhR (Aryl hydrocarbon receptor)

AhR kontroluje genovou expresi

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

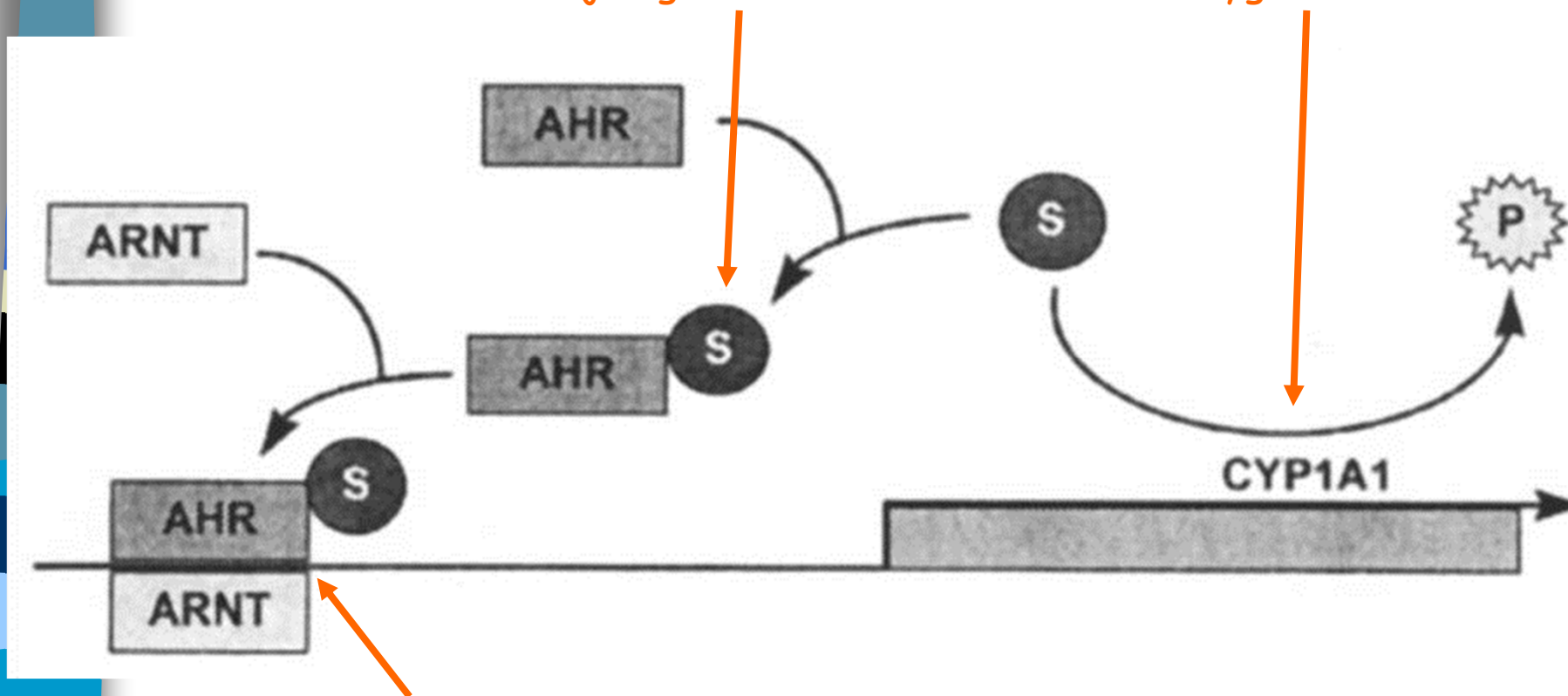
regulátorů bun. cyklu / přímé interakce (ER?,...)
apoptózy (p27, Bax,...)

další funkce AhR-dependentní genové exprese

AKTIVACE Ah RECEPTORU A INDUKCE CYP1A1 SUBSTRÁTEM CYP1A

substrát S je ligandem AhR

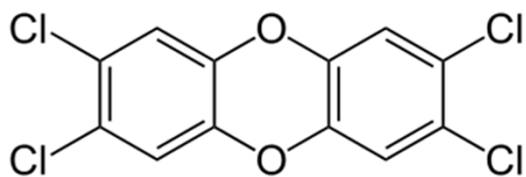
monooxygenázová reakce



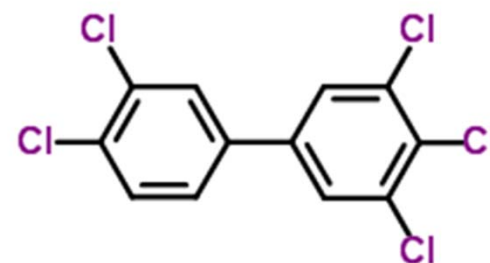
AhR/ARNT nasedá na XRE = DRE = xenobiotic (dioxin) response element

LIGANDY / INDUKTORY AhR

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

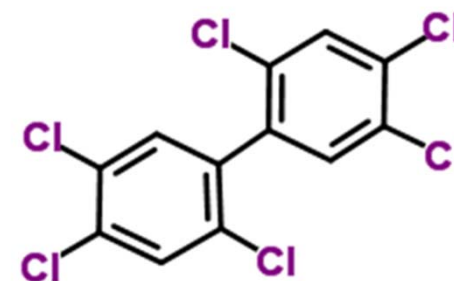


**TCDD = nejsilnější agonista AhR
= modelový dioxinový toxikant**



**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**

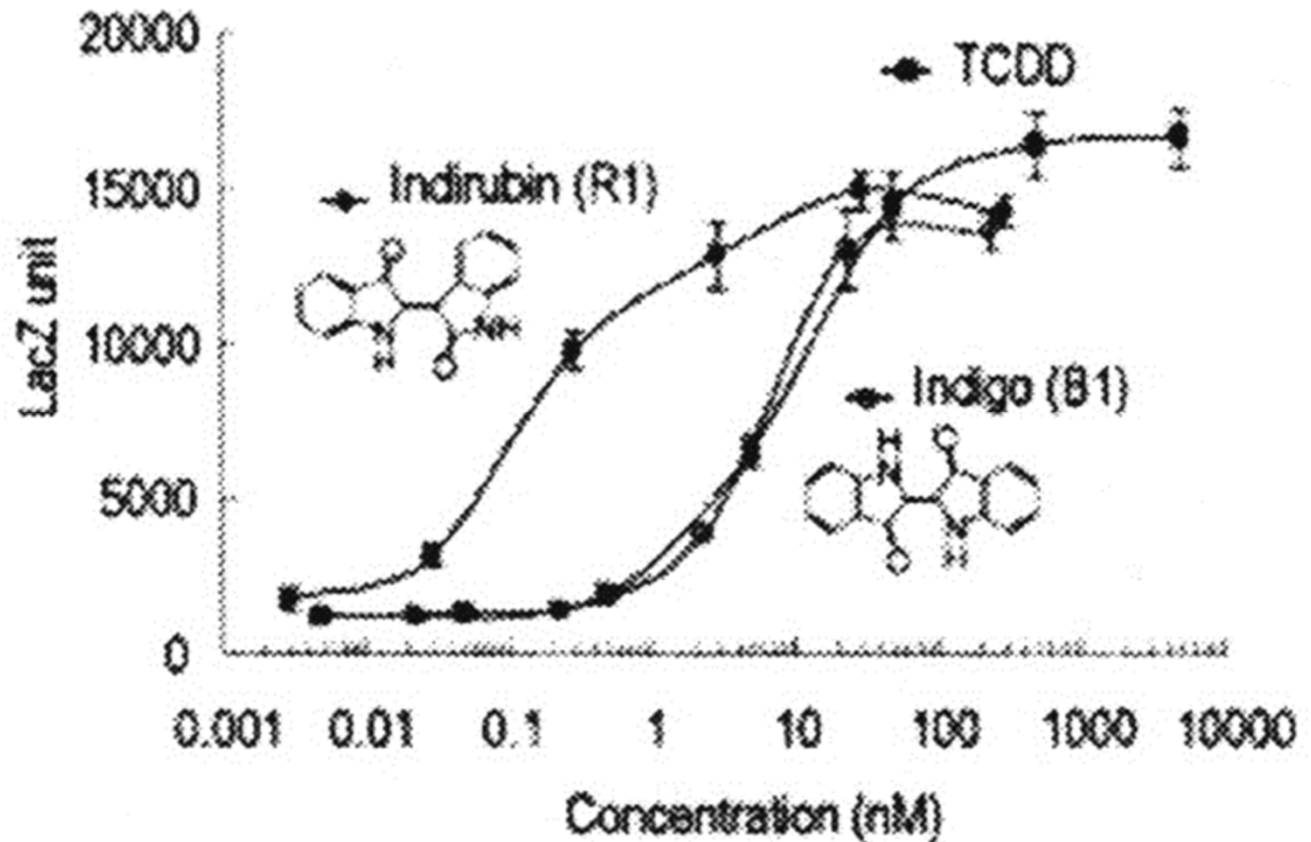


ENDOGENNÍ AGONISTÉ AhR

dosud nejsou přesně určeny (deriváty tryptofanu ?)

