

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE**



**HLEDÁNÍ SELEKTIVNÍCH ANTAGONISTŮ  
KONSTITUTIVNÍHO ANDROSTANOVÉHO  
RECEPTORU**

Diplomová práce

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

Hradec Králové, 2024

Karolína Ondraszková

### **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 či stejného titulu.

V Hradci Králové, 2024

Karolína Ondraszková

### **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Tomáši Smutnému, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce a PharmDr. Lucii Smutné, Ph.D. za praktické vedení při práci v laboratoři.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Karolína Ondraszková

Školitel: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Název diplomové práce: **Hledání selektivních antagonistů konstitutivního androstanového receptoru**

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) je významný, ligandem-řízený xenosenzor, který reguluje transkripci důležitých enzymů biotransformujících léčiva (např. CYP2B6). Pregnanový X receptor (PXR) spadá do stejné skupiny nukleárních receptorů jako CAR. Struktura a funkce obou receptorů vykazují mnohé společné rysy. PXR má ale větší a flexibilnější ligand-vázací doménu. V současné době není prakticky k dispozici selektivní, vysoce potentní a netoxický inhibitor CAR.

Tato práce si klade za cíl určit afinitu dříve identifikovaných látek v naší skupině s antagonistickou aktivitou vůči CAR. Jde o replikační studii. Pro tyto účely jsme látky testovali pomocí gene reporter a two-hybrid assay.

Ze všech testovaných látek jsme dosáhli nejlepšího výsledku s látkou 1A. Metodou gene reporter assay jsme zjistili, že substance 1A je schopna redukovat bazální expresi CAR, ale potlačuje také expresi CAR indukovanou pomocí modelového agonisty CITCO. Vysoká afinita látky k receptoru byla potvrzena pomocí two-hybrid assay. Látka navíc neovlivňuje funkci PXR. U látky 1A byla pomocí testů cytotoxicity stanovena hodnota  $IC_{50}$  (= 18,88  $\mu$ M).

Závěrem této diplomové práce je, že látka 1A má vysokou afinitu a vykazuje antagonistický účinek na CAR, přičemž neaktivuje PXR. Výsledky práce mohou pomoci identifikovat nové látky, které umožní studovat unikátní funkce CAR bez současného ovlivnění aktivity PXR.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Karolína Ondraszková

Supervisor: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Title of diploma thesis: **An identification of selective antagonists of constitutive androstane receptor**

The constitutive androstane receptor (CAR) is an important ligand-regulated xenosensor that regulates the transcription of important drug biotransforming enzymes (e.g. CYP2B6). The pregnane X receptor (PXR) belongs to the same family of nuclear receptors as the CAR. The structure and function of both receptors share many common features. However, PXR has a larger and more flexible ligand-binding domain. At present, a selective, highly potent and non-toxic inhibitor of CAR is not practically available.

This work aims to determine the affinity of previously identified compounds in our group with antagonistic activity towards CAR. This is a replication study. For this purpose, we tested the compounds using gene reporter and two-hybrid assay.

Of all the tested substances, we obtained desired results with substance 1A. Using the gene reporter assay method, we found that substance 1A can reduce basal CAR expression but also suppresses CAR activity induced by the model agonist CITCO. The high affinity of the substance for the receptor was confirmed by a two-hybrid assay. Moreover, the substance does not affect PXR function. The  $IC_{50}$  value ( $= 18,88 \mu M$ ) of 1A was determined by cytotoxicity assays.

The conclusion of this thesis is that substance 1A has high affinity and exhibits an antagonistic effect on CAR, while not activating PXR. The results of this thesis may help to identify new substances that will allow to study unique CAR functions without affecting PXR activity.

# Obsah

<b>1. Seznam zkratek.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Úvod.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Teoretická část.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. Metabolismus xenobiotik .....</b>	<b>5</b>
3.1.1. Enzymy nadrodiny P450.....	6
3.1.2. CYP2B6 .....	7
3.1.3. CYP3A4 .....	7
<b>3.2. Nukleární receptory .....</b>	<b>9</b>
3.2.1. Struktura NR.....	10
<b>3.3. Konstitutivní androstanový receptor .....</b>	<b>10</b>
3.3.1. Ligandy CAR a mezidruhové rozdíly .....	11
3.3.2. Účinky CAR na metabolismus .....	12
3.3.3. Přímá aktivace CAR.....	13
3.3.4. Nepřímá aktivace CAR.....	14
3.3.5. Alternativní sestřih CAR .....	15
<b>3.4. Pregnanový X receptor .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5. Strukturní podobnosti CAR a PXR .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Cíl práce .....</b>	<b>20</b>
<b>5. Experimentální část.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1. Materiál.....</b>	<b>21</b>
5.1.1. Buněčná linie HepG2 .....	21
5.1.2. Plasmidy .....	22
5.1.3. Reagencia .....	23
5.1.4. Přístroje a pomůcky.....	23
<b>5.2. Metody.....</b>	<b>24</b>
5.2.1. Testy cytotoxicity (MTS assay).....	24
5.2.2. Transfekce buněk.....	26
5.2.3. Gene reporter assay .....	26
5.2.4. Two-hybrid assay.....	29
<b>5.3. Statistická analýza .....</b>	<b>31</b>
<b>6. Výsledky.....</b>	<b>33</b>
<b>6.1. Výsledky testů cytotoxicity .....</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Vyhodnocení vlivu testovaných látek na aktivitu CAR a PXR pomocí metody gene reporter assay.....</b>	<b>34</b>
6.2.1. Vliv látek na aktivitu CAR .....	34
6.2.2. Vliv látek na aktivitu PXR.....	35
<b>6.3. Vyhodnocení afinity testovaných látek k receptoru CAR pomocí metody two-hybrid assay.....</b>	<b>36</b>
<b>7. Diskuze.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Závěr .....</b>	<b>40</b>
<b>9. Reference .....</b>	<b>41</b>

## 1. Seznam zkratk

ABC	ABC transportér, ATP binding cassette
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
AF-1	aktivační funkce 1, na ligandu nezávislá
AF-2	aktivační funkce 2, na ligandu závislá
AMK	aminokyselina
ANOVA	analýza rozptylu, analysis of variance
BP	páry bází
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCRP	cytosolový CAR retenční protein
CINPA1	CAR inhibitor not PXR activator 1
CITCO	6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA-vazebná doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
FBS	fetální bovinní sérum
FoxO1	„forkhead“ transkripční faktor O1
GRIP1	protein 1 interagující s glutamátovým receptorem

GST	glutathion S-transferáza
hCAR	humánní konstitutivní androstanový receptor
HFD	vysokotučná dieta
HSP90	protein teplotního šoku 90
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace
LBD	ligand-vazebná doména
mCAR	myší konstitutivní androstanový receptor
MDR1	transportér mnohočetné lékové rezistence 1
MK	mastné kyseliny
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
NAT	N-acetyltransferáza
NK	nukleová kyselina
NR	nukleární receptor
NR1I2	nukleární receptor podrodina 1, skupina I, člen 2 gen kódující pregnový X receptor
NR1I3	nukleární receptor podrodina 1, skupina I, člen 3 gen kódující konstitutivní androstanový receptor
OATP	polypeptidový transportér organických aniontů
OCT	transportér organických kationtů
PB	fenobarbital
PBREM	fenobarbitalový responzivní element



PK11195	1-(2-chlorofenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3- isochinolinkarboxamid
PP2A	proteinová fosfatáza 2
PPP1R16A	membránová podjednotka proteinové fosfatázy 1 $\beta$
PXR	preganový X receptor
RACK1	receptor pro aktivovanou C kinázu 1
RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
snRNP	malý jaderný ribonukleoprotein
SRC-1	koaktivátor 1 steroidního receptoru
SULT	sulfotransferáza
SV	sestříhová varianta, splice varianta
TCPOBOP	1,4-bis[(3,5-dichloropyridin-2-yl)oxy]benzen
Thr38	threonin 38
TPR	tetratrikopeptidová repetice
UAS	upstream aktivační sekvence
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
VDR	receptor pro vitamín D

## 2. Úvod

Nukleární receptory jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které ovlivňují velké množství fyziologických pochodů v organismu (mj. vývin, metabolismus a stárnutí). Mají také vliv na patologické procesy, například na rakovinu (Burriss et al., 2023, Font-Díaz et al., 2021).

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) a pregnanový X receptor (PXR) jsou členy nadrodiny nukleárních receptorů. Oba tyto transkripční faktory jsou považovány za klíčové regulátory metabolismu a exkrece xenobiotik a endobiotik, neboť se podílejí na řízení exprese důležitých enzymů a transportérů (Buchman et al., 2018).

Vazba látek na PXR a CAR může vést k zvýšené nebo snížené expresi cílových genů. Je podkladem četných lékových interakcí vedoucích k neuspokojivým terapeutickým výsledkům. Zásah do funkce PXR a CAR může také ovlivnit patofyziologické buněčné pochody (Wang et al., 2012).

Jelikož mají oba tyto nukleární receptory promiskuitní vlastnosti a jsou tak schopny vázat širokou škálu různých látek, je obtížné vyvinout jejich selektivní ligandy. Připravená látka tudíž může být například antagonistou CAR, ale zároveň agonistou PXR. V současné době není prakticky k dispozici selektivní, vysoce potentní a netoxický inhibitor CAR (Cherian et al., 2018).

Tato práce si klade za cíl určit afinitu látek, dříve identifikovaných v naší skupině, s antagonistickou aktivitou vůči CAR. Tyto látky navíc vykazovaly malou nebo žádnou afinitu k PXR. Jedná se o replikační studii. Výsledky práce mohou pomoci identifikovat malé molekuly, které umožní studovat unikátní funkce CAR bez současného ovlivnění aktivity PXR.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Metabolismus xenobiotik

Osud xenobiotik v organismu má 4 fáze, kterými jsou absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece (ADME). Samotný metabolismus se dále rozkládá na dvě hlavní fáze.

Principem I. fáze metabolismu je zavedení polární skupiny do lipofilní molekuly. Tuto fázi představují oxidační, redukční a hydrolytické reakce. Cílem I. fáze je zvýšit polaritu molekuly, a tak i její rozpustnost ve vodě. Enzymy, které zprostředkovávají uvedené reakce, jsou v největší míře exprimovány v játrech, lze je ale nalézt i extrahepatálně, např. v gastrointestinálním traktu, ledvinách a plicích (Dostálek et al., 2006, Chen et al., 2012).

II. fáze spočívá v konjugaci polární skupiny látky s endogenní molekulou. Jako příklad můžeme uvést konjugaci s kyselinou glukuronovou zprostředkovanou enzymem UDP-glukuronyltransferásou (UGT). Dalšími enzymy II. fáze metabolismu jsou N-acetyltransferázy (NAT), glutathion S-transferázy (GST), sulfotransferázy (SULT) a další (Chen et al., 2012).

Substráty pro metabolizační enzymy jsou obvykle lipofilní látky. Procesem biotransformace nabývá molekula hydrofilnější charakter, a je tak schopna se vyloučit z organismu. Látky, které mají hydrofilní vlastnosti, nepodléhají přeměně a jsou vylučovány z organismu převážně v nezměněné, původní formě. Některá xenobiotika vstupují pouze do I. fáze metabolismu (např. lokální anestetikum prokain podléhá hydrolyze), naopak některá vstupují pouze do II. fáze (např. paracetamol je přeměňován převážně glukuronidací) (Dostálek et al., 2006).

Někdy navíc k I. a II. fázi metabolismu bývá řazen transport látek do místa (fáze 0) a z místa (III. fáze) biotransformace. Významnou roli v přenosu látek přes plasmatickou membránu buněk hrají molekulární transportéry. Ty lze rozdělit do dvou skupin, které představují efluxní transportéry (ABC transportéry, ATP binding cassette) využívající energii z ATP a uptake transportéry, které k přenosu využívají koncentrační gradienty (např. OATP, polypeptidový transportér organických aniontů a OCT, transportér organických kationtů) (Chen et al., 2012, Skálová et al., 2017).

Metabolismus léčiv často vede ke vzniku neaktivních metabolitů a následně k jejich exkreci. Mohou však také vzniknout metabolity toxické. Pokud je podávané léčivo

ve formě proléčiva, vzniká během jeho metabolismu vlastní terapeuticky aktivní molekula. Z toho vyplývá, že exprese a aktivita biotransformačních enzymů ovlivňuje terapeutický i toxický profil léčiva (Dostálek et al., 2006, web 1).

### **3.1.1. Enzymy nadrodiny P450**

Nadrodina cytochromů P450 (CYP) zahrnuje hlavní enzymy I. fáze metabolismu. Ze všech léčiv, které jsou metabolizovány pomocí enzymů, se CYP podílí na biotransformaci asi 75 % z nich. Na základě podobnosti sekvence aminokyselin (AMK) jsou enzymy rozřazeny do osmnácti rodin, které se označují arabskou číslicí (např. CYP2). Dále rozeznáváme 43 podrodin, ty jsou v nomenklatuře specifikovány písmenem. Tvoří je enzymy se shodou AMK sekvencí alespoň z 55 % (např. CYP2B). Jednotlivé isoformy podrodin jsou poté číslovány (např. CYP2B6). Aktuálně je známo 57 enzymů CYP (Machalz et al., 2021, Zhao et al., 2021).

Lidské CYP jsou membránovými proteiny, nacházejícími se buď na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula, nebo na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány (Machalz et al., 2021).

Není bez zajímavosti, že genetický polymorfismus podmiňuje aktivitu CYP. Mezi nejvíce polymorfní isoformy patří CYP2D6. Pravděpodobnou příčinou je lokalizace genu pro CYP2D6 na dlouhém raménku 22. chromozomu, jenž je úsekem schopným rychle reagovat na měnící se podmínky, v důsledku čehož může často podléhat mutacím (Skálová et al., 2017, Zhao et al., 2021).

Interakce na úrovni CYP mohou významně ovlivnit účinnost léčby či způsobit nežádoucí účinky. Mnoho substancí působí jako CYP induktory nebo inhibitory. Může se jednat o léčiva, produkty cigaretového kouře, alkohol a další látky. V případě indukce CYP hrozí, že dojde k rychlejší metabolizaci léčiva, což v konečném důsledku může snížit účinnost léčby. Opačná situace nastává s inhibitory CYP (Zhao et al., 2021).

Významnými zástupci CYP jsou CYP2B6 a CYP3A4, které jsou předmětem studia této diplomové práce.

### 3.1.2. CYP2B6

CYP2B6 je jediný gen podrodiny CYP2B, který kóduje funkční enzym. Odhaduje se, že CYP2B6 metabolizuje nebo se částečně podílí na metabolizaci přibližně 8–13 % klinicky významných léčiv (Desta et al., 2021).

Expres tohoto enzymu je mezi jedinci velmi variabilní a je regulována na transkripční úrovni nukleárními receptory CAR a PXR. Expres CYP2B6 může být indukována mnoha látkami, např. antiretrovirotikem efavirenzem nebo artemisininem, jenž se užívá na léčbu malárie. Některé induktory CYP2B6 jsou zároveň jeho substráty. Enzymatickou indukci tak urychlují svou vlastní biotransformaci. Příkladem těchto látek je opět efavirenz a artemisinin, dále cyklofosfamid a ifosfamid (Desta et al., 2021).

### 3.1.3. CYP3A4

CYP3A4 je nejdůležitějším metabolizačním CYP enzymem. Nejhojněji je zastoupen v játrech, dále ve střevě a méně v dalších orgánech, jako jsou např. plíce a mozek. CYP3A4 pravděpodobně figuruje v metabolizaci 30 % veškerých xenobiotik a až 50 % léčiv užívaných v humánní medicíně (Skálová et al., 2017).

Míra exprese a aktivity CYP3A4 je vysoce variabilní, jelikož může být zvýšená indukci induktory, nebo naopak snižena po podání látek, které působí inhibičně. Tento mechanismus je důvodem častých lékových interakcí. Během indukce dochází ke snížení hladin léčiva, což může mít za následek nedostačující terapeutický efekt. Pokud dochází k inhibici, léčivo může dosahovat vysokých plasmatických koncentrací, a tak vykazovat nežádoucí a toxické účinky. Mezi látky, které ovlivňují aktivitu CYP3A4, spadá široká škála léčiv, složky potravy, ale i látky znečišťující životní prostředí. Regulace transkripce podrodiny CYP3A probíhá prostřednictvím PXR, CAR a dalších nukleárních receptorů (Kousalová et al., 2003, Skálová et al., 2017, Werk a Cascorbi, 2014).

Interakční potenciál na úrovni CYP3A4 vykazují i některé rostlinné přípravky. *Hypericum perforatum* (Třezalka tečkovaná), rostlina z čeledi *Hypericaceae* (třezalkovité), je známá především pro své antidepresivní účinky, ale působí také analgeticky, protizánětlivě, antimikrobiálně a má hojivé vlastnosti. Je obsažena v mnoha léčivých přípravcích a čajích. Hyperforin, obsahová látka třezalky, indukuje CYP3A4 a P-glykoprotein skrze vazbu na PXR (Nobakht et al., 2022).

Struktura CYP3A4 se příliš neliší od ostatních isoform CYP, ale aktivní místo této isoformy je flexibilnější a otevřenější, a tak je pro substráty přístupnější. CYP3A4 je schopen vázat velké množství různorodých substrátů a uvádí se, že v některých případech je možné, aby vázal také dva substráty najednou (Švihovec et al., 2018, Zhao et al., 2021).

Tabulka 1 a 2 uvádí modelové induktory a inhibitory CYP3A4.

### Induktory CYP3A4

Dexametason
Fenobarbital
Fenytoin
Karbamazepin
Rifabutin
Rifampicin
Třezalka tečkovaná

*Tab. 1: V tabulce je výčet několika typických induktorů CYP3A4.*

*Převzato a modifikováno podle: Dostálek et al., 2006, Kousalová et al., 2003*

### Inhibitory CYP3A4

Amiodaron	Indinavir
Bromokryptin	Itrakonazol
Cimetidin	Ketokonazol
Klotrimazol	Klaritromycin
Cyklosporin	Midazolam
Danazol	Mikonazol
Diltiazem	Nefazodon
Ergotamin	Nifedipin
Erytromycin	Nikardipin
Etinylestradiol	Omeprazol
Flukonazol	Progesteron
Fluoxetin	Ritonavir
Fluvoxamin	Saquinavir
Gestoden	Testosteron
Grapefruitový džus	Troleandomycin
Chinidin	Verapamil

*Tab. 2: V tabulce je výčet několika typických inhibitorů CYP3A4.*

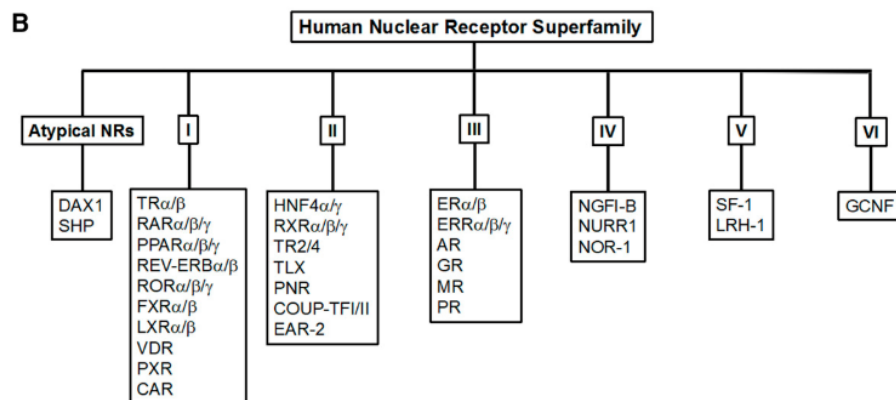
*Převzato a modifikováno podle: Kousalová et al., 2003*

### 3.2. Nukleární receptory

Nukleární receptory (NR) tvoří širokou nadrodinu ligandem aktivovaných transkripčních faktorů, které se podílejí v různé míře na biologických pochodech organismu včetně metabolismu, homeostázy či reprodukce. NR vážou ligandy a řídí expresi cílových genů. Dysregulace funkce NR může vést k patologickým stavům. NR jsou proto zajímavé cíle potenciálních léčiv (Papageorgiou et al., 2021).

Nadrodina NR čítá u člověka 48 zástupců, ti se rozdělují do několika skupin. Sirotčí receptory představují ty, u nichž zatím nebyl objeven endogenní ligand. Pokud byl u těchto sirotčích receptorů po objevení identifikován fyziologický ligand, řadí se receptory do skupiny adoptovaných sirotčích receptorů. Další skupinou jsou endokrinní NR, jejichž ligandy jsou endokrinní hormony. CAR i PXR patří do skupiny adoptovaných sirotčích receptorů (de Vera, 2018).

NR jsou klasifikovány do 7 podrodin (atypické, I–VI) dle jejich homologie. Atypické NR tvoří unikátní podrodinu NR (0). Ve své struktuře mají zachovanou ligand-vazebnou doménu (LBD), ale neobsahují DNA-vazebnou doménu (DBD). Atypické receptory se váží na jiné NR, a tak ovlivňují transkripci. Nejpočetnější skupinou NR je podrodina I (viz obr. 1). U téměř všech členů této podrodiny je znám endogenní ligand. Do této podrodiny patří mj. CAR a PXR (Burris et al., 2023).



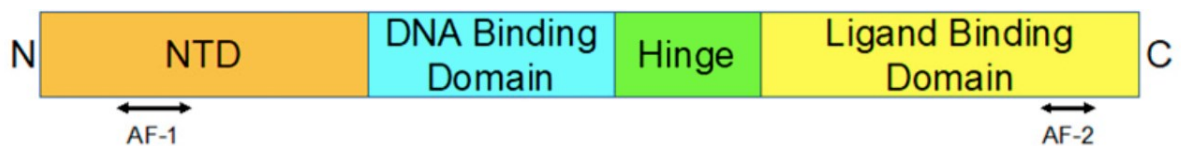
Obr. 1: Přehled podrodin nukleárních receptorů.

Převzato z: Burris et al., 2023

### 3.2.1. Struktura NR

Architekturu NR obvykle tvoří 4 podjednotky (viz obr. 2). První je doména, která obsahuje aktivační funkci 1 (AF-1) nezávislou na ligandu. Dále následuje DBD, která je nejkonzervativnější strukturou NR. Tvoří ji dva zinkové prsty, které rozpoznávají responzivní element, což je specifická sekvence DNA v promotorové oblasti genu. Kladně nabitý zinkový iont tvoří kationické místo pro vazbu s negativně nabitou DNA. DBD je pomocí hinge regionu spojena s LBD. LBD je místo, kam se vážou ligandy a vyvolávají tak konformační změny NR. Aktivační funkce 2 (AF-2) je součástí LBD (Burris et al., 2023, Sonoda et al., 2008).

Pokud se ligand naváže na LBD, dochází ke konformační změně AF-2, uvolnění korepresorů a k vazbě koaktivátorů. Jsou ale také známy receptory, jejichž AF-2 doména je trvale aktivovaná i přesto, že nedošlo k interakci s ligandem. Takové receptory se označují jako konstitutivně aktivní (Sonoda et al., 2008).



Obr. 2: Schéma struktury jaderného receptoru.

*N (NTD): amino-terminální část; AF-1: aktivační funkce 1; DNA binding domain: DNA-vazebná doména; Hinge: spojovací doména; Ligand binding domain: ligand-vazebná doména; AF-2: aktivační funkce 2; C: karboxy-terminální část*

*Převzato z: Burris et al., 2023*

### 3.3. Konstitutivní androstanový receptor

Konstitutivní androstanový receptor (CAR, NR1I3) je transkripční faktor z nadrodiny NR. Na základě jeho strukturní podobnosti s jinými NR byl zařazen do podrodiny 1 a skupiny I. Tuto skupinu sdílí s PXR a receptorem pro vitamín D (VDR) (Hernandez et al., 2012, Molnár et al., 2013).

Lidský CAR (hCAR) byl poprvé popsán v roce 1994. Byl klasifikován jako sirotčí receptor, jelikož po objevení nebyl znám jeho endogenní ligand. Zanedlouho poté bylo popsáno několik steroidních endogenních ligandů CAR, dnes proto bývá řazen do skupiny adoptovaných sirotčích receptorů (Brožová et al., 2023).



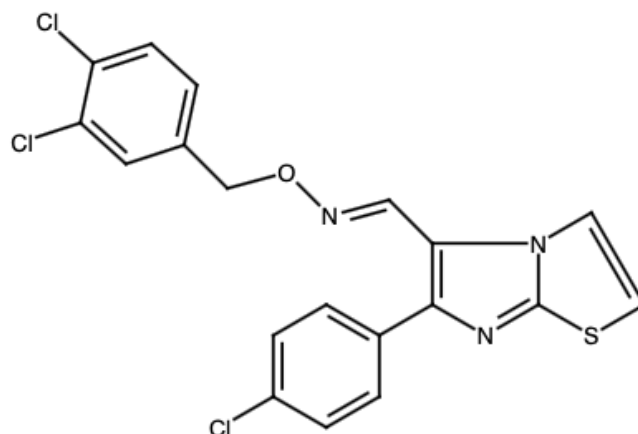
CAR je považován za významný xenosenzor regulující expresi mnoha eliminačních proteinů. Řada přírodních a chemických látek (včetně léčiv) má afinitu k tomuto receptoru a schopnost ovlivňovat jeho aktivitu. CAR transkripčně reguluje enzymy I. fáze metabolismu (některé CYP isoformy), II. fáze metabolismu (UGT a SULT) a také některé transportéry jako je transportér mnohočetné lékové rezistence 1 (MDR1) (Brožová et al., 2023, Hernandez et al., 2012, Oliviero et al., 2020).

Nedávné studie poukazují na skutečnost, že CAR nehraje roli pouze v metabolismu a exkreci xenobiotik, ale také v mnoha fyziologických a patologických pochodech v organismu, např. v homeostáze glukózy, metabolismu tuků, lipidů, mastných kyselin, žlučových kyselin a cholesterolu (Brožová et al., 2023).

Expresí CAR je významná převážně v detoxikačních orgánech jako jsou játra, ledviny a střeva, kde dochází k přeměně xenobiotik biotransformačními enzymy. V menší míře je také lokalizován v tkáních jako je srdce, mozek, kosterní svalstvo, plíce a další (Nishimura et al., 2004, Oliviero et al., 2020).

### **3.3.1. Ligandy CAR a mezidruhové rozdíly**

LBD CAR má převážně hydrofobní a flexibilní charakter. Má velikost přibližně 600 Å, některé zdroje uvádějí až 675 Å. Hydrofobní charakter kavity naznačuje, že ligandy CAR jsou převážně lipofilní molekuly. Zatím nebyly objeveny účinné a netoxické ligandy CAR, které by zároveň nepůsobily na jiné NR. To je také důvodem, proč se tematikou zabýváme v diplomové práci. CITCO, 6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim, je modelová látka s vysokou afinitou k receptoru CAR (viz obr. 3). Nevýhodou je, že ovlivňuje i aktivitu PXR, a to v závislosti na koncentraci. CITCO však nemá účinky na myší CAR (mCAR), což vypovídá o tom, že existují rozdíly v LBD mezi hCAR a myší variantou receptoru. CITCO je v našich experimentech používán jako agonista pro hCAR. Pro mCAR byl identifikován agonista TCPOBOP, 1,4-bis[(3,5-dichloropyridin-2-yl)oxy]benzen, který však nepůsobí na hCAR (Buchman et al., 2018, Lin et al., 2020, Mejdrová et al., 2023).



Obr. 3: Agonista konstitutivního androstanového receptoru 6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim (CITCO).

*Struktura byla vytvořena pomocí ChemDraw Professional*

Mezi některé další látky s afinitou ke CAR patří PK11195 a klotrimazol, které jsou inverzními agonisty CAR. Obě látky však také aktivují PXR. Látka CINPA1 inhibuje CAR a je schopna antagonizovat aktivaci CAR způsobenou CITCO. Mělo se za to, že CINPA1 neaktivuje PXR, proto také byla pojmenována CAR inhibitor not PXR activator 1, ale další studie toto tvrzení vyvrátily. Bylo potvrzeno, že PXR je aktivován jak CINPA1, tak i jeho dalšími analogy (Cherian et al. 2015, Jeske et al., 2017, Mackowiak a Wang, 2016).

Stojí za zmínku, že steroidní struktury androstanol a androstenol byly první identifikované ligandy CAR. Androstanol je jeho inverzní agonista, který potlačuje konstitutivní aktivitu CAR vlivem disociace koaktivátorů (Xiao et al., 2013).

### 3.3.2. Účinky CAR na metabolismus

CAR v experimentech potlačuje glukoneogenezi. Mechanismus působení zahrnuje transkripční faktor forkhead box O1 (FoxO1), který vlivem hladovění způsobuje zvýšenou míru exprese genů pro glukosa-6-fosfatázu a fosfoenolpyruvátkarboxykinázu 1, jež jsou enzymy podílející se na glukoneogenezi. Po jídle je inzulínem tato transkripce potlačena, a tak se zabraňuje syntéze glukosy v játrech. Předpokládá se, že CAR se může vázat na FoxO1, a tím bránit jeho funkci. Dochází tedy k represí genů působících v procesu glukoneogeneze (Küblbeck et al., 2020).

U myši geneticky obézních (ob/ob) a s vysokotučnou dietou (HFD) bylo prokázáno, že aktivovaný CAR zlepšuje odpověď na inzulín. Naopak myši bez CAR a myši, kterým byl podáván CAR antagonist, byly rezistentní na inzulín. První studie na lidech ukázaly, že v případě aktivace CAR fenobarbitalem (PB) (nepřímý aktivátor CAR) byly zlepšeny plasmatické hladiny glukózy nalačno, inzulínová odpověď i glukózová tolerance (Küblbeck et al., 2020).

U myši krmených HFD a léčených TCPOBOP byla inhibována jaterní lipogeneze a indukována  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (MK), tím došlo k potlačení jaterní steatózy. CAR také indukuje expresi genů pro enzymy CYP a další skupiny enzymů, jež napomáhají v přeměně cholesterolu na žlučové kyseliny a následně jejich vyloučení (Küblbeck et al., 2020).

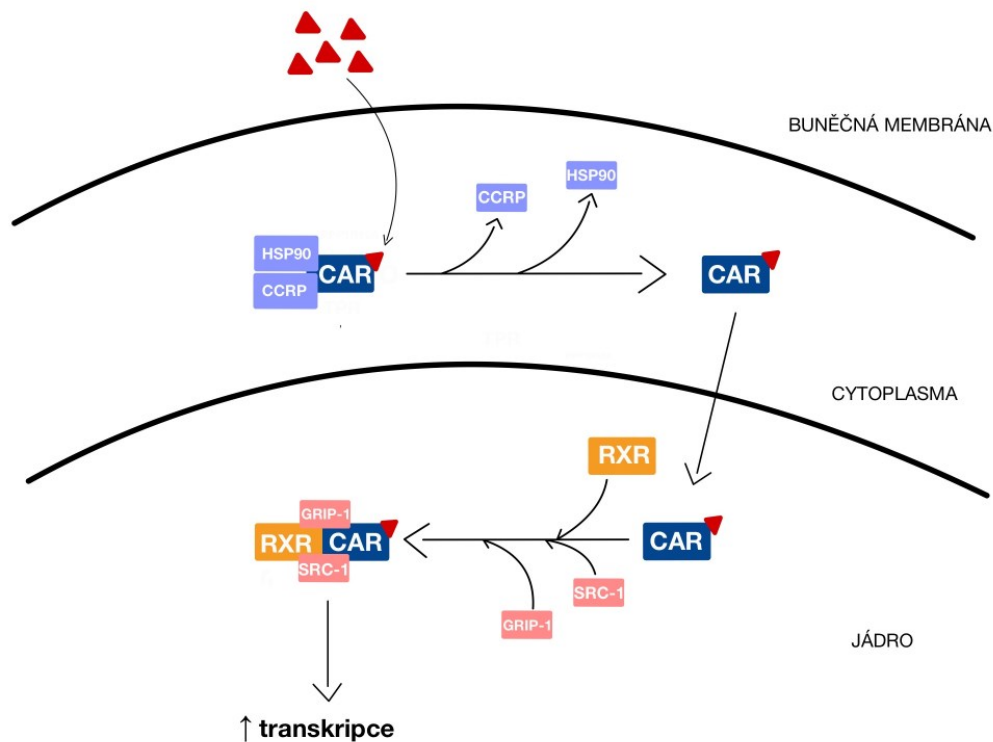
Další experimenty byly provedeny na skupině myši krmených HFD, poté byly medikovány TCPOBOP po dobu 1 týdne. V kosterním svalstvu, v játrech i v tukové tkáni byla značně inhibovaná exprese lipogenních genů. Podobné výsledky byly dosaženy po 8 týdnech podávání TCPOBOP. Dalšími zjištěními bylo, že došlo ke zlepšení stavu jaterní steatózy a zmenšení velikosti bílé i hnědé tukové hmoty (Gao et al., 2009).

Poznatky ohledně vlivu CAR na metabolismus lipidů jsou v současnosti nejasné a sporné, jelikož CAR může přispívat za určitých experimentálních okolností k metabolismu lipidů i negativně, např. zvýšenou lipogenezi či vyšší koncentrací cirkulujících MK (Küblbeck et al., 2020).

### **3.3.3. Přímá aktivace CAR**

CAR je za běžné situace lokalizován ve fosforylované formě v cytoplasmě, kde je vázán v komplexu proteinů, který tvoří protein teplotního šoku 90 (HSP90), cytosolový CAR retenční protein (CCRP), membránová podjednotka proteinové fosfatázy 1 $\beta$  (PPP1R16A) a tetratrikopeptidová repetice (TPR). Po navázání ligandu se tento komplex uvolní, CAR je translokován do jádra, kde dochází k jeho heterodimerizaci s retinoidním X receptorem (RXR). Poté dochází k navázání koaktivátorů, jako jsou např. koaktivátor 1 steroidního receptoru (SRC-1) a protein 1 interagující s glutamátovým receptorem (GRIP1). Následuje transkripce CAR cílových genů. Jako příklad agonisty a přímého ligandu CAR můžeme uvést CITCO (Chen et al., 2012, Mackowiak a Wang, 2016).

Schéma přímé aktivace je znázorněno na obr. 4.



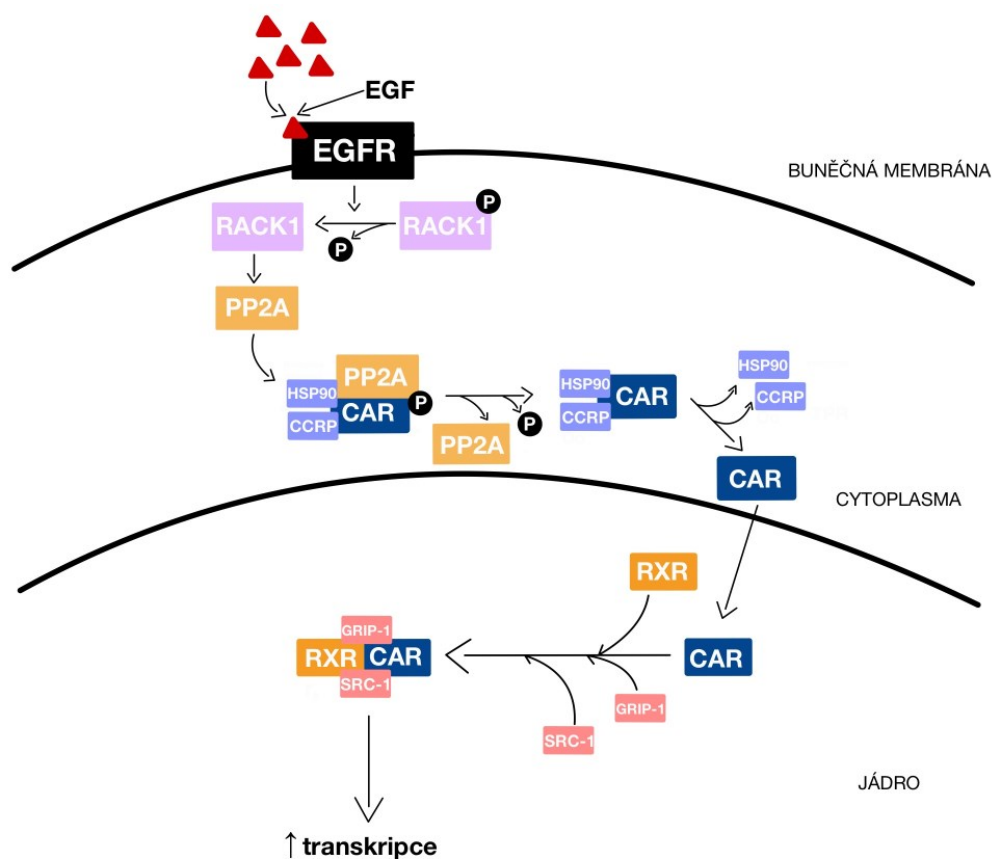
Obr. 4: Přímá aktivace CAR.

*CAR: konstitutivní androstanový receptor; HSP90: protein teplotního šoku 90; CCRP: cytosolový CAR retenční protein; RXR: retinoidní X receptor; SRC-1: koaktivátor 1 steroidního receptoru; GRIP1: protein 1 interagující s glutamátovým receptorem; červená značka (trojúhelník) reprezentuje CITCO*

### 3.3.4. Nepřímá aktivace CAR

Nepřímá aktivace probíhá prostřednictvím receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Antagonista EGFR inhibuje signál, který zprostředkovává epidermální růstový faktor (EGF). Dojde k defosforylaci receptoru pro aktivovanou C kinázu 1 (RACK1), což dále vede k defosforylaci Thr38 CAR receptoru pomocí proteinové fosfatázy 2 (PP2A). Následkem defosforylace CAR je jeho jaderná translokace. V jádře dochází k obdobným dějům jako v případě přímé aktivace, tj. heterodimerizaci CAR s RXR. Takto vzniklý komplex se váže na responzivní elementy, které jsou lokalizovány na promotorech cílových genů CAR. V jádře mimo jiné také dochází k náboru koaktivátorů, jako jsou např. SRC-1 a GRIP1. K nepřímým aktivátorům CAR řadíme PB. Konkrétním příkladem CAR responzivního elementu je fenobarbitalový responzivní element (PBREM), který se nachází v promotorové oblasti genu pro CYP2B6 (Mackowiak a Wang, 2016).

Schéma nepřímé aktivace CAR je znázorněno na obr. 5.



Obr. 5: Nepřímá aktivace CAR.

