UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

TESTOVÁNÍ INTERAKCE NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH LÁTEK S KONSTITUTIVNÍM ANDROSTANOVÝM RECEPTOREM

Diplomová práce

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

Hradec Králové, 2012

Jitka Lágnerová

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.

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a poskytnutí odborných materiálů. Mé díky patří i PharmDr. Marcelu Špulákovi, PhD. za syntézu testovaných látek a PharmDr. Ingrid Némethové za korekci textu a přátelskou podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Jitka Lágnerová
Školitel: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.
Název diplomové práce: **Testování interakce nově syntetizovaných látek s konstitutivním androstanovým receptorem**

Nukleární receptory jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které regulují expresi genů zapojených do široké škály biologických procesů.

Pregnanový X receptor (PXR) a konsitutivní androstanový receptor (CAR) jsou členové sirotčí podrodiny nukleárních receptorů, které byly původně definované jako xenobiotické senzory regulující expresi enzymů metabolizující léčiva s cílem ochránit organismus před toxickými sloučeninami.

Změna ve funkci CAR může ovlivnit nejen farmakokinetiku, účinnost a toxicitu léčiv, ale i endokrinní homeostázu, energetický metabolismus a buněčnou proliferaci.

Cílem této experimentální diplomové práce bylo prověření interakce nově syntetizovaných látek s lidským CAR. Pomocí metody gene reporter assay a two-hybrid assay jsme otestovali na buněčných kulturách HepG2 a LS174T celkem 40 látek v různých koncentracích.

Jako přímé ligandy hCAR s výraznou transkripční aktivitou jsme označili dvě látky, a sice 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol resp. -ol působící v koncentraci 10 μM.

Výsledky této práce v budoucnu mohou vést k nalezení dalších specifických ligandů, k identifikaci chemické struktury zodpovědné za tento účinek a k definitivnímu pochopení funkce receptoru CAR v lidském organismu.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Jitka Lágnerová
Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.
Title of diploma thesis: **Interactions of new compounds with constitutive androstane receptor**

Nuclear receptors (NRs) are ligand-activated transcription factors that regulate the expression of genes involved in a broad range of biological processes.

Pregnan X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) are members of the orphan NR subfamily, that were originally defined as xenobiotic sensors regulating the expression of drug-metabolizing enzymes in order to protect the body from toxic chemicals.

Alteration in CAR function may impact not only pharmacokinetics, efficacy, and toxicity of drugs but also endocrine homeostasis, energy metabolism, and cell proliferation.

The aim of this study was to verified interactions of newly synthesized compounds with human CAR. Using the methods of gene-reporter assay and two-hybrid assay we tested 40 agents in various concentrations in HepG2 and LS174T cell lines.

As the direct ligands of hCAR with significant transcriptional activity we have identified two substances, namely 2 - (3-methoxyphenyl)quinazoline-4-thiol, resp. -ol used in concentration of 10 μM.

In the future, the results of this study may lead to finding other specific ligands, to identify the chemical structure responsible for this effect, and finally understanding the function of CAR receptor in the human organism.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK 7

2. ÚVOD 10

3. TEORETICKÁ ČÁST 11

3. 1 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK 11

3.1.1 Biotransformační enzymy I. a II. fáze 12

3. 2 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY 16

3.2.1 Struktura nukleárních receptorů 17

3.3 XENOBIOTICKÉ RECEPTORY 19

3.3.1 Aktivace nukleárních receptorů PXR a CAR 20

3.3.2 Pregnanový X receptor 22

3.3.3 Konstitutivní androstanový receptor 24

3.4 CAR V REGULACI ENERGETICKÉHO METABOLISMU 31

3.4.1 Regulace glukoneogeneze 31

3.4.2 Regulace syntézy cholesterolu 34

4. CÍL PRÁCE 36

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 37

5.1 REAGENCIE 37

5.2 BUNĚČNÉ LINIE A JEJICH KULTIVACE 38

5.2.1 Buněčná linie HepG2 38

5.2.2 Buněčná linie LS174T 38

5.2.3 Kultivace buněčných linií 39

5.3 TESTOVANÉ LÁTKY A JEJICH KONCENTRACE 40

5.4 METODA GENE REPORTER ASSAY 46

5.4.1 Princip metody gene reporter assay 46

5.4.2 Pracovní postup metody gene reporter assay 49

5.5 METODA TWO-HYBRID ASSAY 50

5.5.1 Princip metody two-hybrid assay 50

5.5.2 Pracovní postup metody two-hybrid assay 53

6. VÝSLEDKY 55

6.1 METODA GENE REPORTER ASSAY 55

6.2 METODA TWO-HYBRID ASSAY 57

7. DISKUSE 60

8. ZÁVĚR 63

9. LITERATURA 64

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette, ABC transportéry
AD	aktivační doména
AF1	aktivační funkce 1
AF2	aktivační funkce 2
AR	androgenní receptor
BD	DNA vázající doména v metodě two-hybrid assay
BME	Basal Medium Eagle – komerční označení média
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCRP	cytosolový CAR retenční protein
cDNA	komplementární DNA k mRNA vláknu
CITCO	6-(4-chloropheny)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4--dichlorobenzyl) oxim
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CREBP	protein vázající se na cAMP responzivní elementy
CYP450	cytochrom P450
DBD	DNA vázající doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium – komerční označení média
DMSO	dimethylsulfoxid
DRn	direct repeats; sekvence v přímém opakování za sebou
EC50	koncentrace látky, při které je dosaženo 50% maximálního účinku
ECCAC	Evropská databáze buněčných kultur
ER	estrogenní receptor
ERn	everted repeats; sekvence opakující se ve směru proti sobě
FBS	fetální bovinní sérum
FoxO1	„forkhead“ transkripční faktor O1
FXR	farnesoid X receptor
G6Páza	glukosa-6-fosfatáza
GR	glukokortikoidní receptor

GST	glutathion-S-transferáza
H1	histon 1
HAT	histonacetyltransferáza
hCAR	humánní forma CAR
HMGCoA	hydroxymethylglutaryl-koenzym A
hPXR	humánní forma PXR
HSP90	heat shock protein 90, protein teplotního šoku 90
HRE	hormonální responsivní element
INSIG	protein genu indukovaného insulinem
IRn	inverted repeats, sekvence opakující se ve směru od sebe
IRS	sekvence odpovídající na inzulin
LBD	ligand vázající doména
LXR	liver X receptor, jaterní X receptor
mCAR	myší forma CAR
MDR	multidrug rezistance, resistence na léčbu
MMS	mikrozomální monooxigenázový systém
mPXR	myší forma PXR
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	messenger RNA
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2, protein spojený s resistencí na léčbu
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAT	N-acetyltransferáza
NEAA	neesenciální aminokyseliny
NF1	nukleární faktor 1
NR	nukleární receptor(y)
PAR	pregnanem aktivovaný receptor
PB	fenobarbital
PBREM	phenobarbital responsive enhancer modul, zesilující oblast odpovídající na fenobarbital
PBS	phosphate buffered saline; fosfátový pufr s 0,15M koncentrací NaCl

PCN	pregnenolon-16α-karbonitril
PEPCK1	fosfoenolpyruvát-karboxykináza 1
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKB	proteinkináza B
PP2A	proteinová fosfatáza 2A
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PR	progesteronový receptor
PXR	pregnanový X receptor
RE	responzivní elementy
RXRα	retinoidní X receptor α
SCAP	SREBP cleavage-activating protein, protein aktivující štěpení SREBP
SREBP	sterol regulatory element binding protein, protein vázající se na regulační oblasti sterolů
SULT	sulfotransferáza
SXR	steroidní a xenobiotický receptor
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
ThR	receptor thyroidního hormonu
TPMT	thiopurin-S-methyltransferáza
UASG	upstream activation sequence of GAL
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
VDR	vitamin D receptor
XRE	xenobiotický responzivní element
XREM	xenobiotic responsive enhancer modul, zesilující oblast odpovídající na xenobiotika

2. ÚVOD

V průběhu evoluce si každý organismus vyvinul komplexní obranný systém proti akumulaci xenobiotik a potencionálně toxických endogenních metabolitů. Zatímco mnohé z hydrofilních sloučenin jsou přímo eliminované transportními proteiny, lipofilní sloučeniny podstupují enzymatický proces biotransformace (Gao a Xie 2010).

Enzymy a transportní proteiny zahrnuté do tohoto obranného systému jsou zpravidla indukované svým substrátem a na buněčné úrovni tato skutečnost probíhá mechanismem regulace exprese jejich genů transkripčními faktory (Gao a Xie 2010).

Nukleární receptory zahrnují velkou rodinu transkripčních faktorů aktivovaných ligandem, které kontrolují vývoj, reprodukci, energetickou homeostázu a další biologické procesy (Konno et al 2008).

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) a pregnanový X receptor (PXR) jsou v první řadě exprimovány v játrech a definovány jako nukleární receptory citlivé na xenobiotika. Na základě vystavení těmto sloučeninám, CAR a PXR aktivují transkripci cílových genů, které kódují různé enzymy a proteiny zapojené do metabolismu léků a exkrece (Konno et al. 2008).

Současné poznatky naznačují, že PXR a CAR mají stejně důležité endobiotické úlohy v energetickém metabolismu, kde ovlivňují metabolismus mastných kyselin, lipidů a glukosy (Wada et al 2009).

Ve výzkumných projektech zaměřených na objasnění role CAR v lidském organismu, se jako experimentální ligand využívá jediná sloučenina, CITCO. Zbylé ligandy vykazují příliš nízkou afinitu k receptoru a tedy podstatně menší specifitu v účinku.

Mnoho vědeckých pracovníků usiluje o nalezení specifického ligandu, s vysokou afinitou, který by již v nízkých nanomolárních koncentracích aktivoval lidský CAR, a umožnil tak přesně definovat jeho funkci.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3. 1 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Buněčná membrána vytváří efektivní bariéru, která chrání buňku před toxickými, ve vodě rozpustnými látkami. Lipofilní substance tuto bariéru překonávají mnohem snadněji, čímž hrozí riziko buněčné akumulace a tvorby toxických hladin těchto látek. Proto, aby chránili sami sebe před touto hrozbou, museli biologické organismy vyvinout systémy, které jsou schopné této akumulaci zabránit (Handschin a Meyer 2003).

Do lidského těla vstupují z okolí různé cizorodé látky neboli xenobiotika (řec. *xénos* = cizí). Označují se tak látky, které se v organismu normálně nevyskytují a nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj a ani pro něj neslouží jako zdroj energie. Jen výjimečně se xenobiotika v těle nemění, naprostá většina z nich podléhá změnám označovaných jako biotransformace (Knejzlík et al. 2000, Ledvina 2004).

Biotransformace xenobiotik je základním mechanismem pro udržení homeostázy organismu během expozice cizorodým látkám (např. léčivům, doplňkům stravy, chemikáliím, enviromentálním polutantům aj.) (Parkinson 2001).

Přeměny cizorodých látek jsou v živých organismech zprostředkovány enzymy, které vykazují širokou substrátovou specificitu. Tyto enzymy mají svoji nezastupitelnou úlohu nejen v biotransformaci xenobiotik, ale také v metabolismu endobiotik např. vitamínů, žlučových kyselin, eikosanoidů, mastných kyselin nebo steroidních hormonů (Parkinson 2001).

Biotransformační enzymy se vyznačují širokou tkáňovou distribucí. Svoji funkci plní především v játrech, ale jejich metabolická aktivita je důležitá i v dalších orgánech jako jsou plíce, ledviny, kůže, slinivka, nosní sliznice, srdce, mozek, varlata, vaječníky, placenta, ale také krevní buňky a trávicí trakt (Parkinson 2001).

Subcelulární lokalizace enzymů je různá - jsou ve všech součástech buňky s výjimkou buněčného jádra. Nejvyšší výskyt byl zaznamenán v membránách hladkého endoplazmatického retikula (v mikrozómech), hojné jsou také v cytosolu

a mitochondriích. Hydrolytické enzymy jsou obsaženy v lysozómech a uplatňují se hlavně na fagocytovaných cizích nerozpustných částicích (Ledvina 2004).

Biotransformační reakce lze rozdělit do dvou fází, přičemž není nezbytné, aby xenobiotikum prošlo oběma fázemi. Reakce I. fáze biotransformace vedou k zvýšení polarity látky a to připojením nebo odhalením funkčních skupin (-OH, -NH_2, -SH, -COOH). Převážná část reakcí je oxidoredukční povahy, mohou se uplatnit též hydrolytické reakce, jimiž se větší molekula štěpí na menší fragmenty. Jestliže je vzniklý metabolit dostatečně polární, může být vyloučen ledvinami, málo polární produkty vstupují do fáze II (Ledvina 2004).

V průběhu druhé tzv. konjugační fáze reagují funkční skupiny metabolitů s malými molekulami endogenního původu (např. s uridindifosfát-glukuronovou kyselinou, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem, glutathionem, acetylkoenzymem A, S-adenosylmethioninem nebo aminokyselinami). Cílem konjugace je odstranit lipofilní vlastnosti modifikovaného xenobiotika a usnadnit exkreci z těla, obvykle močí a žlučí, nebo změnit jeho aktivitu (Ledvina 2004).

Biotransformace xenobiotik vede ve většině případů k farmakologické inaktivaci parentní látky a k vytvoření metabolitů, které jsou následně vyloučeny z těla. Nicméně, biotransformace může též aktivovat tzv. proléčiva na farmakologicky aktivní produkty, nebo dokonce toxické metabolity. Např. netoxické prokancerogeny mohou být aktivovány v potenciální kancerogeny, jako sám o sobě neškodný benzpyren a některé další polycyklické aromatické uhlovodíky nabývají až v těle kancerogenní vlastnosti. Není tedy možné ztotožňovat biotransformaci s detoxifikací (Handschin a Meyer 2003, Ledvina 2004).

3.1.1 BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY I. A II. FÁZE

V I. fázi biotransformace převažují oxidační reakce, podstatně menší význam má redukce a hydrolýza. Přestože se na první fází metabolismu xenobiotik podílejí různé enzymatické systémy (Tab. 1), pravděpodobně nejpozoruhodnější dráhou v tomto schématu představuje mikrozomální monooxigenázový systém (MMS), jehož hlavní složkou je cytochrom P450 (CYP450) (Omiecinski et al. 2011).

Tab. 1 Přehled biotransformačních enzymů I. fáze

OXIDACE	REDUKCE	HYDROLÝZA
Alkoholdehydrogenáza	Azo- a nitroredukce	Esterázy
Aldehyddehydrogenáza	Redukce karbonylu	Peptidázy
Aldehydoxidáza, Xantinoxidáza	Redukce disulfidu	Epoxidhydrolázy
Monoaminoxidáza, Diaminoxidáza	Redukce sulfoxidu	
Prostaglandin H syntháza	Redukce chinonu	
Polyaminoxidáza	Redukční dehalogenace	
Flavinové monooxygenázy		
Cytochromy P450		

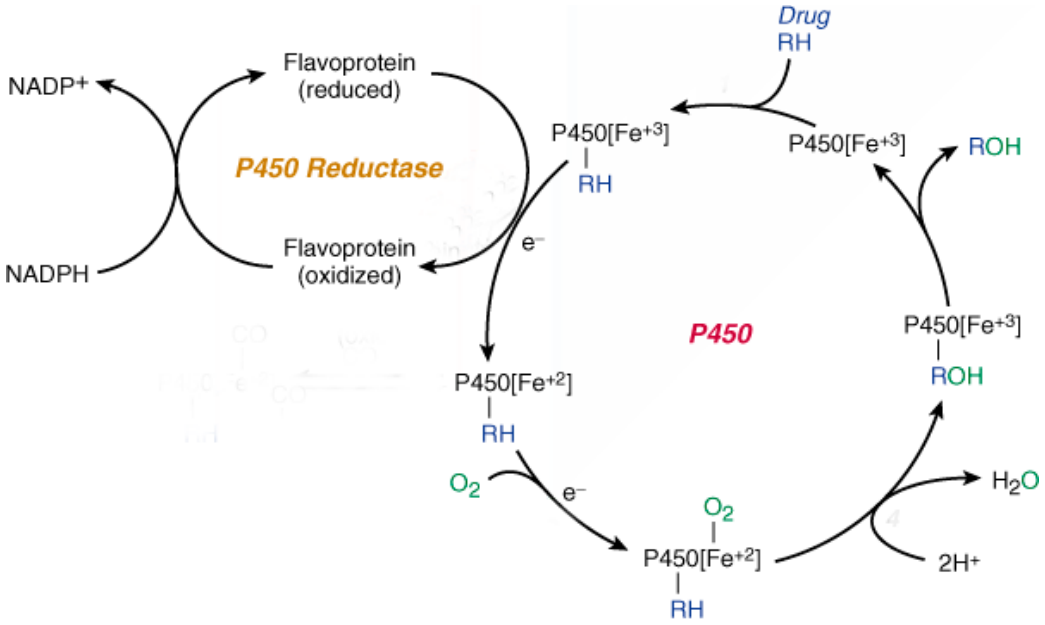
Modifikováno dle: Parkinson (2001)

Z oxidačních reakcí na prvním místě dominují hydroxylace, při kterých se na molekule xenobiotika vytváří nová OH skupina. V endoplasmatickém retikulu tuto reakci zprostředkovává již zmíněný MMS, který je tvořen nejen CYP450, ale i NADPH:cytochrom P450 reduktázou (Stiborová 1999).

