

VYBRANÉ KAPITOLY Z BUNĚČNÉ BIOLOGIE

Autoři: prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D., Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty UP

Tato skripta jsou neprodejná a slouží pro potřeby studentů Molekulární a buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Vznik díla byl finančně podpořen Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České Republiky, v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost – „*Inovace studia molekulární a buněčné biologie*“ – projekt **OP VK CZ 1.07/2.2.00/07.0354**.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Název projektu:



INOVACE STUDIA MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÉ BIOLOGIE



Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.2.00/07.0354

Program podpory: Operační program Vzdělávání pro konkurenceschopnost

Partner projektu: Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Termín realizace: 1. 6. 2009–31. 5. 2012



Kontakt:

hlavní řešitel projektu: prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D., zdenek.dvorak@upol.cz

projektový manažer: Ing. Veronika Důjková, veronika.dujkova@upol.cz

webové stránky projektu: <http://inovace-mbb.upol.cz/>



Anotace:

Cílem projektu je implementace nejnovějších poznatků do studovaných předmětů, rozšíření spektra volitelných předmětů a inovace sylabů a studijních materiálů. Důraz bude kladen na praktické využití znalostí a získaných dovedností s cílem zvýšit konkurenceschopnost absolventů na trhu práce i v mezinárodním měřítku. Dále vznikne internetový portál s výukovými materiály využívající multimediální studijní opory. Konkrétně bude inovováno 17 předmětů a budou připraveny 2 nové kurzy.



Dále se předpokládá:

- vytvářet multimediální studijní opory (inovace elektronických studijních materiálů, týkající se všech povinných a volitelných (kategorie 1) předmětů;
- aktivní zapojování studentů do výzkumných a vzdělávacích projektů;
- podporovat možnosti výuky vybraných předmětů v angličtině i v magisterských programech jako předpoklad pro případné budoucí rozšíření akreditace vybraných programů o výuku v angličtině;
- zvýšení úrovně vybraných přednášek přednášejícími zvanými ze zahraničí;
- zajistit krátkodobé stáže maximálního počtu studentů, zejména magisterského programu, ve spolupracujících zahraničních laboratořích;
- reagovat na potřeby rozvoje oboru a potřeby praxe, kde se absolventi uplatňují, a inovovat jednotlivé kurzy na základě těchto potřeb;
- upravit a zefektivnit základní strukturu (vybrané kurzy) bakalářského a magisterského studijního programu Molekulární a buněčná biologie, aby mohla být v blízké době podána žádost o akreditaci nového studijního oboru Experimentální biologie.

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY



ÚVOD

Tématem tohoto učebního textu jsou ty oblasti buněčné biologie, jimiž se zabýváme aktivně jako výzkumníci (odkazy na náš výzkum jsou uvedeny během výkladu látky). Posledních pár let oba přednášíme buněčnou biologii na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého a koncepci celého předmětu postupně inovujeme v rámci projektu *Inovace studia molekulární a buněčné biologie* **OP VK CZ1.07/2.200/07.0354** (Operační program Vzdělávání pro konkurenceschopnost financovaný z Evropské sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky). Kromě základních znalostí z buněčné biologie na úrovni standardních mezinárodních učebnic (např. Alberts et al. *Základy buněčné biologie*) požadujeme po studentech oboru Molekulární a buněčná biologie podrobnější znalosti z oblastí, v nichž se buněčná biologie setkává s farmakologií a farmakoterapií. Chceme, aby chápali věci v kontextu od základních chemických zákonitostí a buněčných dějů až po vedlejší účinky léčiv, klinické testy nebo finanční zisky farmaceutických firem, plynoucí z nových objevů. Mělo by být zřejmé, že buněčná biologie je živá, stále a překvapivě se vyvíjející disciplína, která má klíčový význam pro moderní medicínu a současnou společnost vůbec. Studenti by měli chápat náš text jako úvod do problematiky a se zájmem si vyhledávat další, podrobnější informace v původních článcích, z nichž některé citujeme. Pouze opravdový zájem může vést k píli a píle zase k pochopení složitých, abstraktních souvislostí a zákonitostí, jež moderní buněčnou biologii jako intelektuálně náročný obor konstituují. Mnoho věcí zůstává neobjeveno, mnoho otázek široce otevřeno a absolventi odborného studia Molekulární a buněčné biologie by měli mít ambici je uchopit a zodpovědět, protože jenom tak mohou v zájmu svém i celé společnosti plně využít svého studia a svých schopností. Stále existuje na světě mnoho smrtelných nemocí, které neumíme léčit a na něž umírají třeba i děti. Krom toho nemocí, pro něž máme účinné léky, se začínají vymykat kontrole a jejich původci se stávají rezistentními na běžnou terapii (např. tuberkulóza).

Naše skriptum je rozděleno na pět základních částí. V *Receptorové teorii* je vysvětleno fungování receptorů na molekulární úrovni, což je klíčově důležité pro pochopení účinku mnoha léčiv (v této oblasti výzkumu, spjaté s jedním ze zakladatelů moderní farmakoterapie Paulem Ehrlichem, bylo uděleno několik Nobelových cen za fyziologii a medicínu). Druhá část, *Jaderné a steroidní receptory*, se podrobněji zaměřuje na dvě významné skupiny receptorů, na jejich fyziologickou funkci i na jejich roli cílů pro různá léčiva. Kriticky

důležitým tématem pro toho, kdo se zabývá účinkem léčiv a vůbec cizorodých látek (xenobiotik) na organismus, je způsob, jakým organismus zachází s takovými látkami, čili jak je metabolizuje. Tomu se věnuje třetí část, nazvaná *Metabolismus xenobiotik*. Dvě poslední části našeho textu se pohybují v oblasti dvou vážných epidemií ve vyspělé části světa, jde o onemocnění nervového systému a o nádorová onemocnění. Část *Neurotransmitery* je věnována fungování nervového systému na buněčné úrovni a důsledkům, plynoucím z těchto faktů pro farmakoterapii. Konečně *Degradace proteinů v buňce* vysvětluje mechanismus, jak buňky odstraňují nepotřebné proteiny (Nobelova cena 2004). Tento mechanismus se podivuhodnou souhrou okolností stal jedním z nejnovějších cílů protinádorové terapie s prvním klinicky používaným lékem VELCADE (v USA povolen od roku 2003).

Děkujeme našim oponentům za trpělivost a cenné připomínky. Prosíme studenty a čtenáře vůbec, aby vznášeli dotazy a upozorňovali nás na to, co by bylo dobré vylepšit, lépe vysvětlit, ukázat z jiného úhlu pohledu. Jenom tak lze naplnit společný cíl důkladného a efektivního vzdělávání, které nebude samoúčelné, nýbrž bude ku prospěchu všech.

Zdeněk Dvořák (autor částí I-IV)

Boris Cvek (autor části V)

I. RECEPTOROVÁ TEORIE

RECEPTORY

Cílem této kapitoly je seznámit se základními principy a teorií fungování receptorů na molekulární úrovni. Receptorová teorie kvantitativně popisuje interakce mezi receptorem, ligandem a konečnou buněčnou odpovědí. Vlastní mechanismy přenosu signálu prostřednictvím receptorů jsou popsány v mnoha učebnicích věnujících se buněčné biologii a buněčné signalizaci, a nebudou předmětem této kapitoly.

Prostřednictvím receptorů je v organismu zajištěn přenos signálů zejména v následujících ohledech:

1. **Hormonálně řízené děje** – jedná se o tzv. endokrinní signalizaci. Vychází se z konceptu, že místo vzniku signální molekuly je odlišné od místa účinku a k přenosu signální molekuly dochází krevním řečištěm. Příkladem je adrenalin, který je sekretován dřením nadledvinek a krevním řečištěm dopraven k srdci, kde se váže na adrenergní receptory. V původní koncepci se vycházelo ze schématu žláza-hormon-receptor, tj. předpokládalo se, že každý hormon má „svou“ žlázu a následně receptor v cílovém orgánu. Z mechanistického hlediska však není rozdílem mezi hormonálním dějem probíhajícím prostřednictvím receptorů a mezi ligandy-aktivovanými transkripčními (a jinými) faktory, kdy ligandem není hormon, dle klasické definice.
2. **Přenos nervového signálu** – neurotransmitery se váží na příslušné receptory na postsynaptických, někdy i na nesynaptických neuronech.
3. **Parakrinní signalizace** – účinek sekretované molekuly je limitován vzdáleností – jedná se o účinek na krátkou vzdálenost, nikoliv na úrovni celého organismu. Příkladem jsou různé růstové faktory, faktory srážení krve. Analogií je **autokrinní signalizace**, kdy je signální molekula sekretována buňkou, na kterou následně působí – příkladem jsou některé cytokininy nebo eikosanoidy.
4. **Komunikace mezi dvěma buňkami** – tj. na povrchu jedné buňky je exponován ligand a na povrchu druhé buňky je exponován receptor.
5. **Účinek léčiv** a jiných cizorodých látek na receptory v různých tkáních.

Za zakladatele receptorové teorie je považován John Newport Langley, který v roce 1878 experimentoval s analogy nikotinu a kurare na svalovou kontrakci. S využitím izolovaných svalových vláken pozoroval, že pilokarpin vyvolal kontrakci svalu, zatímco atropin měl inhibiční účinky na kontrakci. Učinil závěr, že tyto dvě sloučeniny soutěží o třetí látku, v té době ještě neznámou (dnes již víme, že se jednalo o neurotransmitter acetylcholin). Dalším významným průkopníkem v oblasti receptorové teorie byl Paul Ehrlich, současník Langleyho, který prokázal nezbytnost stereoselektivity při interakci receptor-léčivo.



John Newport Langley
2.11.1852 – 5.11.1925



Paul Ehrlich
14.3.1854 – 20.8.1915

Jelikož jsou receptory jednou z nejdůležitějších buněčných entit z hlediska fyziologie a účinku léčiv, byl výzkum receptorů ve 20. Století předmětem intenzivního zájmu.

V souvislosti s receptory byla udělena celá řada Nobelových cen, např.:

- 2004 Nobelova cena za fyziologii a medicínu; Richard Axel a Linda Buck; objev čichových receptorů a organizace čichového systému
- 1988 Nobelova cena za fyziologii a medicínu; Sir James Black, Gertrude Elion, George Hitchings; za objev důležitých principů v účinku léčiv (objev beta-adrenergního receptoru a histaminových receptorů)
- 1985 Nobelova cena za fyziologii a medicínu; Michael Brown a Joseph Goldstein; objevy související s regulací metabolismu cholesterolu (objev Low Density Lipoprotein receptoru)

Lze říci, že v současné době již byla většina receptorů identifikována, izolována a biochemicky charakterizována. S rozluštěním lidského genetického kódu byla většina receptorů klonována a sekvenována. Obdobný stupeň poznání byl dosažen i na úrovni proteinů interagujících s receptory. Běžně rozšířenou metodou studia receptorů je využití mutantů a *in silico* přístupů.

Klasifikace receptorů není předmětem tohoto textu, a čtenáři doporučujeme webové portály Americké společnosti pro farmakologii a experimentální terapii (www.aspet.org) a Mezinárodní unie pro základní a klinickou farmakologii (www.iuphar.org).

Jelikož jsou receptory jedním z nejčastějších cílů farmakoterapie, lze říci, že:

- Receptory determinují kvantitativní vztah mezi dávkou léčiva a farmakologickým účinkem léčiva.
- Receptory jsou zodpovědné za selektivitu léčiva.
- Receptory zprostředkovávají účinek farmakologických agonistů a antagonistů.

Pohlížíme-li na receptory z hlediska **hormonálně řízených dějů**, musí být splněna následující kritéria:

- Receptor musí vykazovat strukturní a sterickou specifitu pro hormon a strukturně blízká analoga
- Receptory jsou satureovatelné a vyskytují se v systému v omezeném množství; tj. existuje konečný počet vazebných míst
- Vazba hormonu na receptor je reversibilní
- Vazba hormonu na receptor je buněčně specifická a je v souladu se specificitou hormonu k cílovému orgánu
- Receptor musí vykazovat pro hormon vysokou afinitu při fyziologických koncentracích
- Bezprostředně po vazbě hormonu na receptor musí následovat tzv. brzká biochemická událost (*early event*)

Skutečnost, že látka nesplňuje jakoukoliv z výše uvedených podmínek naznačuje nespecifickou vazbu látky na proteiny, plazmatické fosfolipidy nebo buněčné membrány.

Základní dvě charakteristické vlastnosti receptoru jsou tzv. **recognition** (schopnost rozpoznání ligandu) a **transduction** (schopnost převedení signálu).

Recognition = receptor existuje v konformačním stavu, který umožňuje rozpoznání a vazbu látky (ligandu) a splňuje následující kritéria:

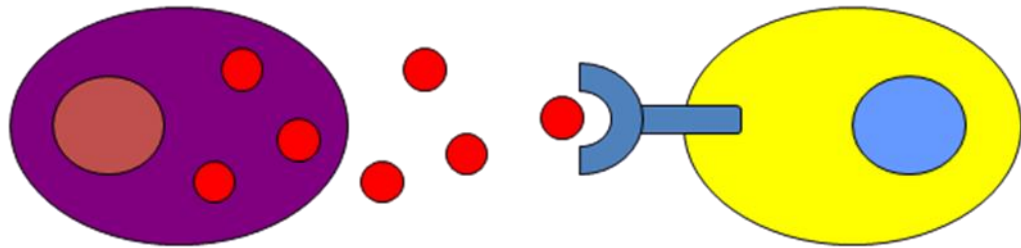
- Saturovatelnost – počet vazebných míst je konečný
- Reversibilita vazby - vodíkové můstky, nekovalentní vazby, van der Waalsovy síly
- Stereoselektivita – schopnost rozpoznat optické izomery -/+, L/D, S/R
- Specifita k agonistům – strukturně podobné látky se váží dobře na receptor, zatímco strukturně odlišné látky se na receptor váží špatně
- Tkáňová specifita – vazba proběhne ve tkáních, které jsou citlivé pro endogenní ligand a to ve fyziologicky relevantních koncentracích

Transduction = vazba agonisty na receptor musí být přeměněna (převedena, proměněna, transdukována) na nějakou funkční odpověď (biologickou či fyziologickou). Různé typy receptorů jsou spojeny s příslušnými efektorovými systémy buď přímo nebo prostřednictvím jednoduchých či komplexních systémů pro bezprostřední amplifikaci signálu.

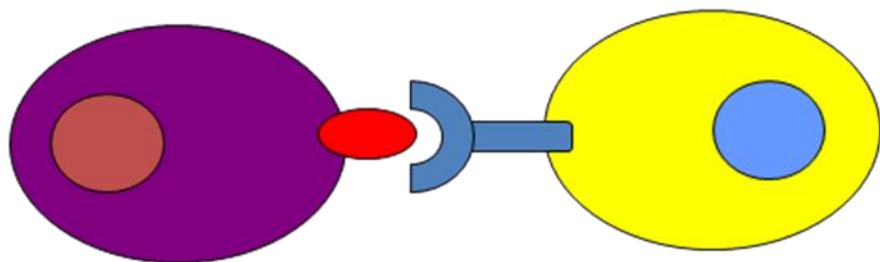
Receptory zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami. Z tohoto pohledu rozlišujeme dva typy komunikace:

- Signalizace sekretovanými molekulami (hormony, neurotransmitery apod.)
- Signalizace molekulami vázanými na buněčnou membránu (např. buňky imunitního systému)

- **signalizace sekretovanými molekulami**



- **signalizace molekulami vázanými na plasmatickou membránu**



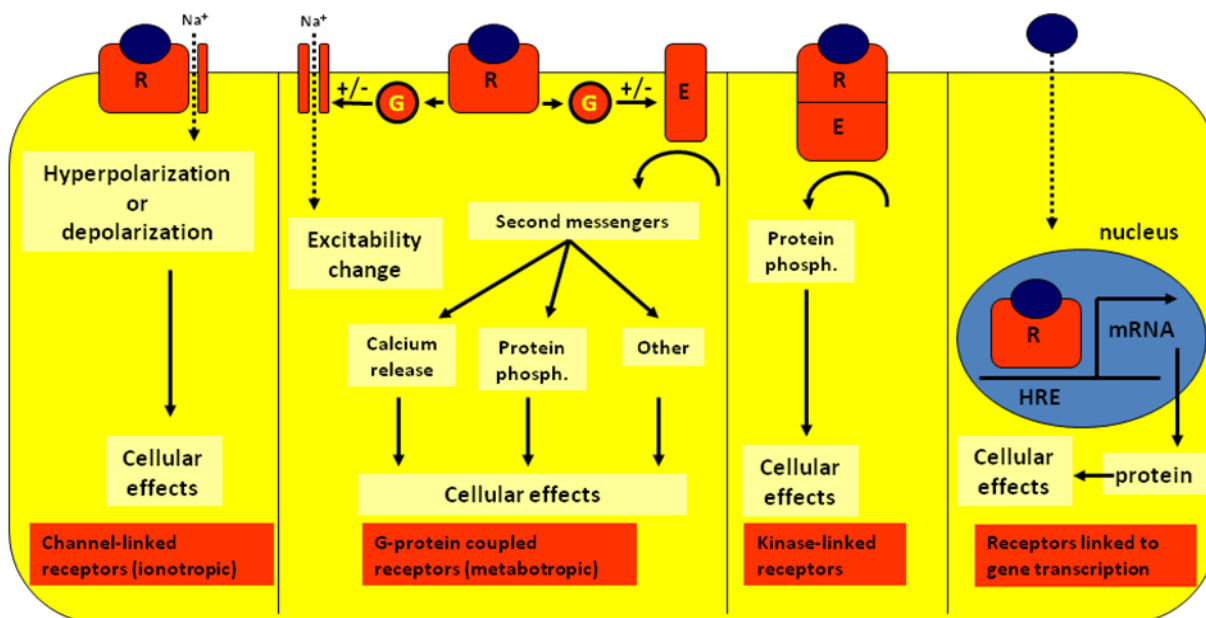
Receptory umožňují přenos signálu z extracelulárního prostoru dovnitř do buňky. Podle způsobu, jakým je signál do buňky přenášen, lze receptory rozdělit do čtyř skupin (Obr. 1):

1. **Channel-linked receptors** = českým ekvivalentem jsou receptory spřažené s iontovými kanály, ionotropní receptory a nebo ligandem-řízené iontové kanály. Receptor je lokalizován na vnější straně buněčné membrány a je fyzicky asociován s iontovým kanálem (transmembránová struktura). Po vazbě ligandu na receptor dojde ke konformační změně, která je přenesena na iontový kanál, který se následně buď otevře, nebo uzavře. Jedná se *de facto* o alosterický proces. Změna stavu iontového kanálu otevřeno/uzavřeno, vyvolá/zablokuje efflux/influx konkrétního iontu, a následně dojde k depolarizaci/hyperpolarizaci membrány, což vede ke konečné buněčné odpovědi. Jedná se o proces extrémně rychlý (odpověď v řádu milisekund), proto je tento systém využíván převážně neurotransmitery, kdy organismus/buňka vyžaduje okamžitou reakci. Typickým příkladem jsou nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR; spojené s Na^+ kanálem), receptory typu A pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_A , spojené s Cl^- kanálem), serotoninové receptory podtřídy 3

(5-HT₃, spojené s Na⁺, K⁺ a Ca²⁺ kanály) a ionotropní glutamátové receptory (GluA, GluK, GluN, GluD; spojené s Na⁺, K⁺ a Ca²⁺ kanály).

2. **G-protein coupled receptors (GPCR)** = receptory spřažené s G-proteiny. Dělí se do šesti základních tříd A-F. O GPCR pojednává celá řada učebnic, a podrobný popis není cílem tohoto skriptu. Jedná se o transmembránové receptory, které se skládají z extracelulární domény (zodpovědná za rozpoznání a vazbu ligandu), ze sedmi transmembránových segmentů (proto se označují 7TM), a intracelulární domény, která zprostředkovává interakci s tzv. G-proteiny. G-protein následně aktivuje efektor, což je nejčastěji enzym (různé adenylát cyklasy nebo fosfolipasa C), který spustí kaskádu biochemických dějů; proto se tyto receptory nazývají metabotropní. Signální kaskáda zahrnuje syntézu tzv. druhých posílů. Efektorem G-proteinu může být i iontový kanál (K⁺, Ca²⁺). Spektrum GPCR je velmi široké a zahrnuje např. metabotropní GABA_B receptory, metabotropní glutamátové receptory mGluR, adrenergní receptory, histaminové receptory, serotoninové receptory, dopaminové receptory a další. Rychlost buněčné odpovědi je u GPCR v řádu sekund, což odpovídá potřebám metabolických regulací.
3. **Enzyme-linked receptors** = receptory spojené s enzymovou aktivitou. Jedná se o transmembránové receptory, skládající se z extracelulární domény (rozpoznává a váže ligand), většinou jednoduchá transmembránové domény a intracelulární domény, která vykazuje katalytickou enzymovou aktivitu. Po vazbě ligandu na receptor dojde ke konformační změně receptoru, a tato je přenesena na intracelulární doménu a dojde k aktivaci enzymu. Jedná se většinou o kinasy, které fosforylují další regulační proteiny a dojde k přenosu a amplifikaci buněčné odpovědi. Příkladem jsou receptory pro insulin, růstové faktory, mitogeny, cytokininy apod. Zajímavým příkladem receptoru spojeného s enzymem je membránová forma guanylát cyklasy. Rychlost buněčné odezvy je řádově v minutách.
4. **Jaderné a steroidní receptory** – jedná se o proteiny lokalizované v cytoplasmě nebo v buněčném jádře. Ligand se do buňky resp. do jádra dostává volnou difúzí přes plasmatickou membránu. V cytoplasmě se nacházejí receptory pro steroidní hormony (např. estrogenní receptor, glukokortikoidní receptor), a po vazbě ligandu dochází

k jejich translokaci do jádra. V jádře se nacházejí tzv. jaderné receptory (např. receptor pro kyselinu retinovou, receptor pro vitamín D apod.). Efektorem steroidních a jaderných receptorů je DNA a buněčnou odpovědí je transkripce genu a následná syntéza proteinů. Rychlost buněčné odezvy jsou řádově hodiny až dny.



Obrázek č.1: Schematické znázornění čtyř základních typů receptorů dle funkce.

Rovnováhu léčiva (ligandu) na receptoru ovlivňují:

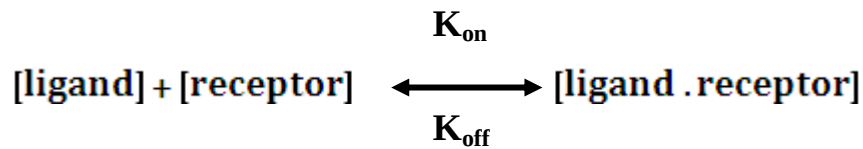
- Omezená difúze
- Metabolismus ligandu
- Zachycení ligandu krví, lipidy, proteiny apod.

Buněčná odpověď závisí na:

- Druhu efektoru
- Potřebě allosterických kofaktorů
- Přímé modifikaci receptoru – např. fosforylace, proteolytické štěpení atd.

VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

Vazba ligandu na receptor se řídí zákonem o aktivním působení hmoty. Primárním předpokladem je, že se ligand váže na homogenní populaci receptorů. Platí následující vztah:



K_{on} je počet vazeb (událostí) za časovou jednotku; jedná se o rychlost či míru asociace ligandu (L) s receptorem (R) za vzniku komplexu LR

K_{off} je počet disociací (událostí) za časovou jednotku; jedná se o rychlost či míru disociace komplexu LR za vzniku volného ligandu (L) a receptoru (R)

K vazbě dochází, když ligand a receptor kolidují ve správné orientaci a se správnou energií. Interakce mezi ligandem a receptorem je reversibilní. Rychlost asociace a disociace závisí jen na počtu receptorů, koncentraci ligandu a rychlostních konstantách K_{on} a K_{off} .

V rovnováze je rychlost tvorby komplexu rovna rychlosti jeho disociace:

$$[\text{L}] \times [\text{R}] \times \text{K}_{\text{on}} = [\text{LR}] \times \text{K}_{\text{off}}$$

Potom definujeme rovnovážnou disociační konstantu K_D následovně:

$$\text{K}_D = \frac{\text{K}_{\text{off}}}{\text{K}_{\text{on}}} = \frac{[\text{L}] \times [\text{R}]}{[\text{LR}]}$$

Jednotkou K_D je molární koncentrace (mol/l) a vyjadřuje **AFINITU** léčiva k danému receptoru. Jinými slovy, ochota, s jakou se léčivo váže na daný receptor je charakterizována afinitou. Za situace, kde je koncentrace ligandu $[L]$ rovna hodnotě K_D , je 50% populace receptorů obsazeno ligandem.

Pro vazbu ligandu na receptor platí:

- Jakmile dojde k vazbě ligandu na receptor, zůstává ligand vázaný na receptoru po náhodný časový interval
- Pravděpodobnost disociace je stejná v jakýkoliv okamžik po asociaci
- Vazba ligandu na receptor je reversibilní
- Neexistuje částečná vazba; receptor je buď volný, nebo obsazený
- Všechny receptory jsou pro vazbu ligandu rovnocenné
- Po disociaci by ligand i receptor měly zůstat nezměněny (ligand by měl být recyklovatelný)
- Pokud je receptor nebo ligand po disociaci pozměněn, neplatí zákon o působení aktivní hmoty

Populace receptorů, na kterou je navázaný ligand je charakterizována veličinou, která se nazývá **FRAKČNÍ OBSAZENOST RECEPTORU**. Jedná se tedy o poměr mezi počtem receptorů obsazených ligandem ku celkovému počtu receptorů v dané populaci:

$$F. O. = \frac{[LR]}{[\text{celkový receptor}]} = \frac{[LR]}{[LR] + [R_{\text{volný}}]}$$

Dosadíme-li do výše uvedené rovnice vzorec pro výpočet K_D , dostáváme pro frakční obsazenost receptoru následující vztah:

$$F. O. = \frac{[L]}{[L] + K_D}$$

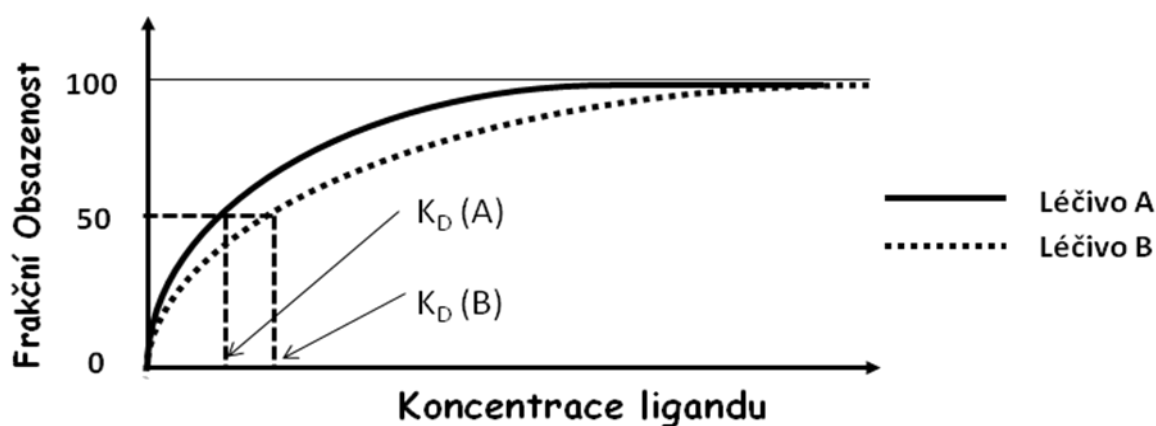
Grafickým vyjádřením závislosti frakční obsazenosti receptoru na koncentraci ligandu je saturační křivka ve tvaru hyperboly (Obr. 2). Pro různé koncentrace ligandu platí:

$$[L] = K_D = 50\% \text{ F. O.}$$

$$[L] = \frac{1}{2}K_D = 30\% \text{ F. O.}$$

$$[L] = 10 \times K_D = 90\% \text{ F. O.}$$

$$[L] = 0 = 0\% \text{ F. O.}$$



Obrázek č.2: Frakční obsazenost receptoru – saturační křivka – lineární vyjádření.

Pomocí saturační křivky lze přímo měřit množství (hustotu) receptorů. Dále křivka poskytuje informaci o afinitě a selektivitě ligandů. Saturační křivka charakterizuje ustálený stav (steady-state, teoretická rovnováha). Pro experimentaci se využívají radioaktivně značené ligandy, např. ^{125}I , ^3H , ^{35}S apod. Důležitá je volba vhodného ligandu (agonista vs. antagonisty). Antagonisté mají často vyšší afinitu, ale rovnováha se ustavuje déle.

Jelikož se se saturační křivkou v lineárním vyjádření obtížně pracuje, vyjadřuje se tato často v logaritmické formě, tj. jako závislost frakční obsazenosti (resp. množství vázaného ligandu = $B = \text{bound}$) versus logaritmus molární koncentrace ligandu. Saturační křivka v logaritmickém vyjádření má tvar sigmoidy a hodnota K_D se určí z inflexního bodu křivky (Obr. 3). Pro snadnější interpretaci křivky se používají linearizované grafy, pomocí tzv.

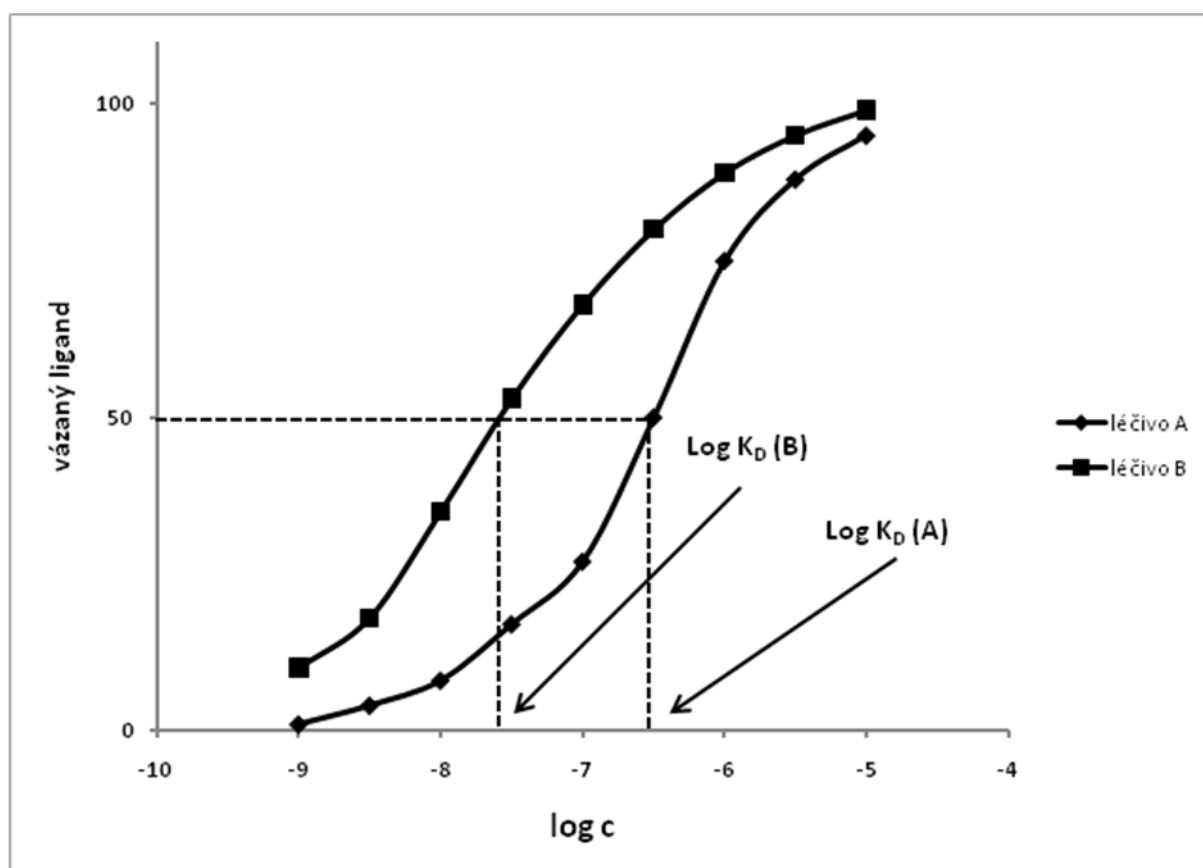
Scatchardových transformací. Množství vázaného ligandu na receptory je v každém časovém okamžiku dáno:

- Počtem receptorů
- Koncentrací přidaného ligandu
- Afinitou ligandu ke svému receptoru

Vazba ligandu na receptor je popsána stejnou matematickou funkcí jako vazba substrátu na enzym pomocí rovnice Michaelise a Menteové (srovnej).

$$B = \frac{B_{\max} \times [\text{radioligand}]}{K_D + [\text{radioligand}]}$$

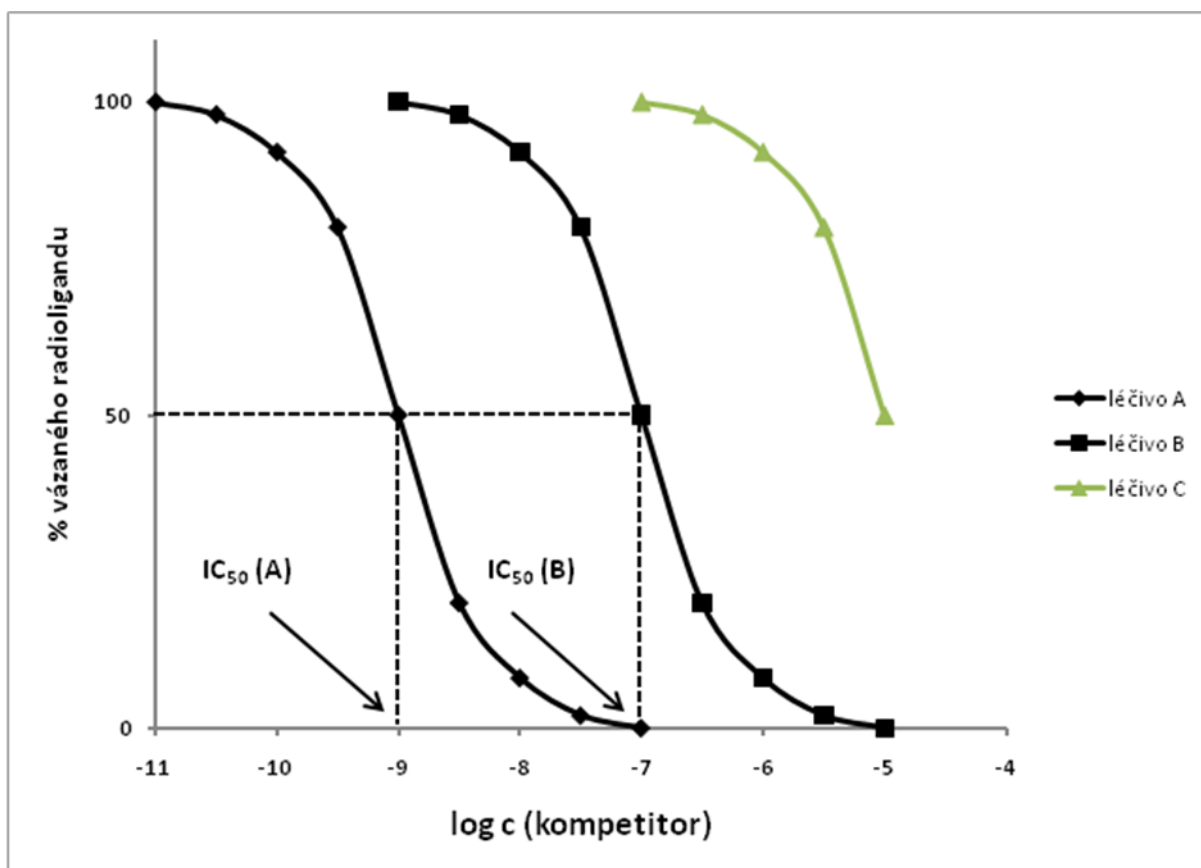
$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$



Obrázek č.3: Frakční obsazenost receptoru – saturační křivka – lineární vyjádření.

Aktivace receptorů a konečná buněčná odpověď jsou přímo úměrné stupni obsazenosti receptoru.

POZOR!!! Koncentrace ligandu, při které je obsazena polovina (50%) populace receptorů ligandem (K_D), je často nižší než koncentrace ligandu potřebná k vyvolání poloviční maximální biologické odpovědi (EC_{50} – viz dále). Nezaměňovat tyto dvě veličiny, i když jsou si tvary křivek podobné!



Obrázek č.4: Kompetitivní vazebné křivky.

Frakční obsazenost receptoru a afinita ligandu k receptoru se studuje s využitím radioaktivně značených ligandů. Ne vždy však je radioaktivní ligand k dispozici. V tom případě se využívají techniky tzv. **COMPETITIVE BINDING ASSAYS**, které umožňují stanovit hrubým odhadem afinitu neznačeného ligandu k receptoru. Přídavek neradioaktivního ligandu (např. léčivo **B**), který se rovněž váže na receptor **R**, do inkubační směsi, povede k tomu, že

méně molekul R bude dostupných pro vazbu radioaktivně značeného agonisty **D***, tj. sníží se množství vytvořeného komplexu [**D*R**]. Jinými slovy, látka **B** soutěží (odtud název kompetitivní) s agonistou **D*** o obsazení **R**. Se zvyšující se koncentrací **B** bude klesat množství tvořeného [**D*R**]. Technicky se metoda provádí tak, že se použije jedna koncentrace **D*** a kombinuje se s logaritmičsky rostoucí koncentrací neznačeného (soutěžícího) ligandu **B**.

Koncentrace inhibitoru (léčiva, ligandu), která vytěsňuje 50% radioaktivně značeného ligandu z vazby na receptor se nazývá IC_{50} léčiva/ligandu. Pozor – v tomto případě není IC_{50} rovna K_D , protože se jedná jen o odhad – byl použit jiný ligand s odlišnou afinitou. Koncentrace soutěžícího ligandu **B**, která by se vážala na 50% vazebných míst v nepřítomnosti radioaktivně značeného ligandu **D***, se nazývá **ROVNOVÁŽNÁ DISOCIAČNÍ INHIBIČNÍ KONSTANTA** – K_i . Ke stanovení hodnoty K_i je třeba nejprve znát hodnotu IC_{50} . Pro výpočet se využívá rovnice Chenga a Prusoffa:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_D}}$$

Příklad: Vypočítejte hodnotu K_i pro morfin, jestliže v experimentu s radioaktivně značeným 3H -diprenorfinem byly zjištěny následující parametry: $IC_{50} = 100$ nM, $[L] = 3$ nM, $K_D = 1$ nM.

