

Prof. Giorgio Sartor

Biotrasformazione degli xenobiotici

Enzimi di Fase I

Copyright © 2001-2020 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 4.7 - Feb-20

1

Biotrasformazione degli xenobiotici

- Scopo
 - Convertire sostanze lipofile in idrofile
 - Facilitare l'escrezione
- Conseguenze
 - Cambio di solubilità
 - Cambio di pK
 - Detossificazione
 - Attivazione metabolica

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 2 -

2

Schema generale

Lipofilo \longrightarrow Idrofilo

- Diminuzione dell'attività biologica
- Aumentata escrezione



- Variazione di polarità
- Variazione di funzionalità

- Variazione di dimensioni
- Variazione di carica
- Variazione di solubilità

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 3 -

3

Schema generale ...

Lipofilo \longrightarrow Idrofilo



- Ulteriore metabolismo

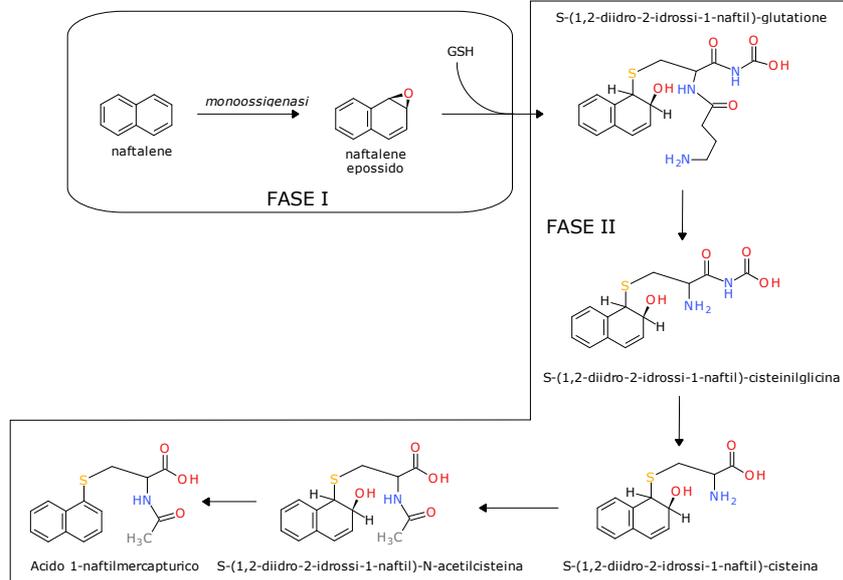
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 4 -

4

Biotrasformazione del naftalene



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 5 -

5

Fase I e Fase II

	FASE I	FASE II
Tipo di reazione	Idrolisi Ossidazione Riduzione Metilazione	Coniugazione
Aumento di idrofilia	Piccolo	Grande
Meccanismo generale	Esposizione di gruppi funzionali	Addizione di un composto polare ad un gruppo funzionale
Conseguenze	Può portare all'attivazione metabolica	Facilita l'escrezione

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 6 -

6

Formazione di radicali dell'ossigeno

- Le reazioni di ossidoriduzione che coinvolgono l'ossigeno possono portare alla produzione di radicali (specie reattive dell'ossigeno, ROS):
 - anione superossido ($O_2^{\cdot-}$)
 - radicale idrossido (OH^{\cdot})
 - acqua ossigenata (H_2O_2)
 - esistono sistemi di protezione (SOD, catalasi, perossidasi)
- Alcuni contaminanti possono interagire con la luce per formare radicali (IPA)

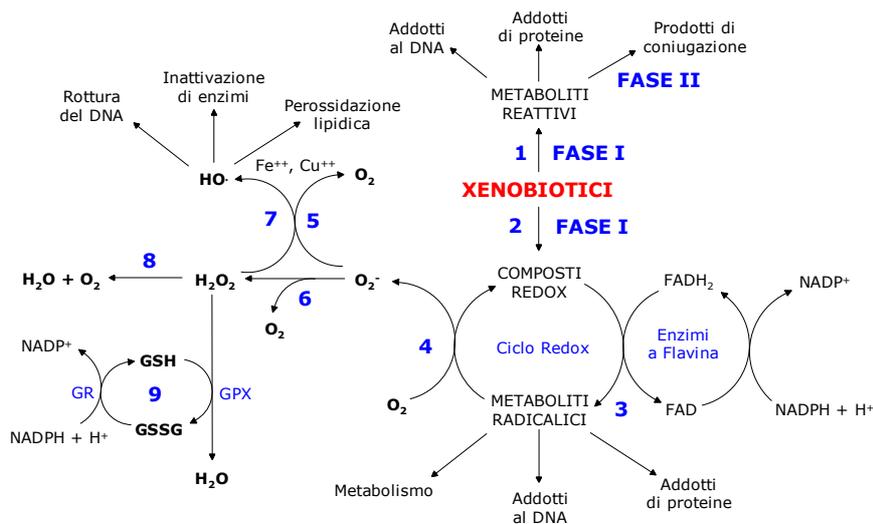
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 7 -

7

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



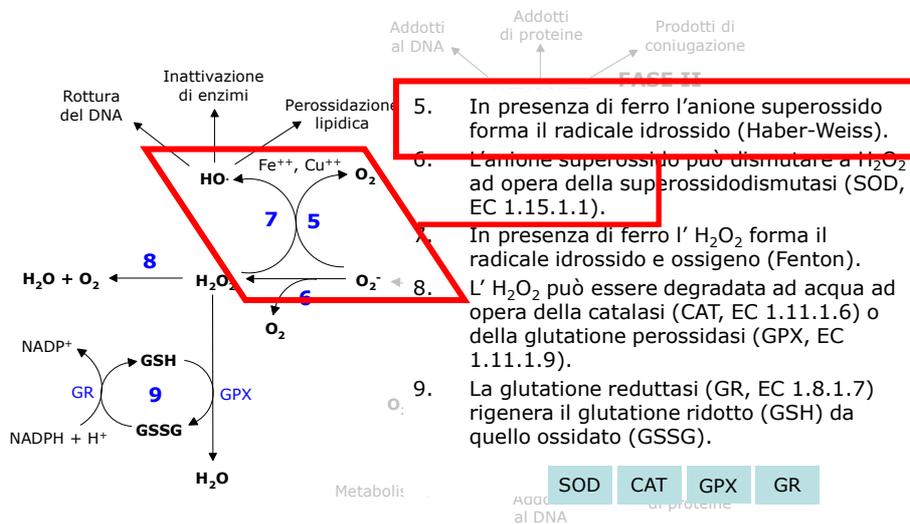
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 8 -

8

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



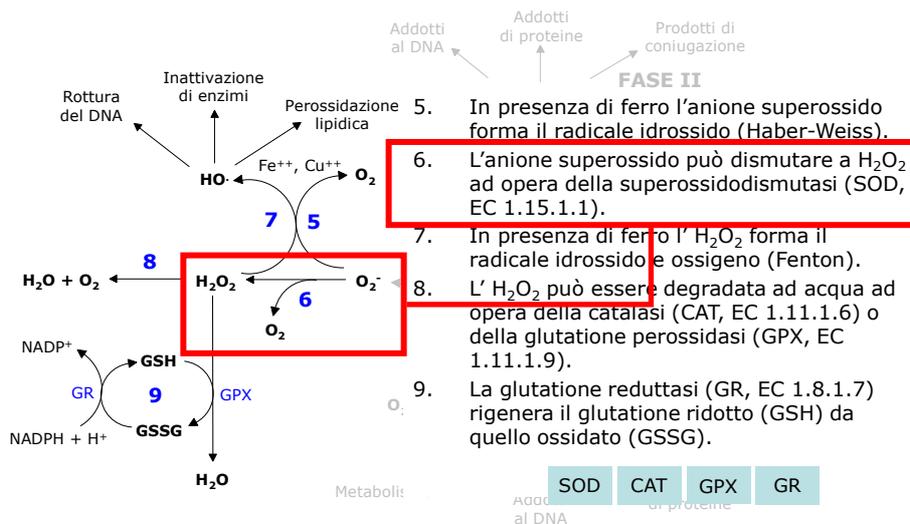
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 11 -

11

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



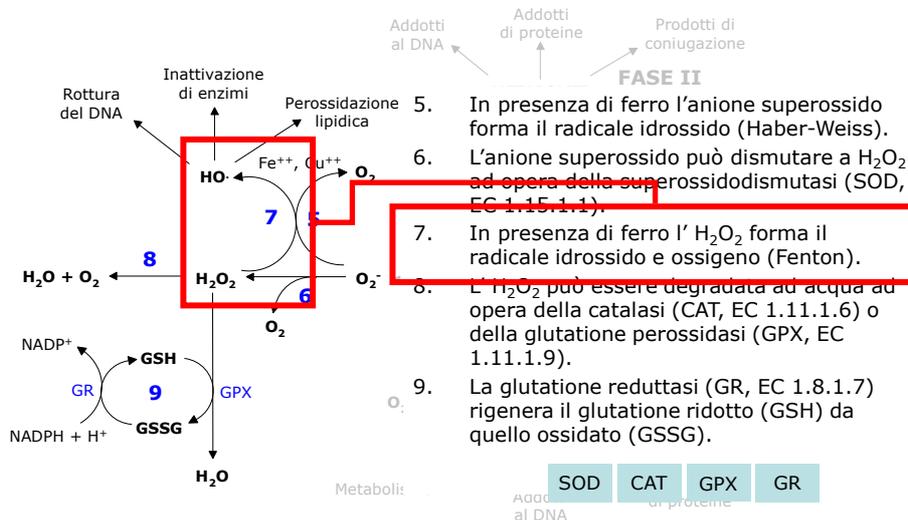
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 12 -

12

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



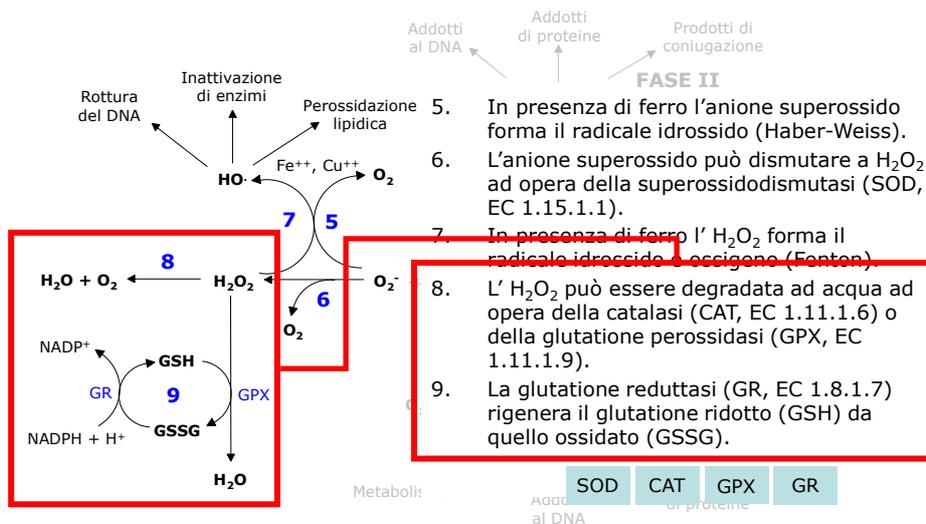
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 13 -

13

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 14 -

14

Enzimi di Fase I

Catalizzano reazioni di:

- Idrolisi
- Riduzione
- Ossido-riduzione
- Ossigenazione (mono o di)

15

Fase I: Idrolisi

- Esterasi e peptidasi
 - idrolisi di esteri **EC 3.1.1.1**
 - idrolisi di legami peptidici **EC 3.4.13.X**
- Idrolasi ad epossido **EC 3.3.2.9**
 - H₂O addizionata ad un epossido

16

Fase I : Riduzione

- Azo riduzione
 - Gruppi N=N a due gruppi -NH₂
- Nitro riduzione
 - Gruppo N=O ad un gruppo -NH₂
- Riduzione del carbonile
- Alcool deidrogenasi (ADH)
- Riduzione dei disolfuri
- Riduzione solfato

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 17 -

17

Fase I : Riduzione

- Riduzione dei chinoni **EC 1.1.3.4**
 - Chinone ossidoreduttasi citosolica
 - Riduzione a due elettroni, non si formano ROS
 - FMN P450-reduttasi
 - Riduzione a un elettrone si possono formare ROS (O₂^{•-})
 - Attivazione metabolica del paraquat

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 18 -

18

Fase I : Riduzione

- Dealogenazione
 - Riduttiva (H rimpiazza X)
 - Aumenta la tossicità del CCl_4 formando radicali liberi
 - Ossidativa (X e H rimpiazzati da =O)
 - Causa epatiti da alotano per formazione di acilalidi intermedie
 - Deidroclorazione (2 X rimossi, si forma $\text{C}=\text{C}$)
 - Da DDT a DDE

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 19 -

19

Fase I: Ossido-riduzione

- Alcool deidrogenasi
 - Da alcool ad aldeide
 - Polimorfismo genetico: gli asiatici metabolizzano l'alcool più rapidamente
 - Inibita da ranitidina, cimetidina e aspirina
- Aldeide deidrogenasi
 - Da aldeide a acido carbossilico

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 20 -

20

Fase I

- Monoossigenasi
 - Metalloproteine (eme)
 - Monoossigenasi a flavina
 - Enzimi microsomiali
 - Coinvolte nella detossificazione
- Diossigenasi
 - Metalloproteine (non eme)

Enzimi di fase I

Citocromo P450

Citocromo P450 (CYP)

- **Microsomiale:** gli elettroni sono trasferiti da NADPH attraverso una CYP450 reduttasi. Anche il Cyt b5 può contribuire alla riduzione attraverso una specifica reduttasi (CYB5R).
- **Mitocondriale:** utilizza adrenodossina reduttasi e e adrenodossina per trasferire elettroni dal NADPH al P450.
- **Batterico:** utilizza ferrodossina e ferrodossina reduttasi per trasferire gli elettroni.
- **Sistemi a FMN/Fd/P450:** presenti in *Rhodococcus* sp. Dove un dominio FMN è fuso con CYP.
- **Sistemi a P450:** non richiedono potere riducente esterno. Includono la tromoxano sintasi (CYP5), la prostaciclina sintasi (CYP8) e la allene ossido sintasi (CYP74A).

