

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

STUDIUM INTERAKCÍ VYBRANÝCH ANTHOKYANIDINŮ  
S FARNESOIDNÍM X RECEPTOREM

Diplomová práce

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

Hradec Králové, 2013

Jana Jeřábková

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

.....

Děkuji Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a poskytnutí odborných materiálů.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Jana Jeřábková

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

Název diplomové práce: Studium interakcí vybraných anthokyanidinů s farnesoidním X receptorem

Lidský farnesoidní X receptor (FXR) patří do superrodiny nukleárních receptorů, které vystupují jako ligandy-aktivované transkripční faktory. FXR se váže do specifických regulačních oblastí DNA a spouští expresi řady cílových genů. Tyto regulované geny se účastní metabolismu a transportu žlučových kyselin, udržení homeostázy krevních lipidů, lipoproteinů, glukózy a dále se podílí na udržení střevní bakteriální rovnováhy, hepatoprotekci a regeneraci jater. V popředí zájmu současných studií je testování řady ligandů FXR pro léčbu a prevenci mnoha onemocnění jako je cholestáza, onemocnění cholesterolemými žlučovými kameny, steatohepatitida, dyslipidémie, ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, rakovina jater a další formy rakoviny, např. karcinom prsu. My jsme se v této experimentální diplomové práci zaměřili na testování potenciálních ligandů lidského farnesoidního X receptoru ze skupiny přírodních rostlinných barviv anthokyanidinů (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin) za použití lidské hepatomové buněčné linie HepG2. Cytotoxický účinek jednotlivých anthokyanidinů jsme testovali pomocí metody CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, negativní vliv na buněčnou aktivitu se neprojevil. Pro prokázání interakcí studovaných látek s lidským farnesoidním X receptorem jsme využili molekulárně biologických metod gene reporter assay a one hybrid assay. Na základě našich výsledků předpokládáme, že peonidin, delphinidin a cyanidin jsou ligandy-agonisté lidského farnesoidního X receptoru. Tyto naše výsledky by mohly nastínit budoucí potenciální význam peonidinu, delphinidinu či cyanidinu v léčbě a prevenci řady onemocnění.

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Jana Jeřábková

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

Title of diploma thesis: Interaction of selected anthocyanidins with farnesoid X receptor

Human farnesoid X receptor (FXR) is a member of nuclear receptor superfamily that act as ligand-activated transcription factors. FXR binds to specific regulatory DNA regions and induces expression of many target genes. These regulated genes are involved in bile acid metabolism and transport, maintaining blood lipids, lipoproteins and glucose homeostasis and also contribute to maintain intestinal bacterial balance, hepatoprotection and liver regeneration. The interest of recent studies is to test the range of FXR ligands for treatment and prevention of many diseases such as cholestasis, cholesterol gallstone disease, steato-hepatitis, dyslipidemia, atherosclerosis, type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, liver cancer and other forms of cancer such as breast cancer. In this experimental diploma thesis we are focused on testing of potential ligands of human farnesoid X receptor from the group of natural plant pigments anthocyanidins (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin and petunidin) using the human hepatoma cell line HepG2. The cytotoxic effect of anthocyanidins was tested using the CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, negative effects on cellular activity has not been observed. To demonstrate the interaction of the studied compounds with human farnesoid X receptor we used molecular biological methods gene reporter assay and one hybrid assay. Based on our results, we assume that peonidin, delphinidin and cyanidin are the ligands-agonists of human farnesoid X receptor. These our results could outline the potential importance of peonidin, delphinidin and cyanidin in the treatment and prevention of many diseases.

## Obsah

1. Seznam zkratek .....	8
2. Úvod .....	13
3. Teoretická část .....	14
3.1. Nukleární receptory .....	14
3.2. Farnesoidní X receptor .....	19
3.2.1. Obecně o farnesoidním X receptoru .....	19
3.2.2. Struktura a isoformy .....	20
3.2.3. Dimerizace .....	23
3.2.4. Koaktivátory .....	24
3.2.5. Vazba na DNA .....	25
3.2.6. Exprese v tkáních .....	26
3.2.7. Regulace exprese farnesoidního X receptoru .....	27
3.2.8. Ligandy .....	27
3.2.9. Cílové geny .....	38
3.3. Anthokyanidiny .....	50
3.3.1. Chemická struktura .....	50
3.3.2. Výskyt a použití .....	52
3.3.3. Význam .....	54
4. Cíl práce .....	55
5. Experimentální část .....	56
5.1. Materiál .....	56
5.1.1. Buněčná linie HepG2 .....	56
5.1.2. Pomůcky, přístroje .....	56
5.1.3. Reagencie .....	57
5.2. CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay .....	58
5.2.1. Princip .....	58
5.2.2. Pracovní postup .....	60
5.3. Gene reporter assay .....	60
5.3.1. Princip .....	60
5.3.2. Pracovní postup .....	65
5.4. One hybrid assay .....	67
5.4.1. Princip .....	67
5.4.2. Pracovní postup .....	71

5.5. Statistická analýza dat .....	72
6. Výsledky.....	73
6.1. CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay .....	73
6.2. Gene reporter assay .....	74
6.3. One hybrid assay .....	77
7. Diskuze.....	79
8. Závěr .....	82
9. Literatura .....	83

## 1. Seznam zkratk

6-ECDCA	kyselina 6-ethyl-chenodeoxycholová
ABC	ATP-binding cassette
ABCG5	ATP-binding cassette protein G5
ABCG8	ATP-binding cassette protein G8
ABCG5/ABCG8	heterodimerní membránový transportér cholesterolu ABCG5/ABCG8
AD	aktivační doména
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AMP	adenosinmonofosfát
ANOVA	analýza rozptylu
AP-1	activator protein 1
ApoA-I	apolipoprotein A-I
ApoC-II	apolipoprotein C-II
ApoC-III	apolipoprotein C-III
ASBT	apical sodium-coupled bile salt transporter
ATP	adenosintrifosfát
BACS	bile acid-CoA synthetase
BAT	bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase
βRARE	responzivní element RARβ
BSEP	exportní pumpa pro žlučové kyseliny (bile salt export pump)
C3	complement 3
CA	cholová kyselina
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
cDNA	kódující (komplementární) DNA
COX-2	cyklooxygenáza 2
CYP3A4	cytochrom P450 isoforma 3A4
CYP27A1	cytochrom P450 isoforma 27A1
CYP7A1	cytochrom P450 isoforma 7A1
CYP7B1	cytochrom P450 isoforma 7B1
CYP8B1	cytochrom P450 isoforma 8B1



DBD	DNA-vazebná doména
DCA	deoxycholová kyselina
DHEAS	dehydroepiandrosteronsulfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DR	přímá repetice (direct repeat)
DR-1	přímá repetice oddělená 1 párem bází
DR-2	přímá repetice oddělená 2 páry bází
DR-5	přímá repetice oddělená 5 páry bází
EcR	receptor pro ekdyzon
EcRE	responzivní element EcR
ER	evertovaná repetice (everted repeat)
ER-8	evertovaná repetice oddělená 8 páry bází
ER $\alpha$	estogenní receptor $\alpha$
ER $\beta$	estogenní receptor $\beta$
FGF15	fibroblastový růstový faktor 15 (fibroblast growth factor 15)
FGF19	fibroblastový růstový faktor 19 (fibroblast growth factor 19)
FGFR4	receptor pro fibroblastový růstový faktor 4 (fibroblast growth factor receptor 4)
FXR/RXR	heterodimer receptorů FXR a RXR
FXR/RXR $\alpha$	heterodimer receptorů FXR a RXR $\alpha$
FXR	farnesoidní X receptor
FXR $\alpha$ 1	farnesoidní X receptor $\alpha$ 1
FXR $\alpha$ 2	farnesoidní X receptor $\alpha$ 2
FXR $\alpha$ 3	farnesoidní X receptor $\alpha$ 3
FXR $\alpha$ 4	farnesoidní X receptor $\alpha$ 4
FXR $\beta$	farnesoidní X receptor $\beta$
FXRE	responzivní element FXR
GAL4	kvasinkový transkripční faktor GAL4
GR	glukokortikoidní receptor
GST	glutathion-S-transferáza
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HL	hepatická lipáza

hMDR3	lidský gen mnohočetné rezistence k lékům 3 (human multi-drug resistance gen 3)
HNF1 $\alpha$	hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$
HNF4	hepatocyte nuclear factor 4
HNF4 $\alpha$	hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
I-BABP	ileální vazebný protein žlučových kyselin (ileal bile acid-binding protein)
IBAT	ileální transportér žlučových kyselin (ileal bile acid transporter)
IL-18	interleukin 18
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible NO synthase)
IR	invertovaná repetice (inverted repeat)
IR-0	invertovaná repetice oddělená 0 páry bází
IR-1	invertovaná repetice oddělená 1 párem bází
JH-III	juvenilní hormon III
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LBD	ligand-vazebná doména
LCA	lithocholová kyselina
LRH-1	jaterní receptorový homolog 1 (liver receptor homolog 1)
LRHRE	responzivní element LRH-1
LXR $\alpha$	liver X receptor $\alpha$
LXR $\beta$	liver X receptor $\beta$
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MDR2	gen mnohočetné rezistence k lékům 2 (multi-drug resistance gen 2)
MDR3	gen mnohočetné rezistence k lékům 3 (multi-drug resistance gen 3)
MED1	mediator complex subunit 1
mMDR2	myší gen mnohočetné rezistence k lékům 2 (mouse multi-drug resistance gen 2)
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	messenger (informační, mediátorová) RNA
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolinum
MYTG	insert čtyř aminokyselin v hinge oblasti
NAD <sup>+</sup>	oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid

NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NADPH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NR	nukleární receptor
NTCP	sodík-dependetní taurocholátový kotransportní protein (natrium-taurochlorat cotransporting polypeptide)
OATP8	organic anion transporting polypeptide 8
Opti-MEM	médium se sníženým obsahem séra
ORI	počátek replikace
OST $\alpha$	organic solute transporter $\alpha$
OST $\alpha$ /OST $\beta$	heterodimer organic solute transporter $\alpha$ a $\beta$
OST $\beta$	organic solute transporter $\beta$
PBS	fosfátový pufr
PEPCK	fosfoenolpyruvátkarboxykináza
PES	fenazin ethosulfát
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$
PLTP	transportní protein pro lipidy (phospholipid transfer protein)
PON1	paraoxonáza 1
PPAR	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor)
PPAR $\alpha$	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory $\alpha$
PPAR $\beta$	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory $\beta$
PPAR $\gamma$	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory $\gamma$
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PP <sub>i</sub>	difosfátový P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup> ion
PR	progesteronový receptor
PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
PXR	pregnanový X receptor
RAR $\alpha$	receptor pro kyselinu retinovou $\alpha$
RAR $\beta$	receptor pro kyselinu retinovou $\beta$
RAR $\gamma$	receptor pro kyselinu retinovou $\gamma$
RE	responzivní element

RIP 14-1	RXR-interacting protein 14-1
RIP 14-2	RXR-interacting protein 14-2
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RXR	retinoidní X receptor
RXR $\alpha$	retinoidní X receptor $\alpha$
RXR $\beta$	retinoidní X receptor $\beta$
RXR $\gamma$	retinoidní X receptor $\gamma$
SDC-1	syndekan-1
SHP	malý heterodimerický partner (small heterodimer partner)
SRC-1	steroid receptor coactivator-1, neboli nuclear receptor coactivator-1
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein 1c
SULT2A1	dehydroepiandrosterone-sulfotransferase
TR $\alpha$	thyroidní receptor $\alpha$
TR $\beta$	thyroidní receptor $\beta$
TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein
UAS	aktivační sekvence
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UGT2B4	UDP-glukuronyltransferáza 2B4
VDR	receptor provitamin D
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě
VLDLR	receptor pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě
Y2H	yeast two-hybrid

## 2. Úvod

V této experimentální diplomové práci se zabýváme potenciálními interakcemi lidského farnesoidního X receptoru (FXR) s ligandy ze skupiny přírodních rostlinných barviv anthokyanidinů (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin).

Lidský farnesoidní X receptor (FXR) patří do superrodiny nukleárních receptorů, které vystupují jako ligandy-modulované transkripční faktory. FXR se ve formě monomeru či heterodimeru s retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) váže do specifických regulačních oblastí DNA a spouští expresi řady cílových genů. Tyto regulované geny se podílí na metabolismu a transportu žlučových kyselin, udržení homeostázy krevních lipidů, lipoproteinů a glukózy. V posledním desetiletí byla studována účast FXR na regulaci genů zapojených do udržení střevní bakteriální rovnováhy, hepatoprotekce a regenerace jater.

Farnesoidní X receptor působí jako senzor pro endogenní žlučové kyseliny a doposud bylo identifikováno okolo 80 sloučenin jak přírodního, tak i syntetického původu, které vystupují jako agonisté či antagonisté FXR receptoru.

Anthokyanidiny jsou rostlinné barevné pigmenty vyskytující se převážně jako glykosidy anthokyany u květů, plodů či listů a propůjčují jim zbarvení od oranžové, přes červené, fialové až po modré. Drogy s obsahem anthokyanidinů jsou využívány jednak pro léčebné účinky, a také jako korigencia barvy. Anthokyanidiny se hojně vyskytují v potravinách, hlavně v ovoci a zelenině, z těchto rostlinných materiálů jsou izolovány a využívány jako potravinářská barviva.

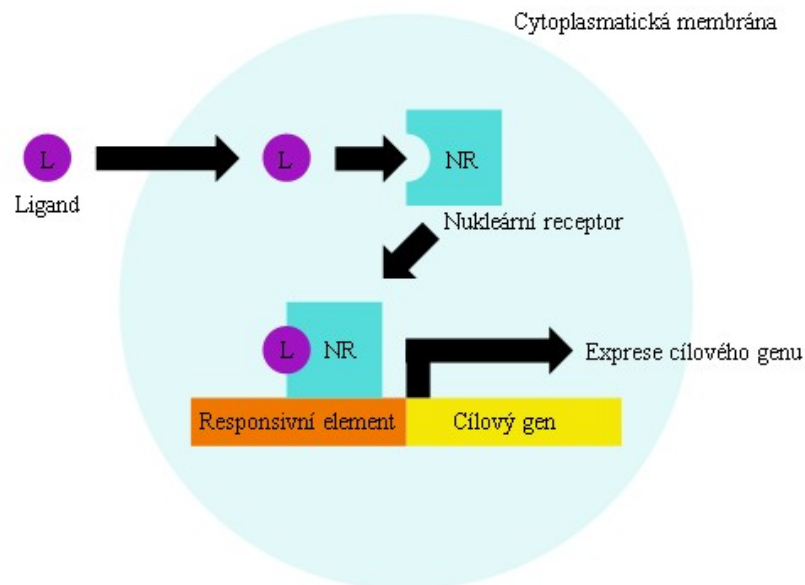
Pozitivní výsledky této experimentální diplomové práce by mohly předznamenat existenci nových ligandů-agonistů lidského FXR receptoru ze skupiny anthokyanidinů a uvést tyto látky do souvislosti s léčbou řady onemocnění jako je triglyceridémie, ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, cholestáza, steatohepatitida, onemocnění cholesterolovými žlučovými kameny či rakovina jater a prsu.

### **3. Teoretická část**

#### **3.1. Nukleární receptory**

Nukleární receptory (NR) tvoří velkou superrodinu ligandy-modulovaných transkripčních faktorů, které se váží do specifických regulačních oblastí DNA a spouštějí expresi cílových genů. Tato superrodina obsahuje 48 členů – lidských nukleárních receptorů (viz Tab. 1). Hrají významnou roli v řadě fyziologických funkcí jako je embryonální vývoj, buněčná diferenciaci, reprodukce, regulace metabolismu, udržení homeostázy řady látek, biotransformace xenobiotik. Vedle normální fyziologie bylo objeveno zapojení nukleárních receptorů do mnoha patologických procesů jako je rakovina, diabetes, ateroskleróza, revmatoidní artritida, astma a hormon-rezistentní syndromy a celá řada dalších onemocnění (Ottow a Weinmann 2008, Pávek et al. 2005, Wang et al. 2008, Zhang et al. 2003).

Jako nukleární receptory se označují proteiny vystupující jako transkripční faktory. Ty se vyskytují v cytoplasmě v inaktivní formě v komplexu s proteiny teplotního šoku, po navázání ligandu se transportují do jádra a váží se na regulační oblast promotoru cílového genu (tzv. responzivní element. RE) v jádře buňky, aktivují transkripci a přepis genetické informace do mRNA (viz Obr. 1). Toto schéma ale neplatí vždy, velká část nukleárních receptorů je konstitutivně navázaná v jádře na DNA i bez přítomnosti ligandu. Je také známo, že mnoho nukleárních receptorů může za nepřítomnosti ligandu vystupovat jako represor genové transkripce. Dále se v průběhu procesu aktivace genové transkripce cílových genů uvolňují korepresorové proteiny a na ligandem-aktivovaný nukleární receptor se váží koaktivátory (Giguere 1999, Ottow a Weinmann 2008, Skálová a Boušová 2011).



**Obr. 1** Schématicky znázorněná vazba specifického ligandu na nukleární receptor (NR). Vzniká aktivovaný transkripční faktor, který se váže na responzivní element a spouští expresi cílového genu.

Nukleární receptory, u kterých dosud nebyl objeven fyziologický ligand, označují jako sirotčí (orphan) nukleární receptory. Předpokládá se, že u většiny z nich fyziologický ligand, který by primárně způsoboval jejich fyziologickou funkci, existuje a po jeho objevení se tyto receptory zařadí mezi tzv. adoptované sirotčí (adopted orphan) nukleární receptory. Dosud není objasněno, zda zatím neobjevený fyziologický ligand skutečně existuje pro všechny sirotčí receptory (Benoit et al. 2006, Ottow a Weinmann 2008, Skálová a Boušová 2011).

Různé malé lipofilní molekuly zahrnující steroidy, retinoidy, tyroidní hormony a vitamin D3 byly izolovány a charakterizovány mnohem dříve, než byly objeveny nukleární receptory a tyto molekuly byly rozpoznány jako jejich ligandy (viz Tab. 1). Jako první byla v roce 1985 popsána primární struktura cDNA kódující lidský glukokortikoidní receptor (GR). Ve stejné době byl naklonován první lidský estrogení receptor (ER). Následující studie vedly k identifikaci lidských tyroidních hormonálních receptorů (TR). S objevem těchto signalizačních drah byla vytvořena nová rodina receptorů, označována jako superrodina steroidních hormonálních receptorů. Později ale bylo objasněno, že ne všechny ligandy jsou steroidy a také biologie těchto receptorů byla hlouběji poznána, a proto bylo pro tuto rodinu přijato označení nukleární receptory. V roce 1987 byl naklonován ptačí receptor pro vitamin D (VDR) a bylo zjištěno, že je strukturně podobný steroidním receptorům. Na základě tohoto zjištění byly uskutečněny další práce s cílem najít další členy této rodiny receptorů. To vedlo k objevení lidského mineralokortikoidního receptoru (MR) a lidského receptoru pro kyselinu retinovou (RAR) (Bunce a Campbell 2010a).

**Tab. 1** Přehled vybraných lidských nukleárních receptorů, systematická nomenklatura genů a jejich endogenní ligandy.

<b>Receptor</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Gen</b>	<b>Endogenní ligand</b>
Thyroidní receptor	TR $\alpha$	<i>NR1A1</i>	Thyroidní hormony
	TR $\beta$	<i>NR1A2</i>	Thyroidní hormony
Receptor pro kyselinu retinovou	RAR $\alpha$	<i>NR1B1</i>	Retinová kyselina
	RAR $\beta$	<i>NR1B2</i>	Retinová kyselina
	RAR $\gamma$	<i>NR1B3</i>	Retinová kyselina
Receptory aktivované peroxizómovými proliferátory	PPAR $\alpha$	<i>NR1C1</i>	Mastné kyseliny, leuktorien B4
	PPAR $\beta$	<i>NR1C2</i>	Mastné kyseliny
	PPAR $\gamma$	<i>NR1C3</i>	Mastné kyseliny, prostaglandin J2
Liver receptor X	LXR $\alpha$	<i>NR1H3</i>	Oxysteroly
	LXR $\beta$	<i>NR1H2</i>	Oxysteroly
Farnesoidní X receptor	FXR $\alpha$	<i>NR1H4</i>	Žlučové kyseliny
	FXR $\beta$	<i>NR1H5</i>	Lanosteroly
Receptor provitamin D	VDR	<i>NR1I1</i>	Vitamin D
Pregnanový X receptor	PXR	<i>NR1I2</i>	Xenobiotika
Konstitutivní androstanový receptor	CAR	<i>NR1I3</i>	Xenobiotika
Retinoidní X receptor	RXR $\alpha$	<i>NR2B1</i>	Retinová kyselina
	RXR $\beta$	<i>NR2B2</i>	Retinová kyselina
	RXR $\gamma$	<i>NR2B3</i>	Retinová kyselina
Estogenní receptor	ER $\alpha$	<i>NR3A1</i>	Estradiol
	ER $\beta$	<i>NR3A2</i>	Estradiol
Glukokortikoidní receptor	GR	<i>NR3C1</i>	Kortizol
Mineralokortikoidní receptor	MR	<i>NR3C2</i>	Aldosteron
Progesteronový receptor	PR	<i>NR3C3</i>	Progesteron

Modifikováno dle: Ottow a Weinmann (2008).

„Z historického hlediska byly jako první receptory ze superrodiny nukleárních receptorů objeveny steroidní receptory, a proto se předpokládalo, že většina, ne-li všechny sirotčí receptory budou mít ligandy charakteru steroidních hormonů. Objev „senzorů“, jako jsou např. receptory aktivované peroxizómovými proliferátory (PPAR, z angl. peroxisome proliferator-activated receptor), farnesoidní X receptor (FXR), liver X receptor (LXR), pregnanový X receptor (PXR) či konstitutivní androstanový receptor (CAR), vedl k přehodnocení tohoto úsudku, protože tyto receptory váží velký počet molekul, často odvozených od endogenních metabolických meziproductů či metabolitů složek potravy. Ty působí, oproti steroidním hormonům, v mnohem vyšších fyziologických koncentracích

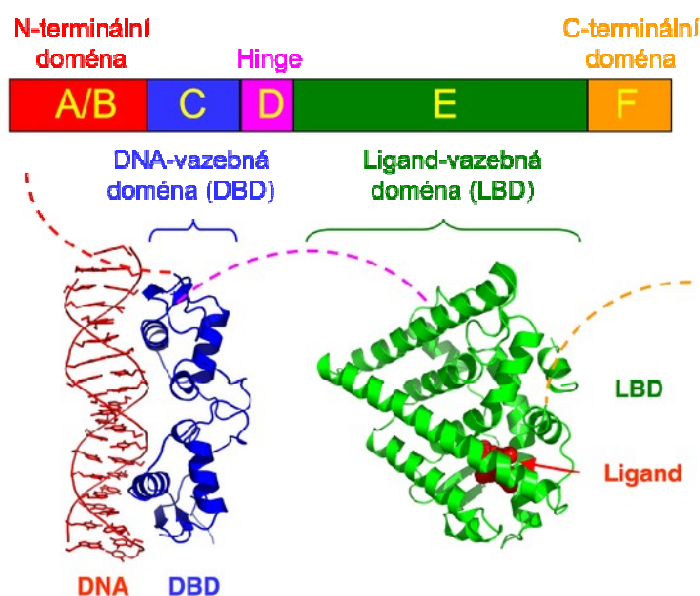


a s výrazně menší afinitou. Aktivita nukleárních receptorů tedy může být modulována nejen hormony, ale i mnohem širším souborem malých molekul.“ (Benoit et al. 2006).

Ty mají lipofilní charakter a snadno procházejí biologickými membránami (Ottow a Weinmann 2008). Tyto proteiny vedly k identifikaci nových signálních drah pro řadu endogenních meziproduktů metabolismu i pro různá xenobiotika, a proto se označují jako senzory, či xenosenzory (Wang et al. 1999).

### Struktura

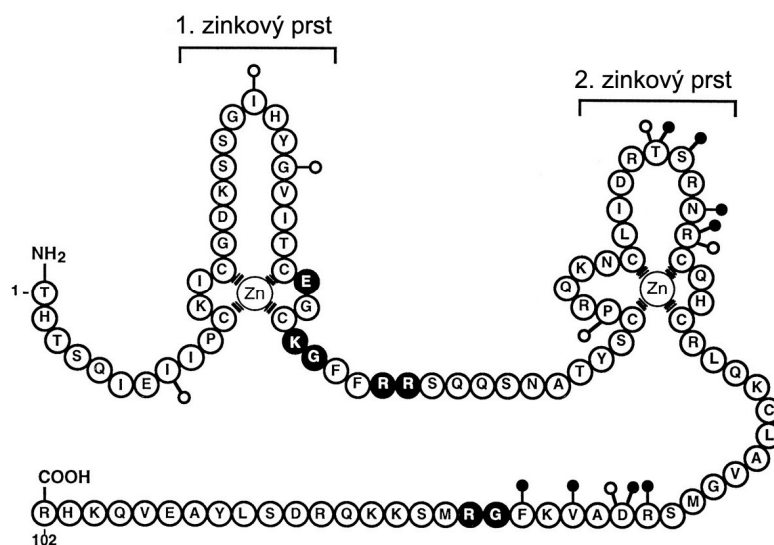
Primární struktura většiny nukleárních receptorů se skládá z pěti funkčních domén různého evolučního původu, které spolu interagují. Jedná se o modulatorovou, neboli N-terminální doménu, DNA-vazebnou doménu (z angl. DNA-binding domain, DBD), závěsnou oblast (hinge), ligand-vazebnou doménu (z angl. ligand-binding domain, LBD) a C-terminální doménu. Označují se písmeny A/B, C, D, E a F ve směru od C-konce k N-konci (viz Obr. 2) (Giguere 1999, Mangelsdorf et al. 1995).



**Obr. 2** Schématické znázornění struktury nukleárních receptorů, na příkladu estrogenního receptoru. Struktura se skládá z pěti domén označovaných písmeny A/B, C, D, E a F. Modifikováno dle: Nuclear Receptor Structure (2013).

DNA-vazebná doména, označovaná jako C region, je vysoce konzervovaná oblast. Rozpoznává specifickou sekvenci promotorové DNA, tzv. responzivní element a zprostředkovává vazbu nukleárního receptoru do tohoto místa. DBD určuje škálu genů, jenž jsou reportovány. DNA-vazebná doména obsahuje osm cysteinových zbytků, ty jsou vždy po čtyřech koordinačně vázány na atom zinku ( $Zn^{2+}$ ) a tvoří tzv. dva zinkové prsty (viz Obr. 3).

Ty jsou tvořeny 66-70 aminokyselinovými zbytky a díky svému tvaru umožňují DBD se orientovat do velkého žlábků dvojšroubovice DNA. První zinkový prst se váže na specifickou sekvenci DNA. Druhý zinkový prst stabilizuje interakce s DNA a umožňuje tvorbu dimerizačních komplexů nukleárních receptorů. Ty se mohou vázat na DNA ve formě monomerů, homodimerů či heterodimerů. Na základě toho se dělí NR na čtyři podskupiny: steroidní receptory, RXR heterodimery, homodimery sirotčích receptorů a monomery sirotčích receptorů (Mangelsdorf et al. 1995). Ve většině heterodimerických komplexů je jedním z vazebných partnerů RXR (Benoit et al. 2006, Giguere 1999, Jacobs et al. 2003, Mangelsdorf et al. 1995, Pávek et al. 2005).



**Obr. 3 Schématické znázornění struktury DNA-vazebné domény nukleárních receptorů.** Čtyři cysteinové zbytky se váží s atomem zinku dva zinkové prsty. Modifikováno dle: Giguere (1999).