*CAR: konstitutivní androstanový receptor; EGF: epidermální růstový faktor; EGFR: receptor pro epidermální růstový faktor; RACK1: receptor pro aktivovanou C kinázu 1; PP2A: proteinová fosfatáza 2; HSP90: protein teplotního šoku 90; CCRP: cytosolový CAR retenční protein; RXR: retinoidní X receptor; SRC-1: koaktivátor 1 steroidního receptoru; GRIP1: protein 1 interagující s glutamátovým receptorem; červená značka (trojúhelník) reprezentuje fenobarbital*

### 3.3.5. Alternativní sestřih CAR

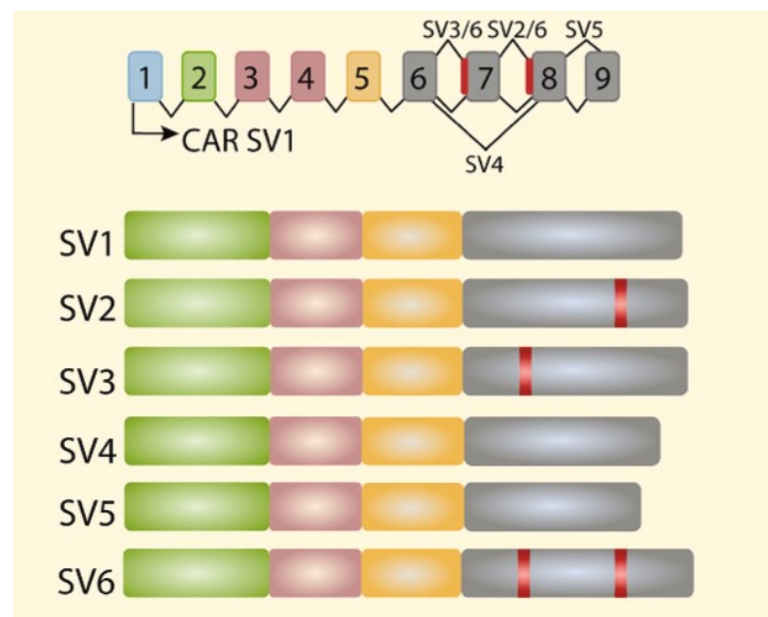
Alternativní sestřih je mechanismus, jenž umožňuje z jednoho genu produkovat různé isoformy mRNA, které mohou být následně překládány do různých proteinů. V lidských buňkách je značný rozdíl v počtu genů kódujících proteiny (~25 000) a v počtu proteinů, které jsou reálně produkovány (>90 000). Klasický, konstitutivní sestřih probíhá odstraňováním intronů a následným spojením exonů v pořadí, ve kterém se nacházejí. U procesu alternativního sestřihu dochází ke změně v tomto procesu. Změnou může být vynechání exonů, ponechání intronů, změna pořadí exonů a další (Singh a Ahi, 2022, Wang et al., 2015).

Sestřih je realizován v jádře pomocí spliceosomu, což je komplex proteinů a RNA, skládající se z 5 malých jaderných ribonukleoproteinů (snRNP, U1, U2, U4–U6) a více než 300 různých proteinů (Abramowicz a Gos, 2018).

Bylo objeveno nejméně 5 isoform CAR a některé zdroje uvádějí, že jich existuje až 22. Takto vzniklé isoformy mohou vykazovat různou expresi a biologické funkce. Předpokládá se, že různé isoformy mají afinitu k různým ligandům a také mají schopnost regulovat expresi rozdílných genů (di Masi et al., 2009, Lamba et al., 2004, Mukha et al., 2021).

Gen pro CAR, NR1H3, je lokalizován na chromozomu 1. Skládá se z 8545 párů bází (bp) a produkuje 9 exonů oddělených 8 introny (di Masi et al., 2009).

Nejhojněji zastoupené isoformy v lidských játrech jsou CAR1 a CAR3. CAR3 isoforma má vloženou sekvenci pěti AMK (15 bp) mezi exon 7 a 8. Další varianta CAR2 má vloženou sekvenci čtyř AMK (12 bp) mezi exony 6 a 7. Tyto modifikace jsou znázorněny na obr. 6. CAR1 vykazuje konstitutivní aktivitu, je tedy schopen regulovat expresi genů také v případě nepřítomnosti ligandu. U variant CAR2 a CAR3 je konstitutivní aktivita potlačena a pro aktivaci je nutná přítomnost ligandu. Bylo zjištěno, že CAR3 je schopna transaktivovat geny CYP2B6 a MDR1 (gen kódující P-glykoprotein), naopak nevykazuje větší vliv na transkripci CYP3A4. Za indukci CYP3A4 zodpovídá isoforma CAR2 (Dring et al., 2010, Mukha et al., 2021).





Obr. 6: Schematické znázornění exonů genu NR1I3 (CAR).

SV1 představuje CAR1. SV2 představuje CAR3, jež má inzert 15 páru bází mezi exony 7 a 8. SV3 je varianta CAR2 mající 12 bp mezi exony 6 a 7. SV4, SV5, SV6 jsou další isoformy CAR.

N: amino-terminální část; AF-1: aktivační funkce 1; DBD: DNA-vazebná doména; Hinge: spojovací doména; LBD: ligand-vazebná doména; AF-2: aktivační funkce 2; C: karboxy-terminální část

Převzato a modifikováno podle: Mukha et al., 2021

### 3.4. Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor (PXR) je transkripční faktor nadrodiny NR. PXR byl objeven a poprvé popsán v roce 1998. Tento NR je kódován genem NR1I2, který se nachází na chromozomu 3. Je složen z 10 exonů a 9 intronů (Tebbens et al., 2018).

PXR je považován za klíčový v expresi genů, které kódují důležité enzymy a transportéry léčiv, např. CYP2B6, CYP2C9, CYP3A5, CYP3A7, UGT1A1 a MDR1. Je nutné zdůraznit, že CYP3A4, enzym podílející se na biotransformaci až 50 % léčiv, je také pod transkripční kontrolou PXR. Nové výzkumy poukazují na skutečnost, že se PXR podílí ve značné míře na regulaci endogenního metabolismu glukózy, lipidů a žlučových kyselin (Pavek, 2016, Tebbens et al., 2018).

PXR je exprimován zejména v játrech a střevech, v menší míře také v jiných tkáních, např. v ledvinách, plicích, mozku a nadledvinách (Tebbens et al., 2018).

Podobně jako CAR byl po objevu řazen mezi sirotčí receptory, protože nebyl znám jeho endogenní ligand. Později byl přerazen do skupiny adoptovaných sirotčích receptorů. Je totiž aktivován pregnanem, endogenní steroidní strukturou s 21 uhlíky. Objev se také promítl do názvu tohoto receptoru (di Masi et al., 2009, Lv et al., 2022).

Aktivace PXR je závislá na přítomnosti ligandu. Po jeho navázání dojde k uvolnění vazby PXR k proteinům v cytosolu, k translokaci tohoto receptoru do jádra, heterodimerizaci s RXR, jeho navázání na responzivní elementy cílových genů a dochází k jejich transkripci (Chang, 2009, Ma et al., 2008).

Jsou popsány minimálně čtyři sestřihové varianty tohoto receptoru. PXR1 a PXR2 reagují na agonisty indukcí exprese cílových genů, kdežto PXR3 a PXR4 expresi neindukují. Zdá se, že PXR3 interaguje s koregulátory, ale nezpůsobuje aktivaci cílových genů. PXR4 soutěží s PXR1 o ligand a koaktivátory, přičemž vykazuje dominantní negativní účinek (Brewer a Chen, 2016, Tebbens et al., 2018).

LBD receptoru PXR má velkou kavitu, která je schopna vázat širokou škálu chemicky různorodých látek. PXR interaguje s léčivy, produkty metabolismu rostlin, doplňky stravy a látkami znečišťující životní prostředí. Jako příklad léčiv z řad ligandů PXR můžeme uvést antituberkulotikum rifampicin (jenž je také modelovým agonistou PXR), cytostatikum cyklofosfamid a protizánětlivý kortikosteroid dexamethason (Ma et al., 2008).

### **3.5. Strukturní podobnosti CAR a PXR**

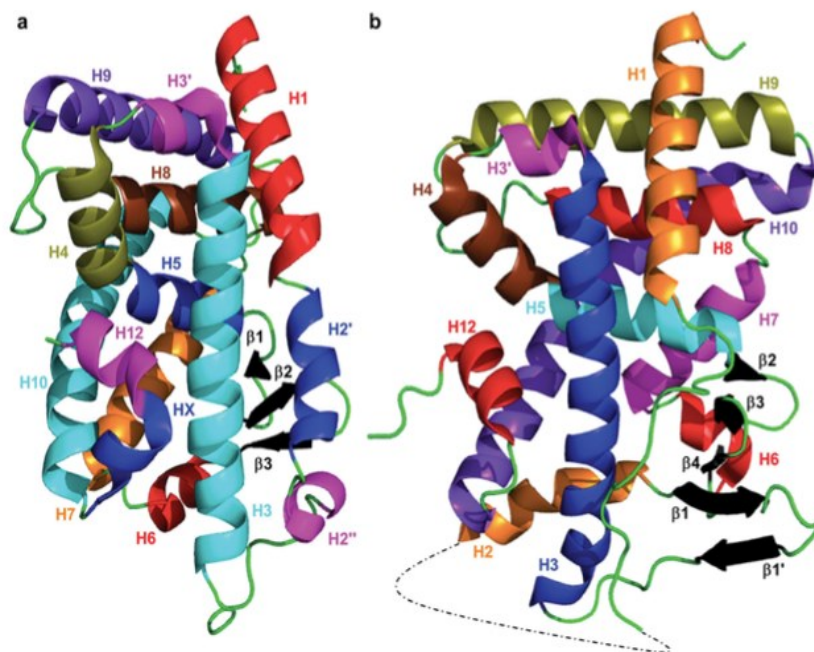
Oba NR interagují s promotory genů prostřednictvím zinkových prstů, které jsou lokalizovány v DBD. Ta je spojena s C-koncovou LBD pomocí hinge regionu (viz obr. 2). Spojovací oblast (hinge region) PXR a CAR má jen malou sekvenční podobnost AMK (Buchman et al., 2018).

Krystalická struktura LBD lidského PXR byla popsána v roce 2001. Následně v roce 2004 byla popsána i u lidského CAR. PXR LBD je tvořena třemi vrstvami  $\alpha$ -helixů, kdežto LBD CAR má i čtvrtou vrstvu, kterou tvoří 3<sup>10</sup> helixy. Ačkoliv jsou mezi receptory jisté strukturní podobnosti, jejich výraznou individuální charakteristikou je velikost LBD. Rozměr LBD je  $\sim 600 \text{ \AA}^3$  v případě CAR a poněkud větších rozměrů dosahuje u PXR ( $\sim 1200\text{--}1600 \text{ \AA}^3$ ). Tento rozdíl ve velikosti LBD PXR je způsoben velkým inzertem dvou  $\beta$  řetězců ( $\beta 1$  and  $\beta 1'$ ) a dalším  $\alpha$ -helixem (H2) mezi H1 a H3 (viz obr. 7) (Buchman et al., 2018).

Závěrem lze konstatovat, že CAR a PXR mají velké a flexibilní LBD, které umožňují vazbu strukturně různých molekul. Tato vlastnost je hlavní překážkou k nalezení selektivních modulátorů těchto receptorů (Cherian et al., 2018).

Selektivní ligandy mají potenciál rozlišit unikátní funkce PXR a CAR. Mohou tak být nástrojem pro pochopení jejich role ve fyziologických a patofyziologických procesech.





Obr. 7: Krystalická struktura ligand vázající domény CAR (a), ligand vázající domény PXR (b).

Převzato z: Buchman et al., 2018

#### **4. Cíl práce**

Cílem experimentální diplomové práce je replikační studie dříve identifikovaných látek v naší vědecké skupině, které vykazují antagonistickou aktivitu vůči CAR receptoru, ale minimálně ovlivňují PXR receptor. Dílčí úkoly zahrnují:

1. Vyhodnotit afinitu testovaných látek k receptoru CAR metodou two-hybrid assay.
2. Vyhodnotit vliv testovaných látek na aktivitu CAR a PXR receptoru metodou gene reporter assay.

## 5. Experimentální část

### 5.1. Materiál

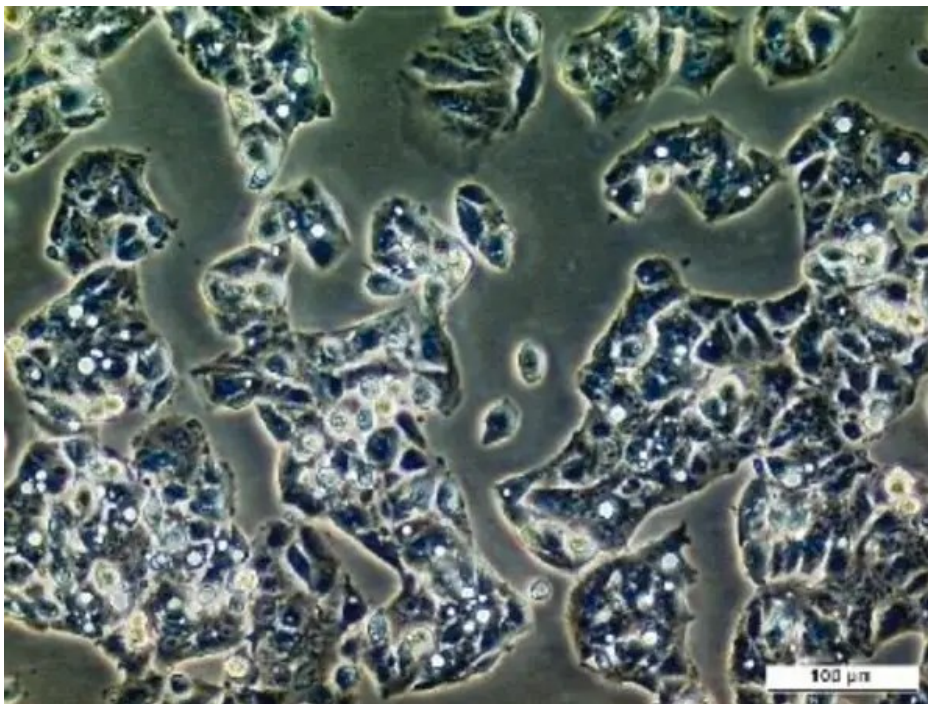
#### 5.1.1. Buněčná linie HepG2

Buněčná nádorová linie HepG2 byla získána z jaterní tkáně od muže kavkazské rasy, jenž byl diagnostikován s hepatoblastomem. Buňky mají adherentní vlastnosti a vážou se tedy na kultivační povrchy (Arzumanian et al., 2021, web 2).