Fyziologické funkce AhR:

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



AKTIVACE Ah RECEPTORU / AhR-DEPENDENTNÍ GENOVÁ EXPRESE

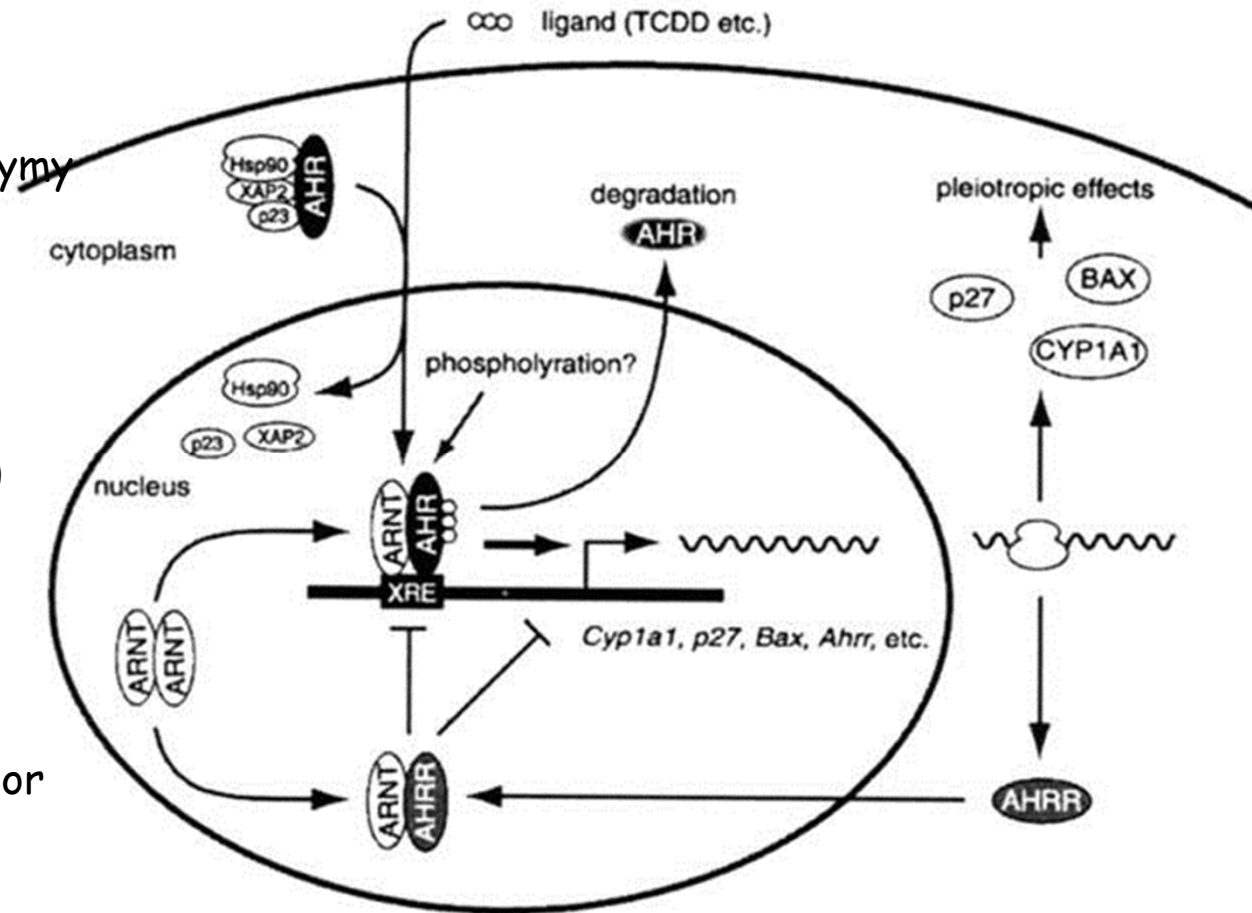
Produkty genové exprese:

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

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

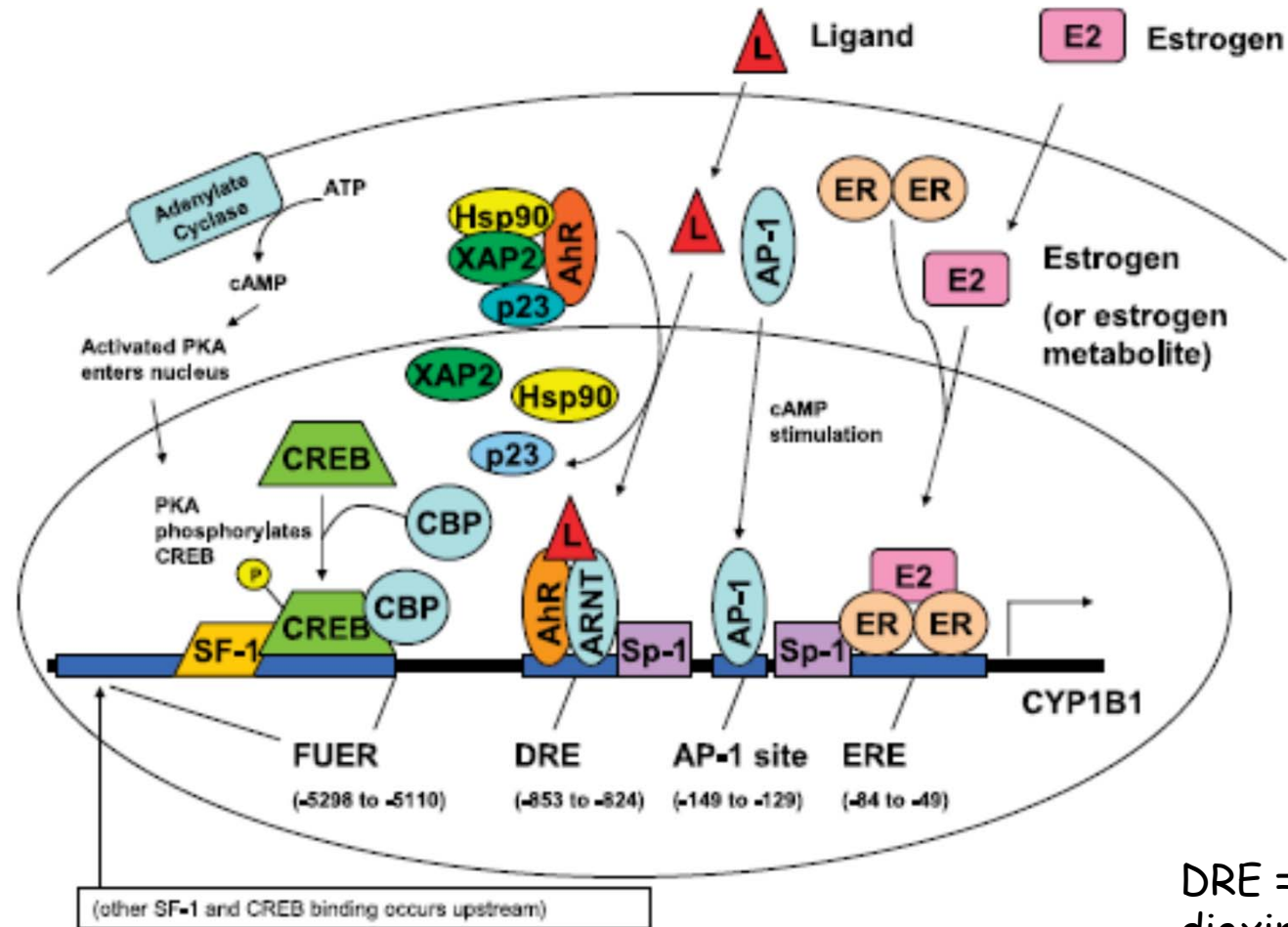
Regulace AhR:

- degradace AhR po navázání ligandu
- AHRR = AhR represor



REGULACE CYTOCHROMU P4501B1 (CYP1B1)

(je velmi komplexní - několik responsních elementů)



