

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie



Farmakologické ovlivnění nukleárních receptorů při terapii diabetes mellitus

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Jakub Draský

Rád bych vyjádřil svůj vděk prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D.: za obrovskou trpělivost, odborné rady a připomínky, za jeho kolegiální a lidský přístup a čas, který mé diplomové práci věnoval.

Abstrakt

Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Jakub Draský

Školitel: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Farmakologické ovlivnění nukleárních receptorů při terapii diabetes mellitus

Nukleární receptory přísluší do superrodiny transkripčních faktorů, mezi jejich hlavní funkce patří regulace exprese cílových genů. Ve svojí práci jsem se věnoval hlavně skupině sirotčích receptorů, konkrétně pregnanovému X receptoru (PXR) a konstitutivnímu androstanovému receptoru (CAR). Společným znakem těchto receptorů je jejich aktivace pomocí specifického ligandu. CAR i PXR mají nezbytnou funkci jako biologické senzory hydrofobních xenobiotik, když indukují enzymy I. a II. fáze metabolismu. Zásadní význam mají také při regulaci glukoneogeneze, inzulínové odpovědi, adipogeneze, homeostáze cholesterolu, mastných kyselin, triglyceridů a glykogenu.

Cílem této experimentální práce bylo zavést metodu luciferázové reportérové eseje pro dva DNA konstrukty obsahující promotorovou oblast genů PEPCK a CYP7A1. Pro aktivaci PXR jsme použili známého agonistu rifampicin a antagonistu SPA70. Jako agonistu CAR receptoru jsme použili látku CITCO.

Funkčnost metody luciferase reporter gene assay jsme si nejdříve ověřili s luciferázovým vektorem pro gen CYP3A4. Výsledky ukázaly, že rifampicin a CITCO významně aktivovali CYP3A4 luciferázový vektor. V dalších experimentech jsme pozorovali významnou deaktivaci CYP7A1 luciferázového vektoru rifampicinem, což odpovídá funkci PXR při potlačení exprese tohoto genu *in vivo*. V případě experimentů s vektorem pro PEPCK jsme pozorovali nespecifickou reakci rifampicinu, CITCA i SPA70 na aktivaci tohoto vektoru.

Závěrem lze říct, že jsme ověřili funkčnost metody luciferázové reportérové eseje s vektorem s promotorovou oblastí genu CYP7A1. Metoda pro druhý vektor nebyla dostatečně optimalizována.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Jakub Draský

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Pharmacological influence of nuclear receptors in diabetes mellitus therapy

Nuclear receptors belong to the superfamily of transcription factors, their main functions include regulating the expression of target genes. In my work I focused mainly on the group of orphan receptors, namely the pregnane X receptor (PXR) and the constitutive androstane receptor (CAR). A common feature of these receptors is their activation by a specific ligand. Both CAR and PXR have an essential function as biological sensors of hydrophobic xenobiotics when they induce enzymes I and II. phase of metabolism. They are also essential in the regulation of gluconeogenesis, insulin response, adipogenesis, cholesterol homeostasis, fatty acids, triglycerides and glycogen.

The aim of this experimental work was to introduce a luciferase reporter assay method for two DNA constructs containing the promoter region of the PEPCK and CYP7A1 genes. We used the known agonist rifampicin and the antagonist SPA70 to activate/deactivate PXR. We used CITCO as a CAR receptor agonist.

We first verified the functionality of the luciferase reporter gene assay method with a luciferase vector for the CYP3A4 gene. The results showed that rifampicin and CITCO significantly activated the CYP3A4 luciferase vector. In further experiments, we observed significant inactivation of the CYP7A1 luciferase vector by rifampicin, corresponding to the function of PXR in suppressing the expression of this gene in vivo. In the case of experiments with the vector for PEPCK, we observed a non-specific reaction of rifampicin, CITCA and SPA70 to the activation of this vector.

In conclusion, we verified the functionality of the luciferase reporter assay method with a vector with the promoter region of the CYP7A1 gene. The method for the second vector was not sufficiently optimized.

Obsah

1. Seznam zkratk.....	7
2. Úvod.....	9
2.1. Genová exprese	9
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1. Diabetes mellitus	10
3.1.1. Regulace glykémie při diabetes mellitus.....	12
3.1.2. Regulace syntézy glukózy v játrech	13
3.1.3. Klíčové geny v intermediálním metabolismu glukózy.....	15
3.2. Nukleární receptory	18
3.2.1. Struktura a funkce nukleárních receptorů.....	19
3.2.2. Pregnanový X receptor	20
3.2.3. Ligandy PXR.....	22
3.2.4. Konstitutivní androstanový receptor	24
3.2.5. Ligandy CAR	25
3.2.6. Ovlivnění metabolismu glukózy ligandy receptorů PXR a CAR.....	28
3.2.7. Klíčové geny metabolismu glukózy ovlivněné ligandy receptorů PXR a CAR.....	29
3.2.8. CYP7A1	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
5. CÍL PRÁCE.....	33
5.1. Chemikálie a média	34
5.2. Pomůcky a přístroje.....	35
5.3. Buněčná linie HepG2	35
5.4. Transfekce	36
5.5. Luciferase gene report assay (luciferázová reportérová esej).....	37
5.6. Dual-Luciferase report gene assay	39
5.7. Pracovní postup metody	40
5.8. Statistické zpracování dat.....	41
6. Výsledky.....	42

6.1.	Efekt známých ligandů PXR a CAR receptorů na luciferázový konstrukt p3A4-luc	43
6.2.	Efekt známých ligandů PXR a CAR receptoru na luciferázový reportérový vektor pCYP7A1-luc v HepG2 buňkách	44
6.3.	Efekt známých ligandů PXR a CAR receptoru na pPEPCK1-Gussia luciferase vektor s a bez kotransfekce pSG5-PXR vektorem v HepG2 buňkách	46
7.	Diskuze	47
8.	Závěr	52
9.	Literatura	53
9.1.	Firemní literatura	60
9.2.	Seznam obrázků	61
9.3.	Seznam tabulek	61

1. Seznam zkratek

AF1 – aktivačně funkční doména 1

AF2 – aktivačně funkční doména 2

ATP – adenosintrifosfát

BMI – body mass index

cAMP – cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát

cDNA – kódující sekvence pro protein

CAR – konstitutivní androstanový receptor

CCRP – cytosolový CAR retenční protein

CITCO – 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehydeO-(3,4-dichlorobenzyl)oxime

CNS – centrální nervová soustava

CYP – cytochrom P450

DBD – doména vázající DNA

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DM – diabetes mellitus

DM1 – inzulin-dependentní diabetes mellitus

DM2 – non-inzulin-dependentní diabetes mellitus

FoxO1 – forkhead box protein O1

GLUT – glukózový přenašeč

GRIP1 – Glutamate Receptor Interacting Protein 1

G-1-P – glukóza 1-fosfát

G-6-P – glukóza-6-fosfát

G6Páza – glukóza-6-fosfatáza

HNF4 α – hepatocytární faktor 4 α

Hsp90 – heat shock protein 90

IRS – inzulinová responzivní sekvence

LBD – doména vázající ligandy

mRNA – mediátorová RNA

NADH – Nikotinamidadenindinukleotid

NR – nukleární receptor

oGTT – orální glukózový toleranční test

PB – Fenobarbital

PCN – pregnolon-16 α -karbonitril

PEPCK1 – fosfoenylpyruvát karboxykináza 1

PGC-1 α – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PXR – pregnanový X receptor

RE – responzivní element

RXR – retinoidní X receptor

SGLTs – na sodíku závislé kotransportéry glukózy

siRNA – small interfering RNA

SULTs – sulfottransferázy

2. Úvod

2.1. Genová exprese

Přepis genetické informace do funkčního proteinu je složitý proces, nazývaný genová exprese. Její regulace může probíhat na několika úrovních, pro její regulaci jsou využívány transkripční faktory a nukleární receptory, epigenetická regulace, nebo regulace zprostředkované stabilizací/degradací mRNA. Některé nukleární receptory jsou významným mechanismem genové regulace enzymů 1. a 2. fáze biotransformace. např. Pregnanový X receptor (PXR) nebokonstitutivní androstanový receptor (CAR), jiné se podílí na zprostředkování funkcí hormonů (např. nukleární receptory pro steroidní hormony).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je chronické heterogenní onemocnění, pro které je charakteristickým projevem hyperglykémie v důsledku absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu. Toto stále častěji se vyskytující onemocnění postihuje vyspělé ale i rozvojové státy. V České republice touto chorobu trpí 8–9 % obyvatel z celkové populace (Karen et al.; 2018). Rozlišujeme několik klinických forem, které se od sebe odlišují rozdílnou etiologií, klinickými projevy a průběhem. Naopak jejich společným znakem je hyperglykémie a předčasný rozvoj aterosklerózy. Etiopatogeneze tohoto onemocnění zahrnuje faktory ovlivnitelné (ze zevního prostředí např. intoxikace nebo virové infekce), ale i neovlivnitelné (genetické) (Svačina, 2010).

Podle Světové zdravotnické organizace rozlišujeme tyto typy.

Tabulka 1 - Klasifikace DM

Klasifikace DM	Charakteristika
Diabetes mellitus 1. typu	zánik B buněk
Diabetes mellitus 2. typu	nedostatečná inzulínová citlivost
Ostatní specifické typy diabetu	současně probíhající onemocnění
Gestační diabetes	riziko vzniku DM po porodu
Hraniční poruchy glukózové homeostázy	glykémie nalačno, OGTT

Tabulka modifikována z Škrha 2009

Diabetes I. typu je onemocnění při kterém dochází k vyčerpání nebo úplnému nedostatku inzulínu. Charakterizuje se velmi rychlým zánikem β -buněk pankreatu již v dětství nebo mladistvém věku, proto je také typická pro mladší osoby a děti. Pro DM1 je příznačný rozvoj ketoacidózy a hromaděním ketolátek konkrétně β -hydroxybutyrátu a acetacetátu. Klinické příznaky zahrnují úbytek hmotnosti, žízeň, polyurii, dehydrataci, hypotenzi, která může vyvolat až šokový stav. Mezi laboratorní ukazatele řadíme hyperglykémii, metabolickou acidózu, hyperurikémii (Martínková 2007).

Na vzniku onemocnění diabetu II. typu má vliv mnoho ovlivnitelných faktorů. Typickým je nedostatečná pohybová aktivita, sedavý způsob života, nepřiměřené porce potravy. Vyšší přísun energie, než její výdej souvisí s nárůstem obezity u dospělých, u kterých může navodit inzulinovou rezistenci. Hladina inzulinu je zpočátku onemocnění zvýšená díky zvýšené tkáňové inzulinové rezistenci, v dalším stádiu onemocnění dochází k poruše sekrece inzulinu. Zvýšená hladina glukózy přestává být regulována β -buňkami pankreatu, kvůli jejich nedostatečné tvorbě inzulinu. Nárůst incidence a prevalence obezity je úzce spjatý s rizikem počátku DM (Škrha, 2009). Mezi klinické příznaky patří polyurie, polydipsie, pokles hmotnosti s tím spojený rozvoj dehydratace. K určení diabetu je nezbytné stanovení glykémie v krevní plazmě. Manifestace onemocnění DM2 je typická pro dospělé jedince, většinou ve věku kolem 40 let. Ve velké míře podléhá dědičnosti v rodinné anamnéze (Martínková 2007).

Tabulka 2 - Srovnání diabetu mellitu typu 1. a typu 2.

Diabetes mellitus 1. typu	Diabetes mellitus 2. typu
chybí sekrece inzulinu	inzulinová rezistence, porucha sekrece inzulinu
typický začátek v dětství a dospívání	typický začátek po 40 letech
ketoacidóza	
častěji nižší BMI	častěji vyšší BMI
pozitivní autoprotilátky	autoprotilátky chybí
C-peptid nepřítomen	C-peptid normální nebo zvýšený
imunoreaktivní inzulin chybí	imunoreaktivní inzulin normální nebo zvýšený

Převzato a upraveno z publikace Naik et al.; 2009

K průkazu DM je třeba laboratorní vyšetření hladiny cukru v krvi (glykémii), ta se odráží od rovnováhy mezi přísunem a odsunem glukózy z plazmy.

Tabulka 3 - Glukóza v plazmě

Vyloučení diabetu	< 5,6 mmol/l
Prediabetes	≥ 5,6 mmol/l ať < 6,9 mmol/l
Diabetes mellitus	≥ 7,0 mmol/l (potvrdit opakovaným měřením)

Tabulka modifikována z Rybka, 2007

3.1.1. Regulace glykémie při diabetes mellitus

Regulace glykémie vychází především z transportu glukózy přes buněčné membrány, regulace jako taková je uskutečněna prostřednictvím metabolických cest jako je glykolýza, glykogenolýza a glukoneogeneze. Cílem regulace je udržovat glykémii v rozmezí 3,5 – 5,6 mmol/l. Zásadní vliv na regulaci glukózy má hypotalamus, ten při poklesu krevní glukózy navozuje pocit hladu, naopak při dostatečné glykémii vyvolává pocit sytosti (Martínková 2007). Inzulin je pankreatický hormon, vznikající v β -buňkách pankreatu posttranslačními úpravami z proinsulinu odloučením C peptidu, jehož produkce se rovná kvantu produkovaného inzulinu. Jeho hlavní posláním je snižování glykémie. Tento hormon napomáhá transportu glukózy do adipocytů a myocytů, napomáhá stimulovat glykolýzu a zvyšuje produkci glykogenu v játrech (Dostál et al.; 2009).

Insulin-dependentní diabetes mellitus (DM1) je onemocnění kdy dochází k inzulinové insuficienci z důvodu jeho nedostatečné tvorby, a tedy i neschopnosti sekrece do krevního oběhu. Tento typ onemocnění je závislý na pravidelném dodávání inzulinu. Tento typ se většinou vyskytuje u dětí a mladších osob, bohužel zatím není žádný proces, který by tvorbu inzulinu obnovil. Rozlišujeme dva podtypy úplavice cukrové typ 1 DM_{1a} a DM_{1b}.

