UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

INTERAKCE DERIVÁTŮ RIFAMPICINU S PREGNANOVÝM X RECEPTOREM A OATP1B1 TRANSPORTÉREM

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Hradec Králové 2022 Zdeňka Krajníková

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové Zdeňka Krajníková

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Tomáši Smutnému, Ph.D. za odborné vedení při jejím zpracování. Mé díky také patří PharmDr. Lucii Smutné, Ph.D. za cenné rady a praktické vedení při práci v laboratoři.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Zdeňka Krajníková

Školitel: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce derivátů rifampicinu s pregnanovým X receptorem a OATP1B1 transportérem

Pregnanový X receptor (PXR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor regulující jaterní expresi genů. Jeden z cílových genů PXR, cytochrom P450 3A4 (CYP 3A4), je nejdůležitější biotransformační enzym klinicky používaných léčiv. Modelovým ligandem PXR je rifampicin (RIF). RIF vstupuje do hepatocytů z bazolaterální strany pomocí OATP1B1 transportéru. Není bez zajímavosti, že je RIF chemicky nestabilní molekulou. Navíc je metabolizován v lidském těle.

V této diplomové práci jsme se rozhodli určit afinitu derivátů RIF (rifampicin chinonu, rifampicin N-oxidu, 25-desacetylrifampicinu a 3-formylrifamycinu SV) k PXR a OATP1B1, která je zatím jen omezeně popsaná. K tomuto účelu jsme použili metody two hybrid a gene reporter assay.

Pomocí two hybrid assay jsme zjistili, že rifampicin chinon, rifampicin N-oxid a 3-formylrifamycin SV (10 μM) aktivují PXR srovnatelně jako RIF (pozitivní kontrola). Naproti tomu 25-desacetylrifampicin má nižší afinitu k PXR než RIF. Dále jsme vyhodnotili vliv OATP1B1 transportéru na bazolaterální transport RIF a jeho derivátů. RIF a rifampicin chinon indukoval aktivitu reportérového genu CYP3A4 silněji v HepG2 buňkách koexpresujících PXR a OATP1B1 ve srovnání s HepG2 buňkami transfekovanými pouze s expresním PXR vektorem. Výsledky nepřímo ukazují možný vliv OATP1B1 na transport RIF a rifampicin chinonu.

Závěrem naše data ukazují, že deriváty RIF aktivují PXR a OATP1B1 může být zapojen do transportu RIF a rifampicin chinonu.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Zdeňka Krajníková

Supervisor: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Title of diploma thesis: Interactions of rifampicin derivatives with pregnane X receptor and OATP1B1 transporter

Pregnane X receptor (PXR) is a ligand-activated transcription factor, which regulates gene expression in the liver. Among PXR target genes, cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) is the most important enzyme responsible for metabolism of clinically used drugs. Rifampicin (RIF) is a prototype PXR ligand. It enters hepatocytes across the basolateral membrane by OATP1B1 transporter. Noteworthy, RIF is a chemically unstable molecule. Additionally, it is also metabolized in the human body.

In this diploma thesis, we decided to determine the affinity of RIF derivatives (i.e. rifampicin quinone, rifampicin N-oxide, 25-desacetylrifampicin, and 3-formylrifamycin SV) to PXR and OATP1B1, which has not been explored in details so far. For this, two hybrid and gene reporter assays were employed.

As revealed by two hybrid assay, rifampicin quinone, rifampicin N-oxide, and 3-formylrifamycin SV (10 μM) activated PXR at a level comparable with RIF (positive control). Contrary, 25-desacetylrifampicin showed a lower affinity to PXR than that of RIF. Furthermore, we evaluated the impact of OATP1B1 on the transport of RIF and its derivatives. RIF and rifampicin quinone induced CYP3A4 gene reporter activity stronger in HepG2 cells co-expressing PXR and OATP1B1 when compared to HepG2 cells transfected only with PXR expression vector. The results indirectly point out possible involvement of OATP1B1 in the transport of RIF and rifampicin quinone.

In conclusion, our data demonstrates that RIF derivatives activate PXR and that OATP1B1 can be involved in the transport of RIF and rifampicin quinone.

Obsah

1 Seznam zkratek 1

2 Úvod 3

3 Teoretická část 4

3.1 Biotransformace 4

3.1.1 Biotransformační enzymy 4

3.2 Nukleární (jaderné) receptory 5

3.2.1 Pregnanový X receptor 7

3.3 OATP 11

3.3.1 OATP1B1 13

3.4 Rifampicin 15

4 Cíl práce 21

5 Experimentální část 22

5.1 Materiál a metody 22

5.1.1 Buněčná linie HepG2 22

5.1.2 Pomůcky, přístroje 23

5.1.3 Plazmidy použité k transfekci HepG2 buněk 23

5.1.4 Reagencia a chemikálie 24

5.2 Transfekce – úvod do metody 25

5.3 Gene reporter assay – úvod do metody 26

5.3.1 Dual-Luciferase reporter assay systém 26

5.4 Two hybrid assay 28

5.5 Statistická analýza 30

6 Výsledky 31

6.1 Aktivace PXR rifampicinem a jeho deriváty analyzované metodou two hybrid assay 31

6.2 Vliv OATP1B1 transportéru na bazolaterální transport derivátů rifampicinu a aktivaci PXR 32

7 Diskuse 36

8 Závěr 38

9 Reference.....39

1 Seznam zkratek

AADAC	arylacetamid deacetyláza
AF-1	aktivační funkce na ligandu nezávislá
AF-2	aktivační funkce na ligandu závislá
ANOVA	analýza rozptylu
ATP	adenosintrifosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA vázající doména
DDI	lékové interakce
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	kyselina edetová
FXR	farnesoidní receptor
GIT	gastrointestinální trakt
HDACs	histonové deacetylázy
HNF	hepatální nukleární faktor
LBD	ligand vázající doména
LRH-1	homolog 1 jaterního receptoru
LXR	jaterní X receptor
MDR2	transportér mnohočetné lékové rezistence 2
NCoR1 a NCoR2	korepresor 1 a 2 jaderného receptoru
NK	nukleová kyselina

OATP	polypetidový přenašeč organických aniontů
PBS	fosfátový pufr
PPAR	receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů
PXR	pregnanový X receptor
PXR-RE	responzivní element pregnanového X receptoru
RAR	receptor kyseliny retinové
RDR	oblast podmiňující rezistenci
RFQ	rifampicin chinon
RID	receptor interakční doména
RIF	rifampicin
RXRα	retinoidní X receptor α
SD	směrodatná odchylka
SLCO	solute carrier for organic anions, gen pro OATP
SNP	jednonukleotidový polymorfismus, bodová mutace
SRC-1	koativátor 1 steroidního receptoru
SXR	receptor pro steroidy a xenobiotika
XREM	zesilující modul odpovídající na xenobiotika

2 Úvod

Nukleární receptory jsou skupinou transkripčních faktorů, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace a udržování homeostázy organismu. Do této skupiny receptorů patří i tzv. sirotčí adoptované receptory, jako je např. pregnanový X receptor (PXR) (Pávek *et al.* 2005, Pávek 2016, Shi 2007).

PXR je ligandem aktivovaný transkripční faktor regulující hepatocytární expresi genů. Typickým příkladem cílového genu regulovaného PXR je CYP3A4, což je jeden z nejdůležitějších biotransformačních enzymů klinicky používaných léčiv. Změna transkripční aktivity PXR podmiňuje farmakokineticky významné lékové interakce a toxicitu. Indukce biotransformačních enzymů pomocí PXR může nejen snížit zamýšlený terapeutický účinek léčiv, ale i zvýšit produkci toxických metabolitů (Carnahan a Redinbo 2005, Correia 2006, Kousalová *et al.* 2003, Mani *et al.* 2013, Martínková *et al.* 2018).

Modelovým ligandem PXR je rifampicin (Mani *et al.* 2013), který vstupuje do hepatocytů pomocí OATP1B1 transportéru (Tirona *et al.* 2003).

Rifampicin (RIF) je polosyntetické antituberkulotikum ze skupiny rifamycinů, které jsou produkovány *Streptomyces mediterranei.* Byl objeven v roce 1957 jako derivát rifamycinu B. Jeho baktericidní účinek je založen na inhibici DNA-dependentní RNA-polymerázy. V současné době se používá převážně k léčbě tuberkulózy a lepry (Alsayyed a Adam 2004, web 1).

RIF je chemicky nestabilní molekulou, navíc je v lidském těle enzymaticky metabolizován (Nakajima *et al.* 2011, Sutradhar a Zaman 2021). V předkládané práci jsme se rozhodli určit afinitu některých derivátů RIF (rifampicin chinonu, rifampicin N-oxidu, 25-desacetylrifampicinu a 3-formylrifamycinu SV) k PXR a OATP1B1, která nebyla v minulosti detailně studována.

3 Teoretická část

3.1 Biotransformace

Metabolismus neboli biotransformace je, vedle absorpce, distribuce a exkrece, jedním z farmakokinetických dějů probíhajících v lidském těle, které nastávají po podání léčiva (xenobiotika). Látky jsou během biotransformace přeměněny na více hydrofilní molekuly, které jsou snadněji vyloučeny ledvinami nebo žlučí. Léčiva podaná do těla mohou být metabolizována buď na látky s nižším nebo žádným terapeutickým účinkem, s účinkem vyšším, tj. proléčiva anebo s účinkem toxickým. Některá léčiva nepodléhají biotransformaci vůbec a jsou tělem vyloučena v původní formě. Biotransformace probíhá pomocí biotransformačních enzymů především v játrech (hepatocytech), střevě, ale i v plicích a ledvinách. Můžeme ji rozdělit do dvou fází tj. reakce I. fáze a reakce II. fáze. V první fázi se xenobiotika stávají polárnějšími, a to navázáním nebo odkrytím funkčních skupin -OH, -NH_2 nebo -SH. Některá pokračují do druhé fáze, která zahrnuje konjugace s endogenní látkou, a to například s kyselinou glukuronovou, sírovou, octovou nebo s glutationem či glycinem. Tato modifikace dále zvýší polaritu léčiva (Correia 2006, Martínková *et al.* 2018).

Xenobiotika mohou být pro biotransformační enzym substrátem, induktorem, inhibitorem nebo jejich vzájemnou kombinací. Důsledkem enzymové indukce je urychlení biotransformace léčiva. Naopak v případě inhibice je rychlost metabolismu snížena (Correia 2006).

3.1.1 Biotransformační enzymy

Enzymy jsou biologické katalyzátory s vysokou účinností a komplexní regulací. Principem působení je snížení velikosti aktivační energie reakce, která pak může proběhnout rychleji, za fyziologické teploty, tlaku a pH. Jedna katalyzovaná reakce je rozdělena do několika dílčích reakcí, tzv. přechodných stavů, z čehož každá má hodnotu aktivační energie znatelně nižší, a je tedy lehce dosažitelná v podmínkách lidského těla. Celková hodnota aktivační energie reakce však zůstává stejná (Ledvina *et al.* 2009).

Z hlediska struktury se enzymy skládají z bílkovinné (apoenzym) a nebílkovinné (koenzym) části. Enzymy jsou většinou větší než substrát, jehož přeměnu katalyzují. Enzym-substrátový komplex vzniká vazbou substrátu do aktivního místa enzymu. Aktivní místo je strukturní oblast enzymu, které kromě vazebných skupin obsahuje i katalytické skupiny zajišťující vlastní přeměnnou reakci (Ledvina *et al.* 2009).

Jeden enzym může mít více forem, které se od sebe liší např. velikostí molekuly, strukturními odchylkami nebo vyšší odolností vůči teplotě. Tyto formy mohou vznikat na podkladě genetickém (tzv. izoenzymy) nebo jiném, jako například během posttranskripční nebo posttranslační úpravy (Ledvina *et al.* 2009).

Mezi základní biotransformační enzymy I. fáze patří cytochrom P450 (CYP), který existuje v mnoha různých izoformách jako například CYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 a 3A4. Nachází se ve vnitřní membráně mitochondrií nebo na membráně endoplazmatického retikula. V lidském těle se CYP nachází nejčastěji v játrech, střevě, mozku, plicích, kůži a ledvinách (Correia 2006, Waring 2020).

V lidských játrech je nejvíce zastoupený CYP3A4, tvoří zhruba 30 % všech CYP. Právě CYP3A4 zajišťuje biotransformaci více jak 50 % klinicky používaných léčiv. Mezi jeho typické induktory patří například dexametason, fenobarbital, fenytoin, karbamazepin, RIF a hyperforin. Mezi inhibitory amiodaron, clotrimazol, cyklosporin, erytromycin, flukonazol, fluoxetin, grapefruitová šťáva, indinavir, klaritromycin, nifedipin, omeprazol, verapamil atd. Do skupiny substrátů řadíme amiodaron, atorvastatin, diazepam, digitoxin, fentanyl, losartan a spoustu dalších. Na podkladě změn aktivity CYP3A4 vznikají klinicky významné farmakokinetické interakce léčiv (Kousalová *et al.* 2003).

Příkladem závažnosti lékových interakcí (z angl. drug-drug interactions, DDIs) může být nasazení RIF u pacientů po transplantaci, kteří souběžně užívají imunosupresivum cyklosporin, substrát CYP3A4. RIF zvyšuje transkripční aktivitu PXR a způsobuje indukci CYP3A4. To vede k poklesu terapeutické koncentrace cyklosporinu v krvi a následně k riziku rejekce transplantátu (Mani *et al.* 2013).

3.2 Nukleární (jaderné) receptory

Nukleární receptory jsou skupinou transkripčních faktorů, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace a udržování homeostázy organismu. Jejich základní molekulární funkcí je regulace buněčné transkripce cílových genů. Transkripční regulaci nukleárních receptorů upravují další proteiny (koaktivátory a korepresory) (Pávek *et al.* 2005, Pávek 2016, Shi 2007).

Jaderné receptory tvoří nadrodinu proteinů (z angl. superfamily), které mají podobné vlastnosti dané typickou strukturou funkčních domén. Obecně se jaderný receptor skládá z domény rozpoznávající specifické sekvence promotorové DNA

tzv. DBD (z angl. DNA binding domain), spojovací struktury (z angl. hinge), domény vázající ligand tzv. LBD (z angl. ligand binding domain) a úseků AF-1 a AF-2. AF-1 je aktivační funkce na ligandu nezávislá, AF-2 je aktivační funkce na ligandu závislá, viz obr. 1 (Carnahan a Redinbo 2005, Pávek *et al.* 2005, Pávek 2016, Shi 2007).

Obr. 1 Znázornění struktury lidského pregnanového X receptoru, zástupce nukleárních receptorů

Modifikováno dle: Carnahan a Redinbo 2005

Do nadrodiny nukleárních receptorů patří mimo jiné steroidní a sirotčí (z angl. orphan) receptory, u kterých neznáme jejich endogenní ligandy. Do skupiny sirotčích receptorů můžeme ještě zařadit podskupinu tzv. adoptovaných sirotčích receptorů, jejichž ligandy byly identifikovány až po objevení samotných receptorů (Pávek 2016, Shi 2007).

První skupina, steroidní jaderné receptory, jsou schopné vázat exogenní i endogenní sloučeniny a zahrnují čtyři druhy receptorů: glukokortikoidní, estrogenní, androgenní a receptor kyseliny retinové (z angl. retinoic acid receptor, RAR) (Chen *et al.* 2012).

Skupina sirotčích receptorů a adoptovaných sirotčích receptorů tvoří téměř 60 % všech jaderných receptorů. Příkladem jsou receptory aktivované proliferátory peroxisomů tj. PPAR (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor), jaterní X receptor (z angl. liver X receptor, LXR), konstitutivní androstanový receptor (z angl. constitutive androstane receptor, CAR) a PXR, které regulují správný vývoj organismu, udržují homeostázu a mohou se také podílet na rozvoji některých onemocnění (Chen *et al.* 2012).

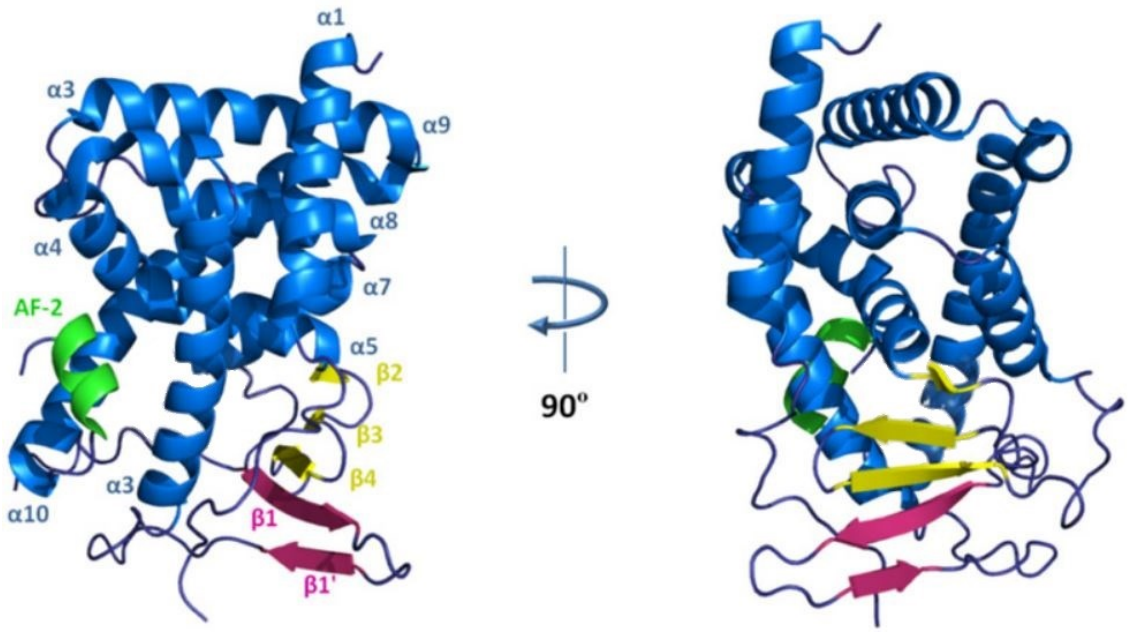
Steroidní receptory se obecně vážou k DNA ve formě homodimerů, adoptované sirotčí receptory pak jako heterodimery spolu s retinoidním X receptorem α (z angl. retinoid X receptor α, RXRα). V obou skupinách se vyskytují výjimky, např. homolog 1 jaterního receptoru (z angl. liver receptor homolog 1, LRH-1) se vyskytuje ve formě monomeru (Mani *et al.* 2013).

3.2.1 Pregnanový X receptor

Mezi adoptované sirotčí jaderné receptory patří PXR, klasifikovaný jako nukleární receptor podrodiny 1, skupiny I, člen 2 (NR1I2) a zároveň jako receptor pro steroidy a xenobiotika (z angl. steroid and xenobiotic receptor, SXR). PXR řídí expresi biotransformačních enzymů první a druhé fáze, a některých transportérů, za účelem ochránit organismus před potenciálně škodlivým vlivem exogenních i endogenních sloučenin (Carnahan a Redinbo 2005, Shi 2007, Skandalaki *et al.* 2021).

Struktura a ligandy PXR

Lidský PXR se skládá ze 434 aminokyselin a je kódován genem *NR1I2*, který se nachází na třetím chromozomu. LBD PXR tvoří tři vrstvy α-helix (modře) uspořádané do tzv. sandwich tvaru a pět β vláken (žlutě a růžově) uspořádaných antiparalelně v jedné ploše, jak je vidět na obr. 2. AF-2 je znázorněna zeleně (Carnahan a Redinbo 2005, Ong *et al.* 2011, Skandalaki *et al.* 2021).

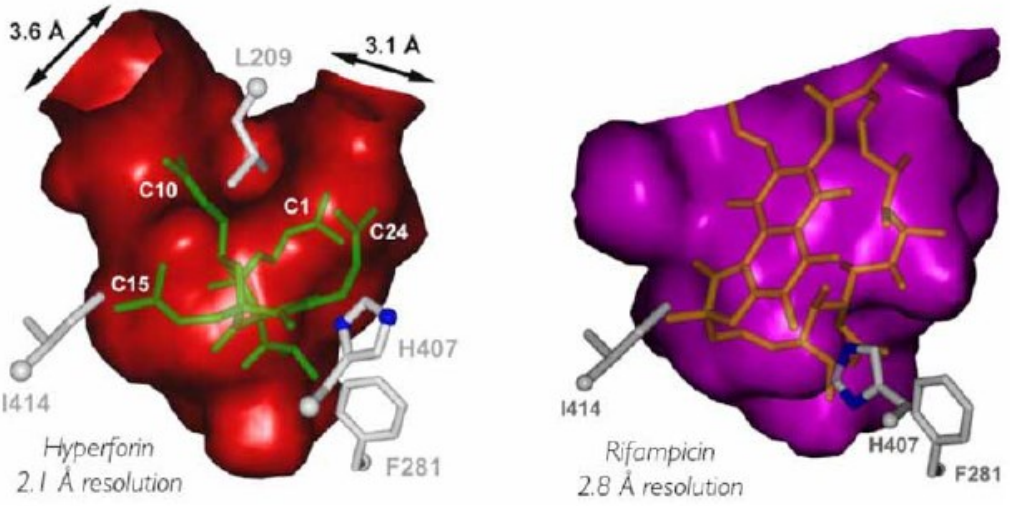


Obr. 2 Struktura LBD PXR. Modře jsou znázorněné α-helix, žlutě β vlákna obdobná pro další NR, růžově β vlákna unikátní pro PXR, zeleně je znázorněna AF-2.

Modifikováno dle: Ong *et al.* 2011

PXR je ligandem regulovaný transkripční faktor, který je schopen vázat velkou škálu různorodých molekul právě díky své struktuře LBD, která tvoří velkou flexibilní hydrofobní kapsu o velikosti 1150 $Å^3$, což je skoro dvojnásobek oproti příbuznému CAR. Typickými ligandy PXR jsou molekuly lipofilní struktury s menším počtem polárních

skupin s velikostí v rozpětí 232 Da (fenobarbital) až víc jak 800 Da (rifampicin, taxol), viz obr. 3. Počet a molekulární různorodost ligandů předurčuje PXR jako jeden z hlavních sensorů xenobiotik. Mezi ligandy, vázající se na PXR, patří například RIF, clotrimazol, tamoxifen, nifedipin, vitamín E a K2, hyperforin z třezalky tečkované a karotenoidy. Z endogenních molekul jsou to například žlučové kyseliny a jejich prekurzory, progesteron, cholesterol a jeho metabolity (Carnahan a Redinbo 2005, Mani *et al.* 2013, Pávek 2016, Skandalaki *et al.* 2021, Timsit a Negishi 2007).



Obr. 3 LBD PXR přizpůsobuje svoji strukturu pro různé ligandy (hyperforin vlevo, rifampicin vpravo)

Převzato z: Carnahan a Redinbo 2005

Polymorfismus genu pro PXR

Není bez zajímavosti, že gen pro PXR je polymorfní. V nízké frekvenci se zde nachází bodové mutace (z angl. single nucleotide polymorphism, SNP). Odlišnost v kódující oblasti genu u europoidních obyvatel odpovídá 1 bp v 15 984 bp. Většina SNP má frekvenci minoritní alely menší než 0,1, všechny se ale významně neliší od Hardyho–Weinbergova zákona (P>0,05). Efekt polymorfismu je různý podle toho, jestli se nachází v kódujících nebo nekódujících oblastech genu. V kódujících oblastech může způsobit změnu struktury LBD nebo DBD domén PXR a tím i potenciálně ovlivňuje vazebnost PXR k ligandům a k cílovým oblastem DNA. Tento fakt může mít vliv na rozdílnou odpověď populace jak v reakci na stejnou léčbu, tak v riziku a závažnosti onemocnění. V nekódujících oblastech může polymorfismus přispívat ke změnám hladin PXR exprese (Kotta-Loizou *et al.* 2013, Pávek *et al.* 2005, Skandalaki *et al*. 2021, Zhang *et al.* 2001).

Lokalizace PXR

V těle se PXR nachází především v játrech, ale i v ledvinách, tenkém a tlustém střevě, v žaludku, míše a kostní dřeni. Je možné ho také detekovat v nádorových buňkách prsu a endometria, kde se patrně podílí na regulaci jejich růstu, proliferaci, apoptóze a vzniku metastáz (Carnahan a Redinbo 2005, Skandalaki *et al.* 2021).

Funkce PXR

Jak bylo již zmíněno, PXR je zodpovědný za regulaci exprese enzymů, které zajišťují biotransformaci xenobiotik (léčiv). Mezi cílové enzymy PXR patří CYP (3A4, 2C9, 2C8, 2C19, 2B6), glutathion S-transferázy, sulfotransferázy a karboxylesterázy (Pávek *et al.* 2005). PXR také řídí expresi genů pro P-glykoprotein transportér MDR2 (mnohočetné lékové rezistence, z angl. multi drug rezistence 2) a OATP transportér (polypetidový přenašeč organických aniontů, z angl. organic anion transporting polypeptides) (Carnahan a Redinbo 2005, Skandalaki *et al.* 2021). Nedávná práce ukázala, že PXR aktivovaný RIF celkem indukuje 164 a inhibuje 334 genů v modelu 2D kultivovaných lidských hepatocytů (Kandel *et al.* 2016). Funkcí PXR je tedy nejen regulace biotransformace xenobiotik, ale podílí se i na mnoha endogenních procesech např. metabolismu glukózy, lipidů, žlučových kyselin, vitaminů a regulaci zánětu. Aktivace PXR může způsobit lékové interakce a vznik rezistence vůči chemoterapeutikům (Mani *et al.* 2013, Skandalaki *et al.* 2021).

Agonisté a antagonisté PXR

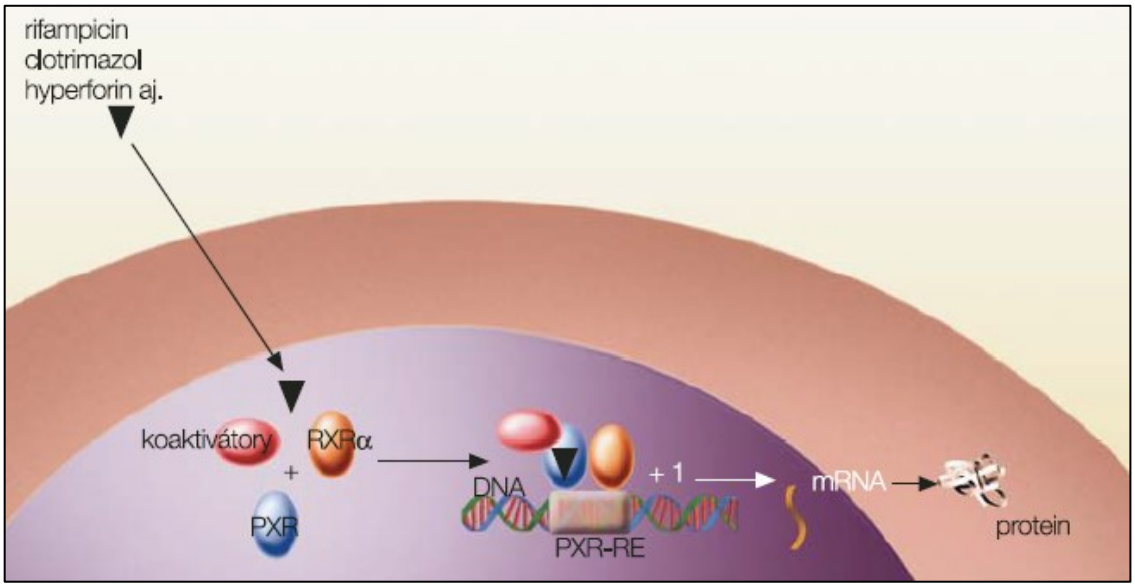
Agonistické působení ligandů zvyšuje transkripční aktivitu PXR. Příkladem agonistů jsou artemisinin, clotrimazol, dexamethason, endosulfan, *glycyrrhiza uralensis* extrakt, hyperforin, nifendipin, paklitaxel, fenobarbital, *ginkgo biloba* extrakt, RIF, ritonavir, *schisandra chinensis* extrakt a taxol (Burk *et al.* 2005, Carnahan a Redinbo 2005, Casabar *et al.* 2010, Chang a Waxman 2008, Kliewer *et al.* 2002, Mu *et al.* 2006, Yeung *et al.* 2006). Antagonisté pak blokují účinek agonistů (Chang a Waxman 2008). Mezi antagonisty PXR paří například flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, leflunomid, SPA70 a trabectedin (Biswas *et al.* 2009, Chang a Waxman 2008, Lin *et al.* 2017).