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 25 -

25

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.

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 26 -

26

CYP

- Ossida gli xenobiotici usando il NADPH come cofattore e O₂
- La reazione procede come ciclo catalitico:
 $RH + O_2 + H^+ + NADPH \longrightarrow ROH + H_2O + NADP^+$
- 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 © 2001-2020 ver 4.7

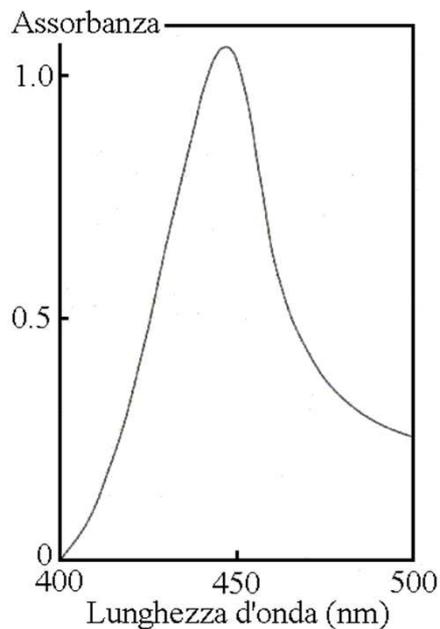
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 27 -

27

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)



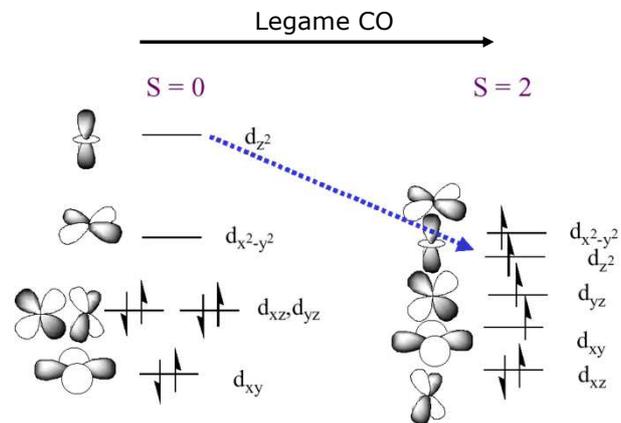
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 28 -

28

Configurazione elettronica del Fe(II)



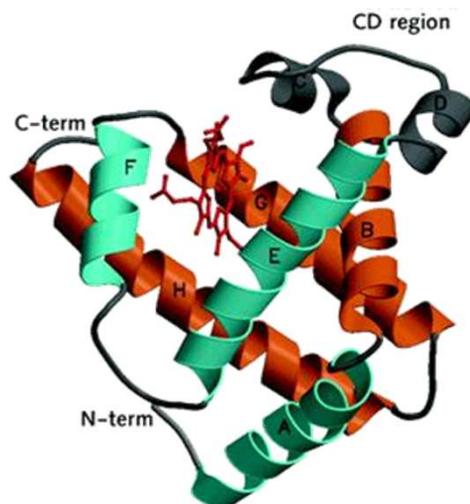
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 29 -

29

Struttura



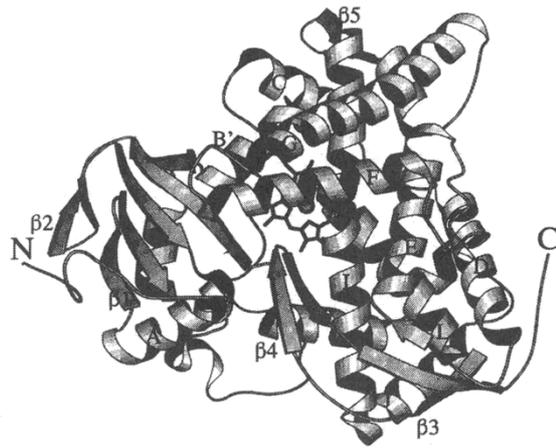
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 30 -

30

Struttura



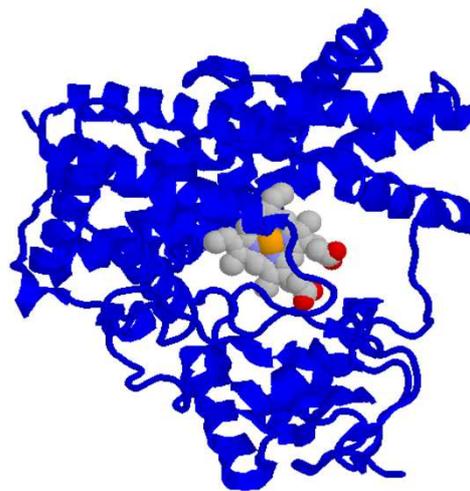
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 31 -

31

Struttura



1PO5

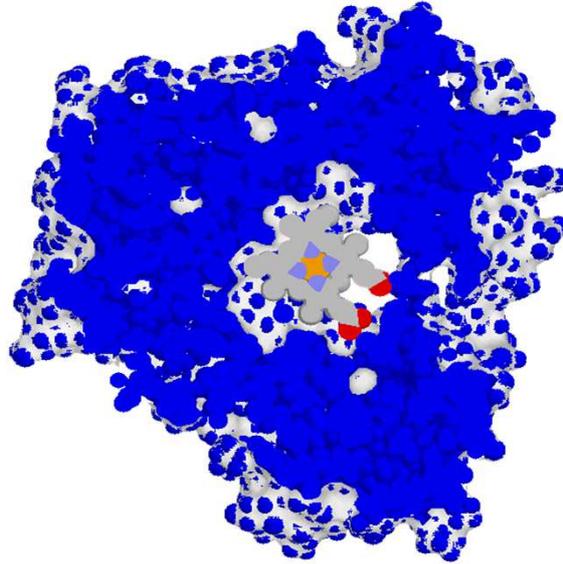
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 32 -

32

Struttura



1PO5

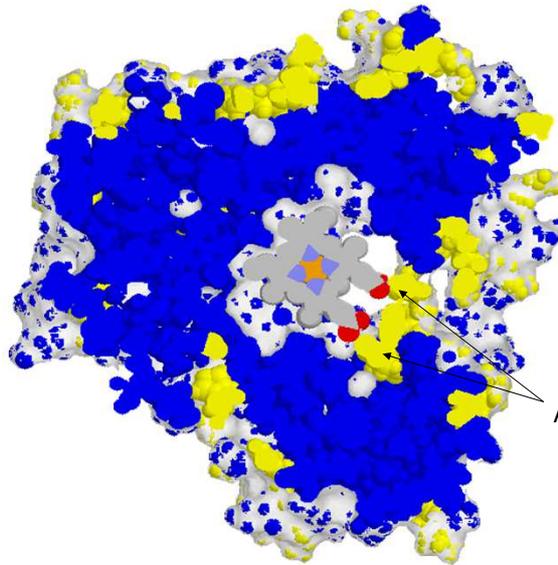
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 33 -

33

Struttura



AA basici

1PO5

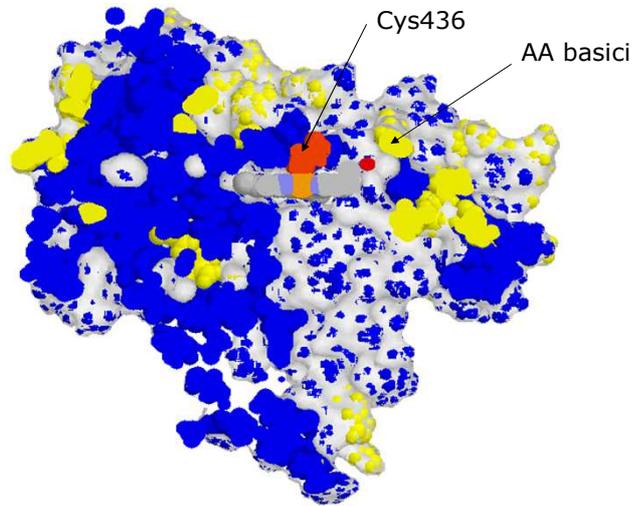
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 34 -

34

Struttura



1PO5

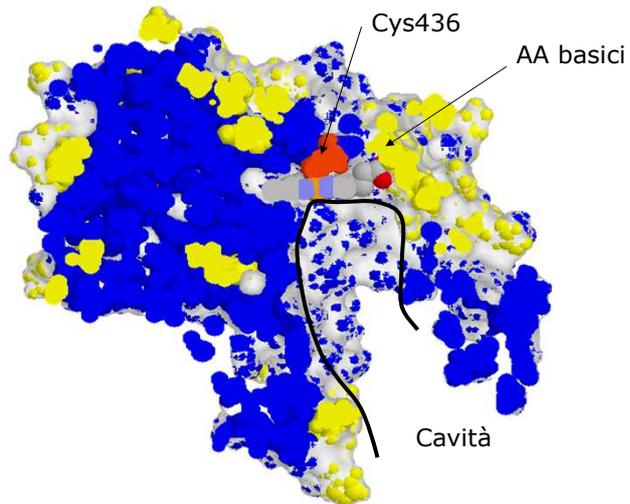
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 35 -

35

Struttura



1PO5

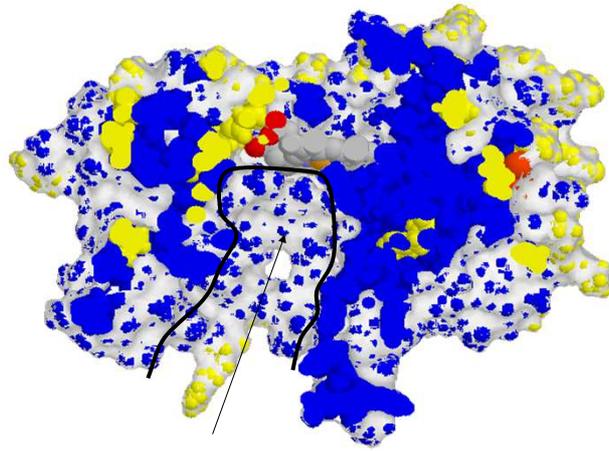
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 36 -

36

Struttura



1P05

Cavità

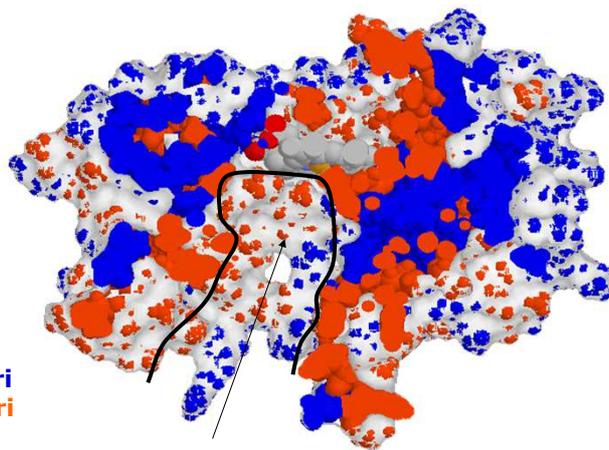
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 37 -

37

Struttura



AA polari
AA neutri

Cavità

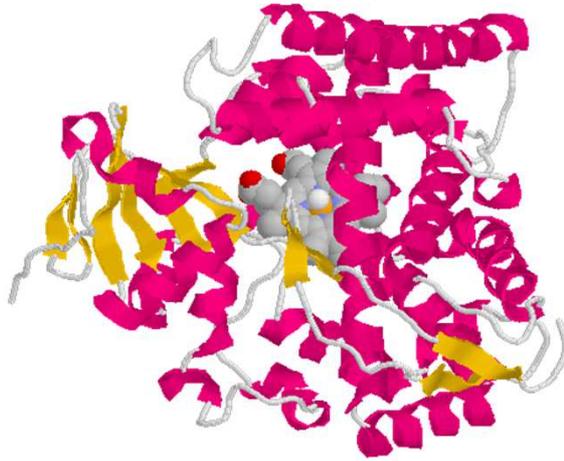
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 38 -

