



Faculty  
of Science

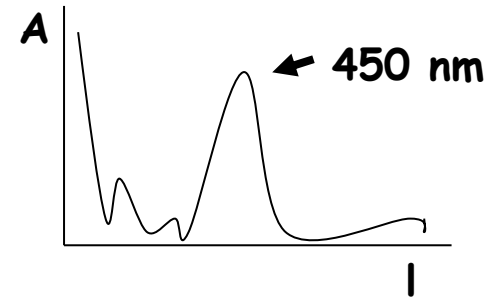
Palacký University  
Olomouc

# ***XENOPROTEKCE II.***

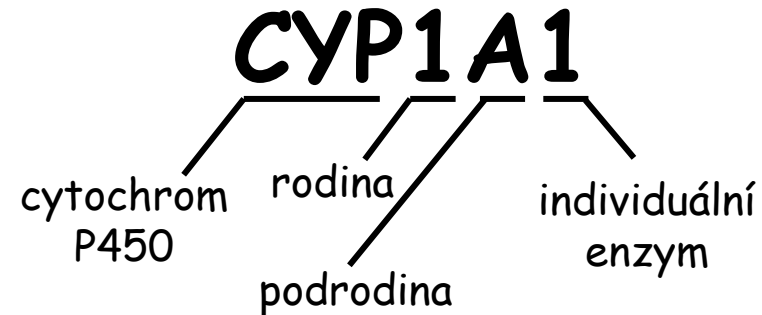
***Prof. RNDr. Zdeněk DVOŘÁK, DrSc., PhD***  
*Katedra buněčné biologie a genetiky*

**Buněčná biologie II. (KBB/BB2)**

# CYTOCHROM P450



- **NÁZEV** - „P“ = pigment, zbarvení zdrojové jaterní tkáně
  - spektrofotometrie komplexu s CO:  
Cyt P450-Fe<sup>2+</sup>-CO = (a)typická absorpce při 450 nm
  - klasifikace podle podobnosti v primární struktuře
  - cca 150 enzymů (4 rodiny); 17 členů u člověka
- **HEMOPROTEIN** - protoporphyrin III. - Fe<sup>3+</sup> koordinovaný s HS-Cys apoenzymu
  - integrální membránový protein (hladké ER; vnější mitochondrie)
  - vazebná místa: 1. pro substrát; 2. hem - vazba a aktivace O<sub>2</sub>
- **LOKALIZACE** - **JÁTRA** (+ placenta; plíce; střevo; kůže)
  - není v séru, svalech, neuronech, erythrocytech
  - přítomen u člověka, zvířat, rostlin, hub, bakterií
- **ROZDÍLY**
  - substrátová a reakční specifita
  - tkáňová a buněčná lokalizace
  - způsob regulace



## Nejvýznamnější CYPy v metabolismu léčiv u člověka

CYP1A1   CYP2A6   CYP3A4   CYP2D6  
CYP1A2   CYP2B6   CYP3A5   CYP2E1  
CYP1B1   CYP2C8   CYP3A7  
CYP2C9  
CYP2C18  
CYP2C19



<u>ISOFORMA</u>	<u>SUBSTRÁT</u>	<u>INHIBITOR</u>	<u>INDUKTOR</u>
CYP1A2	acetaminophen, antipyrine phenacetin, tamoxifen	fluvoxamine, furafylline galangin	PAHs, dioxins, omeprazole
CYP2A6	coumarin, nicotine	menthofuran, methoxsalen	phenobarbital
CYP2B6	artemisin, methadone sertraline, efavirenz	ticlopidine, clopidogel	phenobarbital rifampicin
CYP2C8	taxol, retinoic acid	trimetoprim	RIF, PB
CYP2C9	celecoxib, ibuprofen S-warfarin, tolbutamide	sulfaphenazole, tienilate	RIF, PB
CYP2C18	tolbutamide, mephenytoin	-	RIF, PB
CYP2C19	diazepam, S-mephenytoin	fluconazole	RIF, PB
CYP2D6	bufuralol, fluoxetine, dextromethorphan, sparteine	quinidine, paroxetine	-
CYP2E1	ethanol, chlorzoxazone halothane, enflurane	disulfiram, 4-methylpyrazole	ethanol
CYP3A	(50% of drugs), amiodarone mifepristone, lovastatin	clarithromycin, itraconazole erythromycin, ritonavir	RIF, PB corticoids

- jedna CYP isoforma metabolizuje velké množství rozličných substrátů
- jeden substrát je metabolizován několika CYP isoformami, a produkovány jsou různé metabolity

- jednotlivé CYP isoformy jsou regulovány různými mechanismy: transkripční, post-transkripční, post-translační
- exprese jednotlivých CYP isoformem je ovlivněna polymorfismy, fyziologickými, pato-fyziologickými, a environmentálními faktory
- aktivita jednotlivých CYP isoformem je ovlivněna substráty a inhibitory

# POLYMORFISMUS & MUTACE

## CYP2D6

- pomalí vs rychlí metabolizátoři (mutace resp. duplikace genu)
- tzv. spartein-debrisochinový polymorfismus
- pomalí metabolizátoři (cca 5% kavkazské popul.; 1% orientálci; 18% San Bushman)

## CYP1A1

- mutace v MspI místě v 3' -nekódující oblasti a mutace v exonu 7 zvyšují aktivitu indukovaného enzymu
- není jasné, proč tato mutace představuje zvýšené riziko rakoviny plic u japonské ale ne u kavkazské populace.

## CYP2C19

- pomalí a rychlí metabolizátoři - 4' -OH-(S)-mefenytoin
- mutace CYP2C19m1 - 75% defektů; mutace v exonu 5 - vede k absenci proteinu
- mutace CYP2C19m2 - 25% defektů; mutace v exonu 4 - předčasný STOP kodon, zkrácený neaktivní protein
- 3-5% kavkazské a 20% orientální populace

## CYP3A5

- polymorfismus v expresi genu - přítomen u 10-30% kavkazské populace
- substrátová specifita totožná s CYP3A4
- polymorfismy u enzymů fáze II (N-AcT, UDP-Glu) a transportérů (OATPs)

# POSTTRANSLAČNÍ REGULACE

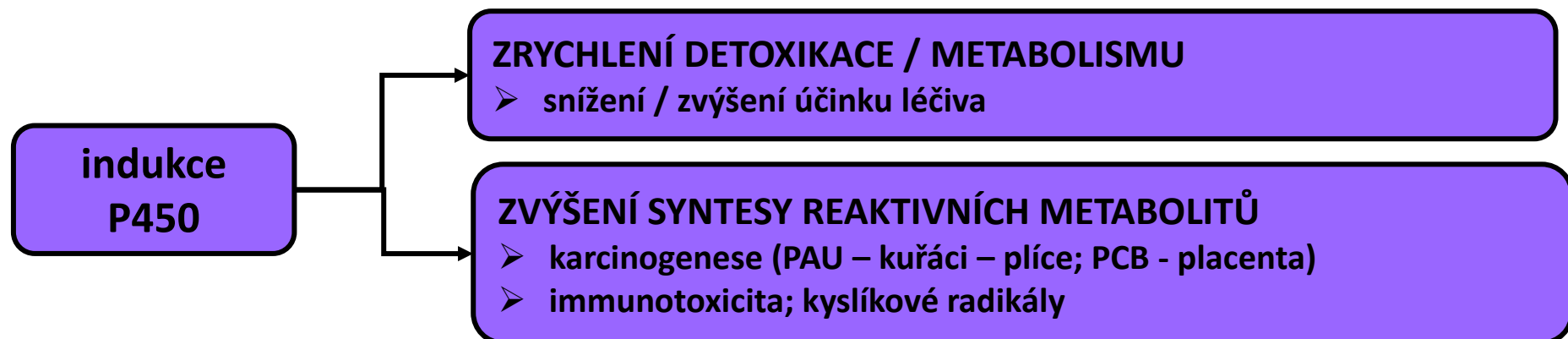
- lokalizace - hrubé endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát
- nejvýznamnější u **CYP2E1**
- velká interindividuální variabilita v expresi genu a množství proteinu
- metabolismus alkoholu a organických rozpouštědel
- indukován svými substráty (ethanol, aceton)
  