Primární funkcí ligand-vazebné domény, označované jako E region, je rozpoznávání a vazba specifických ligandů. Tato doména je vysoce konzervovaná a také multifunkční, neboť vedle vazby ligandů zprostředkovává také dimerizaci, interakci s proteiny teplotního šoku, lokalizaci jádra a má transkripční funkci. Ligand-vazebná doména je ve srovnání s DNA-vazebnou doménou větší, obsahuje okolo 220 aminokyselinových zbytků. Je tvořena z 11-13  $\alpha$ -helixů uspořádaných ve třech vrstvách, jenž tvoří jakousi kapsu, do které se nekovalentně váže ligand a interaguje s aminokyselinovými skupinami LBD. Ligand-dependentní transaktivace je závislá na přítomnosti regionu nazývaného jako aktivační funkce-2 (AF-2), který je lokalizován na C-konci LBD. Jakmile se ligand naváže do kapsy, AF-2 kapsu uzavře, vytvoří styčnou plochu pro ostatní molekuly, které jsou nezbytné pro transkripční aktivitu a dochází ke změně konformace. Zatímco vazbou agonisty dochází ke vzniku aktivní konformace, která může interagovat s koaktivátorem, tak navázání

antagonisty vede ke vzniku nefunkční konformace bránící interakci mezi nukleárním receptorem a koaktivátorem. AF-2 je ligand-dependentní transaktivační doména a hraje důležitou roli v transaktivaci zprostředkovanou pomocí koaktivátorů (Giguere 1999, Glass et al. 1997, Jacobs et al. 2003, Mangelsdorf et al. 1995, Pávek et al. 2005).

N-terminální doména, neboli modulátorová doména nese označení A/B doména. Přejechod mezi A a B regionem není vždy zřetelný. Vykazuje vysokou variabilitu, jak v počtu aminokyselin, tak i v primární sekvenci. Nukleární receptory obecně obsahují dvě transkripční aktivační funkce (AF-1 a AF-2) lokalizované na amino-konci (AF-1) a na karboxy-konci (AF-2). AF-1 umožňuje aktivaci nezávislou na ligandu, může interagovat s buněčnými specifickými koaktivátory (modulačními proteiny), což vede k aktivaci receptorového komplexu (Giguere 1999).

Závěsná oblast tzv. hinge, označovaná jako D region, je vysoce variabilní jak v délce, tak i v primární sekvenci. Jeho hlavní funkcí je spojení DBD a LBD. Poskytuje receptoru flexibilitu, díky níž se DBD může otočit o 180 °, aby mohl vzniknout dimér s jiným receptorem či aby mohlo dojít po navázání ligandu ke změně tvaru a konformace nukleárního receptoru. Současné studie naznačují, že hinge region může sloužit jako styčná plocha pro korepresorové proteiny (Giguere 1999).

C-terminální doména, označovaná jako F region, je krátký variabilní úsek, jehož funkce ještě není zcela objasněna (Weatherman 1999).

Dle fylogenetického vývoje nukleárních receptorů je rozlišováno šest podrodin. Jejich struktury jsou velmi odlišné. Sirotčí receptory tvoří ve skupině lidských nukleárních receptorů téměř polovinu z celkového počtu. Výzkum dosud neobjevených ligandů sirotčích receptorů je výzvou, která může vést k rozluštění nových fyziologicky významných signalizačních drah a cest regulace endokrinního systému (Benoit et al. 2006, Ottow a Weinmann 2008).

## **3.2. Farnesoidní X receptor**

### **3.2.1. Obecně o farnesoidním X receptoru**

Savčí farnesoidní X receptor (FXR) byl poprvé objeven v roce 1995 skupinou Forman et al. (1995), byl izolován z potkaních jater cDNA knihovny. Nezávisle na tom ve stejném roce skupina Seol et al. (1995) izolovala dva myší proteiny, homology potkaního FXR. Byly pojmenovány jako RIP 14-1 a RIP 14-2 (z angl. RXR-interacting protein). Poté byl objeven rovněž lidský farnesoidní X receptor (Laudet a Gronemeyer 2002).

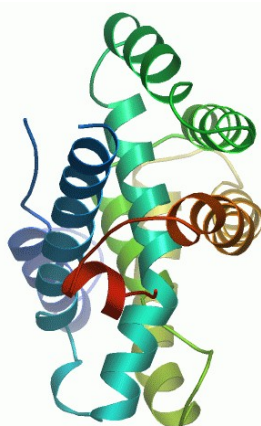
Farnesoidní X receptor byl původně pokládán za sirotčí nukleární receptor, protože jeho endogenní ligand nebyl znám, později se ale ukázalo, že má mnoho endogenních ligandů, z nichž nejvýznamnější jsou žlučové kyseliny. K expresi FXR dochází ve vysoké míře v játrech, střevě, ledvinách a nadledvinkách. Tvoří heterodimerický komplex se svým vazebným partnerem retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) a jeho aktivace je závislá na vazbě specifického ligandu-agonisty. Takto aktivovaný heterodimer či monomer se váže na DNA a reguluje mRNA různých genových transkriptů. Dnes je zřejmé, že FXR je důležitý regulátor metabolických drah žlučových kyselin, cholesterolu, lipidů, lipoproteinů a glukózy (Bunce a Campbell 2010a, Seol et al. 1995, Zhang et al. 2003).

Jsou známy dva geny kódující FXR protein, jejichž produkty jsou dva receptory FXR $\alpha$  a FXR $\beta$ . Lidský gen proteinu FXR $\alpha$  je označován jako *NR1H4* (podrodina nukleárních receptorů 1, skupina H, člen 4) a nachází se na chromozomu 12. Myší a potkaní gen pro FXR $\alpha$  nese označení *Nr1h4*, myší se nachází na chromozomu 10, potkaní na chromozomu 7 (Farnesoid X receptor 2013).

Gen pro lidský pro receptor FXR $\beta$  má název *NR1H5P* (podrodina nukleárních receptorů 1, skupina H, člen 5, pseudogen) a myší a potkaní gen pro FXR $\beta$  je označován jako *Nr1h5* (Farnesoid X receptor- $\beta$  2013).

### 3.2.2. Struktura a isoformy

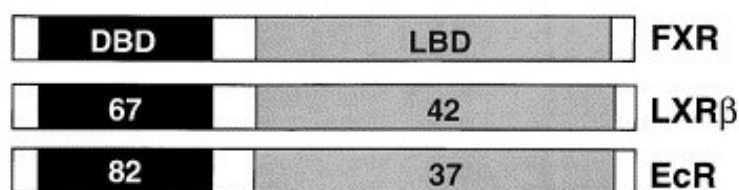
FXR protein má obecnou strukturu (viz Obr. 4), která je společná pro všechny členy superrodiny nukleárních receptorů. Obsahuje N-terminální doménu, DNA-vazebnou doménu, závěsnou oblast (hinge), ligand-vazebnou doménu a C-terminální doménu.



**Obr. 4** Struktura lidského farnesoidního X receptoru určená pomocí rentgenové krystalografie. Převzato z: Protein Data Bank in Europe (2013).

Gen pro FXR je evolučně konzervován a vykazuje vysokou podobnost mezi druhy. Seol et al. (1995), srovnali strukturu tohoto receptoru s ostatními členy superrodiny

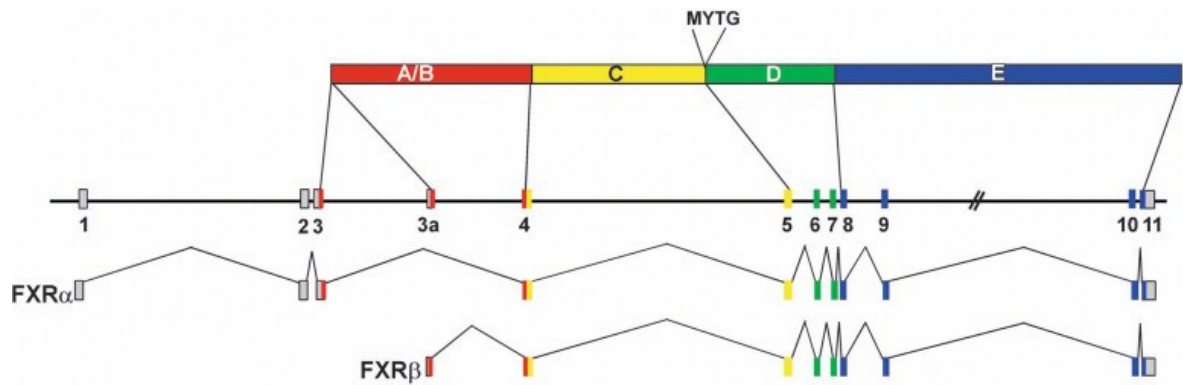
nukleárních receptorů a zjistili, že nejbližší příbuznost má s hmyzím receptorem pro ekdyzon (EcR) a LXR (viz Obr. 5). DNA-vazebná doména FXR vykazuje 67% podobnost aminokyselin s DBD receptoru LXR $\beta$  a 82% identitu s DBD EcR. Stejně tak i ligand-vazebná doména FXR je blízce příbuzná LBD receptoru LXR $\beta$ , aminokyseliny jsou identické ze 42 %. Podobnost s EcR LBD je okolo 37 %. DNA-vazebná i ligand-vazebná doména FXR jsou také velice podobné s dalšími receptory této superrodiny a na základě toho byl FXR zařazen do podskupiny nukleárních receptorů, která také obsahuje VDR, CAR, PXR a LXR (Laudet a Gronemeyer 2002, Seol et al. 1995, Tu et al. 2000, Wang et al. 2008).



**Obr. 5** Procentuálně znázorněná podobnost DNA-vazebné domény (DBD) a ligand-vazebné domény (LBD) farnesoidního X receptoru (FXR) s dvěma nejbližšími příbuznými nukleárními receptory LXR (liver X receptor) a EcR (receptor pro ekdyzon). Modifikováno dle: Tu et al. (2000).

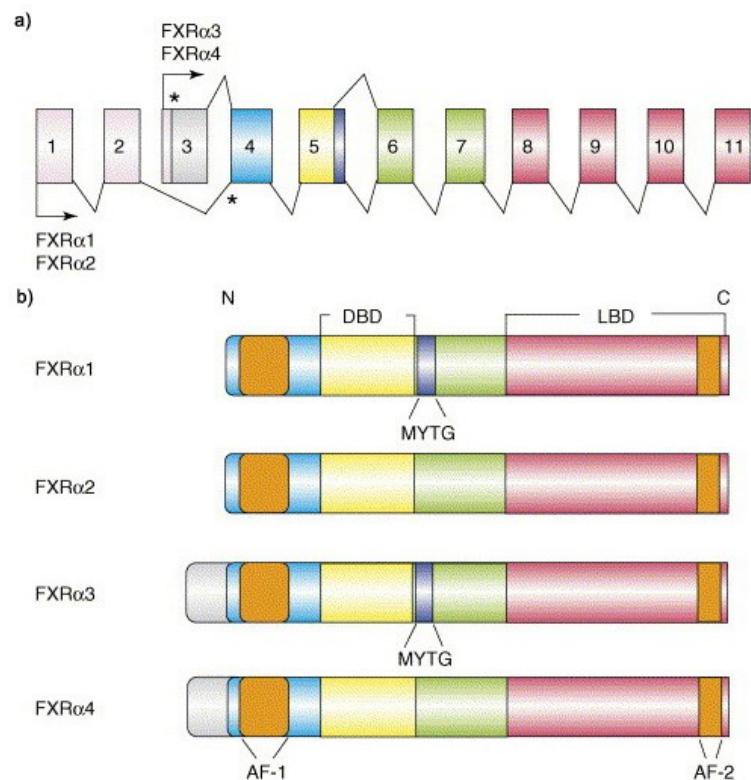
Jsou známy dva lidské geny kódující farnesoidní X receptor, označují se jako *Fxr $\alpha$*  (*NR1H4*) a *Fxr $\beta$*  (*NR1H5P*) a jejich produktem jsou proteiny FXR $\alpha$  a FXR $\beta$ . *Fxr $\alpha$*  je evolučně konzervovaný gen od ryb až po lidi. U myši a lidí se FXR $\alpha$  vyskytuje ve čtyřech isoformách označovaných jako FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3 a FXR $\alpha$ 4. Druhý gen kódující FXR, *Fxr $\beta$*  je identifikován u hlodavců, králíků a psů. Nicméně je to pseudogen u lidí a primátů. FXR $\beta$  je senzorem pro lanosterol, ale jeho fyziologická funkce není stále objasněna (Bunce a Campbell 2010b, Huber et al. 2002, Lee et al. 2006a, Zhang et al. 2003).

Huber et al. (2002) v roce 2002 analyzovali lidský *Fxr* locus, který obsahuje exony s alternativními AUG iniciačními kodony. *Fxr* locus obsahuje 11 exonů s mezerou (z angl. gap) namísto intronu 9 (viz Obr. 6). Lidský *Fxr $\alpha$*  iniciační kodon připadá na 3' konec exonu 3. Exony 1, 2 a 5' konec exonu 3 představují nestranslatovaný region. Lidský receptor FXR $\alpha$  byl srovnán s křeččím FXR $\beta$  receptorem a byl pozorován rozdíl na locusu v protisměru od spojení exonů 3 a 4. Je zde pravděpodobně nedefinovaný exon, který byl označen jako 3a (viz Obr. 6). Díky tomuto rozdílu jsou N-terminální (A/B) domény FXR $\alpha$  a FXR $\beta$  receptorů odlišné (Huber et al., 2002).



**Obr. 6 Schématické znázornění exonové/intronové mapy lidského locus farnesoidního X receptoru (FXR), sestřihu a jednotlivých kódovaných domén FXR.** Zobrazena je exonová/intronová mapa lidského FXR locusu (uprostřed). Symbol // představuje mezeru namísto intronu 9. Barevně jsou znázorněny exony kódující jednotlivé domény A/B, C, D, E proteinu FXR (nahore). Je znázorněn insert čtyř aminokyselin (MYTG) v hinge oblasti. Je znázorněn sestřih lidského FXR $\alpha$  a křeččího FXR $\beta$  (dole). Šedá barva reprezentuje netranslatované regiony. Převzato z: Huber et al. (2002).

Zhang et al. (2003) objasnili, že existují čtyři isoformy lidského FXR $\alpha$  (FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3 a FXR $\alpha$ 4). Jsou odvozené od jednoho genu *Fxr $\alpha$*  a liší se v N-konci a v hinge regionu. Tato odlišnost je dána různorodostí promotorů a alternativním sestřihem exonů 4 a 5, který produkuje čtyři mRNA (viz Obr. 7). Locus *Fxr $\alpha$*  obsahuje 11 exonů, na exonech 1 nebo 3 jsou dva funkční promotory, které iniciují transkripci. Díky tomu obsahují FXR $\alpha$ 3 a FXR $\alpha$ 4 (oproti FXR $\alpha$ 1 a FXR $\alpha$ 2) rozsáhlou N-terminální oblast složenou z 37 aminokyselin, která obsahuje AF-1. FXR $\alpha$ 1 a FXR $\alpha$ 3 obsahují (oproti FXR $\alpha$ 2 a FXR $\alpha$ 4) insert čtyř aminokyselin (MYTG) v hinge oblasti bezprostředně připojené na DBD. Tato odlišnost je dána alternativním sestřihem dvanácti párů bazí na 3' konci exonu 5, který kóduje MYTG motiv (Lee et al. 2006a, Zhang et al. 2003).

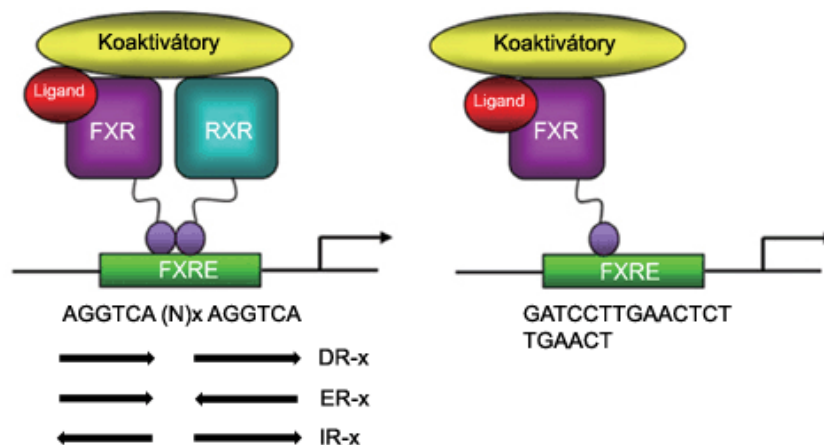


**Obr. 7 Schématické znázornění genu a proteinu lidského farnesoidního X receptoru  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ).** a) Struktura lidského *Fxrα* genu: je znázorněno 11 exonů *Fxrα* genu, na exonech 1 nebo 3 jsou dva funkční promotory, které iniciují transkripci. Alternativní sestřih produkuje čtyři mRNA. Alternativní sestřih 12 párů bazí na 3' konci exonu 5, který kóduje insert čtyř aminokyselin (MYTG) v hinge oblasti je znázorněn tmavě modrou barvou. b) Čtyři isoformy lidského proteinu FXR $\alpha$  (FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3 a FXR $\alpha$ 4). Je znázorněna DNA-vazebná doména (DBD), ligand-vazebná doména (LBD), aktivační funkce 1 (AF-1) a aktivační funkce 2 (AF-2). Převzato z: Lee et al. (2006a).

### 3.2.3. Dimerizace

FXR receptor se může vyskytovat ve formě monomeru, nebo heterodimeru FXR/RXR $\alpha$  (viz Obr. 8). Seol et al. (1995) popsali, že farnesoidní X receptor tvoří heterodimer se svým vazebným partnerem RXR $\alpha$  receptorem a tento heterodimer se váže do FXR responzivního elementu (FXRE) promotoru cílového genu (viz Obr. 8). Interakce FXR s RXR $\alpha$  nevyžaduje DNA vazbu. Farnesoidní X receptor se specificky váže na fúzní protein složený z glutathion-S-transferázy (GST) připojené na RXR $\alpha$ . Dále bylo objasněno, že aktivace tohoto heterodimerického komplexu probíhá v přítomnosti jak ligandů FXR tak i ligandů RXR $\alpha$  (Laudet a Gronemeyer 2002, Seol et al. 1995).

Další potencionální interakce FXR s jinými nukleárními receptory zatím nebyla pozorována (Laudet a Gronemeyer 2002).



**Obr. 8** Schématické znázornění vazby farnesoidního X receptoru (FXR) na responzivní element (FXRE) ve formě heterodimeru s retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) a ve formě monomeru. Responzivní sekvence pro heterodimer jsou DR (přímá repetice), ER (evertovaná repetice) a IR (invetovaná repetice), zatímco monomer má odlišná vazebná místa. Modifikováno dle: Wang et. al (2008).

### 3.2.4. Koaktivátory

Farnesoidní X receptor po navázání ligandu do LBD podstoupí konformační změnu, která zvýší jeho afinitu pro protein koaktivátor, jako je např. koaktivátor SRC-1 (z angl. steroid receptor coactivator-1, označován také jako nuclear receptor coactivator-1) (viz Obr. 9). Vazba koaktivátoru je klíčový krok pro formaci aktivovaného transkripčního komplexu a jeho následné vazby do responzivní oblasti (viz Obr. 8). Wang et al. (1999) poukázali na to, že heterodimerický komplex FXR/RXR neuvolní komplex s koaktivátorem bez ligandu. To značí, že koaktivátor interaguje s nukleárním receptorem ligand-dependentním způsobem a zvyšuje transkripci (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999).

Pro navázání ligandu do LBD dochází prostřednictvím AF-2 (ligand-dependentní aktivační funkce) ke změně konformace, která interaguje s koaktivátorem. U FXR receptoru slouží jako interakční rozhraní mezi molekulou koaktivátoru a AF-2 sekvenčí aminokyselin LXXLL (kdy L označuje leucin a X značí kteroukoliv aminokyselinu) (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999).

Dalšími koaktivátory farnesoidního X receptoru  $\alpha$  jsou např: PPAR $\gamma$ 1A (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), NCOA1 (nuclear receptor coactivator 1), MED1 (mediator complex subunit 1), CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1), PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1) a TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) (Farnesoid X receptor 2013).



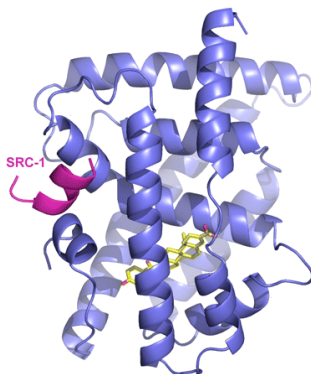
### 3.2.5. Vazba na DNA

Farnesoidní X receptor se ve většině případů váže do svého responzivního elementu (FXRE) promotoru cílového genu jako heterodimer s RXR $\alpha$ , méně často jako monomer (viz Obr. 8).

Heterodimerický komplex rozpoznává několik responzivních elementů a váže se na ně s různou afinitou. Jedná se o šestinukleotidové motivy, které mohou být uspořádány jako: invertovaná repetice IR (z angl. inverted repeat), přímá repetice DR (z angl. direct repeat) a evertovaná repetice ER (z angl. everted repeat) (viz Obr. 8). Invertovaná repetice IR-1 je nejdůležitější vazebná sekvence pro FXR. Je složena z šestinukleotidového středového motivu AGGTCA s palindromickým charakterem, ten je oddělen 1 párem bází. Vyskytuje se např. proti směru genu pro ekdyzon EcR *Drosophily* (EcRE, responzivní element EcR). Dalším responzivním elementem je přímá repetice DR-5 (DR oddělená 5 páry bází), která byla poprvé objevena proti směru genu *RAR $\beta$*  ( $\beta$ RARE, responzivní element RAR $\beta$ ). Další vazba se může uskutečnit na responzivní elementy IR-0 (IR oddělená 0 páry bází), DR-2 (DR oddělená 2 páry bází) a ER-8 (ER oddělená 8 páry bází), ale s mnohem menší afinitou (Bunce a Campbell 2010b, Laudet a Gronemeyer 2002).

FXR se může v některých případech vázat do responzivního elementu jako monomer (Bunce a Campbell 2010b). Jedná se např. o cílový gen pro apolipoprotein A-I, který je regulován prostřednictvím vazby FXR monomeru na DNA (Claudel et al. 2002). Monomerní FXRE je složen z monomerních vazebných míst, které se liší od vazebných míst pro dimerický komplex (viz Obr. 8) (Wang et al. 2008).

Různé isoformy FXR se váží s odlišnou afinitou na FXRE. Rozdíl ve vazebné afinitě může být dán buď odlišností v N-konci nebo přítomností insertu čtyř aminokyselin (MYTG) v hinge oblasti (Seol et al, 1995, Wang et al. 1999, Zhang et al. 2003).



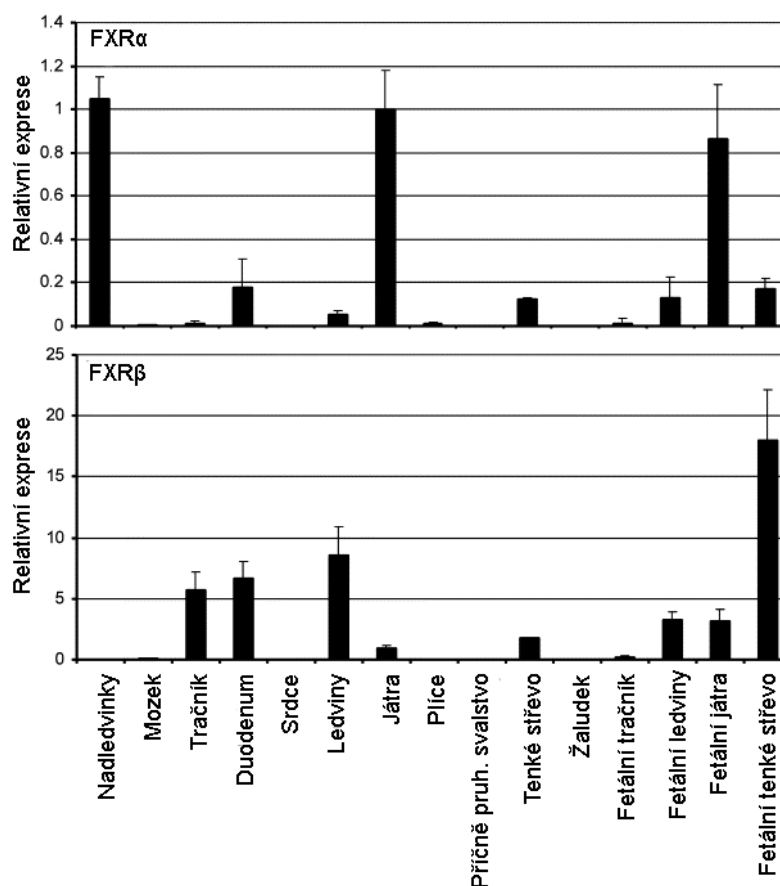
**Obr. 9** Struktura lidského farnesoidního X receptoru v komplexu s ligandem a koaktivátorem. Jako ligand je znázorněn syntetický agonista MFA-1 (vyobrazen žlutou barvou) a koaktivátorem je SRC-1 (steroid receptor coactivator-1). Modifikováno dle: Soisson et al. (2008).

### 3.2.6. Expresa v tkáních

Od nukleárního receptoru se očekává, že bude docházet k jeho expresi ve stejné tkáni, ve které je syntetizován jeho intracelulární metabolický aktivátor. Nejdříve bylo objeveno, že u dospělých krys dochází k expresi FXR v játrech, v ledvinách, střevě a nadledvinkách. Všechny tyto tkáně mají významnou roli v biosyntetických drahách mevalonátu, lze tedy očekávat, že endogenní aktivátor bude mít spojitost právě s touto dráhou (Forman et al. 1995).

Různými metodami bylo zjištěno, že k expresi odlišných isoformů lidského farnesoidního X receptoru, dochází způsobem závislým na tkáni (Zhang et al. 2003).

Expresa lidského FXR $\alpha$  u dospělých lidských tkání je nejvyšší v nadledvinkách a játrech (viz Obr. 10). Duodenum, ledviny a tenké střevo vykazují také signifikantní expresi, ale v 6-18 krát menší míře než játra. Dospělé srdce, příčně pruhované svalstvo a žaludek vykazují velice nízkou expresi. Fetální lidské tkáně – tračník, ledviny, játra a tenké střevo mají téměř identickou hladinu exprese FXR $\alpha$  jako odpovídající dospělé tkáně. K expresi farnesoidního FXR $\alpha$  receptoru dochází také v malé míře i v tukové tkáni, hladké svalovině cév (Huber et al. 2002, Lee et al. 2006a, Wang et al. 2008).



Obr. 10 Expresa lidského farnesoidního X receptoru  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ) a farnesoidního X receptoru  $\beta$  (FXR $\beta$ ) v dospělých a fetálních lidských tkáních. Modifikováno dle: Huber et al. (2002).

Zvýšená exprese farnesoidního X receptoru byla zaznamenána také v patologických tkáních, jako je nádorová tkáň prsu, karcinom jater a spekuluje se o jeho zapojení v rozvoji rakoviny tračníku (Wang et al. 2008).

FXR $\alpha$ 1 a FXR $\alpha$ 2 vykazují mírnou expresi v ileu a nadledvinkách. K hojně expresi FXR $\alpha$ 3 a FXR $\alpha$ 4 dochází v ileu, v menším rozsahu jsou exprimovány v ledvinách a ve velice nízkých hladinách v žaludku, duodenu a jejunu (Wang et al. 2008).

FXR $\beta$  je u dospělých lidských tkání exprimován hlavně v ledvinách, duodenu, tračníku, v tenkém střevu a v játrech (viz Obr. 10). U fetálních lidských tkání dochází k největší expresi v tenkém střevu, v menší míře i v ledvinách a játrech (Huber et al. 2002).

### 3.2.7. Regulace exprese farnesoidního X receptoru

Expese farnesoidního X receptoru může být indukována dlouhotrvajícím hladověním, pravděpodobně prostřednictvím transkripčního faktoru HNF4 $\alpha$  (z angl. hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ) a transkripčního faktoru PGC-1 $\alpha$  (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , tedy PPAR $\gamma$  koaktivátor 1 $\alpha$ ), které zvyšují promotorovou aktivitu FXR genu. PGC-1 $\alpha$  zvyšuje aktivitu FXR dvěma způsoby: jednak zvyšuje hladiny FXR mRNA prostřednictvím koaktivace aktivovaného PPAR $\gamma$  (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) a HNF4 $\alpha$ , což vede ke zvýšení genové transkripce FXR. Druhý způsob spočívá v interakci s DNA-vazebnou doménou FXR a tímto dojde ke zvýšení transkripce cílových genů FXR (Bunce a Campbell 2010b, Zhang et al. 2004).

Je také známo, že HNF1 $\alpha$  (z angl. hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) aktivuje FXR promotor. Dále jsou hladiny mRNA FXR zvýšeny jako odpověď na vysoké hladiny glukózy, ale tento mechanismus není doposud objasněn. Dále hypoxie downreguluje FXR expresi (Bunce a Campbell 2010b).