Cytochrom P450, hemthiolátový enzym, je v redukovaném stavu schopen v komplexu s oxidem uhelnatým absorbovat viditelné světlo při vlnové délce 450 nm, odtud tedy název P450 (pigment 450 nm) (Knejzlík et al. 2000).

V přírodě byly nalezeny stovky izoforem CYP450, které se u savců nachází ve všech typech tkání kromě svalových buněk a erytrocytů. Cytochromy P450 jsou schopné vázat a aktivovat dva kyslíkové atomy. V naprosté většině případů se jedná o molekulární kyslík, jsou však schopné využít i kyslík peroxidů či peroxokyselin (Knejzlík et al. 2000).

Proces je zahájen vazbou substrátu na CYP450, což změní jeho proteinovou konformaci. Následuje redukce hemového železa (Fe^{3+}) elektronem, který pochází z flavoproteinové NADPH:CYP450 reduktázy. Fe^{2+} forma hemu je schopna vázat molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody (Obr. 1) (Stiborová et al. 1999).



Obr. 1 Monooxygenázový cyklus cytochromu P450 v mikrozómech

Proces je zahájen vazbou substrátu (RH) na Fe^{3+} formu CYP450, následuje redukce železa elektronem, který pochází z flavoproteinové NADPH:CYP450 reduktázy. Redukovaná Fe^{2+} forma hemu je schopna vázat molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody. **RH**: mateřské léčivo; **ROH**: oxidovaný metabolit

Převzato z: Katzung et al. (2009)

Zjednodušeně lze tento proces vyjádřit rovnicí:

$$\mathbf{RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow R\text{-}OH + H_2O + NADP^+}$$

CYP450 se vyskytují v různých formách, které jsou řazeny do rodin a podrodin dle stupně homologie primární struktury proteinu. Označení konkrétního cytochromu z rodiny P450 se skládá z předpony CYP, následované arabskou číslicí označující rodinu (40% homologie aminokyselinové sekvence), velkým písmenem pro podrodinu (60% homologie) a další arabskou číslicí pro označení konkrétního izoenzymu, např. CYP 3A4 (Stiborová et al. 1999).

U člověka se doposud podařilo identifikovat 14 rodin cytochromů, z toho pro biotransformaci xenobiotik jsou nejdůležitějšími izoenzymy rodin 1-3 (konkrétně CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), které vykazují širokou substrátovou specifitu (Stiborová et al. 1999).

Látky mohou být substráty, inhibitory a/nebo induktory enzymů CYP. Řada klinicky významných lékových interakcí se odehrává na úrovni metabolizace těmito enzymy, proto je nezbytné před registrací nových léčivých přípravků danou látku na způsob metabolizace otestovat popř. určit schopnost léčiva indukovat či inhibovat určitou izoformu CYP450. Tyto znalosti jednoznačně přispívají k zvýšení bezpečnosti a účinnosti kombinované léčby (Lynch 2007).

II. fázi biotransformace tvoří konjugační reakce. Jedná se o skupinu metabolických reakcí, při kterých xenobiotikum reaguje s endogenní sloučeninou nebo funkční skupinou za vzniku konjugátu, který je zpravidla polárnější než výchozí látka a jeho exkrece z těla močí nebo žlučí je tak efektivnější (Knejzlík et al. 2000).

Nejdůležitějšími enzymy II. fáze jsou transferázy: UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), N-acetyltransferázy (NAT), glutathion-S-transferázy (GST), thiopurin-S-methyltransferáza (TPMT) a katechol-O-methyltransferáza (COMT), a dále enzymy podílející se na konjugaci metabolitů s aminokyselinami, nejčastěji glycinem (Knejzlík et al. 2000).

Konjugační reakce nejsou specifické pouze pro xenobiotika, endobiotika též prochází stejným systémem reakcí (Knejzlík et al. 2000).

Nově se v některých publikacích objevuje termín „Fáze III“, kterým je myšlen transmembránový přenos léčiv a ostatních xenobiotik z buňky do extracelulárního prostředí pomocí transportérů. Jako první z nich byl v roce 1976 objeven P-glykoprotein, který svůj název získal díky své funkci modulátoru membránové permeability léčiv. Patří do rodiny ATP-dependentních membránových přenašečů organických iontů, někdy též označovaných jako ABC transportéry (ATP-binding cassette) (Knejzlík et al. 2000, Omiecinski et al. 2011).

Membránové transportéry si rychle získaly pozornost mnoha výzkumných laboratoří. Jejich funkce byla spojena s prokázanou rezistencí nádorových buněk na používaná chemoterapeutika, funkčně i strukturně odlišná. Anglicky bývá tento fenomén označován jako „multidrug rezistance“ (MDR; resistence na léčbu) (Ficková et al. 2002, Omiecinski et al. 2011).

Kromě ABC transportérů existují také transportéry organických aniontů a kationtů nadrodiny SLC22A a transportní polypeptidy pro organické anionty nadrodiny SLCO (Knejzlík et al. 2000, Omiecinski et al. 2011).

3. 2 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Pro indukci či inhibici exprese většiny eukaryotních genů je nezbytná přítomnost více regulačních proteinů na více regulačních místech. Složitost kombinační regulace se dostává do konfrontace s nedostatečným lidským poznáním. Je cílem mnoha výzkumných laboratoří v tomto poznání postoupit o kus dál (Alberts et al. 2005).

Největší známou skupinou transkripčních faktorů, tj. regulačních proteinů interagujících na úrovni promotoru genu, jsou ligandem aktivované nukleární receptory (NR), které v lidském genomu regulují odlišné biologické pochody zahrnující vývoj, diferenciaci, metabolismus i buněčnou smrt. Dysfunkce jejich signalizace má za následek narušení homeostázy a integrity organismu (Nakata et al. 2006).

Do rodiny NR řadíme nejen klasické endokrinní receptory, které zprostředkovávají působení steroidních hormonů, thyroidních hormonů a v tucích rozpustných vitaminů A a D, ale i velké množství sirotčích NR, které toto označení nesou z důvodů dosud neidentifikovaných fyziologických ligandů, Počet členů se v současné době pohybuje nad hranicí 70, z toho 60% tvoří receptory sirotčí (Wang a LeCluyse 2003).

Mezi klasické endokrinní receptory patří glukokortikoidní (GR), mineralokortikoidní (MR), estrogenní (ER), androgenní (AR) a progesteronový receptor (PR). Jejich ligandy jsou syntetizovány z endogenních zdrojů a tato syntéza je regulována negativní zpětnou vazbou hypotalamické osy (Nakata et al. 2006).

Sirotčí receptory, pro které byl nalezen fyziologický ligand, se staly „adoptovanými“. Jedná se o receptory pro mastné kyseliny (PPAR - peroxisome proliferator-activated receptor), oxysteroly, (LXR - liver X receptor) a žlučové kyseliny (FXR – farnesoid X receptor) (Nakata et al. 2006).

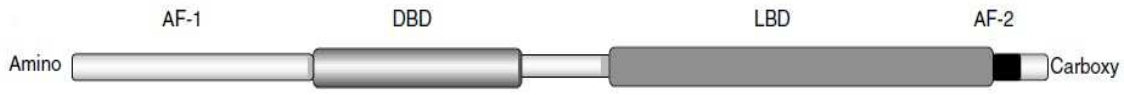
Zvláštní postavení v této skupině mají sirotčí receptory pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR), které se vyznačují širší

substrátovou specifitou a nižší ligandovou afinitou v porovnání s klasickými steroidními receptory. Hodnoty EC50 pro vazbu ligandů ke CAR a PXR jsou v mikromolárním pásmu na rozdíl od nanomolárních hodnot receptorů klasických (di Masi et al. 2009, Nakata et al. 2006).

Jednotná nomenklatura pro nadrodinu NR byla přijata v roce 1999. Vychází z označování nadrodiny CYP450, tedy NR pro nadrodinu, první arabská číslice pro rodinu, písmeno pro podrodinu a druhá arabská číslice určí konkrétní receptor např. NR1I3 pro CAR (Nakata et al. 2006, Wang a LeCluyse 2003).

3.2.1 STRUKTURA NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

Molekuly proteinů NR vykazují podobné strukturální a sekvenční rysy (Obr. 2). Skládají se ze 4 nezávislých, ale interagujících modulů: z N-terminální aktivační funkce transkripce (AF1), která umožňuje aktivaci nezávislou na ligandu a moduluje interakce s kofaktory, z DNA vázající domény (DBD), spojovací oblasti H, z ligand vázající domény (LBD) a z C-terminální aktivační funkce 2 (AF2), která vychytává koaktivátory a zajišťuje aktivaci na ligandu závislou (Nakata et al. 2006).



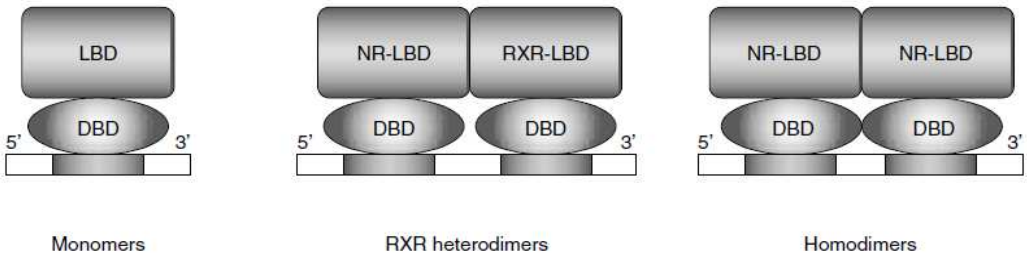
Obr. 2 Struktura nukleárního receptorů a jeho funkčních domén

AF1: aktivační funkce 1, moduluje interakce s kofaktory při N-konci; **DBD**: DNA vázající doména, váže se na responzivní elementy cílových genů, patří též k N-konci; **LBD**: ligand vázající doména, tvoří kavitu pro lignad a koaktivátor, leží při C-konci; **AF2**: aktivační funkce 2, vychytává koaktivátory

Převzato z: Wang a LeCluyse (2003)

Vysoce zachovalá DNA vázající doména umožňuje nukleárním receptorům navázat se na specifickou oblast promotoru cílového genu, která je označována jako hormonální responzivní element (HRE) nebo xenobiotický responzivní element (XRE) (Wang a LeCluyse 2003).

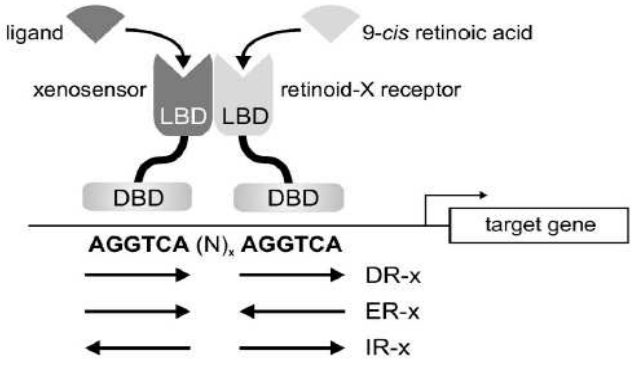
Tyto oblasti DNA jsou většinou tvořeny dvěma sekvencemi šesti nukleotidů, které jsou od sebe odděleny určitým počtem bazí (n = 3-6). Pro steroidní receptory je odpovídající sekvencí ACAACA, pro estrogenní a ostatní receptory zas AGGTCA. Postavení těchto dvou sekvencí může být v přímé repetici za sebou, pak tyto responzivní elementy (RE) nesou označení DRn (direct repeats), můžou být též sestaveny proti sobě (ERn; everted repeats) či od sebe (IRn; inverted repeats). V konkrétním případě je písmeno n nahrazeno počtem bazí. Nukleární receptory se váží na responzivní elementy jako monomery, homodimery či heterodimery s retinoidním X receptorem α (RXRα) (Obr. 3, Obr. 4) (Nakata et al. 2006, Wang a LeCluyse 2003).



Obr. 3 Vazba nukleárních receptorů na DNA responzivní elementy

Monomery: NR se váže přes DBD k struktuře DNA v jednom místě; **Heterodimery**: NR vytváří heterodimer s RXRα, každý receptor má své vazebné místo na DNA; **Homodimery**: 2 stejné NR se váží přes 2 vazebná místa; **LBD**: ligand vázající doména; **DBD**: DNA vázající doména; **RXRα**: retinoidní X receptor α; **NR**: nukleární receptor

Převzato z: Wang a LeCluyse (2003)



Obr. 4 Vazba xenosenzoru (PXR/CAR) jako heterodimeru s RXRα na vazebná místa regulační oblasti cílového genu

DR-x: uspořádání sekvencí nukleotidů vazebného místa v přímém směru (direct repeats);
x: počet nukleotidů oddělující vazebná místa; **ER**: uspořádání sekvencí proti sobě (everted repeats); **IR**: uspořádání sekvencí od sebe (inverted repeats)

Převzato z: Handschin a Meyer (2003)

Ligand vázající doména se nachází na C-konci receptoru a slouží nejen jako vazebné místo pro ligandy, které zde nekovalentně interagují s aminokyselinovými skupinami, ale též obsahuje AF2, sekvenci aminokyselin, která zprostředkovává jaderné umístění receptoru. Navázání ligandu navodí významné konformační změny v LBD, které následně umožní účast korepresorů a koaktivátorů na vazbě receptoru k DNA (Wang a LeCluyse 2003).

U eukaryot je DNA stočena okolo oktameru histonů (H2A, H2B, H3 a H4) a tyto komplexy, nukleozómy, jsou mezi sebou spojeny histonem H1. Neacetylované histony formují kondenzovaný heterochromatin, který nemůže být transkribován, vzhledem k tomu, že se RNA polymeráza II nedostane do oblasti promotoru. Iniciální vazba mezi NR a histonem je doprovázena histonacetyltransferázou (HAT), následná acetylace histonů heterochromatin rozvolní, umožní navázání NR na cílový gen a povolení, podmínění či nepovolení jeho transkripce (Nakata et al. 2006).

3.3 XENOBIOTICKÉ RECEPTORY

V poslední dekádě byl udělán značný pokrok v rozboru mechanismu, kterým xenobiotika vyvolávají změny v jaterním xeno- a endometabolismu. Regulační mechanismus spočívá v navázání sloučeniny na nukleární receptor, po kterém následuje indukce enzymů zapojených do metabolismu léčiva (Timsit a Negishi 2007).

Hlavní roli v tomto procesu hrají 2 členové NR1I podrodiny, konkrétně CAR a PXR. Tyto receptory fungují jako senzory toxických produktů vytvářených při endogenním metabolismu exogenních látek za účelem zvýšení jejich eliminace. Tato jejich jedinečná funkce je odlišuje od receptorů pro steroidní hormony (Timsit a Negishi 2007).

Rozdílnost chemických a steroidně citlivých funkcí se vyvinula, aby zajistila přesnost endokrinní regulace steroidních hormonů a zároveň umožnila rozvoj metabolických drah pro eliminaci xenobiotik (Timsit a Negishi 2007).