- vazba substrátu do aktivního místa CYP2E1 - následně inhibice cAMP-dependentní fosforylace Ser129, která spouští ztrátu hemu a degradaci proteinu CYP2E1
- čím větší je afinita substrátu k enzymu CYP2E1, tím vyšší je míra „indukce“
- sensu stricto - nejedná se o indukci, ale o post-translační stabilizaci

# POSTTRANSKRIPČNÍ REGULACE

- lokalizace - hrubé endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát
- možná úloha mikro RNA?
- nejvýznamnější u **CYP1A1**, **CYP1A2** a **CYP2E1**
- stabilizace mRNA v přítomnosti induktoru - mechanismy nejsou detailně pochopeny
- u CYP1A1/2 hraje receptor AhR roli ve stabilizaci mRNA

# TRANSKRIPČNÍ REGULACE

- významné u **CYP1A1/2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9, CYP2C19, CYP3A4/5**
- zvýšení *de novo* syntézy P450
- **inducibilita** genů strukturně odlišnými sloučeninami:
  - xenobiotika: alkaloidy, léčiva, antibiotika, environmentální polutanty, součásti potravy
  - endogenní sloučeniny: steroidní hormony, retinová kyselina, prostaglandiny, vitamin D
- induktory jsou ligandy (agonisté) xenobiotických receptorů
- silné induktory jsou často pomalu metabolizovanými substráty; např. polyaromatické uhlovodíky, aromatické aminy, polychlorované bifenyly, rifampicin, fenobarbital, karbamazepin, midazolam atd.
- **xenobiotické receptory:**
  - transkripční regulátory exprese/indukce P450s
  - „sirotčí (orphan)“ receptory - neznámý endogenní ligand
  - Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)
  - Pregnane X Receptor (PXR; NR1I2)
  - Constitutive Androstane Receptor (CAR; NR1I3)
- **steroidní a jaderné receptory:**
  - GR, ER, RARs, RXRs, VDR, FXR
  - „cross-talks“



# SIROTČÍ RECEPTORY

- „orphan receptors“; není (dosud) znám endogenní ligand
- sirotčí receptory jsou postupně „deorfanizovány“

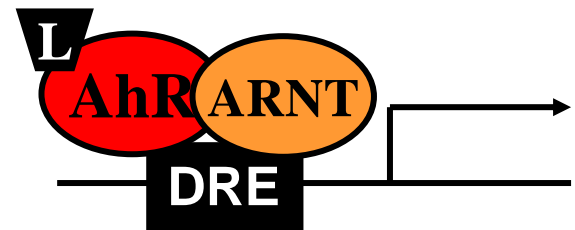
## kanabinoidní receptory / opioidní receptory

- (1) pozorování farmakologického / fyziologického účinku často přírodního produktu (marihuana, hašiš / opium)
- (2) fytochemické studium - identifikace chemické komponenty zodpovědné za buněčný / *in vivo* účinek (THC, tetrahydrokanabinol / morfin)
- (3) medicínální chemie - syntéza biologicky aktivnějších a bezpečnějších analog
- (4) identifikace molekulárního buněčného cíle vč. strukturní charakterizace - krystal (kanabinoidní receptory CB1, CB2 / opioidní receptory  $\mu$ MOR,  $\delta$ DOR  $\kappa$ KOR)
- (5) racionální design léčiva - docking, molekulární modelování
- (6) identifikace endogenního ligandu (ANANDAMID / ENDORFINY)

# ARYL UHLOVODÍKOVÝ RECEPTOR (AHR)

- receptor pro polyaromatické uhlovodíky; dioxinový receptor
  - ligandy-aktivovaný transkripční faktor
  - člen rodiny transkripčních faktorů bHLH/PAS
    - bHLH = basic-Helix-Loop-Helix
    - PAS = Per-Arnt-Sim; Per = period; Sim = single-minded
  - exprimován ve všech tkáních
  - transkripčně aktivní ve formě heterodimeru s ARNT (AhR/ARNT)
    - ARNT = AhR Nuclear Translocator
    - ARNT = podjednotka HIF1 - hypoxia inducible factor 1
- aktivní AhR/ARNT se váže do promotorové oblasti DNA

DRE = dioxin-responsive element  
XRE = xenobiotic-responsive element  
AHRE = AhR responsive element

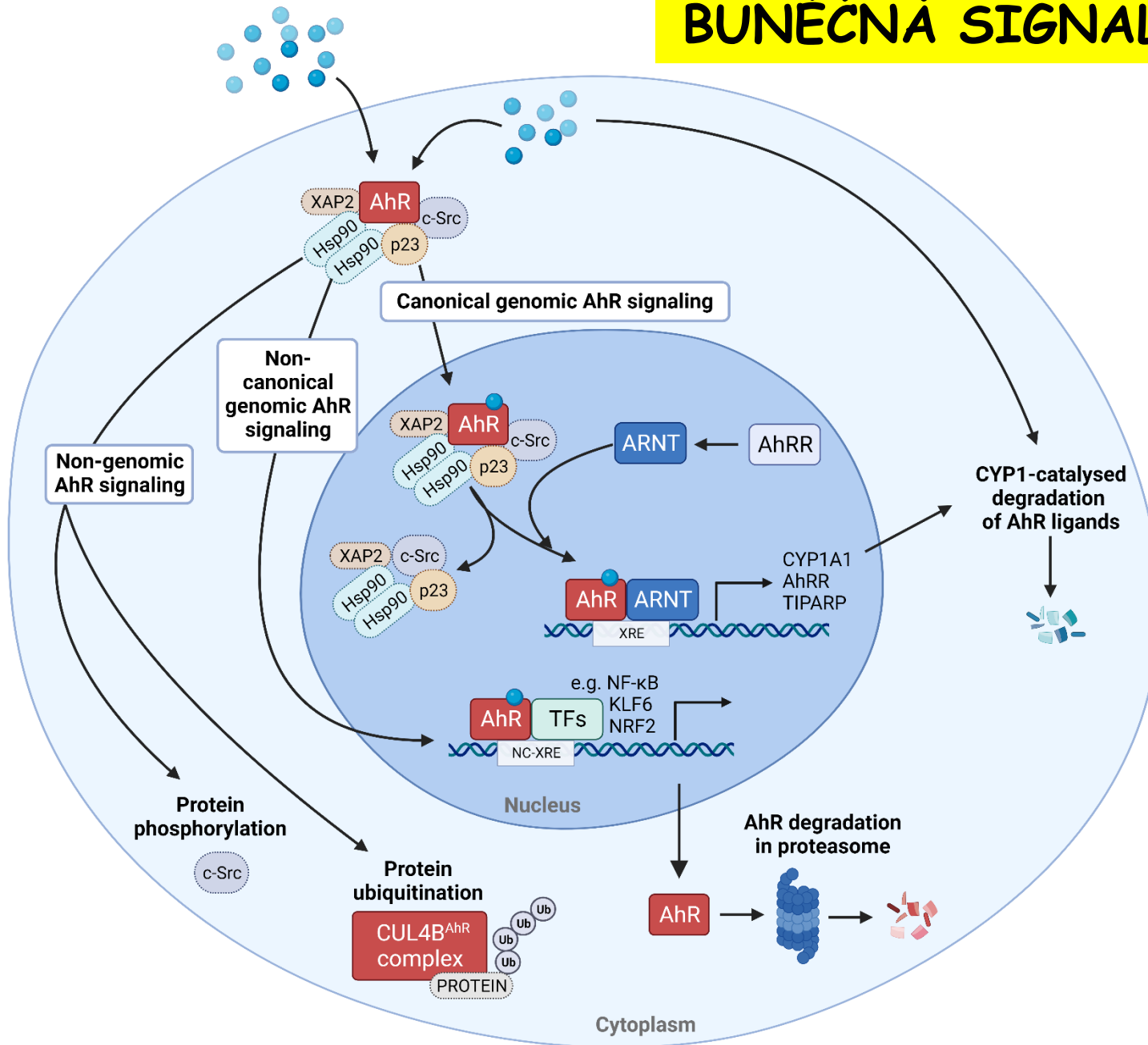


core sequence  
consensus sequence

5'-GCGTG-3'  
5'-T/GNGCGTGA/CG/CA-3'