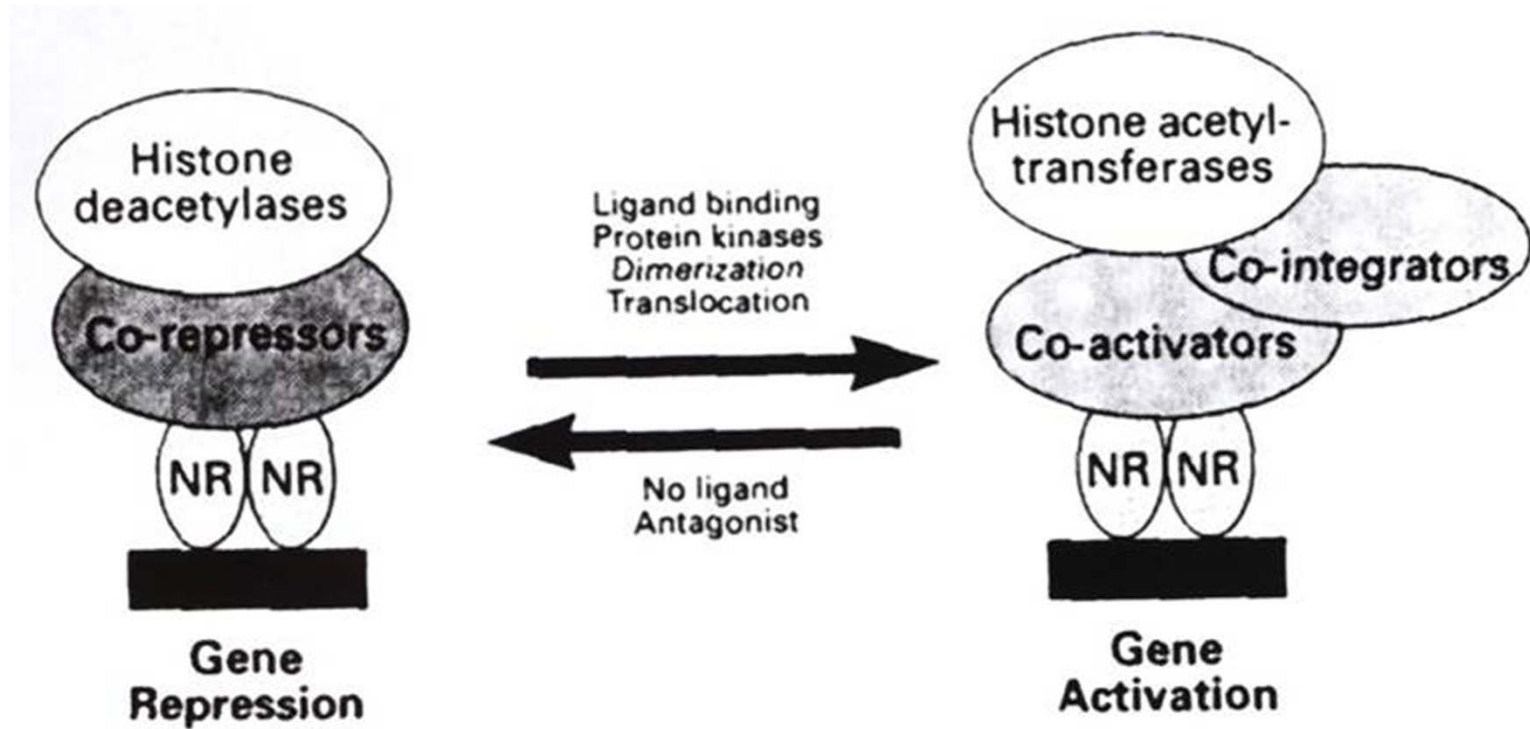
DRE =
dioxin
response
element



**REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH
ENZYMŮ:**

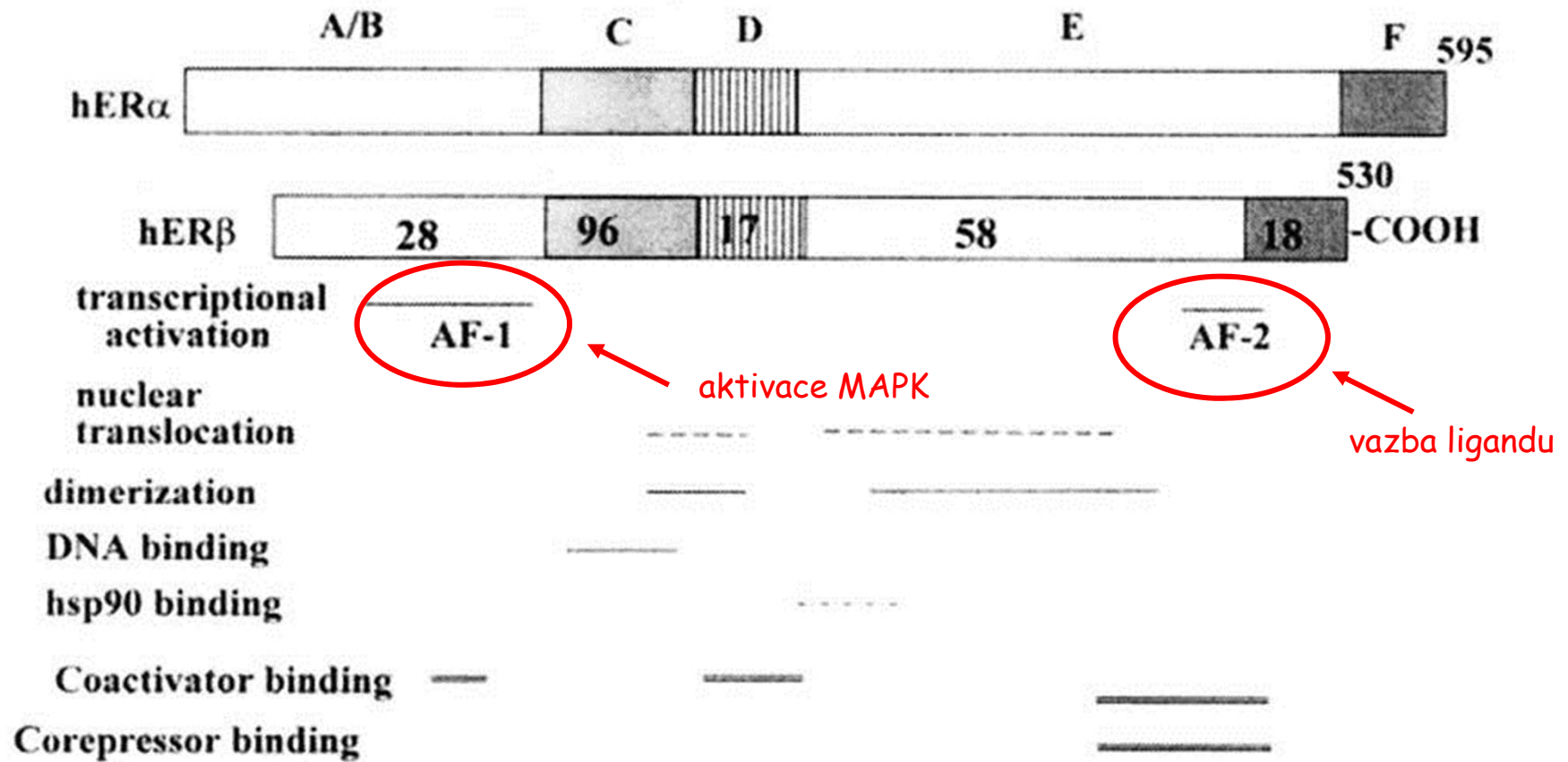
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY (NR)



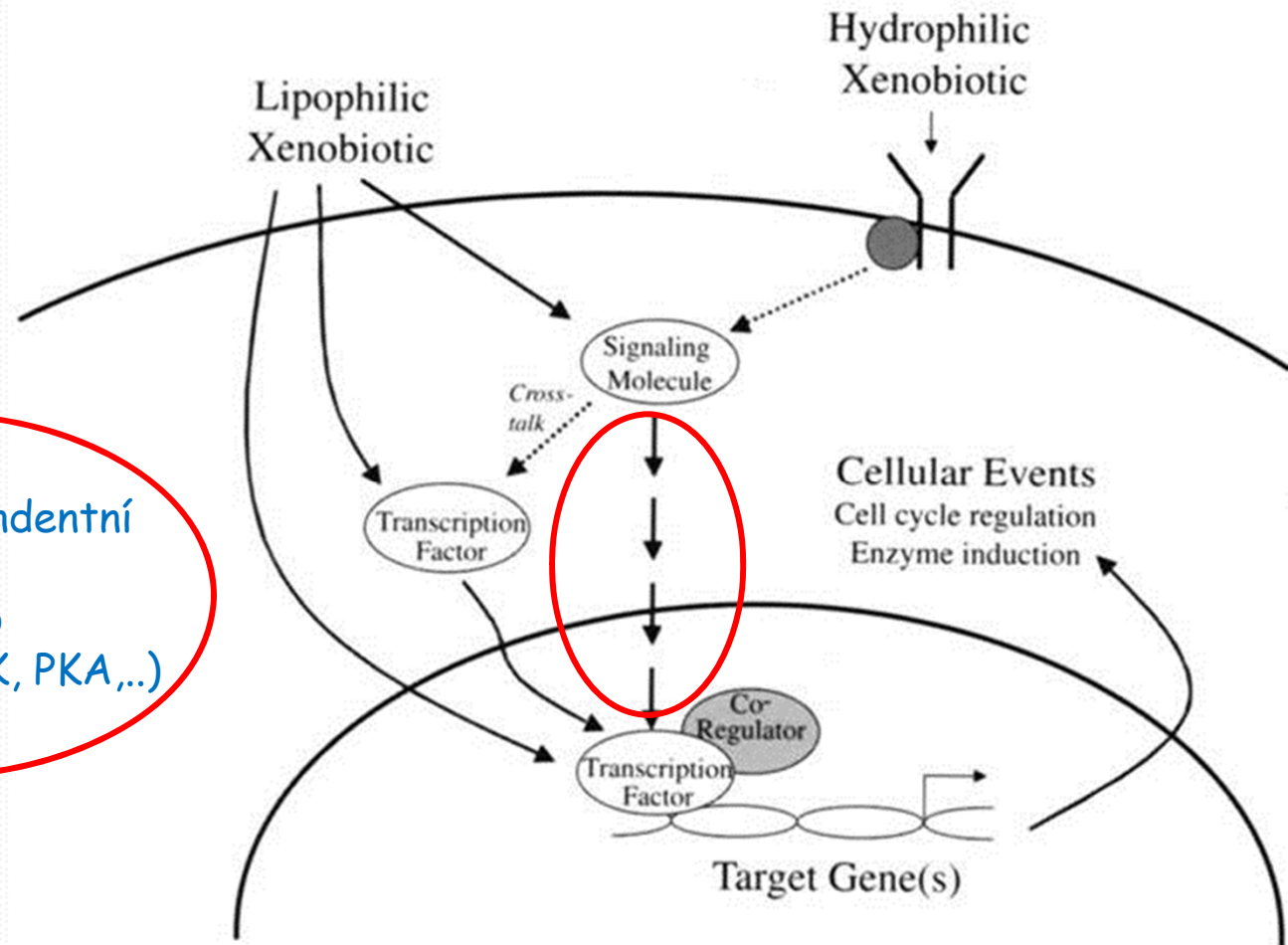
Model for gene activation and gene repression by NRs