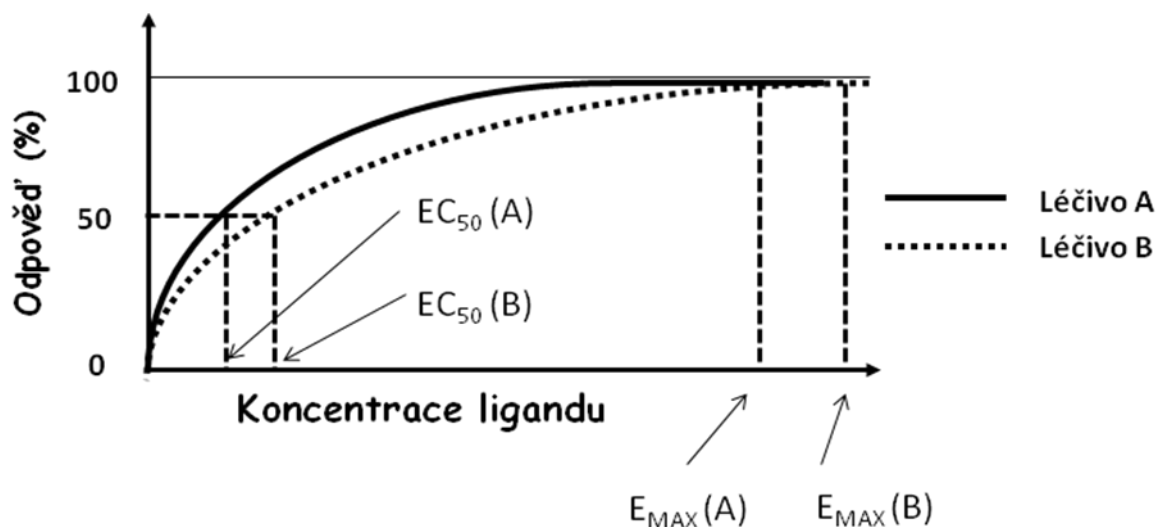
Dosazením do výše uvedené rovnice získáme:

$$K_i = \frac{100}{1 + \frac{3}{1}} = 25 \text{ nM}$$

VZTAH MEZI DÁVKOU LIGANDU A BUNĚČNOU ODPOVĚDÍ

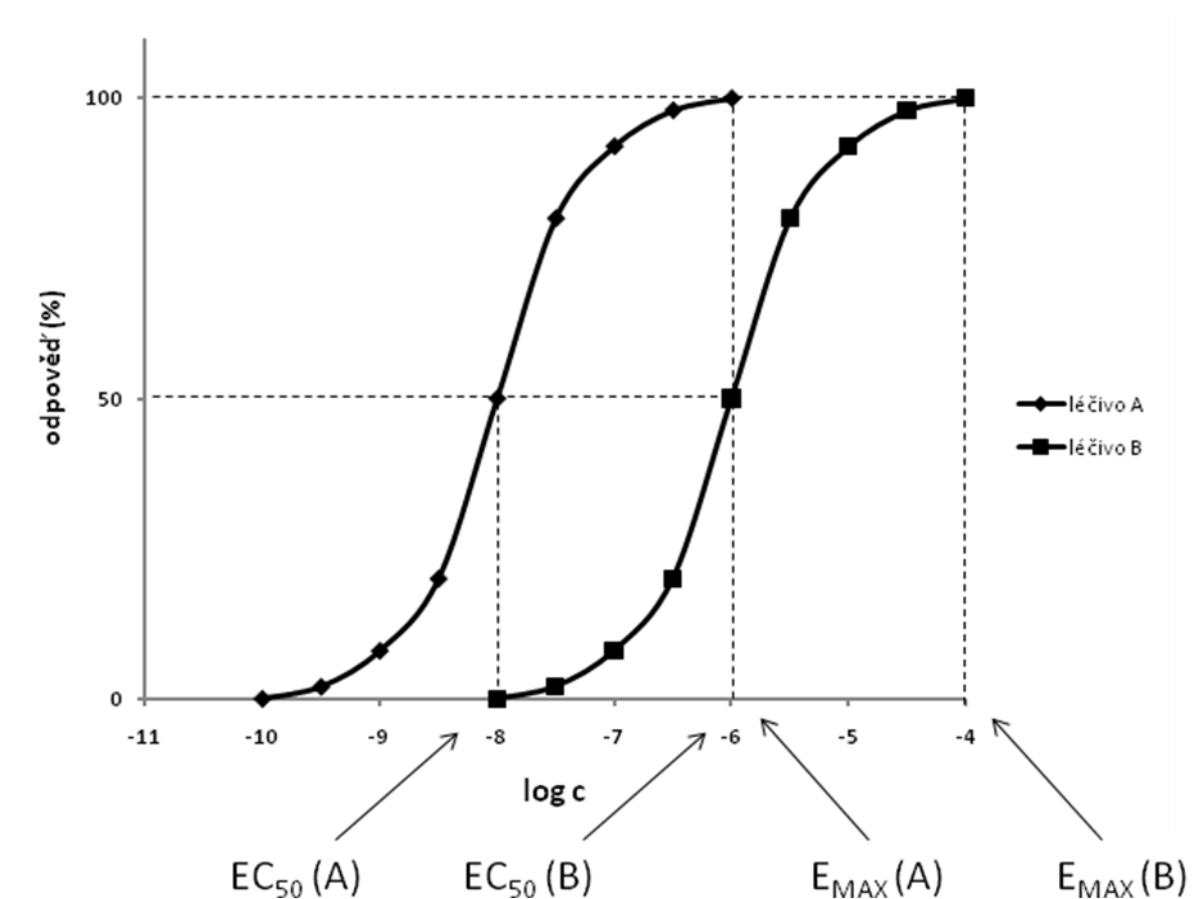
Z hlediska farmakologie je nezbytné znát vztah mezi podanou dávkou léčiva a účinkem léčiva; což lze vysvětlit na podkladu receptorové teorie. V anglické literatuře se hovoří o tzv. **DOSE-RESPONSE** vztazích. Míra funkční odpovědi vyvolané léčivem (ligandem) je jen nepřímým odhadem vazby této látky na receptor (F.O.) a *vice versa*. Podstatnou roli zde hrají rovněž experimentální podmínky – např. rozdíl mezi *in vivo* a *in vitro* provedením. Otázkou je, zda je buněčná odpověď přímo úměrná obsazenosti receptoru ligandem.

Clarkova teorie říká, že „Účinek léčiva je přímo úměrný frakci receptorů obsazených tímto léčivem a maximální odpovědi je dosaženo při maximální obsazenosti receptorů“. Jak si ukážeme později, ne vždy je toto tvrzení pravdivé a ne vždy znamená více = lépe.



Obrázek č.5: Závislost buněčné odpovědi na dávce léčiva (*dose-response curve*) – lineární vyjádření.

Grafickým vyjádřením závislosti buněčné odpovědi na lineární koncentraci ligandu je hyperbola, kdy existuje určitá maximální buněčná odpověď resp. maximální efekt léčiva – **E_{MAX} (maximal effective concentration)**. Koncentrace agonisty, při které je dosaženo 50% E_{MAX} se značí EC_{50} a nazývá se **half-maximal effective concentration** (Obr. 5). Využívá se rovněž logaritmické vyjádření závislosti buněčné odpovědi na koncentraci ligandu, kdy tvarem je sigmoida (Obr. 6). Pozor!!! – nezaměňovat s frakční obsazeností receptoru, i když křivky jsou si podobné!



Obrázek č.6: Závislost buněčné odpovědi na dávce léčiva (*dose-response curve*) – logaritmické vyjádření.

Frakční odpověď (R_f) agonisty (**D**) definujeme následovně:

$$R_f = \frac{[D]}{EC_{50} + [D]}$$

Pro různé koncentrace agonisty potom dostáváme frakční odpověď:

$$[D] = 1 \times EC_{50} \quad R_f = 50\%$$

$$[D] = 10 \times EC_{50} \quad R_f = 90\%$$

$$[D] = 100 \times EC_{50} \quad R_f = 99\%$$

AGONISMUS A ANTAGONISMUS

V odborné literatuře se často operuje s pojmy agonisté a antagonisté, ne vždy však jsou termíny používány správně. Podle úrovně působení lze **ANTAGONISMUS** rozdělit do čtyř skupin:

- **CHEMICKÝ ANTAGONISMUS** – jedná se o interakce molekul v roztocích; např. může jít o tvorbu komplexních sloučenin
- **FARMAKOKINETICKÝ ANATGONISMUS** – snížení koncentrace léčiva v místě účinku. Ve své podstatě je nepředvídatelný, může jít o ovlivnění aktivity transportérů, změněnou expresi biotransformačních enzymů apod.
- **RECEPTOROVÝ ANTAGONISMUS** – bude předmětem této kapitoly
- **FYZIOLOGICKÝ ANTAGONISMUS** – dvě léčiva vykazují opačný účinek na úrovni orgánu či organismu, nezávisle na tom, jakým působí mechanismem na úrovni buněčné. Např. insulin a glukagon budou navzájem fyziologičtí antagonisté z hlediska regulace hladiny glukosy v krvi. Na úrovni buněčné ale působí insulin přes insulinový receptor (enzyme-linked receptor), zatímco glukagon přes GPCR a tvorbu cAMP.

Pro vysvětlení fenoménů agonismus a antagonistismus si nejprve nadefinujeme některé pojmy:

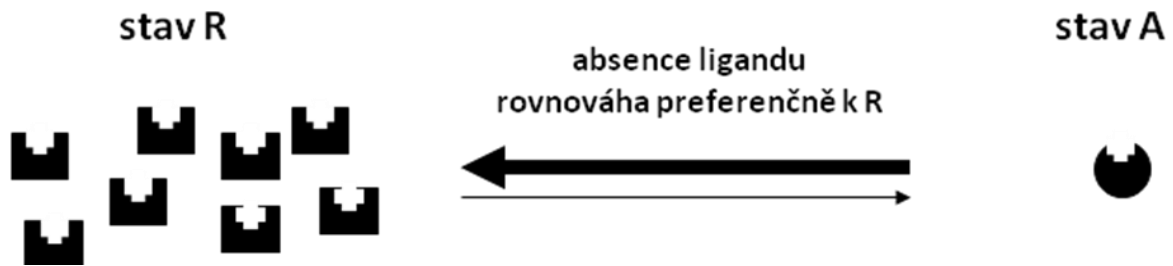
AFINITA (angl. **AFFINITY**) – jak již bylo zmíněno dříve v textu, afinita definuje s jakou ochotou se léčivo váže na daný receptor. Obezřetnosti je třeba u vysoce lipofilních látek, kdy často může jít o nespecifický účinek než o vysokou afinitu. Afinita je vyjádřena rovnovážnou disociační konstantou **K_D**.

POTENCE (angl. **POTENCY**) – jedná se o schopnost ligandu vyvolat měřitelnou funkční změnu. Je to komparativní veličina, která srovnává koncentraci dvou látek, které vyvolají 50% maximální odpovědi (**EC₅₀** – **half-maximal effective concentration**).

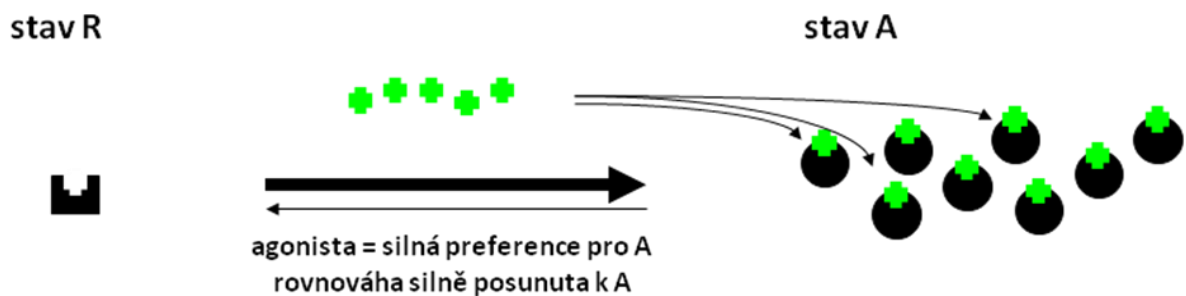
ÚČINNOST (angl. **EFFICACY**; intrinsic efficacy) – vyjadřuje schopnost ligandu vázat se na receptor a vyvolat funkční odpověď. Vyjadřuje míru formace komplexu léčivo-receptor. Tato veličina se někdy nazývá **AKTIVITA** (angl. **INTRINSIC ACTIVITY**; **I.A.**) – vyjadřuje relativní maximální účinek látky v dané tkáni ve srovnání s přirozeným endogenním ligandem. Na základě aktivity rozeznáváme následující typy ligandů:

- **superagonista** (angl. **superagonist**): $I.A. > 1$; tj. vyvolá větší odpověď než endogenní ligand; efficacy je vyšší než u endogenního agonisty.
- **agonista** (angl. **full agonist**): $I.A. = 1$; tj. aktivita (účinnost – efficacy) je totožná s endogenním ligandem – dosáhne stejné E_{MAX} .
- **parciální agonista** (angl. **partial agonist**): $I.A. = 0 \sim 1$; ligand vyvolá submaximální odpověď i při maximální saturaci receptoru. Efficacy je nižší než u endogenního agonisty.
- **antagonista** (angl. **antagonist**): $I.A. = 0$; tj. nevyvolá žádnou funkční odpověď. Tedy má afinitu vůči receptoru (blokuje receptor), ale nemá žádnou efficacy.
- **inverzní agonista** (angl. **inverse agonist**): $I.A. < 0$ (inverse efficacy) – vyvolává kvalitativně opačný účinek

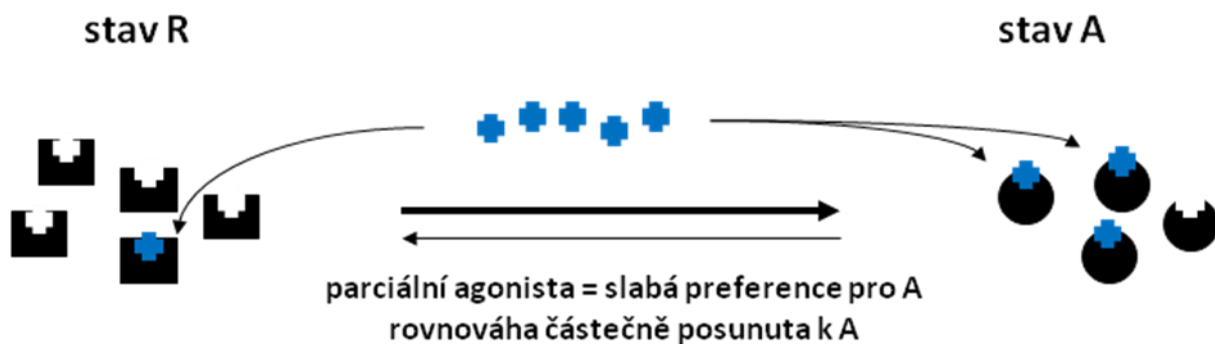
Proč ligand A vyvolá velkou funkční odpověď receptoru, zatímco ligand B nevyvolá žádnou funkční odpověď, přestože se oba ligandy váží na receptor se stejně vysokou afinitou? Tj. jak to, že dva ligandy mají stejnou afinitu, ale různou efficacy? Na tuto otázku se snažila odpovědět řada teorií a modelů, zde si uvedme tzv. **dvoustavový model**, který definoval roku 1995 Paul Leff. Model dle Leffa předpokládá, že receptor existuje ve dvou konformačních stavech, nazvěme si je R (resting) a A (activated). Pokud se ligand naváže na formu R, nedojde k vyvolání buněčné odpovědi, zatímco pokud se ligand naváže na formu A, vzniklý komplex L-A vyvolá funkční odpověď. Rozdílnou efficacy ligandů si potom vysvětlujeme rozdílnou preferencí vazby ligandu buď na A nebo R stav. Pomocí dvoustavového modelu si lze vysvětlit účinek agonistů, parciálních agonistů, antagonistů a inverzních agonistů. V klidovém stavu (v nepřítomnosti ligandu) je rovnováha mezi stavem R a A preferenčně silně posunuta směrem k formě R:



Agonista (**full agonist**) se váže se silnou preferencí na stav A. Po navázání ligandu L na A dojde ke vzniku komplexu L-A a tudíž k odčerpání volného A. Dojde tedy k znovu ustálení rovnováhy mezi A a R, tj. molekuly R se přemění na stav A, na který se opět váže L za vzniku L-A atd. Výsledkem je, že zatímco v klidovém stavu bylo v systému minimum receptorů ve stavu A a většina ve stavu R, po přidání agonisty L se ustálí výsledný stav, kdy v systému bude drtivá většina receptorů ve formě L-A a pouze minimum ve stavu R. Jelikož buněčnou odpověď vyvolá pouze komplex L-A (a nikoliv L-R), vyvolá vazba agonisty maximální odpověď.



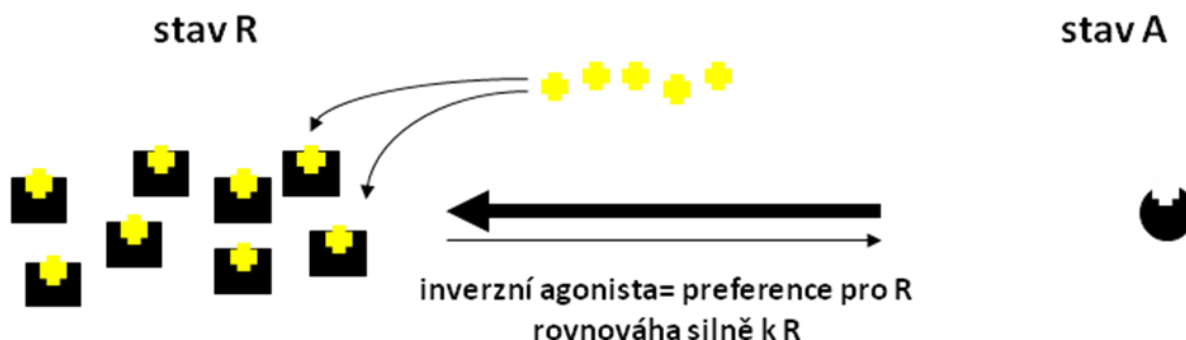
Parciální agonisté se váží na obě formy, tj. A i R, ale se slabou preferencí pro vazbu na A. Parciální agonista nevyvolá maximální odezvu (submaximální aktivace) ani při obsazenosti všech receptorů v populaci, protože část komplexu bude ve formě L-R a část komplexu ve formě L-A.



Antagonista se váže na obě formy, A i R, bez jakékoliv preference. Vzniknou komplexy L-R a L-A. Jelikož v neaktivním stavu je rovnováha silně posunuta k R, dojde po přidavku antagonisty téměř výlučně k tvorbě komplexu L-R a nedojde k vyvolání odpovědi.



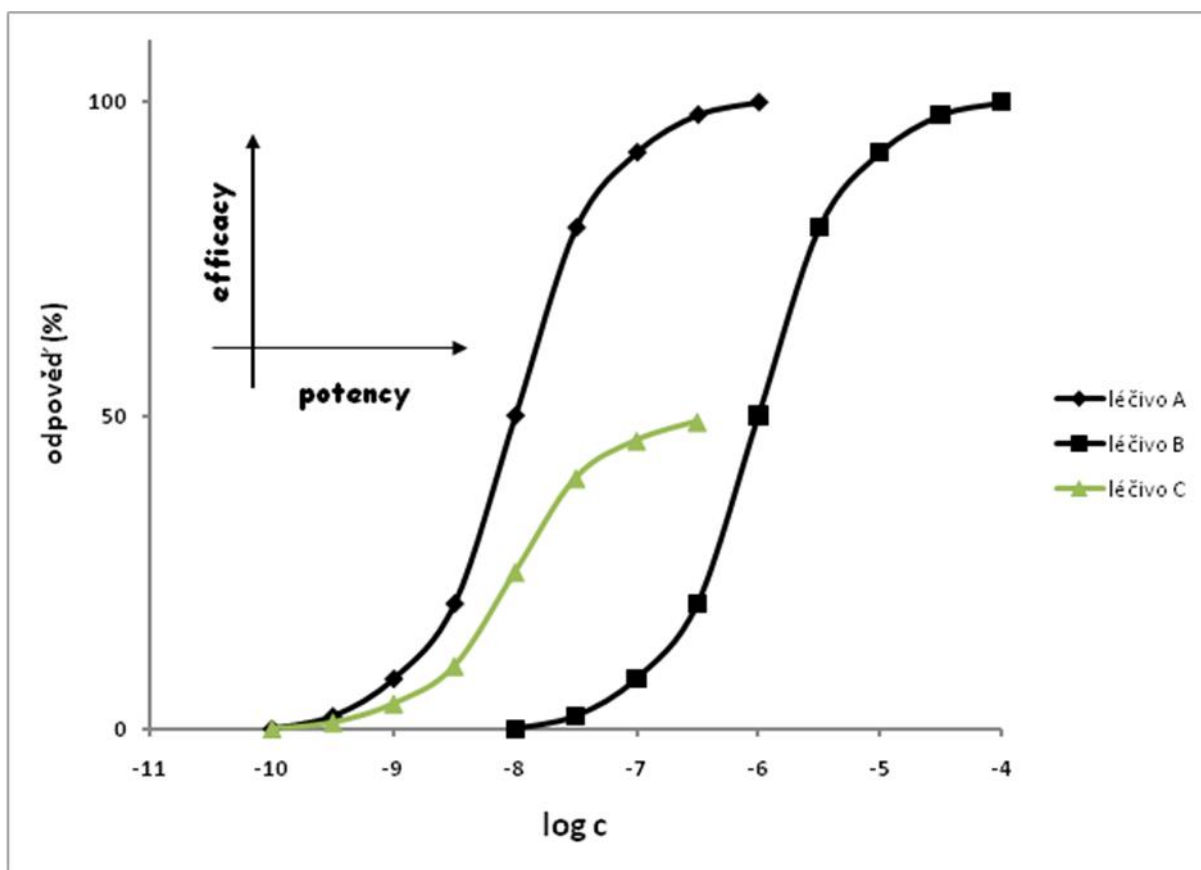
O parciálních agonistech a antagonistech bude ještě podrobněji pojednáno dále v textu. Dalším typem ligandů podle efficacy jsou **inverzní agonisté**.



Obdobně jako agonisté, mohou i inverzní agonisté být full nebo partial. Inverzní agonista (full) se preferenčně váže na stav R, kdy vzniká neaktivní komplex L-R. Klinicky se těchto látek využívá v případě, že jistá frakce neobsazených receptorů ve formě A, je aktivní i bez přítomnosti ligandu (konstitutivní aktivita). Potom po vazbě inverzního agonisty na R dojde ke vzniku L-R a k odčerpání volného R. Následně dojde k posunu rovnováhy a k přeměně konstitutivně aktivního A na neaktivní R. Z tohoto pohledu je využití inverzních agonistů ve farmakoterapii efektivnější než antagonistů. Příkladem jsou některé histaminové receptory nebo GABA_A receptory. GABA_A receptory jsou ligandem-řízené iontové kanály, které regulují influx Cl⁻ iontů do nervových buněk. Ligandem je tlumivý neurotransmitter GABA. Receptory GABA_A obsahují rovněž vazebné místo pro benzodiazepiny, kdy po vazbě benzodiazepinu dojde k potenciaci účinku GABA_A a projeví se anxiolytický účinek léku. Působíme-li na buňky inverzním agonistou GABA_A, sloučeninou Ro15-4513, dojde k deaktivaci konstitutivně aktivních GABA_A receptorů a látka tak vyvolá úzkost (původně byla vyvinuta pro blokaci účinku alkoholu na GABA-ergní systém).

PARCIÁLNÍ AGONISTÉ

Ve srovnání s endogenním ligandem (full agonistou), nevyvolá parciální agonista nikdy maximální odpověď. Hovoříme o tzv. submaximální odezvě. K vyvolání maximální odpovědi nedojde ani v případě, kdy jsou parciálním agonistou obsazeny všechny receptory, což podle Leffova modelu vysvětlujeme tvorbou neaktivních komplexů L-R.



Obrázek č.7: Dose-response křivky pro agonisty a parciálního agonistu.

Srovnáme-li parciálního agonistu s full agonistou: (i) **Afinita** (K_D) je většinou podobná, dokonce může být u parciálního agonisty vyšší než u full agonisty. (ii) **Potence** (EC_{50}) je většinou podobná u full a parciálních agonistů. (iii) **Účinnost** (efficacy, aktivita) – u full agonisty je rovna 1, zatímco u parciálního agonisty je v intervalu 0 až 1. V souladu s Clarkovou teorií pak většinou full agonista musí obsadit méně receptorů než parciální agonista, aby bylo dosaženo stejné buněčné odpovědi.

Na obrázku č. 7 jsou znázorněny dose-response křivky pro tři různé ligandy (léčiva). Ligand A a ligand B jsou agonisté (full), tj. oba v určité koncentraci vyvolají maximální odpověď. Hodnota na svislé ose je stejná, tj. A a B mají stejnou efficacy, ale B má nižší potenci, tj. hodnota EC_{50} je pro B o dva řády vyšší než pro A. Maximální odpověď tedy B vyvolá při vyšší koncentraci než A. Látka C je parciální agonista. Z obrázku je patrné, že A a C mají srovnatelnou potenci, ale C má nižší efficacy, a nedosáhne maximální odpovědi. Povšimněme si, že parciální agonista C vyvolá v koncentraci 10^{-8} M stejnou buněčnou odpověď jako

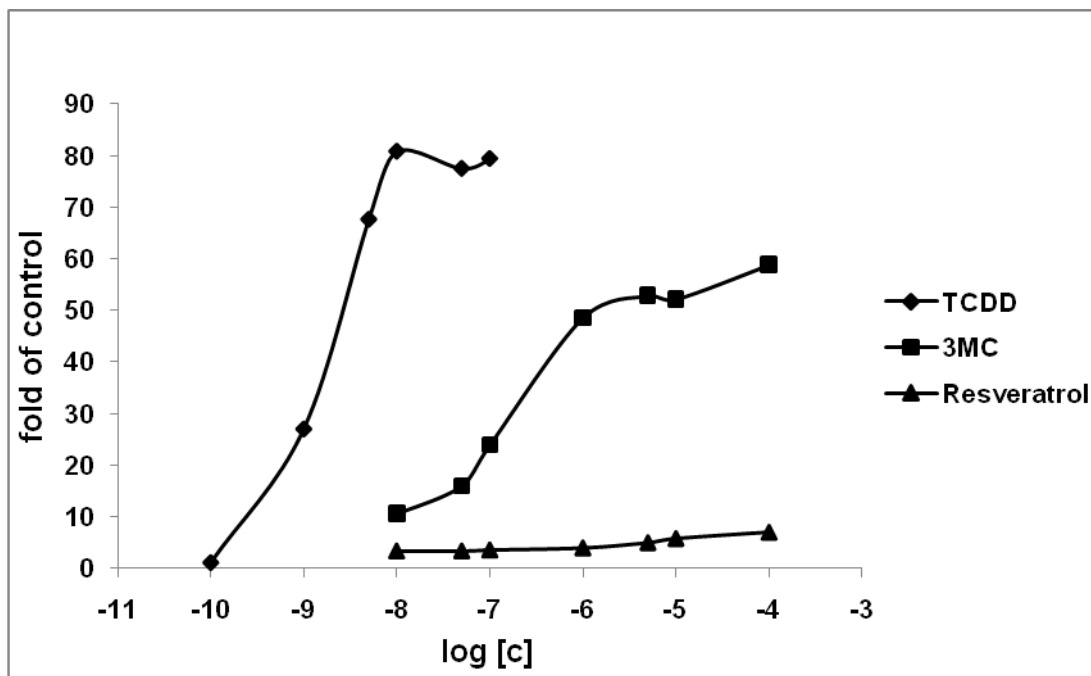
agonista B v koncentraci $10^{-6.5}$ M. Na druhou stranu, maximální odpověď dosažená parciálním agonistou C nedosahuje ani 50% maximální odpovědi vyvolané agonistou B. Tedy ligand B má vyšší efficacy, ale nižší potenci než ligand C.

Charakteristickou vlastností parciálních agonistů je, že v kombinaci s full agonisty se chovají jako antagonisté. Tj. zatímco parciální agonista sám o sobě vyvolá měřitelnou odpověď, současně je schopen inhibovat odezvu full agonisty. Ve své podstatě se jedná o soutěžení o vazebné místo na receptoru mezi parciálním a full agonistou. Připomeňme si, že parciální a full agonisté mají podobnou afinitu, tudíž kompetice je většinou významná.

Chování parciálních agonistů můžeme ukázat na dvou praktických příkladech, které byly publikovány ve vědeckých časopisech naší výzkumnou skupinou:

Příklad č. 1:

- Bachleda P., Vrzal R., Dvorak Z. (2010) Resveratrol enhances NK cell cytotoxicity: Possible role for aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Cellular Physiology* 225(2):289-290.



Obrázek č.8: Dose-response křivky pro agonisty a parciálního agonistu AhR receptoru v HepG2 buňkách.

Receptor pro polyaromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor, AhR) hraje důležitou roli v mnoha buněčných dějích, např. v proliferaci, apoptose, diferenciaci, imunitní odpovědi a v regulaci enzymů metabolizujících cizorodé látky. Typickými ligandy AhR jsou polyaromatické uhlovodíky (z cigaretového kouře), dioxiny, polychlorované bifenylly, polyaromatické aminy a řada dalších látek, často kontaminantů životního prostředí. Mezi endogenní ligandy AhR patří bilirubin, eikosanoidy, deriváty tryptofanu, indol a další.

V naší práci jsme pomocí techniky gene-reporter assays analyzovali účinek typických agonistů AhR ve srovnání s přírodní látkou resveratrolem (obsažen např. v červeném víně), který jsme identifikovali jako parciálního agonistu AhR. Jako modelové full agonisty jsme použili látku dioxinového typu 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dibenzodioxin (TCDD) a polyaromatický uhlovodík 3-methylcholanthren (3MC).

Obrázek č.8 ukazuje dose-response křivky pro 3MC, TCDD a resveratrol. Typickou sigmoidní křivku vykazuje TCDD, což je ligand AhR s nejvyšší známou potencí a efficacy. Z obrázku vidíme, že potence (EC_{50}) TCDD je cca 2 nM. Full agonista 3MC a parciální agonista resveratrol vykazují podobnou potenci (cca $EC_{50} = 500$ nM), která je cca o 2 – 3 řády slabší než pro TCDD. Na druhou stranu, full agonisté TCDD a 3MC vykazují srovnatelnou efficacy (svislá osa), zatímco parciální agonista resveratrol vykazuje řádově nižší efficacy.

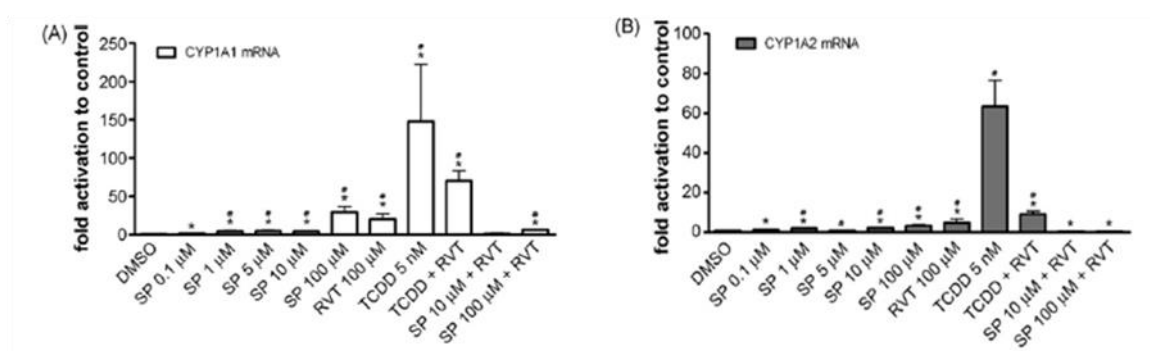
Příklad č. 2:

- Dvorak Z., Vrzal R., Henklova P., Jancova P., Anzenbacherova E., Maurel P., Svecova L., Pavek P., Ehrmann J., Havlik R., Bednar P., Lemr K., Ulrichova J. (2008) JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* **75(2)**:580-588.

Další příklad se opět týká AhR receptoru. V naší práci jsme popsali, že látka SP600125 (používaná jako specifický inhibitor c-jun-N-terminální kinasy), je parciálním agonistou AhR v lidských buňkách. V několika modelových systémech ukazujeme, že SP600125 slabě aktivuje AhR (podmínka submaximální aktivace), ale v kombinaci s full agonistou TCDD

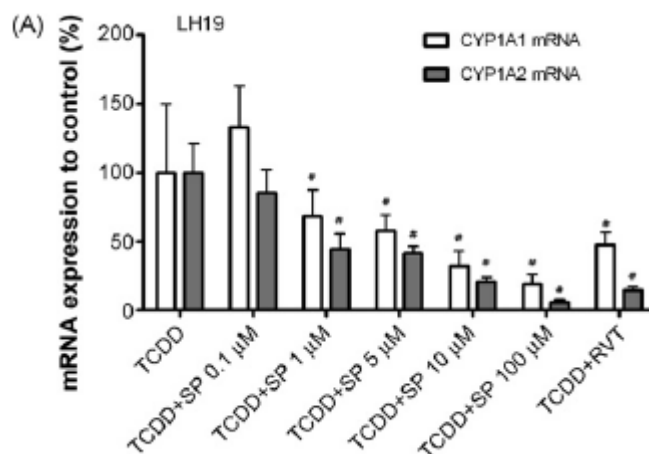
inhibuje účinek full agonisty (podmínka funkčního antagonismu parciálního agonisty). V této práci rovněž ukazujeme účinek resveratrolu na AhR.

Obrázek č.9 ukazuje účinek SP600125 a TCDD na buněčnou odpověď AhR (hodnoceno jako exprese genů CYP1A1 – vlevo, a CYP1A2 – vpravo). Vidíme, že s rostoucí koncentrací SP600125 roste exprese cílových genů (odpověď AhR), ale odpověď zdaleka nedosahuje odpovědi vyvolané full agonistou TCDD (SP600125 v koncentraci 100 μ M dosahuje cca 5% odpovědi pro 5 nM TCDD). Je tedy demonstrována podmínka pro funkci parciálního agonisty - submaximální aktivace.



Obrázek č.9: Účinek SP600125, resveratrolu a TCDD na expresi CYP1A1 a CYP1A2 mRNA v lidských hepatocytech. Buňky byly inkubovány 24 hod s testovanými látkami. Data byla normalizována na expresi GAPDH.

Obrázek č.10 ukazuje účinek SP600125 na buněčnou odpověď AhR vyvolanou full agonistou TCDD (opět hodnoceno jako exprese genů CYP1A1 a CYP1A2). Vidíme, že při kombinaci parciálního agonisty SP600125 s full agonistou TCDD, dochází s rostoucí koncentrací SP600125 ke koncentračně závislé inhibici buněčné odpovědi vyvolané full agonistou TCDD. Je tedy demonstrována podmínka pro funkci parciálního agonisty – funkční antagonismus účinku full agonisty.



Obrázek č.10: Účinek SP600125 na TCDD-indukovanou expresi CYP1A1 a CYP1A2 mRNA v lidských hepatocytech. Buňky byly inkubovány 24 hod s testovanými látkami. Data byla normalizována na expresi GAPDH.

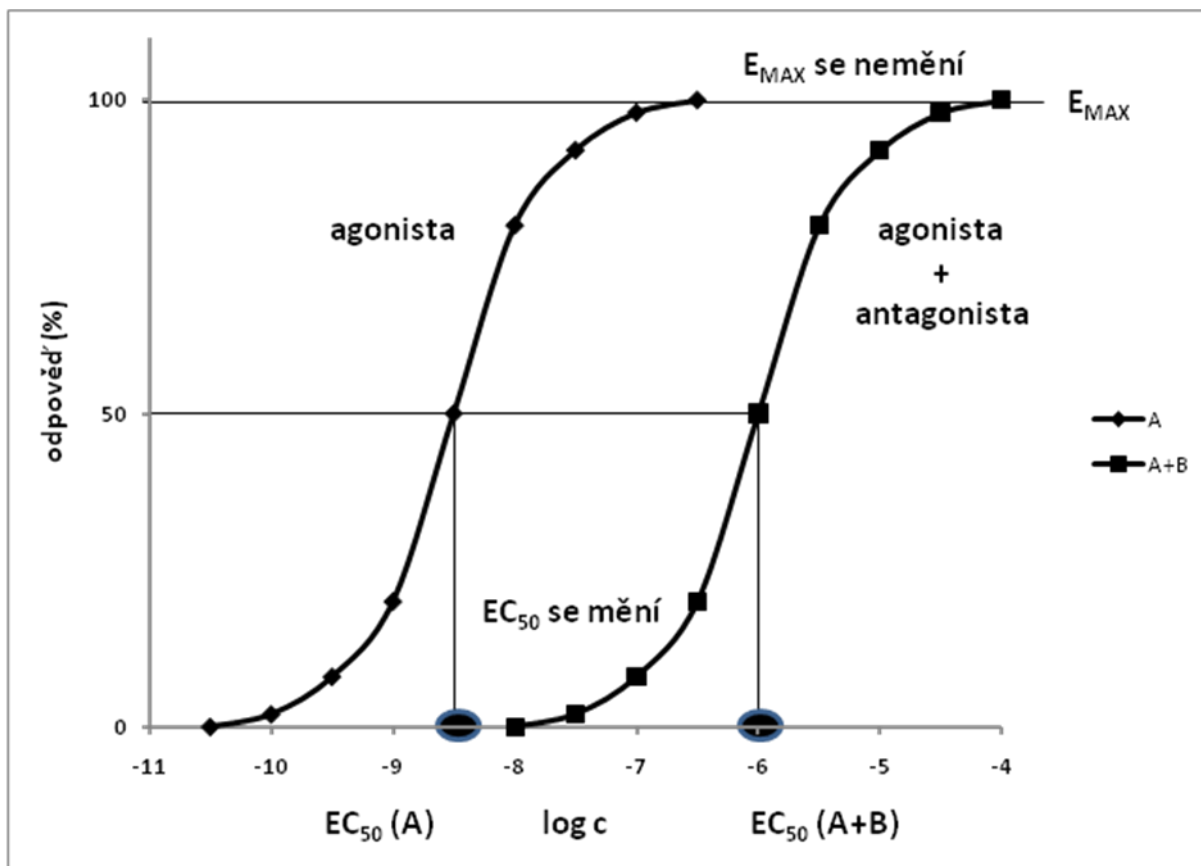
RECEPTOROVÝ ANTAGONISMUS

V předchozím textu byly definovány pojmy agonista, antagonist, receptorový a funkční antagonismus. Na příkladech bylo demonstrováno, že parciální agonisté se chovají jako funkční antagonisté.

Antagonisté blokují odpověď vyvolanou agonisty – brání vazbě léčiva a vyvolání normální odpovědi. Vnitřní aktivita antagonistů je nulová, a jejich účinek na buňku není ovlivněn koncentrací GTP a Na^+ . Antagonisté mají časté terapeutické využití. U antagonistů definujeme selektivitu, afinitu a potenci. Receptorový antagonismus rozdělujeme dle vratnosti procesu na reversibilní (kompetitivní a nekompetitivní) a ireversibilní.

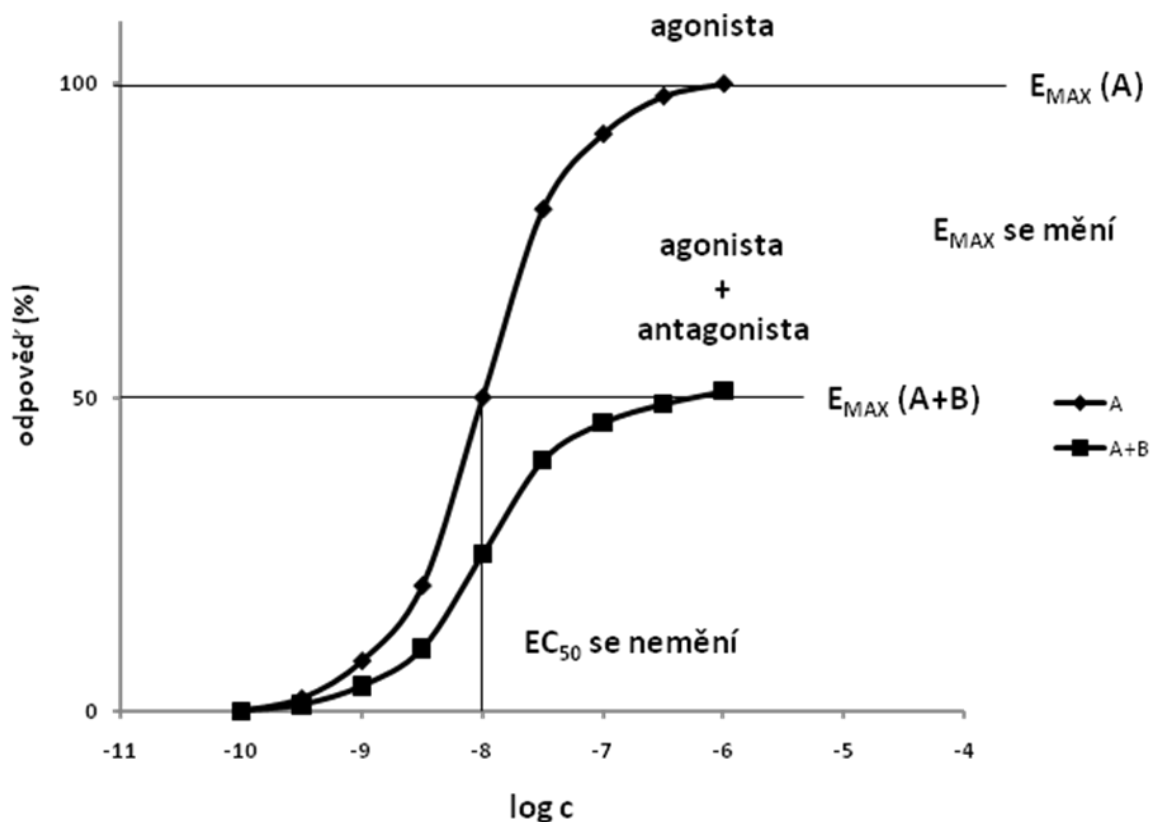
Ireversibilní antagonismus – ireversibilní antagonisté se na receptor váží nevratně. Obvykle dochází ke kovalentní modifikaci receptoru (N-ethylmaleinamid, alkylační činidla). Účinek je většinou neselektivní. Ireversibilní antagonismus mohou vykazovat rovněž protilátky, a na molekulární úrovni se bude stejně jevit i mutace receptoru. Výsledkem je, že je efektivně a prakticky sníženo množství receptorů, schopných vázat agonisty. Přídavek dalšího agonisty je

tudíž v případě ireversibilního antagonismu neúčinný, a jediným způsobem restaurace původního stavu je syntéza receptoru *de novo*.



Obrázek č.11: Kompetitivní antagonismus. Dose-response křivky pro agonistu (A) a agonistu v přítomnosti kompetitivního antagonisty (A+B).

Kompetitivní antagonismus – antagonist se na receptoru váže do stejného místa jako endogenní ligand nebo agonista. Kompetitivní antagonist tedy s agonistou soutěží o vazbu na vazebné místo (analogie kompetitivní inhibice inhibitor versus substrát na enzym). Chemická struktura kompetitivních antagonistů je často podobná struktuře agonistů. Účinek kompetitivního antagonisty může být vyrušen nadbytkem agonisty (**surmountable antagonism**). V grafickém vyjádření dochází jak u křivek dose-response tak u křivek pro frakční obsazenost k posunu křivky doprava. Hodnoty E_{MAX} a B_{MAX} se nemění. Mění se hodnoty K_D a EC_{50} (viz Obr. 11). Dose-response křivky mají podobný tvar, což je typické pro vazbu do stejného místa.



Obrázek č.12: Nekompetitivní antagonismus. Dose-response křivky pro agonistu (A) a agonistu v přítomnosti nekompetitivního antagonisty (A+B).

Nekompetitivní antagonismus – nedochází k inhibici tvorby komplexu ligand-receptor, ale k narušení konformační změny, která spouští buněčnou odpověď. Nekompetitivní antagonist se na receptoru váže do jiného vazebného místa než agonista – allosterická vazba.

Antagonismus nelze vyrušit nadbytkem agonisty (**non-surmountable antagonism**). Dose-response křivky mají odlišný tvar, což je typické pro vazbu do odlišného místa. Hodnoty E_{MAX} a B_{MAX} se mění. Nemění se hodnoty K_D a EC_{50} u nepostižené frakce receptorů (viz Obr. 12).

RECEPTOR-EFFECTOR COUPLING

Proces přenosu mezi receptorem obsazeným ligandem a výslednou buněčnou odpovědí na léčivo se nazývá **coupling**. Účinnost couplingu částečně závisí na počáteční konformační změně receptoru, tj. účinek full agonistů může být lépe „coupled“ ve srovnání s parciálními

agonisty. Vazba agonisty na receptor a následně vyvolaná konformační změna jsou obvykle jen prvními kroky z mnoha kroků potřebných k dosažení výsledného farmakologického účinku. Účinnost couplingu je také dána biochemickými událostmi, které zajišťují přenos od obsazeného receptoru do buněčné odpovědi. Toto je důvodem ne vždy dobré korelace mezi afinitou a účinností. Srovnáme receptor-efektor coupling a vyvolání konečné buněčné odpovědi u nikotinového acetylcholinového receptoru s beta-adrenergním receptorem:

nAChR

1. vazba acetylcholinu na r.
2. otevření iontového kanálu
3. influx Na^+ iontů
4. depolarizace membrány

β -adrenergní r.

1. vazba adrenalinu na r.
2. konformační změna receptoru
3. aktivace G-proteinu
4. aktivace adenylát cyklasy G-proteinem
5. syntéza cAMP
6. vazba cAMP na protein kinasu A (PKA)
7. štěpení PKA na podjednotky
8. PKA fosforyluje glykogen fosforylasu kinasu
9. glykogen f. kinasa fosforyluje glykogen f.
10. štěpení glykogenu

SPARE RECEPTORY

Českým ekvivalentem výrazu ***spare receptors***, by bylo zbytné, spořivé, postradatelné receptory. Podle Clarkovy teorie je odpověď receptoru přímo úměrná obsazenosti receptoru, což ale není vždy pravdou. Spare receptory jsou jedním z vysvětlení nelineární korelace mezi obsazeností receptoru a odpovědí receptoru. Pro spare receptory je typické, že maximální odpověď je vyvolána ligandem v koncentraci, která nedostačuje k plné obsazenosti dané populace receptorů. V některých případech je známo, jaký mechanismus se uplatňuje u spare receptorů; např. vazba GTP na mediátor přetrvává ještě dlouho po ukončení interakce agonista-receptor. Tato *spareness* je pouze dočasná. Někdy se aplikuje představa, že receptory jsou spare v počtu, což si lze představit následovně:

Situace A: V systému jsou přítomny 4 receptory. Každý z receptorů je spojen s jedním efektem. Koncentrace volného agonisty je rovna K_D . To znamená, že při této koncentraci bude obsazeno agonistou 50% receptorů, tj. 2 receptory ze 4 a dosáhne se 50% maximální odpovědi, protože budou aktivovány 2 efekty ze 4.

Situace B: Koncentrace receptorů v systému je desetinásobná oproti A (tj. 40 receptorů). Analogicky, každý receptor je spojen s jedním efektem (40 efektů). Hodnota K_D je stejná jako v předchozím případě. Nyní velmi malá koncentrace agonisty ($0,05 \times K_D$) postačí k obsazení 2 receptorů a následné aktivaci 2 efektů. Dosáhneme tedy 50% maximální odezvy jako v případě A, ale při 20 x nižší koncentraci ligandu.

Průkaz spare receptorů se provádí pomocí ireversibilních antagonistů, které sníží aktivní pool receptorů schopných vázat ligand, ale přesto nedojde k inhibici farmakologické odpovědi. Například maximální ionotropní odpověď srdečního svalu na katecholaminy může být vyvolána i v případě, kdy je 90% β -adrenergických receptorů obsazeno quasi-ireversibilním antagonistou; tj. myokard obsahuje značné množství spare β -adrenergických receptorů.

PODTPY RECEPTORŮ

U mnoha druhů receptorů existuje více podtypů. Různé podtypy mají často tkáňově specifickou lokalizaci a odlišné farmakologické efekty. Z terapeutického hlediska je výzvou syntetizovat specifické agonisty a antagonisty pro jednotlivé podtypy receptorů. Příkladem mohou být opiátové receptory:

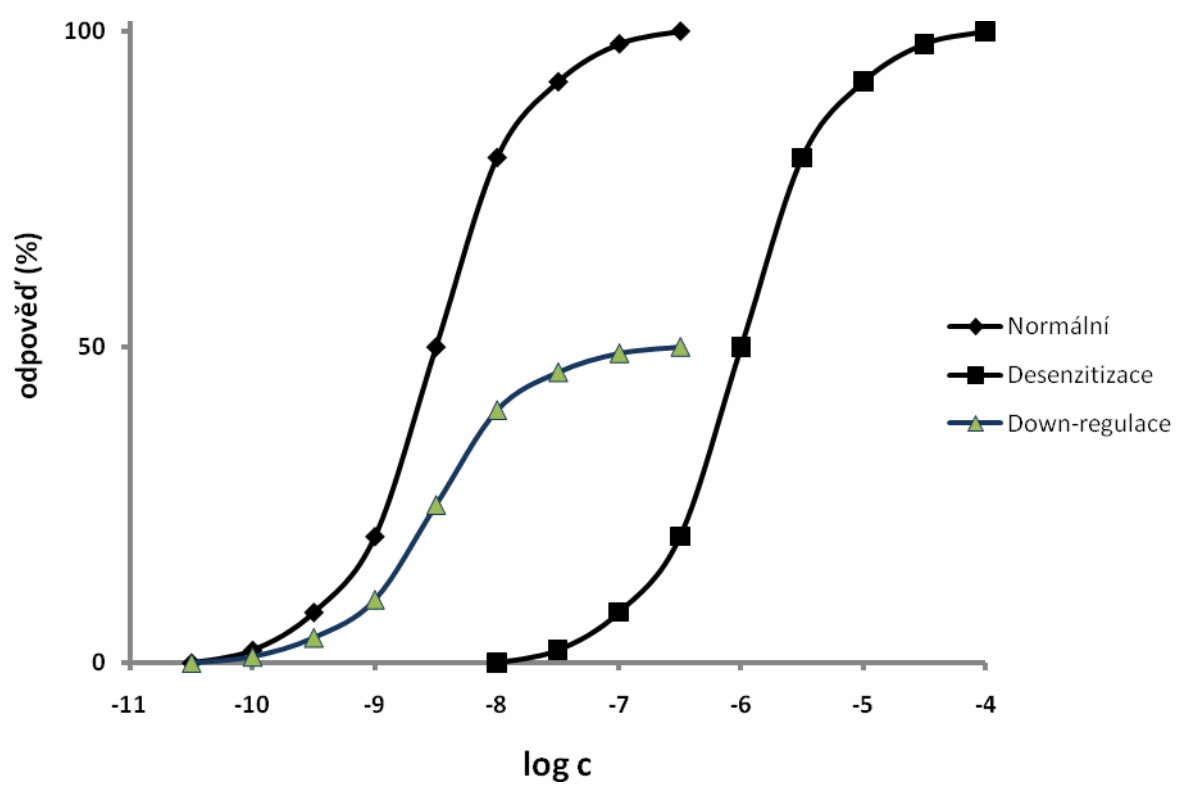
TYP RECEPTORU	μ -receptor $\mu 1, \mu 2, \mu 3$	δ -receptor $\delta 1, \delta 2$	κ -receptor $\kappa 1, \kappa 2$
SELEKTIVNÍ AGONISTÉ	endomorfín-1 endomorfín-2 DAMGO	[D-Ala]-delt. I [D-Ala]-delt. II DPDPE SNC 80 DSLET	enadolin U-50488 U-69593
SELEKTIVNÍ ANTAGONISTÉ	CTAP	naltrindol TIPP- ψ ICI 174864	nor-binal- torfimin

DOWN-REGULACE A DESENZITIZACE RECEPTORŮ

Je-li receptor vystaven působení ligandu, dochází k vazbě ligandu na receptor, ke vzniku komplexu L-R, k přenosu signálu a vyvolání buněčné odpovědi. Pokud je ligand odstraněn, dojde k posunu rovnováhy z L-R pět na L + R, a dojde k vymizení buněčné odpovědi. Některé receptory zůstávají aktivní i po odstranění ligandu. Jindy je zapotřebí, aby byla buněčná odpověď terminována, i když je ligand stále přítomen. Proto se vyvinula řada zpětnovazebných mechanismů zapojených do inaktivace receptorové odpovědi v přítomnosti ligandu.

Desenzitizace receptoru – po chronické stimulaci receptoru agonistou dojde ke ztrátě afinity receptoru k agonistovi, ale celkové množství receptorů v systému se nemění. Desenzitizace receptorů je často molekulární příčinou nebo průvodním jevem mnoha onemocnění. Na molekulární úrovni dochází k desenzitizaci receptoru několika mechanismy, např. fosforylací receptoru, nebo interakcí s jinými proteiny – např. arestiny. Dojde k un-couplingu receptoru s efektořem, a důsledkem je posun vazebné křivky doprava. Příkladem je β -adrenergní receptor, kdy K_D isoproterenolu roste (1 nM $\rightarrow$ 100 nM), zatímco B_{MAX} se nemění (viz Obr. 13).

Down-regulace receptorů – různými mechanismy dochází k fyzickému snížení počtu receptorů v dané populaci. Při down-regulaci klesá B_{MAX} , zatímco K_D zůstává nezměněna. Způsobů down-regulace je několik. Pro jaderné a steroidní receptory je typické, že po vazbě ligandu na receptor a „vykonání funkce“ v jádře, je receptor exportován do cytoplasmy, kde je degradován proteasom-ubiquitinovým systémem. Jiným způsobem down-regulace je ovlivnění rychlosti syntézy receptoru R, jako buněčná odpověď na aktivaci receptoru R (negativní zpětnovazebná regulace). Membránové receptory jsou často internalizovány (endocytosa) a následně degradovány lysozomem nebo proteasomem.



Obrázek č.13: Desenzitizace a down-regulace receptorů

II. JADERNÉ A STEROIDNÍ RECEPTORY

V této kapitole se stručně seznámíme s receptory jadernými a steroidními, které dle mechanismu účinku spadají do kategorie 4, tak jak jsme definovali v obrázku č.1. Základní dělení těchto receptorů plyne z endokrinologického konceptu, tj. žláza-hormon-receptor.

Rozlišujeme tyto typy receptorů:

STEROIDNÍ RECEPTORY (též receptory pro steroidní hormony), které se dále dělí na:

Receptory pro pohlavní hormony:

Estrogenový receptor (ER)

Progesteronový receptor (PR)

Androgenní receptor (AR)

Receptory pro kortikoidní hormony:

Glukokortikoidní receptor (GR)

Mineralokortikoidní receptor (MR)

JADERNÉ RECEPTORY

„Klasické“:

Thyroidní receptor (receptor pro thyroidní hormon; TR)

Receptor pro kyselinu *cis*-retinovou (RXR)

Receptor pro kyselinu *trans*-retinovou (RAR)

Xenoreceptory: (podrobněji viz kapitola o metabolismu xenobiotik)

Pregnanový X receptor (PXR)

Konstitutivní androstanový receptor (CAR)

Receptor pro polyaromatické uhlovodíky (AhR)

Ostatní: (viz Tabulka č.1)

Některé jaderné receptory se nazývají **sirotčí** receptory, angl. **orphan**. Název je odvozen od faktu, že pro tyto receptory není znám (zatím) endogenní ligand. Tj. je znám a popsán receptor, může být popsána aktivace cizorodými látkami, ale není známá (zatím) endogenní sloučenina, která by receptor aktivovala (byla jeho ligandem). Je pravděpodobné, že každý z orphan receptorů čeká postupem času deorphanizace. Uveďme si dva typické příklady deorphanizovaných receptorů (ne steroidních ani jaderných!):

Opiátové receptory – účinek exogenních ligandů na lidský organismus je znám po mnoho staletí (opium, morfium). Teprve počátkem sedmdesátých let dvacátého století byly poprvé popsány opiátové receptory, jako cílové buněčné struktury pro účinek opiátů. Dnes již byla identifikována, charakterizována a klonována celá řada opiátových receptorů (κ , σ , μ , δ). Krátce po objevu opiátových receptorů (tehdy tedy ještě sirotčích), následovaly v druhé polovině sedmdesátých let dvacátého století objevy endogenních ligandů opiových receptorů. Jedná se o neuropeptidy, z nichž některé slouží jako neurotransmitery. Nejdůležitějšími jsou endorfiny, enkefaliny, dynorfiny a endomorfiny. Tyto jsou sekretovány v různých částech mozku v odezvě na bolest, fyzickou námahu, vzrušení, orgasmus apod. Někdy se jim říká hormony štěstí.

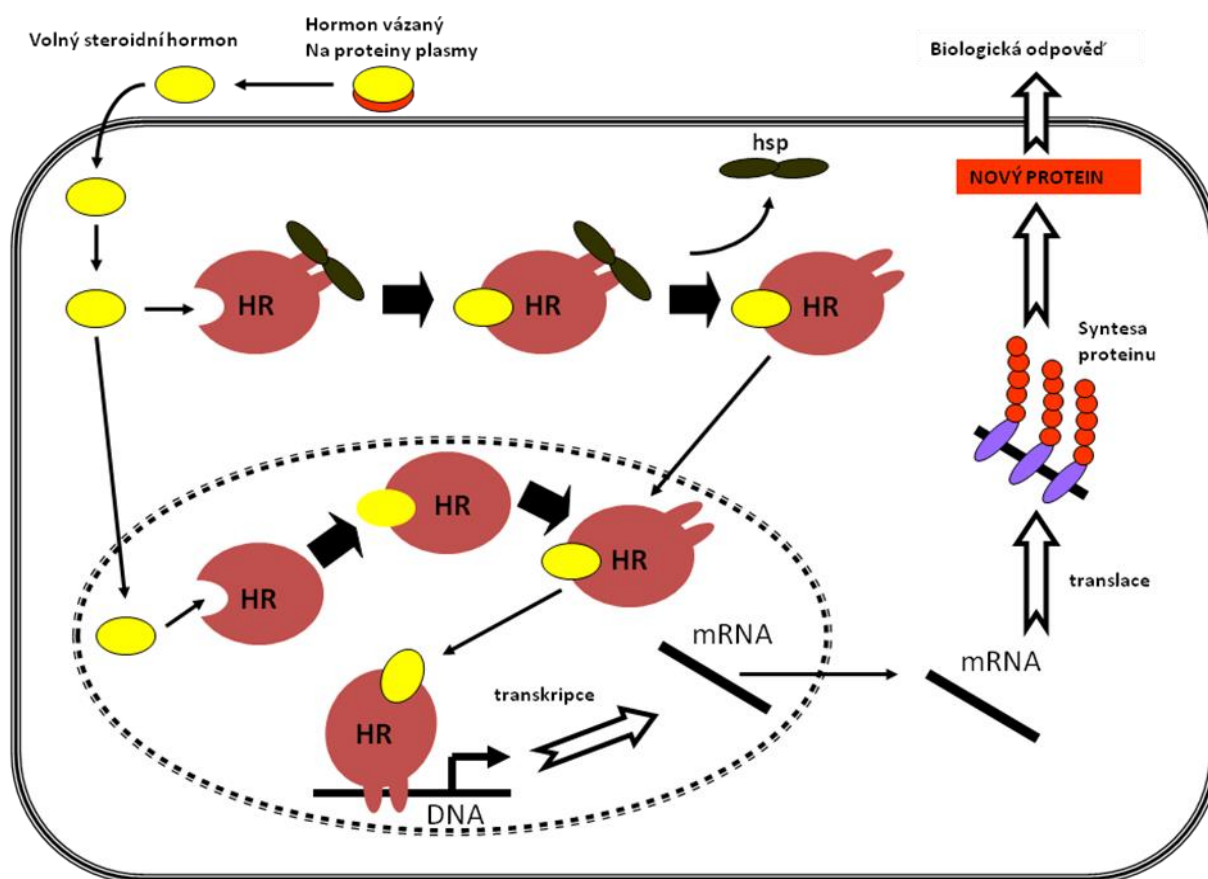
Cannabinoidní receptory – účinek exogenních ligandů na lidský organismus byl znám po staletí (hašiš, marihuana). Aktivní složkou (exogenním ligandem) je THC – tetrahydrocannabinol. Cannabinoidní receptory byly objeveny koncem osmdesátých let minulého století, nicméně plně charakterizovány a sekvenovány byly až na přelomu tisíciletí; v roce 1998 cannabinoidní receptor 1 (CB1, v CNS), a v roce 1993 cannabinoidní receptor 2 (CB2, periferní). V roce 1992 byl objeven první endogenní cannabinoid (endocannabinoid) anandamid, následován v roce 2001 objevem 2-arachidonylglyceroletheru, jako dalšího endocannabinoidu. Tím se staly CB deorphanizovány. Za zmínku stojí, že členem výzkumného teamu, který objevil endogenní cannabinoidey, byl pan prof. Lumír Hanuš, absolvent Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Níže jsou citace klíčových vědeckých prací, popisujících objev endocannabinoidů:

- Devane WA, **Hanus L**, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258(5090)**:1946-9.
- **Hanus L**, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98(7)**:3662-5.

RECEPTOR	IUPHAR	LIGAND
Retinoid-related Orphan Receptor (ROR α)	NR1F1	cholesterol
Retinoid-related Orphan Receptor (ROR β)	NR1F2	kys. retinová
Retinoid-related Orphan Receptor (ROR γ)	NR1F3	sirotek
Liver X Receptor (LXR α)	NR1H3	oxysteroly
Liver X Receptor (LXR β)	NR1H2	oxysteroly
Farnesoid X Receptor (FXR α)	NR1H4	žlučové kys.
Farnesoid X Receptor (FXR β)	NR1H5	lanosterol
Peroxisome-proliferator activated r. (PPAR α)	NR1C1	leukotrien B4
Peroxisome-proliferator activated r. (PPAR β)	NR1C2	mastné kys.
Peroxisome-proliferator activated r. (PPAR γ)	NR1C3	prostaglandiny
Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF4 α)	NR2A1	sirotek
Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF4 γ)	NR2A2	sirotek
Short Heterodimerization Partner (SHP)	NR0B2	sirotek
Neuron-derived Orphan Receptor 1 (NOR1)	NR4A3	sirotek
Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1)	NR5A2	sirotek

Tabulka č.1: Ostatní jaderné receptory. Převzato z: Germain P et al. (2006) Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol Rev* 58:685–704.

Buněčná a biologická odpověď vyvolaná jadernými a steroidními receptory je pomalá (řádově hodiny až dny) a účinky hormonů/ligandů jsou dlouhodobého charakteru. Regulovány jsou děje důležité pro metabolismus, diferenciaci, imunitní odpověď, biotransformaci, adaptaci, stres apod.

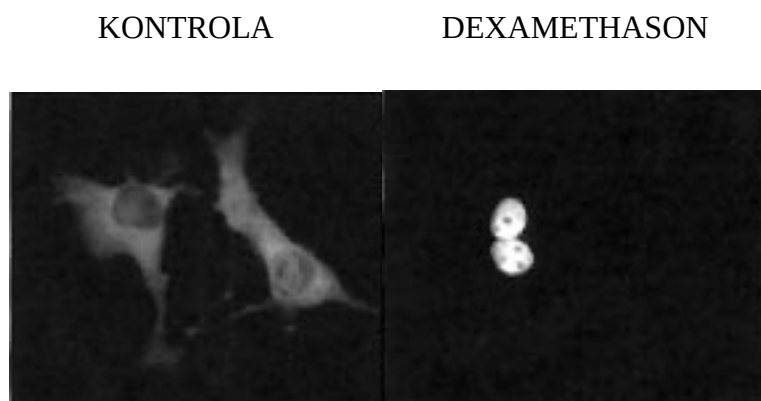


Obrázek č.14: Schematické znázornění funkce receptoru pro steroidní hormony

V rámci buňky jsou tyto receptory lokalizované buď v buněčném jádře (např. RAR, RXR, VDR, TR, PXR) a nebo v cytoplasmě odkud po aktivaci translokují do jádra (např. GR, ER, PR, AR, CAR, AhR). Receptory jsou v cytosolu většinou udržovány v inaktivním (aktivovatelném) stavu v komplexu s tzv. chaperonovými proteiny. Po vazbě ligandu na receptor dochází k disociaci multiproteinového komplexu a k translokaci receptoru do jádra. Na rozdíl od většiny jiných receptorů nemají jaderné a steroidní receptory druhého posla a jejich efektem je DNA. Vazbou aktivovaného receptoru do DNA je spuštěna/zastavena genová exprese (tj. buněčná odpověď) a je zvýšená/snížená syntéza proteinů. Steroidní receptory se vážou do DNA ve formě homodimeru GR-GR, ER-ER apod., zatímco jaderné receptory většinou ve formě heterodimeru RAR-RXR, VDR-RXR apod.

Na obrázku č. 15 je znázorněna translokace glukokortikoidního receptoru (chimérický fúzní konstrukt GR-GFP transientně transfekovaný do lidských embryonálních ledvinových buněk HEK293) do jádra po stimulaci syntetickým glukokortikoidem dexamethasonem.

V kontrolních buňkách je fluorescenční signál (GR-GFP) lokalizován především v cytosolu, zatímco jádra neobsahují GR (tmavé skvrny). Po stimulaci dexamethasonem dochází k rapidní jaderné translokaci GR-GFP do jádra a pozorujeme silný fluorescenční signál jen v jádrech a nikoliv v cytosolu.

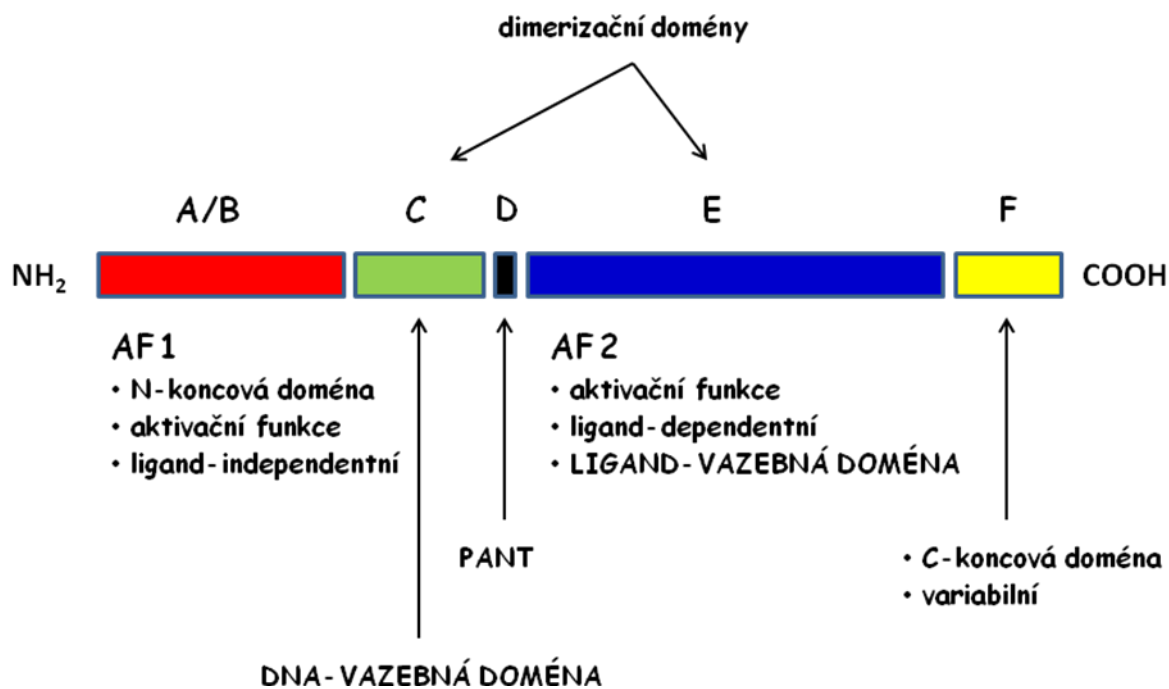


Obrázek č.15: Translokace GR-GFP v buňkách HEK293. Převzato z:

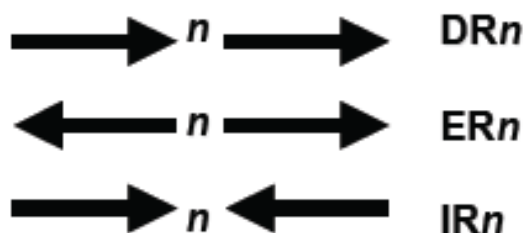
Dvořák Z. et al. (2003) Colchicine down-regulates cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C9, and 3A4 in human hepatocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Molecular Pharmacology* **64**(1):160-169.

Jaderné a steroidní receptory mají charakteristickou strukturu, skládající se z aktivačních domén, ligand-vazebné domény, DNA-vazebné domény a tzv. pantu (angl. hinge), který umožňuje konformační změny receptoru (Obrázek 16).

O kvalitativních a kvantitativních vztazích popisujících interakci ligandu s receptorem pojednává podrobněji předchozí kapitola, a pro jaderné a steroidní receptory platí stejná pravidla jako pro receptory membránové. Efektorem je v tomto případě DNA a aktivované receptory se váží do specifických oblastí DNA, které se nacházejí v promotorové regulační oblasti. Pro jaderné receptory jsou mají vazebné sekvence v DNA motiv přímých opakování sekvencí (tzv. **direct repeats; DR-n**) oddělených několika basemi. Podle počtu oddělovajících basí je dána specifita pro ten či onen jaderný receptor (Tabulka č.2). Dalšími typickými vazebnými motivy pro jaderné receptory jsou tzv. **everted repeats (ER-n)** a **inverted repeats (IR-n)** oddělené n-basemi (Obrázek 17). Jeden receptor se může vázat i do více vazebných motivů, např. PXR se váže do DR-3 a ER-6 motivů.



Obrázek č.16: Struktura jaderných receptorů



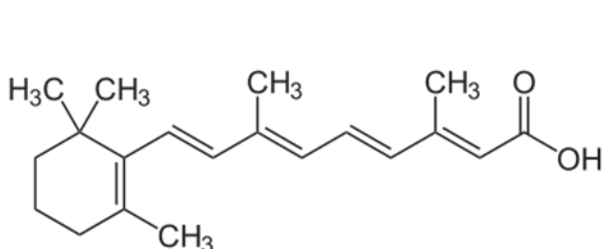
Obrázek č.17: Typy DNA-vazebných motivů pro jaderné receptory

DNA MOTIV	RAR	RXR	VDR	TR
DR-1: AGGTCA _n AGGTCA		+		
DR-2: AGGTCA _{nn} AGGTCA	+			
DR-3: AGGTCA _{nnn} AGGTCA			+	
DR-4: AGGTCA _{nnnn} AGGTCA				+
DR-5: AGGTCA _{nnnnn} AGGTCA	+			

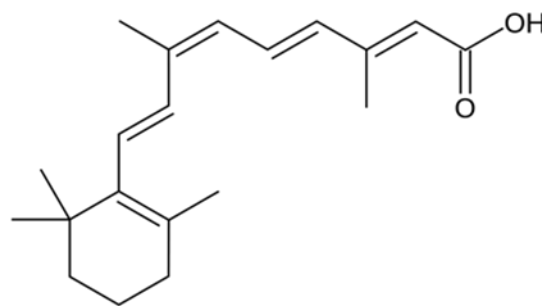
Tabulka č.2: DNA-vazebné sekvence a motivy pro jaderné receptory.

RETINOIDNÍ RECEPTORY

Jsou zapojeny do celé řady klíčových buněčných dějů a funkcí a jsou esenciální pro existenci lidského organismu. Regulují růst, přežití a diferenciaci buněk, krvetvorbu, tvorbu kostí, vidění, reprodukci atd. Retinoidní receptory jsou exprimovány ve všech tkáních, zejména v kůži, rohovce, epitelu plic a průdušek a v buňkách imunitního systému. Jednotlivé subtypy retinoidních receptorů jsou diferenciatně exprimovány ve zdravých a nádorových tkání, a tudíž mohou sloužit jako diagnostický marker. Retinoidní receptory jsou terapeutickým cílem některých léčiv využívaných v onkologii a dermatologii. Rozlišujeme dva základní typy retinoidních receptorů, a to **Retinoic Acid Receptors (RARs)** a **Retinoid X Receptors (RXRs)**. Agonistou RAR je kyselina *all-trans*-retinová (a obecně tzv. retinoidy), zatímco agonistou RXR je kyselina 9-*cis*-retinová (a obecně tzv. rexinoidy).



Kyselina *all-trans*-retinová



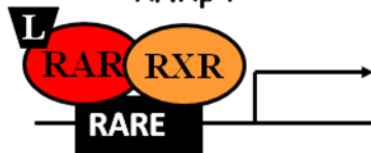
Kyselina 9-*cis*-retinová

Existuje několik subtypů receptorů RAR a RXR (Obrázek 18). Receptory RAR jsou transkripčně aktivní ve formě heterodimeru RAR-RXR, který se váže do sekvence RARE (Retinoic Acid Responsive Element; motivy DR-2 a DR-5). Receptory RXR se do DNA váží v podobě homodimeru RXR-RXR a to do sekvence RXRE (Retinoid X Responsive Element; motiv DR-1).

Retinoic Acid Receptors

NR1B1 NR1B2 NR1B3

RAR α 1 RAR β 1 RAR γ 1
 RAR α 2 RAR β 2 RAR γ 2
 RAR β 3
 RAR β 4



AGGTCA_nAGGTCA
 AGGTCA_nnnnnnAGGTCA

Retinoid X Receptors

NR2B1 NR2B2 NR2B3

RXR α 1 RXR β 1 RXR γ 1
 RXR α 2 RXR β 2 RXR γ 2



AGGTCA_nAGGTCA

Obrázek č.18: Retinoidní receptory

RECEPTORY PRO THYROIDNÍ HORMON

Někdy jsou nazývány thyroïdní receptory (TR), správný název však zní „*thyroid hormone receptors*“. TR jsou esenciální pro existenci lidského organismu, regulují jaterní metabolismus (např. žlučových kyselin) a metabolismus periferních tkání, řídí mnoho fyziologických funkcí, např. vývoj a růst skeletu, vývoj svalů apod. Existují dvě formy TR α a TR β a u každého pak podvarianty 1 a 2 (Obrázek 19). Forma TR β 2 je transkripčně neaktivní. Receptory TR se váží do DNA ve formě heterodimeru TR-RXR a to do sekvence TRE (Thyroid hormone Responsive Element; motiv DR-4).

Thyroidní Receptory

NR1A1 NR1A2

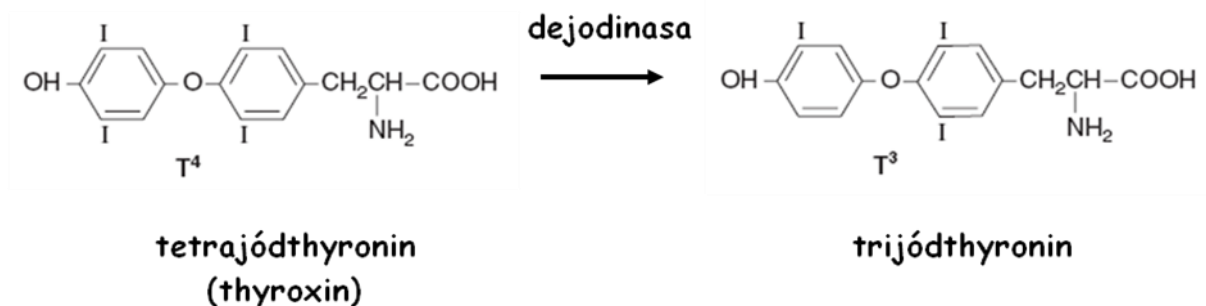
TR α 1 TR β 1
 TR α 2 TR β 2



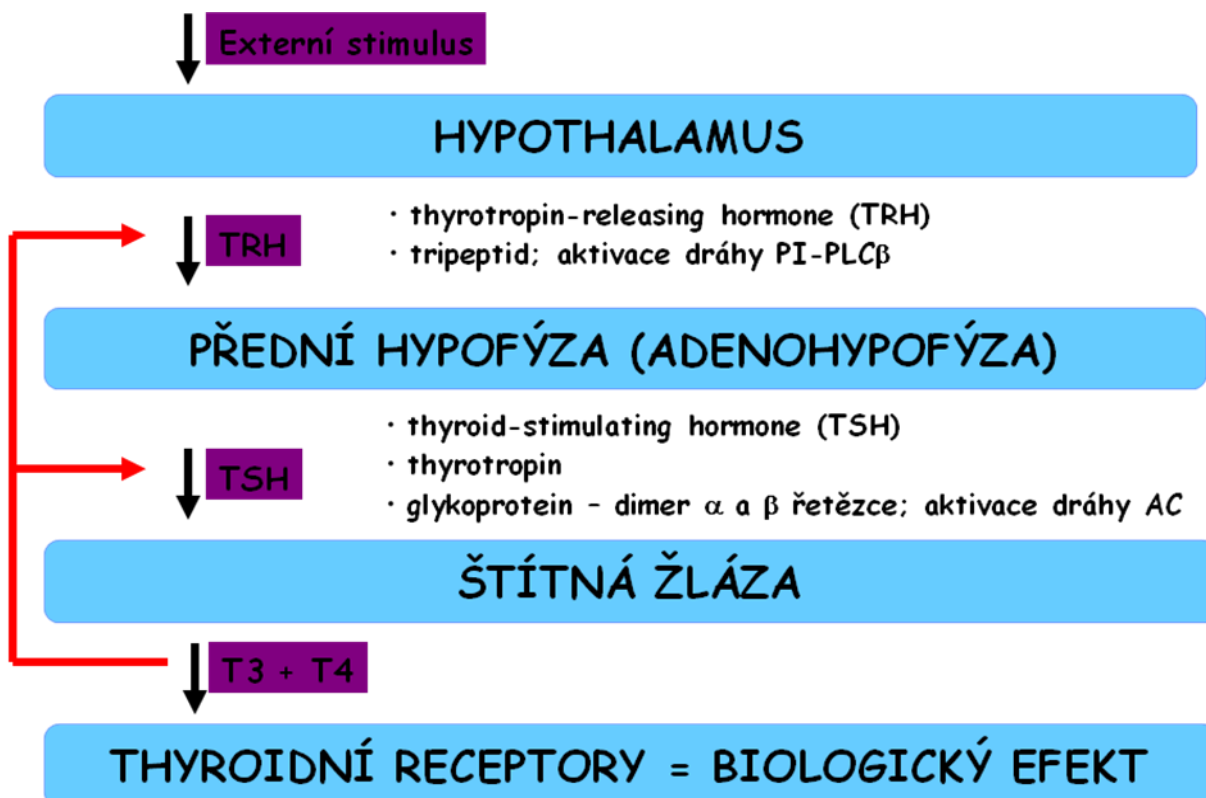
AGGTCA_nnnnnAGGTCA

Obrázek č.19: Receptory pro thyroïdní hormon

Štítná žláza je orgán zodpovědný za syntézu thyroïdního hormonu. Biologicky aktivní forma thyroïdního hormonu je tzv. trijódthyronin (T₃; thyroxin), který vzniká z méně aktivního prekursoru tetrajódthyroxinu (T₄; thyroxin) za působení enzymu dejodinasy:



V rámci lidského organismu existuje regulační kaskáda hormonálně řízených dějů. TR se účastní tzv. **Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis**; na vrcholu kaskády je hypothalamus, který na základě vnějších podnětů sekretuje thyrotropin-releasing hormone (TRH). Uvolněný TRH působí na přední lalok hypofýzy (adenohypofýza) a vyvolá sekreci thyrotropinu (thyroid-stimulating hormone; TSH), který pak působí na štítnou žlázu, kde je následně syntetizován biologicky vysoce aktivní thyroïdní hormon T₃. Existuje zpětnovazební regulace dráhy, kdy T₃ inhibuje sekreci TRH hypothalamem a TSH hypofýzou.

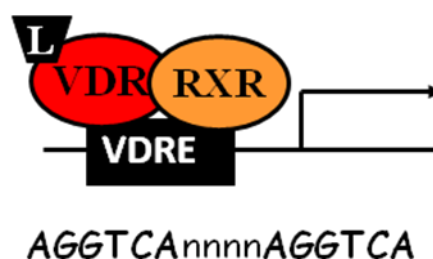


Obrázek č.20: Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis

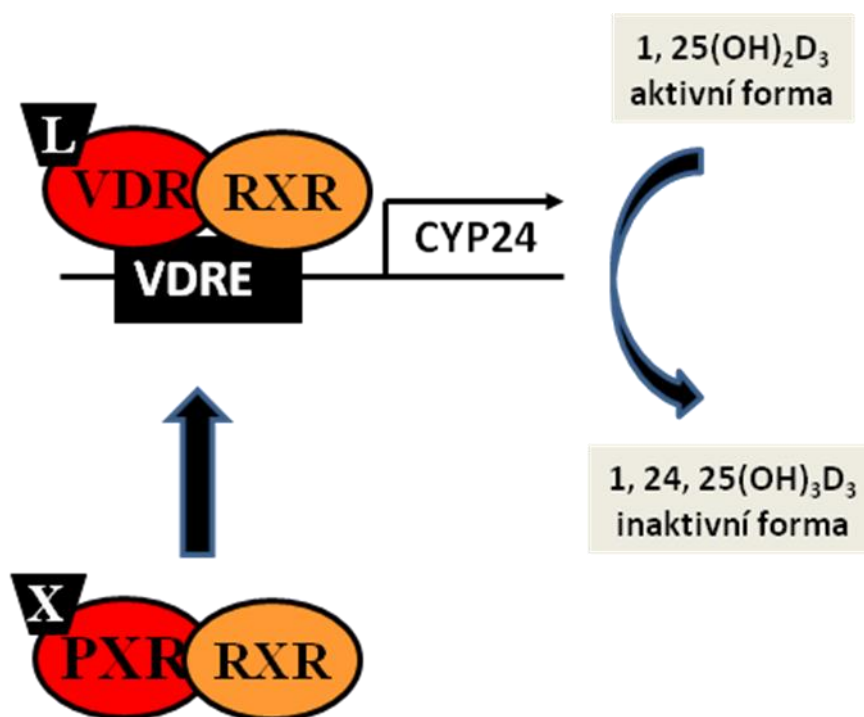
RECEPTOR PRO VITAMÍN D

Vitamín D působí na molekulární úrovni prostřednictvím aktivace receptoru pro vitamín D (**vitamin D receptor**; VDR). Mechanismus účinku VDR je transkripční regulace exprese celé řady genů, zapojených do intermediárního metabolismu, mineralizace kostí, homeostazy vápníku apod. Aktivovaný VDR (po vazbě ligandu), se váže ve formě heterodimeru VDR-RXR do DNA sekvence VDRE (Vitamin D Responsive Element; motiv DR-3). Vazba ale není specifická a do VDRE se váží rovněž receptory PXR a CAR. Tato nespecifická vazba má klinické důsledky, neboť léčiva vážící se na PXR a CAR (např. karbamazepin, rifampicin, fenytoin, kyselina valproová apod.) způsobují aktivaci VDRE a následně dysregulaci enzymů zapojených do metabolismu vitamínu D, což vede k tzv. léky vyvolané osteomalacii (soubor klinických příznaků vyvolaných nedostatkem vitamínu D).

Vitamin D Receptor (VDR) *NR1I1*



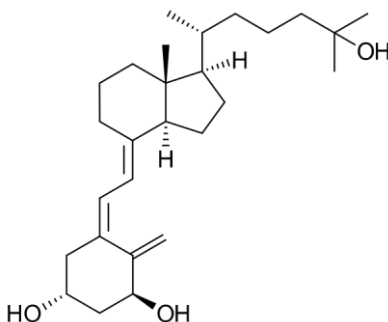
Obrázek č.21: Receptor pro vitamín D



Obrázek č.22: Molekulární mechanismus léky vyvolané osteomalacie.

Na druhou stranu, VDR se neváže pouze do VDRE, ale rovněž např. do ER-6 vazebných elementů, do kterých se váží PXR a CAR; tedy VDR je důležitým regulátorem exprese enzymů metabolizujících léčiva (CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4). Tento fenomén se uplatňuje zejména ve střevě.

Metabolismus vitamínu D je velmi komplikovaný a probíhá v kůži, játrech a v ledvinách. Aktivní formou vitamínu D a potentním ligandem VDR je calcitriol (1,25-dihydroxy cholecalciferol nebo-li 1,25-dihydroxy vitamín D3).



1,25-dihydroxy vitamín D3

RECEPTORY PRO STEROIDNÍ HORMONY

Syntéza, degradace a biologická funkce steroidních hormonů nebude v rámci tohoto skriptu prezentována, neboť je náplní kurzů biochemie. Receptory pro steroidní hormony jsou lokalizovány v cytoplasmě buňky v komplexu s chaperonovými proteiny (např. hsp90, hsp70 atd.). Ligandy těchto receptorů jsou steroidní hormony. Po vazbě hormonu na receptor dojde k disociaci receptoru z komplexu s chaperonovými proteiny a k translokaci L-R do buněčného jádra. Aktivované receptory pro steroidní hormony se váží do specifických sekvencí v DNA ve formě homodimerů, v komplexu s koaktivátory a korepresory.

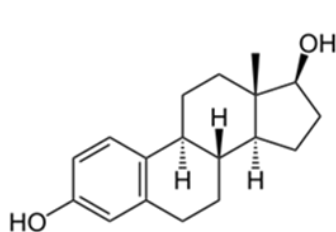
Receptory pro pohlavní hormony zahrnují tři typy receptorů:

Estrogenový receptor (ER) – existuje ve dvou formách ER α (NR3A1) a ER β (NR3A2). Byla identifikována řada subtypů ER α a ER β . Hormony, které aktivují ER, se nazývají estrogeny. Jedná se o ženské pohlavní hormony, které jsou syntetizovány ve žlutém tělisku vaječníků, v těhotenství v placentě a v menší míře v játrech a nadledvinkách. K estrogenům náleží

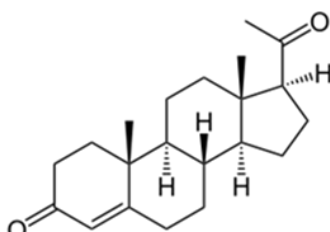
estron, estriol a především estradiol (17 β -estradiol; E2). Aktivovaný ER se váže do Estrogen Response Elements (ERE; consensus sekvence AGGTCANNNTGACCT) ve formě homodimerů ER α -ER α , ER β -ER β nebo heterodimeru ER α -ER β .

Progesteronový receptor (PR) – (NR3C3) je aktivován gestageny, které jsou produkovány ve žlutém tělisku vaječníků, v těhotenství placentou a v menší míře v nadledvinkách a u mužů ve varlatech. Přírodním gestagenem je progesteron. Syntetické gestageny jsou využívány v hormonální antikoncepci. Aktivovaný PR se váže do DNA na specifické sekvence Progesterone Response Elements (PRE; GGTACAnnnTGTTCT) ve formě homodimeru PR-PR.

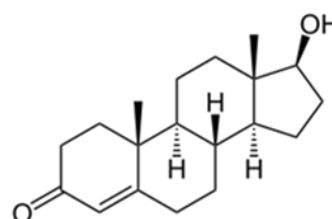
Androgenní receptor (AR) – (NR3C4) je aktivován androgeny, což jsou mužské pohlavní hormony. Primární a nejtypičtější androgen je testosteron, který je syntetizován ve varlatech. Aktivovaný AR se váže ve formě homodimeru AR-AR do DNA sekvencí zvaných Androgen Response Elements (ARE). Struktura ARE je různá; liší specifitou a afinitou k AR. Příkladem sekvence, která je vysoce afinitní a současně vysoce specifická pro AR je GGTTCG TGG AGTACT.



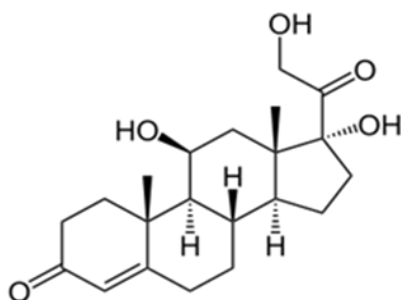
estradiol



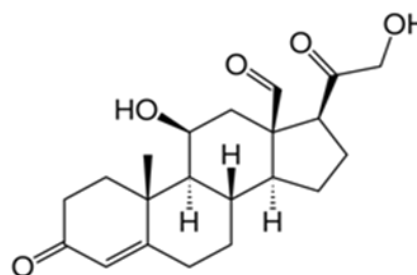
progesteron



testosteron



kortisol

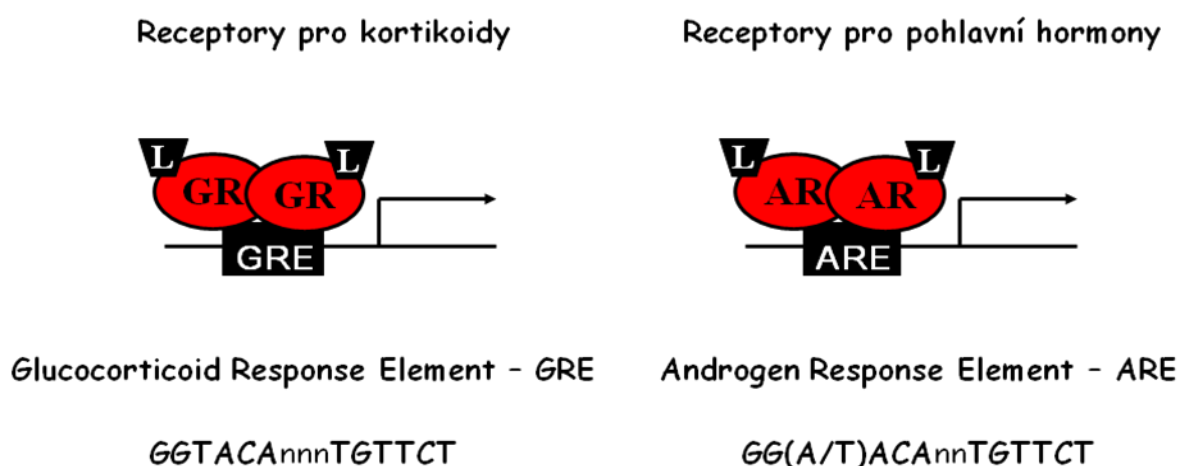


aldosteron

Receptory pro kortikoidní hormony, nebo-li kortikosteroidy, zahrnují dva typy receptorů:

Glukokortikoidní receptor (GR) – Funkční formou GR je forma GR α (NR3C1), zatímco forma GR β není funkční a ukazuje se, že její role je antagonistická vůči GR α . Ligandy (agonisté) GR jsou glukokortikoidy, které jsou produkovány kůrou nadledvinek. Typickým přirozeným glukokortikoidem je kortisol, mezi syntetické pak patří dexamethason. Glukokortikoidy jsou důležité regulátory intermediárního metabolismu (lipidy, sacharidy, bílkoviny), a hrají významnou roli v imunitním a centrálním nervovém systému. Aktivovaný GR se v jádře váže ve formě homodimeru GR α -GR α do tzv. Glucocorticoid Response Elements (GRE; GGTACAnnnTGTTCT). Na úrovni organismu existuje (obdobně jako u TR) tzv. **hypothalamic-pituitary-adrenal axis**, kdy na vnější podnět hypothalamus sekretuje corticotropin-releasing hormone (CRH), který následně stimuluje sekreci adrenocorticotropic hormone (ACTH) z hypofýzy. ACTH působí na nadledvinky a vyvolá syntézu a sekreci kortizolu; kortizol zpětnovazebně inhibuje kaskádu a blokuje sekreci CRH a ACTH.

Mineralokortikoidní receptor (MR) – (NR3C2) je aktivován mineralokortikoidy, z nichž typickým představitelem je aldosteron, který je syntetizován v nadledvinkách. MR má klíčovou funkci v regulaci homeostázy Na⁺, K⁺ a vody, je tedy důležitým regulátorem hospodaření s minerály a vodou. Regulace probíhá na transkripční úrovni – např. syntéza Na⁺ pumpy apod.



Obrázek č.23: Receptory pro steroidní hormony

Pozn.: Xenoreceptory budou podrobně popsány v následující kapitole.

Steroidní a jaderné receptory mají za efektor DNA, do které se váží ve formě homodimerů, nebo heterodimerů s RXR. Pro správnou funkci těchto receptorů je po vazbě do DNA vytvořen celý proteinový komplex, který obsahuje transkripční koaktivátory a korepresory. Příkladem jsou:

NRIP1	Nuclear Receptor Interacting Protein
GRIP	Glucocorticoid receptor Interacting Protein
DRIP	Vitamin D Receptor Interacting Protein
SMRT	Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors
TRAM	Thyroid hormone Receptor Activator Molecule
TRAP	Thyroid hormone Receptor Associated Protein
SRC-1	Steroid Receptor Co-activator 1
p300	
p160	
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CBP	CREB Binding Protein

Jaderné a steroidní receptory jsou důležitým buněčným cílem v klinické farmakoterapii.

Tabulka č.3 ukazuje příklady léčiv cílených na jaderné a steroidní receptory:

RECEPTOR	APLIKACE	PREPARÁT
TR	Hypofunkce štítné žlázy	Euthyrox, Lethrox, Eltroxin
RAR	Dermatologie (akné) Onkologie (leukémie)	Airol, Retin, Locacid Vesanoid
GR	Protizánětlivé léky, imunitní onemocnění, astma	Dexamethason, Betamethason, Hydrokortisol
PR	Antikoncepční preparáty	Yadine, Eloine, Belanette
AR	Antiandrogeny – rakovina prostaty	Bicaluplex, Casodex, Atembin
ER	Antiestrogeny – rakovina prsu	Fulvestrant, Faslodex

Tabulka č.3: Jaderné a steroidní receptory jako cíl farmakoterapie

III. METABOLISMUS XENOBIOTIK

Jednou ze základních vlastností živých organismů je schopnost udržet stálé vnitřní prostředí (homeostáza). Aby toto bylo možné, musí se organismy vypořádat s působením cizorodých látek, které na ně působí z vnějšího prostředí. Naše znalosti buněčného metabolismu jsou poměrně mladé. Ještě počátkem 18. století panovalo vitalistické přesvědčení, tj. že složení lidského těla a všech živých věcí je výsledkem životní síly (*vital force*, *vis vitalis*) a vnitřního plamene (*internal flame*). V roce 1828 syntetizoval Friedrich Woehler močovinu, jako jednu z odpadních sloučenin vylučovanou močí, a to pomocí tepelného rozkladu kyanatanu amonného. Tato jednoduchá syntéza byla prvním indikátorem, že děje v živých organismech jsou založeny na chemických reakcích a ne na životní síle. Woehler pak poslal svému současníkovi Berzeliovi následující vzkaz: „*I must tell you that I can prepare urea without requiring a kidney of an animal, either man or dog*“. Byl schopen vytvořit metabolický produkt bez potřeby orgánu (pozn. dnes již víme, že močovina nevzniká v ledvinách ale v játrech). Prvním krokem ve studiu metabolismu cizorodých látek byla experimentace, kterou sám na sobě prováděl Justus von Liebig v roce 1829. Pravidelně večer požil kyselinu benzoovou a ze své ranní moče izoloval metabolický produkt – kyselinu hipurovou. Prokázal tedy, že lidský organismus je schopen přeměnit a vyloučit cizorodé sloučeniny. Originální zápisky von Liebiga nám přiblíží detaily experimentu (text převzatý z www.issx.org):

„In the evening, shortly before going to bed, I ingested 2 grams (about 32 grains) of benzoic acid in a sugar syrup. During the night I started sweating, which could be an effect of this acid, since I otherwise very rarely sweat profusely. I experienced no other obvious effect, even over the course of the following days when I took the same dose, and neither did the sweating reoccur In the urine eliminated the next morning was found to be unusually acidic, even after being allowed to stand 12 hours after evaporation ...after the residue was mixed with hydrochloric acid and allowed to stand, a large amount of long prismatic brown crystals was formed, which did look like benzoic acid. Another portion, which had been concentrated to a syrupy thickness, formed a magma of crystalline plates after being mixed with hydrochloric acid. ...Long, colorless prismatic crystals were then isolated. These crystals consisted of pure hippuric acid. ... As long as I continued to ingest benzoic acid, I could very easily continue to produce quantities of hippuric acid, without any apparent unhealthy effects, so it would be quite easy to produce in such a way great quantities of hippuric acid. One could keep a subject on hand for weeks , in order to continue this method of production“.

Dnes již víme, že za metabolismus cizorodých látek jsou v buňce zodpovědné tzv. biotransformační enzymy. Látky cizí lidskému organismu se nazývají **xenobiotika**, mezi která patří zejména:

- Léčiva
- Drogy (cannabinoidy, amfetaminy, nikotin)
- Environmentální polutanty (cigaretový kouř, nátěrové hmoty, dioxiny)
- Agrochemikálie (pesticidy, hnojiva, růstové stimulanty)
- Potravní aditiva (ochucovadla, stabilizátory, barviva)
- Přírodní látky (alkaloidy, terpeny, flavonoidy)

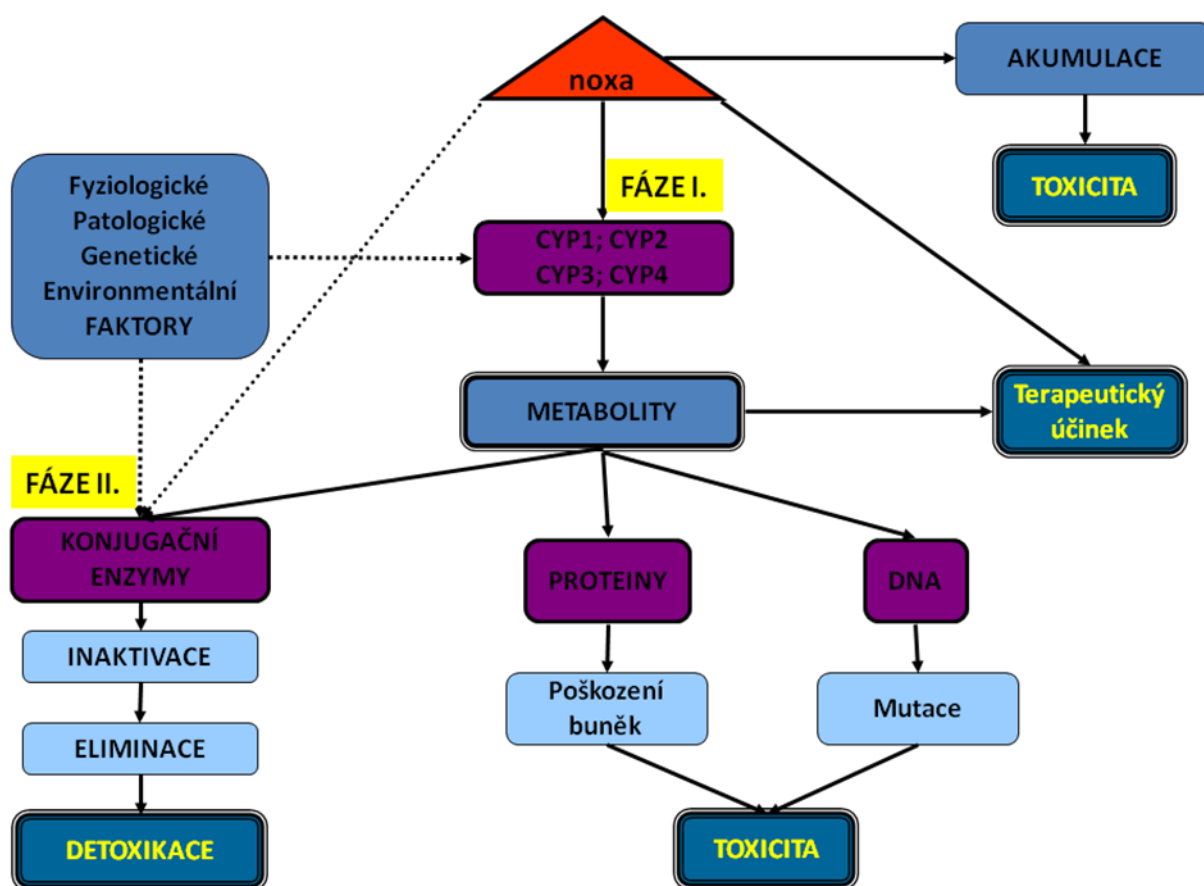
Metabolismus xenobiotik u člověka probíhá zejména v játrech, ale i v mnoha mimojatrných tkáních např. v plicích, kůži, placentě, střevě a ledvinách. Strategií organismu je cizorodou látku z těla vyloučit, což se děje zejména močí a prostřednictvím žluči stolicí. Jelikož těmito cestami se vylučují látky polární, a většina cizorodých látek jsou látky nepolární, je cílem organismu zvýšit biotransformací polaritu xenobiotika a usnadnit tak jeho exkreci.

Mechanismy působení léčiva (xenobiotika) studuje **farmakodynamika**, „pohyb“ léčiva (xenobiotika) v organismu studuje **farmakokinetika**. Základní čtyři děje, které zahrnuje farmakokinetika jsou A.D.M.E.:

- Absorpce
- Distribuce
- Metabolismus
- Eliminace

Metabolický osud léčiva v organismu může být velice rozmanitý a schematicky jej ukazuje obrázek 24. Pro metabolismus xenobiotik je charakteristické, že biotransformace může někdy představovat krok **detoxikace**, někdy však dochází k tvorbě reaktivních a toxických metabolitů a hovoříme o procesu **metabolické aktivace**.

Metabolismus xenobiotik se formálně dělí do dvou fází, během kterých dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika. Ve **fázi I. biotransformace** vedou ke zvýšení polaritě tři strategie – vnesení polární skupiny do molekuly, přeměna méně polární skupiny na polárnější skupinu nebo odkrytí polární skupiny chemickou přeměnou molekuly. Uplatňují se zde reakce



Obrázek č.24: Metabolismus cizorodých látek

oxidoredukční a hydrolytické. Hydrolytické reakce jsou katalyzovány karboxyesterasami, peptidasami a epoxidhydrolasami. Dochází ke štěpení esterů a amidů. Oxidoredukční reakce zahrnují široké spektrum reakcí, např. dehydrogenace, oxygenace, oxidační/reduktivní dehalogenace a redukce funkčních skupin (azo-, nitro-, karbonyl-, disulfid-, chinon).

Nejvýznamnějším enzymovým systémem, který je zodpovědný za fázi I. biotransformace je nadrodina enzymů cytochromu P450 (podrobněji dále v textu), která katalyzuje *N*-dealkylace, *O*-delakylace, oxygenace heteroatomu, epoxidace dvojné vazby, alifatické a aromatické hydroxylace, přenosy funkčních skupin atd. Ve *fázi II. biotransformace* je polarita xenobiotika zvyšována připojením jiné polární molekuly, proto se tato fáze nazývá konjugační.

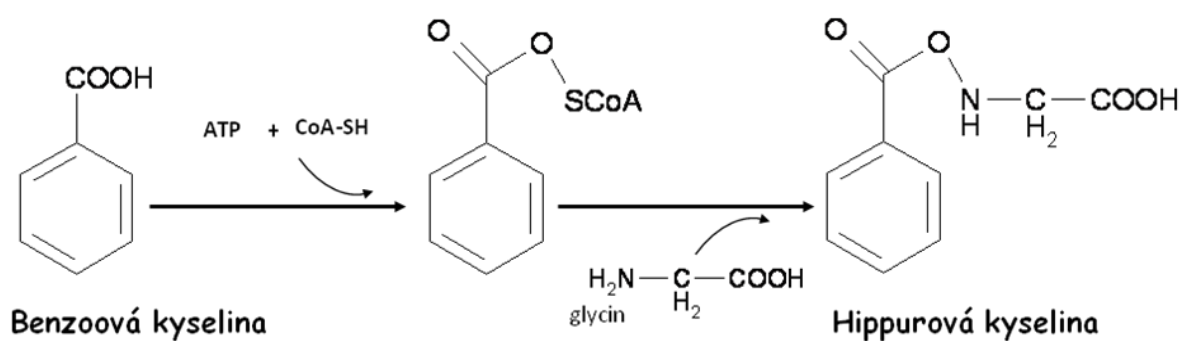


Nejdůležitější konjugační reakce shrnuje Tabulka č.4

KONJUGAČNÍ ČINIDLO	ENZYMY	SUBSTRÁTY
Uridindifosfoglukuronová kyselina (UDP-GA)	UGT; UDP-glukuronyltransferasy	Morfin, metadon, kyselina valproová
Fosfoadenosin-5'-fosfo sulfát (PAPS)	Sulfotransferasy (SULT)	Fenoly, katecholy
Acetylkoenzym A (AcCoA)	N-acetyltransferasy (NAcT)	Isoniazid, sulfanilamid
S-adenosylmethionin (SAME)	methyltransferasy	Katecholy, fenoly
Glutathion (GSH)	Glutathion-S-transferasy (GST)	Epoxidy, paracetamol
Glycin (Gly), Glutamin (Gln)	Gly(Gln)-N-acetyltransferasa	Kyselina benzoová

Tabulka č.4: Fáze II biotransformace

Někdy se hovoří i o tzv. fázi III. a fázi 0. biotransformaci, které odpovídají za transport xenobiotika do buňky (import, fáze 0.), a metabolitů z buňky (export, fáze III.). Transportery jsou důležité buněčné cíle mnoha terapií, včetně onkologických (MDR1) či psychiatrických (serotoninové transportery) apod.



Konjugace kyseliny benzoové s glycinem. Produktem je kyselina hippurová – slouží jako monitoring abusu toluenu.

CYTOCHROM P450

Nejdůležitějším enzymem fáze I. biotransformace xenobiotik je cytochrom P450. Strukturně se jedná o hemoprotein, kde je protoporfyrin III.-Fe³⁺ koordinován s SH- skupinou cysteinu

z apoproteinu. Lokalizován je ve vnější mitochondriální membráně a v membránách hladkého endoplazmatického retikula. Svůj název P450 získal díky atypické absorpci komplexu cyt P450-Fe²⁺-CO při 450 nm. Cytochrom P450 je dominantně jaterní enzym, nachází se však také v placentě, střevě, plicích a kůži. Cytochrom P450 (CYP) je celá nadrodina (superfamily) enzymů, která se dále dělí na rodiny, podrodiny a individuální enzymy (isoformy) na základě podobnosti v primární struktuře:



Kromě odlišností v primární struktuře se jednotlivé isoformy P450 liší i jinými kritérii:

- **Tkáňová specifita** – některé isoformy jsou lokalizovány tkáňově specificky. Např. CYP1A2 je jaterní isoforma, zatímco CYP1A1 je typická v extrahepatálních tkáních.
- **Reakční specifita** – jedna isoforma P450 může katalyzovat u různých substrátů různé typy reakcí, např. u substrátu č.1 oxidativní dehalogenaci a u substrátu č.2 aromatickou hydroxylaci.
- **Substrátová specifita** – jedna isoforma P450 katalyzuje metabolismus několika substrátů (v praxi mnoha substrátů); např. CYP3A4 metabolizuje 60% všech známých léčiv. Na metabolismu jednoho substrátu se může podílet několik isoform P450.

U člověka se na metabolismu cizorodých látek podílejí zejména následující cytochromy P450:

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

Z hlediska farmakoterapie je potřeba znát, jaké faktory či mechanismy ovlivňují aktivitu jednotlivých CYPů. Vliv mají faktory fyziologické (věk, pohlaví, těhotenství, výživa, polymorfismy) i patofyziologické (hypoxie, oxidační stres, zánět, infekce, diabetes, nádorová onemocnění, environmentální polutanty). Uplatňuje se rovněž řada regulačních mechanismů, zejména transkripčních, ale i dalších.

Polymorfismy P450 – jedná se o duplikace genů, nebo mutace v genech pro P450 (často hovoříme o tzv. SNP = single nukleotide polymorphism). Důsledkem je pak pozměněná exprese, nebo kvalita proteinu a tedy zvýšení nebo snížení aktivity CYP. Tento fenomén má závažné důsledky ve farmakoterapii, kdy hovoříme o pomalých nebo rychlých metabolizátorech. Je zřejmé, že je-li aktivní formou léčiva původní podaný lék, a je aplikován pomalému metabolizátorovi, je třeba dávku léku snížit oproti „normálnímu“ jedinci. Polymorfismus je jedním z důvodů zavádění individualizované farmakoterapie (na míru, *tailored*). Klinicky významné polymorfismy jsou:

CYP2D6 - nejdéle poznáný polymorfismus, který se někdy nazývá spartein-debrisoquinový. V bělošské populaci se vyskytuje asi 5% pomalých metabolizátorů.

CYP1A1 – mutace v 3'-nekódující oblasti a v exonu 7 vede ke zvýšené aktivitě indukovaného enzymu, což představuje zvýšené riziko vzniku rakoviny plic u japonské ale ne u bělošské populace.

CYP2C19 – mapuje se jako 4'-hydroxylace-S-mefenytinu. Mutace CYP2C19m1 (exon 5) vede k absenci proteinu. Mutace CYP2C19m2 (exon 4) – předčasný STOP kodon. Vyskytuje se u 3-5% bělošské populace a u 20% orientální populace.

CYP3A5 – polymorfismus je přítomen asi u 30% bělošské populace. Nemá klinický význam, protože substrátová specifita CYP3A5 je totožná s CYP3A4.

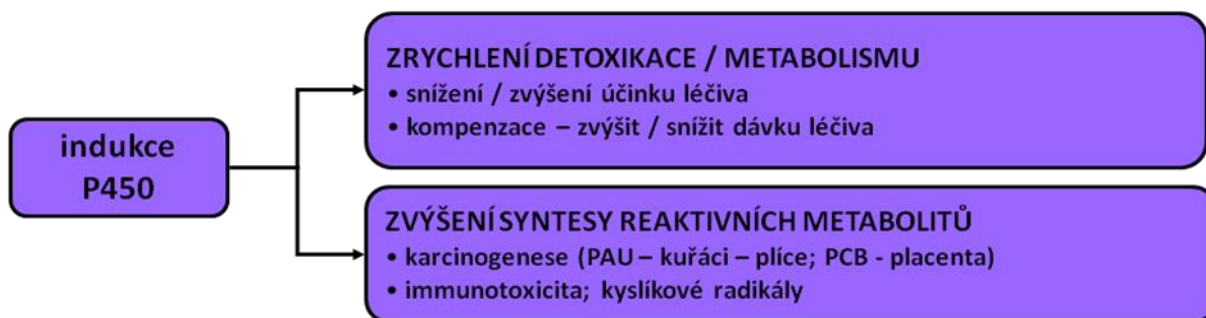
Důležité jsou rovněž polymorfismy enzymů fáze II. biotransformace (N-AcT, UGT).

Post-transkripční regulace – významné u CYP1A1, CYP1A2 a CYP2E1. Mechanismy nejsou ještě detailně pochopeny. Roli hraje stabilizace mRNA v přítomnosti induktoru, kdy u CYP1A1 a CYP1A2 se předpokládá zapojení AhR receptoru. Uvažuje se i o roli mikroRNA.

Post-translační regulace – situováno v Golgiho aparátu a endoplasmatickém retikulu.

Významné u CYP2E1, kde je zdrojem velké interindividuální variability v expresi proteinu. Enzym CYP2E1 metabolizuje alkohol a organická rozpouštědla, a je těmito substráty „indukován“. Po vazbě substrátu (ethanolu) do aktivního místa enzymu dochází k inhibici cAMP-dependentní fosforylace CYP2E1 na residuu Ser129, která spouští ztrátu hemu a degradaci enzymu. Nejedná se tedy o indukci, ale o post-translační stabilizaci. Je to jedním z důvodů zrychleného metabolismu alkoholu u pijáků.

Transkripční regulace – je významná u isoform CYP1A1/2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9, CYP2C19 a CYP3A4/5. Hovoříme o tzv. indukci genové exprese, kdy dochází ke zvýšení množství enzymu syntézou *de novo*. Induktory jsou strukturně odlišné sloučeniny, např. alkaloidy, léčiva, antibiotika, environmentální polutanty apod. Silné induktory jsou často pomalu metabolizovanými substráty daného CYP, tj. jedná se o pozitivní zpětnovazebnou regulaci. Cytochromy P450 jsou indukovány i endogenními sloučeninami jako jsou glukokortikoidy, retinoly, vitamín D apod. Indukce cytochromů P450 probíhá prostřednictvím aktivace tzv. xenoreceptorů, ale rovněž prostřednictvím jaderných a steroidních receptorů. Indukce P450 s sebou přináší dva aspekty: (i) změny ve farmakokinetice léčiva – zvýšení/snížení účinku léčiva, což je třeba kompenzovat změnou dávkování; (ii) metabolickou aktivaci – zvýšení syntézy reaktivních a karcinogenních metabolitů. Příklady si uvedeme na konci kapitoly.



XENORECEPTORY

Receptor pro polyaromatické uhlovodíky – synonyma aryluhlovodíkový receptor, **aryl hydrocarbon receptor (AhR)**, dioxinový receptor – byl první objevený xenoreceptor. Jedná se o ligandy-aktivovaný transkripční faktor z rodiny bHLH/PAS (basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Sim; Per = Period, Sim = single-minded). V neaktivní formě je AhR lokalizován převážně v cytoplazmě v komplexu s chaperonovými proteiny. Po vazbě ligandu translokuje AhR do jádra, kde tvoří heterodimer AhR-ARNT (ARNT = AhR Nuclear Translocator), který se váže do specifických promotorových oblastí a spouští expresi cílových genů. Vazebné DNA elementy pro AhR-ARNT se nazývají dioxin-responsive elements (DRE) nebo xenobiotic-responsive elements (XRE).



core sequence

5'-GCGTG-3'

consensus sequence

5'-T/GNGCGTG/CA/CA-3'

DRE = dioxin-responsive element

XRE = xenobiotic-responsive element

AHRE = AhR responsive element

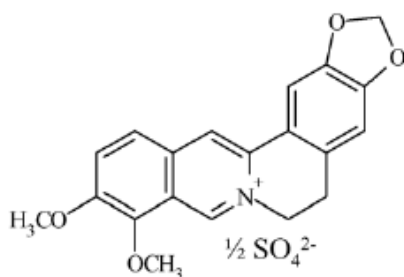
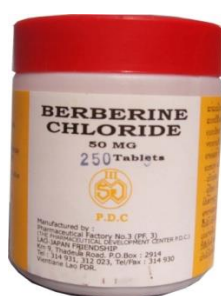
Obrázek č.25: Receptor pro polyaromatické uhlovodíky (AhR)

Xenoreceptor AhR je důležitým buněčným regulátorem, zapojeným do regulace enzymů metabolizujících xenobiotika, buněčném cyklu, imunitní odpovědi, vývoji, diferenciaci, apoptose, regulaci intermediárního metabolismu atd. Nedávno bylo zjištěno, že AhR má funkci jak ubiquitin-E3-ligasa. Cílové geny AhR jsou rozmanité, a zahrnují jak detoxikační geny (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT, GST, NADPH-red.), tak spoustu dalších (např. AhRR, Bax, Jun, TGFβ, p27, IL-1β).

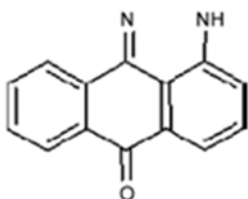
Ligandy AhR jsou rozmanité organické sloučeniny, jako environmentální polutanty (polyaromatické uhlovodíky, dioxiny, polychlorované bifenylly), léčiva (lansoprazol, omeprazol), přírodní látky (berberin, resveratrol, flavonoidy) a syntetické látky (SP600125). Endogenní ligandy AhR jsou bilirubin, biliverdin, indirubin, deriváty tryptofanu (UV-zářením generované), eikosanoidy (prostaglandin G, lipoxin A4).

V naší výzkumné práci jsme publikovali originální výsledky popisující účinek některých ligandů na AhR:

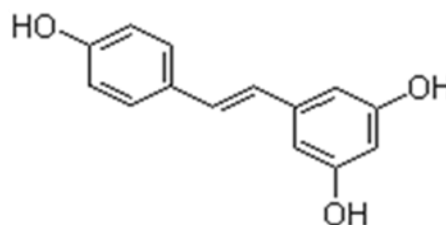
- Vrzal R., Zdarilova A., Ulrichova J., Blaha L., Giesy J.P., Dvorak Z. (2005)
Activation of Aryl Hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 cells and H4IIE cells:
Biphasic effect on CYP1A1. *Biochemical Pharmacology* **70(6)**:925-936.



- Dvorak Z., Vrzal R., Henklova P., Jancova P., Anzenbacherova E., Maurel P., Svecova L., Pavek P., Ehrmann J., Havlik R., Bednar P., Lemr K., Ulrichova J. (2008)
JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* **75(2)**:580-588



SP600125

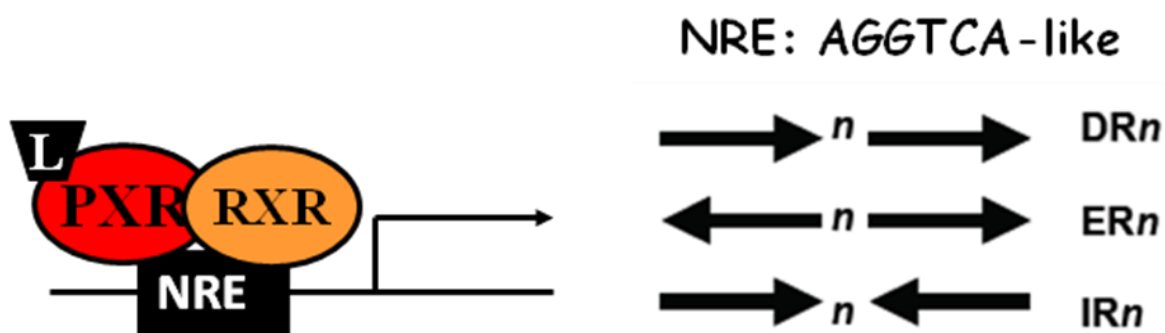


resveratrol

Důležitá je role AhR v extrahepatálních tkáních:

- střevo – aktivace složkami potravy – polyaromatické uhlovodíky z uzených a grilovaných potravin, flavonoidy, resveratrol apod. Indukce extrahepatálního enzymu CYP1A1 – tvorba reaktivních metabolitů – možný vliv na proces chemicky vyvolané karcinogeneze?
- placenta – úloha není přesně jasná, zdá se významná vzájemná funkční interakce se signální dráhou glukokortikoidního receptoru
- plíce – indukce enzymu CYP1A1 působením polyaromatických uhlovodíků obsažených v cigaretovém kouři – příspěvek k procesu karcinogeneze? Aktivace prokarcinogenů na ultimátní karcinogeny.
- kůže – působením UV-záření dochází k aktivaci MAP kinas a k tvorbě reaktivních metabolitů tryptofanu (ligandy AhR) a k synergistické aktivaci AhR a indukci CYP1A1. Podíl na vzniku rakoviny působením UV-záření.

Pregnanový X Receptor (PXR; NR1I2) – je jaderný receptor náležející do rodiny steroid-thyroid-retinoid receptorů. Objev PXR v 90. letech znamenal revoluci ve farmakologii a vývoji léčiv. PXR je aktivován strukturně odlišnými sloučeninami (většinou léčiv) a transkripčně řídí (indukuje expresi) enzymů fáze I. a II. biotransformace a lékových transporterů. Transkripčně aktivní forma PXR je heterodimer PXR-RXR, který se váže do vazebných míst s různými strukturními motivy (DR3, DR4, ER6, IR6) s core-sekvencí AGGTCA-like.

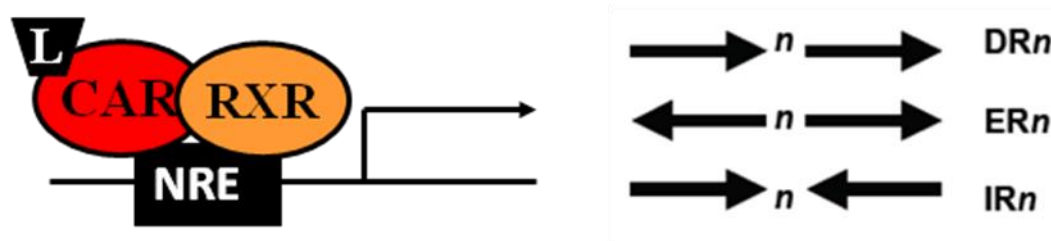


Obrázek č.26: Pregnanový X receptor (PXR)

PXR je někdy nazýván xenosenzor, neboť je klíčovým regulátorem enzymů metabolizujících léčiva. Má však i významnou úlohu v intermediárním metabolismu jako regulátor metabolismu lipidů sacharidů, cholesterolu, žlučových kyselin, vitamínu D apod. PXR je exprimován v játrech, GIT a v ledvinách. Ligandů PXR je známo několik set, většinou léčiv (rifampicin, glukokortikoidy, nifedipin, hyperforin, benzodiazepiny, benzimidazoly, azolová antimykotika apod.), ale i dalších přírodních (hypericin) a syntetických látek (ftaláty). V současné době je PXR považován za sirotčí receptor, ale kandidátními endogenními ligandy jsou žlučové kyseliny a vitamín E. Cílové geny PXR jsou zejména detoxikační enzymy CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A7, GST, ST, MDR1 apod. Z ostatních genů pak např. ALAS-1, ApoA1, HDLc apod.

V rámci naší výzkumné činnosti jsme studovali vliv několika skupin léčiv na aktivitu PXR. Jednalo se o azolová antimykotika clotrimazol, ketoconazol, econazol, oxiconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol), benzodiazepiny (Alprazolam, Bromazepam, Chlordiazepoxid, Clonazepam, Diazepam, Lorazepam, Medazepam, Midazolam, Nitrazepam, Oxazepam, Tetrazepam, Triazolam) a kyselinu valproovou (podrobnosti lze najít v citovaných vědeckých publikacích – viz níže).

Konstitutivní Androstanový Receptor (CAR, NR1I3) – byl objeven ve stejné době jako PXR a v mnohém jsou si tyto dva receptory podobné (sdílené koaktivátory, responsivní elementy, cílové geny apod.). Na rozdíl od PXR je CAR lokalizován v cytosolu, a po aktivaci podstupuje jadernou translokaci. Mechanismus aktivace CAR není ještě zcela známý, předpokládá se zapojení některých protein fosfatas. CAR není aktivován klasicky vazbou ligandu, a de facto ligandy CAR jsou velmi vzácné. Transkripčně aktivní forma CAR je heterodimer CAR-RXR.



