

Prof. Giorgio Sartor

Enzimi di fase I Citocromo P450

Copyright © 2001-2012 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 3.7 – nov 2012

Citocromo P450 (CYP)

- Enzima microsomiale, il più versatile tra gli enzimi di fase I.
- Inducibile.
- Anche conosciuto come ossidasi a funzioni miste (MFO).
- Proteina che contiene un gruppo eme
 - Il complesso formato dal Fe^{2+} e CO ha uno spettro di assorbimento con massimo centrato a 450 nm (447-452) nm.

CYP

- Ossida gli xenobiotici usando il NADPH come cofattore e O₂
- La reazione procede come ciclo catalitico:
 $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \longrightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$
- Non è attivo contro tutti i contaminanti (specialmente gli alogeni)
- In alcuni casi genera prodotti tossici (epossidi)
- L'induzione delle MFO è un sistema di biomarcatura

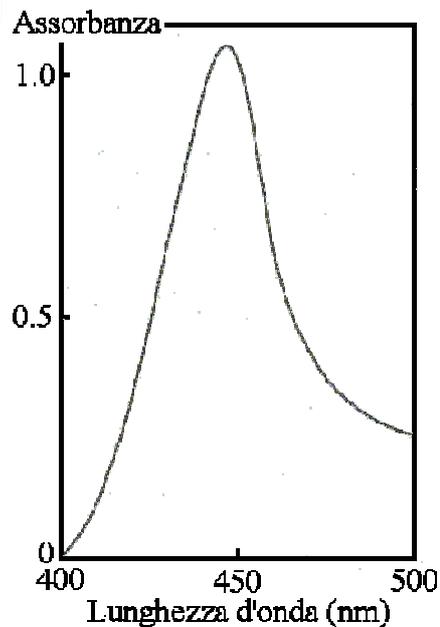
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 3 -

Assorbimento del gruppo eme

- Tipo I: ferro ad alto spin (385-394 nm)
- Tipo II: ferro a basso spin, legame diretto al ferro (416-420 nm), shiftato spesso a lunghezze d'onda maggiori (CO: 450 nm)

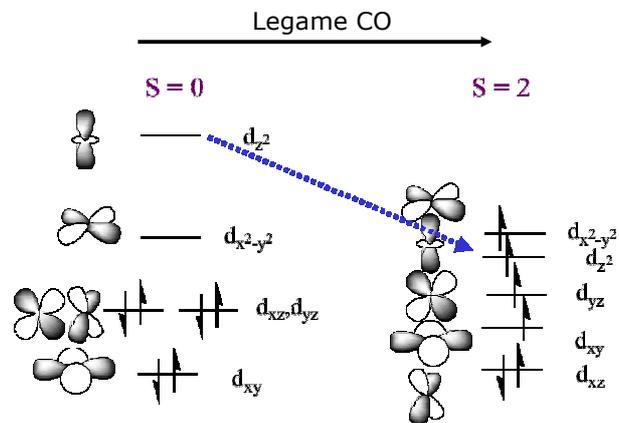


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 4 -

Configurazione elettronica del Fe(II)

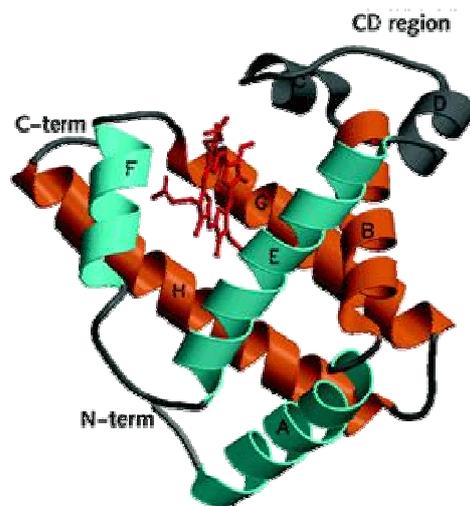


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 5 -

Struttura

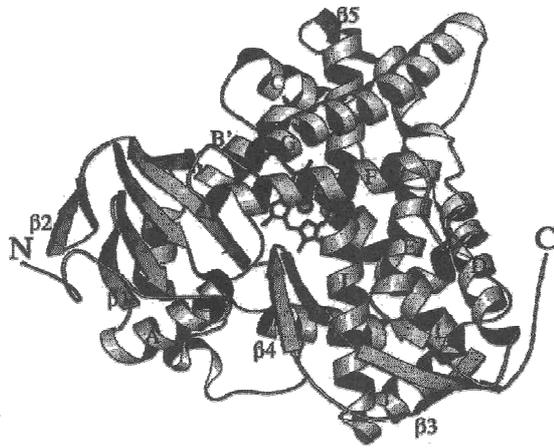


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 6 -

Struttura

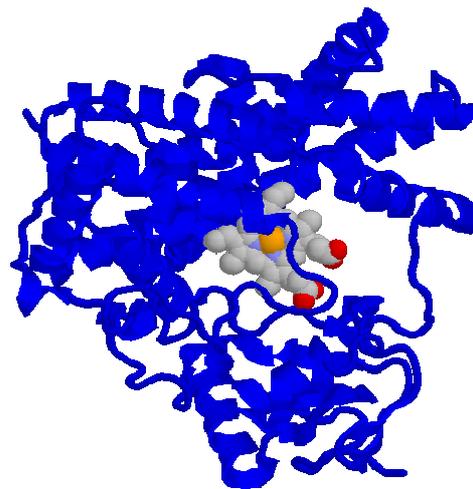


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 7 -

Struttura



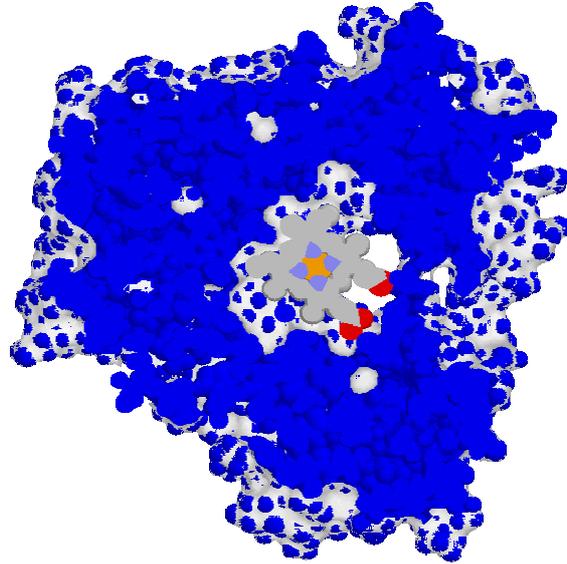
1PO5

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 8 -

Struttura



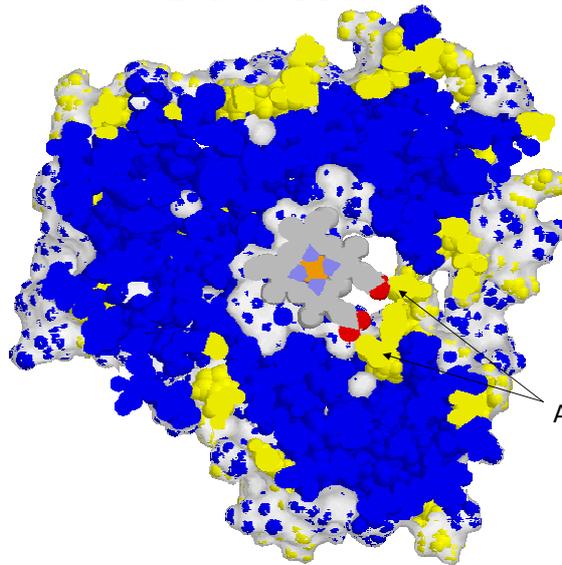
1PO5

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 9 -

Struttura



AA basici

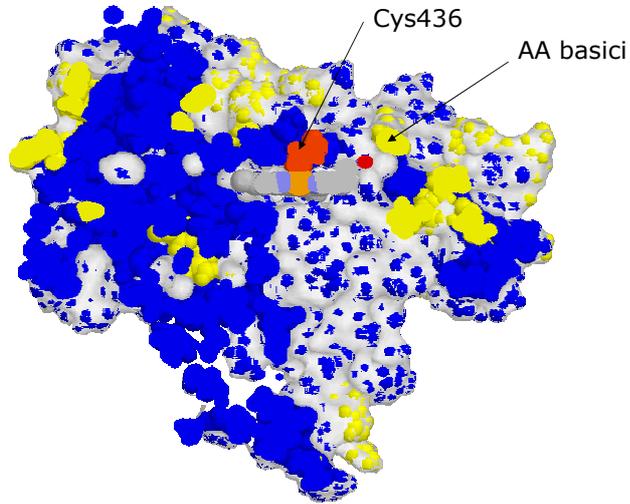
1PO5

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 10 -

Struttura



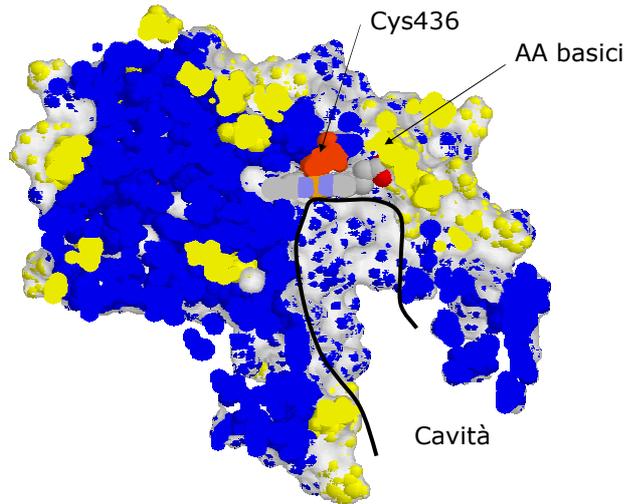
1PO5

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 11 -

Struttura



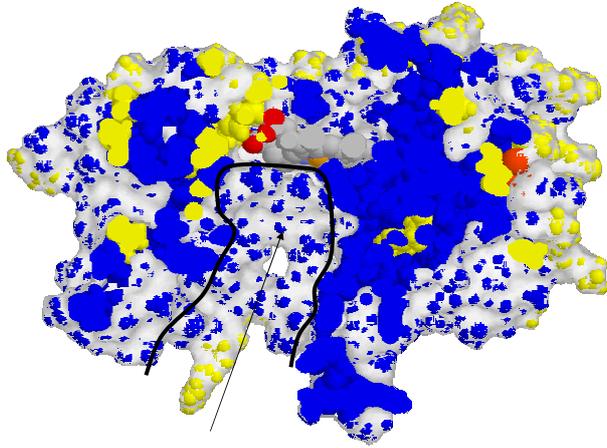
1PO5

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 12 -

Struttura



1P05

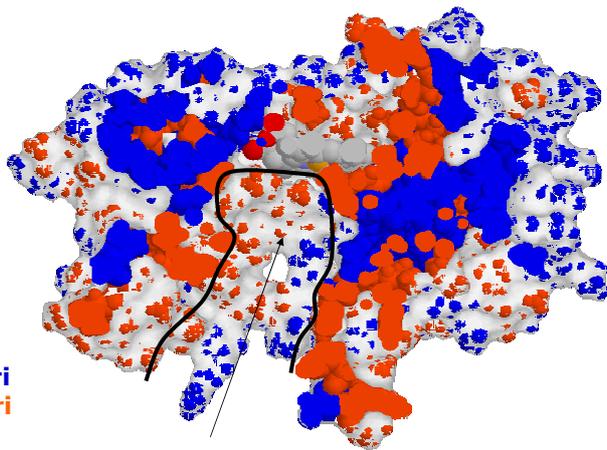
Cavità

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 13 -

Struttura



AA polari
AA neutri

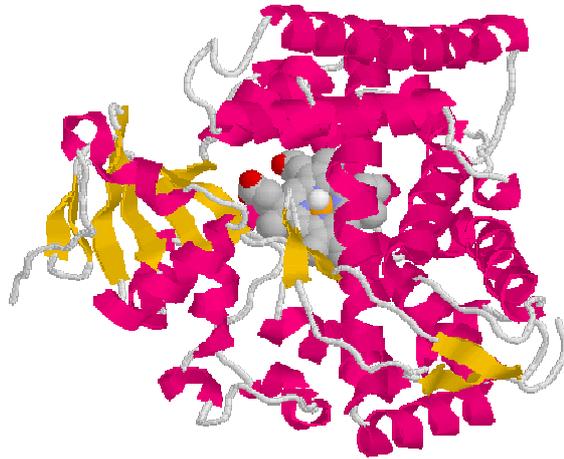
Cavità

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 14 -

Struttura

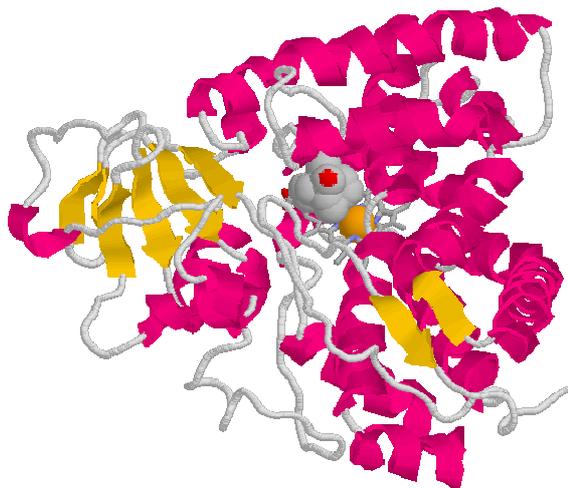


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 15 -

Struttura

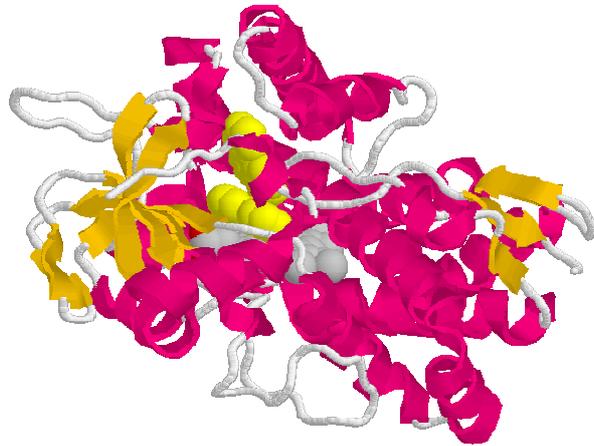


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 16 -

Struttura del CYP

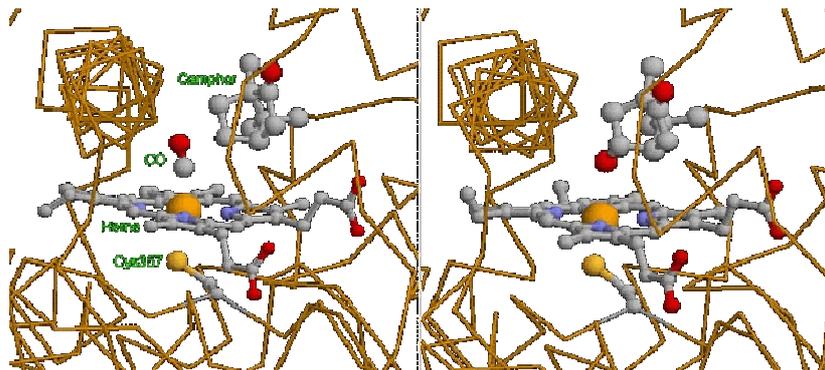


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 17 -

Sito di legame

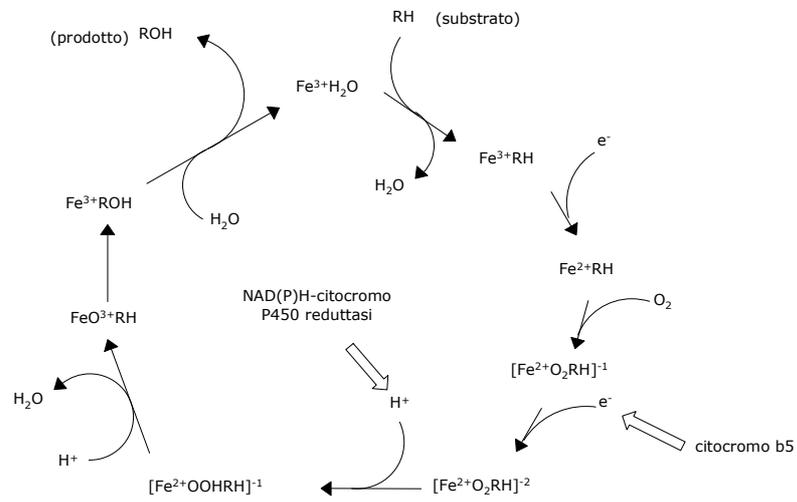


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 18 -

Ciclo semplificato del CYP

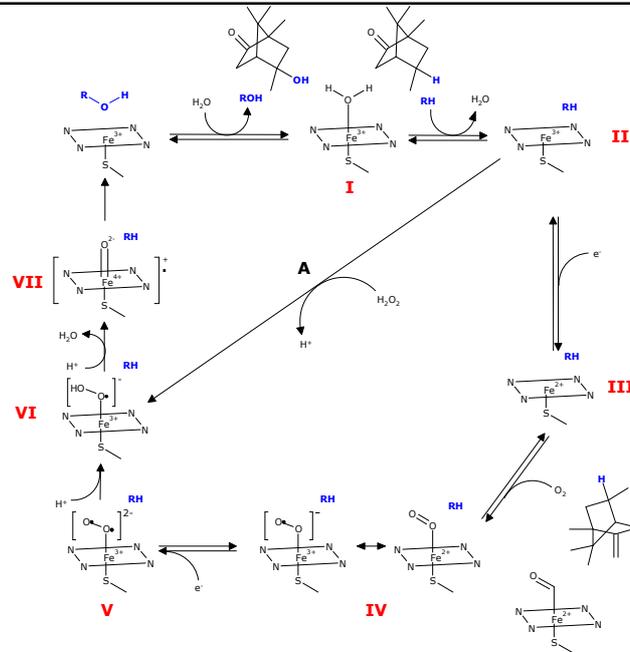


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 19 -

Meccanismo ciclico del CYP



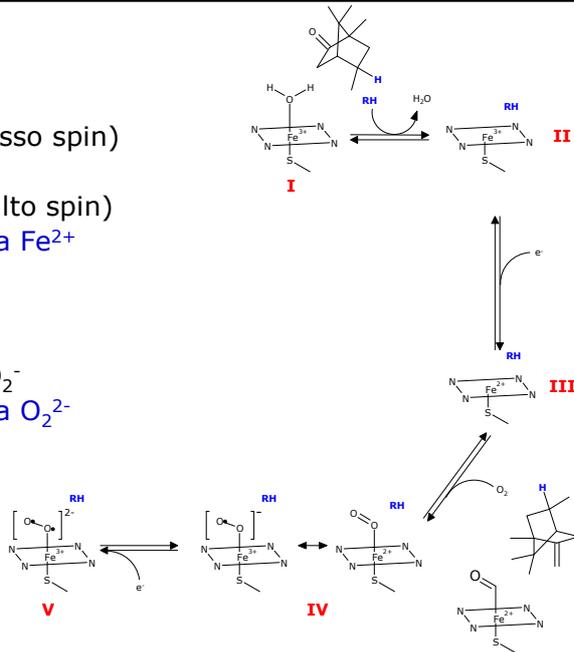
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 20 -