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: struktura domén receptorů

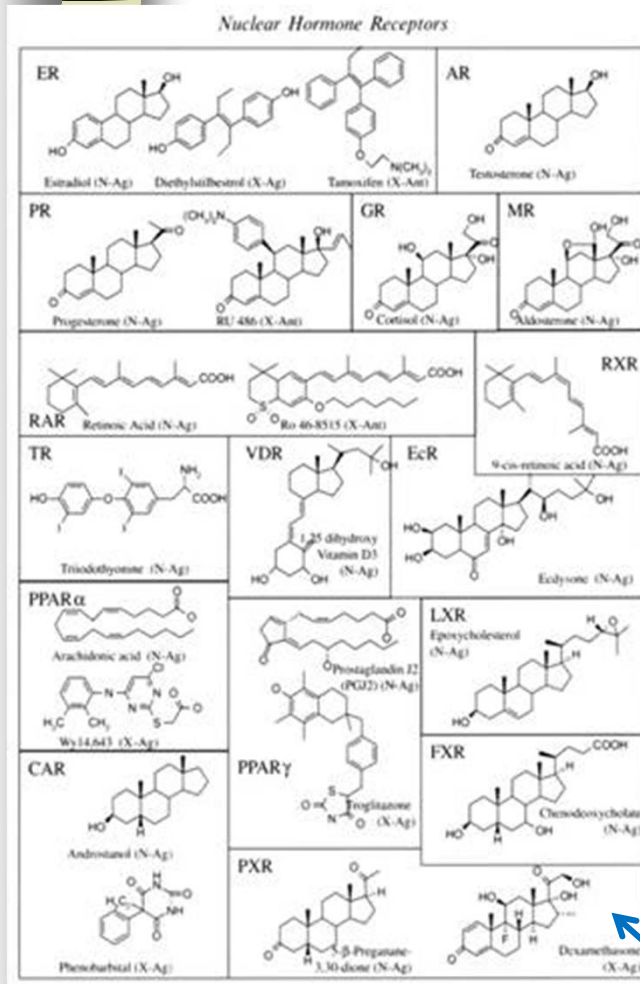


NUKLEÁRNÍ RECEPTORY MOHOU BÝT AKTIVOVÁNY TAKÉ PROTEINKINÁZAMI

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



NUKLEÁRNÍ RECEPTORY - KLASIFIKACE

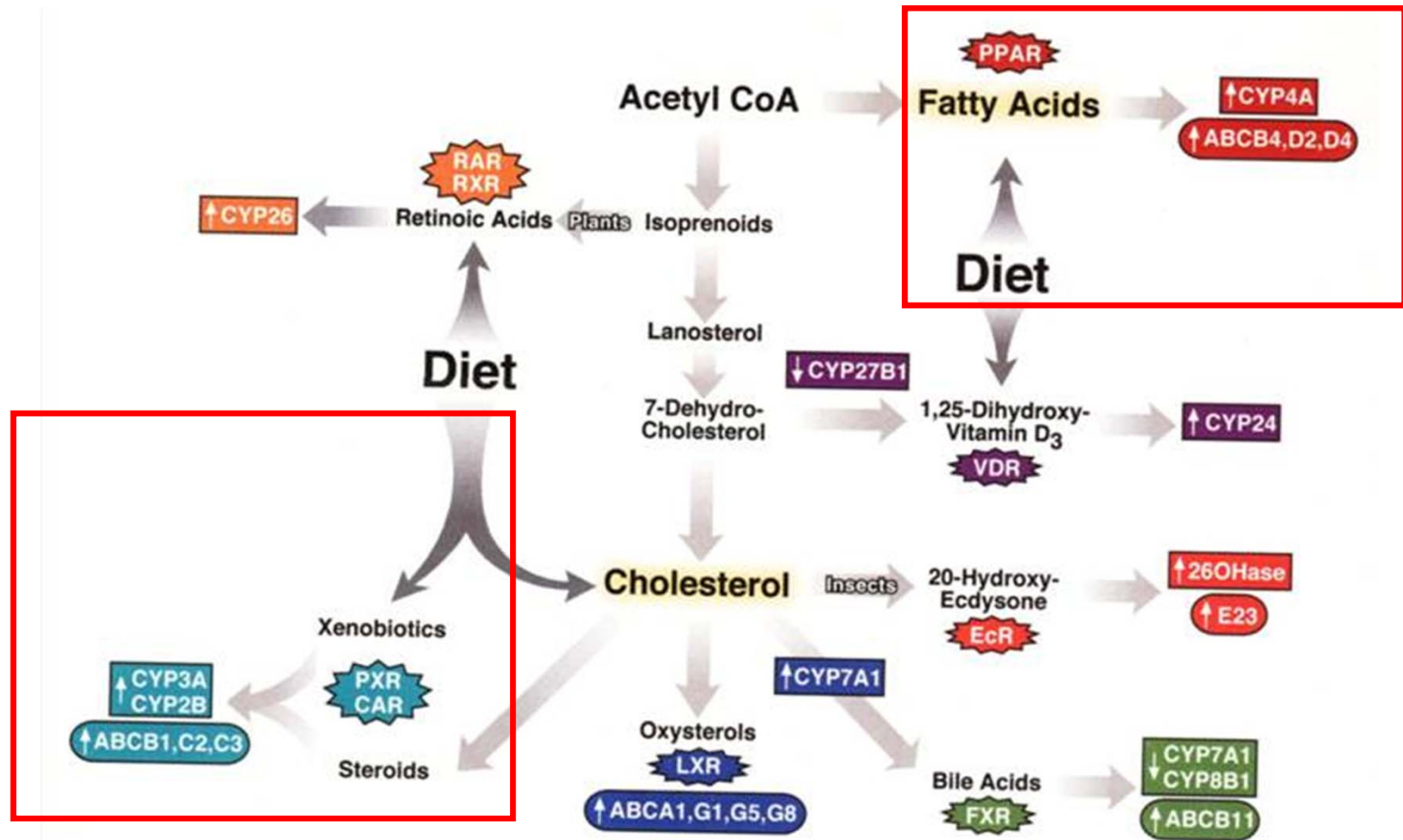


	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
Ligands:	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	<div style="background-color: #0000FF; color: white; padding: 5px;"> ER α, β PR AR GR MR </div> <div style="background-color: #800080; color: white; padding: 5px;"> RAR α, β, γ TR α, β VDR EcR </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: #000000; 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>

Ligandy (agonisté) jaderných receptorů

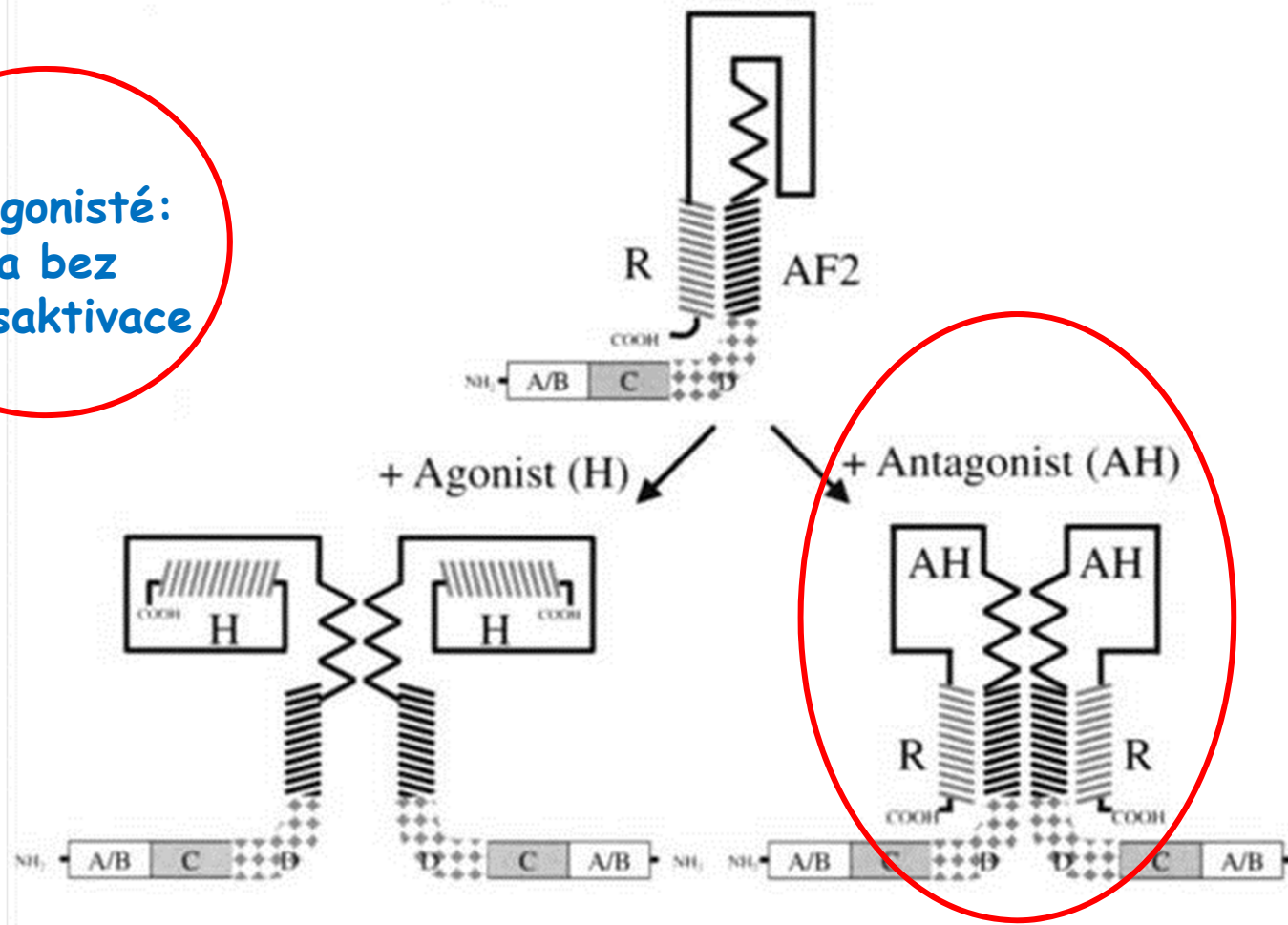
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

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



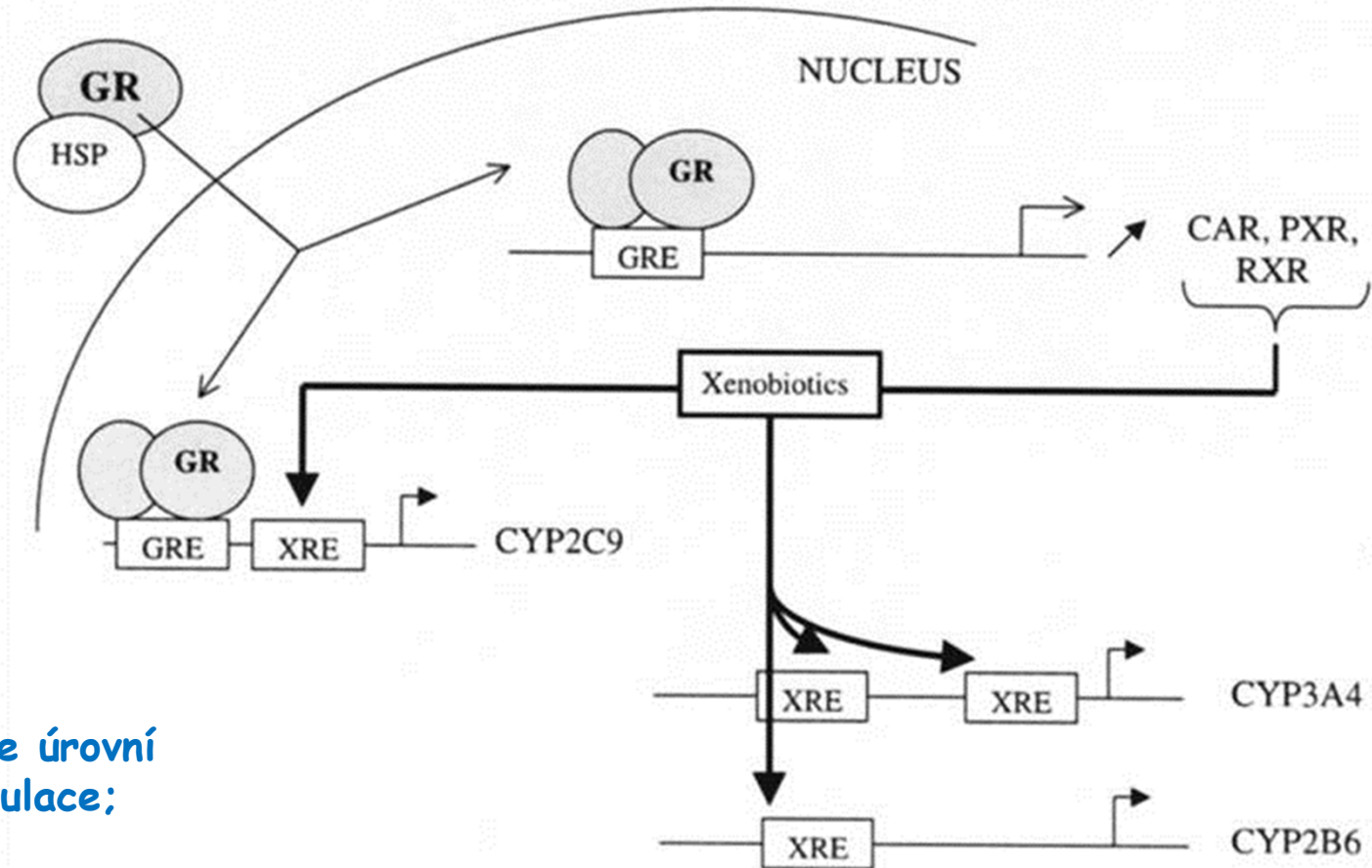
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: vazba antagonistického a agonistického ligandu

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

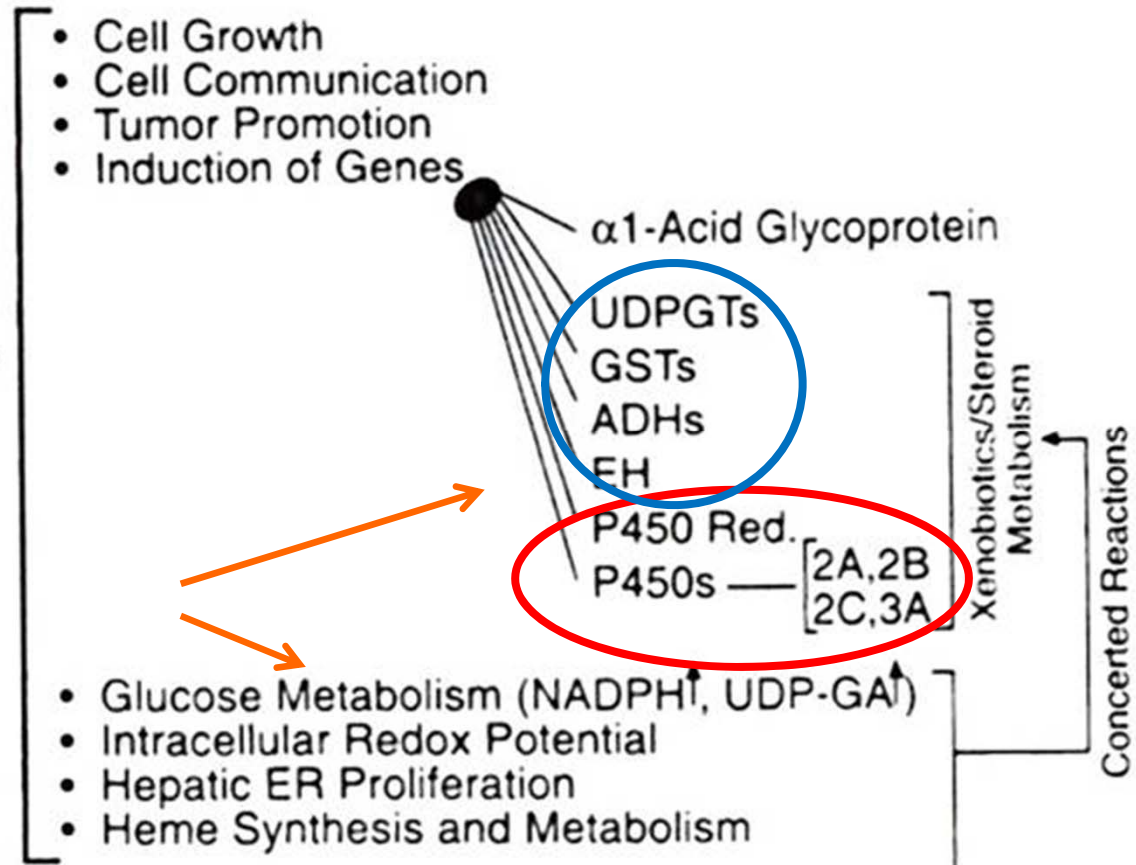
Biotransformace:

enzymy 1. fáze

enzymy 2. fáze

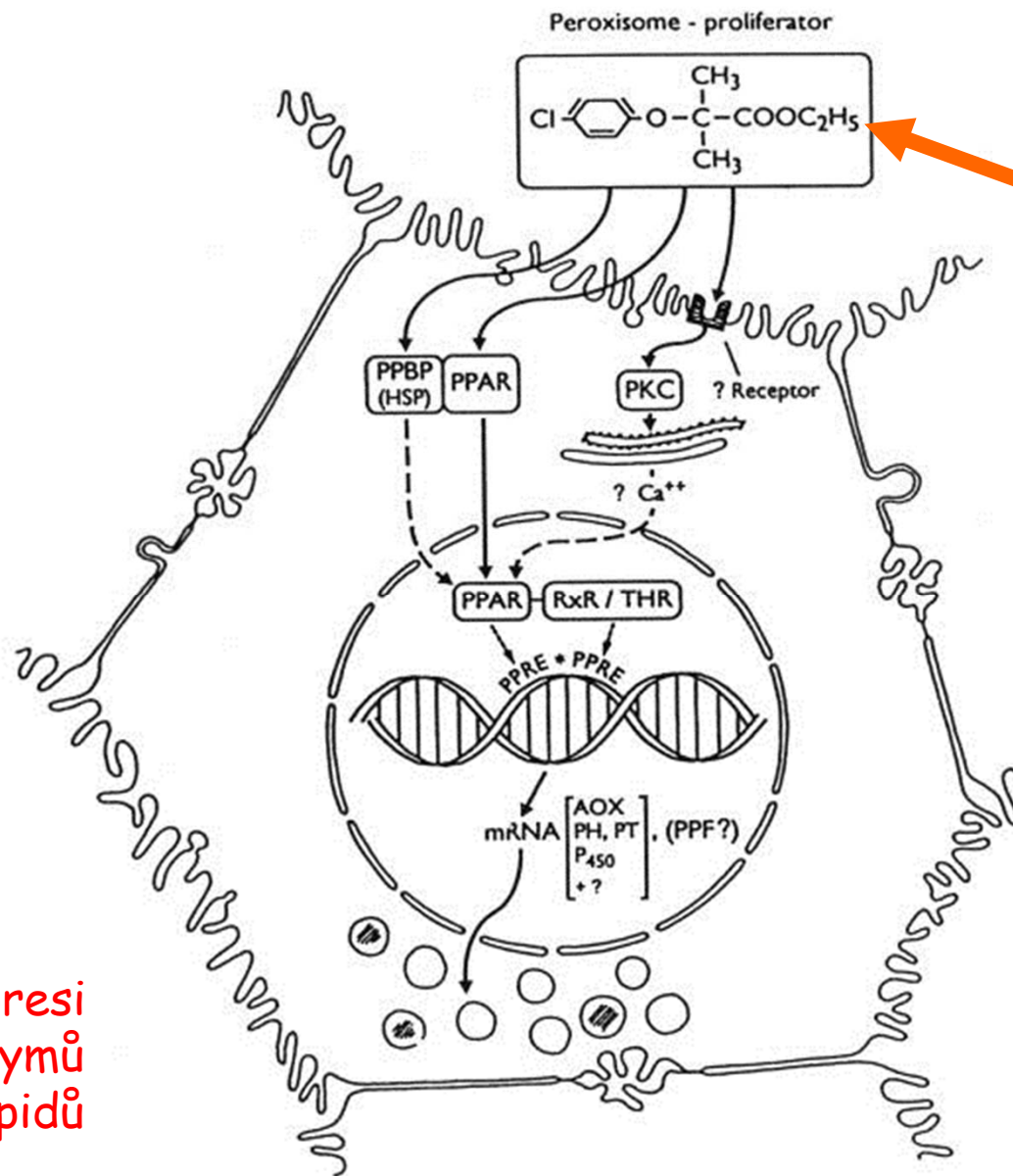
PB →

Modulace endogenního
metabolismu



PPAR α
(Peroxisomal
Proliferator-
Activated
Receptor alpha)

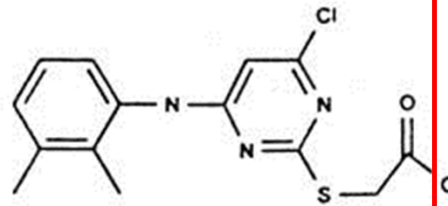
kontroluje expresi
CYP4A11 a enzymů
metabolismu lipidů



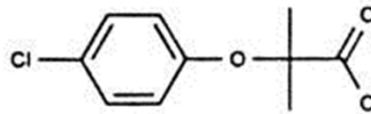
Induktory:
mastné
kyseliny,
hypo-
lipidemika
(fibráty),
environ.
látky
(ftaláty)

LIGANDY PPAR α

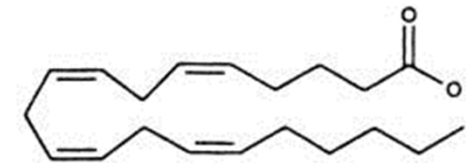
Farmaka
(hypolimidemika)



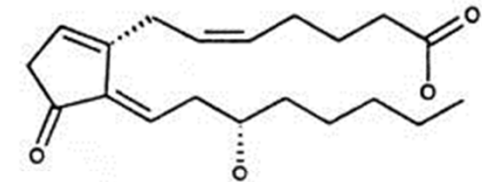
Wy 14,643



Clofibrate

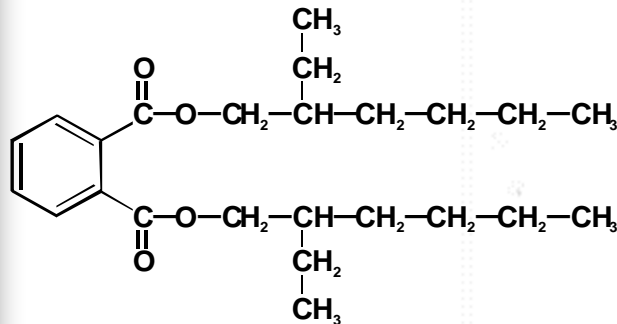


Arachidonic Acid

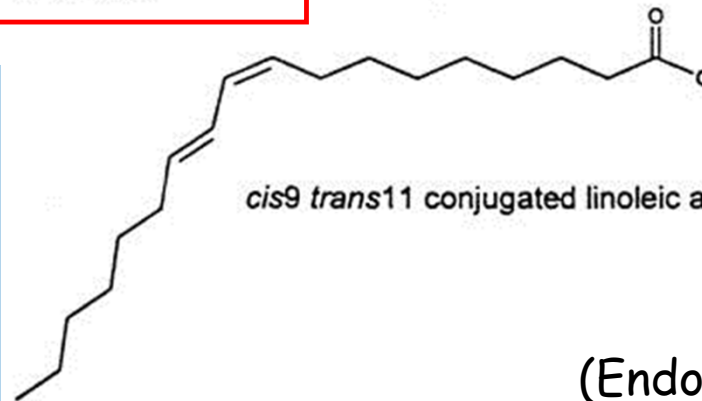


Prostaglandin J2

Environmentální
kontaminanty



Di(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)