38

Struttura



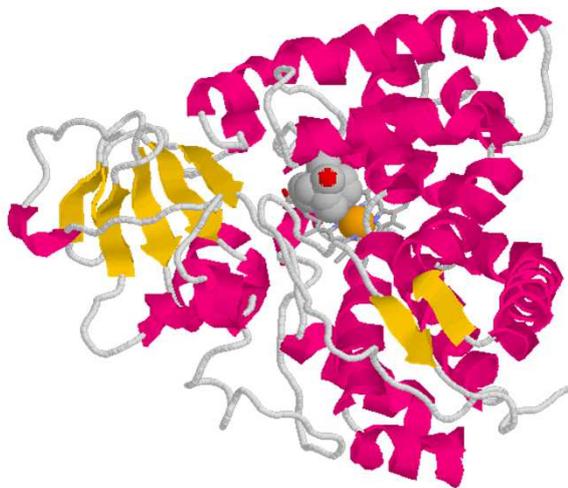
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 39 -

39

Struttura



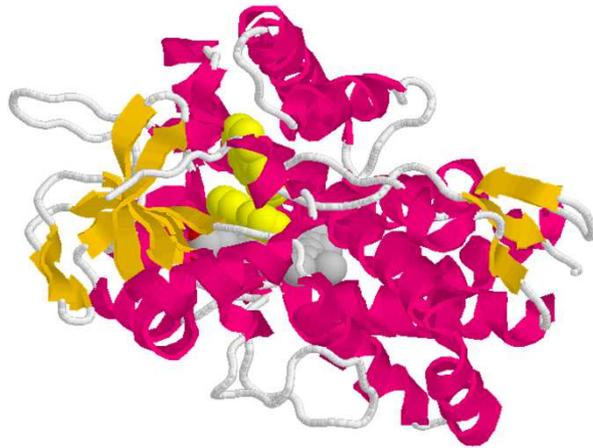
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 40 -

40

Struttura del CYP



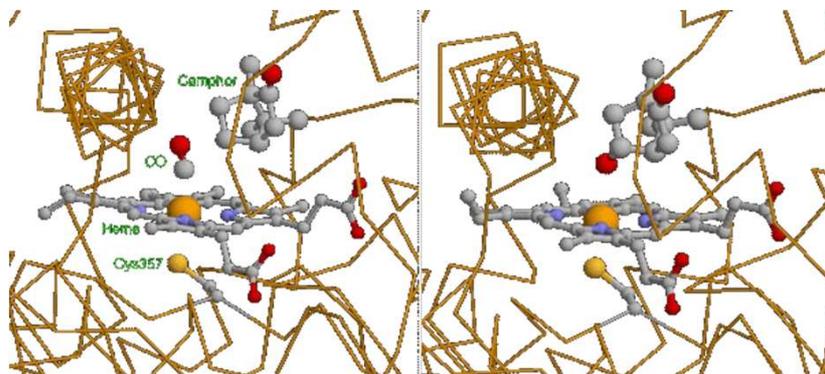
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 41 -

41

Sito di legame



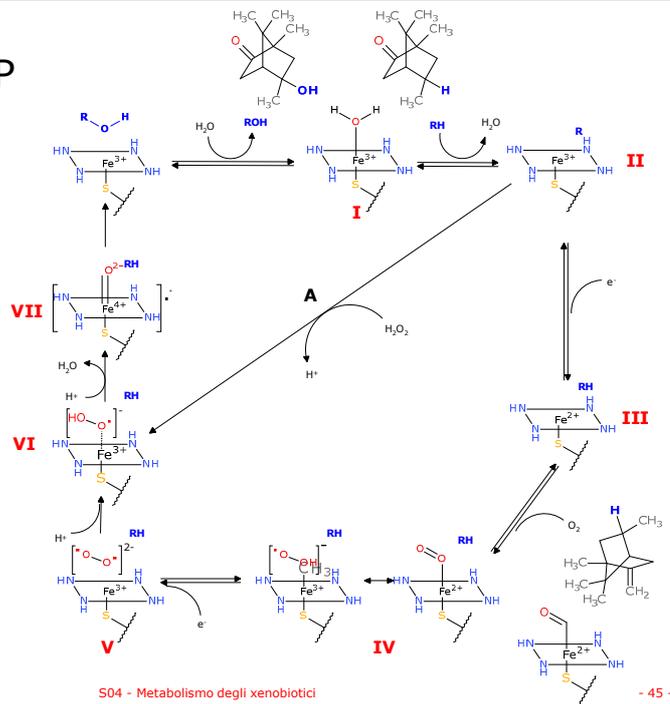
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 42 -

42

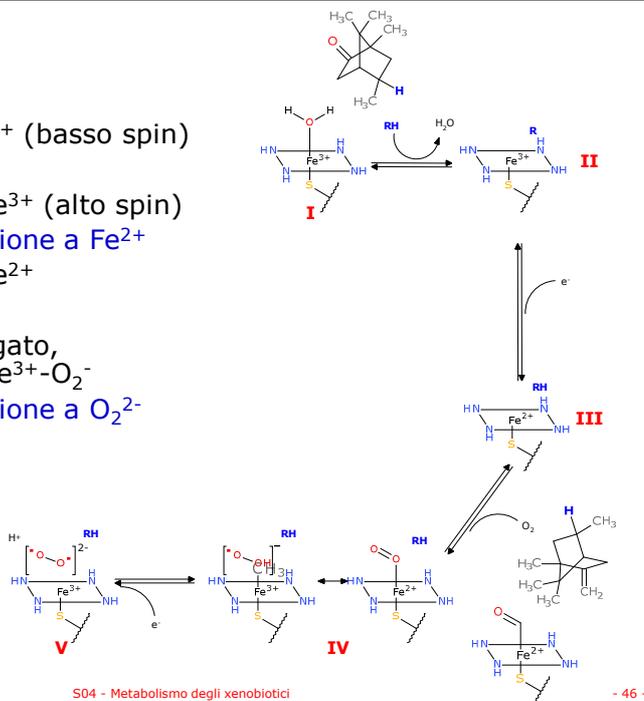
Meccanismo ciclico del CYP



45

Meccanismo ciclico del CYP

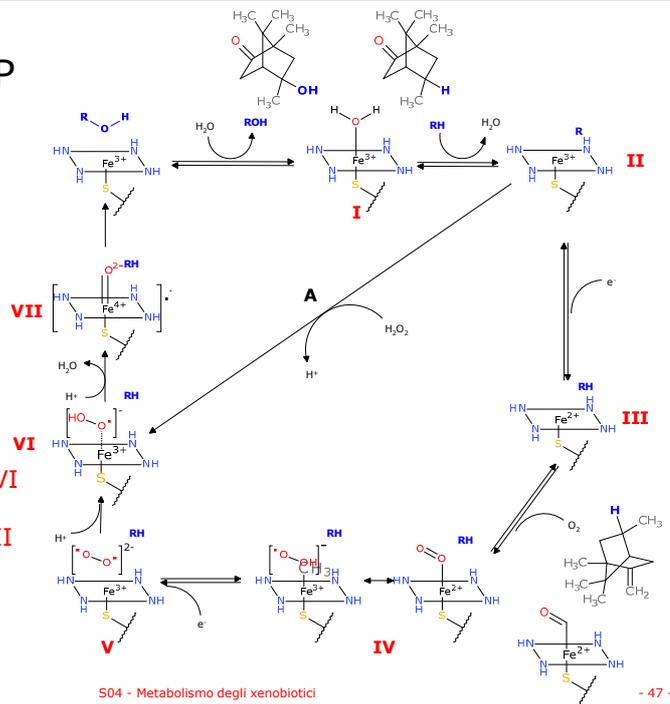
- I. P450 acquo Fe^{3+} (basso spin)
Lega RH
- II. P450 canfora Fe^{3+} (alto spin)
entra $1e^-$, riduzione a Fe^{2+}
- III. P450 canfora Fe^{2+}
Lega O_2
- IV. P450 con O_2 legato,
equivalente a $\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^-$
entra $1e^-$, riduzione a O_2^{2-}
- V. P450 perossido



46

Meccanismo ciclico del CYP

- VI. Entra 1H⁺
P450 idroperossido
Entra 1H⁺ esce H₂O
- VII. P450 Fe⁴⁺ O²⁻
catione radicale sulla proteina
si forma ROH
- A. L'idroperossido VI si può formare per reazione di II con H₂O₂



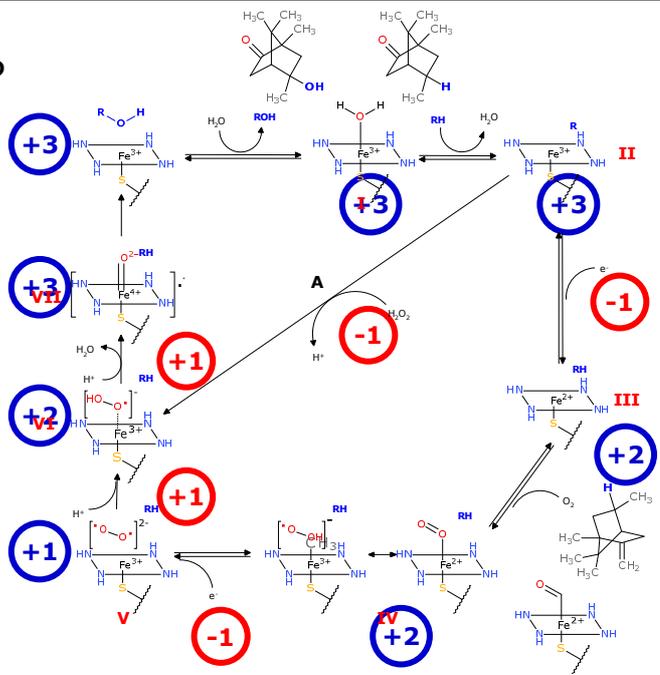
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 47 -

47

Meccanismo ciclico del CYP



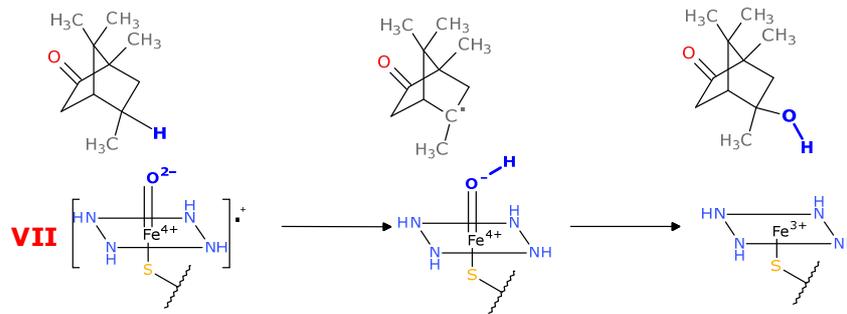
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 48 -

48

Meccanismo ciclico del CYP



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 49 -

49

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 50 -

50

Meccanismo

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



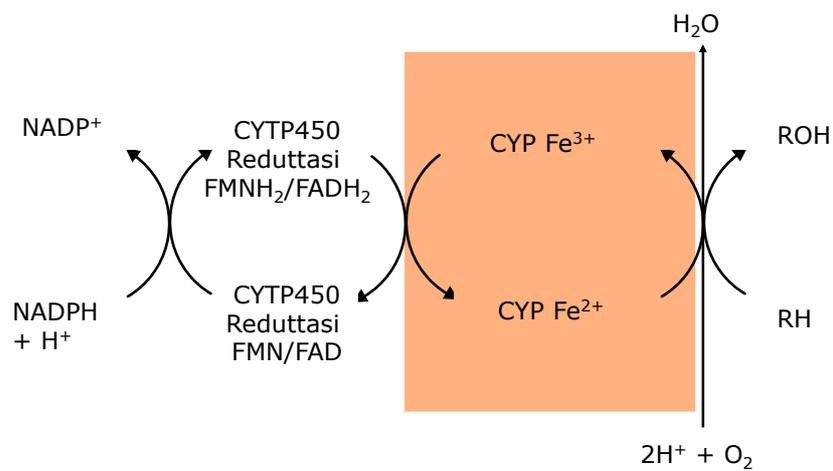
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 51 -

51

Meccanismo generale del CYP



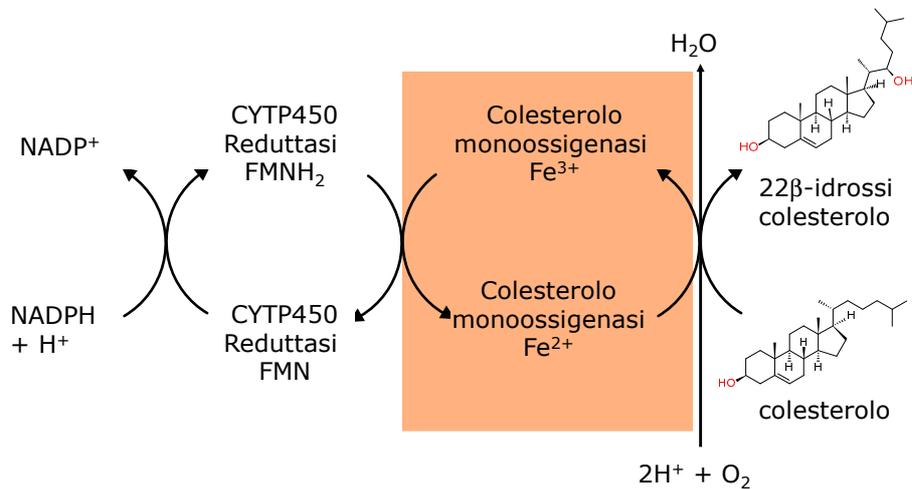
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 52 -