Navíc vedle transkripční regulace je FXR také posttranslačně modifikován fosforylací proteinkinázou C, což zvyšuje FXR aktivitu. Pro porozumění regulace exprese farnesoidního X receptoru bude zapotřebí dalších prací (Bunce a Campbell 2010b).

### 3.2.8. Ligandy

Doposud bylo identifikováno víc než 80 sloučenin (viz Tab. 2), které by mohly být potenciálními ligandy farnesoidního X receptoru  $\alpha$  s různým stupněm afinity. Největší význam mají endogenní žlučové kyseliny, nicméně bylo objeveno mnoho sloučenin, které

nemají vztah ke žlučovým kyselinám a přesto jsou ligandy FXR $\alpha$ . Jako agonisté FXR $\alpha$  s vysokou afinitou vystupují strukturně různorodé látky: steroidy, aromáty, terpenoidy, alkaloidy a mastné kyseliny. Steroidní struktura je nejvýznamnější, vyskytuje se řady endogenních sloučenin a jejich metabolitů, jako jsou žlučové kyseliny, cholesterol a hormony (Matsubara et. al 2013).

**Tab. 2** Přehled vybraných přírodních a syntetických agonistů i antagonistů farnesoidního X receptoru  $\alpha$ .

<b>Účinek a původ</b>	<b>Skupina látek</b>	<b>Látka</b>	<b>Struktura</b>	
Přírodní agonisté	Farnesol a jeho metabolity	farnesol	terpenoidy	
		juvenilní hormon III	terpenoidy	
	Primární žlučové kyseliny	CA,	steroidy	
		CDCA	steroidy	
	Sekundární žlučové kyseliny	LCA	steroidy	
		DCA	steroidy	
	Metabolity žlučových kyselin	25-hydroxylované žlučové kyseliny	steroidy	
		26-hydroxylované žlučové kyseliny	steroidy	
	Oxysteroly	22R-hydroxycholesterol	steroidy	
	Steroidní hormony	androsteron	steroidy	
		etiocholanolon	steroidy	
		Přírodní rostlinné produkty	forskolin	steroidy
			coumestrol	steroidy
			cafestol	terpenoidy
xanthohumol			aromáty	
marchantin A			aromáty	
marchantin E	aromáty			
ginkgolová kyselina	aromáty			
Syntetiční agonisté	Deriváty žlučových kyselin	6-ECDCA	steroidy	
		5 $\beta$ -cyprinol	steroidy	
		5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina	steroidy	
		methylcholát	steroidy	
		metyldeoxycholát	steroidy	
	Ostatní	GW4064	aromáty	
		GW9047	aromáty	
		AGN29	aromáty	
		fexaramin	aromáty	
		TTNPB	aromáty	
GSK8062	aromáty			

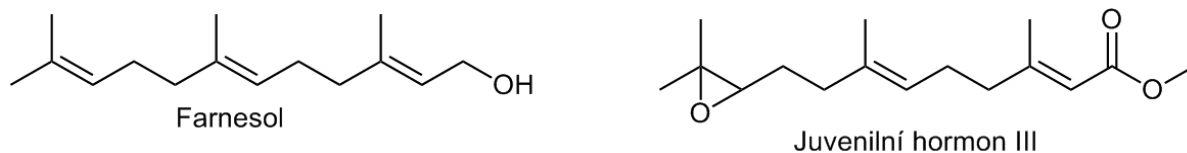
		GSK2324	aromáty
		deriváty pyrazolidin-3,5-dionu	aromáty
		NIHS700	aromáty
		WAY-362450	alkaloidy
		MFA-1	steroidy
	"Glitazony"	froglitazon	alkaloidy
		rosiglitazon	alkaloidy
		pioglitazon	alkaloidy
Přírodní			
antagonisté	Přírodní rostlinné produkty	guggulsteron	steroidy
		stigmasterol	steroidy
		tuberatolidy	terpenoidy
			mastné
	Polynenasycené MK	arachidonová kyselina	kyseliny
			mastné
		dokosaheptaenová kyselina	kyseliny
			mastné
		linolenová kyselina	kyseliny
Syntetické			
antagonisté	Deriváty žlučových kyselin	5 $\alpha$ -bufol	steroidy
		5 $\beta$ -bufol	steroidy
		5 $\alpha$ -cyprinol	steroidy
		lithocholát	steroidy
	Ostatní	AGN34	aromáty
		sulfátované steroidy	steroidy

Vysvětlivky: CA (cholová kyselina), CDCA (chenodeoxycholová kyselina), LCA (lithocholová kyselina), DCA (deoxycholová kyselina), 6-ECDCA (kyselina 6-ethyl-chenodeoxycholová). Modifikováno dle: Matsubara et. al (2013) a Wang et al. (2008).

### *Farnesol a jeho metabolity*

V počátečních studiích z roku 1995 Forman et al. (1995) zjistili, že ligandem potkaního FXR je farnesol (v suprafyziologické koncentraci) a jeho příbuzné metabolity (viz Obr. 11). Tyto látky vykazovaly zvýšení aktivace komplexu FXR/RXR $\alpha$ . Odtud nese tento člen superrodiny nukleárních receptorů své pojmenování jako farnesoidní X receptor. Metabolity farnesolu se tvoří intracelulárně a jsou potřebné pro syntézu cholesterolu, žlučových kyselin, steroidů, retinodů a farnesylovaných proteinů. Jedním z metabolitů farnesolu, který vykazoval aktivitu, je juvenilní hormon (JH-III, viz Obr. 11), jedná se o metabolit farnesyly pyrofosfátu, klíčového prekursoru v biosyntetické dráze mevalonátu. Farnesol a příbuzné molekuly byly rozpoznány jako modulátory transkripce u bakterií i kvasinek a tento výzkum nastínil existenci nové potencionální signální dráhy i u obratlovců (Bunce a Campbell 2010b, Forman et al. 1995, Zhang et al. 2003).

FXR sice byl původně považován jako receptor pro intermediární metabolit farnesol, nicméně pro aktivaci FXR jsou vyžadovány suprafyziologické koncentrace farnesolu, a to brání tomu, aby byl endogenní ligand (Bunce a Campbell 2010b).



**Obr. 11** Chemická struktura farnesolu, ((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimethyldodeka-2,6,10-trien-1-ol) a juvenilního hormonu, JH-III ((2*E*,6*E*)-10*R*-(oxiranyl)-3,7,11-trimethyl-2,6-dodekadienoát).

### Žlučové kyseliny

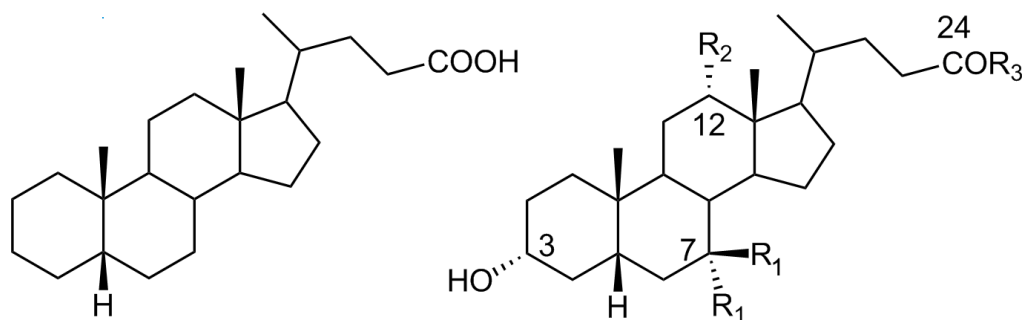
V roce 1999 identifikovalo několik na sobě nezávislých skupin (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999), že k aktivaci FXR dochází pomocí žlučových kyselin, endogenních ligandů ve fyziologických koncentracích. Doposud sirotčí receptor FXR byl ideálním kandidátem na senzor pro žlučové kyseliny, protože je specificky exprimován v játrech, ledvinách a ve střevě, tedy v tkáních důležitých pro funkci žlučových kyselin. Tyto tkáně jsou jednak vystaveny proudu žlučových kyselin a také zde dochází k expresi transportérů žlučových kyselin (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Byla testována řada žlučových kyselin (viz Tab. 3) a bylo objeveno, že se žlučové kyseliny vážou do LBD FXR a aktivují transkripci cílových genů FXR. Největší aktivaci FXR vykazovala primární žlučová kyselina CDCA (chenodeoxycholová kyselina), malou aktivaci CA (cholová kyselina), u sekundárních žlučových kyselin DCA (deoxycholová kyselina) a LCA (lithocholová kyselina) byla aktivace v mnohem menším rozsahu. UDCA (ursodeoxycholová kyselina) byla inaktivní (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Z těchto výsledků vyplývá, že pro aktivaci FXR je u chemické struktury (viz Obr. 12) rozhodující základní stavební kostra (5β-cholan-24-ová kyselina), substituce v polohách 3-, 7- a 12- i stereochemie hydroxylových skupin. V poloze 3- je pro aktivaci FXR preferován keton před α-hydroxy skupinou, 3β-hydroxyskupina má negativní vliv na aktivaci. V poloze 7- pozitivní vliv na aktivaci FXR klesá v tomto pořadí: 7α-hydroxy > 7-keto > 7β-hydroxy. Obecně se tedy dá říct, že 3β-, 7β-, 12β- prostorová orientace hydroxylových skupin snižuje potenciál žlučové kyseliny aktivovat farnesoidní X receptor (Fujino et al. 2004, Wang et al. 1999).

**Tab. 3** Přehled vybraných žlučových kyselin.

Zkratka	Název	Chemická struktura
CA	cholová kyselina	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina
CDCA	chenodeoxycholová kyselina	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina
DCA	deoxycholová kyselina	3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina
LCA	lithocholová kyselina	3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina
UDCA	ursodeoxycholová kyselina	3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina



5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	aktivace FXR
CDCA	$\alpha$ OH	H	+++
CA	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	++
DCA	H	$\alpha$ OH	++
LCA	H	H	+
UDCA	$\beta$ OH	H	-

R <sub>3</sub>	
OH	volná kyselina
NHCH <sub>2</sub> COOH	konjugát s glycinem
NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H	konjugát s taurinem

**Obr. 12 Chemická struktura žlučových kyselin.** Je zobrazena základní stavební kostra (5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina), vybrané žlučové kyseliny (CDCA-chenodeoxycholová kyselina, CA-cholová kyselina, DCA-deoxycholová kyselina, LCA-lithocholová kyselina, UDCA- ursodeoxycholová kyselina) ve formě volné kyseliny, jako konjugát s glycinem či taurinem. Je znázorněna míra jejich aktivace FXR receptoru. Modifikováno dle: Wang et al. (1999).

Další vliv struktury na aktivaci FXR demonstrovala skupina Fujino et al. (2004). Konverzí karboxylové skupiny v poloze 24- na hydroxylovou skupinu u kyselin CA a CDCA vznikly odpovídající alkoholy. Jejich schopnost aktivovat farnesoidní X receptor byl srovnatelný s vlivem původní kyseliny, výhodou je, že dochází k výraznému usnadnění jejich transportu do buňky. Tento objev může vést k navržení nových látek s pozitivním vlivem na homeostázu žlučových kyselin a cholesterolu (Fujino et al. 2004).

CDCA, aktivátor s největším potenciálem, aktivoval jak myší FXR (v koncentraci 50  $\mu$ M), tak i lidský FXR (v koncentraci 10  $\mu$ M). Tyto hodnoty odpovídají fyziologickým

intracelulárním koncentracím *in vivo* (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Wang et al. (1999) popsali, že žlučové kyseliny aktivují pouze FXR podjednotku heterodimeru FXR/RXR. CDCA, LCA, CA ani DCA k této aktivaci FXR nevyžadují žádnou speciální metabolickou konverzi (Parks et al. 1999). Dále bylo objeveno, že aktivace FXR není výsledkem pouze vazby žlučových kyselin, ale i vazby koaktivátorů (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999).

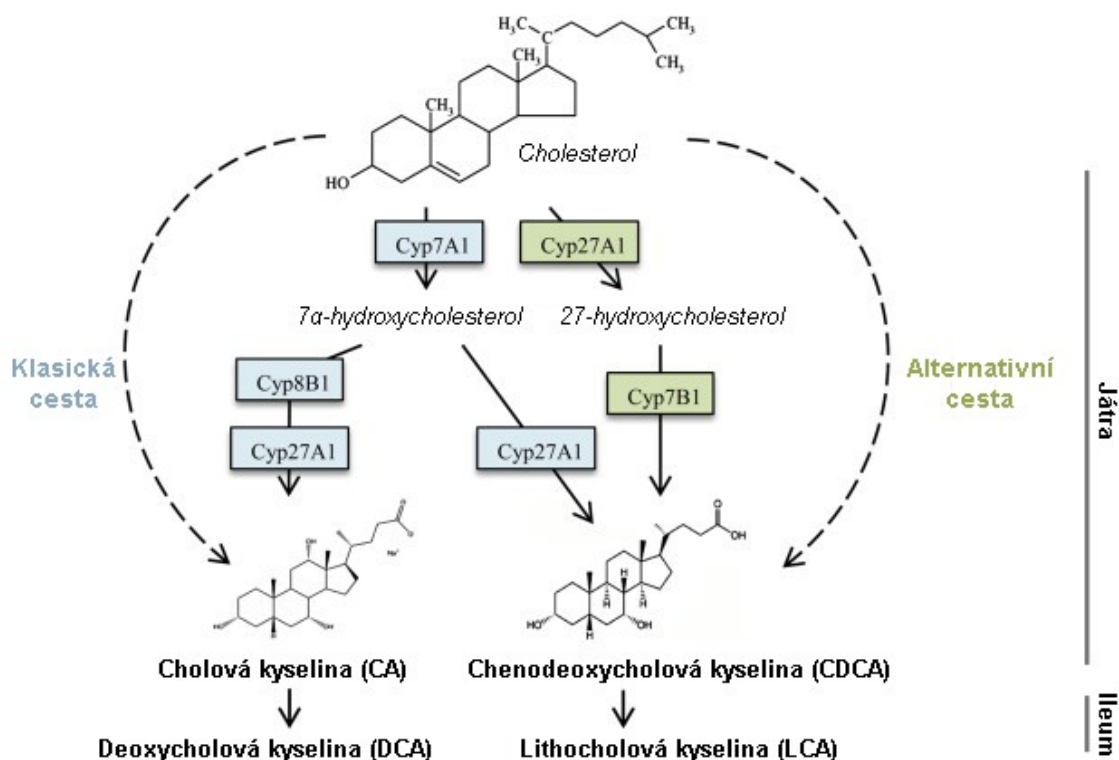
Žlučové kyseliny se nejčastěji nacházejí v konjugaci s glycinem nebo taurinem (viz Obr. 12). Tyto konjugáty jsou hydrofilní sloučeniny, které nepronikají přes buněčné membrány. Proto, pro absorpci těchto konjugovaných derivátů ze střeva, je v buňkách vyžadována přítomnost aktivního ileálního transportéru žlučových kyselin IBAT (z angl. ileal bile acid transporter). Bylo zjištěno, že FXR může být aktivován konjugovanými deriváty pouze ve tkáních, ve kterých dochází k expresi IBAT, jako je terminální ileus, játra a ledviny. Z toho vyplývá, že konjugáty žlučových kyselin reprezentují endogenní ligandy FXR ve tkáních, které exprimují IBAT, zatímco nekonjugované formy mohou mít funkci jako endogenní ligandy ve tkáních, které neexprimují IBAT. Obě formy žlučových kyselin, jak nekonjugované tak i konjugované jsou schopny aktivovat FXR ve fyziologických koncentracích (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

#### *Homeostáza žlučových kyselin a cholesterolu*

Hlavní metabolická dráha eliminace cholesterolu je cesta konverze na žlučové kyseliny (viz Obr 13). Koncové produkty této dráhy jsou primární žlučové kyseliny CDCA a CA, obě jsou produkovány výhradně v játrech, kde mohou být dále metabolizovány konjugací s glycinem nebo taurinem. Tyto žlučové kyseliny jsou vylučovány do střeva, zde podstoupí 7 $\alpha$ -dehydroxylaci zprostředkovanou střevní mikroflórou a jsou konvertovány na sekundární žlučové kyseliny LCA a DCA. Ty jsou dále reabsorbovány v ileu a transportovány zpět do jater cestou portální cirkulace (Huber et al. 2002, Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Pro konverzi cholesterolu na žlučové kyseliny je vyžadováno okolo deseti enzymů, ale „rate limiting“ krok je 7 $\alpha$ -hydroxylace cholesterolu, která je katalyzována enzymem CYP7A1 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxyláza), který představuje klíčový enzym biosyntézy žlučových kyselin (Wang et al. 1999).





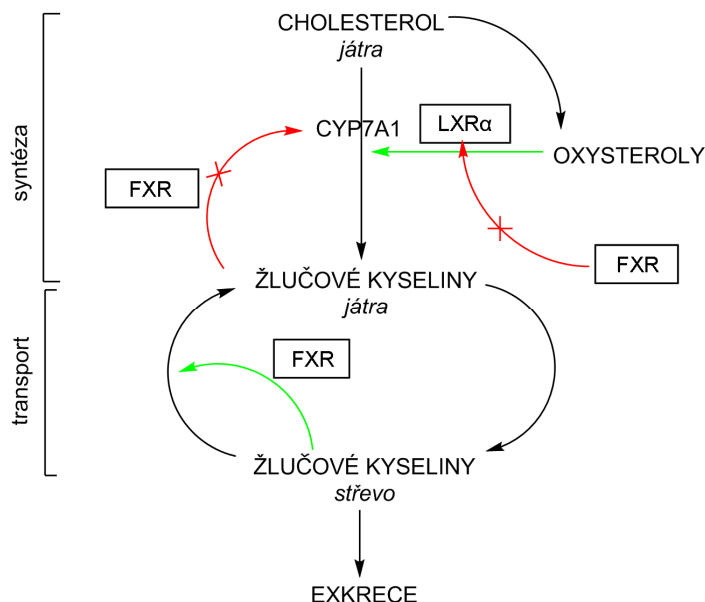
**Obr. 13 Konverze cholesterolu na žlučové kyseliny.** Klasická cesta zahrnuje enzymy CYP7A1, což je „rate limiting“ krok, CYP8B1, CYP27A1 a koncovým produktem této dráhy je primární žlučová kyselina CA. Alternativní cesty se účastní enzymy CYP27A1 a CYP7B1, koncovým produktem je primární žlučová kyselina CDCA. Primární žlučové kyseliny jsou střevní mikroflórou konvertovány na sekundární žlučové kyseliny LCA a DCA. Modifikováno dle: Baptissart et al (2013).

Žlučové kyseliny transkripcí regulují svou vlastní biosyntézu i svůj vlastní enterohepatický transport (viz Obr. 14). Biosyntéza žlučových kyselin je regulována jak přímo, v závislosti na příjmu potravy, tak i mechanismem zpětné vazby. Obě tyto regulační cesty zahrnují kaskádu hormonálních nukleárních receptorů. Přímá regulace, v závislosti na dietě, je zprostředkována pomocí oxysterolů, které vznikají v důsledku akumulace cholesterolu z potravy. Oxysteroly působí na receptor LXR $\alpha$ , který je pozitivním regulátorem transkripce CYP7A1 a tím pádem i pozitivním regulátorem degradace cholesterolu. Zpětná regulace je zprostředkována pomocí žlučových kyselin, které aktivují FXR a to vede k potlačení exprese CYP7A1. Transkripce CYP7A1 je stimulována hromaděním jeho substrátu, tedy cholesterolu (Huber et al. 2002, Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Kromě toho, že žlučové kyseliny regulují svou vlastní syntézu, tak také regulují svůj vlastní transport (viz Obr. 14). Návrat žlučových kyselin ze střeva do jater je usnadněn pomocí specifických vazebných proteinů, které transportují žlučové kyseliny skrz intestinální enterocyty. Jedním z nich je I-BABP, jehož exprese se zvyšuje jako odpověď na žlučové

kyseliny prostřednictvím FXR (Huber et al. 2002, Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Ligandem obsazený FXR také inhibuje transkripční aktivitu receptoru LXR $\alpha$  (viz Obr. 14) (Wang et al. 1999).



**Obr. 14** Schéma transkripční kontroly homeostázy cholesterolu a žlučových kyselin prostřednictvím nukleárních receptorů FXR (farnesoidní X receptor) a LXR $\alpha$  (liver X receptor  $\alpha$ ). Modifikováno dle: Makishima et al. (1999).

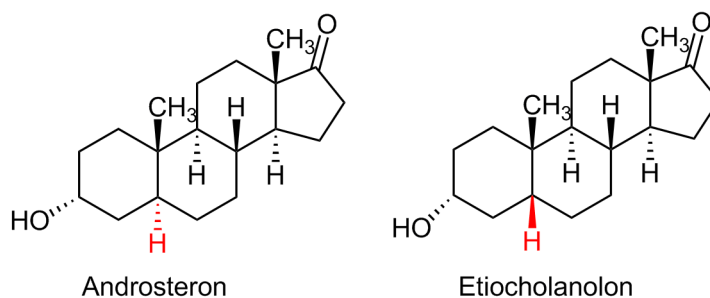
Farnesoidní X receptor a liver X receptor  $\alpha$  mají opačné funkce. LXR $\alpha$  je pozitivní regulátor transkripce CYP7A1 a syntézy žlučových kyselin, zatímco FXR způsobí potlačení exprese CYP7A1 a tím inhibuje syntézu žlučových kyselin. Žlučové kyseliny tedy mají schopnost potlačit svou vlastní syntézu v játrech i snížit syntézu svých transportních proteinů ve střevě prostřednictvím nukleárního receptoru FXR (Huber et al. 2002, Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Objev žlučových kyselin jako endogenních ligandů FXR představoval velký průlom ve výzkumu FXR. Signalizační dráhy zprostředkované FXR a LXR $\alpha$  se staly cílem dalších výzkumů zaměřených na regulaci homeostázy cholesterolu a žlučových kyselin (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

### *Steroidní hormony*

Jelikož v nadledvinkách nebyl objeven fyziologicky významný tok žlučových kyselin, tak se spekuluje o možnosti, že si nadledvinky syntetizují svého vlastního endogenního FXR agonistu. Howard et al. (2000) prokázali, že skutečně existuje endogenní ligand nadledvinkového FXR. Jedná se o steroidní hormony androsteron (5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on,

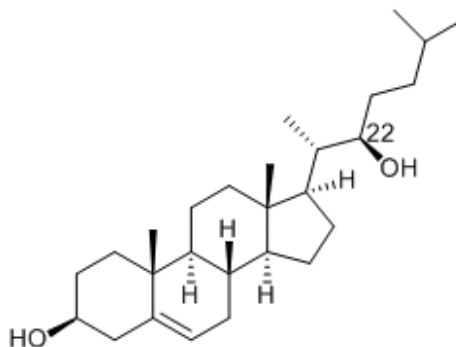
viz Obr. 15) a etiocholanolon (5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, viz Obr. 15), které slabě aktivují farnesoidní X receptor. Fyziologický význam tohoto jevu čeká na objasnění (Howard et al. 2000, Lee et al. 2006a).



**Obr. 15 Chemická struktura endogenních agonistů farnesoidního X receptoru: androsteronu (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on) a etiocholanolonu (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on).**

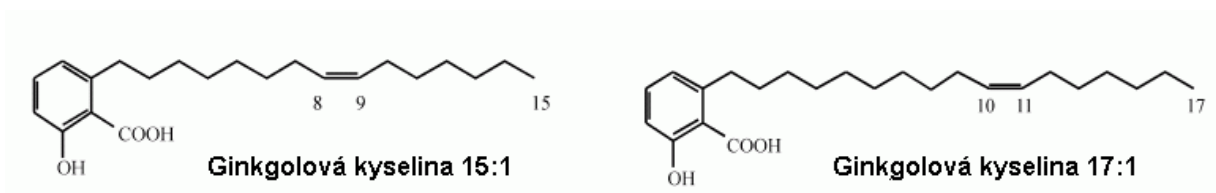
#### *Další přírodní agonisté*

Přirozeným ligandem FXR je i oxysterol 22R-hydroxycholesterol (viz Obr.16). Nicméně fyziologické důsledky jeho aktivace FXR zatím nejsou zcela objasněny (Bunce a Campbell 2010b).

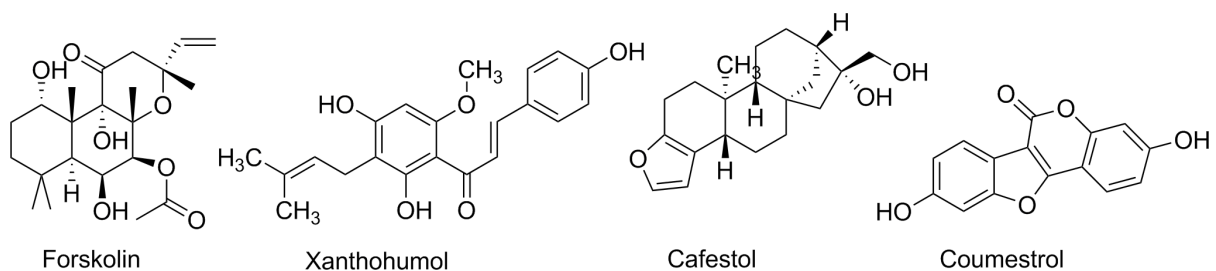


**Obr. 16 Chemická struktura přírodního agonisty farnesoidního X receptoru – 22R-hydroxycholesterolu.**

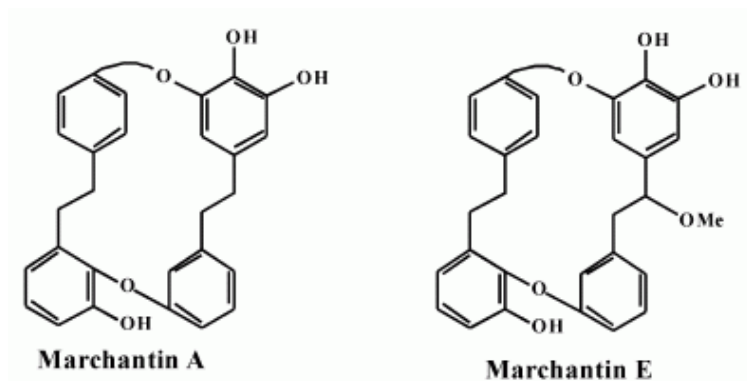
V současné době byly identifikovány různé přírodní produkty jako potencionální ligandy-agonisté FXR, jedná se o kyselinu ginkgolovou (kyselina s aromatickou strukturou izolovaná z rostliny *Ginkgo biloba*, viz Obr. 17), forskolin (diterpén produkovaný rostlinou *Coleus forskohlii*, tato látka má bronchodilatačními účinky, viz Obr. 18), coumestrol (fytoestrogen, viz Obr. 18), cafestol (diterpén produkovaný rostlinou *Coffea arabica*, viz Obr. 18), xanthohumol (prenylovaný flavonoid z rostliny *Humulus lupulus*, viz Obr. 18), marchantin A a marchantin E (látky aromatické struktury izolované z rostliny *Marchantia paleacea* var. *diptera*, viz Obr. 19) (Hofta et al. 2004, Howard et al. 2000, Suzuki et al. 2008).



**Obr. 17 Chemická struktura přírodního agonisty farnesoidního X receptoru – ginkgolové kyseliny.** Vysvětlivky: 15:1 (15uhlíkový řetězec, dvojná vazba v poloze 8) a 17:1 (17uhlíkový řetězec, dvojná vazba v poloze 10). Modifikováno dle: Suzuki et al. (2008).



**Obr. 18 Chemická struktura přírodních agonistů farnesoidního X receptoru: forskolinu, xanthohumolu, cafestolu a coumestrolu.** Modifikováno dle: Xanthohumol (2013), Coumestrol (2013), Forskolin (2013), Cafestol (2013).