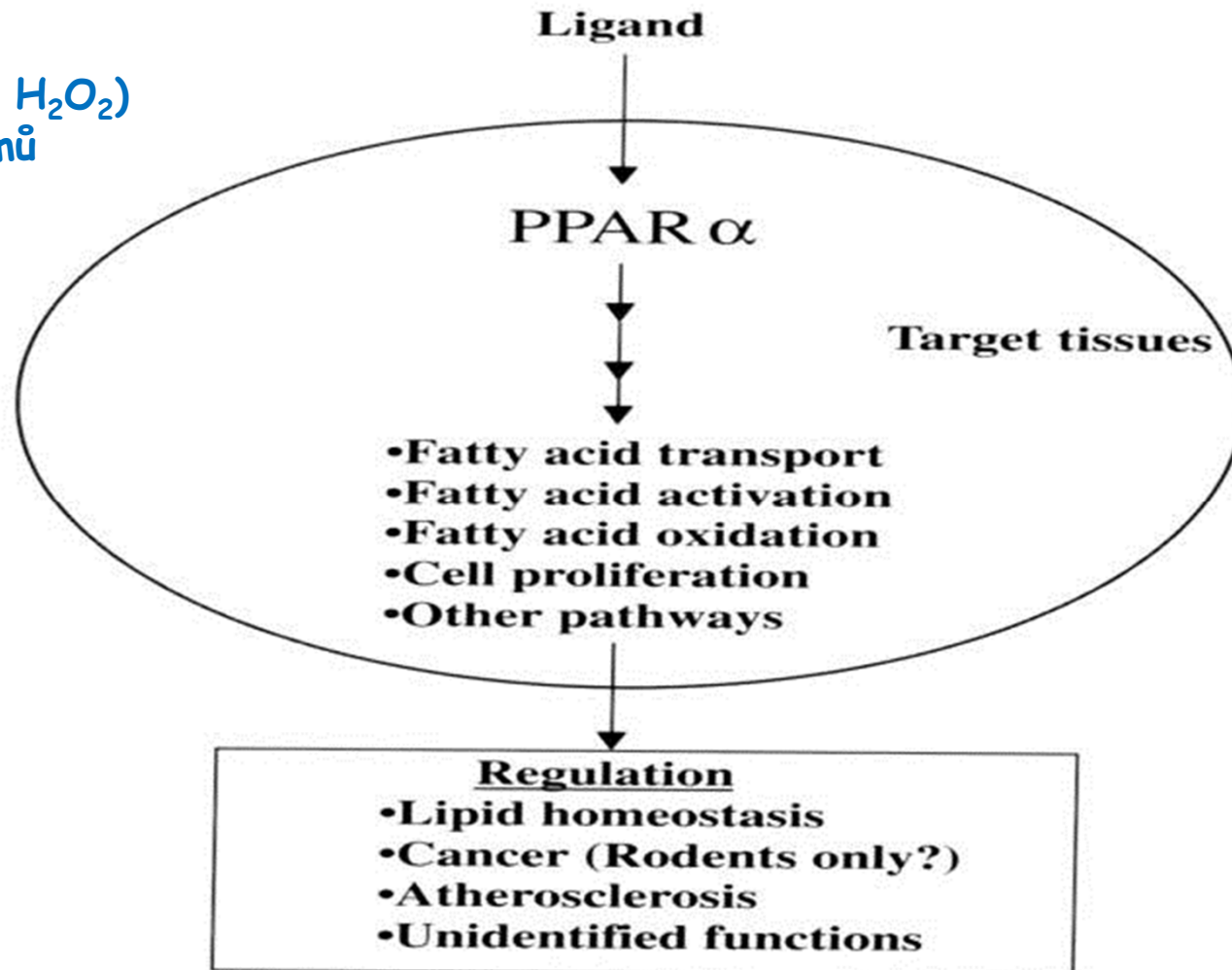


cis9 trans11 conjugated linoleic acid

(Endogenní) lipidy

DŮSLEDKY AKTIVACE PPAR α

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





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

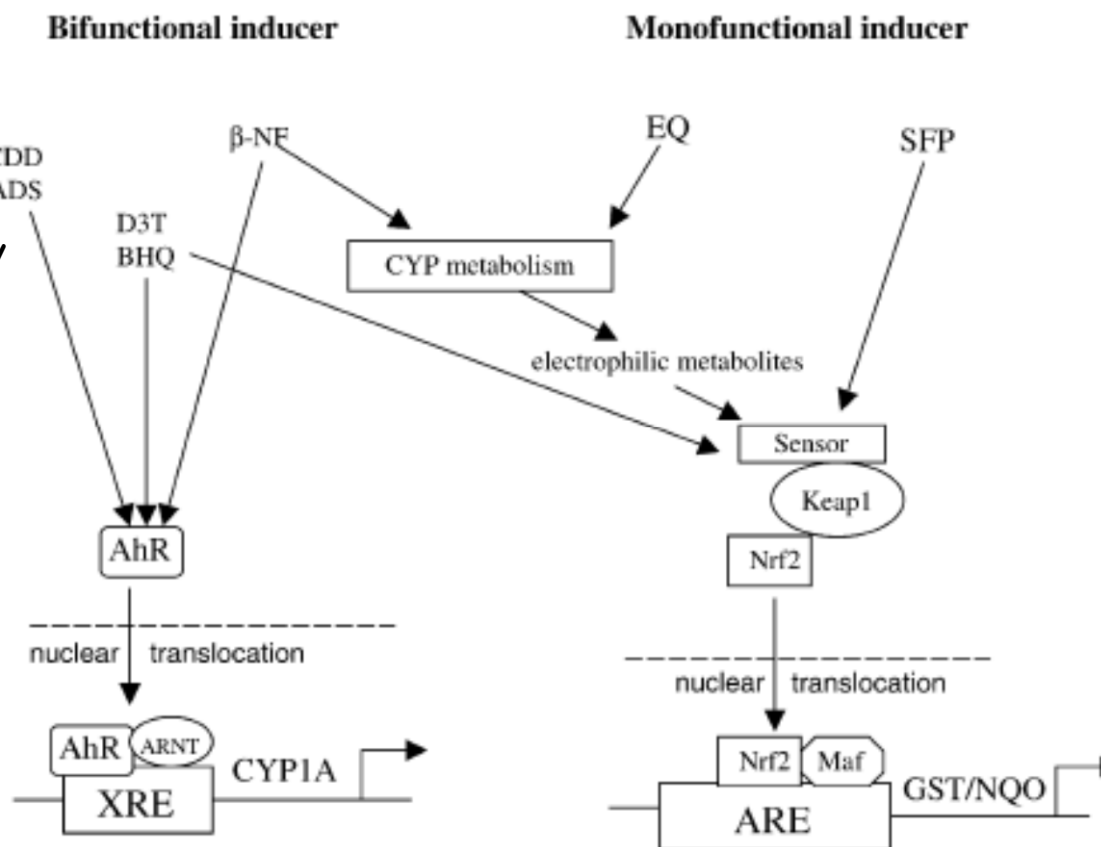
DALŠÍ ENZYMY 1.FÁZE BIOTRASFORMACE A JEJICH REGULACE

- 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⁺; 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)

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

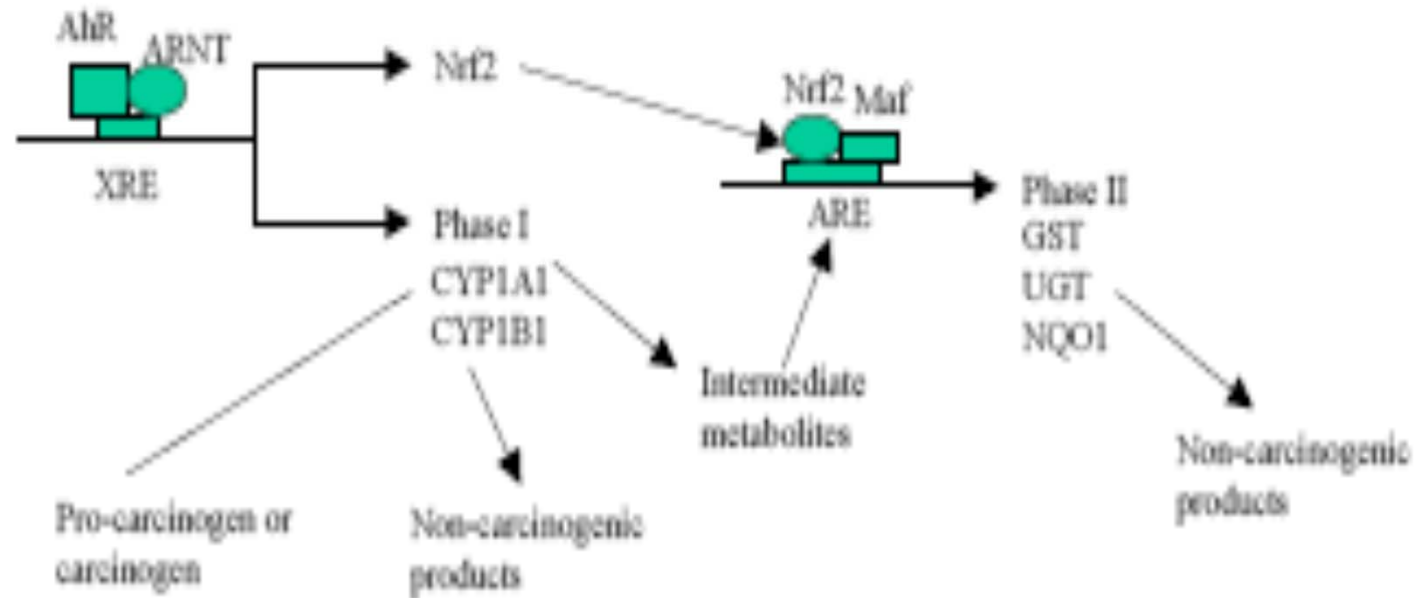
Bifunkční induktory
= xenobiotika
aktivující
AhR a Nrf2

NQO; GST a další
enzymy 2. fáze
biotransformace



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

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



Miao et al., JBC, 2005

ALDOKETOREDUKTÁZY

- většinou monomerní NAD(P)(H)-závislé 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)

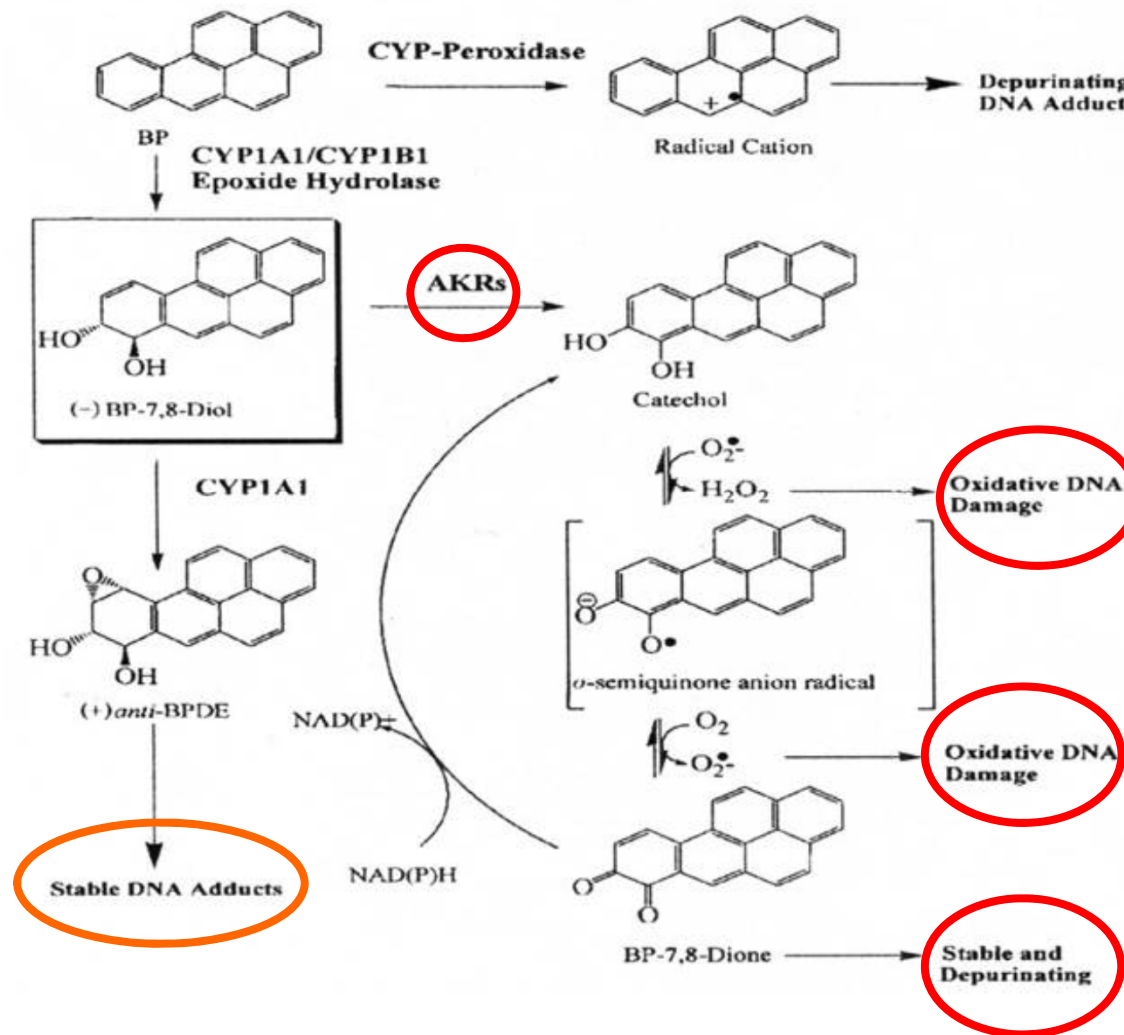
AKR1B1 (aldosareduktáza)