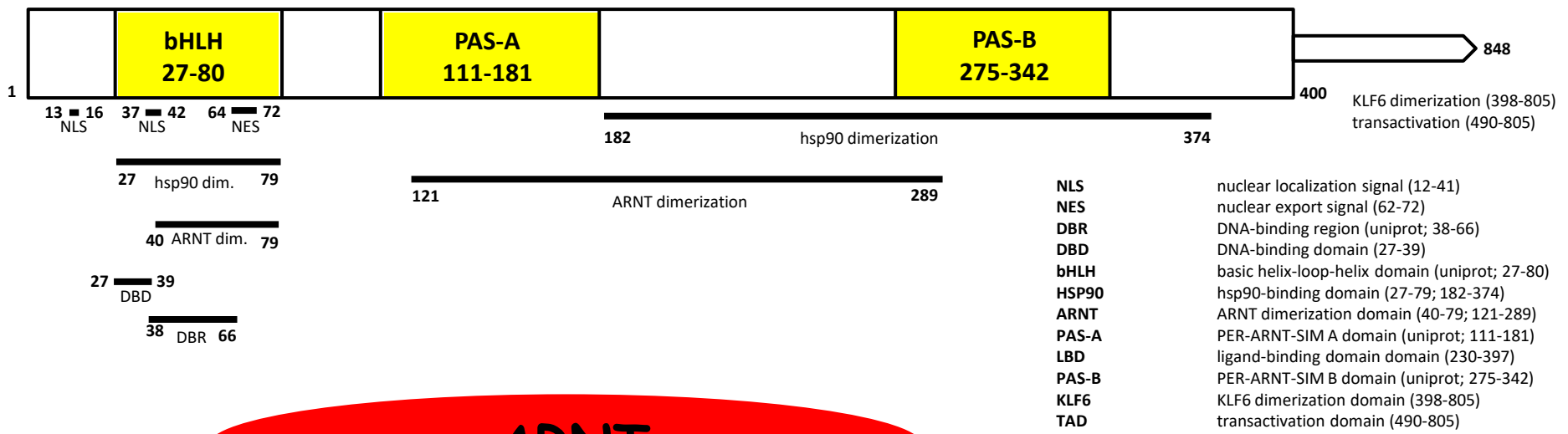


# BUNĚČNÁ SIGNALIZACE AHR



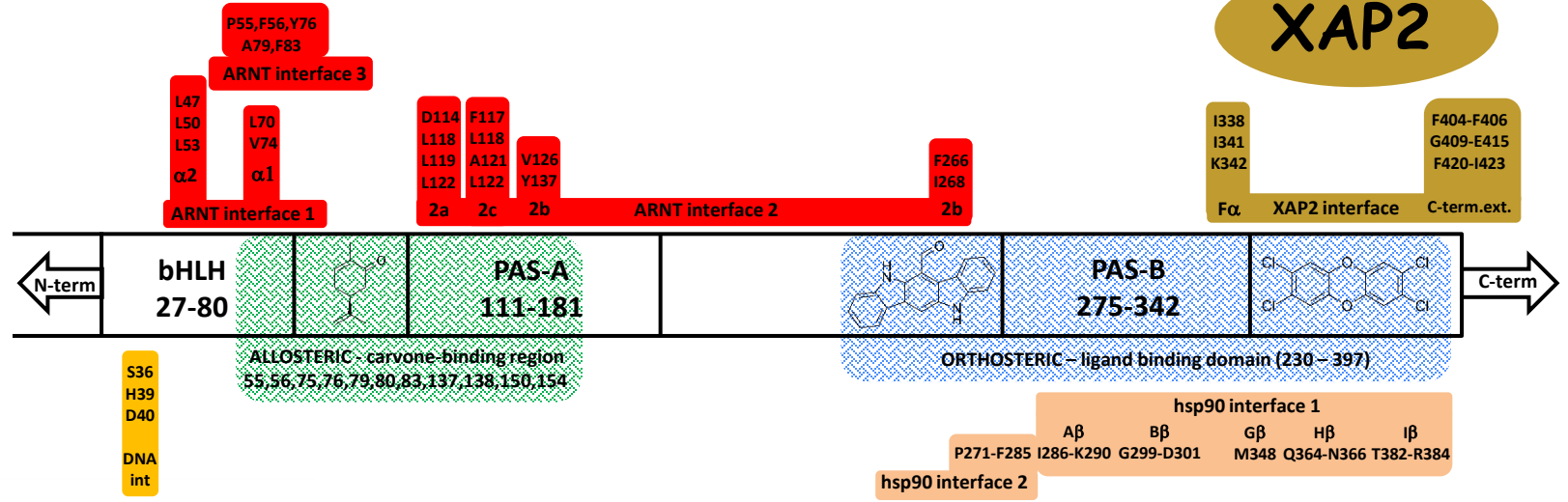
# FUNKČNÍ DOMÉNY AHR

## orthosteric ligand binding domain



# ARNT

# XAP2



# hsp90

# ARYL UHLOVODÍKOVÝ RECEPTOR

## FUNKCE AhR

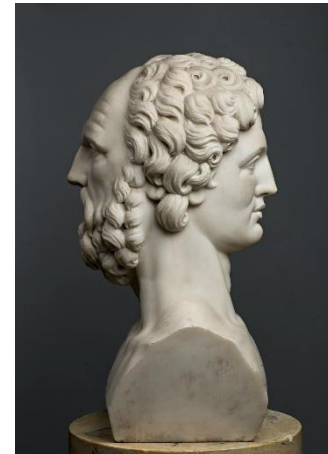
- regulace enzymů metabolismu xenobiotik (fáze I., fáze II.)
- obecně - úloha v mnoha fyziologických dějích - buněčný cyklus, imunitní odpověď, diferenciace, apoptosa, vývoj, regulace intermediárního metabolismu (sacharidy, lipidy)
- orgánově specifické funkce a toxikokinetika/toxikodynamika - játra, střevo, kůže, plíce, placenta
- AhR funguje jako ubiquitin-E3-ligasa

## CÍLOVÉ GENY AhR

- detoxikační - CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGTs, NADPH-red., GSTs atd.
- ostatní - AhRR, TGF $\beta$ , p27, IL-1 $\beta$ , Jun, Bax, atd.

## LIGANDY AhR

- enormní množství - endogenní, mikrobiální (comensal vs pathogenic), xenobiotické (přírodní, syntetické - léčiva, environmentální polutanty)
- velká ligand-vazebná doména; různé ligandy interagují s různými aminokyselinovými zbytky v LBD - diverzita vazby a buněčné odpovědi
- duální charakter AhR a jeho ligandů: „Janus faced“





# PREGNANOVÝ X RECEPTOR (NR1I2)

- jaderný receptor; rodina steroid-thyroid-retinoid receptors
- objev PXR znamenal revoluci ve farmakologii a vývoji léčiv!!!
- aktivace PXR xenobiotiky (vč. léčiv) je molekulární podstatou lékových interakcí způsobených tzv. indukci exprese biotransformačních enzymů - fáze I. (cytochrom P450), fáze II. (UGTs), fáze III. (transportery)

## FUNKCE PXR

- regulace enzymů metabolizujících léčiva - tzv. „xenosenzor“
- regulace genů metabolismu lipidů, sacharidů, cholesterolu, žlučových kyselin
- exprimován v játrech, GIT, ledvinách