Vývojem malých molekul, které by se chovaly jako antagonisté PXR se zabýval Mani *et al.* (2013). Tyto molekuly by snad mohly zvrátit výše zmíněné negativní důsledky

působení agonistů PXR, jako jsou lékové interakce, rezistence nádorů vůči léčbě a možná i samotný růst nádorů.

Aktivace a regulace PXR

Aktivace PXR začíná navázáním ligandu přímo do LBD PXR v buněčném jádře. Zde pak vzniká komplex s retinoidním X receptorem (RXRα), koaktivátory (např. steroid receptor coaktivator-1, SRC-1) a RNA – polymerázou II. DBD identifikuje responzivní místo PXR (z angl. response element, PXR-RE) regulovaných genů a RNA – polymeráza II spouští transkripci za vzniku mRNA, která je následně přeložena do proteinu, viz obr. 4. Aktivace PXR může probíhat taky vazbou ligandu přímo v cytoplazmě s následnou translokací PXR do buněčného jádra. Degradaci PXR zajišťuje proteazom, což je ATP-dependentní komplex degradující většinu buněčných proteinů (Carnahan a Redinbo 2005, Masuyama *et al.* 2002, Pávek *et al.* 2005).



Obr. 4 Regulace exprese genů přes PXR

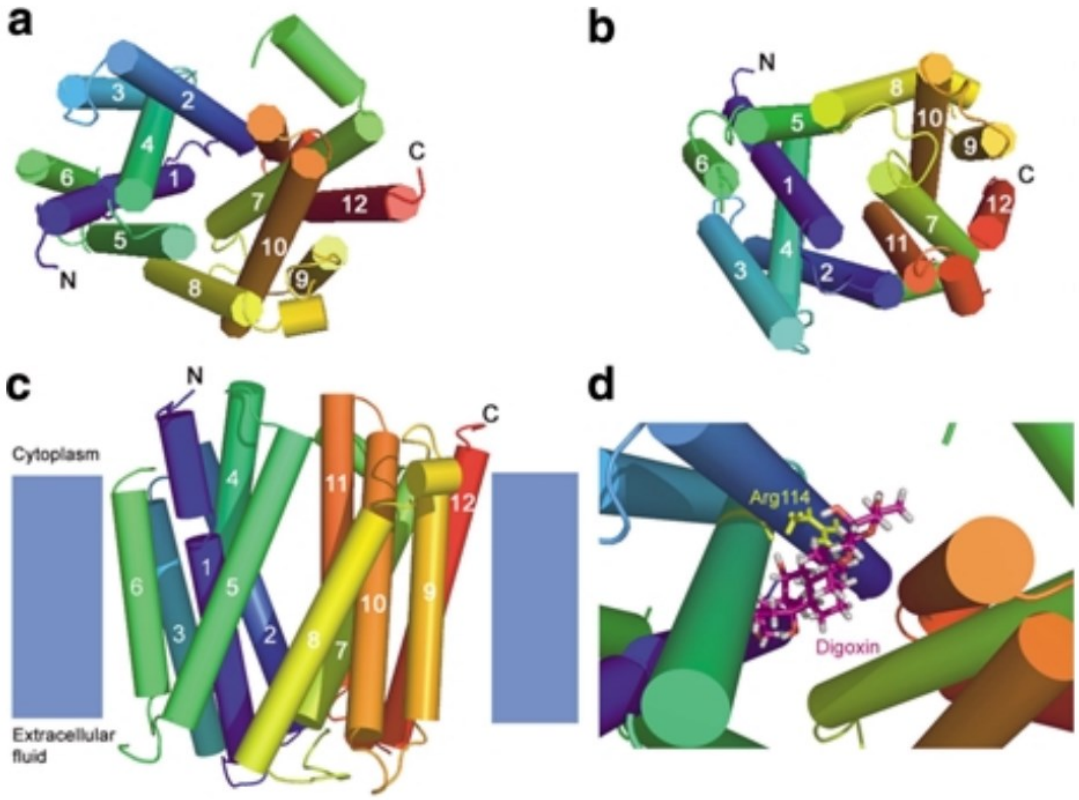
Převzato z: Pávek et al. (2005)

V klidovém stavu, kdy na PXR není navázán agonista, je PXR regulován transkripčními korepresory jako korepresor 1 a 2 jaderného receptoru (z angl. nuclear receptor co-repressor, NCoR1 a NCoR2). NCoR1 a NCoR2 regulují potlačení bazální transkripční aktivity PXR pomocí vazby histonových deacetyláz (z angl. histone deacetylases, HDACs) (Pongula a Mani 2013, Skandalaki *et al.* 2021).

3.3 OATP

OATP, polypeptidové přenašeče organických aniontů, jsou membránové proteiny, které jsou schopné intracelulárně transportovat látky přes buněčnou membránu. Transportéry jsou nezbytnou součástí buněk, protože buňka samotná je od okolí oddělena buněčnou membránou, která zabraňuje volnému průchodu látek. OATP se systematicky dělí do šesti podskupin (OATP1 až OATP6), které zahrnují celkem jedenáct transportérů. Tyto proteiny jsou kódovány geny, které se nazývají *SLCO* (z angl. solute carrier for organic anions). Mezi typické substráty OATP patří digoxin, simvastatin, atorvastatin, atenolol, telmisartan, methotrexát a diklofenak (Choudhuri a Klaasen 2020, Martínková *et al.* 2018, Prokeš *et al.* 2017, Svoboda *et al.* 2011).

OATP tvoří 643 až 722 aminokyselin uspořádaných ve 12 helixech (H1-H12) oddělených šesti extracelulárními a pěti intracelulárními kličkami znázorněných na obr. 5 (**c**). Ilustrativním příkladem (obr. 5) je proteinová struktura OATP1B3. Mezi vlákny aminokyselin je na obr. 5 (**a** a **b**) vidět centrální pór, přes který se uskutečňuje transport. Tento pór má kladný elektrostatický náboj, který usnadňuje vazbu a transport negativně nabitých sloučenin. Obr. 5 (**d**) znázorňuje navázaný digoxin v centrálním póru (Khondoker *et al.* 2018, Svoboda *et al.* 2011).



Obr. 5 Znázornění struktury OATP1B3: (**a**) pohled z vnitřku buňky, (**b**) z vnějšku buňky, (**c**) z boku, (**d**) znázornění navázaného digoxinu (substrátu)

Převzato z: Meier-Abt *et al.* 2006

Pro správnou funkci OATP kanálů je důležitá klička č. 5 mezi H9 a H10. Pokud se na ní projeví genový polymorfismus nebo jiná modifikace, ovlivní to funkci celého transportéru. Výskyt polymorfismu v genu pro OATP1B1 v H4 se projeví nejen pozměněnou funkcí, ale i jeho odlišnou expresí v lidském těle (Choudhuri a Klaassen 2020, Svoboda *et al.* 2011).

OATP můžeme najít v játrech (OATP1B1, OATP1B3), střevě (OATP2B1), mozku, ledvinách, srdci, plicích, varlatech (OATP1C1). OATP2A1, 3A1 a 4A1 jsou ubikvitní. Zvýšená nefyziologická exprese OATP1B3 se nachází v nádorových buňkách žaludku, prostaty, prsu, střeva a pankreatu. Funkce OATP mohou být ovlivněny indukcí, inhibicí, genovým polymorfismem, zánětem, virovou infekcí či nealkoholickou steatohepatitidou. Jsou také místem lékových interakcí, které mohou vést k ovlivnění farmakokinetiky spolu podaných léčiv (Khondoker *et al.* 2018, Rodrigues *et al.* 2020, Svoboda *et al.* 2011).

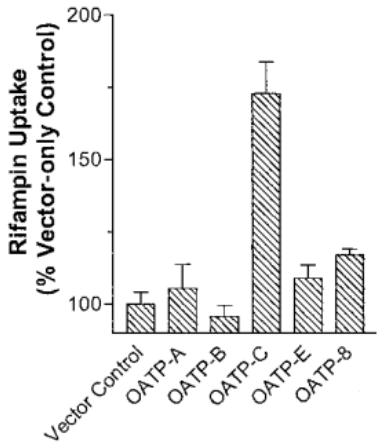
Z hlediska funkce jsou OATP transportéry membránové přenašečové proteiny nezávislé na sodíku, které řídí transport strukturně různých molekul. Příkladem substrátů OATP jsou žlučové soli, bilirubin a jeho glukoronidy, thyroidní hormony, steroidní látky, léčiva uvedená výše a některá další xenobiotika (Svoboda *et al.* 2011).

Je známo, že přenášená molekula se naváže v pozitivně nabitém centrálním póru transportéru, ale zatím nevíme, jestli se váže sama nebo spolu s dalšími látkami. Stojí za zmínku, že OATP1B1 a 1B3 pravděpodobně fungují jako obousměrné kanály pro facilitovanou difuzi závislé na elektrochemickém gradientu přenášené látky (Svoboda *et al.* 2011).

3.3.1 OATP1B1

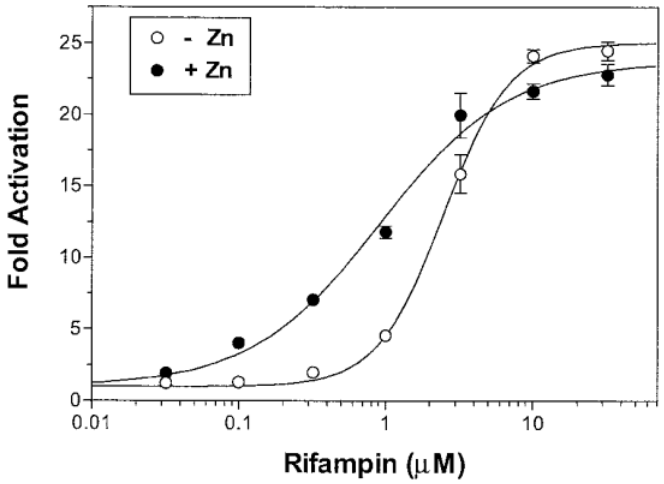
OATP1B1 (také OATP-C, OATP2, LST-1) se spolu s OATP1B3 vyskytuje pouze v játrech na basolaterální membráně hepatocytů a zajišťuje uptake xenobiotik z krve. Transportér je kódovaný genem *SLCO1B1* a protein OATP1B1 se skládá z 691 aminokyselin. Mezi jeho substráty patří žlučové kyseliny, bilirubin, 17beta-glukuronosyl estradiol, leukotrien C4, statiny, antibiotika, sartany, ACEi, toxiny, cytostatika a RIF (Khondoker *et al.* 2018, Svoboda *et al.* 2011).

Tirona *et al.* (2003) zjistili, že RIF vstupuje do jaterních buněk pomocí OATP1B1 a OATP1B3 (viz obr. 6). Na obr. 7 lze vidět, že zvýšená exprese OATP1B1 potencuje aktivaci PXR. Autoři dále zjistili, že transport RIF pomocí OATP1B1 je závislý na čase (fáze plateau je dosažena po 30 min), transportér je tedy saturabilní.



Obr. 6 Transport RIF (0,5 μM) do tranzientně transfekovaných HeLa buněk exprimujících OATP-C (OATP1B1), OATP-8 (OATP1B3) a další transportéry. Porovnáno vůči kontrole (prázdný vektor)

Modifikováno podle: Tirona *et al.* 2003



Obr. 7 Graf ukazuje, že zvýšená exprese OATP1B1 potencuje aktivaci PXR v tranzientně transfekovaných HeLa buňkách v gene reporter studii. + Zn je stabilně indukovaná exprese OATP1B1 pomocí zinku, - Zn ukazuje stejné buňky bez indukce exprese transportéru

Převzato z: Tirona *et al.* 2003

Ligandy jaderných receptorů často prostupují do buněk právě prostřednictvím OATP transportérů. Promotor *SLCO1B1* může být aktivován transkripčními faktory, mezi které patří hepatální nukleární faktor (z angl. hepatic nuclear factor, HNF) 1α a 4α, LXR a farnesoidový X receptor (z angl. farnesoid receptor, FXR). Efekt těchto a dalších faktorů na expresi OATP1B1 je shrnut v tab. 1 (Khondoker *et al.* 2018, Svoboda *et al.* 2011).

Tab. 1 Efekt transkripčních faktorů na OATP1B1

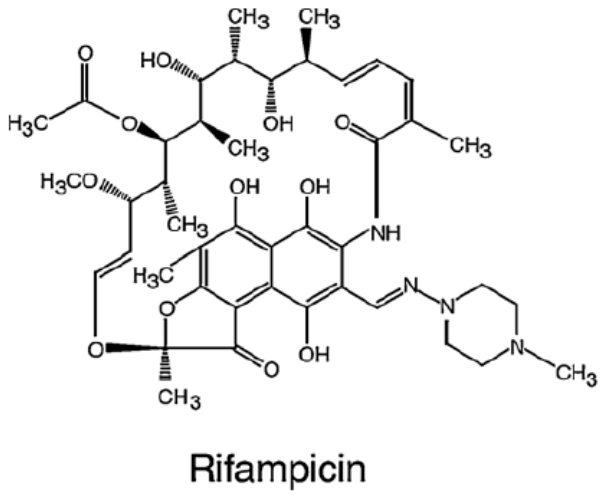
Transkripční faktor	**Efekt na expresi OATP1B1**
PXR	Bez vlivu
CAR	Bez vlivu
LXRα	↑
FXR	↓

Modifikováno dle: Svoboda *et al.* 2011

Vzhledem k tomu, že OATP1B1 dokáže transportovat široké množství xenobiotik, může kompetice mezi jeho substráty způsobit výrazné změny v jejich plazmatických koncentracích (Vavricka *et al.* 2002, Yamaguchi *et al.* 2011).

3.4 Rifampicin

RIF, známý také jako rifampin, je lipofilní léčivo o molekulové hmotnosti 822,94 Da, které se používá převážně k léčbě tuberkulózy. Patří do skupiny rifamycinů, což jsou strukturně podobná makrocyklická antibiotika produkovaná *Streptomyces mediterranei.* Struktura RIF je znázorněna na obr. 8. Rifamyciny spadají k ansamycinům na základě jejich typické struktury připomínající tvar košíku. Mechanismem účinku RIF je inhibice DNA-dependentní RNA-polymerázy v bakteriálních buňkách. (Anonym 2008, Maslow a Portal-Celhay 2015, Nakajima *et al.* 2011).



Obr. 8 Chemická struktura RIF

Převzato z: Nakajima *et al.* 2011

RIF byl objeven v roce 1957 jako polosyntetický derivát rifamycinu B, který vzniká fermentací ze *Streptomyces mediterranei.* Jeho název pochází ze slangového slova „rififi" (znamenajícího ve francouzštině problém), stejnojmenného populárního francouzského kriminálního filmu. RIF se dobře absorbuje z GITu, ale je možné i jeho intravenózní podání. Z hlediska distribuce je terapeutických koncentrací dosaženo v séru, moči, slinách, kostech, pohrudnici, pankreatické a mozkomíšní tekutině. Vylučován je převážně žlučí s poločasem mezi 2 až 5 hodinami. V játrech je deacetylován esterázou za vzniku 25-desacetylrifampicinu (Alsayyed a Adam 2004, Maslow a Portal-Celhay 2015). Konkrétním enzymem zodpovědným za metabolismus RIF je patrně lidská arylacetamid deacetyláza (AADAC) (Nakajima *et al.* 2011).

RIF má prokázanou klinickou účinnost proti *Staphylococcus aureus, Legionella pneumophila, Streptococcus* skupiny A, *Brucella spp., Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis. In vitro* je účinný proti penicilín rezistentnímu *Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Haemophilus ducreyi* a dalším gram negativním bakteriím. V posledních letech je ale velký nárůst rezistence vůči RIF, z 97 % se mutace nachází v tzv. RIF-resistant determining region (RDR), což je oblast celkem 81 bp *rpoB* genu, který kóduje hlavní cíl RIF. Rezistence narůstá velmi rychle pokud je RIF použit v monoterapii, proto se smí používat pouze v kombinacích. Příkladem rezistentních kmenů je *Mycobacterium fortuitum* a *chelonei.* Rezistence se vyskytuje i jako tzv. zkřížená rezistence vůči dalším rifamycinům jako rifapentin a rifabutin (Anonym 2008, Alsayyed a Adam 2004, Nakajima *et al.* 2011).

Hlavní terapeutickou indikací RIF je tuberkulóza (*Mycobacterium tuberculosis*, vždy v kombinaci s izoniazidem, pirazinamidem, streptomycinem nebo etambutolem) a lepra (*Mycobacterium leprae*). Ve výjimečných případech je možné RIF použít k léčbě meningitidy, stafylokokových infekcí a legionelózy. Kontraindikován je při těžké poruše jater, hepatitidě, či současném užívání sachinaviru, ritonaviru a alkoholu (web 1). Mezi další možné indikace RIF patří osteomyelitida a endokarditida (Nakajima *et al.* 2011).

RIF je nejenom používán k léčbě mykobakteriálních infekcí, ale je také díky své schopnosti indukovat biotransformační enzymy a transportéry využíván jako modelový induktor v klinických studiích (Tirona *et al.* 2003).

Obecně je RIF dobře snášen. Nejčastějším nežádoucím účinkem je oranžové zbarvení moči, slz a slin (klinicky nevýznamné). Při léčbě může dojít k hemolýze, která může vést k anémii, tubulární nekróze a k šoku. Hlavně v případech předávkování je RIF hepatotoxický. Cytotoxicitou rifamycinů se zabývali Nakajima *et al.* (2011), RIF má ze tří zkoumaných rifamycinů (rifampicin, rifabutin, rifapentin) nejnižší cytotoxický potenciál. Hlavní metabolit 25-desacetylrifamycin má cytotoxický potenciál nejnižší nebo žádný. Relativně největším problémem RIF je jeho indukce CYP3A4 a P-glykoproteinu prostřednictvím aktivace PXR, kvůli které vykazuje spoustu lékových interakcí. Příklad léčiv s klinicky závažnými lékovými interakcemi s RIF je shrnut v tab. 2. Jeho podání je právě kvůli tomu komplikované u polymorbidních pacientů (Alsayyed a Adam 2004, Baciewicz *et al.* 2013, Nakajima *et al.* 2011, Tirona *et al.* 2003).

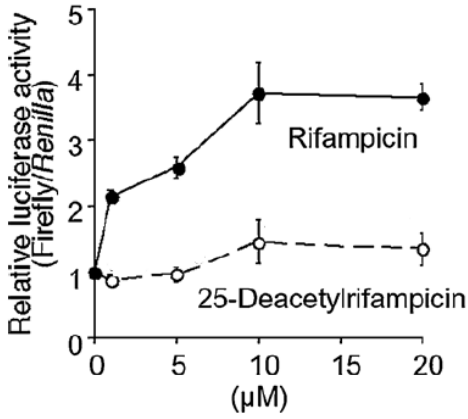
Tab. 2 Léčiva s prokázanými klinicky závažnými lékovými interakcemi s RIF

Klinicky závažné lékové interakce s RIF		
Chinidin	Ifosfamid	Ritonavir
Cyclosporin A	Itrakonazol	Saquinavir
Dapson	Carvedilol	Simvastatin
Delavirdin	Ketokonazol	Sirolimus
Dextromethorfan	Clarithromycin	Tacrolimus
Disopyramid	Codein	Tamoxifen
Dolasetron	Meflochin	Tolbutamid
Ethinylestradiol	Methadon	Toremifen
Etoricoxib	Midazolam	Triazolam
Everolimus	Morphin	Verapamil
Fenprokuron	Nateglinid	Vorikonazol
Gliclazid	Nelfinavir	Warfarin
Glimepirid	Nifedipin	Zopiclon
Glipizid	Nilvadipin	
Haloperidol	Norethisteron	
Indinavir	Ondasetron	
Imatinib	Propafenon	

Převzato z: Pávek *et al.* 2005

RIF patří mezi nejsilnější známé ligandy PXR a induktory CYP3A4, 2B6, 2C9 a P-glykoproteinu. Maximální indukce nastává po 7 dnech podávání, stejnou dobu trvá i návrat organismu do původního stavu po jeho vysazení (Pávek *et al.* 2005).

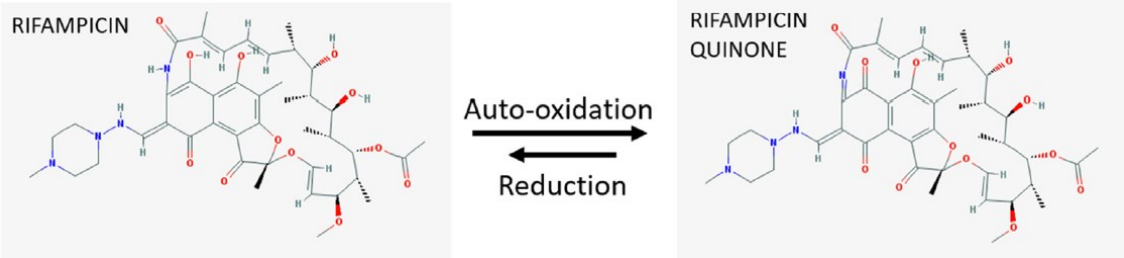
Nakajima *et al.* (2011) zkoumali, zda-li metabolit RIF, 25-desacetylrifampicin je schopný indukovat PXR. Pokus byl proveden pomocí gene reporter assay. Typem použitých buněk byly HepG2. Na obr. 9 je vidět, že schopnost 25-desacetylrifampicinu indukovat CYP3A4 je velmi nízká.



Obr. 9 Srovnání schopnosti indukce CYP3A4 rifampicinem a 25-desacetylrifampicinem (při různých koncentracích) metodou gene reporter assay

Modifikováno podle: Nakajima *et al.* 2011

Jak bylo uvedeno, RIF je v těle enzymaticky metabolizován na 25-desacetylrifampicin (viz obr. 13). Je důležité dále uvést, že molekula RIF i spontánně degraduje ve vodném prostředí. Hlavní degradační produkt RIF, rifampicin chinon (RFQ, viz obr. 12), vzniká neenzymatickou autooxidací (viz obr. 10). Pomocí RFQ jako standardu se určuje kvalita léčiva obsahujícího RIF, protože nízká kvalita léčiva, tj. přítomnost rozkladných produktů a nízký obsah účinné látky (RIF) zvyšuje pravděpodobnost vzniku antibiotické rezistence. RFQ byl prokázán jako příčina vzniku rezistence konkrétně u *E. coli* a *M. smegmatis*. Zjistilo se, že za fyziologických podmínek (37 °C, inkubace 24 hodin) a přítomnosti bakterií přechází RFQ redukcí zpět na RIF (Nakajima *et al.* 2011, Sutradhar a Zaman, 2021).

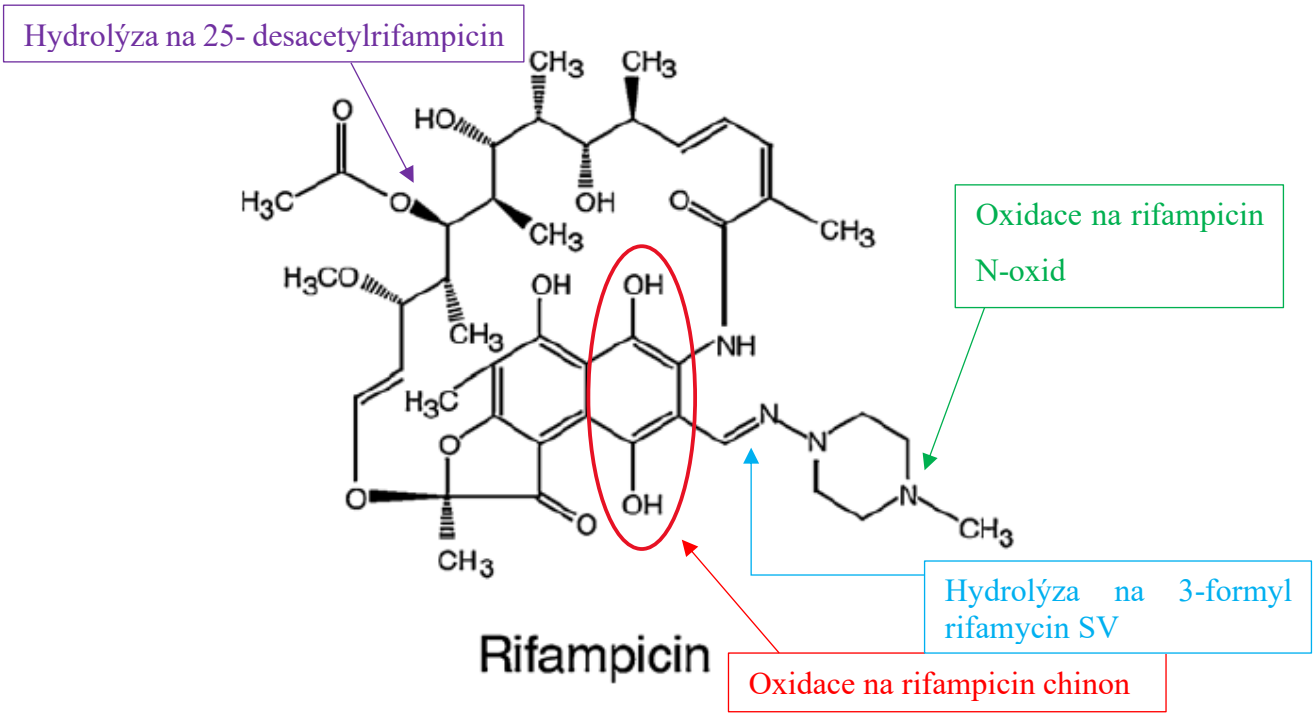


Obr. 10 Autooxidace RIF na RFQ a redukce RFQ na RIF

Převzato z: Sutradhar a Zaman, 2021

Dalším degradačním produktem je 3-formylrifamycin SV (viz obr. 14), který vzniká hydrolýzou RIF v kyselém prostředí. Tento produkt prokázal protimikrobiální aktivitu *in vitro*, ale ne *in vivo*. Na závěr jmenujme degradační produkt rifampicin N-oxid,

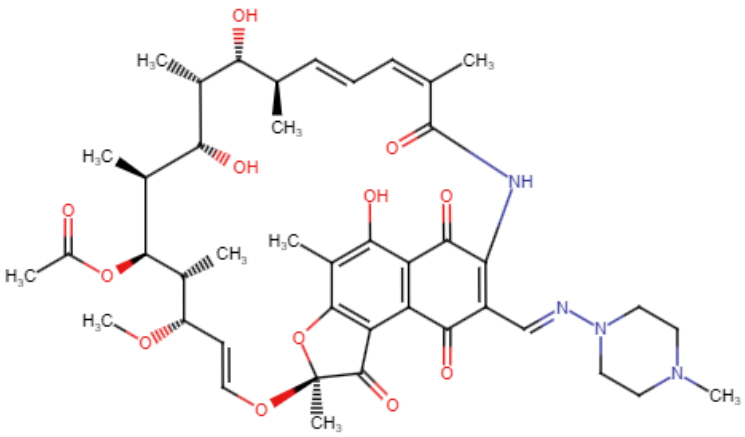
viz obr. 15 (Gallo a Radaelli 1976, Maggi *et al.* 1966, Shishoo *et al.* 1999). Přehled degradačních reakcí a struktur derivátů je na obr 11.



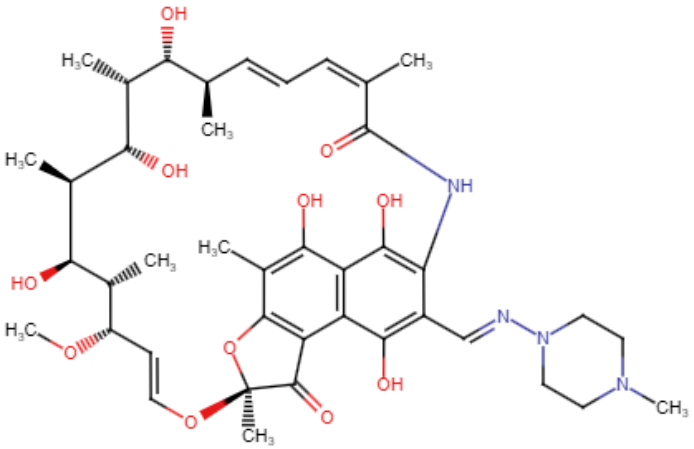
Obr. 11 Degradační produkty rifampicinu

Modifikováno podle: Nakajima *et al.* 2011

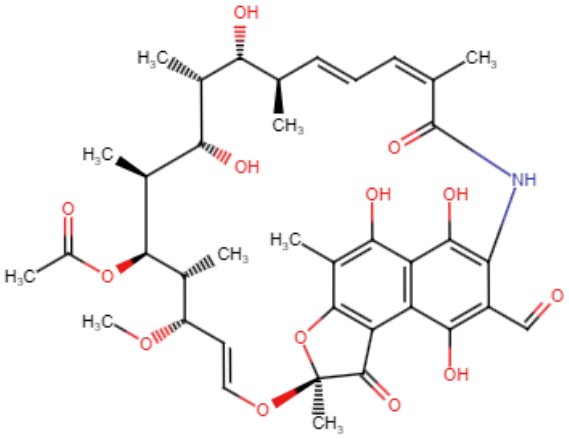
Deriváty RIF jsou znázorněny na obr. 12-15:



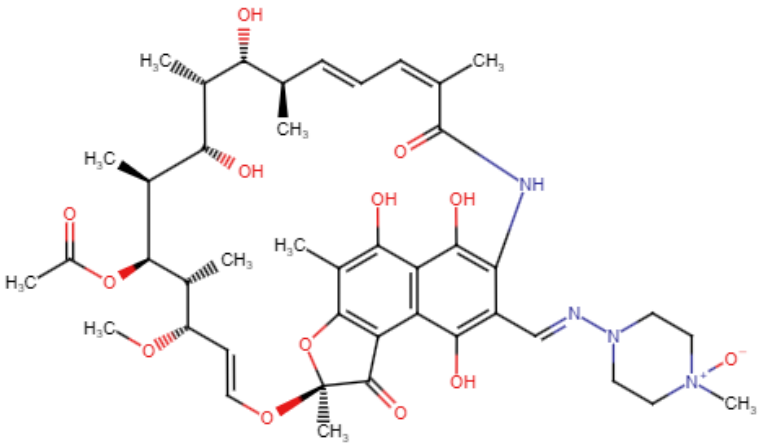
Obr. 12 Rifampicin chinon



Obr. 13 25-desacetylrifampicin



Obr. 14 3-formylrifamycin SV



Obr. 15 Rifampicin N-oxid

Struktury vytvořeny pomocí: web 2

4 Cíl práce

1. **Stanovit afinitu derivátů rifampicinu k nukleárnímu receptoru PXR.**

   Srovnání afinit derivátů rifampicinu s modelovým ligandem PXR, rifampicinem.

2. **Nepřímo určit transport derivátů rifampicinu pomocí OATP1B1 transportéru.**

   Stanovit vliv exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci PXR v přítomnosti derivátů rifampicinu.

5 Experimentální část

5.1 Materiál a metody

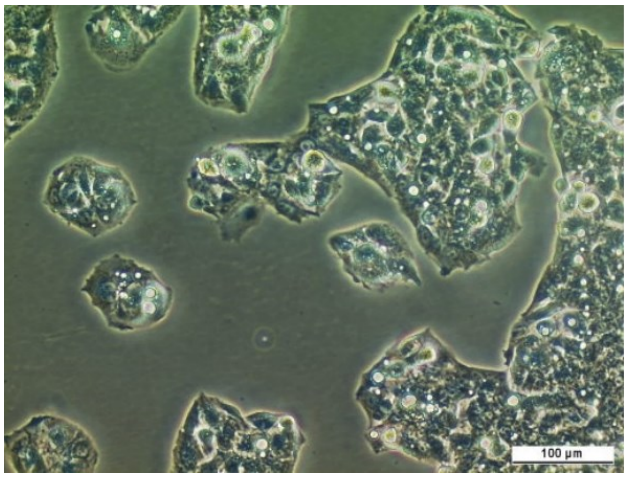
5.1.1 Buněčná linie HepG2

HepG2 (viz obr. 16) je nádorová buněčná linie, která byla získána z jaterní biopsie bělošského 15letého muže s diferenciovaným hepatocelulárním karcinomem. Tyto epiteliální buňky vylučují hlavní plazmatické proteiny jako například albumin, α2-makroglobulin, α1-antitrypsin, transferrin a plasminogen. Buněčná linie je adherentní, tzn. tvoří vazbu k povrchu kultivační nádoby (web 3).

Kultivace buněk probíhala v plném médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) obsahujícím 2 mM glutamin, 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % fetálního bovinního séra. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 5 % CO_2 ve vlhčené atmosféře uvnitř inkubátoru. Při 70-80 % konfluenci, která nastala přibližně po 6 dnech od poslední pasáže, byly buňky opláchnuty v PBS (fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline) a inkubovány v 0,25 % trypsinu-EDTA (kys. edetová). Účinek enzymu byl následně neutralizován přidáním plného média.

Množství buněk v 1 ml buněčné suspenze byl určen pomocí Bürkerovy komůrky, při kalkulaci byly vyřazeny mrtvé buňky obarvené trypanovou modří. Do 48jamkového plata bylo nasazováno 110 000 buněk na jamku, tj. na plochu 0,95 cm^2.

Buněčná linie HepG2 byla získána z General Collection od European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (web 3).



Obr. 16 Buněčná linie HepG2

Převzato z: web 3

5.1.2 Pomůcky, přístroje

48jamková kultivační plata čirá (Thermo Fisher Scientific, USA)

96jamková kultivační plata bílá (Thermo Fisher Scientific)

Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)

Centrifuga Z 326K (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Kahan plynový

Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)

Laminární box TopSafe 1.8 (Bioair Instruments, Itálie)

Lednice

Nesterilní latexové rukavice (VWR, USA)

Serologické pipety (TPP)

Sada automatických pipet se špičkami (Eppendorf, Německo)

Spektrofotometr pro měření luminiscence Synergy 2 (BioTek, USA)

Světelný mikroskop (Optika Microscopes, Itálie)

Váhy (Boeco, Německo)

Vakuová odsávačka

Vodní lázeň TW12 (Julabo, Německo)

Plastové mikrozkumavky (Eppendorf)

5.1.3 Plazmidy použité k transfekci HepG2 buněk

Gene Reporter assay:

Reportérový plazmid p3A4-luc (150 ng/ jamka) obsahuje základní promotor (-361/+53) s PXR responzivním elementem (ER6) a část zesilující odpověď na xenobiotika (z angl. xenobiotic responsive enhancer module, XREM) (-7835/-7208) genu CYP3A4. Obě sekvence byly vloženy do vektoru pGL3-Basic (Promega, Madison, USA)

Expresní vektor pRL-TK (30 ng/ jamka) kóduje *renilla* luciferázu, využívá se k normalizaci transfekce (Promega)

PXR expresní plazmid pSG5-PXR B (100 ng/ jamka) (dar od Dr. S. Kliewera, University of Texas, Dallas, TX, USA)

Expresní plazmid pro lidský OATP1B1 pOATP1B1 (200 ng/ jamka) (Origene, Rockville, MD, USA)

Prázdný plazmid pDNA3 (200 ng/ jamka) (Thermo Fisher Scientific)

Two Hybrid assay:

Reportérový plazmid pGL4-UAS 9X (120 ng/ jamka) s 9 UAS responzivními elementy (Promega)

Expresní plazmid G-PXR-W (100 ng/ jamka) (dar od Dr. A. Takeshita, Toranomon Hospital, Japonsko)

Expresní vektor pRL-TK (30 ng/ jamka) kóduje *renilla* luciferázu, využívá se k normalizaci transfekce (Promega)

Expresní plazmid pVP16-SRC1-NDB (100 ng/ jamka) (dar od Dr. A. Takeshita, Toranomon Hospital)

5.1.4 Reagencia a chemikálie

25-desacetylrifampicin D288726 (TRC, Kanada)

3-formylrifamycin SV BP627 (Sigma Aldrich – dnes Merck, Německo)

Rifampicin chinon R0800000 (Sigma Aldrich – dnes Merck)

Rifampicin N-oxid BP400 (Sigma Aldrich – dnes Merck)

Rifampicin R7382 (Sigma Aldrich – dnes Merck)

DMSO (dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich – dnes Merck)

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)

Fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich – dnes Merck)

Gibco DMEM (Thermo Fisher Scientific)

Gibco OptiMEM (Thermo Fisher Scientific)

L-glutamin (Sigma Aldrich – dnes Merck)

Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific)

Neesenciální aminokyseliny (Sigma Aldrich – dnes Merck)

PBS připravované v laboratoři podle tab. 3. Po úpravě pH je PBS sterilizováno pomocí parního autoklávu.

Tab. 3 Složení PBS pufru

Sloučenina	**Koncentrace v pufru**	**g/1 l**
NaCl	137mM	8,01g
KCl	2,7mM	0,21g
Na_2HPO_4	10mM	3,58g
NaH_2PO_4	10mM	1,56g
NaOH	K úpravě pH na 7,4	

Trypanová modř (Sigma Aldrich – dnes Merck)

5.2 Transfekce – úvod do metody

Transfekce je proces umělého vložení nukleových kyselin (DNA nebo RNA) do buněk za účelem změnit nebo sledovat jejich určité funkce. Transfekce je pojem, který souvisí s přenosem nukleových kyselin do eukaryotních buněk. V případě bakterií a buněk rostlin používáme termín transformace. Přenos DNA pomocí viru můžeme popsat pojmem transdukce (web 4).

Základní dva druhy transfekce jsou přechodná (z angl. transient) a stabilní (z angl. stable). Pří přechodné transfekci je nukleová kyselina (NK) v buňce jen omezený čas, obecně 1-7 dní. Transferovaná NK není inkorporována do genomu buňky, proto se již nenachází v dalších buněčných generacích. Stabilní transfekce způsobí vložení NK do genomu buňky nebo je NK uchována ve formě plazmidu. Z tohoto důvodu se pozměněná genová informace předává do dalších generací (web 4).

Buněčná membrána má negativní náboj a je nepropustná pro velké DNA a RNA molekuly, které jsou také negativně nabité. Z hlediska technologického přístupu máme tři základní metody transfekce: chemická metoda používá přenašeč tvořící s NK neutrální nebo pozitivní náboj; biologická metoda (transdukce) je založená na přenosu nevirových

genů pomocí geneticky modifikovaných virů (např. adenovirus, lentivirus, baculovirus atd.); fyzikální metoda dostane NK přímo do cytoplazmy nebo jádra pomocí elektroporace, mikroinjekce, fototransfekce atd (web 4).

Do chemických metod patří lipofekce (cationic lipid-mediated delivery). Jedná se o nejčastěji používanou metodu transfekce. Principem je tvorba komplexu NK a kladně nabitého lipidu pomocí elektrostatických interakcí. Tento komplex vstupuje do buňky endocytózou a rozpadá se v cytoplazmě. Uvolněné NK buď postupují dále do jádra nebo zůstávají v cytoplazmě. Tato metoda má vysokou účinnost, je rychlá, relativně jednoduchá a použitelná pro různé typy buněk. Často používaným komerčním reagentem pro lipofekci je Lipofectamin 3000 (web 4), který jsme použili i v našich experimentech. Podle zdroje (web 5) může být v případě HepG2 buněk s použitím Lipofectaminu 3000 dosažena transfekční účinnost více než 80 %.

5.3 Gene reporter assay – úvod do metody

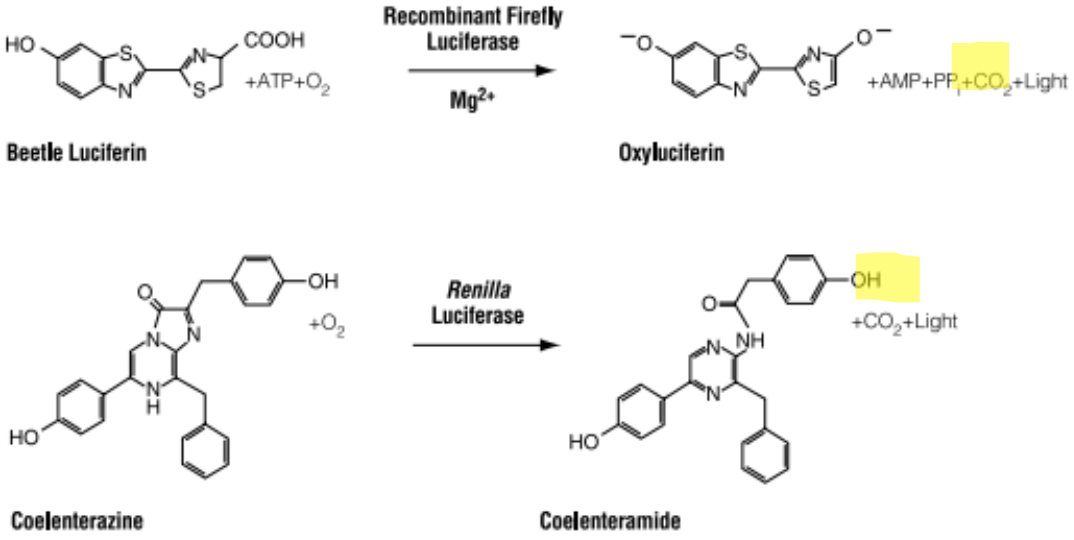
Pro studium změn genové exprese se využívá tzv. genetický reportérový systém. Touto metodou je možné sledovat aktivitu receptorů, transkripčních faktorů, buněčnou signalizaci atd. Reportérový systém využívá reportérového genu, který kóduje protein, jehož aktivitu lze snadno měřit. V našem případě jsme využili enzym luciferázu, který je kódovaný reportérovým genem *luc+*. Gen pro světluškovou luciferázu byl vložen za úsek promotorové oblasti CYP3A4. Indukce transkripce způsobená vazbou PXR k responzivním oblastem promotoru CYP3A4 způsobí navýšení exprese světluškové luciferázy (web 6, web 7, web 8).

5.3.1 Dual-Luciferase reporter assay systém

Principem metody je postupná detekce aktivit dvou reportérových proteinů, enzymů, pomocí luminiscence v jedné reakci. Do buňky je transfekován vektor obsahující reportérový gen pro světluškovou luciferázu (*Photinus pyralis)*, který byl v našem případě vložen za promotorovou sekvenci CYP3A4. Změna aktivity transkripce CYP3A4 se odráží ve změně exprese a aktivity světluškové luciferázy. Další vložený vektor kontinuálně exprimuje *renilla* luciferázu (*Renilla reniformis*) a umožňuje normalizovat rozdíly v transfekční účinnosti mezi jednotlivými jamkami (web 6).

Světlušková a *renilla* luciferáza jsou dva strukturně odlišné proteiny (enzymy). Rozdílné substráty umožní detekovat jejich aktivitu v jedné reakci. Jako první se po přidání Luciferase Assay Reagent II měří světlušková luciferáza, která generuje stabilní

luminiscentní signál. Následně se přidá Stop & Glo Reagent do stejného vzorku, který způsobí nejenom ukončení světluškové luminiscence, ale zároveň spustí luminiscenci katalyzovanou *renilla* luciferázou. Ta rovněž vytváří stabilní signál a tvoří kontrolu transfekční účinnosti. Na obr. 17 je vidět reakce, kterou oba enzymy katalyzují. Luminiscenci měříme vhodným přístrojem (spektrofotometr pro měření luminiscence Synergy 2 Biotek), přičemž intenzita emitovaného světla je přímo úměrná množství luciferázy (web 6).



Obr. 17 Chemická reakce katalyzovaná světluškovou (firefly) a *renilla* luciferázou za vzniku bioluminiscence (light)

Modifikováno dle: web 6

Postup:

1. HepG2 buňky byly nasazeny na 48jamková plata (110 000 buněk/ jamka).
2. Následující den jsme provedli transfekci. Buňky byly opláchnuty PBS (500 µl/ jamka) a byl přidán plný DMEM (150 µl/ jamka).
3. Ve zkumavce jsme připravili roztok plazmidů v OptiMEM mediu (15 µl/ jamka), který obsahoval:
   a. expresní plazmid pSG5-PXR B (100 ng/ jamka),
   b. reportérový plazmid p3A4-luc (150 ng/ jamka),
   c. pRL-TK (30 ng/ jamka) a
   d. P3000 reagent (0,6 µl/ jamka; součást Lipofectamin 3000 kitu).

4. Směs plazmidů z předchozího kroku jsme rozdělili na dvě stejné části a k jedné jsme přidali expresní plazmid pOATP1B1 (200 ng/ jamka) a do druhé prázdný plazmid pDNA3 (200 ng/ jamka).
5. Dále jsme připravili zkumavku s Lipofectaminem 3000 (0,45 µl/ jamka) v OptiMEM mediu (15 µl/ jamka) a rozdělili ji rovnoměrně do dvou samostatných zkumavek.
6. Celý objem směsi plazmidů obohaceným o plazmid pOATP1B1 jsme přidali do jedné zkumavky s Lipofectaminem 3000. Podobně směs plazmidů s prázdným vektorem jsme smísili s druhou zkumavkou s Lipofectaminem 3000. Obě směsi jsme inkubovali 10 minut při pokojové teplotě.
7. Následně jsme pomalu napipetovali 30 µl připravených transfekčních roztoků na příslušné jamky.
8. Po 24 h jsme HepG2 buňky opláchli 500 µl PBS a následně je kultivovali s:
   a. RIF (0,5-10 µM),
   b. RFQ (0,5-10 µM),
   c. rifampicin N-oxidem (1-40 µM),
   d. 3-formylrifamycinem SV (1-10 µM) a
   e. 25-desacetylrifampicinem (10-80 µM).
   f. DMSO (1 ‰) byl použit jako kontrola.
9. Po další 12 h inkubaci jsme detekovali aktivitu p3A4-luc reportérového vektoru. Nejprve jsme odsáli kultivační médium obsahující testované látky, následně jsme buňky opláchli 500 µl PBS a odsáli do sucha. Poté byl k buňkám přidán pasivní lyzovací pufr (100 µl/ jamka, Promega) a plata byla zmražena.
10. Po rozmražení a odebrání lyzátů jsme jako první změřili aktivitu světluškové luciferázy pomocí Luciferase Assay Reagent II, který je součástí kitu (Dual-Luciferase Reporter Assay System). Následně jsme přidali Stop & Glo Reagent do stejného vzorku pro detekci luminiscence *renilla* luciferázy. Luminiscenci jsme měřili spektrofotometrem (Synergy 2 Biotek).

5.4 Two hybrid assay

Principem metody je interakce dvou proteinů, které při vzájemné vazbě stimulují expresi reportérového genu *luc2* (světluškové luciferázy) v reportérovém plazmidu. V naší metodě jsme sledovali interakci fúzního PXR (obsahuje PXR LBD a kvasinkovou DNA vazebnou doménu GAL4) a koaktivátoru SRC-1 (obsahuje receptor interakční

doménu (RID) SRC-1 a VP16 aktivační doménu). Vazba ligandu způsobí změnu konformace PXR-LBD a vede k vazbě SRC-1. Komplex se váže prostřednictvím GAL4 domény k responsivním oblastem (UAS) reportérového vektoru. Míra luminiscence světluškové luciferázy odráží vazbu ligandu k PXR (Svecova *et al.* 2008, web 9).

Postup:

1. HepG2 buňky byly nasazeny na 48jamková plata (110 000 buněk/ jamka).
2. Následující den jsme provedli transfekci. Buňky byly opláchnuty PBS (500 µl/ jamka) a byl přidán DMEM (150 µl/ jamka).
3. Ve zkumavce jsme připravili směs plazmidů v OptiMEM mediu (15 µl/ jamka), která obsahovala:
    a. expresní fúzní plazmid G-PXR-W (100 ng/ jamka),
    b. reportérový plazmid pGL4-UAS 9x (120 ng/ jamka),
    c. pRL-TK (30 ng/ jamka),
    d. vektor pVP16-SCR1-NDB (100 ng/ jamka) a
    e. P3000 reagent (0,6 µl/ jamka; součást Lipofectamin 3000 kitu).
4. Dále jsme připravili zkumavku s Lipofectaminem 3000 (0,45 µl/ jamka) v OptiMEM mediu (15 µl/ jamka).
5. Celý objem směsi plazmidů jsme přidali do zkumavky s Lipofectaminem 3000 a inkubovali 10 minut při pokojové teplotě.
6. Následně jsme pomalu napipetovali 30 µl připraveného transfekčního roztoku na každou jamku.
7. Po 24 h jsme HepG2 buňky opláchli 500 µl PBS a exponovali RIF, RFQ, rifampicin N-oxidem, 3-formylrifamycinem SV a 25-desacetylrifampicinem (10 µM) a jako kontrolu jsme použili 1 ‰ DMSO.
8. Po další 24 h inkubaci jsme detekovali aktivitu reportérových plazmidů. Nejprve jsme odsáli kultivační médium obsahující testované látky, následně jsme buňky opláchli 500 µl PBS a odsáli do sucha. Poté byl k buňkám přidán pasivní lyzovací pufr (100 µl/ jamka, Promega) a plata byla zmražena.
9. Po rozmražení a odebrání lyzátů jsme jako první změřili aktivitu světluškové luciferázy (plazmid pGL4-UAS 9X) pomocí Luciferase Assay Reagent II, který je součástí kitu (Dual-Luciferase Reporter Assay System). Následně jsme přidali Stop & Glo Reagent do stejného vzorku pro detekci luminiscence *renilla* luciferázy. Luminiscenci jsme měřili spektrofotometrem (Synergy 2 Biotek).

5.5 Statistická analýza

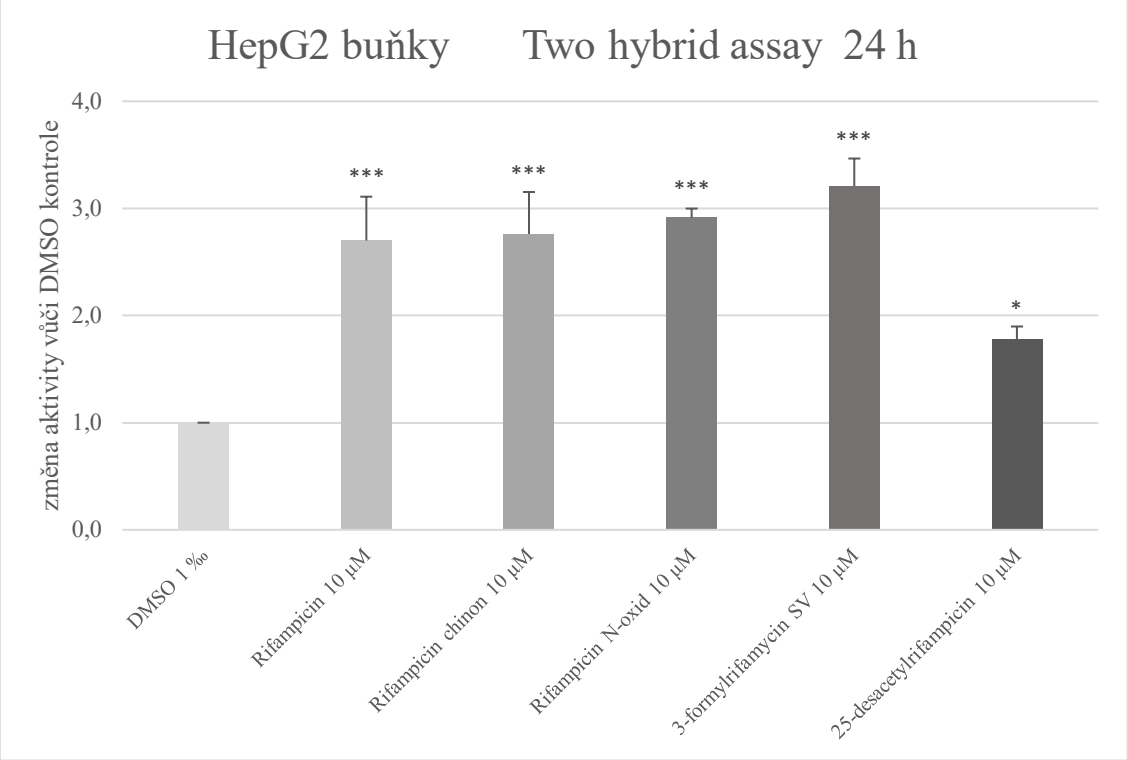
V rámci výzkumu nás obecně zajímá, zdali je naše hypotéza správná či špatná. K tomu nám pomáhá statistické srovnání výsledků a vyhodnocení jejich významnosti (hodnota P). Cílem statistického vyhodnocení je vytvořit z omezeného počtu vstupních dat obecný závěr (Litschmannová 2011, Mrkvička a Petrášková 2006).

Naše data byla získána ze 3 nezávislých biologických měření provedených v technických triplikátech. Výsledky jsou uvedeny jako střední hodnota ±SD (z angl. standart deviation, směrodatná odchylka). Skupinové rozdíly byly porovnány pomocí Studentova nepárového t testu. Při testování víc jak dvou skupin byla použita jednosměrná analýza ANOVA (analýza rozptylu, z angl. analysis of variance) s použitím Dunnettova post-hoc testu (statistické porovnání vzorků exponovaných deriváty rifampicinu vůči DMSO kontrole). Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí GraphPad Prism softwaru (version 9.0.2., La Jolla, California, USA). Jako statisticky významná byla brána hodnota $P<0,05$.

6 Výsledky

6.1 Aktivace PXR rifampicinem a jeho deriváty analyzované metodou two hybrid assay

Analýzu aktivace PXR RIF a jeho deriváty (10 μM) jsme provedli metodou two hybrid assay v HepG2 buňkách (obr. 18). Buňky byly inkubovány s látkami 24 h. RIF je silným agonistou PXR a slouží jako pozitivní kontrola experimentu.

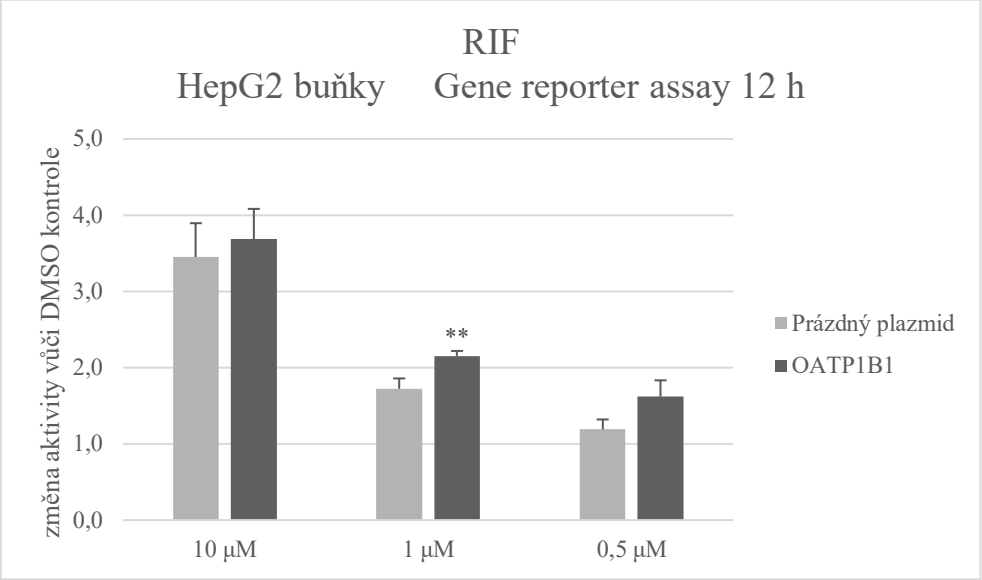


Obr. 18 Aktivace PXR deriváty rifampicinu. Data jsou prezentována jako relativní změna aktivity reportérového plazmidu. Výsledky jsou porovnány vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která nabývá hodnotu 1. N=3. Statistické zpracování bylo provedeno jednosměrným testem ANOVA s použitím Dunnettova post-hoc testu*P<0,05, ***P<0,001

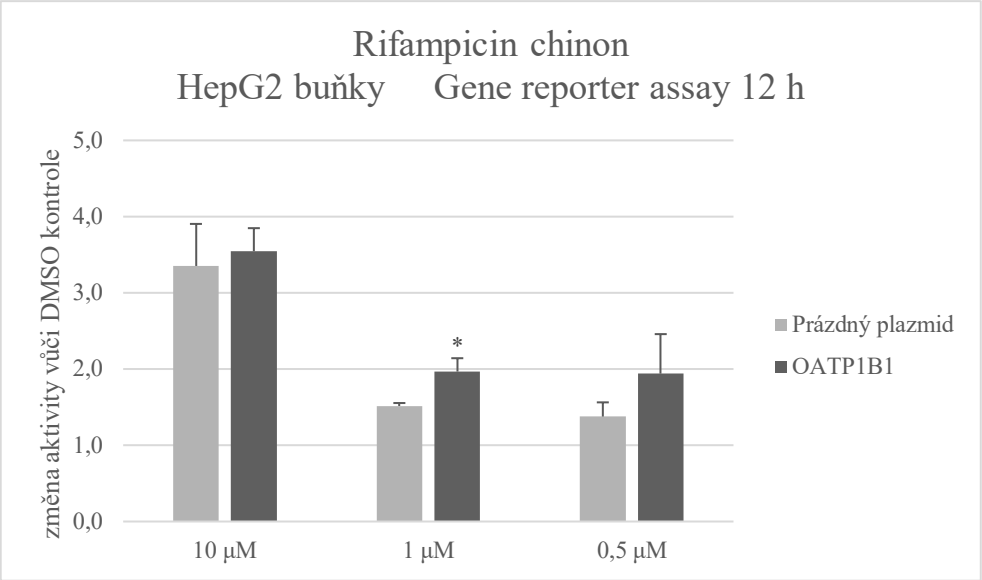
Tímto experimentem jsme zjistili, že schopnost RFQ, rifampicin N-oxidu a 3-formylrifamycinu SV aktivovat PXR je statisticky významná a srovnatelná s RIF. Výsledky ukazují, že schopnost 25-desacetylrifampicinu aktivovat PXR je nižší, než v případě ostatních derivátů. Tato aktivace PXR je nicméně stále signifikantní.

6.2 Vliv OATP1B1 transportéru na bazolaterální transport derivátů rifampicinu a aktivaci PXR

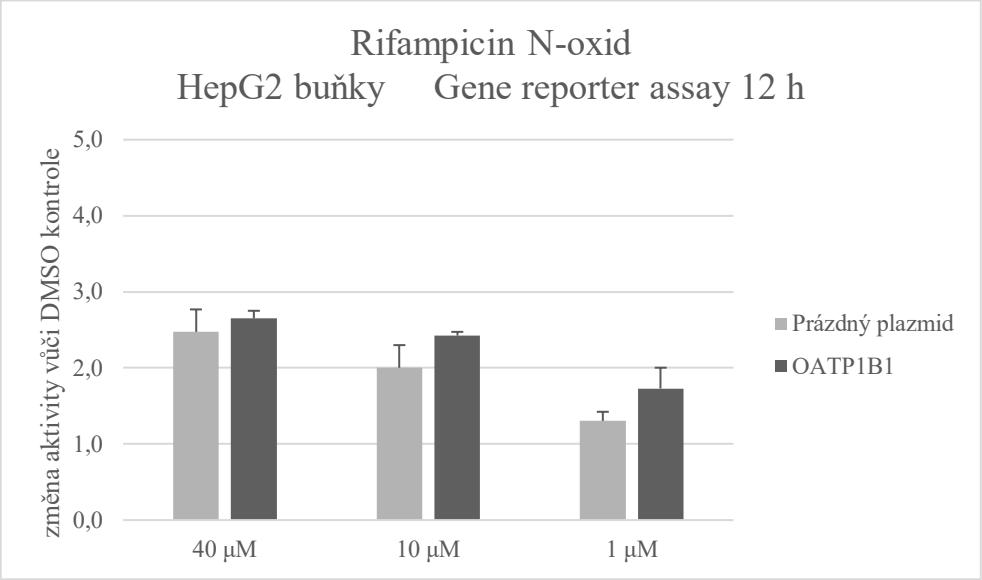
Zhodnocení vlivu OATP1B1 transportéru na bazolaterální transport RIF a jeho derivátů při různých koncentracích jsme provedli metodou gene reporter assay v HepG2 buňkách (obr. 19-23). Buňky byly s látkami inkubovány po dobu 12 h.



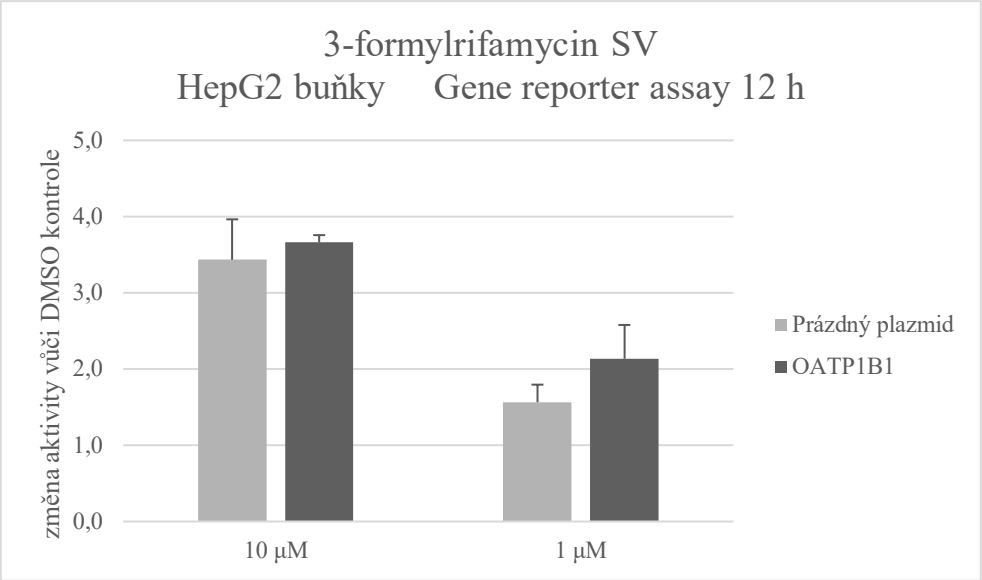
Obr. 19 Aktivace PXR rifampicinem. Data jsou prezentována jako relativní změna aktivity reportérového plazmidu p3A4-luc. Výsledky jsou porovnány vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která nabývá hodnotu 1. N=3. Vliv exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci reportérového plazmidu pro každou koncentraci rifampicinu byl vyhodnocen Studentovým nepárovým t testem, **P<0,01



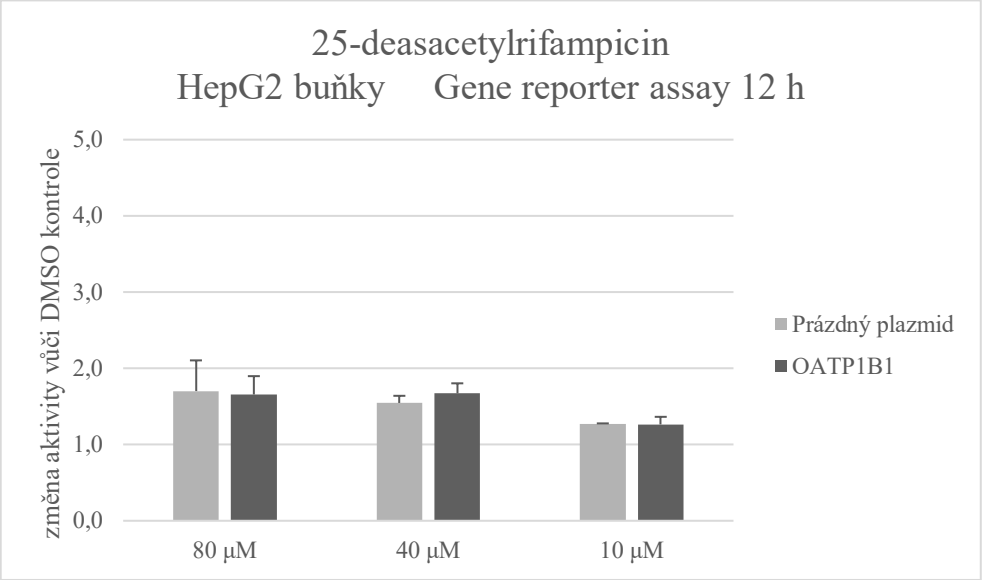
Obr. 20 Aktivace PXR rifampicin chinonem. Data jsou prezentována jako relativní změna aktivity reportérového plazmidu p3A4-luc. Výsledky jsou porovnány vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která nabývá hodnotu 1. N=3. Vliv exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci reporterového plazmidu pro každou koncentraci rifampicin chinonu byl vyhodnocen Studentovým nepárovým t testem, *P<0,05



Obr. 21 Aktivace PXR rifampicin N-oxidem. Data jsou prezentována jako relativní změna aktivity reportérového plazmidu p3A4-luc. Výsledky jsou porovnány vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která nabývá hodnotu 1. N=3. Vliv exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci reporterového plazmidu pro každou koncentraci rifampicin N-oxidu byl vyhodnocen Studentovým nepárovým t testem



Obr. 22 Aktivace PXR 3-formylrifamycinem SV. Data jsou prezentována jako relativní změna aktivity reportérového plazmidu p3A4-luc. Výsledky jsou porovnány vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která nabývá hodnotu 1. N=3. Vliv exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci reportérového plazmidu pro každou koncentraci 3-formylrifamycinu SV byl vyhodnocen Studentovým nepárovým t testem



Obr. 23 Aktivace PXR 25-desacetylrifampicinem. Data jsou prezentována jako relativní změna aktivity reportérového plazmidu p3A4-luc. Výsledky jsou porovnány vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která nabývá hodnotu 1. N=3. Vliv exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci reportérového plazmidu pro každou koncentraci 25-desacetylrifampicinu byl vyhodnocen Studentovým nepárovým t testem

Data nepřímo naznačují, že OATP1B1 hraje roli v transportu testovaných látek. Statisticky významný efekt exprese OATP1B1 transportéru na aktivaci CYP3A4

reportérového vektoru byl zjištěn u RIF (1 μM) a RFQ (1 μM). U ostatních derivátů je pozorovatelný pouze trend vlivu OATP1B1 exprese.

7 Diskuse

RIF je polosyntetické antituberkulotikum produkované *Streptomyces mediterranei.* V současné době je v kombinacích používán k léčbě tuberkulózy a lepry. Vzhledem k dobré účinnosti a méně častým nežádoucím účinkům je jeho použití velmi rozšířené (Alsayyed a Adam 2004, web 1).

RIF je modelovým ligandem PXR, zástupce nukleárních receptorů. PXR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který mimo jiné reguluje transkripci biotransformačních enzymů a buněčných transportérů. Ilustrativním enzymem regulovaným PXR je CYP3A4, který zajišťuje biotransformaci více než 50 % všech klinicky významných léčiv. PXR obsahuje velkou flexibilní hydrofobní kapsu, do které se vážou jeho ligandy. Právě díky prostorové flexibilitě LBD je PXR schopný vázat velkou škálu strukturně různorodých ligandů (tzv. promiskuita receptoru) (Carnahan a Redinbo 2005, Kousalová *et al.* 2003, Skandalaki *et al.* 2021, Tirona *et al.* 2003).

Navázání RIF do LBD PXR způsobí aktivaci receptoru a změnu v expresi cílových genů, která může zapříčinit závažné lékové interakce. Změny ve farmakokinetice, zejména u polymorbidních pacientů, často značně komplikují léčbu onemocnění a mohou vést k závažným zdravotním komplikacím (Carnahan a Redinbo 2005, Pávek *et al.* 2005).

Bylo zjištěno, že RIF je nestabilní molekulou v podmínkách lidského těla tj. vodného prostředí a fyziologické tělesné teplotě. Rozkladem RIF vznikají degradační produkty: RFQ, rifampicin N-oxid a 3-formylrifamycin SV. Navíc enzymaticky vzniká metabolit 25-desacetylrifampicin (Gallo a Radaelli 1976, Maggi *et al.* 1966, Nakajima *et al.* 2011, Shishoo *et al.* 1999, Sutradhar a Zaman, 2021). V rámci naší práce jsme proto zkoumali, jestli i tyto degradační produkty mají schopnost vázat se na PXR podobně jako parentní látka RIF.

Ačkoliv byla afinita RIF a 25-desacetylrifampicinu k PXR již zkoumána (Nakajima *et al.* 2011), podle našich znalostí, nebyla ještě nikým studována afinita dalších derivátů RIF, RFQ, 3-formylrifamycinu SV a rifampicin N-oxidu.

Nakajima *et al.* (2011) zjistili, že schopnost 25-desacetylrifampicinu indukovat CYP3A4 je velmi nízká. Tento pokus provedli na HepG2 buněčné linii metodou gene reporter assay s CYP3A4 reportérovým plazmidem. Buňky byly inkubovány 48 hodin s RIF nebo 25-desacetylrifampicinem v koncentracích 0-20 μM. Nižší afinita metabolitu

byla pozorována i v naší studii (24 h, 10 μM) (obr. 18). Na rozdíl od předchozí studie jsme použili odlišný přístup (two hybrid assay). Studii jsme rozšířili o další deriváty RIF, RFQ, rifampicin N-oxidu a 3-formylrifamycinu SV. Naše výsledky naznačují, že deriváty mohou aktivovat PXR srovnatelně s RIF s výjimkou 25-desacetylrifampicinu. Závěrem lze konstatovat, že rozkladné produkty RIF přispívají k aktivaci PXR.

OATP1B1 transportér má schopnost transportovat RIF z krve do hepatocytů (Tirona *et al.* 2003). V současné době nevíme, zda je i kinetika derivátů RIF ovlivněna OATP1B1 transportem. Schopnost derivátů RIF vstupovat do buňky OATP1B1 transportérem byla zkoumána na tranzientně transfekované buněčné linii HepG2 metodou gene reporter assay s CYP3A4 reportérovým vektorem a OATP1B1 expresním plazmidem. Kratší inkubace s deriváty RIF (12 h) byla zvolena, protože po delší době by se již mohly látky v buňce akumulovat a příspěvek transportéru by nebylo možné detekovat. Koncentrace testovaných látek byly voleny dle odhadu jejich afinity k PXR, tj RIF (0,5-10 μM), RFQ (0,5-10 μM), rifampicin N-oxid (1-40 μM), 3-formylrifamycin SV (1-10 μM) a 25-desacetylrifampicin (10-80 μM). Předpokladem našeho experimentu je, že zvýšený transport PXR ligandů do buňky (pomocí OATP1B1 transportéru) může vést k zesílené indukci CYP3A4 reportéru, která tak odráží vyšší intracelulární koncentraci látek. Experiment umožní nepřímo usuzovat na afinitu derivátů RIF k OATP1B1 transportéru.

Výsledky naznačují, že RIF a RFQ jsou substrátem OATP1B1 transportéru. Vyšší koncentrace testovaných látek nebyly ovlivněny OATP1B1 transportérem. Lze tedy usuzovat i na alternativní cesty transportu látek přes buněčnou membránu. U ostatních derivátů jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl mezi skupinami (prázdný vektor vs OATP1B1). Nicméně trend v rozdílech aktivit byl pozorován např. u rifampicin N-oxidu. K detailnějšímu zhodnocení a zpřesnění či potvrzení výsledků by mohl pomoci větší počet opakování měření s cílem snížit hodnotu směrodatné odchylky pokusů. Dalším krokem k potvrzení substrátů OATP1B1 z řad derivátů RIF může být použití komplementární experimentální metody např. akumulační studie.

8 Závěr

V této diplomové práci jsme se zaměřili na stanovení afinity derivátů RIF (tj. RFQ, rifampicin N-oxid, 25-desacetylrifampicin a 3-formylrifamycin SV) k PXR a OATP1B1. K tomuto stanovení jsme použili two hybrid a gene reporter assay.

Zjistili jsme, že RFQ, rifampicin N-oxid a 3-formylrifamycin SV jsou schopné aktivovat PXR srovnatelně s RIF. Dle předpokladu byla afinita 25-desacetylrifampicinu k PXR menší než afinita RIF.

Dále jsme vyhodnotili vliv OATP1B1 transportéru na bazolaterální transport derivátů RIF do buněk. Data naznačují, že OATP1B1 hraje roli v transportu RIF a RFQ.

9 Reference

1. ALAM, Khondoker, Alexandra CROWE, Xueying WANG, Pengyue ZHANG, Kai DING, Lang LI a Wei YUE. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(3). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19030855
2. ALSAYYED, B. a H. M. ADAM. Rifampin. *Pediatrics in Review*. 2004, **25**(6), 216-217. ISSN 0191-9601. Dostupné z: doi:10.1542/pir.25-6-216
3. ANONYM, BRENNAN, Patrick, Douglas YOUNG a Brian ROBERTSON, ed. Rifampin. *Tuberculosis*. Global Alliance for TB Drug Development, 2008, **88**(2), 151-154. ISSN 14729792. Dostupné z: doi:10.1016/S1472-9792(08)70024-6
4. BACIEWICZ, Anne M., Cary R. CHRISMAN, Christopher K. FINCH a Timothy H. SELF. Update on rifampin, rifabutin, and rifapentine drug interactions. *Current Medical Research and Opinion*. 2013, **29**(1), 1-12. ISSN 0300-7995. Dostupné z: doi:10.1185/03007995.2012.747952
5. BISWAS, Arunima, Sridhar MANI, Matthew R. REDINBO, Matthew D. KRASOWSKI, Hao LI a Sean EKINS. Elucidating the 'Jekyll and Hyde' Nature of PXR: The Case for Discovering Antagonists or Allosteric Antagonists. *Pharmaceutical Research*. 2009, **26**(8), 1807-1815. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-009-9901-7
6. BURK, Oliver, Katja A. ARNOLD, Andreas K. NUSSLER, et al. Antimalarial Artemisinin Drugs Induce Cytochrome P450 and MDR1 Expression by Activation of Xenosensors Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor. *Molecular Pharmacology*. 2005, **67**(6), 1954-1965. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.104.009019
7. CARNAHAN, V. a M. REDINBO. Structure and Function of the Human Nuclear Xenobiotic Receptor PXR. *Current Drug Metabolism*. 2005, **6**(4), 357-367. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200054633844
8. CASABAR, Richard C.T., Parikshit C. DAS, Gregory K. DEKREY, Catherine S. GARDINER, Yan CAO, Randy L. ROSE a Andrew D. WALLACE. Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicology and*

Applied Pharmacology. 2010, **245**(3), 335-343. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2010.03.017

9. CORREIA, Maria Almira a Josef ŠEDIVÝ. Biotransformace léčiv. KATZUNG, Bertram G. *Základní a klinická farmakologie*. 2. Jinočany: H&H Vyšehradská, 2006, s. 61-72. ISBN 80-7319-056-7.
10. GALLO, Gian G. a Pietro RADAELLI. Rifampin. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol. 5. New Jersey: Elsevier, 1976, 1976, s. 467-513. Analytical Profiles of Drug Substances. ISBN 9780122608056. Dostupné z: doi:10.1016/S0099-5428(08)60328-7
11. 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
12. CHEN, Yakun, Yong TANG, Changxiong GUO, Jiuhui WANG, Debasish BORAL a Daotai NIE. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical Pharmacology*. 2012, **83**(8), 1112-1126. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2012.01.030
13. CHOUDHURI, Supratim a Curtis D. KLAASSEN. Elucidation of OATP1B1 and 1B3 transporter function using transgenic rodent models and commonly known single nucleotide polymorphisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2020, **399**. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2020.115039
14. KANDEL, Benjamin A., Maria THOMAS, Stefan WINTER, Georg DAMM, Daniel SEEHOFER, Oliver BURK, Matthias SCHWAB a Ulrich M. ZANGER. Genomewide comparison of the inducible transcriptomes of nuclear receptors CAR, PXR and PPARα in primary human hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016, **1859**(9), 1218-1227. ISSN 18749399. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagrm.2016.03.007
15. KLIEWER, Steven A., Bryan GOODWIN a 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
16. KOTTA-LOIZOU, Ioly, Efstratios PATSOURIS a Stamatios THEOCHARIS. Pregnane X receptor polymorphisms associated with human diseases. *Expert Opinion*

on Therapeutic Targets. 2013, **17**(10), 1167-1177. ISSN 1472-8222. Dostupné z: doi:10.1517/14728222.2013.823403

17. KOUSALOVÁ, Lucie, Jana BARANOVÁ a Pavel ANZENBACHER. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, **17**(3), 151-157. ISSN 1803-5353.
18. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.
19. LIN, Wenwei, Yue-Ming WANG, Sergio C. CHAI, et al. SPA70 is a potent antagonist of human pregnane X receptor. *Nature Communications*. 2017, **8**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00780-5
20. LITSCHMANNOVÁ, Martina. *Úvod do statistiky*. Ostrava, VŠB – TU Ostrava, Fakulta elektrotechniky a informatiky, 2011.
21. MAGGI, N., C.R. PASQUALUCCI, R. BALLOTTA a P. SENSI. Rifampicin: A New Orally Active Rifamycin. *Chemotherapy*. 2004, **11**(5), 285-292. ISSN 0009-3157. Dostupné z: doi:10.1159/000220462
22. MANI, Sridhar, Wei DOU a Matthew R. REDINBO. 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
23. MARTÍNKOVÁ, Jiřina, Jiří GRIM, Helena HOJDÍKOVÁ, Jaroslav CHLÁDEK, Jiřina CHLÁDKOVÁ, Karel KULDA a Jan LIBIGER. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4.
24. MASLOW, Melanie Jane a Cynthia PORTAL-CELHAY. Rifamycins. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* [online]. Elsevier, 2015, 2015, 339-349.e3 [cit. 2021-12-28]. ISBN 9781455748013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00027-8
25. MASUYAMA, Hisashi, Hideshi INOSHITA, Yuji HIRAMATSU a Takafumi KUDO. Ligands Have Various Potential Effects on the Degradation of Pregnane X Receptor by Proteasome. *Endocrinology*. 2002, **143**(1), 55-61. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/endo.143.1.8578
26. MEIER-ABT, Fabienne, Younes MOKRAB a Kenji MIZUGUCHI. Organic Anion Transporting Polypeptides of the OATP/SLCO Superfamily: Identification of New Members in Nonmammalian Species, Comparative Modeling and a Potential

Transport Mode. *Journal of Membrane Biology*. 2006, **208**(3), 213-227. ISSN 0022-2631. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-005-7004-x

27. MRKVIČKA, Tomáš a Vladimíra PETRÁŠKOVÁ. *Úvod do statistiky*. 2. upravené. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2006. ISBN 80-704-0894-4.
28. MU, Ying, Jinnan ZHANG, Shimin ZHANG, et al. Traditional Chinese Medicines Wu Wei Zi (Schisandra chinensis Baill) and Gan Cao (Glycyrrhiza uralensis Fisch) Activate Pregnane X Receptor and Increase Warfarin Clearance in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006, **316**(3), 1369-1377. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.105.094342
29. NAKAJIMA, Akinori, Tatsuki FUKAMI, Yuki KOBAYASHI, Akinobu WATANABE, Miki NAKAJIMA a Tsuyoshi YOKOI. Human arylacetamide deacetylase is responsible for deacetylation of rifamycins: Rifampicin, rifabutin, and rifapentine. *Biochemical Pharmacology*. 2011, **82**(11), 1747-1756. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2011.08.003
30. ONG, Su Sien, Yue-Ming WANG, Sergio C. a Taosheng CHE. Pregnane X Receptor in Drug Development. 2011. *Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies*. 1. Chorvatsko: InTech, 2011, 2011-12-07, s. 337-353. ISBN 978-953-307-257-9. Dostupné z: doi:10.5772/27753
31. PAVEK, Petr. 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
32. PÁVEK, Petr, Lukáš ČERVENÝ, Stanislav MIČUDA, František ŠTAUD, Martina ČEČKOVÁ-NOVOTNÁ a Zdeněk FENDRICH. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí: Pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). *Remedia*. 2005, **2005**(15), 406-409. ISSN 2336-3541.
33. PONDUGULA, Satyanarayana R. a Sridhar MANI. Pregnane xenobiotic receptor in cancer pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Letters*. 2013, **328**(1), 1-9. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2012.08.030
34. PROKEŠ, Michal, Ondřej SUCHOPÁR a Josef SUCHOPÁR. Macrolides Drug Interactions in 2017. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2017, **31**(2), 7-13. ISSN 12127973. Dostupné z: doi:10.36290/far.2017.010

35. RODRIGUES, A. David, Yurong LAI, Hong SHEN, Manthena V.S. VARMA, Andrew ROWLAND a Stefan OSWALD. Induction of Human Intestinal and Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides: Where Is the Evidence for Its Relevance in Drug-Drug Interactions?. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020, **48**(3), 205-216. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.119.089615
36. SHISHOO, C.J., S.A. SHAH, I.S. RATHOD, S.S. SAVALE, J.S. KOTECHA a P.B. SHAH. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, **190**(1), 109-123. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(99)00286-0
37. SHI, Y. Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2007, **12**(11-12), 440-445. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2007.04.006
38. SKANDALAKI, Aikaterini, Panagiotis SARANTIS a Stamatios THEOCHARIS. Pregnane X Receptor (PXR) Polymorphisms and Cancer Treatment. *Biomolecules*. 2021, **11**(8). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom11081142
39. SUTRADHAR, Indorica a Muhammad H. ZAMAN. Evaluation of the effect of temperature on the stability and antimicrobial activity of rifampicin quinone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, **2021**(vol. 197), 1-4. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2021.113941
40. SVECOVA, Lucie, Radim VRZAL, Ladislav BURYSEK, 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
41. SVOBODA, Martin, Juliane RIHA, Katrin WLCEK, Walter JAEGER a Theresia THALHAMMER. Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Regulation of Expression and Function. *Current Drug Metabolism*. 2011, **12**(2), 139-153. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/138920011795016863
42. TIMSIT, Yoav E. a Masahiko NEGISHI. 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
43. TIRONA, Rommel G., Brenda F. LEAKE, Allan W. WOLKOFF a Richard B. KIM. Human Organic Anion Transporting Polypeptide-C (SLC21A6) Is a Major Determinant of Rifampin-Mediated Pregnane X Receptor Activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003, **304**(1), 223-228. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.102.043026

44. VAVRICKA, Stephan R., Jessica VAN MONTFOORT, Huy Riem HA, Peter J. MEIER a Karin FATTINGER. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology*. 2002, **36**(1), 164-172. ISSN 02709139. Dostupné z: doi:10.1053/jhep.2002.34133
45. WARING, Rosemary H. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica*. 2020, **50**(1), 9-18. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498254.2019.1648911
46. YAMAGUCHI, Hiroaki, Toshiko TAKEUCHI, Masahiro OKADA, et al. Screening of Antibiotics That Interact with Organic Anion-Transporting Polypeptides 1B1 and 1B3 Using Fluorescent Probes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011, **34**(3), 389-395. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.34.389
47. YEUNG, Eugene Y. H., Tatsuya SUEYOSHI, Masahiko NEGISHI a Thomas K. H. CHANG. Identification of Ginkgo biloba as a Novel Activator of Pregnane X Receptor. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, **36**(11), 2270-2276. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.108.023499
48. ZHANG, Jiong, Peter KUEHL, Eric D. GREEN, et al. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*. 2001, **11**(7), 555-572. ISSN 0960-314X. Dostupné z: doi:10.1097/00008571-200110000-00003

Internetové zdroje:

web 1

Benemicin: spc. SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2021-12-19]. Dostupné z: https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0093922&tab=texts

web 2

Drugbank online: Chemical structure search [online]. [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: https://go.drugbank.com/structures/search/small_molecule_drugs/structure

web 3

Culture Collections: ECACC General Cell Collection: Hep G2. UK Health Security Agency [online]. [cit. 2021-12-15]. Dostupné z: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011430&collection=ecacc_gc

web 4

Gibco cell culture basics handbook: Master basic cell culture techniques and achieve consistent results. *ThermoFisher SCIENTIFIC* [online]. 2020 [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf

web 5

Lipofectamine 3000 Reagent. *ThermoFisher SCIENTIFIC* [online]. [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-3000.html

web 6

Dual-Luciferase® Reporter Assay System: Technical manual. *Promega: Global* [online]. USA, 2015 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/dual%20luciferase%20reporter%20assay%20system%20protocol.pdf

web 7

Introduction to Reporter Gene Assays. *Promega* [online]. [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/resources/multimedia/reporter-assays-and-transfection/introduction-to-reporter-gene-assays/

web 8

PGL3 Luciferase Reporter Vectors: TECHNICAL MANUAL. *Promega* [online]. 2015 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgl3-luciferase-reporter-vectors-protocol.pdf?sc_lang=en?la=en

web 9

PGL4 Luciferase Reporter Vectors: TECHNICAL MANUAL. *Promega* [online]. 2020 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgl4-luciferase-reporter-vectors-protocol.pdf?rev=d1a2cdb9503847cf90a1a732b2212c57&sc_lang=en