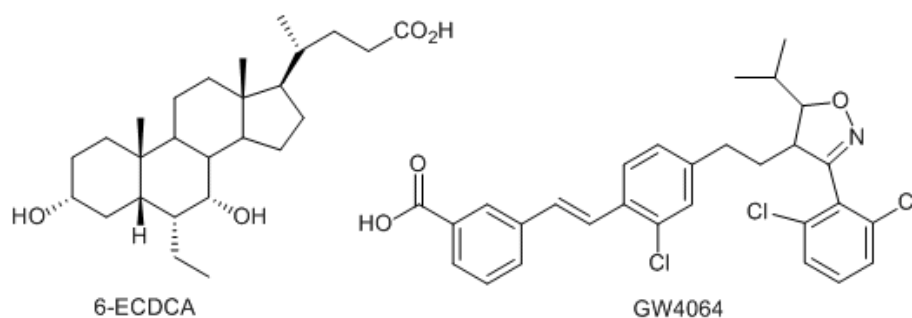


**Obr. 19 Chemická struktura přírodních agonistů farnesoidního X receptoru: marchantinu A a marchantinu E.** Převzato z: Suzuki et al. (2008).

### Syntetičtí agonisté

Následné studie vedly k vygenerování celé řady syntetických ligandů-agonistů farnesoidního X receptoru. Ze semisyntetických sloučenin odvozených od žlučových kyselin se jedná např. o kyselinu 6-ethyl-chenodeoxycholovou (6-ECDCA, viz Obr. 20), což je sloučenina odvozená od přirozeného ligandu FXR kyseliny chenodeoxycholové (CDCA). 6-ECDCA se stala alternativním ligandem-agonistou FXR a v současné době je v klinickém zkoušení pro léčbu různých jaterních onemocnění (Bunce a Campbell 2010b, Matsubara et. al 2013).

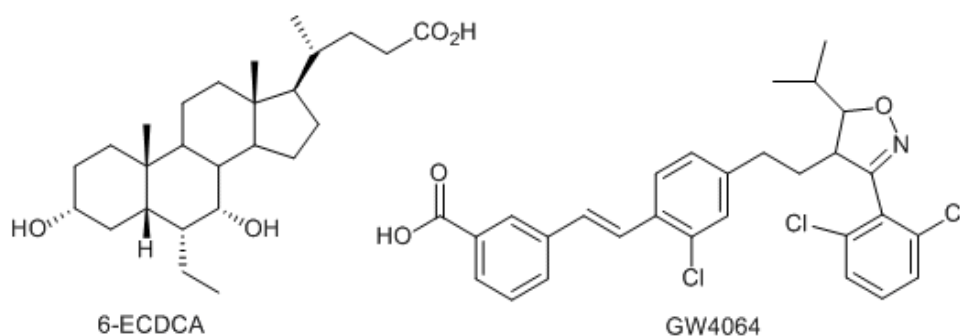
Dalšími vyvinutými agonisty FXR jsou např. syntetické látky GW4064, GW9047, AGN29, fexaramin, MFA-1 a mnoho dalších. Nejvíce používaný je nesteroidní analog isoxazolu GW4064 (viz Obr. 20), ale jeho potencionální buněčná toxicita a malá biodostupnost omezuje širší použití. Proto bylo syntetizováno několik analogů GW4064, ale ani ty stále neřeší problém nízké biodostupnosti (Bunce a Campbell 2010b, Matsubara et. al 2013, Soisson et al. 2008).



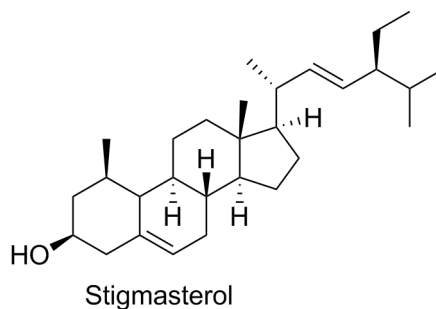
**Obr. 20** Chemická struktura syntetických agonistů farnesoidního X receptoru: 6-ECDCA (kyselina 6-ethyl-chenodeoxycholová) a GW4064. Modifikováno dle: Matsubara et. al (2013).

#### *Antagonisté farnesoidního X receptoru*

V kontrastu s agonisty FXR, je zatím znám jen malý počet antagonistů FXR. Z přírodních látek rostlinného původu byl identifikován guggulsteron (viz Obr. 21), stigmasterol (steroid ze skupiny rostlinných sterolů, viz Obr. 22) a tuberatolidy (terpenoidy izolované z korejských strunatců *Botryllus tuberatus*). Guggulsteron je extrakt z pryskyřice stromu *Commiphora mukul*. Urizar et al. (2002) zjistili, že guggulsteron prostřednictvím antagonistického účinku na FXR snižuje HDL-cholesterol (Bunce a Campbell 2010b, Matsubara et. al 2013).

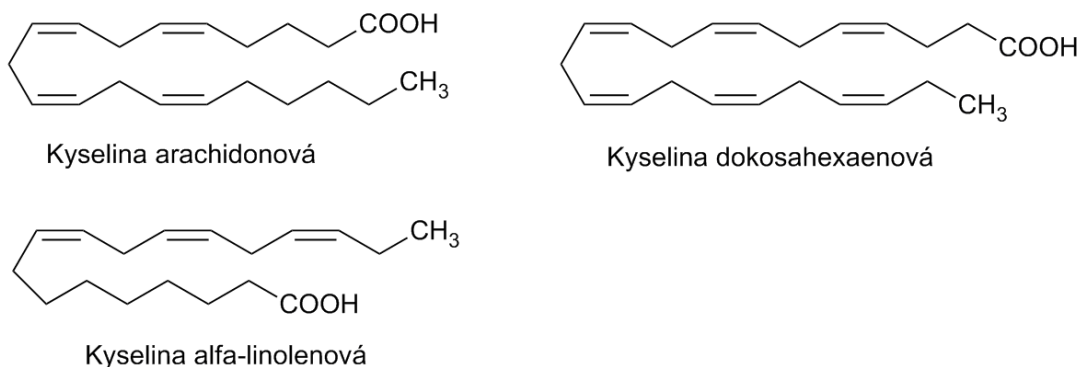


**Obr. 21** Chemická struktura přírodního antagonisty farnesoidního X receptoru: *E*-guggulsteronu a *Z*-guggulsteronu. Modifikováno dle: Urizar et al. (2002).



**Obr. 22 Chemická struktura přírodního antagonisty farnesoidního X receptoru – stigmasterolu.**  
Modifikováno dle: Carter et al. (2007).

V poslední době bylo objeveno (Zhao et al. 2004), že některé polynenasycené mastné kyseliny mohou vystupovat jako ligandy-antagonisté farnesoidního X receptoru. Jedná se o kyselinu arachidonovou, kyselinu dokosahexaenovou a linolenovou (viz Obr. 23) (Bunce a Campbell 2010b, Matsubara et. al 2013, Wang et al. 2008).



**Obr. 23 Chemická struktura přírodních antagonistů farnesoidního X receptoru: kyseliny arachidonové, kyseliny dokosahexaenové a kyseliny  $\alpha$ -linolenové.**

Mezi syntetické antagonisty farnesoidního X receptoru patří deriváty žlučových kyselin ( $5\alpha$ -bufol,  $5\beta$ -bufol,  $5\alpha$ -cyprinol a lithocholát) a např. syntetická sloučenina AGN34 (Matsubara et. al 2013).

### 3.2.9. Cílové geny

FXR reguluje expresi širokého spektra cílových genů tak, že se jako monomer nebo jako heterodimer FXR/RXR váže do responzivního elementu FXR (FXRE). Nejdůležitější vazebnou sekvencí pro FXR je IR-1, dále dochází k vazbě na IR-0, DR-2 a DR-5 (Bunce a Campbell 2010b). FXR reguluje širokou škálu cílových genů buď přímo, nebo prostřednictvím sirotčího nukleárního receptoru pojmenovaného jako malý heterodimerický partner SHP (z angl. small heterodimer partner) (Wang et al. 2008).

Většina cílových genů FXR $\alpha$  je regulována způsobem nezávislým na isoformě. Nicméně několik genů je více citlivých na FXR $\alpha$ 2 a FXR $\alpha$ 4 než na FXR $\alpha$ 1 a FXR $\alpha$ 3. Jedná se o geny kódující ileální vazebný protein žlučových kyselin I-BABP (z angl. ileal bile acid-binding protein), transmembránový protein syndekan-1 (z angl. transmembrane heparan sulfate proteoglycan, SDC-1),  $\alpha$ A-crystallin (s funkcí chaperonu) a fibroblastový růstový faktor 19 (z angl. fibroblast growth factor, FGF19), protein, který se účastní regulace syntézy žlučových kyselin). Fyziologická role aktivace genů prostřednictvím různých isoform FXR není dosud zcela objasněna (Lee et al. 2006a).

Současné studie demonstrují, že FXR reguluje řadu genů (viz Tab. 4), které se účastní metabolismu žlučových kyselin, lipidů a lipoproteinů, glukózy, transportu žlučových kyselin, rovněž reguluje geny podílející se na hepatoprotekci či na růstu střevních bakterií (Bunce a Campbell 2010b, Lee et al. 2006a).

**Tab. 4** Lidské geny regulované aktivovaným FXR $\alpha$ . Geny pro produkty označené \* jsou preferenčně regulovány FXR $\alpha$ 2 a FXR $\alpha$ 4.

<b>Orgán</b>	<b>Funkce</b>	<b>Produkt genu</b>	<b>Regulační efekt</b>
Játra	Metabolismus žlučových kyselin a lipidů	BSEP	Indukce
		MRP2	Indukce
		MDR3	Indukce
		SHP	Indukce
		BAT	Indukce
		BACS	Indukce
		NTCP	Represe
		CYP7A1	Represe
		CYP8B1	Represe
		SREBP-1c	Represe
	Metabolismus lipoproteinů	ApoC-II	Indukce
		PLTP	Indukce
		SDC-1*	Indukce
		VLDLR	Indukce
		HL	Represe
		ApoC-III	Represe
		ApoA-I	Represe
		PON1	Represe
	Hepatoprotekce	CYP3A4	Indukce
		PXR	Indukce
$\alpha$ A-crystallin*		Indukce	
SULT2A1		Indukce	

		UGT2B4	Indukce
		C3	Indukce
	Metabolismus glukózy	PEPCK	Indukce a represe
		Glukóza-6-fosfatáza	Represe
Tenké střevo	Resorbce žlučových kyselin	I-BABP*	Indukce
		OST $\alpha$ , OST $\beta$	Indukce
		FGF19*	Indukce
		ASBT	Represe
	Antibakteriální	Antiogenin	Indukce
		Karbonická anhydráza 12	Indukce
		iNOS	Indukce
		IL-18	Indukce
Ledviny	Transport žlučových kyselin	OST $\alpha$ , OST $\beta$	Indukce
		MRP2	Indukce
		ASBT	Represe
Nadledvinky	Neznámá	OST $\alpha$ , OST $\beta$	Indukce
		SHP	Indukce

Vysvětlivky: BSEP (exportní pumpa pro žlučové kyseliny), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2), MDR3 (gen mnohočetné rezistence k lékům 3), SHP (malý heterodimerický partner), BAT (bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase), BACS (bile acid-CoA synthetase), NTCP (sodík-dependetní taurocholátový kotransportní protein), SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c), ApoC-II (apolipoprotein C-III), PLTP (transportní protein pro lipidy), SDC-1 (syndekan-1), VLDLR (receptor pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě), HL (hepatická lipáza), ApoC-III (apolipoprotein C-III), ApoA-I (apolipoprotein A-I), PON1 (paraaxonáza 1), PXR (pregnanový X receptor), SULT2A1 (dehydroepiandrosterone-sulfotransferase), UGT2B4 (UDP-glukuronyltransferáza 2B4), C3 (complement 3), PEPCK (fosfoenolpyruvátkarboxykináza), I-BABP (ileální vazebný protein žlučových kyselin), ASBT (apical sodium-coupled bile salt transporter), iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého), IL-18 (interleukin 18), OST $\alpha$  (organic solute transporter  $\alpha$ ), OST $\beta$  (organic solute transporter  $\beta$ ). Modifikováno dle: Lee et al. (2006a).

### *Cílové geny účastnící se homeostázy žlučových kyselin*

FXR reguluje geny, které hrají roli na různých úrovních metabolismu žlučových kyselin a jejich enterohepatální cirkulace (viz Obr. 25):

- a) enzymy CYP7A1 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxyláza), CYP8B1 (sterol 12 $\alpha$ -hydroxyláza),
- b) sekrece žlučových kyselin: BSEP (exportní pumpa pro žlučové kyseliny), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2), sekrece fosfolipidů: MDR3 (gen mnohočetné rezistence k lékům 3) skrz kanalikulární membránu hepatocytu,
- c) transport žlučových kyselin: I-BABP (ileální vazebný protein žlučových kyselin), OST $\alpha$  a OST $\beta$  (organic solute transporter  $\alpha$  a  $\beta$ ), ASBT (apical sodium-coupled bile salt transporter),

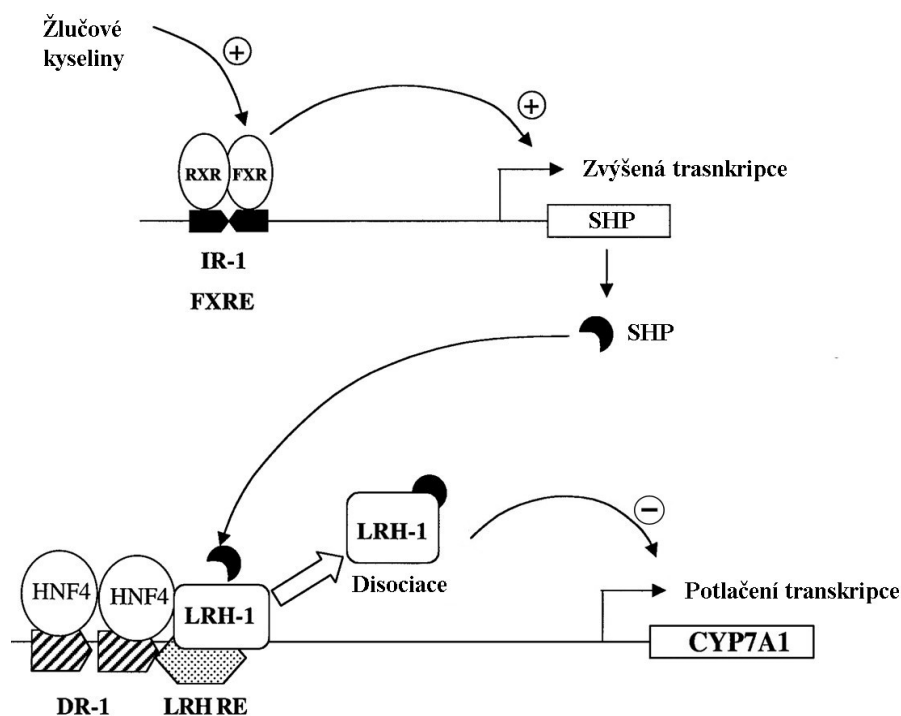


NTCP (sodík-dependetní taurocholátový kotransportní protein) a OATP8 (organic anion transporting polypeptide 8),

d) konjugace a detoxikace žlučových kyselin: BACS (bile acid-CoA synthetase) , BAT (bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase).

FXR je nejdůležitější senzor žlučových kyselin, který koordinuje regulaci jejich metabolismu (Lee et al. 2006a).

FXR jako senzor pro žlučové kyseliny potlačuje transkripci CYP7A1. Downregulace CYP7A1, „rate-limiting“ enzymu v konverzi cholesterolu na žlučové kyseliny, probíhá prostřednictvím regulační kaskády, která začíná vazbou žlučových kyselin na FXR. Farnesoidní X receptor způsobuje nejen downregulaci exprese CYP7A1, ale také potlačuje expresi dalšího klíčového enzymu syntézy žlučových kyselin - CYP8B1 (viz Obr. 25). Goodwin et al. (2000) popsali, že se FXR/RXR heterodimer indukuje expresi nukleárního receptoru pojmenovaného jako malý heterodimerický partner SHP (z angl. small heterodimer partner), prostřednictvím vazby na IR-1 element SHP promotoru. SHP následně inhibuje aktivitu jaterního receptorového homologu 1 LRH-1 (z angl. liver receptor homolog), který je pozitivní regulátor promotoru CYP7A1 (viz Obr. 24). Touto kaskádou je potlačena exprese CYP7A1 i CYP8B1 (Bunce a Campbell 2010b, Goodwin et al. 2000, Huber et al. 2002, Lee et al. 2006a).



**Obr. 24 Regulační kaskáda exprese CYP7A1.** Ligandy žlučové kyseliny aktivují FXR receptor, ten ve formě heterodimeru s RXR receptorem váže na IR-1 (invertovaná repetice oddělená 1 párem bazí) responzivního elementu FXR (FXRE) promotoru SHP (malý heterodimerický partner). SHP následně inhibuje LRH-1 (jaterní receptorový homolog 1) disociací jeho komplexu s HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4). Disociovaný LRH-1 ztrácí funkci pozitivního regulátoru promotoru CYP7A1 a tím dochází k potlačení transkripce CYP7A1. Vysvětlivky: DR-1 (přímá repetice oddělená 1 párem bazí), LRHRE (responzivní element LRH-1). Modifikováno dle: Davis et al. (2002).

Dále FXR kontroluje enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin prostřednictvím regulace genu pro exportní pumpu pro žlučové kyseliny BSEP (z angl. bile salt export pump) a genu pro transportní protein MRP2 (z angl. multidrug resistance-associated protein 2) (viz Obr. 25). BSEP je hlavní exportér žlučových kyselin skrz membránu hepatocytů do žlučových kanáleků. Exprese tohoto transportéru je citlivá na tok žlučových kyselin skrz hepatocyty a na míru transkripce BSEP genu. Ananthanarayanan et al. (2001) poukázali na to, že FXR/RXR aktivovaný žlučovými kyselinami přímo aktivuje transkripci BSEP pomocí vazby na IR-1 element BSEP promotoru. Ligandem aktivovaný FXR chrání játra před cholestázou, prostřednictvím BSEP (Ananthanarayanan et al. 2001, Bunce a Campbell 2010b).

MRP2 zprostředkovává odtok aniontických konjugovaných sloučenin skrz membránu hepatocytů do žlučových kanáleků. Kast et al. (2002) v roce 2002 objevili, že FXR aktivuje transkripci MRP2 prostřednictvím vazby na ER-8 invertovanou repetici MRP2 promotoru (Bunce a Campbell 2010b, Kast et al. 2002).

FXR zvyšuje expresi lidského genu mnohočetné rezistence k lékům 3 MDR3 (z angl. multi-drug resistance gen 3), jenž kóduje P-glykoprotein (viz Obr. 25). Jedná se o ABC (z angl. ATP-binding cassette) transportér, který je zásadní pro prostup fosfolipidů skrz kanalikulární membránu hepatocytů, což dokládá i fakt, že nedostatek MDR3 vede k progresivní familiární intrahepatální cholestáze typu III. Huang et al. (2003) objasnili, že MDR3 gen je transaktivován vazbou FXR/RXR heterodimru do IR elementu promotou tohoto cílového genu (Huang et al. 2003, Lee et al. 2006a).

V tenkém střevě FXR reguluje vstřebávání a enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin prostřednictvím upregulace ileální vazebný protein žlučových kyselin I-BABP (z angl. ileal bile acid-binding protein) (viz Obr. 25). I-BABP je cytosolový protein, který váže žlučové kyseliny s vysokou afinitou. Jeho exprese probíhá v tenkém střevě v ileu a účastní se enterohepatální cirkulace žlučových kyselin. V roce 1999 Grober et al. (1999) objasnili, že žlučové kyseliny indukují expresi lidského I-BABP genu prostřednictvím interakce mezi FXR/RXR heterodimerem a IR-1 elementem I-BABP promotoru (Bunce a Campbell 2010b, Grober et al. 1999, Huber et al. 2002).

FXR zvyšuje expresi genů transportérů OST $\alpha$  a OST $\beta$  (z angl. organic solute transporters  $\alpha$  a  $\beta$ ), které jsou rozhodující pro enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin (viz Obr. 25). Jsou přítomny ve střevě (ale i v ledvinách a nadledvinkách) a usnadňují transport žlučových kyselin do portální žíly. Tato aktivace probíhá opět cestou IR-1 elementu (Bunce a Campbell 2010b, Lee et al. 2006a, Lee et al. 2006b).

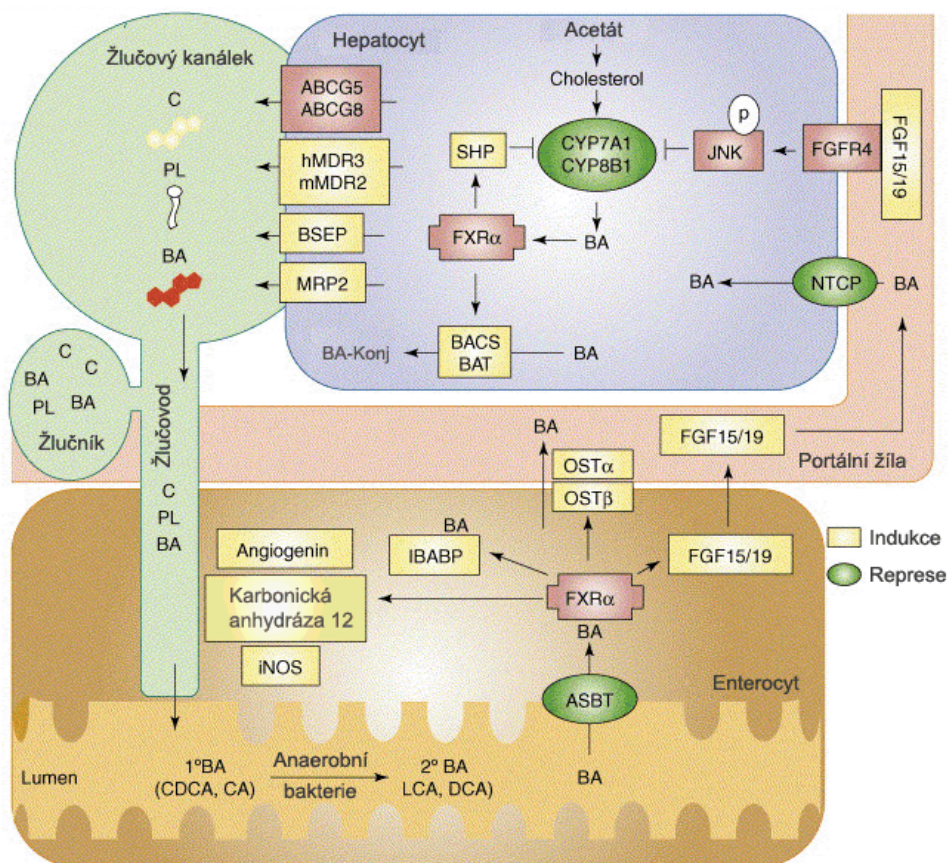
Dalšími cílovými geny FXR, které jsou významné pro transport žlučových kyselin, jsou sodík-dependentní transportér zodpovědný za aktivní transport konjugovaných žlučových kyselin ze střeva ASBT (z angl. apical sodium-coupled bile salt transporter) a sodík-dependentní taurocholátový kotransportní protein NTCP (z angl. natrium-taurochlorat cotransporting polypeptide), který má funkci významného jaterního transportéru konjugovaných žlučových kyselin (viz Obr. 25). Neimark et al. (2004) zjistili, že žlučové kyseliny negativně regulují lidský ASBT prostřednictvím FXR. NTCP podléhá rovněž negativní regulaci pomocí FXR (Bunce a Campbell 2010b, Lee et al. 2006a, Neimark et al. 2004).

Farnesoidní X receptor se podílí na enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin také aktivací genu pro lidský transportní protein OATP8 (z angl. organic anion transporting polypeptide 8) (viz Obr. 25). Jedná se o transportér lokalizovaný v membráně hepatocytů a zprostředkovává uptake organických aniontů, xenobiotik a peptidů do buňky. Jung et al. (2002) pozorovali, že FXR aktivovaný žlučovými kyselinami aktivuje transkripci genu pro

OATP8 pomocí vazby do IR-1 elementu promotoru tohoto genu (Bunce a Campbell 2010b, Jung et al. 2002).

Aktivace FXR žlučovými kyselinami ve střevě vede k indukci lidského fibroblastového růstového faktoru 19 FGF19 (z angl. fibroblast growth factor 19), který způsobí potlačení exprese CYP7A1 a CYP8B1. Dochází k tomu prostřednictvím vazby FGF19 na FGFR4, který aktivuje JNK-dependentní signalizační kaskádu (z angl. c-Jun N-terminal kinases) a dochází k represi CYP7A1 a CYP8B1 (viz Obr. 25). Objevem této nové signalizační kaskády Holt et al. (2003) nastiňují mechanismus zpětnovazebnou kontrolu syntézy žlučových kyselin a zdůrazňuje regulační význam FXR (Bunce a Campbell 2010b, Holt et al. 2003, Lee et al. 2006a).

Farnesoidní X receptor také hraje roli v tvorbě konjugátů žlučových kyselin. Ty jsou syntetizovány v hepatocytech, konjugovány s taurinem nebo glycinem pomocí enzymů BACS (z angl. bile acid-CoA synthetase) a BAT (z angl. bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase) a vylučovány do žlučových kanálků pomocí dvou membránových ABC transportérů (BSEP a MRP2) (viz Obr. 25). Pircher et al. (2003) popsali FXR zprostředkovanou indukci exprese genů BACS a BAT cestou interakce IR-1 elementu a promotorů těchto genů. Tvorba konjugátů žlučových kyselin je zásadním krokem jejich enterohepatální cirkulace (Bunce a Campbell 2010b, Lee et al. 2006a, Pircher et al. 2003).



**Obr. 25 Schématické znázornění enterohepatální cirkulace žlučových kyselin.** Je vyznačena syntéza cholesterolu (C) a jeho následná konverze na žlučové kyseliny (BA). Zkratka PL je použita pro fosfolipidy. Žlučové kyseliny se přímo vážou na FXR $\alpha$  v játrech a ve střevě a tím se FXR aktivuje a zprostředkovává represi nebo indukci cílových genů. Vysvětlivky: ABCG5 (ATP-binding cassette protein G5), ABCG8 (ATP-binding cassette protein G8), hMDR3 (lidský gen mnohočetné rezistence k lékům 3), mMDR2 (myší gen mnohočetné rezistence k lékům 2), BSEP (exportní pumpa pro žlučové kyseliny), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2), SHP (malý heterodimerický partner), BACS (bile acid-CoA synthetase), BAT (bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase), JNK (c-Jun N-terminal kinases), FGFR4 (receptor pro fibroblastový růstový faktor 4), FGF15 (fibroblastový růstový faktor 15), FGF 19 (fibroblastový růstový faktor 19), NTCP (sodík-dependetní taurocholátový kotransportní protein), OST $\alpha$  (organic solute transporter  $\alpha$ ), OST $\beta$  (organic solute transporter  $\beta$ ), IBABP (ileální transportér žlučových kyselin), ASBT (apical sodium-coupled bile salt transporter), iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého), CDCA (chenodeoxycholová kyselina), CA (cholová kyselina), LCA (lithocholová kyselina), DCA (deoxycholová kyselina). Modifikováno dle: Lee et al. (2006a).

### *Cílové geny účastníci se homeostázy krevních lipidů a lipoproteinů*

Současné studie demonstrují, že FXR také reguluje řadu genů, které mají význam pro metabolismus lipoproteinů, triglyceridů a mastných kyselin (viz Tab. 4). Jedná se o cílové geny FXR zapojené v metabolismu:

- a) HDL-cholesterolu ApoA-I (apolipoprotein A-I), PLTP (phospholipid transfer protein),

b) triglyceridů a lipidů ApoC-II (apolipoprotein C-II), ApoC-III (apolipoprotein C-III), SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c), VLDLR (very low density lipoprotein receptor).

#### *HDL-cholesterol*

Farnesoidní X receptor hraje roli v metabolismu lipoproteinů o vysoké hustotě HDL (z angl. high density lipoprotein) (viz Obr. 26). Aktivace FXR žlučovými kyselinami vede k snížení hladiny HDL-cholesterolu, zatímco deaktivace FXR hladinu HDL-cholesterolu zvyšuje. Dochází k tomu cestou regulace genové exprese, aktivovaný farnesoidní X receptor snižuje hladinu HDL-cholesterolu prostřednictvím potlačení exprese genu ApoA-I a indukce exprese genu PLTP (Dufour a Clavien 2010).

FXR monomer negativně reguluje expresi lidského apolipoproteinu A-I (ApoA-I). Claudel et al. (2002) objasňují, že tento monomer aktivovaný žlučovými kyselinami se váže na responzivní element promotou cílového genu a způsobuje downregulaci exprese ApoA-I (Bunce a Campbell 2010b, Claudel et al. 2002).

