

## **Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jana Duška: „Development of novel Constitutive androstane receptor (CAR) ligands“**

Disertační práce je předkládána k obhajobě před ukončením doktorského studia v oboru Farmakologie a toxikologie na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Byla vypracována pod odborným vedením školitele pana prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D.

Práce se zaměřila na aktuální problematiku úlohy nukleárních receptorů (NR) při regulaci metabolických pochodů zahrnujících endogenní i exogenní látky včetně léčiv. NR ovlivňují řadu dějů v organismu, jako jsou růst a vývoj, metabolismus, homeostatické děje a reakce imunitního systému. Proto jsou považovány za potenciální molekulární cíle pro nová léčiva v řadě terapeutických oblastí (nádory, metabolická onemocnění, poruchy autoimunity, neurodegenerativní onemocnění aj.). Agonisté PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  jsou příkladem úspěšného využití NR při farmakoterapii. Detailní pozornost byla věnována konstitutivnímu androstanovému receptoru (CAR). Jedná se o vhodně zvolené téma, protože současné poznatky o tomto nukleárním receptoru jsou značně neúplné. CAR a pregnanový X receptor plní důležitou funkci senzorů, které mobilizují metabolismus a exkreci toxických xenobiotik a endobiotik.

Školitelské pracoviště se systematicky věnuje problematice mechanismů regulace metabolismu a transportu léčiv prostřednictvím intracelulárních receptorů již delší dobu a na mezinárodním měřítku velmi vysoké úrovni. Publikace z této oblasti od autorů z pracovní skupiny prof. Pávka získaly opakovaně ocenění České společnosti pro experimentální a klinickou farmakologii a toxikologii a také cenu předsednictva ČLS JEP za nejlepší vědeckou práci za rok 2016. Na kvalitě disertační práce se projevila hluboká znalost problematiky a dostupnost vhodných výzkumných metod počínaje *in silico* molekulárním modelováním přes celé spektrum *in vitro* metod až po *in vivo* humanizované experimentální modely.

Disertace má standardní formu komentovaného souboru publikací. Je přehledně uspořádána a pečlivě sepsána v anglickém jazyce. Teoretická část má 28 stran. Mgr. Dušek v ní uvádí základní informace k tématu v dostatečném rozsahu a správně akcentuje poznatky se vztahem k cílům vlastní práce. První kapitola stručně popisuje strukturu nukleárních receptorů,

mechanismy regulace genové transkripce a relevantní cílové geny a proteiny, významné pro eliminaci xenobiotik. Ve druhé kapitole jsou uvedeny podrobné informace o strukturách lidských a myších genů a proteinů CAR. Detailně je popsána přímá aktivace CAR po vazbě ligandu na vazebné místo na receptoru a nepřímý mechanismus, při kterém jsou defosforylace CAR a jeho přesun do jádra vyvolány prostřednictvím vazby ligandů na receptor pro epidermální růstový faktor (např. fenobarbital) a antagonizací účinku tohoto faktoru. Dále jsou představeny doposud známé ligandy CAR a látky, které aktivují CAR nepřímým mechanismem. Následující podkapitoly podrobně uvádějí, které enzymy a transportéry CAR ovlivňuje a jakými mechanismy. Pozornost je věnována také vlivu CAR na metabolismus endogenních látek (glukosa, lipidy, bilirubin, žlučové kyseliny a některé hormony) a na buněčnou proliferaci a apoptózu. Na závěr jsou uvedeny základní poznatky o jiných zástupcích intracelulárních receptorů s funkcí xenosenzorů – pregnanovém X receptoru (PXR) a receptoru pro aromatické uhlovodíky (AHR). Splnění cílů disertace dokládají přiložené původní vědecké práce publikované v časopisech s impaktním faktorem. Komentáře jednotlivých prací mají přiměřený rozsah a jsou informativní. Výsledky jsou detailně diskutovány v publikacích. Diskuse v části 7 spisu představuje spíše stručný souhrn a vytyčení dalších směrů navazujícího výzkumu.

### **Vyjádření ke splnění cílů práce a dotazy oponenta**

**Cíl práce 1:** Identifikovat nové ligandy nukleárních receptorů PXR a CAR z oblasti potravinových aditiv rostlinného původu. Ověřit, zda umělé sladidlo steviosid a jeho metabolit, necukerná složka glykosidu steviol jsou ligandy intracelulárních receptorů

Cíl byl splněn. Měření aktivace intracelulárních receptorů pomocí transfekce několika eukaryotní nádorových buněčných linií reportérovými plasmidy s luciferasou, studium genové a proteinové exprese vybraných isoform CYP450 a sledování jejich enzymové aktivity v buněčných liniích a primárních lidských hepatocytech ukázalo, že steviol mírně aktivuje PXR a AHR receptor a neovlivňuje jiné intracelulární receptory. Steviosid neměl na studované receptory vliv. V kultuře primárních lidských hepatocytů steviol zvýšil genovou expresi a enzymatickou aktivitu CYP3A4 a 1A2 a vykázal slabou inhibiční aktivitu vůči CYP3A4 a 2C9.