Meccanismo ciclico del CYP

- I. P450 acqua Fe^{3+} (basso spin)
Lega RH
- II. P450 canfora Fe^{3+} (alto spin)
entra $1e^-$, riduzione a Fe^{2+}
- III. P450 canfora Fe^{2+}
Lega O_2
- IV. P450 con O_2 legato,
equivalente a $\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^-$
entra $1e^-$, riduzione a O_2^{2-}
- V. P450 perossido



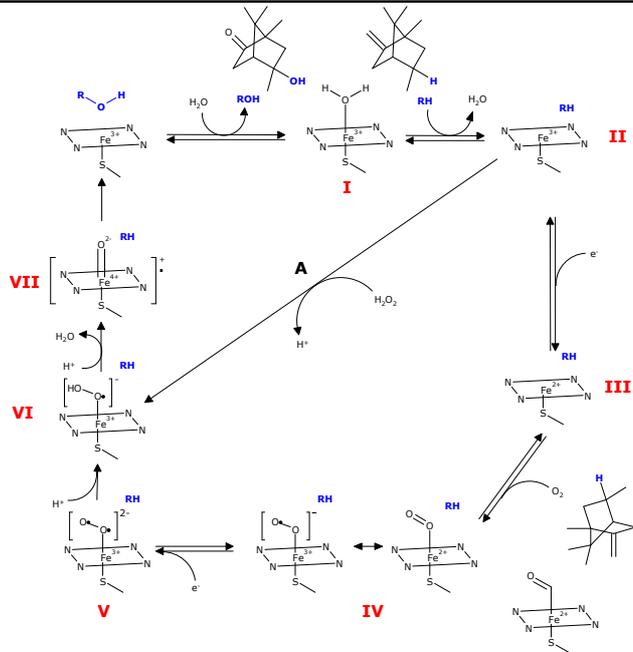
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 21 -

Meccanismo ciclico del CYP

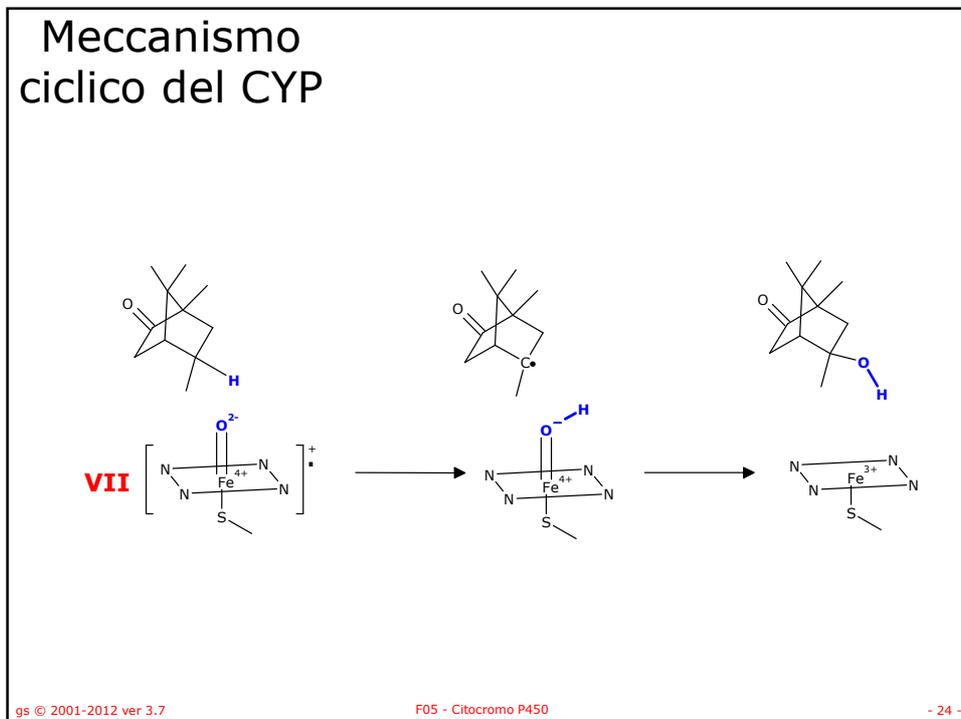
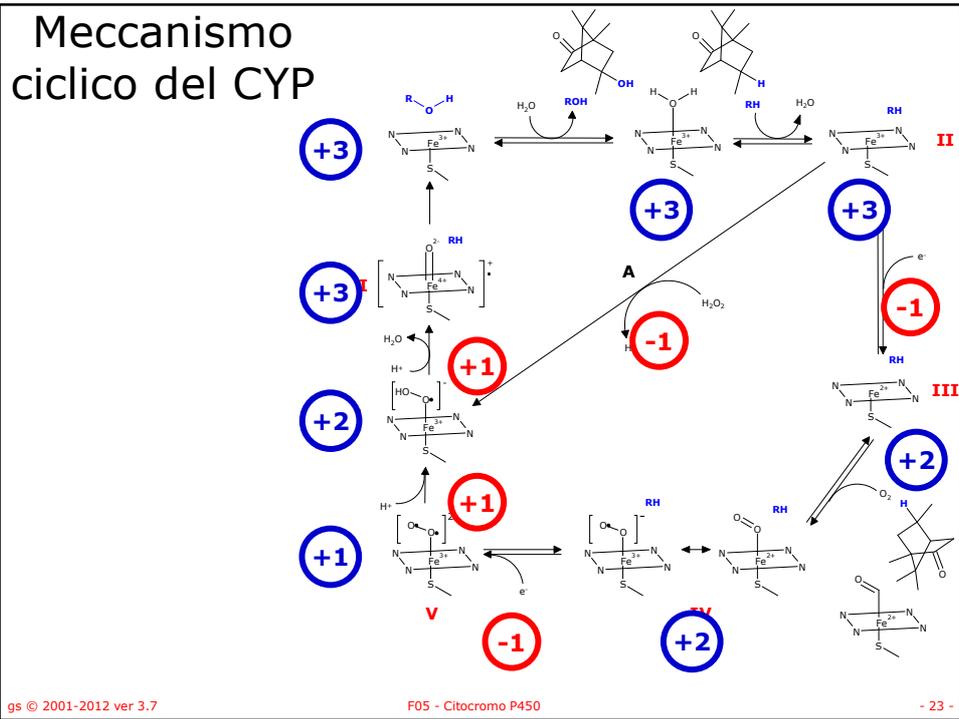
- VI. P450 idroperossido
Entra 1H^+
Entra 1H^+ esce H_2O
- VII. P450 $\text{Fe}^{4+} \text{O}_2^-$
catione radicale sulla proteina
si forma ROH
- A. L'idroperossido VI
si può formare
per reazione di II
con H_2O_2



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 22 -



Meccanismo

- L'ossigeno è legato non ad angolo 180°.
- Il legame dell'ossigeno allontana il ligando (RH) solo dopo che i due atomi di ossigeno si sono ridotti il ligando si riavvicina. Ciò previene la formazione di ROS.
- Gli elettroni per la riduzione dell'ossigeno sono forniti da una proteina Fe-S (P450 batterica o mitocondriale) o da una NADPH-citocromo P450 ossidoreduttasi FAD/FMN dipendente (microsomi).

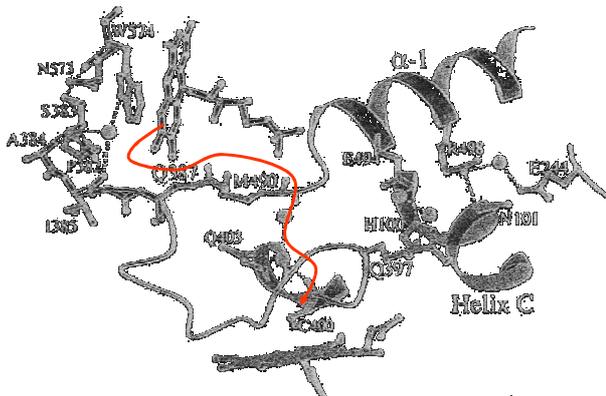
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 25 -

Meccanismo

- Nel complesso con la NADPH-citocromo P450 ossidoreduttasi si muove attraverso lo scheletro della proteina

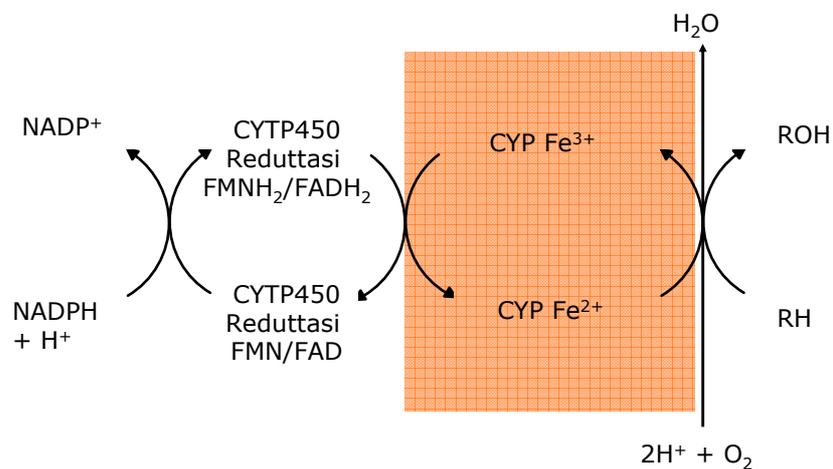


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 26 -

Meccanismo generale del CYP

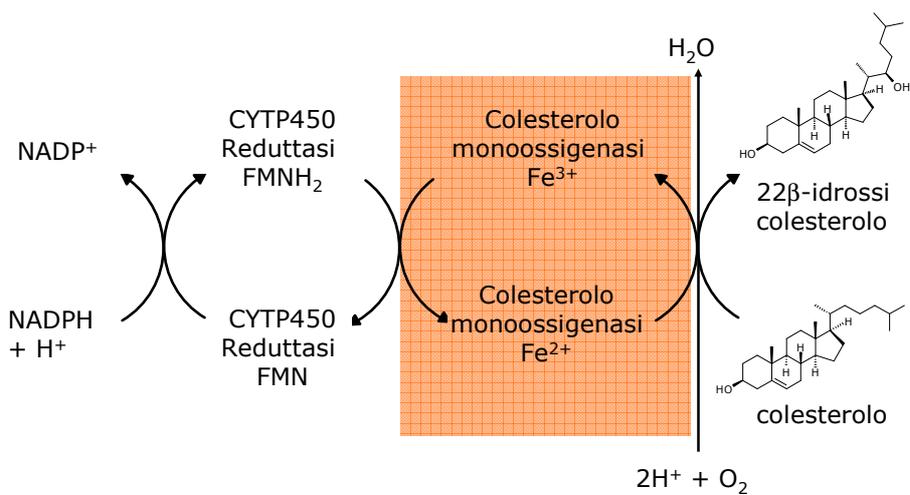


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 27 -

Colesterolo monoossigenasi (CYTP450scc - EC 1.14.15.6 - CYP11A)



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 28 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

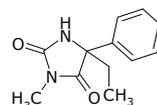
- Idrossilazione di aromatici
- Epossidazione di aromatici
- Idrossilazione di alifatici
- Epossidazione di alcheni
- N-dealchilazione
- O-dealchilazione
- S-sealchilazione
- N-ossidazione
- N-idrossilazione
- S-ossidazione
- Ossidazione di aldeidi
- Aromatizzazione di androgeni
- Ossidazione dell'alotano
- Riduzione dell'alotano
- Ossidazione dell'arginina
- Taglio della catena laterale del colesterolo
- Deidrogenazione
- Dealogenazione
- Azoriduzione
- Deaminazione
- Desolforazione
- Idrolisi di ammidi
- Idrolisi di esteri
- Perossidazione
- Denitrazione

Più almeno altre 20

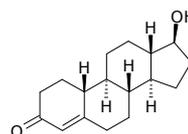
Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Idrossilazione di atomi di carbonio alifatici o aromatici

- Da (*S*)-mefentoina a 4'-idrossi-(*S*)-mefentoina (CYP2C19)

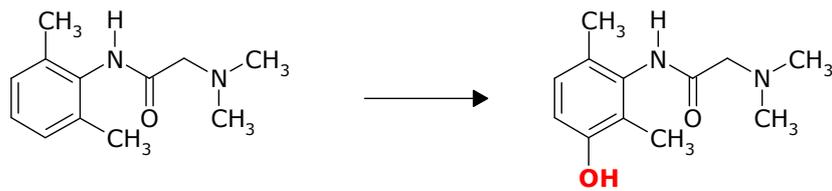


- Da testosterone a 6 α -idrossitestosterone (CYP3A4)



Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Idrossilazione di atomi di carbonio aromatici
 - Idrossilazione della linocaina



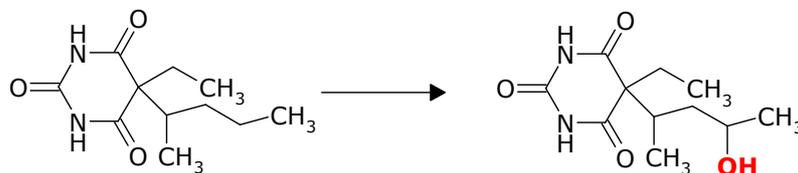
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 31 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Idrossilazione di atomi di carbonio alifatici
 - Idrossilazione del pentobarbitone



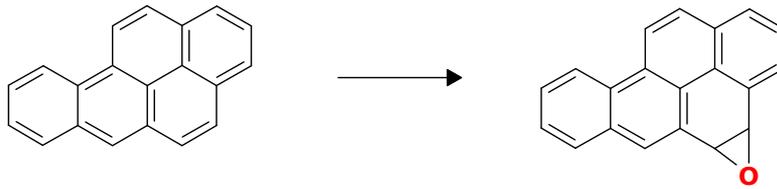
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 32 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Epossidazione
 - Formazione di benzo[α]pirene-4,5,epossido



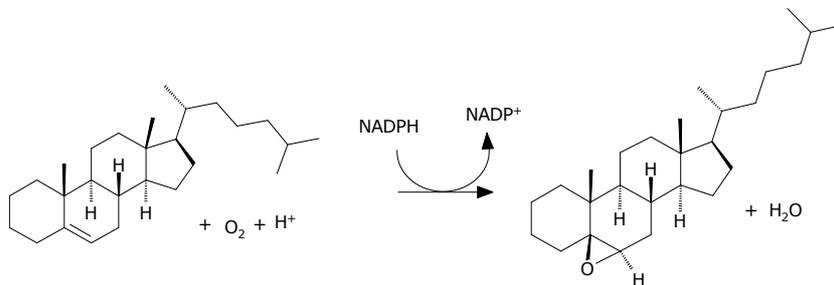
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 33 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Epossidazione
 - Da 5-colestene a 5,6 β -epossi-5 β -colestano



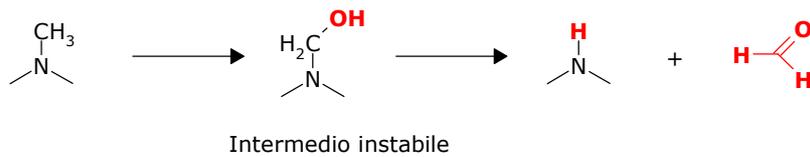
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 34 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione
 - Meccanismo della dealchilazione



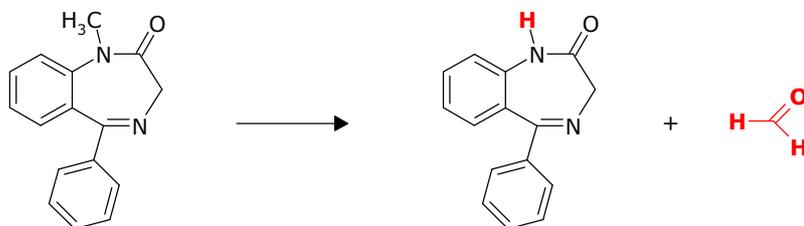
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 35 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione
- N-demetilazione del diazepam



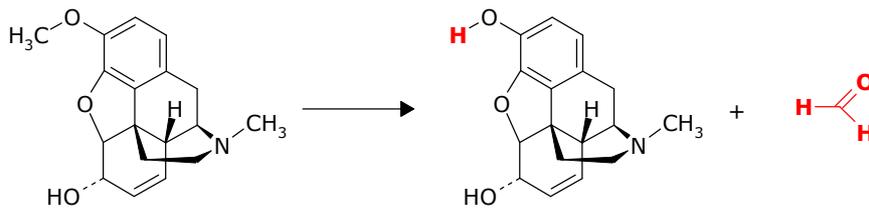
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 36 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione
 - O-demetilazione della codeina



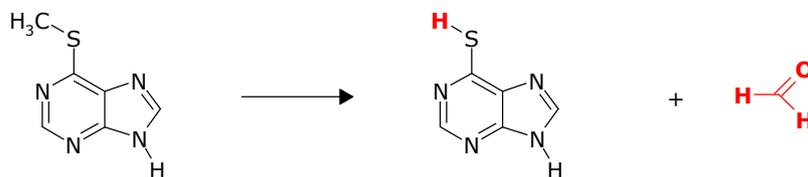
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 37 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione
 - S-demetilazione della S-metiltiopurina