Urizar et al. (2000) objasnili, že farnesoidní X receptor zvyšuje expresi specifického plazmatického transportního proteinu pro lipidy PLTP (z angl. phospholipid transfer protein). Ten je nezbytný pro převod lipoproteinů o velmi nízké hustotě VLDL (z angl. very low density lipoprotein) na HDL. Žlučovými kyselinami aktivovaný FXR indukuje expresi PLTP genu prostřednictvím interakce s IR-1 elementem PLTP promotoru (Bunce a Campbell 2010b, Urizar et al. 2000).

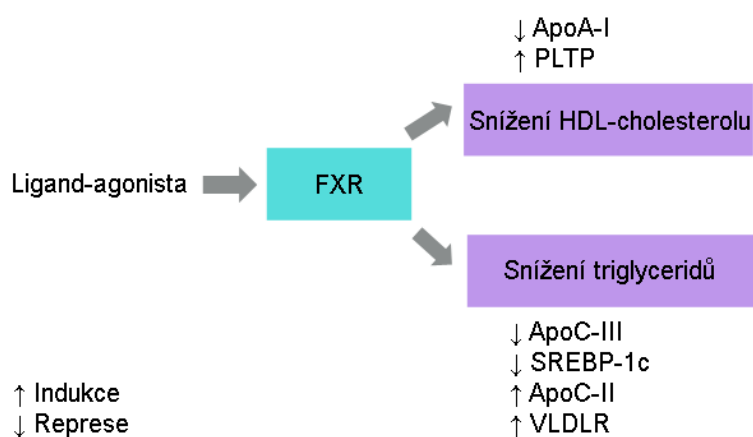
Ligandy-agonisté farnesoidního X receptoru mohou mít s největší pravděpodobností škodlivý vliv na kardiovaskulární soustavu a důsledku snížení hladiny HDL-cholesterolu. Tento fakt je třeba brát na zřetel např. při dlouhodobé léčbě cholestázy agonisty FXR (Dufour a Clavien 2010).

#### *Triglyceridy a lipidy*

Farnesoidní X receptor ovlivňuje hladiny triglyceridů a lipidů tak, že upravuje transkripci řady genů zapojených do jejich metabolismu a syntézy. Aktivovaný FXR snižuje plasmatické hladiny triglyceridů (viz Obr. 26). Kast et al. (2001) ukázali, že aktivovaný FXR receptor indukuje transkripci apolipoproteinu C-II (ApoC-II). Dále bylo objeveno že, aktivace FXR vede ke snížení exprese transkripčního faktoru SREBP-1c (z angl. sterol regulatory element binding protein 1c), který řídí expresi genů účastnících se syntézy mastných kyselin a triglyceridů. Aktivovaný farnesoidní receptor potlačuje expresi apolipoproteinu C-III

(ApoC-III); vede k indukci exprese VLDLR (z angl. very low density lipoprotein receptor) receptoru pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě VLDL (z angl. very low density lipoprotein), účastnícího se odbourávání VLDL (Bunce a Campbell 2010b, Dufour a Clavien 2010, Kast et al. 2001, Lee et al., 2006a).

Všechny tyto výsledky poskytují vysvětlení, jakým mechanismem dochází ke snížení plasmatických hladin triglyceridů, rizikových faktorů pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, pomocí žlučových kyselin a mnoha ligandů-agonistů FXR. Ty jsou, díky těmto vlastnostem, středem zájmu dalších výzkumů (Dufour a Clavien 2010).



**Obr. 26 Schématické znázornění regulace homeostázy lipidů prostřednictvím farnesoidního X receptoru.** Aktivace FXR ligandy-agonisty (žlučovými kyselinami) vede prostřednictvím indukce nebo potlačení exprese řady cílových genů ke snížení hladin HDL-cholesterolu a ke snížení hladin triglyceridů. Vysvětlivky: ApoA-I (apolipoprotein A-I), PLTP (transportní protein pro lipidy), ApoC-III (apolipoprotein C-III), SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c), ApoCII (apolipoprotein C-II), VLDLR (receptor pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě). Modifikováno dle: Dufour a Clavien (2010).

#### *Cílové geny účastnící se homeostázy glukózy*

Současné studie demonstrují, že FXR také reguluje geny, které se účastní glukózového metabolismu. Jedná se o geny pro PEPCK a glukózu-6-fosfatázu (viz Tab. 4).

Duran-Sandoval et al. (2004) v roce 2004 zjistili, že u potkanů s indukovaným diabetem byla snížena jaterní exprese FXR a díky tomu nastínili, že exprese farnesoidního X receptoru je regulována hladinou glukózy. Stayrook et al. (2005) objasnili, že aktivace FXR vede k indukci exprese fosfoenolpyruvátcarboxykinázy PEPCK (z angl. phosphoenolpyruvate carboxykinase) v primárních hepatocytech, jednoho z klíčových enzymů účastnícího se regulace glukoneogeneze a tím stimuluje produkci glukózy primárními hepatocyty, tento vliv je nepříznivý u onemocnění diabetem. Oba tyto objevy vedly k návrhu, že zde funguje zpětnovazebná kontrola hladiny glukózy zprostředkovaná FXR receptorem (Bunce

a Campbell 2010b, Dufour a Clavien 2010, Duran-Sandoval et al. 2004, Lee et al., 2006a, Stayrook et al., 2005).

Naproti tomu několik nedávných studií, např. Ma et al. (2006) poukázalo na skutečnost, že žlučovými kyselinami indukovaná aktivace FXR vede k potlačení exprese genů pro enzymy PEPCCK a glukóza-6-fosfatáza, které umožňují jaterní glukoneogenezi. Díky tomu dochází ke snížení glykémie a tento vliv je příznivý u diabetu. Aktivace FXR vedla také k zvýšení inzulínové senzitivity. S tím korespondují i další studie, např. Zhang et al. (2006) z roku 2006, kdy byly použity FXR deficitní myši, jež vykazovaly porušenou glukózovou toleranci a inzulínovou rezistenci. (Bunce a Campbell 2010b, Lee et al. 2006a, Ma et al. 2006, Zhang et al. 2006).

Různé výsledky studií, kdy hladiny glukózy v důsledku aktivace farnesoidního X receptoru rostou, klesají nebo zůstávají nezměněny, naznačují, že klíčové faktory musí být teprve identifikovány. Pro posouzení těchto účinků a jejich základních molekulárních mechanismů jsou nutné další výzkumy, které v budoucnu objasní potencionální význam FXR selektivních agonistů a jejich vliv na diabetes mellitus 2. typu. Nicméně se již nyní FXR jeví jako důležitý regulátor homeostázy glukózy *in vivo* (Bunce a Campbell 2010b, Dufour a Clavien 2010, Lee et al. 2006a).

#### *Cílové geny účastníci se růstu střevních bakterií*

Nedávné studie vedly k objevení cílových genů střevního FXR receptoru, které mají antibakteriální vlastnosti. Jedná se o geny kódující angiogenin, karbonickou anhydrázu 12, inducibilní syntázu oxidu dusnatého (z angl. inducible NO synthase, iNOS) a interleukin 18 (IL-18) (viz Tab. 4) (Bunce a Campbell 2010b, Lee et al. 2006a).

Inagaki et al. (2006) zjistili, že u myši postrádajících střevní FXR došlo ke zvýšení hladin střevních bakterií a k ústupu epiteliální bariéry. K tomuto efektu dochází prostřednictvím aktivovaného FXR, který zvyšuje expresi cílových genů s antibakteriálními vlastnostmi. Jedním z nich je gen kódující angiogenin, protein účastníci se akutní fáze zánětu a má účinné antibakteriální a antimykotické účinky. Dalším cílovým genem FXR je gen pro karbonickou anhydrázu 12, která hraje roli v udržení optimálního pH a iontové rovnováhy. FXR také reguluje gen pro inducibilní syntázu oxidu dusnatého, jejíž produktem je oxid dusnatý, který má přímé antimikrobní účinky, reguluje mnoho různých aspektů vrozené imunitní odpovědi včetně produkce hlenu a epiteliální bariérové funkce (Inagaki et al. 2006, Lee et al. 2006a).



Farnesoidní X receptor má klíčovou roli v udržení střevní bakteriální rovnováhy, chrání střevo před přemnožením bakterií a jejich prostupem skrz epiteliální bariéru, což by mohlo vyústit v systémovou infekci (Lee et al. 2006a).

#### *Cílové geny podílející se na hepatoprotekci*

Farnesoidní X receptor reguluje geny, které se účastní ochrany před cytotoxickými vlivy žlučových kyselin (viz Tab. 4). Tato FXR závislá hepatoprotekce je zprostředkována FXR potlačením exprese enzymů zapojených do syntézy žlučových kyselin (CYP7A1), zvýšenou expresí proteinů umožňujících transport fosfolipidů a žlučových kyselin do žluči (MDR2, gen mnohočetné rezistence k lékům 2, z angl. multidrug resistant protein 2) (viz Obr. 25). Aktivace FXR vede ke zvýšení jaterní exprese  $\alpha$ A-crystallinu, který funguje jako chaperon a má ochranný význam před denaturací bílkovin (Lee et al. 2006a).

V nedávné době bylo prokázáno skupinou Jung et al. (2006), že FXR může aktivovat transkripci genu PXR. Aktivovaný PXR vede k indukci řady genů, jenž se podílí na odbourávání žlučových kyselin a tím chrání jaterní buňky před toxickými vlivy, které vyplývají z akumulace žlučových kyselin. (Lee et al. 2006a Jung et al. 2006).

FXR má rovněž vliv na tvorbu cholesterolových žlučových kamenů. Wittenburg et al. (2003) objasnili, že žlučovými kyselinami aktivovaný FXR zvyšuje v játrech expresi genů pro heterodimerní membránový transportér cholesterolu ABCG5/ABCG8 (z angl. ATP-binding cassette proteins) (viz Obr. 25). Farnesoidní X receptor tedy může mít význam pro ochranu před žlučovými kameny (Lee et al. 2006a, Wittenburg et al. 2003).

Farnesoidní X receptor také potlačuje hepatický zánět zprostředkovaný skupinou transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B (z angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), které ovlivňují expresi genů pro zánětlivou odpověď. Prostřednictvím NF- $\kappa$ B má FXR pozitivní vliv jak na ochranu hepatocytů, tak i na regeneraci jater (Wang et al., 2008). Současně je tato protizánětlivá funkce identifikována u hladkého cévního svalstva a endotelu cév, a to poukazuje na potenciální roli FXR v působení proti zánětlivé odpovědi zprostředkované pomocí NF- $\kappa$ B (Bunce a Campbell 2010b).

#### *Cílové geny ledvin*

Nedávné studie vedly k objevení genů, které jsou cílem ledvinového farnesoidního X receptoru. Jedná se o geny pro OST $\alpha$ , OST $\beta$  a MRP2, jejichž exprese je aktivovaným FXR indukována a gen pro ASBT, jehož exprese je potlačena (viz Tab. 4). Všechny tyto proteiny se nacházejí na basolaterálním povrchu ledvinových tubulárních buněk a podílejí se na

transportu při reabsorbci žlučových kyselin. Nicméně role FXR v ledvinách ještě není zcela objasněna (Lee et al. 2006a).

#### *Cílové geny nadledvinek*

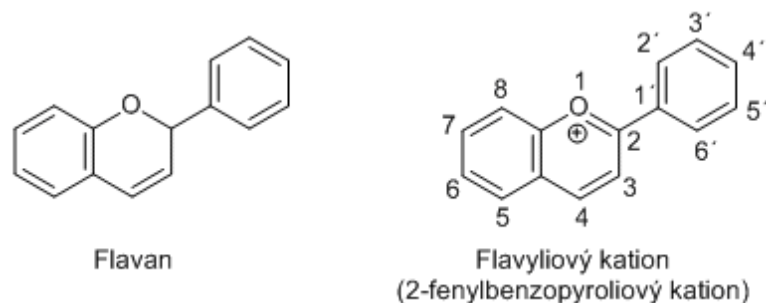
Jako cílové geny nadledvinkového FXR byly objeveny geny pro OST $\alpha$ , OST $\beta$  a SHP, jsou indukovány FXR-dependentním způsobem (viz Tab. 4). Je pravděpodobné, že OST $\alpha$  a OST $\beta$  slouží v nadledvinkách, stejně jako ve střevě, k transportu žlučových kyselin, nicméně některé studie poukazují na skutečnost, že by heterodimer OST $\alpha$ /OST $\beta$  mohl sloužit jako transportér pro dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS), steroidní hormon, který je v konjugované formě vylučovaný nadledvinkami. Míra exprese FXR v kůře nadledvinek u myši je poměrně vysoká, ale ještě není zcela zřejmé, co jsou jeho endogenní agonisté a i jeho funkce zde stále zůstává neobjasněna (Lee et al. 2006a).

### **3.3. Anthokyanidiny**

Anthokyanidiny jsou velice rozšířenou skupinou rostlinných barevných pigmentů květů a plodů, méně často i listů či kořenů. Jedná se o početně velmi rozsáhlou skupinu, neboť bylo identifikováno 25 anthokyanidinů, které tvoří až 300 různých anthokyanů. Tyto sloučeniny jsou nositelé různého zbarvení od oranžové, přes červené, fialové až po modré. Díky těmto vlastnostem jsou hojně používány jak v potravinářství, tak i ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Opletal a Koula 2013, Tomko et al. 1989, Velíšek 2002).

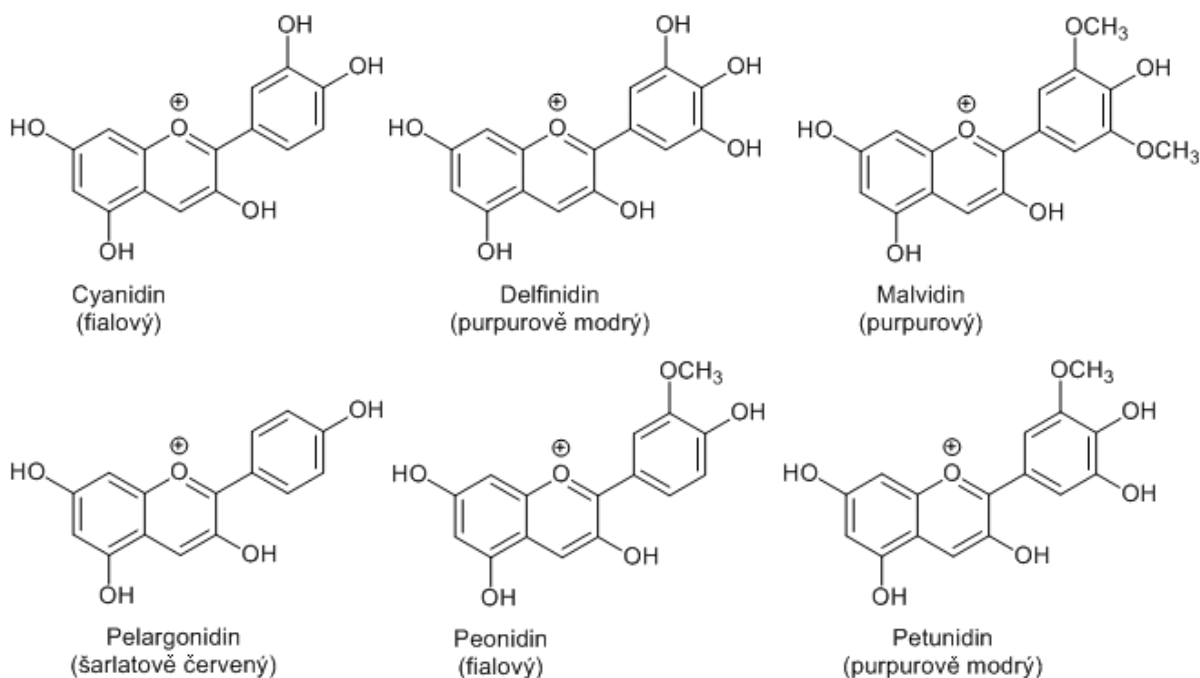
#### **3.3.1. Chemická struktura**

Anthokyanidiny jsou aglykony a spolu s cukry tvoří glykosidy anthokyany. Anthokyanidiny se řadí mezi flavonoidy, jejichž základní strukturu tvoří flavan (viz Obr. 27). Velíšek (2002:21) uvádí, že: „všechny anthokyanidiny jsou odvozeny od jedné základní struktury, kterou je flavyliový (2-fenylbenzopyryliový) kation“ (viz Obr. 26). Všech 15 anthokyanidinů je v poloze C-4' substituováno hydroxylovou skupinou. Odlišnost mezi jednotlivými sloučeninami je dána substitucí v polohách C-3, C-5, C-6, C-7, C-3' a C-5' (Opletal a Koula 2013, Velíšek 2002).



**Obr. 27** Chemická struktura flavanu, který tvoří základní strukturu flavonoidů a flavyliového kationtu, který je základní strukturou anthokyanidinů. Modifikováno dle: Velišek (2002).

Nejvýznamnějších šest anthokyanidinů má v poloze C-3 hydroxyskupinu (viz Obr. 28). Nejhojněji se v přírodě vyskytuje cyanidin (název získal podle chrpy, z lat. *Cyanus*), dále pelargonidin (název dle pelargonie, z lat. *Pelargonium*), potom peonidin (název podle pivoňky, z lat. *Peonia*), dále delphinidin (název dle stračky, z lat. *Delphinium*), poté petunidin (název dle petunie, z lat. *Petunia*) a nejméně často se vyskytuje malvidin (název podle slézu, z lat. *Malva*, dříve označován také jako oenidin) (Velišek 2002).



**Obr. 28** Chemická struktura šesti nejvýznamnějších anthokyanidinů. Modifikováno dle: Opletal a Koula (2013) a Velišek (2002).

Anthokyanidiny jako volné aglykony se v rostlinných materiálech vyskytují zřídka, hlavními pigmenty jsou glykosidy anthokyanu. Cukernou složku tvoří pět různých sacharidů, jedná se o D-glukózu, méně často o D-galaktózu a velmi zřídka o L-rhamnózu, D-xylózu a L-arabinózu. Ty se vždy vážou na hydroxyskupinu v poloze C-3, navíc může být glykosylována i další hydroxyskupina v poloze C-5 a C-7. Výjimečně se cukr může vázat na

OH-skupiny v polohách C-7, C-3', C-4' a C-5' jako monosacharid, disacharid nebo trisacharid. Cukry mohou být acylovány kyselinami, jako je kyselina octová, malonová nebo fenolovými kyselinami (např. kyselinou kávovou, p-kumarovou, ferulovou či sinapovou) (Tomko et al. 1989, Velíšek 2002).

Barevnost anthokyanů závisí na řadě faktorů, intenzivní barvu mají jen při pH < 3,5, dále zabarvení závisí na tvorbě komplexu s kovem jako je Fe<sup>3+</sup> nebo Al<sup>3+</sup> (Tomko et al. 1989, Velíšek 2002).

### 3.3.2. Výskyt a použití

„Anthokyaniny se vyskytují v mnoha druzích rostlin, kde jsou lokalizovány v buněčných vakuolách a stabilizovány interakcemi typu ion-ion s organickými kyselinami (malonovou, jablečnou, citronovou).“ (Velíšek 2002:23).

Ze skupiny léčivých rostlin se anthokyaniny vyskytují v největší míře u čeledi brusnicovité (*Vacciniaceae*), srstkovité (*Grossulariaceae*), bezovité (*Sambucaceae*), růžovité (*Rosaceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*), lilkovité (*Solanaceae*) a kosatcovité (*Iridaceae*). Drogy s obsahem anthokyanů se využívají pro svůj protizánětlivý a antiedematózní účinek, za účelem snížení lomivosti a permeability kapilárních stěn, indikují se při zánětech v oftalmologii, při mikrokrvácení a v neposlední řadě se používají jako barviva. Mezi tyto drogy patří myrtilli fructus (borůvkový plod, *Vaccinium myrtillus*, *Vacciniaceae*), tento plod obsahuje deriváty cyanidinu, peonidinu, delfinidinu (např. myrtillin), malvidinu a petunidinu. Dále se používá sambuci fructus (plod bezu černého, *Sambucus nigra*, *Sambucaceae*), jenž obsahuje glykosidy cynidinu (např. sambucin), ribis nigri fructus (plod rybízu černého, *Ribes nigrum*, *Grossulariaceae*) s obsahem glykosidů delfinidinu a cyanidinu, hibisci flos (květ ibišku, *Hibiscus sabdariffa*, *Malvaceae*), u něhož je v nejvyšší míře zastoupen derivát delfinidinu (hibiscin). Dále je využíván aroniae fructus (plod arónie, *Aronia melanocarpa*, *Rosaceae*) s obsahem glykosidů cyanidinu a cyani flos (květ chrpy, *Cyanus segetum*, *Asteraceae*), který obsahuje derivátů cyanidinu (Flavonoidy 2011, Opletal a Koula 2013, Tomko et al. 1989).

Potravinářsky významné rostliny s obsahem anthokyanů (viz Tab. 5) náleží např. do čeledi révovitých – *Vitaceae* (hrozny vinné révy), růžovitých – *Rosaceae* (jahody, maliny, ostružiny, třešně, švestky a další), lilkovitých – *Solanaceae* (lilek, odrůdy brambor s červenou slupkou), brukvovitých – *Brassicaceae* (např. červené zelí, ředkvičky), vřesovcovitých – *Ericaceae* (borůvky, brusinky) a olivovitých – *Oleaceae* (olivy). Z těchto přírodních zdrojů se

izolují anthokyany a využívají se jako potravinářská barviva. Jako potravinářská barviva se nejčastěji používají anthokyanová barviva získaná ze slupek vinné révy (*Vitis vinifera*, *Vitaceae*), z plodů černého bezu (*Sambucus nigra*, *Sambucaceae*), z plodů aronie černoplodé (*Aronia melanocarpa*, *Rosacea*) či z květů ibišku (*Hibiscus Sabdariffa*, *Malvaceae*) (Velíšek 2002).

**Tab. 5** Hlavní anthokyanová barviva vybraných potravin.

<b>Český název</b>	<b>Latinský název</b>	<b>Hlavní anthokyanová barviva - deriváty:</b>
angrešt - červené		
odráždy	<i>Ribes grossularia</i>	cyanidinu
borůvka	<i>Vaccinium myrtillus</i>	delfinidinu
brambory - červené		pelargonidinu, cyanidinu, peonidinu,
odráždy	<i>Solanum tuberosum</i>	delfinidinu, petunidinu a malvidinu
brambory sladké	<i>Ipomoea batatas</i>	cyanidinu a peonidinu
brusinka	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	cyanidinu a malvidinu
cibule	<i>Allium cepa</i>	cyanidinu a peonidinu
granátové jablko	<i>Punica granatum</i>	cyanidinu, delfinidinu a pelargonidinu
hruška (slupka) - červené odrůdy	<i>Prunus persica</i>	cyanidinu
jablko (slupka) - červené odrůdy	<i>Malus pumila</i>	cyanidinu
jahoda	<i>Fragaria sp.</i>	pelargonidinu a cyanidinu
kukuřice - červené		
odráždy	<i>Zea mays</i>	cyanidinu, pelargonidinu, peonidinu
lilek	<i>Solanum melongena</i>	delfinidinu
malina	<i>Rubus idaeus</i>	cyanidinu a pelargonidinu
mango	<i>Mangifera indica</i>	peonidinu
oliva	<i>Olea europea</i>	cyanidinu
ostružina	<i>Rubus fruticosus</i>	cyanidinu a malvidinu
plod bezu	<i>Sambucus nigra</i>	cyanidinu
pomeranč - červené		
odráždy	<i>Citrus sinensis</i>	cyanidinu a delfinidinu
rybíz černý	<i>Ribes nigrum</i>	cyanidinu a delfinidinu
rybíz červený	<i>Ribes rubrum</i>	cyanidinu
ředkvička - červené		
odráždy	<i>Raphanus sativus</i>	pelargonidinu a cyanidinu
švestka	<i>Prunus domestica</i>	cyanidinu a peonidinu
vinné hrozny - červené odrůdy	<i>Vitis vinifera</i>	cyanidinu, peonidinu, delfinidinu, petunidinu a malvidinu
	<i>Vitis labrusca</i>	cyanidinu, peonidinu, delfinidinu, petunidinu a malvidinu
višně	<i>Prunus cerasus</i>	cyanidinu a peonidinu
zelí červené	<i>Brassica oleracea</i>	cyanidinu

Modifikováno dle: Velíšek (2002).

### 3.3.3. Význam

Současné studie prokázaly, že anthokynidiny mají silné antioxidační účinky (Hou et. al 2004). Hou et. al (2004) popsali poprvé na molekulární úrovni, že anthokyanidiny mohou hrát roli v chemoprevenci rakoviny. Mají vliv na tři různé signální dráhy tohoto procesu: jednak anthokyanidiny zabraňují transformaci buněk prostřednictvím inhibice transkripčního faktoru AP-1 (activator protein 1) a inhibice dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy MAPK (mitogen-activated protein kinase), dále potlačují rozvoj zánětu a karcinogeneze blokací dráhy NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) a inhibicí genové exprese enzymu cyklooxygenázy 2 (COX-2), která se účastní zánětlivých procesů a hraje klíčovou roli v rozvoji nádorů. Anthokyanidiny také způsobují apoptózu nádorových buněk prostřednictvím aktivace signální dráhy reaktivních forem kyslíku ROS (z angl. reactive oxygen species), JNK (c-Jun N-terminal kinases) a kaspázy, která je enzymem účastnícím se apoptózy. Dosud ale není známo, jestli jsou tyto dráhy rovněž ovlivňovány přirozeně se vyskytujícími glykosidy anthokyaniny (Hou et. al 2004).

Anthokyanidiny jsou po příjmu z potravy absorbovány ze střeva a distribuují se do krevního oběhu (Hou et. al 2004).

#### 4. Cíl práce

Cílem této experimentální diplomové práce je testování potenciálních ligandů lidského farnesoidního X receptoru (FXR) ze skupiny přírodních rostlinných barviv anthokyanidinů (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin) za použití lidské hepatomové buněčné linie HepG2.

V této práci chceme otestovat vliv anthokyanidinů na buněčnou aktivitu prostřednictvím metody CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay od firmy Promega.

Dále chceme využít molekulárně biologických metod gene reporter assay a one hybrid assay k prokázání možné interakce těchto anthokyanidinů s lidským farnesoidním X receptorem.

Experimentální výsledky této práce by mohly naznačit existenci nových ligandů FXR receptoru ze skupiny anthokyanidinů a mohly by předznamenat další studium testovaných látek v souvislosti s dyslipidemiemi, hyperglykemií a diabetem 2. typu, metabolickým syndromem či homeostázou žlučových kyselin.

## **5. Experimentální část**

### **5.1. Materiál**

#### **5.1.1. Buněčná linie HepG2**

Modelová buněčná linie HepG2 byla izolována biopsií z jater patnáctiletého bělocha mužského pohlaví z dobře diferenciovaného hepatocelulárního karcinomu, jedná se o buňky epiteliální morfologie. Tato linie buněk je běžně používána v biochemických a molekulárně-biologických studiích k popisování funkcí jaterních buněk. Buňky produkují řadu významných plazmatických proteinů jako je například albumin, alfa-2-makroglobulin, alfa-1-antitrypsin, transferin či plasminogen. Povrchové antigeny viru hepatitidy B nebyly zjištěny. Buňky reagují na stimulaci lidským růstovým hormonem. Jedná se buněčnou linii adherentní (buňky přilnou na dno kultivační nádoby a rostou v jedné vrstvě) (General Cell Collection: HepG2 2013, HepG2 (Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE) 2013).

Kultivaci jsme prováděli v tzv. plném médiu – DMEM obsahující 2 mM glutaminu, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin. Inkubace probíhala v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C při 5 % CO<sub>2</sub>. HepG2 buňky jsme pasážovali při 70-80% konfluenci za použití 0,25% trypsinu. Na kultivační destičky jsme buněčnou linii nasazovali v koncentraci 20 000-30 000 buněk na 1 cm<sup>2</sup>.

#### **5.1.2. Pomůcky, přístroje**

48jamkové destičky

96jamkové destičky

destičkový spektrofotometr-luminometr Genios Plus (Tecan)

inkubátor

kahan

kultivační lahve

laminární box

mikropipety

mikroskop

odsávačka

plastové mikrozkuhavky

plastové zkuhavky



skleněné Pasteurovy pipety

třepačka

### 5.1.3. Reagencie

anthokyanidiny (Extrasynthese, Francie):

- cyanidin (Extrasynthese, Francie)
- delphinidin (Extrasynthese, Francie)
- malvidin (Extrasynthese, Francie)
- pelargonidin (Extrasynthese, Francie)
- peonidin (Extrasynthese, Francie)
- petunidin (Extrasynthese, Francie)

CDCA (Sigma-Aldrich)

DMEM Dulbecco's Modified Eagles's médium (Sigma-Aldrich)

DMSO dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

fetální bovinní sérum (PAA)

glutamin (Sigma-Aldrich)

Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent (Invitrogen)

Luciferase Assay Reagent II (Promega):

- Luciferase Assay Buffer II (Promega)
- Luciferase Assay Substrate (Promega)

neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich)

Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Invitrogen)

Passive Lysis Buffer (Promega)

PBS fosfátový pufr

plasmid pFXRE-luc2P (plasmid byl připraven v laboratoři Doc. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D.)

plasmid pGAL4-FXR

plasmid pGL5-luc (Promega)

plasmid pRL-TK (Promega)

plasmid pSG5-FXR

roztok reagentů CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution (Promega):

- MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolinum) (Sigma Aldrich)
- PES (fenazin ethosulfát)

Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent (Promega):

- Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer (Promega)

- Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate (Promega)

0,25% trypsin (Sigma-Aldrich)

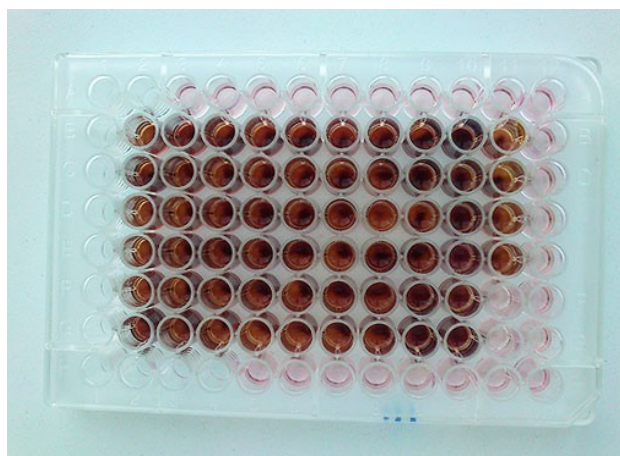
## 5.2. CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

### 5.2.1. Princip

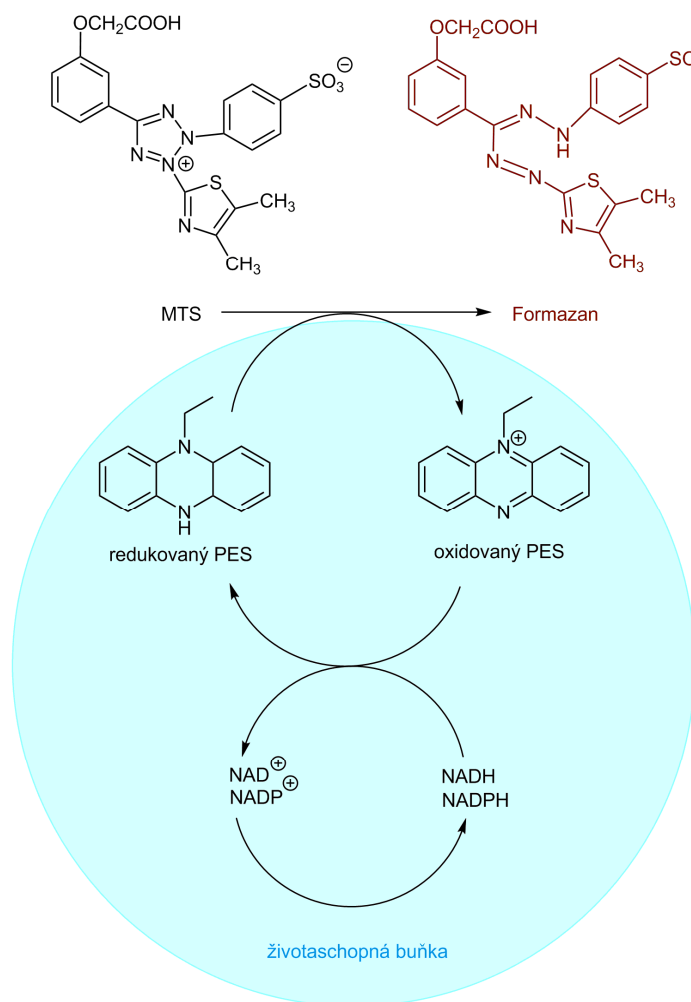
Jedná se o kolorimetrickou metodu, která je určena ke kvantifikaci životaschopných buněk v testech cytotoxicity a ke sledování počtu buněk při testování inhibice buněčné proliferace. Buněčná viabilita je monitorována jako aktivita mitochondriálních enzymů dehydrogenáz. Předpokládáme, že živá buňka má dehydrogenázu aktivní, zatímco buňka v nekróze nebo apoptóze nikoliv (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 2012, Dvořák 2011).

Tato metoda využívá reagentie tetrazolinovou sůl MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolinum) a PES (fenazin ethosulfát). Tato reagentia jsou stabilní v jednom roztoku. Test je založen na přeměně MTS na barevný (tmavě modrofialový) formazan rozpustný v médiu (viz Obr. 29). Redukce probíhá pomocí enzymů dehydrogenáz mitochondriálního respiračního řetězce a za účasti kofaktorů NADPH (redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) a NADH (redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid) pouze v metabolicky aktivních buňkách (viz Obr. 30). Proto tato metoda detekuje výhradně viabilní buňky. Míra přeměny MTS na barevný formazan je úměrná počtu životaschopných buněk vyjádřených v procentech. Kvantifikace vzniklého formazanu se provede měřením absorbance při vlnové délce 490 nm (maximum absorbance formazanu), použije se 96jamková destička (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 2012, Dvořák 2011).

V našem experimentu jsme tuto metodu využili k testování cytotoxického vlivu studovaných anthokyanidinů v daných koncentracích na buňky linie HepG2.



**Obr. 29** 96jamková destička s barevnými roztoky formazanu při našem experimentu, metoda CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay.



**Obr. 30** Přeměna MTS na barevný formazan. Vysvětlivky: MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolinum), PES (fenazin ethosulfát), NAD<sup>+</sup> (oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid), NADP<sup>+</sup> (oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát), NADH (redukováný nikotinamid adenin dinukleotid), NADPH (redukováný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát). Modifikováno dle: CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (2012).

### 5.2.2. Pracovní postup

1. Buňky linie HepG2 jsme nasadili na 96jamkovou destičku. Přidali jsme do každé jamky 100  $\mu$ l plného média, tzn. DMEM jenž obsahovalo 2 mM glutaminu, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin.
2. Buňky jsme inkubovali 24 hodin v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C při 5 % CO<sub>2</sub>.
3. Po 24 hodinách jsme odsáli plné médium z buněk, přidali jsme 100  $\mu$ l PBS, odsáli PBS.
4. Potom jsme k buňkám přidali do každé jamky 100  $\mu$ l roztoku testovaných látek, tento roztok se skládal z jednotlivých testovaných anthokyanidinů v daných koncentracích, rozpuštěných v DMSO a v Opti-MEM médiu. Jako kontrolní vzorek jsme použili roztok DMSO v Opti-MEM médiu o koncentraci 1 ‰.
5. Následně jsme buňky nechali 24 hodin inkubovat.
6. Roztok reagensí CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution jsme rozmrazili ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C na 10 minut.
7. Přidali jsme 20  $\mu$ l tohoto roztoku reagensí do každé jamky destičky.
8. Destičku jsme nechali inkubovat 2 hodiny.
9. Poté jsme měřili absorbanci vzniklých roztoků formazanu v jednotlivých jamkách při 490 nm. Pro vyhodnocení jsme použili destičkový spektrofotometr-luminometr Genios Plus (Tecan).
10. Získané výsledky jsme vyhodnotili.

### 5.3. Gene reporter assay

#### 5.3.1. Princip

Metoda gene reporter assay je určena ke studiu genové exprese u eukaryotních buněk. Ze samotného názvu vyplývá, že se jedná o systém, který nás informuje (reportuje) o změně genové exprese. Dále tuto metodu můžeme využít ke studiu buněčné fyziologie, receptorové aktivity, buněčné signalizace, transkripčních faktorů, úprav mRNA či skládání proteinů (Introduction to Reporter Gene Assays 2013, Kameníčková 2012).

Princip spočívá v transfekci expresního vektoru do vhodných hostitelských buněk a kontrtransfekci reportérového vektoru do těchto buněk. Expresní vektor zajistí expresi studovaného genu (např. genu pro nukleární receptor) v cílové buňce. Reportérový plasmid

obsahuje reportérový gen (např. gen pro luciferázu) a promotorovou (regulační) oblast pro studovaný gen nukleárního receptoru, která se nachází těsně před kódující DNA reportérového genu. Pokud je reportérový vektor konstruován správně, tak transkripční aktivita studovaného genu a interakce ligandu s nukleárním receptorem koreluje s mírou exprese reportérového genu. Expresi reportérového genu lze kvantifikovat a tím vyjádřit aktivitu studovaného genu nebo interakci ligandu s nukleárním receptorem (Introduction to Reporter Gene Assays 2013, Kameníčková 2012).

### *Plasmidové vektory*

Plasmidové vektory jsou malé kruhové molekuly DNA (1-200 kbp) vyskytující se běžně v bakteriálních buňkách. Plasmidy jsou dále geneticky upravené vložением molekuly cizí DNA (o velikosti kolem 10-20 kbp). Každý vektor obsahuje tzv. mnohočetné klonovací místo, ve kterém dojde k otevření kruhu, vloží se do něj cizí DNA a kruh se opět uzavře tak, aby se cizí DNA stala jeho součástí. Aby došlo k replikaci v hostitelské buňce, obsahuje každý plasmid sekvenci, která je rozpoznávána DNA-polymerázou hostitelské buňky, což je většinou *Escherichia coli*. Tato sekvence je označována jako ORI (z angl. origin, tedy počátek replikace). V cílové buňce dochází k replikaci nezávisle na chromozomální DNA. Takto lze vytvořit plasmid-konstrukt přesně pro daný účel, nechá se pomnožit (naklonovat) vložением do bakterií a získá se z nich zpět v mnohonásobném množství (Raclavský 2003).

Expresní vektory jsou konstrukty vytvořené rekombinantními technologiemi pro sledování míry exprese studovaného genu. Slouží pro dopravu a expresi genu do cílových buněk, využijí jejich transkripčního a translačního aparátu k syntéze proteinu, který je kódován cDNA obsaženou v plasmidu. Vzniklý protein může být buď samostatný nebo fúzovaný s jiným proteinem. Expresní plasmidy nesou silné eukaryotické promotory a terminátory (Vondrejs a Storchová 1997).

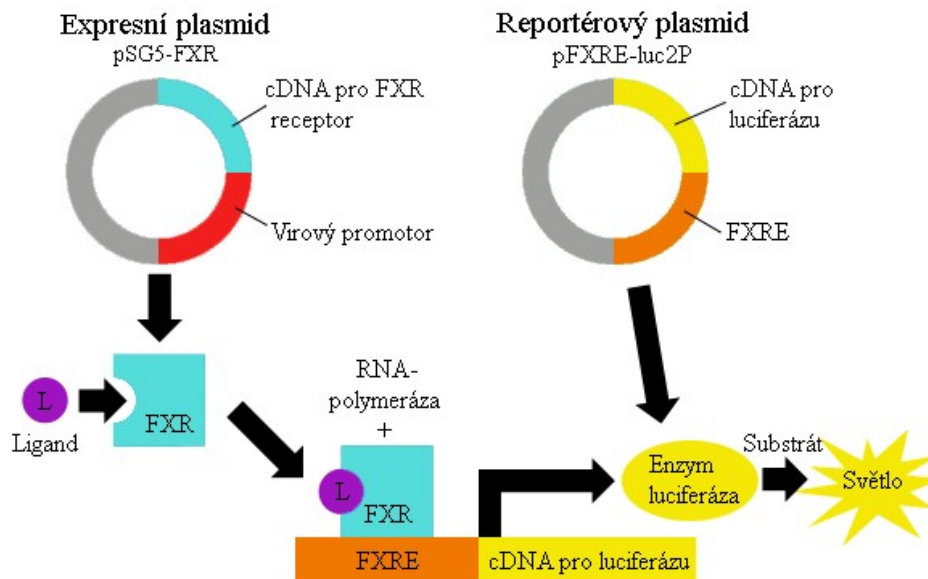
Reportérový plasmid obsahuje ve své struktuře reportérový gen a promotorovou (regulační) oblast pro studovaný gen nukleárního receptoru, která se nachází těsně před reportérovým genem. Transkripční aktivita studovaného receptoru koreluje s mírou aktivace nukleárního receptoru a jeho transkripční aktivitou. Reportérový gen nám takto hlásí (reportuje) míru genové exprese studovaného genu.

V našem experimentu jsme transfekovali do buněk linie HepG2 expresní plasmid pSG5-FXR, který obsahuje kódující DNA sekvenci (cDNA) lidského FXR receptoru. FXR

receptor je ligandy-agonisty aktivovaný transkripční faktor, který se spolu s RNA-polymerázou váže do specifických promotorových sekvencí FXRE (z angl. FXR-responsive elements). FXRE je obsažena v reportérovém plasmidu pFXRE-luc2P, který obsahuje i reportérový gen pro světluškovou luciferázu. Po nasednutí RNA-polymerázy a transkripčního faktoru dochází k iniciaci transkripce, k translaci (Alberts et al. 1998). Zahajuje se tedy exprese reportérového genu pro enzym luciferázu, po dodání substrátu dochází k luminiscenci (viz Obr. 31). My jsme pro náš experiment použili systém duálních reportérů. Jednalo se o reportérový tzv. experimentální plasmid a jako tzv. kontrolní reportérový plasmid jsme použili pRL-TK nesoucí reportérový gen pro *Renilla* luciferázu.

Tuto metodu jsme využili pro dva experimenty. V prvním jsme pomocí známého ligandu-agonisty lidského nukleárního FXR receptoru ověřovali, zda je expresní plasmid pSG5-FXR zkonstruován správně. Tím zajistíme, aby výsledky dalšího měření byly průkazné.

V druhém experimentu jsme zjišťovali, zda jsou testované látky ligandy-agonisty FXR receptoru. Detekcí luminiscence jsme ověřovali, zda došlo ke zvýšení exprese genu pro luciferázu, která je výsledkem zvýšené transkripční aktivity FXR receptoru aktivovaného ligandem-agonistou. Testování jsme prováděli ve srovnání s kontrolou (1% roztok DMSO).

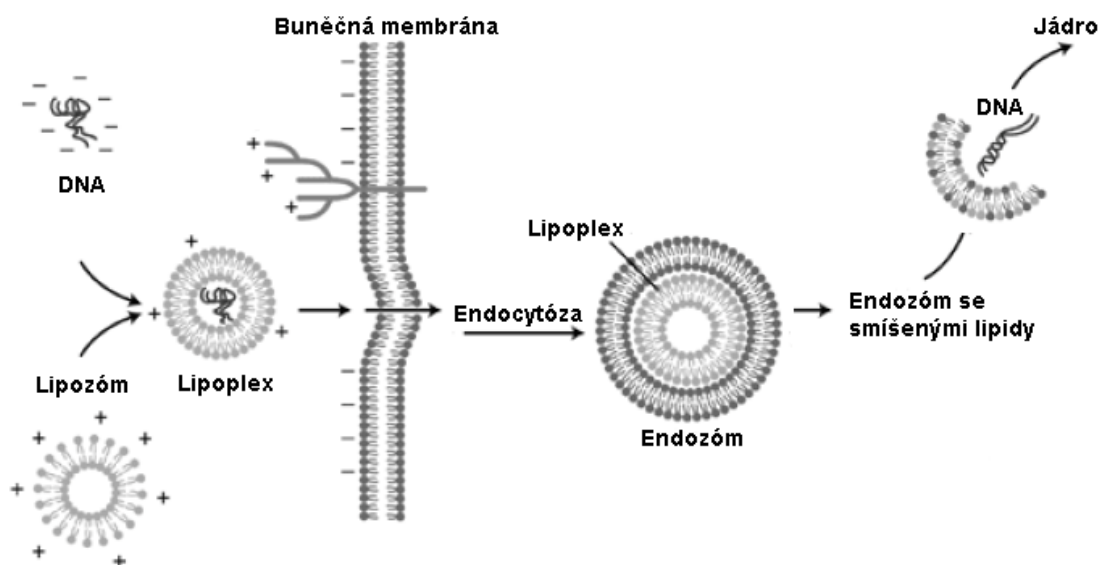


**Obr. 31 Schéma našeho experimentu, metoda gene reporter assay.** Expresní plasmid pSG5-FXR nese cDNA (kódující DNA) pro FXR (farnesoidní X receptor), reportérový plasmid pFXRE-luc2P obsahuje FXRE (responzivní oblast FXR) a cDNA pro luciferázu. FXR aktivovaný ligandem se váže de FXRE a zahajuje expresi reportérového genu.

## Transfekce

Plasmidové vektory se do hostitelských buněk mohou vkládat různými technikami, my jsme použili metodu transfekce pomocí lipofekčního činidla Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent, neboli lipofekci. Jedná se o transfekci transientní, tedy že plasmid je vložen do hostitelské buňky „ad hoc“ pro daný experiment. Opakem je transfekce trvalá. Negativně nabitá DNA nemůže projít lipidovými membránami buněk rovněž s negativním nábojem. Proto využijeme lipofekční činidla, jejichž struktura je analogická k fosfolipidům biologických membrán, jedná se o kationické lipidy, které tvoří lipozómy. Dojde k uzavření DNA uvnitř lipozómu, vzniklý komplex (lipoplex) proniká do buňky endocytózou a DNA se dostává z endozómů do jádra (viz Obr. 32) (Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent 2012, Cotransfecting Plasmid DNA and RNAi into Mammalian Cells Using Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 2005, Transfection 2003, Pávek 2010, Kameníčková 2012).

Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent je vhodný pro transfekci nukleových kyselin do eukaryotních buněk. Komplexy DNA a lipofektaminu se přidávají přímo na buňky v kultivačním médiu, které mají konfluenci 70-90 %. Pro ředění plasmidů DNA i lipofektaminu se používá médium Opti-MEM. Pro tvorbu komplexů se doporučuje poměr DNA ( $\mu\text{g}$ ) : lipofektaminu ( $\mu\text{l}$ ) v rozmezí 1 : 2 až 1 : 3 (Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent 2012).



**Obr. 32 Lipofekce.** DNA je uzavřena uvnitř lipozómu, vzniklý lipoplex proniká do buňky endocytózou a DNA se dostává z endozómů do jádra. Modifikováno dle: Frébort (2006).

## Princip Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System

V našem experimentu jsme použili systém duálních reportérů Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System, díky kterému lze dosáhnout přesnějších výsledků. Tato metoda

využívá současně dvou reportérových plasmidů, které nesou geny pro enzym luciferázu. První gen pochází ze světlušek (*Photinus pyralis*) a druhý ze svítivých korálnatců renil fialových (*Renilla reniformis*). Evoluční původ těchto dvou enzymů luciferáz je odlišný a proto mají i rozdílnou strukturu a substrátové požadavky. Díky těmto rozdílům můžeme měřit luminiscenci v jednom vzorku a postupně za sebou tak, že jednotlivé luminiscenční signály můžeme selektivně rozlišit (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 2011, Allard a Kopish 2008).

První reportérový plasmid tzv. experimentální reportérový plasmid obsahuje promotorovou oblast pro studovaný gen a světluškovou luciferázu. Hladina jeho exprese koreluje s transkripční aktivitou studovaného genu. Druhý reportérový plasmid tzv. kontrolní plasmid slouží pro vnitřní kontrolu a obsahuje gen pro *Renilla* luciferázu. Normalizaci aktivity světluškové luciferázy na aktivitu *Renilla* luciferázy provádíme stanovením jejich poměru a slouží k minimalizaci variability experimentu, která může být způsobena rozdíly v buněčné viabilitě, v efektivnosti transfekce, v pipetování odlišných objemů či v efektivnosti lýzy buněk. Eliminací vlivu těchto vnějších podmínek docílíme přesnější interpretace experimentálních dat (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 2011, Allard a Kopish 2008).

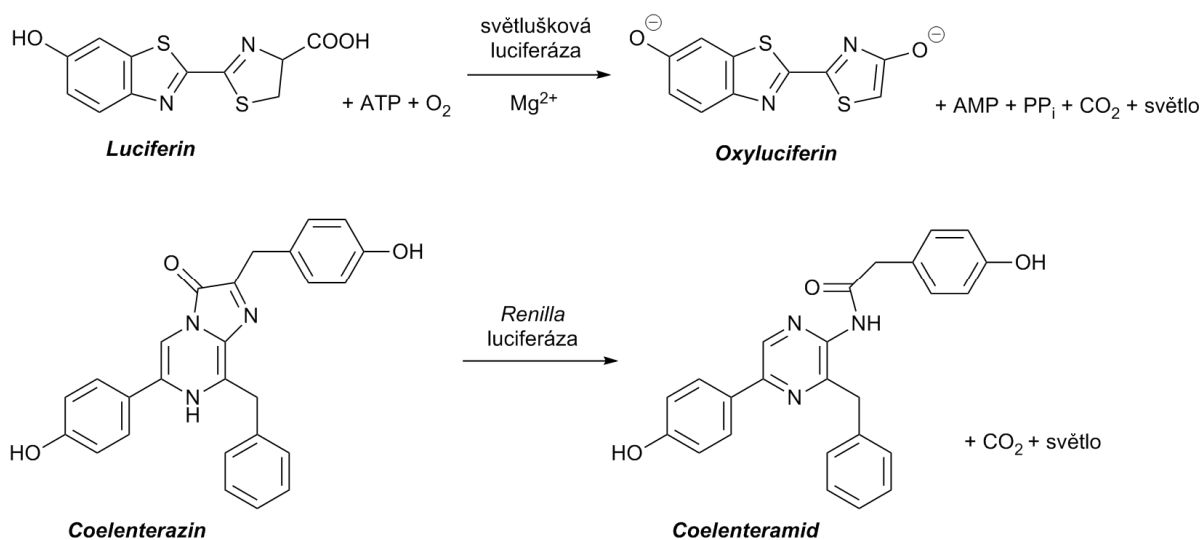
Expresi obou genů pro enzymy postupně detekujeme chemoluminiscenčně. Nejdříve měříme luminiscenci světluškové luciferázy. Stabilizovaný luminiscenční signál vzniká po přidání substrátu pro světluškovou luciferázu - Luciferase Assay Reagentu II. Po kvantifikaci tento signál v jednom kroku zhasíme a zároveň přidáváme substrát pro *Renilla* luciferázu pomocí Stop & Glo<sup>®</sup> Reagentu. Tím vzniká druhý luminiscenční signál, který po ukončení měření postupně slábne. Odezva luciferázového testu je okamžitá. Vyzařované světlo má vlnovou délku v oblasti 550-570 nm, barevně je tedy zelené až žluté. Intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná ke koncentraci enzymu luciferázy (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 2011, Allard a Kopish 2008).

Světlušková luciferáza je monomerní protein o velikosti 61 kDa, pro jeho enzymovou aktivitu není zapotřebí post-translační modifikace. Díky tomu může působit jako genový reportér hned po translaci. Po smíchání enzymu a substrátu dochází k luminiscenci díky emisi fotonu prostřednictvím oxidace světluškového luciferinu, tato reakce vyžaduje  $Mg^{2+}$ , ATP (adenosin trifosfát) a  $O_2$  (viz Obr. 33) (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 2011).

*Renilla* luciferáza je 36kDa monomerní protein. Stejně jako u světluškové luciferázy není zapotřebí posttranslační modifikace pro správnou funkci tohoto enzymu a díky tomu může ihned po translaci působit jako genový reportér. Po smíchání tohoto enzymu a substrátu, kterým je koloenterazin dochází za přítomnosti  $O_2$  k luminiscenční reakci. Jedná se



o autoluminiscenční reakci koloenterazinu, při které dochází k emisi fotonu (viz Obr. 33) (Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 2011, pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vectors 2013).



**Obr. 33 Bioluminiscenční reakce katalyzované světluškovou luciferázou a *Renilla* luciferázou.** Vysvětlivky: ATP (adenosintrifosfát), AMP (adenosinmonofosfát), PP<sub>i</sub> (difosfátový P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup> ion). Modifikováno dle: Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (2011).

### Materiál

pSG5-FXR – expresní plasmid nesoucí cDNA lidského nukleárního receptoru FXR

pFXRE-luc2P – reportérový plasmid obsahující regulační oblast FXRE pro FXR receptor (obsahuje 4 kopie oblasti IR lidského genu *NR0B2*) a reportérový gen pro světluškovou luciferázu

pRL-TK – expresní plasmid nesoucí cDNA pro *Renilla* luciferázu

### 5.3.2. Pracovní postup

1. Nasadili jsme 48jamkovou destičku s 30 000 buňkami linie HepG2 na jednu jamku (o ploše 1 cm).
2. Přidali jsme do každé jamky 160 μl plného média, tzn. DMEM jenž obsahovalo 2mM glutaminu, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin.
3. Nechali jsme 24 hodin inkubovat v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C při 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Před transfekcí jsme vyměnili staré plné médium za nové plné médium (160 μl).
5. Vypočítali jsme si potřebné množství DNA plasmidů a lipofektaminu.

6. Pro vlastní transfekci jsme si připravili 60  $\mu$ l transfekční směsi na jamku, ta se skládala ze dvou částí:
  - a) První část byla složena z 30  $\mu$ l média Opti-MEM s obsahem plasmidů pSG5-FXR (100 ng na jamku), pFXRE-luc2P (200 ng na jamku) a pRL-TK (50 ng na jamku).
  - b) Druhá část obsahovala 30  $\mu$ l Opti-MEM média a lipofektaminu (v poměru 2,5 : 1 k DNA plasmidům).Po pěti minutách jsme obě části smíchali, inkubovali 20 minut za pokojové teploty a pipetovali 60  $\mu$ l této transfekční směsi na jamku.
7. Inkubovali jsme 24 hodin.
8. Po 24 hodinách jsme odsáli z buněk směs plného média a transfekční směsi. Následně jsme přidali na 6-8 hodin 100  $\mu$ l Opti-MEM média na každou jamku.
9. Po inkubaci jsme přidali 150  $\mu$ l roztoku složeného z testovaných látek o požadované koncentraci rozpuštěných v DMSO a média DMEM na každou jamku. Jako kontrolní roztok jsme použili roztok DMSO v DMEM o koncentraci 1 ‰.
10. Poté následovala 24 hodinová inkubace.
11. Následně jsme odstranili z buněk roztoky a opláchli buňky pomocí PBS ohřátého na teplotu 37 °C.
12. Přidali jsme Passive lysis buffer o objemu 100  $\mu$ l na jamku a nechali jsme destičku zmraznout. Vzniklé krystaly zlyzovaly buňky.
13. Připravili jsme si 96jamkovou destičku a na ni jsme po rozmrznutí z každé jamky pipetovali 40  $\mu$ l lyzátu a 40  $\mu$ l Luciferase Assay Reagentu II, neboli luminolu (připraveného z 10 ml Luciferase Assay Buffer II a lyofylizátu Luciferase Assay Substrate).
14. Následovala analýza chemiluminiscence na destičkovém spektrofotometru-luminometru Genios Plus (Tecan). Jako první jsme analyzovali luminiscenci světluškové luciferázy.
15. Přidali jsme 40  $\mu$ l Stop & Glo<sup>®</sup> Reagentu (připraveného z Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer a Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate v poměru 50 : 1). A následně jsme analyzovali chemoluminiscenci *Renilla* luciferázy na destičkovém spektrofotometru-luminometru Genios Plus (Tecan).
16. Získané výsledky jsme vyhodnotili.