## CÍLOVÉ GENY PXR

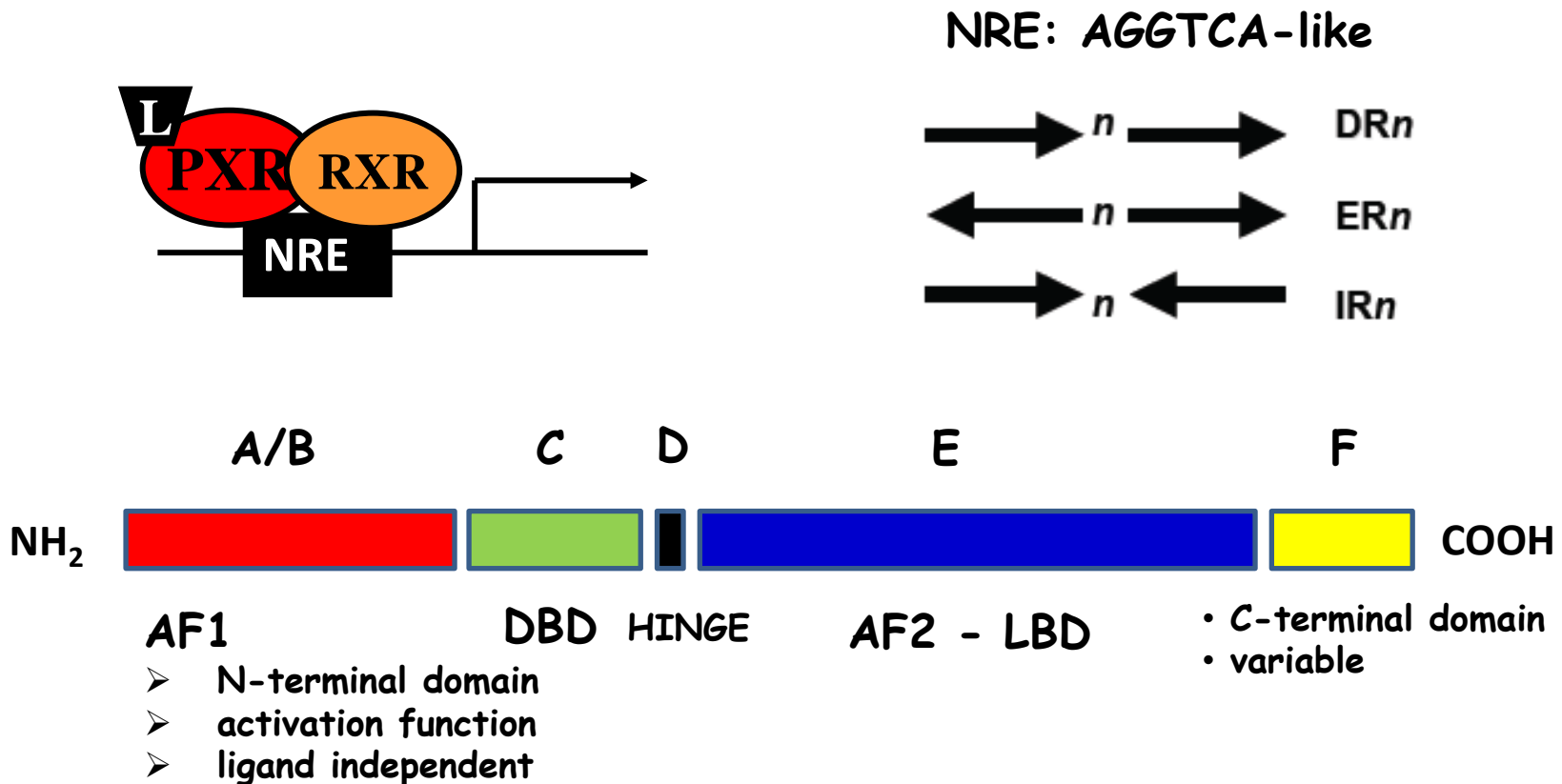
- detoxikační - CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A7, GSTs, STs, MDR1, MRPs atd.
- ostatní - ALAS-1, ApoA1, HDLc atd.

## LIGANDY PXR

- XENOBIOTICKÉ - rifampicin, barbituráty, glukokortikoidy, nifedipin, hyperforin, azolová antimykotika atd.
- ENDOGENNÍ - vitamin E, žlučové kyseliny, steroidy
- MIKROBIÁLNÍ - střevní mikrobiota - žlučové kyseliny, indol-3-octová kys.

# PREGNANOVÝ X RECEPTOR

- transkripčně aktivní PXR funguje ve formě heterodimeru s RXR
- vazebná místa pro PXR/RXR v DNA AGGTCA-like core sekvenci, a různé strukturální motivy - DR3, DR4, ER6, IR6 apod.



# KONSTITUTIVNÍ ANDROSTANOVÝ RECEPTOR (CAR)

- formálně jaderný receptor (NR1I3); někdy Constitutive-Activated Receptor
- CAR je velmi podobný PXR - sdílejí aktivátory, cílové geny, dimerizační partnery a koaktivátory, responsivní elementy....
- transkripčně aktivní ve formě heterodimeru CAR/RXR
- v klidové formě je v cytosolu a po aktivaci translokuje do jádra
- mechanismus aktivace není přesně jasný - ligand-dependentní aktivace (ligandy CAR jsou vzácné) vs ligand-independentní aktivace (fosfatasy?)

## FUNKCE CAR

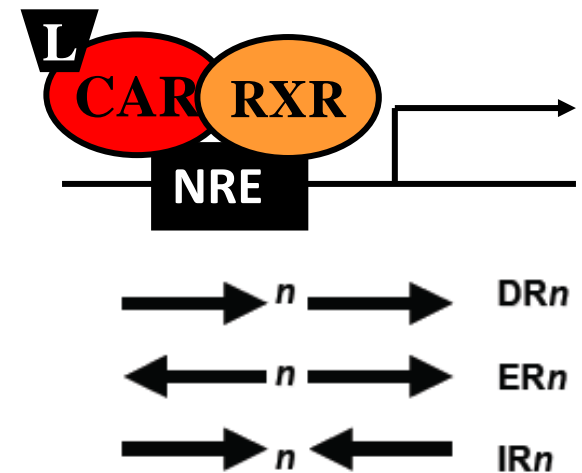
- regulace enzymů metabolizujících léčiva - tzv. „xenosenzor“
- regulace genů metabolismu lipidů, sacharidů, cholesterolu, žlučových kyselin
- exprimován v játrech, GIT, ledvinách

## AKTIVÁTORY CAR (ligandy nejsou známy)

- XENOBIOTICKÉ - barbituráty, fenytoin, léčiva
- ENDOGENNÍ - (?orphan?); bilirubin, farnesol