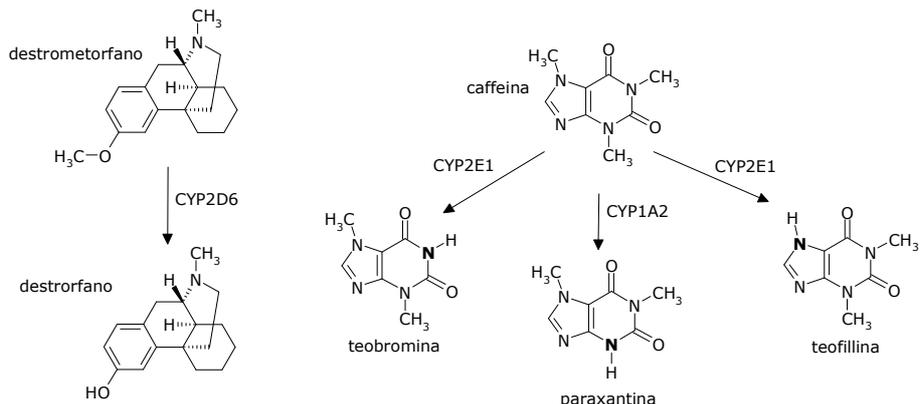
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 38 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione di eteroatomi
 - *O*-dealchilazione (da destrometorfano a destrorfano)
 - *N*-demetilazione della caffeina



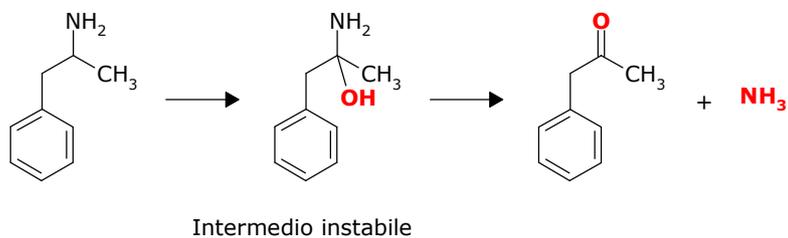
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 39 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Deaminazione ossidativa
 - Meccanismo di deaminazione dell'anfetamina



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 40 -

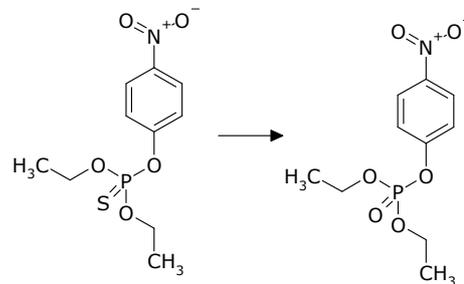
Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Trasferimento di gruppo per via ossidativa

- N, S, X

rimpiazzato con O

- Da parathion a paroxon (da S a O)
- Attivazione dell'alotano a trifluoroacetilcloruro



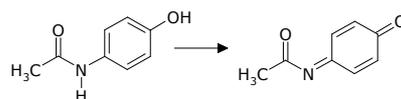
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 41 -

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Scissione di esteri
 - Scissione del gruppo funzionale con O nel gruppo uscente
 - Da loratadina a lorantadina desacetilata (CYP3A4, 2D6)
- Deidrogenazione
 - Astrazione di due H con formazione di C=C
 - Attivazione di acetaminofene al metabolita epatotossico *N*-acetilbenzochinoneimina



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 42 -

Varietà

- Oltre 4000 isoforme di CYP sono state identificate nella biosfera.
- Il genoma umano contiene 60 distinti geni CYP che sono stati raggruppati in base alla similarità di sequenza in
 - 18 famiglie geniche suddivise a loro volta in 42 sottofamiglie

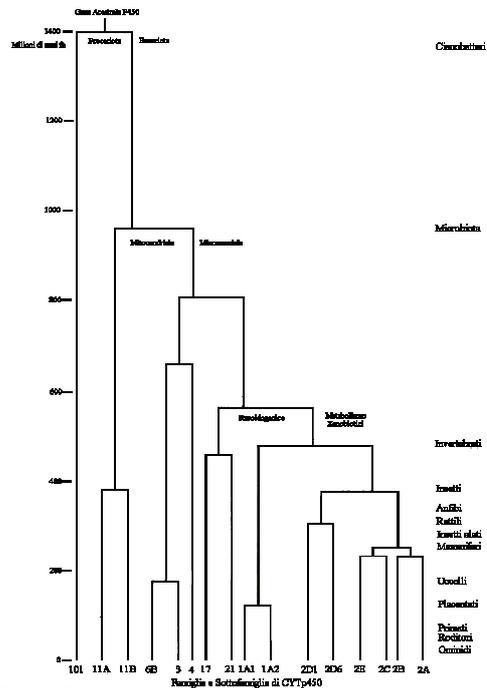
Varietà

- Le famiglie di CYP:
- 1-3: coinvolte nel metabolismo di xenobiotici
 - Delle 22 isoforme delle famiglie 1, 2 e 3 solo 6 isoforme sono interessate al metabolismo di fase I
- Le altre sono coinvolte nel metabolismo di composti endogeni: steroidi, eicosanoidi ecc.
- Spesso la stessa trasformazione è catalizzata da diverse isoforme, nel caso predomina quella con K_m minore.

La famiglia del Citocromo P450

- Ha molti membri:
 - 450 nel riso, 57 nell'uomo, 84 nel topo, 10 nella Chlamydomonas

- Filogenesi



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 45 -

Una classificazione degli isoenzimi

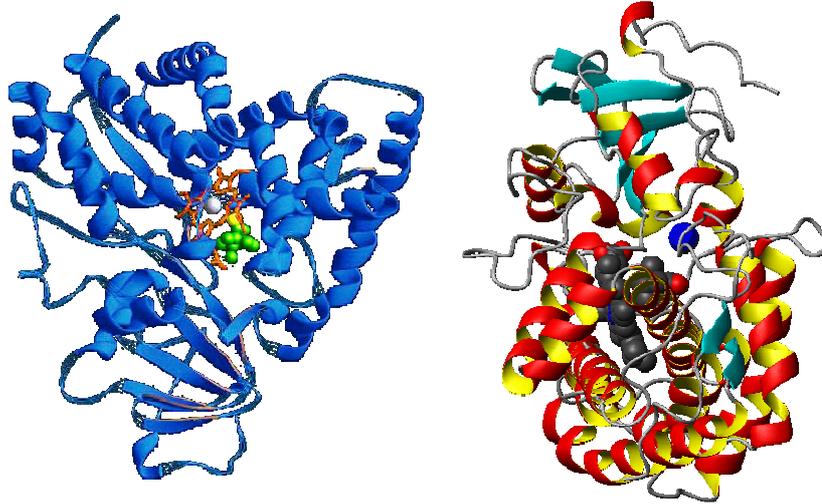
Classe	Caratteristiche
1	In mitocondri di cellule eucariote e batteriche. Associato con una proteina Fe-S e assistito da una reduttasi NADH dipendente che contiene FAD o FMN.
2	Nel reticolo endoplasmatico (microsomi) di cellule eucariote. Implicato nel metabolismo di composti esogeni. Il partner redox di questa classe è una NADPH-citocromoP450 reduttasi.
...	

gs © 2001-2008 ver 3.6
gs © 2001-2012 ver 3.7

Citocromo P450
F05 - Citocromo P450

- 46 -
- 46 -

Citocromo P450 classe 1

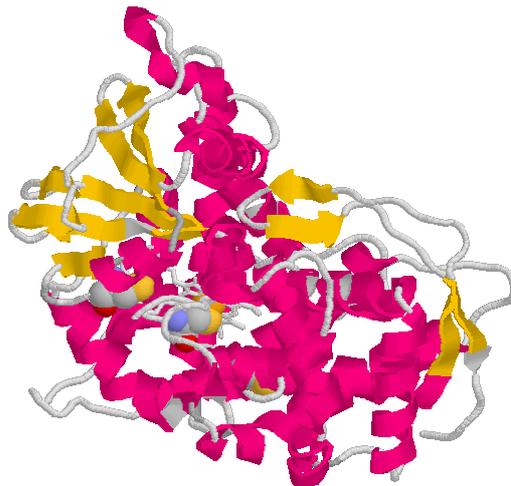


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 47 -

Citocromo P450 classe 1

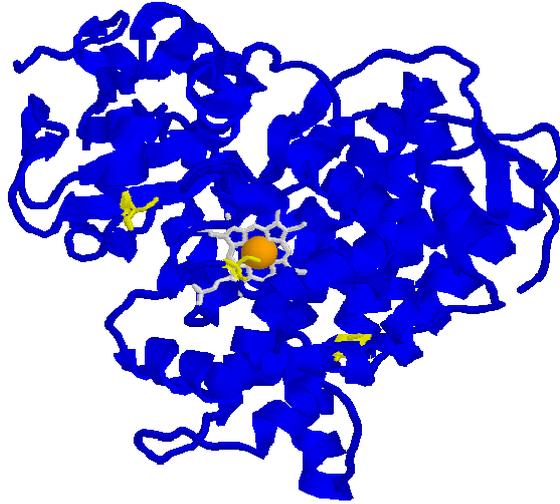


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 48 -

Citocromo P450 classe 1

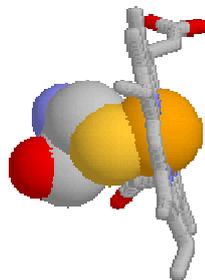


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 49 -

Citocromo P450 classe 1

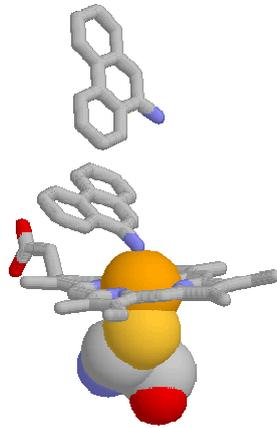


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 50 -

Citocromo P450 classe 1



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 51 -

Una classificazione degli isoenzimi

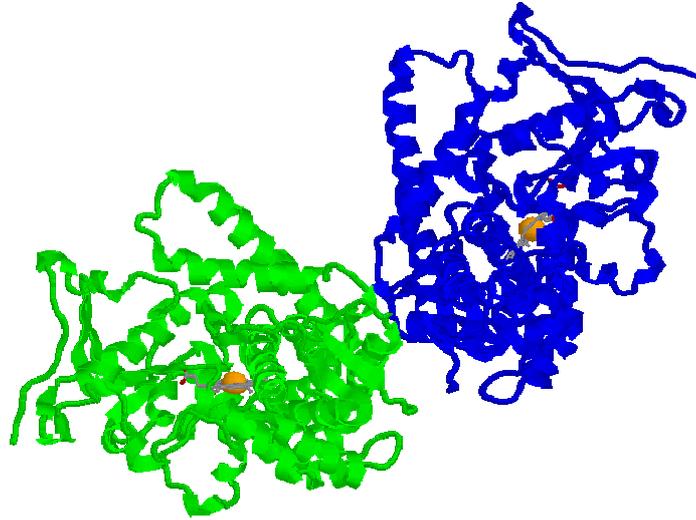
Classe	Caratteristiche
1	In mitocondri di cellule eucariote e batteriche. Associato con una proteina Fe-S e assistito da una reduttasi NADH dipendente che contiene FAD o FMN.
2	Nel reticolo endoplasmatico (microsomi) di cellule eucariote. Implicato nel metabolismo di composti esogeni. Il partner redox di questa classe è una NADPH-citocromo P450 reduttasi.
...	

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 52 -

Citocromo P450 classe 2



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 53 -

Citocromo P450 classe 2

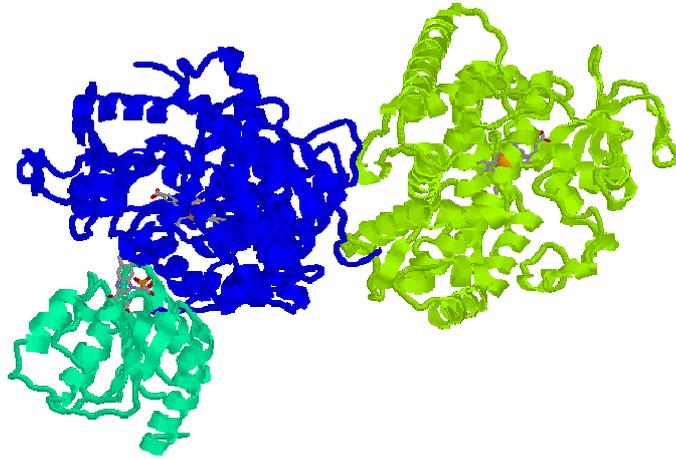


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 54 -

Citocromo P450 classe 2 e dominio legante FMN della NADPH reduttasi

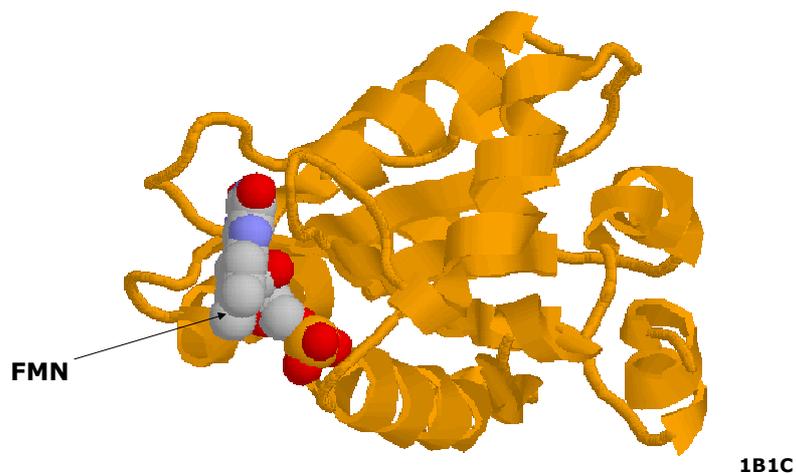


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 55 -

Citocromo P450 Reduttasi (EC:1.6.2.4)

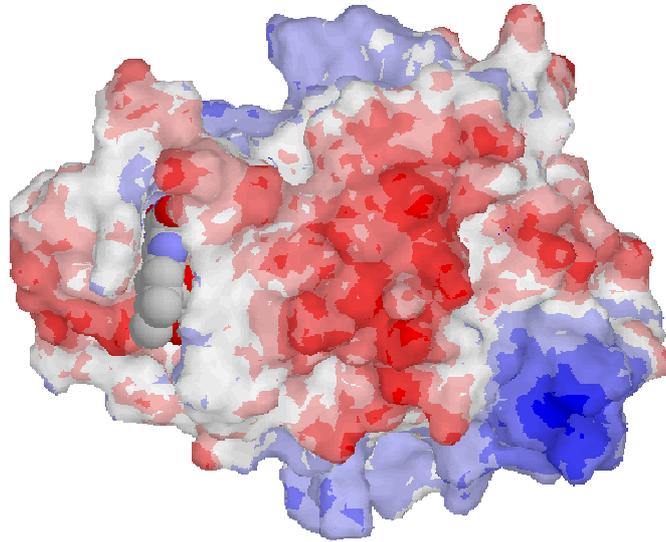


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 56 -

Citocromo P450 Reduttasi (EC:1.6.2.4)

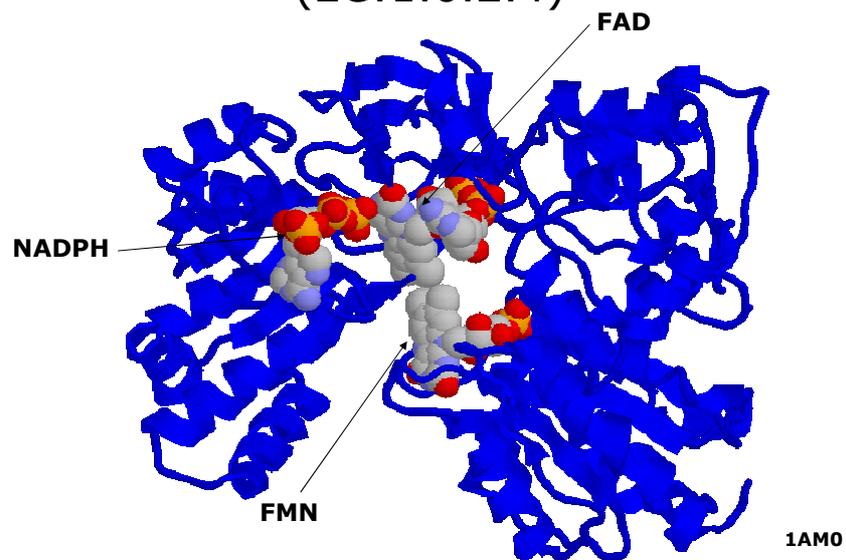


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 57 -

NADPH-Citocromo P450 Reduttasi (EC:1.6.2.4)



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 58 -

Gli isoenzimi

- A. **Degradano xenobiotici:** CYP1, CYP2A..2E, CYP3
- B. **Coinvolti nel metabolismo degli steroidi:** CYP2G1, CYP7, CYP8B1, CYP11, CYP17, CYP19, CYP21, CYP27A1, CYP46, CYP51
- C. **Metabolismo degli acidi grassi** (specialmente arachidonato e suoi metaboliti): CYP2J2, CYP4, CYP5, CYP8A1
- D. **Altri substrati:** CYP2R1 (?), CYP2S1 (?), CYP24 (Vitamina D), CYP26 (acido retinoico), CYP27B1 (Vitamina D), CYP39 (?)