3.3.1 AKTIVACE NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ PXR A CAR

Nukleární receptory patří do skupiny transkripčních faktorů aktivovaných ligandem. V klidovém stavu mohou působit jako „tlumiče“ genové exprese, což bylo prokázáno u receptoru pro thyroidní hormon (ThR), který se váže na DNA a aktivně vychytává korepresory, které tak omezují transkripci daného genu. Tato schopnost se předpokládá i u PXR (di Masi et al. 2009).

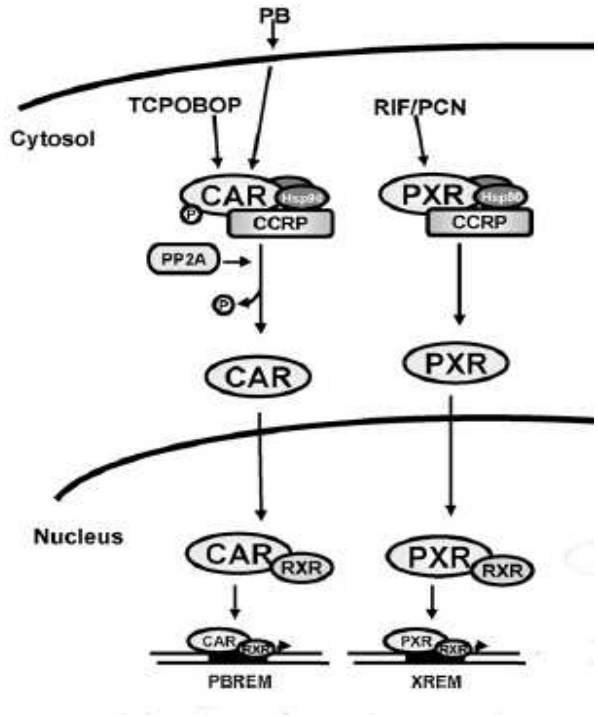
Následná aktivace ligandy vede k odpojení korepresorů od PXR a umožní tak navázání jeho koaktivátorů. Ty se značnou měrou podílejí na destabilizaci chromatinu, díky které má transkripční aparát dostatečný prostor pro nasednutí na cílový gen a může tak zahájit transkripci genu (di Masi et al. 2009).

Přestože se PXR vyskytuje především v buněčném jádře, byla též prokázána jeho lokalizace v cytoplasmě, a to v klidovém stavu – za nepřítomnosti ligandu. Následný proces aktivace je velmi podobný aktivační dráze receptoru CAR, pro který je cytoplasmatická lokalizace typická (di Masi et al. 2009, Pávek et al. 2005).

PXR, resp. CAR je zadržován v cytoplasmě multiproteinovým komplexem, který se skládá z CCRP (cytosolový CAR retenční protein) a HSP90 (protein teplotního šoku 90). Po aktivaci ligandem dochází k odpojení receptoru od tohoto komplexu a následuje jeho translokace do jádra. V jádře vytváří heterodimer s RXRα, spolu s koaktivátory se váže na responzivní elementy cílového genu a spouští transkripci (Obr. 5) (Timsit a Negishi 2007).

Pro aktivaci CAR je navíc charakteristický proces defosforylace Ser202 (serin na 202. pozici) pomocí proteinové fosfatázy 2A (PP2A), který doprovází odpojení receptoru od komplexu CCRP:HSP90 (Obr. 5). To, které kinázy CAR fosforylují a tím ho udržují v cytosolu, je zatím nejasné (di Masi et al. 2009, Timsit a Negishi 2007).

Zdá se, že retence CAR v cytosolu a jeho translokace do jádra jsou hlavními regulačními kroky receptorové aktivity. Těsná kontrola těchto pochodů chrání buňku před chronickou aktivací cílových genů a umožňuje její rychlou adaptaci k enviromentálním a fyziologickým situacím (di Masi et al. 2009, Timsit a Negishi 2007).



Obr. 5 Schématické znázornění aktivačních drah receptorů PXR a CAR

Receptor PXR tvoří v cytosolu komplex s CCRP a HSP90. Po navázání ligandu dochází k odpojení receptoru, k jeho translokaci do jádra a k tvorbě heterodimeru s RXRα. Tento komplex se váže na XREM cílových genů.

Receptor CAR je aktivován přítomností fenobarbitalu či přímým navázáním TCPOBOP (platí pro myší formu CAR - mCAR). Následuje odpojení od cytosolového komplexu s HSP90 a CCRP, defosforylace Ser202 pomocí PPA2 a translokace CAR do jádra. Zde se váže na PBREM cílových genů jako heterodimer s RXRα.

RIF: rifampicin, **PCN**: pregnenolon-16α-karbonitril, **PXR**: pregnanový X receptor, **HSP90**: protein teplotního šoku 90, **CCRP**: cytosolový CAR retenční protein, **RXR**: retinoidní X receptor, **XREM**: oblast xenobiotických responzivních elementů, **PB**: fenobarbital, **PP2A**: proteinová fosfatáza 2A, **TCPOBOP**: 1,4-bis[2-3,5-dichloropyridyloxy]benzen, **P**: fosfátový zbytek, **PBREM**: zesilující oblast odpovídající na fenobarbital

Převzato z Timsit a Negishi (2007)

Aktivace CAR může být dosaženo nejen přímým navázáním ligandu na vazebné místo receptoru, ale i nepřímými aktivačními mechanismy, jejichž molekulární podstata je zatím nejasná. Jisté ale je, že obě tyto cesty vedou k uvolnění receptoru z cytosolového komplexu a k jeho následné translokaci do jádra (Omiecinski et al. 2011).

Existují ale i látky, které přesto, že se přímo váží k receptoru, vedou k redukci jeho celkové aktivity. Ty jsou poté označovány pojmem inversní agonista receptoru. Pro humánní CAR (hCAR) je jím např. klotrimazol (Omiecinski et al. 2011, Pustylnyak et al. 2007).

3.3.2 PREGNANOVÝ X RECEPTOR

Pregnanový X receptor (PXR) je považován za xenobiotický senzor pro svou širokou substrátovou specifitu a ústřední roli v metabolismu xenobiotik. Své jméno získal díky aktivaci deriváty pregnanu. V době jeho identifikace ještě neexistoval dostatečně propracovaný nomenklaturní systém pro NR, proto se v literatuře můžeme setkat i s označením „steroidní a xenobiotický receptor“ (SXR) či „pregnanem aktivovaný receptor“ (PAR) a to ve smyslu humánní izoformy PXR (hPXR) (Wang a LeCluyse 2003).

PXR je exprimován převážně v játrech, třebaže se také objevuje v jiných extrahepatálních tkáních, včetně tenkého střeva, tlustého střeva, ledvin, mozkových kapilár a prsní tkáně. Navíc studie s lidskými vzorky ukázaly lokalizaci PXR v prsních a endometriálních tumorech (Chang 2009).

Studie zaměřené na výzkum tkáňové distribuce tohoto receptoru ukázaly, že dominuje zejména na místech zvýšené exprese biotransformačních enzymů, zvláště pak CYP3A, který se podílí na metabolizaci a eliminaci 50% klinicky preskribovaných léčiv (Wang a LeCluyse 2003).

Na rozdíl od ostatních členů nadrodiny nukleárních receptorů, porovnání sekvencí aminokyselin LBD úseků různých PXR ortologů odhalilo neobvykle vysokou divergenci. U druhově odlišných PXR je v oblastech DBD sekvenční shoda na úrovni vyšší než 95%, ale v oblasti LBD dosahuje pouze 75-80%, což je neobvyklé v porovnání s klasickými NR, které vykazují 90% shodu v LBD regionu. Tato divergence vysvětluje druhové rozdíly pozorované v indukci CYP450 různými léčivy (Handschin a Meyer 2003, Wang a LeCluyse 2003).

Pomocí krystalografie byla charakterizována struktura ligand vázající domény PXR, která vykazuje existenci rozsáhlé hydrofobní kavity obsahující několik polárních zbytků. Díky tomuto uskupení může PXR vázat strukturálně různorodé ligandy zahrnující nízko- a vysokomolekulární sloučeniny (Wang a LeCluyse 2003).

Existuje několik jasných důkazů, které označují PXR za dominantní regulátor exprese genu pro CYP3A v játrech a tenkém střevě. Bylo prokázané, že PXR se váže na vazebná místa v oblasti promotoru genu CYP3A4 (DR-3, ER-6) (Handschin a Meyer 2003, Wang a LeCluyse 2003).

Definitivní důkaz pro PXR regulaci CYP3A a druhovou specifitu indukce byl získán pomocí generace PXR-null myší (*pozn.* mutantní myš s defektem v genu pro PXR, zcela vylučuje funkci receptoru), které byly ošetřeny pregnenolon-16α-karbonitrilem (PCN). Ten je považován za silný induktor CYP3A a selektivní aktivátor myšího PXR (mPXR). Indukce exprese CYP3A nebyla v tomto testu zpozorována (Wang a LeCluyse 2003).

Nahrazení mPXR lidským protějškem způsobilo, že xenobiotická citlivost humanizované myši byla obnovena, ale odpověď byla lidského charakteru. Díky těmto závěrům je možné podrobit nově vyvíjená léčiva interakci s receptorem PXR pro určení míry rizika vzniku lékových interakcí se substráty CYP3A4 (Wang a LeCluyse 2003).

Zajímavé je, že jedním z nejsilnějších induktorů PXR, které byly doposud nalezeny, je hyperforin, složka extraktu z rostliny Hypericum perforatum. Mechanismus aktivace zahrnuje přímé navázání ligandu k receptoru a následnou stimulaci exprese cílových genů PXR, mezi nimi i CYP3A4. Hypericum perforatum je jen jedním z příkladů široce používaných přírodních léčiv s potenciálem vyvolat nežádoucí lékové interakce pocházející ze stimulace CYP450 (Chang 2009, Handschin a Meyer 2003).

Nedávné studie odhalily, že PXR hraje též důležitou úlohu v ochraně před hepatotoxicitou vyvolanou vysokými koncentracemi žlučových kyselin, které pocházejí z potravy bohaté na cholesterol. Klíčovým enzymem jejich tvorby je CYP7A (cholesterol 7α-hydroxyláza), který je potlačen PXR jako odpověď na litocholovou kyselinu, která je jedním z konečných produktů katabolismu cholesterolu. Sonoda a kolegové (2005) uvedli, že PXR ligand je schopen zlepšit cholestatické onemocnění jater a přidružené akutní renální selhání (Nakata et al. 2006).

Pro přehled je v tabulce 2 na straně 29 uveden seznam dalších ligandů a regulovaných genů PXR.

3.3.3 KONSTITUTIVNÍ ANDROSTANOVÝ RECEPTOR

Konstitutivní androstanový receptor (CAR, NR1I3) byl izolován v roce 1997 díky analýze cDNA (*pozn*. DNA komplementární k mRNA vláknu) knihovny oligonukleotidem, jehož sekvence vycházela z vysoce zachovalé DBD nukleárních receptorů. Označení CAR původně vyjadřovalo konstitutivní aktivátor, neboť byl schopen tvorby heterodimeru s RXRα bez přítomnosti ligandu a následně se vázal k responzivním elementům kyseliny retinové (CAR – constitutive activator of retinoid response) (Wang a LeCluyse 2003).

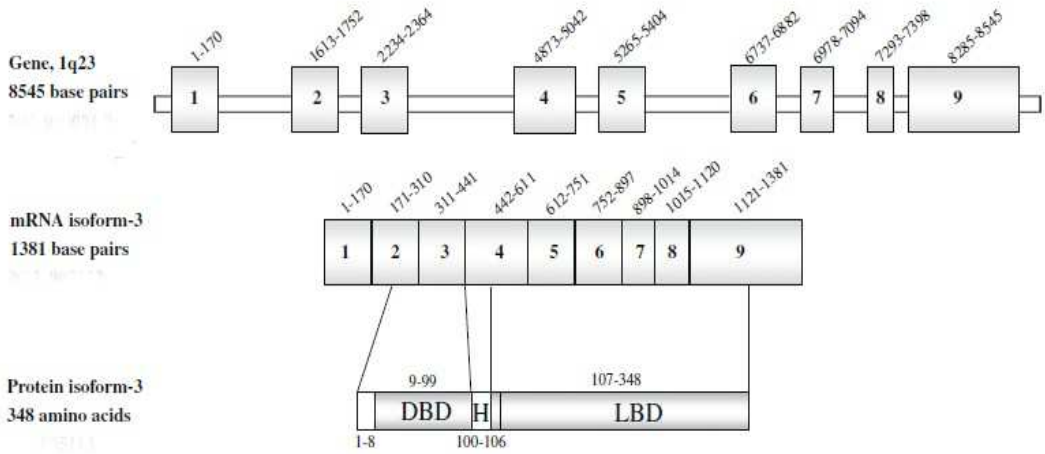
Při náhodném testování potenciálních ligandů byly nalezeny 2 endogenní ligandy CAR s nízkou afinitou, a sice androstanol (5α-androstan-3α-ol) a androstenol (5α-androst-16-en-3α-ol), které způsobily disociaci receptoru od jeho koaktivátoru a inhibovaly tak transaktivaci genu. Odtud tedy pochází pojmenování receptoru jako konstitutivní androstanový (Wang a LeCluyse 2003).

V současnosti je CAR řazen spolu s PXR do první rodiny NR – receptory podobné ThR, a do skupiny I – receptory podobné vitamin D receptoru (VDR). Výsledné označení je tedy NR1I3 (di Masi et al. 2009).

CAR je exprimován hlavně v játrech, minoritně v tenkém střevě, srdci a prostatě (Timsit a Negishi 2007).

Díky své široké substrátové specifitě je někdy též označován za „xenosenzor“. Vzhledem k tomu, že kavita, kterou je schopna vytvořit LBD je menších rozměrů, menší jsou i ligandy receptoru hCAR v porovnání s hPXR (Timsit a Negishi 2007).

Humánní CAR je produktem NR1I3 genu, který je lokalizován na chromozomu 1, lokus 1q23. Je složen z 8545 párů bazí a zahrnuje 9 exonů rozdělených 8 introny (Obr. 6). Bylo identifikováno 22 unikátních hCAR variant mRNA obsahujících různé kombinace alternativního sestřihu (tzn. úplná či částečná delece určitých exonů či inzerce úseků z intronů). Izoforma-3 je považována za tzv. wild-type formu CAR, u které byl nalezen pouze základní sestřih (Obr. 6) (di Masi et al. 2009).



Obr. 6 Scématické znázornění genu hCAR, mRNA a proteinu izoformy 3

Gen hCAR je složen z 8545 párů bazí, které tvoří 9 exonů a 8 intronů. mRNA izoformy-3 je složena z kompletních exonů. **DBD**: DNA vázající doména, **H**: spojovací oblast, **LBD**: ligand vázající doména.

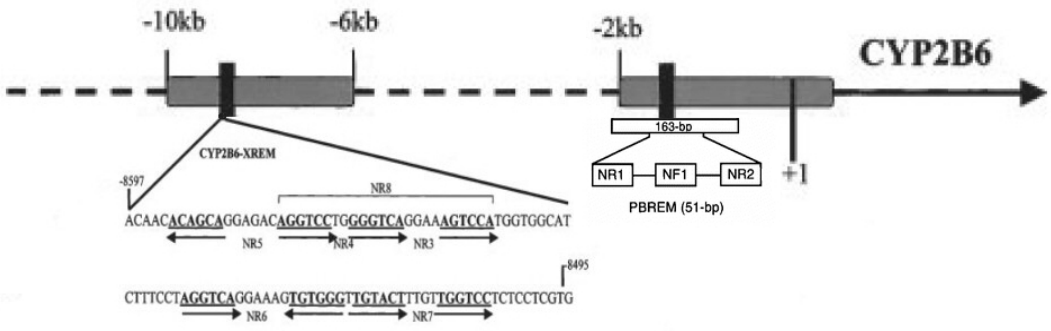
Převzato z: di Masi et al (2009)

Na regulační oblasti konkrétních genů může působit zároveň více nukleárních receptorů. CAR se významně podílí spolu s PXR na indukci genu CYP2B (Wang a LeCluyse 2003).

Při analýze promotorové oblasti tohoto genu, byla nalezena sekvence odpovídající na působení fenobarbitalu. Byla nazvána PBREM (phenobarbital responsive enhancer modul). Obsahuje dvě vazebná místa pro nukleární receptory (NR1 a NR2) a vazebné místo pro nukleární faktor 1 (NF1), jehož funkce není zatím objasněna (Obr. 7). Bylo prokázáno, že na tyto úseky se váže CAR jako heterodimer s RXRα (Wang a LeCluyse 2003).