## 5.4. One hybrid assay

### 5.4.1. Princip

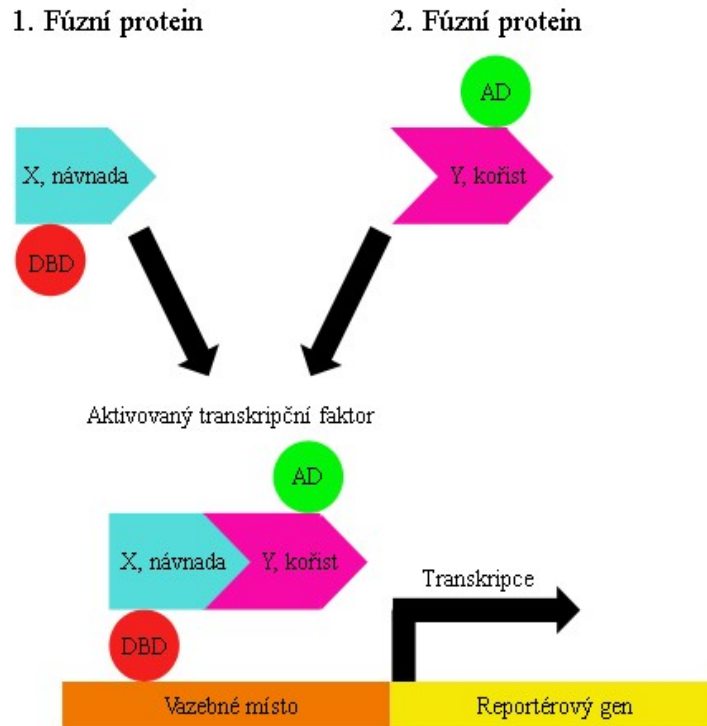
Metoda one hybrid assay je určena ke studiu interakcí mezi proteinem a DNA *in vivo*. Jedná se o upravenou metodu Two hybrid assay. Oproti ní využívá jen jeden fúzní protein (složený z X, neboli návnady a DNA-vazebné domény). Druhý fúzní protein (složený z Y, neboli kořisti a aktivační domény) v této metodě není použit. Funkce druhého fúzního proteinu je nahrazena endogenními koaktivátory u dané buněčné linie, které se podílí na aktivaci transkripčního faktoru.

#### *Princip Two hybrid assay*

Metoda Two hybrid assay slouží ke studiu interakcí mezi dvěma proteiny *in vivo*. Tato assay byla původně vyvinuta pro kvasinky (Y2H, yeast two-hybrid), dnes existují modifikace i pro bakteriální a savčí buňky (Wildová a Rumlová 2008).

Principem této metody je interakce mezi dvěma proteiny, při které vzniká jeden výsledný protein s funkcí transkripčního faktoru. První interagující protein se označuje jako X, neboli jako tzv. návnada (z angl. bait protein). Je fúzovaný s DNA-vazebnou doménou DBD (z angl. DNA-binding protein) připojenou na jeho N-konci, která zajišťuje vazbu vzniklého transkripčního faktoru do specifických promotorových oblastí. Druhý protein je potenciálním vazebným partnerem, nese označení písmenem Y, jedná se tzv. kořist (z angl. prey protein). Prey protein je fúzovaný s transkripční aktivační doménou AD (z angl. activator domain). Interakcí mezi těmito dvěma fúzními proteiny dochází ke spojení dvou domén (DBD a AD) a následnému vzniku aktivního transkripčního faktoru, který se váže na promotorovou DNA reportérového genu a aktivuje transkripci (viz Obr. 34). Míra interakce protein-protein koreluje s mírou exprese reportérového genu. Expresi reportérového genu lze kvantifikovat a tím vyjádřit rozsah interakcí mezi studovanými fúzními proteiny na základě vazby ligandu na bait protein (Wildová a Rumlová 2008, CheckMate<sup>TM</sup>/Flexi<sup>®</sup> Vector Mammalian Two-Hybrid System 2009).

Limitujícím faktorem této techniky je možnost použít pouze ty proteiny, které jsou transportovány do jádra buněk, a které mají ve formě fúzních proteinů zachovanou jak strukturu, tak i aktivitu (Wildová a Rumlová 2008).



**Obr. 34 Schéma metody Two hybrid assay.** První fúzní protein (X, návnada) je fúzovaný s DBD (DNA-vazebnou doménou), druhý fúzní protein (Y, kořist) je fúzovaný s AD (aktivační doménou), interakcí těchto dvou proteinů vzniká aktivní transkripční komplex váže se na vazebné místo promotoru reportérového genu a tím aktivuje transkripci.

### *GAL4/UAS systém*

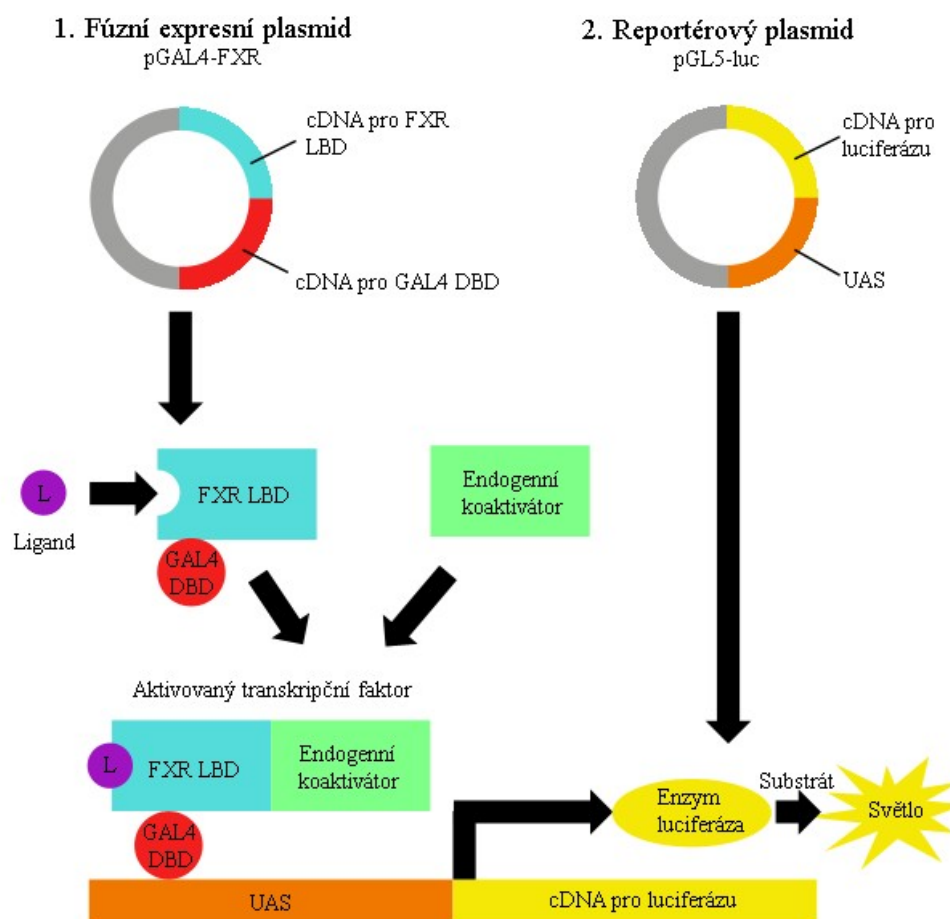
Tento dvojitý systém je převzat z kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) a původně byl vytvořen pro genetickou analýzu modelového organismu octomilky (*Drosophila melanogaster*). GAL4/UAS systém využívá kvasinkový protein GAL4 a regulační sekvenci UAS (z angl. upstream activating sequences) k indukci exprese genů různého původu. Principem je umístění studovaného genu za promotor obsahující UAS regulační sekvenci. Na UAS sekvenci se váže GAL4 „driver“, fungující jako transkripční faktor a iniciuje expresi studovaného genu (Sonnenfeld 2013, Doležal 2009).

Výhodou použití tohoto systému je, že se GAL4 a UAS vyskytují pouze u kvasinek, zatímco tato genetická informace není obsažena v lidském genomu, a proto se při jeho použití na buněčné linii HepG2 váže do UAS pouze protein GAL4. Další endogenní transkripční faktory se do UAS vázat nemohou, a proto nedojde tímto způsobem ke zkreslení výsledků.

V našem experimentu jsme pro metodu one hybrid assay využili systém duálních reportérů postupu gene reporter assay. Náš experiment je založen na transfekci tří typů

plasmidů do buněk linie HepG2. Prvním typem je fúzní expresní plasmid pGAL4-FXR, který nese cDNA pro ligand-vazebnou doménu lidského nukleárního receptoru FXR a cDNA pro kvasinkovou DNA-vazebnou doménu transkripčního faktoru GAL4. Expresí DNA tohoto plasmidu v buňce vzniká fúzní protein složený z tzv. návnady (ligand-vazebná doména FXR) a kvasinkové DNA-vazebné domény GAL4. Dále jsme do buněk kotransfekovali druhý typ plasmidu pGL5-luc, tedy reportérový vektor, který je zkonstruován z responzivní oblasti GAL4 (regulační sekvence UAS) a z reportérového genu pro světluškovou luciferázu. Interakcí mezi vzniklým fúzním proteinem a endogenními koaktivátory se vytváří transkripční komplex, aktivovaný ligandy-agonisty FXR, které se váží do ligand-vazebné domény. Část tohoto fúzního proteinu GAL4 DNA-vazebná doména se váže do specifických promotorových oblastí (UAS) reportérového genu pro luciferázu a dochází k iniciaci transkripce tohoto genu (viz Obr. 35). Jako třetí plasmid je do buněk kotransfekován reportérový tzv. kontrolní vektor pRL-TK nesoucí reportérový gen pro *Renilla* luciferázu, slouží pro vnitřní kontrolu. Expresi genů pro luciferázu lze detekovat chemoluminiscenčně.

Touto metodou jsme zjišťovali, zda jsou jednotlivé testované látky ligandy-agonisty FXR receptoru. Měřením luminiscenčních signálů jsme ověřovali, zda došlo ke zvýšení exprese genu pro luciferázu, která je výsledkem zvýšené transkripční aktivity FXR receptoru aktivovaného ligandem-agonistou za přítomnosti koaktivátorů. Testování jsme prováděli oproti kontrole (1% roztok DMSO).



**Obr. 35 Schéma našeho experimentu, metoda one hybrid assay.** Fúzní expresní plasmid pGAL4-FXR nese cDNA (kódující DNA) pro ligand-vazebnou vazebnou doménu (LBD) farnesoidního X receptoru (FXR) a cDNA pro GAL4 (kvasinkový protein GAL4) DNA-vazebnou doménu (DBD). Reportérový plasmid pGL5-luc obsahuje UAS (aktivační sekvence) a cDNA pro luciferázu. Ligandem aktivovaná FXR LBD interaguje s endogenními koaktivátory, vzniká aktivovaný transkripční faktor, DBD se váže do UAS a tím aktivuje transkripci reportérového genu.

### *Materiál*

pGAL4-FXR – fúzní expresní plasmid nesoucí cDNA pro ligand-vazebnou doménu lidského nukleárního receptoru FXR a cDNA pro kvasinkovou DNA-vazebnou doménu transkripčního faktoru GAL4

pGL5-luc – reportérový plasmid obsahující responzivní doménu kvasinkového transkripčního faktoru GAL4 (regulační sekvence UAS) a reportérový gen pro světluškovou luciferázu

pRL-TK – expresní plasmid nesoucí cDNA pro *Renilla* luciferázu

#### 5.4.2. Pracovní postup

1. Nasadili jsme 48jamkovou destičku s 30 000 buňkami linie HepG2 na jednu jamku (o ploše 1 cm).
2. Přidali jsme do každé jamky 160  $\mu$ l plného média, tzn. DMEM jenž obsahovalo 2mM glutaminu, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin.
3. Nechali jsme 24 hodin inkubovat v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C při 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Před transfekcí jsme vyměnili staré plné médium za nové plné médium (160  $\mu$ l).
5. Vypočítali jsme si potřebné množství DNA plasmidů a lipofektaminu.
6. Pro vlastní transfekci jsme si připravili 60  $\mu$ l transfekční směsi na jamku, ta se skládala ze dvou částí
  - a) První část byla složena z 30  $\mu$ l média Opti-MEM s obsahem plasmidů pGAL4-FXR (80 ng na jamku), pGL5-luc (150 ng na jamku) a pRL-TK (50 ng na jamku).
  - b) Druhá část obsahovala 30  $\mu$ l Opti-MEM média a lipofektaminu (v poměru 2,5 : 1 k DNA plasmidům).
7. Po pěti minutách jsme obě části smíchali, inkubovali 20 minut za pokojové teploty a pipetovali 60  $\mu$ l této transfekční směsi na jamku.
8. Inkubovali jsme 24 hodin.
9. Po 24 hodinách jsme odsáli z buněk směs plného média a transfekční směsi. Následně jsme přidali na 6-8 hodin 100  $\mu$ l Opti-MEM média na každou jamku.
10. Po inkubaci jsme přidali 150  $\mu$ l roztoku složeného z testovaných látek o požadované koncentraci rozpuštěných v DMSO a média DMEM na každou jamku. Jako kontrolní roztok jsme použili roztok DMSO v DMEM o koncentraci 1 %.
11. Poté následovala 24 hodinová inkubace.
12. Následně jsme odstranili z buněk roztoky a opláchli buňky pomocí PBS ohřátého na teplotu 37 °C.
13. Přidali jsme Passive lysis buffer o objemu 100  $\mu$ l na jamku a nechali jsme destičku zmraznout. Vzniklé krystaly zlyzovaly buňky.
14. Připravili jsme si 96jamkovou destičku a na ni jsme po rozmrznutí z každé jamky pipetovali 40  $\mu$ l lyzátu a 40  $\mu$ l Luciferase Assay Reagentu II, neboli luminolu (připraveného z 10 ml Luciferase Assay Buffer II a lyofylizátu Luciferase Assay Substrate).

15. Následovala analýza chemiluminiscence na destičkovém spektrofotometru-luminometru Genios Plus (Tecan). Jako první jsme analyzovali luminiscenci světluškové luciferázy.
16. Přidali jsme 40  $\mu$ l Stop & Glo<sup>®</sup> Reagentu (připraveného z Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer a top & Glo<sup>®</sup> Substrate v poměru 50 : 1). A následně jsme analyzovali chemoluminiscenci *Renilla* luciferázy na destičkovém spektrofotometru-luminometru Genios Plus (Tecan).
17. Získané výsledky jsme vyhodnotili.

### **5.5. Statistická analýza dat**

Statistické zpracování výsledků z metody gene reporter assay (I. a II.experiment) jsme provedli v programu *GraphPad Prism 6.01 Trial* (2012).

Použili jsme analýzu rozptylu (ANOVA) s post-Dunnettovým testem. Statistická významnost na úrovni  $p < 0,05$  je vyznačena v grafech \*.

Dále jsme provedli nepárový t-test. Statistická významnost na úrovni  $p < 0,05$  je vyznačena v grafech \*\*.

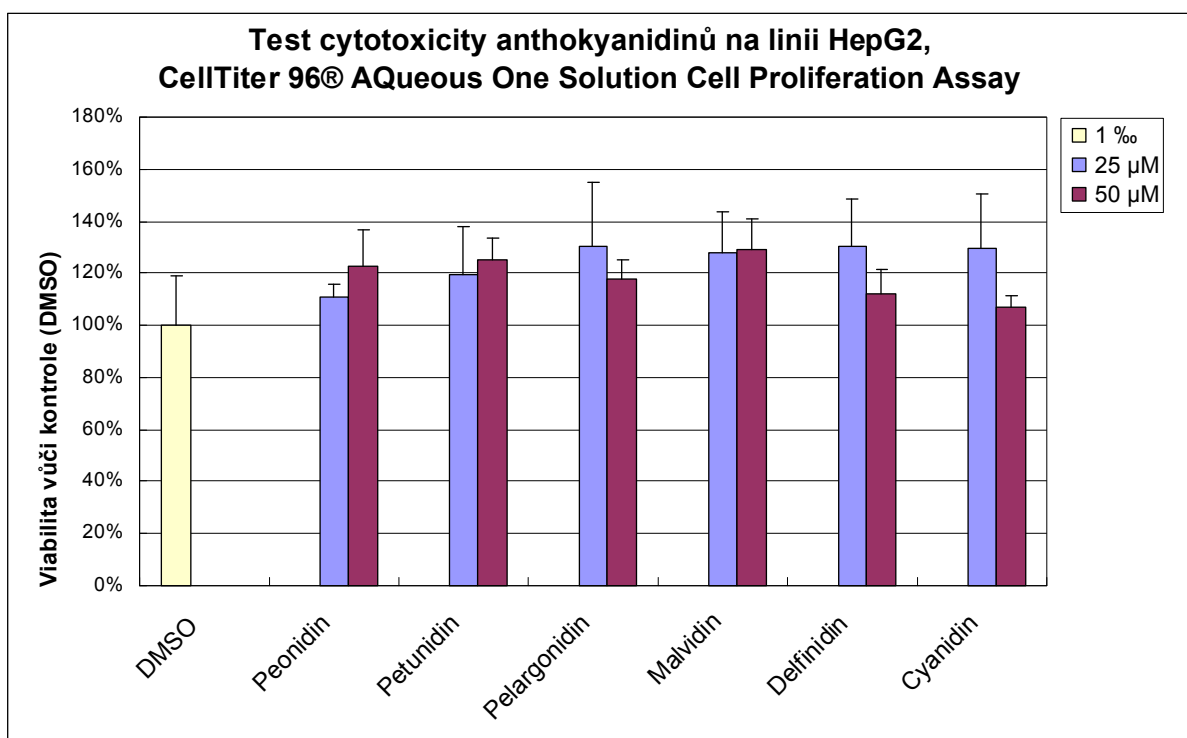


## 6. Výsledky

### 6.1. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Pomocí této metody jsme testovali cytotoxický účinek jednotlivých anthokyanidinů na buněčné linii HepG2 (viz Obr. 36).

Na 96jamkovou destičku jsme umístili jednotlivé testované látky v triplikátech, vždy ve dvou koncentracích (25  $\mu$ M a 50  $\mu$ M). Jednalo se o peonidin, petunidin, pelargonidin, malvidin, delfinidin a cyanidin. Zásobní roztoky těchto látek byly připraveny v DMSO v koncentraci 50 mM. Jako kontrolní vzorek jsme použili roztok DMSO v Opti-MEM médiu o koncentraci 1 ‰ v šesti jamkách. Buňky byly vystaveny vlivu testovaných látek po dobu 24 hodin.



Obr. 36 Test cytotoxicity vybraných anthokyanidinů metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid).

V tomto experimentu jsme zjistili, že u buněk linie HepG2, které byly vystaveny vlivu všech testovaných anthokyanidinů ve dvou koncentracích (50  $\mu$ M a 25  $\mu$ M) po dobu 24 hodin, došlo k mírnému zvýšení proliferace (viz Obr. 36). Z výsledků je tedy patrné, že obě tyto koncentrace nemají na buňky cytotoxický vliv a proto můžeme testovat vliv těchto anthokyanidinů, aniž by hrozilo riziko falešné interpretace výsledků.

Výsledky metody CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nebyly podrobeny statistické analýze, neboť mají pouze informativní charakter pro další experimenty.

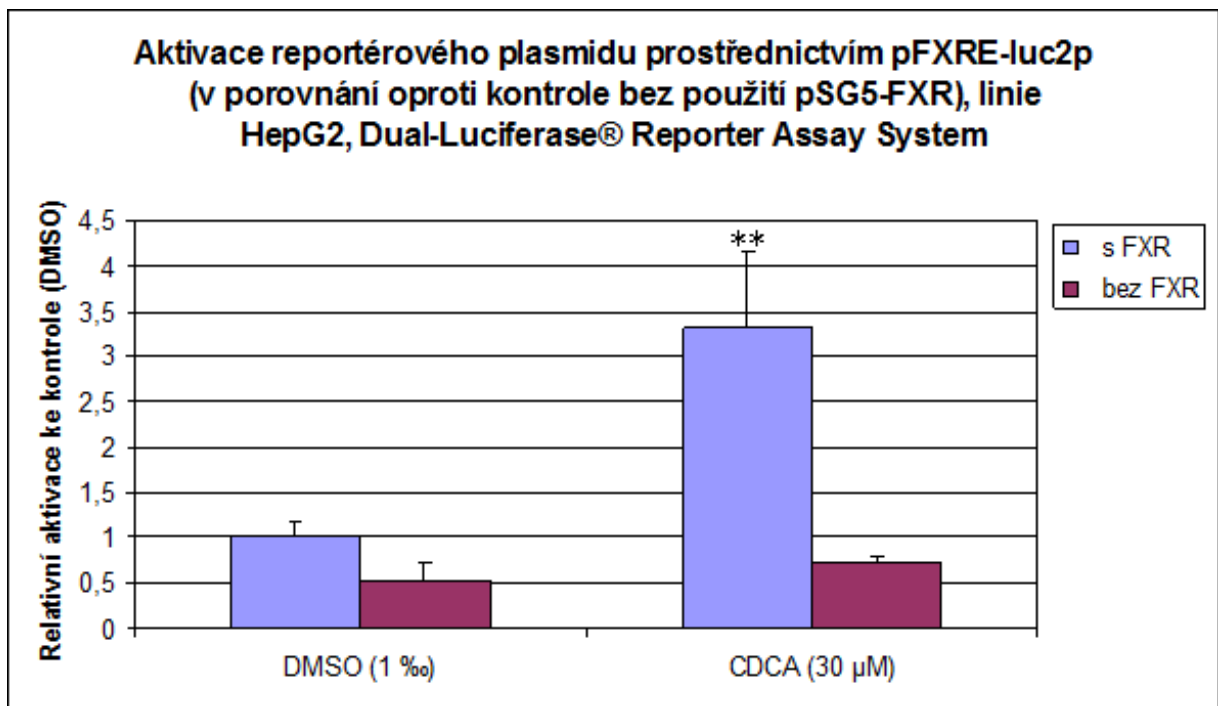
## 6.2. Gene reporter assay

Tuto metodu jsme využili pro dva experimenty. V prvním jsme na buněčné linii HepG2 pomocí známého ligandu-agonisty (kyseliny chenodeoxycholové, CDCA) lidského nukleárního FXR receptoru ověřovali, zda je expresní plasmid pSG5-FXR zkonstruován správně s cílem zajistit přesnější interpretaci experimentálních dat z dalších měření. Testovali jsme, zda skutečně dojde ke zvýšení exprese reportérového genu pro luciferázu, která je výsledkem zvýšené transkripční aktivity FXR receptoru aktivovaného známým ligandem-agonistou (viz Obr. 37).

V druhém experimentu jsme na buněčné linii HepG2 ověřovali, zda jsou jednotlivé testované látky ligandy-agonisty FXR receptoru. Měřením luminiscenčních signálů jsme zjišťovali, zda došlo ke zvýšení exprese reportérového genu pro luciferázu prostřednictvím zvýšené transkripční aktivity FXR receptoru aktivovaného ligandem-agonistou (viz Obr. 38). Jako pozitivní kontrolu jsme použili kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA), která je známým ligandem-agonistou FXR receptoru.

### *I. experiment*

48jamkovou destičku jsme si rozdělili na dvě části. V první části jsme transfekovali do buněk expresní plasmid pSG5-FXR nesoucí cDNA pro FXR receptor i oba reportérové vektory pFXRE-luc2P a pRL-TK. Na tuto část jsme umístili testovanou látku v kvadruplikátech. Druhá část 48jamkové destičky obsahovala buňky transfekované pouze reportérovými plasmidy, tato část sloužila pro kontrolu. Na tuto část jsme umístili testovanou látku v duplikátech. Studovanou látkou byl známý agonista FXR receptoru CDCA o koncentraci 30  $\mu$ M. Jako kontrolní vzorek jsme použili DMSO v DMEM o koncentraci 1 %. Buňky byly vystaveny vlivu testovaných látek po dobu 24 hodin (viz Obr. 37).

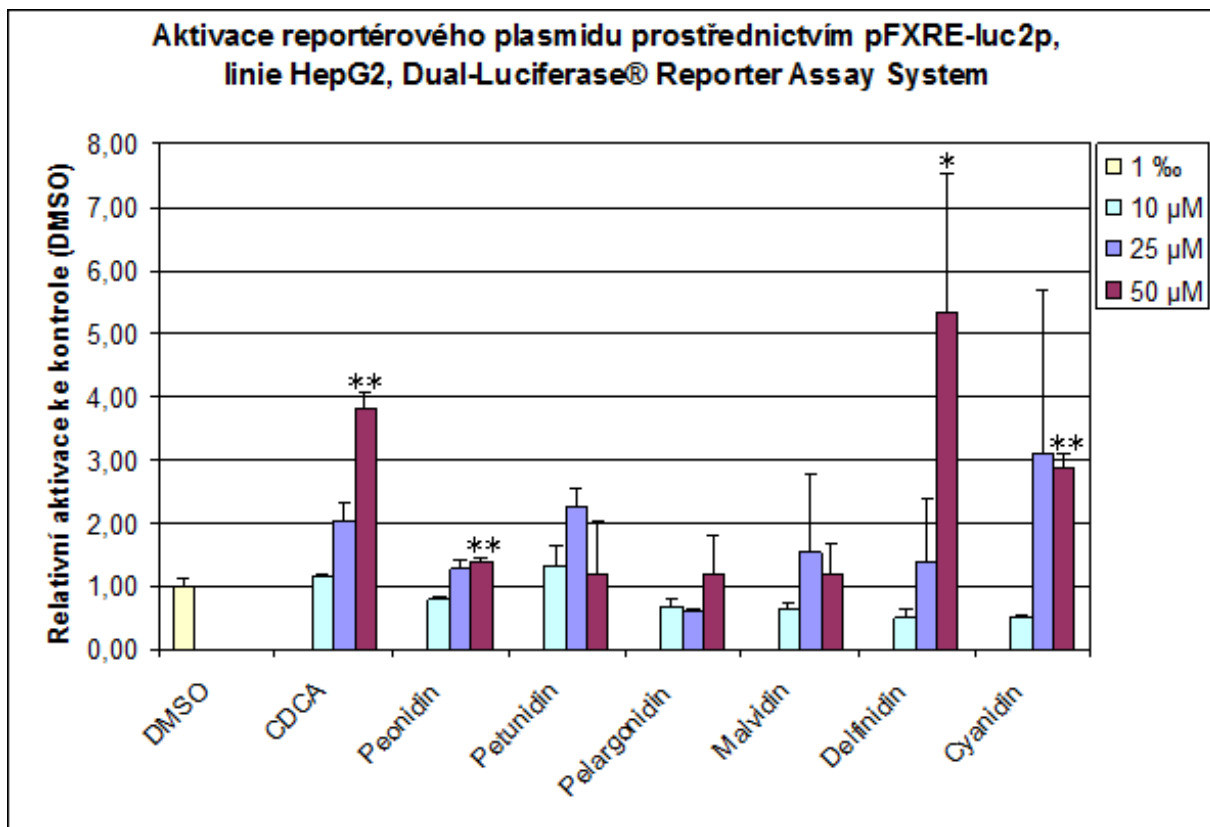


**Obr. 37** Test interakce studované látky CDCA (kyselina chenodeoxycholová) s FXR receptorem metodou Dual-Luciferase® Reporter Assay System, za použití reportérového konstruktu pFXRE-luc2P a expresního konstruktu pSG5-FXR (v porovnání oproti kontrole bez použití pSG5-FXR) na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid), statistická významnost na úrovni  $p < 0,05$  je zaznačena \*\* (nepárový t-test).

V tomto experimentu jsme pozorovali, že došlo ke zvýšení transkripční aktivity FXR receptoru u testované látky CDCA (30 µM) se statistickou významností na úrovni  $p < 0,05$  (v grafu vyznačeno \*\*, nepárový t-test). Tímto jsme ověřili, že se jedná o ligand-agonistu FXR receptoru. V kontrolním vzorku bez FXR receptoru CDCA nezvýšila aktivaci reportérového konstruktů.

## II. experiment

Do buněk jsme transfekcí vnesli expresní vektor pSG5-FXR kódující gen pro lidský nukleární FXR receptor i oba reportérové plasmidy pFXRE-luc2p a pRL-TK. Studované látky jsme testovali v duplikátech, vždy ve třech koncentracích (10 µM, 25 µM a 50 µM). Jednalo se o CDCA, peonidin, petunidin, pelargonidin, malvidin, delfinidin a cyanidin. Jako kontrolní vzorek jsme použili roztok DMSO v Opti-MEM médiu o koncentraci 1 ‰ v triplikátu. Buňky byly vystaveny vlivu testovaných látek po dobu 24 hodin (viz Obr. 38).