Famiglie nell'uomo

- 18 famiglie geniche suddivise a loro volta in
 - CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 e CYP51
 - 42 sottofamiglie
- http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_10/Table.htm
- [Strutture](#)

Alcuni componenti nell'uomo

Denominazione	Espresso in	Substrati	Induttori	Inibitori	Polimorfismo genetico
CYP1A1/2	Fegato Polmoni Pelle Placenta	Caffeina Teofillina	Fumo di sigarette Carne alle braci	Furafilline α -naftoflavone (reversibile)	
CYP2B6	Fegato	Diazepam Fenantrene	?	Orfenandrina	
CYP2C19		Fenitoina Piroxicam Tolbutamide Warfarin	Rifampin	Sulfafenazolo	Si

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 61 -

Alcuni componenti nell'uomo

Denominazione	Espresso in	Substrati	Induttori	Inibitori	Polimorfismo genetico
CYP2D6		Propafenone Desipramine Propranololo Codeine Destrometorfano	Nessuno conosciuto	Fluoxetina Quinidine	Si
CYP2E1	Fegato Polmoni Rene Linfociti	Etanolo Caffeine Teofilline Benzene	Etanolo Isoniazide	Disulfiram	

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 62 -

Alcuni componenti nell'uomo

Denominazione	Substrati	Induttori	Inibitori
CYP3A4	Acetaminofene, Carbamazepina Ciclosporina, Dapsone, Digitossina, Diltiazem, Diazepam, Eritromicina, Etoposide, Lidocaina, Loratadina, Midazolam, Lovastatina, Nifedipina, Rapamicina, Taxolo, Verapamil	Rifampin Carbamazepine Fenobarbitale Fenitoina	Fluoxetina Quinidina
CYP4A9/11	Acidi grassi e derivati		

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 63 -

Nomenclatura CYP ed EC

EC	Nome	Famiglia/ Gene
1.3.3.9	secologanina sintasi	CYP72A1
1.14.13.11	trans-cinnamato 4-monossigenasi	CYP73
1.14.13.12	benzoato 4-monossigenasi	CYP53
1.14.13.13	calcidiol 1-monossigenasi	CYP27
1.14.13.15	colestaneetriolo 26-monossigenasi	CYP27
1.14.13.17	colesterolo 7alfa-monossigenasi	CYP7
1.14.13.21	flavonoide 3'-monossigenasi	CYP75
1.14.13.28	3,9-diidrossipterocarpano 6alfa-monossigenasi	CYP93A1
1.14.13.30	leukotriene-B4 20-monossigenasi	CYP4F
1.14.13.37	metiltetraidroprotoberberina 14-monossigenasi	CYP93A1
1.14.13.41	tirosina N-monossigenasi	CYP79
1.14.13.42	idrossifenilacetone nitrile 2-monossigenasi	-

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 64 -

Nomenclatura CYP ed EC

EC	Nome	Famiglia Gene
1.14.13.47	(-)-limonene 3-monossigenasi	-
1.14.13.48	(-)-limonene 6-monossigenasi	-
1.14.13.49	(-)-limonene 7-monossigenasi	-
1.14.13.52	isoflavone 3'-idrossilasi	-
1.14.13.53	isoflavone 2'-idrossilasi	-
1.14.13.55	protopine 6-monossigenasi	-
1.14.13.56	diidrosanguinarina 10-monossigenasi	-
1.14.13.57	diidrochelirubina 12-monossigenasi	-
1.14.13.60	27-idrossicolesterolo 7alfa-monossigenasi	-
1.14.13.70	sterolo 14-demetilasi	CYP51
1.14.13.71	N-metilcodaurina 3'-monossigenasi	CYP80B1
1.14.13.73	tabersonina 16-idrossilasi	CYP71D12

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 65 -

Nomenclatura CYP ed EC

EC	Nome	Famiglia Gene
1.14.13.74	7-deossiloganina 7-idrossilasi	-
1.14.13.75	vinorina idrossilasi	-
1.14.13.76	taxano 10beta-idrossilasi	CYP725A1
1.14.13.77	taxano 13alpha-idrossilasi	CYP725A2
1.14.13.78	ent-kaurene ossidasi	CYP701
1.14.13.79	acido ent-kaurenoico ossidasi	CYP88A
1.14.14.1	monossigenasi aspecifica	multipla
1.14.15.1	canfora 5-monossigenasi	CYP101
1.14.15.3	alcano 1-monossigenasi	CYP4A
1.14.15.4	steroidi 11beta-monossigenasi	CYP11B
1.14.15.5	corticosterone 18-monossigenasi	CYP11B
1.14.15.6	colesterolo monossigenasi (clivaggio della catena laterale)	CYP11A

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 66 -

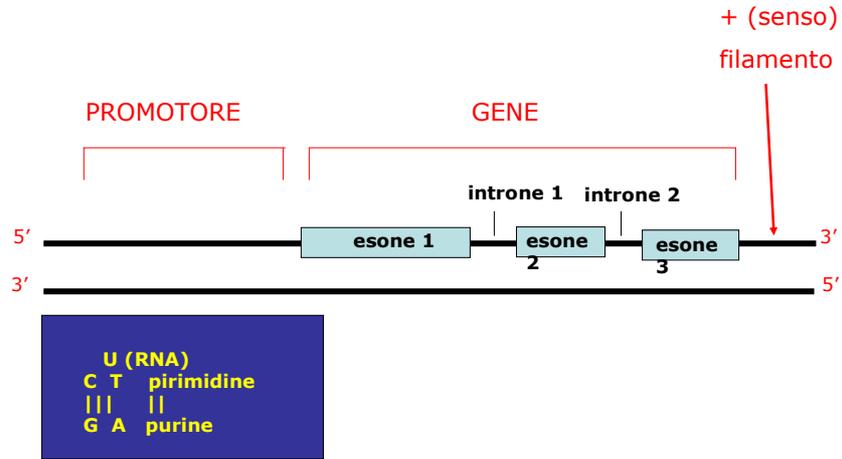
Nomenclatura CYP ed EC

EC	Nome	Famiglia/Gene
1.14.21.1	(S)-stilopina sintasi	-
1.14.21.2	(S)-cheilantifolina sintasi	-
1.14.21.3	berbamunina sintasi	CYP80
1.14.21.4	salutaridina sintasi	-
1.14.21.5	(S)-canadina sintasi	-
1.14.99.9	steroidi 17alfa-monossigenasi	CYP17
1.14.99.10	steroidi 21-monossigenasi	CYP21
1.14.99.22	ecdisoni 20-monossigenasi	-
1.14.99.28	linalolo 8-monossigenasi	CYP111
4.2.1.92	idroperossido deidratasi	CYP74
5.3.99.4	prostaglandina 1-monossigenasi	CYP8
5.3.99.5	trombossano-A sintasi	CYP5

Induzione

- Meccanismo attraverso il quale uno stimolo esterno alla cellula provoca come risposta la produzione di una o più proteine o, comunque, una attivazione della sintesi proteica:
 - HSP
 - Stress
 - CYP

Un gene

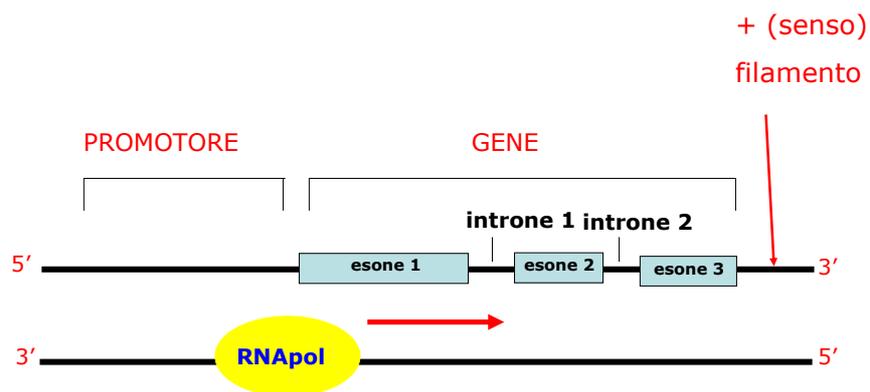


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 69 -

Il DNA fa RNA che fa PROTEINA

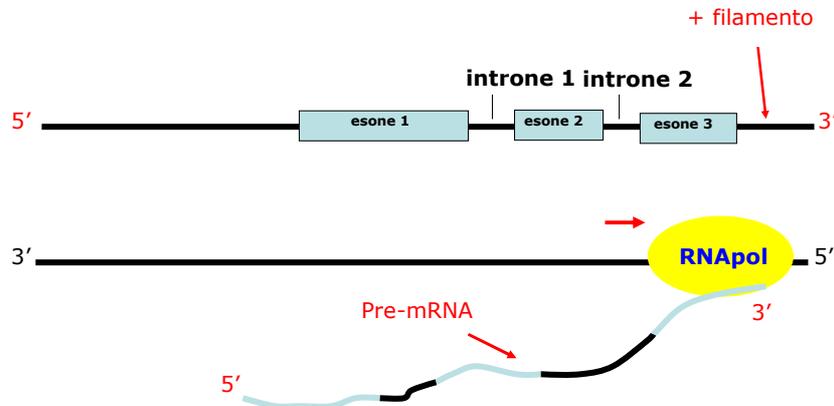


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

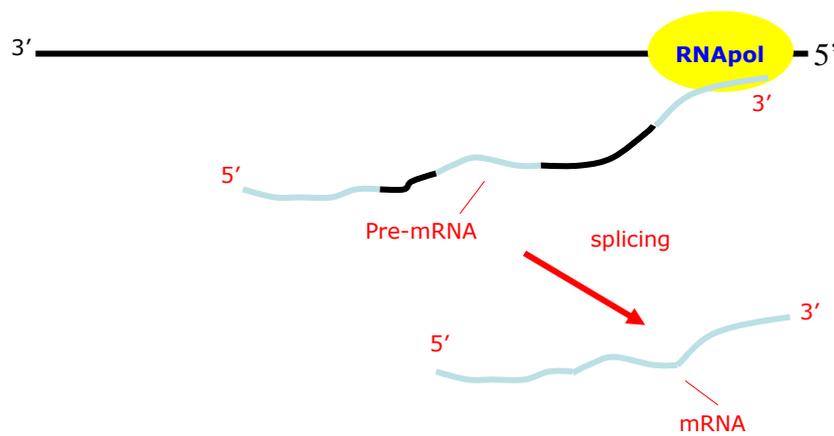
- 70 -

Trascrizione

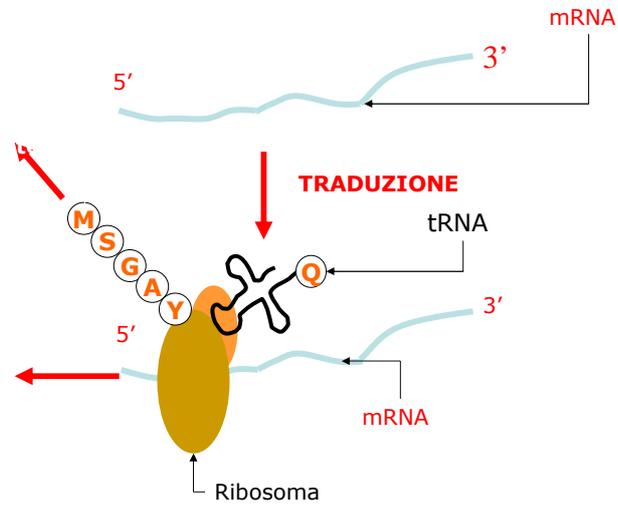


Il filamento complementare dà una COPIA del GENE.

Splicing



Traduzione

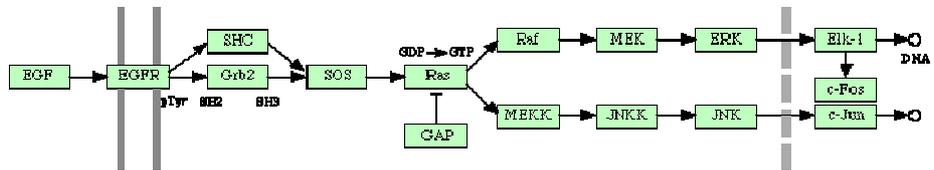


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 73 -

MAPK

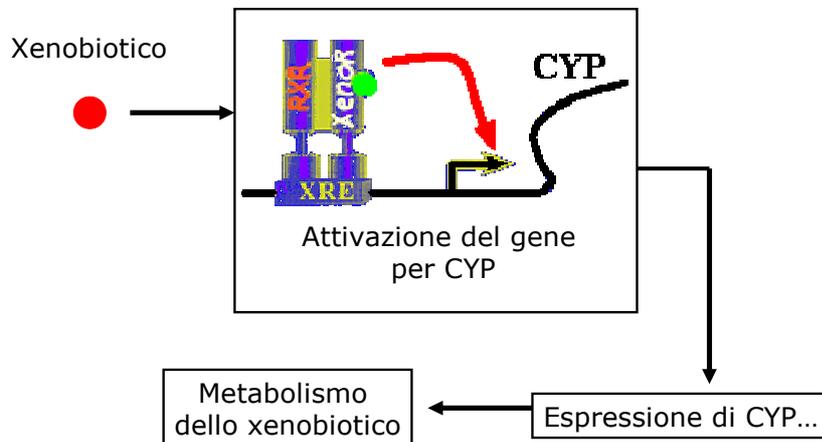


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 74 -

Il paradigma



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 75 -

CYP1A1 e recettori per idrocarburi aromatici

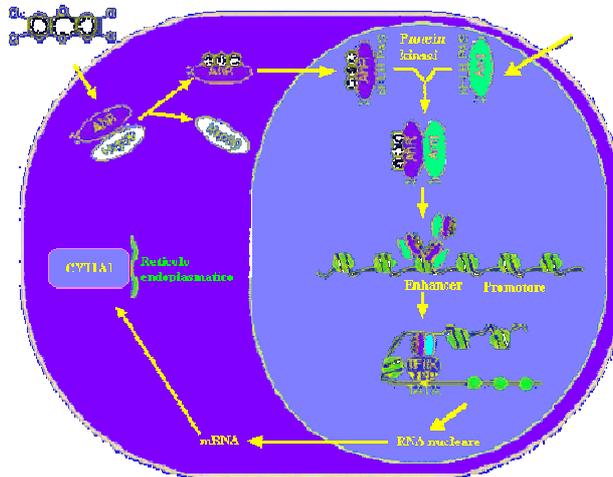
- CYP1A1 non è espressa costitutivamente nel fegato di ratto.
- CYP1A1 è indotta da idrocarburi policiclici
 - Benzo(α)pirene, TCDD (diossine).
 - Farmaci (omeprazolo, inibitore delle pompe protoniche).
- Meccanismo - up-regulation trascrizionale.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 76 -

Induzione CYP1



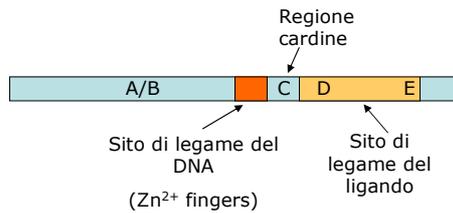
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

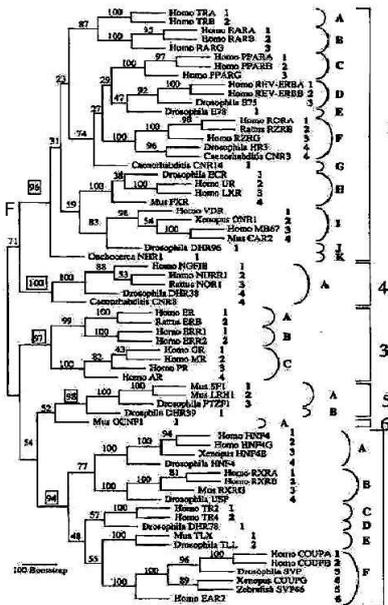
- 77 -

Induzione CYP2-4 (e 7)

Regolata da recettori nucleari



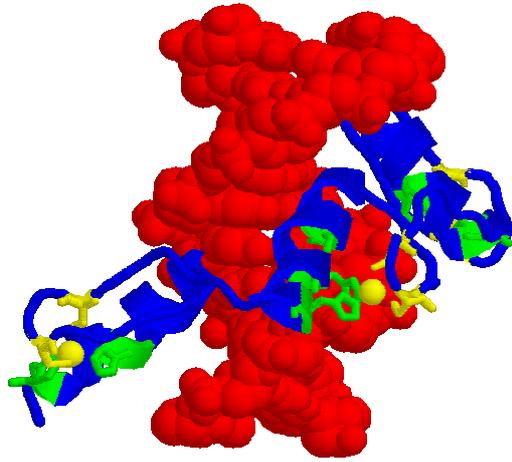
I recettori nucleari sono una superfamiglia di proteine



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

Dominio zinc-fingers

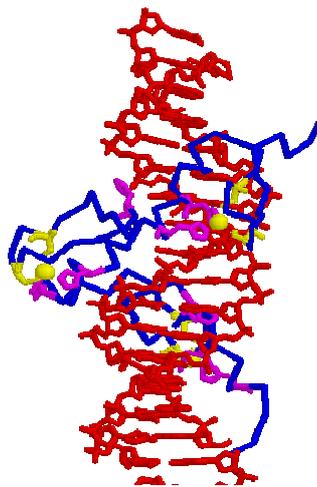


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 79 -

Dominio zinc-fingers

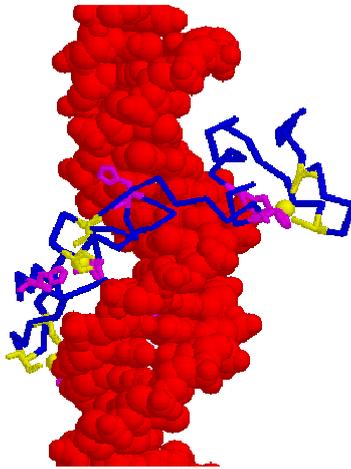


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 80 -

Dominio zinc-fingers



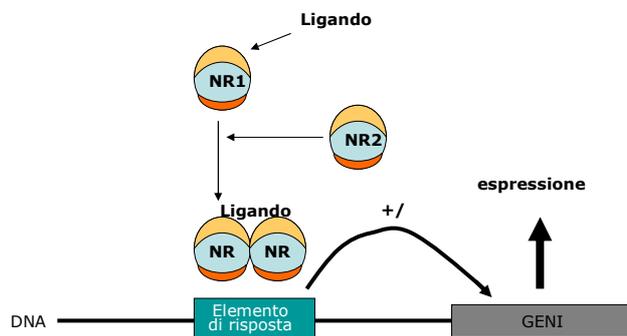
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 81 -

Recettori nucleari

I recettori nucleari sono fattori di trascrizione attivati dai ligandi



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 82 -

Recettori nucleari

- Recettori per gli steroidi
 - GR: recettore per i glucocorticoidi
 - MR: recettore per i mineralocorticoidi
 - AR: recettore per gli androgeni
 - ER: recettore per gli estrogeni
- Recettori per altri ligandi
 - RXR: recettore per X retinoide
 - RAR: recettore per acido retinoico
 - TR: recettore per l'ormone tiroideo
 - VDR: recettore per la vitamina D
- ?
 - PXR: recettore per X pregnano
 - CAR: recettore costitutivo attivato