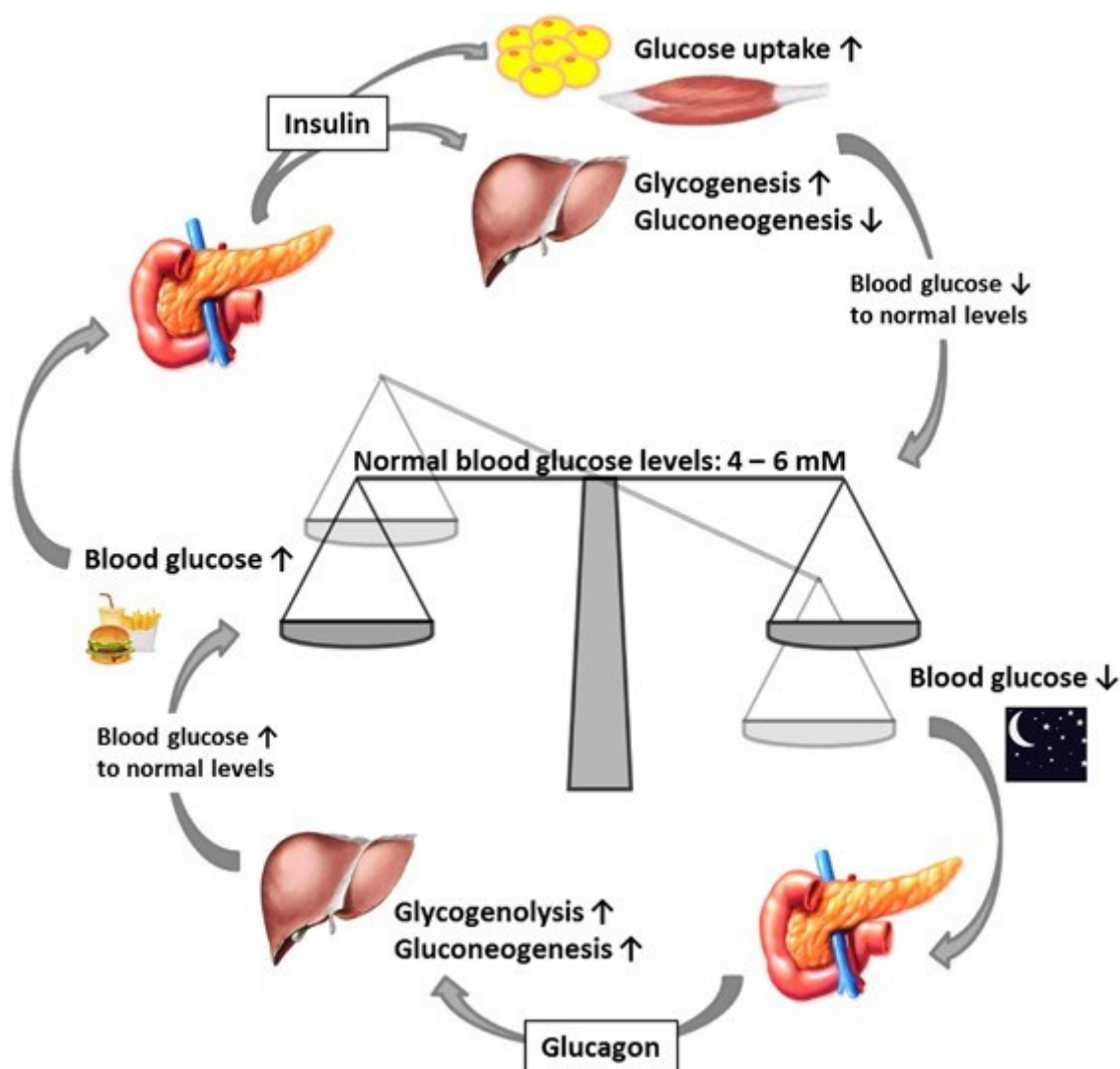
Pro DM_{1a} je typická autoimunitní destrukce β -buněk pankreatu způsobená T-lymfocyty a makrofágy. Naopak pro DM_{1b} je charakteristický tzv. idiopatický diabetes. V krvi se nenachází autoprotilátky proti inzulinu, nebo jejich produktům, i přesto jsou β -buňky zničeny neznámým způsobem. (Rybka, 2007).

Naopak u non-insulin-dependentní DM (DM2) při tomto typu nejsou β -buňky pankreatu naprosto zničeny, nýbrž dochází k rezistenci na cílové buňky, která souvisí se snížením odpovědi β -buněk pankreatu na hyperglykémii. DM2 vzniká většinou v průběhu života z predispozičních faktorů, mezi které řadíme DM v rodinné anamnéze, obezitu, arteriální hypertenzi, nebo prediabetes. Dalšími příčinami vzniku mohou být mutace genu pro inzulin, glukokinázu, ale i inzulinový receptor. Mezi léky první volby řadíme metformin, který patří do skupiny perorálních antidiabetik. (Fusek et al.; 2012). Část pacientů s DM2 mohou mít také klinické příznaky metabolického syndromu v důsledku inzulinové rezistence (Rybka, 2007; Racek et al.; 1999).

3.1.2. Regulace syntézy glukózy v játrech

Játra patří mezi největší orgány lidského těla, hrají nezbytnou roli v intermediálním i energetickém metabolismu, biotransformace xenobiotik i endogenních látek a ovlivnění metabolických drah lipidů, které zasahují do cílových struktur v organismu. Jedním z důležitých biotransformačních procesů je také zachování glukostatické funkce jater. Pokud v organismu nacházíme hyperglykémii, pracují játra na principu zvýšeného vychytávání krevní glukózy, která je následně přeměněna na jaterní glykogen, ten slouží jako zásobárna glukózy pro další použití. Zvýšené aktivity mohou dosahovat také procesy, které úzce souvisí s hyperglykemií, a to glykolýza a lipogeneze.

Při opačném stavu, tedy hypoglykémii, která se prezentuje jako nedostatek glukózy v krvi je využita jaterní zásoba glykogenu. Jaterní glykogen je štěpen procesem glykogenolýzou několika krokovou reakcí, jejíž výsledkem jsou molekuly glukózy, které jsou uvolňovány do krevního oběhu. Dalším regulačním bodem při hypoglykémii je glukoneogeneze, ta využívá tvorby glukózy z necukerných analytů např. pyruvátu. Pro správné fungování orgánů nezbytně nutných pro přežití je důležitý konstantní přísun glukózy v potravě. Pokud dojde ke krátkodobému hladovění, jsou játra schopna absenci glukózy zajistit glykogenolýzou a glukoneogenezí, při déle trvajícím hladovění je využit jaterní zásobní glykogen, který podléhá depleci (Hainer, 2011).



Obrázek 1: Pankreatická regulace glukózové homeostázy

Převzato z Röder et al.; 2016

Obrázek č. 1 představuje udržení glykémie pomocí glukagonu a inzulínu. Pokud je nízká glykémie, pankreas aktivuje proces glykogenolýzy vyloučením glukagonu, tento proces normalizuje glykémii. Po jídle, když glykémie výrazně stoupá, se z pankreatu uvolní inzulín, díky němuž se glukóza přesouvá do inzulín-dependentní tukové a svalové tkáně, dochází také ke stimulaci glykogeneze, tím se normalizuje hladina krevní glukózy (Röder et al.; 2016).

Rychlost metabolismu glukózy je závislá na přítomnosti některých enzymů, může ji ovlivňovat také potřeba glukózy pro CNS, ale i změna objemu hepatocytů v důsledku transportu vody. Způsob aktivace glykogenolýzy je dán hladověním a tím i zvýšenou koncentrací glukagonu, katecholaminů a glukokortikoidů. Glukóza tvořená v endoplazmatickém retikulu hepatocytů je složena z glukoplastických aminokyselin a laktátu, pro její transport je využívána facilitovaná difuze. Její cesta do krve je uskutečněna pomocí glukozového transportéru GLUT-2 také facilitovanou difuzí. Zdrojem endogenní glukózy může být také přeměna z galaktózy a laktózy (Hůlek et al.; 2018).

3.1.3. Klíčové geny v intermediálním metabolismu glukózy

Glukóza patří mezi monosacharidy, je využívána v játrech, svalech, tukové a mozkové tkáni jako energetický zdroj. Jejímu vstřebávání napomáhají přenašeče SGLT-1 a SGLT-2, které využívají pasivní difuzi, nebo sekundárně aktivního transportu s ionty Na^+ . Přes vena portae se glukóza z enterocytu dostává do krevního řečiště přes transportér GLUT-2 bez přítomnosti iontů Na^+ . Do buňky se glukóza dostává pomocí přenašečů GLUT, v současnosti je známo 14 typů těchto receptorů, liší se od sebe enzymatickou kinetikou a specifickou lokalizací v určitých tkáních lidského organismu, to vysvětluje rozdíly v senzitivě orgánů (Chen et al.; 2015).

Glukóza je po včlenění do buňky ihned fosforylována na glukóza-6-fosfát (G-6-P) enzymem hexokinázou, pro játra je využíván izoenzym glukokináza. Díky koncentračnímu gradientu, který umožňuje velká aktivita hexokináz, vstupuje glukóza rychle do buňky. G-6-P je součástí metabolických dějů, mezi které patří pentózový cyklus, glykolýza, nebo glukoneogeneze, G-6-P umožňuje neustále udržovat glukózu v buňce, protože jeho deriváty jsou pro buněčnou stranu neprůchozí (Röder et al., 2016).

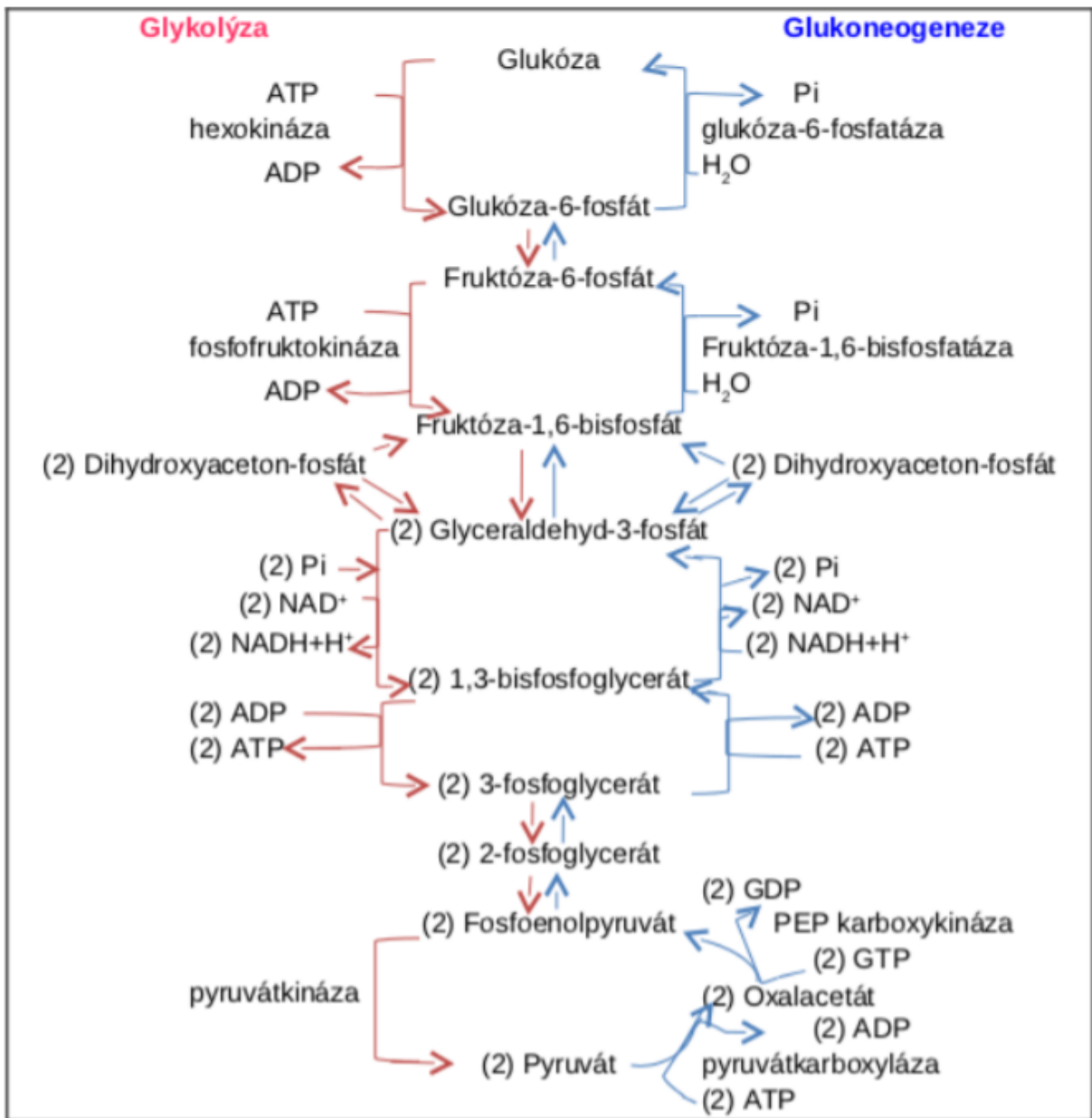
Glukóza může být odbourána, jak již bylo popsáno výše, dvěma různými cestami, které odlišují jejich finální produkty. Za anaerobních podmínek glykolýzy z jednoho molu glukózy vznikají 2 moly laktátu a 2 moly ATP.

Produktem aerobní glykolýzy vzniká energie ve formě ATP, kdy se z jednoho molu glukózy tvoří 2 moly pyruvátu, 2 moly $\text{NADH} + \text{H}^+$ a 2 moly ATP. Vzniklý pyruvát je přeměněn na acetyl-CoA a začleňuje se do citrátového cyklu, kde je jeho hlavní část zoxidována na oxid uhličitý. Průběhem těchto reakcí vznikají redukční ekvivalenty, které

využívá aerobní fosforylace v dýchacím řetězci jako zásobu energie pro tvorbu ATP. Z 1 molu glukózy po odbourání aerobní cestou vzniká 36-38 molů ATP.

V případě dostatečné buněčné energie i glukózy, stává se G-6-P tzv. substrátem, jehož úkolem je tvorba zásobního glykogenu (glykogeneze). Nejvíce glykogenu se ukládá do zásoby do myocytů nebo hepatocytů. Jaterní glykogen je pomocí glykogenolýzy odbouráván, produktem této reakce je glukóza-1-fosfát (G-1-P), reakce zprostředkuje enzym glykogenfosforyláza. G-1-P je izomerován na glukóza-6-fosfát, který je fosforylován a následně může být postupně uvolňován do krve. Tento enzym se nachází pouze v hepatocytech, buňkách ledvinných tubulů, případně v enterocytech. Jaterní zásoby glykogenu mají kapacitu pro tělesnou námahu na 12–24 hodin. Při nedostatku glykogenu v játrech využívá organismus reakci glukoneogeneze z necukerných složek, ty probíhající z velké míry v játrech. Energie na tvorbu glukózy je využita z beta oxidace mastných kyselin. Ačkoliv složí glukóza jako zdroj energie pro všechny buňky, při jejím nedostatku v organismu jí využívají pouze buňky, u kterých není možné využít pro tvorbu glukózy mastné kyseliny nebo ketolátky (erytrocyty). Jiné buňky organismu využívají jiné zdroje energie (např. mozek, je závislý na příjmu glukózy, nicméně může využít zdroj energie z ketolátek) (Röder et al.; 2016, Holeček, 2006).

Glukóza také patří do Coriho cyklu, tato anaerobní přeměna přeměňuje glukózu na laktát, laktát je transportován do jater, odtud je využit glukoneogenezí pro vznik glukózy, která je nadále využita jako zdroj energie. Glukózo-alaninový cyklus využívá alanin z muskulárních buněk, ten je v játrech reformován glukoneogenezí na glukózu, pro zpětné využití pro svalové buňky (Holeček, 2006). Glukóza je také spotřebovávána v pentózovém cyklu. Přímo oxidací se G-6-P transformuje na ribóza-5-fosfát, který je použit jako stavební kámen pro syntézu mastných kyselin a nukleotidů. Po následných několika reakcích vznikají z ribózy fosforylované monosacharidy, organismus je dále zužitkovává na syntézu glykoproteinů nebo proteoglykanů (Holeček, 2006).



Obrázek 2: Porovnání zjednodušeného schématu glykolýzy s glukoneogenezí

Převzato, upraveno z Nelson a Cox, 2017

3.2. Nukleární receptory

Nukleární receptor patří do rodiny „ligandem aktivovaných“ transkripčních faktorů. Hrají nezbytnou roli v udržení metabolické homeostázy, diferenciaci a proliferaci buněk, ochrany proti stresu indukovanému xenobiotiky, ale hlavně se řadí mezi receptory extracelulárních i intracelulárních signálů. Mohou po navázání ligandu v cytoplazmě aktivovat kaskádu dějů, která vede k zahájení exprese určitých genů v jádře. Jsou spojeny s celou řadou onemocnění, ať už s kardiovaskulárními chorobami, metabolickými chorobami, záněty nebo dokonce nádorovým bujením (Skálová, 2017).

V lidském genomu se nachází 48 nukleárních receptorů, které rozdělujeme do několika skupin, dle jejich specifické vazby na ligandy nebo podle mechanismu sekvenční kompozice.

1. **hormonální/endokrinní NR** – endogenní ligandy s vysokou afinitou, jsou intracelulární receptory, jejichž funkce je přikládána transkripčním faktorům. Pro jejich účinek je nezbytná přítomnost steroidních hormonů. Je známo několik zástupců této skupiny.

androgenní (AR – androgen receptor)

estrogenní (ER – estrogen receptor)

progesteronový (PR – progesterone receptor)

glukokortikoidní (GR – glucocorticoid receptor)

mineralokortikoidní (MR – mineralocorticoid receptor)

2. **sirotčí NR („orphan“ receptory)** u nichž nebyl identifikován endogenní ligand.