## CÍLOVÉ GENY CAR

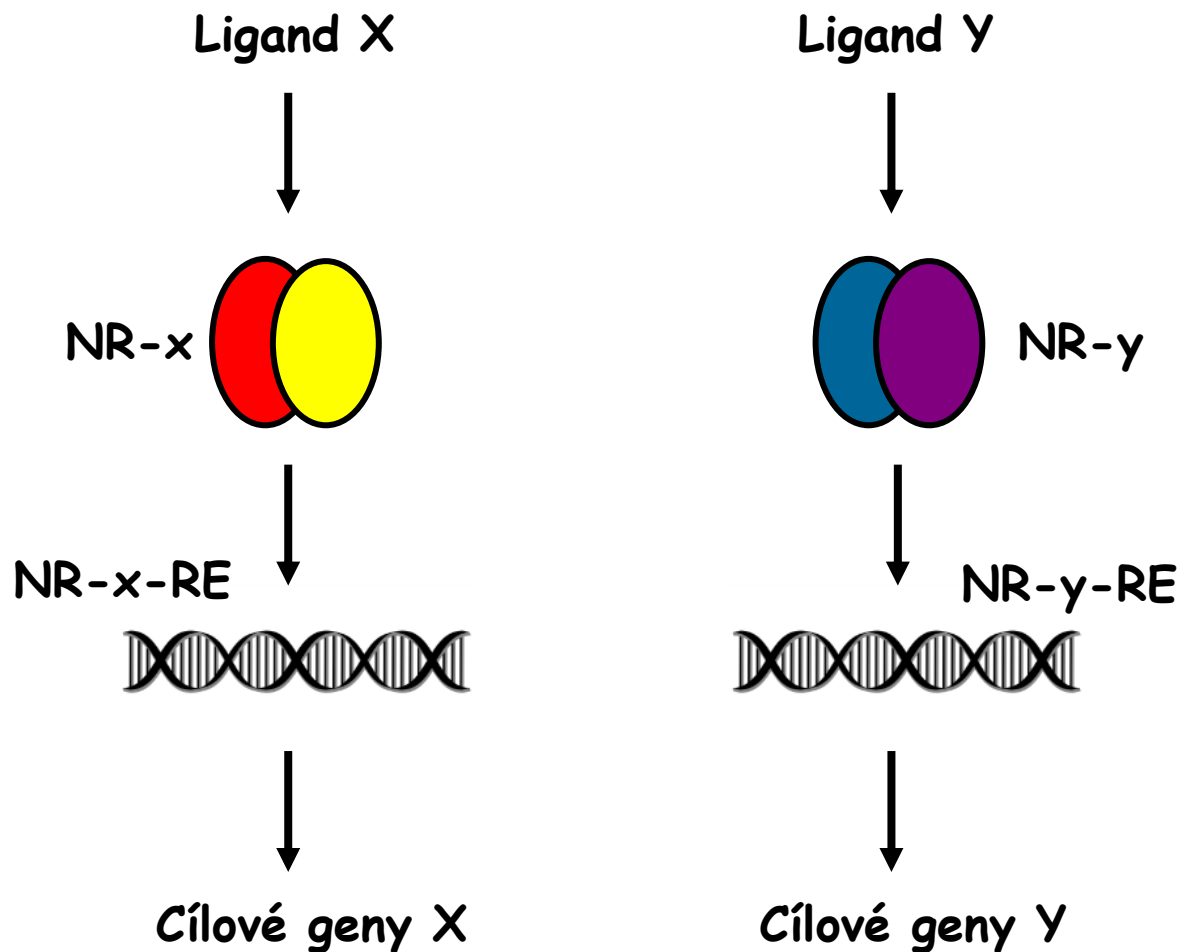
- detoxikační - CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A7, GSTs, STs, GSTs, MDR1, MRPs atd.
- ostatní - ALAS-1, ApoA1, HDLc atd.



NRE: AGGTCA-like

# RECEPTOR CROSS-TALKS

- mezi xenoreceptory, steroidními, thyroidními a retinoidními receptory existují různé funkční a transkripční vzájemné interakce, probíhající různými mechanismy - tzv. CROSS-TALKS
- významné fyziologické a patofyziologické dopady