52

Colesterolo monoossigenasi (CYTP450scc - EC 1.14.15.6 - CYP11A)



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 53 -

53

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Idrossilazione di aromatici
- Epossidazione di aromatici
- Idrossilazione di alifatici
- Epossidazione di alcheni
- N-dealchilazione
- O-dealchilazione
- S-dealchilazione
- 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

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 54 -

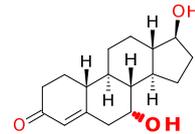
54

Idrossilazione di atomi di carbonio alifatici o aromatici:

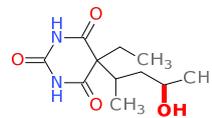
da (*S*)-mefentoina a 4'-idrossi-(*S*)-mefentoina (CYP2C19)



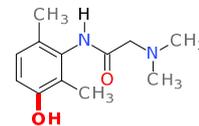
da testosterone a 7 α -idrossitestosterone (CYP3A4)



Idrossilazione del pentobarbitone



Idrossilazione della linocaina



gs © 2001-2020 ver 4.7

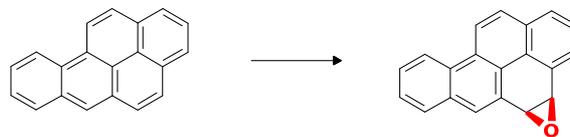
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 55 -

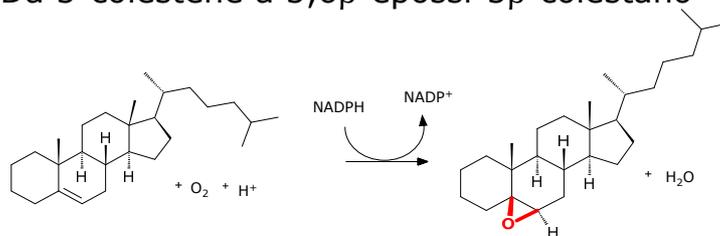
55

Epossidazione:

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



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



gs © 2001-2020 ver 4.7

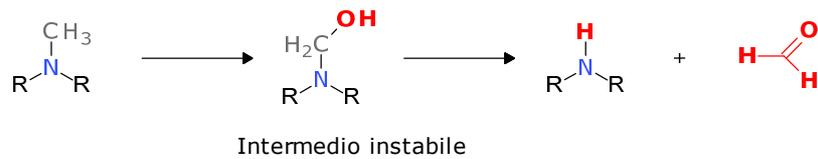
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 56 -

56

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione
 - Meccanismo della dealchilazione



gs © 2001-2020 ver 4.7

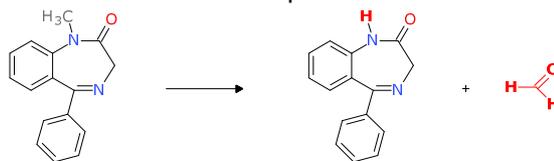
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 57 -

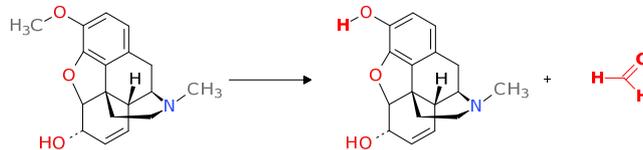
57

Dealchilazione:

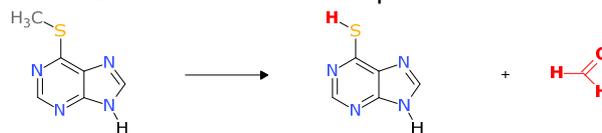
N-demetilazione del diazepam



O-demetilazione della codeina



S-demetilazione della S-metiltiopurina



gs © 2001-2020 ver 4.7

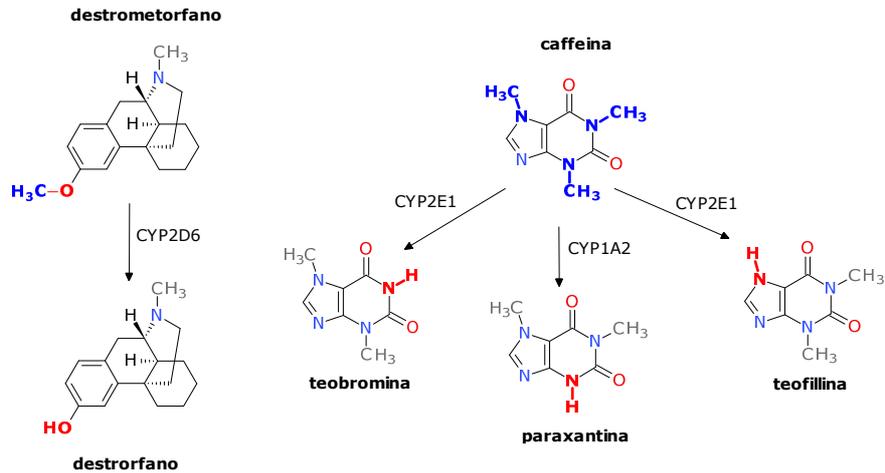
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 58 -

58

Dealchilazione di eteroatomi

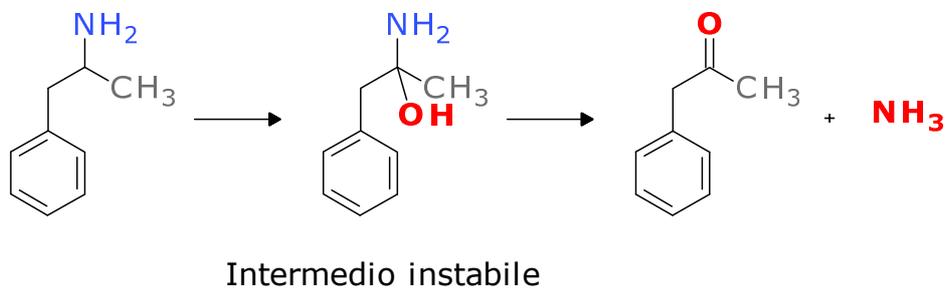
- *O*-dealchilazione (da destrometorfano a destrorfano)
- *N*-demetilazione della caffeina



59

Deaminazione ossidativa

- Meccanismo di deaminazione dell'anfetamina

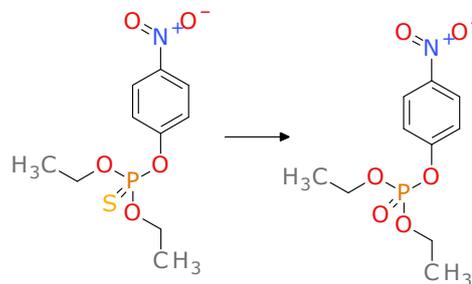


60

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 © 2001-2020 ver 4.7

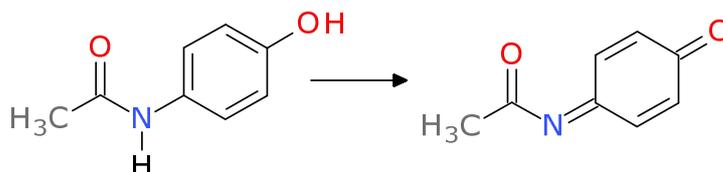
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 61 -

61

Altre 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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 62 -

62

Varietà

- Oltre 12000 isoforme di CYP sono state identificate nella biosfera.
- Il genoma umano contiene circa 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

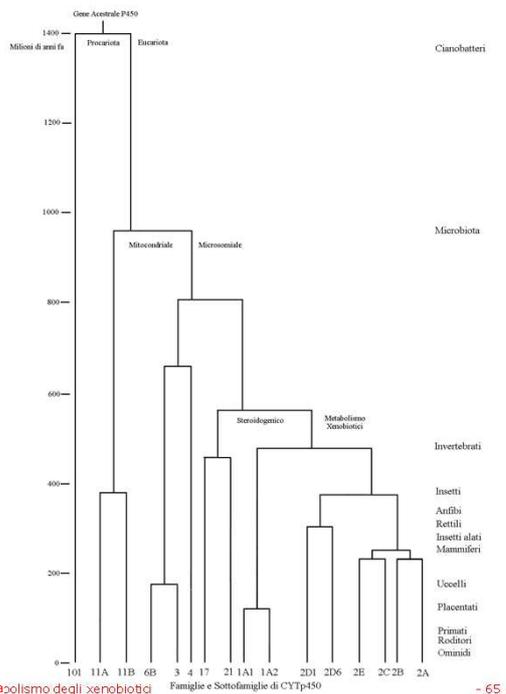
Varietà

- 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 in *Chlamodymonas*

- Filogenesi



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 65 -

65

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.
...	

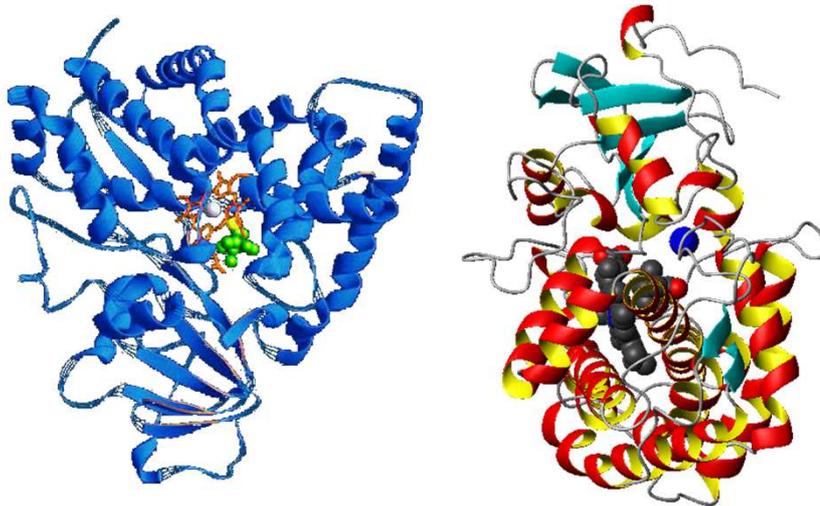
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 66 -

66

Citocromo P450 classe 1



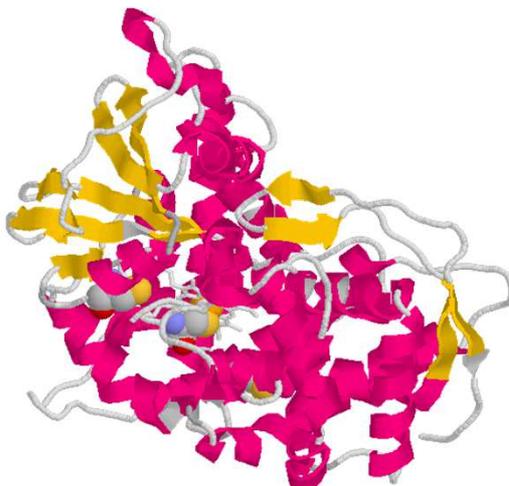
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 67 -

67

Citocromo P450 classe 1



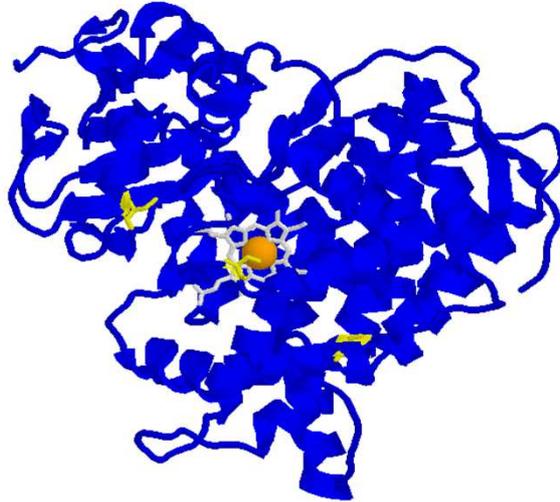
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 68 -

68

Citocromo P450 classe 1



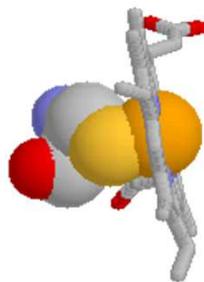
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 69 -

69

Citocromo P450 classe 1



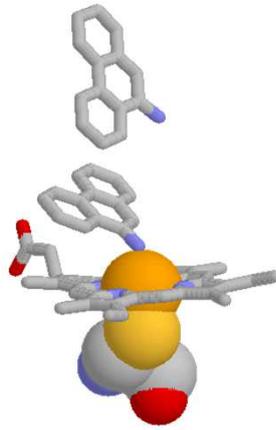
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 70 -