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 83 -

Recettori nucleari

- I recettori nucleari si legano ad uno specifico elemento di risposta
- Generalmente 2 mezzi siti di legame correlati con AGGTCA
- Sono i recettori per gli ormoni steroidei (GR, MR ecc...)
- Si lega come omodimero
- Sequenza palindromica imperfetta
- Separati da 3bp

AGGACANNTGTTACC

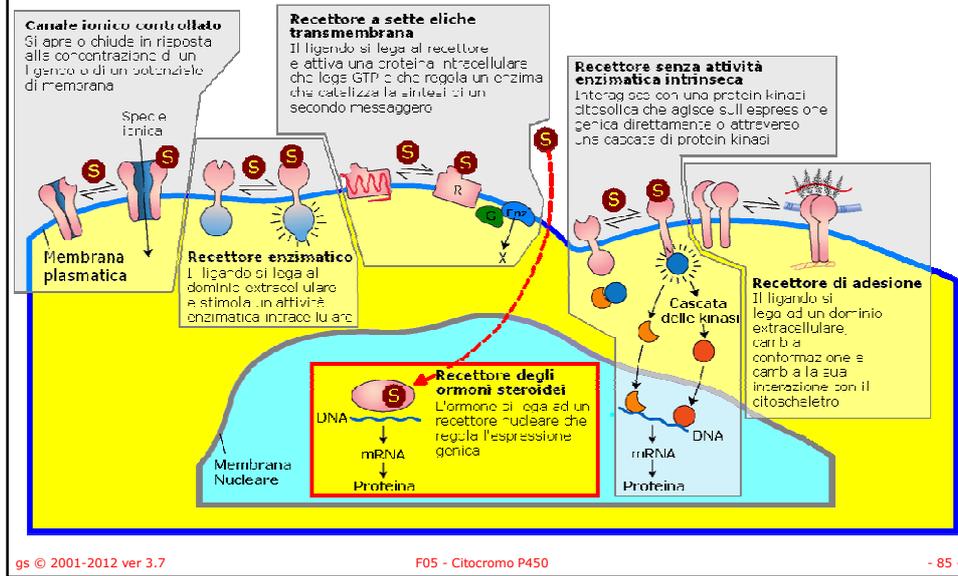
TCCTTGTINNACATTGG

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

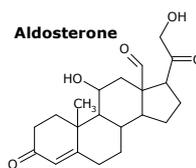
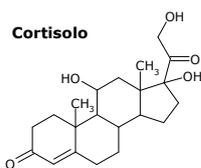
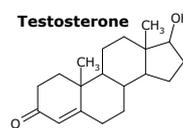
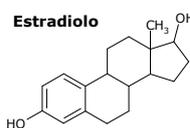
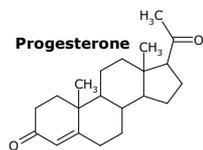
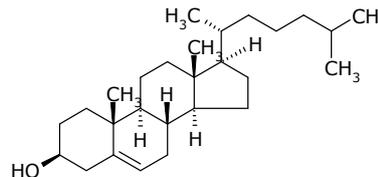
- 84 -

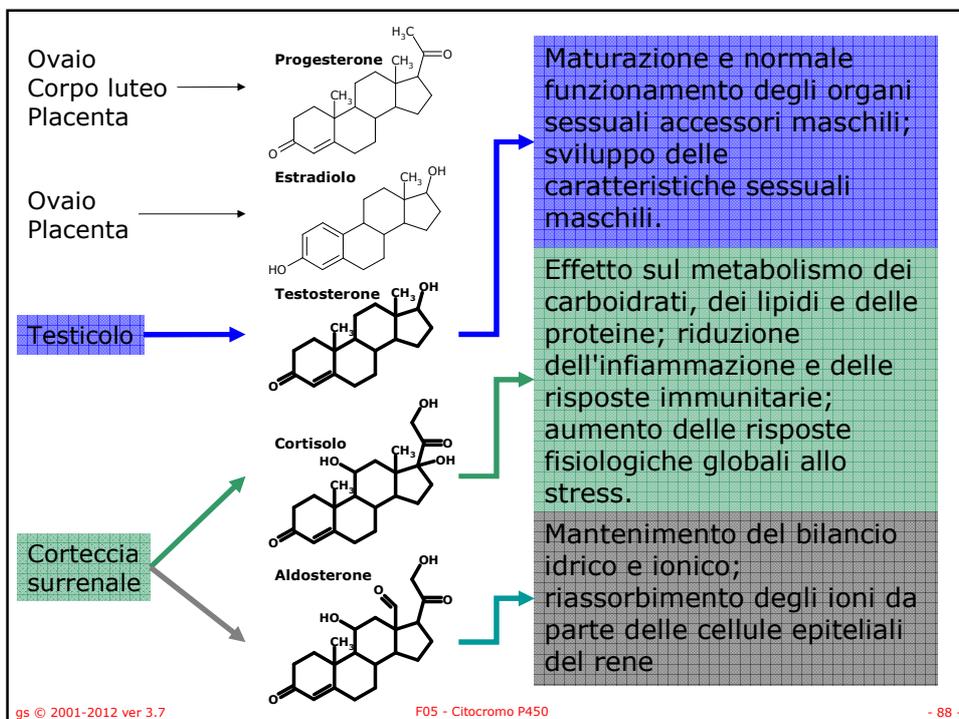
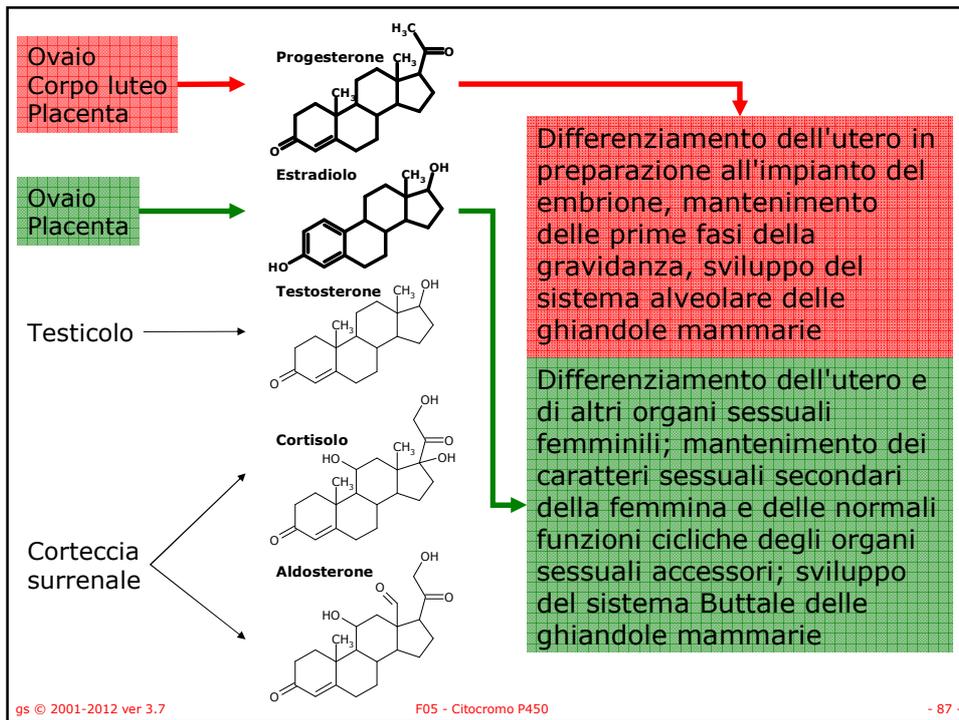
Recettori degli ormoni steroidei



Ormoni steroidei

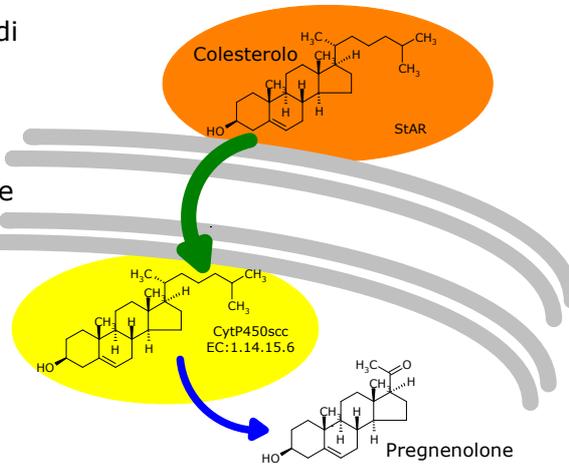
- Precursore comune: Colesterolo
- Secreti da:
 - Organi riproduttivi
 - Corteccia surrenale
- Metaboliti attivi della Vitamina D





Sintesi del progesterone

Grazie ad una proteina di trasporto detta StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), il colesterolo raggiunge la membrana mitocondriale interna (rate-limiting step) dove subisce l'azione del Citocromo P450_{scc} (side chain cleavage) che causa la rottura della catena laterale del colesterolo.

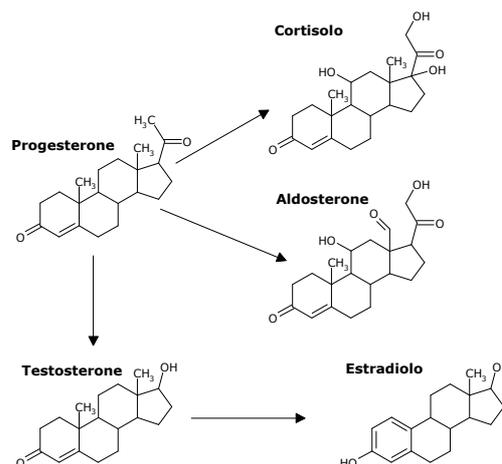


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 89 -

- Tutti gli ormoni steroidei nei mammiferi sono sintetizzati a partire dal colesterolo attraverso un intermedio comune, il progesterone
- Gli enzimi della steroidogenesi sono in parte mitocondriali ed in parte microsomiali, con conseguente movimento dei substrati dentro e fuori dal mitocondrio

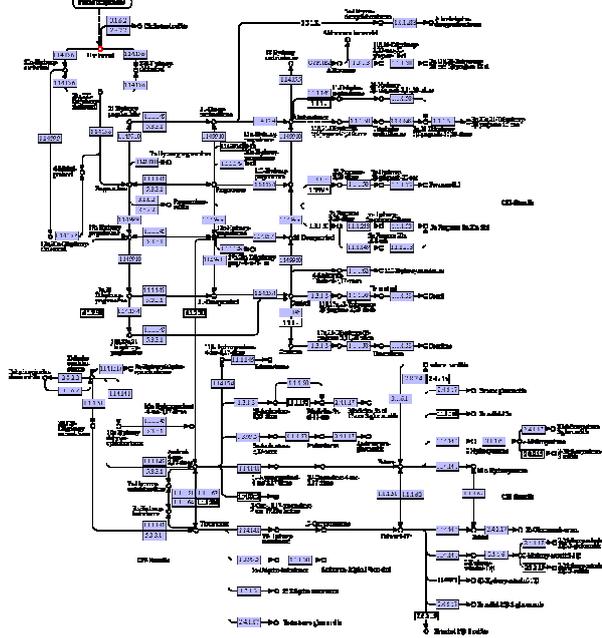


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 90 -

http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00140+C00187

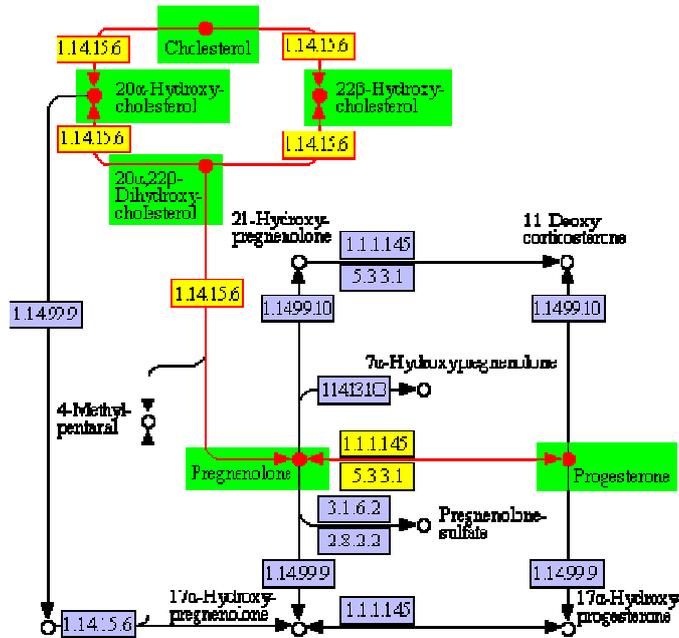


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 91 -

http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00140+C00187

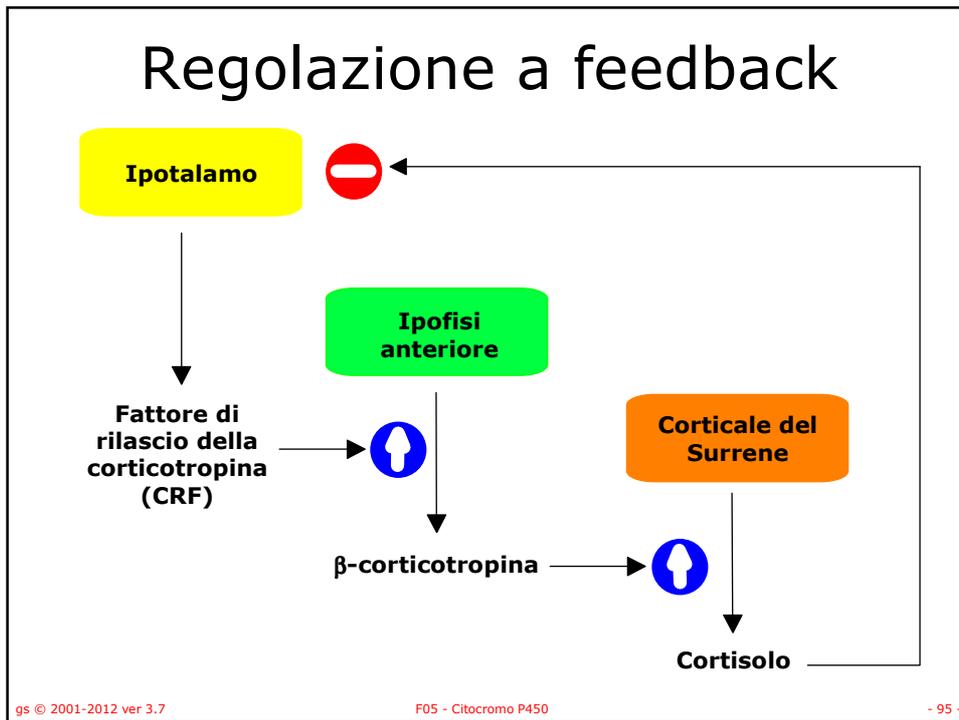


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 92 -

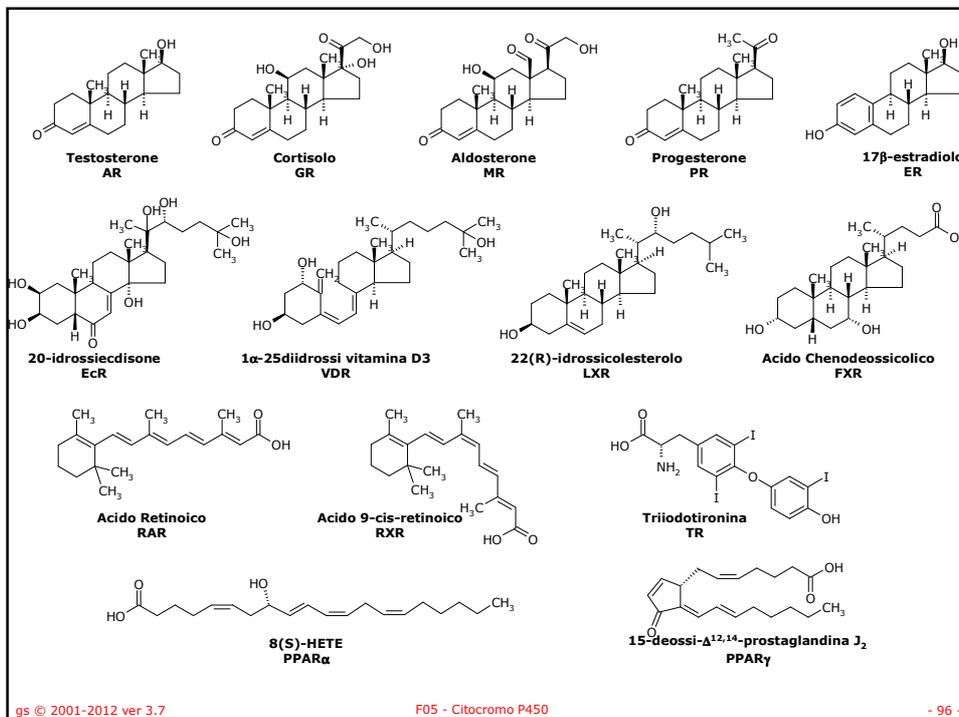
Regolazione a feedback



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 95 -



gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 96 -

Azione degli ormoni steroidei

- Gli ormoni steroidei sono immessi in circolo e si legano a proteine di trasporto
- Tali proteine mantengono una riserva circolante di ormoni in caso di improvvisi cambiamenti della loro concentrazione plasmatica e prolungano la vita media degli ormoni.
 - **Glucocorticoidi e progestinici** → transcortina o CBG (corticosteroid-binding globulin)
 - **Aldosterone** → non si lega ad una proteina specifica
 - **Andogeni ed estrogeni** → SHBG (sex hormone-binding globulin)
- Gli ormoni steroidei agiscono tramite recettori intracellulari, espressi nelle cellule bersaglio
- Gli estrogeni esplicano parte della loro azione anche tramite un recettore metabotropo (detto GPR30: G protein-coupled receptor 30 o GPER1: G protein-coupled estrogen receptor 1) che attiva una proteina Gq

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 97 -

Stadi dell'azione degli ormoni steroidei

- A. Riconoscimento della struttura ormonale da parte della cellula bersaglio;
- B. passaggio dell'ormone all'interno della cellula;
- C. sua captazione da parte di una proteina specifica definita "recettore";
- D. traslocazione del complesso ormone-recettore attivato nel nucleo e legame alla cromatina nucleare;
- E. dissociazione dalla molecola recettoriale ed attivazione della RNA polimerasi;
- F. sintesi di RNA messaggero che, fuoriuscito dal nucleo, stimola a livello di reticolo endoplasmatico la sintesi di proteine che determinano l'azione dello steroide.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 98 -

Recettore cellulare

A. alta affinità di legame

- L'alta affinità di legame è indispensabile per la definizione di **recettore ormonale**: gli **ormoni steroidei** sono presenti nel plasma e nei tessuti in concentrazione relativamente bassa e spesso legati a strutture proteiche, con bassa affinità, non definibili quindi come recettori.