**Obr. 38** Test interakce studovaných látek s FXR receptorem metodou Dual-Luciferase® Reporter Assay System, za použití konstruktů pFXRE-luc2P na buněčné línii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová), statistická významnost na úrovni  $p < 0,05$  je zaznačena \* (ANOVA) a \*\* (nepárový t-test).

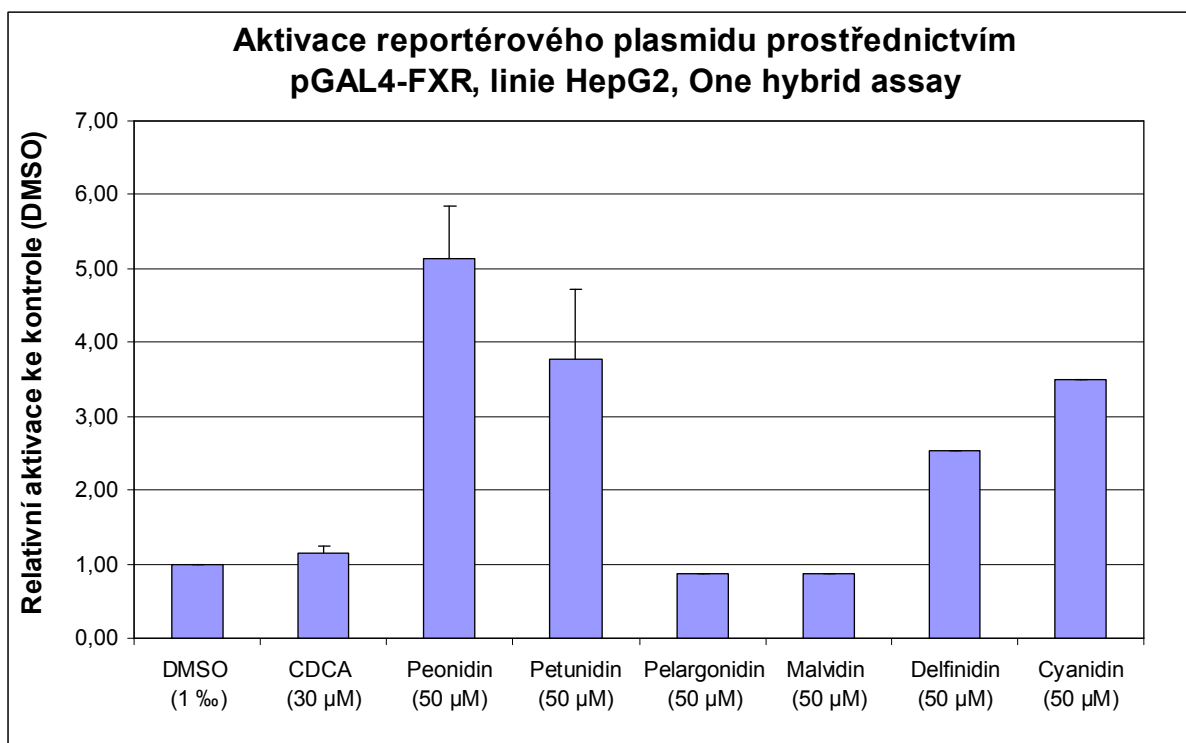
V tomto experimentu jsme pozorovali zvýšení transkripční aktivity lidského nukleárního receptoru FXR u peonidinu v koncentracích 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , u petunidinu v koncentracích 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , u pelargonidinu v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , u malvidinu v koncentracích 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , u delfinidinu v koncentracích 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  a u cyanidinu v koncentracích 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ). Touto metodou jsme zjistili, že tyto anthokyanidiny interagují s lidským nukleárním FXR receptorem, tedy že jsou jeho ligandy-agonisty.

Zvýšení transkripční aktivity farnesoidního X receptoru se statistickou významností na úrovni  $p < 0,05$  (v grafu vyznačeno \*\*, nepárový t-test) bylo pozorováno u CDCA v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , u peonidinu v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  a u cyanidinu v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Zvýšení transkripční aktivity FXR receptoru se statistickou významností na úrovni  $p < 0,05$  (v grafu vyznačeno \*, ANOVA) bylo tímto experimentem zjištěno u delfinidinu v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ .

### 6.3. One hybrid assay

Pomocí této metody jsme na buněčné linii HepG2 zjišťovali, zda jsou jednotlivé testované anthokyanidiny ligandy-agonisty lidského nukleárního FXR receptoru. Detekci luminiscenčních signálů jsme ověřovali, zda došlo ke zvýšení exprese reportérového genu pro luciferázu, které vychází ze zvýšené transkripční aktivity exprimované ligand-vazebnou doménou FXR receptoru. Předpokladem je aktivace tohoto transkripčního faktoru endogenním koaktivátorem za přítomnosti ligandu-agonisty. Jako pozitivní kontrolu jsme použili kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA), která je známým ligandem-agonistou FXR receptoru.

V tomto experimentu jsme transfekovali do buněk fúzní expresní plasmid pGAL4-FXR nesoucí cDNA pro ligand-vazebnou doménu lidského nukleárního receptoru FXR a reportérový plasmid pGL5-luc nesoucí reportérový gen pro světluškovou luciferázu. Třetím kotransfekovaným plasmidem byl expresní vektor pRL-TK nesoucí cDNA pro *Renilla* luciferázu. Testovanými látkami, které jsou potencionálními ligandy-agonisty FXR receptoru, byly jednotlivé anthokyanidiny v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Jednalo se o peonidin, petunidin, pelargonidin, malvidin, delfinidin a cyanidin. Peonidin a petunidin jsme testovali v duplikátu, ostatní anthokyanidiny jsme zkoumali v počtu jeden vzorek. Pro pozitivní kontrolu jsme použili CDCA v koncentraci 30  $\mu\text{M}$ , také v duplikátu. Jako kontrolní vzorek sloužil roztok DMSO v Opti-MEM médiu o koncentraci 1 %, rovněž v duplikátu. Doba inkubace byla 24 hodin (viz Obr. 39).



**Obr. 39** Test interakce studovaných látek s FXR receptorem metodou one hybrid assay, za použití konstruktů pGAL4-FXR na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).

Tímto experimentem bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity exprimované ligand-vazebnou doménou FXR za přítomnosti peonidinu (50 μM), petunidinu (50 μM), delfinidinu (50 μM) a cyanidinu (50 μM) oproti kontrolnímu vzorku DMSO (1 ‰). Je tedy zřejmé, že tyto anthokyanidiny interagují s lidským nukleárním FXR receptorem.

## 7. Diskuze

V této experimentální diplomové práci jsme studovali látky ze skupiny anthokyanidinů (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin) na lidské hepatomové buněčné linii HepG2 a jejich interakce s lidským farnesoidním X receptorem (FXR).

Cytotoxický účinek jednotlivých anthokyanidinů jsme testovali pomocí metody CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay od firmy Promega. Negativní vliv na buněčnou aktivitu se u žádné z testovaných látek neprojevil, a proto jsme mohli uvedené anthokyanidiny studovat v dalších buněčných experimentech, aniž by hrozilo riziko falešné interpretace výsledků v důsledku cytotoxického působení testovaných látek na použitou buněčnou linii.

Dále jsme využili běžných molekulárně biologických metod gene reporter assay a one hybrid assay pro ověření interakcí studovaných látek s lidským farnesoidním X receptorem.

Postupem gene reporter assay jsme v prvním experimentu, za použití známého ligandu-agonisty FXR (kyseliny chenodeoxycholové, CDCA), ověřovali, zda je použitý plasmid zkonstruován správně, s cílem vyloučit ovlivnění a zkreslení experimentálních dat z dalších měření. Tímto experimentem jsme prokázali, že plasmid je zkonstruován správně a ověřili, že CDCA je skutečně ligandem-agonistou FXR receptoru.

Druhým experimentem gene reporter assay jsme zjistili, že statisticky významnými aktivátory lidského farnesoidního X receptoru jsou peonidin (50  $\mu$ M), delphinidin (50  $\mu$ M) a cyanidin (50  $\mu$ M).

Při použití metody one hybrid assay jsme pozorovali zvýšení transkripční aktivity exprimované ligand-vazebnou doménou FXR za přítomnosti peonidinu, petunidinu, delphinidinu a cyanidinu (všechny v koncentraci 50  $\mu$ M). Limitací tohoto experimentu je skutečnost, že peonidin a petunidin byly použity v duplikátu, ostatní pouze v jednom vzorku a to z důvodu nedostatku materiálu. Na základě tohoto faktu nemohla být provedena statistická analýza dat. Pro objasnění této problematiky bude zapotřebí provedení dalších experimentů.

Na základě našich výsledků předpokládáme, že anthokyanidiny peonidin, delphinidin a cyanidin jsou ligandy-agonisté lidského farnesoidního X receptoru.

Lidský farnesoidní X receptor ovlivňuje mnoho signalizačních drah prostřednictvím genové regulace buď přímo, nebo interferencí se signalizačními drahami dalších nukleárních receptorů. FXR reguluje řadu genů, které hrají významnou roli v mnoha fyziologických funkcích jako je metabolismus žlučových kyselin a cholesterolu, udržení homeostázy

glukózy, krevních lipidů a lipoproteinů, zachování rovnováhy střevních bakterií, FXR se podílí i na hepatoprotekci a na regeneraci jater. Díky tomu je farnesoidní X receptor slibným terapeutickým cílem pro léčbu a prevenci onemocnění jako je cholestáza, onemocnění cholesterolovými žlučovými kameny, steatohepatitida, dyslipidémie, ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, rakovina jater a další formy rakoviny jako je karcinom prsu. Na druhou stranu má ligandem aktivovaný FXR receptor částečně negativní vliv na kardiovaskulární systém v důsledku snížení hladiny HDL-cholesterolu. To je třeba brát na zřetel při potenciální dlouhodobé léčbě řady onemocnění agonisty FXR (Bunce a Campbell 2010b, Dufour a Clavien 2010).

Všechny tyto funkce FXR receptoru jsou v posledních letech v popředí vědeckého zájmu. V mnoha současných studiích je, pro léčbu a prevenci těchto onemocnění, testována řada ligandů farnesoidního X receptoru.

Námi studované anthokyanidiny jako potenciální ligandy FXR receptoru jsou aglykony glykosidů anthokyanů, řadí se do skupiny sekundárních rostlinných metabolitů flavonoidů. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu barevných pigmentů květů a plodů či listů. Anthokyaniny se vyskytují u řady rostlin, které se používají pro své léčebné účinky i jako zdroj pro izolaci přírodních barviv hojně využívaných v potravinářském či farmaceutickém průmyslu. Současné studie poukazují na silný antioxidační efekt anthokyanidinů a na jejich roli v chemoprevenci rakoviny (Hou et. al 2004).

Peonidin, kterého můžeme pokládat za liganda-agonistu FXR receptoru, se nachází ve formě derivátů např. v plodu brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*), v červených odrůdách hroznů (plody vinné révy, *Vitis vinifera* a americké révy, *Vitis labrusca*), v hlízách rostliny lilek brambor (*Solanum tuberosum*, červené odrůdy) a v řadě dalších rostlin. Delfinidin se hojně vyskytuje ve formě derivátů např. v plodu brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*), v plodu rybízu černého (*Ribes nigrum*), v květu ibišku súdánského (*Hibiscus sabdariffa*), v hlízách rostliny lilek brambor (*Solanum tuberosum*, červené odrůdy), v červených odrůdách pomerančů (plod pomerančovníku čínského, *Citrus sinensis*) či v červených odrůdách hroznů (plody vinné révy, *Vitis vinifera* a americké révy, *Vitis labrusca*). Deriváty cyanidinu se vyskytují ze všech anthokyanidinů nejhojněji, jen namátkou se jedná např. o plody vinné révy (*Vitis vinifera*, červené odrůdy), plody rybízu černého (*Ribes nigrum*), plody aronie černoplodé (*Aronia melanocarpa*), plody bezu černého (*Sambucus nigra*) či květy chrpy modré (*Cyanus segetum*) (Flavonoidy 2011, Tomko et al. 1989, Velíšek 2002).

Naše výsledky naznačují, že farmakognostické drogy obsahující peonidin, delfinidin nebo cyanidin či doplňky stravy s obsahem těchto přírodních barviv by mohly mít vliv na



homeostázu žlučových kyselin, krevních lipidů, lipoproteinů a glukózy. Naše výsledky by mohly nastínit budoucí potenciální význam peonidinu, delfinidinu či cyanidinu v léčbě a prevenci onemocnění jako je triglyceridémie, ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, cholestáza, steatohepatitida, onemocnění cholesterolovými žlučovými kameny či rakovina jater a prsu.

## 8. Závěr

Cílem této experimentální diplomové práce bylo testování potenciálních ligandů lidského farnesoidního X receptoru (FXR) ze skupiny anthokyanidinů (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin) za použití lidské hepatomové buněčné linie HepG2.

Nejdříve jsme otestovali cytotoxicitu jednotlivých anthokyanidinů na této buněčné linii pomocí metody CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay od firmy Promega. U žádné z testovaných látek se neprojevil negativní vliv na buněčnou aktivitu.

S využitím metod gene reporter assay a one hybrid assay jsme zjistili, že peonidin, delphinidin a cyanidin (všechny v koncentraci 50  $\mu$ M) vykazují interakci s lidským farnesoidním X receptorem. Naše výsledky tedy poukazují na to, že peonidin, delphinidin a cyanidin jsou ligandy-agonisté lidského receptoru FXR.

Na základě našich výsledků lze předpokládat, že peonidin, delphinidin a cyanidin mají vliv na metabolismus a transport žlučových kyselin, homeostázu glukózy, krevních lipoproteinů a lipidů. Tyto poznatky by mohly předznamenat význam peonidinu, delphinidinu a cyanidinu v léčbě a prevenci onemocnění jako jsou např. dyslipidémie, ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, cholestáza či onemocnění cholesterolovými žlučovými kameny.

## 9. Literatura

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. Vyd. 2. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem: Espero, 1998:257-73.

Allard STM, Kopish K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research [internet]. Madison: Promega Corporation, 2008 [citováno: 2013, 02, 14]. Dostupné z:

<http://www.promega.com/~media/files/resources/cell%20notes/cn021/luciferase%20reporter%20assays-%20powerful%20adaptable%20tools%20for%20cell%20biology%20research.pdf?la=en>

Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem.* 2001 Aug;276(31):28857-65.

Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JMA, et al. Bile acids: From digestion to cancers. *Biochimie.* 2013 Mar;95(3):504-17.

Benoit G, Cooney A, Giguere V, Ingraham H, Lazar M, Muscat G, et al. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006 Dec;58(4):798-836.

Bunce CM, Cambell MJ, eds. Nuclear Receptors: Current Concepts and Future Challenges [internet]. Heidelberg: Springer, 2010a:3-6 [citováno: 2013, 04, 09]. Dostupné z: <http://books.google.sk/books?id=lmrsEtBIyPsC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>

Bunce CM, Cambell MJ, eds. Nuclear Receptors: Current Concepts and Future Challenges [internet]. Heidelberg: Springer, 2010b:307-21 [citováno: 2013, 04, 09]. Dostupné z: <http://books.google.sk/books?id=lmrsEtBIyPsC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>

Cafestol [internet]. 2013 [citováno: 2013, 04, 29]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cafestol.svg>

Carter BA, Taylor OA, Prendergast DR, Zimmerman TL, Von Furstenberg R, Moore DD, et al. Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr Res*. 2007 Sep;62(3):301-6.

CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay [internet]. Madison: Promega Corporation, 2012 [citováno: 2013, 02, 07]. Dostupné z: <http://www.promega.co.uk/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf>

Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, et al. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*. 2002 Apr;109(7):961-71.

Cotransfecting Plasmid DNA and RNAi into Mammalian Cells Using Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 [internet]. Carlsbad (California): Invitrogen Corporation, 2005 [citováno: 2013, 02, 12]. Dostupné z: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cotransfecting\\_rnai\\_dna\\_lf2k\\_web.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cotransfecting_rnai_dna_lf2k_web.pdf)

Coumestrol [internet]. 2013 [citováno: 2013, 04, 29]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Coumestrol.png>

Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 alpha-hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res*. 2002 Apr;43(4):533-43.

Doležal T. Modelové organismy [internet]. České Budějovice: Katedra molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2009 [citováno: 2013, 03, 01]. Dostupné z: <http://apendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/models/modelorg.htm>

Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System [internet]. Madison: Promega Corporation, 2011 [citováno: 2013, 02, 14]. Dostupné z: <http://www.promega.co.uk/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Dual%20Luciferase%20Reporter%20Assay%20System%20Protocol.pdf>

Dufour JF, Clavien PA, eds. Signaling Patways in Liver Diseases [internet]. Heidelberg: Springer, 2010:323-25 [citováno: 2013, 04, 23]. Dostupné z: [http://books.google.cz/books?id=bNyT\\_rumsJEC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false](http://books.google.cz/books?id=bNyT_rumsJEC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false)

Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin GV, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):890-8.

Dvořák Z. Metodologie v buněčné a molekulární biologii [internet]. Olomouc: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2011 [citováno: 2013, 02, 08]. Dostupné z: <http://nanosystemy.upol.cz/upload/25/pp-prezentace-prof.-dvorak.pdf>

Farnesoid X receptor [internet]. Kansas City: IUPHAR DATABASE: International Union of Basic and Clinical Pharmacology, 2013 [citováno: 2013, 04, 27]. Dostupné z: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=603>

Farnesoid X receptor- $\beta$  [internet]. Kansas City: IUPHAR DATABASE: International Union of Basic and Clinical Pharmacology, 2013 [citováno: 2013, 04, 27]. Dostupné z: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=604&familyId=89>

Flavonoidy [přednáška z předmětu Farmakognozie]. Hradec Králové: Katedra farmakognozie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011.

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al. IDENTIFICATION OF A NUCLEAR RECEPTOR THAT IS ACTIVATED BY FARNESOL METABOLITES. *Cell*. 1995 Jun;81(5):687-93.

Forskolin [internet]. 2013 [citováno: 2013, 04, 29]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Forskolin.svg>

Frébort I. Základy molekulární biologie: Metody molekulární biologie II. [internet]. Olomouc: Oddělení molekulární biologie Katedry biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2006 [citováno: 2013, 02, 12]. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MBIOZ/5%20Metody%202.pdf>

Fujino T, Murakami K, Ozawa I, Minegishi Y, Kashimura R, Akita T, et al. Hypoxia downregulates farnesoid X receptor via a hypoxia-inducible factor-independent but p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Febs J.* 2009 Mar;276(5):1319-32.

Fujino T, Une M, Imanaka T, Inoue K, Nishimaki-Mogami T. Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J Lipid Res.* 2004 Jan;45(1):132-8.

General Cell Collection: HepG2 [internet]. [citováno: 2013, 03, 13]. Dostupné z: [http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011430&collection=ecacc\\_gc](http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011430&collection=ecacc_gc)

Giguere V. Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocr Rev.* 1999 Oct;20(5):689-725.

Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):222-32.

Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000 Sep;6(3):517-26.

GraphPad Software. GraphPad Prism 6.01 Trial [software]. La Jolla: GraphPad Software, 2012.

Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, et al. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene - Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem.* 1999 Oct;274(42):29749-54.

HepG2 (Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE) [internet]. [citováno: 2013, 03, 13].  
Dostupné z: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=HepG2>

Hofta P, Dostálek P, Basařová G. Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol?  
[internet]. Chemické listy 2004;98:825-30 [citováno: 2013, 04, 29]. Dostupné z:  
[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_09\\_01.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_09_01.pdf)

Holt JA, Luo GZ, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, et al. Definition of a novel  
growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes  
Dev.* 2003 Jul;17(13):1581-91.

Hou DX, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M. Molecular mechanisms behind the  
chemopreventive effects of anthocyanidins. *J Biomed Biotechnol.* 2004 Dec(5):321-5.

Howard WR, Pospisil JA, Njolito E, Noonan DJ. Catabolites of cholesterol synthesis  
pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol  
Appl Pharmacol.* 2000 Mar;163(2):195-202.

Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X receptor  
activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem.* 2003  
Dec;278(51):51085-90.

Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, et al. Generation of  
multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene.* 2002  
May;290(1-2):35-43.

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System [internet]. Madison: Promega  
Corporation, 2009 [citováno: 2013, 03, 01]. Dostupné z:  
<http://www.promega.co.uk/~~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/CheckMate%20Flexi%20Vector%20Mammalian%20Two-Hybrid%20System%20Protocol.pdf>

Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, Peng L, Zhao GX, Downes M, et al. Regulation of  
antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad  
Sci U S A.* 2006 Mar;103(10):3920-5.

Introduction to Reporter Gene Assays [internet]. Madison: Promega Corporation, 2013 [citováno: 2013, 02, 09]. Dostupné z: <http://www.promega.co.uk/resources/multimedia/reporter-assays-and-transfection/introduction-to-reporter-gene-assays/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%2fresources%2fmultimedia%2freporter-assays-and-transfection%2fintroduction-to-reporter-gene-assays%2f>

Jacobs MN, Dickins M, Lewis DFV. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor beta (hER beta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hER alpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha) ligand binding domain from the human PPAR gamma crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Feb;84(2-3):117-32.

Jung D, Mangelsdorf DJ, Meyer UA. Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor. *J Biol Chem.* 2006 Jul;281(28):19081-91.

Jung D, Podvinec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, et al. Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology.* 2002 Jun;122(7):1954-66.

Kameníčková A. Gene reporter assay [internet]. Olomouc: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2012 [citováno: 2013, 02, 09]. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=219&t=0>

Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, et al. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol.* 2001 Oct;15(10):1720-8.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 2002 Jan;277(4):2908-15.



Laudet V, Gronemeyer H, eds. THE NUCLEAR RECEPTOR FactsBook [internet]. London: Academic Press, 2002:199-01 [citováno: 2013, 04, 27]. Dostupné z: [http://books.google.cz/books?id=P0cQjHg\\_kkUC&printsec=frontcover&dq=%22nuclear+receptor%22&hl=cs&sa=X&ei=Hr52UZahD\\_Lb4QSwjYCYAQ&redir\\_esc=y#v=onepage&q=%22nuclear%20receptor%22&f=false](http://books.google.cz/books?id=P0cQjHg_kkUC&printsec=frontcover&dq=%22nuclear+receptor%22&hl=cs&sa=X&ei=Hr52UZahD_Lb4QSwjYCYAQ&redir_esc=y#v=onepage&q=%22nuclear%20receptor%22&f=false)

Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang YQ. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends BiochemSci.* 2006a Oct;31(10):572-80.

Lee H, Zhang YQ, Lee FY, Nelson SF, Gonzalez FJ, Edwards PA. FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res.* 2006b Jan;47(1):201-14.

Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent [internet]. Carlsbad (California): Life Technologies Corporation, 2012 [citováno: 2013, 02, 12]. Dostupné z: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf)

Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):1102-9.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 1999 May;284(5418):1362-5.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. THE NUCLEAR RECEPTOR SUPERFAMILY - THE 2ND DECADE. *Cell.* 1995 Dec;83(6):835-9.

Matsubara T, Li F, Gonzalez FJ. FXR signaling in the enterohepatic system. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2013;368:17-29.

Neimark E, Chen F, Li XP, Shneider BL. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology.* 2004 Jul;40(1):149-56.

Nuclear Receptor Structure [internet]. 2013 [citováno: 2013, 04, 14]. Dostupné z:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nuclear\\_Receptor\\_Structure.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nuclear_Receptor_Structure.png)

Opletal L, Koula V. Anthokyany [internet]. Hradec Králové: Daidalea, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013 [citováno 2013, 05, 03]. Dostupné z:  
[http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/docs/Compound/2-3-4\\_Anthokyany.pdf](http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/docs/Compound/2-3-4_Anthokyany.pdf)

Ottow E, Weinmann H, eds. Nuclear Receptors as Drug Targets [internet]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008:1-7 [citováno: 2013, 04, 12]. Dostupné z:  
[http://books.google.sk/books?id=iATfLbPgRugC&pg=PA264&hl=cs&source=gbs\\_selected\\_pages&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](http://books.google.sk/books?id=iATfLbPgRugC&pg=PA264&hl=cs&source=gbs_selected_pages&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile acids: Natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999 May;284(5418):1365-8.

Pávek P. Ovlivnění genové exprese, metody transfekce/transdukce a gene silencing [internet]. Olomouc: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2010 [citováno: 2013, 02, 12]. Dostupné z:  
<http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=132&t=0>

Pávek P, Červený L, Mičuda S, Štaud F, Čečková-Novotná M, Fendrich Z. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí [internet]. *Remedia*. 2005;15:406-9 [citováno: 2013, 04, 09]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/682.magarticleprintversion.ashx>

Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, et al. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem*. 2003 Jul;278(30):27703-11.

pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vectors [internet]. Madison: Promega Corporation, 2013 [citováno: 2013, 02, 14]. Dostupné z: <http://www.promega.co.uk/products/reporter-assays-and-transfection/reporter-vectors-and-cell-lines/pri-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%2fproducts%2freporter-assays-and->

transfection%2freporter-vectors-and-cell-lines%2fpml-renilla-luciferase-control-reporter-vectors%2f

Protein Data Bank in Europe [internet]. Hinxton: EMBL-EBI, 2013 [citováno: 2013, 04, 27].  
Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1osh/openastex>

Raclavský V. Metody molekulární genetiky [internet]. Olomouc: Ústav biologie lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, 2003 [citováno: 2013, 02, 09]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/>

Seol WG, Choi HS, Moore DD. ISOLATION OF PROTEINS THAT INTERACT SPECIFICALLY WITH THE RETINOID-X RECEPTOR - 2 NOVEL ORPHAN RECEPTORS. *Mol Endocrinol.* 1995 Jan;9(1):72-85.

Skálová L, Boušová I, eds. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* Praha: Karolinum, 2011:96-01.

Soisson SM, Parthasarathy G, Adams AD, Sahoo S, Sitlani A, Sparrow C, et al. Identification of a potent synthetic FXR agonist with an unexpected mode of binding and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr;105(14):5337-42.

Sonnenfeld MJ. GAL4/UAS Expression System [internet]. Heidelberg: Springer, 2013 [citováno: 2013, 03, 02]. Dostupné z: <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/115453.html>

Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, et al. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):984-91.

Suzuki T, Tamehiro N, Sato Y, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Shinozaki Y, et al. The novel compounds that activate farnesoid X receptor: The diversity of their effects on gene expression. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2008 Jul;107(3):285-94.

Tomko J, Kresánek J, Hubík J, Suchý V, Felklová M, Sikyta B, et al. Farmakognózia: Učebnice pre farmaceutické fakulty. Vyd. 2. Martin: Osveta, 1989:192-6.

Transfection [internet]. Madison: Promega Corporation, 2013 [citováno: 2013, 02, 13]. Dostupné z: <http://www.promega.co.uk/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%2fpaguide%2fchap12.ht>

Tu H, Okamoto AY, Shan B. FXR, a bile acid receptor and biological sensor. Trends Cardiovasc Med. 2000 Jan;10(1):30-5.

Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. J Biol Chem. 2000 Dec;275(50):39313-7.

Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, Silva FV, Ordentlich P, Yan YZ, et al. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. Science. 2002 May;296(5573):1703-6.

Velíšek J. Chemie potravin 3. Vyd. 2. Tábor: OSSIS, 2002:19-29.

Vondrejs V, Storchová Z. Genové inženýrství I. Praha: Karolinum, 1997:10-3.

Wang HB, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR BAR. Mol Cell. 1999 May;3(5):543-53.

Wang YD, Chen WD, Moore DD, Huang WD. FXR: a metabolic regulator and cell protector. Cell Res. 2008 Nov;18(11):1087-95.

Weatherman RV, Fletterick RJ, Scanlan TS. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. Annu Rev Biochem. 1999;68:559-81.

Wildová M, Rumlová M. Metody studia vzájemných interakcí proteinů [internet]. Chemické listy 2008;102:28-34 [citováno: 2013, 03, 01]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_01\\_28-34.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_01_28-34.pdf)

Wittenburg H, Lyons MA, Li RH, Churchill GA, Carey MC, Paigen B. FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):868-81.

Xanthohumol [internet]. 2013 [citováno: 2013, 04, 29]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Xanthohumol.svg>

Zhang YQ, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev*. 2004 Jan;18(2):157-69.

Zhang YQ, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2003 Jan;278(1):104-10.

Zhang YQ, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan;103(4):1006-11.

Zhao A, Yu JH, Lew JL, Huang L, Wright SD, Cui JS. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol*. 2004 Aug;23(8):519-26.