70

Citocromo P450 classe 1



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 71 -

71

Una classificazione degli isoenzimi

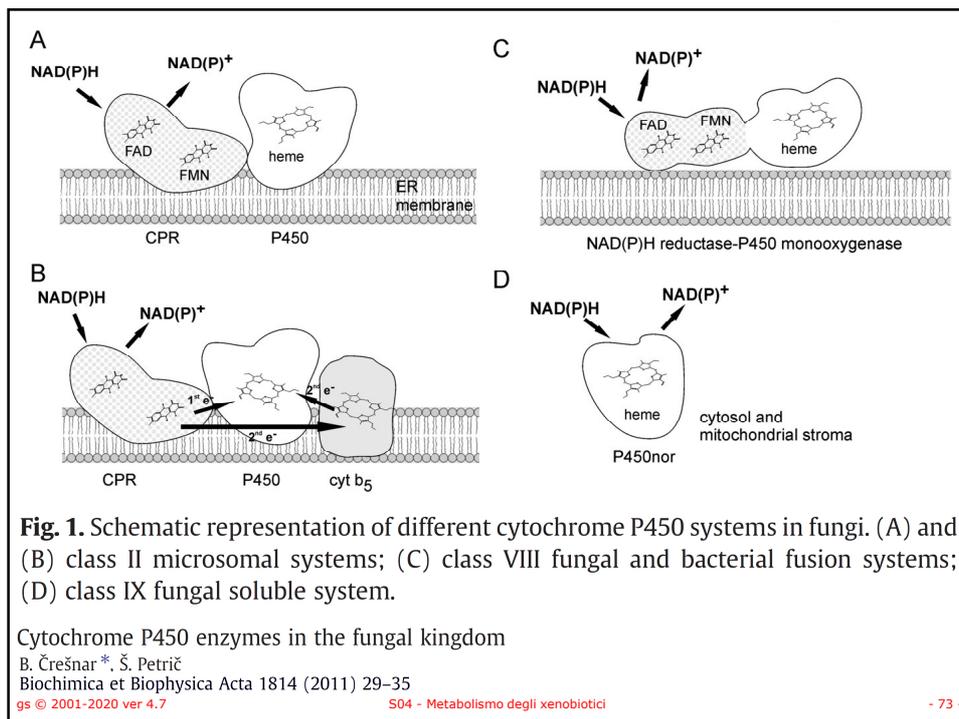
Classe	Caratteristiche
1	In mitocondri di cellule eucariote e batteriche. Associato con una proteina Fe-S e assistito da una reduttasi NADH dipendente che contiene FAD o FMN.
2	Nel reticolo endoplasmatico (microsomi) di cellule eucariote. Implicato nel metabolismo di composti esogeni. Il partner redox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

gs © 2001-2020 ver 4.7

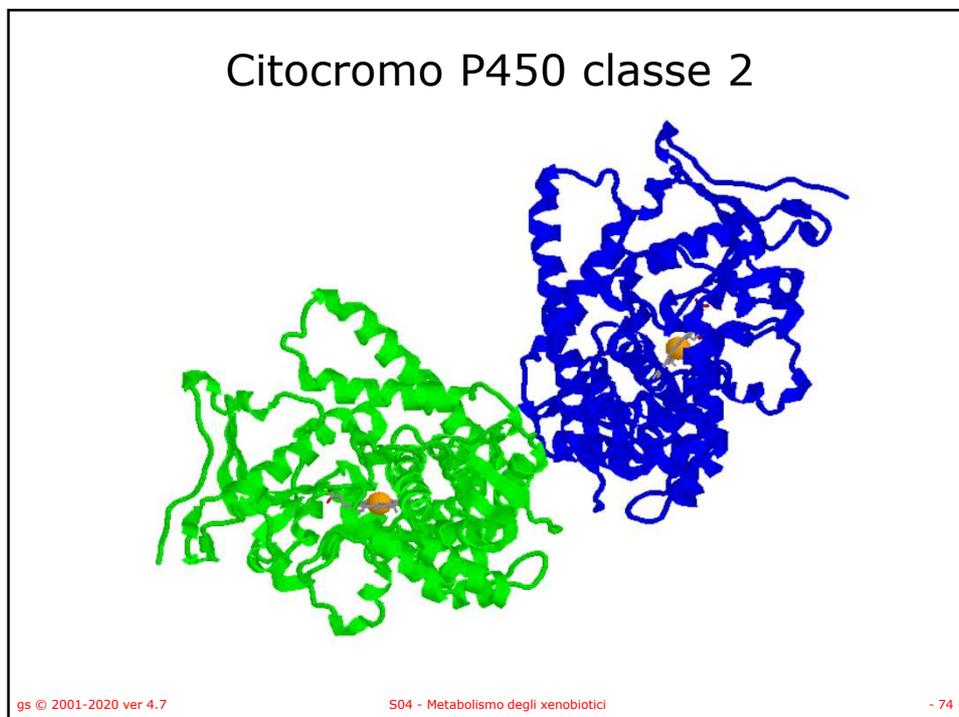
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 72 -

72

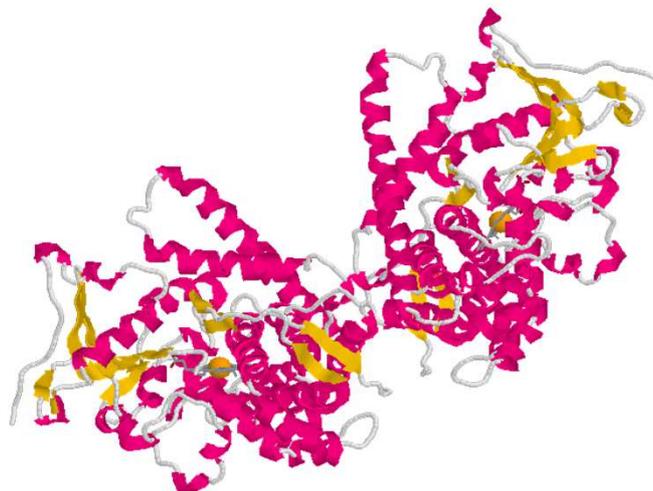


73



74

Citocromo P450 classe 2



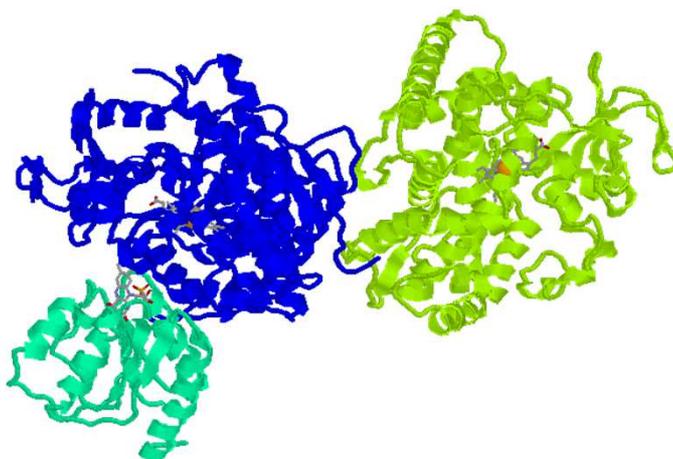
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 75 -

75

Citocromo P450 classe 2 e dominio legante FMN della NADPH reduttasi



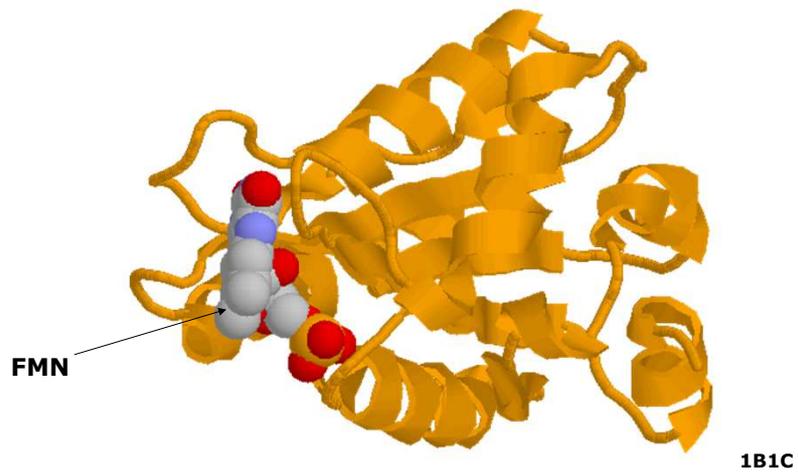
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 76 -

76

Citocromo P450 Reduttasi (EC:1.6.2.4)



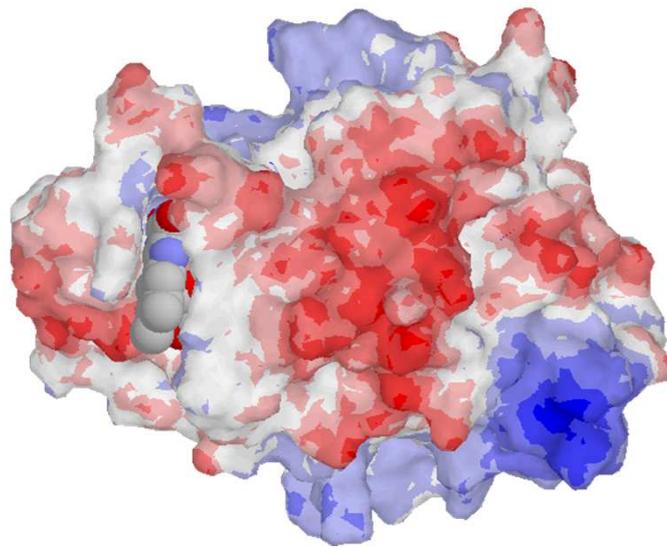
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 77 -

77

Citocromo P450 Reduttasi (EC:1.6.2.4)



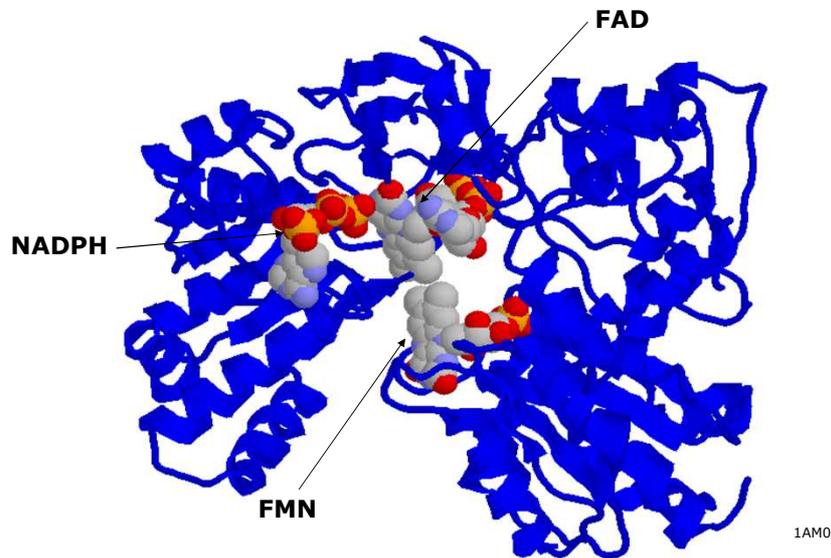
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 78 -

78

NADPH-Citocromo P450 Reduttasi (EC:1.6.2.4)



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 79 -

79

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 (?)