B. capacità limitata

- Il **recettore è saturabile** e quindi è limitato il numero di molecole capaci di entrare nella cellula bersaglio. La saturabilità della proteina legante recettoriale varia nelle diverse situazioni fisiologiche e determina l'ampiezza della risposta biologica. La **concentrazione dei recettori** per cellula bersaglio è compresa tra 10^3 e 10^5 ;

Recettore cellulare

C. specificità

- Ogni **recettore è specifico** per una classe di ormoni (il recettore per gli estrogeni lega solo le strutture di tipo estrogenico), con risposta cellulare specifica;

D. reversibilità di legame

- Il **complesso ormone-recettore (HR) è dissociabile**; quando il legame è specifico la velocità di dissociazione è lenta;

E. specificità tissutale

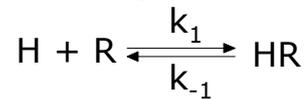
- La differenza tra organi **non ormono-responsivi** ed organi **ormono-responsivi** risiede nella distribuzione sia quantitativa che qualitativa dei recettori;

F. risposta biologica

- Una risposta biologica specifica definisce sia il recettore, sia l'organo bersaglio: la presenza della risposta biologica testimonia la presenza di un recettore specifico.

Cinetica del legame recettoriale

Il legame ormone-recettore segue la reazione:



Indicando con k_1 e k_{-1} le costanti di associazione e dissociazione rispettivamente, quando il sistema è all'equilibrio le velocità di associazione e dissociazione sono uguali e si ottiene:

$$\frac{[H][R]}{[HR]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d$$

[H] = concentrazione dell'ormone libero
[R] = concentrazione del recettore libero

dove K_d è la costante di dissociazione all'equilibrio e rappresenta la misura dell'affinità del recettore all'equilibrio.

Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

- Concentrazione dell'ormone libero;**
- Concentrazione del recettore;**
- Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

- Concentrazione dell'ormone libero;**
- Concentrazione del recettore;**
- Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

- Concentrazione dell'ormone libero;**
- Concentrazione del recettore;**
- Costante di affinità dell'ormone per il recettore;**

Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

Concentrazione dell'ormone libero;

Concentrazione del recettore;

Costante di affinità dell'ormone per il recettore;

Cinetica del legame recettoriale

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

$$[HR] = [H][R] \frac{1}{K_d}$$

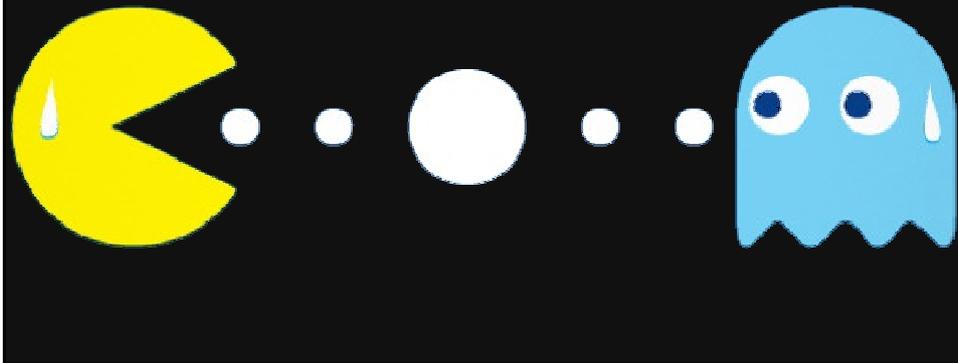
Che viene definita come **risposta biologica** che dipende quindi da:

Concentrazione dell'ormone libero;

Concentrazione del recettore;

Costante di affinità dell'ormone per il recettore;

Struttura dei recettori per gli ormoni steroidei



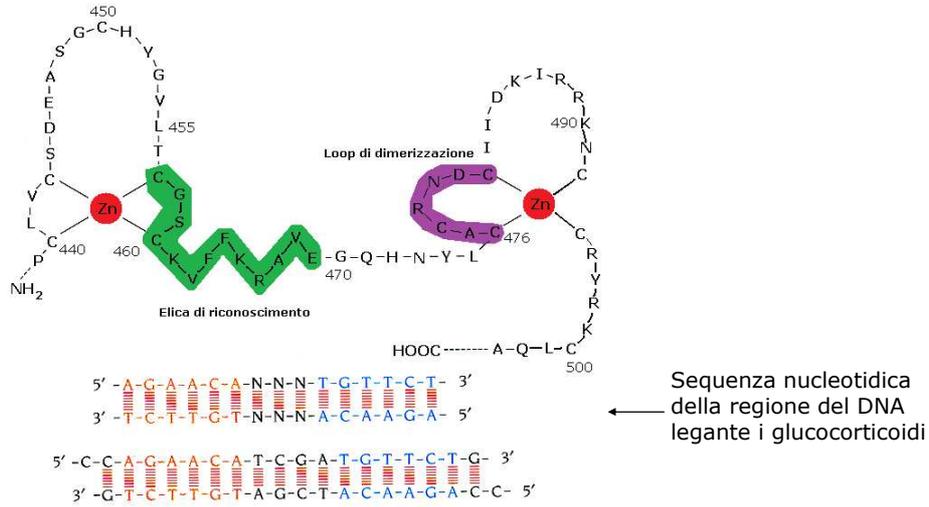
	N	1	440	530	795	C	Recettore dei glucocorticoidi
N						C	Recettore dei mineralcorticoidi
	N					C	Recettore degli estrogeni
N						C	Recettore del progesterone
	N					C	Recettore della Vitamina D ₃
	N					C	Recettore dell'ormone tiroideo
	N					C	Recettore dell'acido retinoico

- I membri di questa famiglia di proteine contengono:
 - un **dominio di legame del DNA** (contenente zinco) altamente conservato, costituito da 90 residui, che si lega agli elementi attivatori presenti nel DNA detti elementi di risposta all'ormone (HRE).
 - un **dominio C-terminale** variabile, deputato alla interazione coi ligandi, alcuni poi possono avere anche un grande **dominio N-terminale** implicato nell'attivazione della trascrizione.

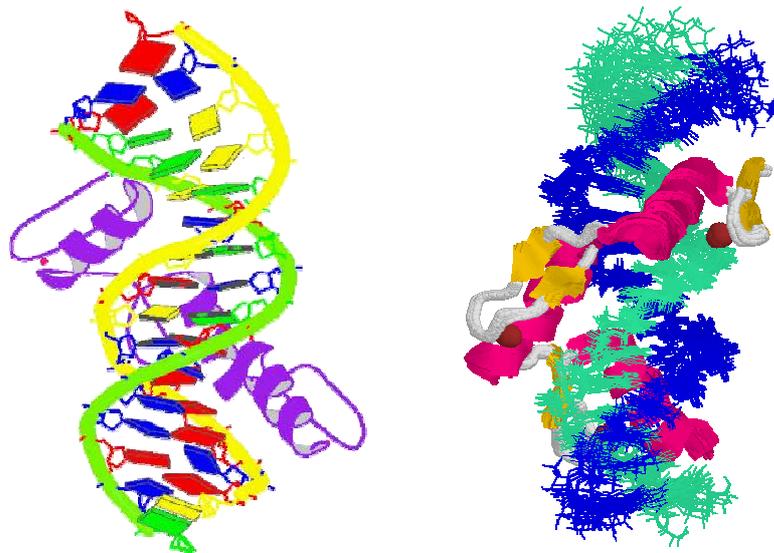
gs © 2001-2012 ver 3.7 F05 - Citocromo P450 - 108 -

Sequenza AA del dominio di legame del DNA contenente Zn⁺⁺ del recettore dei glucocorticoidi.

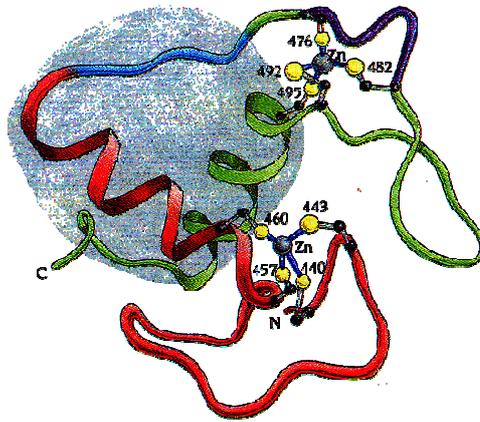
Ogni ione di Zn⁺⁺ è legato a 4 residui di cisteina. Uno di questi stabilizza l'**elica di riconoscimento** che fornisce siti di legame ai DNA sequenza -specifici mentre nella altra regione contenente Zn⁺⁺ è presente un **loop** implicato nella formazione del dimero.



Sequenza AA del dominio di legame del DNA contenente Zn del recettore dei glucocorticoidi.



- Nella struttura i due motivi leganti lo ione Zn^{2+} non sono separati in due unità discrete ma sono intrecciati a formare un dominio globulare in cui sono presenti numerose interazioni tra le due unità digitiformi.
- In ognuno dei due motivi contenenti Zn^{2+} , la seconda coppia delle cisteine leganti lo Zn^{2+} dà inizio a un'α-elica anfipatica.

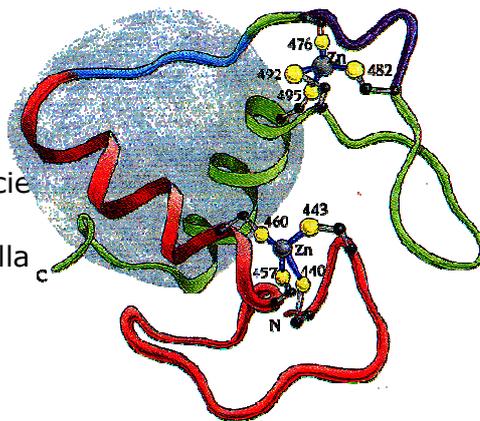


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 111 -

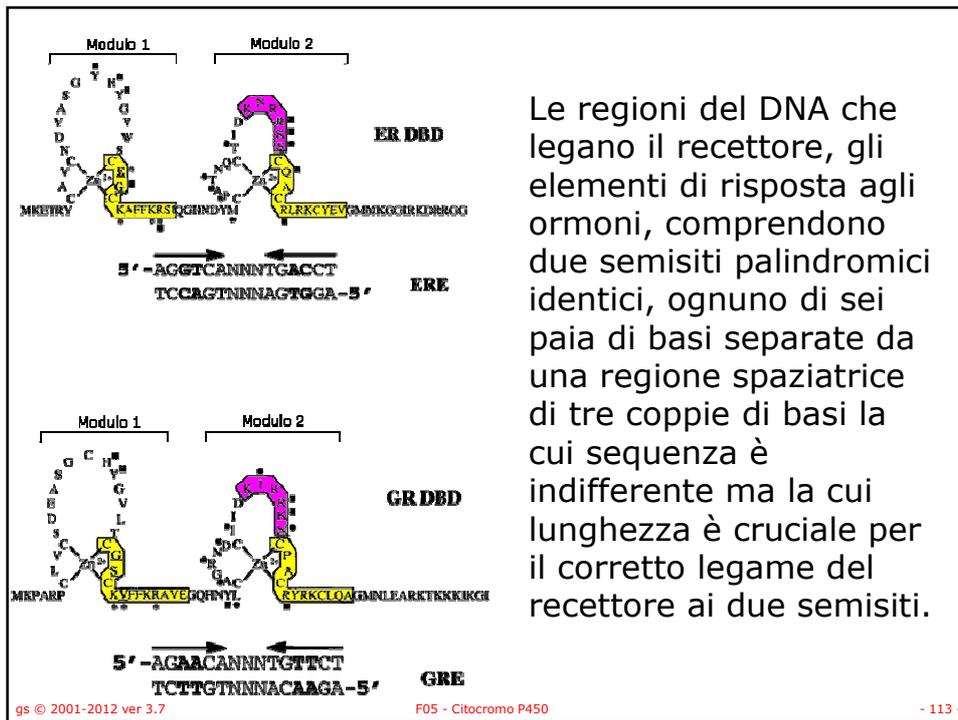
- I lati idrofobi delle due α-eliche si impaccano l'uno contro l'altro formando un *core* con un interno idrofobo.
- Le catene laterali idrofile presenti sull'altro lato della prima α-elica sono esposte al solvente e formano la superficie di interazione con il DNA.
- I due ioni Zn^{2+} e le regioni della proteina tra i ligandi di questi formano protrusioni che si proiettano da questo *core* idrofobico.



gs © 2001-2012 ver 3.7

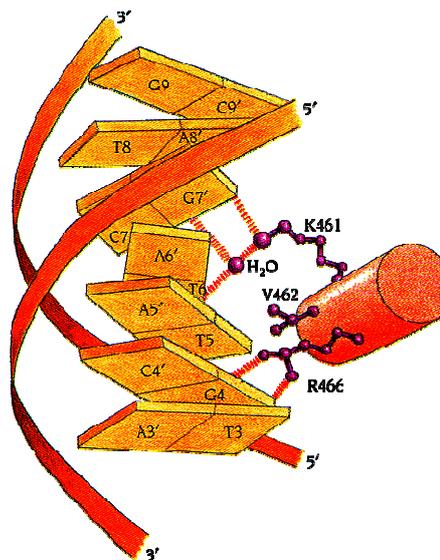
F05 - Citocromo P450

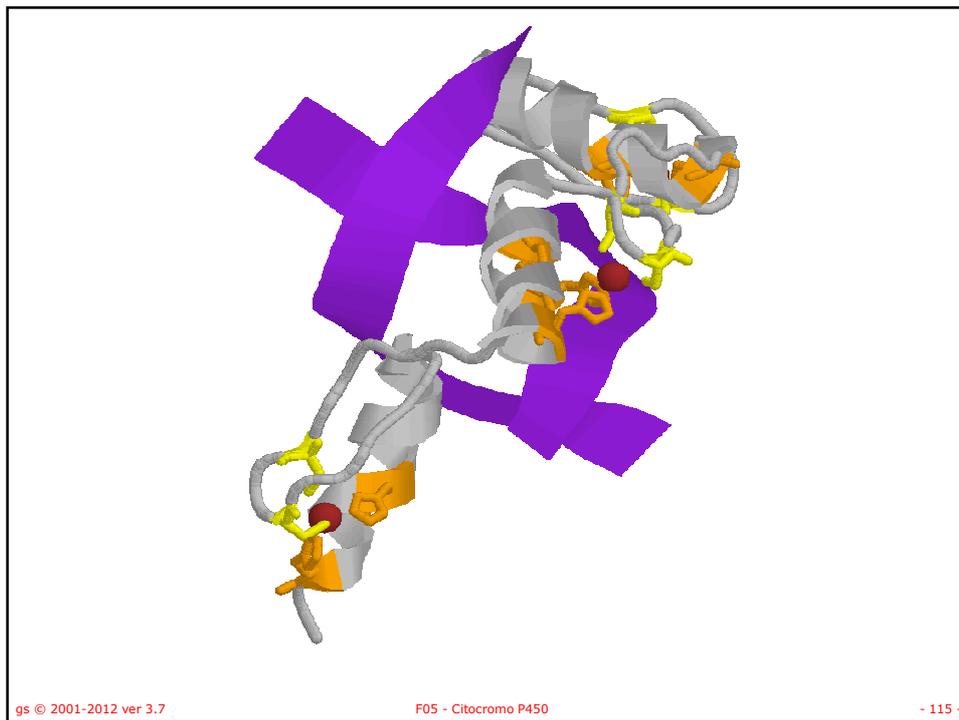
- 112 -



- I contatti con i margini delle basi presenti nel solco maggiore sono dovuti alle interazione dei tre residui presenti nella metà N-terminale dell'elica di riconoscimento del GR:

- Lys 461;
- Val 462;
- Arg 466.





Recettori degli estrogeni (ER)

- Gli estrogeni hanno un ruolo fondamentale nei processi di crescita e differenziamento cellulari, soprattutto a livello degli organi riproduttivi femminili e maschili, delle ghiandole mammarie e dei sistemi scheletrico e cardiovascolare.
 - **17 β -estradiolo (E2)**: prodotto soprattutto dalle ovaie, specificamente dalle cellule della teca e della granulosa dei follicoli, dal corpo luteo e dall'unità feto-placentare durante la gravidanza; è l'estrogeno con maggiore attività.
 - **Estrone**: prodotto principalmente a livello ovarico, è l'estrogeno maggiormente presente nelle donne dopo la menopausa;
 - **Estriolo**: deriva dall'ossidazione degli altri estrogeni, che avviene principalmente a livello del fegato, ed acquista un ruolo rilevante nell'organismo solo se è presente in elevate concentrazioni, condizione che si verifica durante la gravidanza.