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

AKR1D1 (5 β -reduktáza)

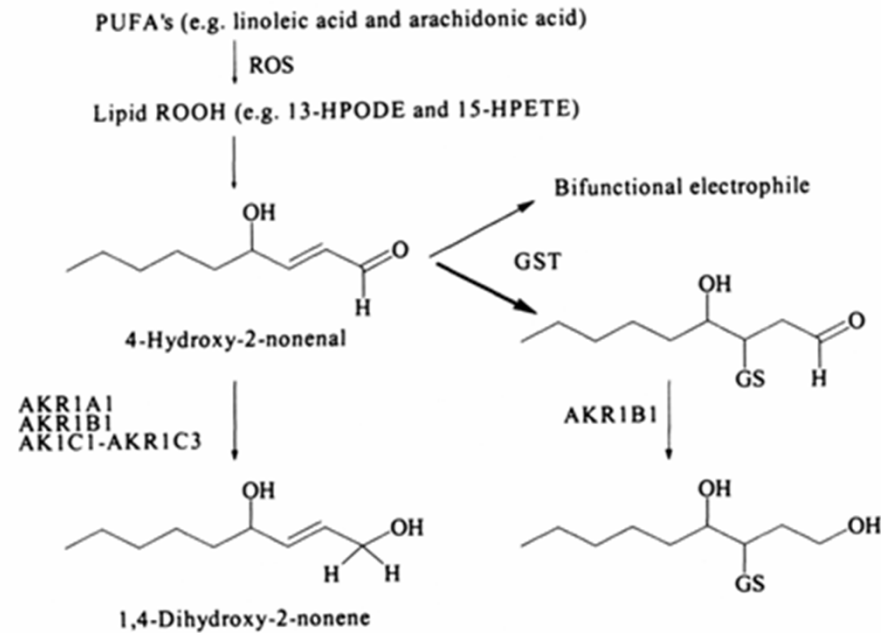
1. fáze biotransformace PAH: účast CYP1A1/1A2/1B1 (monooxygenace), EH (hydroláza) a AKR (reduktáza)

Detoxikace
versus
bioaktivace



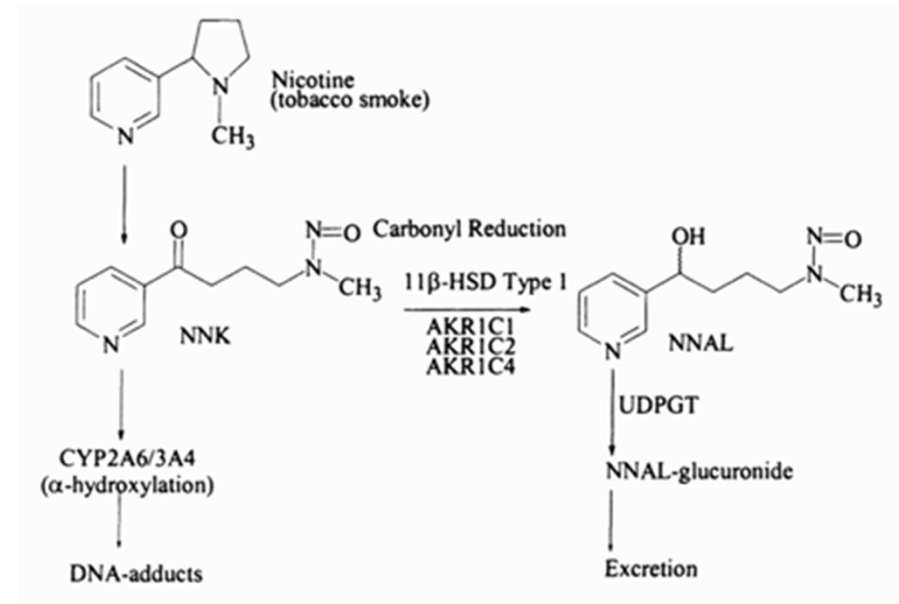
katecholy =
- metabolity PAHs,
- podobně
metabolity
steroidů (E2)

ALDOKETOREDUKTÁZY

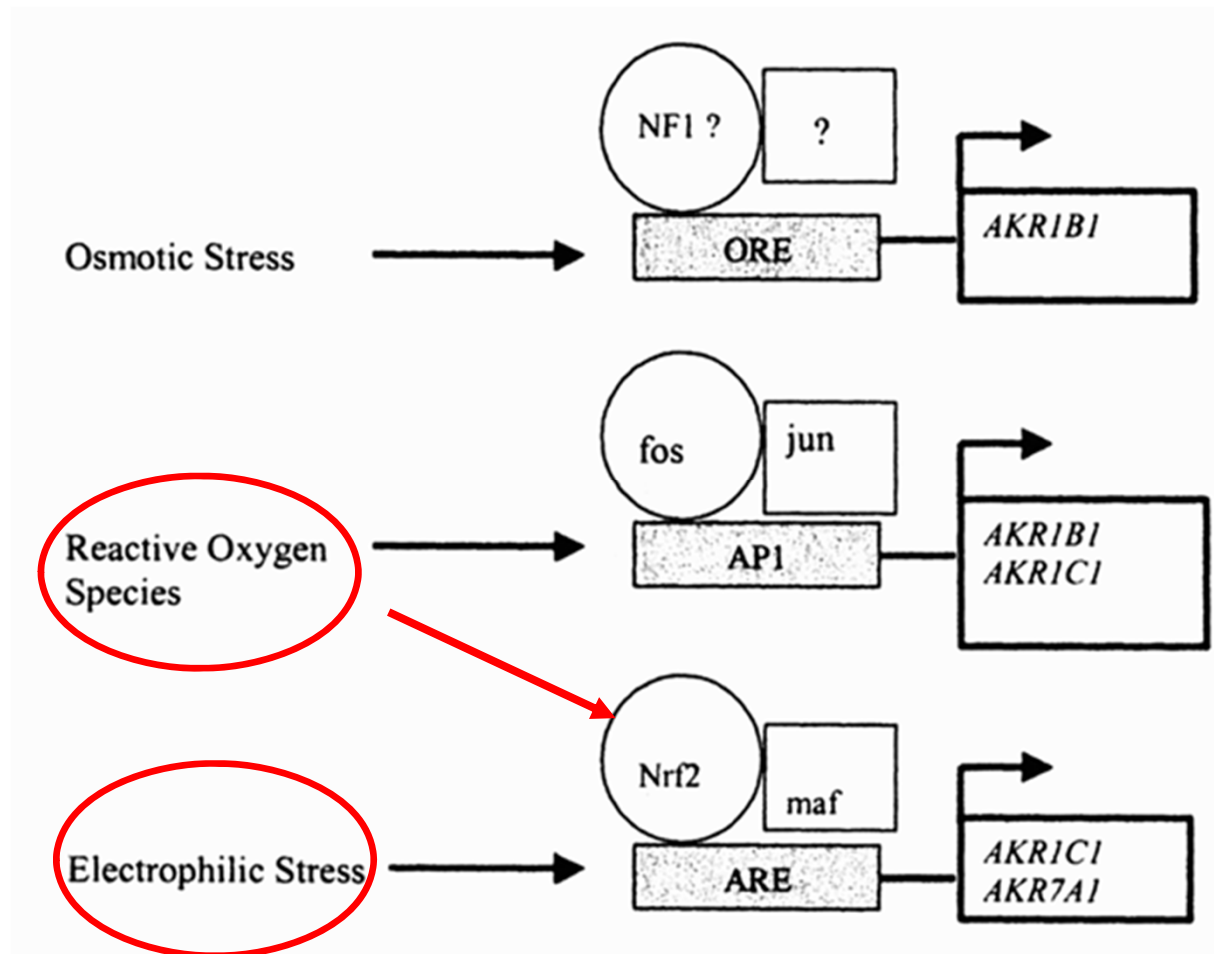


Biotransformace aldehydů
lipidní peroxidace

Detoxikace NNK



REGULACE ALDOKETOREDUKTÁZ





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