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 80 -

80

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](#)

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 81 -

81

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 82 -

82

Alcuni componenti nell'uomo

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

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 83 -

83

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 84 -

84

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 85 -

85

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-metilcolaurina 3'-monossigenasi	CYP80B1
1.14.13.73	tabersonina 16-idrossilasi	CYP71D12

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 86 -

86

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 87 -

87

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	linaloolo 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

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

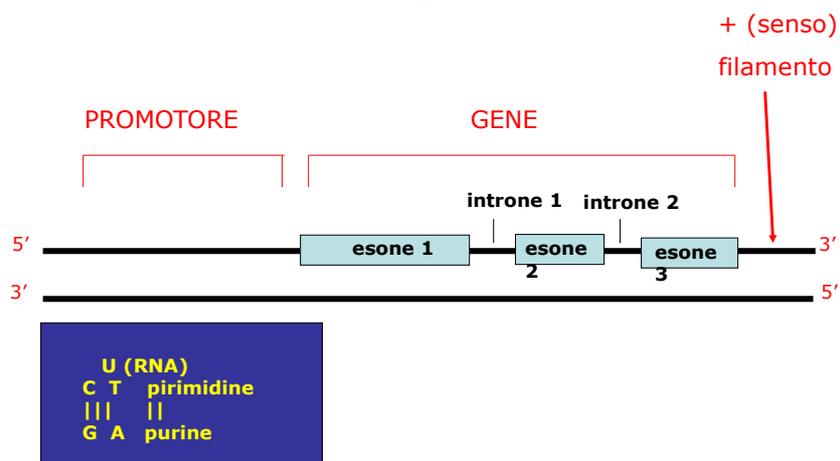
- 88 -

88

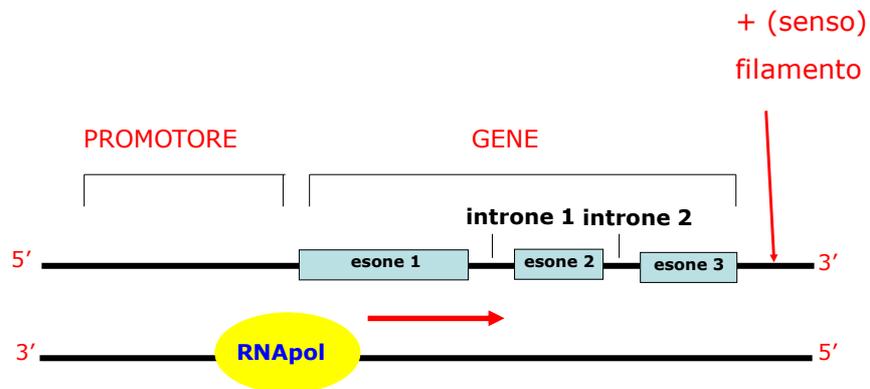
Induzione

- 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



Il DNA fa RNA che fa PROTEINA



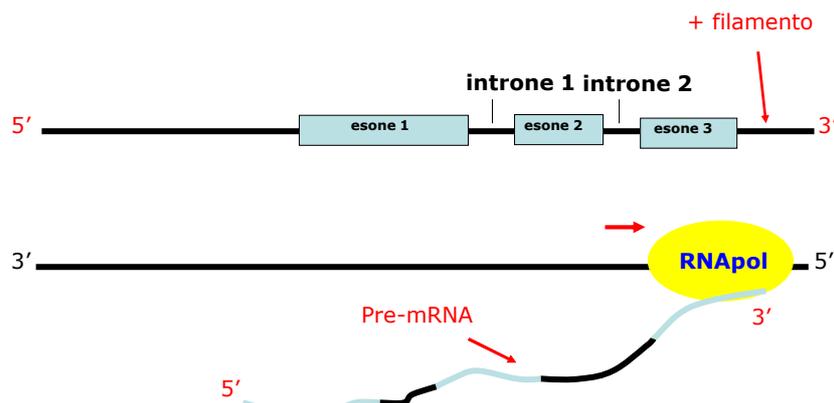
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 91 -

91

Trascrizione



Il filamento complementare dà una COPIA del GENE.

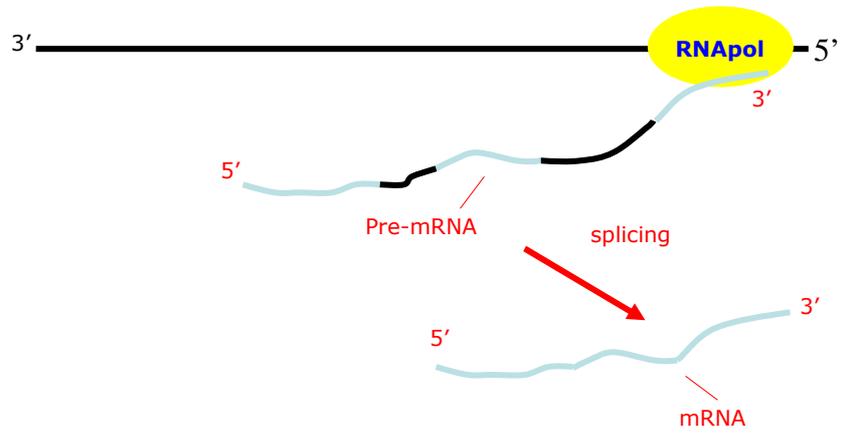
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 92 -

92

Splicing



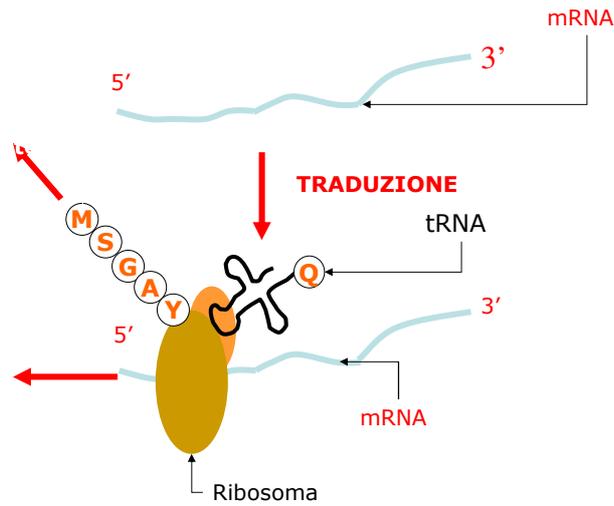
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 93 -

93

Traduzione



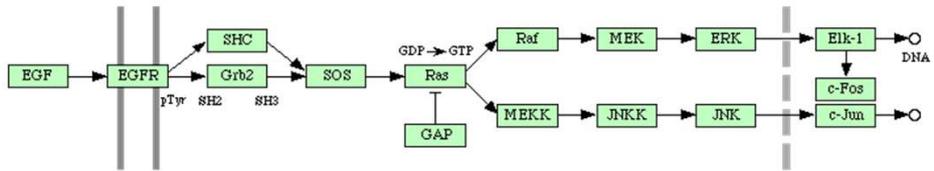
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 94 -

94

MAPK



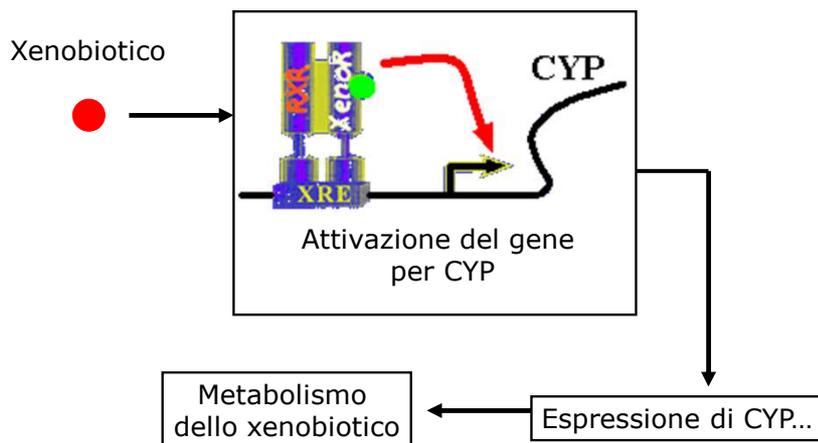
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 95 -

95

Il paradigma



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 96 -

96

CYP1A1 e recettori per idrocarburi aromatici

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

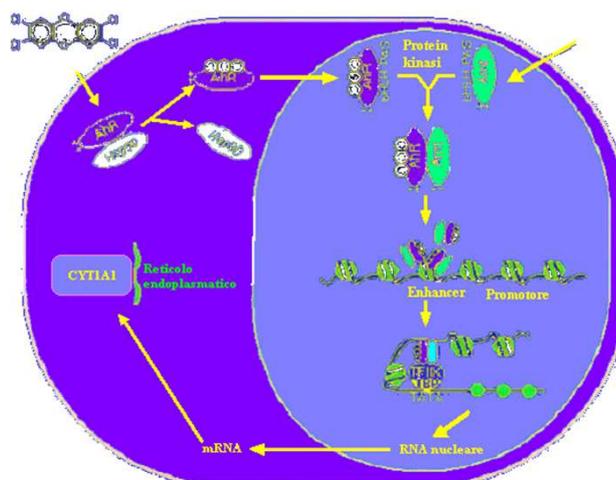
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 97 -

97

Induzione CYP1



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 98 -

98

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 101 -

101

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

AGGACANNNTGTACC

TCCTGTNNNACATGG

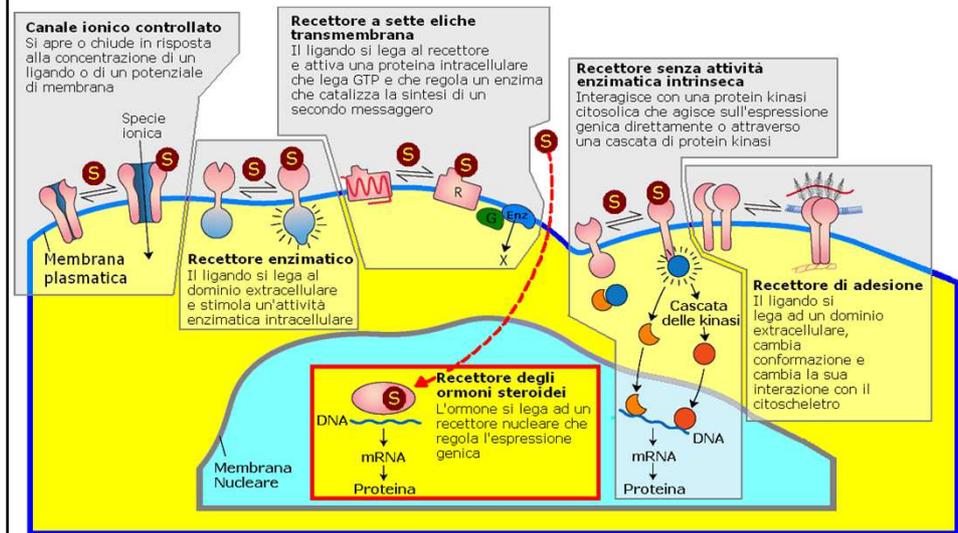
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 102 -

102

Recettori degli ormoni steroidei



gs © 2001-2020 ver 4.7

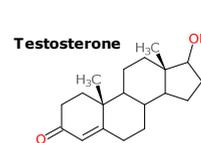
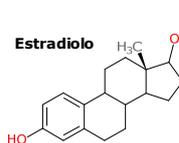
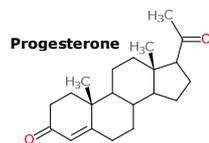
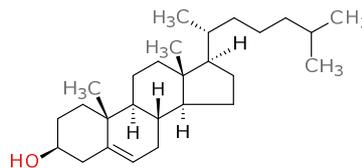
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 103 -

103

Ormoni steroidei

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



gs © 2001-2020 ver 4.7

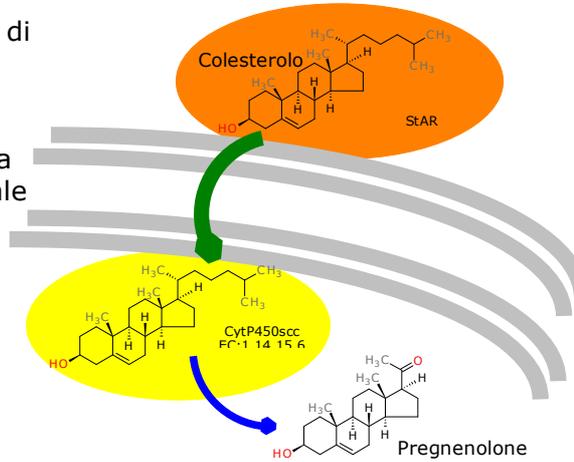
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 104 -

104

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.



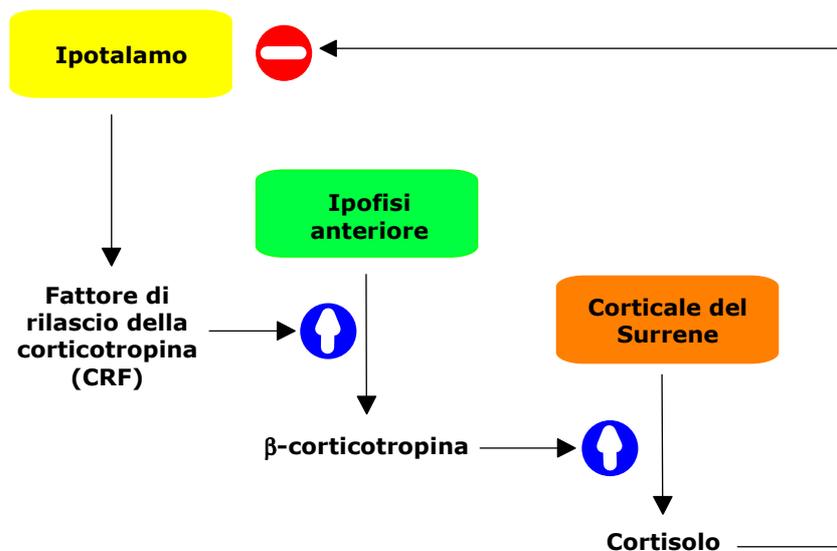
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 105 -