Mezi nejvýznamnější zástupce patří:

pregnanový X receptor (PXR – pregnane X receptor),

konstitutivní androstanový receptor (CAR – constitutive androstane receptor),

jaterní X receptor (LXR – liver X receptor).

3. **„adopted orphan“** takové nukleární receptory disponují nízkou afinitou k endogenním ligandům. Jejich vznik je dokládán existencí a identifikací endogenních ligandů.

Některé NR mohou být aktivovány i přes nepřítomnost endogenních ligandů. Všechny NR jsou klíčovými transkripčními faktory, které se podílejí na správném fungování organismu.

Dysfunkce v procesech regulovaných NR mohou vést k vysoce relevantním chorobám a patologickým onemocněním, jako je obezita, diabetes mellitus typu II, ateroskleróza, rakovina nebo hyperlipidémie (Ma et al.; 2008, di Masi et al.; 2009).

3.2.1. Struktura a funkce nukleárních receptorů

NR byly objeveny v 19. století, od té doby bylo identifikováno spousta dalších receptorů, které sejevily strukturně téměř totožně, jsou totiž fylogenetického původu s podobnou stavební strukturou (Laudet, a Gronemeyer 2002).

Strukturu nukleárních receptorů rozdělujeme na šest různých oblastí, které jsou nazývány písmeny A-F. Obsahuje tyto části - DNA-vázající domény (DBD) na N-konci, ligand-vázající domény (LBD) na C-konci, spojovací struktury a dvě aktivační domény AF-1 a AF-2.

- **N-terminal domain** má funkci aktivátoru transkripce AF-1 (transactivation function). Tato oblast může být posttranslačně změněna (fosforylací) a alternativním sestřihem, to může do jisté míry ovlivnit aktivaci AF-1 a kooperaci s aktivátorem transkripce AF-2.
- **DNA binding domain** uskutečňuje vazbu NR na příslušnou nukleotidovou sekvenci označovanou jako responzivní element (RE). Tato oblast rozhoduje, u kterého genu proběhne indukce transkripce.
- **Hinge region** slouží jako doména spojující DBD a LBD.
- **Ligand binding domain** vytváří takzvanou kapsu, ve kterém probíhá nekovalentní interakce ligandů (hormonů, xenobiotik) na základě chemických struktur s aminokyselinovými skupinami LBD. Obsahuje také aktivační funkci-2 (AF2), která na rozdíl od AF-1 vyžaduje přítomnost ligandu.
- **C – terminal domain** je doména, která je nejvíce variabilní oblastí ze všech, nemusí být přítomna u všech typů NR (Pávek et al.; 2005; Garcia et al.; 2018; Nolte et al.; 1998).



Obrázek 3: Znárodnění struktury nukleárních receptorů

Převzato a upraveno z Jonker et al.; 2009

Ligandy kontrolují interakce NR s koaktivátory nebo korepresory prostřednictvím změny v konformaci AF-2, která se nachází v LBD doméně. (Jonker et al.; 2009). Přestože je struktura NR velice obdobná, jejich mechanismy účinků a funkce mohou být značně rozmanité. Pro využití těchto funkcí je nezbytná vazba receptoru na DNA za pomoci homodimerů, heterodimerů s jinými receptory, nebo jako monomery, které nejsou sdruženy s odlišným receptorem. Některé studie poukazují, že transkripce genů může začínat v pozicích, které mohou být vzdáleny od vazebného místa, kde se transkripční mechanismy váží do promotorové DNA (Carroll et al.; 2006).

3.2.2. Pregnanový X receptor

PXR patří mezi ligandem aktivované nukleární receptory, byl objeven po CAR receptoru v roce 1998 (Bertilsson et al.; 1998). Lidský PXR je produktem genu NR1I2, který je součástí chromozomu 3 lokusu 3q11–q13.3. Složení genu NR212 je rozloženo mezi 10 exonů oddělenými 9 intronickými oblastmi (Tebbens Duintjer et al.; 2018).

Tento receptor má zásadní význam v regulaci hlavních cytochromových P450 xenobiotik-metabolizujících enzymů (CYP), mimo jiné působí jako biologický senzor hydrofobních xenobiotik a také kóduje enzymy I. a II. fáze metabolismu. Hlavním cílovým genem, který PXR reguluje je CYP3A4, ale podílí se také na ovlivnění CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, CYP3A7 a CYP2A6 (Tebbens Duintjer et al.; 2018). Dle nových studií můžeme říct, že PXR vykonává taktéž nedílnou roli v endobiotickém metabolismu a dokáže regulovat důležité geny, které ovlivňují metabolismus glukózy, lipidů, a žlučových kyselin (di Masi et al.; 2009). Velikou výhodou PXR je různorodost ligandů,

kam můžeme zařadit léky na předpis, přírodní látky, endobiotika další. (Kliwer Steven 2003). Díky jeho vlastnostem, je mu přiřazován negativní význam v rozvoji diabetes mellitus, jaterní steatózy nebo dyslipidemií. Naopak bylo zjištěno, že je vhodný k protizánětlivému působení, a to hlavně při zánětlivých onemocnění spojených s metabolickým syndromem a steatohepatidou (Gao and Xie 2012, Ma et al.; 2008).

PXR receptor byl zpočátku klonován hlavně ze zvířat, konkrétně myši, ale i savců nebo ptáků. Svě jméno dostal na základě aktivační dráhy C21 steroidy (pregnany) včetně pregnenolonu 16 α -karbonitril (PCN). V nynější době už můžeme říct, že PXR je hlavním transkripčním regulátorem izoenzymu CYP3A. Je označován jako orphan, neboli sirotek, jelikož nejsou známy žádné endogenní ligandy s vysokou afinitou (Kliwer 2002).

U PXR rozlišujeme čtyři isoformy, které charakterizuje odlišná transkripční aktivita. Isoformy PXR1 a PXR2 reagují na agonistu aktivací exprese cílového genu, naopak transkripční varianty PXR3 a PXR4 indukují expresi cílového genu. Bylo zjištěno, že PXR obsahuje sférický ligand vázající kapsu, jejíž velikost je dvakrát větší než u retinoidních receptorů nebo steroidních hormonů, tato kapsa je hydrofobní a pružná, díky těmto strukturálním vlastnostem dokáže PXR rozpoznat širokou škálu xenobiotik (Watkins et al.; 2001).

V současné době máme nespočet důkazů, že PXR slouží jako hlavní transkripční regulátor izoenzymu CYP3A. Výzkumy dokazují, že PXR aktivují mnoho genů, které zasahují do clearance bilirubinu, hemu a tyroxinu, dále ovlivňuje hemostázu kostí a v neposlední řadě i metabolismus vitamínu D (Pávek 2016).

3.2.3. Ligandy PXR

Zpočátku byl NR PXR přidělen ke skupině sirotčích receptorů, dnes je tomu však jinak, bylo objeveno mnoho ligandů různého původu, proto byl překlasifikován do skupiny s označením adoptovaný sirotčí receptor (di Masi et al.; 2009).

Cesta aktivace PXR je různorodá, existuje velké množství ligandů z různých skupin látek:

léčiva:

- **rifampicin**
- **dexametazon**
- **fenobarbital**

endogenní sloučeniny:

- **progesteron**
- **kortikosteron**
- **5 α -pregnane-3,20-dion**
- **Žlučové kyseliny**

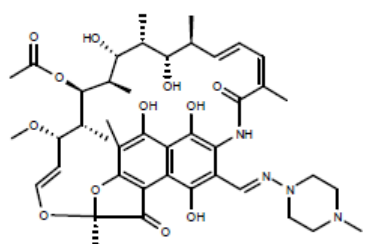
pesticidy, polutanty:

- **polychlorované bifenyly**

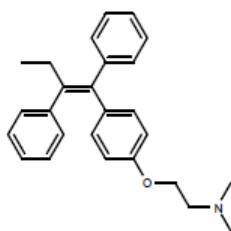
sloučeniny přírodního původu:

- **hyperforin**
- **paklitaxel**

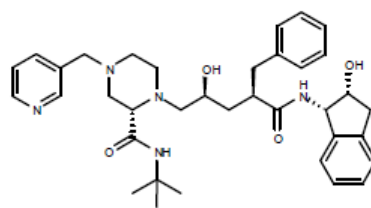
Všechny tyto látky mají schopnost tento receptor aktivovat. PXR je více promiskuitní receptor než CAR, má schopnost vázat velký počet různých sloučenin, a to hlavně díky vlastnostem LBD. (Chang and Waxman 2006, di Masi et al.; 2009, Timsit and Negishi 2007). U tohoto receptoru nacházíme mezidruhové odlišnosti např. u antibiotika rifampicin, ten vykazuje afinitu k PXR receptoru lidskému i králičímu, ale nikoli k myššímu (Mani et al.; 2013, Xu et al.; 2005).



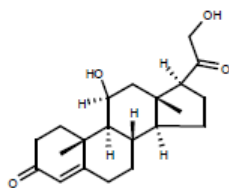
rifampicin



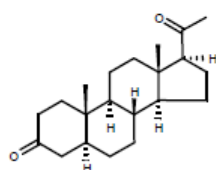
tamoxifen



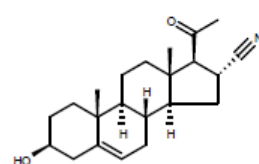
indinavir



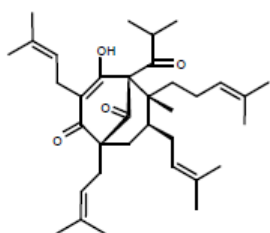
kortikosteron



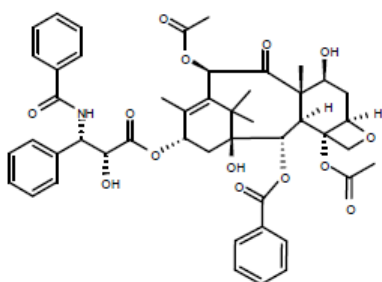
5α-pregnan-3,20-dion



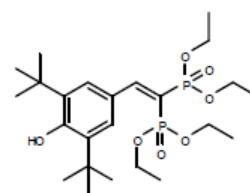
pregnenolon-16α-karbonitril



hyperforin



paklitaxel



SR12813

Obrázek 4: Vybrané ligandy PXR receptoru

3.2.4. Konstitutivní androstanový receptor

Gen kódující CAR má označení NR1H3, nachází se na chromozomu 1 (1q23). CAR je členem superrodiny jaderných receptorů, společně s pregnanovým X receptorem (PXR) slouží jako senzory endobiotických a xenobiotických látek, z toho vyplývá, že CAR a PXR hrají významnou roli při detoxikaci cizích látek, xenobiotik. Touto funkcí se liší od receptorů steroidních hormonů nebo hormonů T₃ a T₄. CAR receptor označujeme jako „sirotčí“ nukleární receptor, protože nebyl doposud identifikován fyziologický ligand, který by sloužil jako „spínač“ k jeho fyziologické funkci.

Původně byl popsán jako MB67 jako sirotčí nukleární receptor, který se nachází v játrech. Později bylo objeveno, že se na MB67 váží metabolity testosteronu, androstanolu a androstenolu a tím zdolávají jeho efekt, a proto byl přejmenován na konstitutivní androstanový receptor (CAR). Mezi endogenní agonisty CAR receptoru se řadí dehydroepiandrosterone (DHEA). Na rozdíl od většiny nukleárních receptorů je tento transkripční regulátor aktivní i v nepřítomnosti ligandů (tj. má tzv. konstitutivní aktivitu), jeho regulace může být ovlivněna agonisty tak i inverzními agonisty. Vazba na ligand vede k translokaci CAR z cytosolu do jádra, kde se protein může vázat na DNA. Vazba se vyskytuje buď jako monomer, nebo heterodimer společně s retinoidním X receptorem (RXR), což vede k aktivaci nebo represi cílové genové transkripce. Geny regulované CAR receptorem jsou nezbytnou součástí pro metabolismus léčiv, také mají důležitou roli v eliminaci bilirubinu. Genová regulace CAR ovlivňuje enzymy sulfotransferáz (SULT) a glutathion-S-transferáz (GST), ale hlavně cytochromy a to konkrétně formy CYP2B, CYP2C, CYP3A4.\

CAR se především vyskytuje v játrech, ale také ho nacházíme v jiných tkáních i orgánech (i když ve velmi malých koncentracích), jako jsou střevní epitel, mozek, sval kosterní, srdce, plíce nebo ledviny. CAR bez navázaného ligandu nacházíme především v cytoplazmě buněk, za těchto podmínek je receptor inaktivovaný a fosforylován. Jeho cytoplazmatický komplex je tvořen CCRP (CAR Cytoplazmatický retenční protein), Hsp90 (protein tepelného šoku 90) a GRIP1 (Glutamátový Receptor Interacting Protein 1) (Kobayashi et al.; 2003, Min et al.; 2002a, Min et al.; 2002b, Timsit & Negishi 2007).

Hlavní funkcí, kterou CAR disponuje je regulace metabolismu a zpracování xenobiotik a endobiotik, s tím úzce souvisí změna jaterního metabolického prostředí. Pokud je CAR aktivován pomocí fenobarbitalu (PB) dochází inhibicí jaterních glukoneogenních

enzymů, mezi které patří fosfoenolpyruvát karboxykináza 1 (PEPCK1) a glukóza-6-fosfatáza (G6Pase) (Ueda et al.; 2002). CAR dokáže regulovat syntézu hormonů pankreatu, pohlavních hormonů jejichž cílovými geny jsou CAR, SULT a UGT. (Fangt Hai-Lin 2005, Sugatani Junko et al.; 2005). CAR náleží mezi xenobiotické senzory, díky své rozmanité specifitě pro endogenní i exogenní ligandy s možno měnící se strukturou. Vědci zjistili, že oblast CAR LBD je velká a hydrofobní, pomocí této oblasti dochází k vazbám na další chemické struktury. Následně oblast AF-2 CAR LBD je spojena s aktivní konformací i při absenci ligandů, s tím je spojena myšlenka, která říká že změna konformace bude mít vliv na transkripční aktivitu CAR (Xu et al.; 2004).

3.2.5. Ligandy CAR

Ligandy konstitutivního androstanového receptoru, byly obtížně popisovány, nejdříve se praktikoval názor, že CAR nemá žádný endogenní ligand, opak je pravdou. Co se týče CAR, bylo objeveno že jeho endogenní ligandy patří do skupiny steroidů (androstany, estrogyeny a progestiny) a metabolitů žlučových kyselin, jejich afinita k CAR receptoru je ale nepatrná. Mezi další modulátory konstitutivního androstanového receptoru řadíme klinicky používaná léčiva, pesticidy, flavonoidy obsažené v potravě a polyfenoly vzniklé metabolismem alkoholu. Zásadou těchto ligandů se u CAR projevuje odolávání vůči buněčné toxicitě a detoxikaci xenobiotik. (Molnár et al.; 2013).

Ligandy CAR, jejichž cesta aktivace nastává přímou vazbou na LBD jsou:

- **TCPOBOP** - 1,4- bis[2(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene - jedná se o čistě myší ligand myšího CAR
- **CITCO** - 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehydeO-(3,4-dichlorobenzyl)oxime - čistě ligand lidského receptoru

Aktivitu CAR, mohou ovlivňovat tzv. nepřímé aktivátory mezi ně řadíme:

- **paracetamol**
- **bilirubin**
- **fenobarbital**
- **fenytoin**
- **6,7- dimethylskuletin**

Tyto nepřímé aktivátory podněcují nukleární translokaci CAR a expresi cílových genů i v nepřítomnosti přímé vazby na ligand binding domain. (Molnár et al.; 2013).

CAR je složen narozdíl od ostatních NR pouze ze 3 domén – DBD, spojovací části a LBD, to by mohlo vysvětlovat jeho podstatné vlastnosti, vzhledem k menší CAR – LBD kapse, je schopen strukturně vázat molekuly: endogenní, syntetické a přírodní. CAR disponuje méně variabilními vlastnosti než PXR (Hernandez et al.; 2009). Nýbrž známé údaje poukazují o překrývající se regulaci metabolických enzymů a transportérů léčiv mezi CAR a PXR. U PXR byla zjištěna větší indukce v případě enzymů CYP3A4 a CYP2C9, tyto geny lze srovnat s CAR-zprostředkované indukce těchto genů.