# SDÍLENÍ LIGANDU

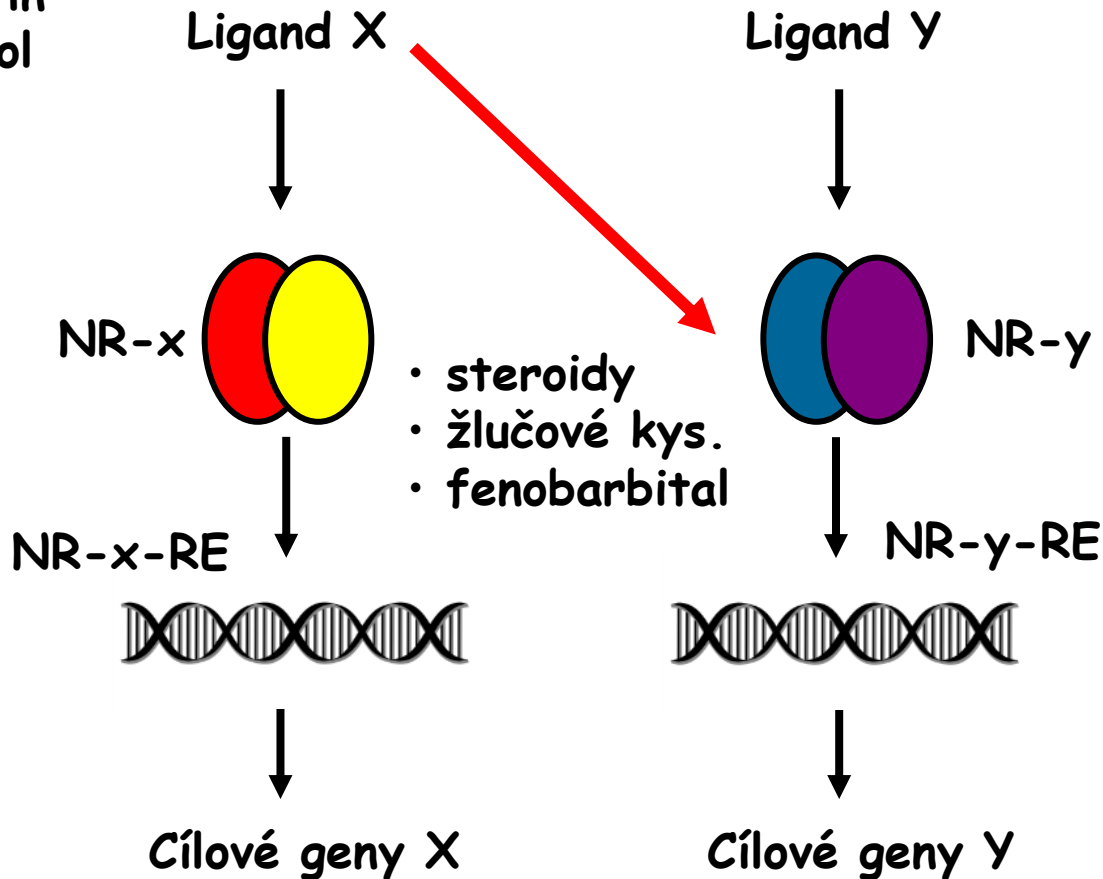
➤ Ligand „X“ se váže na receptor „NR-Y“

PXR ligandy

- rifampicin
- hyperforin
- omeprazol

CAR ligandy

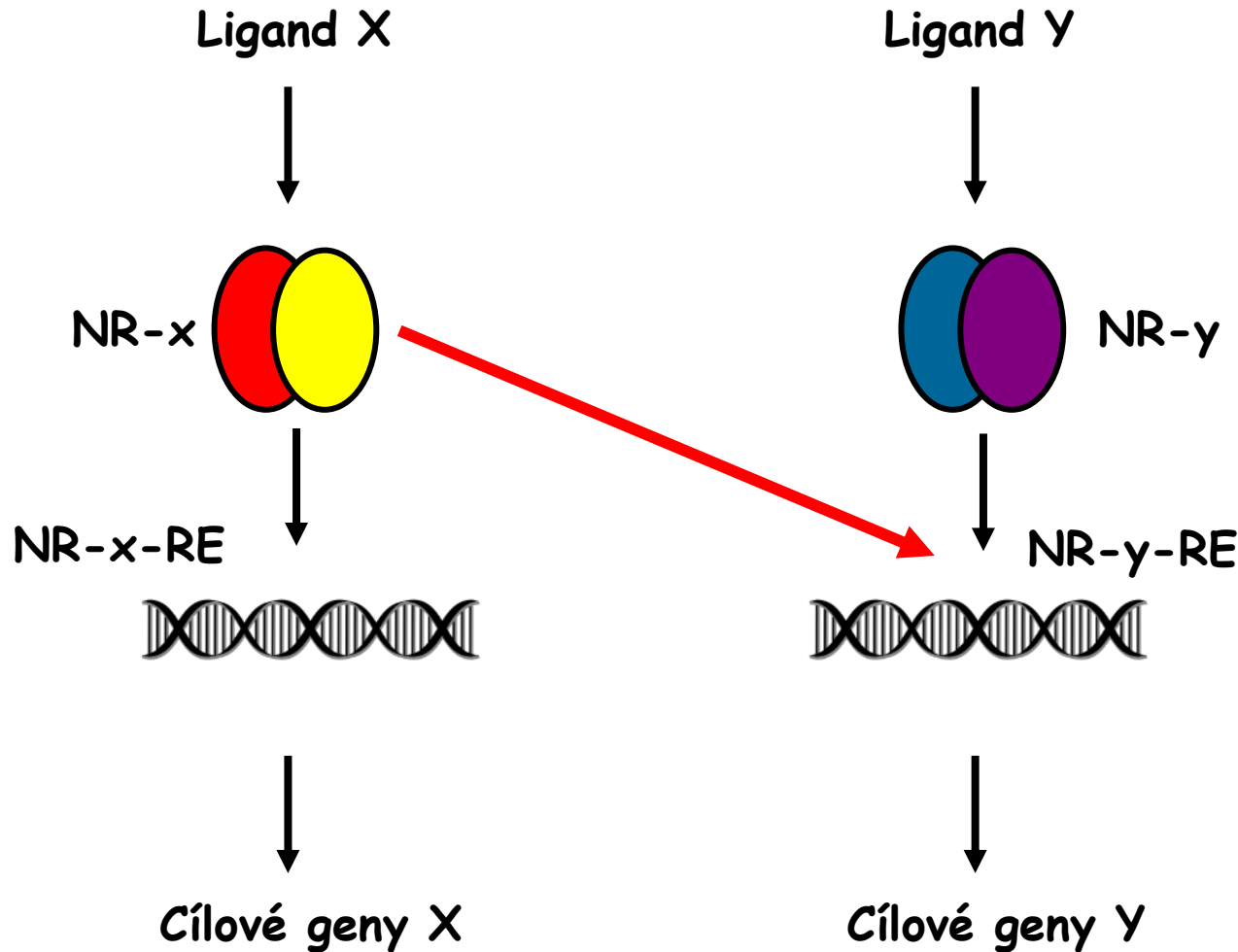
- CITCO
- bilirubin
- valproát



- CAR a PXR
- PXR a GR
- FXR a PXR
- FXR a VDR

# SDÍLENÍ RESPONSIVNÍHO ELEMENTU

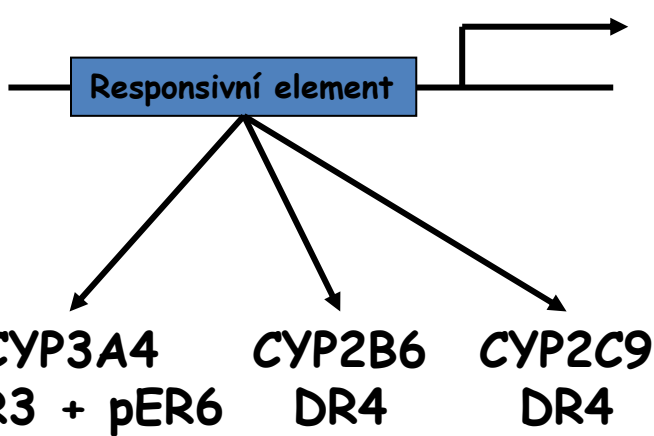
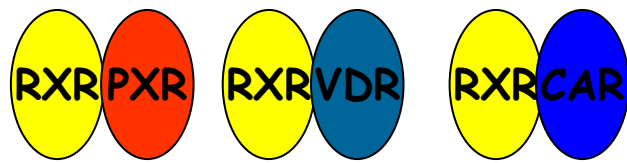
➤ Receptor „NR-X“ se váže do promotoru „NR-Y-RE“