105

Regolazione a feedback

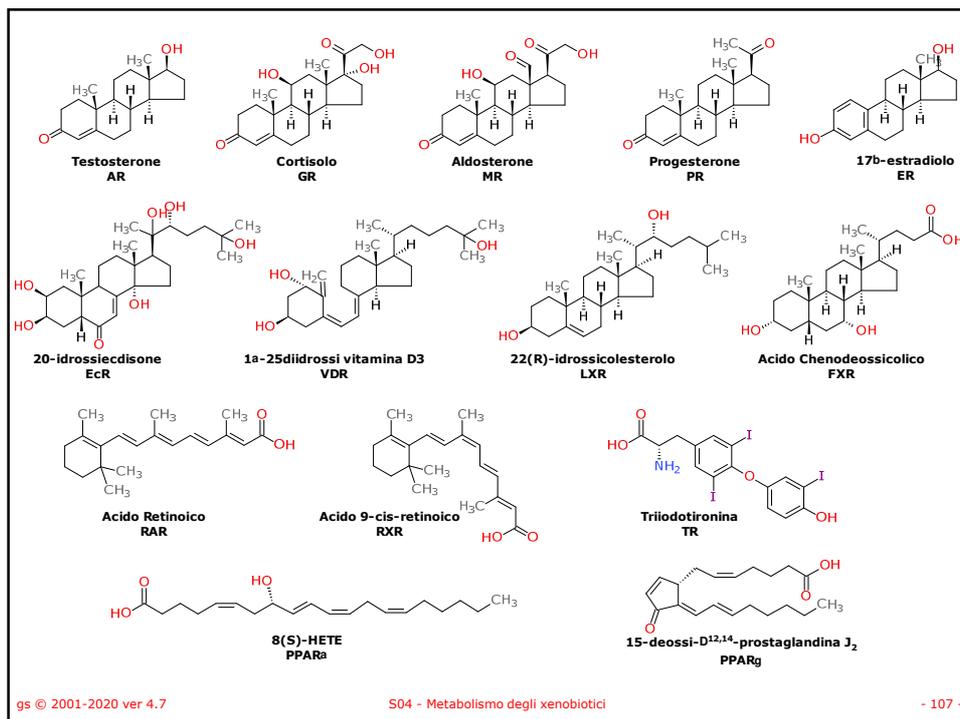


gs © 2001-2020 ver 4.7

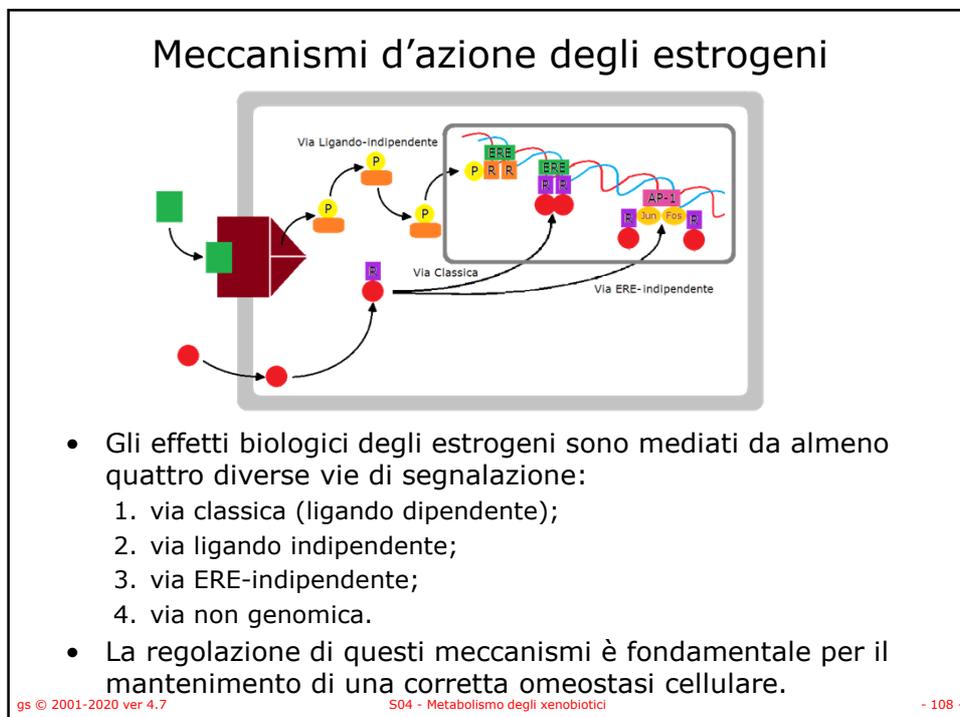
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 106 -

106

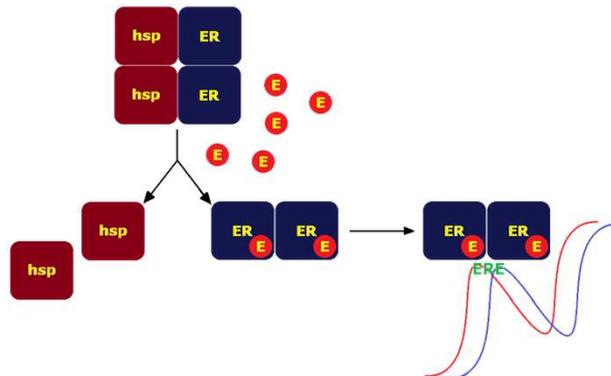


107



108

Via classica 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 hsp70, hsp90 e hsp56.

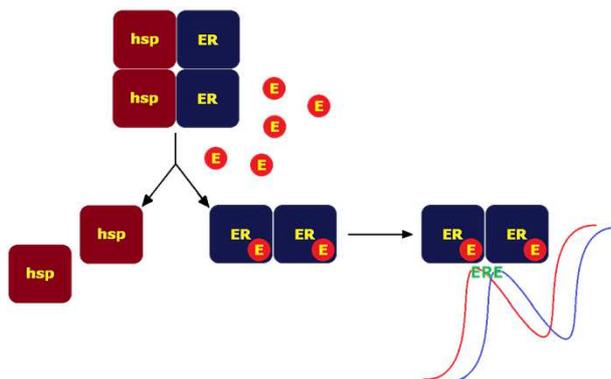
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 109 -

109

Via classica ligando-dipendente



- In seguito al legame con l'estrogeno, il recettore va incontro a cambiamenti conformazionali che interessano soprattutto il dominio di legame del ligando (LBD), 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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 110 -

110

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.

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 111 -

111

Recettori degli estrogeni (ER)

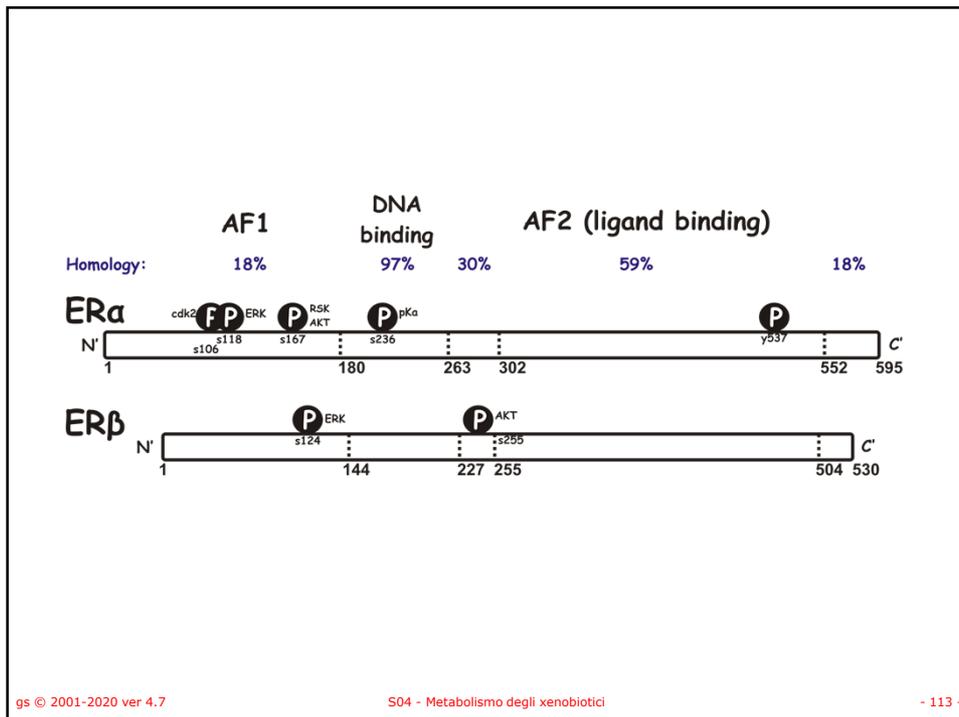
- L'attività degli estrogeni si esplica infatti mediante il legame ai recettori per gli estrogeni che sono localizzati a livello nucleare, dove si trovano sotto forma di dimeri, complessati con le proteine dello shock termico, (Hsp).
- Gli estrogeni attraversano per diffusione le membrane cellulari e, 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 © 2001-2020 ver 4.7

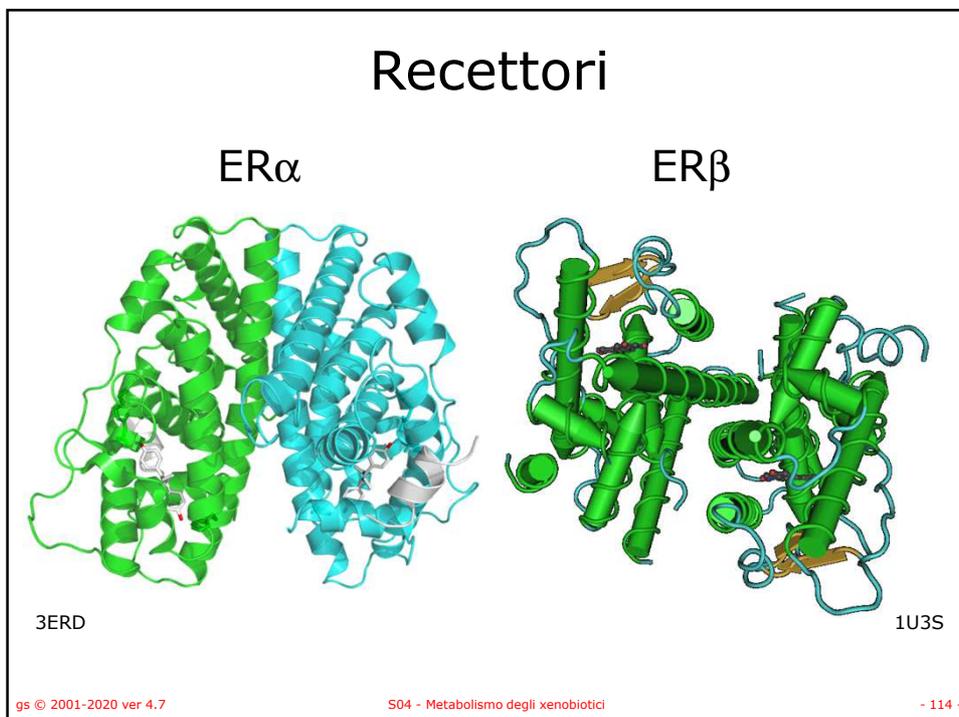
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 112 -

112



113



114

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 115 -

115

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.

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 116 -

116

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.

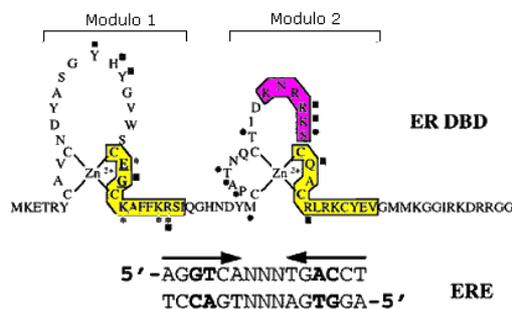
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 117 -

117

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.

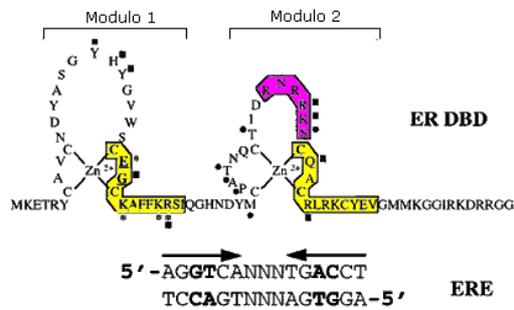
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 118 -

118

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.

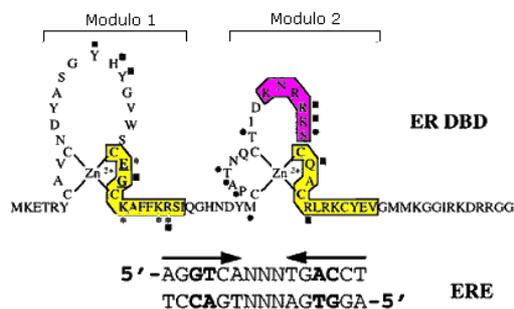
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 119 -

119

Recettori degli estrogeni (ER)



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

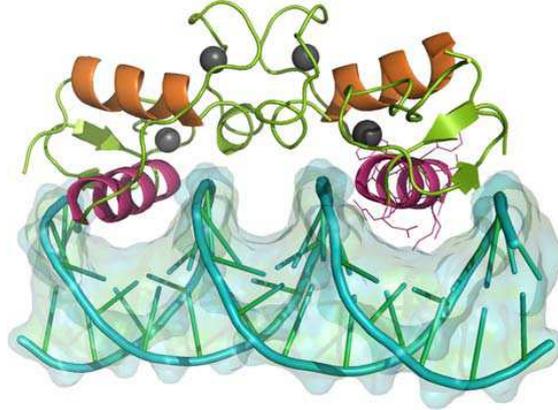
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 120 -

120

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 © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 121 -

121

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

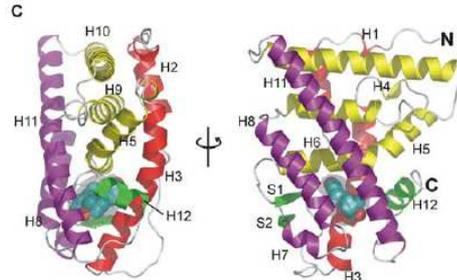
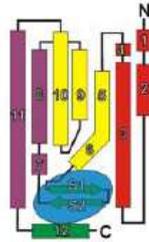
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 122 -

122

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 .