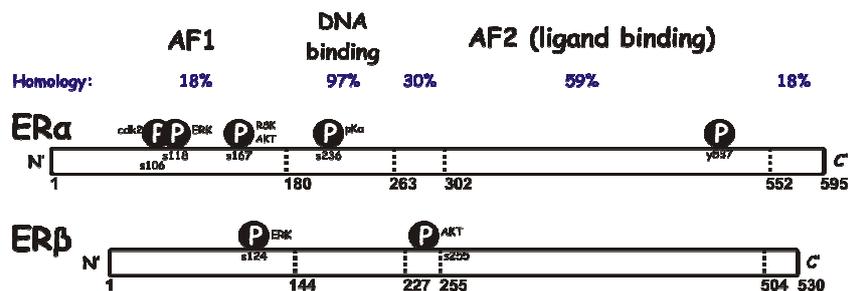
Recettori degli estrogeni (ER)

- L'attività degli estrogeni si esplica infatti mediante il legame ai recettori per gli estrogeni che sono localizzati a livello nucleare, dove si trovano sotto forma di dimeri, complessati con le proteine dello shock termico, (Hsp).
- Gli estrogeni attraversano per diffusione le membrane cellulari e, una volta giunti legano gli ER con interazioni non covalenti, provocandone la dissociazione dalle Hsp. Il complesso estrogeno-recettore così formatosi, riconosce e lega regioni specifiche di DNA, modulando il processo di trascrizione di geni bersaglio degli estrogeni.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 117 -



gs © 2001-2012 ver 3.7

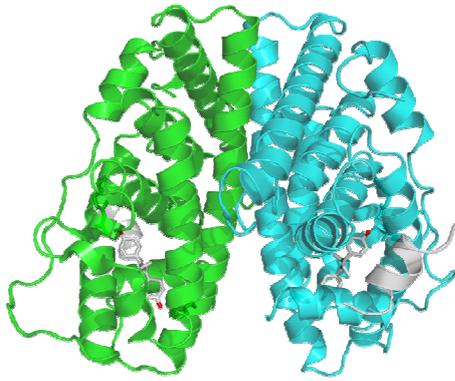
F05 - Citocromo P450

- 118 -

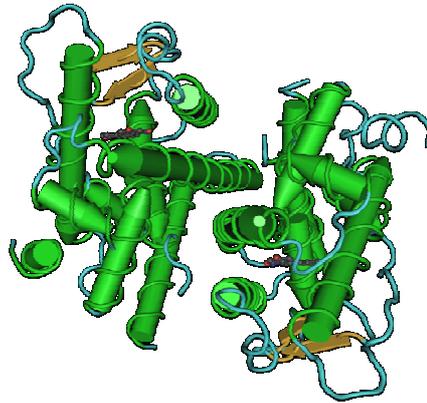
Recettori

ER α

ER β



3ERD



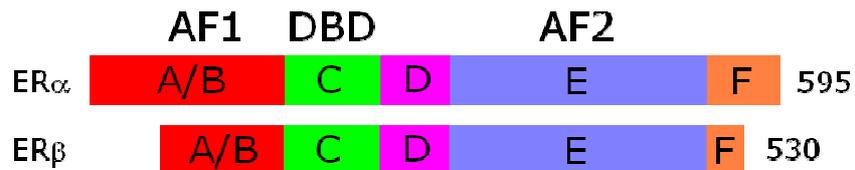
1U3S

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 119 -

Recettori degli estrogeni (ER)



- **Il dominio A/B**, localizzato all'ammino-terminale, è il dominio meno conservato tra i diversi membri della famiglia dei recettori nucleari ed include la regione *activation function 1* (AF1) con funzione di transattivazione.
- La funzione AF1 regola la trascrizione dei geni bersaglio, in modo ligando-indipendente. La sua variabilità strutturale è un elemento importante per conferire la specificità d'azione a ciascun recettore. In particolare, la regione AF1 di ER β (al contrario di ER α) contiene una porzione con funzione repressiva, che diminuisce l'attività trascrizionale del recettore ER β stesso.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

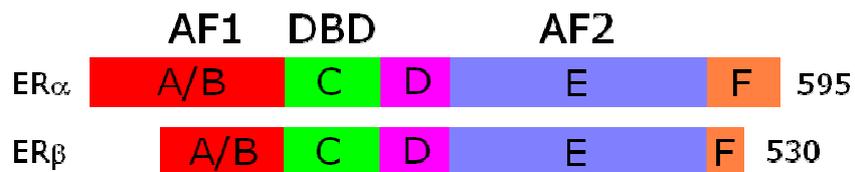
- 120 -

Recettori degli estrogeni (ER)



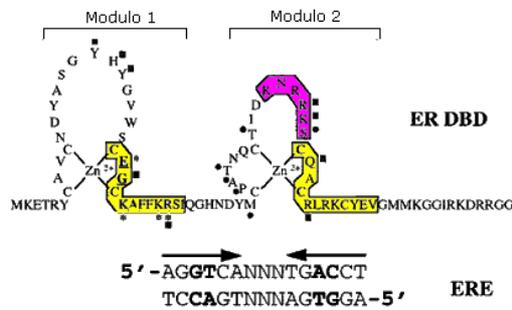
- **Il dominio A/B**, presenta diversi siti di fosforilazione ed è bersaglio della via di segnalazione mediata dalle MAP chinasi, indicando un meccanismo di comunicazione crociata tra la trasduzione innescata dai fattori di crescita e quella degli ormoni steroidei a livello.

Recettori degli estrogeni (ER)



- **Il dominio C** o *DNA Binding Domain* (DBD), è il dominio più conservato tra tutti i recettori nucleari, ed è deputato al legame con il DNA e alla dimerizzazione dei recettori.
- Sono stati descritti omodimeri ed eterodimeri di recettori per gli estrogeni, con affinità paragonabili per il DNA.

Recettori degli estrogeni (ER)



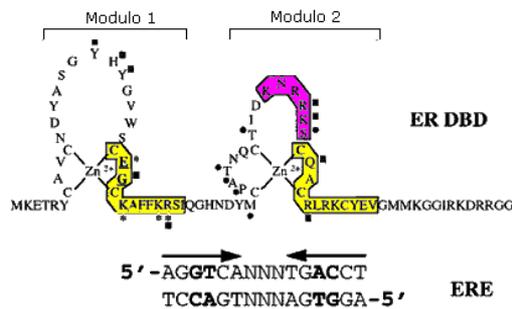
- **Il dominio DBD** contiene cisteine in posizioni molto conservate che, per mezzo di legami di coordinazione con due ioni zinco, conferiscono alla proteina una conformazione spaziale detta *Zinc finger* che permette l'inserimento del recettore all'interno del solco maggiore del DNA e la formazione di ponti a idrogeno con le cariche negative del DNA.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 123 -

Recettori degli estrogeni (ER)



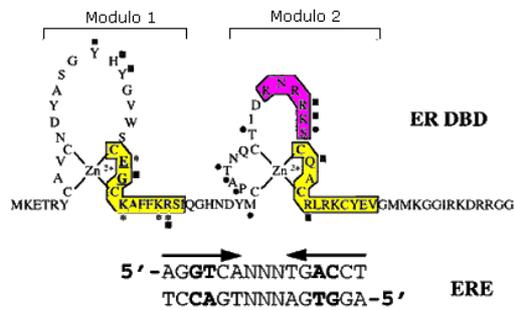
- In prossimità del primo motivo zinc-finger si trova la regione P-box (*proximal-box*) responsabile del riconoscimento specifico delle sequenze di DNA, mentre in prossimità del secondo zinc-finger si trova la D-box (*distal-box*) coinvolta nella dimerizzazione dei recettori.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 124 -

Recettori degli estrogeni (ER)



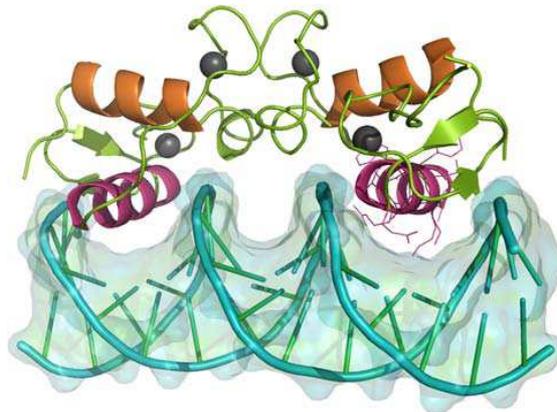
- Il DBD dei recettori per gli estrogeni riconosce sequenze specifiche di DNA dette sequenze ERE (*estrogen responsive element*), sequenze palindromiche **AGGTCA** separate da tre nucleotidi, localizzate a livello dei promotori di geni sottoposti a controllo estrogenico.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 125 -

Recettori degli estrogeni (ER)



- Sono presenti due motivi ad α -elica: una di queste due eliche interagisce con il solco maggiore della doppia elica di DNA e l'altra ne stabilizza il complesso.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 126 -

Recettori degli estrogeni (ER)



- **Il dominio D** è un dominio flessibile, che connette i domini C ed E e contiene un residuo di serina fosforilabile (Ser305).
- **Il dominio E** rappresenta il sito di legame per il ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD). Contiene inoltre la sequenza segnale per la localizzazione nucleare (*Nuclear Localization Signal*, NLS) e media l'interazione con le HSP.
- A livello dell'LBD è localizzato il dominio di transattivazione AF2 (*Activation Function 2*) che, interagendo con coattivatori e corepressori, regola la trascrizione genica in modo ligando-dipendente



Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment[☆]

Erin K. Shanle, Wei Xu^{*}

McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin, 1400 University Avenue, Madison, WI 53706, USA
Molecular and Environmental Toxicology Center, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

ARTICLE INFO

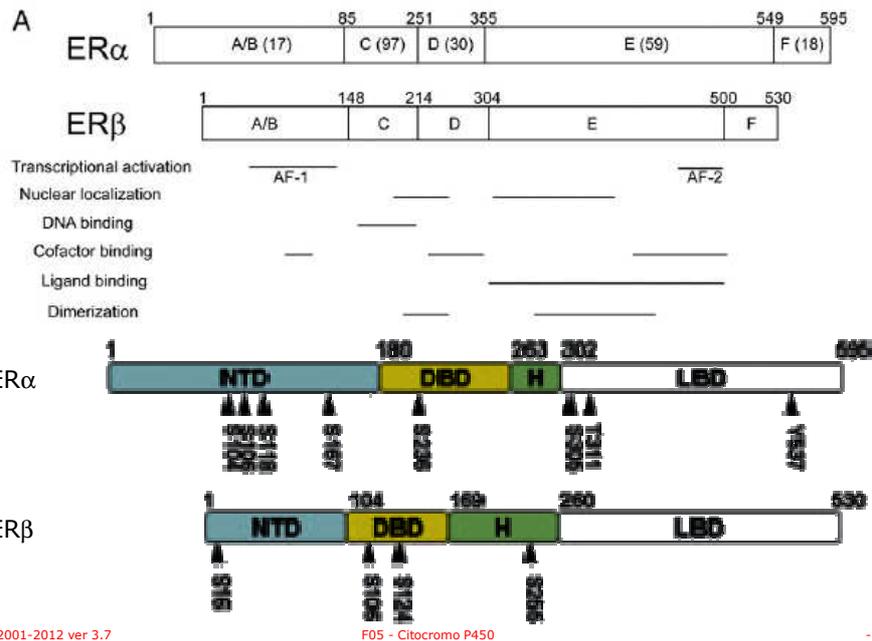
Article history:
 Received 25 February 2010
 Accepted 4 August 2010
 Available online 10 August 2010

Keywords:
 Estrogen receptor alpha
 Estrogen receptor beta
 SERMs
 SERDs
 Selective agonist
 Antagonist
 Breast cancer
 Prostate cancer
 Colon cancer

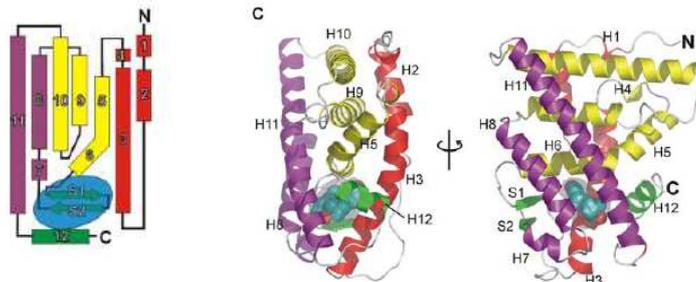
ABSTRACT

Estrogens regulate growth and development through the action of two distinct estrogen receptors (ERs), ER α and ER β , which mediate proliferation and differentiation of cells. For decades, ER α mediated estrogen signaling has been therapeutically targeted to treat breast cancer, most notably with the selective estrogen receptor modulator (SERM) tamoxifen. Selectively targeting ERs occurs at two levels: tissue selectivity and receptor subtype selectivity. SERMs have been developed with emphasis on tissue selectivity to target ER signaling for breast cancer treatment. Additionally, new approaches to selectively target the action of ER α going beyond ligand-dependent activity are under current investigation. As evidence of the anti-proliferative role of ER β accumulates, selectively targeting ER β is an attractive approach for designing new cancer therapies with the emphasis shifted to designing ligands with subtype selectivity. This review will present the mechanistic and structural features of ERs that determine tissue and subtype selectivity with an emphasis on current approaches to selectively target ER α and ER β for cancer treatment.

Published by Elsevier B.V.

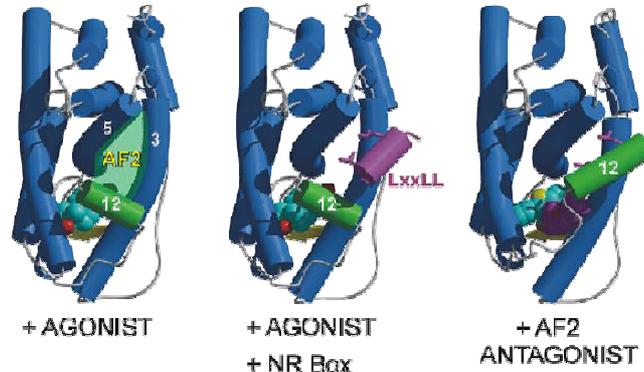


Recettori degli estrogeni (ER)



- Le eliche si organizzano in tre strati di eliche antiparallele formando un "sandwich ad α -eliche":
 - il core centrale è formato dalle eliche H5, H6, H9 e H10, ed è racchiuso tra due strati formati rispettivamente dall'eliche H1-H4 e dalle eliche H7, H8 e H11.
 - L'elica H12 e il foglietto β affiancano il sandwich.
 - Il sito di legame dell'ormone è una tasca idrofobica formata dalle eliche H3, H6 e H8 ed H11, e chiusa da un lato dall'elica H12, dall'altro dal foglietto β .

Recettori degli estrogeni (ER)



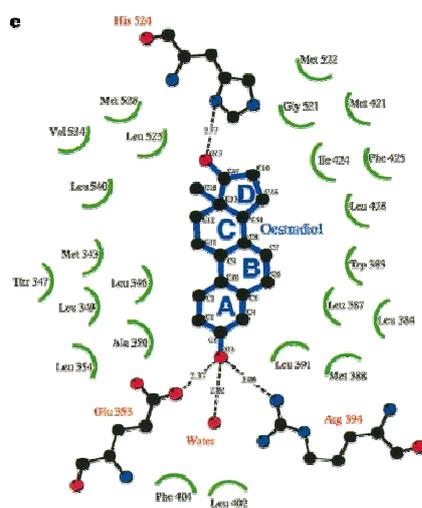
- Il dominio AF2 è formato dalle eliche H3-H5 e H12, le quali, in seguito al legame con il ligando, si assemblano a formare una superficie idrofobica in grado di interagire con il motivo conservato **ricco di leucine (LXXLL)** presente in numerose proteine coregolatrici della trascrizione

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 131 -

Recettori degli estrogeni (ER)



- La tasca idrofobica di legame ospita al suo interno due regioni polari poste alle estremità opposte della cavità.
- Nel complesso ER α -E2 cristallizzato, gli amminoacidi Glu353 e Arg394 rivestono il ruolo di punti di ancoraggio per il gruppo OH in posizione 3 di E2 e una molecola d'acqua ne stabilizza l'interazione.
- La seconda regione polare, attraverso l'amminoacido His524, interagisce invece con il gruppo OH in posizione 17.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 132 -

Isoforme dei recettori per gli estrogeni

- Le due isoforme principali di ER, ER α e ER β sono codificate da geni differenti, localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 (6q25.1), e sul cromosoma 14 (14q22-24). Pur avendo alta omologia di sequenza, sono caratterizzate da una diversa distribuzione tissutale, differenti effetti trascrizionali e affinità di legame per i ligandi.
 - **ER α** è principalmente espresso nel tessuto mammario, nel tessuto uterino, nella vagina, ma è presente in numerosi altri organi.
 - Una volta attivato dal ligando estrogenico o per fosforilazione, attiva la trascrizione di geni bersaglio legando sequenze specifiche sul DNA, promuovendo i processi di **proliferazione e differenziamento cellulari**. Al contrario

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 133 -

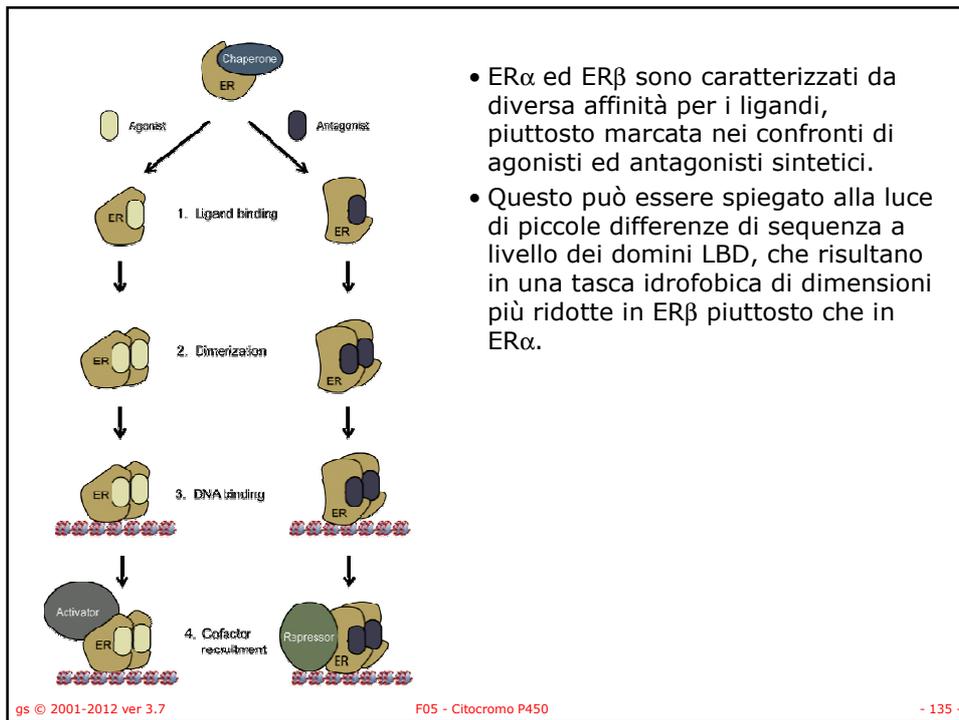
Isoforme dei recettori per gli estrogeni

- **ER β** mostra un profilo di espressione diverso, che comprende ovaio, prostata, testicoli, milza, polmoni, ipotalamo e timo.
- Sono espressi, seppur a bassi livelli, nel sistema nervoso centrale (nuclei della base, corteccia, ippocampo, ipotalamo) e nel sistema cardiovascolare.
- Pur condividendo il meccanismo d'azione con ER α , sembra agire da repressore trascrizionale, esplicando così un **effetto antiproliferativo**. In particolare, la regione AF1 di ER β sembra avere minore capacità di transattivazione su geni reporter sotto il controllo di sequenze ERE rispetto a ER α , mentre l'attività della regione AF2 è comparabile per i due recettori.