U myších pokusů při hyperglykemických stavech byl prokázán příznivý účinek CAR, ve smyslu regulace syntézy glukózy po aktivaci CAR. Byl regulován první krok glukoneogeneze – potlačení tvorby enzymů G6Pázy (glukóza 6-fosfatázy) a PEPCK1 (fosfoenolpyruvátkarboxykinázy 1) (Kodama et al.; 2004, Ueda et al.; 2002, Yarushkin et al.; 2013).

Tabulka 4 - Vybrané ligandy nebo aktivátory CAR

Látky	Efekt na lidský CAR	Reference
Steroidy		
Androstan-3 α -ol a androsten-3 α -ol	IA (h>m)	Dau a kol. 2013
3,17 β -Estradiol a 17 α -ethinylestradiol	IA (h), A (m)	Dau a kol. 2013
5 β -Pregnanedione	A (h), IA (m)	Maglich a kol. 2003
Pesticidy		
Pyrethroidy (permetrin, cypermetrin)	A	Küblbeck a kol. 2011
Karbamáty (benfuracarb)	A	Abass a kol. 2012
Organochloriny (methoxychlor, PCB153, <i>o,p'</i> -DDT)	A	Küblbeck a kol. 2011
Léčiva		
Klotrimazol	IA nebo A	Jyrkkärinne a kol. 2008 Lynch a kol. 2012
Meklizin	IA nebo neaktivní	Huang a kol. 2004
Artemisinin a některé deriváty	A	Burk a kol. 2012
Karbamazepin	A	Faucette a kol. 2007
Nevirapin	A	Faucette a kol. 2007
Fenytoin	Aktivátor nebo A	Küblbeck a kol. 2011
Přirodní polyfenoly		
Flavonoidy nacházející se v jídle (chrysin)	A	Yao a kol. 2011
Flavonoidy vznikající z alkoholu (kys. ellagová)	A	Yao a kol. 2011
Plastizátory		
Triarylfosfáty	A	Jyrkkärinne a kol. 2008
Di(2-ethylhexyl)ftaláty	A pro hCAR2	DeKeyser a kol. 2009
Syntetické látky		
TCPOBOP	A	Tzamelis a kol. 2000
CITCO	A	Maglich a kol. 2003
Flexibilní diarylové sloučeniny (FL81)	A	Küblbeck a kol. 2011
Thiazolidin-4-ony	A	Küblbeck a kol. 2011
Sulfonamidy	A	Küblbeck a kol. 2011
PK11195	IA	Küblbeck a kol. 2011 Lynch a kol. 2012
S07662	IA	Küblbeck a kol. 2011

A, agonista; IA, inverzní agonista; h, lidský CAR; m, myšší CAR; PK11195, *ischinolinkarboxamid*; S07662, 1-[(2-methylbenzofuran-3-yl)methyl]3-(thiofen-2-ylmethyl)urea,

Převzato z publikace Molnár et al.; 2013

3.2.6. Ovlivnění metabolismu glukózy ligandy receptorů PXR a CAR

Jaterní glukoneogeneze je pevně ovládána inzulínem a glukagonem a má nemá nezbytný význam pro přežití během půstu nebo hladovění. Mezi geny podílející se na glukoneogenezi, patří zejména glukóza-6-fosfatáza (G6Pase) a fosfoenolpyruvátu carboxykinase (PEPCK).

G6Páze je kritický enzym, řídící hladinu glukózy v séru katalyzující defosforylaci glukóza-6-fosfátů generovaných jak z glukoneogeneze, tak z glykogenolýzy, zatímco PEPCK katalyzuje tvorbu fosfoenolpyruvátu z oxalacetátu. Jaterní glukoneogeneze je řízena dvěma směry. Pozitivní směr, řízený glukokortikoidy, cAMP a glukagonem, naopak negativní směr je ovládaný inzulínem společně s glukózou (Konno et al.; 2008).

Je známo, že léčba léky, které řadíme mezi aktivátory CAR a PXR, potlačují jaterní enzymy glukoneogeneze (Argaud, 1991; Ueda et al.; 2002; Kodama et al.; 2004). Bylo zjištěn, že ligand PXR PB dokáže redukovat u diabetických pacientů plazmatickou glukózu. (Lahtela et al.; 1985). Významný efekt byl zjištěn při užívání PCN, který je schopný aktivovat mPXR a tím snížit hladinu glukózy v krvi nalačno. Bohužel přesný mechanismus účinku zůstává neznámý, nýbrž většina zjištěných údajů poukazuje, že při aktivaci CAR a PXR dochází k redukci glukoneogenní cesty pomocí transkripčních faktorů a kofaktorů, které se podílejí na regulaci těchto enzymů glukoneogeneze (Kodama et al.; 2004).

CAR má schopnost také ovlivňovat glukoneogenezi pomocí transkripčního faktoru 1, jeho úkolem je regulace inzulínu, ke které využívá gen FOXO1. CAR může do jisté míry ovlivňovat i geny stimující glukoneogenezi jako např. PEPCK, regulace je způsobena vazbou na zmíněný gen FOXO1 (Kodama et al.; 2004). To nám napomáhá vysvětlit jak léčba PB zkvalitňuje citlivost na inzulín u diabetu nezávislého na inzulínu /diabetu typu II. (Lahtela et al.; 1985). Přímá interakce CAR nebo PXR receptoru s FOXO1 je základním mechanismem, pro regulaci genů *G6Pasa* a *PEPCK* v odpovědi na xenobiotika. Tato regulace je odlišná od regulace glykémie inzulínem. Spojení CAR nebo PXR receptorů s genem FOXO1 má za následek potlačení glukoneogeneze. PXR dokáže potlačit transkripční aktivitu genu FOXO1 na inzulínově responzivní prvek, tzn. působí jako negativní transkripční regulátor genů zapojených do metabolismu glukózy (Kodama et al.; 2004).

3.2.7. Klíčové geny metabolismu glukózy ovlivněné ligandy receptorů PXR a CAR

Jak již bylo popsáno výše, PXR zasahuje do metabolismu glukózy ovlivněním dvou základních enzymů glukoneogeneze: glukóza-6-fosfatázy (G6P) a fosfoenolpyruvátkarboxykinázy (PEPCK).

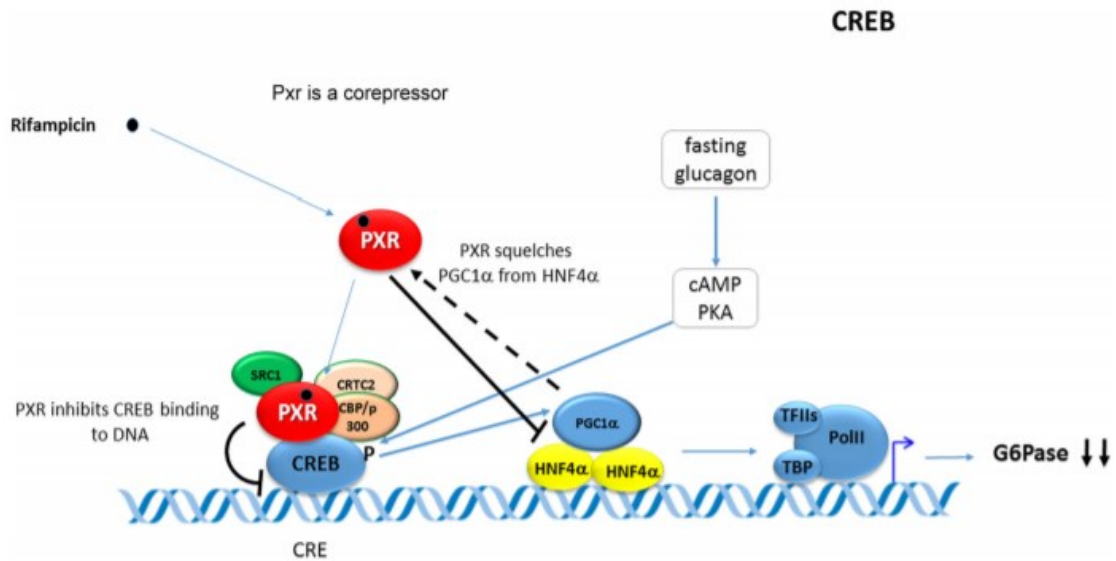
Při aktivaci ligandem typickým pro PXR dochází k poklesu exprese těchto enzymů, což vede k regulaci glukoneogeneze. Regulace může být ovlivňována několika formami:

- 1) interakce transkripčním faktorem FOXO1
- 2) interakce proteinem vázající cAMP-responzivní element (CREB)
- 3) ovládnutí genů zprostředkované HNF4 α , následná kompetice o koaktivátor PGC-1 α

U první a druhé formy, jak FOXO1 tak i CREB se za nepřítomnosti ligandem aktivovaného PXR vážou na responzivní elementy na DNA, tím dochází zahájení transkripce genů pro G6P a PEPCK (Chai et al.; 2013, Konno et al.; 2008).

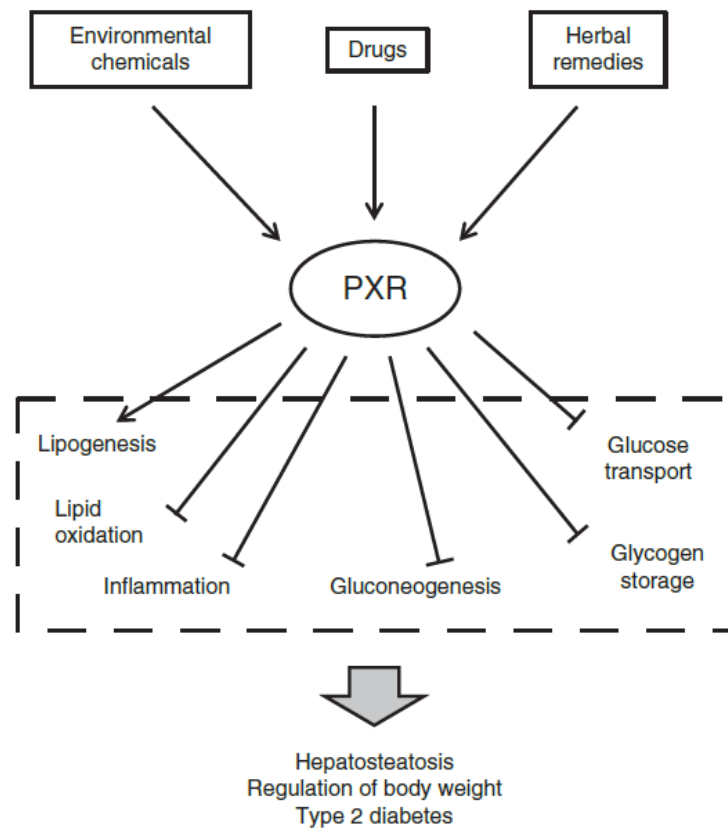
Při aktivaci PXR dochází k snížení exprese transportéru pro glukózu GLUT2 společně s enzymem glukokináza, tím je ovlivňován tzv. uptake glukózy, to může mít za následek postprandiální hyperglykémii. (Hakkola et al.; 2016). Možný vliv na narušení glukozové tolerance byl zjištěn u pacientů, kterým byly podávány léčebné agonisty PXR (rifampicin, fenobarbital, fenytoin, cyklofosfamid, ale i u některých antivirotik), to poukazuje na možný vliv PXR na diabetes 2. typu.

Celkově shrnuto, PXR i CAR dokážou potlačit expresi glukoneogenního genu, který je cíleně zaměřen na klíčové transkripční faktory podílející se na glukoneogenezi. Existuje spojení mezi PXR/CAR a glukoneogenní cestou, tato cesta může představovat mechanismus buněčné adaptace, která by mohla přinést řešení pro nedostatek energie ve patofyziologických procesech. Jelikož je glukoneogeneze velice náročný energetický proces, při kterém se laktát, pyruvát a glycerol přeměňují na glukózu a glykogen, je zde zapotřebí velké množství energie, kterou poskytne ATP, pro tvorbu dostatečného množství NADPH, což je redukční koenzym cytochromu P450. Potlačení glukoneogeneze, zprostředkovanou PXR a CAR, jsou hepatocyty schopny udržovat nezbytné hladiny NADPH a udržovat tak ochrannou funkci metabolismu vůči podávanému léčivu. Tyto závěry byly však založeny pouze na studiích *in vitro* (Hukkanen et al.; 2014, Gao and Xie 2012)



Obrázek 5: Potlačení transkripce genu G6Páza

K potlačení transkripce genu G6Páza, dochází inhibiční schopností CREB s vazbou na DNA, vazebné místo v promotorové oblasti tzv. response element je CRE. PXR přímo interaguje s CREB. Modré šipky ve schématu naznačují aktivaci nebo stimulaci, zatímco černé šipky napovídají o účinku aktivovaného PXR na expresi genu G6Pasa. Soutěž o společný kofaktor naznačuje přerušovaná šipka (Pávek, 2016).



Obrázek 6: Vliv PXR receptoru na lidský metabolismus

- Activation
- | Repression

Při aktivaci PXR xenobiotiky dochází vlivem léčiv, k redukci glukoneogeneze, sníženému transportu glukózy a s ním spojenému ukládání zásobního glykogenu. Dále dochází k zahájení lipogeneze, pokles β -oxidaci mastných kyselin a potlačení imunitní odpovědi. Při dlouhodobé aktivaci PXR může dojít až k ztučnění jater (jaterní steatóze) i DM 2. typu.

Převzato z Hukkanen et al.; 2014

NR CAR ovlivňuje jak lipidový metabolismus, tak i jaterní metabolismus glukózy, bylo tak prokázáno na myších po vložení ligandu TCPOBOP, docházelo u testovaných myší ke zlepšení glukozové tolerance. To má za následek potlačení hepatální glukoneogeneze. Jak již bylo uvedeno výše, při aktivaci CAR receptoru dochází k potlačení exprese enzymů PEPCCK a G6Páza. Tento způsob inhibice může mít různé formy:

- I. CAR společně bojuje s FoxO1 o vazebné místo na inzulinové responzivní sekvenci (IRS) a také HNF α na promotorech genů PEPCCK a G6Pázy.
- II. CAR se kompetitivně konfrontuje s koaktivátory HNF4 α , tím dochází ke snížení exprese cílových genů glukoneogeneze.

Transkativace těchto genů uskutečňuje HNF4 α , důležitá je translokace do jádra, která následuje po acetylaci HNF4 α . Bylo zjištěno, že sulfáty cholesterolu společně se SultB1b inhibují glukoneogenezi deacetylací HNF4 α , tzn. že pokud bude CAR stimulován genem Sult2B1b, jeho působení bude mít za následek potlačení glukoneogeneze (Yan et al.; 2014).

3.2.8. CYP7A1

Patří mezi klíčový enzym biosyntézy žlučových kyselin, je také jeden z klíčových genů aktivovaného PXR. Své uplatnění nachází také jako klíčový enzym metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin. Bylo zjištěno, že PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) zvyšuje hladinu HNF4 α , tento komplex aktivuje transkripci genu CYP7A1. Reakcí CYP7A1 s FOXO1 a HNF4 α dochází k regulaci jaterní glukoneogeneze prostřednictvím PEPCCK1 a G6Pásové geny. Potlačením exprese CYP7A1, má za následek inhibici syntézy žlučových kyselin. Naopak transkripce CYP7A1 je stimulována hromaděním jeho substrátu, tedy cholesterolu (Bhalla et al. 2004).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. CÍL PRÁCE

Cílem této experimentální diplomové práce bylo zavést a validovat metodu *luciferase reporter gene assay* s dvěma luciferázovými konstrukty, které by měly být negativně regulovány (to je suprimovány) prostřednictvím PXR a CAR. Konkrétně se jednalo o luciferázový konstrukt s promotorovou oblastí lidského genu PEPCCK. Druhým konstruktem byl luciferázový konstrukt s promotorovou oblastí lidského genu CYP7A1.