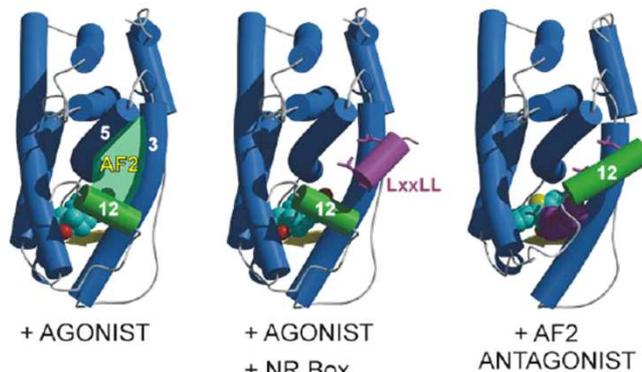
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 123 -

123

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

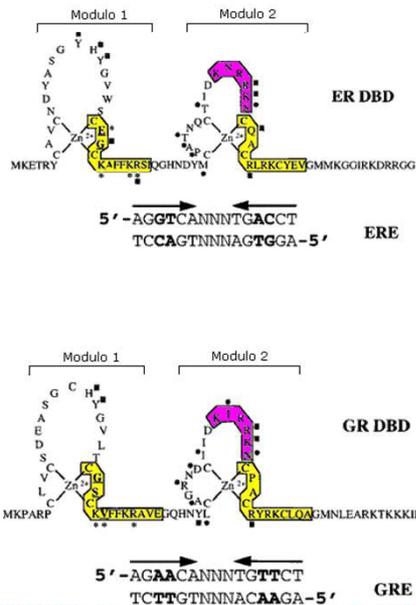
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 124 -

124

Riconoscimento



- Le regioni del DNA che legano il recettore, gli elementi di risposta agli ormoni, comprendono due semisiti palindromici identici (ognuno di sei paia di basi separate da una regione spaziatrice di tre coppie di basi) la cui sequenza è indifferente ma la cui lunghezza è cruciale per il corretto legame del recettore ai due semisiti.

gs © 2001-2020 ver 4.7

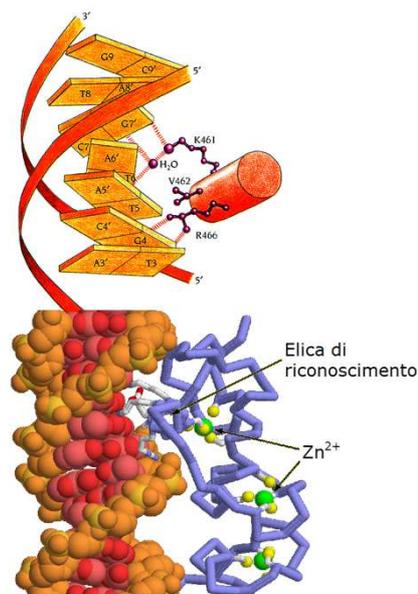
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 125 -

125

Riconoscimento

- I contatti con i margini delle basi presenti nel solco maggiore sono dovuti alle interazioni dei tre residui presenti nella metà N-terminale dell'elica di riconoscimento del GR:
 - Lys 461;
 - Val 462;
 - Arg 466.



gs © 2001-2020 ver 4.7

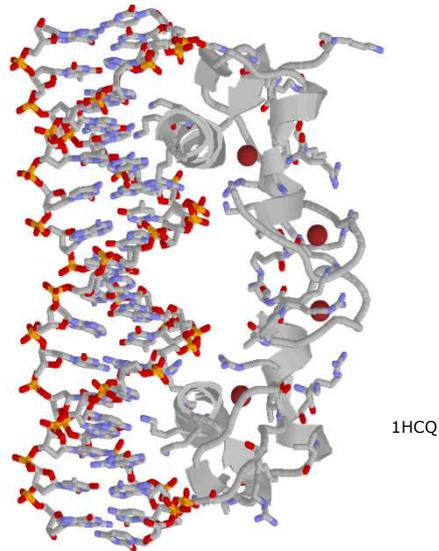
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 126 -

126

Riconoscimento

- I contatti con i margini delle basi presenti nel solco maggiore sono dovuti alle interazioni dei tre residui presenti nella metà N-terminale dell'elica di riconoscimento del GR:
 - Lys 461;
 - Val 462;
 - Arg 466.



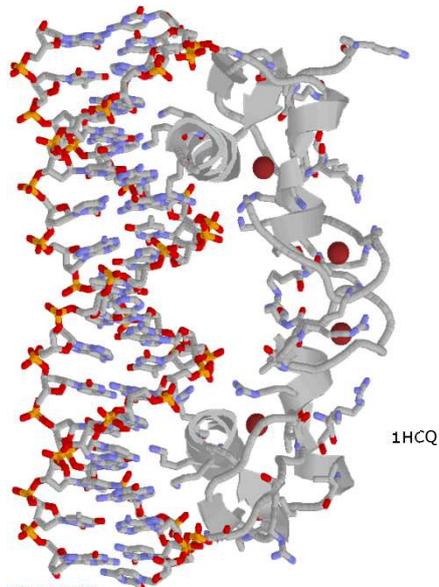
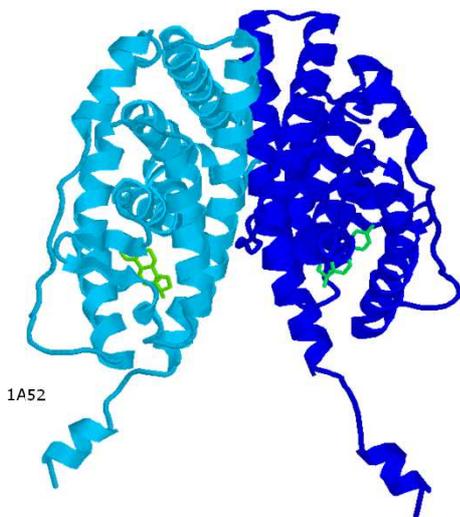
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 127 -

127

Riconoscimento



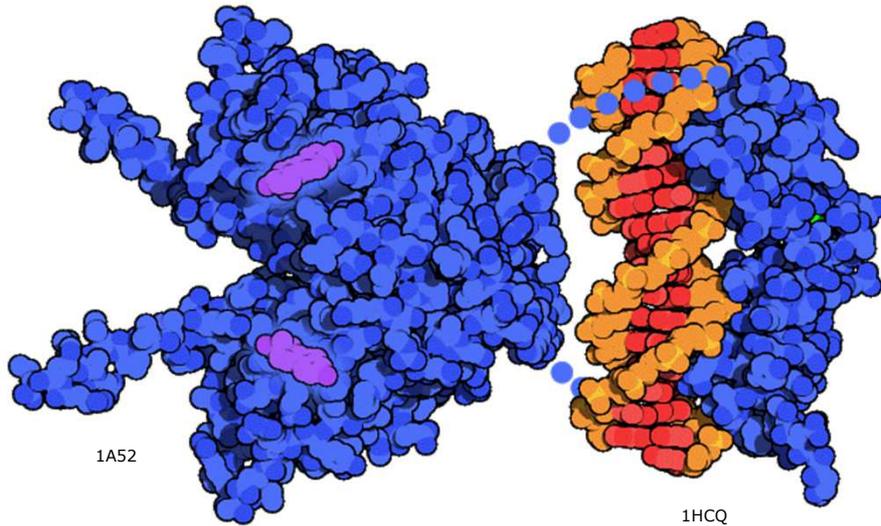
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 128 -

128

Complessivo



1A52

1HCQ

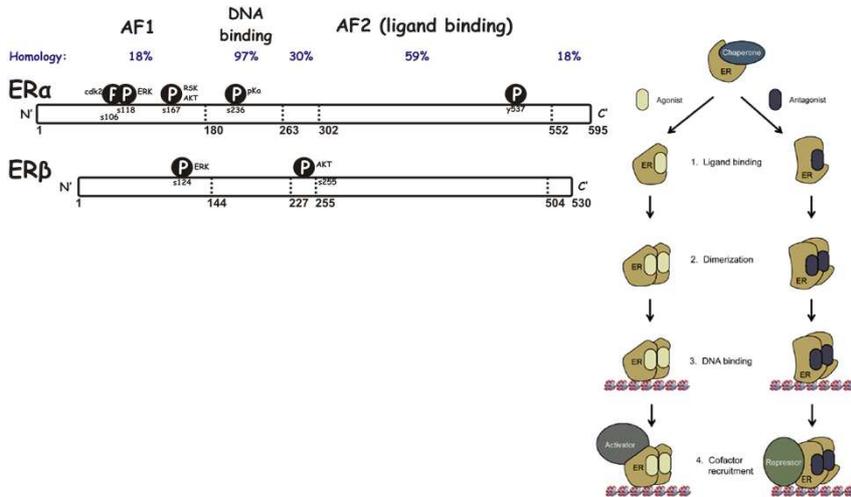
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 129 -

129

Recettori degli estrogeni (ER)



gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

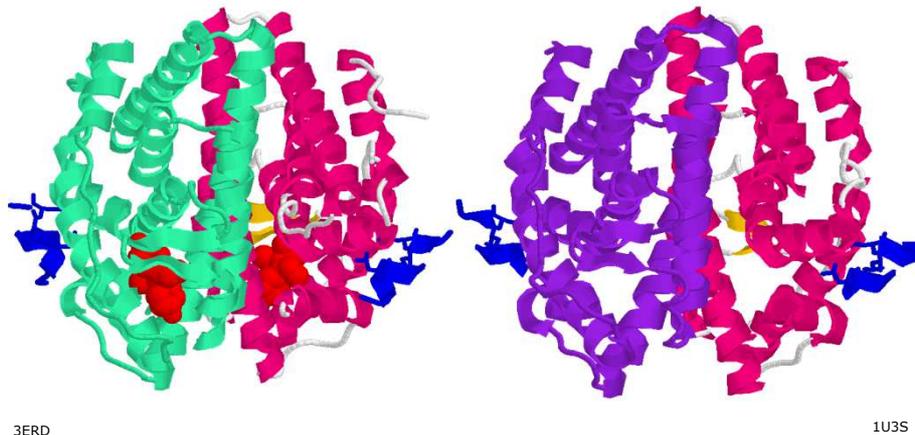
- 130 -

130

Recettori

ER α

ER β



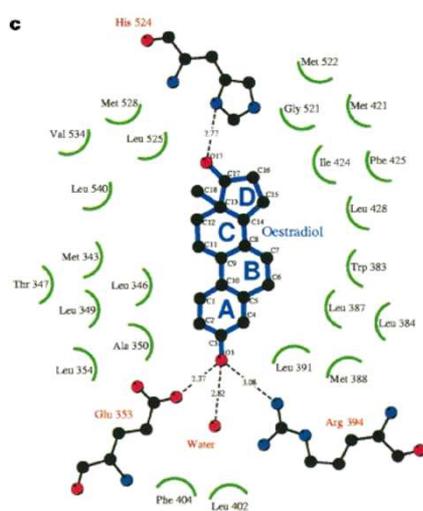
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 131 -

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 © 2001-2020 ver 4.7

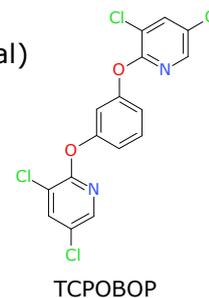
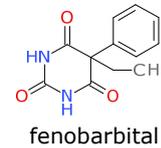
S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 132 -

132

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.



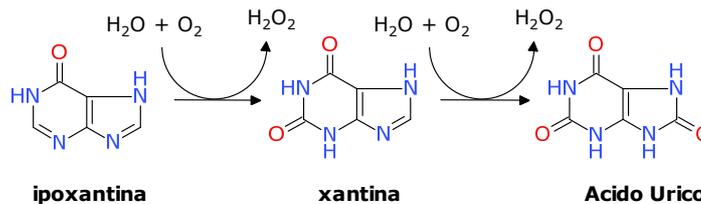
gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 133 -

133

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 H_2O_2
 - In alcuni casi può produrre anione superossido
 - $\text{RH} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{ROH} + 2 \text{O}_2^{\cdot -}$

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 134 -

134

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>

gs © 2001-2020 ver 4.7

S04 - Metabolismo degli xenobiotici

- 135 -

135

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
<http://www.gsartor.org/pro/didattica>
- 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

Data ultima versione: 03/02/2020 18:48

136