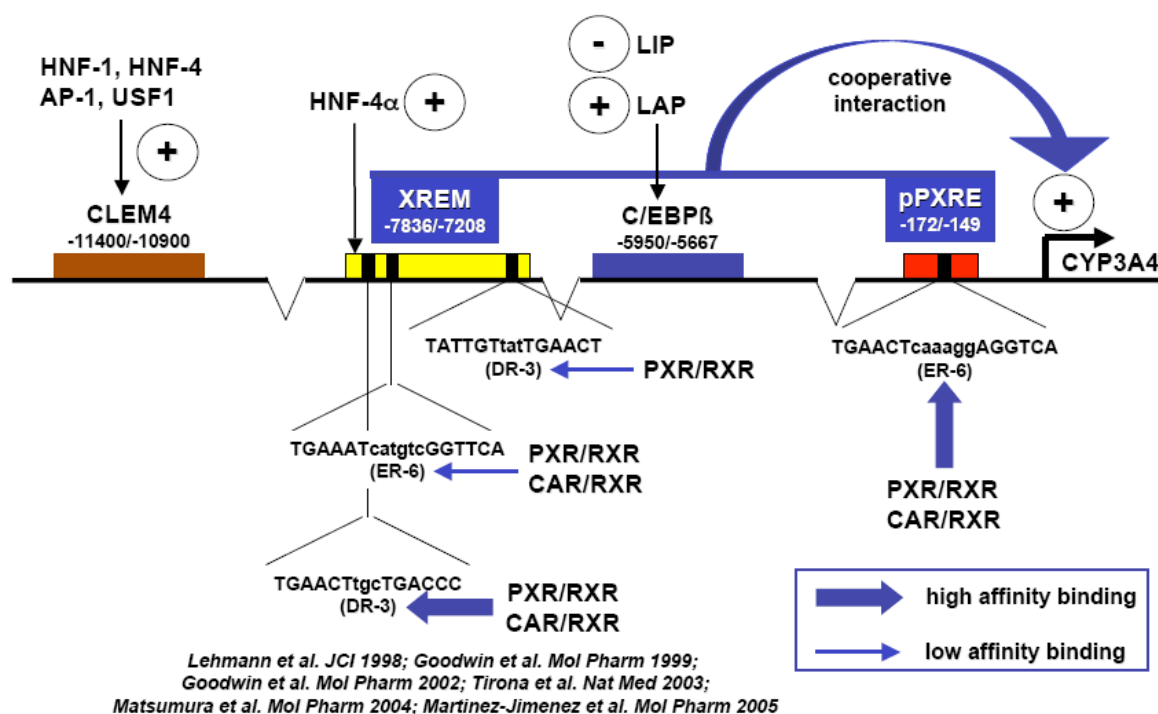
PBREM - Phenobarbital Responsive Enhancer Module
NRE: AGGTCA-like

Obrázek č.27: Konstitutivní androstanový receptor (CAR)

- Svecova L., Vrzal R., Burysek L., Anzenbacherova E., Cerveny L., Grim J., Trejtnar F., Kunes J., Pour M., Staud F., Anzenbacher P., Dvorak Z., Pavek P. (2008) Azole antimycotics differentially affect rifampicin-induced Pregnane X Receptor (PXR)-mediated *CYP3A4* gene expression. *Drug Metabolism and Disposition* **36(2)**:339-348.
- Červený L., Švecová L., Anzenbacherová E., Vrzal R., Štaud F., Dvořák Z., Ulrichová J., Anzenbacher P., Pávek P. (2007) Valproic acid induces *CYP3A4* and *MDR1* genes expression by activation of Constitutive androstane receptor and Pregnane X receptor pathways. *Drug Metabolism and Disposition* **35(7)**:1032-1041.
- Bachleda P., Vrzal R., Pivnicka J., Cvek B., Dvorak Z. (2009) Examination of Zolpidem effects on AhR and PXR dependent expression of drug-metabolizing cytochromes P450 in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicology Letters* **191(1)**:74-78
- Vrzal R., Kubesova K., Pavek P., Dvorak Z. (2010) Benzodiazepines medazepam and midazolam are activators of pregnane X receptor and weak inducers of *CYP3A4*: Investigation in primary cultures of human hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines. *Toxicology Letters* **193(2)**:183-188.

Obdobně jako PXR, i CAR je xenosenzorem, který reguluje expresi biotransformačních genů, ale hraje také úlohu v intermediárním metabolismu. Exogenní aktivátory CAR zahrnují mnoho léčiv, např. fenobarbital, fenytoin apod. Ligandy CAR jsou vzácné, dosud byl popsán ligand lidského CAR (CITCO = (6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime)), a myšího CAR (TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen). Inverzním agonistou myšího CAR je androstanol. CAR je považován za sirotčí receptor, kandidátní endogenní ligandy jsou žlučové kyseliny a farnesol.

Transkripční regulace cytochromů P450 je velmi komplexní, a zahrnuje jak xenoreceptory, tak steroidní a jaderné receptory. Obrázek 28 ukazuje schématicky organizaci promotoru cytochromu *CYP3A4*.

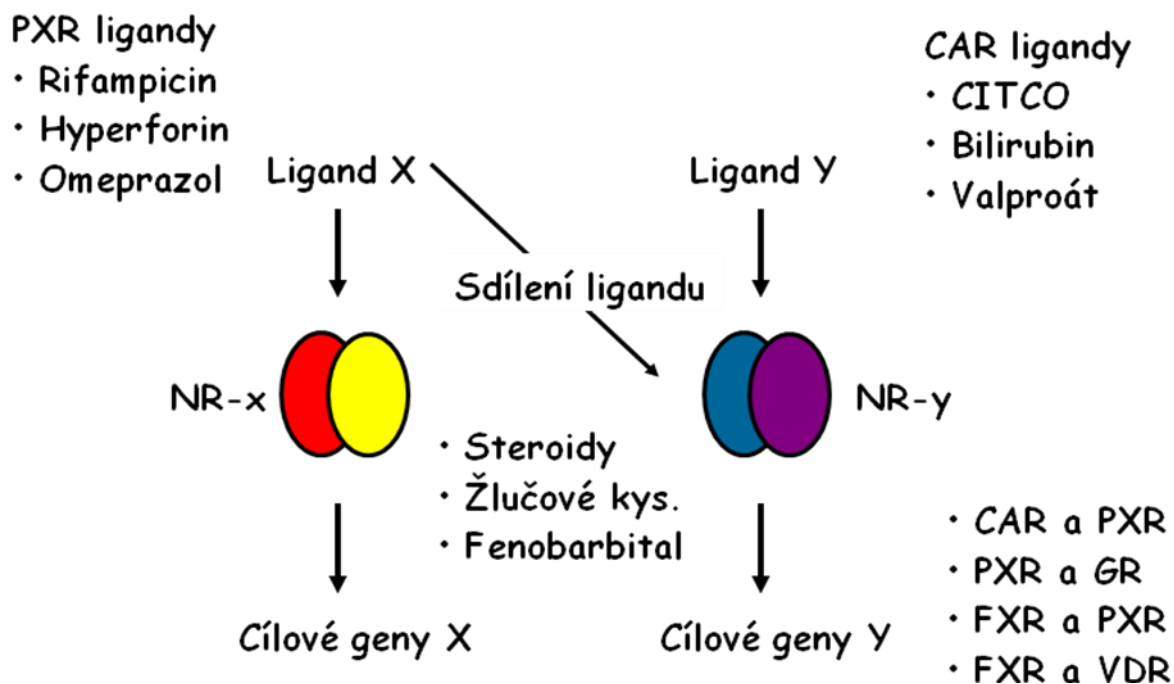


Obrázek č.28: Organizace promotoru lidského CYP3A4 (převzato se souhlasem Dr. Patricka Maurela z www.hepatologyinvitro.org)

V proximální promotorové oblasti CYP3A4 (-172/-149) se nachází tzv. *proximal PXR-responsive element* (pPXRE), který je aktivován vazbou PXR-RXR a CAR-RXR do motivu ER6. Heterodimery PXR-RXR a CAR-RXR se rovněž váží v distální promotorové oblasti (-7836/-7208) do tzv. *xenobiotic responsive enhancer module* (XREM), který obsahuje nejméně tři různá vazebná místa pro tyto heterodimery (motivy ER6, DR3). Co se týče regulace CYP3A4 jadernými receptory, VDR-RXR se váže do stejných vazebných motivů jako PXR-RXR a CAR-RXR, tj. pPXRE (ER6) a XREM (DR3, DR4). Nejnovější vědecké práce ukazují, že v distální oblasti CLEM (-11400/-10900), tzv. *constitutive liver enhancer module*, se nachází PXR vazebný element motivu ER6. V naší recentní práci jsme popsali, že do ER6 motivu v CLEM oblasti se váže i VDR-RXR. Exprese CYP3A4 je dále řízena celou řadou transkripčních faktorů (HNF4, HNF3, HNF1, AP1, C/EBPβ apod.) a jaderných receptorů FXR a LXR.

- Pavěk P., Pospechová K., Svecová L., Syrová Z., Stejskalová L., Blázková J., Dvůrak Z., Bláhos J. (2010) Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Biochemical Pharmacology* **79**(2):277-287

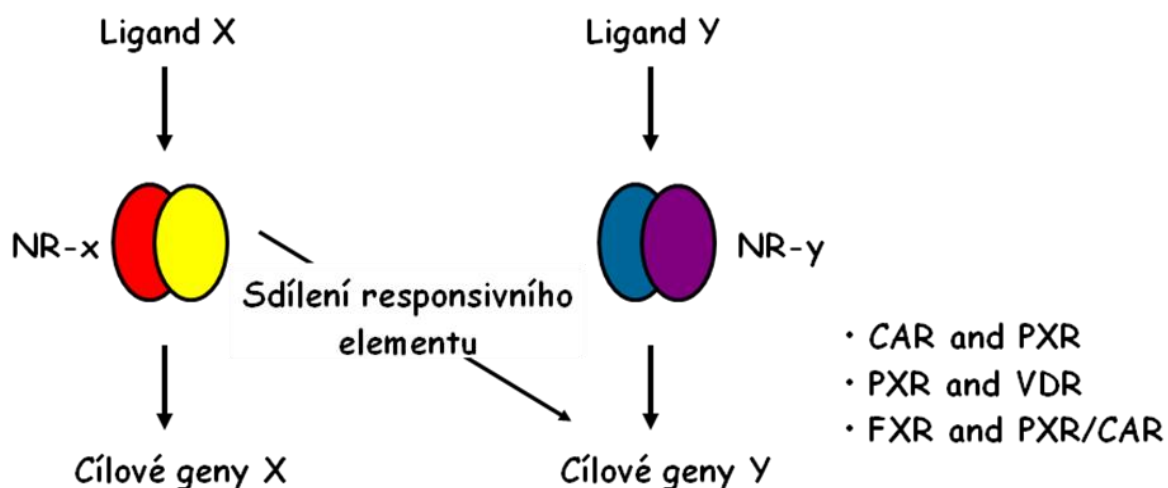
Je tedy zřejmé, že transkripční regulace cytochromů P450 není jednoduše definovatelná jako aktivace receptoru A vede k expresi genu B, ale jedná se o souhru mezi mnoha transkripčními faktory. Tuto mezikomunikaci v literatuře nazýváme někdy **cross-talks**, ve kterých se mohou uplatňovat následující mechanismy:



Obrázek č.29: Receptor cross-talks. Sdílení ligandu. (www.hepatologyinvitro.org)

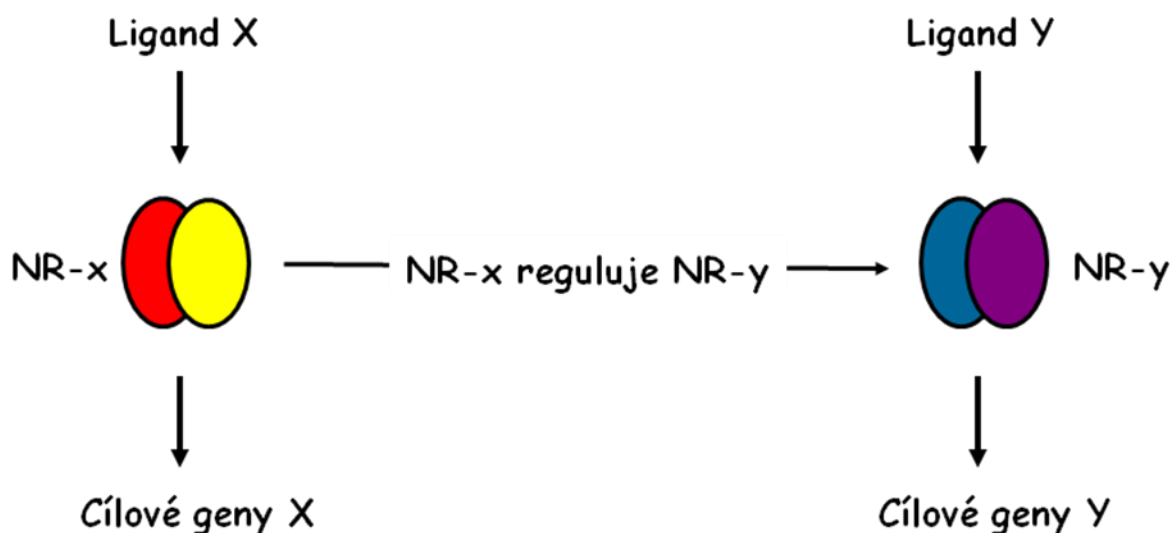
Sdílení ligandu – Ve většině případů je vazba ligandu na receptor specifická. Existují ovšem ligandy, které jsou schopny vazby na dva a více receptorů, tj. několik receptorů může sdílet jeden ligand. Příkladem je dvojice receptorů PXR a CAR, které mají jak své specifické ligandy, tak ligandy společné (resp. u CAR se může jednat o aktivátory). Toto sdílení ligandu se uplatní i v jiných kombinacích receptorů, zapojených do regulace P450 (viz Obrázek 29).

Sdílení responsivního elementu – Některé responsivní elementy v promotorových oblastech cytochromů P450 jsou schopny vázat více než jeden konkrétní xenoreceptor (resp. jaderný či steroidní receptor). Jedná se o jistou nespecifitu vazby do DNA. Např. u CYP3A4 se do responsivních elementů v oblastech pPXRE (ER6), XREM (DR3, DR4, ER6) a CLEM (ER6) váží PXR, CAR a VDR (Obrázek 30). Obdobně bylo popsáno, že do VDRE1 a VDRE2 v promotoru CYP24 se váže rovněž PXR a CAR.



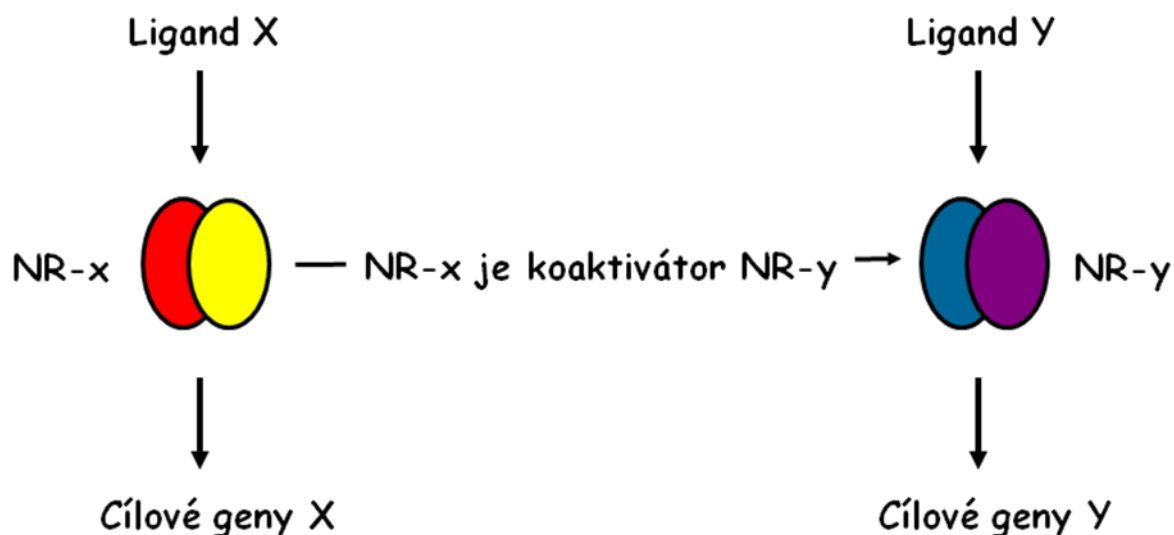
Obrázek č.30: Receptor cross-talks. Sdílení responsivního elementu. (převzato se souhlasem Dr. Patricka Maurela z www.hepatologyinvitro.org)

Regulace regulátoru – V buněčné signalizaci jsou časté případy, kdy transkripční faktor X reguluje expresi transkripčního faktoru Y. Existují tedy transkripčně regulační kaskády. U cytochromu P450 se uplatní několik kaskád, typická je transkripční regulace PXR, CAR a RXR, které jsou indukovány glukokortikoidy (GR), a následně regulují P450 (Obrázek 31).



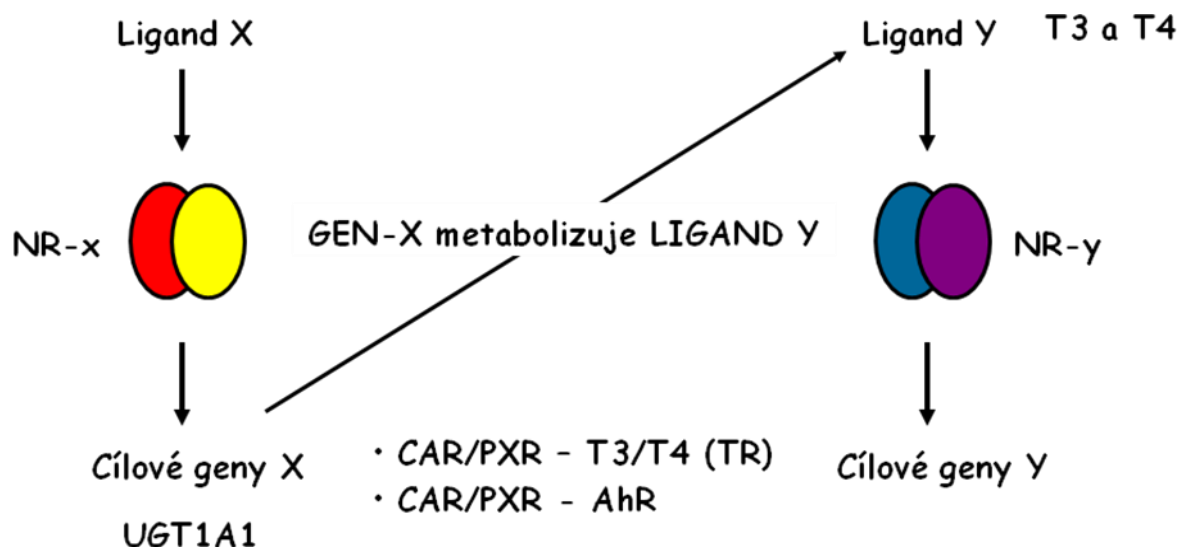
Obrázek č.31: Receptor cross-talks. Regulační kaskáda, regulace regulátoru. (převzato se souhlasem Dr. Patricka Maurela z www.hepatologyinvitro.org).

Sdílení koaktivátoru – Jedná se o situaci, kdy jeden transkripční faktor (xenoreceptor, receptor) je transkripčním koaktivátorem jiného transkripčního faktoru. Příkladem je AhR, který je koaktivátorem estrogenního receptoru, a *vice versa*, ER je koaktivátorem AhR.



Obrázek č.32: Receptor cross-talks. Sdílení koaktivátoru. (převzato se souhlasem Dr. Patricka Maurela z www.hepatologyinvitro.org).

Gen „X“ metabolizuje ligand „Y“ – Běžným zpětnovazebným mechanismem v biochemických reakcích je pozitivní či negativní zpětnovazebná regulace aktivity enzymu v kaskádě. Tento mechanismus se uplatňuje i u cytochromu P450. Příkladem je aktivace signálních drah PXR a CAR (receptor „X“) xenobiotiky (ligand „X“), což vede k up-regulaci některých enzymů fáze II. biotransformace, včetně UGT1A1 (gen „X“). Enzym UGT1A1 je zodpovědný za konjugaci a následnou inaktivaci thyroidního hormonu T3 a T4 (ligand „Y“). Následně je tedy snížena aktivace TR (receptor „Y“) a exprese cílových genů (gen „Y“). V souhrnu tedy ligand „X“ ovlivní koncentraci ligandu „Y“ a expresi genu „Y“. V tomto případě je cross-talk i klinicky významný.



Obrázek č.33: Receptor cross-talks. Gen „X“ metabolizuje ligand „Y“. (převzato se souhlasem

Dr. Patrick Maurela z www.hepatologyinvitro.org).

IV. NEUROTRANSMITERY

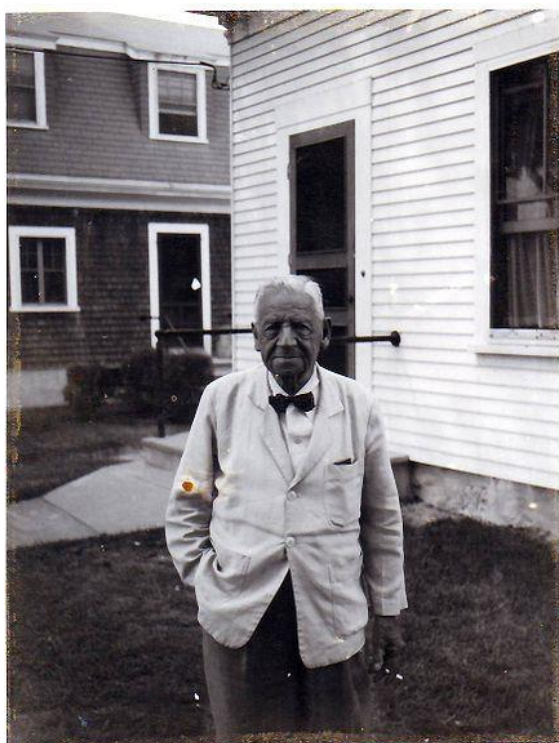
Tato kapitola je prezentována v rozsahu přednášeného učiva a není v žádném případě vyčerpávající. Definice základních pojmů:

Neurotransmise – základní proces přenosu vzruchu v synapsi centrálního a periferního nervového systému pomocí neurotransmiterů.

Neurotransmitter – chemický mediátor, který je uvolňován z pre-synaptického nervového zakončení. Vyvolá rychlou excitační nebo inhibiční odpověď post-synaptického neuronu.

Neuromodulátor – chemická látka uvolňovaná neurony, která vyvolá pomalou pre-synaptickou nebo post-synaptickou odpověď. Neuromodulátory modulují účinek neurotransmiterů.

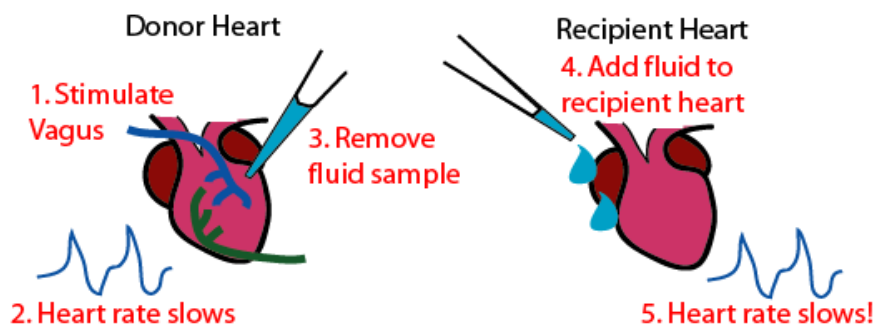
Historie objevu přenosu nervového signálu je velmi vzrušující a vykresluje atmosféru tehdejší doby. Na přelomu 19. a 20. století se přesně nevědělo, jakým způsobem je přenášen nervový signál. Byla ovšem učiněna četná pozorování, že elektrický proud ovlivňuje kontraktilitu svalů, včetně svalu srdečního.



Dr. Otto Loewi 1955

OTTO LOEWI (http://en.wikipedia.org/wiki/Otto_Loewi)

Otázkou přenosu nervového signálu se zabýval Otto Loewi, německý farmakolog, který od roku 1903 působil v Rakousku na univerzitách ve Štýrském Hradci a ve Vídni, a od roku 1905 získal rakouské občanství. V roce 1940 emigroval do USA, kde v roce 1946 získal americké občanství a roku 1961 zemřel. Dnes je Loewi považován za otce neurověd. Loewi se do dějin zapsal slavným experimentem s žabími srdci. Kladl si otázku (okolo roku 1903), proč po aplikaci elektrického proudu jeden ze srdečních nervů (*accelerator*) zrychluje srdeční frekvenci, zatímco jiný nerv (*vagus*) frekvenci snižuje, přestože elektrické impulsy byly identické. O 17 let později měl Loewi velmi zvláštní sen, ve kterém se mu zjevil způsob jak otestovat hypotézu. Probudil se a napsal několik poznámek, ale další den ráno nebyl schopen přechíst své čmáranice! Naštěstí se mu jeho sen opakoval následující noc a on okamžitě vstal (ve 3 hodiny ráno) a provedl experiment. Vyřízl dvě žabí srdce s intaktními nervy. Srdce zavěsil na mechanické zařízení, které zaznamenávalo tlukot srdcí. Pak elektricky stimuloval vagový nerv jednoho srdce (donora). Donorovo srdce se dle očekávání okamžitě zpomalilo. Následně byl odebrán pipetou vzorek z kapaliny obklopující donorovo srdce a byl kápnut na druhé srdce (recipient). Recipientovo srdce se zpomalilo i přesto, že nebyl elektricky stimulován vagový nerv. Látky uvolněné z donorova srdce postačovaly k zpomalení druhého srdce (Obrázek 34). Loewi navrhl, že dva druhy nervů uvolňují dvě různé chemické látky, a zakončení těchto nervů jsou těmito látkami stimulována. Látka z vagového nervu srdce zpomalovala, zatímco látka z acceleratorového nervu srdce zrychlovala. Loewi tyto látky pojmenoval „*vagusstoff*“ a „*acceleratorstoff*“; dnes již víme, že se jednalo o neurotransmitery acetylcholin a noradrenalin. Loewi tímto experimentem přinesl klíčový důkaz, že přenos signálu mezi nervy je zprostředkován chemickými sloučeninami, které jsou uvolňovány elektrickými impulsy a které jsou schopny vyvolat elektrické impulsy.



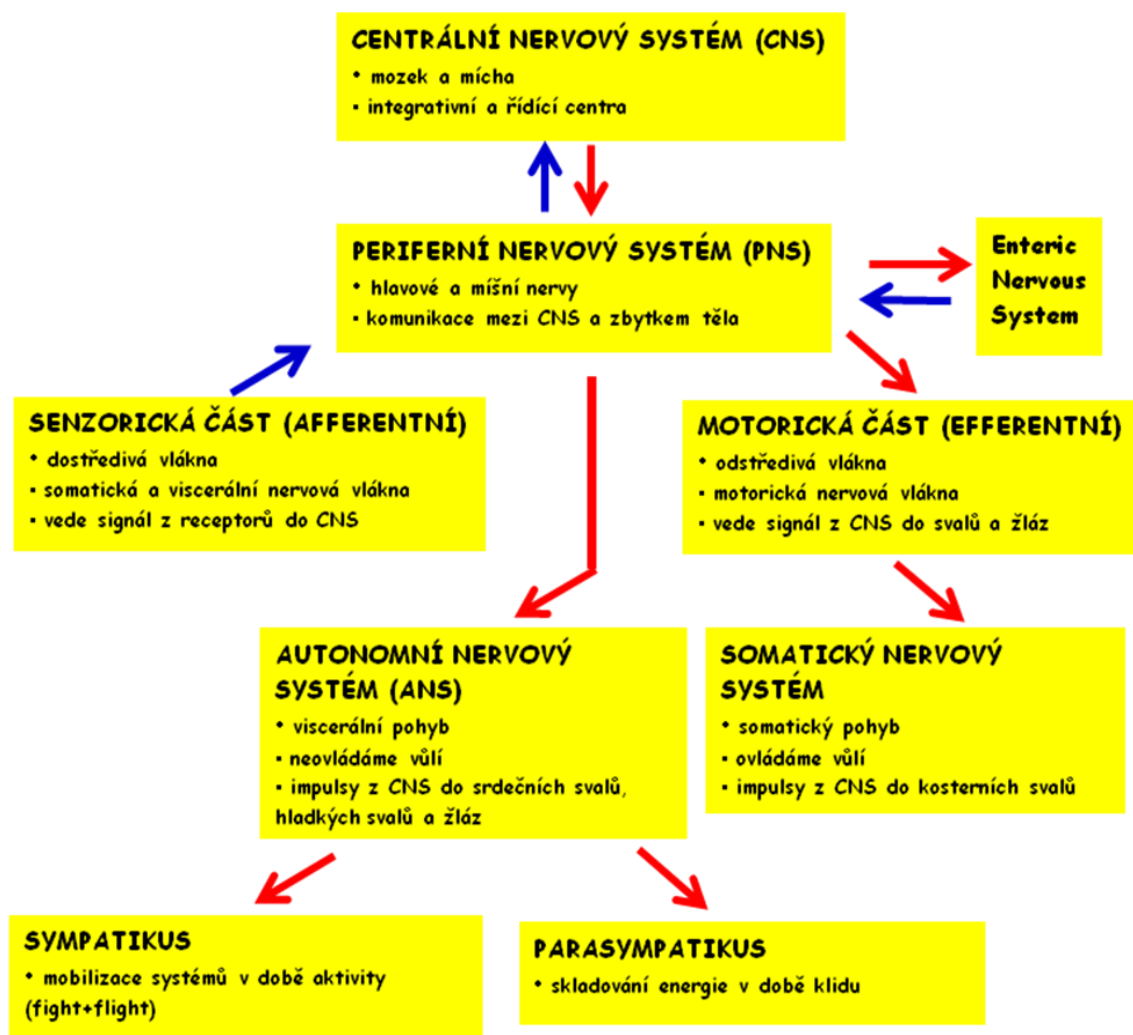
Obrázek č.34: Loewiho experiment s žabími srdci (http://en.wikipedia.org/wiki/Otto_Loewi).

Dnes již považujeme za běžné, že pro šíření nervového vzruchu jsou využity elektrické signály a chemické signální sloučeniny (neurotransmitery). Za objev „chemického přenosu nervových impulzů“ obdržel v roce 1936 Otto Loewi, společně s Angličanem Henry Hallet Dale, Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Neurotransmitterů je dnes známa celá řada. Z hlediska historického vývoje byla struktura a syntéza neurotransmitterů známa mnohem dříve než jejich funkce v nervovém systému. Objev funkce jednotlivých neurotransmitterů byl často spojen s oceněním Nobelovou cenou:

ACETYLCHOLIN
NORADRENALIN
DOPAMIN
GABA
GLUTAMÁT

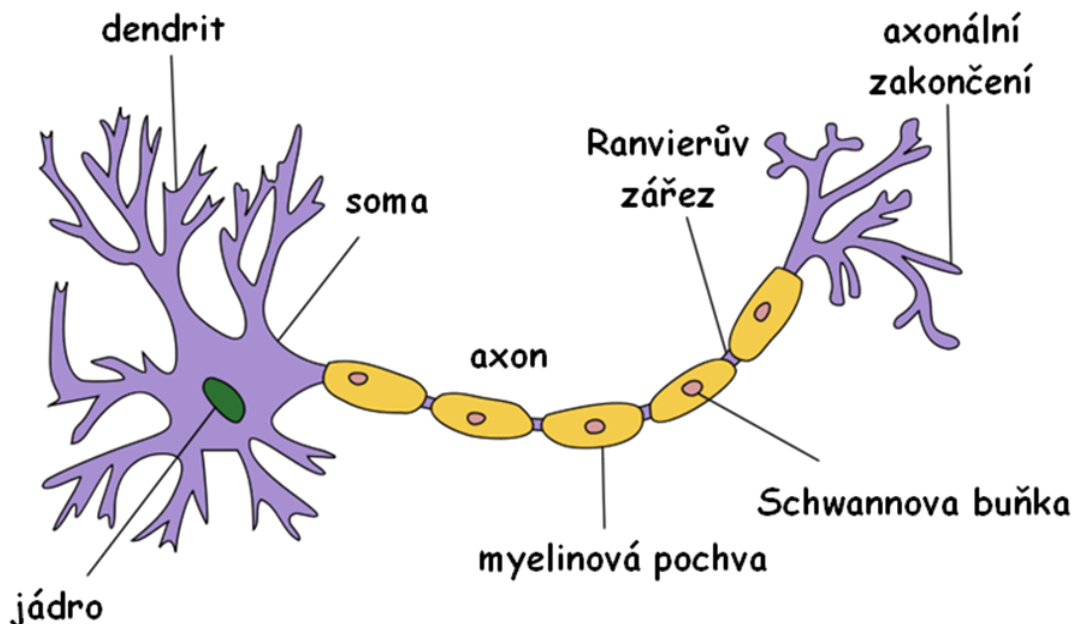
OTTO LOEWI - 1921
ULF VON EULER - 1946
ARVID CARLSSON – 1958
EUGENE ROBERTS – 1950
PETER USHERWOOD – 1994

Nobelova cena 1936
Nobelova cena 1970
Nobelova cena 2000



Obrázek č.35: Nervový systém člověka

Základní strukturní a funkční jednotkou nervového systému je **neuron**. Tato teze se nazývá **Neuronová doktrína**, a byla postulována 1880 (Santiago Ramón y Cajal). Struktura neuronu je znázorněna na Obrázku 36.



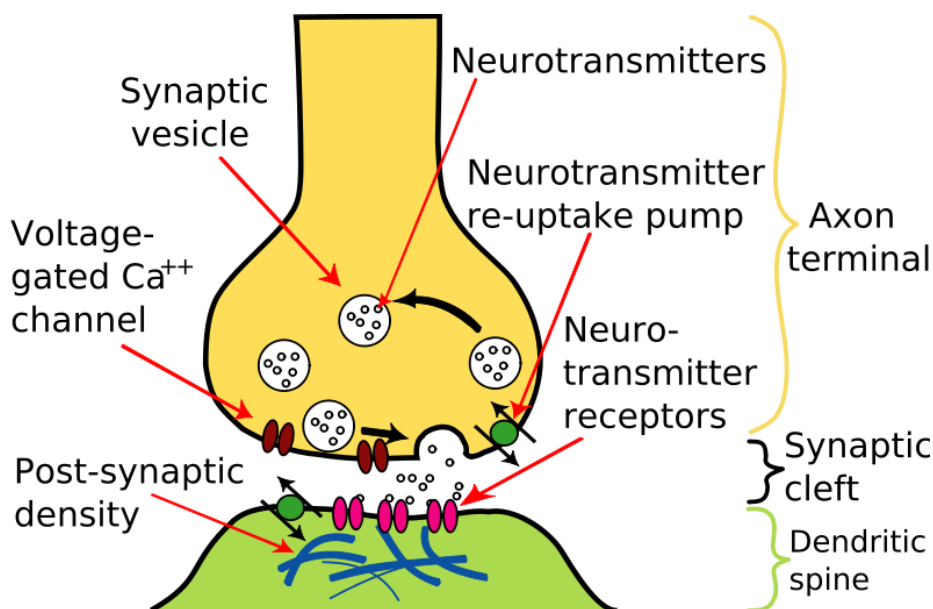
Obrázek č.36: Neuron. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Neuron>)

Neurony jsou vzájemně propojeny do drah pomocí tzv. **synapsí**. Jedná se o komplikované prostorové a funkční vztahy, kdy různé části nervového systému jsou uspořádány v různých kombinacích, a v určitých oblastech mozku vykazují i tzv. **plasticitu** – schopnost přestavby sítě. Prostou kombinatorikou lze vyvodit, že existují následující typy synaptických spojení mezi neurony:

- Axoaxonová
- Dendrodendritová
- Dendrosomatická
- Axosomatická
- Axodendritová

Kromě neuronů se na stavbě nervového systému podílejí i další typy buněk, které mají podpůrnou funkci a další fyziologické funkce. Sumární název pro tyto typy nervových buněk jiných než neurony je **glia**. V CNS mezi glia patří astroglie (astrocyty), mikroglie a oligodendroglie (oligodendrocyty); v PNS pak Schwannovy buňky.

Synapse (přesněji chemická synapse – viz Obrázek 37) je malá mezera mezi dvěma neurony (cca 20 nm). Je tvořena **pre-synaptickým neuronem**, který vysílá signál (neurotransmitter), a **post-synaptickým neuronem**, který signál přijímá (obsahuje receptory, které váží neurotransmitter).



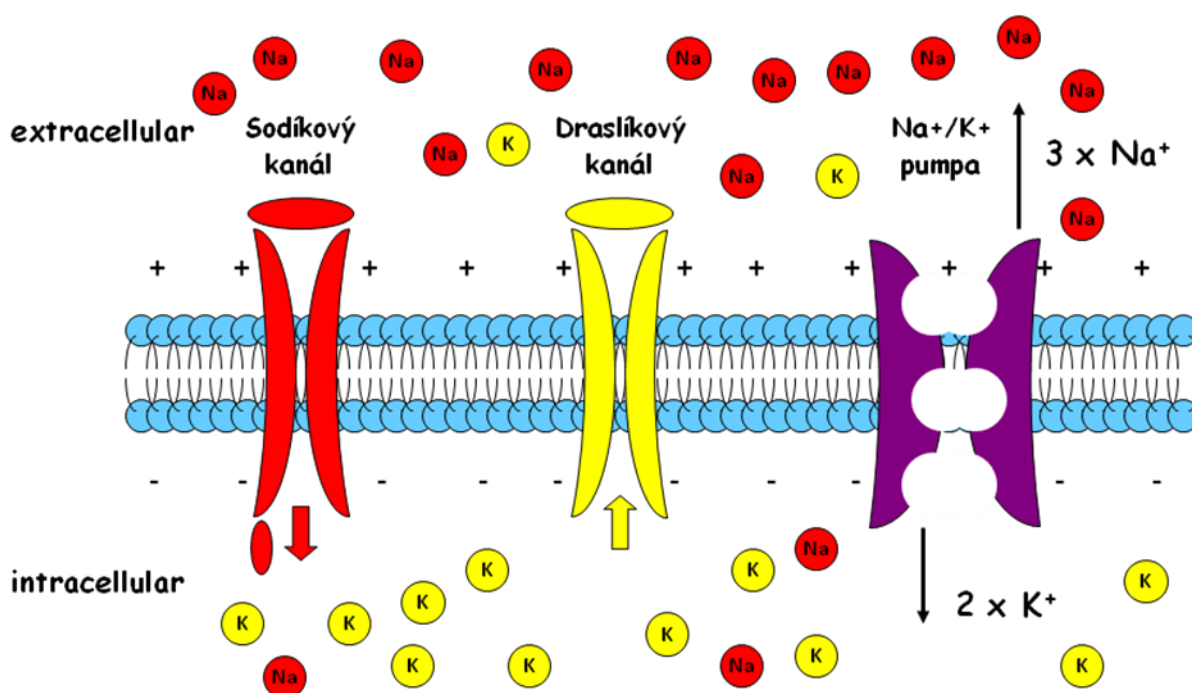
Obrázek č.37: Chemická synapse. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Synapse>)

AKČNÍ POTENCIÁL

Přenos nervového signálu je zajištěn pomocí kombinace elektrických a chemických signálů. Podél neuronu se šíří elektrický signál, který v nervovém zakončení vyvolá uvolnění chemického signálu (neurotransmiteru). Neurotransmitter vyvolá v post-synaptickém neuronu vznik elektrického signálu, který se dále šíří podél neuronu, a proces se takto opakuje. Klíčovou roli v tomto procesu hrají sodné, draselné a vápenaté ionty a příslušné iontové kanály a Na^+/K^+ pumpa. Vznik a šíření sodného akčního potenciálu lze vysvětlit následovně:

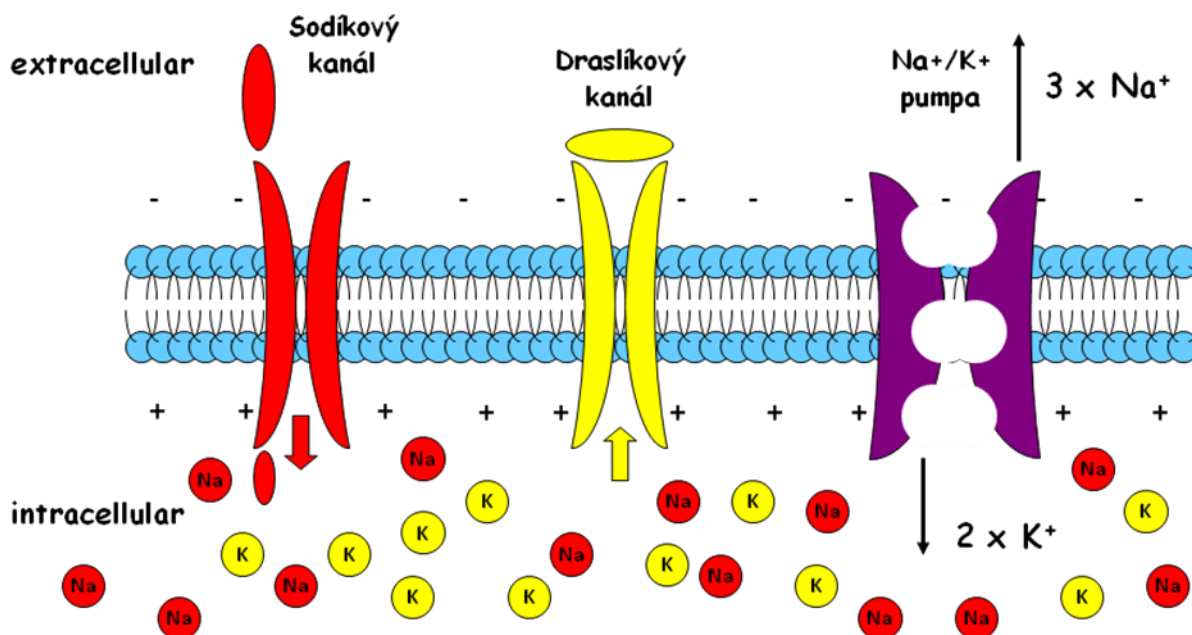
Klidový potenciál – V klidovém stavu je aktivní Na^+/K^+ pumpa, která transportuje 3 sodné ionty vně buňky a současně 2 draselné ionty dovnitř buňky. Sodíkový i draslíkový kanál jsou uzavřené. Ustaví se tedy koncentrační rovnováha v intracelulární a extracelulární koncentraci Na^+ a K^+ iontů, s převahou Na^+ vně buňky a K^+ uvnitř buňky. Za této situace je převaha kladného náboje vně buňky a ustaví se tzv. klidový potenciál (-70 mV). Situaci znázorňuje Obrázek 38.

Depolarizace – prvním krokem ve vzniku akčního potenciálu je depolarizace, ke které dojde tím, že se intracelulární prostor stane pozitivně nabitým. Dochází k otevření sodíkového kanálu (buď napětím – při šíření akčního potenciálu, nebo po vazbě neurotransmiteru na ionotropní receptor), a sodné ionty, kterých je nadbytek v extracelulárním prostoru proniknou do intracelulárního prostoru, aby se vyrovnal koncentrační spád. Draslíkový kanál zůstává uzavřený. Přesunem Na^+ iontů dochází ke změně polaritu membrány (+30 mV), tj. k depolarizaci a výsledkem je kladný náboj uvnitř buňky. Tento děj se odehraje v diskrétní oblasti buněčné membrány.

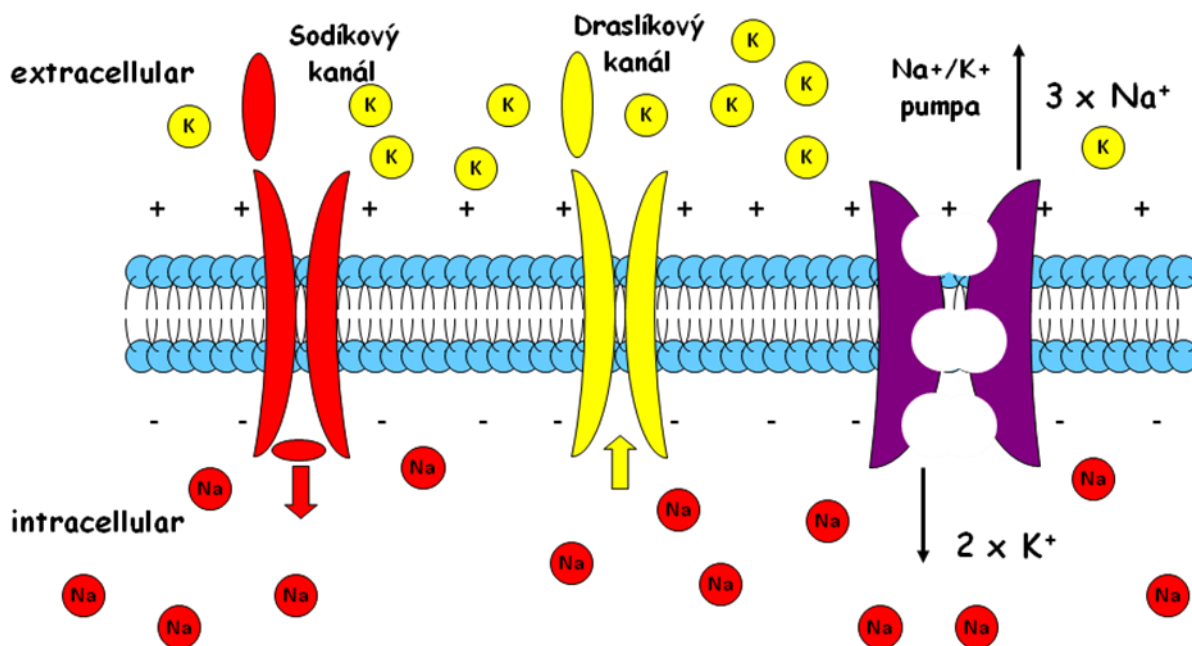


Obrázek č.38: Klidový potenciál.

Repolarizace – po influxu sodných iontů a po změně polaritu membrány dojde k uzavření sodíkového kanálu a k otevření kanálu draslíkového. Ionty K^+ putují do extracelulárního prostoru po koncentračním spádu. Opět se mění polarita membrány, dochází k tzv. depolarizaci (-75 mV). Opět se takto děje v diskrétní oblasti buněčné membrány.

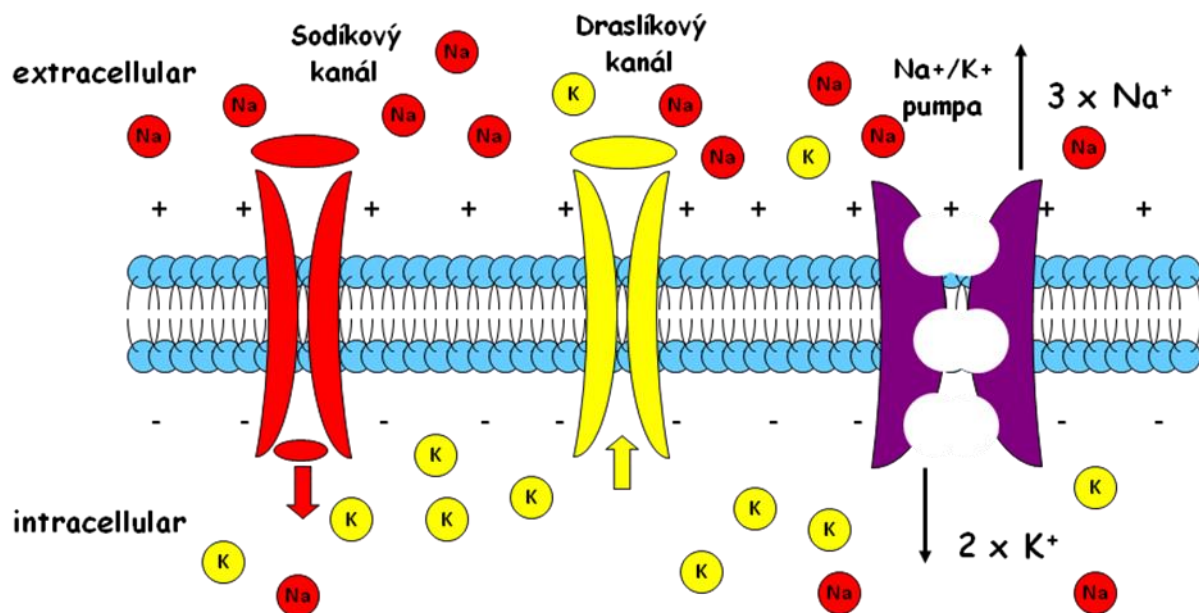


Obrázek č.39: Depolarizace.



Obrázek č.40: Repolarizace.

Znovuustavení klidového potenciálu - Potenciál je po depolarizaci o něco nižší než klidový potenciál a distribuce Na^+ a K^+ iontů je opačná než v klidovém stavu. Dochází k uzavření draslíkového kanálu a Na^+/K^+ pumpa za spotřeby ATP znovuustaví rovnováhu Na^+ a K^+ iontů a dojde ke znovuuštění klidového potenciálu.

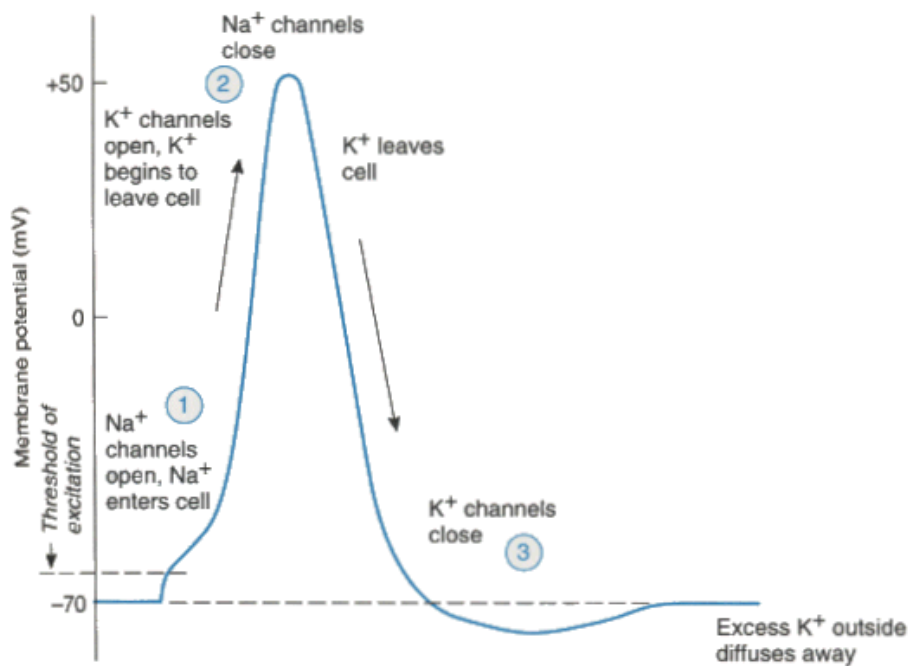


Obrázek č.41: Znovuustavení klidového potenciálu.

Na internetu lze nalézt mnoho animací vzniku a šíření akčního potenciálu, např.:

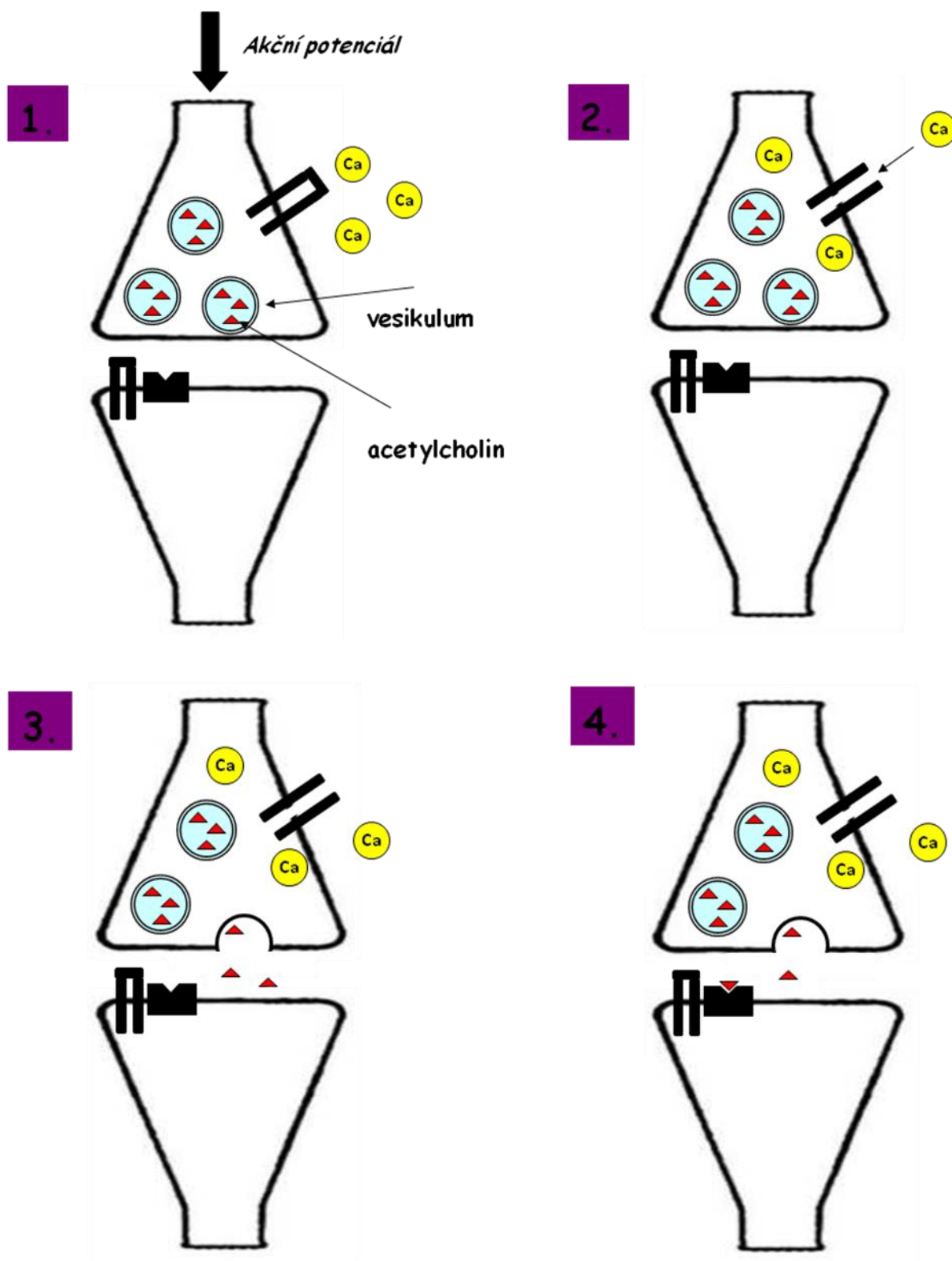
<http://www.youtube.com/watch?v=SCasruJT-DU>

<http://outreach.mcb.harvard.edu/animations/actionpotential.swf>

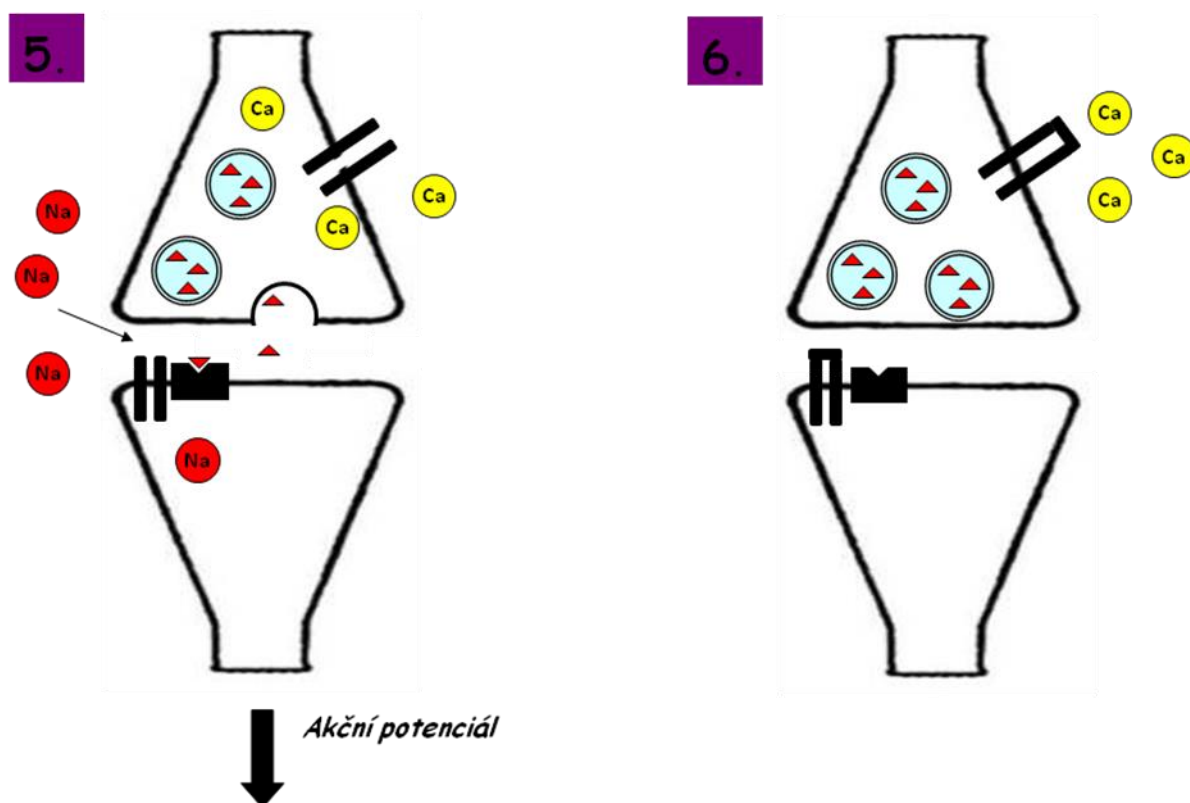


Obrázek č.42: Průběh akčního potenciálu (<http://www.mindcreators.com/NeuronBasics.htm>)

Přenos nervového vzruchu tedy využívá jak chemických, tak elektrických signálů. Ukažme si na příkladu **cholinergní synapse**, jak tento přenos je realizován:



Obrázek č.43: Přenos signálu v cholinergní synapsi.

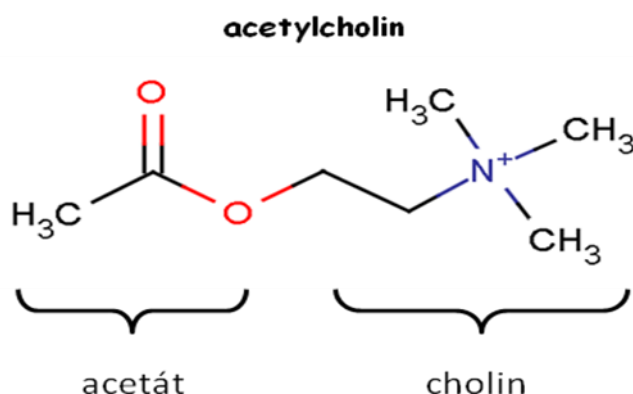


Obrázek č.43: Přenos signálu v cholinergní synapsi

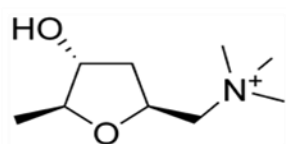
Akční potenciál dorazí do nervového zakončení (axonu, dendritu) pre-synaptického neuronu (Obrázek 43.1.). Jakmile akční potenciál doputuje k napěťově řízenému vápníkovému kanálu, dochází k otevření kanálu a k influxu vápenatých iontů do uzlu pre-synaptického neuronu (Obrázek 43.2.). Zvýšená koncentrace vápenatých iontů v cytosolu vyvolá fúzi synaptických vesikul obsahujících acetylcholin s pre-synaptickou membránou a následné uvolnění acetylcholinu do synaptické štěrbině (Obrázek 43.3.). Acetylcholin difunduje v synaptické štěrbině a váže se na acetylcholinové receptory na vnější membráně post-synaptického neuronu (Obrázek 43.4.). Acetylcholinový receptor je ionotropní receptor, který ovládá Na^+ kanál. Po vazbě acetylcholinu se otevře Na^+ kanál a dojde k influxu sodných iontů do post-synaptického neuronu. To má za následek depolarizaci membrány post-synaptického neuronu. Důsledkem depolarizace je vznik akčního potenciálu a další šíření nervového vzruchu – tj. buněčná odpověď v CNC a PNS (Obrázek 43.5.). Acetylcholin je v synaptické štěrbině degradován acetylcholinesterasou, a štěpné produkty jsou transportovány zpět do pre-synaptického neuronu, kde je acetylcholin re-syntetizován a opět uskladněn ve vesikulách k dalšímu použití (Obrázek 43.6.).

CHOLINERGNI SYSTÉM

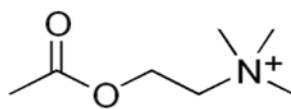
Neurotransmitterem v tomto systému je acetylcholin. Vyskytuje se v CNS i PNS. V PNS zprostředkovává neurosvalová spojení mezi neurony a všemi typy svalů (srdeční, hladné, kosterní). Acetylcholin je zodpovědný za kontrakci svalů. Cholinergní systém se nazývá parasymptikus. Abnormality v cholinergní transmisi se podílejí na neurodegenerativních onemocněních, např. demence, Parkinsonova choroba apod.



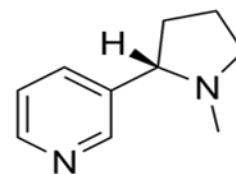
Na molekulární úrovni působí acetylcholin prostřednictvím vazby na **acetylcholinové receptory** (AChR). Na základě afinity různých agonistů a antagonistů rozlišujeme dva základní typy AChR – **nikotinové (nAChR)** a **muskarinové (mAChR)**. Nikotinové AChR dělíme na neuronální a muskulární; u muskarinových AChR rozlišujeme subtypy M1, M2, M3, M4 a M5. Receptory nAChR mají přednostní afinitu k nikotinu a jedná se o ionotropní receptory, které řídí sodíkový kanál. Receptory mAChR váží přednostně muskarin a jedná se o metabotropní receptory (spojené s G-proteiny), které aktivují syntézu druhých posílů (adenylátcyklasa, fosfolipasa C) a řídí draslíkový kanál.



muskarin



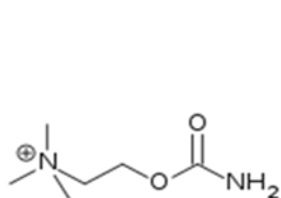
acetylcholin



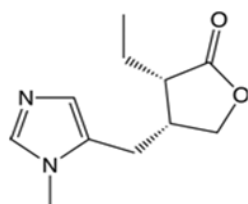
nikotin

Parasympatomimetika – jsou látky, které imitují stimulaci parasymptiku. Tyto látky vyvolávají bradykardii, hypotenzi, bronchokonstrikci, zvracení, pocení, průjem. Parasympatomimetika mají léčebné aplikace při pooperační atonii močového měchýře a

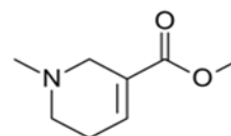
střev, při glaukomu apod. Antidotem je atropin. **Přímá parasymptomimetika** jsou agonisté mAChR. Příkladem je karbachol, pilokarpin či arekolin (obsažen v betelovém ořechu, *Areca Catechu*). **Nepřímá parasymptomimetika** jsou inhibitory acetylcholinesterasy. Inhibice může být buď reversibilní (fyzostigmin, neostigmin, takrin) nebo ireversibilní (insekticidy, nervové jedy – sarin, soman). Zajímavý příběh se váže k fyzostigminu – tato látka je obsažena v semenech kalabarového bobu (*Physostigma venenosum*), kterým se říkalo boby Božího soudu. V západoafrických kulturách se boby používaly k důkazu viny či nevinu – kdo konzumaci přežil, byl nevinen. V praxi se to odehrávalo tak, že kdo „měl štěstí“ tak ihned po požití preparátu začal zvracet a tím si zachránil život = byl nevinen. U koho nebylo zvracení vyvoláno, nakonec zemřel = byl vinen. Ještě pragmatičtější vysvětlení je, že záleželo na stáří preparátu a aktivitě obsahových složek.



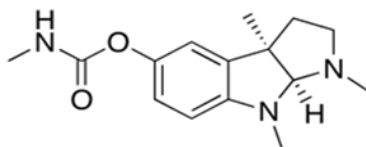
karbachol



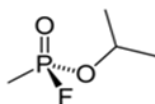
pilokarpin



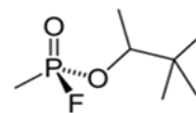
arekolin



fysostigmin



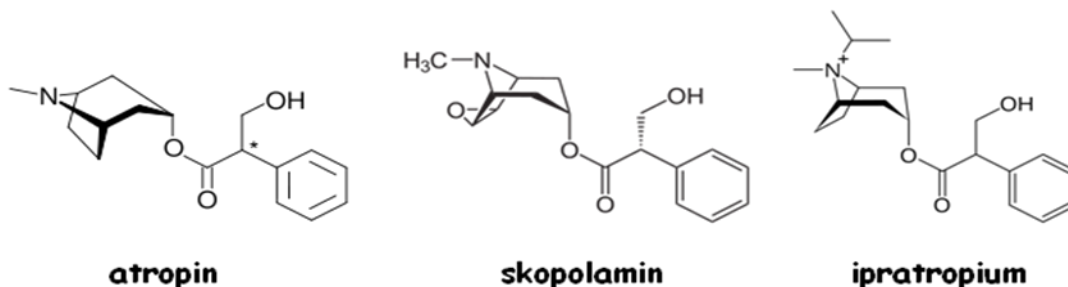
sarin



soman

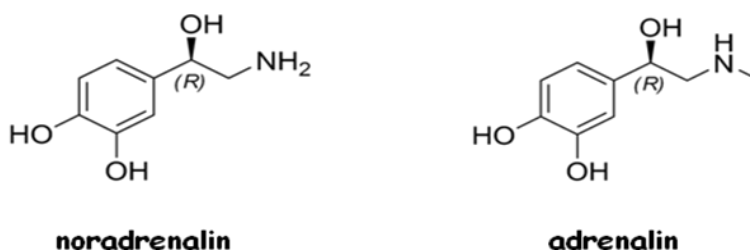
Parasympatolytika – jsou specifická antagonisté muskarinových AChR. Působí útlum sekrece potních a slinných žláz, útlum sekrece hlenu v nose, hltanu, průduškách, a potlačují sekreci slz. Vyvolávají mydriasu (rozšíření zornic), snižují vliv vagu na srdce, snižují tonus střev a močového měchýře, mají broncholytický účinek. Asi nejznámějším parasympatolytikem je **atropin**, tropanový alkaloid nacházející se v durmanu obecném, blínu černém či rulíku zlomocném. Atropin blokuje neselektivně všechny typy mAChR, vyvolává všeobecný parasympatolytický účinek a neumožňuje cílené ovlivnění jednoho orgánu. Příbuzným alkaloidem je skopolamin, který má stejné účinky jako atropin v PNS, ale tlumivý účinek

v CNS – proto se využívá v profylaxi kinetos. Ipratropium je anticholinergní preparát, který se využívá v inhalační formě v terapii bronchitidy.



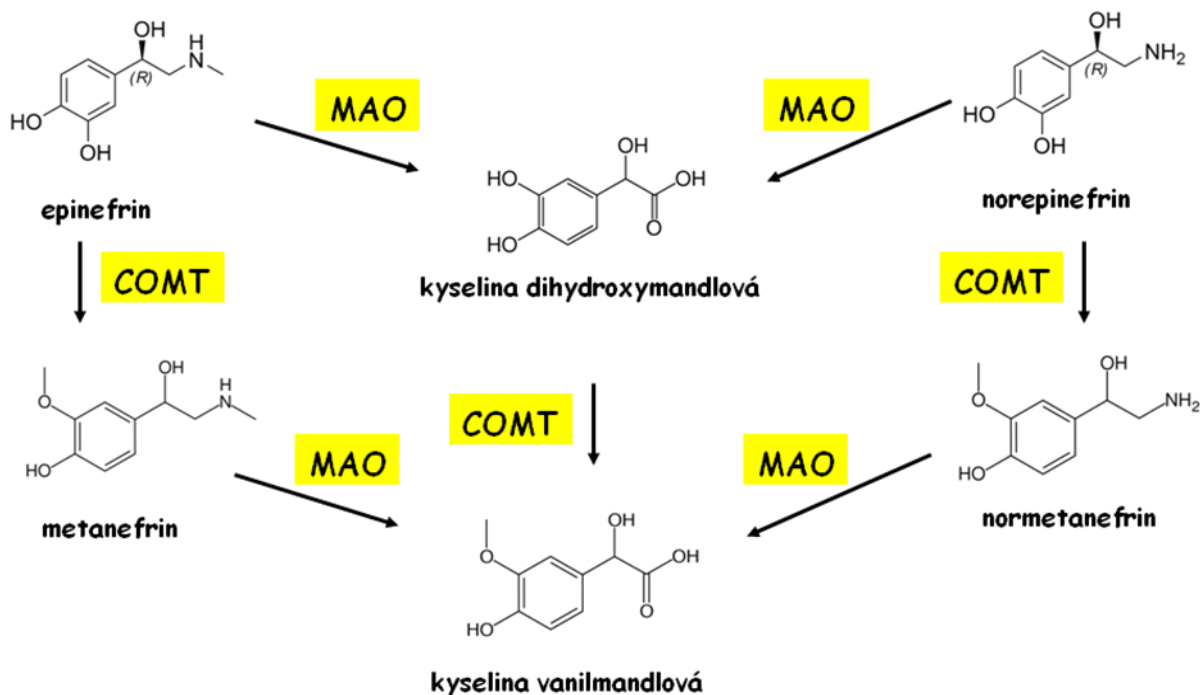
ADRENERGNÍ SYSTÉM

Hlavními molekulami adrenergního systému (neboli sympatiku) jsou **adrenalin** (syn. epinefrin) a **noradrenalin** (syn. norepinefrin). Předpona „nor-“, značí strukturní vlastnost, z německého „*Nitrogen Ohne Radikal*“. Adrenalin i noradrenalin se strukturně řadí mezi katecholaminy, avšak mají několik odlišností. Adrenalin je hormon, který je syntetizován a sekretován dřením nadledvinek. K jeho uvolnění dochází depolarizací vyvolanou acetylcholinem. Noradrenalin je neurotransmitter, který je uložen ve varikozitách sympatických nervových vláken. K jeho uvolnění dochází akčním potenciálem a toto uvolnění blokují pre-synaptické α_2 -receptory.



Z hlediska buněčných funkcí a farmakoterapie (cíle léčiv) je důležitá inaktivace účinku katecholaminů. Po uvolnění katecholaminů do synaptické štěrbiny dochází k jejich zpětnému vychytávání pre-synaptickým neuronem pomocí specifických transporterů. Degradace katecholaminů probíhá dvěma cestami. Methyloací aromatické hydroxylové skupiny –

katalyzují Catechol-O-Methyl-Transferases (COMT) a nebo oxidací aminoskupiny – katalyzují MonoAminoOxidasy (MAO) – viz Obrázek 44.

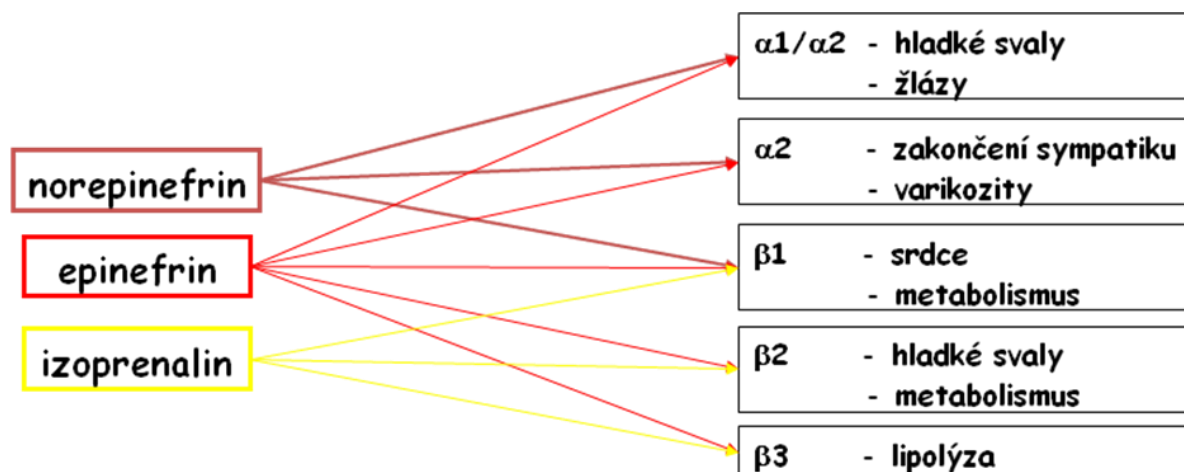


Obrázek č.44: Degradace katecholaminů

Adrenalin i noradrenalin působí na buněčné úrovni prostřednictvím α - a β -adrenoreceptorů (adrenergických receptorů). Jedná se o metabotropní receptory spřažené s G-proteiny. Aktivace jednotlivých podtypů adrenergických receptorů vede k různé biologické odpovědi.

$\alpha 1$ a $\alpha 2$	stimulace hladkého svalstva (vazokonstrikce)
$\alpha 2$	inhibice uvolnění norepinefrinu, centrální účinky
$\beta 1$	stimulace srdce
$\beta 2$	relaxace hladkého svalstva (bronchů, uteru), katabolismus

Lokalizaci, funkci a specifitu jednotlivých adrenoreceptorů vůči adrenalinu, noradrenalinu a syntetické látce isoprenalinu ukazuje obrázek 45:



Obrázek č.45: Účinek katecholaminů na adrenergní receptory

Ligandy (agonisté, antagonisté) adrenergních receptorů jsou klinicky využívaná léčiva. Na obrázku 46 je znázorněna specifita vybraných léčiv působících na adrenergní receptory vůči jednotlivým izoformám. Všechny adrenergní receptory využívají druhé posly, pro $\alpha 2$, $\beta 1$ a $\beta 2$ se jedná o cAMP; v případě $\alpha 1$ o IP₃ a DAG.

Biologický účinek noradrenalinu a adrenalinu se liší. Noradrenalin se nachází ve vysokých koncentracích v CNS, kde působí jako neurotransmitter (zejména hypotalamus, vegetativní centra mozkového kmene). Má lokálně ohraničenou účinnost a vyvolává okamžité změny orgánových funkcí. Z fyziologických projevů lze uvést kontrakci *m. dilatator pupillae* (mydriasa – při snížení intenzity světla), zvýšení tepové frekvence jako kompenzace na pokles tlaku vazodilatací, či vazokonstrikce kožních cév, pro snížení telených ztrát při nízké teplotě okolí. Adrenalin je humorální přenašeč, distribuovaný krví – má tedy na rozdíl od noradrenalinu systémové účinky. Zprostředkovává zvýšení bdělosti a výkonnosti organismu (tzv. signál fight-fright-flight) – při ohrožení, strachu, fyzické námaze. Zvyšuje krevní tlak, dilatuje bronchy, bystří vědomí, účinkuje na CNS - vyvolává motorický neklid a tremor. Není známo, zda prostupuje hematoencefalickou bariérou. Naopak působí útlum nedůležitých činností (např. trávení), aby tělo bylo připraveno na útěk a boj. Na úrovni metabolismu aktivuje katabolické děje – glykogenolýzu, glukoneogenezi, lipolýzu apod.

		$\alpha 2$	$\alpha 1$	$\beta 1$	$\beta 2$
Mechanismus spřažení		cAMP↓	IP3 DAG	cAMP↑	cAMP↑
AGONISTÉ	noradrenalin	—	—	—	—
	adrenalin	—	—	—	—
	izoprenalin	—	—	—	—
	salbutamol	—	—	—	—
	fenylefrin	—	—	—	—
	klonidin	—	—	—	—
	oxymetazolin	—	—	—	—
ANTAGONISTÉ	fentolamin	—	—	—	—
	prazosin	—	—	—	—
	doxazosin	—	—	—	—
	atenolol	—	—	—	—
	propranolol	—	—	—	—
		—	—	—	—

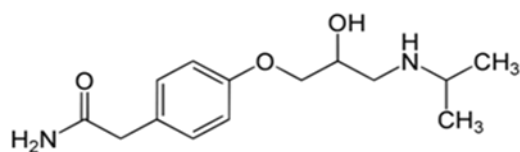
Obrázek č.46: Specificita ligandů adrenergních receptorů

Sympatomimetika

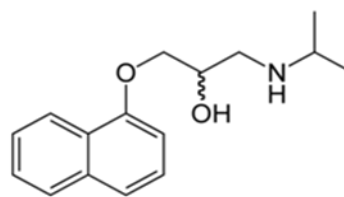
- **Přímá α -sympatomimetika** – jsou agonisté α -adrenergních receptorů. Vyvolávají vazokonstrikci. Při systémovém podání vyvolávají hypotenzi (např. etilefrin). Lokálně jsou podávána k dekongesci sliznic – ucpaný nos při rýmě (např. nafazolin = Sanorin, oxymethazolin = Nasivin)
- **Přímá β -sympatomimetika** - jsou agonisté β -adrenergních receptorů. Vyvolávají relaxaci hladké svaloviny. Užívají se inhalačně jako bronchodilatační agens u astmatiků (salbutamol = Ventolin, terbutalin = Bricanyl). Dále se využívají jako tokolytika – inhibice děložních stahů (Fenoterol, Ritodrin).
- **Nepřímá sympatomimetika** – pronikají dobře do CNS, mají stimulační a euforizující účinky. Nemají terapeutický význam a vyvolávají nutkové zneužívání. Příkladem je amfetamin a kokain – inhibují zpětný příjem noradrenalinu a amfetamin zvyšuje uvolňování noradrenalinu.

Sympatolytika

- **α -sympatolytika** – selektivní antagonisté α -adrenergních receptorů, někdy nazývané α -blokátory. Historicky byl vývoj α -blokátorů problematický – první preparáty byly nespecifické kromě α_1 receptorů blokovaly i pre-synaptické α_2 receptory, což způsobovalo nekontrolovatelné uvolňování noradrenalinu (fenoxybenzamin, fenylamin). Dnes jsou již k dispozici selektivní α_1 -sympatolytika blokující post-synaptické α_1 receptory. Využívají se v terapii komplikované hypertenze (Terazosin, Doxazosin) a benigní hyperplazie prostaty (Tamsulosin, Alfuzosin).
- **β -sympatolytika** – selektivní antagonisté β_1 a β_2 receptorů, často nazývané β -blokátory. Jejich objev znamenal revoluci v léčbě hypertenze, ischemické choroby srdeční, a infarktu myokardu (Atenolol, Propranolol). Lokálně jsou využívány v léčbě glaukomu (Timolol).



atenolol

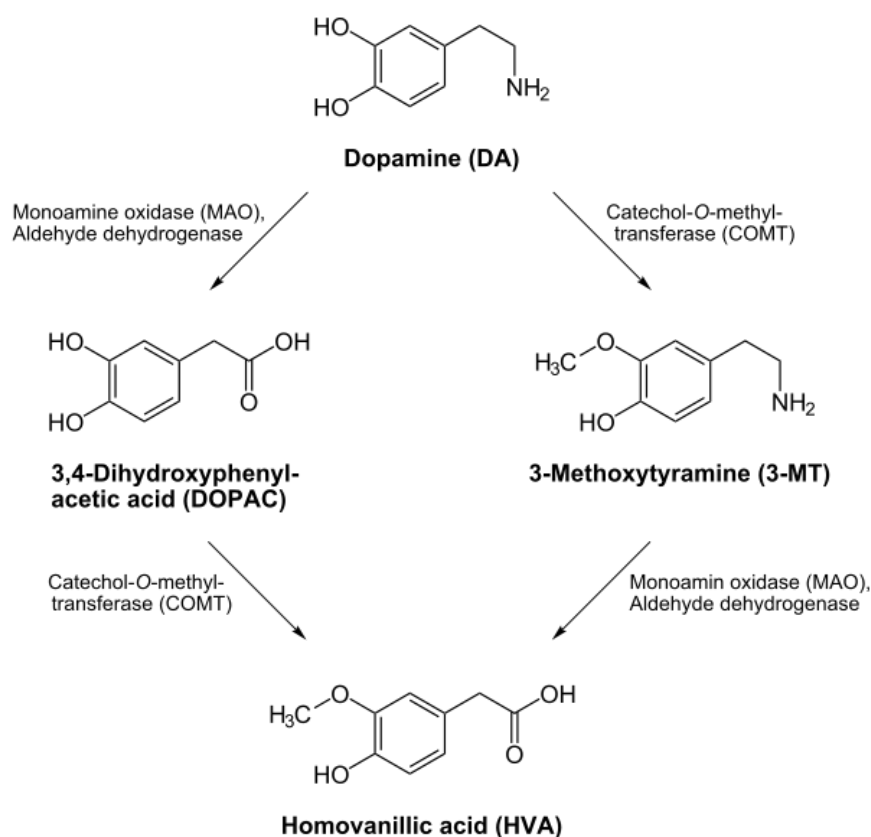


propranolol

DOPAMINERGNI SYSTÉM

Neurotransmitterem v tomto systému je dopamin. Jedná se o katecholamin, který je prekurzorem adrenalinu a noradrenalinu. Prekurzorem dopaminu je DOPA, využívaná v terapii Parkinsonismu. Dopamin je degradován enzymy COMT a MAO obdobně jako noradrenalin a adrenalin (Obrázek 47). Dopamin působí v CNS i PNS, je zapojen do motorického systému (Parkinsonova choroba), má behaviorální účinky (učení, motivace, trest, nálada, pozornost, odměna, spánek, paměť), a neuroendokrinní funkci (inhibuje sekreci prolaktinu adenohypofýzou, stimuluje sekreci růstového hormonu). Důležité je zapojení dopaminu do tzv. „reward pathways“ – tj. „odměny“, a do „reinforcement“ – tj. posílení v konání určitých aktivit – spojeno s jídlem, sexem, drogami. Dopaminový systém je tedy klíčový ve vzniku závislostí, a dopaminergní systém je pozměněn u závislých osob. Zvýšená signalizace dopaminem má euforizující účinky – látky jako kokain a amfetaminy inhibují

dopaminový transporter a dochází k zaplavení synapse dopaminem – pocity euforie, ale zároveň vysoký návykový potenciál.



Obrázek č.47: Degradace dopaminu (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dopamine_degradation.svg)

Na buněčné úrovni působí dopamin prostřednictvím **dopaminových receptorů**. Jedná se o **metabotropní receptory spřažené s G-proteiny**. Existuje pět základních subtypů dopaminových receptorů, které se řadí do dvou skupin:

D₁ – like family – zahrnuje **D₁** a **D₅** receptory, někdy označované **D_{1A}** a **D_{1B}**. Aktivace těchto receptorů má stimulační účinky, dochází k aktivaci G α -stimulačních proteinů, k aktivaci adenylát cyklasy, elevaci cAMP – excitace, akční potenciál, modulace iontových kanálů.

D₂ – like family – zahrnuje **D₂**, **D₃** a **D₄** receptory. U receptoru **D₄** je známo 16 allelických variant. Aktivace těchto receptorů má inhibiční účinky, dochází k aktivaci G α -inhibičních proteinů a k poklesu cAMP.

Dysfunkce v dopaminergní transmissi je příčinou celé řady psychiatrických onemocnění, např. schizofrenie, sociální fobie, attention-deficit hyperaktivity disorder, Tourettův syndrom atd. Mnohá antipsychotika jsou právě ligandy dopaminových receptorů – chlorpromazin, chlorprotixen, haloperidol atd. Inhibitory zpětného vychytávání dopaminu jsou využívány i jako antidepresiva (typ NDRI – norepinephrine and dopamine re-uptake inhibitor). Příkladem je bupropion (Wellbutrin, Zyban), který se využívá i pro odvykání kouření – anti-crawing účinek v CNS. Důležitou skupinou farmak zasahujících do zpětného vychytávání dopaminu jsou antiparkinsonika a neuroleptika.

SEROTONINERGNÍ SYSTÉM

Neurotransmitterem je serotonin, chemicky 5-hydroxy tryptamin (5-HT). Poprvé byl serotonin identifikován jako „element“, který napomáhá srážení krve a vyvolává vasokonstrikci. Odtud pochází název SERO (pocházející ze séra) TONIN (vyvolává tonus svalů). Vyskytuje se v gastrointestinálním traktu, trombocytech a CNS. Nedostatek serotoninu lze ovlivnit příjmem stravy bohaté na tryptofan. Dostupné jsou i preparáty obsahující 5-hydroxy tryptofan, který na rozdíl od serotoninu proniká hematoencefalickou bariérou (pozor! při užívání není kontrola vlastním metabolismem na rozdíl od tryptofanu). V CNS hraje serotonin celou řadu klíčových funkcí, kdy ovlivňuje vnímání, příjem potravy, náladu (smutek, radost, agrese), sexuální funkce, spánek, bdělost, zvracení atd. Zajímavá je historie poznání funkce serotoninu:

- 1933 *Izolace ENTERAMINU (Vialle, Erspamer)*
- 1947 *Nález Enteraminu v krevních destičkách (Rapport, Green, Page); přejmenován na SEROTONIN*
- 1952 *Iproniazid – původně lék na tuberkulosu, ale pacienti byli „inappropriately happy“ – začal se používat jako antidepresivum (1958)– inhibitor MAO. Pro svou hepatotoxicitu byl 1961 stažen z trhu a nahrazen novými méně toxickými deriváty – Marplan, Parnate*
- 1956 *Serotonin zprostředkovává účinky Reserpinu – antipsychotikum a antihypertenzivum – způsobuje depleci monoaminu v nervových zakončeních – při užívání se u pacientů rozvíjí deprese!*
- 1957 *Charakterizace dvou subtypů 5-HT receptorů (Gaddum, Picarelli)*
- 1958 *Imipramin – první tricyklické antidepresivum (Ciba-Geigy)*
- 1963 *Měření vazby a re-uptake serotoninu (Axelrod, Inscoc)*
- 1964 *Hypotalamická „self-stimulation“ serotoninem (Stark, Boyd, Fuller)*
- 1965 *Katecholaminová hypotéza deprese (Schildkraut, Bunney, Davis)*
- 1972 *První patentovaný SSRI – Zimelidin (Norbud, Zelmid) – Astra AB stažen z trhu pro vážné nežádoucí účinky*
- 1974 *Fluoxetin inhibuje uptake serotoninu (Wong et al.)*
- 1987 *FDA schválila PROZAC jako první SSRI pro léčbu deprese*

Obrázek č.48: Historie poznání funkce serotoninu

Zavedení fluoxetinu (Prozac) do klinické praxe znamenalo revoluční zlom ve farmakoterapii a v léčbě deprese a úzkostných poruch. Na toto téma vznikla i celá řada literárních děl a filmů. Na obrázku 49 je ukázán úryvek z článku publikovaného v časopise Molecular Interventions, ukazující, že tržby farmaceutické firmy Lilly za Prozac předčily mnohonásobně očekávání marketingového oddělení.



Obrázek č.49: Prozac – přehled úspěchu zlomového léčiva

RODINA	COUPLING	SIGNALIZACE
5-HT ₁	G _i /G ₀ coupled	↓ cAMP
5-HT ₂	G _q /G ₁₁ coupled	↑IP ₃ , ↑DAG
5-HT ₃	Na ⁺ , K ⁺ channels	Depolarizace membrány
5-HT ₄	G _s coupled	↑cAMP
5-HT _{5A}	G _i /G ₀ coupled	Inhibice AC
5-HT ₆	G _s coupled	↑cAMP
5-HT ₇	G _s coupled	↑cAMP

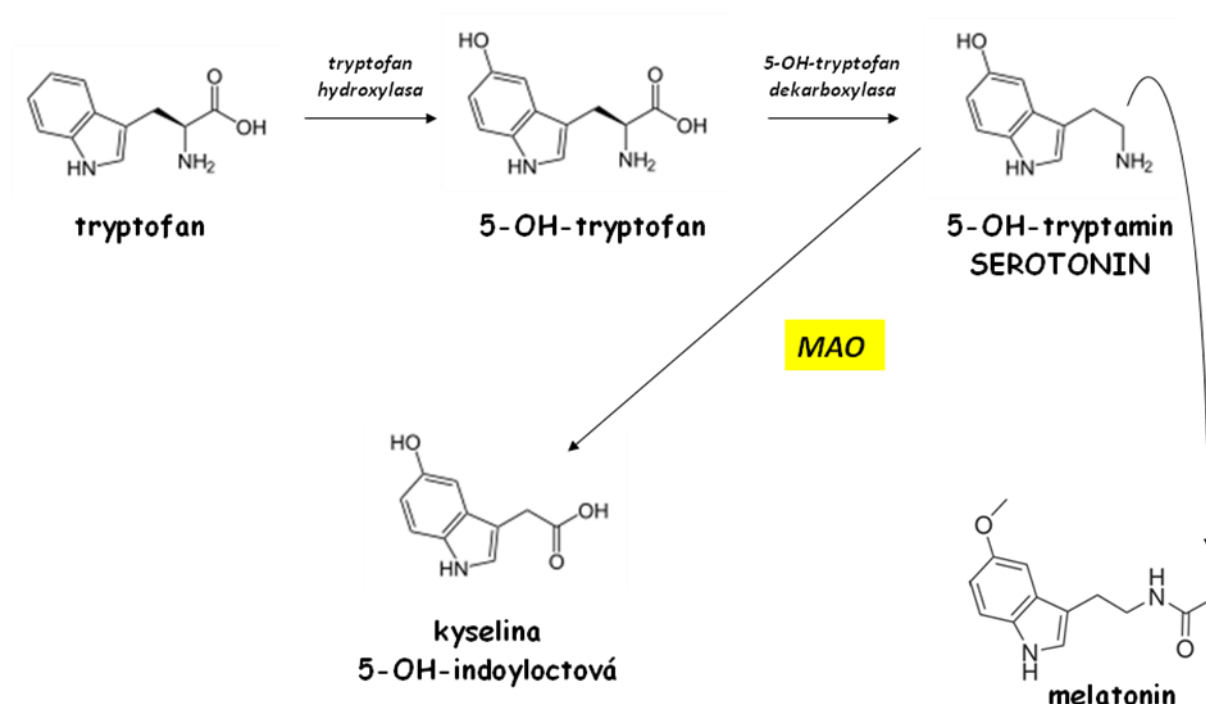
Tabulka č.5: Klasifikace 5-HT receptorů

Na buněčné úrovni působí serotonin prostřednictvím serotoninových receptorů, podle chemické struktury nazývaných 5-HT receptory. Dosud bylo identifikováno 7 rodin 5-HT receptorů (Tabulka č. 5). Jedná se o membránové receptory, které se liší fyziologickou funkcí, afinitou k ligandům, mechanismem spřažení a signálními kaskádami (druhými posly). Přehled fyziologických účinků 5-HT receptorů a jejich agonistů a antagonistů ukazuje Tabulka č. 6.

REC.	účinky	agonisté	antagonisté
5-HT _{1A}	CNS (inh.) – chování, spánek, apetit, agresivita, úzkost	LSD, psilocin, buspiron, MDMA	ergotamin, yohimbin
5-HT _{1B}	CNS – chování; PNS – plicní vasokonstrikce	ergotamin, sumatripan	risperidon, yohimbin
5-HT _{1D}	CNS – lokomoce, úzkost; PNS – mozková vasokonstrikce	sumatripan	ergotamin, yohimbin
5-HT _{1E}	?	LSD, BRL54443	?
5-HT _{1F}	?	BRL54443	?
5-HT _{2A}	CNS (exc.) – chování, učení, úzkost; PNS – kontrakce hladkých svalů, agregace krevních destiček	meskalin, psilocin, LSD	mirtazapin, trazodon, ketanserin
5-HT _{2B}	PNS – kontrakce žaludku	LSD, fenfluoramin	yohimbin
5-HT _{2C}	CNS - úzkost	YM-384	mesulergin
5-HT ₃	CNS – úzkost, emeze	quipazin	mirtazapin, ondansetron
5-HT ₄	CNS (exc.) – učení, paměť; PNS – motilita GIT	cisaprid, metoklopramid	piboserod
5-HT _{5A}	CNS ?	LSD	SB-699
5-HT ₆	CNS – uvolňování Glu, ACh	LSD	SB-271
5-HT ₇	CNS?, GIT?	LSD	risperidon, methiotepin

Tabulka č.6: Agonisté, antagonisté a biologické účinky 5-HT receptorů

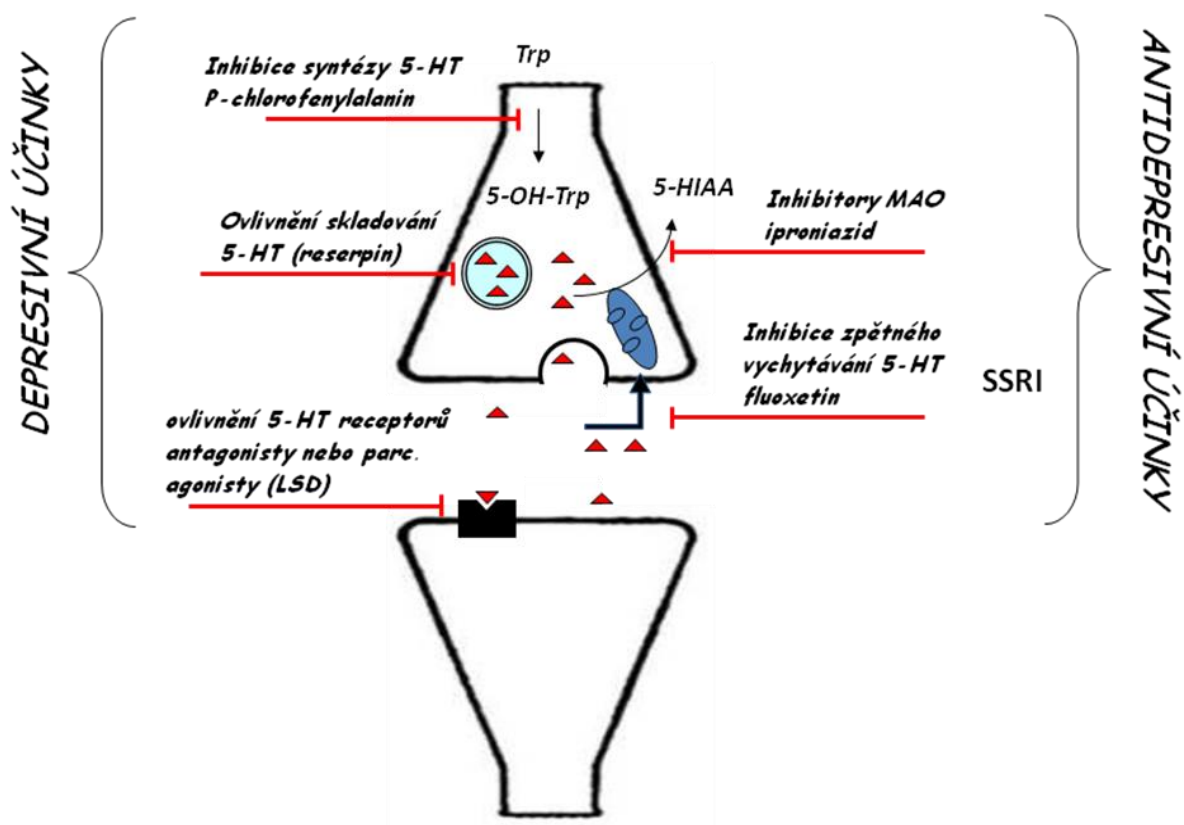
Z výše uvedených tabulek vyplývá, že ovlivnění metabolismu serotoninu a ovlivnění 5-HT receptorů má obrovský klinický potenciál. Na obrázku 50 je schéma znázorňující biosyntézu a degradaci serotoninu.



Obrázek č.50: Syntéza a degradace serotoninu

Metabolismus a homeostázu serotoninu lze ovlivnit několika způsoby. Obecně lze říci, že stimuly vedoucí k poklesu hladiny serotoninu v synapsi CNS mají depresivní účinky, zatímco zvýšení koncentrace serotoninu má antidepresivní efekt (neplatí ovšem vždy – serotonin má v různých částech mozku různé funkce a v různých částech mozku jsou exprimovány různé podtypy 5-HT receptorů). Zatímco zvýšení příjmu potravy bohaté na tryptofan má pozitivní účinky na serotoninergní systém, inhibice syntézy 5-HT vyvolá depresivní stavy. V klinickém výzkumu chování na experimentálních zvířatech se využívá syntetická aminokyselina *para*-chlofenylalanin (fenclofidin), která je selektivním a ireverzibilním inhibitorem tryptofanhydroxylasy, prvního enzymu v syntéze 5-HT (Obrázek 50 a 51). Depresivní účinky má rovněž reserpin, rostlinný indolový alkaloid, který se využíval k léčbě vysokého krevního tlaku a jako antipsychotikum. Reserpin je inhibitorem vezikulárního transporteru monoaminů, který je zodpovědný za transport serotoninu do vesikul, odkud je serotonin vypuštěn do synapse. Reserpin tedy způsobuje depleci serotoninu v synapsi, a vyvolává deprese – byl

využíván jako experimentální nástroj k ověření monoaminové hypotézy vzniku deprese. Účinek serotoninu v synapsi CNS je rovněž potlačen antagonisty (resp. parciálními agonisty) jednotlivých 5-HT receptorů, např. LSD – tj. tyto látky mají depresivní účinky. Na druhou stranu, experimentální přístupy vedoucí ke zvýšení koncentrace serotoninu v synapsích CNS jsou využívány k léčbě deprese. První generace antidepresiv byla založena na inhibitorech MAO, byla tedy neselektivní a působila rovněž na metabolismus noradrenalinu a dopaminu. V případě serotoninu dojde inhibicí MAO k snížení degradace na kyselinu 5-hydroxyindoyloctovou. Moderní antidepresiva jsou inhibitory zpětného vychytávání (transporterů) monoaminů pre-synaptickými neurony. Velkým zlomem ve farmakoterapii byl objev selektivních inhibitorů zpětného vychytávání (tzv. SSRI), kdy prvním byl Prozac (Obrázek 51).



Obrázek č.51: Ovlivnění homeostázy serotoninu v CNS

Na trhu jsou v současné době dostupná léčiva, která ovlivňují metabolismus a buněčný účinek serotoninu několika způsoby:

Tricyklická antidepressiva (TCA) - patřila do první generace antidepressiv. De facto se jednalo o nespecifické inhibitory zpětného vychytávání norepinefrinu a serotoninu, díky inhibici serotoninového transporteru (SERT) a norepinefrinového transporteru (NET). Příkladem těchto léčiv jsou Amitryptilin (Elavil, Laroxyl), Clomipramin (Anafranil), Dosulepin (Prothiaden), Imipramin (Tofranil, Praminil) atd. Nevýhodou TCA je jejich nespecifita vůči buněčným cílům, neboť vykazují afinitu vůči adrenergním receptorům, dopaminovému transporteru, mAChR, histaminovým receptorům atd., což je příčinou jejich vedlejších účinků. Nejzávažnějším faktem je, že TCA se chovají jako blokátory Na^+ a Ca^{2+} kanálů, což je (bylo) příčinou vysoké úmrtnosti při předávkování léčivem (kardiotoxicita). TCA se využívají k léčbě depresí, poruchy nálady, úzkostných poruch a celé řady dalších duševních onemocnění.

Mono Amine Oxidase Inhibitors (MAOI) – léčiva, která inhibují neselektivně degradaci monoaminů (serotonin, dopamin, norepinefrin), a působí neselektivně vůči MAO-A a MAO-B. Vedlejší účinky těchto léčiv spočívaly kromě neselektivity v inhibici metabolismu složek potravy v GIT a v neočekávaných změnách hladin biogenních aminů v séru, což vedlo k hypertenzním krizím – zejména u jídel obsahujících tyramin (tzv. *cheese syndrom*). Příkladem MAOI jsou Iproniazid (Marsilid, Iprozid), Isocarboxazid (Marplan) atd. Využívána byla při léčbě deprese, agorafobie, sociální úzkosti, Parkinsonismu a profylaxi migrén.

Reversible Inhibitors of MAO-A (RIMA) – nevykazují vedlejší účinky na krevní tlak, příkladem je Moclobemid (Aurorix, Manerix). Využívají se v terapii deprese a sociální úzkosti. Existují i specifické inhibitory MAO-B, např. Selegilin (Eldepryl, Deprenyl), který je využíván zejména k léčbě Parkinsonismu.

Serotonin Selective Re-uptake Inhibitors (SSRI) – jejich objev byl milníkem v klinické farmakoterapii. Jedná se o látky, které specificky inhibují zpětné vychytávání serotoninu (SERT), s minimálním vlivem na transportery dopaminu a norepinefrinu. Jsou využívány v terapii deprese, sociální úzkostné poruchy (SAD), panické poruchy, obsesivně-kompulsivní poruchy (OCD), generalizované úzkostné poruchy (GAD), poruch příjmu potravy (bulimie), nespavosti, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) atd. Jako tzv. *off-label use* se SSRI využívají v terapii syndromu dráždivého tračníku či předčasné ejakulace. SSRI byla první psychofarmaka syntetizována pomocí tzv. *rational drug design*. Příkladem je

Fluoxetin (Prozac, Lovan, Fontex), Citalopram (Seropram, Citalec), Paroxetin (Paxil, Seroxat, Remood), Sertralin (Zoloft, Asentra) atd.

Selective Serotonin Specific Enhancers (SSSE) – donedávna se předpokládalo, jak z názvu plyne, že se jedná o látky s opačným účinkem než SSRI, tj. že SSSE zesilují zpětné vychytávání serotoninu. Mechanismus však není znám, pravděpodobně je nepřímý, protože SSSE neinhibují SERT. Příkladem je lék Tianeptin (Coaxil). Z tohoto pohledu je využití Tianeptinu jako antidepresiva paradoxní. Nejnovější výzkumy ukazují, že Tianeptin zesiluje uvolňování dopaminu v mesolimbickém systému. Skutečný mechanismu účinku není doposud vysvětlen, Mezi indikace Tianeptinu patří deprese a úzkostné poruchy. Jako *off label use* se využívá v léčbě Parkinsonismu, astmatu, erektilní dysfunkce a jako antikonvulzivum.

Serotonin and Norepinephrine Re-uptake Inhibitors (SNRI) – využívají se k léčbě deprese, úzkostných poruch, obsesivní-kompulsivní poruchy, ADHD, chronické neuropatické bolesti atd. Příkladem je Venlafaxin (Argofan, Efectin), Duloxetine (Cymbalta), Sibutramin (Meridia, Lindaxa) atd. Sibutramin byl dlouhou dobu využíván jako *off label* indikace v léčbě obezity – jako anorektikum. Od roku 2010 je zakázán v EU i USA.

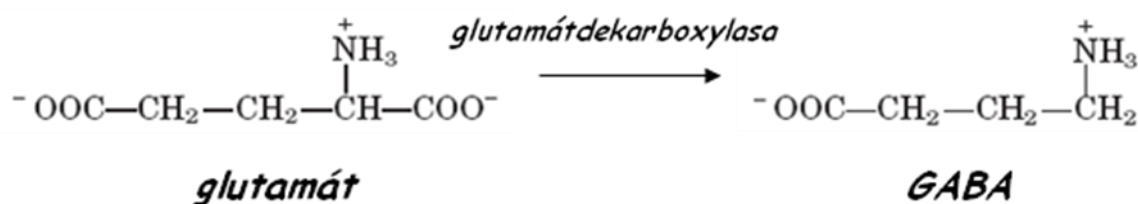
Serotonin Antagonist Re-uptake Inhibitors (SARI) – příkladem je Trazodon (Trittico), využívaný k léčbě deprese a úzkosti. Trazodon je antagonist 5-HT_{2A} ($K_i = 13$ nM) a 5-HT_{2C} ($K_i = 192$ nM). Zároveň je parciální agonista 5-HT_{1A} ($K_d = 78$ nM), a slabý inhibitor zpětného vychytávání serotoninu; SERT ($K_d = 160$ nM). Vedlejší účinky (ortostatická hypotenze a sedace) jsou pravděpodobně způsobeny blokací α_1 adrenergických receptorů ($K_d = 39$ nM).

Noradrenergic and Specific Serotonergic Antidepressants (NaSSA) – Jedná se o moderní antidepresiva s komplexním mechanismem účinku. Využívána jsou v léčbě deprese, úzkostných poruch, OCD, PTSD, nespavosti, úbytku na váze atd. Příkladem je Mirtazapin (Remeron, Esprital) a Mianserin (Bolvidon, Norval). Mirtazapin je antagonistou celé řady receptorů (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₇, H₁, α_1 , α_{2A} , α_{2C}) z čehož plyne jeho unikátní a široký klinický účinek, který lze moderovat dávkováním – např. v nízkých dávkách preferenčně blokuje histaminové receptory a vyvolává spánek (při nespavosti), zatímco ve vyšších dávkách se prostřednictvím 5-HT a $\alpha_{1/2}$ receptorů projeví účinek antidepresivní.

Jiným příkladem cílení 5-HT receptorů je antiemetikum Ondansetron, který je antagonistou 5-HT₃ receptorů a je využíván k tlumení nežádoucích účinků chemoterapie.

GABA-ERGNÍ SYSTÉM

Neurotransmitterem je kyselina gama-aminomáselná (**G**amma-**A**mino-**B**utyric-**A**cid), která je syntetizována dekarboxylací glutamátu.



GABA je tlumivý neurotransmitter, který má v PNS účinek myorelaxační, a v CNS účinky anxiolytické, hypnotické, antikonvulzivní, amnestické. Na buněčné úrovni působí GABA prostřednictvím GABA_A a GABA_B receptorů. Receptory GABA_A jsou ligandem-řízené chloridové kanály, kdy chloridové ionty způsobí hyperpolarizaci membrány a mají tudíž inhibiční účinek (tlumivý). Vysoké koncentrace GABA_A receptorů se nacházejí v limbickém systému a hrají roli ve vzniku emocí. Prostřednictvím GABA_A receptorů působí celá řada léčiv – viz níže. Receptory GABA_B jsou metabotropní receptory spojené s G-proteiny. Prostřednictvím GABA_B receptoru působí antispastikum Baclofen.

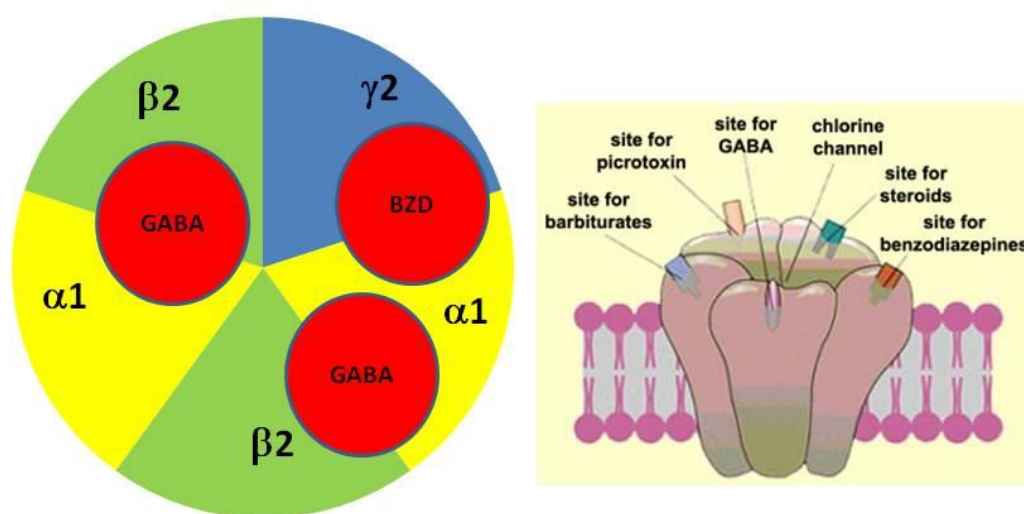
Strukturně je GABA_A receptor heteropentamer, skládající se z kombinací podjednotek α , β , γ , δ , ϵ , π , θ . V současné době jsou známy následující podjednotky GABA_A receptoru:

GABRA1 = GABA _A α 1	GABRB1 = GABA _A β 1	GABRE = GABA _A ϵ
GABRA2 = GABA _A α 2	GABRB2 = GABA _A β 2	GABRP = GABA _A π
GABRA3 = GABA _A α 3	GABRB3 = GABA _A β 3	GABRD = GABA _A δ
GABRA4 = GABA _A α 4	GABRG1 = GABA _A γ 1	GABRQ = GABA _A θ
GABRA5 = GABA _A α 5	GABRG2 = GABA _A γ 2	
GABRA6 = GABA _A α 6	GABRG3 = GABA _A γ 3	

Kombinace jednotlivých podjednotek určuje tkáňovou a vazebnou specifitu jednotlivých typů GABA_A receptorů a finální farmakologický a fyziologický účinek. Podjednotky se v

heteropentameru mohou v zásadě kombinovat libovolně, minimální požadavek na to, aby se vytvořil funkční chloridový kanál je přítomnost α i β podjednotky, kdy nejtypičtější kompozice pentametu GABA_A je $\alpha_2\beta_2\gamma$.

Receptory GABA_A obsahují několik alosterických vazebných míst pro léčiva a endogenní sloučeniny, které modulují účinek GABA na receptory (Obrázek 52).



Obrázek č.52: GABA_A receptor.

Převzato z : http://thebrain.mcgill.ca/flash/i/i_04/i_04_m/i_04_m_peu/i_04_m_peu_2a.jpg

Aktivita GABA_A receptoru (tj. účinek GABA) může být ovlivněn celou řadou ligandů, které se váží na různá místa receptoru:

Agonisté – váží se na „hlavní“ receptorové vazebné místo (kde se normálně váže GABA – orthosterické vazebné místo) a vyvolají zvýšený influx chloridových iontů. Příkladem jsou kyselina ibotenová, muscimol, a tzv. Z-drugs (působí hypnotický účinek bez anxiolytického - Zolpidem, Zaleplon, Zopiclon - váží se specificky na $\alpha 1$ podjednotku).

Antagonisté - váží se na „hlavní“ receptorové vazebné místo, ale neaktivují receptor; sami o sobě nemají žádný účinek, ale inhibují účinek GABA a snižují influx chloridových iontů. Příkladem jsou Bicucullin a Gabazin, látky, které blokací GABA mohou vyvolat epileptický záchvat a jsou využívány ke studiu epilepsie.

Pozitivní allosterické modulátory – váží se na allosterická vazebná místa na GABA receptorech a pozitivně modulují účinnost vazby GABA na hlavní vazebné místo, což ve výsledku zvýší influx chloridových iontů. Tuto vlastnost má celá řada léčiv, včetně barbiturátů, benzodiazepinů, glutethimid, meprobamát, propofol, kyselina valerová (Valeriana). Podobný účinek mají i endogenní neurosteroidy a alkohol. Širokou terapeutickou skupinou látek jsou benzodiazepiny, které podle selektivity vazby (na typ receptoru a jeho lokalizaci) vyvolávají účinek anxiolytický (Alprazolam – Neurole, Xanax, Bromazepam – Lexaurin), antikonvulzivní (Diazepam – Valium), hypnotický (Flunitrazepam – Rohypnol, Midazolam – Dormicum) či myorelaxační (Tetrazepam – Myolastan).

Negativní allosterické modulátory - váží se na allosterická vazebná místa na GABA receptorech a negativně modulují účinnost vazby GABA na hlavní vazebné místo, což ve výsledku sníží influx chloridových iontů. Příkladem je Flumazenil (Anexát) a Ro15-4513 používané v terapii intoxikace benzodiazepiny. Chovají se jako inverzní agonisté, tj. jsou schopny inhibovat i bazální aktivitu GABA_A v nepřítomnosti ligandu.

Nekompetitivní blokátory chloridového kanálu – účinkují antagonisticky na GABA_A receptory mechanismem jiným než výše uvedené. Příkladem je Pikrotoxin, Thujon, Lindan, Cucutoxin apod. Jedná se o látky, které mají stimulační účinky a mohou vyvolat epileptický záchvat. Proto jsou potraviny a nápoje obsahující Thujon v EU regulovány (Absint).

Důležitou terapeutickou skupinou, která cílí GABA-ergní systém, jsou antiepileptika; např. kyselina valproová, gabapentin atd.

GLUTAMÁTERGNÍ SYSTÉM

Neurotransmitterem je glutamát – jedná se o endogenní sloučeninu zapojenou do mnoha metabolických dějů, např. transaminace, detoxikace amoniaku v mozku, syntéza močoviny, je prekurzorem GABA atd. Glutamát je hlavní excitační neurotransmitter (spolu s aspartátem a homocysteinem). Na molekulární úrovni glutamát působí prostřednictvím *glutamátových*

receptorů, které mohou být ionotropní a metabotropní. Pro aktivaci glutamátových receptorů není důležitý pouze glutamát, ale (podobně jako u GABA) spousta dalších sloučenin může modulovat činnost glutamátových receptorů, z čehož plyne jejich široká fyziologická funkce. Velmi důležitou úlohu hrají glutamátové receptory v nervovém systému. Za zmínku stojí zapojení glutamátových receptorů do procesu vnímání chuti, kdy tzv. chuť **umami** je zprostředkována glutamátem sodným. Na téma glutamátové receptory by se mohlo napsat celé samostatné skriptum; pro potřeby studia MBB. Základní vlastnosti a ligandy glutamátových receptorů shrnuje Tabulka č. 7.

TYP	MECHANISMUS	AGONISTA	ANTAGONISTA
NMDA	Ionotropní; Na^+ , K^+ , Ca^{2+}	N-Methyl-D-Aspartát ? D-serin	Ethanol, ketamin, methadon, tramadol, dextrofan, fencyklidin
AMPA	Ionotropní; Na^+ , K^+ , Ca^{2+}	α -Amino-3-hydroxyl-5- Methyl-4-isoxazol-PropionAt	CNQX, NBQX
KAINÁT	Ionotropní; Na^+ , K^+ , (Ca^{2+})	Kainát	CNQX, DNQX
mGluR	Metabotropní (GPCR)	různé	různé

Tabulka č.7: Glutamátové receptory

GLYCIN

Jedná se o inhibiční neurotransmitter v CNS (mícha, mozkový kmen). Na buněčné úrovni působí prostřednictvím **glycinových receptorů (GlyR)**, což jsou ligandem řízené chloridové kanály (podobně jako GABA_A). Glycinový receptor je tvořen pěti podjednotkami okolo chloridového kanálu. Známé jsou podjednotky GlyR- α 1, GlyR- α 2, GlyR- α 3, GlyR- α 4 a GlyR- β . Heteropentamer je tvořen kombinacemi $\alpha_3\beta_2$ nebo $\alpha_4\beta$. Příkladem agonistů GlyR jsou alanin, cykloserin, serin, hypotaurin, taurin, sarkosin a betain. Antagonisté GlyR jsou strychnin, brucin, pikrotoxin a kofein.

HISTAMIN

Je neurotransmiterem, který působí v CNS, PNS a GIT prostřednictvím histaminových receptorů, které jsou spřaženy s G-proteiny.

TYP	GPCR	FUNKCE	ANTAGONISTA
H ₁	G _q	Systémová vasodilatace, kontrakce ilea, bronchokonstrikce, cirkadiánní rytmus	Loratidin, Cetirizin
H ₂	G _s , ↑Ca ²⁺	Stimulace žaludeční sekrece, relaxace hladkých svalů, inhibice syntézy protilátek a sekrece cytokinů	Cimetidin, Ranitidin
H ₃	G _i	Neurotransmitter v CNS, presynaptické autoreceptory	Ciproxifan
H ₄	G _i	Chemotaxe mastocytů	Thioperamid

Tabulka č.8: Histaminové receptory

- 1907 Izolace Histaminu (Windaus, Vogt)*
- 1910 Histamin působí na cévní systém (Dale, Laidlaw)*
- 1916 Histamin stimuluje sekreci žaludeční šťávy (Popielski)*
- 1937 První antihistaminikum - Piperoxan (Bovet - Nobelova cena 1957)*
- 1940 Úloha histaminu v anafylaxi*
- 1942 Výroba Benadrylu (Rieveschl)*
- 1948 Navržena hypotéza o existenci dvou typů adrenergických receptorů (Ahlquist)*
- 1972 Definice existence H₂ receptoru - pomocí vazebných studií s analogy Cimetidinu (Black - Nobelova cena 1988)*
- 1979 FDA schválila Cimetidin*
- 2000- klonovány H₃ a H₄ receptory....*

Obrázek č.53: Historie poznání histaminu

Cimetidin (Tegamet) bylo jedno z prvních léčiv vyvinuté na základě tzv. rational drug design. Tj. po objevu existence H₂ receptorů (v GIT) byla hledána léčiva selektivně účinkující na tento podtyp histaminových receptorů. Právě Cimetidin byl první lék v terapii žaludečních vředů, schválený FDA. Antagonisté H₁ receptorů jsou běžně užívanými antihistaminiky a mají rovněž sedativní účinek.

V. DEGRADACE PROTEINŮ V BUŇCE

(Tato část skriptu vyšla jako příloha ZRCADLO ČESKÉ VĚDY v Britských listech:

<http://blisty.cz/art/56680.html>.)

Tradičním tématem molekulární a buněčné biologie, jemuž rozumíme se stále více ohromující detailností, je proteosyntéza a její regulace. Od dob formulace „centrálního dogmatu molekulární biologie“ F. Crickem v roce 1958 jsou biologové a biochemici dodnes zaujati studiem replikace DNA, transkripce a translace, což je patrné snad ze všech učebnic, jež se nějak věnují fungování buňky. Tématem naopak dlouho ignorovaným a teprve v současnosti hlouběji docenovaným je to, jak jsou v buňce degradovány již syntetizované proteiny, které jsou z nějakého důvodu buď defektní nebo nepotřebné. Do biologických učebnic téma degradace proteinů v buňce proniká jenom velmi zvolna a v češtině snad ani žádná učebnice s podrobným pojednáním této látky neexistuje (i proto citujeme v následujícím textu poměrně extenzivně původní časopiseckou literaturu, z níž jsme vycházeli). Nabízíme tedy v tomto skriptu shrnutí celé problematiky pro studenty biologických, chemických a lékařských oborů s načrtnutím pozoruhodné aplikace inhibitorů degradace proteinů v onkologii (lék bortezomib a nová generace inhibitorů proteazomu).

JAK JSOU PROTEINY V BUŇCE DEGRADOVÁNY

V eukaryotních buňkách existují dva hlavní způsoby, jimiž dochází k rozkladu proteinů na peptidové zbytky. Prvním z nich je autofagie (z řečtiny „sebepojídání“), při níž dochází k odstranění proteinů s dlouho životností nebo větších struktur, jako jsou organely, jejich transportem do lyzozomu, kde jsou rozštěpeny [1].

Proteiny, které mají kratší dobu životnosti, a to je drtivá většina (cca 90%) všech degradovaných proteinů, nejsou rozkládány v nějaké membránové organelle, jakou je lyzozom, nýbrž volně v cytozolu nebo v jádře pomocí multiproteinového komplexu, zvaného *proteazom*. Prostřednictvím proteazomů jsou také degradovány defektní proteiny, které se buňce nepodařilo syntetizovat správně (asi 30% všech nativních proteinů v buňce) a jejichž likvidace probíhá ihned během translace nebo krátce po ní [2]. Jsou-li nově defektní proteiny umístěny v endoplazmatickém retikulu (ER), a zde jde především o proteiny špatně

poskládané do terciárních struktur, podléhají procesu, v němž proteazomy spolupracují s ER a který se nazývá ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation). Během ERAD je nesprávně poskládaný protein nejprve označen specifickým kódem (jedná se o glykany), pak je transportován přes membránu ER do cytozolu a degradován přilehlými proteazomy [3]. V případě nenativních proteinů, které jsou špatně poskládány a agregovány, dochází k jejich vychytávání v cytozolu pomocí dvou kompartmentů zvaných JUNQ (juxta-nuclear quality control) a IPOD (insoluble protein deposit). I tyto proteiny jsou nakonec degradovány v proteazomech [4]. Proteazomy ovšem zdaleka nedegradují pouze defektní proteiny, nýbrž se také významnou měrou podílejí na zpracování funkčních proteinů ve smyslu ovlivňování jejich funkce. Degradace nějakého proteinu může být důležitou součástí různých signalizačních dějů v buňce, jak uvidíme níže.

Proteazomy jsou obsaženy v cytoplazmě i v jádře, kde se volně a rychle pohybují. Přenos proteazomu z cytoplazmy, kde je proteazomů více, do jádra (opačným směrem to nejde) je naopak pomalý. Během mitózy se obě oddělené populace proteazomů, jaderná a cytoplazmatická, mohou spojit a promísit [5]. Celkové množství proteazomů v buňce je ve stovkách až tisících nanogramů na miligram všech buněčných proteinů s tím, že v rakovinných buňkách může být výrazně větší než ve zdravých buňkách [6]. Bližší podrobnosti o lokalizaci proteazomů v cytoplazmě a jádru lze najít v literatuře [7].

OBJEV UBIKVITIN-PROTEAZOMOVÉHO SYSTÉMU (UPS), UBIKVITINACE PROTEINŮ

Degradace proteinů pomocí proteazomů je velice sofistikovaný proces, který se děje v rámci tzv. ubikvitin-proteazomového systému (UPS) neboli tzv. ubikvitin-proteazomové cesty (cesta = pathway, tedy zkraka UPP). Významnou roli v tomto procesu hraje malý (76 aminokyselin, 8,5 kDa) protein ubikvitin, který byl objeven už v roce 1975, aniž by byla známa jeho funkce. Již z názvu však plyne, že tento protein se hojně vyskytuje ve všech eukaryotních buňkách (je „ubikvitní“ čili „všude se vyskytující“). Dnes už víme, že ubikvitin slouží ke značení proteinů v ději, jemuž říkáme ubikvitinace nebo ubikvitinylace proteinu. Význam, rozmanitost a komplexní kontext označování proteinů ubikvitinem dnes dosahuje úrovně dosud nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů, kterou je fosforylace [8]. Přesto je ubikvitin pro nás spojený především s objevem mechanismu degradace proteinů,

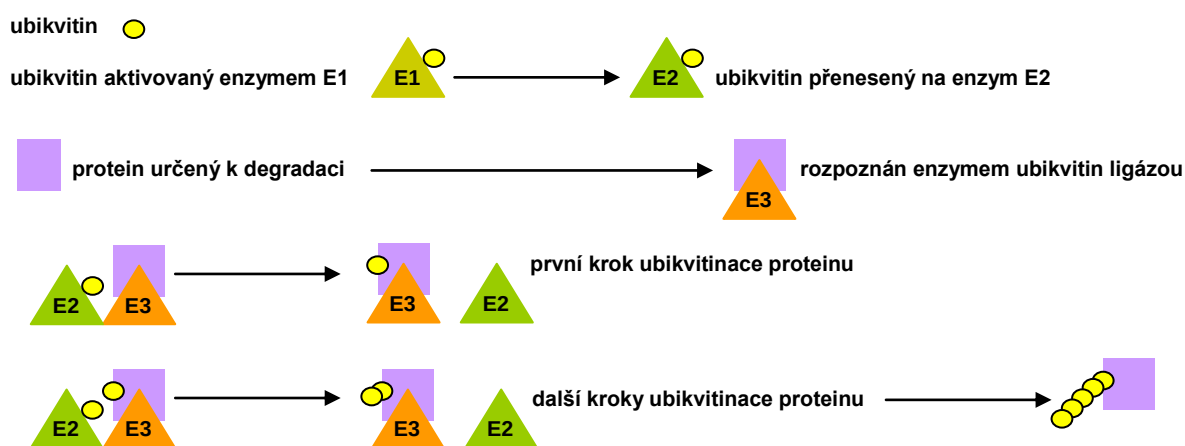
který učinili na začátku 80. let minulého století Avram Hershko, Aaron Ciechanover a Irwin Rose. Všichni tři tito vědci obdrželi za svůj objev v roce 2004 Nobelovu cenu v oboru chemie. Z nobelovské přednášky profesora Hershka budeme vycházet ve vyličení historie objevu UPS [9].