Buňky byly kultivovány ve vlhčené atmosféře při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Jako kultivační médium bylo používáno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), které obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % neeseciálních AMK. Pasážování probíhalo v poměru 1:6 jednou týdně, když buňky dosáhly 80% konfluence. Adherentní buňky byly uvolněny z povrchu kultivační nádoby pomocí enzymu trypsinu.

Počet buněk byl určen pomocí Bürkerovy komůrky, při kalkulaci jsme nebrali zřetel na mrtvé buňky obarvené trypanovou modří.

Buněčná linie HepG2 byla zakoupena z General Collection od European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (web 2). Mikroskopický snímek HepG2 buněk můžeme vidět na obr. 8.



*Obr. 8: Mikroskopický snímek HepG2 buněčná linie.*

*Převzato z: web 2*

### 5.1.2. Plasmidy

- pB-1,6kb/PB/XREM.luc (150 ng/ jamka)  
reportérový plasmid pro studium aktivity CAR, dar od Dr. Hongbing Wanga (University of Maryland School of Pharmacy, Baltimore, MD, USA)
- CAR van (100 ng/ jamka)  
expresní vektor CAR, varianta X4 (Genscript, Piscataway, NJ, USA)
- p-RL-TK (30 ng/ jamka)  
expresní vektor, který kóduje *renilla* luciferázu (Promega, USA)
- p3A4-luc (150 ng/ jamka)  
reportérový plasmid, který tvoří základní promotor (-361/+53) s PXR responzivním elementem (ER6) a oblast zesilující odpověď na xenobiotika (xenobiotic responsive enhancer module) (-7835/-7208) genu CYP3A4, obě sekvence byly vneseny do plasmidu pGL3-Basic (Promega, USA) (popsáno v Pavek et al., 2010)
- pSG5-PXR B (100 ng/ jamka)  
expresní plasmid PXR, dar od Dr. S. Kliewera (University of Texas, Dallas, TX, USA)
- pGL4-UAS 9x (150 ng/ jamka) (Promega, USA)  
reportérový plasmid s 9 UAS responzivními elementy (Promega, USA)
- hCAR-N/GAL4 (100 ng/ jamka)  
expresní plasmid kóduje fúzní protein, který je tvořen CAR šroubovicí 1 (AMK 103–150) spolu s kvasinkovou DBD GAL4 (popsáno v Carazo Fernández et al., 2015)
- hCAR-C/VP16 (100 ng/ jamka)  
expresní plasmid kóduje fúzní protein, který tvoří CAR šroubovice 3–12 (AMK 151–349) a aktivační doména VP16 (popsáno v Carazo Fernández et al., 2015)

### 5.1.3. Reagencia

- DMEM (Thermo Fisher Scientific, USA)  
10 % fetálního bovinního séra (FBS) (Merck, Německo)  
1 % neesenciálních AMK (Merck, Německo)
- Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Fosfátový pufr (PBS) (Merck, Německo)

Fosfátový pufr se připravuje ze zakoupených tablet. Jedna tableta se rozpustí v 1 litru deionizované vody, čímž se získá pufr o pH 7,4. Složení PBS je: 140 mM NaCl, 10 mM fosfátový pufr ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a 3 mM KCl.

- Trypsin (Merck, Německo)
- Trypanová modř (Merck, Německo)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay reagent (Promega, USA)
- Pasivní lyzovací pufr (Promega, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Německo)
- Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Testované látky 1AF, 1ABr, 1AS, MV1, MV1F, MV1Br, MV1S, 1BBr, 1BS, MV1B, 1A byly syntetizované ve spolupráci s Vysokou školou technickou a ekonomickou v Českých Budějovicích. Jejich chemickou strukturu zde nemůžeme vzhledem k předpokládané budoucí ochranné patentem zveřejnit.
- CITCO a RIF (rifampicin) (Merck, Německo)

### 5.1.4. Přístroje a pomůcky

- Laminární box Telstar Clean Air EF/S
- Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)
- Vakuová odsávačka

- Inkubátor New Brunswick Galaxy 170 S (Eppendorf, Německo)
- Mikropipety a špičky (Eppendorf, Německo)
- Sérologické pipety (Eppendorf, Německo)
- Světelný mikroskop
- Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)
- 48jamková kultivační plata čirá (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 96jamková kultivační plata čirá (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 96jamková kultivační plata bílá Nunclone (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrofotometr Synergy 2 Biotek (BioTek, USA)
- Vodní lázeň
- Zkumavky (15, 50 ml) (TPP, Švýcarsko)
- Mikrozukavky (Eppendorf, Německo)
- Lednice
- Plynový kahan
- Pasteurovy pipety 150 mm (Kimble, Německo)

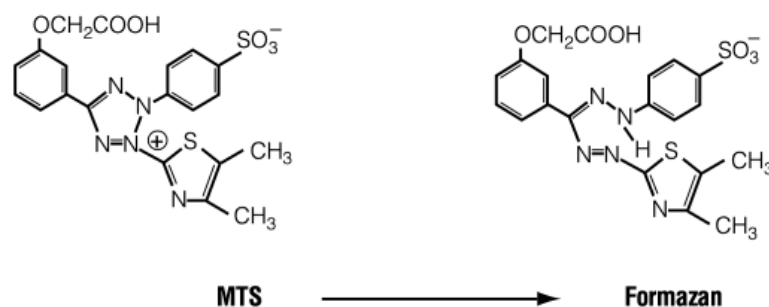
## **5.2. Metody**

### **5.2.1. Testy cytotoxicity (MTS assay)**

Za použití testu cytotoxicity jsme analyzovali, zda látky, později používané v gene reporter a two-hybrid assays, nevykazují toxické účinky na HepG2 buňky.

Experiment je založený na kolorimetrické metodě, která prokazuje životaschopnost buněk. V rámci pokusu jsme využili komerčně dostupný reagent CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation. Reagent obsahuje sůl tetrazolinu, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS). Životaschopné buňky redukují MTS na barevný produkt formazan (viz obr. 9).

Množství vzniklého formazanu je vyjádřené absorbcí při 490 nm a je přímo úměrné počtu viabilních buněk (web 3).



Obr. 9: Struktura MTS a formazanu.

Převzato z: web 3

Postup:

1. HepG2 buňky byly nasazeny na 96jamková pláta v hustotě 40 000 buněk/ jamka.
2. Po 24 hodinách jsme buňky opláchli PBS a následně exponovali k testovaným látkám v mediu Opti-MEM obohaceném o 5 % FBS (100  $\mu$ l/ jamka). DMSO 10 % jsme použili jako toxickou kontrolu a DMSO 3 ‰ jako netoxickou kontrolu (100% viabilita). Testované látky 1AF, 1ABr, 1AS, MV1, MV1F, MV1Br, MV1S, 1BBr, 1BS, MV1B jsme použili v koncentraci 10  $\mu$ M. Testovanou látku 1A, která má z dřívějšího pozorování popsanou nejlepší afinitu ke CAR, jsme testovali v širším rozmezí koncentrací, tj. 30; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,1 a 0,01  $\mu$ M.
3. Po 24 hodinách expozice jsme přidali reagent CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation (MTS) (20  $\mu$ l/ jamka), buňky uložili do inkubátoru (90 min) a následně změřili absorbcí při 490 nm.
4. Data byla získána z 1 biologického měření provedeného v technických triplikátech. Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD (z angl. standard deviation, směrodatná odchylka). Od výsledků absorbance jsme také odečetli pozadí (background), tj. hodnota absorbance (při 490 nm) v kompletních podmínkách kultivace, ale bez přítomnosti buněk.

### 5.2.2. Transfekce buněk

Transfekce je proces inkorporace nukleových kyselin (NK) do eukaryotických buněk. Vnášení NK je možné fyzikálními (mikroinjekce, elektroporace) nebo chemickými metodami a může sloužit jako nástroj pro studium funkce genů (web 4).

NK je polymer, který je složen z monomerních jednotek, tzv. nukleotidů. Ten je tvořen ze tří složek, tj. cukru, dusíkaté báze a zbytku kyseliny fosforečné, která nese negativní náboj NK (Minchin a Lodge, 2019).

Jelikož je buněčná membrána záporně nabitá, musely být vyvinuty metody transfekce, které umožní přenos souhlasně nabitých NK. Tyto metody neutralizují záporný náboj NK, nebo dokonce maskují negativní náboj nábojem kladným. Chemické metody transfekce mohou být provedeny pomocí látek jako je fosforečnan vápenatý, diethylaminoethyl (DEAE)-dextran anebo pomocí kationicky nabitých lipidů (web 4).

V naší sérii experimentů byla použita chemická metoda s využitím kationicky nabitých lipidů (komerčně dostupný reagent Lipofectamin 3000), které se na základě elektrostatické interakce vážou s negativně nabitými fosfáty NK. Vstup komplexu do buňky je zprostředkován endocytózou. V buňce jsou následně NK uvolněny (web 4).

### 5.2.3. Gene reporter assay

Metoda se používá ke studiu NR a využívá reportérového genu. Ten kóduje protein, který má snadno měřitelnou enzymatickou aktivitu anebo je jinak detekovatelný (např. pomocí fluorescence) (Ito-Harashima & Yagi, 2021).

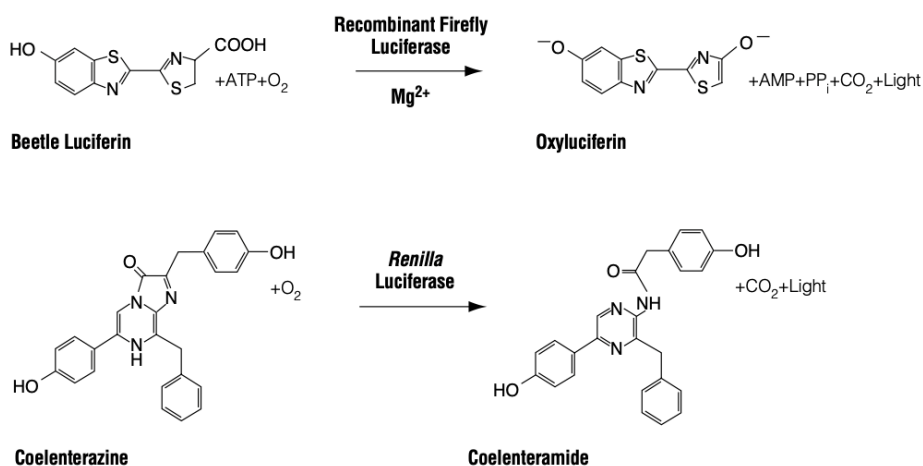
V případě CAR experimentu jsme použili reportérový plasmid nesoucí úsek promotorové oblasti CYP2B6 (pB-1,6kb/PB/XREM.luc). Ta byla umístěna před sekvenci světluškové luciferázy (reportérového genu). Změna aktivity světluškové luciferázy nepřímo odráží změny aktivity CAR, která je ovlivněna studovanými látkami.

Pro receptor PXR jsme gen pro světluškovou luciferázu vložili za sekvence promotoru genu CYP3A4 (p3A4-luc). V případě aktivace PXR opět dochází ke změnám exprese a aktivity světluškové luciferázy, která je mírou funkce PXR.



Protokol genových reportérových studií je doplněn o kotransfekci expresních plasmidů, které kontinuálně produkují příslušné NR. Je to z důvodu nízkých expresních hladin PXR a CAR v testované linii HepG2.

Detekce aktivity luciferázy byla provedena pomocí komerčně dodávaných reagensí (Dual-Luciferase® Reporter Assay). Duální systém je založen na postupném měření aktivity dvou enzymů v jedné reakci. V našem experimentálním designu je důvodem použití systému normalizace transfekční účinnosti mezi jednotlivými jamkami kultivačního plata. První signál produkuje světlušková luciferáza z reportérového plasmidu. Druhý signál produkuje kontinuálně exprimovaná *renilla* luciferáza (pocházející z *Renilla reniformis*) produkovaná z vlastního kotransfekovaného plasmidu. V experimentu využíváme rozdílných substrátů enzymů. Světlušková luciferáza katalyzuje přeměnu luciferinu (součást Dual-Luciferase® Reporter Assay) na oxyluciferin za vzniku luminiscenčního signálu (viz obr. 10). Po naměření signálu je do stejného vzorku přidán Stop & Glo reagent (součást Dual-Luciferase® Reporter Assay), který obsahuje substrát pro *renillu* a zároveň zhasí signál světluškové luciferázy. Druhý signál slouží jako kontrola transfekce a je používán pro normalizaci výsledků (web 5). Luminiscence se měří spektrofotometrem pro měření luminiscence (Synergy 2 Biotek) a intenzita emitovaného světla je úměrná množství luciferázy.



Obr. 10: Znárodnění enzymatických substrátů a reakcí, které jsou katalyzovány světluškovou luciferázou (firefly) a *renilla* luciferázou za vzniku detekovatelné bioluminiscence (light).

Převzato z: web 5

## Postup:

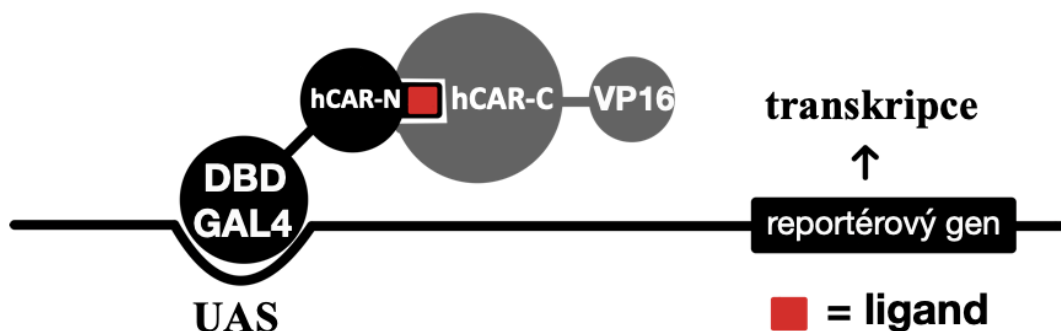
1. HepG2 buňky jsme nasadili na 48jamková plata v hustotě 110 000 buněk/ jamka.
2. Po 24 hodinách jsme buňky opláchli PBS (500  $\mu$ l/ jamka), přidali jsme 150  $\mu$ l DMEM (se suplementy) na jamku a následovala transfekce.
3. Připravili jsme si 4 zkumavky (vždy dvě pro každý receptor, tj. PXR a CAR). Do všech 4 zkumavek jsme přidali Opti-MEM v objemu potřebném na stanovený počet jamek (15  $\mu$ l/ jamka).
4. Do prvních dvou zkumavek jsme přidali Lipofectamin 3000 (0,45  $\mu$ l/ jamka).
5. Do zbývajících 2 zkumavek jsme přidali plasmidy pro gene reporter assay:  
do zkumavky pro CAR gene reporter assay jsme přidali:
  - reportérový plasmid pB-1,6kb/PB/XREM.luc (150 ng/ jamka)
  - expresní plasmid CAR (100 ng/ jamka)
  - expresní plasmid p-RL-TK (30 ng/ jamka)
  - reagent P3000 (součást produktu Lipofectamin 3000) (0,6  $\mu$ l/ jamka)do zkumavky pro PXR gene reporter assay jsme přidali:
  - reportérový plasmid p3A4-luc (150 ng/ jamka)
  - expresní plasmid pSG5-PXR B (100 ng/ jamka)
  - expresní plasmid p-RL-TK (30 ng/ jamka)
  - reagent P3000 (0,6  $\mu$ l/ jamka)
6. Směsi plasmidů (krok 5) jsme přenesli do zkumavek s Lipofectaminem 3000 (krok 4). Jemně jsme promíchali pipetou a nechali inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
7. Po uplynutí inkubační doby jsme k HepG2 buňkám přidali příslušnou transfekční směs v objemu 30  $\mu$ l/ jamka.

8. Po 24 hodinách jsme si připravili v příslušných koncentracích roztoky testovaných látek a kontroly (modelový aktivátor PXR (rifampicin) a aktivátor CAR (CITCO)) v Opti-MEM mediu s 5 % FBS. Odsáli jsme staré médium a buňky jsme opláchli PBS (500  $\mu$ l/ jamka). Poté jsme buňky inkubovali s čerstvě připravenými roztoky testovaných látek (250  $\mu$ l/ jamka).
9. Po 24 hodinách jsme odsáli kultivační médium, opláchli jamky PBS (500  $\mu$ l/ jamka) a přidali pasivní lyzovací pufr (100  $\mu$ l/ jamka). Zamrazili jsme plata na několik hodin.
10. Během rozmražení kultivačních plat jsme si nachystali bílé 96jamkové plato pro detekci luminiscence. Do tohoto plata jsme napipetovali 40  $\mu$ l lyzátu z každé jamky kultivačního plata.
11. Do každé jamky jsme dále přidali 40  $\mu$ l substrátu světluškové luciferázy a změřili luminiscenci.
12. Následně jsme připravili Stop & Glo reagent (1 díl substrátu do 49 dílů pufru). Přidali jsme jej v objemu 30  $\mu$ l na jamku. Poté jsme detekovali luminiscenční aktivitu *renilla* luciferázy.
13. Data byla získána z 1 biologického měření provedeného v technických triplicátech. Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD (z angl. standard deviation, směrodatná odchylka) a normalizovány na hodnotu luminiscence *renilla* luciferázy.

#### 5.2.4. Two-hybrid assay

Postup experimentu vyžaduje expresi dvou fragmentů proteinu CAR v buňce. Expresní plasmid hCAR-N/GAL4 kóduje fúzní protein, který tvoří CAR šroubovice 1 (AMK 103–150) spolu s kvasinkovou DBD GAL4. Expresní plasmid hCAR-C/VP16 kóduje fúzní protein, který tvoří CAR šroubovice 3–12 (AMK 151–349) a aktivační doména VP16. Plasmidy jsou kotransfekovány spolu s reportérovým plasmidem nesoucím UAS vazebná místa (pGL4-UAS 9x). Vazba ligandu mění konformaci fragmentů CAR a vede k jejich vzájemné vazbě. Komplex se následně váže prostřednictvím DBD GAL4 k responsivní oblasti tvořené UAS vazebnými místy v reportérovém plasmidu (viz obr. 11). Míra

transkripce reportérového konstruktů vyjádřená luminiscenčním signálem umožňuje nepřímo monitorovat interakci testované látky s LBD CAR.



Obr. 11: Schematické znázornění principu two-hybrid assay.

*UAS (upstream activating sequence, sekvence v reportérovém plasmidu, kam se váže GAL4); hCAR-N/GAL4: CAR fragment s navázanou DBD GAL4; hCAR-C/VP16: CAR fragment s navázanou aktivační doménou VP16. Po navázání ligandu dojde ke spojení fragmentů, navázání DBD GAL4 na UAS, a to následně vede k zahájení transkripce reportérového genu.*

Postup:

1. HepG2 buňky jsme nasadili na 48jamková plata v koncentraci 110 000 buněk/ jamka.
2. Po 24 hodinách jsme buňky opláchli PBS (500  $\mu$ l/ jamka), přidali jsme 150  $\mu$ l DMEM (se suplementy) na jamku a následovala transfekce.
3. Připravili jsme si 2 zkumavky. Do obou jsme přidali Opti-MEM v objemu potřebném na definovaný počet jamek (15  $\mu$ l/ jamka).
4. Do jedné z nich jsme přidali Lipofectamin 3000 (0,45  $\mu$ l/ jamka).
5. Do druhé z nich jsme přidali plasmidy:
  - reportérový plasmid pGL4-UAS 9x (150 ng/ jamka)
  - expresní plasmid hCAR-N/GAL4 (100 ng/ jamka)
  - expresní plasmid hCAR-C/VP16 (100 ng/ jamka)
  - expresní plasmid p-RL-TK (30 ng/ jamka)
  - reagent P3000 (0,6  $\mu$ l/ jamka)

6. Směs plasmidů (krok 5) jsme přenesli do zkumavky s Lipofectaminem 3000 (krok 4). Jemně jsme promíchali pipetou a nechali inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
7. Po uplynutí inkubační doby jsme k HepG2 buňkám přidali příslušnou transfekční směs v objemu 30  $\mu\text{l}$ / jamka.
8. Po 24 hodinách jsme si připravili v příslušných koncentracích roztoky testovaných látek a kontrolu (aktivátor CAR (CITCO)) v Opti-MEM mediu s 5 % FBS. Odsáli jsme staré médium a buňky jsme opláchli PBS (500  $\mu\text{l}$ / jamka). Poté jsme buňky inkubovali s čerstvě připravenými roztoky testovaných látek (250  $\mu\text{l}$ / jamka).
9. Po 24 hodinách jsme odsáli kultivační médium, opláchli jamky PBS (500  $\mu\text{l}$ / jamka) a přidali pasivní lyzovací pufr (100  $\mu\text{l}$ / jamka). Zamrazili jsme plata na několik hodin.
10. Během rozmražení kultivačních plat jsme si nachystali bílé 96jamkové plato pro detekci luminiscence. Do tohoto plata jsme napipetovali 40  $\mu\text{l}$  lyzátu z každé jamky kultivačního plata.
11. Do každé jamky jsme dále přidali 40  $\mu\text{l}$  substrátu světluškové luciferázy a změřili luminiscenci.
12. Následně jsme připravili Stop & Glo reagent (1 díl substrátu do 49 dílů pufru). Přidali jsme jej v objemu 30  $\mu\text{l}$  na jamku. Poté jsme detekovali luminiscenční aktivitu *renilla* luciferázy.
13. Data byla získána z 1 biologického měření provedeného v technických triplikátech. Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD (z angl. standard deviation, směrodatná odchylka) a normalizovány na hodnotu luminiscence *renilla* luciferázy.

### 5.3. Statistická analýza

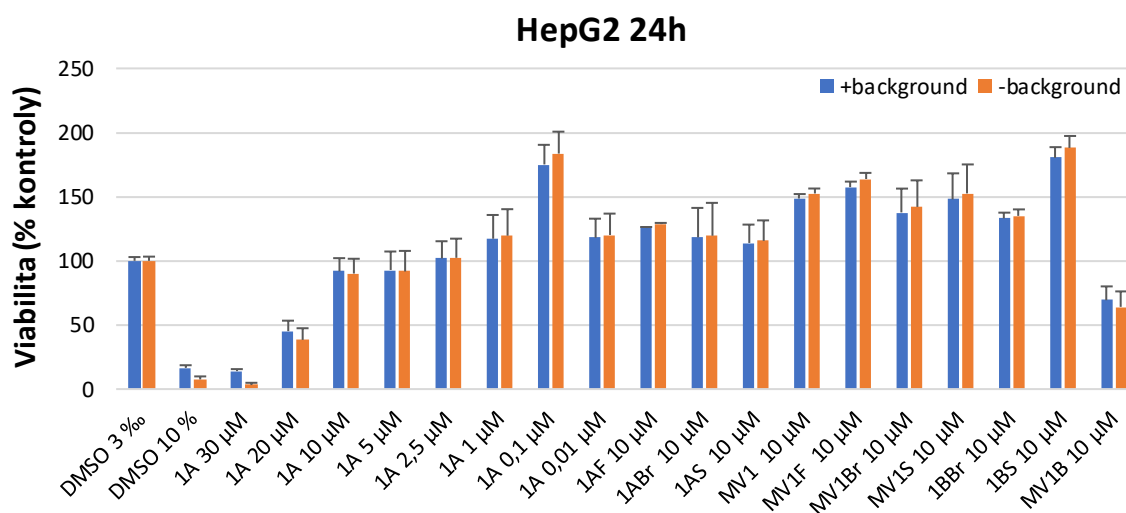
Závislost buněčné viability na koncentraci látky byla popsána nelineární regresní analýzou a vypočítána hodnota  $IC_{50}$ . Rozdíly ve skupinách byly porovnány pomocí Studentova nepárového t-testu. Při testování více skupin byla aplikována jednosměrná analýza ANOVA (analýza rozptylu, z angl. analysis of variance) s použitím Dunnettova post-hoc testu (statistické porovnání vzorků exponovaných testovaným látkám vůči DMSO kontrole). Všechny statistické analýzy byly realizovány s použitím GraphPad

Prism softwaru (verze 9.3.1., La Jolla, California, USA). Hodnota  $P < 0,05$  byla považována za statisticky významný výsledek.

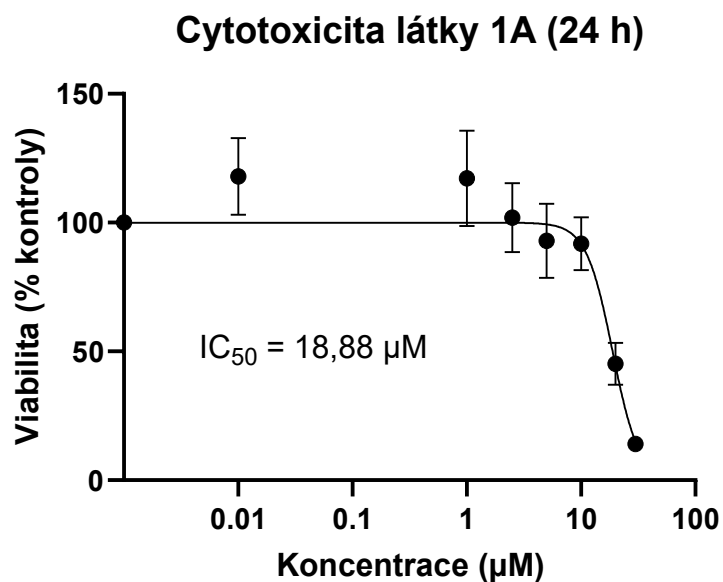
## 6. Výsledky

### 6.1. Výsledky testů cytotoxicity

Buňky HepG2 byly exponovány testovaným látkám v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci. Testovanou látku 1A, která má z dřívější pilotní studie popsanou nejlepší afinitu ke CAR, jsme analyzovali v širším rozmezí koncentrací, tj. 30; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,1 a 0,01  $\mu\text{M}$ . Délka testování byla stanovena na 24 h. Výsledky na obr. 12 naznačují minimální cytotoxicitu testovaných látek na koncentrační hladině 10  $\mu\text{M}$ . Výjimku představuje látka MV1B (64,1 % viability kontroly). Pozadí reakce (např. barevnost látek) prakticky neinterferuje s měřením absorbance při 490 nm, neboť naměřené hodnoty s a bez pozadí jsou prakticky totožné u všech látek. Toxická koncentrace DMSO (10 %) byla detekovatelná použitou metodou. U látky 1A jsme dále samostatně vynesli závislost buněčné viability na koncentraci látky a popsali nelineární regresní analýzou (obr. 13, koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$  nebyla zahrnuta do analýzy). Kalkulovaná hodnota  $\text{IC}_{50}$  dosahuje hodnoty 18,88  $\mu\text{M}$ .



Obr. 12: Graf znázorňující viabilitu buněk po expozici testovanými látkami. Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm\text{SD}$  a vyneseny jako relativní % změny buněčné viability v porovnání s kontrolou (DMSO 3 ‰, definováno jako 100 %). Data jsou prezentována s odečtením a bez odečtení backgroundu (pozadí).



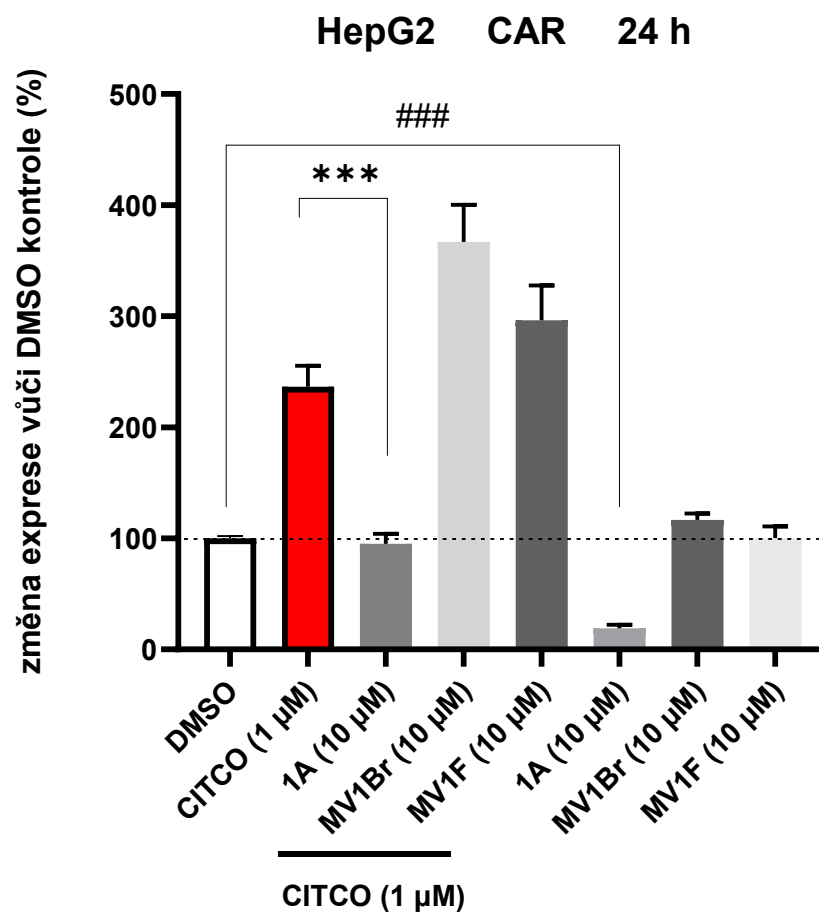
Obr. 13: Cytotoxicita látky 1A po 24 hodinách v HepG2 buňkách. Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD a vyneseny jako relativní % změny buněčné viability v porovnání s kontrolou (DMSO 3 %, definováno jako 100 %). Data jsou analyzována nelineární regresí. Závislost má semilogaritmické zobrazení (osa x je logaritmická).  $IC_{50}$  je hodnota odpovídající koncentraci látky 1A, která sníží viabilitu buněk o 50 %.

## 6.2. Vyhodnocení vlivu testovaných látek na aktivitu CAR a PXR pomocí metody gene reporter assay

### 6.2.1. Vliv látek na aktivitu CAR

Do další analýzy byly zahrnuty látky 1A, MV1Br a MV1F (10 µM). Látka CITCO (1 µM) byla použita jako modelový agonista CAR. Genová reportérová studie, která využívá expresní vektor pro CAR a reportérový plasmid s CAR responsivním promotorem, ukazuje, že látka 1A dokáže statisticky signifikantně snížit jak bazální, tak indukovanou aktivitu CAR. Další testované látky nevykazovaly podobný efekt (obr. 14).

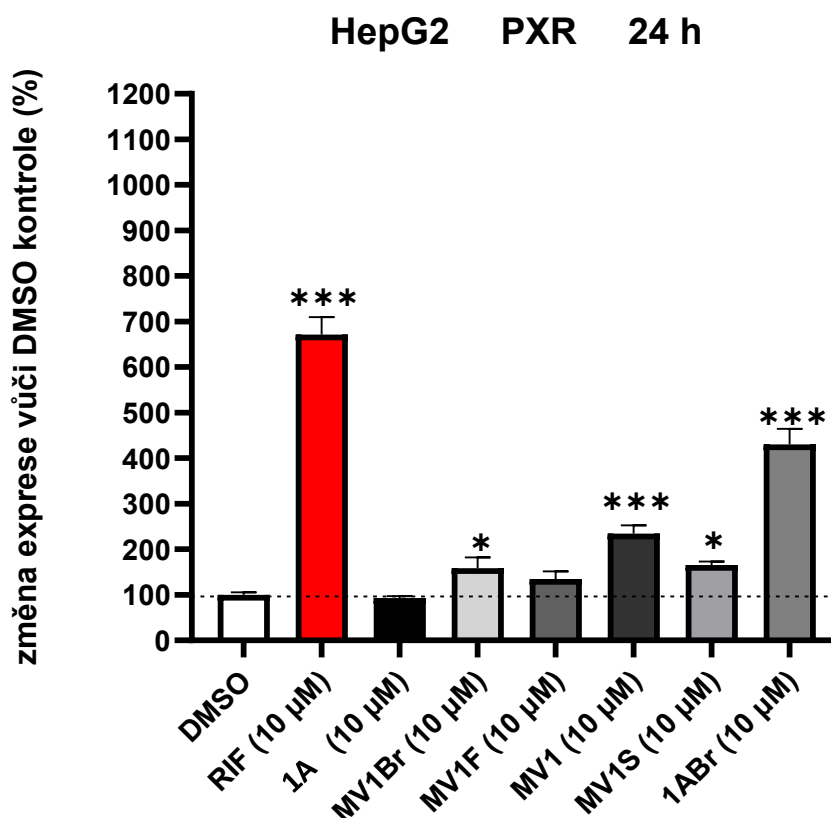




Obr. 14: Změna aktivity CAR v gene reporter assay po expozici k testovaným látkám (24 h). Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD a vyneseny jako relativní % změny aktivity vůči DMSO (definováno jako 100 %). Rozdíly ve skupinách byly porovnány pomocí Studentova nepárového t-testu. \*\*\* a ###  $P < 0,001$ .

### 6.2.2. Vliv látek na aktivitu PXR

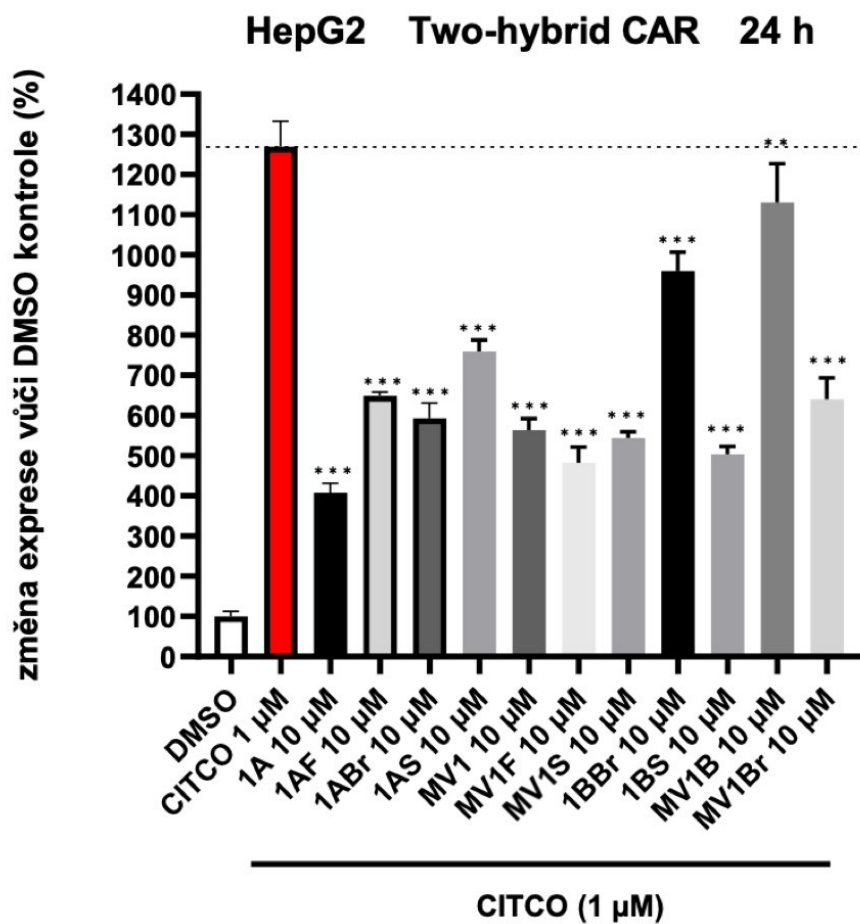
Jelikož je naší snahou najít selektivního antagonistu CAR, testovali jsme potenciální nežádoucí vliv vybraných látek na aktivitu příbuzného receptoru PXR. V následující analýze byly testovány látky 1A, MV1Br, MV1F, MV1, MV1S a 1ABr (10 µM). Látka rifampicin (RIF, 10 µM) byla použita jako modelový agonista PXR. Genová reportérová studie, která využívá expresní vektor pro PXR a reportérový plasmid s PXR responsivním promotorem, ukazuje, že látka 1A neovlivňuje aktivitu PXR. Podobný výsledek dosahuje i látka MV1F. U dalších testovaných látek při koncentraci 10 µM vidíme afinitu k PXR (obr. 15).



Obr. 15: Změna aktivity PXR v gene reporter assay po expozici k testovaným látkám (24 h). Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD a vyneseny jako relativní % změny aktivity vůči DMSO (definováno jako 100 %). Statistické porovnání vzorků exponovaných testovaným látkám vůči DMSO kontrole bylo provedeno pomocí jednosměrné analýzy ANOVA s použitím Dunnettova post-hoc testu (\*\*\*  $P < 0,001$ , \*  $< 0,05$ ).

### 6.3. Vyhodnocení afinity testovaných látek k receptoru CAR pomocí metody two-hybrid assay

Dalším experimentálním krokem bylo ověřit afinitu testovaných látek k receptoru CAR v two-hybrid assay. Všechny testované látky byly studovány při koncentraci 10  $\mu$ M a HepG2 buňky byly exponovány po dobu 24 h. Opět jsme použili CITCO (1  $\mu$ M), modelový ligand CAR. V souladu s očekáváním CITCO aktivovalo funkci CAR (téměř 13krát). Můžeme dále konstatovat, že ve všech případech, kde jsme spolu s CITCO použili jednu z testovaných látek, je exprese reportérového genu nižší (viz obr. 16). Kompetice látek o vazebné místo CAR tak naznačuje jejich afinitu k receptoru. Výsledky dále ukazují, že látka 1A má jednu z nejsilnějších afinit mezi testovanými látkami (pokles aktivity CAR z téměř 13násobného zvýšení na 4násobné).



Obr. 16: Změna aktivity CAR v two-hybrid assay po expozici k testovaným látkám (24 h). Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD a vyneseny jako relativní % změny aktivity vůči DMSO (definováno jako 100 %). Statistické porovnání vzorků exponovaných testovaným látkám vůči CITCO (1  $\mu$ M) bylo provedeno pomocí jednosměrné analýzy ANOVA s použitím Dunnettova post-hoc testu (\*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $< 0,01$ ).

## 7. Diskuze

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) a pregnanový X receptor (PXR) jsou jedny z hlavních transkripčních faktorů regulující enzymy, které metabolizují xenobiotika a endogenní látky. Oba se podílí na udržování vnitřního prostředí. Mají společné funkce a podobnost struktury. V současné době však není prakticky k dispozici selektivní, vysoce potentní a netoxický inhibitor CAR (Brožová et al., 2023, Cherian et al., 2018, Wang et al., 2012).

V rámci předkládané replikační studie jsme určili afinitu látek, dříve identifikovaných v naší skupině, s antagonistickou aktivitou vůči CAR, abychom pomohli s identifikací nových malých molekul, které by umožnily studovat unikátní funkce CAR bez současného ovlivnění PXR.

Vyhodnocením screeningového testu cytotoxicity jsme určili, že látky v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  nepůsobí na HepG2 buňky toxicky (s výjimkou látky MV1B) (obr. 12). U látky 1A jsme testovali více koncentrací a určili  $\text{IC}_{50}$  (= 18,88  $\mu\text{M}$ ) (obr. 13). Netoxický charakter látek při zvolené koncentraci je dobrý předpoklad pro jejich další testování v reportérových studiích. Limitem testu je použití nádorové linie, která obecně vykazuje nižší prediktivní schopnost cytotoxicity. Budoucí studie by se měly zaměřit na analýzu viability v pokročilém *in vitro* modelu, např. primárních lidských hepatocytech. Dále by měly rozšířit paletu testů o další markery buněčné viability.

U metody gene reporter assay jsme sledovali míru aktivace či represe CAR. Design studie se zaměřil na tři látky. Konkrétně šlo o látky 1A, MV1Br, MV1F. Ty byly testovány jak samostatně, tak v kombinaci s agonistou CITCO, abychom případně prokázali schopnost látky tlumit aktivaci tímto modelovým agonistou. Látka 1A úspěšně snížila jak bazální aktivitu, tak aktivitu vyvolanou CITCO (viz obr. 14). Efekt je významný a předurčuje látku k dalšímu testování. Vzhledem k tomu, že se CAR a PXR zastupují ve svých funkcích, bylo pro naše snažení klíčové identifikovat látku, která nebude ovlivňovat PXR.

Slibným zjištěním bylo, že látka 1A nevykazuje aktivaci PXR (obr. 15). Podobně se zachovala i látka MV1F. Jak bylo uvedeno, PXR má vysokou afinitu ke xenobiotikům, působí jako obecný xenosensor (Ma et al., 2008). Identifikace látek, které ovlivňují CAR, ale nezasahují do PXR, nejsou čtené.

K verifikaci afinity látek ke CAR jsme přistoupili za použití metody two-hybrid assay. Rozšířili jsme skupinu testovaných látek (obr. 16). Ty velmi efektivně kompetovaly s CITCO o CAR. Látka 1A vykazovala vysokou afinitu v testované skupině.

Při srovnání výsledků two-hybrid assay a gene reporter pro látky MV1F, MV1Br a 1A můžeme vidět, že látka 1A v obou těchto metodách velmi signifikantně snížila aktivitu CAR. Látky MV1F a MV1Br mohly antagonizovat CAR v two-hybrid assay, ale ne v gene reporter assay. Data ukazují důležitost komplementárních metod, které jsou založené na jiném mechanismu. MV1Br navíc ovlivnila funkci PXR, což není pro dosažení našich cílů žádoucí.

Budoucím krokem v projektu musí být testování látek k dalším potenciálním cílům (NR) a následné potvrzení selektivity látek ke CAR. Dále bude třeba ověřit efekt látky v pokročilejším *in vitro* modelu (např. primárních lidských hepatocytech). Látka 1A má zatím nejlepší profil vlastností a mohla by se stát prekurzorem pro další syntézu CAR antagonistů s cílovými vlastnostmi.

## **8. Závěr**

Závěrem této diplomové práce je, že se nám podařilo potvrdit antagonistu CAR, látku 1A, která nepůsobí aktivačně na PXR. Výsledky práce mohou pomoci identifikovat malé molekuly, které umožní studovat unikátní funkce CAR bez současného ovlivnění aktivity PXR.

## 9. Reference

1. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(23) doi: 10.3390/ijms222313135
2. Abramowicz A, Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of Applied Genetics* 2018;59(3):253–268 doi: 10.1007/s13353-018-0444-7
3. Brewer CT, Chen T. PXR variants: the impact on drug metabolism and therapeutic responses. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2016;6(5):441–9 doi: 10.1016/j.apsb.2016.07.002
4. Brožová ZR et al. 2-Substituted quinazolines: Partial agonistic and antagonistic ligands of the constitutive androstane receptor (CAR). *European Journal of Medicinal Chemistry* 2023;259 doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115631
5. Buchman CD, Chai SC, Chen T. A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2018;14(6):635–647 doi: 10.1080/17425255.2018.1476488
6. Burris TP et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology CXIII: Nuclear Receptor Superfamily – Update 2023. *Pharmacological Reviews* 2023;75(6):1233–1318 doi: 10.1124/pharmrev.121.000436
7. Carazo Fernández A, Smutný T, Hyrsová L, Berka K, Pavek, P. Chrysin, baicalein and galangin are indirect activators of the human constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology letters* 2015;233(2):68–77 doi: 10.1016/j.toxlet.2015.01.013

8. de Vera IMS. Advances in Orphan Nuclear Receptor Pharmacology: A New Era in Drug Discovery. ACS Pharmacology and Translational Science 2018;1(2):134–137 doi: 10.1021/acsptsci.8b00029
9. Desta Z et al. PharmVar GeneFocus: CYP2B6. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2021;110(1):82–97 doi: 10.1002/cpt.2166
10. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. Molecular Aspects of Medicine 2009;30(5):297–343 doi: 10.1016/j.mam.2009.04.002
11. Dostálek et al. Farmakokinetika. 1. vydání. Praha: Grada, 2006:220.
12. Dring AM, Anderson LE, Qamar S, Stoner MA (2010). Rational quantitative structure-activity relationship (RQSAR) screen for PXR and CAR isoform-specific nuclear receptor ligands. Chemico-Biological Interactions, 2010;188(3): 512–525. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.018
13. Font-Díaz J et al. Nuclear receptors: Lipid and hormone sensors with essential roles in the control of cancer development. Seminars in Cancer Biology. 2021;73:58–75 doi: 10.1016/j.semcancer.2020.12.007
14. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves in sulin sensitivity. Journal of Biological Chemistry. 2009;284(38):25984–25992 doi: 10.1074/jbc.M109.016808
15. Hernandez J, Mota L, Baldwin W. Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2012;7(2):81–105 doi: 10.2174/187569209788654005



16. Chang TKH. Activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines. *AAPS Journal*. 2009;11(3):590–601 doi: 10.1208/s12248-009-9135-y
17. Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical Pharmacology*. 2012;83(8):1112-1126 doi:10.1016/j.bcp.2012.01.030
18. Cherian MT. CINPA1 binds directly to constitutive androstane receptor and inhibits its activity. *Biochemical Pharmacology*. 2018;152:211–223 doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.029
19. Cherian MT, Lin W, Wu J, Chen T. CINPA1 Is an Inhibitor of Constitutive Androstane Receptor That Does Not Activate Pregnane X Receptor. *Molecular Pharmacology*. 2015;87(5): 878-889 doi: <https://doi.org/10.1124/mol.115.097782>
20. Ito-Harashima S, Yagi T. Reporter gene assays for screening and identification of novel molting hormone-and juvenile hormone-like chemicals. *Journal of Pesticide Science*. 2021;46(1):29–42 doi: 10.1584/jpestics.D20-079
21. Jeske J, Windshügel B, Thasler WE, Schwab M, Burk O. Human pregnane X receptor is activated by dibenzazepine carbamate-based inhibitors of constitutive androstane receptor. *Molecular toxicology*. 2017;91:2375–2390 doi: 10.1007/s00204-017-1948-3
22. Kousalová L, Baranová J, Anzenbacher P. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450-Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003;17:151–157

23. Küblbeck J, Niskanen J, Honkakoski P. Metabolism-Disrupting Chemicals and the Constitutive Androstane Receptor CAR. *Cells*. 2020;9(10) doi: 10.3390/cells9102306
24. Lamba JK et al. Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;311(2):811–821 doi: 10.1124/jpet.104.069310
25. Lin W et al. CITCO directly binds to and activates human pregnane X receptor. *Molecular Pharmacology* 2020;97(3):180–190 doi:10.1124/mol.119.118513
26. Lv Y, Luo YY, Ren HW, Li CJ, Xiang ZX, Luan ZL. The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13 doi:10.3389/fendo.2022.959902
27. Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ. The pregnane X receptor: From bench to bedside. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2008;4(7):895–908 doi: 10.1517/17425255.4.7.895
28. Mackowiak B, Wang H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016;1859(9):1130–1140. doi: 10.1016/j.bbagrm.2016.02.006
29. Machalz D, Pach S, Bermudez M, Bureik M, Wolber G. Structural insights into understudied human cytochrome P450 enzymes. *Drug Discovery Today*. 2021;26(10):2456–2464. doi: 10.1016/j.drudis.2021.06.006
30. Mejdrová I et al. Discovery of Novel Human Constitutive Androstane Receptor Agonists with the Imidazo[1,2-a]pyridine Structure. *Journal*

of Medicinal Chemistry. 2023;66(4),2422–2456 doi:  
10.1021/acs.jmedchem.2c01140

31. Minchin S, Lodge J. Understanding biochemistry: Structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry*. 2019;63(4):433–456 doi: 10.1042/EBC20180038
32. Molnár F, Küblbeck J, Jyrkkärinne J, Prantner V, Honkakoski P. An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metabol Drug Interact*. 2013;28(2):79–93 doi: 10.1515/dmdi-2013-0009
33. Mukha A, Kalkhoven E, van Mil SWC. Splice variants of metabolic nuclear receptors: Relevance for metabolic disease and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2021;1867(10) doi:10.1016/j.bbadis.2021.166183
34. Nishimura M, Naito S, Yokoi T. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2004;19(2):135–49
35. Nobakht SZ, Akaberi M, Mohammadpour AH, Moghadam AT, Emami SA. *Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2022;26(9):1045–1058 doi: 10.22038/IJBMS.2022.65112.14338
36. Oliviero F et al. (2020). Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor. *In Cells*. 2020;9(11) doi:10.3390/cells9112426
37. Papageorgiou L et al. An updated evolutionary study of the nuclear receptor protein family. *World Academy of Sciences Journal*. 2021;3(6) doi:10.3892/WASJ.2021.122

38. Pavek 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(456) doi:10.3389/fphar.2016.00456
39. Pavek P et al. Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Biochemical Pharmacology*. 2010;79(2):277–287 doi: 10.1016/j.bcp.2009.08.017
40. Singh P, Ahi EP. The importance of alternative splicing in adaptive evolution. *Molecular ecology*. 2022;31(7):1928–1938 doi:10.1111/mec.16377
41. Skálová et al. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, 2017:172
42. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: Decoding metabolic disease. *FEBS Letters*. 2008; 582(1): 2–9 doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.016
43. Švihovec et al. *Farmakologie*. 1. vydání. Praha:Grada, 2018:1008
44. 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. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6) doi: 10.3390/ijms19061785
45. Wang Y et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*. 2015; 3(2): 152–8 doi: 10.3892/br.2014.407
46. Wang YM, Ong SS, Chai SC, Chen T. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opinion on Drug*

Metabolism and Toxicology. 2012;8(7):803–817  
doi:10.1517/17425255.2012.685237

47. Werk AN a Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2014;96(3):340–8 doi: 10.1038/clpt.2014.129
48. Xiao L, Wang J, Jiang M, Xie W, Zhai Y. The Emerging Role of Constitutive Androstane Receptor and Its Cross talk with Liver X Receptors and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor A in Lipid Metabolism. *Vitamins and Hormones*. 2013;91:243–258 doi:10.1016/B978-0-12-407766-9.00010-9
49. Zhao M et al. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23) doi: 10.3390/ijms222312808

## **Internetové zdroje:**

### Web 1

Susa ST, Hussain A, Preuss CV. Drug Metabolism. StatPearls. 2023

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442023/>

Přístup: 15.2. 2024

### Web 2

Culture Collections: ECACC General cell collection: HepG2. UK Health Security Agency. Dostupné z: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/hep-g2>

Přístup: 27.1.2024

### Web 3

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay: Technical bulletin. Promega. 2023. Dostupné z: [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?rev=d82fc3dda1554b26b9c253acae903164&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?rev=d82fc3dda1554b26b9c253acae903164&sc_lang=en)

Přístup: 7.11. 2023

### Web 4

Transfection: Protocol for transfection and information on optimization. Promega. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/transfection/>

Přístup: 5.12. 2023

### Web 5

Dual-Luciferase® Reporter Assay System: Technical manual. Promega. 2023. Dostupné z: [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?rev=766125b44a18445cbde88f3262864617&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?rev=766125b44a18445cbde88f3262864617&sc_lang=en)

Přístup: 10.11. 2023