I když fenobarbital (PB) indukuje expresi genu CYP2B převážně prostřednictvím CAR, není to jeho přímý ligand, ale nepřímý aktivátor (Omiecinski et al. 2011).

Další rozbor promotorové oblasti vedl k objevu XREM sekvence (xenobiotic responsive enhancer modul; zesilující oblast odpovídající na xenobiotika), která předchází oblasti PBREM (Obr. 7). Její vazebná místa byla označena jako NR 3-8. K těmto motivům se jako heterodimery s RXRα váže CAR i PXR. Pro maximální indukci exprese CYP2B6 se ukázala být nepostradatelná součinnost těchto dvou modulů (Wang et al. 2003).



Obr. 7 Schematické znázornění regulační oblasti genu CYP2B6

V regulační oblasti genu CYP2B6 se nachází 2 regulační moduly, a sice XREM a PBREM. Obsahují vazebná místa pro receptory PXR a CAR, které nesou označení NR1-8. **XREM**: zesilující oblast odpovídající na xenobiotika; **PBREM**: zesilující oblast odpovídající na fenobarbital; **NR1-8**: vazebná místa pro nukleární receptory 1-8; **NF1**: nukleární faktor 1

Modifikováno dle: Pustylnyak (2007), Wang et al. (2003)

Charakteristika CAR jako sirotčího receptoru vedla k hledání endogenního ligandu, zvláště z důvodů zjevné konstitutivní aktivity receptoru. I přesto, že už je v současné době známé působení endogenních androstanových metabolitů (androstenol, androstanol) jako ligandů respektive inversních agonistů CAR, stále platí, že endogenní ligand s vysokou afinitou ke CAR není dosud znám (di Masi et al. 2009, Swales a Negishi 2004).

Jak již bylo zmíněno, CAR je proteinem, který zprostředkuje indukci vyvolanou fenobarbitalem. Následně byla identifikována celá skupina strukturálně odlišných sloučenin indukujících CYP2B skrze aktivaci CAR, která je označována jako „induktory fenobarbitalového typu“. Nejsilnějším členem této skupiny je pesticid TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen) (Wang a LeCluyse 2003).

Ligandová afinita k receptoru CAR se významně liší mezi druhy a některé případy zůstávají dosud předmětem diskusí. CAR agonisté TCPOBOP a CITCO (6-(4-chloropheny)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4--dichlorobenzyl) oxim) jsou jediné dvě sloučeniny známé tím, že se váží na myší, respektive lidský CAR. Oba projevuji svoji funkci přímou vazbou na receptor a zahajují tak jeho uvolnění z cytoplazmatického komplexu, čímž umožňuji jeho translokaci do jádra (di Masi et al. 2009, Wada et al 2009).

Rozdíly v aktivaci CAR u myší a lidí jsou nejpravděpodobněji výsledkem rozdílné LBD domény CAR ortologů u těchto druhů. Z toho důvodu není možné extrapolovat zvířecí data na lidskou populaci (Hadchin a Meyer 2003, Wang a LeCluyse 2003).

Vytvoření humanizované myši, kde myší PXR nebo CAR byly geneticky nahrazeny jejich lidskými protějšky, představuje hlavní krok v zakládání humanizovaných hlodavčích toxikologických modelů, které následně vykazují humanizovanou odpověď na léčivo (Wada et al. 2009).

Ligandy CAR receptoru představují sloučeniny různorodých struktur, včetně přirozeně se vyskytujících látek přítomných v léčivých rostlinách. Z doposud studovaných bylinných extraktů je nejlépe charakterizovaným aktivátorem CAR Yin zhi Huang. Jedná se o tradiční čínský odvar skládající se z Artemisia capillaries, Gardenia jasminoides Ellis, Rheum officinale Baill a Scutellaria baicalensis Georgi. Tento bylinný lék má dlouhou historii používání v Asii v léčbě neonatální žloutenky, která je nejčastěji způsobena rozpadem nadměrného množství erytrocytů. Charakteristické pro toto onemocnění je zvýšená hladina bilirubinu, který vzniká jako konečný produkt katabolismu hemu (Chang 2009, di Masi et al. 2009).

Podávání odvaru (10ml/kg/den po dobu 3 dnů) snížilo hladinu bilirubinu v séru pouze u myší, které nepostrádaly endogenní CAR receptor. Tato změna byla doprovázena zvýšenou expresí mRNA genů CYP2B10 a UGT1A1, které jsou pod regulací CAR (Chang 2009).

Zůstává otázkou, která chemická sloučenina z odvaru může za tento efekt. Kandidátskou sloučeninou je 6,7-dimethylskuletin, což je kumarinový derivát z odvaru. Na základě testů na buněčných kulturách hepatocytů z humanizovaných myší bylo zjištěno, že tato sloučenina stimuluje nukleární translokaci CAR a zvyšuje expresi jaterních genů UGT1A1 a efluxního transportéru MRP2 (multidrug resistance-asociated protein; protein spojený s resistencí na léčbu), což jsou klíčový hráči v detoxifikaci bilirubinu (Chang 2009, di Masi et al. 2009).

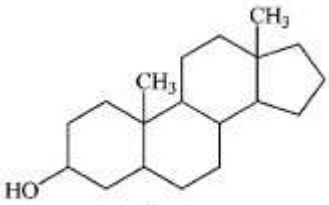
Vztah aktivace CAR a detoxifikace bilirubinu byl též potvrzen klinickou zkušeností lékařů, kteří v terapii vzácného geneticky podmíněného onemocnění Criegler-Najjarova syndromu II. typu používají fenobarbital. U takto nemocných pacientů je snížená exprese genu UGT1A1 a léčba fenobarbitalem je chrání před toxickými hladinami bilirubinu prostřednictvím aktivace CAR (Wang a LeCluyse 2003).

Přehled ligandů a genů regulovaných konstitutivním androstanovým receptorem je uveden v tabulce 2 a na obrázku 8.

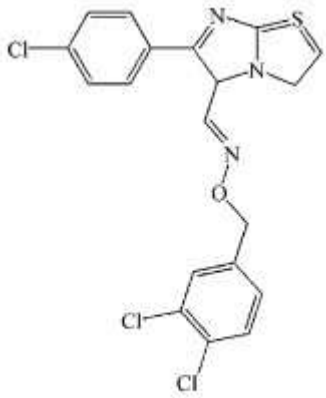
Tab. 2 Přehled ligandů a regulovaných genů pro receptory hPXR a hCAR

PREGNANOVÝ X RECEPTOR (PXR)			KONSTITUTIVNÍ ANDROSTANOVÝ RECEPTOR (CAR)		
Sloučenina	Poznámka	Indukované geny	Sloučenina	Poznámka	Indukované geny
Betametazon	Vysoké dávky	CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6	5α-androstan-3α-ol	Inverzní agonista	CYP2A6
Karbamazepin	Vysoké dávky	CYP2B6, CYP2B10, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19	5α-androst-16-en-3α-ol	Inverzní agonista (mCAR)	CYP2B6, CYP2B10
Klotrimazol	Vysoké dávky	CYP3A4, CYP3A11	Klotrimazol	Inverzní agonista	CYP2C9, CYP2C19
Mifepriston	Vysoké dávky	CYP7A1 !redukce!		Agonista (mCAR)	CYP3A4, CYP3A11
Fenobarbital	Vysoké dávky	SULT2A1, GSTA2	CITCO		UGT1A1
PCN	Vysoké dávky (mPXR)	UGT1A1, UGT1A3	TCPOBOP	(mCAR)	GSTA1/A2
Ecteinascidin-743	Antagonista	MDR1 (P-glykoprotein)	Fenobarbital	Nepřímý aktivátor	MDR1 (P glykoprotein)
5β-pregnan-3,20-dion		MRP2, MRP3	Fenytoin	Nepřímý aktivátor	MRP2 , MRP3
Hyperforin			6,7-dimethylskuletin	Nepřímý aktivátor	
Rifampicin					
Kolupulon					

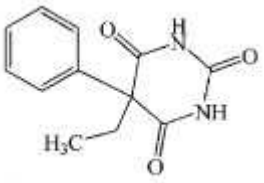
Modifikováno dle: di Masi et al. (2009)



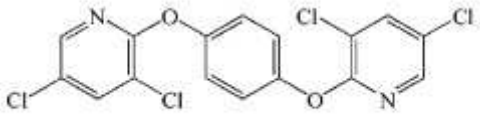
5α-androstan-3α-ol



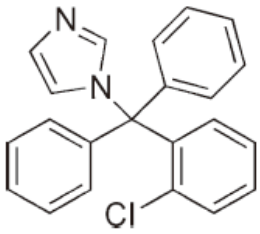
CITCO



Fenobarbital



TCPOBOP



Klotrimazol

Obr. 8 Chemické sloučeniny ovlivňující aktivitu CAR

Převzato z: di Masi et al. (2009), Winnicka et al. (2011)

3.4 CAR V REGULACI ENERGETICKÉHO METABOLISMU

Játra jsou jedním z hlavních orgánů zapojených do regulace energetické homeostázy. Živiny jako sacharidy a lipidy jsou zde modifikovány a syntetizovány, aby byly následně využity pro potřeby celého organismu (Konno et al. 2008).

Hlavní roli v regulaci těchto pochodů zaujímají pankreatické hormony, insulin a glukagon. Regulují transkripci genů, které kódují klíčové enzymy v drahách glukózového a lipidového metabolismu (Konno et al. 2008).

Nedávné studie naznačily, že nukleární receptory PXR a CAR ovlivňují nejen metabolismus xeno- a endobiotik, nýbrž i tuto energetickou homeostázu (Wada et al. 2009).

3.4.1 REGULACE GLUKONEOGENEZE

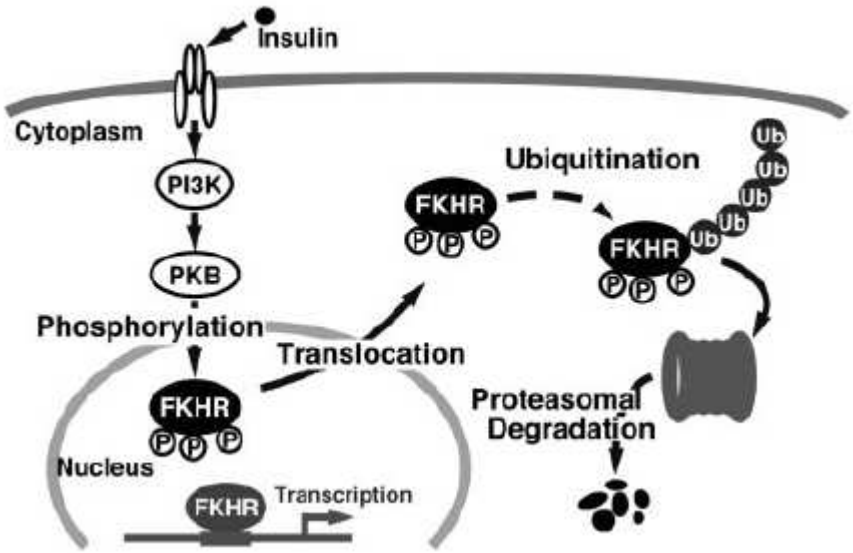
Glukosa-6-fosfatáza (G6Páza) a fosfoenolpyruvát-karboxykináza 1 (PEPCK1) jsou klíčovými enzymy glukoneogeneze. Geny kódující tyto enzymy obsahují ve svých regulačních oblastech sekvence nukleotidů, které nepřímo reagují na hladiny glukagonu a insulinu v krvi (Konno et al. 2008).

Prostředníkem mezi glukagonem a těmito responzivními elementy je cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), jehož hladina se zvyšuje aktivací adenylátcyklázy přímo pod působením glukagonu (Konno et al. 2008).

cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA), která následně stimuluje fosforylací CREBP (protein vázající se na cAMP responzivní elementy). Aktivovaný CREBP je schopný navázat se na cAMP-responzivní elementy genů pro G6Pázu a PEPCK1 a aktivovat tak jejich transkripci (Konno et al. 2008).

Insulin působí zcela opačně, transkripci těchto genů potlačuje. Aktivuje fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), která přes fosforylaci proteinkinázy B fosforyluje transkripční faktor FoxO1 („forkhead“ transkripční faktor O1) (Obr. 9). Ten je v klidovém stavu navázán na IRS (sekvence odpovídající na insulin), které se nachází v regulačních oblastech genů G6Pázy a PEPCK1 (Konno et al. 2008).

Fosforylovaná forma FoxO1 již není aktivní, odpojí se od IRS a následně přechází z jádra do cytosolu, kde je označena ubiquitinem a degradována v proteozómu. Výsledkem je zastavení procesu transkripce genů G6Pázy a PEPCK1 (Obr. 9) (Matsuzaki et al. 2003).



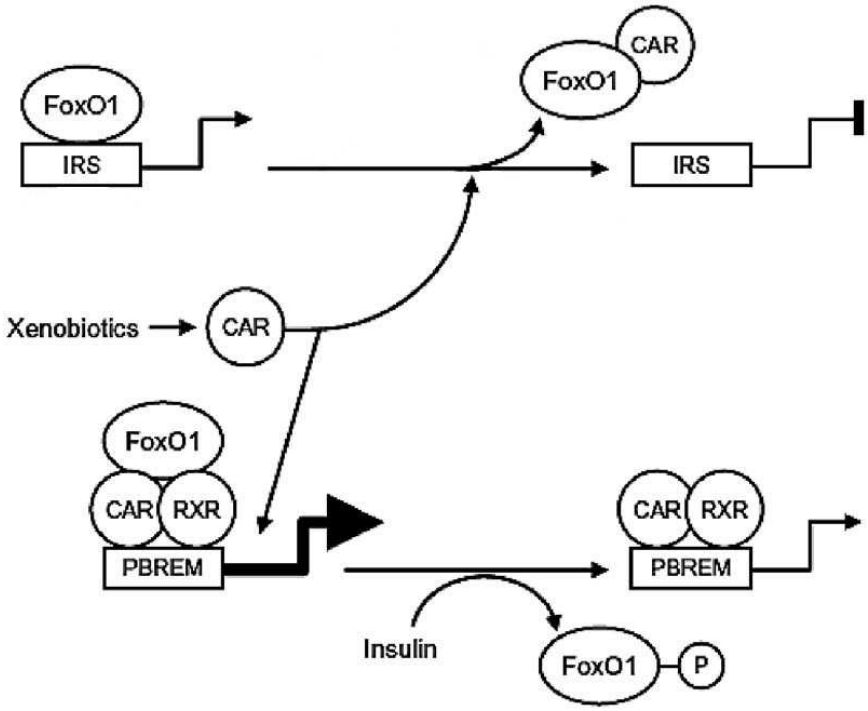
Obr. 9 Schématické znázornění působení insulinu na transkripci genů klíčových glukoneogenních enzymů (G6Páza, PEPCK1)

Vazba insulinu na receptor vede k fosforylaci PI3K, PKB a nakonec i FoxO1 (na obr. jako FKHR). Fosforylovaný FoxO1 se odpojí od IRS, je translokován do cytosolu, označen ubiquitinem a následně degradován v proteozómu. Transkripce genů je tím potlačena. **PI3K**: fosfotidylinositol-3-kináza; **PKB**: proteinkináza B; **FKHR**: „forkhead" transkripční faktor, syn. FoxO1; **P**: fosfátový zbytek; **Ub**: ubiquitin

Převzato z: Matsuzaki et al. (2003)

Z klinické praxe je dlouho známé, že chronické podávání fenobarbitalu vede k snížení hladiny glukózy v krvi u diabetických pacientů. Nedávné studie odhalily molekulární podstatu této zkušenosti (Konno et al. 2008).

Bylo zjištěno, že xenobiotiky aktivovaný CAR se přímo váže na FoxO1, což vede k jeho inaktivaci, odpojení od IRS a k inhibici glukoneogeneze (Obr. 10). Působí tedy analogicky jako insulin (Konno et al. 2008).



Obr. 10 Schéma spolupráce CAR, FoxO1 a insulinu na transkripci cílových genů

Xenobiotiky aktivovaný CAR zajistí odvázání FoxO1 od regulačních sekvencí genů citlivých na působení insulinu. Výsledkem je zastavení transkripce a útlum glukoneogeneze stejně jako při pouhém působení insulinu. V případě genů, jejichž regulační oblast je citlivá na fenobarbital (např. CYP2B) vystupuje insulin jako zeslabovač genetické exprese cestou fosforylace FoxO1. **FoxO**: „forhead" transkripční faktor O1; **IRS**: sekvence citlivé na insulin; **CAR**: konstitutivní androstanový receptor; **RXR**: retinoidní X receptor; **PBREM**: zesilující modul citlivý na fenobarbital; **P**: fosfátový zbytek

Modifikováno dle: Tien a Negishi (2006)

V součinnosti zvýšené hladiny insulinu a expozice xenobiotiky dochází k zeslabení indukce exprese genů obsahující oblast citlivou na fenobarbital (PBREM), na kterou se váže aktivovaný CAR, a to prostřednictvím likvidace transkripčního faktoru FoxO1 insulinem (Obr. 9, Obr. 10) (Tien a Negishi 2006).

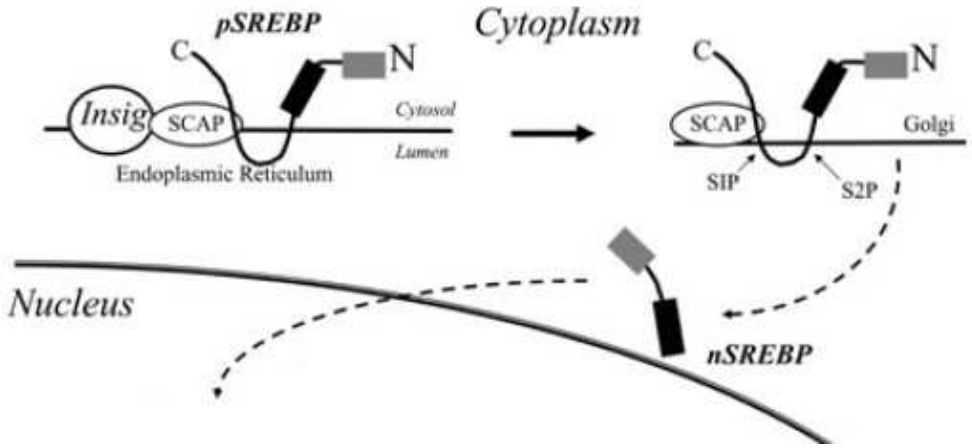
PXR též inhibuje proces glukoneogeneze a to interakcí se signalizační dráhou glukagonu. Po aktivaci ligandem vytváří komplex s fosforylovaným CREBP, což znemožní jeho navázání na cAMP responzivní elementy genů G6Pasy a PEPCK1 (Konno et al. 2008).

3.4.2 REGULACE SYNTÉZY CHOLESTEROLU

Klíčovým enzymem syntézy cholesterolu je mikrozomální enzym hydroxymethlyglutaryl-koenzym A reduktáza (HMG-CoA reduktáza). V regulační oblasti genu tohoto enzymu se nacházejí sekvence nukleotidů, které jsou cílové pro transkripční faktor SREBP (sterol regulatory element binding protein; protein vázající se na regulační oblasti sterolů) (Jump 2004).

Při optimální hladině cholesterolu v buňce je tento transkripční faktor součástí membrány endoplasmatického retikula v komplexu se SCAP (SREBP cleavage-activating protein; protein aktivující štěpení SREBP) (Jump 2004).

Sníží-li se hladina sterolů, je schopen SCAP transportovat SREBP do Golgiho aparátu, kde probíhá jeho proteolytická aktivace prostřednictvím S1P a S2P proteáz. Odštěpený N-konec cestuje dále do jádra, kde aktivuje transkripci genu HMG-CoA reduktázy (Obr. 11) (Jump 2004).



Obr. 11 Schématické znázornění aktivační cesty SREBP

Při optimální hladině sterolů v buňce je komplex SREBP:SCAP součástí membrány ER. Regulačním prvkem je zde INSIG protein, jehož vznik je indukován insulinem. Brání jakémukoli transportu z membrány. V situaci, kdy cholesterol klesne pod určitou mez, INSIG protein je degradován a komplex SCAP:SREBP se přemístí do Golgiho aparátu, kde je SREBP proteolyticky aktivován. Aktivní N-doména přechází do jádra, kde aktivuje expresi genů lipidového metabolismu. **S1P, S2P**: proteázy odštěpující N-doménu; **p/nSREBP**: plasmatická nebo nukleární forma SREBP (sterol regulatory element binding protein); **SCAP**: SREBP cleavage-activating protein; **INSIG**: gen indukovaný insulinem

Modifikováno dle: Jump (2004)

Regulačním prvkem je zde INSIG protein (gen indukovaný insulinem), jehož vznik je indukován insulinem. Ve chvílích zvýšené hladiny cholesterolu v buňce fixuje komplex SREBP:SCAP v membráně retikula, čímž účinně brání aktivaci SREBP (Jump 2004).

Nedávné studie naznačují, že v tomto kroku regulace se uplatňuje i CAR, který je schopen stimulovat INSIG protein v jeho inhibiční funkci a tím v konečném důsledku snižovat hladinu endogenně vzniklého cholesterolu (Wada et al. 2009).

4. CÍL PRÁCE

Cílem této experimentální diplomové práce bylo testovat pomocí metod gene reporter assay a two-hybrid assay skupinu nově syntetizovaných látek na interakci s konstitutivním androstanovým receptorem v liniích HepG2 a LS174T. Tato experimentální práce je součástí rozsáhlejšího projektu, který si klade cíl najít nové přímé ligandy receptoru CAR pro bližší charakterizaci funkce tohoto receptoru i pro možné terapeutické užití.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 REAGENCIE

DMEM médium – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, USA)

Fetální bovinní sérum, FBS (PAA, Rakousko)

Neesenciálních aminokyseliny, NEAA (Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)

Dimethylsulfoxid, DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

Fosfátový pufr, PBS

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)

Opti-MEM I Reduced Serum Medium - Minimum Essential Medium (Invitrogen, USA)

Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega, USA)

- Luciferase Assay Reagent II
    - Luciferase Assay Buffer
    - Luciferase Assay Substrat
- Stop & Glo Reagent II
    - Stop & Glo Substrat 50x
    - Stop & Glo Buffer
- Passive Lysis Buffer

5.2 BUNĚČNÉ LINIE A JEJICH KULTIVACE

5.2.1 BUNĚČNÁ LINIE HEPG2

HepG2 je adherentní buněčná linie, která byla izolována z biopsie jater bělocha, 15 let starého, z dobře diferenciovaného hepatocelulárního karcinomu. Buňky secernují množství hlavních plasmatických proteinů, jako albumin, α2-makroglobulin, α1-antitrypsin, transferin a plasminogen.

Povrchové antigeny viru hepatitidy B nebyly u této linie detekovány. Buňky odpovídají na stimulaci lidským růstovým hormonem.

HepG2 buňky byly pasážovány při konfluenci 70-80% s použitím 0,25% trypsinu za splitování v poměru 1:3 až 1:6. Na kultivační plata byly nasazeny v koncentraci 20-30 tisíc buněk/cm² a kultivovány při 37°C v atmosféře 5% CO_2.

Linie byla získána z Evropské databáze buněčných kultur (ECCAC).

5.2.2 BUNĚČNÁ LINIE LS174T

LS174T je též adherentní buněčná linie, která pochází z adenokarcinomu tlustého střeva ženy, 58 let staré. Epiteliální buňky obsahují mikrovili a cytoplasmatické vakuoly. Může trvat až 7 dní než dojde k napojení buněk. Rostou v ostrůvcích a mají tendenci růst i přes sebe.

Buňky byly pasážovány při konfluenci 70-80% s použitím 0,25% trypsinu za splitování v poměru 1:2 až 1:5. Na kultivační plata byly nasazeny v koncentraci 20-50 tisíc buněk/cm^2 a kultivovány při 37°C v atmosféře 5% CO_2.

Linie byla opět získána z Evropské databáze buněčných kultur (ECCAC).

5.2.3 KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ

Pro kultivaci uvedených buněčných linií bylo použito médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich). Jedná se o modifikaci základního media BME (Basal Medium Eagle), která se vyznačuje čtyřnásobně vyšší koncentrací aminokyselin a vitamínů oproti základnímu mediu.

Existuje několik variant DMEM médií, která se liší v obsahu kvalitativně i kvantitativně. V základu ale vždy obsahují anorganické ionty, sacharidy, aminokyseliny, vitamíny, mastné kyseliny, lipidy, proteiny, peptidy a případně i stopové prvky jako měď, zinek a selen, který má antioxidační vlastnosti (Sigma-Aldrich 2010).

Obsah aminokyselin v médiu určuje maximální hustotu buněk, které lze v kultivaci dosáhnout. Použité médium se vyznačovalo 2mM koncentrací esenciálního L-glutaminu a 1% koncentrací neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich 2010).

Pro správný průběh kultivace je nezbytné udržení optimálního pH v rozmezí obvykle 7,2-7,4. V našem médiu bylo využito přirozené pufrovací schopnosti komplexu bikarbonát/vzdušný CO_2. Z toho důvodu bylo nutné kultivovat buňky v atmosféře s obsahem 5% CO_2. Pro kontrolu správného pH obsahovalo médium fenolovou červeň jako indikátor, které mění barvu ve žlutou (kyselé pH) či fialovou (alkalické pH) (Sigma-Aldrich 2010).

Sérum jako komplexní směs albuminů, růstových faktorů a inhibitorů je jednou z nejdůležitějších složek kultivačního média, která přímo ovlivňuje růst buněk. Nejčastěji se používá fetální bovinní sérum (FBS). V našem médiu bylo použito v koncentraci 10%. Pro eliminaci rizika virové kontaminace bylo FBS nejprve inaktivováno při 56°C po dobu 30 minut (Sigma-Aldrich 2010).

Kultivace probíhala v termostatu při 37°C. Po 48 hodinách bylo buněčným kulturám vyměňováno medium pro zajištění dostatečného přísunu živin.

PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK

Buňky se v buněčné kultuře množí přibližně exponenciálně a to až do okamžiku, kdy se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat (fáze plató) (Vejražka 2012).

Charakteristické pro nádorové buňky je absence kontaktní inhibice. Z toho důvodu rostou dál i přes tvorbu jednoduché konfluentní vrstvy a hrozí riziko postupného odumírání buněk (Vejražka 2012).

V rámci experimentu jsme kultivaci přerušili zhruba při 70-80% konfluenci a buněčné kultury pasážovali.

Z kultivační nádoby jsme odlili staré médium, buňky jsme dvakrát opláchli 3ml, resp. 7ml sterilního fosfátového pufru (PBS), dle velikosti nádoby (25 ml, 75 ml). Tímto oplachem jsme z buněk odstranili Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty, složky mnoha adhezních faktorů.

K opláchnutým buňkám jsme přidali 0,25% roztok trypsinu (1 ml, resp. 2 ml), kývavým pohybem ho rozprostřeli po celém povrchu dna kultivační nádoby a nechali 30 sekund působit. Poté jsme odsáli 2/3 tekutiny a stav buněk sledovali pod mikroskopem.

V okamžiku, kdy všechny buňky získaly kulovitý tvar, setřásli jsme je na dno nádoby, čímž jsme zabránili vzniku shluků. Přidali jsme 2 ml, resp. 4 ml předehřátého kultivačního media s obsahem FBS pro zastavení enzymatické reakce a buněčnou suspenzi opakovaným nasátím tekutiny homogenizovali.

Pro další kultivaci jsme použili pouze polovinu suspenze (tzv. splitování 1:2) a doplnili na požadovaný objem (5 ml, resp. 15ml) kultivačním médiem.

5.3 TESTOVANÉ LÁTKY A JEJICH KONCENTRACE

K experimentům jsme použili celkem 40 látek (Tab. 3), které byly syntetizovány na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, na katedře anorganické a organické chemie pod vedením PharmDr. Marcela Špuláka, PhD.

V roce 2009 jsme otestovali prvních 20 látek, z nichž jedna vedla k syntéze derivátů, které jsme otestovali v létě roku 2011.

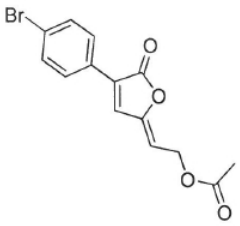
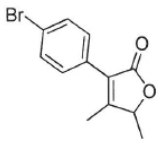
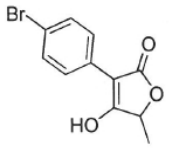
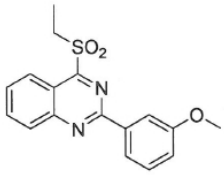
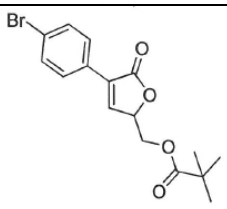
Sloučeniny jsme naředili rozpouštědlem dimethylsulfoxid (DMSO) do podoby zásobních roztoků v různých vyšších koncentracích (15mM, 30mM, 50mM, 100mM).

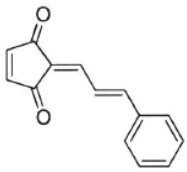
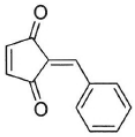
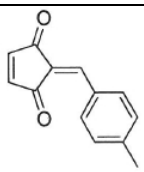
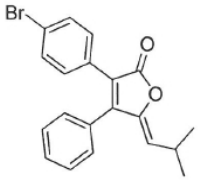
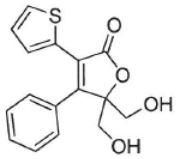
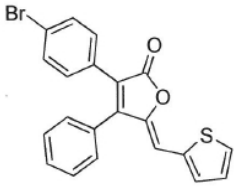
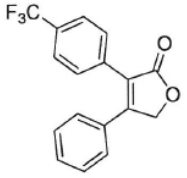
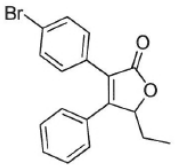
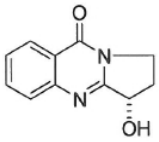
Před dalšími experimenty bylo nutné naředit tyto roztoky DMEM médiem (včetně FBS a NEAA), čímž jsme získali potřebné koncentrace k vlastním experimentům, a sice 5 μM, 10 μM, 20 μM a 30 μM. Z důvodu validity dat jsme ještě k těmto roztokům přidali DMSO do výsledné koncentrace 1‰ v/v.

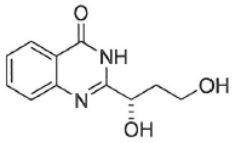
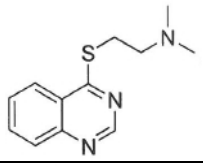
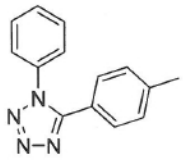
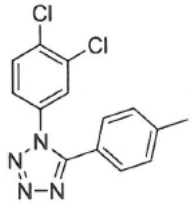
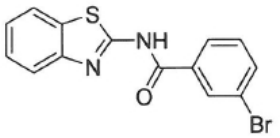
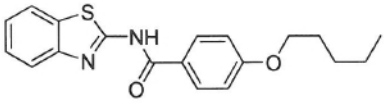
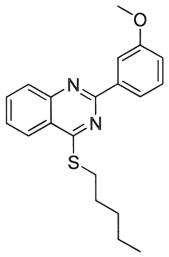
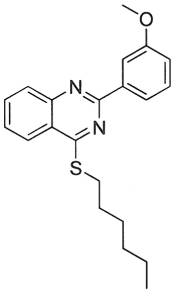
U všech metod jsme jako kontrolu použili 1‰ v/v DMSO v DMEM (včetně FBS a NEAA) médiu a jako standard pro srovnání interakce s CAR receptorem modelového agonistu CITCO v 1μM, resp. 0,5μM koncentraci.