Oba tyto geny jsou známy jako cílové geny regulované ligandy PXR a CAR a jejich aktivace vede k potlačení exprese těchto genů. Tyto luciferázové konstrukty nebyly testovány a metoda luciferase reporter assay pro tyto geny nebyla zavedena v laboratoři školitele Profesora PharmDr. Petra Pávka, PhD.

Použili jsme známe ligandy PXR receptoru: agonistu rifampicin a antagonistu SPA70. Pro lidský CAR jsme použili jeho ligand CITCO. Validace probíhala za standartních podmínek na linii HepG2.

5.1. Chemikálie a média

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, USA)

FBS, fetální bovinní sérum (PAA, Rakousko)

PBS, fosfátový pufr

trypsin (Sigma-Aldrich, USA)

DMSO, dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)

CITCO (Tocris), agonista lidského CAR receptoru

Fenobarbital (Sigma-Aldrich, USA)

rifampicin (Sigma-Aldrich, USA), agonista PXR receptoru

SPA70 (Abcr, Německo), antagonist PXR receptoru

p3A4-luc – luciferázový vektor s promotorovými oblastmi genu CYP3A4

CYP7A1-luc – luciferázový reportérový vektor který obsahuje promotorovou sekvenci -1887/+24 genu CYP7A1

pPEPCK1-Gaussia luciferase – reportérový konstrukt s Gaussia luciferázou a 1 kb promotorové oblasti genu PEPCK

pSG5-hPXR – expresní vektor pro lidský PXR

pRL-TK (Promega, USA)

Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Reagent P3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Passive Lysis Buffer (Promega, USA)

Luciferase Assay Reagent II (Promega, USA)

Luciferase Assay Substrate

Luciferase Assay Buffer II

Stop & Glo Reagent (Promega, USA)

Stop & Glo Substrate

Stop & Glo Buffer

5.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky:

48 jamkové destičky, 12 jamkové destičky, kultivační láhve, laminární box, pipety, mikropipety, špičky, kahan, inkubátor CO₂, optický mikroskop, odsávačka, mikrozkuhavky, plastové zkuhavky, Pasteurovy pipety skleněné destičkový

Přístroje:

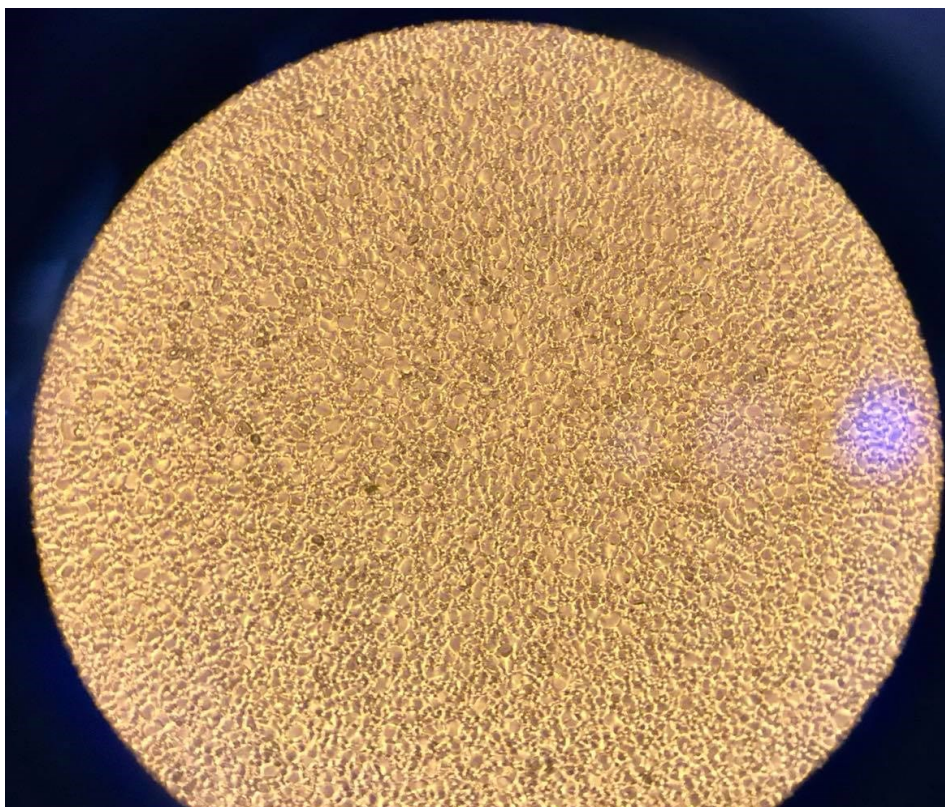
BioTek Synergy 2 luminometr

5.3. Buněčná linie HepG2

Buněčná linie HepG2 má původ z hepatocelulárního karcinomu, odebraná je od patnáctiletého muže bělošského původu s nádorovým bujením jaterní tkáně. Genetická výbava těchto buněk je padesát pět párů chromozomů. Buněčný růst je uskutečněn v drobných shlucích v monovrstvách. Pro buněčnou linii HepG2 je typická produkce plazmatických proteinů (např. fibrinogenu, plasminogenu, albuminu, aj.). Buňky jsou negativní na přítomnost viru hepatitidy B. Buňky pocházejí z buněčných kultur z Evropské databanky ECACC (katalogové číslo 85011430).

Kultivace probíhala v médiu DMEM za přítomnosti L-glutaminu, pyruvátu, 10% FBS s přídavkem 1 % neesenciálních aminokyselin, při 5% tenzi CO₂, při teplotě 37 °C.

Pasážování buněčné linie se uskutečnilo s přídavkem 0,25% trypsinu. Na jednu destičkovou jamku jsme nasadili přibližně 20 000 – 30 000 buněk linie HepG2 (Hep-G2 cell line profile 2017).



Obrázek 7: Buněčná linie HepG2 pod světelným mikroskopem, zvětšení 1000x

5.4. Transfekce

Proces využívaný v našem experimentu se nazývá transfekce. Při transfekci dochází k vložení nukleových kyselin bez virové účasti do eukaryot. Díky této metodě jsme schopni studovat geny a jejich exprese v buňkách, taktéž nám dovoluje provádět reportérové eseje. Pro náš experiment jsem použili metodu lipofekce tzn. tj. přenos genetické informace je uskutečněn pomocí lipozomů, to jsou koloidní částice, které jsou tvořené lipidovou dvojvrstvou se strukturou v podobě kruhu. Kationová část lipidů interaguje s negativně nabitými fosfáty DNA za vzniku komplexu. Lipidy s kladným nábojem usnadňují spojení s buněčnou membránou a začlenění využitím endocytózy. Výhody transfekce lipozomů spočívají ve velké účinnosti přenosu genů do buněk, má využití v in vitro i in vivo studiích, také přenos DNA různé velikosti (Transfection 2019). K provedení pokusu jsme používali transfekční činidlo Lipofectamin 2000.

5.5. Luciferase gene report assay (luciferázová reportérová esej)

Luciferázová reportérová esej (Luciferase reporter gene assay) je metoda, kterou jsme pro náš experiment využili. Metoda umožňuje pozorovat biomolekulární jevy za přítomnosti reporterového enzymu. V našem případě se jedná o buněčnou transkripční aktivitu s enzymem luciferáza.

Principem je transfekce reporterového genu, společně s genovým konstruktem do buňky. Výsledkem sledujeme míru exprese určitého genu nebo můžeme sledovat interakci daných proteinů. Pro sledování regulace exprese daných genů jsou využívány tzn. reporterové geny, slouží pro kontrolu úspěšnosti transfekce buněk. Pro tyto geny existují jednoduchá pravidla. Měly by být snadno detekovány, neměly by se vyskytovat v testované buňce, abychom předešli ovlivnění výsledků. Zároveň by neměl záporně ovlivňovat fyziologické procesy v buňce samotné, ani buněčnou kondici. Pro detekci exprese cílových genů se využívají chemiluminiscenční metody, dalším způsobem je enzymatická detekce.

Obsahem reporterového plazmidu je regulační oblast a oblast kódující sekvence díky které dochází k transkripci. V naší práci jsme použili enzym luciferázu. Cílovým genem byl vybrán myší PXR, jako promotor jsme vybrali geny CYP3A4 a CYP7A1. Další volbou může být vpravení tzv. expresního plazmidu, jehož promotor obsahuje sekvenci nukleotidů, která samovolně zahajuje expresi kódující oblasti, tak je zajištěna hojnost struktur vázajících se do regulační oblasti reportérového plazmidu. Pro zlepšení přesnosti se využívá duálních reportérů. Do buňky jsou tedy přidány dva plazmidy, kontrolní a experimentální. Následně dochází k expresi obou plazmidů. Normalizací aktivity plazmidu reporterového k plazmidu kontrolnímu dochází k eliminaci efektivity transfekce, vnějších vlivů při měření, ale i přesnosti pipetování. Využitím této metody můžeme také pozorovat vliv testovaných látek na buněčnou životaschopnost (Bioluminescence Reporters 2019, Dual-Luciferase Reporter Assay System 2015, Reporter Gene Assays 2019).

Transfekované plazmidy použité pro náš experiment:

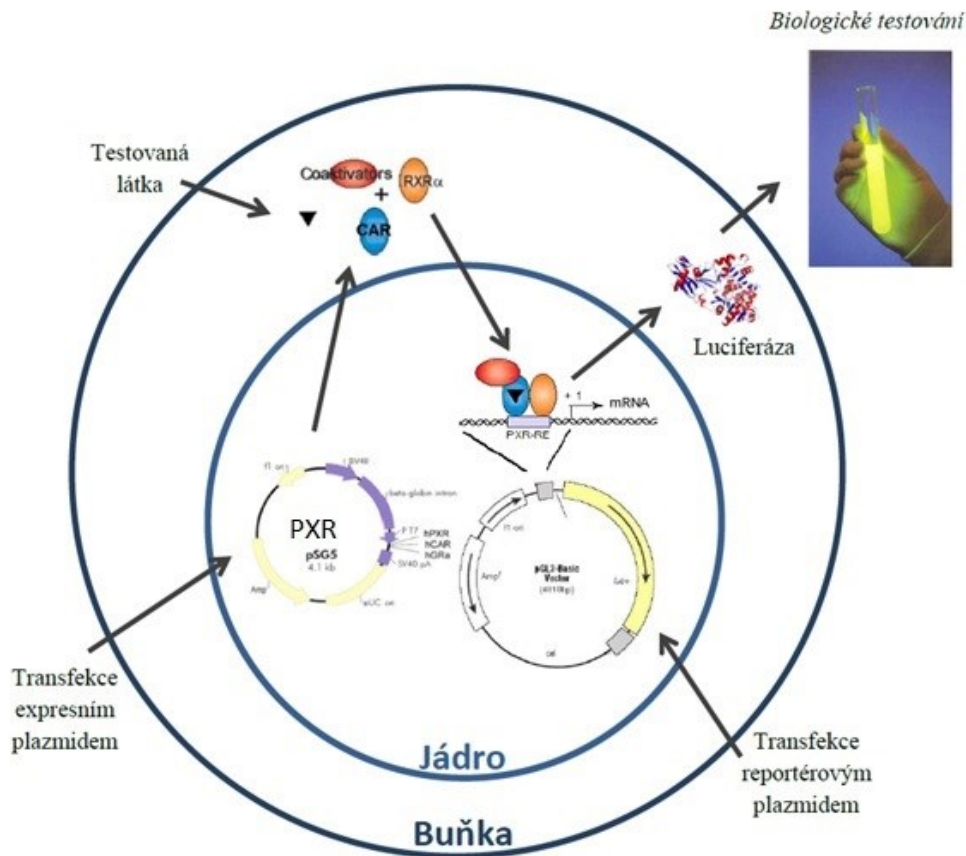
pPEPCK1 – Gaussia luciferase, komerční vektor od firmy OriGene s 1 kb promotorové oblasti, obsahuje Gaussia luciferázu namísto světluškové luciferázy

pRL-TK – expresní plazmid pro Renilla luciferázu

p3A4-luc – reportérový plazmid nesoucí promotorovou oblast genu *CYP3A4* a gen pro luciferázu světluškovou (firefly); plazmid je citlivý na aktivaci PXR ligandy, plazmid byl popsán v publikaci Švecová et al.; 2008.

pSG5-PXR – expresní plazmid obsahující cDNA pro lidský PXR

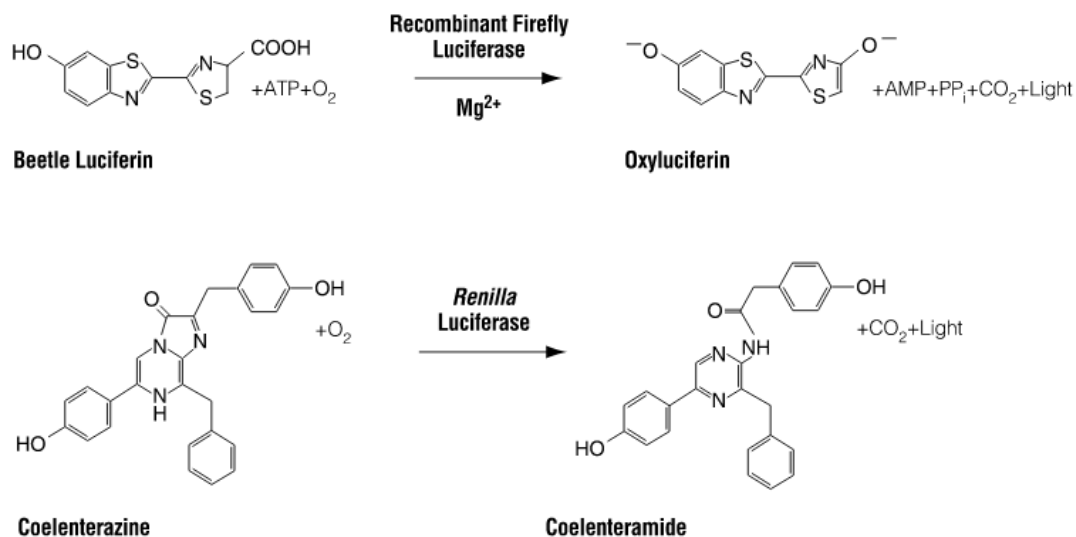
pCYP7A1-luc – reportérový plazmid obsahující promotorovou oblast genu CYP7A1 a gen pro luciferázu, obsahuje 1,5 kb promotorové oblasti lidského genu CYP7A1 vektor by publikován v práci Prášnická et al.; 2017.



Obrázek 8: Metoda gene report assay

5.6. Dual-Luciferase report gene assay

Jak již napovídá název, jde o systém dvou reportérů od firmy Promega. Konkrétně jde o zajištění aktivity enzymů „firefly“ světluškové (*Photinus pyralis*) luciferázy a „Renilla“ luciferázy, ta má původ v mořské žahavce renilly fialové (*Renilla reniformis*). Díky odlišnému evolučnímu vývoji disponují oba enzymy rozdílnými požadavky pro substrát, proto není těžké je od sebe odlišit pomocí bioluminiscenčních signálů. Posttranslační modifikace neovlivňují žádný z jmenovaných enzymů. Během reakce po přidání luciferinu se jako první přemění „firefly“ světlušková luciferáza. Jedná se o reakci, kdy se oxiduje luciferin na oxyluciferin za přítomnosti ATP, Mg²⁺ a O₂. Pro reakci je typický prudký záblesk světla.



Obrázek 9: Luminiscenční reakce katalyzované Firefly a Renilla luciferázou

Převzato z: *Dual-Luciferase Reporter Assay System 2015*.