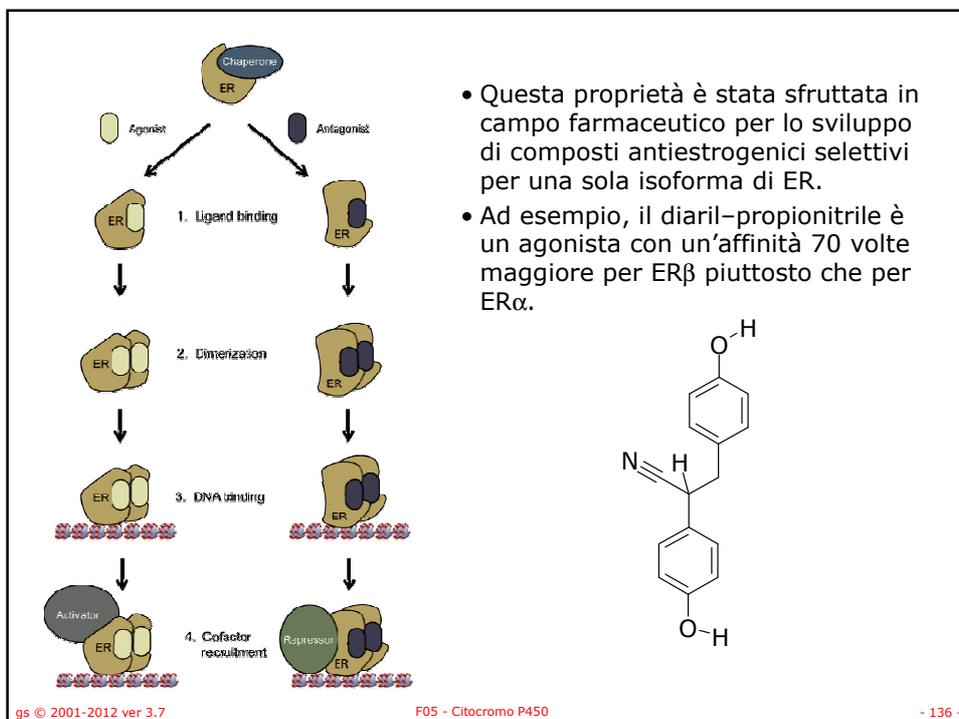
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

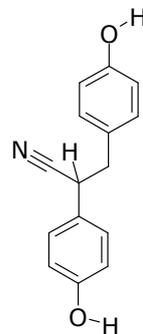
- 134 -



- ER α ed ER β sono caratterizzati da diversa affinità per i ligandi, piuttosto marcata nei confronti di agonisti ed antagonisti sintetici.
- Questo può essere spiegato alla luce di piccole differenze di sequenza a livello dei domini LBD, che risultano in una tasca idrofobica di dimensioni più ridotte in ER β piuttosto che in ER α .



- Questa proprietà è stata sfruttata in campo farmaceutico per lo sviluppo di composti antiestrogenici selettivi per una sola isoforma di ER.
- Ad esempio, il diaril-propionitrile è un agonista con un'affinità 70 volte maggiore per ER β piuttosto che per ER α .



Isoforme ERβ

ERβ Isoforms:

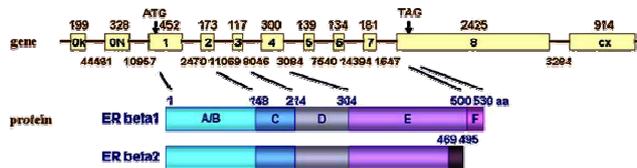
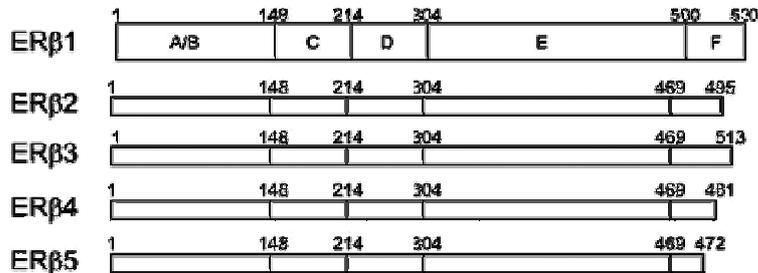
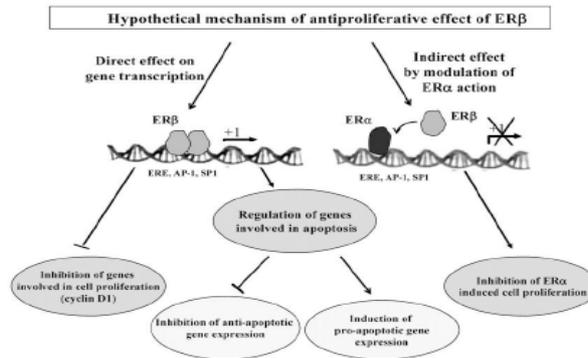


FIGURE 1. Genomic organization of the human *ERβ* gene, protein, and functional domains. For the gene, exons are indicated with boxes and introns with lines. *Ok*, exon 0k; *ON*, exon 0N. The numbers above each box indicate the size of the exons in base pairs; the numbers below each line designate the size of the respective introns in base pairs. The diagonal lines between the gene and protein point to protein domain junctions. For the protein, numbers indicate the total size of the protein in amino acids (aa). The dark purple bar shows the divergent C-terminal regions between the isoforms.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 137 -



- Sono stati proposti due diversi modelli di meccanismo d'azione di ERβ quale inibitore della proliferazione cellulare:
 - il primo prevede un effetto diretto di ERβ sulla trascrizione genica, risultante nella repressione di geni correlati con la proliferazione e nella concomitante induzione di geni proapoptotici.
 - Il secondo modello propone invece la competizione tra ERα ed ERβ per il legame al DNA: la presenza di ERβ sulle regioni promotrici impedirebbe il legame di ERα, portando a mancata induzione di geni coinvolti nella proliferazione.

gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

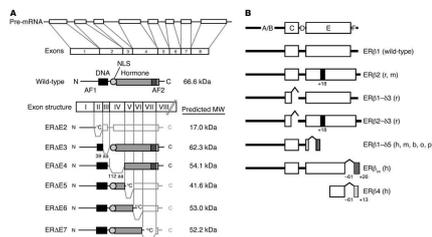
- 138 -

Mutazioni dei recettori

- Le mutazioni a carico del recettore $EP\alpha$ possono essere classificate in tre gruppi a seconda del significato funzionale.
 - I "mutanti negativi" sono parzialmente o completamente inattivi e non influenzano la funzionalità dei recettori *wild-type*. Questo tipo di mutazioni sono quelle più diffuse nei tumori e solitamente sono localizzate a livello del carbossi-terminale, nel sito LBD.
 - Il secondo tipo di mutanti è rappresentato dai mutanti "dominanti negativi", completamente inattivi e che rendono inattivo anche il recettore *wild-type* (es. delezione dell'esone 7).
 - Il terzo tipo include le mutazioni che rendono il recettore attivo anche in assenza di ligando e sono denominate "dominanti positive"

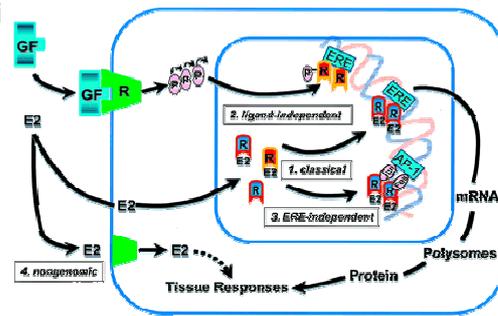
Mutazioni dei recettori

- La maggior parte delle isoforme del recettore $ER\alpha$ possiede un'attività trascrizionale residua, a eccezione di $ER\Delta E5$, a cui manca quasi interamente LBD.
- Al recettore $ER\Delta E2$ manca il DBD, e il dominio di dimerizzazione,
- Al recettore $ER\Delta E3$ manca una parte del DBD.
- $ER\Delta E4$ non lega né il DNA né il ligando, essendo troncato per una parte del LDB,
- $ER\Delta E6$ è troncato sia per una parte dell'LDB che per il dominio di dimerizzazione.
- $ER\Delta E3$, $ER\Delta E5$, e $ER\Delta E7$ sono mutanti dominanti negativi.



Meccanismi d'azione dei recettori per gli estrogeni

- Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati da almeno quattro diverse vie di segnalazione:
 1. via classica ligando-dipendente;
 2. via ligando indipendente;
 3. via ERE-indipendente;
 4. via non genomica.
- La regolazione di questi meccanismi è fondamentale per il mantenimento di una corretta omeostasi cellulare.



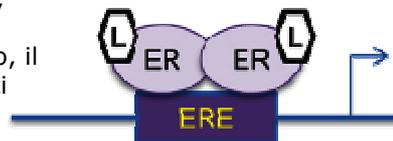
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 141 -

Via classica di segnalazione ligando-dipendente

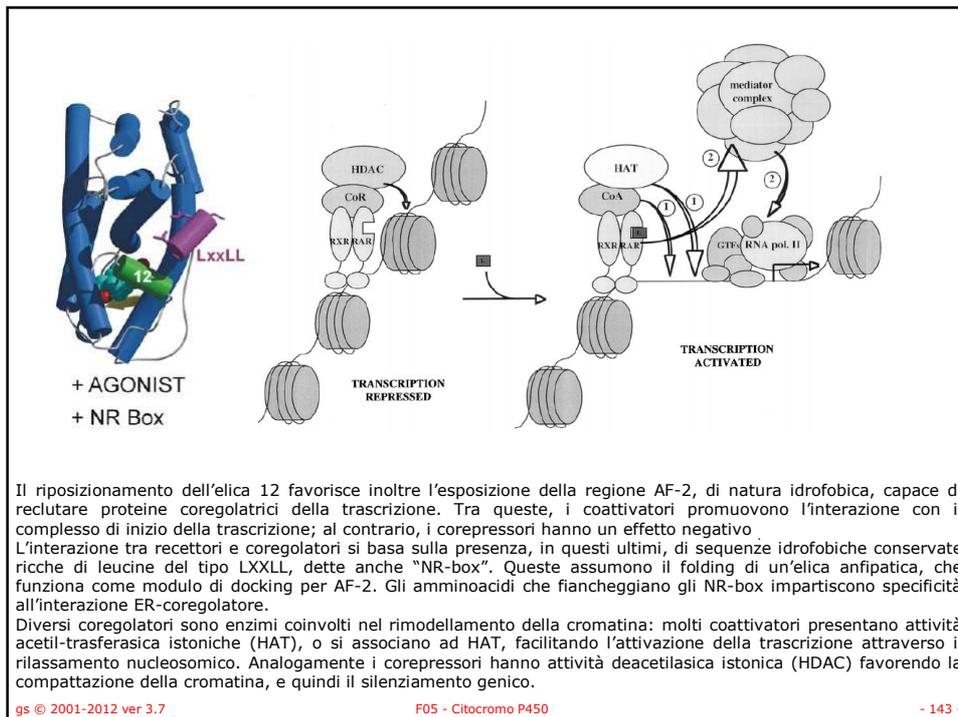
- L'azione dei recettori degli estrogeni sui siti ERE è un classico esempio di azione genomica dei recettori nucleari.
- In assenza di ligando estrogenico, ER è mantenuto a livello nucleare complessato con le proteine hsp 70, hps 90 e hps 56.
- In seguito al legame con l'estrogeno, il recettore va incontro a cambiamenti conformazionali che interessano soprattutto il dominio LDB, in particolare l'elica 12, determinando il distacco dalle hsp, la dimerizzazione ed il legame al DNA.
- Quest'ultimo avviene in corrispondenza delle sequenze ERE, elementi *enhancer* localizzate in *cis* in geni sottoposti a controllo estrogenico.



gs © 2001-2012 ver 3.7

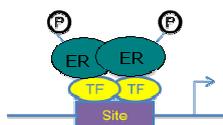
F05 - Citocromo P450

- 142 -



Via di segnalazione ligando-indipendente

- Recentemente è stato dimostrato che ER può essere attivato anche in assenza di ligando, attraverso la fosforilazioni di particolari residui. Il dominio A/B di ER α contiene diversi residui di serina (104, 106, 118, 167) conservati che sono bersaglio di fosforilazione.
- La fosforilazione della Ser 118 di ER α è mediata dalle MAP kinasi, attivate dal legame con EGF al suo recettore di membrana EGFR, e determina il reclutamento di complessi coregolatori.
- La stessa fosforilazione può essere indotta da altri fattori di crescita, quali l'insulina, i fattori di crescita insulino-simili I e II (IGF-I ed IGF-II), il fattore di crescita trasformante beta (TGF-beta) ed il fattore di crescita trasformante beta (TGF-beta). La fosforilazione della Ser167 di ER α sembra invece mediata dalla Ck2 e risulta in una aumentata affinità del recettore stesso per il DNA.
- Anche ER β può essere attivato in modo ligando-indipendente, mediante fosforilazione delle Ser106 e Ser124 operata dalle MAP kinasi, in presenza di EGF. Questa fosforilazione determina il reclutamento ligando-indipendente di SRC-1 ed il conseguente aumento dell'attività trascrizionale di ER β .



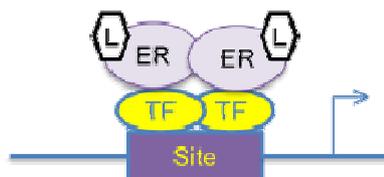
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 144 -

Via di segnalazione ERE-indipendente

- I recettori degli estrogeni, una volta attivati dal ligando, sono in grado di modulare anche la trascrizione di geni che non presentano sequenze ERE nei propri promotori.
- In questi casi la transattivazione non sarebbe diretta, ma mediata da altri fattori di trascrizione, come AP-1 (*Activating-Protein-1*), costituito da un eterodimero delle proteine Jun e Fos, e Sp-1 (*Stimulating protein 1*), che riconosce sequenze di DNA ricche di guanine e citosine.



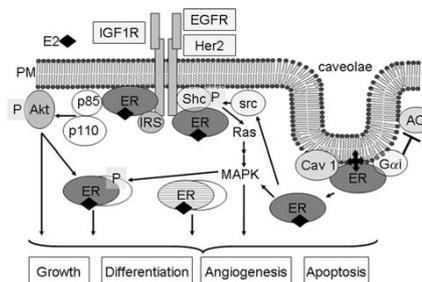
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 145 -

Via di segnalazione non genomica

- È stato osservato che la somministrazione di E2 può avere anche effetti a breve termine (da secondi a minuti), che includono l'attivazione di chinasi e fosfatasi e aumentano il flusso di ioni attraverso le membrane, che presuppongono un'azione non genomica di ER.
- È stato infatti proposto l'esistenza di un pool di ER di membrana che, attivati dal legame con E2, sarebbe in grado di interloquire direttamente con vie di segnalazione citoplasmatiche, tra cui quelle delle MAP chinasi e di Src, implicate nel controllo della proliferazione cellulare.



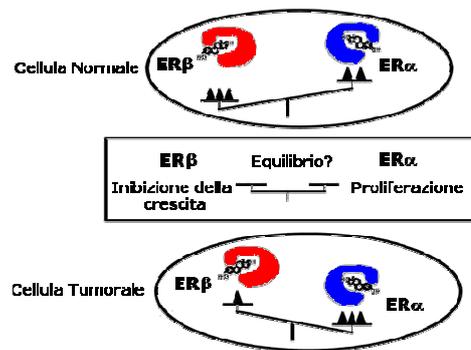
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 146 -

I recettori per gli estrogeni e la carcinogenesi

In diversi modelli cellulari di cancro della mammella e dell'ovaio, la riduzione dell'espressione di ER β durante la carcinogenesi è da ricondursi a meccanismi epigenetici, che comprendono la metilazione delle citosine delle isole CpG del promotore, nonché l'ipoacetilazione istonica del gene ER β .



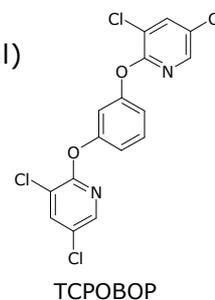
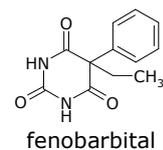
gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 147 -

CYP2B e CAR

- Ratti – CYP2B1 e CYP2B2
- Umani CYP2B6
- L'espressione di CYP2B1 non è misurabile in ratti non trattati
- CYP2B1/2 è indotta da farmaci (fenobarbital) o da altre molecole (TCPOBOP)
- Meccanismo – up-regulation trascrizionale.

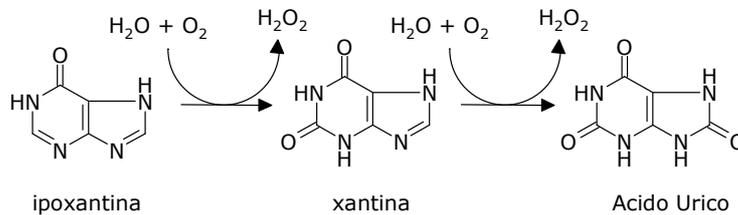


gs © 2001-2012 ver 3.7

F05 - Citocromo P450

- 148 -

Xantina ossidasi



- Xantina ossidasi (EC 1.17.3.2)
 - Catalizza la formazione di Xantina e acido urico nel metabolismo delle purine.
 - Coinvolto anche in altri sistemi ossidativi
 - Metallo proteina (Fe Mo) contiene un centro ferro zolfo 2Fe-2S
 - Produce H₂O₂
 - In alcuni casi può produrre anione superossido
 - $RH + H_2O + 2 O_2 = ROH + 2 O_2^{\cdot -}$

Referenze sul WEB

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
 - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
 - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
 - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
 - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna – Alma Mater

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it