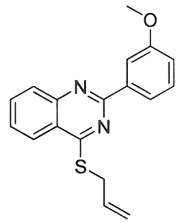
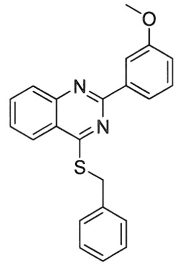
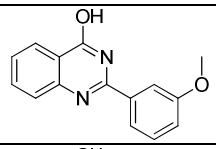
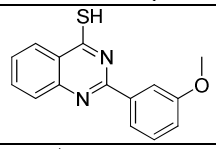
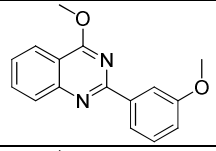
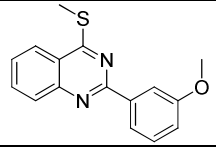
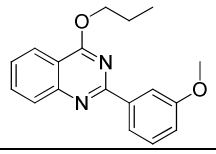
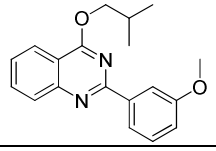
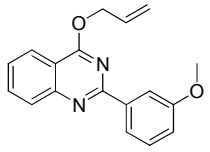
V metodě gene reporter assay byl též pro srovnání použit inversní agonista CAR androstanol v 10μM koncentraci.

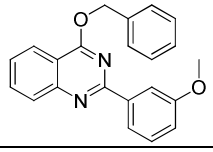
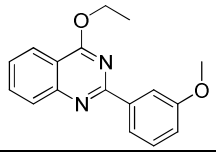
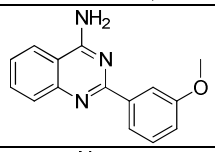
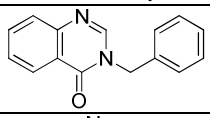
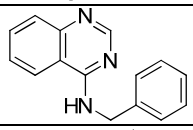
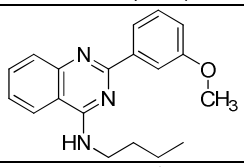
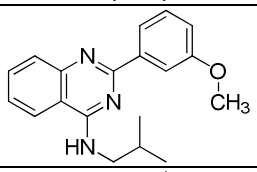
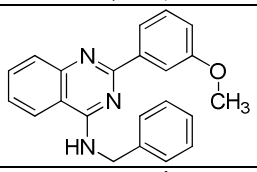
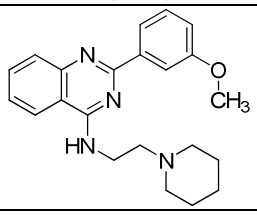
Tab. 3 Testované látky

KÓD	VZOREC	NÁZEV
1		(Z)-2-[4-(4-bromfenyl)-5-oxofuran-2(5H)-yliden]ethylacetát
2		3-(4-bromfenyl)-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on
3		3-(4-bromfenyl)-4-hydroxy-5-methylfuran-2(5H)-on
4		4-(ethylsulfonyl)-2-(3-methoxyfenyl) chinazolin
5		[4-(4-bromfenyl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl]methylpivalát

KÓD	VZOREC	NÁZEV
6		2-(3-fenylallyliden)cyclopent-4-en-1,3-dion
7		2-benzylidencyclopent-4-en-1,3-dion
8		2-(4-methylbenzyliden)cyclopent-4-en-1,3-dion
9		(Z)-3-(4-bromfenyl)-5-(2-methylpropyliden)-4-fenylfuran-2(5H)-on
10		5,5-bis(hydroxymethyl)-4-fenyl-3-(thiofen-2-yl)furan-2(5H)-on
11		(Z)-3-(4-bromfenyl)-4-fenyl-5-(thiofen-2-ylmethylen)furan-2(5H)-on
12		4-fenyl-3-(4-(trifluormethyl)fenyl)furan-2(5H)-on
13		3-(4-bromfenyl)-5-ethyl-4-fenylfuran-2(5H)-on
14		(S)-3-hydroxy-2,3-dihydropyrrolo[2,1-b] chinazolin-9(1H)-on

KÓD	VZOREC	NÁZEV
15		(S)-2-(1,3-dihydroxypropyl)chinazolin-4(3H)-on
16		N,N-dimethyl-2-(chinazolin-4-ylthio) ethanamin
17		1-fenyl-5-*p*-tolyl-1H-tetrazol
18		1-(3,4-dichlorofenyl)-5-*p*-tolyl-1H-tetrazol
19		N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-brombenzamid
20		N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-4-(pentyloxy)benzamid
21		2-(3-methoxyfenyl)-4-(pentylthio)chinazolin
22		4-(hexylthio)-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

KÓD	VZOREC	NÁZEV
23		4-(allylthio)-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
24		4-(benzylthio)-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CH3		2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-ol
CH4		2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol
CH5		4-methoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CH6		2-(3-methoxyfenyl)-4-methylsulfanylchinazolin
CH7		2-(3-methoxyfenyl)-4-propoxychinazolin
CH8		4-isobutoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CH9		4-allyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

KÓD	VZOREC	NÁZEV
CH10		4-benzyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CH11		4-ethoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CH12		2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-amin
CH14		3-benzyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on
CH18		4-benzylaminochinazolin
CH19		4-butylamino-2-(3-methoxyfenyl)-chinazolin
CH20		4-isobutylamino-2-(3-methoxyfenyl)-chinazolin
CH21		4-benzylamino-2-(3-methoxyfenyl)-chinazolin
CH22		2-(3-methoxyfenyl)-4-[2-(piperidin-1-yl)ethylamino]chinazolin

5.4 METODA GENE REPORTER ASSAY

5.4.1 PRINCIP METODY GENE REPORTER ASSAY

Metoda gene reporter assay je založena na vložení reportérového plasmidu, tj. cirkulární DNA, do buňky pomocí lipozomů.

Reportérový plasmid je složen z regulační oblasti a protein kódující oblasti, která v našem případě dává vzniknout luciferáze. Exprese genu je řízena regulační oblastí, se kterou interagují buněčné transkripční faktory. My jsme využili promotor genu CYP3A4, což je cílový gen hCAR. Intenzita exprese je detekována enzymatickou reakcí nebo chemiluminiscenčně.

Do buňky může být dále vložen tzv. expresní plasmid, který se opět skládá z regulační a protein kódující oblasti. Rozdíl mezi expresním a reportérovým plasmidem spočívá v promotoru, kdy expresní plasmid nese promotor viru, který transkripci zahajuje automaticky. Výsledkem jeho exprese je transkripční faktor, který se váže na oblast promotoru reportérového plasmidu. V našem experimentu to je transkripční faktor aktivovaný ligandem, nukleární receptor hCAR.

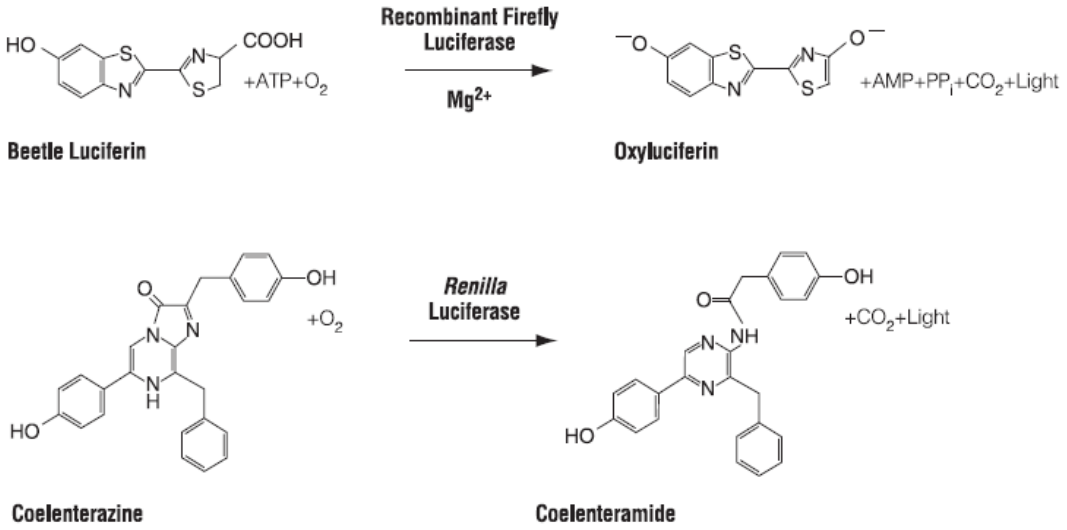
Pro zvýšení přesnosti a detekci případného cytotoxického či proliferativního účinku testovaných látek na buňky se běžně používají tzv. duální reportéry. V takovém případě jsou vloženy do buňky 2 expresní plasmidy, jeden experimentální a druhý kontrolní. K expresi enzymů pak dochází simultánně.

Za předpokladu, že by všechny testované látky měly stejný efekt na buněčnou proliferaci, byl by efekt kontrolního enzymu ve všech jamkách stejný. Výsledky z těchto měření je proto možné použít pro ověření životaschopnosti buněk v prostředí testované látky.

Kontrolní plasmid hraje roli vnitřní kontroly. Normalizace aktivity reportérového plasmidu k aktivitě kontrolního minimalizuje experimentální variabilitu způsobenou nejen rozdíly v buněčné viabilitě, ale i efektivitě transfekce, přesnosti pipetování a efektivitě buněčné lýzy (Promega 2011).

DUAL-LUCIFERASE® REPORTER ASSAY SYSTEM (od firmy Promega)

V tomto systému se využívá schopnosti 2 enzymů, a sice luciferázy označované jako „firefly“ pocházející ze světlušky Photinus pyralis a luciferázy „renilla“ z mořského korálu Renilla reniformis, katalyzovat dekarboxylaci substrátu za vzniku viditelného záření, které je detekovatelné luminometrem (Obr. 12) (Promega 2011).



Obr. 12 Bioluminiscenční reakce katalyzované luciferasami „firefly“ a „renilla“

Převzato z Promega (2011)

První je proměřena aktivita „firefly“ luciferázy z reportérového plasmidu. Do jednotlivých jamek se přidá Luciferase Assay Regent II obsahující luciferin, substrát pro luciferázu „firefly“(Promega 2011).

Po kvantifikaci luminiscence musí být signál pro další měření zhasnut. K tomu se využívá Stop&Glo Reagent, který slouží též k spuštění enzymatické reakce „renilla“ luciferázy. Signál, který toto činidlo vyvolá, je stabilizovaný a pomalu slábne (Promega 2011).

Vzhledem k tomu, že „firefly“ a „renilla“ luciferázy mají odlišný evoluční původ, liší se nejen v struktuře enzymu, ale i v požadavcích na substrát. Tato rozdílnost umožňuje selektivní rozlišení jejich aktivity (Promega 2011).

„Firefly“ luciferáza je monomerní protein, který ke své aktivitě nevyžaduje posttranslační modifikaci. Emise fotonu je dosaženo během dekarboxylace luciferinu v reakci vyžadující ATP, Mg^{2+} a O_2 (Obr. 12). Výsledkem je záblesk, který rychle slábne (Promega 2011).

„Renilla“ luciferáza též nevyžaduje k funkci posttranslační modifikaci. Substrátem je pro ni koelenterazin (Obr. 12), který se vyznačuje nízkou hladinou autoluminiscence, která při nízké koncentraci enzymu může výsledky zkreslovat. Dual-luciferase reporter assay system společnosti Promega svým složením tuto autoluminiscenci tlumí na nedetekovatelnou mez (Promega 2011).

TRANSFEKCE

Základem genových reportérových metod je transfekce, tj. vnesení nukleových kyselin do eukaryotických buněk pomocí lipozomů (Staňková 2009).

Lipozomy jsou dvouvrstevné koloidní částice obsahující kationické lipidy. Na základě elektrostatických interakcí tvoří komplex s nukleovou kyselinou a buněčnou membránou, čímž umožňují inkorporaci nukleové kyseliny do buňky procesem endocytózy (Staňková 2009).

Účinnost transfekce významně ovlivňuje koncentrace DNA a liposomů, poměr nábojů, konfulence, stáří a typ buněk, doba inkubace, přítomnost partikulárních agens (Staňková 2009).

Lipofectamine 2000, který jsme v experimentech použili, je patentovaný preparát firmy Invitrogen vhodný pro transfekci nukleových kyselin do eukaryotických buněk (Invitrogen 2012).

Komplexy DNA-Lipofectamine se mohou přidávat přímo k buňkám v kultivačním médiu. Pro jejich tvorbu je vyžadován poměr DNA (v μg)/ Lipofectamine 2000 (v μl) 1:2 až 1:3 u většiny buněčných linií. V době transfekce je doporučena konfluence buněk 90-95% (Invitrogen 2012).

Pro naředění reagencie Lipofectamine 2000 se doporučuje Opti-MEM I Reduced Serum Medium, které neobsahuje FBS. Při použití sérového média by mohlo dojít k tvorbě komplexů lipozomů se sérovou DNA (Invitrogen 2012).

ZÁSOBNÍ ROZTOKY PLASMIDŮ

pRL-TK: expresní plasmid, obsahuje gen pro „renilla“ luciferázu

pCR3-hCAR: expresní plasmid, obsahuje gen pro hCAR

p(ER6)$_3$-luc: reportérový plasmid, obsahuje: tři ER6 sekvence pro vazbu hCAR z CYP3A4; TATA box (vazebné místo pro RNA polymerasu II.) a gen pro „firefly“ luciferázu

5.4.2 PRACOVNÍ POSTUP METODY GENE REPORTER ASSAY

- Pro experiment jsme si připravili 48-jamkovou destičku s narostlými buňkami o konfluenci přibližně 40-50%, 250 µl kultivačního média/jamku a inkubovali jsme ji 24 hodin při 37°C a 5% CO_2
- Dále jsme si připravili 2 vialky:
- 1. vialka byla určena pro směs DNA a Opti-MEM média, na 1 jamku obsahovala
    - 30 µl Opti-MEM média
    - 250 ng reportérového plazmidu p(ER6)$_3$-luc
    - 50 ng expresního plazmidu pCR3-hCAR
    - 30 ng expresního plazmidu pRL-TK
- 2. vialka byla určena pro směs Lipofectaminu 2000 a Opti-MEM média, na 1 jamku:
    - 30 µl Opti-MEM média
    - 660 ng Lipofectaminu 2000 (k DNA v poměru 2:1)
- Jednotlivé směsi jsme po 5 minutách smíchali a čekali při pokojové teplotě dalších 20 minut než se spontánně vytvoří komplexy liposomů s DNA
- Nakonec jsme vzali připravenou destičku s buňkami, vyměnili médium za čerstvé (200 µl na jamku) a do každé jamky jsme dali 60 µl transfekční směsi
- Destičku jsme inkubovali 24 hodin při 37°C a 5% CO_2
- Po 24 hodinách jsme odstranili médium, do každé jamky přidali 100 µl zásobního roztoku testované látky v kompletním kultivačním médiu (DMEM, FBS, NEAA)
- Jako negativní kontrolu jsme použili 1‰ v/v DMSO, následovala 24 hodinová inkubace při 37°C a 5% CO_2

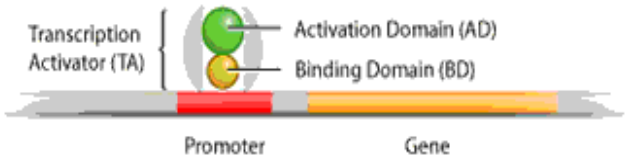
- Destičku jsme opláchli sterilním PBS zahřátým na 37°C, přidali 100µl Passive lysis buffer do každé jamky a destičku jsme nechali zmrznout. Vzniklé krystaly lyzovaly buňky
- Z každé jamky jsme přenesli 40 µl lyzátu na 96-jamkovou destičku a přidali 30 µl Luciferase Assay Reagentu II (Luciferase Assay Buffer + Luciferase Assay Substrat)
- Vzniklou chemiluminiscenci jsme proměřili na destičkovém spektrofotometru/ luminometru Genios Plus (Tecan)
- Dále jsme si připravili Stop&Glo Reagent, a to ze Stop&Glo Substrate 50x a Stop&Glo Buffer v poměru 1:50, na jamku jsme této směsi nanesli 25 µl
- Vzniklou chemiluminiscenci jsme opět proměřili na destičkovém spektrofotometru/ luminometru Genios Plus (Tecan)

5.5 METODA TWO-HYBRID ASSAY

5.5.1 PRINCIP METODY TWO-HYBRID ASSAY

Two-hybrid systém umožňuje charakterizovat interakce mezi dvěma proteiny v buněčném prostředí (např. interakce mezi nukleárním receptorem a koaktivátorem) (Promega 2007)

Transkripce reportérového genu je aktivována transkripčním faktorem, který se naváže do jeho regulační oblasti. Tento faktor se skládá ze dvou domén se specifickou funkcí, a sice z DNA vázající domény (BD), která se váže na promotor, a z aktivační domény (AD), která interaguje s RNA polymerázou II (Obr. 13) (Sobhanifar a Long 2003)



Obr. 13 Transkripční faktor a jeho domény

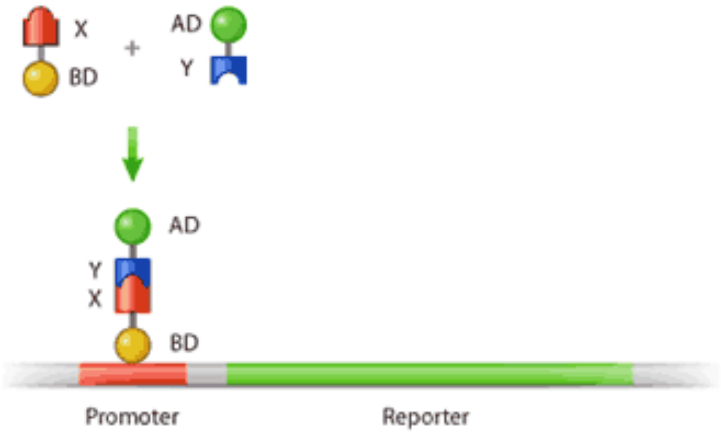
Transkripční faktor je složen ze 2 domén, BD je schopna vázat DNA v oblasti promotoru a AD interaguje s RNA polymerázou II. **AD**: aktivační doména; **BD**: doména vázající DNA

Převzato z: Sobhanifar a Long (2003)

Spojení těchto dvou domén je nezbytné pro správnou funkci transkripčního faktoru. Není však nezbytné, aby byly součástí stejného proteinu (Sobhanifar a Long 2003).

Metoda two-hybrid assay je založena na fúzi 2 proteinů, kdy každý nese jednu doménu. X-protein je nosičem BD při jeho N-konci a Y-protein zas nese aktivační doménu (Obr. 14) (Sobhanifar a Long 2003).

Fúzní proteiny jsou do buňky transfekovány pomocí expresních plazmidů, které vstupují do procesu transkripce a translace. Pokud X-protein interaguje s Y-proteinem, vzniká funkční transkripční faktor, který aktivuje transkripci reportérového genu, jehož produkt je detekovatelný (Obr. 14). Exprese tohoto genu je tedy měřítkem interakce mezi proteiny (Sobhanifar a Long 2003).



Obr. 14 Schématické znázornění fúze 2 proteinů tvořící two-hybrid assay

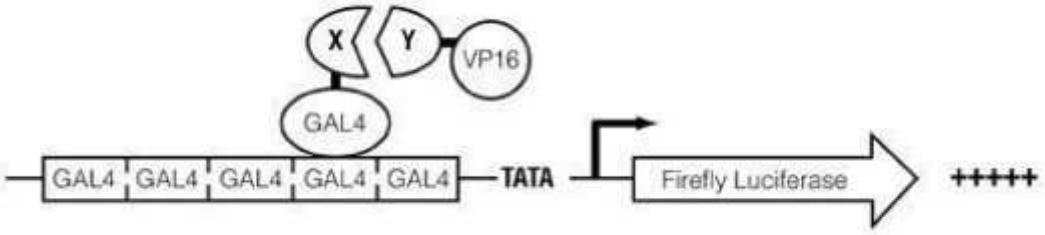
Protein X nese BD; protein Y aktivační doménu. Spojením těchto dvou proteinů vzniká funkční transkripční faktor, který aktivuje transkripci reportérového genu. **BD**: DNA vázající doména; **AD**: aktivační doména

Převzato z: (Sobhanifar a Long 2003)

Two-hybrid systém tvoří 3 různé plasmidy, 2 expresní a 1 reportérový. Jeden z expresních plasmidů kóduje protein-X a DNA vázající doménu a druhý Y-protein a aktivační doménu. Třetí plasmid, reportérový, nese 4-5 vazebných míst pro BD, za kterými následuje sekvence TATA a reportérový gen, který kóduje detekovatelný protein, v našem případě luciferázu „firefly“ (Promega 2009)

Obvyklé uspořádání two-hybrid systému je takové, že BD tvoří GAL4 protein, transkripční aktivátor ze Saccharomyces cerevisiae, a jeho vazebnými místy na reportérovém plasmidu jsou UASG (upstream activation sequence of GAL). Aktivační doména je v podobě VP16 proteinu viru herpes simplex (Obr. 15) (Promega 2009, Trčka 2008).

V našem experimentu jsme využili interakce mezi ligand vázající doménou hCAR (X-protein) a jeho koaktivátorem SRC1 (Y-protein). Míra této spolupráce je přímo závislá na přítomnosti ligandu CAR.



Obr. 15 Reportérový plasmid a aktivace transkripce přes vazbu expresních plasmidů

BD doména X-proteinu je tvořena GAL4 ze Sacharomyces cerevisiae, aktivační doména Y-proteinu zas VP16 z viru Herpes Simplex. Po navázání X proteinu, resp. GAL4 na jeho vazebná místa v regulační oblasti reportérového plasmidu a po spojení proteinů X a Y dojde k tvorbě funkčního transkripčního faktoru, který zahájí transkripci reportérového genu. Vzniklá luciferáza katalyzuje dekarboxylaci luciferinu a tvoří tak světelný záblesk, který je detekovatelný luminometrem.

Převzato z: Promega (2009)

ZÁSOBNÍ ROZTOKY PLASMIDŮ

pGL5-luc: reportérový plazmid, obsahuje pět vazebných míst GAL4 a reportérový gen pro „firefly luciferázu“

VP16-SRC-1: expresní plazmid, obsahuje gen pro VP16 a gen pro koaktivátor SRC-1

pGAL4-hCAR-LBD: expresní plazmid, obsahuje gen pro GAL4, gen pro LBD hCAR a gen pro kontrolní luciferázu „renilla“

5.5.2 PRACOVNÍ POSTUP METODY TWO-HYBRID ASSAY

- Pro experiment jsme si připravili 48-jamkovou destičku porostlou buňkami o přibližné konfluenci 40-50%, s 250 μl kultivačního média/jamku a inkubovali jsme ji 24 hodin při 37°C a 5% CO_2
- Dále jsme si připravili 2 vialky:
- 1. vialka byla určena pro směs DNA a Opti-MEM média, na 1 jamku obsahovala
    - 30 μl Opti-MEM média
    - 200 ng reportérového plazmidu pGL5-luc
    - 100 ng expresního plazmidu pGAL4-hCAR-LBD
    - 100 ng expresního plazmidu VP16-SRC-1
- 2. vialka byla určena pro směs Lipofectaminu 2000 a Opti-MEM média, na 1 jamku:
    - 30 μl Opti-MEM média
    - 800 ng Lipofectaminu 2000 (k DNA v poměru 2:1)
- Jednotlivé směsi jsme po 5 minutách smíchali a čekali při pokojové teplotě dalších 20 minut než se spontánně vytvoří komplexy liposomů s DNA
- Nakonec jsme vzali připravenou destičku s buňkami, vyměnili médium za čerstvé (200 μl na jamku) a do každé jamky jsme dali 60 μl transfekční směsi
- Destičku jsme inkubovali 24 hodin při 37°C a 5% CO_2
- Po 24 hodinách jsme odstranili médium, do každé jamky přidali 100 μl zásobního roztoku testované látky v kompletním kultivačním médiu (DMEM, FBS, NEAA)
- Jako negativní kontrolu jsme použili 1‰ v/v DMSO, následovala 24 hodinová inkubace při 37°C a 5% CO_2
- Destičku jsme opláchli sterilním PBS zahřátým na 37°C, přidali 100μl Passive lysis buffer do každé jamky a destičku jsme nechali zmrznout. Vzniklé krystaly lyzovaly buňky
- Z každé jamky jsme přenesli 40 μl lyzátu na 96-jamkovou destičku a přidali 30 μl Luciferase Assay Reagentu II
- Vzniklou chemiluminiscenci jsme proměřili na destičkovém spektrofotometru/ luminometru Genios Plus (Tecan)

- Dále jsme si připravili Stop&Glo Reagent, a to ze Stop&Glo Substrate 50x a Stop&Glo Buffer v poměru 1:50, na jamku jsme této směsi nanesli 25 µl
- Vzniklou chemiluminiscenci jsme opět proměřili na destičkovém spektrofotometru/ luminometru Genios Plus (Tecan)

6. VÝSLEDKY

6.1 METODA GENE REPORTER ASSAY

Pomocí metody gene reporter assay jsme otestovali 20 zadaných látek definované struktury o koncentraci 30 μM na buněčné linii LS174T. Použitím expresního plasmidu pCR3-hCAR jsme v buňce zajistili dostatečné množství hCAR pro interakci s testovanými látkami.

Regulační oblast reportérového plasmidu, p$(ER6)_3$-luc, obsahovala vazebná místa hCAR z jeho cílového genu CYP3A4. Díky tomu následná exprese reportérového genu a její intenzita byla přímo závislá na schopnosti testované látky aktivovat hCAR.

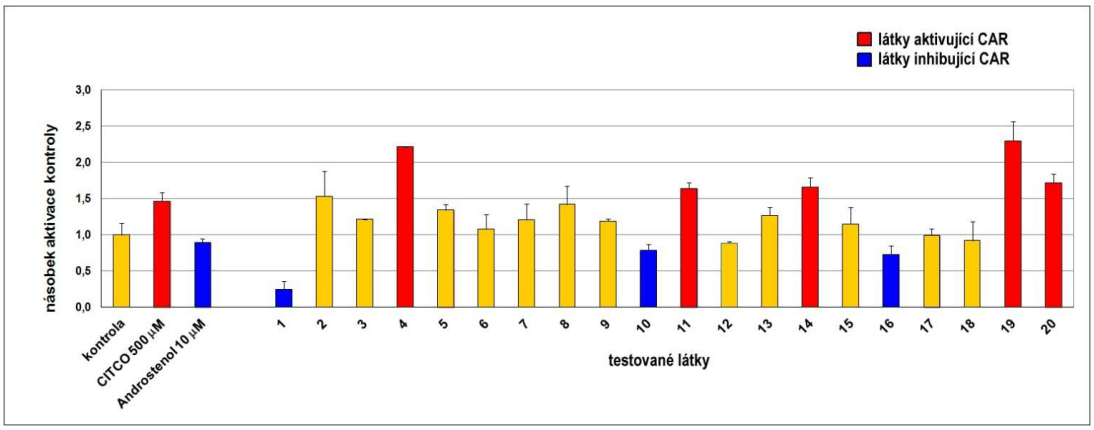
Exprese reportérového genu pro „firefly“ luciferázu byla kvantifikována luminometrem (Obr. 16).

Pro zvýšení přesnosti a pro detekci buněčné proliferace v prostředí testovaných látek jsme využili přítomnost druhého, kontrolního expresního plasmidu, pRL-TK, který nesl gen pro „renilla“ luciferázu.

Pro porovnání v experimentu sloužil přímý ligand hCAR, CITCO v 500μM koncentraci, inversní agonista hCAR, androstanol v 10μM koncentraci a jako kontrola 0,1% v/v roztok DMSO, a to vždy v kompletním DMEM médiu.

Buněčná kultura LS174T byla inkubována v prostředí testovaných látek 24 hodin při teplotě 37°C a 5% CO_2.

Po kvantifikaci luminiscencí vyvolaných „firefly“ a „renilla“ luciferázou byly příslušné hodnoty u jednotlivých látek dány do poměru a porovnány se stejným poměrem kontrolního roztoku 0,1% v/v DMSO. Výsledky byly zaneseny do grafu (Obr. 16).



Obr. 16 Test interakce látek s hCAR na buněčné linii LS174T

Aktivace reportérového plasmidu $(ER6)_3$-luc byla analyzována v buněčné linii LS174T. Těmto buňkám byl také tranferován expresní plasmid pCR3-hCAR a jako kontrolní pRL-TK. Testovaným látkám v koncentraci 30 µM byly vystaveny 24 hodin. Měřítkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscencí „firefly“ a „renilla“ luciferáz u dané látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly 0.1% v/v DMSO.

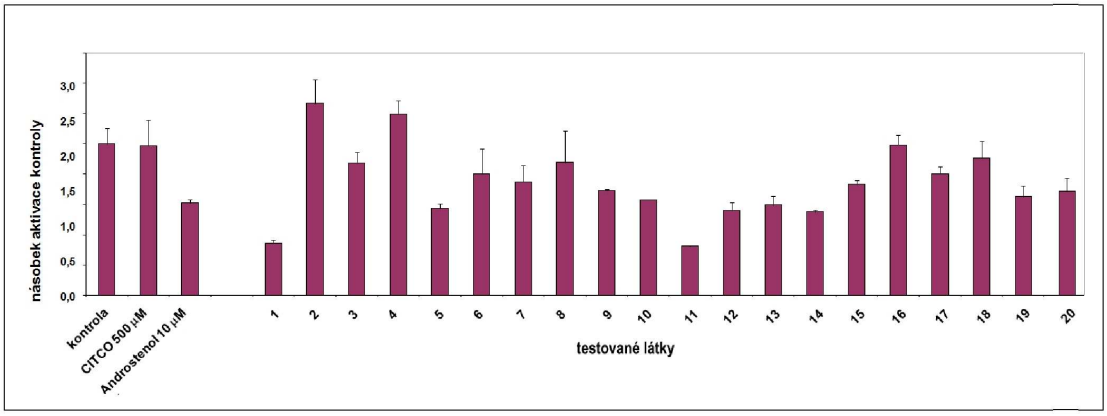
U látek č. 4, 11, 14, 19 a 20 jsme pozorovali zvýšenou aktivitu reportérového genu vyvolanou navázáním hCAR do jeho regulační oblasti oproti specifickému agonistovi hCAR, CITCO.

Metodou gene reporter assay není možné specifikovat typ aktivace, tedy zda proběhla přímým navázání látky na hCAR či látka „pouze“ translokovala receptor do jádra.

Z toho důvodu můžeme látky označené červeně na obrázku 16 označit „pouze“ za aktivátory hCAR. Obzvlášť zajímavá byla reakce buněk LS174T na látky č. 4 a 19.

Pro specifikaci vlivu testovaných látek na viabilitu a proliferaci buněk jsme data získaná kvantifikací luminiscence vyvolané „renilla“ luciferázou zanesli do samostatného grafu (Obr. 17). Jak je patrno, pouze látky č. 2 a 4 zvýšily v porovnání s kontrolním roztokem DMSO životaschopnost buněk.

Vzhledem k antiproliferativním až toxickým vlastnostem většiny látek v dané koncentraci a vzhledem k výraznému aktivačnímu potenciálu látky č. 4, byla tato sloučenina podrobena dalším experimentům.



Obr. 17 Vliv testovaných látek na viabilitu LS174T buněk

V tomto grafu je zaznamenána pouze aktivita „renilla“ luciferázy, která koreluje s proliferací/viabilitou buněk exponovaných 24 hodin testovaným látkám v koncentraci 30 µM. Případný antiproliferativní/toxický účinek látek byl posuzován vzhledem ke kontrolnímu vzorku 0,1% v/v DMSO.

6.2 METODA TWO-HYBRID ASSAY

Metoda two-hybrid assay byla zvolena k prokázání přímé vazby testovaných látek s hCAR, resp. s jeho lignad vázající doménou (LBD).

Otestovali jsme takto 20 látek a to v koncentracích 5 µM, 10 µM a 20 µM.

Látky označené kódem CH jsou deriváty 4-(ethylsulfonyl)-2-(3-methoxyfenyl) chinazolinu (č. 4 v metodě gene reporter assay). Buněčná kultura HepG2 byla inkubována v prostředí těchto látek 24 hodin při teplotě 37°C a 5% CO_2.

Princip two-hybrid assay je založen na fúzi dvou proteinů, kdy každý nese jednu funkční doménu transkripčního faktoru. Spojení domén je nezbytné pro plnou funkčnost faktoru a následnou aktivaci transkripce reportérového genu. V našem experimentu byl reportérovým plasmidem pGL5-luc, který nesl gen pro „firefly“ luciferázu.

Do buněk jsme dále vpravili 2 expresní plasmidy, pGAL4-hCAR-LBD a VP16-SRC-1, které automaticky produkovaly LBD hCAR a SRC-1 (koaktivátor CAR).