Firefly luciferáza katalyzuje přeměnu luciferinu na oxyluciferin v přítomnosti ATP, O₂ a Mg²⁺. Renilla luciferáza oxiduje koelenterazinu na koelenteramid za přítomnosti O₂. Do reakce jsme přidali činidlo s koelenterazinem, jako substrát pro Renilla luciferázu, při přeměně na koelenteramid dochází k uvolnění fotonu za přítomnosti O₂. výsledkem je stabilnější luminiscenční impuls, který postupně klesá. Tento systém zaručuje značnou citlivost, také zabraňuje přítomnosti endogenní buněčné aktivity (Dual-Luciferase Reporter Assay System 2015).

5.7. Pracovní postup metody

1. Nejprve jsme si připravili 48 jamkové plato s buněčnou linií HepG2 ve 150 µl kultivačního média DMEM. Buňky jsme inkubovali při 5% tenzi CO₂ po dobu 24 h při 37 °C.
2. Poté jsme odsáli médium a nahradili ho přidáním 150 µl média do každé jamky nového média.
3. Dalším krokem bylo vypočítat množství plazmidů a Lipofectaminu potřebných k provedení experimentu.
4. V dalším bodě jsme připravili první zkumavku s následujícími činidly na jednu jamku:
 - a) pPEPCK1 – Gaussia luciferase – 200 ng na jamku
 - b) pSG5-PXR – 100 ng na jamku
 - c) pRL-TK – 30 ng na jamku

- d) p3A4-luc – 200 ng na jamku
5. Poté následovalo připravení druhé zkumavky s těmito činidly na jednu jamku:
- a) 400 μ l Opti-MEM média
 - b) 7 μ l Lipofectaminu 2000
6. Směsi jsme promíchali a nechali inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
7. Přidali jsme 30 μ l transfekční směsi do každé jamky.
8. Dále jsme pipetovanou destičku s buňkami inkubovali 24 h při 37 °C a 5% tenzi CO₂.
9. Další den jsme odsáli médium a přidali 100 μ l směsi testovaných látek společně s kultivační, médiem DMEM s 10 % FBS. Jako kontrolní vzorek posloužil 0,1% roztok DMSO, který sloužil jako solvent testovaných látek.
10. Po přidání jsme destičku inkubovali při 5% tenzi CO₂. 24 h při 37 °C.
11. Druhý den následovalo opláchnutí buněk, do všech jamek jsme přidali 100 μ l Passive Lysis Buffer a nechali destičku zmrznout, aby došlo k lýze buněk.
12. Po rozmražení a lýze buněčných kultur jsme z všech testovaných jamek přepipetovali 40 μ l do 96 jamkové destičky a následně přidali 40 μ l Luciferase Assay Reagent II obsahující luciferin. Vzniklou luminiscenci jsme změřili na luminometru.
13. Přidáním 30 μ l Stop & Glo jsme zastavili vzniklou reakci, tento reagent se skládá ze Stop & Glo Substrate a Stop & Glo Buffer v poměru 1:50. Činidlo obsahuje koelenterazin pro započítání druhé reakce. Na BioTek Synergy 2 byla měřena vzniklá luminiscence.
14. Ze získaných dat jsme vytvořili grafy, které jsme následně vyhodnocovali.

5.8. Statistické zpracování dat

Grafické zpracování dat se uskutečnilo v programu GraphPad Prism 8.1.1 verze trial.; Využita byla metoda one-way ANOVA s následným Dunettovým testem (agonista vs. kontrola).

Použité výsledky jsou získány jako aritmetické průměry třikrát opakovaného měření jednoho experimentu společně s daty jsou zaznamenány také směrodatné odchylky měření.

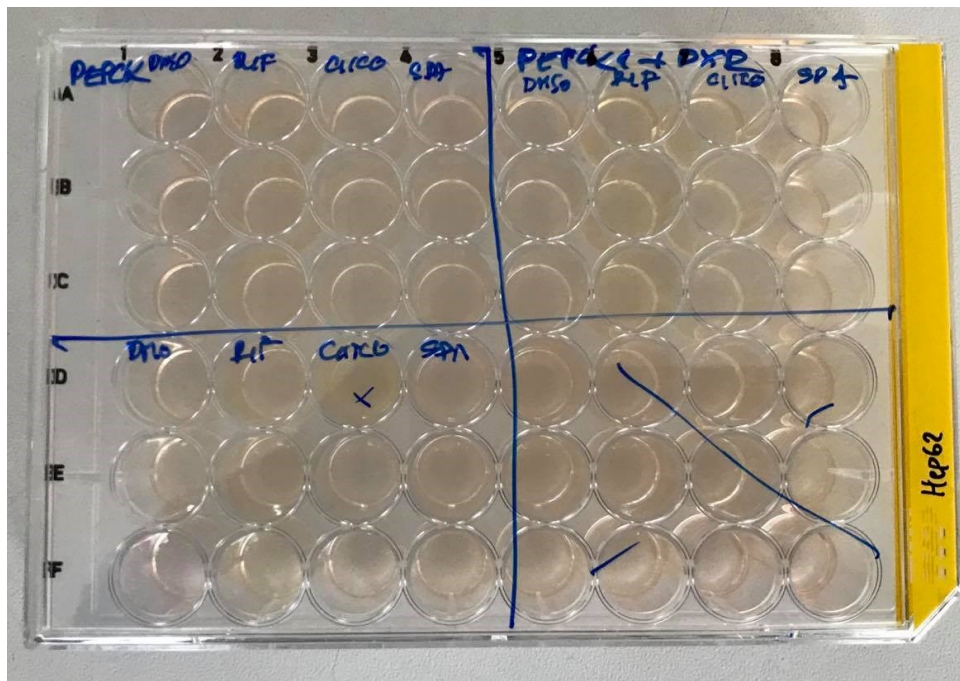
6. Výsledky

Metodou gene reporter assay jsme validovali dva dosud nevyzkoušené luciferázové vektory s promotorovými oblastmi genů PEPCK a CYP7A1. O obou genech se ví, že jsou jejich geny negativně regulovány aktivovanými PXR a CAR receptory. Předpokládali jsme proto, že jejich vektory budou ovlivněny ligandy PXR a CAR receptoru při této metodě.

Nejdříve jsme si ověřili metodu luciferázové reportérové esej na konstruktu 3A4-luc, který je již zaveden na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK. Použili jsme známe ligandy PXR: agonistu Rifampicin a antagonistu SPA70. Jako agonistu CAR receptoru jsme použili látku CITCO.

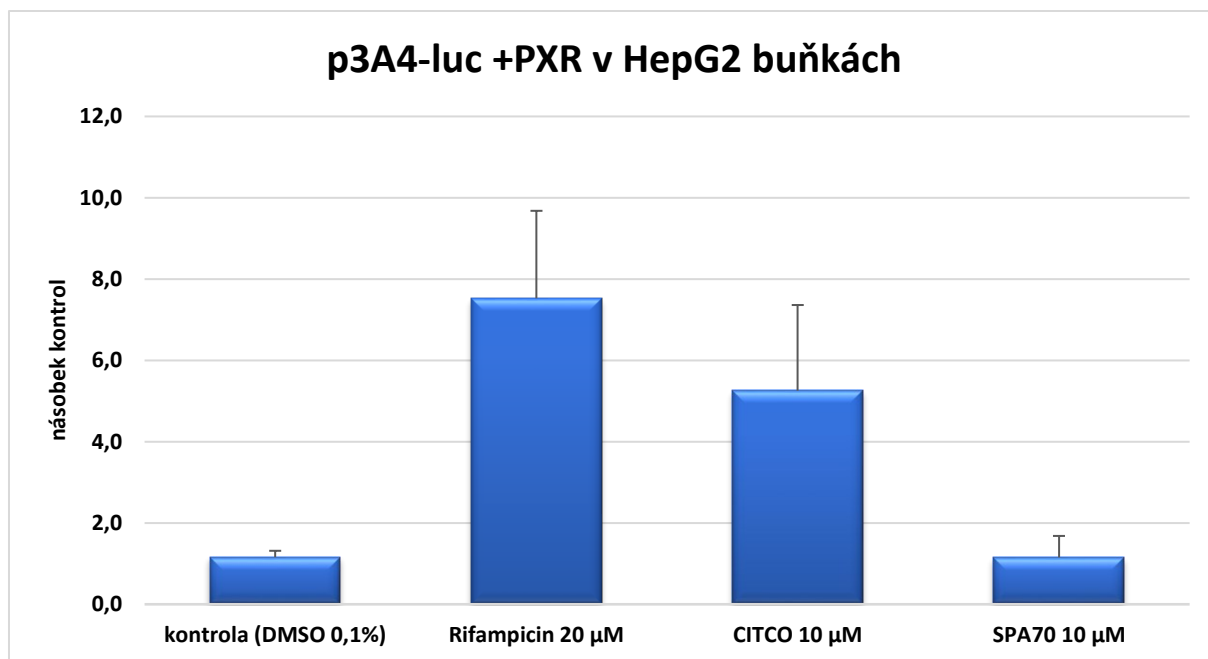
Pozorovali jsme, zda nezvyšují nebo nesnižují transkripční aktivitu promotorových oblastí v těchto vektorech, ta by se projevila jako luminiscenční signál vzniklý v důsledku exprese světluškové luciferázy z reporterového plazmidu a jí katalyzovanou reakcí luciferinu. Vehikulum/solvent DMSO v 0,1% koncentraci byl použit jako negativní kontrola.

Transfekované buňky byly exponovány testovaným látkám vždy v tripletech pro každou látku, do výsledků jsou započítány aritmetické průměry všech tří měření. Výsledky tohoto testu jsme využili k předběžné statistické analýze.



Obrázek 10: 48 jamková destička s naším přesně popsáním experimentem

6.1. Efekt známých ligandů PXR a CAR receptorů na luciferázový konstrukt p3A4-luc



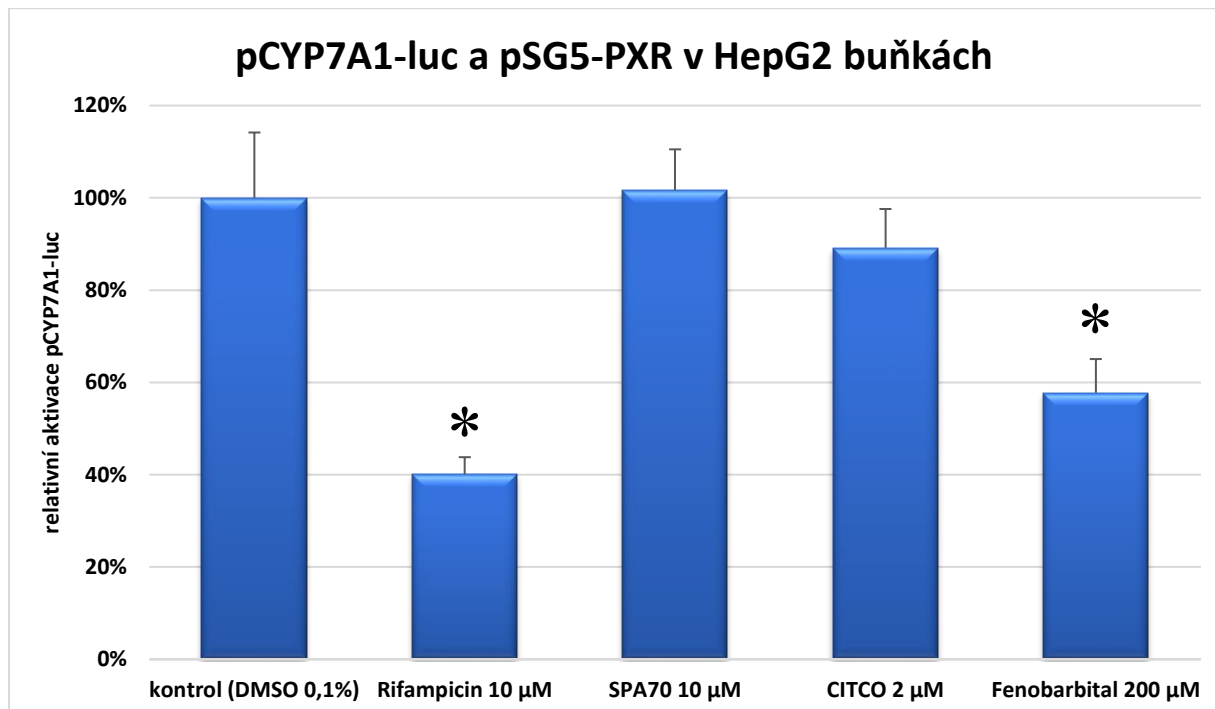
Obrázek 11: Analýza interakce testovaných látek s PXR receptorem metodou luciferase gene reporter assay s reportérovým plazmidem p3A4-luc na HepG2 buněčné linii

Výsledek interakcí byl měřen po inkubaci 24 hodin s testovanými látkami v koncentracích sdělených v grafu na luminometru BioTek Synergy 2. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako poměr luminiscenčních signálů luciferáz firefly a Renilla pro jednotlivé látky. Výsledky představovaly poměr aktivity obou luciferáz vztažených k aktivitě kontroly DMSO 0,1%.

Zaznamenali jsme zvýšení transkripční aktivity receptoru PXR u známého ligandu rifampicinu v koncentraci 20 μM , nárůst jsme pozorovali také u látky CITCO v koncentraci 10 μM . Můžeme tedy konstatovat, že tyto látky mají vysokou afinitu k receptorům PXR nebo CAR a jsou tedy aktivátory tohoto promotoru. Naopak u látky SPA70 jsme nezaznamenali nárůst, nejedná se tedy o ligand receptoru PXR.

Použitá metoda fungovala dle našich představ, lze ji tedy využít další plasmidy, které by mohli potlačovat aktivaci promotorových oblastí genů PEPCK1 a CYP7A1.

6.2. Efekt známých ligandů PXR a CAR receptoru na luciferázový reportérový vektor pCYP7A1-luc v HepG2 buňkách



Obrázek 12: Analýza interakce známých ligandů PXR a CAR receptorů metodou gene reporter assay s reportérovým plazmidem pCYP7A1-luc v HepG2 buňkách.

* -statisticky významný účinek na deaktivaci aktivity ($P < 0,05$)

V dalším experimentu jsme se zaměřili na validaci metody luciferázové reportérové eseje s vektorem pCYP7A1-luc. Gen CYP7A1 je regulovaný skrze aktivovaný PXR receptor, avšak nedochází k indukci, ale k supresi (potlačení) genové exprese.

V mé diplomové práci jsme se proto zajímal, zdali i luciferázový promotorový vektor genu CYP7A1 bude potlačen po přidání ligandů PXR.

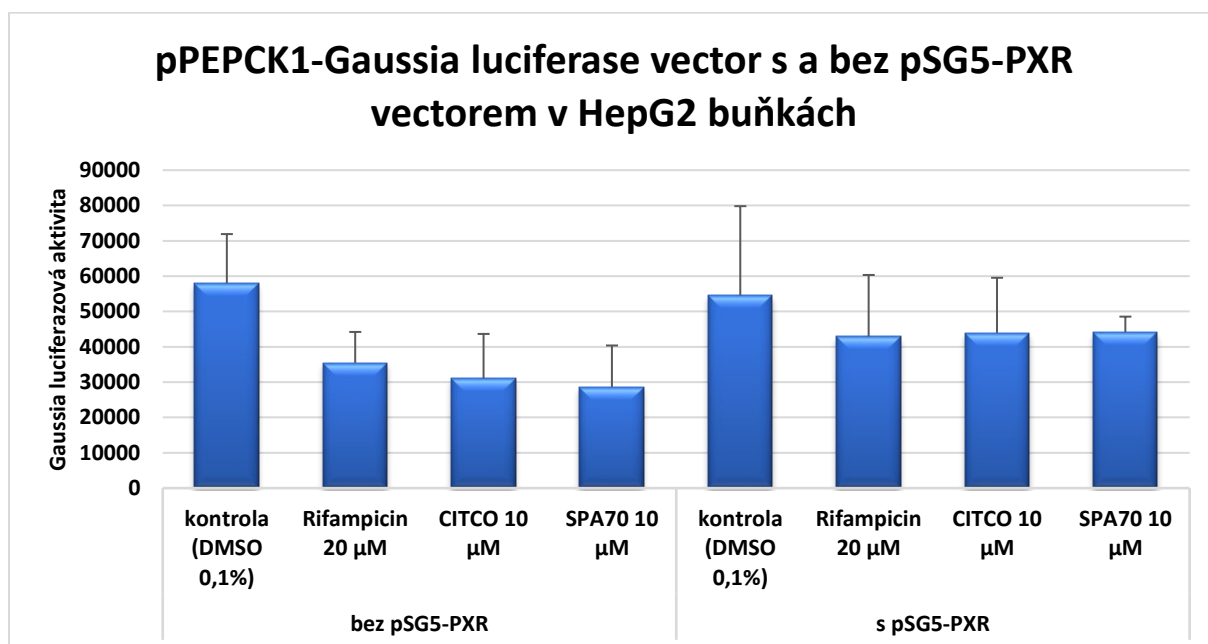
Výsledek interakcí byl měřen po inkubaci 24 hodin s testovanými látkami v koncentracích sdělených v grafu na luminometru BioTek Synergy 2. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako poměr luminiscenčních signálů luciferáz firefly a Renilla pro jednotlivé látky. Výsledky představovaly poměr aktivity obou luciferáz vztažených k aktivitě kontroly DMSO 0,1%.

V případě vektoru pPEPCK1-Gaussia luciferase, pouze Gaussia luciferáza byla detekována na základě metabolismu koelenterazinu (metoda obdobná pro detekci Renilla luciferázy za použití stejného kitu of firmy Promega).

Pomocí naměřených hodnot jsme zaznamenali drobné zvýšení pouze u testované látky SPA70 v 10 μ M koncentraci se srovnání s kontrolou. Tato látka je antagonist PXR. U všech ostatních testovaných sloučenin došlo k poklesu hodnot oproti kontrole. V případě rifampicinu a fenobarbitalu byl pokles statisticky signifikantní na úrovni P je menší nežli 0,05. Látka CITCO v 2 μ M koncentraci vykazoval nejnižší snížení z testovaných sloučenin. Fenobarbital v 200 μ M koncentraci poklesl na aktivaci vektoru na hodnotu 58 % oproti kontrole, je tedy nepřímým aktivátorem PXR. Největší úbytek jsme naměřili u látky rifampicin v 10 μ M koncentraci, naměřená hodnota byla pouze 40 % oproti kontrole, tato látka je přímým aktivátorem PXR a inhibítorem aktivace tohoto plazmidu.

Látka rifampicin v 10 μ M koncentraci je schopna potlačit exprese CYP7A1, který má za následek inhibici syntézy žlučových kyselin. Ostatní testovací sloučeniny nebyly v tomto pokusu statisticky významné. Metoda s pCYP7A1-luc proto funguje dobře, dle předpokladů z literatury.

6.3. Efekt známých ligandů PXR a CAR receptoru na pPEPCK1-Gaussia luciferase vektor s a bez kotransfekce pSG5-PXR vektorem v HepG2 buňkách



Obrázek 13: Analýza interakce známých ligandů PXR a CAR receptorů metodou gene reporter assay s reportérovým plazmidem pPEPCK1-Gaussia luciferase vektor s a bez pSG5-PXR vektorem v HepG2 buňkách

V tomto experimentu jsme srovnávali Gaussia luciferázovou aktivitu vektoru pPEPCK1-Gaussia luciferase s přidáním expresního plazmidu nesoucího cDNA lidského nukleárního receptoru PXR a bez něj, a s pomocí známých ligandů PXR a CAR.

Předpokládali jsme, že přidáme-li do transfekční směsi také expresní vektor pro PXR (pSG5-PXR), zesílí se účinek PXR agonisty rifampicinu a aktivace vektoru pPEPCK1-Gaussia luciferase bude významněji potlačena.

Výsledky měřených hodnot bez pSG5-PXR se výrazně lišili od hodnot naměřených s přítomností tohoto plazmidu. U látek rifampicin 20 μM, CITCO 10 μM a SPA70 10 μM bez pSG5-PXR byla naměřena nižší Gaussia luciferázová aktivita, než u totožných látek ve stejných koncentracích s přidáním reportérovým plazmidem pSG5-PXR. Experimentální výsledky mohou být ovlivněny značnou směrodatnou odchylkou, která byla zapříčiněna nepřesnostmi při uskutečňování měření. V nepřítomnosti PXR nám experiment fungoval, ale po jeho přidání docházelo k nevysvětlitelným efektům, které by bylo nutné dále prozkoumat, nebo dále optimalizovat metodu.

7. Diskuze

Pregnanový X receptor má zásadní význam v regulaci hlavních xenobiotik-metabolizujících enzymů cytochromu P450, mimo jiné působí jako biologický senzor hydrofobních xenobiotik a také kóduje ostatní enzymy I. a II. fáze metabolismu. Důležitý je zejména CYP3A4, který zvládá metabolicky eliminovat více než 50 % uplatňovaných léčiv. PXR vykonává taktéž nedílnou roli v endobiotickém metabolismu a dokáže regulovat důležité geny, které ovlivňují metabolismus glukózy, lipidů, žlučových kyselin, steroidních hormonů a zahrnuje také spojitost k protizánětlivému působení a imunitním procesům. Rozdílnost PXR od ostatních jaderných receptorů vychází z jeho promiskuity, která je konsekvencí uspořádání vazebné domény receptoru. Tento receptor je začleněn v řadě fyziologických procesů, dovede reagovat s jinými jadernými receptory, proto je jeho role v buňkách velice různorodá.

Ačkoliv má PXR většinou obranný vliv, dokáže mít i tmavou stránku. Při nadměrné expresi tohoto jaderného receptoru může nastávat stav zvýšené metabolizace léčiv, která je daná enzymy řízené zvýšenou hladinou PXR. Při testování myši bylo zjištěno, že nadměrná dlouhodobá aktivace PXR má za příčinu vznik diabetes mellitus 2. typu. Využití znalostí ohledně vlastností receptoru PXR by se při objevu bezpečného antagonisty dalo aktivně využít cíleně právě při terapii aterosklerózy nebo diabetes mellitus. Ovlivnění glukózového a lipidového metabolismu a tím i zlepšení života pro lidi s velmi častým zdravotním problémem nás vedlo ke studiu potenciálně agonistů i antagonistů PXR při regulaci jeho cílových genů prostřednictvím luciferázové genové eseje.

Cílem této práce bylo zavést a validovat metodu luciferase reporter gene assay s dvěma luciferázovými konstrukty, které by měly být regulovány prostřednictvím PXR a CAR. Konkrétně se jednalo o luciferázový konstrukt s promotorovou oblastí lidského genu PEPCCK. Druhým konstruktem byl luciferázový konstrukt s promotorovou oblastí lidského genu CYP7A1 na buněčné linii HepG2. Podstatou metody bylo zjištění, zda nedochází ke zvýšení nebo snížení transkripční aktivity, která by se projevila jako luminiscenční signál vzniklý v důsledku exprese světluškové luciferázy z reporterového plazmidu a jí katalyzovanou reakcí luciferinu. Solvent DMSO (0,1%) byl použit jako negativní kontrola. Transfekované HepG2 buňky byly exponovány testovaným látkám vždy v tripletech pro každou látku, do výsledků jsou započítány aritmetické průměry všech tří měření. Testování probíhalo na 48 jamkové destičce kterou jsme rozdělili na 4 části po 12 jamkách.

V experimentu s reportérovým plazmidem pro luciferázu p3A4-luc jsme zkoumali látky, které ovlivňují transkripční aktivitu lidského pregnanového X receptoru. Jamky v destičce byly pro tento pokus obsazeny těmito vektory: pSG5-hPXR (expresní plazmid PXR) (150 ng), p3A4-luc (reportérový plazmid pro luciferázu) (200 ng) a vnitřní kontrola pRL-TK (expresní plazmid pro renilla luciferázu) (30 ng). Následovala šestihodinová transfekce, poté byly mezi buňky přidány testované látky a vehikulum (0,1 % DMSO) a byly inkubovány 24 h.

Mezi testované látky patřily: rifampicin agonista PXR receptoru v koncentraci 20 μM , CITCO v koncentraci 10 μM a SPA70 antagonist PXR receptoru v koncentraci 10 μM , které jsme vybrali pro náš pokus. U prvního experimentu jsme zaznamenali zvýšení transkripční aktivity receptoru PXR u známého ligandu rifampicinu v koncentraci 20 μM , nárůst jsme pozorovali také u látky CITCO v koncentraci 10 μM (obr. 11). Můžeme tedy určit, že tyto látky mají vysokou afinitu k receptoru PXR a jsou tedy aktivátory tohoto promotoru. Naopak u látky SPA70 jsme nezaznamenali nárůst, nejedná se tedy o ligand receptoru PXR. Při použití stejných buněk se stejnými plazmidy můžeme identifikovat další látky, jejichž účinek povede k přesnému určení ligandu PXR. Pro přesné určení ligandu je zapotřebí výzkum několikrát zopakovat. Obdobné výsledky experimentu byly prezentovány i v práci Švecová et al., za použití metody RT-PCR, kde zkoumali účinky azolových antimykotik na expresi mRNA CYP3A4 a PXR ve stejné buněčné linii HepG2. Jako kontrola byla použit 0,1% DMSO. Badatelé popsali několik ligandů PXR receptoru v této skupině stejnou metodou luciferázové reportérové eseje a popsali koncentrační křivky pro tyto látky. Mezi několika testovanými sloučeninami byl také rifampicin v koncentraci 10 μM . V následných experimentech za použití metody RT-PCR byly tyto výsledky ověřovány na úrovni indukce cílového genu pro PXR CYP3A4. Právě u zmíněného 10 μM rifampicinu byla zjištěna největší indukce exprese mRNA CYP3A4, téměř pětkrát vyšší oproti kontrole. Azolová antimykotika rovněž indukovala CYP3A4 mRNA, což ukazuje na validitu luciferázové reportérové eseje. Tento experiment nasvědčuje, že prostřednictvím rifampicinu nebo jiného PXR ligandu lze regulovat expresi genu CYP3A4 prostřednictvím PXR, avšak autoři nepopsali vliv antagonisty PXR na expresi CYP3A4. To je především důsledek toho, že v této době ještě žádný osvědčený PXR antagonist nebyl objeven. Přestože je PXR hlavním faktorem pro genovou expresi právě CYP3A4, o maximální aktivaci tohoto genu rozhoduje i vazba kofaktorů např. HNF4 α a PGC-1 α na LBD místo PXR receptoru (Švecová et al., 2008).

V další části experimentu jsme zkoumali relativní aktivaci nebo inhibici luciferázového plazmidu pCYP7A1 odvozeného od genu CYP7A1 v HepG2 buňkách metodou luciferázové reportérové eseje, kdy jsme použili stejný pracovní postup jako u předešlého experimentu, ale použili jsme buď jiné testované látky, nebo stejné látky v jiných koncentracích. CYP7A1 (cholesterol 7- α hydroxyláza) řadíme mezi jaterní enzymy jejímž úkolem je udržování homeostázu cholesterolu a žlučových kyselin (Bhalla et al., 2004). Pro výzkum byly použity tyto vektory: pSG5-hPXR (expresní plazmid PXR) (150 ng), pCYP7A1-luc (reportérový plazmid pro luciferázu) (200 ng) a vnitřní kontrola pRL-TK (expresní plazmid pro renilla luciferázu) (30 ng). Mezi námi vybrané testované látky náležel rifampicin a SPA70 v 10 μ M koncentraci, CITCO v 2 μ M koncentraci a fenobarbital v 200 μ M koncentraci.

Lehké zvýšení reportérové aktivity pCYP7A1 jsme naměřili u 10 μ M SPA70, jednalo se o navýšení 2 % oproti kontrole. Jemný pokles reportérové aktivity jsme zaznamenali u látky CITCO v 2 μ M koncentraci, míra úbytku aktivity oproti kontrole byla 11 %. Patrný pokles aktivity pCYP7A1 jsme zpozorovali u látky fenobarbital v 200 μ M koncentraci, zde jsme sledovali rozdíl 42 % oproti kontrole. Z námi zjištěných výsledků je proto 200 μ M fenobarbital nepřímým aktivátorem PXR a proto inhibitorem pCYP7A1. Největší úbytek byl pak naměřen u testované látky rifampicin v 10 μ M koncentraci, zde byl naměřen úbytek oproti kontrole 60 % (Obr. 12). Toto zjištění koreluje s předchozími publikovanými výsledky. Experimentální studie naznačují, že ligand PXR rifampicin dokáže snížit hladinu jaterních žlučových kyselin potlačením exprese CYP7A1. Jedním z možných mechanismů represe je inhibice signální dráhy HNF4 α , který řadíme mezi hlavní regulátory a aktivátory exprese CYP7A1 (Bhalla et al., 2004). Autoři výše zmíněné studie uvádějí, že aktivace PXR rifampicinem podporuje interakci mezi PXR a HNF4 α a blokuje aktivaci PGC-1 s HNF4 α , to má za následek transkripční inhibici genu CYP7A1. HNF4 α náleží mezi klíčové regulátory exprese mnoha jaterních genů zapojených do regulace lipidové homeostázy (Bhalla et al., 2004). Rifampicin může inhibovat syntézu žlučových kyselin, na druhé straně indukuje genovou expresi CYP3A4 zprostředkovanou PXR receptorem, který se podílí na eliminaci žlučových kyselin. PXR by proto mohl být obranným mechanismem proti cholestáze způsobené léky nebo žlučovými kyselinami. Tuto teorii potvrzuje využití rifampicinu při terapii svědění při některých cholestatických onemocněních. Studie Blahha et al. se také zabývala kvantitativní analýzou exprese mRNA CYP7A1 pomocí RT-PCR metody na stejné buněčné linii. I touto metodou byla potvrzena inhibiční vlastnost 10 μ M rifampicinu na aktivitu pCYP7A1 a expresi příslušného genu (Li et Chaing, 2004; Bhalla et al., 2004). Tyto výsledky opět potvrzují

funkčnost metody luciferázové genové eseje s vektorem pCYP7A1-luc, i když autoři použili mírně modifikovaný protokol této eseje.

V této práci byly buňky kotransfekovány (transfekce se dvěma samostatnými molekulami nukleové kyseliny, jako je plasmidová DNA a siRNA) 500 ng 1887hCYP7A1-luc v rostoucím množství společně s vektorem CMV-FLAG lidského PXR. CMV vektor byl přidáván dle potřeby. Pro každou transfekci bylo přítomno stejné množství expresního vektoru. Buňky byly následně ošetřeny rifampicinem. Výsledky experimentu napovídají že, lidský PXR potlačuje expresi lidského promotoru CYP7A1 způsobem závislým na rifampicinu. Expresi endogenní CYP7A1 byla zvýšena potlačením exprese PXR siRNA, tedy opačným mechanismem nežli je aktivace PXR rifampicinem. Z výsledkového grafu je patrné, že rifampicin zprostředkuje represi CYP7A1 prostřednictvím receptoru PXR. Zvýšením exprese vektoru kódujícího siRNA tlumící stabilitu PXR mRNA dochází k down-regulaci hladiny endogenní PXR mRNA v buňkách HepG2 a tím pádem ke zvýšení CYP7A1 mRNA (Bhalla et al. 2004).

V poslední části experimentu jsme se věnovali interakci testovaných látek s PXR receptorem metodou luciferase gene reporter assay s reportérovým plazmidem pPEPCK1-Gussia luciferase vector s a bez pSG5-PXR vektorem v HepG2 buňkách. Výsledek interakcí byl měřen po inkubaci 24 hodin s testovanými látkami na luminometru BioTek Synergy 2. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aktivita luciferázy Gussia pro jednotlivé látky. Výsledkem mělo být srovnání aktivity pPEPCK1 s přidáním expresního plazmidu PXR a bez jeho přítomnosti pomocí Gussia luciferasové aktivity. Poslední volné pole destičky bylo obsazeno těmito vektory: pSG5-hPXR (expresní plazmid PXR) (150 ng), pPEPCK1 (reportérový plazmid) (200 ng) a jako vnitřní kontrola pRL-TK (expresní plazmid pro renilla luciferázu) (30 ng). Mezi zkoumané látky náležely 20 μ M rifampicin, CITCO a SPA70 v 10 μ M koncentracích. Předpokládali jsme, že přidáme-li do transfekční směsi také expresní vektor pro PXR (pSG5-PXR), zesílí se účinek PXR agonisty rifampicinu a aktivace vektoru pPEPCK1-Gussia luciferase bude významněji potlačena. Bohužel náš výsledek toto tvrzení nepotvrdil.

Nejnižší Gussia luciferázovou aktivitu bez přítomnosti pSG5-hPXR dle výsledků vykazuje látka SPA70 v 10 μ M koncentraci. Naopak nejvyšší Gussia luciferázovou aktivitu jsme zaznamenali u testované látky rifampicin v 20 μ M koncentraci. Naopak nejvyšší Gussia luciferázovou aktivitu s přítomností pSG5-hPXR podle naměřených výsledků vykazuje látka SPA70 v 10 μ M koncentraci. Nejnižší aktivita byla zjištěna u látky rifampicin

v 20 μM koncentraci. Výsledné naměřené hodnoty všech testovaných látek s přidaným pSG5-hPXR a bez přidání tohoto vektoru se od sebe výrazně nelišily (Obr. 13). Výsledky mohou být ovlivněny značnou odchylkou aritmetických průměrů všech tří měření, která byla zapříčiněna nepřesnostmi při uskutečňování měření.

V nepřítomnosti PXR nám hodnoty experimentu vyšly dle očekávání, ale po jeho přidání docházelo k nevysvětlitelným efektům, které by bylo nutné dále prozkoumat a opakovat měření. Jeden z kroků, který by mohl vést ke zlepšení výsledků je optimalizace metody. Bohužel k dalšímu přezkoumání jsme se nedostali, kvůli časovému nedostatku ovlivněnému pandemií.

8. Závěr

Cílem této práce diplomové experimentální práce bylo zavést metodu luciferázové reportérové eseje s dvěma novými vektory. Ve vektorech byly zaklonovány promotorové oblasti genů CYP7A1 a PEPCCK1, které jsou známé jako cílové geny regulované skrze PXR a CAR. V jejich případě však aktivace PXR a CAR způsobuje potlačení exprese. Předpokládali jsme proto, že známe ligandy PXR a CAR budou inhibovat aktivity těchto vektorů.

To se potvrdilo v případě vektoru pCYP7A1-luc, který byl významně potlačen agonistou PXR rifampicinem a nepřímým aktivátorem PXR fenobarbitalem.

V případě vektoru pPEPCCK1-Gaussia luciferase jsme nedostali konzistentní výsledky a tato metoda bude muset být v budoucnu více optimalizována.

9. Literatura

1. Arguad, D, S Halimi, F Catelloni a X M Lerverve. Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital. *Biochemical Journal*. 1991, 280(3), 663-669. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2800663
2. Bertilsson, G., J. Heidrich, K. Svensson, et al. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, 95(21), 12208-12213. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.21.12208
3. Bhalla, Sonali, Cengiz Ozalp, Sungsoon Fang, Lingjin Xiang a Jongsook Kim Kemper. Ligand-activated Pregnane X Receptor Interferes with HNF-4 Signaling by Targeting a Common Coactivator PGC-1 α . *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(43), 45139-45147. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M405423200
4. Carroll, J. S., Meyer, C. A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T. R., Eeckhoute, J., Brodsky, A. S., Keeton, E. K., Fertuck, K. C., Hall, G. F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E. A., Silver, P. A., Gingeras, T. R., Liu, X. S., & Brown, M. (2006). Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nature Genetics*, 38(11), 1289-1297. <https://doi.org/10.1038/ng1901>
5. Chai, Xiaojuan, Su Zeng a Wen Xie. *Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond*. 2012, 9(3), 253-266. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1517/17425255.2013.754010
6. Chang, Thomas K. H. a David J. Waxman. Synthetic Drugs and Natural Products as Modulators of Constitutive Androstane Receptor (Car) and Pregnane X Receptor (PXR). *Drug Metabolism Reviews*. 2008, 38(1-2), 51-73. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.1080/03602530600569828
7. Chen LQ, Cheung LS, Feng L et al.; *Transport of Sugars. Annual Review of Biochemistry*[online]. 2015, 84(1), 865-894 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033904. ISSN 0066-4154. Dostupné z:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060614-033904>

8. Di Masi, Alessandra, Elisabetta De Marinis, Paolo Ascenzi a Maria Marino. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30(5), 297-343. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2009.04.002
9. Dostál, Jiří. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-5020-4.
10. Fang HL, Strom SC, Cai H, Falany CN, Kocarek TA, Runge-Morris M. Regulation of human hepatic hydroxysteroid sulfotransferase gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcription factor. *Mol Pharmacol*. 2005;67(4):1257-1267. doi:10.1124/mol.104.005389
11. Fusek, Martin, Libor Vitek, Jaroslav Blahoš, Marián Hajdúch, Tomáš Ruml a kolektiv. *Biologická léčiva*. Grada Publishing, 2012. ISBN 9788024779300.
12. Gao J, Xie W. 2012. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012, 33(10), 552-558. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2012.07.003
13. Garcia M, Thirouard L, Sedès L, et al.; Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(11). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19113630
14. Hainer, Vojtěch a kolektiv. *Základy klinické obezitologie. 2.*, přepracované a doplněné vydání. Grada Publishing, 2011. ISBN 9788024732527.
15. Hakkola J, Rysä J, Hukkanen J. Regulation of hepatic energy metabolism by the nuclear receptor PXR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016, 1859(9), 1072-1082. ISSN 18749399. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagr.2016.03.012

16. Hernandez, J. P., Mota, L. C., & Baldwin, W. S. (2009). Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2009, 7(2), 81-105. ISSN 18756921. Dostupné z: doi:10.2174/187569209788654005
17. Holeček, Milan. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. *Grada Publishing*, 2006. ISBN 9788024715629.
18. Hukkanen J, Hakkola J, Rysä J. Pregnane X receptor (PXR) – a contributor to the diabetes epidemic? *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2014, 29(1). ISSN 2191-0162. Dostupné z: doi:10.1515/dmdi-2013-0036
19. Hůlek, Petr, Petr Urbánek a kolektiv. Grada Publishing a.s, 2018. ISBN 9788024729398.
20. Jonker JW, Stedman CA, Liddle C, Downes M. Hepatobiliary ABC transporters: physiology, regulation and implications for disease. *Frontiers in Bioscience*. 2009, 14(1). ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/3576
21. Karen Igor a Štěpán SVAČINA. *Diabetes mellitus: doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře 2018*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2018. ISBN 9788086998992.
22. Karen, Igor, et al. *Diabetes mellitus : doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře* [online] . 1. vydání. Praha : Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009. ISBN 978-80-86998-30-5.
23. Kliewer SA. The Nuclear Pregnane X Receptor Regulates Xenobiotic Detoxification. *The Journal of Nutrition*. 2003, 133(7), 2444S-2447S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/133.7.2444S

24. Kobayashi, Kaoru, Tatsuya Sueyoshi, Kaoru Inour, Rick Moore a Masahiko Negishi. Cytoplasmic Accumulation of the Nuclear Receptor CAR by a Tetratricopeptide Repeat Protein in HepG2 Cells. *Molecular Pharmacology*. 2003, 64(5), 1069-1075. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.64.5.1069
25. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. 2004. Nuclear Receptors CAR and PXR Cross Talk with FOXO1 To Regulate Genes That Encode Drug-Metabolizing and Gluconeogenic Enzymes. *Molecular and Cellular Biology*. 2004, 24(18), 7931-7940. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.24.18.7931-7940.2004
26. Konno, Y., Negishi, M., Kodama, S., 2008. The Roles of Nuclear Receptors CAR and PXR in Hepatic Energy Metabolism. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2008, 23(1), 8-13. ISSN 13474367. Dostupné z: doi:10.2133/dmpk.23.8
27. Koonen, D.P.Y., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.L.M., Ong, H., Vance, D.E., Dyck, J.R.B., 2007. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2007, 56(12), 2863-2871. ISSN 0012-1797. Dostupné z: doi:10.2337/db07-0907
28. Lahtela, J.T., Arranto, A.J., Sotaniemi, E.A., 1985. Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulindependent diabetic subjects. *Diabetes* 34, 911–916.
29. Laudet, Vincent a H. Gronemeyer. *The nuclear receptor: factsbook*. San Diego: Academic Press, c2002. ISBN 9780124377356.
30. Li, Tiangang a John Y. L. Chiang. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005, 288(1), G74-G84. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00258.2004
31. Lihong, Chen, Tuo Biguang a Hui Dong. Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients*. 2016, 8(1). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8010043

32. Mani S, Dou W, Redinbo MR. PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, 45(1), 60-72. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2012.746363
33. Martínková, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 9788024713564.
34. Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ. *The pregnane X receptor: from bench to bedside*. 2008, 4(7), 895-908. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1517/17425255.4.7.895
35. Min, Gyesik, J. Kim Kemper a Byron Kemper. Glucocorticoid Receptor-interacting Protein 1 Mediates Ligand-independent Nuclear Translocation and Activation of Constitutive Androstane Receptor in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277(29), 26356-26363. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M200051200
36. Min, Gyesik, Hwajin Kim, Yangjin Bae, Larry Petz a Jongsook Kim Kemper. Inhibitory Cross-talk between Estrogen Receptor (ER) and Constitutively Activated Androstane Receptor (CAR). *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277(37), 34626-34633. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M205239200
37. Molnár, F., Küblbeck, J., Jyrkkärinne, J., Prantner, V., & Honkakoski, P. (2013). An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2013, 28(2). ISSN 2191-0162. Dostupné z: doi:10.1515/dmdi-2013-0009
38. Naik, Ramachandra G., Barbara M. Brooks-Worrell a Jerry P. Palmer. *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*. 2009, 94(12), 4635-4644. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2009-1120
39. Nelson, David L. a Michael Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*. 7th ed. WH Freeman, 2017. ISBN 9781319108243.
40. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, et al.; Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature*. 1998, 395(6698), 137-143. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/25931

41. Pávek P. Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2016, 7. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2016.00456
42. Pávek P., Červený L., Mičuda S., Štaud F., Novotná-Čečková M., Fendrich Z. (2005). *Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí*, *Remedia* 15 (1-4) Dostupné z: <https://www.klinikafarmakologie.cz/pdfs/far/2009/02/09.pdf>
43. Racek, Jaroslav a kolektiv. *Klinická Biochemie*. Praha: GALÉN, KAROLINUM, 1999. ISBN 8072620231.
44. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. *Pancreatic regulation of glucose homeostasis*. 2016, 48(3), e219-e219. ISSN 2092-6413. Dostupné z: doi:10.1038/emm.2016.6
45. Rybka, Jaroslav. *Diabetes mellitus – Komplikace a přidružená onemocnění: Diagnostické a léčebné postupy*. Grada Publishing, 2007. ISBN 9788024767345.
46. Skálová, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 9788024637334.
47. Steven A. Kliewer, Bryan Goodwin, Timothy M. Willson, The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews*. 2002, 23(5), 687-702. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2001-0038
48. Sugatani J, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M. Regulation of the Human UGT1A1 Gene by Nuclear Receptors Constitutive Active/Androstane Receptor, Pregnane X Receptor, and Glucocorticoid Receptor. *Phase II Conjugation Enzymes and Transport Systems*. Elsevier, 2005, 2005, , 92-104. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780121828059. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(05)00006-6
49. Svačina, Štěpán. *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén, 2010. ISBN 9788072626762.
50. Škrha, J. a kol. *Diabetologie*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-607-6.

51. Švecová L, Vrzal R, Burýšek L, Anzenbacherová E, Červený L, Grim J, et al. Azole Antimycotics Differentially Affect Rifampicin-Induced Pregnane X Receptor-Mediated CYP3A4 Gene Expression. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, 36(2), 339-348. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.107.018341
52. Tebbens JD, Azar M, Friedmann E, Lanzendörfer M, Pávek P. Mathematical Models in the Description of Pregnane X Receptor (PXR)-Regulated Cytochrome P450 Enzyme Induction. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1785. Published 2018 Jun 15. doi:10.3390/ijms19061785
53. Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors☆. *Steroids*. 2007, 72(3), 231-246. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2006.12.006
54. Ueda A, Hamadeh HK, Webb HK, et al.; Diverse Roles of the Nuclear Orphan Receptor CAR in Regulating Hepatic Genes in Response to Phenobarbital. *Molecular Pharmacology*. 2002, 61(1), 1-6. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.61.1.1
55. Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, et al.; The Human Nuclear Xenobiotic Receptor PXR: Structural Determinants of Directed Promiscuity. *Science*. 292(5525), 2329-2333. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1060762
56. Xu C, Li CY-T, Kong A-NT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*. 2005, 28(3), 249-268. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/BF02977789
57. Xu RX, Lambert MH, Wisely BB, et al.; A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXR α Heterodimer. *Molecular Cell*. 2004, 16(6), 919-928. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2004.11.042
58. Yan, J., Chen, B., Lu, J., & Xie, W. (2014). Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015, 36(1), 62-70. ISSN 1671-4083. Dostupné z: doi:10.1038/aps.2014.102

59. Yarushkin AA, Kachaylo EM, Pustyl'nyak VO. 2013. The constitutive androstane receptor activator 4-[(4R,6R)-4,6-diphenyl-1,3-dioxan-2-yl]-N,N-dimethylaniline inhibits the gluconeogenic genes PEPCCK and G6Pase through the suppression of HNF4 α and FOXO1 transcriptional activity. *British Journal of Pharmacology*. 2013, 168(8), 1923-1932. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/bph.12090

9.1. Firemní literatura

1. Bioluminescence Reporters. Protocols and Applications Guide. *Promega*. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/bioluminescent-reporters> [cit. 11.8.2020].
2. Dual-Luciferase Reporter Assay System. Technical manual 2015. *Promega*. Dostupné z: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf> [cit. 11.8.2020].
3. Hep-G2 cell line profile. ECACC 2017. *Culture collections*. Dostupné z: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/134737/hep-g2-cell-line-profile.pdf> [cit. 11.8.2020].
4. Transfection. Protocols and Applications Guide. *Promega*. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection> [cit. 11.8.2020].

9.2. Seznam obrázků

Obrázek 1: Pankreatická regulace glukózové homeostázy	14
Obrázek 2: Porovnání zjednodušeného schématu glykolýzy s glukoneogenezí	17
Obrázek 3: Znázornění struktury nukleárních receptorů	20
Obrázek 4: Vybrané ligandy PXR receptoru	23
Obrázek 5: Potlačení transkripce genu G6Páza.....	30
Obrázek 6: Vliv PXR receptoru na lidský metabolismus	31
Obrázek 7: Buněčná linie HepG2 pod světelným mikroskopem, zvětšení 1000x.....	36
Obrázek 8: Metoda gene report assay	39
Obrázek 9: Luminiscenční reakce katalyzované Firefly a Renilla luciferázou	40
Obrázek 10: 48 jamková destička s naším přesně popsáním experimentem	42
Obrázek 11: Analýza interakce testovaných látek s PXR receptorem metodou luciferase gene reporter assay s reportérovým plazmidem p3A4-luc na HepG2 buněčné linii	43
Obrázek 12: Analýza interakce známých ligandů PXR a CAR receptorů metodou gene reporter assay s reportérovým plazmidem pCYP7A1-luc v HepG2 buňkách.....	44
Obrázek 13: Analýza interakce známých ligandů PXR a CAR receptorů metodou gene reporter assay s reportérovým plazmidem pPEPCK1-Gaussia luciferase vector s a bez pSG5-PXR vektorem v HepG2 buňkách	46

9.3. Seznam tabulek

Tabulka 1 - Klasifikace DM.....	10
Tabulka 2 - Srovnání diabetu mellitu typu 1 a typu 2	11
Tabulka 3 - Glukóza v plazmě	12
Tabulka 4 - Vybrané ligandy nebo aktivátory CAR	27