Jedná se o originální poznatky ukazující na možnost interakcí mezi léčivými – substráty CYP3A4 a 2C9 a umělými sladidly – glykosidy steviolu.

**Otázka 1:** Pokuste se o *in vitro-in vivo* extrapolaci závěrů práce. Jaké jsou *in vivo* poznatky o kinetice glykosidů steviolu. Jsou koncentrace použité v *in vitro* studiích dosažitelné po konzumaci potravin a nápojů obsahujících tato sladidla?

**Cíl práce 2:** Objev nových ligandů myšního CAR – polyfenolů se strukturou blízkou stilbenu. Studium interakce mezi tetramethoxystilbenem a CAR pomocí CAR-dependenčních genů.

Cíl práce byl splněn. Originálním poznatkem je zjištění, že tetramethoxystilben je agonistou na myším CAR, který indukce myší enzymy Cyp a další proteiny závislé na CAR. Na rozdíl od známého ligandu TCPOBOP nezpůsobuje proliferaci hepatocytů a jaterní hypertrofii u myší *in vivo*, neovlivňuje CAR-dependenční geny způsobující proliferaci a stimuluje apoptózu mechanismem nezávislým na CAR.

**Cíl práce 3:** Studium teriflunomidu jako nepřímého agonisty lidského CAR receptoru.

Cíl práce byl splněn. Leflunomid je již dlouho používán jako klasické alternativní imunosupresivum-DMARD v léčbě revmatoidní artritidy. Teriflunomid je jeho dominantní cirkulující metabolit vznikající především v důsledku mohutného first-pass efektu. Zajímavostí teriflunomidu je extenzivní enterohepatální cirkulace v rozsahu podobném žlučovým kyselinám. Teriflunomid je vlastní účinnou látkou. Nově se uplatňuje v léčbě roztroušené sklerózy. Cíl práce byl splněn. Práce přinesla originální a velice zajímavé poznatky. Bylo prokázáno, že teriflunomid nepřímo aktivuje CAR stejným mechanismem jako fenobarbital a fenytoin – zásahem do signální kaskády EGFR. Dalším zjištěním je, že teriflunomid a leflunomid aktivují glukokortikoidní receptor a na něm závislé geny ovlivňující glukoneogenezi a syntézu žlučových kyselin.

**Otázka 2.** Jaké riziko interakcí mezi jinými léčivými a leflunomidem / teriflunomidem plyne z ovlivnění enzymů a transportérů závislých na CAR? Přinesly doposud publikované klinické interakční studie s leflunomidem / teriflunomidem poznatky potvrzující vaše výsledky?

**Cíl práce 4.** Vývoj nových selektivních agonistů CAR zahrnující screening knihoven kandidátních látek, identifikaci možných selektivních a silných agonistů a ověření interakce perspektivních kandidátních molekul s CAR v primárních lidských hepatocytech a pomocí humanizovaného myšního modelu (hCAR/hPXR/hCYP3A4). Na buněčných liniích byla testována také cytotoxicita vybraných agonistů a jejich vliv na aktivitu CYP450 v mikrosomálních esejích. Oponent se nemohl podrobně seznámit s výsledky této části disertace, protože jsou podkladem pro patentovou přihlášku EP 19171938.4. Tato skutečnost dokládá splnění cíle 4.

### **Publikační aktivita uchazeče**

Mgr. Dušek je prvním autorem dvou původních prací v časopisech s významným impaktním faktorem, týkajících se tématu PGS. První byla otištěna v časopise Food and Chemical

Toxicology (IF 3.8) a druhá byla přijata do tisku v časopise Toxicology Letters (IF 3.5). Uchazeč je spoluautorem třetí publikace výsledků získaných při PGS studiu v časopise Frontiers Pharmacology (IF 3.85). Jedná se o renomovaná periodika s náročným recenzním řízením. Výsledky získané při PGS studiu podpořily patentovou přihlášku. V seznamu publikační činnosti je dále spoluautorství 3 prací otištěných v časopisech s významným IF, které nevznikly jako náplň PGS studia, ale řeší podobnou problematiku.

### **Závěr a doporučení.**

Disertační práce Mgr. Duška je velmi kvalitní. Přinesla mnoho originálních poznatků. Uchazeč prokázal schopnost dobře teoreticky a prakticky zvládnout náročné výzkumné projekty a mnoho experimentální technik. Podle prohlášení o autorství byl jeho podíl na publikacích zásadní. Podílel se na designu experimentů, realizoval jejich velký počet a byl velmi aktivní i v publikační fázi. Publikační aktivita uchazeče převýšila požadavky na studenty PGS na UK.

**Proto doporučuji komisi pro obhajobu, aby přijala disertační práci jako podklad pro udělení akademického titulu Ph.D.**

V Hradci Králové, 6. 9. 2019

---

Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.

Ústav farmakologie

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové