

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

VÝZKUM NOVÝCH LIGANDŮ FXR RECEPTORU

Rigorózní práce

Konzultant rigorózní práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Mgr. Jana Jeřábková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.

.....

Děkuji panu prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D., za odborné vedení rigorózní práce, za poskytnutí odborných materiálů, za věcné připomínky při stylizaci jednotlivých částí práce a za čas, který mi tímto způsobem věnoval.

Dále děkuji paní Mgr. Evě Kudové, Ph.D., z Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky za poskytnutí testovaných látek.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Jana Jeřábková

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

Název rigorózní práce: Výzkum nových ligandů FXR receptoru

Lidský farnesoidní X receptor (FXR) je ligandy aktivovaný transkripční faktor patřící do superrodiny nukleárních receptorů. FXR se váže na svůj responzivní element (FXRE) jako monomer nebo jako heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), což vede k aktivaci transkripce cílových genů. FXR pozitivně či negativně reguluje širokou škálu cílových genů účastnících se udržování homeostázy žlučových kyselin, cholesterolu, lipidů a metabolismu glukózy. FXR dále transkripčně reguluje geny podílející se na regulaci imunitní odpovědi, na rozvoji zánětu, na udržení intestinální bariérové funkce a geny kontrolující koagulaci a remodelaci cévní stěny. Díky tomu se do popředí zájmu současných vědeckých studií dostává nalezení ligandů FXR, které by byly vhodné k terapeutickému využití. Vedle přirozených žlučových kyselin byl v loňském roce zaregistrován první léčivý přípravek obsahující jako léčivou látku polosyntetický ligand FXR receptoru, a to kyselinu obeticholovou (6-ECDC) pro terapii primární biliární cholangitidy. My jsme se v této experimentální rigorózní práci zaměřili na testování potenciálních ligandů lidského FXR ze skupiny steroidních sloučenin patřících mezi steroidní hormony, neuroaktivní steroidy, látky odvozené od žlučových kyselin a další látky za použití lidské hepatomové buněčné linie HepG2. Vliv jednotlivých steroidních sloučenin na buněčnou viabilitu jsme nejdříve testovali prostřednictvím metody MTT assay, výrazný negativní vliv látek na viabilitu se však neprojevil. Pro prokázání interakcí studovaných látek s lidským FXR jsme využili molekulárně biologickou metodu gene reporter assay. Na základě našich výsledků předpokládáme, že látka podobná přirozeným žlučovým kyselinám 12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina a sloučenina 5 β -androstan-3 β -ol jsou ligandy-agonisty lidského FXR receptoru. Kyselina 12-oxo-5 β -cholan-24-ová se jeví být silnějším agonistou, než je přirozená žlučová kyselina chenodeoxycholová (CDCA). Tyto naše výsledky by mohly poskytnout užitečný pohled při vývoji nových léčiv cílených na FXR receptor.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Candidate: Mgr. Jana Jeřábková
Consultant: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.
Title of Thesis: Study of Novel FXR Ligands

Human farnesoid X receptor (FXR) is ligand-activated transcription factor that belongs to the nuclear receptor superfamily. FXR binds to its response element (FXRE) as monomer or heterodimer with retinoid X receptor (RXR) resulting to activation of transcription of target genes. FXR positively or negatively regulates a wide range of target genes involved in maintaining the homeostasis of bile acids, cholesterol, lipid and glucose metabolism. Furthermore, FXR transcriptionally regulates genes involved in regulation of the immune response, in the development of inflammation and maintaining the intestinal barrier function and genes controlling coagulation and remodeling of the vessel wall. The interest of current scientific studies is to find the new ligands of FXR, which would be suitable for therapeutic use. Besides the natural bile acids, the first medicinal product containing semi-synthetic FXR ligand, obeticholic acid (6-ECDC) as active substance was registered last year for the treatment of primary biliary cholangitis. In this experimental rigorosum thesis we focused on testing of the potential ligands of FXR from group of steroid compounds that belongs to the steroid hormones, neuroactive steroids, the compounds derived from bile acids and other using the human hepatoma cell line HepG2. In preliminary experiments, effects of tested compounds on cell viability was tested by MTT assay, however, no meaningful negative effect on cell viability was observed. To demonstrate the interactions of studied steroids with the human FXR, the molecular biological method gene reporter assay was used. Based on our results, we assume that the substance similar to the natural bile acids 12-oxo-5 β -cholan-24-oic acid and the compound 5 β -androstane-3 β -ol are ligands-agonists of the human FXR. In addition, 12-oxo-5 β -cholan-24-oic acid appears to be more potent agonist than the natural bile acid chenodeoxycholic acid (CDCA). These results could provide useful insights to development of new drugs targeting to FXR receptor.

Obsah

1. Seznam zkratk.....	7
2. Úvod.....	12
3. Teoretická část.....	13
3.1. Obecně o farnesoidním X receptoru.....	13
3.2. Struktura farnesoidního X receptoru.....	18
3.3. Vztah struktury farnesoidního X receptoru a jeho funkce.....	30
3.4. Koaktivátory, korepresory.....	39
3.5. Ligandy.....	41
3.5.1. Steroidní ligandy agonisté.....	41
3.5.2. Steroidní ligandy antagonisté.....	64
3.5.3. Nesteroidní ligandy agonisté.....	71
3.5.4. Nesteroidní ligandy antagonisté.....	75
3.5.5. Modulátory farnesoidního X receptoru.....	75
3.6. Steroidní sloučeniny.....	78
4. Cíl práce.....	81
5. Experimentální část.....	82
5.1. Materiál.....	82
5.1.1. Buněčná linie HepG2.....	82
5.1.2. Pomůcky, přístroje a reagentie.....	82
5.1.3. Testované látky a jejich koncentrace.....	84
5.2. MTT assay.....	91
5.2.1. Princip.....	91
5.2.2. Pracovní postup.....	93
5.3. Gene reporter assay.....	93
5.3.1. Princip.....	93
5.3.2. Pracovní postup.....	99
5.4. Statistická analýza dat.....	100
6. Výsledky.....	101
6.1. MTT assay.....	101
6.2. Gene reporter assay.....	103
7. Diskuze.....	111
8. Závěr.....	120
9. Literatura.....	122

1. Seznam zkratek

3D	trojrozměrný, z angl. three-dimensional
5 α -DHP	5 α -dihydroprogesteron
5 β -DHP	5 β -dihydroprogesteron
6-ECDC	6 α -ethyl-chenodeoxycholová kyselina, obeticholová kyselina
AD	autonomní doména
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AMP	adenosinmonofosfát
ANOVA	analýza rozptylu
AP-1	aktivační protein 1
ApoC-I	apolipoprotein C-I
ApoC-II	apolipoprotein C-II
ApoC-III	apolipoprotein C-III
ApoC-IV	apolipoprotein C-IV
ApoE	apolipoprotein E
AR	androgenní receptor
ASBT	z angl. apical sodium-coupled bile salt transporter
ATP	adenosintrifosfát
BAAT	z angl. bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase
BACS	z angl. bile acid-CoA synthetase
BAR	receptor pro žlučové kyseliny, z angl. bile acid receptor
BSEP	exportní pumpa pro žlučové kyseliny, z angl. bile salt export pump
CA	cholová kyselina, z angl. cholic acid
CAR	konstitutivní androstanový receptor, z angl. constitutive androstane receptor
CARM-1	z angl. coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CDCA	chenodeoxycholová kyselina, z angl. chenodeoxycholic acid
cDNA	kódující/komplementární DNA
CoA	koenzym A
CoRNR	korepresorový nukleární receptorový box
CTE	C-terminální rozšíření, z angl. C-terminal extension
CXCL2	z angl. chemokine C-X-C motif
CYP3A4	cytochrom P450 isoforma 3A4

CYP7A1	cytochrom P450 isoforma 7A1, cholesterol 7 α -hydroxyláza
CYP8B1	cytochrom P450 isoforma 8B1, sterol 12 α -hydroxyláza
DBD	DNA-vazebná doména, z angl. DNA-binding domain
DCA	deoxycholová kyselina, z angl. deoxycholic acid
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHT	dihydrotestosteron
DMEM	z angl. Dulbecco's modified Eagles's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin
DR	přímá repetice, z angl. direct repeat
DRIP-205	z angl. vitamin-D-receptor-interacting protein 205
EGCG	epigalokatechin-3-galát
ER	estrogenní receptor
ER	evertovaná repetice, z angl. everted repeat
ERR	receptor spojený s estrogenními receptory, z angl. estrogen receptor-related receptor
ERR α	receptor α spojený s estrogenními receptory z angl. estrogen receptor-related receptor α
FAS	syntáza mastných kyselin, z angl. fatty acid synthase
FGF15	lidský fibroblastový růstový faktor 15, z angl. fibroblast growth factor 15
FGF19	lidský fibroblastový růstový faktor 19, z angl. fibroblast growth factor 19
FGF4R	FGF4 receptor, z angl. fibroblast growth factor 4 receptor
FXR	farnesoidní X receptor
FXRE	responzivní element FXR, z angl. FXR responsive element
FXR α	farnesoidní X receptor α
FXR β	farnesoidní X receptor β
G6Pase	glukóza-6-fosfatáza, z angl. glucose-6-phosphatase
GABA	γ -amino máselná kyselina, z angl. γ -amino butyric acid
GR	glukokortikoidní receptor
GRIP-1	z angl. glucocorticoid receptor interacting protein 1
GSK3 α	glykogen syntáza kináza 3 α , z angl. glycogen synthase kinase 3 α
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě, z angl. high density lipoproteins
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA

HNF4 α	hepatocytární nukleární faktor 4 α
IBABP	ileální vazebný protein žlučových kyselin, z angl. ileal bile acid-binding protein
IL8	interleukin 8
IR	invertovaná repetice, z angl. inverted repeat
LBD	ligand-vazebná doména, z angl. ligand-binding domain
LCA	lithocholová kyselina, z angl. lithocholic acid
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě, z angl. low density lipoproteins
LPL	lipoproteinová lipáza, z angl. lipoprotein lipase
LRH-1	jaterní receptorový homolog 1, z angl. liver receptor homolog 1
LXR	jaterní X receptor, z angl. liver X receptor
LXR α	jaterní X receptor α , z angl. liver X receptor α
MDR3	gen mnohočetné rezistence k lékům 3, z angl. multi-drug resistance gen 3
MeCA	methylester cholové kyseliny
MeDCA	methylester deoxycholové kyseliny
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	informační/mediátorová RNA, z angl. messenger RNA
MRP2	z angl. multidrug resistance-associated protein 2
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NADPH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAFLD	nealkoholická steatóza až steatofibróza jater, z angl. nonalcoholic fatty liver disease
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NCoR	jaderný korepresor, z angl. nuclear corepressor
NF κ B	nukleární faktor kappa B
NGFI-B	nervový růstový faktor I-B, z angl. nerve growth factor I-B
NLS	jaderný lokalizační signál, z angl. nuclear localization signal
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
NR	nukleární receptor
NRRE	responzivní element nukleárního receptoru, z angl. nuclear receptor responsive element

NTCP	sodík-dependetní taurocholátový kotransportní protein, z angl. sodium-taurochlorat cotransporting polypeptide
NTD	N-terminální doména
OATP	z angl. organic anion transporting polypeptide
OST α	z angl. organic solute transporter α
OST β	z angl. organic solute transporter β
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline
PEPCK	fosfoenolpyruvátcarboxykináza, angl. phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1 α	z angl. PPAR γ coactivator 1 α
PLTP	transportní protein pro fosfolipidy, z angl. phospholipids transfer protein
PPAR	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory, z angl. peroxisome proliferators-activated receptor
PPAR γ	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory γ , z angl. peroxisome proliferators-activated receptor γ
PPi	difosfátový ion
PR	progesteronový receptor
PRMT-1	z angl. protein arginine methyl transferase 1
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor pro kyselinu retinovou, z angl. retinoic acid receptor
RAR α	receptor pro kyselinu retinovou α , z angl. retinoic acid receptor α
RAR γ	receptor pro kyselinu retinovou γ , z angl. retinoic acid receptor γ
RE	responzivní element
RNA	ribonukleová kyselina
ROR α	sirotčí receptor α spojený s receptory pro kyselinu retinovou, z angl. retinoic acid receptor-related orphan receptor α
RXR	pregnanový X receptor
RXR α	pregnanový X receptor α
SAR	vztah struktury a účinku, z angl. structure-activity relationship
SBARMs	selektivní FXR modulátory, z angl. selective bile acid receptor modulators
SDS	dodecylsulfát sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
SF1	steroidogenní faktor 1
SHP	malý heterodimerický partner, z angl. small/short heterodimer partner
SMRT	z angl. silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors

SRC-1–3	steroidní receptorové koaktivátory 1–3, z angl. steroid receptor coactivators 1–3
SREBP-1C	z angl. sterolregulatory element-binding protein 1C
SULT2A1	sulfotransferáza 2A1
SXR	z angl. steroid and xenobiotic receptor
TR	thyroidní receptor
UCA	ursocholová kyselina, z angl. ursocholic acid
UDCA	ursodeoxycholová kyselina, z angl. ursodeoxycholic acid
UDP	uridindifosfátglukóza
UGT2B4	z angl. UDP-glucuronosyltransferase 2B4
VDR	receptor pro vitamin D, z angl. vitamin D receptor
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě, z angl. very low density lipoprotein
LDLR	receptor pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě, z angl. very low density lipoprotein receptor

2. Úvod

V této experimentální rigorózní práci se zabýváme potenciálními interakcemi lidského farnesoidního X receptoru (FXR) s 44 vybranými steroidními sloučeninami ze skupiny steroidních hormonů, neuroaktivních steroidů, látek odvozených od žlučových kyselin a dalšími steroidními sloučeninami.

Farnesoidní X receptor je ligandy-aktivovaný transkripční faktor patřící do superrodiny nukleárních receptorů. FXR se váže na svůj responzivní element (FXRE) jako monomer nebo jako heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), což vede k aktivaci transkripce cílových genů. FXR pozitivně, či negativně reguluje širokou škálu cílových genů účastnících se udržování homeostázy žlučových kyselin, cholesterolu, lipidů a metabolismu glukózy. FXR dále transkripčně reguluje geny podílející se na regulaci imunitní odpovědi, na rozvoji zánětu, na udržení intestinální bariérové funkce a geny kontrolující koagulaci a remodelaci cévní stěny.

Endogenními ligandy FXR jsou žlučové kyseliny, odtud pochází označení tohoto receptoru jako BAR (receptor pro žlučové kyseliny, z angl. bile acid receptor). Vedle přirozených žlučových kyselin bylo identifikováno široké spektrum jak přírodních, tak i (polo)syntetických ligandů agonistů i antagonistů FXR receptoru se steroidním i nesteroidním strukturním základem.

Steroidní látky jsou ve velkém rozsahu přítomny mj. v živočišné říši. Mezi nejdůležitější živočišné steroidy patří žlučové kyseliny, napomáhající trávení lipidů, a steroidní hormony, sloužící v organismu jako signální molekuly. V této práci testujeme kyselinu 12-oxo-5 β -cholan-24-ovou, která je modifikací přirozené žlučové kyseliny lithocholové (LCA), a látky ze skupiny steroidních hormonů, např. dihydrotestosteron (DHT), 5 α -androstandion, androsteron, epiandrosteron a další. Dále studujeme látky ze skupiny neuroaktivních steroidů, což jsou steroidní sloučeniny, které modulují excitabilitu neuronů prostřednictvím interakce s neurotransmiterovými membránovými receptory. Jedná se o allopregnanolon, pregnanolon, epipregnanolon, epiallopregnanolon, 5 α -dihydroprogesteron, 5 β -dihydroprogesteron, 3 α -androstandiol, etiocholanon, androsteron a další látky jim strukturně podobné.

Pozitivní výsledky této experimentální rigorózní práce by mohly předznamenat existenci nových ligandů FXR receptoru ze skupiny steroidních hormonů, neuroaktivních steroidů, látek odvozených od žlučových kyselin či dalších látek a mohly by poskytnout užitečný pohled při vývoji nových léčiv cílených na FXR.

3. Teoretická část

3.1. Obecně o farnesoidním X receptoru

FXR je ligandy-aktivovaný transkripční faktor, který patří do superrodiny nukleárních receptorů (NR), subrodiny 1, skupiny H a je členem 4 (NR1H4). Své pojmenování získal na základě výzkumu skupiny Forman et al. (1995), která objevila, že je aktivován farnesoidními sloučeninami, zejména farnesolem, a stal se tedy adoptovaným sirotčím receptorem. Teprve později bylo třemi na sobě nezávislými vědeckými skupinami (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999) objasněno, že endogenními ligandy FXR jsou žlučové kyseliny, neboť aktivují FXR ve fyziologických koncentracích, zatímco u farnesolu k aktivaci dochází teprve v suprafyziologických koncentracích. FXR získal nové označení BAR (receptor pro žlučové kyseliny, z angl. bile acid receptor). Následné studie vedly k identifikaci dalších jak přírodních, tak i (polo)syntetických ligandů agonistů i antagonistů se steroidním i nesteroidním strukturním základem. FXR se váže na svůj rezpozivní element (FXRE) jako monomer nebo jako heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), což vede k aktivaci transkripce cílových genů (Carr a Reid 2015, Forman et al. 1995, Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Teodoro et al. 2011, Wang et al. 1999).

Existují dva geny kódující FXR receptor: FXR α (*NR1H4*) a FXR β (*NR1H5*). FXR α (dále v práci jen FXR) je konzervován od ryb až po člověka, u lidí a hlodavců kóduje tento gen čtyři FXR α izoformy receptoru (FXR α 1–4) jako výsledek účasti různých promotorů a RNA sestřihu. Výskyt FXR α 1–4 je tkáňově specifický, doposud byly různé izoformy nalezeny v mnoha tkáních a buněčných typech: FXR α 1–2 se u lidí nachází převážně v játrech a nadledvinách, zatímco FXR α 3–4 je nejvíce zastoupen v tlustém střevě, dvanáctníku a v ledvinách. V mnohem menší míře byl výskyt FXR α pozorován i v tukové tkáni, v srdci a dalších tkáních. Druhý FXR receptor, FXR β , vystupuje jako sensor pro lanosterol u myši, králíků a psů, nicméně u lidí je pseudogenem. Většina FXR cílových genů je regulována způsobem nezávislým na izoformě receptoru (FXR α 1–4) (Carr a Reid 2015, Fiorucci et al. 2007, Fiorucci et al. 2009, Teodoro et al. 2011).

FXR pozitivně či negativně reguluje širokou škálu cílových genů účastnících se udržování homeostázy žlučových kyselin, cholesterolu, lipidů a metabolismu glukózy. FXR dále transkripčně reguluje geny podílející se na regulaci imunitní odpovědi, na rozvoji zánětu, na udržení intestinální bariérové funkce a geny kontrolující koagulaci a remodelaci cévní stěny (Adorini et al. 2012, Carr a Reid 2015, Hollman et al. 2012).

Homeostáza žlučových kyselin

V játrech FXR **snižuje syntézu žlučových kyselin** a to tak, že podporuje transkripci SHP (malý heterodimerický partner, z angl. small/short heterodimer partner), který vystupuje jako represor konverze cholesterolu na žlučové kyseliny prostřednictvím downregulace exprese enzymů účastnících se syntézy žlučových kyselin, tedy klíčového CYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxyláza, cytochrom P450 isoforma 7A1) a CYP8B1 (sterol 12 α -hydroxyláza, cytochrom P450 isoforma 8B1) (viz Obr. 1). FXR také podporuje uvolnění lidského fibroblastového růstového faktoru 19 (FGF19, z angl. fibroblast growth factor 19) do střeva, ten odtud postupuje do jater a váže se na FGF4 receptor (FGF4R, z angl. fibroblast growth factor 4 receptor) nacházející se na buněčném povrchu hepatocytů, snižuje expresi CYP7A1, a tím potlačuje syntézu žlučových kyselin (viz Obr. 1) (Calkin a Tontonoz 2012, Fiorucci et al. 2009, Hollman et al. 2012, Pávek et al. 2012).

Žlučové kyseliny jsou, díky amfipatickým vlastnostem, toxické ve vysokých koncentracích. FXR **snižuje toxicitu žlučových kyselin** v játrech prostřednictvím zvýšení exprese enzymů modifikujících žlučové kyseliny – jedná se o SULT2A1 (sulfotransferáza 2A1), UGT2B4 (z angl. UDP-glucuronosyltransferase 2B4) a CYP3A4 (cytochrom P450 isoforma 3A4) (viz Obr. 1). UGT2B4 a SULT2A1 zabezpečují v játrech glukuronidaci a sulfataci žlučových kyselin a činí je více hydrofilními, méně biologicky aktivními a snadněji vylučitelnými (Calkin a Tontonoz 2012, Fiorucci et al. 2009, Hollman et al. 2012).

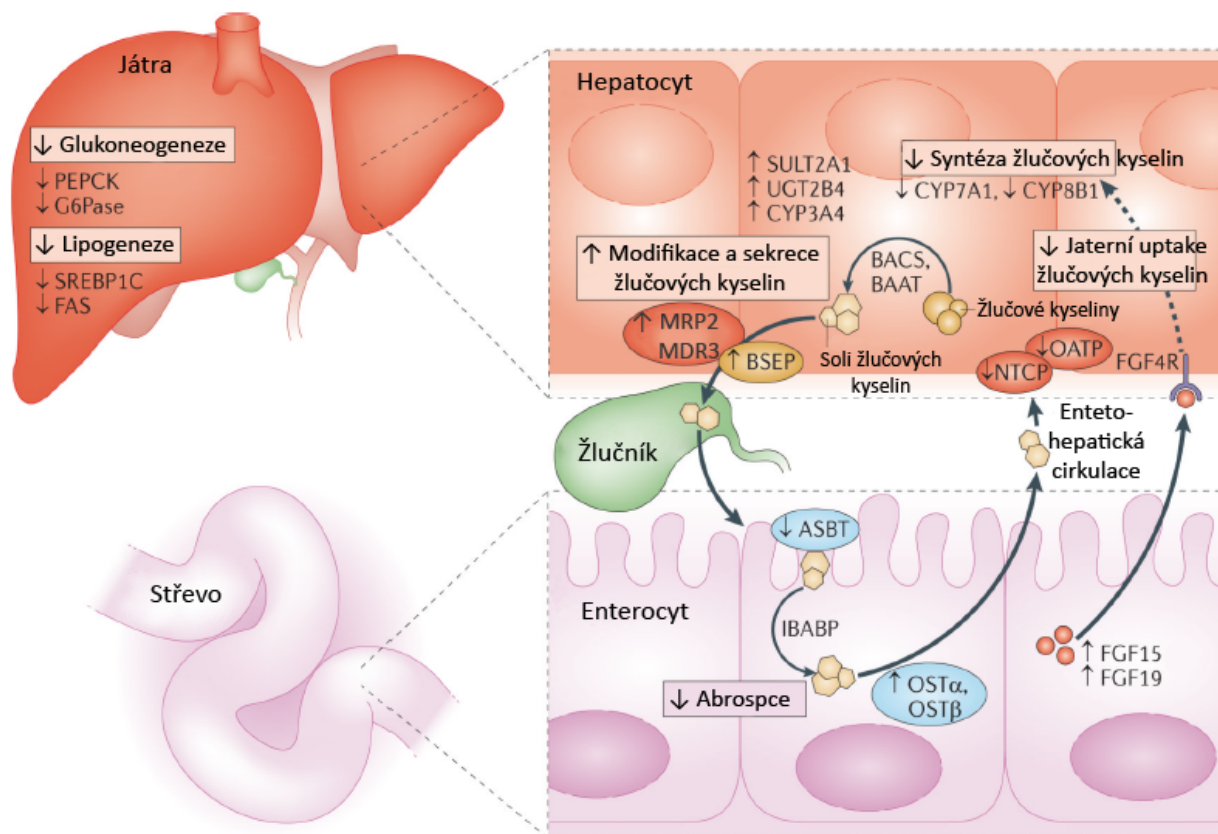
Žlučové kyseliny jsou před vyloučením do žluči konjugovány s glycinem či taurinem, FXR **usnadňuje konjugaci žlučových kyselin** prostřednictvím zvýšení exprese enzymů BACS (z angl. bile acid-CoA synthetase) a BAAT (z angl. bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase) (viz Obr. 1) (Calkin a Tontonoz 2012).

FXR **podporuje export žlučových kyselin z hepatocytů** do žlučových kanálků prostřednictvím indukce transkripce exportní pumpy pro žlučové kyseliny BSEP (z angl. bile salt export pump) a transportního proteinu MRP2 (z angl. multidrug resistance-associated protein 2) a zvyšuje export fosfolipidů prostřednictvím zvýšení exprese genu mnohočetné rezistence k lékům 3 MDR3 (z angl. multi-drug resistance gen 3) (viz Obr. 1) (Calkin a Tontonoz 2012, Fiorucci et al. 2009, Hollman et al. 2012).

Ve střevě FXR **snižuje absorpci žlučových kyselin** prostřednictvím downregulace transportéru ASBT (z angl. apical sodium-coupled bile salt transporter), podporuje pohyb žlučových kyselin napříč enterocyty díky ileálnímu vazebnému proteinu žlučových kyselin IBABP (z angl. ileal bile acid-binding protein) a **stimuluje návrat žlučových kyselin do jater** prostřednictvím zvýšení exprese transportérů OST α a OST β (z angl. organic solute

transporters α a β), které se podílí na jejich enterohepatické cirkulaci (viz Obr. 1) (Calkin a Tontonoz 2012, Hollman et al. 2012).

FXR dále **snižuje uptake žlučových kyselin do hepatocytů** kvůli negativní regulaci transportního proteinu OATP (z angl. organic anion transporting polypeptide) a sodík-dependetního taurocholátového kotransportního proteinu NTCP (z angl. natrium-taurochlorat cotransporting polypeptide) (viz Obr. 1) (Calkin a Tontonoz 2012, Fiorucci et al. 2009, Hollman et al. 2012).



Obr. 1 FXR reguluje cílové geny účastníci se metabolismu žlučových kyselin, cholesterolu, lipidů a glukózy. Aktivovaný farnesoidní X receptor (FXR) zprostředkovává indukci (↑), či represi (↓) cílových genů. Vysvětlivky: ASBT (apical sodium-coupled bile salt transporter), BAAT (bile acid-CoA : amino acid N-acetyltransferase), BACS (bile acid-CoA synthetase), BSEP (exportní pumpa pro žlučové kyseliny), CYP3A4 (cytochrom P450 isoforma 3A4), CYP7A1 (cytochrom P450 isoforma 7A1), CYP8B1 (cytochrom P450 isoforma 8B1), FAS (syntéza mastných kyselin), FGF15 (fibroblastový růstový faktor 15), FGF19 (fibroblastový růstový faktor 19), FGF4R (fibroblast growth factor 4 receptor), G6Pase (glukóza-6-fosfatáza), IBABP (ileální vazebný protein žlučových kyselin), MDR3 (gen mnohočetné rezistence k lékům 3), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2), NTCP (sodík-dependetní taurocholátový kotransportní protein), OATP (organic anion transporting polypeptide), OST α (organic solute transporter α), OST β (organic solute transporter β), PEPCCK (fosfoenolpyruvátcarboxykináza), SREBP-1C (sterolregulatory element-binding protein 1C), SULT2A1 (sulfotransferáza 2A1), UGT2B4 (UDP-glucuronosyltransferase 2B4). Modifikováno dle: Calkin a Tontonoz 2012.

Homeostáza glukózy

FXR receptor také hraje důležitou roli v metabolismu glukózy. V játrech FXR **potlačuje glukoneogenezi** prostřednictvím downregulace dvou klíčových enzymů při syntéze glukózy: fosfoenolpyruvátcarboxykinázy PEPCK (z angl. phosphoenolpyruvate carboxykinase) a glukóza-6-fosfatázy (G6Pase, z angl. glucose-6-phosphatase) (viz Obr. 1) (Calkin a Tontonoz 2012, Hollman et al. 2012).

FXR také **indukuje syntézu glykogenu** v játrech tak, že zvyšuje fosforylaci glykogen syntázy kinázy 3 α (GSK3 α , z angl. glycogen synthase kinase 3 α), rozhodujícího enzymu v syntéze glykogenu. Modulace homeostázy glukózy prostřednictvím FXR byla také popsána i na úrovni produkce inzulínu a inzulínové senzitivity (Hollman et al. 2012, Modica et al. 2010).

Homeostáza triglyceridů a lipidů

Aktivovaný FXR **snižuje plazmatické hladiny triglyceridů** tak, že potlačuje lipogenezi v játrech cestou inhibice exprese transkripčního faktoru SREBP-1C (z angl. sterolregulatory element-binding protein 1C) a syntázy mastných kyselin FAS (z angl. fatty acid synthase) (viz Obr. 1). FXR také přispívá ke snížení hladiny triglyceridů prostřednictvím inhibice lipoproteinové lipázy LPL (z angl. lipoprotein lipase), jejíž interakce s lipoproteiny o velmi nízké hustotě VLDL (z angl. very low density lipoprotein) a chylomikrony vedou k uvolnění triglyceridů. K inhibici LPL dochází na základě FXR pozitivní regulace exprese apolipoproteinu C-II (ApoC-II) a negativní regulace exprese apolipoproteinu C-III (ApoC-III). S redukcí hladiny triglyceridů je také spojena FXR indukce exprese receptoru pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě VLDLR (z angl. very low density lipoprotein receptor), transportního proteinu pro fosfolipidy PLTP (z angl. phospholipids transfer protein) a apolipoproteinu E (ApoE) (Calkin a Tontonoz 2012, Hollman et al. 2012, Modica et al. 2010).

FXR receptor **snižuje plazmatické hladiny HDL-cholesterolu** prostřednictvím pozitivní regulace exprese PLPT zodpovědného za transfer fosfolipidů a cholesterolu z LDL (lipoproteiny o nízké hustotě, z angl. low density lipoproteins) do HDL (lipoproteiny o vysoké hustotě, z angl. high density lipoproteins) a potlačením exprese jaterních lipoproteinů, jako jsou např. ApoE, apolipoprotein C-I (ApoC-I) a apolipoprotein C-IV (ApoC-IV), které se účastní vylučování HDL játry a jsou hlavními aktéry v clearance HDL cholesterolu (Modica et al. 2010).

Receptor FXR (stejně jako ostatní nukleární receptory) se považuje za ligandem aktivovaný transkripční faktor, neboť schopnost receptoru modulovat transkripci cílových genů (**genomický efekt**) je indukovaná vazbou ligandu na receptor. Nicméně NR nejsou pouze transkripčními faktory vždy ukotvenými v buněčném jádru. Subcelulární lokalizace nukleárních receptorů se liší: i když některé jsou považovány za výhradně jaderné, mnoho z nich (včetně FXR) kyvadlově putuje mezi jádrem a cytosolem, přičemž podíl výskytu v jádře je variabilní a obvykle se zvyšuje po vazbě ligandu. Konformační změny NR indukované vazbou ligandu mohou také podporovat jejich separaci z cytosolových chaperonů, fosforylaci a homo- nebo hetero-dimerizaci, což spolu dohromady zvyšuje vazbu na příslušné responzivní elementy (Ordonez-Moran a Munoz 2009, Dufer et al. 2012).

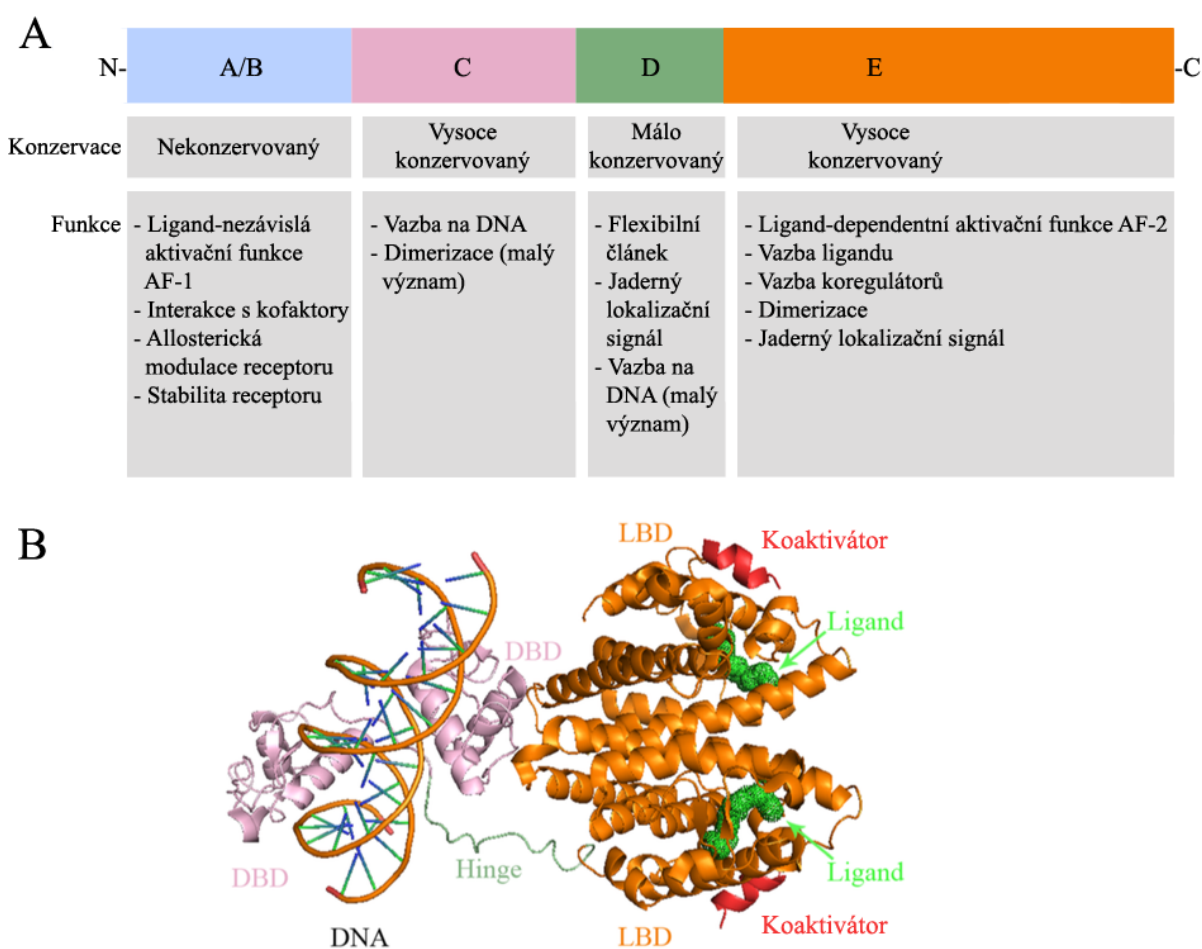
I přesto, že u většiny svých přímých cílových genů NR zvyšují transkripční rychlost, jaderné receptory mohou rovněž inhibovat genovou expresi, a to buď přímo prostřednictvím přímé vazby na negativní responzivní element (represe) a nebo nepřímo prostřednictvím antagonizace dalších transkripčních faktorů cestou fyzikální interakce nebo interference s jejich regulátory (transreprese), jako je tomu v případě antagonismu aktivačního proteinu 1 (AP-1) a nukleárního faktoru kappaB (NFκB). K regulaci cílových genů FXR může také docházet prostřednictvím cílového genu pro sirotčí nukleární receptor nazývaný malý heterodimerický partner (SHP, z angl. small/short heterodimer partner). SHP je atypický jaderný receptor, neboť mu chybí DNA-vazebná doména a jeho hlavní funkcí je represe ostatních nukleárních receptorů prostřednictvím kompetice s jejich koaktivátory. K nejvyšší expresi SHP dochází v játrech. Prostřednictvím těchto odlišných mechanismů jsou ligandy NR hlavními regulátory genové exprese u vyšších organismů modulující transkripční rychlost nepřeborného množství genů způsobem závislým na typu buněk (Fiorucci et al. 2009, Ordonez-Moran a Munoz 2009, Pávek et al. 2012).

Jaderné receptory byly dlouhou dobu považovány výhradně za skupinu ligandem regulovaných transkripčních faktorů účinkujícím v buněčném jádře, později však byl, na základě rychlého účinku ligandů NR na buněčné úrovni, objeven účinek nezávislý na genové expresi (**non-genomický efekt**). Non-genomický účinek nepůsobí aktivaci cílových genů receptoru, je výsledkem aktivity NR majících účinek mimo buněčné jádro a zahrnuje modulační aktivitu iontových kanálů, kináz, fosfatáz a dalších enzymů vyskytujících se v různých typech buněk. Non-genomický efekt byl také pozorován u FXR receptoru. Současné studie podporují teorii, že non-genomický a genomický efekt se může propojit v charakteristickém mechanismu účinku ligandů NR tak, že non-genomický efekt představuje

signální dráhu požadovanou pro efekt na genomické úrovni (Dufer et al. 2012, Gronemeyer et al. 2004, Ordonez-Moran a Munoz 2009).

3.2. Struktura farnesoidního X receptoru

FXR receptor sdílí společnou všeobecnou strukturní organizaci s ostatními členy superrodiny nukleárních receptorů. FXR, stejně jako typický nukleární receptor, obsahuje čtyři hlavní funkční regiony: A/B region, neboli N-terminální doménu (NTD), C region také označovaný jako DNA-vazebná doména (DBD, z angl. DNA-binding domain), D region (tzv. hinge region) a E region neboli ligand-vazebnou doménu (LBD, z angl. ligand-binding domain) (viz Obr. 2) (Pávek et al. 2005).



Obr. 2 Strukturní a funkční organizace nukleárních receptorů. A) Schématické zobrazení obecné struktury regionů nukleárních receptorů. Jednotlivé regiony se označují písmeny A/B, C, D a E ve směru od N-konce po C-konec. Pod jednotlivými regiony je popsána jejich konzervace. Příklady funkcí, které charakterizují jednotlivé domény, jsou shrnuty v odrážkách pod příslušnými regiony. B) Znáznorněna je obecná prostorová a funkční organizace nukleárních receptorů při vazbě na DNA-responzivní sekvenci (vyobrazeným příkladem je komplex receptoru HNF4 α (hepatocytární nukleární faktor 4 α) ve formě homodimeru s DNA). Růžovou barvou je zobrazena DNA-vazebná doména (DBD), zeleně je vyobrazen hinge region, oranžová barva charakterizuje

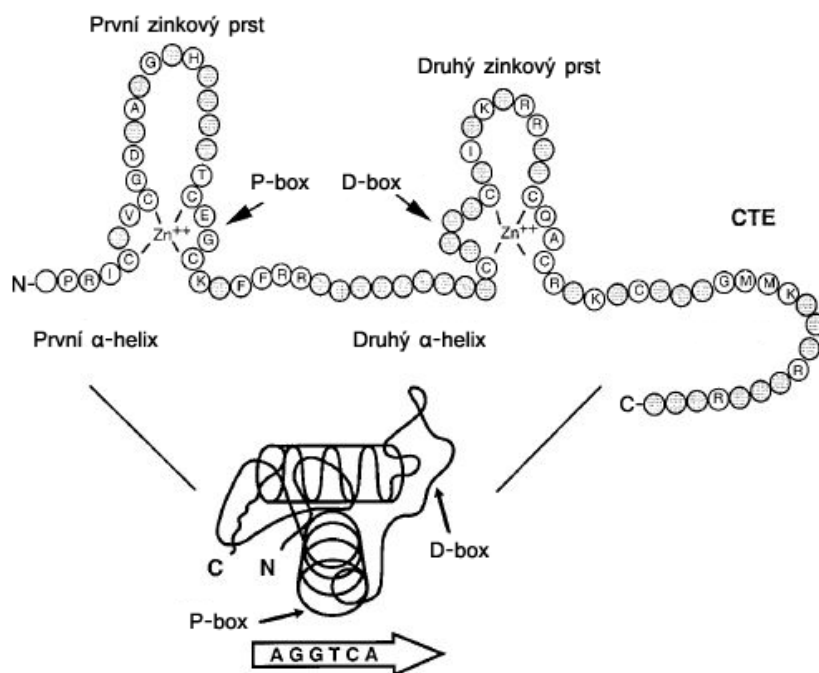
ligand-vazebnou doménu (LBD), červenou barvou je zobrazen koaktivátor a světle zelenou barvou je vyobrazen ligand. Vysvětlivky: AF-1 (aktivační funkce 1), AF-2 (aktivační funkce 2), N (amino-konec), C (karboxy-konec). Modifikováno dle: Yang et al. 2014, Aagaard et al. 2011.

A/B doména (NTD, N-terminální doména) je nekonzervovaným a vysoce variabilním regionem NR jednak v primární sekvenci, jednak v délce, která se pohybuje od méně než 50 až po více než 500 aminokyselinových zbytků (viz Obr. 2 A). Obsahuje jeden konstitutivní ligand-nezávislý transaktivační region nazývaný jako aktivační funkce 1 (AF-1) a několik transaktivačních autonomních domén (AD), NTD se tedy podílí na aktivaci receptorového komplexu nezávisle na interakci LBD s ligandy. A/B doména se rovněž účastní interakcí s kofaktory a může mít i další funkce, jako je např. allosterická modulace receptoru či ovlivnění na stability receptorového komplexu (Aagaard et al. 2011, Huang et al. 2010, Robinson-Rechavi et al. 2003, Yang et al. 2014).

C doména neboli DNA-vazebná doména (DBD, z angl. DNA-binding domain) se nachází v centrální části receptoru a je spolu s LBD nejvíce konzervovaným regionem NR (viz Obr. 2). Vysoký stupeň konzervace je zachován jak v primární sekvenci aminokyselinových zbytků, tak i ve struktuře. LBD se skládá přibližně z 66 aminokyselinových zbytků a u celé řady NR, včetně FXR, byla objasněna 3D struktura DNA-vazebné domény, kdy základ tvoří dva zinkové prsty (Zn-I a Zn-II) a dva svislé α -helixy (viz Obr. 3 a Obr. 5). Typickým znakem DBD jsou dva vysoce konzervované motivy zinkových prstů C-X2-C-X13-C-X2-C a C-X5-C-X9-C-X2-C (C – cysteinový zbytek, X – jakýkoliv aminokyselinový zbytek), tyto čtyři cysteinové zbytky každého zinkového prstu koordinačně váží jeden zinečnatý iont (Zn^{2+}) (Aagaard et al. 2011, Helsen et al. 2012, Robinson-Rechavi et al. 2003).

První α -helix (DNA rozpoznávací helix) se utváří mezi motivem dvou zinkových prstů a přímo interaguje s velkým žlábkem dvojšroubovice DNA (viz Obr. 2 B). Krátký motiv aminokyselinových zbytků zodpovědný za specifickou vazbu na příslušnou sekvenci DNA, která se označuje jako responzivní element nukleárního receptoru (NRRE, z angl. nuclear receptor responsive element), v případě FXR receptoru na FXR-responzivní element (FXRE), se nachází na prvním α -helixu a nazývá se P-box (viz Obr. 3). P-box se také podílí na dimerizaci NR, v případě FXR receptoru se svým dimerizačním partnerem RXR (viz Obr. 11 B). Druhý α -helix se nachází ve svislé poloze mezi Zn-II a prvním α -helixem, čímž stabilizuje strukturu DBD a umožňuje tak receptoru interakci s DNA, nicméně tento druhý α -helix nemá specifický kontakt s DNA-responzivními elementy. Druhý zinkový prst (Zn-II)

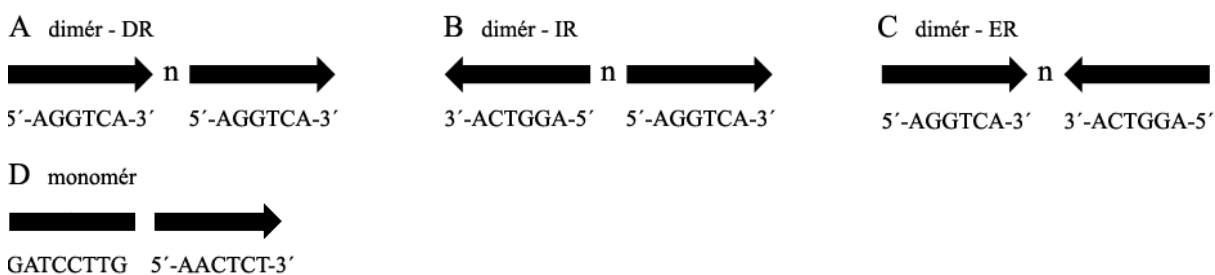
obsahuje motiv nazývaný D-box (viz Obr. 3), který hraje roli v dimerizaci (Aagaard et al. 2011, Robinson-Rechavi et al. 2003).



Obr. 3 Strukturální organizace DNA-vazebné domény nukleárních receptorů. Základ DNA-vazebné domény tvoří dva zinkové prsty a dva α -helixy. Čtyři cysteinové zbytky (C) každého zinkového prstu koordinačně váží jeden zinečnatý iont (Zn^{++}). Na prvním α -helixu se nachází motiv nazývaný P-box, který je zodpovědný za specifickou vazbu na responzivní element nukleárního receptoru, např. na motiv 5'-AGGTCA-3'. Druhý zinkový prst obsahuje motiv nazývaný D-box. D-box i P-box se podílí na dimerizaci. Vedle základu DNA-vazebné domény je důležitým faktorem pro vazbu na příslušné sekvence DNA také C-terminální rozšíření (CTE). Vysvětlivky: A (argininový zbytek), G (glycinový zbytek), T (tyrozinový zbytek), C (cysteinový zbytek), N (amino-konec), C (karboxy-konec). Modifikováno dle: Aagaard et al. 2011.

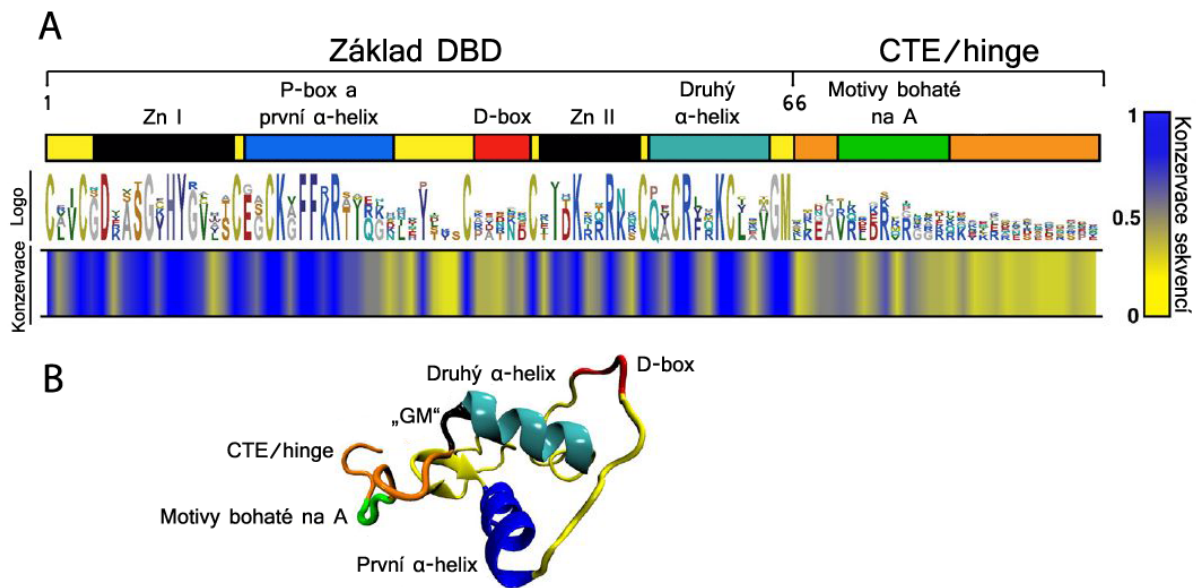
Prostřednictvím vazby na specifické sekvence DNA cílových genů regulují nukleární receptory transkripci. Tyto sekvence jsou zpravidla lokalizovány v regulačních sekvencích cílových genů, relativně blízko jádra promotoru a jsou typicky složeny ze dvou hexanukleotidových repetice. Ačkoli sekvence jednotlivých NRRE mohou být velmi variabilní, všechny NR mají vysokou afinitu k jednomu ze dvou motivů: 5'-AGAACA-3' či 5'-AGGTCA-3' (A – argininový zbytek, G – glycinový zbytek, T – tyrozinový zbytek, C – cysteinový zbytek) (viz Obr. 3). Tyto hexamerní elementy jsou od sebe odděleny mezerou, která je tvořena jedním, dvěma nebo třemi (nejčastěji) nukleotidy. Obrázek 4 A, B, C znázorňuje uspořádání, v jakém se NR mohou vázat na své responzivní elementy: přímá repetice (DR, z angl. direct repeat), invertovaná repetice (IR, z angl. inverted repeat) nebo evertovaná repetice (ER, z angl. everted repeat). FXR/RXR heterodimer se váže s největší

afinitou na sekvenci 5'-AGGTCA-3' v uspořádání IR-1, tedy v uspořádání invertované repetice s mezerou tvořenou jedním nukleotidem. Nicméně heterodimer receptorů FXR/RXR se v menší míře váže formou invertované repetice (nejčastěji IR-1 a IR-0) i na další elementy, které se odlišují v sekvenci hexanukleotidů a dále se váže na své RE i formou přímé či invertované repetice. Méně často se FXR váže na své RE ve formě monomeru. Vazebné místo pro monomer se skládá z jednoho hexanukleotidového motivu a navíc z další sekvence, která se nachází se před hexamerním elementem a označuje se jako 5' rozšíření (viz Obr. 4 D). Jedná se např. o motiv GATCCTTG-5'-AACTCT-3' (Aranda a Pascual 2001, Helsen et al. 2012, Laffitte et al. 2000, Wang et al. 2008).



Obr. 4 Schématické znázornění vazby nukleárních receptorů na své responzivní elementy DNA. Nukleární receptory ve formě dimerů se váží na hexanukleotidový motiv např. 5'-AGGTCA-3' regulačních sekvencí cílových genů v následujícím uspořádání: A) Přímá repetice (DR); B) Invertovaná repetice (IR); C) Evertovaná repetice (ER). D) Nukleární receptory ve formě monomerů se váží na motiv např. GATCCTTG-5'-AACTCT-3' regulačních sekvencí cílových genů, ve kterém se před hexaneukleotidovým elementem nachází motiv tzv. 5' rozšíření. Vysvětlivky: A (argininový zbytek), G (glycinový zbytek), T (tyrozinový zbytek), C (cysteinový zbytek), n (počet nukleotidů).

Vedle základu DBD je důležitým faktorem pro specifickou vazbu na příslušné sekvence DNA také C-terminální rozšíření (CTE, z angl. C-terminal extension) (viz Obr. 3). CTE je složeno z 10–30 aminokyselinových zbytků, následuje po plně konzervované „GM“ sekvenci (G – glycinový zbytek, M – methioninový zbytek) základu DBD a je narozdíl od DBD vysoce variabilní napříč NR (viz Obr. 5). Mnoho nukleárních receptorů má CTE motivy bohaté na argininové zbytky a ty rozšiřují protein-DNA styčný povrch nad rámec RE prostřednictvím interakcí s malými žlábkami DNA. DNA sekvence po stranách responzivních elementů se tedy podílejí na selektivní vazbě některých NR na DNA. Navíc pro receptory, které tvoří dimer s RXR, tedy i FXR, může CTE formovat dimerizační povrch zodpovědný za rozmístění vazebných partnerů. U receptorů, které se váží na DNA ve formě monomerů, rozšiřuje CTE interakční povrch, což vysvětluje, proč tyto receptory rozpoznávají RE, které jsou rozsáhlejší než hexanukleotidový motiv (Aagaard et al. 2011, Helsen et al. 2012).



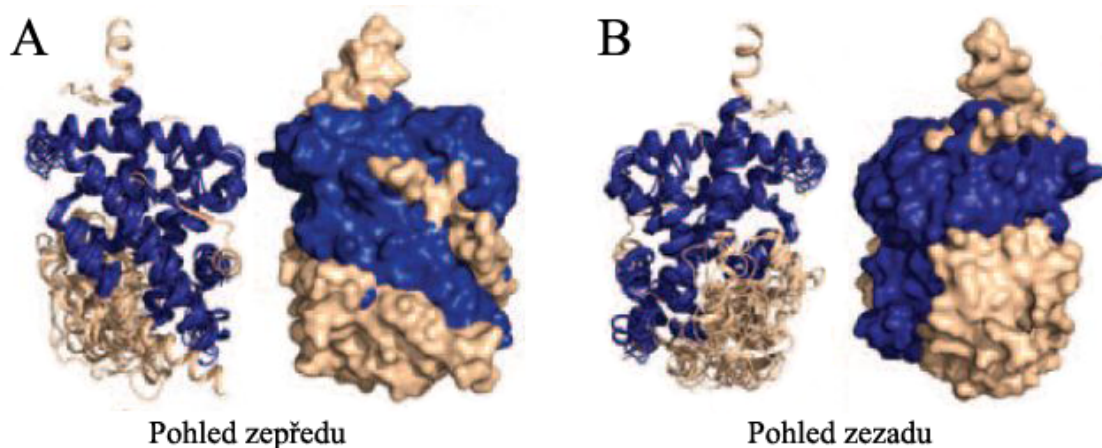
Obr. 5 Strukturální organizace DNA-vazebné domény nukleárních receptorů. A) Na obrázku je schématicky znázorněna obecná struktura DNA-vazebné domény (DBD) a konzervace jednotlivých sekvencí: základ DBD, tvořený 66 aminokyselinovými zbytky, je vysoce konzervován, zatímco konzervace není udržena v C-terminálním rozšíření (CTE), respektive hinge regionu. Vyobrazeny jsou jednotlivé funkční motivy DBD, které se podílejí na vazbě na DNA a dimerizaci: první zinkový prst (Zn I), P-box a první α -helix, D-box, druhý zinkový prst (Zn II), druhý α -helix a motivy bohaté na argininové zbytky (A). B) Vyobrazena je obecná prostorová strukturální organizace základu DNA-vazebné domény se znázorněnými jednotlivými funkčními motivy. Vysvětlivky: „GM“ (GM sekvence, G – glycinový zbytek, M – methioninový zbytek). Modifikováno dle: Aagaard et al. 2011.

Selektivita FXR receptoru pro cílové specifické DNA-responzivní elementy je především kódována prostřednictvím DBD, tedy DNA rozpoznávacími helixy a vzorci pro heterodimerizaci s RXR. DNA-responzivní elementy nakonec lokalizují fyziologickou odpověď na ligandy do přesného genetického programu, který je jak časově, tak i prostorově řízený (Aagaard et al. 2011; Huang et al. 2010).

D doména (hinge region) je málo konzervovaná, nachází se mezi DNA-vazebnou doménou a ligand-vazebnou doménou a propůjčuje receptorům velkou flexibilitu (viz Obr. 2). Hinge region byl donedávna považován pouze za flexibilní článek, který umožňuje DBD a LBD zaujmout navzájem odlišnou orientaci a usnadnit tak vazbu na DNA RE (responzivní element) a dimerizaci. Později se ale ukázalo, že D doména přispívá u mnoha NR k receptorové funkci, neboť obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků vážících se do malého žlábků DNA, ty jsou umístěny C-terminálně k DBD a jsou označovány jako C-terminální rozšíření. CTE bývá také v některých literárních zdrojích, např. dle Aagaard et al. (2011), zmiňováno jako součást C domény (viz Obr. 5). Hinge region dále obsahuje

jaderný lokalizační signál (NLS, z angl. nuclear localization signal), který může přesahovat do C domény (Aagaard et al. 2011, Huang et al. 2010, Robinson-Rechavi et al. 2003).

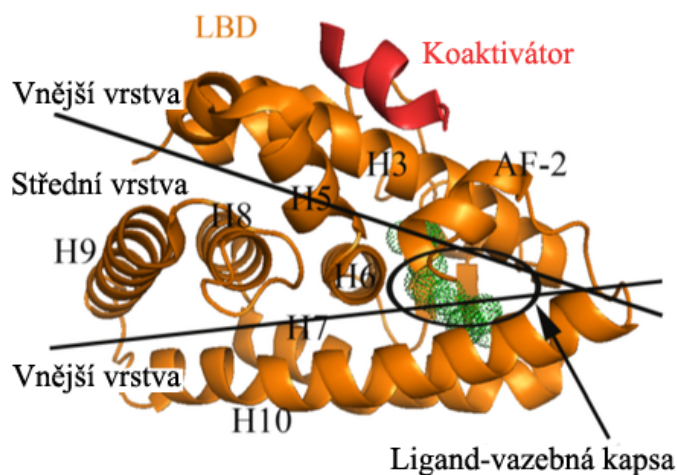
E region, neboli ligand-vazebná doména (LBD, z angl. ligand-binding domain) je největší doménou, neboť se skládá z 200–300 C-terminálních aminokyselinových zbytků (viz Obr. 2). Tento region je napříč NR, včetně FXR receptoru, vysoce konzervovaný, jeho sekundární struktura je lépe konzervovaná (viz Obr. 6) než primární sekvence. E doména je zodpovědná za mnoho funkcí, které jsou většinou indukované vazbou ligandu. Jedná se především o aktivační funkci 2 (AF-2), kdy LBD interaguje s ligandy a zprostředkuje tak transkripční aktivaci ligand-dependentním způsobem. LBD také obsahuje vazebná místa pro koaktivátory či koregulátory, dále tento region zprostředkovává dimerizaci, obsahuje jaderný lokalizační signál a často obsahuje i represní funkce (Aagaard et al. 2011, Huang et al. 2010, Robinson-Rechavi et al. 2003, Wallace a Redinbo 2013).



Obr. 6 Schématické znázornění konzervace ligand-vazebné domény nukleárních receptorů. Sekundární strukturní prvky vyobrazené modře se řadí mezi konzervované části ligand-vazebné domény, zatímco béžová barva charakterizuje nekonzervované strukturní prvky, které lemují ligand-vazebnou kapsu. A) Pohled zepředu. B) Pohled zezadu. Modifikováno dle: Wallace a Redinbo 2013.

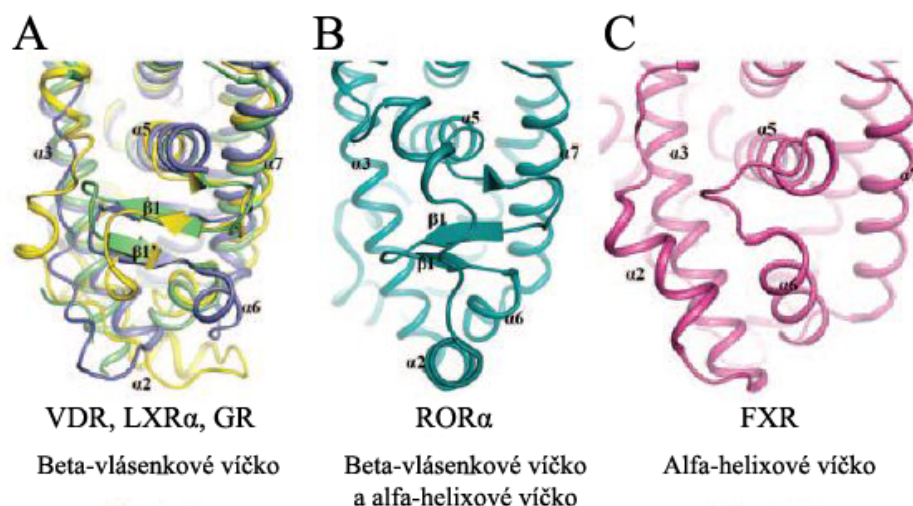
Všechny NR vykazují podobné strukturní vlastnosti LBD, ta se zpravidla skládá z 11–13 α -helixů a 2–4 β -listů. LBD FXR obsahuje 12 α -helixů. α -helixy jsou uspořádány do globulární domény, která je označována jako „třívrstvý antiparalelní sendvič“ (viz Obr. 7). Tři dlouhé helixy (H3, H7 a H10) tvoří vnější dvě vrstvy, střední vrstva tvořena helixy (H5, H6, H8 a H9) je přítomna pouze v horní polovině domény, tudíž tvoří dutinu pro vazbu ligandu, která se nazývá ligand-vazebná kapsa. Velikost této centrální hydrofóbní kapsy se pohybuje téměř od nulového objemu (kdy je ligand-vazebná kapsa vyplněna vlastními hydrofóbními postranními řetězci receptoru) až po objem větší než 1500 \AA^3 . Tvar a velikost ligand-vazebných kapes i jejich vnímavost k molekulám jsou vysoce indukovatelné. Nejvíce

C-terminální segment amfipatický helix H12, který je hlavním architektonickým prvkem spojeným s AF-2 funkcí, může podstoupit dramatické posuny v pozici jako odpověď na vazbu ligandu do kapsy (viz Obr. 10). Další α -helixy LBD mohou také podstoupit posuny v pozici, ty jsou sice nepatrné, ale přesto významné, neboť mohou ovlivnit aktivaci receptoru (Aagaard et al. 2011, Downes et al. 2003, Helsen et al. 2012, Huang et al. 2010, Yang et al. 2014).



Obr. 7 Prostorová strukturní organizace ligand-vazebné domény nukleárních receptorů. Ligand-vazebná doména (LBD) je tvořena zpravidla 11–13 α -helixy, které se označují jako H1–H13. „Třívrstvý antiparalelní sendvič“ je složen z dvou vnějších vrstev, které jsou tvořeny helixy H3, H7 a H10, střední vrstva je tvořena helixy H5, H6, H8 a H9. Centrální hydrofilní kavita, do které se váže ligand (vyobrazen zelenou barvou), se nazývá ligand-vazebná kapsa. Koaktivátorový protein je znázorněn červeně. Vyobrazeným příkladem je LBD hepatocytárního nukleárního faktoru 4 α ve formě monomeru. Vysvětlivky: AF-2 (aktivační funkce 2). Modifikováno dle: Yang et al. 2014, Soisson et al. 2008.

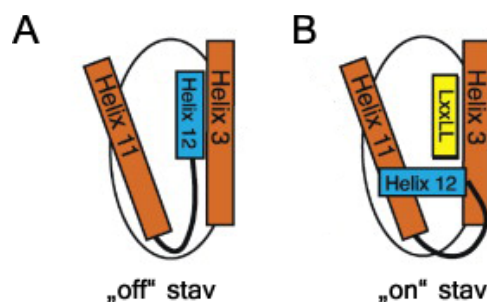
Ačkoliv je u FXR receptoru udržena vysoká míra konzervace sekundárních strukturních prvků LBD, sekundární struktura LBD se podobá sekundární struktuře E regionu dalších NR (viz Obr. 6): levá strana ligand-vazebné kapsy je překryta pouze tzv. alfa-helixovým víčkem, jak je ukázáno na Obr. 8 C. Naproti tomu u jiných NR se běžně vyskytuje tzv. beta-vláseňkové (z angl. beta-hairpin) víčko (viz Obr. 8 A, B). Tyto sekundární strukturní prvky překrývají ligand-vazebnou dutinu a umožňují její uzavření. Ligand-vazebná kapsa FXR se podobá té od LXR (jaterní X receptor, z angl. liver X receptor) a VDR (receptor pro vitamin D), jen je o poznání menší, kompaktnější a s téměř úplnou hydrofóbní povahou (Wallace a Redinbo 2013).



Obr. 8 Sekundární strukturní prvky, které překrývají ligand-vazebnou kapsu a umožní její uzavření.

A) Strukturním prvkem, který umožní uzavřít ligand-vazebnou kapsu, je tzv. beta- α vláscnkové (z angl. beta-hairpin) víčko. Nachází se např. u receptoru pro vitamin D (VDR, vyobrazen žlutě), jaterního X receptoru α (LXR α , znázorněn zeleně) a glukokortikoidního receptoru (GR, vyobrazen modrou barvou). B) Ligand-vazebnou kapsu uzavírá tzv. beta- α vláscnkové víčko a zároveň α -helixové víčko nacházející se nad beta- α vláscnkovým víčkem. Vyobrazeným příkladem je sirotčí receptor α spojený s receptory pro kyselinu retinovou (ROR α). C) Ligand-vazebná kapsa je uzavřena pouze tzv. α -helixovým víčkem, je tomu tak u farnesoidního X receptoru (FXR). Vysvětlivky: $\alpha 2-7$ (α -helixy 2-7), $\beta 1-2$ (β -lisy 1-2). Modifikováno dle: Wallace a Redinbo 2013.

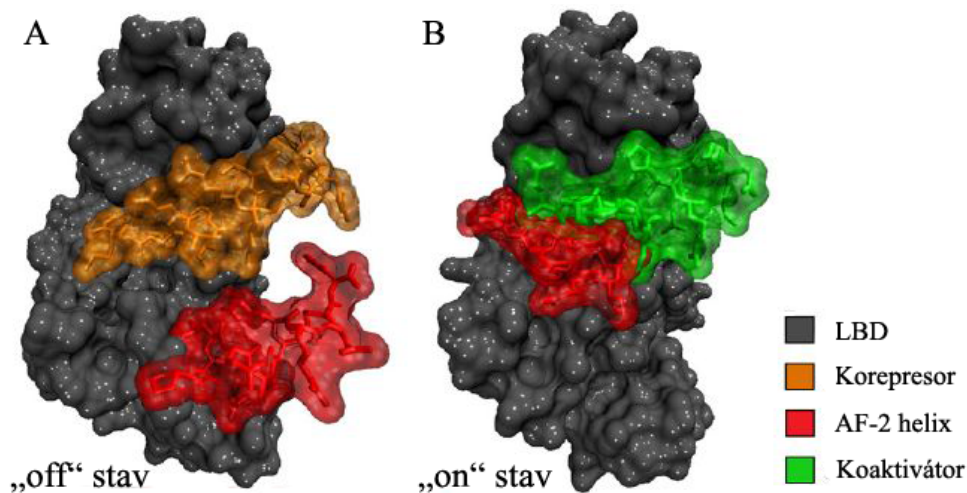
AF-2 funkce je lokalizována na C-konci ligand-vazebné domény receptoru a označuje se takto funkce NR spojovat se koaktivátorem. LBD vystupuje prostřednictvím AF-2 jako tzv. molekulární „switch“, který řídí uvolnění korepresorového proteinu a následný rekrutment koaktivátoru, což vede k transkripční aktivaci NR. První krok aktivace NR je vyvolán vazbou ligandu-agonisty, což indukuje konformační změny receptoru. Po navázání agonisty dochází ke změně pozice C-terminálního helixu H12 (je označován také jako AF-2 helix, helix aktivací funkce 2) oproti zbytku LBD, a tím receptor přechází z „off“ stavu do „on“ stavu (viz Obr. 9). V aktivním stavu je AF-2 helix lokalizován příčně vůči helixům H3 a H11. Helixy H3, H11 a H12 tedy formují nabitou sevřenou hydrofóbní kavitu, nazývanou jako AF-2 místo, které specificky přijímá obecný strukturní motiv přítomný u většiny koaktivátorů. Tento motiv má ustálenou sekvenci LXXLL (L – leucinový zbytek, X – jakýkoliv aminokyselinový zbytek) a při vazbě na LBD receptoru zaujímá dvě otáčky α -helixu. LBD takto přispívá k modulaci a podpoření genové transkripce (Aagaard et al. 2011, Huang et al. 2010, Nettles a Greene 2003, Yang et al. 2014, Zhang et al. 2006).



Obr. 9 Konformace ligand-vazebné domény nukleárních receptorů v inaktivním a aktivním stavu.

A) „Off“ stav ligand-vazebné domény nastává v přítomnosti antagonisty. Helix H12 se nachází v inaktivní pozici. B) Po navázání agonisty se helix H12 orientuje do „on“ stavu, kdy je lokalizován příčně vůči helixům H3 a H11. Helixy H3, H11 a H12 formují sevřenou kavitu, která váže koaktivátorův motiv LXXLL (L – leucinový zbytek, X – jakýkoliv aminokyselinový zbytek). Modifikováno dle: Nettles a Greene 2003.

Antagonisté blokují efekt agonistů prostřednictvím kompetitivní vazby do stejného vazebného místa NR. Tudíž receptor s navázaným antagonistou je v inaktivním stavu (viz Obr. 9 A) a přednostně váže korepresorové proteiny (viz Obr. 10), což vede k represi genové transkripce. Jako odpověď na vazbu antagonisty (nebo u některých NR při absenci agonisty) změní AF-2 helix pozici a formuje rozsáhlý vazebný povrch, na který se váže strukturní motiv LXXXIXXX(L/I) (I – isoleucinový zbytek) nazývaný jako korepresorový nukleární receptorový box (CoRNR box, z angl. corepressor nuclear receptor box), a který je přítomný u běžných korepresorů. CoRNR box je delší než LXXLL motiv koaktivátorových proteinů, při vazbě na LBD receptoru zaujímá tři otáčky α -helixu. Vazebné povrchy LBD pro CoRNR box korepresorů a LXXLL motiv koaktivátorů se částečně překrývají, tudíž je vyloučeno navázání koaktivátoru a korepresoru zároveň. Navíc se vazebný povrch pro CoRNR box nalézá v regionu, který je obvykle obsazený AF-2 helixem v aktivní konformaci, což podporuje fakt, že se korepresor nemůže na ligand-vazebnou doménu navázat, když je LBD v aktivním stavu (viz Obr. 10) (Aagaard et al. 2011, Huang et al. 2010, Yang et al. 2014).



Obr. 10 Funkce AF-2 helixu ligand-vazebné domény receptoru. AF-2 helix (helix aktivační funkce 2, helix H12) je zodpovědný za odpověď na vazbu ligandu. A) „Off“ stav ligand-vazebné domény (LBD): v přítomnosti antagonisty umožňuje pozice AF-2 helixu (znázorněn červeně) vazbu korepresoru (vyobrazen oranžovou barvou) prostřednictvím rozsáhlého vazebného povrchu, který se nazývá korepresorový nukleární receptorový box (CoRNR box). B) „On“ stav LBD: Vazbou agonisty dochází k přesunu AF-2 helixu (vyobrazen červeně) do takové pozice, která upřednostňuje vazbu koaktivátoru (znázorněn zelenou barvou). Navíc v této pozici AF-2 helix obsazuje část vazebného povrchu pro CoRNR box, a díky tomu se nemůže korepresor na LBD navázat. Modifikováno dle: Aagaard et al. 2011.

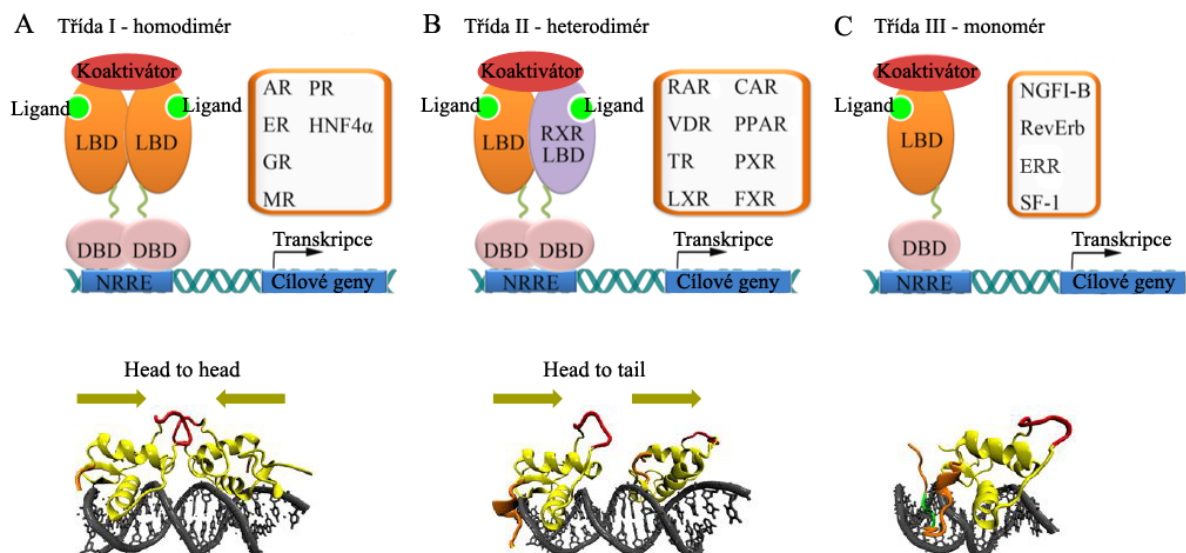
Konformační flexibilita AF-2 helixu umožňuje nukleárnímu receptoru rozpoznat přítomnost vazby ligandu, jak agonisty, tak i antagonisty, a rekrutovat koaktivátor nebo korepresor tak, že v konečném důsledku určuje transkripční aktivaci nebo represi NR. Vazba ligandu a ligandem-zprostředkovaný rekrutment kofaktoru jsou zásadní pro funkci nukleárních receptorů. LBD hraje klíčovou roli v signalizaci NR, a proto byly právě na LBD zaměřeny studie struktury a LBD se stala hlavním cílem pro výzkum léčiv (Yang et al. 2014).

Ligand-vazebná doména, vedle vazby ligandů, zprostředkovává také dimerizaci, která je rozhodující v mnoha regulačních procesech. Superrodina nukleárních receptorů je na základě svých dimerizačních vlastností členěna do tří tříd označovaných jako „hormonální receptory“ (třída I), „adoptované sirotčí receptory“ (třída II), mezi které patří FXR, a „sirotčí receptory“ (třída III) (viz Obr. 11). NR třídy I se váží na své příslušné RE jako homodimery, zpravidla „head to head“ způsobem (viz Obr. 11 A). Do této třídy patří klasické steroidní hormonální receptory, jako jsou např. androgenní receptor (AR), estrogenní receptory (ER), glukokortikoidní receptor (GR), mineralokortikoidní receptor (MR), progesteronové receptory (PR) a hepatocytární nukleární faktor 4 α (HNF4 α). Hormonální receptory (s výjimkou ER) s nenavázaným ligandem se nacházejí v cytoplasmě v komplexu s proteiny teplotního šoku. Vazba hormonu indukuje konformační změny, které vedou k disociaci tohoto komplexu

a dochází k transportu do jádra, kde se receptor váže na svůj příslušný RE a aktivuje transkripci cílových genů (Aagaard et al. 2011, Helsen et al. 2012, Yang et al. 2014).

NR třídy II se váží na své příslušné RE jako obligátní heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR), zpravidla „head to tail“ způsobem (viz Obr. 11 B). RXR existuje při absenci ligandu přednostně ve formě inaktivního homotetraméru a ten se po vazbě ligandu rozpojuje za vzniku heterodimeru s ostatními NR. Do této skupiny se řadí endokrinní receptory, jako jsou např. receptory pro kyselinu retinovou (RAR, z angl. retinoic acid receptors) a thyroideální receptory (TR), které jsou aktivovány hormonálními ligandy. Tyto receptory se i při absenci ligandu nacházejí především v jádře, kde tvoří komplex s korepresory a jsou navázány na své RE. Po vazbě ligandu dojde ke konformačním změnám, což vede k vytěsnění korepresoru z komplexu a následnému rekrutmentu koaktivátoru. Tento vzniklý komplex vyvolá transkripční aktivaci cílových genů. Třída II také obsahuje adoptované sirotčí receptory jako jsou např. farnesoidní X receptor (FXR), jaterní X receptory (LXR, z angl. liver X receptors) a receptory aktivované peroxizómovými proliferátory (PPAR, z angl. peroxisome proliferators-activated receptors). Tyto receptory se nacházejí primárně v jádře, kde jsou aktivovány velkým množstvím různých lipofilních metabolitů, od hojně se vyskytujících ligandů s nízkou afinitou až po méně často se vyskytující ligandy s vysokou afinitou. Tato třída také obsahuje receptory, jako jsou např. receptor pro vitamin D (VDR, z angl. vitamin D receptor), konstitutivní androstanový receptor (CAR, z angl. constitutive androstane receptor) a pregnanový X receptor (PXR). Receptory třídy II vystupují jako metabolické senzory regulující genovou odpověď v závislosti na metabolickém stavu buňky (Aagaard et al. 2011, Helsen et al. 2012, Yang et al. 2014).

NR třídy III se váží na své příslušné RE jako monomery (viz Obr. 11 C) nebo jako dimery. Do této skupiny patří především sirotčí receptory, pro které nebyl doposud nalezen žádný endogenní ligand. Řadí se sem např. tzv. receptory spojené s estrogenními receptory (ERR, z angl. estrogen receptor-related receptors), steroidogenní faktor 1 (SF1), receptor znám také pod označením nervový růstový faktor I-B (NGFI-B, z angl. nerve growth factor I-B) a receptor označovaný jako RevErb. Zajímavé je, že některé NR fungují mnoha způsoby, např. FXR se může vázat na DNA jako monomer i jako heterodimer, a není výjimkou, že se některé NR váží na své RE ve formě monomerů, homodimerů i heterodimerů (Aagaard et al. 2011, Helsen et al. 2012, Wang et al. 2008, Yang et al. 2014).



Obr. 11 Rozdělení nukleárních receptorů do tří tříd na základě dimerizačních vlastností. Vazbou ligandu na ligand-vazebnou doménu (LBD) se tvoří aktivovaný receptorový komplex, dochází k rekrutmentu koaktivátoru a vzniká tak aktivovaný transkripční faktor, který se prostřednictvím DNA-vazebné domény (DBD) váže na příslušný responzivní element nukleárního receptoru (NRRE) a spouští expresi cílových genů. A) Nukleární receptory třídy I se váží na DNA jako homodimery zpravidla „head to head“ způsobem. Řadí se zde androgenní receptor (AR), estrogenní receptory (ER), glukokortikoidní receptor (GR), mineralokortikoidní receptor (MR), progesteronové receptory (PR) a hepatocytární nukleární faktor 4 α (HNF4 α). B) Nukleární receptory třídy II se váží na DNA jako heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR) zpravidla „head to tail“ způsobem. Patří zde receptory pro kyselinu retinovou (RAR), receptor pro vitamin D (VDR), thyroidní receptory (TR), jaterní X receptory (LXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), receptory aktivované peroxizómovými proliferátory (PPAR), pregnanový X receptor (PXR) a farnesoidní X receptor (FXR). C) Nukleární receptory třídy III se váží na DNA jako monomery. Do této skupiny náleží nervový růstový faktor I-B (NGFI-B), receptor RevErb, receptory spojené s estrogenními receptory (ERR) a steroidogenní faktor 1 (SF-1). Modifikováno dle: Aagaard et al. 2011, Yang et al. 2014.

Dimerizace NR je především zprostředkována rozsáhlým dimerizačním povrchem lokalizovaným v LBD. Jedná se o zbytky helixů H7, H9 a H10, které jsou v blízkosti smyček promotoru cílových genů L8–9 a L9–10. Vzniká tak styčná plocha, která obsahuje síť komplementárních hydrofóbních nabitých aminokyselinových zbytků. Jejich hydrofóbní interakce hrají důležitou roli v pozici a stabilizaci dimerů. Helix H11 se odklání z osy dimeru, neboť je v kontaktu s ligandem, který takto může modulovat orientaci H11 a následně ovlivnit stabilitu dimeru. Na dimerizaci se rovněž podílí i DBD nukleárních receptorů (dimerizace DNA-indukovaná či DNA-nezávislá). Zatímco LBD stabilizuje dimery (ligandem-indukovaná dimerizace), DBD přispívá prostřednictvím utváření homodimerů, heterodimerů či monomerů k výběru responzivních elementů NR. Společná vazba dimerů (homodimerů, heterodimerů)

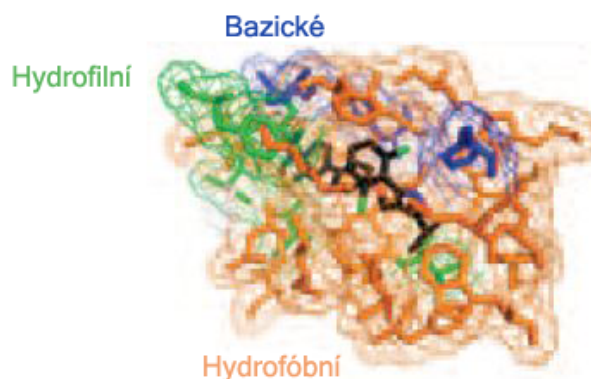
na DNA, ale na odlišné responzivní elementy, dělá z dimerizace obecný mechanismus pro zvýšení specificity a afinity k vazebnému místu (Brelivet et al. 2012, Helsen et al. 2012, Yang et al. 2014).

F region nukleární receptory mohou, ale nemusí, obsahovat. Jedná se o koncovou doménu na C-konci, jejíž sekvence je extrémně variabilní a její struktura i funkce je doposud neznámá (Robinson-Rechavi et al. 2003).

3.3. Vztah struktury farnesoidního X receptoru a jeho funkce

K usnadnění výzkumu účinných ligandů FXR bylo potřeba objasnit detailní vztahy struktury a funkce ligand-vazebné domény (LBD) receptoru a ligandů. Ligand-vazebná doména funguje jako molekulární „switch“, kdy jsou vazbou příslušného ligandu-agonisty vyvolány dynamické konformační změny, které vyústí v uvolnění navázaného korepresoru a v následný rekrutment koaktivátoru, což vede k transkripční aktivaci FXR. Z pohledu výzkumu nových léčiv je nejdůležitějším strukturním prvkem LBD ligand-vazebná kapsa, neboť umožňuje receptoru interagovat s mnoha ligandy díky své vysoké flexibilitě a hydrofóbní povaze. Strukturní analýza objasnila, že některé vlastnosti ligand-vazebné kapsy přispívají k ligand-vazebné afinitě a specificitě. Ligand-vazebná kapsa se jak tvarem, tak i velikostí liší u různých jaderných receptorů, a díky tomu se následně odlišují specifika pojmutí ligandů. Např. do malé ligand-vazebné kapsy receptoru α spojeného s estrogenními receptory (ERR α , z angl. estrogen receptor-related receptor α) pasují pouze ligandy se 4–5 uhlíky. Naproti tomu velká ligand-vazebná kapsa např. pregnanového X receptoru (PXR) umožňuje vazbu antibiotika rifampicinu, jednoho z největších ligandů nukleárních receptorů. Ligand-vazebná kapsa LBD FXR má objem 726 Å³, je tedy menší než např. ligand-vazebná kapsa receptoru SXR (z angl. steroid and xenobiotic receptor) o velikosti 1150 Å³, ale naopak je větší, než např. ta od retinoidního X receptoru α (RXR α) o velikosti 439 Å³ (Downes et al. 2003, Yang et al. 2014).

Ligand-vazebná kapsa FXR je složena z 29 aminokyselinových zbytků, jejichž chemické vlastnosti umožňují interakce s ligandy. Aminokyselinové zbytky jsou, dle vlastností, rozděleny na hydrofóbní, hydrofilní, bazické, kyselé, cysteinové a glycinové (viz Obr. 12). Ligand-vazebná kapsa FXR je především hydrofóbní povahy, uplatňují se ale i polární a další aminokyselinové zbytky (Wallace a Redinbo 2013).



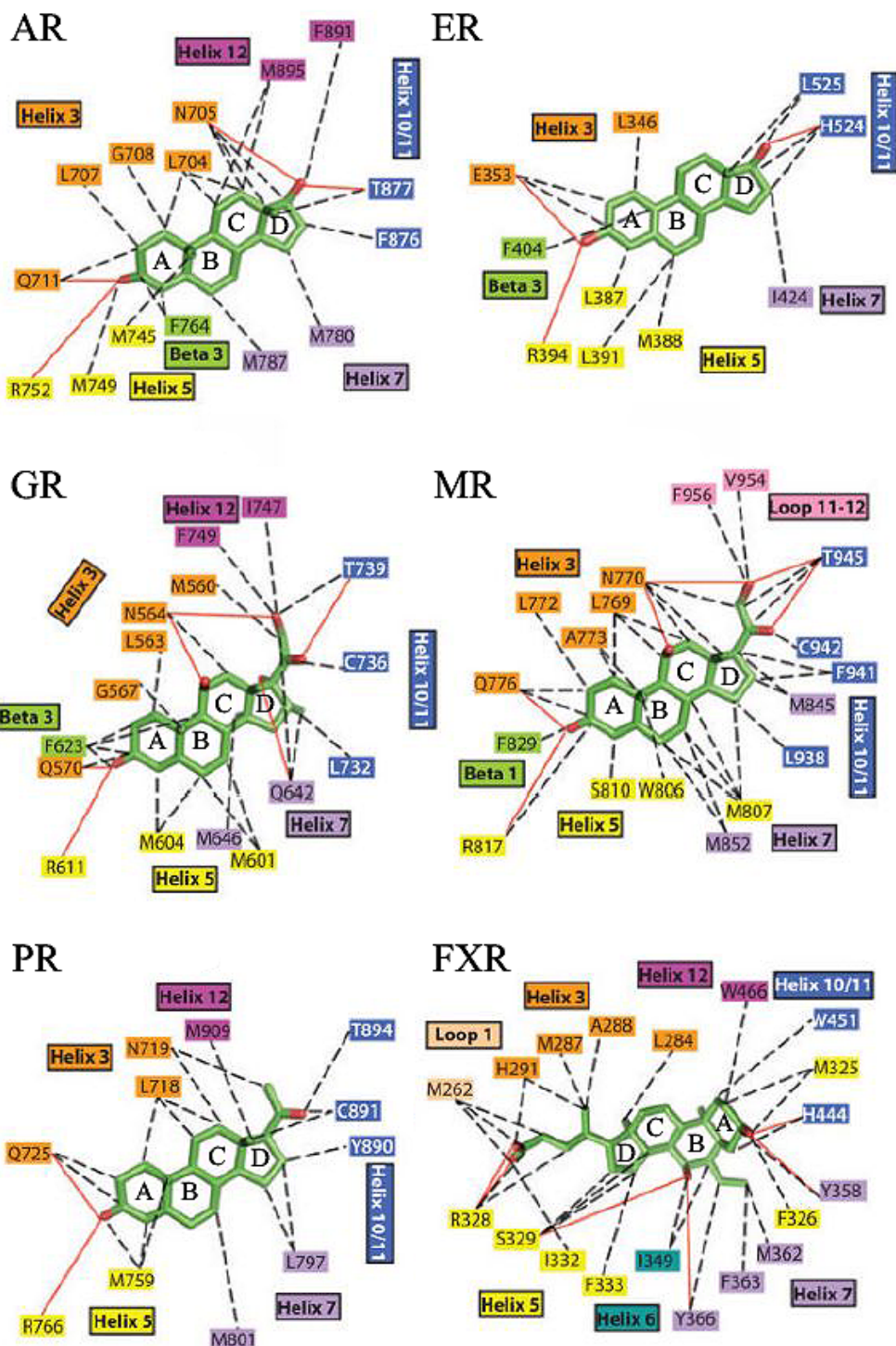
Obr. 12 Detail ligand-vazebné kapsy farnesoidního X receptoru. Aminokyselinové zbytky jsou, dle vlastností, rozděleny na hydrofóbní (oranžové), hydrofilní (zelené), bazické (modré) a glycinové (bílé). Jak je vidět i v tabulce 3.1, ligand-vazebná kapsa je především hydrofóbní povahy, uplatňují se ale i polární a další aminokyselinové zbytky. Modifikováno dle: Wallace a Redinbo 2013.

Ve snaze identifikovat molekulární determinanty spojené s vazbou ligandů, rekrutmentem koaktivátorů a expresí cílových genů byla v roce 2003 objevena krystalografická struktura ligand-vazebné domény FXR v komplexu s různými ligandy. Díky tomu byly objasněny mnohé otázky týkající se strukturního upořádání LBD i mechanismu přijímání ligandů a koaktivátorů. Bylo zjištěno, že LBD FXR má vysoce konzervovanou strukturu, nicméně vykazuje tři charakteristické vlastnosti: 1) žlučové kyseliny se váží svou steroidní kostrou na FXR obráceně oproti jiným steroidním ligandům příslušných NR; 2) helix H12 je stabilizován žlučovými kyselinami (agonisty) v aktivní konformaci. Stabilizaci aktivní konformace zprostředkovává tzv. π -kationtový aktivační „switch“ tvořený triádou aminokyselinových zbytků tyrozinu, histidinu a tryptofanu; 3) LBD FXR obsahuje i druhé koaktivátor-vazebné místo oproti ostatním NR. Všechny tyto tři charakteristické vlastnosti mají významné funkční následky (Constantino et al. 2005, Nettles a Greene 2003).

Žlučové kyseliny se váží svou steroidní kostrou na FXR obráceně

Pracovní skupinou Downes et al. (2003) byla identifikována struktura LBD FXR v komplexu s CDCA (chenodeoxycholová kyselina, z angl. chenodeoxycholic acid), dalšími endogenními žlučovými kyselinami a nesteroidním ligandem fexaraminem. Nezávisle na tom vědecká skupina Mi et al. (2003) objasnila strukturu LBD FXR v komplexu se dvěma analogy žlučových kyselin 6-ECDC (6 α -ethyl-CDCA) a 3-deoxy-CDCA. Tyto strukturní studie ukázaly, že žlučové kyseliny obsazují ligand-vazebnou kapsu svým steroidním jádrem, které je orientováno obráceně než u ostatních steroidů. Kruh A žlučových kyselin směřuje k C-terminálnímu helixu 12 (H12, AF-2 helix) receptoru. Tato orientace byla neočekávaná,

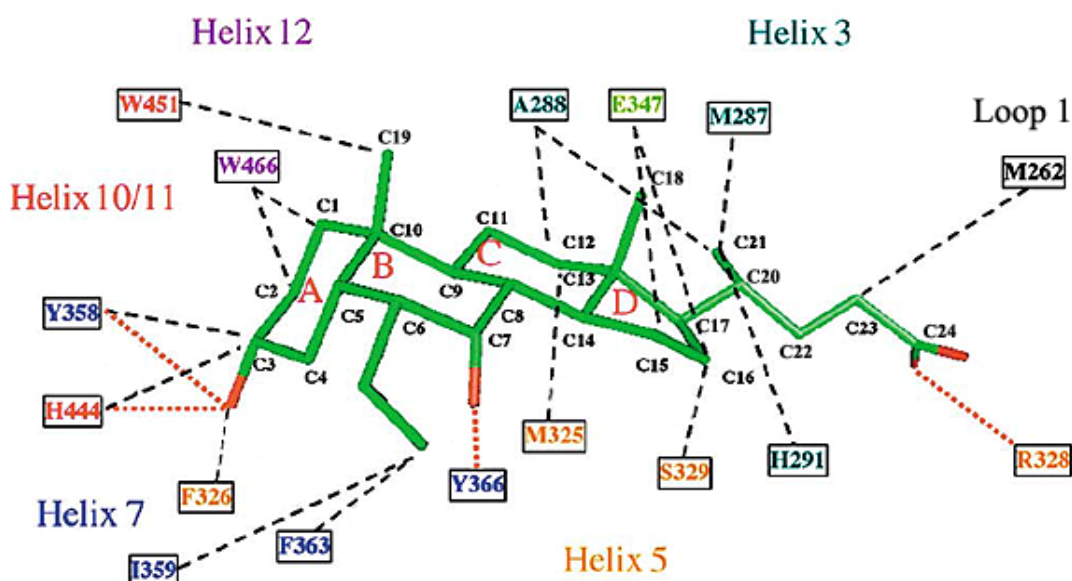
neboť např. testosteron, estrogen, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a progesteron jsou orientovány opačně, tedy tak, že k helixu 12 jejich příslušného receptoru směřuje jejich kruh D a jejich kruh A je orientován hluboko v ligand-vazebné kapse (viz Obr. 13) (Downes et al. 2003, Huang et al. 2010, Mi et al. 2003).



Obr. 13 Prostorová orientace steroidních základů ligandů při vazbě na nukleární receptory. Pohled na ligand-vazebné interakce steroidních základů testosteronu, estrogenu, glukokortikoidů, mineralokortikoidů a progesteronu s příslušnými nukleárními receptory, tedy s androgenním receptorem (AR), estrogenními

receptory (ER), glukokortikoidním receptorem (GR), mineralokortikoidním receptorem (MR) a progesteronovými receptory (PR) ukazuje, že jejich kruh A je orientován hluboko v ligand-vazebné kapse receptoru a jejich kruh D směřuje k helixu 12. Znázornění orientace steroidní kostry žlučových kyselin (vyobrazena je 6-ethyl-chenodeoxycholová kyselina) v ligand-vazebné kapse farnesoidního X receptoru (FXR) ukazuje, že tato orientace je oproti ostatním jaderným receptorům opačná, neboť kruh A žlučových kyselin směřuje k helixu 12. Červenou barvou jsou znázorněny vodíkové vazby mezi OH-skupinami ligandů a polárními postranními řetězci aminokyselin ligand-vazebné kapsy. Čárkovaně jsou vyobrazeny van der Waalovy síly. Vysvětlivky: Beta 1 (beta list 1), beta 3 (beta list 3). Písmena označují zbytky následujících aminokyselin: A (alanin), C (cystein), E (kyselina glutamová), F (fenylalanin), G (glycin), H (histidin), I (isoleucin), L (leucin), M (methionin), N (asparagin), Q (glutamin), R (arginin), S (serin), T (threonin), Y (tyrozin), V (valin), W (tryptofan). Modifikováno dle: Huang et al. 2010.

Žlučové kyseliny jsou amfipatické steroidy. Fyzikálně-chemické vlastnosti steroidní kostry žlučových kyselin jsou nezbytné k formaci jedné konvexní (vypouklé) hydrofobní strany a druhé konkávní (duté) hydrofilní strany. Steroidní kostra žlučových kyselin nemá plochou strukturu díky atomu vodíku orientovanému v β -konfiguraci v poloze C-5 (viz Obr. 14). Tento substituent způsobí to, že spojení kruhů A a B je v poloze *cis*, a díky tomu kruh A leží mimo rovinu kruhů B, C a D. Díky tomu je vzdálenost mezi OH-skupinou na uhlíku C-3 v poloze α a karboxylovou skupinou v poloze C-24 podstatně kratší, než je délka obrysu molekuly, a díky tomu mají žlučové kyseliny zaoblený profil, který jim umožňuje těsně zapadnout do kapsy FXR (viz Obr. 13 a Obr. 14). Obrázky 13 a 14 ukazují, jak se spolu doplňuje tvar FXR ligand-vazebné kapsy a neplanární kostra žlučových kyselin. Ligand-vazebná kapsa FXR využívá rovněž amfipatických vlastností žlučových kyselin k rozpoznávání jejich molekul. Primární a sekundární žlučové kyseliny mají dvě zřetelné strany – stranu α a β . Na straně α jsou navázány hydroxylové skupiny v poloze C-3 α , C-7 α a C-12 α , zatímco strana β je složena z uhlovodíkového povrchu methylových skupin v poloze C-18 a C-19 (viz Obr. 14) (Mi et al. 2003).



Obr. 14 Orientace steroidní kostry a vazebné interakce při vazbě žlučových kyselin do ligand-vazebné kapsy farnesoidního X receptoru. Na příkladu 6-ethyl-chenodeoxycholové kyseliny (6-ECDC) je ukázáno, že steroidní kostra žlučových kyselin nemá plochou strukturu, ale kruh A leží mimo rovinu kruhů B, C a D. Žlučové kyseliny mají dvě strany – stranu α a β . Na stranu α 6-ECDC jsou navázány hydroxylové skupiny v poloze C-3 α a C-7 α , strana β je složena z uhlovodíkového povrchu methylových skupin v poloze C-18 a C-19. Dále jsou znázorněny vazebné interakce žlučových kyselin a ligand vazebné kapsy farnesoidního X receptoru (FXR). Červenou barvou jsou znázorněny vodíkové vazby mezi OH-skupinami a polárními postranními řetězci aminokyselin ligand-vazebné kapsy. Čárkovaně jsou vyobrazeny van der Waalsovy síly. Vysvětlivky: Loop 1 (smyčka 1). Písmena označují zbytky následujících aminokyselin: A (alanin), E (kyselina glutamová), F (fenylalanin), H (histidin), I (isoleucin), M (methionin), R (arginin), S (serin), Y (tyrozin), W (tryptofan). Modifikováno dle: Mi et al. 2003.

Obrázky 13 a 14 ukazují, že jak steroidní kostra žlučových kyselin, tak i ligand-vazebná kapsa postrádá dostatečný počet donorů a akceptorů vodíkových vazeb na to, aby byly žlučové kyseliny plně rozlišeny od jiných steroidních hormonů. Namísto toho se u ligand-vazebné kapsy FXR vyvinul systém rozpoznávání žlučových kyselin na základě jejich jedinečného neplanárního tvaru a amfipatických fyzikálně-chemických vlastností. Mechanismus rozpoznávání na základě tvaru a fyzikálně-chemických vlastností využívaný u FXR pro vazbu ligandů v podstatě znemožňuje všem ostatním steroidům a metabolitům cholesterolu aktivovat tento receptor. Např. estrogény mají aromatický kruh A, a proto u nich není možná *cis-trans* izomerie na uhlíku C-5. Progesteron, testosteron, aldosteron a glukokortikoidy mají v kruhu B dvojnou vazbu v poloze 5, a tudíž nemají vodík v poloze C-5 β potřebný pro orientaci spojení kruhů A/B do polohy *cis*. Navíc, vedle odlišné prostorové struktury, nemá žádná z těchto molekul amfipatické vlastnosti, spojené s α a β stranami žlučových kyselin, které jsou určující pro jejich biologickou funkci a umožnění vazby na

FXR. Charakteristické prostorové uspořádání žlučových kyselin umožňuje jejich typicky *cis*-orientovanému kruhu A převést FXR receptor do aktivovaného stavu prostřednictvím tzv. π -kationového aktivačního „switch“, který je lokalizován hluboko v ligand-vazebné kapse (Mi et al. 2003).

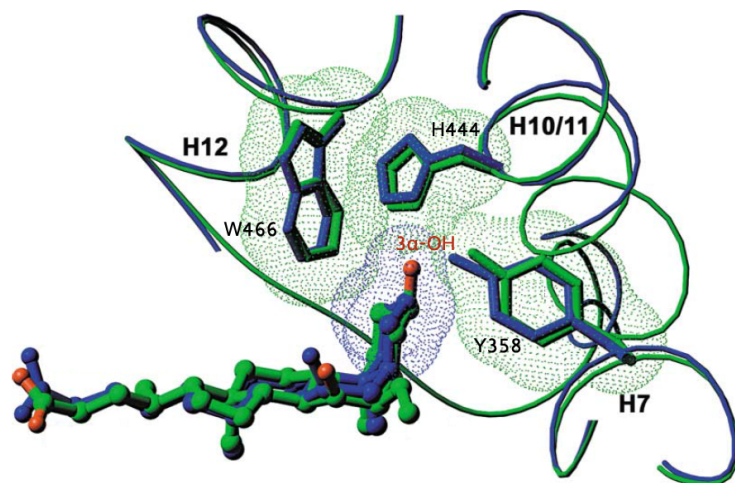
Helix H12 je stabilizován žlučovou kyselinou v aktivní konformaci, tuto stabilizaci zprostředkovává tzv. π -kationový aktivační „switch“

Žlučové kyseliny jsou v ligand-vazebné kapse FXR obklopeny helixy H3 a H7 a významně se uplatňuje i kontakt s helixy H5, H6, H10/11 a H12. Po navázání žlučových kyselin (agonistů) do ligand-vazebné kapsy FXR dochází ke změně pozice helixu H12 do aktivní konformace tak, že je orientován naproti helixům H3, H4 a H10/11. Tato konformace receptoru reprezentuje aktivovaný stav, kdy posunem H12 vznikne prostor pro vazbu koaktivátoru. H12 takto umožňuje stabilní interakce mezi receptorem a koaktivátorem. H12 se dostává do své pozice prostřednictvím tvorby vodíkových vazeb mezi hydroxylovou skupinou v poloze C-3 α (přítomnou u všech přirozeně se vyskytujících žlučových kyselin) a kyslíkem aminokyselinových zbytků H444 (histidinový zbytek) helixu H10/11 a Y358 (tyrozinový zbytek) helixu H7 (viz Obr. 14). Mi et al. (2003) objasnili, že u žlučových kyselin, které mají hydroxylovou skupinu i v poloze C-7 α , např. u chenodeoxycholové kyseliny, se tvoří vodíkové můstky mezi touto OH-skupinou a tyrozinovým zbytkem Y366 helixu 7 (viz Obr. 14). Huang et al. (2010) navíc popisují i vodíkový můstek mezi serinovým zbytkem S329 helixu 5 a touto OH-skupinou (viz Obr. 13). Vodíkové vazby se také tvoří mezi OH-skupinou karboxylu a argininovým zbytkem R328 helixu H5 (viz Obr. 14). Znalost vazebných interakcí mezi ligand-vazebnou kapsou a lithocholovou kyselinou (LCA, z angl. lithocholic acid) či deoxycholovou kyselinou (DCA, z angl. deoxycholic acid) poskytuje vysvětlení pro jejich parciálně agonistické vlastnosti. Tyto žlučové kyseliny postrádají hydroxylovou skupinu v poloze C-7, netvoří tedy v této poloze vodíkové můstky, následkem toho nedochází k přemostění helixů H3 a H7 tak pevně, jako u CDCA, což v konečném důsledku ovlivní stabilizaci helixu H12 v aktivní poloze. Nepřítomnost této OH-skupiny na kruhu B u LCA a DCA snižuje jejich afinitu k FXR receptoru. Kyselina ursodeoxycholová (UDCA, z angl. ursodeoxycholic acid) nemá příliš velký aktivační účinek na FXR, přestože má dvě hydroxylové skupiny v poloze C-3 α a C-7 β . OH-skupina na uhlíku 7 je (oproti CDCA) orientována v poloze β , což vede k formaci více otevřené ligand-vazebné kapsy. Toto uspořádání následně ovlivňuje optimální pozici H12 a výsledkem je parciální inhibice koaktivátorové interakce. Ligand-vazebná kapsa nemá žádné polární postranní řetězce, které

by mohly vázat hydroxylovou skupinu žlučových kyselin v poloze C-12 α , a proto je vazba kyseliny cholové (CA, z angl. cholic acid) a DCA energeticky náročnější než vazba CDCA. Vedle vodíkových můstků se při vazbě ligandů do ligand-vazebné kapsy uplatňují i van der Waalsovy síly (viz Obr. 14) (Constantino et al. 2005, Downes et al. 2003, Huang et al. 2010, Mi et al. 2003).

Žlučové kyseliny se běžně vyskytují v konjugované formě s glycinem či taurinem. Na základě studií krystalové struktury bylo zjištěno, že karboxylový konec žlučových kyselin je orientován směrem ke vstupu do ligand-vazebné kapsy LBD, což vysvětluje, proč si konjugované žlučové kyseliny zachovávají schopnost aktivovat FXR. Karbonylový kyslík na uhlíku C-24 u konjugovaných, stejně jako u volných žlučových kyselin, formuje vazbu s argininovým zbytkem R328 LBD FXR (Fujino et al. 2004; Modica et al. 2010).

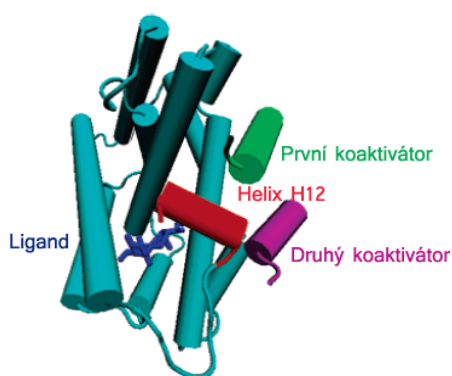
Všechny přirozeně se vyskytující žlučové kyseliny mají 3 α -hydroxylovou skupinu na kruhu A, která sice tvoří vodíkové můstky s aminokyselinovými zbytky ligand-vazebné kapsy, ale přímo neinteraguje s helixem H12. Hydroxylová skupina v poloze C-3 α tedy sama o sobě není dostatečná, a ani nezbytná, ke stabilizaci helixu H12 do aktivní konformace. Jak ukazuje obrázek 14, kruh A žlučových kyselin a 3 α -hydroxylová skupina jsou orientovány směrem k helixu H12, kde 3 α -hydroxylová skupina tvoří vodíkové můstky s histidinovým zbytkem H444 na helixu H10/11 a kruh A prostřednictvím van der Waalsových sil interaguje tryptofanovým zbytkem W466, jediným zbytkem helixu H12 nacházejícím se v bezprostřední blízkosti ligandu. Tyto dva aminokyselinové zbytky fungují jako spouštěcí mechanismus aktivace FXR receptoru prostřednictvím formace π -kationtové interakce mezi indolovým kruhem W466 (π -elektronový systém) a kationtem na postranním řetězci kolmo orientovaného H444. Kruh A žlučových kyselin dále přiléhá na tyrozinový zbytek Y358 helixu H7, který dále vymezuje pozici H444 (viz Obr. 15). Tato π -kationtová interakce byla, vedle FXR, popsána i u značného počtu nukleárních receptorů jako molekulární „switch“ pro aktivaci receptoru, kdy ligand není v přímém kontaktu s H12, a receptor tak podléhá nepřímé aktivaci AF-2 helixu. Naproti tomu, některé ligandy přímo kontaktují, a stabilizují tak helix H12 FXR receptoru. Za nepřítomnosti ligandu není π -kationtová interakce mezi H444 a W466 stabilizována, a helix H12 tak nemůže být orientován do aktivní pozice. Tento mechanismus vysvětluje, proč přítomnost agonisty je tedy nutná pro následnou vazbu koaktivátoru (Constantino et al. 2005, Huang et al. 2010, Mi et al. 2003).



Obr. 15 π -kationtový aktivační „switch“ zprostředkovává ligandem indukovanou stabilizaci aktivní konformace farnesoidního X receptoru. 3 α -hydroxylová skupina žlučových kyselin (modře vyobrazeným příkladem je 3-deoxy-chenodeoxycholová kyselina, zeleně je znázorněna 6-ethyl-chenodeoxycholová kyselina) se váže vodíkovým můstkem na histidinový zbytek (H444) a van der Waalsovými silami na tryptofanový (W466) a tyrozinový (Y358) zbytek. Mezi H444 a W466 vznikají π -kationtové interakce, které stabilizují helix 12 (H12) v aktivní konformaci. Vysvětlivky: H7–12 (helixy 7–12). Modifikováno dle: Mi et al. 2003.

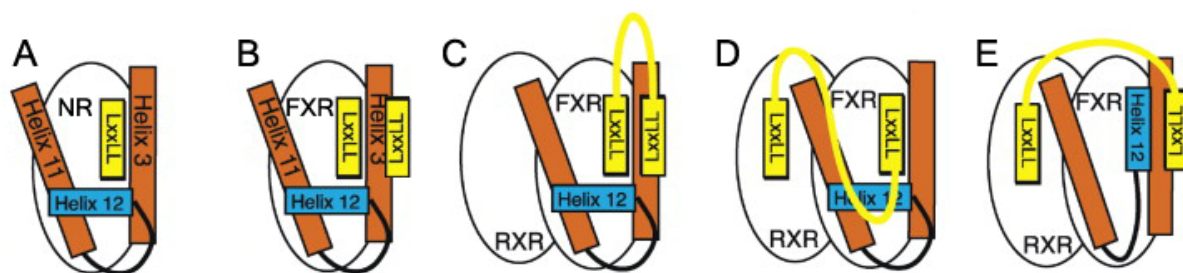
LBD FXR obsahuje i druhé koaktivátor-vazebné místo

Překvapivým zjištěním bylo, že FXR může vázat dva koaktivátory zároveň (viz Obr. 16), neboť LBD FXR obsahuje vedle prvního AF-2 vazebného místa pro koaktivátor i druhé koaktivátor-vazebné místo, které je lokalizováno na helixu H3, přímo sousedí s prvním vazebným místem a je k němu orientováno antiparalelním způsobem (viz Obr. 17 B). Toto druhé vazebné místo obsahuje rovněž hydrofóbní úsek homologní k motivu LXXLL koaktivátorových proteinů (Constantino et al. 2005, Nettles a Greene 2003, Zhang et al. 2006).



Obr. 16 Schématické znázornění ligand-vazebné domény FXR za přítomnosti dvou koaktivátorů. Ligand vazebná doména farnesoidního X receptoru (FXR) obsahuje dvě vazebná místa pro koaktivátorové proteiny, první koaktivátor je zobrazen zeleně, druhý koaktivátor fialově, červenou barvou je vyobrazen helix H12 a tmavě modrá barva charakterizuje ligand (agonistu). Modifikováno dle: Constantino et al. 2005.

FXR se vyskytuje v komplexu se svým heterodimerickým partnerem RXR, který obsahuje jedno koaktivátor-vazebné místo s vysokou afinitou pro motiv LXXLL, kdy vazba koaktivátoru probíhá prostřednictvím elektrostatických sil. Možné konformace LBD těchto nukleárních receptorů a následné interakce s koaktivátory jsou zobrazeny na obrázcích 17 C, D a E. První možnou variantou je kontakt motivů LXXLL obou dvou koaktivátorů s monomerním FXR, kdy dochází k obsazení obou vazebných míst LBD FXR (viz Obr. 17 C). Dále se může každý koaktivátorový protein vázat na jeden monomer komplexu FXR/RXR, kdy koaktivátor v LBD FXR obsazuje „klasické“ AF-2 vazebné místo (viz Obr. 17 D). V případě, že je helix H12 v antagonistické pozici, a tedy znemožňuje vazbu koaktivátorového proteinu do „klasického“ koaktivátor-vazebného místa LBD FXR, LXXLL motiv koaktivátoru interaguje s druhým vazebným místem FXR. Toto uspořádání je označováno jako tzv. „on deck“ vazebné místo (Constantino et al. 2005, Nettles a Greene 2003).



Obr. 17 Možné konformace LBD nukleárních receptorů a interakce s koaktivátory. A) Ligand-vazebná doména (LBD) nukleárních receptorů nejčastěji obsahuje jedno koaktivátor-vazebné místo, které tvoří sevřená kavita mezi helixy H3, H11 a H12. B) LBD farnesoidního X receptoru (FXR) obsahuje i druhé koaktivátor-vazebné místo, které je lokalizováno na helixu H3 a je orientováno k prvním vazebnému místu antiparalelně. C), D) a E) Na příkladu koaktivátorů SRC 1–3 (steroidní receptorové koaktivátory 1–3), který má tři LXXLL motivy, z nichž dva jsou spojeny prostřednictvím můstku, jsou ukázány možné interakce koaktivátorů a ligand-vazebných domén komplexu FXR/RXR (retinoidní X receptor). C) Motiv LXXLL obsazují obě koaktivátor-vazebné místa FXR. D) Jeden motiv LXXLL obsazuje „klasické“ vazebné místo FXR, druhý se váže na vazebné místo RXR. E) Helix H12 LBD FXR se nachází v antagonistické pozici, proto se motiv LXXLL váže do druhého koaktivátor-vazebného místa označovaného jako „on deck“, zatímco druhý LXXLL motiv obsazuje vazebné místo RXR. Vysvětlivky: L (leucinový zbytek), X (jakýkoliv aminokyselinový zbytek). Modifikováno dle: Nettles a Greene 2003.

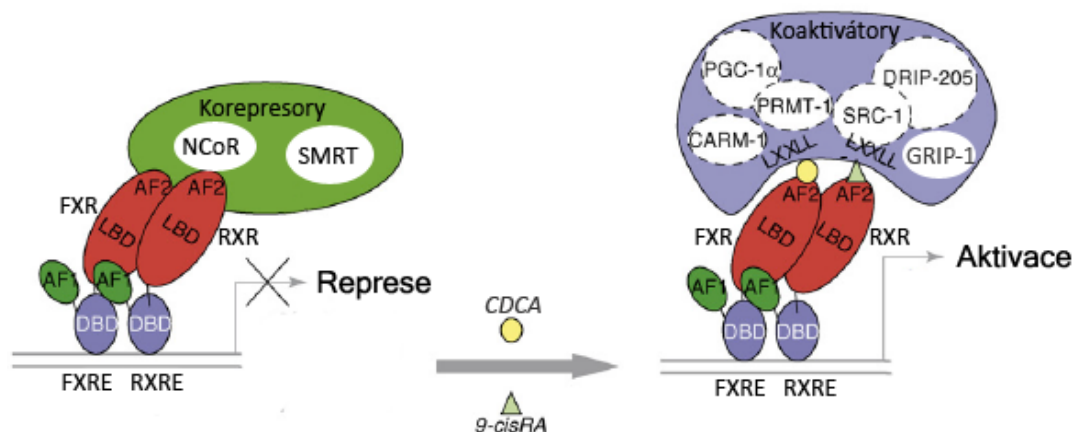
Toto druhé koaktivátor-vazebné místo může mít významnou funkci v celkovém procesu molekulárního rozpoznávání. Kromě FXR a jaterního receptorového homologu 1 (LRH-1, z angl. liver receptor homolog 1) nebylo napříč superrodinou nukleárních receptorů takového druhé vazebné místo pro koaktivátory pozorováno (Nettles a Greene 2003, Zhang et al. 2006).

K porozumění role jednotlivých ligandů, vlivu vazby agonistů na rekrutment koaktivátorů a následného vlivu na expresi cílových genů je klíčová schopnost předpovídat konformační změny a stabilitu receptoru po navázání ligandů. Proto je znalost vztahů struktury a funkce (SAR, z angl. structure-activity relationship) ligandů a LBD FXR velice důležitá (Constantino et al. 2005).

3.4. Koaktivátory, korepresory

Regulační proteiny, které modifikují transkripční aktivitu nukleárních receptorů, se označují jako koregulátory. Dělí se na dvě skupiny: koaktivátory, které se podílí na zvýšení transkripce cílových genů při vazbě ligandu-agonisty na receptor, a korepresory, které přispívají k potlačení transkripční aktivity při vazbě ligandu antagonisty na receptor či ve stavu, kdy na receptor není navázán žádný ligand (viz Obr. 18). Doposud bylo objeveno přes 200 transkripčních koaktivátorů. Jedná se o proteiny s různou distribucí do buněk a tkání a s odlišnými funkcemi. Mezi koaktivátory FXR patří např. steroidní receptorový koaktivátor 1 SRC-1 (z angl. steroid receptor coactivator 1), GRIP-1 (z angl. glucocorticoid receptor interacting protein 1), PRMT-1 (z angl. protein arginine methyl transferase 1), CARM-1 (z angl. coactivator-associated arginine methyltransferase 1), PGC-1 α (z angl. PPAR γ coactivator 1 α , peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α) a DRIP-205 (z angl. vitamin-D-receptor-interacting protein 205) (Fiorucci et al. 2007, Huang et al. 2010, Lonard a O'Malley 2012).

Mezi korepresory FXR se řadí např. jaderný korepresor NCoR (z angl. nuclear corepressor) a korepresor SMRT (z angl. silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors) (Huang et al. 2010).



Obr. 18 Koaktivátory a korepresory se podílí na aktivaci či represi transkripční aktivity FXR. Při absenci ligandu či při vazbě ligandu antagonisty tvoří farnesoidní X receptor (FXR) komplex s korepresorem a dochází k represi transkripce. Korepresory FXR jsou např. NCoR (nuclear corepressor) a SMRT (silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors). Aktivace receptoru prostřednictvím vazby ligandu agonisty, např. kyseliny chenodeoxycholové (CDCA) pro FXR a 9-*cis*-retinové kyseliny (9-*cis*RA) pro retinoidní X receptor (RXR), způsobí uvolnění korepresoru z komplexu a vzniká nový receptorový komplex s koaktivátorem, který vede k aktivaci transkripční aktivity. Mezi koaktivátory FXR patří např. SRC-1 (steroidní receptorový koaktivátor 1), GRIP-1 (glucocorticoid receptor interacting protein 1), PRMT-1 (protein arginine methyl transferase 1), CARM-1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1), PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α) a DRIP-205 (vitamin-D-receptor-interacting protein 205). Vysvětlivky: LBD (ligand-vazebná doména), DBD (DNA-vazebná doména), AF-1 (aktivační funkce 1), AF-2 (aktivační funkce 2), FXRE (responzivní element FXR), RXRE (responzivní element RXR), LXXLL (L – leucinový zbytek, X – jakýkoliv aminokyselinový zbytek). Modifikováno dle: Fiorucci et al. 2007.

Bylo pozorováno, že vazba odlišných typů agonistů vede k aktivaci odlišných souborů cílových genů nukleárních receptorů. Downes et al. (2003) zaznamenali, že dva syntetické agonisté FXR fexaramin a GW4064 indukují genovou expresi s odlišnými profily. Obdobný jev byl pozorován např. u parciálních agonistů estrogenového receptoru (ER) tamoxifenu a raloxifenu, které mají téměř identickou krystalovou strukturu, ale liší se v aktivaci svých cílových genů. Tento fenomén pozorovaný napříč jadernými receptory je způsoben prostřednictvím rekrutmentu odlišných, ligand-specifických koaktivátorů. Nicméně mechanismus, kterým dochází k rekrutmentu těchto ligand-specifických koaktivátorů, a relevance těchto molekul k regulaci specifických cílových genů prostřednictvím ligandů FXR, nejsou stále objasněny (Aagaard et al. 2011, Downes et al. 2003, Fiorucci et al. 2007, Nettles a Greene 2003).

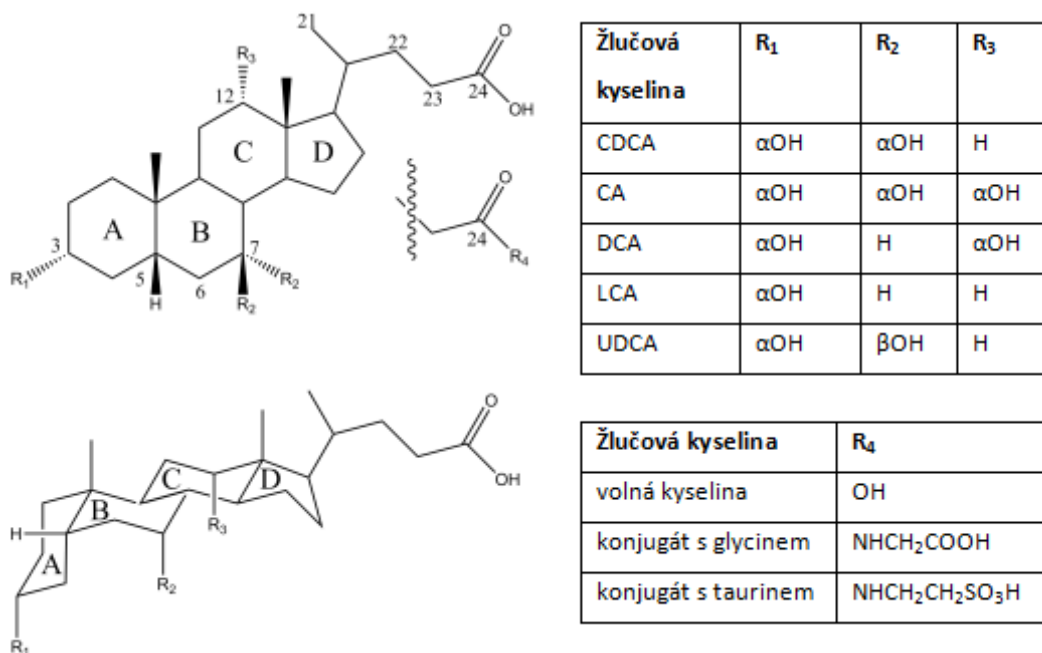
3.5. Ligandy

3.5.1. Steroidní ligandy agonisté

Hlavními a nejdůležitějšími ligandy FXR receptoru jsou látky steroidní struktury. Jedná se zejména o endogenní žlučové kyseliny, a právě jejich modifikacím byl v posledních letech věnován intenzivní výzkum s cílem získat více selektivní a účinnější agonisty FXR. Mezi endogenní steroidy aktivující FXR patří také látky ze skupiny oxysterolů a steroidních hormonů.

Přirozené žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou konečnými produkty katabolismu cholesterolu. U člověka existuje pět hlavních endogenních žlučových kyselin (viz Obr. 19 a Tab. 1): primárními žlučovými kyselinami jsou kyselina chenodeoxycholová (CDCA, z angl. chenodeoxycholic acid, č. T1) a kyselina cholová (CA, z angl. cholic acid, č. T2), které jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech; mezi sekundární žlučové kyseliny se řadí deoxycholová kyselina (DCA, z angl. deoxycholic acid, č. T3) a lithocholová kyselina (LCA, z angl. lithocholic acid, č. T4), které jsou tvořeny střevními bakteriemi z primárních žlučových kyselin 7 α -dehydroxylací, a kyselina ursodeoxycholová (UDCA, z angl. ursodeoxycholic acid, č. T5), která je terciární žlučovou kyselinou, jež je syntetizována v játrech z příslušné sekundární žlučové kyseliny (Lew et al. 2004, Modica et al. 2010, Wang et al. 1999).



Obr. 19 Chemická struktura přirozených žlučových kyselin. Jsou zobrazeny přirozené žlučové kyseliny: kyselina chenodeoxycholová (CDCA), kyselina cholová (CA), kyselina deoxycholová (DCA), kyselina lithocholová (LCA) a kyselina ursodeoxycholová (UDCA). Tyto kyseliny se mohou vyskytovat ve volné

podobě, častěji se vyskytují v konjugované formě s glycinem či taurinem. Dále je zobrazeno *cis*-spojení kruhů A/B žlučových kyselin díky atomu vodíku v β -konfiguraci na uhlíku č. 5. Modifikováno dle: Wang et al. 1999.

Tab. 1 Přehled přirozených žlučových kyselin.

Číslo	Zkratka	Název	Chemická struktura
T1	CDCA	chenodeoxycholová kyselina	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T2	CA	cholová kyselina	3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T3	DCA	deoxycholová kyselina	3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T4	LCA	lithocholová kyselina	3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T5	UDCA	ursodeoxycholová kyselina	3 α ,7 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina

V roce 1999 bylo poprvé popsáno, že žlučové kyseliny jsou ve fyziologických koncentracích endogenními ligandy FXR. Tento objev učinily tři na sobě nezávislé vědecké skupiny (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999), které zjistily, že ze žlučových kyselin je nejsilnějším aktivátorem FXR CDCA ($EC_{50} = 50 \mu\text{M}$). Dále tyto skupiny pozorovaly, že i CA, DCA a LCA jsou schopny aktivovat FXR, ale s menší účinností než CDCA. Toto pozorování později doplnili Lew et al. (2004) pro CA a DCA a Yu et al. (2002) pro LCA o zjištění, že tyto žlučové kyseliny jsou schopny inhibovat aktivaci FXR receptoru způsobenou CDCA. CA, DCA a LCA tedy vystupují jako parciální agonisté FXR. Ani u nejvíce hydrofilní žlučové kyseliny UDCA nebyla všechna pozorování konzistentní, v počátečních studiích UDCA bylo zjištěno, že UDCA není schopna aktivovat FXR receptor, nicméně pozdějším testováním skupinami Lew et al. (2004) a Campana et al. (2005) byla tato hypotéza vyvrácena, neboť bylo zjištěno, že UDCA je parciálním agonistou, který kompetitivně inhibuje schopnost CDCA aktivovat FXR (Campana et al. 2005, Lew et al. 2004, Makishima et al. 1999, Modica et al. 2010, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999, Yu et al. 2002).

Vysvětlení těchto nesrovnalostí může spočívat v použité experimentální metodě, testování *in vitro* schopnosti ligandu indukovat interakci LBD FXR s koaktivátorem (např. SRC-1 coactivator association assay) se nejeví jako nejlepší experimentální model, neboť plně nevystihuje biologickou aktivitu receptoru. Výsledek transkripce závisí na mnoha

faktorech, jako je např. vazba na specifickou sekvenci DNA a dimerizace. Tudíž se jako výhodnější jeví použití tzv. cell-based assays, metod za použití buněk. Lew et al. (2004) poukazují na fakt, že rozdílné žlučové kyseliny mají, jako ligandy FXR, unikátní vlastnosti v rozsahu od plně agonistických přes parciálně agonistické až po antagonistické. Různé endogenní žlučové kyseliny interagují s FXR charakteristickým způsobem, jejich vazba vyústí v odlišné konformace FXR, následuje promotorově-specifická vazba na DNA a výsledkem je odlišná regulace exprese jednotlivých cílových genů FXR genově-selektivním způsobem. Dále Lew et al. (2004) prokázali u plných agonistů a parciálních agonistů FXR existenci tzv. auto-regulační smyčky (z angl. auto-regulatory loop) FXR signalizační dráhy, tedy schopnost regulovat expresi genů pro vlastní FXR protein. Auto-regulační smyčka byla identifikována i u některých dalších nukleárních receptorů, jako jsou např. receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory γ (PPAR γ , z angl. peroxisome proliferators-activated receptor γ), receptory pro kyselinu retinovou α a γ (RAR α a RAR γ , z angl. retinoic acid receptor α and γ) a jaterní X receptory (LXR, z angl. liver X receptors) (Lew et al. 2004, Modica et al. 2010).

Žlučové kyseliny se obvykle vyskytují v konjugované formě s glycinem či taurinem (viz Obr. 19). Bylo prokázáno, že konjugovaná CDCA, CA, DCA i LCA aktivují FXR receptor na stejné úrovni jako příslušná volná kyselina (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Z výsledků studií vztahu struktury a účinku vyplývá, že pro aktivaci FXR je klíčová základní steroidní kostra (5 β -cholan-24-ová kyselina), s typicky *cis*-orientovaným kruhem A díky atomu vodíku orientovanému v β -konfiguraci v poloze C-5 (viz Obr. 19). Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3, hydroxylová skupina v poloze C-3 α (přítomná u všech přirozeně se vyskytujících žlučových kyselin) se podílí na aktivaci receptoru, nicméně není nezbytná. Hydroxylová skupina v poloze C-7 α poskytuje CDCA vysokou kapacitu aktivovat FXR. Naproti tomu absence 7 α -OH (v případě DCA a LCA) narušuje stabilní rekrutment koaktivátoru, což ústí v částečné agonistické vlastnosti. Hydroxylová skupina v poloze C-7 β snižuje schopnost aktivovat receptor, proto UDCA, přestože má dvě hydroxylové skupiny v poloze C-3 α a C-7 β , má oproti CDCA nižší afinitu k FXR a vykazuje parciálně agonistické vlastnosti. FXR LBD nemůže vázat hydroxylovou skupinu žlučových kyselin v poloze C-12 α , a proto CA a DCA mají nízkou afinitu k FXR (Downes et al. 2003, Mi et al. 2003, Modica et al. 2010).

Z přirozených žlučových kyselin se jako léčiva používají kyselina ursodeoxycholová (mj. k léčbě primární biliární cirhózy, primární sklerotizující cholangitidy, hepatitis různé

etiologie s cholestatickým syndromem, reaktivní gastritidy při duodenogastrickém refluxu a k rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů), kyselina cholová (k léčbě vrozených poruch syntézy primárních žlučových kyselin jako tzv. orphan drug) a kyselina chenodeoxycholová (k léčbě vrozených poruch syntézy primárních žlučových kyselin jako tzv. orphan drug) (Public summary of opinion on orphan designation: Chenodeoxycholic acid for the treatment of inborn errors in primary bile acid synthesis 2015, Public summary of opinion on orphan designation: Cholic acid for the treatment of inborn errors in primary bile acid synthesis 2013, Souhrn údajů o přípravku Ursodeoxycholová kyselina Strides 2014, Souhrn údajů o přípravku Ursofalk 2014, Souhrn údajů o přípravku Ursosan 2014).

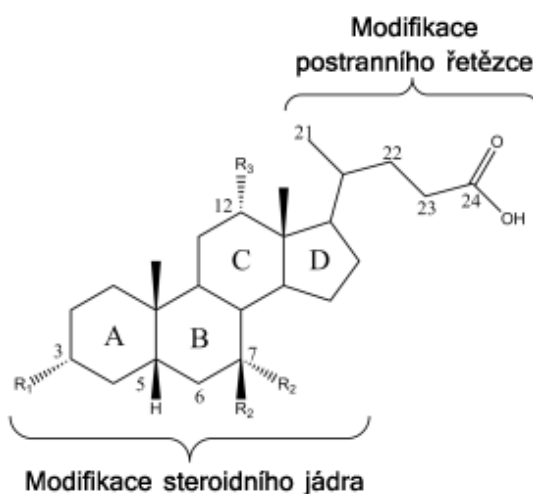
Nicméně klinické použití žlučových kyselin je částečně omezeno kvůli jejich nízké účinnosti a selektivitě, navíc jsou při systémovém podání metabolizovány, a pokud jsou podány ve vysokých koncentracích, mohou být toxické. Všechny tyto „nereceptorové“ vlastnosti dělají ze žlučových kyselin látky ne zcela ideální pro terapeutické použití, a proto byl započat výzkum derivátů žlučových kyselin, které by měly, jako léčiva, lepší vlastnosti (Sabbatini et al. 2013, Merk et al. 2012a, Merk a Schubert-Zsilavec 2012b).

Modifikované žlučové kyseliny

S využitím vztahu struktury a aktivity (SAR, z angl. structure-activity relationship) žlučových kyselin a LBD FXR byly v posledních letech navrženy a studovány polosyntetické a syntetické molekuly s cílem získat více selektivní a účinnější aktivátory FXR, než jsou endogenní žlučové kyseliny. Byly provedeny modifikace obecné struktury žlučových kyselin ve dvou hlavních typech: 1) modifikace steroidního jádra a 2) modifikace postranního řetězce (viz Obr. 20). Tyto studie ukázaly, že i drobné úpravy fyziologických žlučových kyselin, jejichž cílem je získat požadovanou biologickou aktivitu, mohou významně ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti, distribuci, metabolizaci a hlavně cytotoxické vlastnosti nových analogů žlučových kyselin. Jedná se zejména o přítomnost a/nebo odlišnou prostorovou orientaci hydroxylových skupin, modifikaci kruhu B steroidního jádra a postranního řetězce, které mohou vyvolat různé konformační uspořádání těchto analogů žlučových kyselin, výrazně pozměnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a následně ovlivnit schopnost aktivovat FXR (Merk et al. 2012a, Modica et al. 2010).

Z analogů žlučových kyselin, které jsou agonisty FXR, se jako lék v klinické praxi prozatím používá kyselina obeticholová (6-ECDCA, 6 α -ethyl-CDCA). První léčivý přípravek s kyselinou obeticholovou byl v Evropské Unii (včetně České republiky) zaregistrován v roce 2016 jako tzv. orphan drug, a to k léčbě primární biliární cholangitidy (označované též

primární biliární cirhóza) v kombinaci s kyselinou ursodeoxycholovou (UDCA) u dospělých pacientů s nedostatečnou odpovědí na UDCA, nebo jako monoterapie u dospělých pacientů, kteří netolerují léčbu UDCA. S kyselinou obeticholovou dále v současné době probíhá řada klinických studií pro léčbu primární sklerotizující cholangitidy, nealkoholické steatózy až steatofibrózy jater (NAFLD, z angl. nonalcoholic fatty liver disease), nealkoholické steatohepatitidy (NASH), alkoholické hepatitidy, průjmu při malabsorpci žlučových kyselin, familiární parciální lipodystrofie a dalších onemocnění. Rovněž kyselina norursodeoxycholová (se statusem tzv. orphan drug) byla testována v klinické studii pro léčbu primární sklerotizující cholangitidy (Public summary of opinion on orphan designation: Norursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis 2014, Public summary of opinion on orphan designation: Obeticholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis 2014, Public summary of opinion on orphan designation: 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis 2010, Sabbatini et al. 2013, Search of: norursodeoxycholic acid 2017, Search of: obeticholic acid 2017, Souhrn údajů o přípravku Ocaliva 2016).



Obr. 20 Modifikace obecné struktury žlučových kyselin. Modifikace žlučových kyselin se dělí na dva hlavní typy: 1) modifikace steroidního jádra, zejména na uhlících č. 3, 5, 6, 7 a 12; a 2) modifikace postranního řetězce, zejména na uhlících č. 21, 22, 23 a 24.

1) Modifikace steroidního jádra

Modifikace v poloze C-3

Za účelem stanovení efektu hydroxylové skupiny v poloze C-3 α u žlučových kyselin byla syntetizována 3-deoxy-CDCA (č. T6). Pellicciari et al. (2004) prokázali, že 3 α -hydroxylová skupina může být eliminována bez významné ztráty schopnosti aktivovat FXR oproti CDCA. Tento výsledek může být interpretován na základě krystalové struktury

LBD FXR v komplexu s 3-deoxy-CDCA, kdy bylo zjištěno, že 3-deoxy-CDCA se váže do ligand-vazebné kapsy stejným způsobem jako přirozené žlučové kyseliny, jen s tím rozdílem, že chybí vodíkové vazby mezi OH-skupinou na uhlíku C-3 a histidinovým zbytkem H444 helixu H10/11 i tyrozinovým zbytkem Y358 helixu H7 (viz Obr. 14). Ke stejnému závěru, tedy že 3 α -hydroxylová skupina není zodpovědná za aktivaci FXR, došli i Suzuki et al. (2008) při testování dvou analogů žlučových kyselin, které se od endogenních žlučových kyselin odlišovaly absencí 3 α -hydroxylové skupiny. Zajímavé je, že 3-deoxy-CA (č. T7) a 3-deoxy-LCA (č. T8) aktivovaly FXR na srovnatelné úrovni jako CDCA, tedy na úrovni vyšší než původní LCA a CA. Eliminace 3 α -hydroxylové skupiny, v tomto případě, zvýšila potenciál aktivovat FXR (Merk et al. 2012a, Mi et al. 2003, Pellicciari et al. 2004, Suzuki et al. 2008).

Pro další objasnění role orientace hydroxylové skupiny v pozici C-3 na aktivaci FXR, testovali Fujino et al. (2004) sérii syntetických 3 β - a/nebo 12 β - epimerů DCA (3 β ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ovou kyselinu, č. T9; 3 α ,12 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-ovou kyselinu, č. T10; 3 β ,12 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-ovou kyselinu, č. T11) a 3 β -epimer LCA (3 β -hydroxy-5 β -cholan-24-ovou kyselinu, č. T12). 3 β -orientace hydroxylové skupiny u DCA a LCA snížila jejich schopnost aktivovat FXR. Fujino et al. (2004) dále zavedli u CDCA do pozice C-3 α či C-3 β methylovou skupinu (3 α ,7 α -dihydroxy-3 β -methyl-5 β -cholan-24-ová kyselina, č. T13; 3 β ,7 α -dihydroxy-3 α -methyl-5 β -cholan-24-ová kyseliny, č. T14) a pozorovali, že zavedení methylu do polohy C-3 β zmenšuje účinek výrazně, zatímco do polohy C-3 α jen nepatrně ve srovnání s CDCA. Snížení potenciálu být ligandem FXR je přičítáno sterickému bránění v důsledku zavedení objemného ligandu, který snižuje vazebnou afinitu pro LBD FXR. Tudiž z těchto dat vyplývá, že 3 β -orientace hydroxylových skupin i alkylové substituenty v pozici C-3 β snižují schopnost aktivovat FXR. Dále Wang et al. (1999) studovali účinek na aktivaci FXR 7-oxo-LCA kyseliny (č. T15) a 3,7-dioxo-5 β -cholan-24-ové kyseliny (č. T16) a výsledky ukázaly, že keton v pozici C-3 je preferován před 3 α -hydroxylovou skupinou (Fujino et al. 2004, Wang et al. 1999).

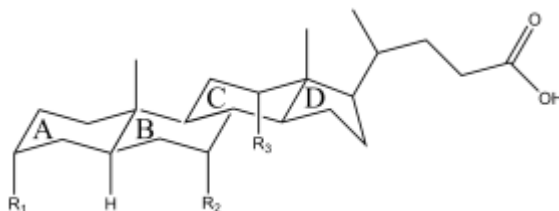
Tab. 2 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v poloze C-3 steroidního jádra na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/název	Chemická struktura
T6	3-deoxy-CDCA	7 α -hydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T7	3-deoxy-CA	7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T8	3-deoxy-LCA	5 β -cholan-24-ová kyselina

T9	-	3 β ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T10	-	3 α ,12 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T11	-	3 β ,12 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T12	-	3 β -hydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T13	-	3 α ,7 α -dihydroxy-3 β -methyl-5 β -cholan-24-ová kyselina
T14	-	3 β ,7 α -dihydroxy-3 α -methyl-5 β -cholan-24-ová kyseliny
T15	7-oxoLCA	7-oxo-3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T16	-	3,7-dioxo-5 β -cholan-24-ová kyselina

Modifikace v poloze C-5

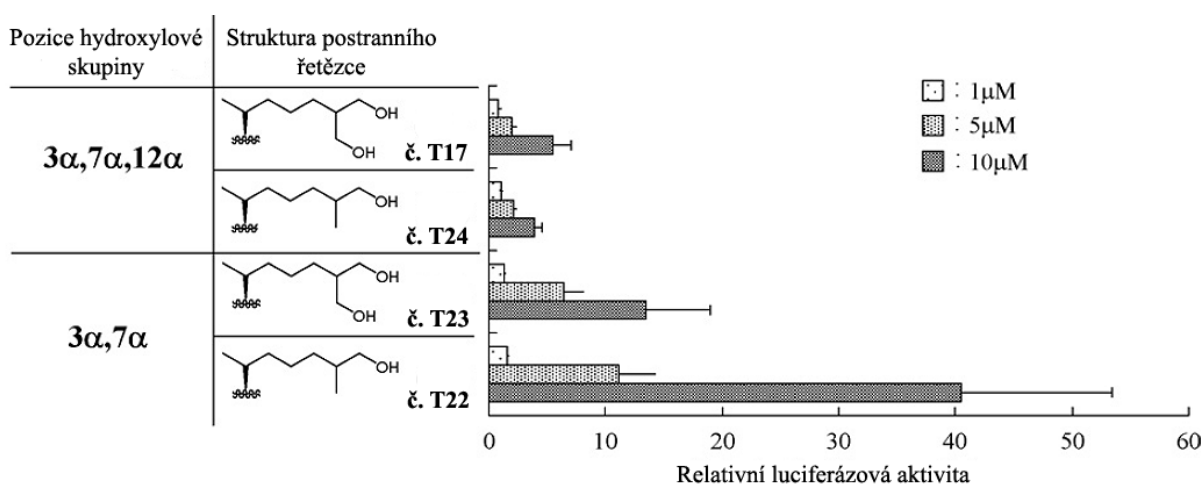
Některé práce vyzdvihly důležitost prostorové orientace vodíku v poloze C-5 a konfiguraci na spojení kruhů A/B (viz Obr. 21) pro schopnost žlučových kyselin aktivovat FXR. Ačkoli přirozeně se vyskytující žlučové kyseliny u člověka mají konfiguraci C-5 β , několik druhů ryb a žab produkuje 5 α -alkoholy žlučových kyselin obsahující *trans*-orientovaný kruh A. Nishimaki-Mogami et al. (2006) testovali alkoholy žlučových kyselin 5 α -cyprinol (č. T17), který byl izolován ze žluči asijského kapra *Cyprinus carpi*, 5 α -bufol (č. T18), který byl izolován ze žluči zástupců podtřídy dvojdyšných (*Dipnoi*), a jejich 5 β -epimery (č. T19, č. T20). Výsledky ukázaly, že 5 β -cyprinol a 5 β -bufol účinkují jako silní agonisté FXR, zatímco jejich 5 α -epimery 5 α -cyprinol a 5 α -bufol neaktivují FXR, nýbrž kompetitivně inhibují agonistou vyvolanou aktivaci FXR, jedná se tedy o FXR antagonisty. Tyto výsledky navrhují, že *cis*-orientace kruhu A dána konfigurací C-5 β je nezbytná pro aktivaci FXR. *Trans*-orientovaný kruh A u 5 α -alkoholů žlučových kyselin patrně destabilizuje agonistickou konformaci helixu 12, a tudíž nejspíše nedochází k interakci mezi koaktivátorovým peptidem a receptorem (Nishimaki-Mogami et al. 2006).



Obr. 21 Obecná chemická struktura modifikovaných žlučových kyselin s *cis*-spojením kruhů A/B. K *cis*-spojení kruhů A/B žlučových kyselin dochází díky atomu vodíku v α -konfiguraci na uhlíku č. 5. Modifikováno dle: Fiorucci et al. 2012.

V rozporu s výše uvedenými výsledky Iguchi et al. (2010) předkládají, že *cis*-orientace kruhu A žlučových kyselin (a jejich alkoholů) daná konfigurací C-5 β není nezbytná pro

aktivaci FXR. Tato vědecká skupina zkoumala vztah struktury a aktivity dvou 5 α - a 5 β -izomerů CDCA a 5 α -alkoholů žlučových kyselin. 5 α -izomer CDCA (č. T21) překvapivě vykazoval aktivaci FXR na podobné úrovni jako CDCA. Dva 5 α -alkoholy odvozené od CDCA (s hydroxylovými skupinami v polohách C-3 α a C-7 α), tedy látka č. T22 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26-triol) a sloučenina č. T23 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol) vykazovaly srovnatelnou FXR agonistickou aktivitu, jako jejich příslušné 5 β -izomery (viz Obr. 22). Naproti tomu dva 5 α -alkoholy žlučových kyselin analogické k CA (s hydroxylovými skupinami v polohách C-3 α , C-7 α a C-12 α), tedy látka č. T24 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol) a 5 α -cyprinol (č. T17) nebyly schopné výrazně aktivovat FXR (Iguchi et al. 2010).



Obr. 22 Konfigurace C-5 β není nezbytná pro aktivaci FXR a nepřítomnost hydroxylové skupiny v poloze C-12 α nesnižuje schopnost aktivovat FXR. Aktivace farnesoidního X receptoru (FXR) byla hodnocena luciferázovou reportérovou assay, za použití Huh-7 buněk, které byly transfekovány expresními plasmidy kódujícími FXR, RXR α a reportérovým plasmidem nesoucím gen pro luciferázu. 5 α -alkoholy žlučových kyselin, tedy látky č. T17 (5 α -cyprinol), č. T22 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26-triol), č. T23 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol) a č. T24 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol) byly testovány v koncentracích 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M. Tyto látky se navzájem odlišují strukturou postranního řetězce a přítomností hydroxylové skupiny v pozici C-12 α . Výsledky naznačují, že konfigurace C-5 β není nezbytná pro aktivaci FXR a nepřítomnost hydroxylové skupiny v poloze C-12 α nesnižuje schopnost aktivovat FXR. Modifikováno dle: Iguchi et al. 2010.

Iguchi et al. (2010) tyto zdánlivě nekonzistentní výsledky u 5 α - (A/B *trans*) alkoholů žlučových kyselin na aktivaci FXR vysvětlují odlišným počtem hydroxylových skupin. Ligand-vazebná kapsa FXR neobsahuje žádné polární postranní řetězce, které by mohly vázat C-12 α hydroxylovou skupinu, a proto je vazba 5 α -alkoholů žlučových kyselin s C-3 α -, C-7 α - a C-12 α -OH energeticky náročnější (analogicky k úrovni aktivace FXR prostřednictvím CA) než vazba 5 α -alkoholů žlučových kyselin pouze s C-3 α - a C-7 α -OH (analogicky k úrovni

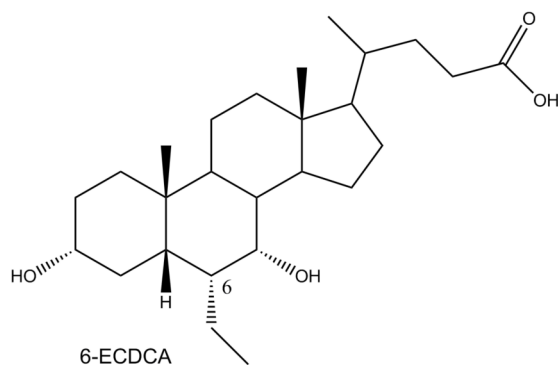
aktivace FXR prostřednictvím CDCA). Pro úplné objasnění této problematiky bude potřeba dalšího testování (Iguchi et al. 2010).

Tab. 3 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v poloze C-5 steroidního jádra na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/název	Chemická struktura
T17	5 α -cyprinol	5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol
T18	5 α -bufol	5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,25,26-pentol
T19	5 β -epimer 5 α -cyprinolu	5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol
T20	5 β -epimer 5 α -bufolu	5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,25,26-pentol
T21	5 α -izomer CDCA	3 α ,7 α -dihydroxy-5 α -cholan-24-ová kyselina
T22	-	5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26-triol
T23	-	5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol
T24	-	5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol

Modifikace v poloze C-6

Modifikace na kruhu B steroidního jádra významně ovlivňuje schopnost aktivovat FXR, nejvíce klíčová je pozice C-6 α . Přišli na to Pellicciari et al. (2002) díky objevení vysoké účinnosti 6-ECDCa (6 α -ethyl-CDCA, kyselina obeticholová, č. T25) (viz Obr. 23). FXR agonistický účinek srovnatelný s účinkem kyseliny obeticholové pozorovala vědecká skupina Sepe et al. (2016) jak u jejího 3 β -izomeru (látka č. T26), tak u sloučeniny odvozené od 6-ECDCa, které hydroxylová skupina v poloze C-3 zcela chybí (látka č. T27). Pellicciari et al. (2002) testovali sérii analogů CDCA, které jsou charakterizovány vzestupně objemnými 6 α -substituenty: 6 α -methyl-CDCA (látka č. T28), sloučenina s malým lineárním alkylovým postranním řetězcem, vykazovala vyšší účinnost v aktivaci FXR než CDCA. Ukázalo se, že 6-ECDCa je doposud nejvíce účinným steroidním agonistou FXR, tato látka je mnohem více účinná (EC₅₀ = 99 nM) než CDCA. Dobrou účinnost vykazovala také 6 α -propyl-CDCA (látka č. T29), zatímco 6 α -benzyl-CDCA (látka č. T30) byla v podstatě inaktivní (Merk et al. 2012a, Pellicciari et al. 2002, Sepe et al. 2016).



Obr. 23 Chemická struktura kyseliny obeticholové. Kyselina obeticholová (6-ECDCA, 6 α -ethyl-chenodeoxycholová kyselina) je odvozena od chenodeoxycholové kyseliny zavedením ethylu do polohy C-6 α . 6-ECDCA je nejvíce účinným steroidním agonistou FXR (farnesoidní X receptor).

Studie série 6 α -substituovaných derivátů CDCA umožnila navíc popsat klíčový vztah struktury a účinku. Přírozeně se vyskytující žlučové kyseliny nezaplní ligand-vazebnou kapsu FXR svými substituenty zcela úplně, neboť v ligand-vazebné kapse existuje oddělená hydrofóbní kavita, jejíž velikost je vhodná zejména pro malé lineární alkylové substituenty. Pellicciari et al. (2002) ukazují na semisyntetické kyselině 6-ethyl-chenodeoxycholové, že 6 α -ethyllová skupina je v kapse umístěna v hydrofobní kavitě, která existuje mezi aminokyselinovými zbytky I359 (isoleucinový zbytek) a F363 (fenylalaninový zbytek) (viz Obr. 14), či dle Huang et al. (2010) i mezi tyrozinovým zbytkem Y366 a methioninovým zbytkem M362 (viz Obr. 13), což se projeví vyšší afinitou k receptoru. Naopak methylová nebo objemnější skupina (např. benzylová) v této C-6 α poloze má, oproti ethylové skupině, účinnost nižší. Důvodem je fakt, že menší methylová skupina nevyplní hydrofobní kavitu tak dobře, jako větší ethylová skupina. Výsledná ztráta vazebné energie prostřednictvím snížení kontaktní plochy má za následek ztrátu účinnosti. Objemnější substituenty jsou také nepříznivé, neboť van der Waalovy síly se překrývají, což vede ke vzniku významných odpudivých sil v ligand-vazebné kapse FXR (Constantino et al. 2003, Downes et al. 2003, Huang et al. 2010, Mi et al. 2003, Modica et al. 2010, Pellicciari et al. 2002).

Výše uvedené výsledky byly podnětem pro vědeckou skupinu Pellicciari et al. (2004) k syntéze a výzkumu dalších C-6 α substituovaných CDCA analogů. Ačkoli žádný z dalších testovaných derivátů CDCA nebyl více účinný než 6-ECDCA, prospěšný efekt substituce byl pozorován při zavedení malých lineárních alkylových 6 α -skupin (6 α -allyl-CDCA, látka č. T31; 6 α -(2'-hydroxyethyl)-CDCA, látka č. T32 a 6 α -propargyl-CDCA, č. T33), které vykazovaly vysokou účinnost. Tyto výsledky jsou v souladu s výše popsány fyzikálně-chemickými vlastnostmi ligand-vazebné kapsy. Dále se jednalo o více hydrofilní substituenty,

jako je hydroxy- (6 α -hydroxy-CDCA, č. T34) nebo methoxy- (6 α -methoxy-CDCA, č. T35) skupina, které výrazně redukovaly aktivační efekt. Více polární skupiny a substituenty se schopností tvořit vodíkové můstky mají negativní vliv na účinnost, což je v souladu s velmi hydrofóbní povahou ligand-vazebné kapsy v místě komplementárním k 6 α -pozici. Zajímavé je, že vložení atomu fluoru na pozici 6 (6 α -FCDCA, č. T36 a 6 β -FCDCA č. T37) mělo střední efekt na aktivaci FXR. Fluor byl považován za potenciálně užitečný kvůli své malé velikosti, relativní lipofilitě, hydrofóbní/hydrofilní rovnováze a přiměřené schopnosti vystupovat jako vodíkový akceptor (Pellicciari et al., 2004).

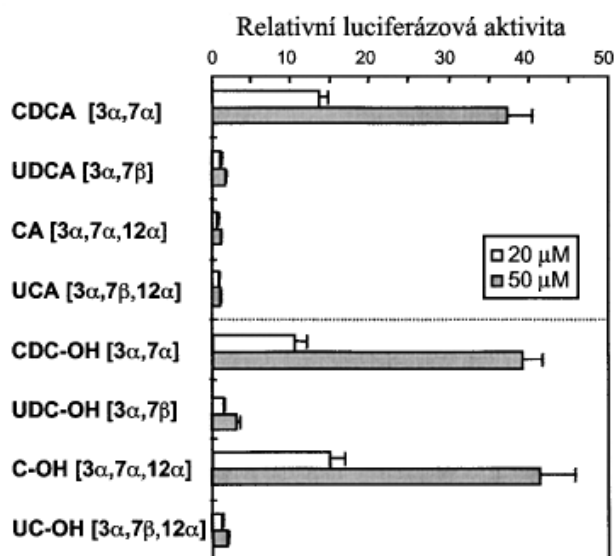
Tab. 4 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v poloze C-6 steroidního jádra na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/název	Chemická struktura
T25	6-ECDCA/ obeticholová kyselina	6 α -ethyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T26	3 β -izomer 6-ECDCA	6 α -ethyl-3 β ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T27	-	6 α -ethyl-7 α -hydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T28	6 α -methyl-CDCA	6 α -methyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T29	6 α -propyl-CDCA	6 α -propyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T30	6 α -benzyl-CDCA	6 α -benzyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T31	6 α -allyl-CDCA	6 α -allyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T32	6 α -(2'-hydroxyethyl)- CDCA	6 α -(2'-hydroxyethyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T33	6 α -propargyl-CDCA	6 α -propargyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T34	6 α -hydroxy-CDCA	3 α ,6 α ,7 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T35	6 α -methoxy-CDCA	3 α ,7 α -dihydroxy-6 α -methoxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T36	6 α -FCDCA	6 α -fluor-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T37	6 β -FCDCA	6 β -fluor-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina

Modifikace v poloze C-7

Pro objasnění vlivu orientace hydroxylové skupiny v poloze C-7 na potenciál vystupovat jako ligand FXR testovali Fujino et al. (2004) polosyntetické alkoholy žlučových kyselin a jejich příslušné 7 β -epimery: alkohol odvozený od CDCA (CDC-OH, č. T38) a jeho 7 β -epimer alkohol odvozený od UDCA (UDC-OH, č. T39); alkohol odvozený od CA (C-OH, č. T40) a jeho 7 β -epimer alkohol odvozený od kyseliny ursocholové (UCA, z angl. ursocholic

acid), tedy UC-OH (č. T41). CDC-OH je účinným aktivátorem FXR (stejně jako původní CDCA), zatímco jeho 7 β -epimer UDC-OH vykazoval velmi nízkou aktivitu (stejně jako původní UDCA) (viz Obr. 24). C-OH silně aktivoval FXR (narozdíl od původní CA), zatímco jeho 7 β -epimer UC-OH byl inaktivní (stejně jako původní UCA). Tato pozorování jasně ukazují, že žlučové kyseliny a jejich alkoholy s 7 β -hydroxylovým substituentem neaktivují FXR. Stereochemie hydroxylové skupiny na pozici C-7 je tedy rozhodující pro aktivaci FXR, její orientace v poloze β snižuje účinnost (Fujino et al. 2004).