Hershko byl v letech 1969-1971 na postdoktorském pobytu v laboratoři prof. G. Tomkinse v Kalifornii, kde si všiml při experimentální práci, že degradace proteinu, který byl předmětem jeho studia, vyžaduje energii (spotřeba ATP). Tento tajemný proces, vyžadující energii, byl vysoce specifický (došlo k degradaci jen toho určitého proteinu) a zaujal Hershka natolik, že se mu rozhodl věnovat svou pozornost i po návratu do Izraele. V té době už byl znám ATP-dependentní proteolytický systém z lyzátů z retikulocytů, popsáný harvardskými vědci J. D. Etlingerem a A. L. Goldbergem [10]. Hershko, jeho student Ciechanover a jejich přítel Rose z Fox Chase Cancer Center (Pensylvánie) se pustili do biochemické frakcionace tohoto systému, aby mohli popsat jeho složky. Zjistili, že ATP-dependentní degradace proteinů vyžaduje právě řetězce ubikvitinů. Tyto ubikvitiny jsou jeden po druhém připojeny k proteinu, který má být degradován (takové proteiny nazýváme zkratkou PDG), jako „polibek smrti“, čili oznamují proteazomům, že tento protein má být zničen. Jak jsou ovšem ubikvitinové řetězce k proteinům připojovány? Mezi lety 1980 až 1990 našla Hershkova skupina odpověď i na tuto otázku (do historie tohoto objevu se vrací i C. M. Pickart v [11] z pohledu skupiny A. Varshavského).

Ubikvitin je v buňce nejprve vázán (aktivován) za spotřeby ATP tzv. ubikvitin-aktivujícím enzymem E1, potom je přenesen na ubikvitin-přenášeč enzym E2. Další přesun ubikvitinu na PDG (nebo na vytvářející se řetězec ubikvitinů na proteinu) je podmíněn ubikvitin-ligázou E3, která dokáže specificky rozpoznat proteiny, jež mají být degradovány. Jinými slovy enzymy E1 a E2 slouží převážně pouze k transportu ubikvitinů, naopak enzym E3 obsluhuje jejich konečné navázání na PDG, rozpoznáný právě enzymem E3. Nejprve je tedy na PDG navázán první ubikvitin, na něj pak druhý, na druhý třetí atd. Z tohoto, že E3 enzymy specificky rozpoznávají různé PDG, plyne, že v buňkách je málo různých E1 (podle [12] existují v lidských buňkách přinejmenším dva E1 enzymy, totiž Uba6 a Ube1) a E2 enzymů, zatímco E3 enzymů existuje rozmanité množství (stovky) pro různé skupiny proteinů, určených k degradaci. Rozeznáváme základní dvě skupiny ubikvitin-ligáz, které se liší přítomností aktivní domény: buď obsahují doménu HECT (homologous to E6-Associated Protein C-Terminus), nebo doménu RING (really interesting new gene) [13-14]. Navíc kromě

klasické kaskády E1-E2-E3 dnes už víme také o tzv. E4 enzymech, které se mohou podílet na prodlužování polyubikvitinového řetězce [15].

Klíčovou otázkou je také to, jakým způsobem jsou ubikvitiny v řetězci navzájem spojeny. Nikoli každý polyubikvitinový řetězec je totiž prima facie polibkem smrti. Nejběžnější způsob vazby dvou ubikvitinů v polyubikvitinovém řetězci je přes lysin 48 (tzv. K48 řetězce) nebo lysin 63 (tzv. K63 řetězce), existují však i řetězce ubikvitinů vázané přes lysin 6, 11, 27, 29 a 33, výjimečně bývají tyto řetězce i rozvětvené [16]. Dnes neumíme přesně říci, jaký je význam celé pestrosti těchto signálů. Za „polibek smrti“ jsou považovány zejména K48 řetězce, zatímco K63 řetězce hrají především jiné role v buněčné signalizaci. Nedávno se však ukázalo, že také proteiny označené K63 řetězci mohou být rozpoznány proteazomy a degradovány v nich [17]. Existuje dokonce možnost, že K63 řetězce mohou být přeměněny přímo a označeném proteinu na K48 řetězce [18].



Obrázek č.53: Ubikvitinace k degradaci v proteazomu určených proteinů (vznik K48 ubikvitinových řetězců).

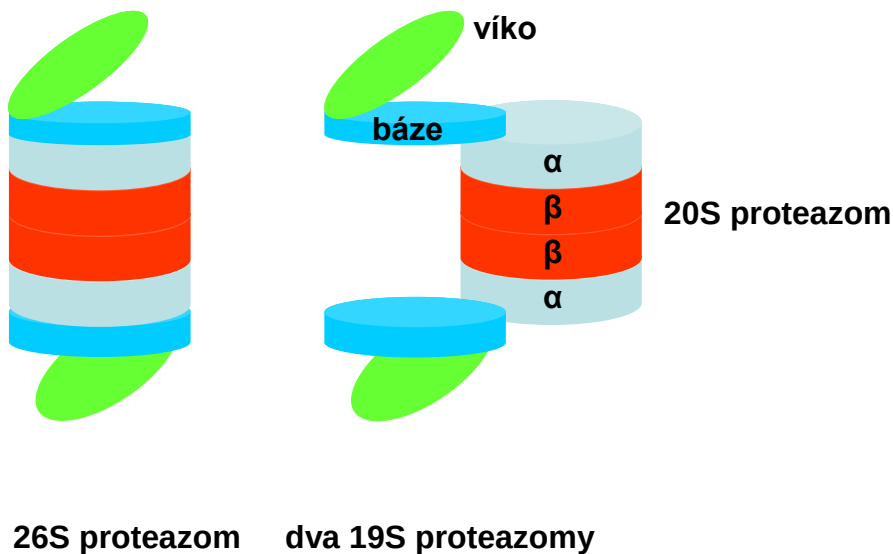
V eukaryotní buňce dochází kromě ubikvitinace proteinů také k jejich deubikvitinaci. Enzymy zodpovědné za tento proces se nazývají deubikvitinázy a označují se zkratkou DUB. Můžeme je rozdělit do následujících pěti skupin: 1. ubikvitin C-terminální hydrolázy, 2. ubikvitin specifické proteázy, 3. proteázy s doménou Machadovy-Josephovy nemoci, 4. proteázy z vaječnickových tumorů a 5. proteázy s JAMM doménou [19]. Dnes je známo 75 DUB, které

interagují se stovkami proteinů a hrají v eukaryotní buňce nesmírné množství různých rolí [20]. Pro náš další výklad je dobré poznamenat, že jedna z JAMM doménových deubikvitináz, označovaná v lidských buňkách jako Poh1, je součástí eukaryotního proteazomu a hraje klíčovou roli pro jeho správné fungování.

STRUKTURA A FUNKCE PROTEAZOMU V EUKARYOTNÍ BUŇCE

Jakmile protein na sobě nese K48 polyubikvitinový řetězec, může být rozpoznán tzv. 26S proteazomem a degradován v něm. 26S proteazom je běžný typ proteazomu, obsažený v našich buňkách. Skládá se [21] ze dvou základních částí: a) z 20S proteazomu čili hlavní částice (core particle), která má tvar válce a v níž probíhá samotná proteolýza PDG, b) z 19S proteazomu čili regulační částice (regulatory particle), která se také nazývá PA700. 20S proteazom se skládá celkem ze čtyř prstenců: dva vnější jsou tvořeny sedmi α podjednotkami a dva vnitřní sedmi β podjednotkami. Aktivní místa štěpící proteiny jsou v β prstencích a jsou obráceny dovnitř válce 20S proteazomu, konkrétně se jedná o $\beta 1$ podjednotku s aktivitou podobnou kaspázám, $\beta 2$ podjednotku s aktivitou podobnou trypsinu a $\beta 5$ podjednotku s aktivitou podobnou chymotrypsinu. Kromě běžného 20S proteazomu existují v našich buňkách také indukibilní proteazomy s jinými aktivními místy ($\beta 1i$, $\beta 2i$ a $\beta 5i$), jež se nazývají imunoproteazomy nebo směsné proteazomy a hrají roli v imunitní odpovědi buněk na cizorodé látky [22]. Zcela speciální typ proteazomů existuje v brzlíku, jde o tzv. thymoproteazomy, obsahují $\beta 5t$ podjednotku s neobvyklou katalytickou aktivitou. Jejich role souvisí s pozitivní selekcí $CD8^+$ T buněk [23].

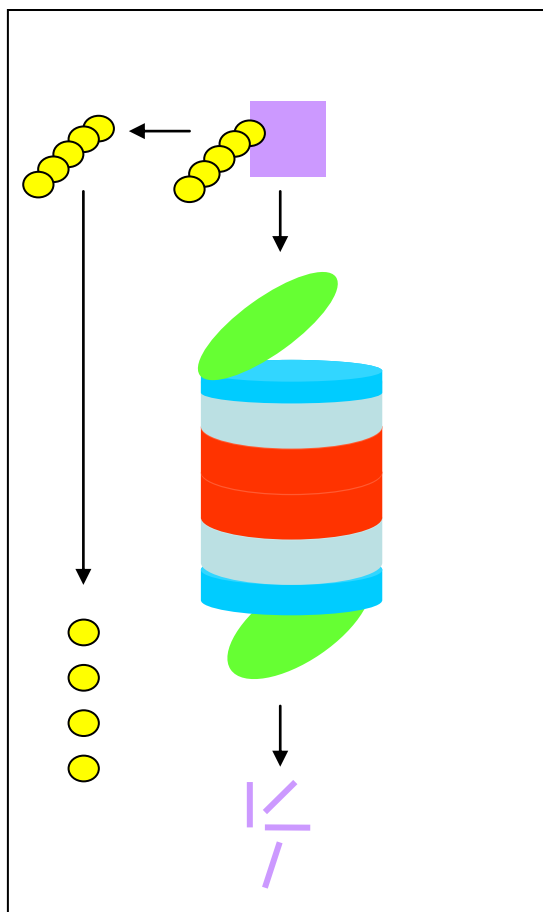
Regulační částice se vážou na vnější, tedy α prstence 20S proteazomu. Kromě 19S proteazomu to mohou být i jiné komplexy, jako jsou PA28 či PA200, nebo dokonce proteiny, které se reverzibilně připojují k 20S proteazomu v substechiometrických množstvích [24]. I když uspořádání proteazomů se různě dynamicky mění, bylo prokázáno, že 26S proteazom zůstává během degradace proteinů intaktní [25]. Regulační částice 26S proteazomu (PA700) obsahuje dvě základní, navzájem spojené, oblasti: bázi a víko. V bázi můžeme najít šest rozdílných AAA+ ATPáz a další čtyři podjednotky. Jejím hlavním posláním je regulovat vstup do nitra 20S proteazomu [26]. Víko obsahuje devět ne-ATPázových podjednotek [27] a jeho základní funkcí je deubikvitinace ubikvitinovaných proteinů pomocí JAMM doménové DUB Poh1 před jejich vstupem do nitra 26S proteazomů [28].



Obrázek č.54: Schematicky znázorněná struktura proteazomu, který se nalézá běžně v eukaryotních buňkách (26S proteazom).

Ačkoli typický protein, degradovaný v eukaryotní buňce proteazomy, musí být ubikvitinován, podle nedávného zjištění asi 20% všech proteinů, štěpených proteazomy v eukaryotních buňkách, nemusí mít ubikvitinové značení – takové proteiny obsahují špatně uspořádaná místa ve svých strukturách a taková místa potom slouží jako nespecifický signál pro degradaci v proteazomech bez nutnosti ubikvitinace daného proteinu [29]. My se však zaměříme na mechanismus degradace ubikvitinovaných PDG v 26S proteazomech. V rozpoznání ubikvitinovaného proteinu hrají klíčovou roli některé jednotky z báze (ubikvitinové receptory) a také některé proteiny, které se jen přechodně asociují s 26S proteazomy [30]. Jestliže je ubikvitinovaný protein již navázán na 26S proteazom, jeho polyubikvitinový řetězec může být proteazomem různě štěpen a znovu syntetizován pomocí deubikvitináz a ubikvitin-ligáz [31]. Bylo také ukázáno, že snížení intenzity degradace samotných ubikvitinů v proteazomu souvisí s činností specifické DUB, nazývané Ubp6, která není stálou podjednotkou 26S proteazomů [32].

Před samotnou degradací PDG je však polyubikvitinový řetězec odštěpen en bloc pomocí Poh1 a dále je odstraňován jinými DUB [33]. Rozplétání proteinu do primární struktury a jeho přesunutí do otvoru proteazomu je pak spojeno s hydrolýzou ATP AAA+ ATPázami [34].



Obrázek č.55: Degradace proteinu 26S proteazomem. Vznikají oligopeptidové fragmenty.

Rozpletený protein může být „skladován“ v α prstencích, pokud β prstence jsou ještě vytiženy degradací předchozího proteinu [35]. Proteiny mohou přitom vcházet do 20S proteazomu z obou stran [36]. Degradace probíhá tak dlouho, dokud vzniknuvší oligopeptidy nejsou dostatečně malé, aby mohly samovolně difundovat ven [37]. Jakmile se oligopeptidy dostanou ven z 26S proteazomu, jsou v buňce dále štěpeny jinými peptidázami až na aminokyseliny, použitelné pro další proteosyntézu [38], nebo jsou použity v rámci imunitního systému jako antigeny [39]. Některé proteiny jsou 26S proteazomy degradovány neúplně, nýbrž jsou vlastně aktivovány, a to tak, že dojde k degradaci jiných proteinů, které jsou na ně vázány a inhibují je. Typickým příkladem je aktivace tzv. jaderného faktoru- κ B (NF- κ B), který se běžně v cytoplazmě vyskytuje v komplexu se svým inhibitem I- κ B. Jakmile je tento I- κ B ubiquitininován a degradován, NF- κ B se translokuje do jádra a spouští transkripci příslušných genů [40]. Funkce 26 proteazomů je tedy spojena nikoli jen s regulací množství daného proteinu v buňce, nýbrž i s regulací aktivity různých proteinů. Není proto divu, že UPS hraje

klíčovou roli v mnoha terapeuticky významných procesech, jako jsou zánětlivá onemocnění, neurodegenerativní procesy, svalové dystrofie, virové infekce nebo karcinogeneze [41-42].

VELCADE (BORTEZOMIB): PŘÍBĚH JEDNOHO ÚSPĚCHU

Úspěšná aplikace inhibitoru proteazomu bortezomibu (podává se jako lék pod názvem VELCADE) proti mnohočetnému myelomu je považována, např. na stránkách amerického National Cancer Institute (NCI), za exemplární „příběh úspěchu“, dodnes neuvěřitelného. Žádný jiný zásah do UPS, kromě využití bortezomibu, nebyl zatím schválen jako terapeutický přístup, aplikovatelný na lidských pacientech. O detailech objevu a vývoje bortezomibu se zmíníme níže, přičemž budeme vycházet ze třech hlavních zdrojů (kde není uvedeno jinak): z rozhovoru s Julianem Adamsem pro časopis Myeloma Today (6.5.2003), z článku The Velcade Story v Boston Globe (6.5.2007) a z článku Velcade: First in a New Class of Cancer Drug na stránkách Science Progress (Harvard Medical School).

Jak už bylo zmíněno výše, Hershko a jeho skupina navazovali na práci skupiny prof. Goldberga z Harvardu, který také vymyslel název „26S proteazom“ pro entitu degradující v savcích buňkách proteiny nelyzozomální cestou. Goldbergova skupina postupně zjistila, že tyto proteazomy jsou ve všech eukaryotních buňkách a že v každé buňce jsou jich desítky tisíc. Goldberg si velice brzy uvědomil, že tyto objevy by mohly mít terapeutickou hodnotu v léčení svalové atrofie, která mívá různé příčiny – hladovění, rakovinu, AIDS, TBC – ústící do nadbytečné degradace proteinů proteazomy ve svalu. S dalšími třemi harvardskými profesory, kteří báдали v této oblasti, konkrétně s T. Maniatisem, M. Rosenblattem a K. Rockem, založil v roce 1993 Goldberg společnost MyoGenics, jež měla dosažené poznání komercializovat v podobě nových léčiv. Zde byl také připraven první známý inhibitor proteazomu, nazvaný podle jména společnosti MG132. Ve spolupráci s K. Rockem se Goldbergovi podařilo prokázat roli, jakou hrají proteazomy v imunitním systému, a spolu s Maniatisovou laboratoří objevili význam proteazomu pro aktivaci NF- κ B. Na základě Maniatisova směru výzkumu se společnost MyoGenics přejmenovala na ProScript se zaměřením nyní už ne na svalovou atrofii, nýbrž na vztah mezi proteazomy (Pro) a regulací transkripce (Script). V té době Goldberg a jeho společníci zaměstnali chemika J. Adamse, který měl už zkušenosti s prací na vývoji nových léků ve velkých farmaceutických firmách. Adams na podzim 1994 vyvinul specifický a velmi silný inhibitor proteazomu pod názvem

PS-341, pro nějž se později vžilo jméno bortezomib. V té době již Adams po konzultaci s A. Hershkem a za podpory T. Maniatis věřil, že se ProScript musí zaměřit na aplikaci bortezomibu v léčbě rakoviny. V roce 1995 se poprvé podařilo ukázat, že bortezomib in vivo (v myších) potlačuje rakovinné bujení. Goldberg, většina zaměstnanců ProScriptu a také lidé zvenčí však byli přesvědčeni, že masivní aplikace bortezomibu u lidských pacientů bude mít fatální vedlejší účinky a Adamsovo směřování nepodpořili.

Klíčovým bodem obratu byl příchod D. Livingstona do vědecké rady ProScriptu a také Adamsovo navázání spolupráce s E. Sausvillem z NCI. První klinický test bortezomibu, podávaného intravenózně jako lék VELCADE, byl tak zahájen v říjnu 1998 pod vedením R. Orlowského na University of North Carolina, která celý test také financovala. V té době totiž ProScript už neměl peníze. V roce 1997 umřel bohatý filantrop W. Steinberg, jehož společnost Health Care Ventures vlastnila všechny akcie ProScriptu. Steinbergovi nástupci Adamsovu směru nevěřili a nakonec v červnu 1999 prodali ProScript za 2,7 milionů dolarů firmě LeukoSite, jež byla tři měsíce potom koupena firmou Millenium Pharmaceuticals za 635 milionů dolarů. Všechny tyto obchody se děly v rámci Cambridge v Massachusetts, kde sídlí také Harvardova univerzita (a za Charles River v Bostonu je zase Harvard Medical School a k ní přidružené kliniky jako např. Dana-Farber Cancer Institute). Millenium Pharmaceuticals nekupovala LeukoSites kvůli VELCADE, nýbrž jako konkurenta, jenž se podílel na vývoji protizánětlivých léčiv. Adams a jeho výzkum byly zcela bezvýznamnou součástí firmy LeukoSite.

Mezitím klinický výzkum v Severní Karolíně ukázal, že VELCADE nemá vážné vedlejší účinky a může mít veliký potenciál pro léčbu některých rakovin. V roce 2000 tým R. Orlowského při aplikaci nízkých dávek VELCADE, které bývají aplikovány pouze pro ověření bezpečnosti léku, pozoroval naprosté vymizení mnohočetného myelomu u 47-leté pacientky. Za těchto okolností šéf onkologického oddělení v Millenium Pharmaceuticals, J. Bolen, již pochopil důležitost těchto výsledků a stejně pozitivně byl Adamsovým snahám nakloněn také management, vedený M. Levinem. Adams se spojil s K. Andersonem, odborníkem na mnohočetný myelom z Dana-Farber Cancer Institute, a spolu přesvědčili Levina, aby Millenium zaplatilo náklady spojené s dalšími klinickými testy léku. Zásadní důležitost pro prosazení VELCADE měly dvě další okolnosti. Jednak se Adams a Anderson spojili s organizacemi pacientů, trpících mnohočetným myelomem. Pro tento druh rakoviny tehdy nebyla prakticky žádná fungující terapie, a proto zájem na povolení VELCADE

k běžnému klinickému použití byl obrovský. Druhou zásadní okolností byla úzká spolupráce lidí z Millenium Pharmaceuticals s americkým úřadem pro povolování léčiv FDA (Food and Drug Administration). Výsledky dalších klinických testů byly tak úžasné, že dne 13. května 2003 FDA povolil VELCADE pro léčbu pacientů s relapsujícím mnohočetným myelomem, a to ještě předtím, než byla dokončena 3. fáze klinických testů, která je obvykle pro takové povolení nezbytná.

V roce 2008 byl VELCADE v USA povolen jako lék první volby proti mnohočetnému myelomu a dnes se používá zejména v kombinaci s jinými léčivy [43]. VELCADE je indikován k léčbě mnohočetného myelomu běžně i v Evropě, v Japonsku a jinde na světě. Pro Millenium Pharmaceuticals se tento lék stal velmi významným zdrojem příjmů (podle článku v Boston Globe jde o třetinu všech zisků firmy). Ve většině případů VELCADE ovšem nepředstavuje úplnou léčbu nemoci, nýbrž „jen“ prodloužení života v řádu měsíců. VELCADE se také s různými úspěchy kombinuje s jinými kancerostatiky. Podle jedné z nedávných studií [44] ze 64 pacientů s mnohočetným myelomem, kteří brali VELCADE, 9% bylo vyléčeno a 41% dosáhlo aspoň částečného potlačení nemoci. Medián trvání citlivosti nemoci na lék byl 8,4 měsíců a medián doby, než došlo k další progresi nemoci, byl 17,3 měsíců. V současné době existují stovky klinických testů VELCADE proti mnohočetnému myelomu i dalším typům rakoviny. V zásadě se ukazuje, že VELCADE selhává v případech pevných nádorů, zatímco některé krevní nádory (lymfomy) jsou na něj citlivé (podrobnosti jsou v tabulce, více informací k jednotlivým klinickým testům lze najít na PubMedu).

Přes stovky studií a publikací o působení VELCADE na celý organismus i na buněčné kultury stále nevíme, proč vlastně tento lék přednostně zabíjí rakovinné buňky a zdravé buňky nechává žít. Jisté je, že inhibice proteazomů představuje simultánní zásah do obrovského množství buněčných dějů najednou a ne ve všech typech rakovinných linií *in vitro* vyvolává tytéž změny. Některé ze základních mechanismů smrtícího účinku VELCADE na rakovinné buňky byly shrnuty v publikaci [45] z podzimu 2008. V této publikaci se stále ještě opakuje počáteční dogma (přejaté v mnoha stovkách článků), že jedním z klíčových mechanismů, které jsou zodpovědné za účinek VELCADE na buňky mnohočetného myelomu, je inhibice NF- κ B, a to přes tehdy už známá data z různých studií, která v roce 2008 shrnuli v přehledném článku autoři tohoto skriptu [46]. Přelomová práce potom vyšla v červenci 2009 v časopise Blood z týmu profesora Andersona z Dana-Farber Cancer Institute. Autoři prokázali, že VELCADE nejenže neinhibuje NF- κ B v buňkách mnohočetného myelomu,

odebraných z pacientů, nýbrž tento transkripční faktor dokonce aktivuje, a tím snižuje svůj vlastní smrtící efekt na tyto buňky (který je posílen přidáním specifického inhibitoru NF-κB) [47]. V roce 2009 se tedy správná odpověď na otázku, jak VELCADE zabíjí rakovinné buňky v lidském těle, stala ještě záhadnější. Limitace může být i v tom, že drtivá většina publikovaného výzkumu na toto téma se děje v nádorových liniích *in vitro* a nereflektuje tak dostatečně realitu procesů v těle léčených pacientů.

typ onemocnění	výsledky klinických testů
mnohočetný myelom	v klinické léčbě
lymfom plášťových buněk	v klinické léčbě
lymfom kožních T-buněk	signifikantní aktivita ve 2. fázi testů*
MALT lymfom	signifikantní aktivita ve 2. fázi testů
Waldenströмова makroglobulinemie	signifikantní aktivita ve 2. fázi testů
chronická lymfocytární leukemie	biologická aktivita ve 2. fázi testů
dětská leukemie	nízká aktivita v 1. fázi testů
sarkomy měkkých tkání	nízká aktivita ve 2. fázi testů
malobuněčný karcinom plic	nízká aktivita ve 2. fázi testů
kolorektální karcinom	žádná aktivita ve 2. fázi testů
melanom	žádná aktivita ve 2. fázi testů
neuroendokrinní nádory	žádná aktivita ve 2. fázi testů
rakovina prsu	žádná aktivita ve 2. fázi testů
nemalobuněčný karcinom plic	žádná aktivita ve 2. fázi testů
karcinom žaludku a jícnu	žádná aktivita ve 2. fázi testů

Tabulka č.9: Výsledky klinických testů léku VELCADE (bez kombinace s jinými léčivy), stav na konci roku 2010.

*(Klinické testy nových léčiv se klasicky rozdělují do tří fází. V první fázi (20-100 pacientů) se ověřuje bezpečnost používané látky, její farmakokinetika a farmakodynamika a vhodné

dávkování pro další testy. Ve druhé fázi klinických testů (20-300 pacientů), do níž nové léčivo zpravidla postupuje až po zjištění, že je dostatečně bezpečné, se zjišťuje zejména jeho schopnost dosáhnout žádoucího účinku proti dané nemoci. Samozřejmě se stále monitorují všechny nežádoucí vedlejší účinky. Je-li nové léčivo dostatečně efektivní, postupuje do třetí fáze klinických testů (300-3000 i více pacientů), která je nejdražší, nejdelší a nejnáročnější. Jde o randomizované, multicentrické studie, jejímž cílem je zjistit, zda nové léčivo (či jeho kombinace s jinými léčivy) je účinnější proti dané nemoci než současný zlatý standard léčby. Teprve na základě výsledků třetí fáze klinických testů dochází k povolení nového léčiva pro léčbu dané nemoci v běžné klinické praxi. Třetí fáze testů může ovšem probíhat pro různé kombinace daného léčiva s jinými léčivy i po jeho povolení, např. v současnosti lze najít na stránkách NCI 24 klinických testů VELCADE ve třetí fázi, všechny proti mnohočetnému myelomu. Cena klinických testů jednoho nového léčiva od začátku první fáze testů až po jeho uvedení do běžné klinické péče se odhaduje [48] na půl miliardy USD (1 USD v hodnotě z roku 2000). Díky výrazné variabilitě v lidské populaci se však musí sledovat bezpečnost a účinnost daného léku i při jeho běžném používání, což bývá označováno za čtvrtou fázi klinických testů. Nedávno bylo navrženo [49], aby se během této fáze sledovaly i případné nečekané pozitivní účinky daného léku na jiné nemoci, jimiž pacient trpí zároveň.)

NOVÉ KLINICKY TESTOVANÉ LÁTKY ZASAHUJÍCÍ UPS

Lék VELCADE má mnohé nevýhody: podává se injekčně, není příliš účinný, nefunguje v pevných tumorech a i pacienti s mnohočetným myelomem si na něj vytvářejí zpravidla rezistenci. Existuje proto značná poptávka po dalších, nových inhibitech proteazomu, jež by mohly přinést onkologickým pacientům větší užitek a farmaceutickým firmám nové zisky. Zmíníme se nejprve o tzv. druhé generaci inhibitorů 20S proteazomu a budeme vycházet z publikace, vydané vědci z Millenium Pharmaceuticals [50].

V současnosti jsou v klinických testech následující látky: MLN9708 (Millenium Pharmaceuticals), CEP-18770 (Cephalon & Cell Therapeutics Europe), Carfilzomib (Proteolix) a NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals). MLN9708 je chemicky podobný bortezomibu a podobně jako bortezomib inhibuje 20S proteazom reverzibilně (po nějaké době se uvolní z místa navázání na 20S proteazom). Oproti bortezomibu je účinný také při perorálním podání. Na stránkách NCI lze najít čtyři právě probíhající klinické testy (fáze 1-2)

této látky (mnohočetný myelom, pevné nádory, lymfom). CEP-18770 je také reverzibilní inhibitor 20S proteazomu (opět chemicky podobný bortezomibu), podává se však intravenózně. V současné době probíhá pouze jeden klinický test této látky (fáze 2, mnohočetný myelom). Obě další látky jsou ireverzibilní inhibitory 20S proteazomu a patří do zcela jiných chemických skupin: na rozdíl od bortezomibu, který je odvozen od kombinace monoalkylborité kyseliny a dipeptidu, carfilzomib je kombinací epoxyketonu a tretrapeptidu a NPI-0052 je bicycklý γ -laktam- β -lakton. NPI-0052 je znám také jako salinosporamid A a byl původně izolován z jedné mořské bakterie. Pro tuto látku lze najít na stránkách NCI čtyři probíhající klinické testy (intravenózně, fáze 1, mnohočetný myelom, pevné nádory, lymfom). Carfilzomib je testován v osmi klinických testech (intravenózně, fáze 1-2, lymfom, leukemie, pevné nádory), v kombinaci s jinými léky dokonce už ve fázi 3 u pacientů s mnohočetným myelomem. VELCADE (bortezomib) však zatím zůstává stále jediným klinicky používaným inhibitorem proteazomu.

Původní Hershkova idea při jeho rozhovoru s Adamsem však nespočívala v tom zastavit degradaci proteinů jako takovou. Inhibitory 20S proteazomu zasahují příliš mnoho buněčných dějů. Hershko uvažoval v tom smyslu, jak ovlivnit degradaci konkrétních vybraných proteinů, o nichž se ví, že hrají významnou roli ve vzniku a progresi rakoviny. Pro takový přístup je nutné inhibovat konkrétní E3 ligázy, jež rozhodují o ubikvitinaci těchto proteinů. První takový inhibitor (MLN4924) vstoupil do klinických testů zcela nedávno a pochází z produkce Millenium Pharmaceuticals [51]. Ve skutečnosti nejde o inhibitor přímo nějaké E3 ligázy, nýbrž o inhibitor enzymu NAE (NEDD8-activating enzyme), který reguluje jednu skupinu E3 ligáz. V tom smyslu MLN4924 představuje zcela unikátní přístup k léčbě rakoviny, jenž dosud nebyl vůbec vyzkoušen. Na stránkách NCI lze najít čtyři klinické testy této látky (intravenózně, fáze 1, melanom, leukemie, lymfom, mnohočetný myelom a také pevné nádory).

Další dosud „exotickou“ možností, jak ovlivnit UPS, je inhibování deubikvitináz. V roce 2007 vědci z Millenium Pharmaceuticals navrhli jako jeden z nadějných cílů protinádorové terapie už výše zmíně Poh1 ve víku 26S proteazomu [52]. Je docela možné, že jeden starý lék, používaný desítky let proti alkoholismu (antabus neboli disulfiram), je schopen Poh1 a jiné JAMM doménové DUB inhibovat, a tím velmi efektivně potlačovat rakovinu. V dalším textu se pokusíme ukázat, co je o tom už známo. Je to jedno z hlavních výzkumných témat našeho pracoviště. Přehled celé problematiky lze najít v publikaci [53].

PŘÍBĚH ANTABUSU

Pro možnost, že antabus je schopen potlačovat některá onkologická onemocnění svědčí několik roztroušených klinických pozorování. V jednom zapadlém článku z roku 1977 [54] doktor E. F. Lewison z Johns Hopkins Hospital popisuje případ ženy, která v roce 1956 ve svých 35 letech byla operována kvůli agresivní rakovině prsu. O tři roky později se u ní objevila vážná bolest zad, čehož příčinou se ukázaly vážné metastázy v páteři, žebrech a pánvi. V roce 1961 se pacientka stala alkoholičkou a musela užívat antabus. Během následujících deseti let došlo k úplnému vymizení všech metastáz. Žena umřela v roce 1971 díky pádu z okna v těžké opilosti, z hlediska onkologického však naprosto zdravá. Lewison spekoval o protirakovinné aktivitě antabusu v důsledku jeho základní schopnosti inhibovat enzym acetaldehyd dehydrogenázu.

Na přelomu 80./90. let se stala populární látka, nazývaná ditiocarb nebo také immuthiol. Tato látka vzniká v těle z antabusu po jeho požití a vyznačuje se vysokou reaktivitou, mj. je schopna reagovat s mědí, obsaženou v krvi, a vytvářet komplex, který si označme zkratkou CuEt. Věřilo se, že ditiocarb je schopen mít příznivý vliv na imunitu a mohl by tedy být vhodným lékem proti HIV/AIDS. Některé klinické testy publikované v prestižních časopisech (Lancet, JAMA) ukázaly na podivuhodnou účinnost ditiocarbu proti tomuto onemocnění. Další klinické testy však selhaly a když se zjistilo, že ditiocarb nemá na imunitu pacientů s HIV/AIDS žádný vliv, upadl celý příběh do zapomnění. Úspěch klinických testů ditiocarbu proti HIV/AIDS zůstal dodnes nevysvětlen. Zdá se však, že jeho účinnost mohla být výrazně ovlivněna množstvím mědi ve stravě pacientů a vůbec nesouvisela s vlivem na imunitu, nýbrž se schopností CuEt inhibovat proteazom [55]. Pro nás je však podstatné, že ditiocarb byl ještě v době své slávy využit také v klinickém testu na 64 pacientkách (fáze 2) s rakovinou prsu (nezávisle na Lewisonovi). Výsledky byly velmi pozitivní: po šesti letech žilo ve skupině, beroucí ditiocarb, 81% pacientek, zatímco ve skupině s placebem pouhých 55% pacientek [56]. Autoři vycházeli v tomto testu z předpokladu, že ditiocarb příznivě ovlivňuje imunitní systém. Když se tento předpoklad ukázal mylný, získaná data přestávala dávat smysl a další výzkum byl opuštěn.

Potom se antabus začal znovu vnucovat lidské pozornosti na základě experimentů, jež provedla skupina profesora T. P. Kennedyho na Utah University. Tito výzkumníci nezávisle na obou již zmíněných publikacích objevili, že antabus má silnou protinádorovou aktivitu, když

vytváří komplexy s kovy, zejména se zinkem a mědí. Rozhodli se aplikovat své výsledky u beznadějně nemocné pacientky s velkou metastází melanomu v játrech. Pacientka brala zvláště antabus a glukonát zinečnatý každý den. Po třech měsících metastáze zmizela a došlo k úplnému obnovení zdraví, takže nebylo již zapotřebí žádné hospitalizace. Až do publikování výsledků v roce 2004 žila žena s každodenní dávkou antabusu a zinku po dobu 55 měsíců bez zhoršení zdraví [57]. Důvod této pozoruhodné protinádorové aktivity bylo však obtížné najít až do objevu, který udělal profesor Q. P. Dou v Detroitu se svým týmem. Při experimentování v jeho laboratoři se totiž ukázalo, že CuEt je silný inhibitor proteazomu, a to dokonce in vivo v myších, kde efektivně potlačoval xenografty odvozené od lidské prsní nádorové linie [58]. Z výsledků obou amerických týmů potom vyšel klinický test na Huntsman Cancer Institute v Utahu, zahájený v létě 2008 a trvající dodnes (investorem je University of Utah). V tomto testu 1. fáze je pacientům s nádory jater (primárními i sekundárními, s určením původu i bez určením původu) perorálně podáván antabus a glukonát měďnatý, každý zvláště.

Působí-li antabus, potencovaný mědí, tak výrazně proti pevným nádorům, zdá se, že bude inhibovat proteazom nějakým jiným způsobem než VELCADE. Způsob inhibice proteazomu pomocí CuEt je nyní tou vskutku vzrušující otázkou. Ve spolupráci se skupinou profesora Doua jsme ukázali, že CuEt není schopen inhibovat 20S proteazom a jeho cílem je mnohem spíše Pih1 ve víku 26S proteazomu [59]. Mechanismus protinádorového účinku látky CuEt, která vzniká v našem těle po požití antabusu či ditiocarbu [60], je však dnes ještě mnohem větší otázkou než mechanismus účinku bortezomibu.

Literatura k DEGRADACE PROTEINŮ V BUŇCE

- [1] Todde V et al. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:3-13.
- [2] Schubert U et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770-774.
- [3] Hirsch C et al. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 2009;458:453-460.
- [4] Kaganovich D et al. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 2008;454:1088-1095.

- [5] Reits EA et al. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J* 1997;16:6087-6094.
- [6] Kumatori A et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7071-7075.
- [7] Wojcik C & DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:579-589.
- [8] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 2009;37:937-953.
- [9] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 2005;12:1191-1197.
- [10] Etlinger JD & Goldberg AL. Soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:54-58.
- [11] Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004;116:181-190.
- [12] Jin J et al. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007;447:1135-1138.
- [13] Rotin D & Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:398-409.
- [12] Deshaies RJ & Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009;78:399-434.
- [15] Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: “one size” doesn’t fit all. *Trends Biochem Sci* 2005;30:183-187.
- [16] Ikeda F & Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep* 2008;9:536-542.
- [17] Saeki Y et al. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* 2009;28:359-371.
- [18] Newton K et al. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 2008;134:668-678.

- [19] Komander D et al. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:550-563.
- [20] Sowa ME et al. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 2009;138:389-403.
- [21] Bedford L et al. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* 2010;20:391-401.
- [22] Strehl B et al. Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19-30.
- [23] Murata S et al. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol* 2008;20:192-196.
- [24] De Martino GN & Gillete TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 2007;129:659-662.
- [25] Kriegenburg F et al. Mammalian 26S proteasomes remain intact during protein degradation. *Cell* 2008;135:355-365.
- [26] Li X & De Martino GN. Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin. *Biochem J* 2009;421:397-404.
- [27] Sharon M et al. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* 2006;4:1314-1323.
- [28] Verma R et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002;298:611-615.
- [29] Baugh JM et al. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol* 2009;386:814-827.
- [30] Verma R et al. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 2004;118:99-110.
- [31] Crosas B et al. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell* 2006;127:1401-1413.

- [32] Hanna J et al. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell* 2007;129:747-759.
- [33] Koulich E et al. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 2008;19:1072-1082.
- [34] Striebel F et al. Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:209-217.
- [35] Sharon M et al. 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J Biol Chem* 2006;281:9569-9575.
- [36] Hutschenreiter S et al. Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. *EMBO J* 2004;23:2488-2497.
- [37] Kohler A et al. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001;7:1143-1152.
- [38] Vabulas RM & Hartl FU. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* 2005;310:1960-1963.
- [39] Klotzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004;5:661-669.
- [40] Rape M & Jentsch S. Productive RUPTure: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:209-213.
- [41] Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006;443:780-786.
- [42] Schwartz AL & Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:73-96.
- [43] San Miguel JF et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008;359:906-917.
- [44] Richardson PG et al. Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *J Clin Oncol* 2009;27:3518-3525.

- [45] McConkey DJ & Zhu K. Mechanism of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 2008;11:164-179.
- [46] Cvek B & Dvorak Z. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov Today* 2008;13:716-722.
- [47] Hideshima T et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells. *Blood* 2009;114:1046-1052.
- [48] DiMasi JA et al. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003;22:151-185.
- [49] Boguski MS et al. Repurposing with a difference. *Science* 2009;324:1394-1395.
- [50] Dick LR & Fleming PE. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010;15: 243-249.
- [51] Soucy TA et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 2009;458:732-737.
- [52] Gallery M et al. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther* 2007;6:262-268.
- [53] Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;in press.
- [54] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Progr Clin Biol Res* 1977;12:47-53.
- [55] Cvek B. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: was diet the reason? *Curr HIV Res* 2009;7:254.
- [56] Dufour P et al. Sodium ditiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy* 1993;6:9-12.
- [57] Brar SS et al. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1049-1060.

[58] Chen D et al. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res* 2006;66:10425-10433.

[59] Cvek B. et al. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem* 2008;51:6256-6258.