Spojením těchto proteinů vznikl onen funkční transkripční faktor. Nezbytná proto však byla změna konformace LBD, kterou vyvolal navázaný ligand.

Expresí konstruktu pGAL4-hCAR-LBD vznikla LBD spojená s GAL4 proteinem, jehož vazebná místa se nacházela v regulační oblasti plasmidu pGL5-luc.

V situaci, kdy testovaná látka byla ligandem hCAR, došlo k jejímu navázání na LBD, k spojení s SRC-1 a k navázání tohoto komplexu ke GAL4 vazebným místům. Následná aktivace transkripce vedla k vzniku „firefly“ luciferázy a k dekarboxylaci luciferinu. Vyvolaný světelný záblesk jsme detekovali luminometrem.

Intenzita záblesku přímo odpovídala schopnosti testované látky navázat se na LBD hCAR.

Pro zvýšení přesnosti a pro detekci buněčné proliferace v prostředí testovaných látek jsme využili duální systém s „renilla“ luciferázou. Vzhledem k tomu, že gen pro tento enzym byl umístěn v konstruktu pGAL4-hCAR-LBD, odpadla nutnost přidávat 4. plasmid. Navíc díky vlastní promotorové oblasti bylo množství „renilla“ luciferázy závislé pouze na viabilitě buněk, nikoli na vazbě ligandu.

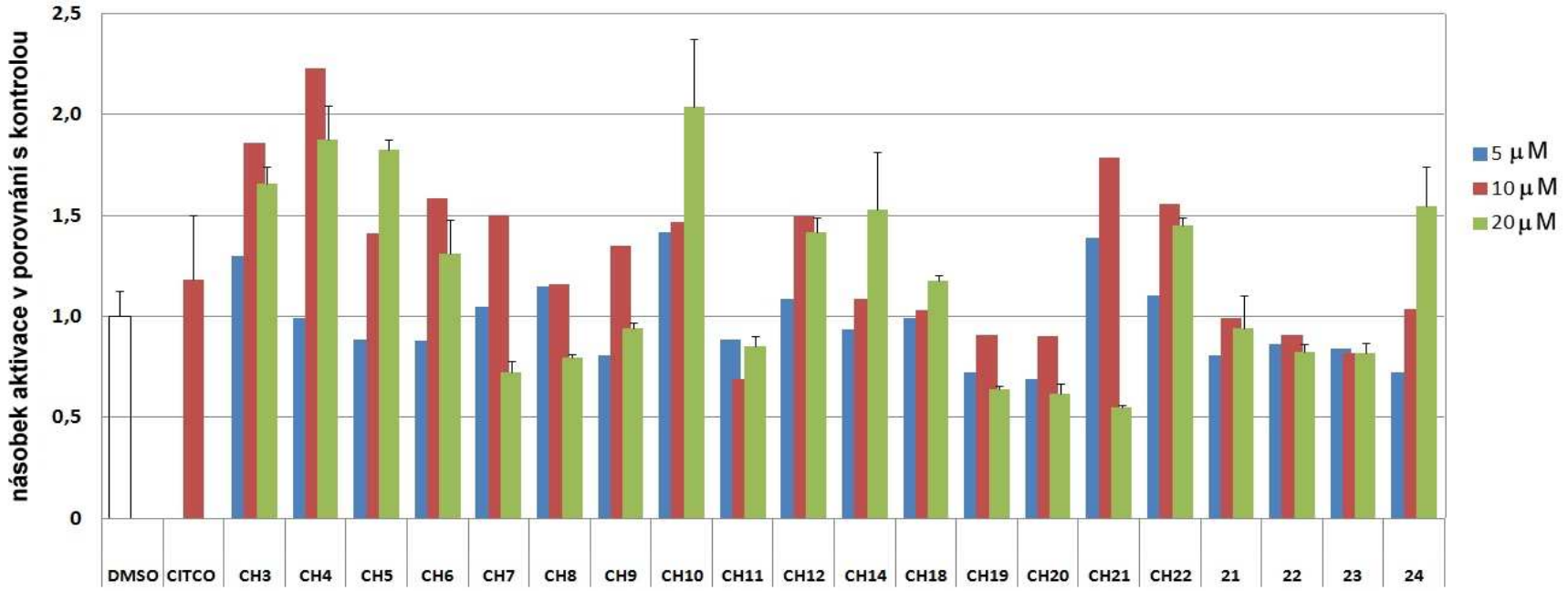
Pro srovnání ligandové aktivity jsme zvolili CITCO v koncentraci 1 μM, jako kontrola sloužil 0,1% v/v roztok DMSO v kompletním DMEM médiu.

Po kvantifikaci luminiscencí vyvolaných „firefly“ a „renilla“ luciferázou jsme stejně jako u metody gene reporter assay příslušné hodnoty u jednotlivých látek dali do poměru a porovnali se stejným poměrem kontrolního roztoku 0,1% v/v DMSO. Výsledné hodnoty jsme zanesli do grafu (Obr. 18).

Na dávce závislý účinek jsme pozorovali u látek CH5, CH10, CH14, CH18 a 24. Látky CH5 a CH10 vykazovaly vyšší transkripční aktivitu až od koncentrace 20 μM. Látka CH18 nedosáhla požadované aktivity ani v nejvyšší použité koncentraci.

Výrazný nárůst aktivity v nižších koncentracích je viditelný u látek CH3 a CH4. Pokles v koncentraci 20 μM může být způsoben schopností těchto látek snižovat viabilitu buněk.

Zajímavý nárůst aktivity způsobený látkou CH21 v koncentraci 10 μM je silně zastíněn výraznou cytotoxicitou ve vyšších koncentracích.



Obr. 18 Testování interakce derivátů látky č. 4 s hCAR na buněčné línii HepG2

Aktivace reportérového plasmidu pGL5-luc byla analyzována v buněčné linii HepG2, která byla zároveň transferována expresními plasmidy pGAL4-hCAR-LBD a pVP16-SRC-1. Expozice testovanými látkami v koncentracích 5 µM, 10 µM a 20 µM trvala 24 hodin. Měřítkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscencí „firefly“ a „renilla“ luciferáz u dané látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly 0.1% v/v DMSO.

7. DISKUSE

Xenobiotické receptory pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR) představují dva důležité členy rodiny ligandem aktivovaných nukleárních receptorů NR1I. Svou aktivitou regulují řadu genů zapojených do všech aspektů biotransformace léčiv zahrnující oxidativní metabolismus, konjugaci a transport.

Aby mohly tyto receptory pracovat jako xenosenzory, musí disponovat širokou škálou strukturně odlišných ligandů. V porovnání s klasickými steroidními receptory disponují unikátní hydrofobní kapsou vázající ligand, která je větší a flexibilnější, což může velkou měrou přispět k jejich široké substrátové specifitě (Timsit a Negishi 2007).

Prvním a dosud nepřekonaným specifickým ligandem lidského CAR je CITCO. Maglich a kolegové (2003) charakterizovali tuto sloučeninu jako vysoce selektivní a velmi účinnou v aktivaci CAR cestou nukleární translokace.

Tzameli a kolegové (2000) narazili ve svých experimentech na druhý, specificky působící ligand. Sloučenina 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen, zkráceně označovaná jako TCPOBOP, působila v závislosti na dávce jako přímý agonista, který byl schopen soutěžit s inhibičním účinkem inverzního agonisty, androstanolu. Jak ukázaly další studie, tato látka bohužel vykazuje svůj specifický účinek pouze s myším ortologem CAR.

V roce 2004 Huang a kolegové publikovali studii, která se zabývala testováním interakce myšího a lidského CAR s antiemeticky působící látkou meklizin. Zjistili, že meklizin vystupuje jako přímý ligand myšího a inversní agonista lidského CAR. Navýšení transkripční aktivace bylo na dávce závislé. Pro své experimenty využili transgenní myši, které exprimovali lidský CAR, a jejich primární hepatocyty. Zjistili, že meklizin potlačil transkripční aktivaci cílových genů CAR, která byla stimulovaná fenobarbitalem.

Vzhledem k tomu, že struktura LBD domén receptoru CAR se druhově liší, liší se i jejich substrátová specifita. Výsledky, které vychází z experimentů na zvířecích modelech, musí být proto ověřeny na modelech lidských. Prvním krokem jsou určitě modely transgenních myší, které exprimují hCAR a vykazují tak humanizovanou odpověď na sloučeninu.

CAR je schopen vázat řadu rozličných sloučenin. Kromě již zmíněné vysoce afinitní struktury CITCO, váže i 5β-pregnan-3,20-dion a klotrimazol. Efekt těchto látek je však odlišný. 5β-pregnan-3,20-dion je ligandem-aktivátorem, klotrimazol zas ligandem-inversním agonistou. Tyto dvě sloučeniny se liší i ve své afinitě k receptoru. Zatím co polovinu maximálního účinku vykazuje klotrimazol v koncentracích 50-1000 nM (Maglich 2003), 5β-pregnan-3,20-dion vyžaduje koncentraci vyšší, a sice 670-3000 nM (Moore 2000). Jeho afinita k receptoru CAR je tedy nižší.

Problematika nízké afinity k receptoru doprovází řadu ligandů. Nalezení vysoce afinitní specifické sloučeniny by velmi usnadnilo identifikaci chemické struktury zodpovědné za aktivaci CAR a definitivní pochopení funkce tohoto receptoru v lidském organismu.

Cílem této práce bylo studovat interakce 40 látek s receptorem CAR. Vzhledem k tomu, že výsledky nejsou podloženy statistickou analýzou, lze je využít jako inspiraci k dalším experimentům. Pro porovnání s již definovanými ligandy by bylo zajímavé prověřit např. u látky 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol (CH4) závislost účinku na dávce a to v koncentracích menších než 10 μM, případně stanovit její EC50.

Současný výzkum se nesoustředí jen na hledání ligandů. Vzhledem k tomu, že CAR na rozdíl od klasických jaderných receptorů nevyžaduje vždy pro svou aktivaci ligand, vytvořili Dussault a kolegové (2002) trojrozměrný model CAR, aby tak prohloubili pochopení molekulární podstaty této činnosti. Důležité strukturální rysy též ověřili v mutační analýze. Během experimentů došli k závěru, že motivy, které usnadňují aktivitu receptoru závislou na ligandu, jsou stejné jako ty, které zajišťují jeho konstitutivní aktivitu. V souvislosti s tím vyvstává otázka, jakým způsobem by bylo možné udržet tyto motivy v aktivní konformaci i za nepřítomnosti ligandu a transaktivovat tak cílové geny receptoru CAR.

Vzhledem k tomu, že PXR a CAR transaktivují geny pro CYP3A4, CYP2B6 a izoformy podrodiny CYP2C, které se velkou měrou podílejí na metabolismu léčiv, mohou jejich agonisti a antagonisti výrazně zasáhnout do farmakokinetických a farmakodynamických vlastností spolupodávaných léčiv. Nejen toto je důvod, proč se PXR a CAR staly atraktivními cíli výzkumu a vývoje nových léčiv.

Lahtela a kolegové (1984) ve svých studiích zjistili, že léčba fenobarbitalem u pacientů s diabetem mellitus II. typu jednoznačně vedla k zvýšení citlivosti na insulin a k celkovému zlepšení glukozóvého a lipidového metabolismu. Agonisté CAR se mohou též uplatnit při léčbě cholestázy, pro kterou je charakteristická zvýšená hladina bilirubinu v krvi.

8. ZÁVĚR

Cílem této experimentální diplomové práce bylo prověření interakce nově syntetizovaných látek s lidským CAR. Pomocí metody gene reporter assay a two-hybrid assay jsme otestovali na buněčných kulturách HepG2 a LS174T celkem 40 látek v různých koncentracích.

Metoda two-hybrid assay byla zvolena jako dostatečně citlivá pro ověření přímé aktivace receptoru navázáním jeho ligandu. Výběr buněčných linií HepG2 a LS174T ovlivnil fakt, že tyto kultury nevykazují vlastní expresi hCAR.

Díky tomu bylo možné za přímé ligandy hCAR s výraznou transkripční aktivitou označit dvě látky, a sice 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol resp. -ol působící v koncentraci 10 μM.

Je nezbytné tyto výsledky v budoucnu podrobit statistické analýze, která tak přesně definuje validitu dat.

Experimenty byly prováděny na izolovaných buněčných kulturách. Pro další výzkum by bylo velice zajímavé tyto látky otestovat in vivo/ex vivo použitím transgenních myší, které by ve svém genomu obsahovaly lidský ortolog receptoru CAR.

9. LITERATURA

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Základy buněčné biologie. 2nd ed. Ústí nad Labem: Espero Publishing,2005:257-75
- Chang TKH. Activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines. *AAPS J*. 2009;11(3):590-601
- di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med*. 2009;30(5):297-343
- Dussault I et al. A structural model of the constitutive androstane receptor defines novel interactions that mediate ligand-independent activity. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(15):5270-80
- Ficková D, Vlček J, Topinková E. Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích. *Remedia* 2002;12(3):207-13
- Gao J, Xie W. PXR and CAR at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(12):2091-5
- Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2003;55:649-73
- Huang W, Zhang J, Wei P, Schrader WT, Moore DD. Meclizine is an agonist ligand for mouse constitutive androstane receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR. *Mol Endocrinol*. 2004;18(10):2402-8
- Invitrogen. Lipofectamin ® 2000 Reagent. Manual 2012
- Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004; 41(1):41-78
- Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2009:55
- Knejzlík Z, Káš J, Ruml T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. listy* 2000;94(10):913-8
- Konno Y, Negishi M, Kodama S. The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(1):8-13

- Lahtela JT, Särkkä P, Sotaniemi EA. Phenobarbital treatment enhances insulin mediated glucose metabolism in man. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1984; 44(2):215-26
- Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. Biochemie pro studující medicíny II. díl. Praha: Karolinum, 2004:397-402
- Lynch T. Cytochrom P450, jeho vliv na metabolismus léčiv, jejich působení, interakce a nežádoucí účinky. *Medicína po promoci* 2007;8(6):28
- Maglich JM et al. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem*. 2003; 278(19):17277-83
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(20):11285-90
- Moore LB et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem*. 2000;275(20):15122-7
- Nakata K et al. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in phase I, II and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006; 21(6):437-57
- Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci*. 2011;120:49-75
- Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001:133-224
- Pávek P, Červený L, Mičuda S, Štaud F, Novotná-Čečková M, Fendrich Z. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* 2005;15(4-5):406-9
- Promega. CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System. Technical manual 2009
- Promega. Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Technical manual 2011
- Promega. Protein interaction guide. 2007

- Pustylnyak VO, Gulyaeva LF, Lyakhovich VV. Induction of cytochrome P4502B: role of regulatory elements and nuclear receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 2007;72(6):608-17
- Sigma-Aldrich. Fundamental techniques in cell culture laboratory handbook. 2nd ed. 2010:64
- Sobhanifar S, Long J. The yeast two hybrid assay: an excercise in experimental eloquence. 2003; [Internet][citováno:2012-05-02][http://www.scq.ubc.ca/the-yeast-two-hybrid-assay-an-exercise-in-experimental-eloquence/]
- Sonoda J et al. Pregnane X receptor prevents hepatorenal toxicity from cholesterol metabolites. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005;102(6):2198-203
- Staňková Ingrid. Příprava transgenních buněčných línií a jejich analýza. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2009:53
- Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. listy* 1999;93(4):229-37
- Swales K, Negishi M. CAR, driving into the future. *Mol Endocrinol*. 2004; 18(7):1589-98
- Tien ES, Negishi M. Nuclear receptors CAR and PXR in the regulation of hepatic metabolism. *Xenobiotica* 2006;36(10-11):1152-63
- Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 2007; 72(3):231-46
- Tzameli I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol.* 2000;20(9):2951-8
- Vejražka M. Buněčné kultury. [Internet] [citováno: 2012-05-02] [http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf]
- Wada T, Gao J, Xie W. PXR a CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(6):273-79
- Wang et al. A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor and constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J Biol Chem*. 2003;278(16):14146-52

- Wang H, LeCluyse EL. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(15):1331-57
- Winnicka K, Sosnowska K, Wieczorek P, Sacha PT, Tryniszewska E. Poly(amidoamine) dendrimers increase antifungal activity of clotrimazole. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(7):1129-33
- Yao R et al. Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J Agric Food Chem.* 2010;58(4):2168-73