- CAR a PXR
- PXR a VDR
- FXR a PXR/CAR

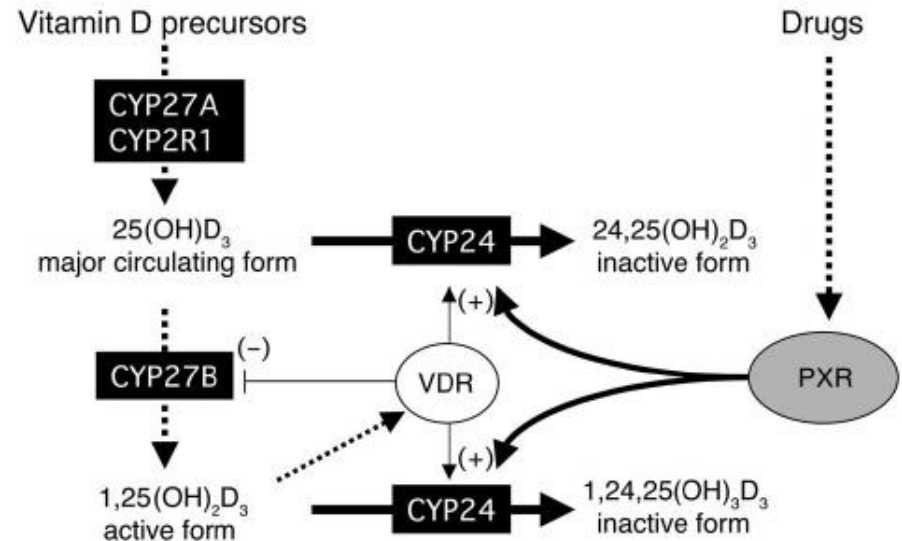
# SDÍLENÍ RESPONSIVNÍHO ELEMENTU

- responsivní element pro CYP3A4 váže VDR, PXR, CAR



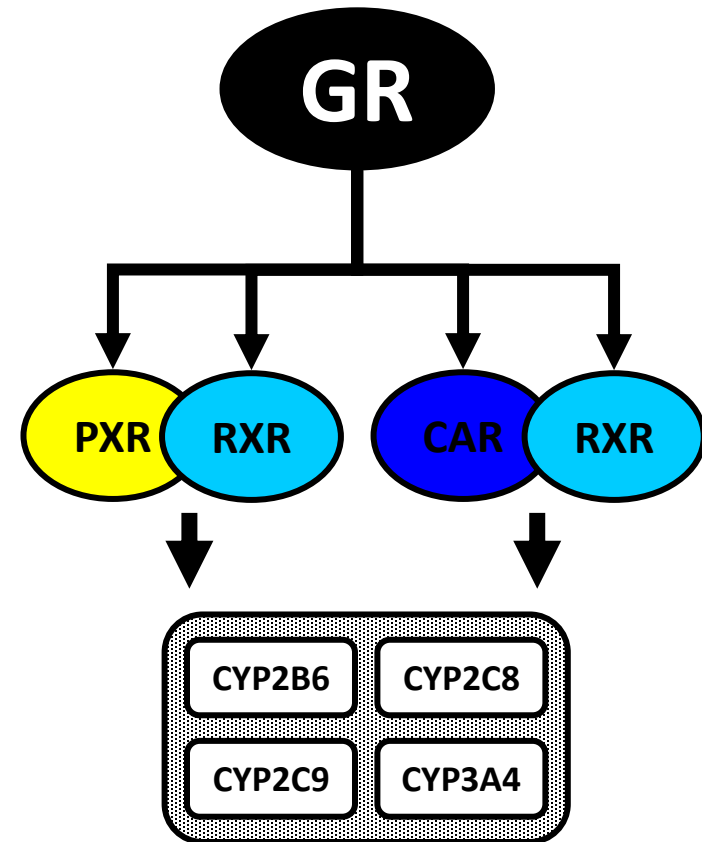
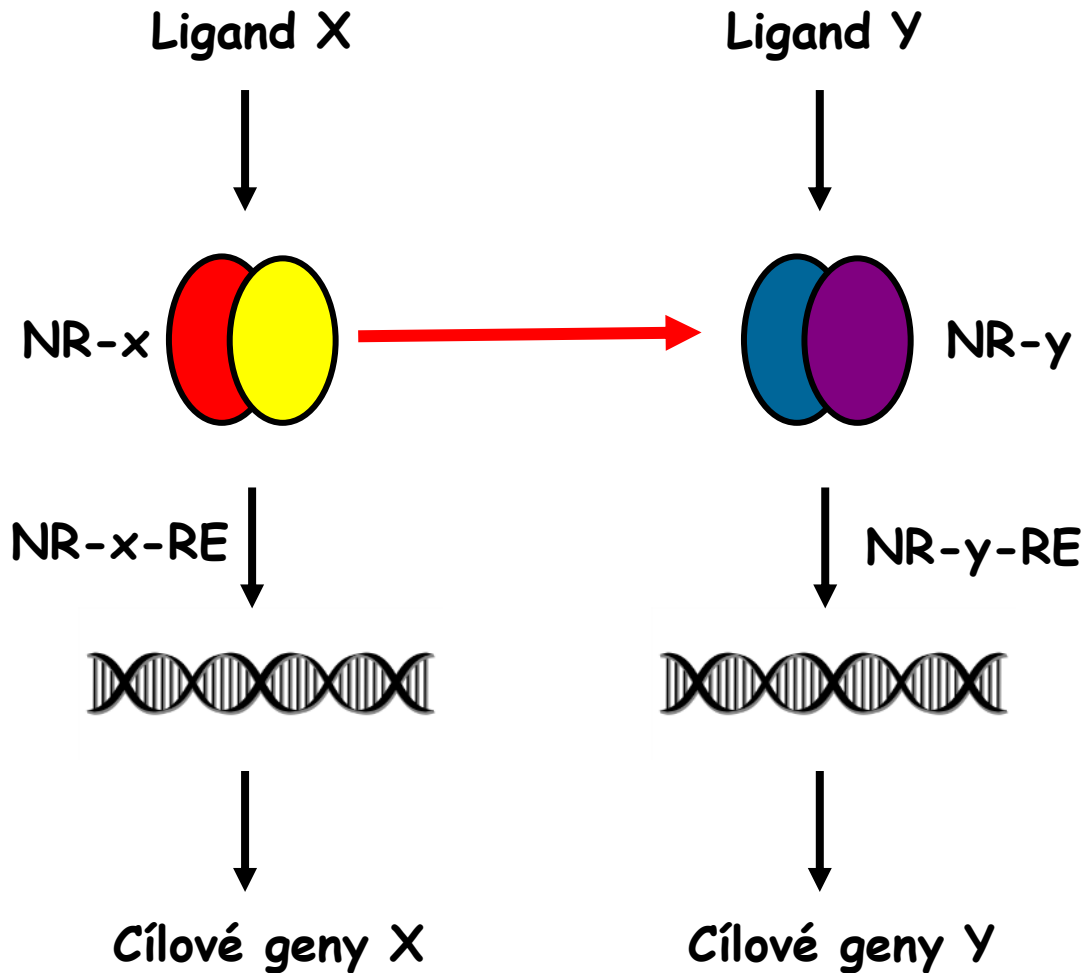
CYP3A4  
CYP2B6  
CYP2C9

- do VDRE se váže PXR
- léky vyvolaná osteomalacie - indukce CYP24 - zrychlený katabolismus vitamínu D (inaktivace)



# REGULACE REGULÁTORU

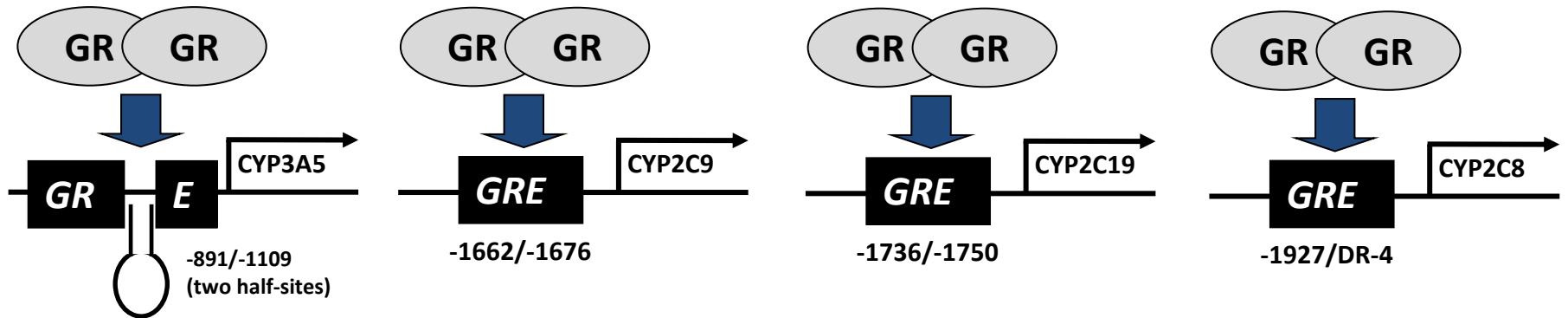
➤ receptor NR-x reguluje expresi receptoru NR-y



➤ kaskáda GR-PXR/CAR-P450

# MECHANISMY INDUKCE P450s GLUKOKORTIKOIDY

## Přímá vazba GR do promotoru



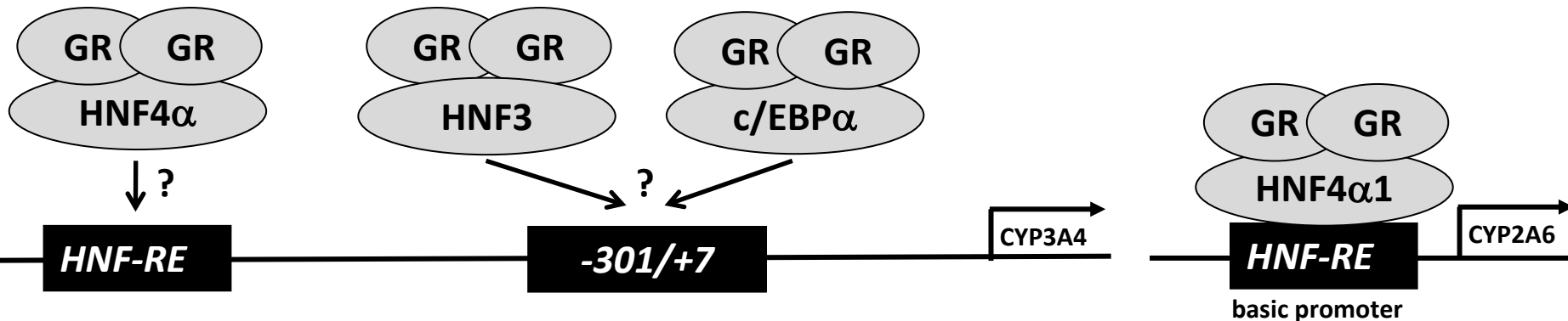
Schuetz (1996) *Mol Pharmacol*

Gerbal-Chaloin (2002) *J Biol Chem*

Chen (2003) *Mol Pharmacol*

Ferguson (2005) *Mol Pharmacol*

## Nepřímá vazba GR do promotoru



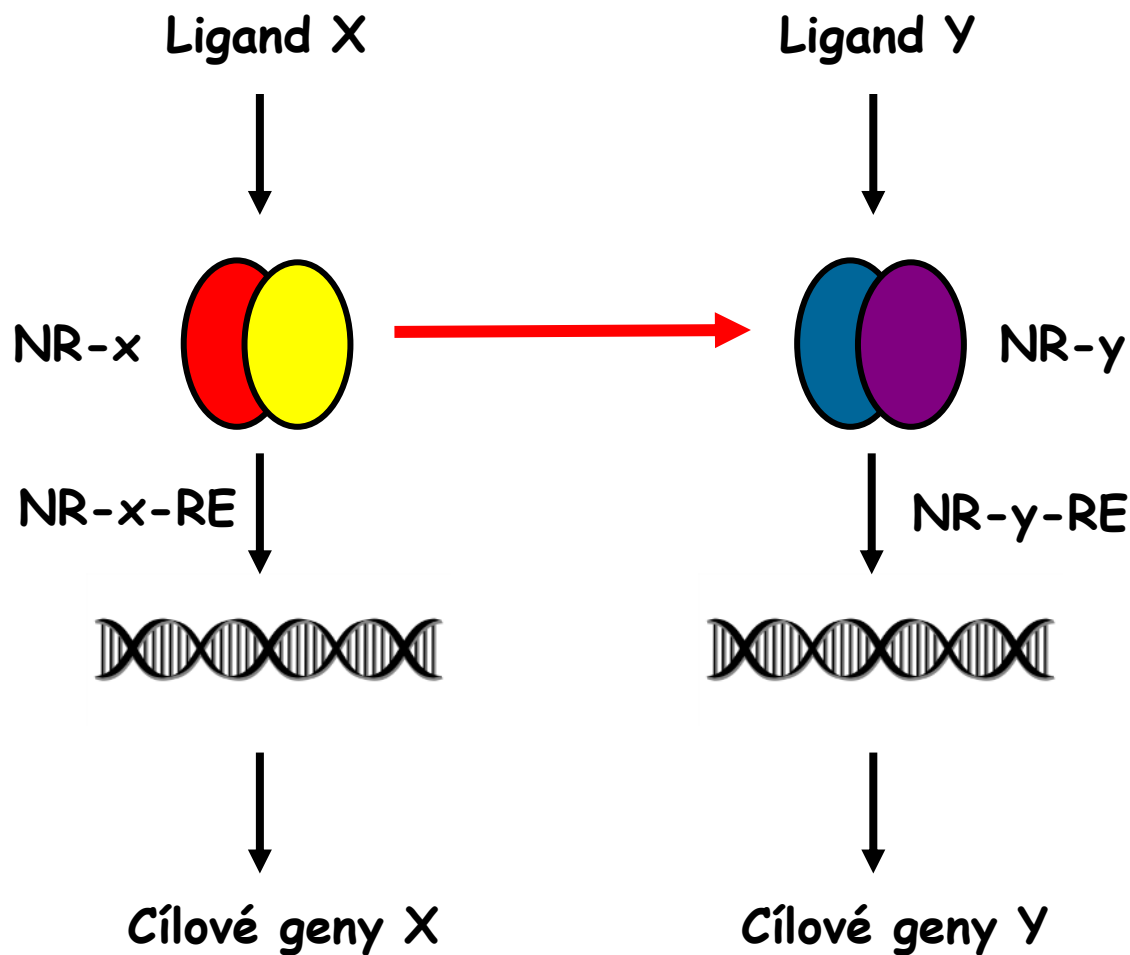
Pavek (2007) *Placenta*

El-Sankary (2002) *Drug Metab Dispos*

Onica (2008) *Mol Pharmacol*

# INTERAKCE PŘES KOAKTIVÁTOR

➤ receptor NR-x je koaktivátorem receptoru NR-y

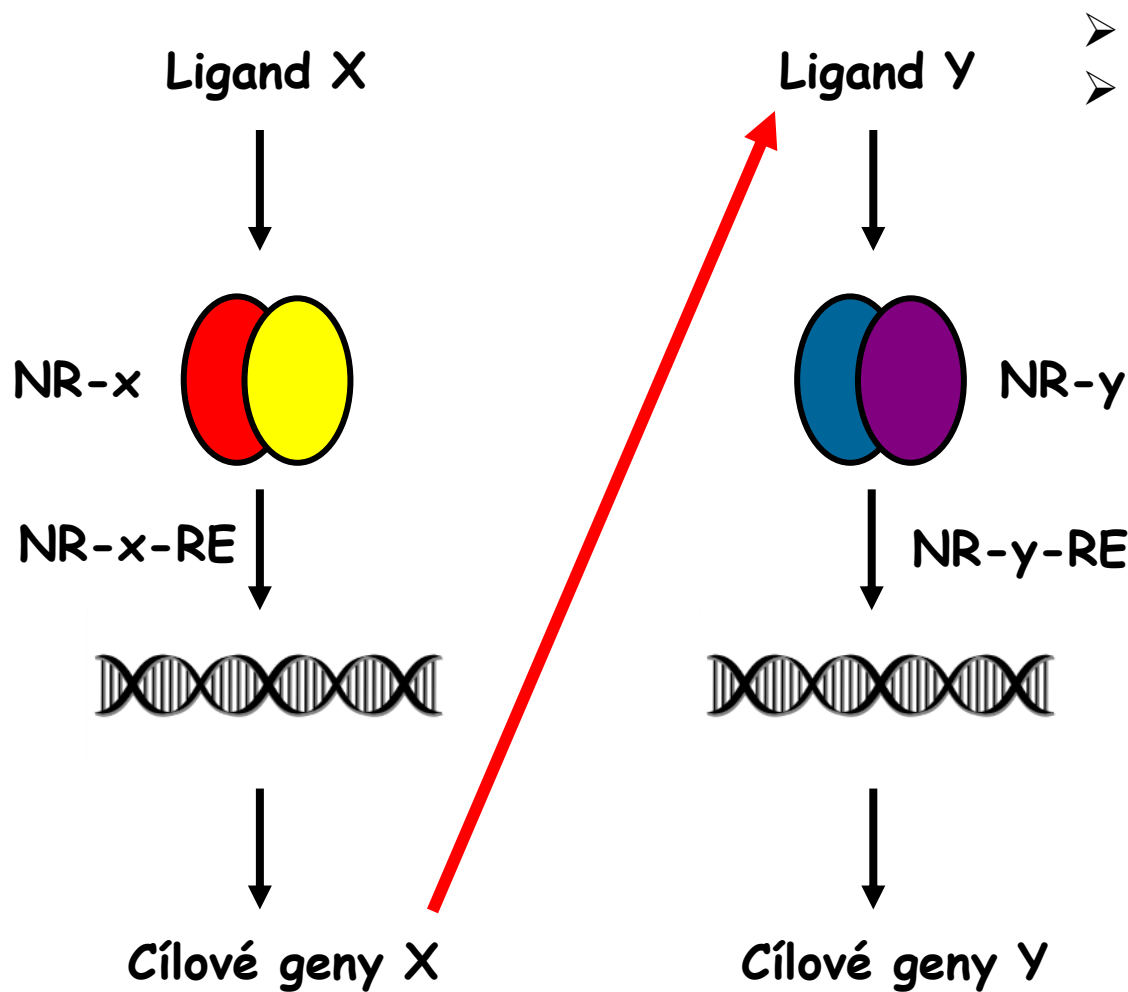


- AHR-ER
- CAR/PXR-FoxO1
- CAR/PXR-SHP

➤ AhR je koaktivátor ER

# METABOLISMUS LIGANDU CÍLOVÝM GENEM

➤ Gen „X“ mebatolizuje ligand „Y“



- CAR/PXR - T3/T4 (TR)
- CAR/PXR - AhR

- T3 a T4 jsou metabolizovány UGT1A1
- UGT1A1 je indukován přes CAR

# LÉKOVÉ INTERAKCE

- farmakodynamické - jsou předvídatelné, vychází se z mechanismu účinku
- farmakokinetické - *a priori* nepředvídatelné

## Lékové interakce - indukce P450 enzymu (cyclosporin vs rifampicin)

- pacient po transplantaci ledvin užívá imunosupresivum cyclosporin a antibiotikum rifampicin
- cyclosporin je substrátem CYP3A4
- rifampicin je silný induktor exprese CYP3A4
- metabolismus cyclosporinu je natolik akcelerovaný, že bez úpravy dávkování vymizí jeho terapeutický účinek → *organ rejection*

## Lékové interakce - inhibice P450 enzymu (cyclosporin vs ketokonazol)

- pacient po transplantaci ledvin užívá imunosupresivum cyclosporin a antimykotikum ketokonazol
- cyclosporin je substrátem CYP3A4
- ketokonazol je silný inhibitor enzymové aktivity CYP3A4
- metabolismus cyclosporinu je natolik zpomalený, že bez úpravy dávkování dojde k nárůstu plasmatické koncentrace nad bezpečnou mez → *nefrotoxicita*