Obr. 24 Hydroxylová skupina v poloze C-7 β snižuje schopnost aktivovat FXR. Aktivace farnesoidního X receptoru (FXR) byla hodnocena luciferázovou reportérovou assay, za použití CV-1 buněk, které byly transfekovány expresními plasmidy kódujícími FXR, RXR α a reportérovým plasmidem nesoucím gen pro luciferázu. Alkoholy žlučových kyselin lišící se od svých příslušných žlučových kyselin hydroxylovou skupinou v poloze C-7 β , tedy alkohol odvozený od CDCA (CDC-OH, 5 β -cholan-3 α ,7 α ,24-triol, č. T38), alkohol odvozený od UDCA (UDC-OH, 5 β -cholan-3 α ,7 β ,24-triol, č. T39), alkohol odvozený od CA (C-OH, 5 β -cholan-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol, č. T40) a alkohol odvozený od UCA (UC-OH, 5 β -cholan-3 α ,7 β ,12 α ,24-tetrol, č. T41), byly testovány v koncentracích 20 μ M a 50 μ M. Pro srovnání je zobrazena úroveň aktivace FXR původními žlučovými kyselinami, tedy kyseliny chenodeoxycholové (CDCA), ursodeoxycholové (UDCA), cholové (CA) aursocholové (UCA), které byly testovány ve stejných koncentracích. Výsledky naznačují, že hydroxylová skupina v poloze C-7 β snižuje schopnost aktivovat FXR. Modifikováno dle: Fujino et al. 2004.

Fujino et al. (2004) dále testovali, zda zavedení postranního alkylového řetězce do polohy C-7 β CDCA ovlivní její schopnost aktivovat FXR. Zavedení methylové skupiny do pozice C-7 β CDCA (7 β -methyl-CDCA, č. T42) snižuje její schopnost aktivovat FXR o 65–80 %. Přítomnost větších substituentů, tedy ethylové (7 β -ethyl-CDCA, č. T43) nebo propylové (7 β -propyl-CDCA, č. T44) skupiny ještě více redukuje její aktivitu (v případě ethylové skupiny na 5–20 % a v případě propylové skupiny na 10–20 % aktivace CDCA).

Tato data tudíž jasně říkají, že nepolární alkylové substituenty v pozici C-7 β CDCA snižují schopnost aktivovat FXR. To je přičítáno sterickému bránění alkylového substituentu (stejně jako u UCDA), kdy se formuje více otevřená ligand-vazebná kapsa, což ústí v parciální inhibici spojení s koaktivátorem. Zajímavé je, že tento efekt alkylových substituentů v poloze C-7 β je v kontrastu s ethylovou substitucí v pozici C-6 α CDCA, která vede k velkému zvýšení aktivace FXR. Následující pořadí ukazuje klesající pozitivní vliv alkylových substituentů v poloze C-7 β na aktivaci FXR: 7 β -methyl > 7 β -ethyl = 7 β -propyl (Fujino et al. 2004).

Naproti tomu substituce methylem v pozici C-7 α UDCA (7 α -methyl-UDCA, č. T45) neovlivňuje její aktivitu. Je pravděpodobné, že methylová skupina na pozici C-7 α není schopna zvyšovat afinitu k FXR, nicméně alternativním vysvětlením je, že snížení afinity způsobené sterickým bráněním 7 β -hydroxylové skupiny UDCA je příliš velké na to, aby byl identifikován pozitivní efekt 7 α -methylové skupiny na aktivaci FXR (Fujino et al. 2004).

Wang et al. (1999) nahradili u LCA 7 α -hydroxylovou skupinu oxoskupinou (7-oxo-LCA, č. T15) a pozorovali úroveň aktivace mezi CDCA a UDCA. Na základě těchto dat navrhuje, že pozitivní vliv substituentů na aktivaci FXR v poloze C-7 klesá v tomto pořadí: 7 α -hydroxy > 7-oxo > 7 β -hydroxy (Wang et al. 1999).

Tab. 5 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v poloze C-7 steroidního jádra na aktivaci FXR.

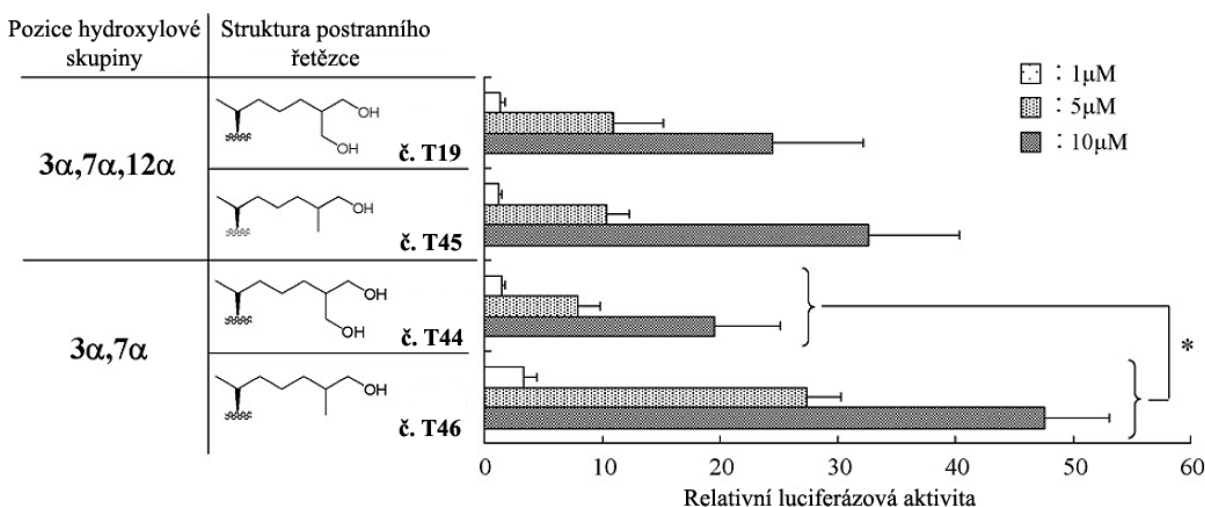
Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T38	CDC-OH	5 β -cholan-3 α ,7 α ,24-triol
T39	UDC-OH	5 β -cholan-3 α ,7 β ,24-triol
T40	C-OH	5 β -cholan-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol
T41	UC-OH	5 β -cholan-3 α ,7 β ,12 α ,24-tetrol
T42	7 β -methyl-CDCA	7 β -methyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T43	7 β -ethyl-CDCA	7 β -ethyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T44	7 β -propyl-CDCA	7 β -propyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T45	7 α -methyl-UDCA	7 α -methyl-3 α ,7 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina

Modifikace v poloze C-12

Fujino et al. (2004) testovali pro objasnění role orientace OH- skupiny v pozici C-12 na aktivaci FXR dva 12 β - a 3 β ,12 β - epimery DCA (tedy látky č. T10 a č. T11). Oba epimery

vykazovaly aktivitu méně než poloviční oproti DCA. 12 β -orientace hydroxylové skupiny snižuje schopnost ligandu aktivovat FXR (Fujino et al. 2004).

Iguchi et al. (2010) dále studovali, jak aktivaci FXR ovlivní odebrání hydroxylové skupiny z polohy C-12. Za tímto účelem testovali sérií alkoholů žlučových kyselin: ze žluče kapra izolovaný 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol (č. T19) a jeho analog bez 12 α -OH skupiny (č. T46); polosyntetický 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol (č. T47) a jeho analog bez 12 α -OH skupiny (č. T48). Jak je znázorněno na obrázku 25, dva alkoholy žlučových kyselin bez 12 α -hydroxylové skupiny, tedy látky č. T46 a č. T48, jsou schopny aktivovat FXR, a to přibližně na úrovni jako CDCA (Iguchi et al. 2010).



Obr. 25 Nepřítomnost hydroxylové skupiny v poloze C-12 α nesnižuje schopnost aktivovat FXR. Aktivace farnesoidního X receptoru (FXR) byla hodnocena luciferázovou reportérovou assay, za použití Huh-7 buněk, které byly transfekovány expresními plasmidy kódujícími FXR, RXR α a reportérovým plasmidem nesoucím gen pro luciferázu. Alkoholy žlučových kyselin, tedy látky č. T19 (5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol), č. T46 (5 β -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol), č. T47 (5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol) a č. T48 (5 β -cholestan-3 α ,7 α ,26-triol), byly testovány v koncentracích 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M. Tyto látky se navzájem odlišují odlišující strukturou postranního řetězce a přítomností hydroxylové skupiny v pozici C-12 α . Výsledky naznačují, že nepřítomnost hydroxylové skupiny v poloze C-12 α nesnižuje schopnost aktivovat FXR. Statistická významnost na úrovni $p < 0,05$ je vyznačena *. Modifikováno dle: Iguchi et al. 2010.

Obdobné výsledky byly skupinou Iguchi et al. (2010) pozorovány i při porovnání aktivace FXR u 5 α -alkoholů žlučových kyselin analogických k CA (s hydroxylovými skupinami v polohách C-3 α , C-7 α a C-12 α), tedy u látky č. T24 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol) a 5 α -cyprinolu (č. T17, 5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol), oproti jejich analogům bez 12 α -OH skupiny, tedy látky č. T22 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26-triol) a sloučeniny č. T23 (5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol). Jak je zobrazeno na obrázku 22, dva 5 α -alkoholy odvozené od CDCA žlučových kyselin bez 12 α -hydroxylové skupiny, tedy látky č. T23 a č. T22,

vykazovaly FXR agonistickou aktivitu, zatímco jejich analogy s 12 α -hydroxylovou skupinou, tedy látky č. T17 a č. T24, byly inaktivní. Z těchto výsledků je možné usoudit, že odebráním 12 α -hydroxylové skupiny nedochází ke snížení agonistické aktivity. Pro úplné objasnění této problematiky bude potřeba dalšího testování (Iguchi et al. 2010).

Suzuki et al. (2008) testovali látku NIHS700 (12-hydroxyimino-5 β -cholan-3 α ,24-diol, č. T49) se steroidním základem, jejíž struktura se odlišuje od LCA substituenty na pozicích C-12 a C-24. Sloučenina NIHS700 aktivovala FXR srovnatelně jako CDCA (Suzuki et al. 2008).

Tab. 6 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v poloze C-12 steroidního jádra na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T46	-	5 β -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol
T47	-	5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol
T48	-	5 β -cholestan-3 α ,7 α ,26-triol
T49	NIHS700	12-hydroxyimino-5 β -cholan-3 α ,24-diol

2) Modifikace postranního řetězce

Na cestě studia nových látek s FXR-agonistickou aktivitou byly hodnoceny i **alkoholy žlučových kyselin**. Alkoholy žlučových kyselin jsou meziproducty v dráze syntézy žlučových kyselin u savců a také představují terminální produkty katabolismu cholesterolu u většiny evolučně primitivních obratlovců (Iguchi et al. 2010, Nishimaki-Mogami et al. 2006).

Vědecká skupina Fujino et al. (2004) studovala alkoholy odvozené od žlučových kyselin CDCA, CA, UDCA a UCA, u nichž se zabývala vlivem konverze karboxylové skupiny v poloze C-24 na skupinu hydroxylovou na schopnost aktivovat FXR. Alkohol žlučové kyseliny CDCA (CDC-OH, č. T38) vykazoval aktivitu srovnatelnou s CDCA (viz Obr. 24), zajímavé ale je, že ačkoli CA byla inaktivní, alkohol od ní odvozený (C-OH, č. T40) efektivně aktivoval FXR. Alkoholy odvozené od UDCA (UDC-OH, č. T39) a od UCA (UC-OH, č. T41) byly při aktivaci FXR inaktivní, stejně jako příslušné žlučové kyseliny. Stejný efekt pozorovali u CDC-OH a C-OH i Iguchi et al. (2010). Tyto výsledky ukázaly, že alkoholy žlučových kyselin odvozené od žlučových kyselin konverzí karboxylové skupiny na alkoholovou vykazují vlastnosti ligandů FXR v míře srovnatelné s původními příslušnými žlučovými kyselinami. Touto konverzí není výrazně ovlivněna vazebná afinita k FXR, která

je zachována díky vodíkovým vazbám mezi alkoholovým kyslíkem ligandu na C-24 a argininovým zbytkem R328 ligand-vazebné kapsy. Negativní náboj v postranním řetězci žlučových kyselin tedy není nezbytný pro FXR agonistickou aktivitu. Konverze karboxylové skupiny na alkoholovou usnadňuje transport látky do buňky (Fujino et al. 2004, Iguchi et al. 2010).

Vliv modifikací karboxylové skupiny byl dále studován vědeckou skupinou Suzuki et al. (2008), která u methylesterů kyseliny cholové (MeCA, č. T50) a deoxycholové (MeDCA, č. T51) pozorovala schopnost aktivace FXR na úrovni CDCA. Karboxylová skupina není tedy pro aktivaci FXR nezbytná, a jen drobná modifikace struktury žlučových kyselin může způsobit odlišnou regulaci FXR (Suzuki et al. 2008).

Tab. 7 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v postranním řetězci (esterifikace karboxylové skupiny) na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T50	MeCA	methylester kyseliny 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-ové
T51	MeDCA	methylester kyseliny 3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ové

Předchozí objevy vedly ke zkoumání vztahu struktury a aktivity celé řady žlučových kyselin a alkoholů strukturně podobných žlučovým kyselinám, které byly modifikovány prodloužením či zkrácením postranního řetězce a zavedením různého počtu hydroxylových skupin do rozmanitých poloh postranního řetězce. Iguchi et al. (2010) potvrdili, že sterol bez hydroxylové skupiny v postranním řetězci 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α -triol (č. T52), který je meziproduktem v biosyntetické dráze žlučových kyselin, nemá žádnou FXR agonistickou aktivitu, zatímco 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol (č. T47), který je produktem hydroxylace na terminální methylové skupině sloučeniny č. T52, je potenciálním ligandem pro FXR. Tyto výsledky navrhují, že přítomnost hydroxylové skupiny (nebo atomu kyslíku) v postranním řetězci je nezbytná pro FXR agonistickou aktivitu (Iguchi et al. 2010).

Dále byl studován efekt pozice a konfigurace hydroxylové skupiny v postranním řetězci na schopnost aktivovat FXR. Tyto modifikace postranního řetězce vedly k zajímavým rozdílům ve výsledcích. Pellicciari et al. (2004) testovali funkci polohy C-22: zavedením hydroxylové skupiny do pozice 22*S*- u CDCA vznikla látka č. T53, která pozoruhodně vykazovala třikrát nižší aktivitu než CDCA. Obdobné výsledky pozorovala i vědecká skupina Iguchi et al. (2010), která testovala sérii osmi alkoholů žlučových kyselin, u nichž byl postranní řetězec prodloužen na 27 uhlíků. Zavedením OH- skupiny do polohy C-22 vznikly

dva stereoizomery: 22*R*- (látka č. T54) a 22*S*- (látka č. T55). Izomer 22*S*- aktivoval FXR na nižší úrovni než CDCA, zatímco jeho protějšek 22*R*- vykazoval FXR agonistickou aktivitu srovnatelnou s CDCA. Substituce hydroxylovou skupinou v poloze C-22 značně ovlivňuje FXR agonistickou aktivitu, neboť zde hraje roli sterické bránění okolo pozice C-22. Pellicciari et al. (2004) substituovali polohu C-23 u CDCA hydroxylovou skupinou za vzniku dvou enantiomerů: 23*R*- (látka č. T56) a 23*S*- (látka č. T57). Obě tyto látky vykazovaly jen minimální pokles aktivity oproti CDCA. Tyto výsledky jsou konzistentní s pozorováním skupiny Iguchi et al. (2010), která zavedením OH- skupiny do polohy C-23 alkoholu žlučové kyseliny s 27 uhlíky získala dvojici stereoizomerů: izomery 23*S*- (látka č. T58) a 23*R*- (látka č. T59). Oba tyto izomery aktivovaly FXR ve srovnatelné míře jako CDCA. Zavedení OH- skupiny do polohy C-23 nemá vliv na schopnost aktivovat FXR. Iguchi et al. (2010) dále zavedli OH- skupinu do polohy C-24, čímž vznikla dvojice stereoizomerů: izomery 24*S*- (látka č. T60) a 24*R*- (látka č. T61). Obě tyto sloučeniny aktivovaly FXR ve srovnatelné míře jako CDCA. Sepe et al. (2016) testovali sloučeniny odvozené od 6-ECDCa (látky č. T62 a č. T63), kterým byla mj. zavedena hydroxylová skupina do polohy C-24. Obě tyto látky vykazovaly silnou aktivaci FXR. Zavedením OH- skupiny do polohy C-25 či C-26 vznikly látky č. T64 a č. T47, které aktivovaly FXR ve srovnatelné míře jako CDCA. Výsledky těchto studií ukazují, že substituce OH- skupinou v polohách C-24, C-25 a C-26 nemá vliv na schopnost aktivovat FXR (Iguchi et al. 2010, Pellicciari et al. 2004, Sepe et al. 2016).

Tab. 8 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v postranním řetězci (přítomnost, pozice a konfigurace hydroxylové skupiny) na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T52	-	5β-cholestan-3α,7α,12α-triol
T53	-	(22 <i>S</i>)-3α,7α,22-trihydroxy-5β-cholan-24-ová kyselina
T54	-	(22 <i>R</i>)-5β-cholestan-3α,7α,12α,22-tetrol
T55	-	(22 <i>S</i>)-5β-cholestan-3α,7α,12α,22-tetrol
T56	-	(23 <i>R</i>)-3α,7α,23-trihydroxy-5β-cholan-24-ová kyselina
T57	-	(23 <i>S</i>)-3α,7α,23-trihydroxy-5β-cholan-24-ová kyselina
T58	-	(23 <i>S</i>)-5β-cholestan-3α,7α,12α,23-tetrol
T59	-	(23 <i>R</i>)-5β-cholestan-3α,7α,12α,23-tetrol
T60	-	(24 <i>S</i>)-5β-cholestan-3α,7α,12α,24-tetrol
T61	-	(24 <i>R</i>)-5β-cholestan-3α,7α,12α,24-tetrol

T62	-	6 α -ethyl-5 β -cholan-7 α ,24-diol
T63	-	6 α -ethyl-5 β -cholan-3 β ,7 α ,24-triol
T64	-	5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,25-tetrol

Dále byl u žlučových kyselin zkoumán vliv přítomnosti jiných než hydroxylových skupin v polohách C-22 a C-23 na aktivaci FXR. Pellicciari et al. (2004) zavedli do pozice C-23 CDCA methylovou skupinu za vzniku látky č. T65. Tato látka vykazovala jen minimální pokles aktivity oproti CDCA. Studován byl vliv cyklopropanace v pozicích C-22 a C-23 CDCA, kdy takto vznikly čtyři diastereoizomery (látky č. T66, T67, T68 a T69). Dva *cis* izomery (č. T66 a T67) zcela postrádaly jakoukoliv aktivitu, zatímco jejich dva *trans* izomery (č. T68 a T69) byly schopny aktivovat FXR. Odlišné výsledky vysvětluje sterické bránění okolo pozice C-22 v postranním řetězci. Tato data jasně ukazují konformační preferenci modifikací postranního řetězce žlučových kyselin při interakci s FXR receptorem (Pellicciari et al. 2004).

Tab. 9 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v postranním řetězci (přítomnost jiných než hydroxylových skupin) na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T65	-	23-methyl-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T66	-	(22 <i>S</i> ,23 <i>S</i>)-methylen-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T67	-	(22 <i>R</i> ,23 <i>R</i>)-methylen-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T68	-	(22 <i>S</i> ,23 <i>R</i>)-methylen-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina
T69	-	(22 <i>R</i> ,23 <i>S</i>)-methylen-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina

Dále byly skupinou Iguchi et al. (2010) syntetizovány alkoholy žlučových kyselin s hydroxylovou skupinou na terminální methylové skupině, které měly odlišnou délku postranního řetězce. Jedná se o látky č. T70 s 23 uhlíky, č. T71 s 24 uhlíky, č. T72 s 25 uhlíky a č. T73 s 26 uhlíky. Zkracování postranního řetězce vedlo ke klesající schopnosti aktivovat FXR, sloučenina č. T70, která je nejnižším homologem v této řadě, vykazovala pouze slabou aktivaci FXR. FXR agonistická aktivita žlučových kyselin a jejich alkoholů klesá spolu se zkracující se délkou postranního řetězce. Tyto výsledky jsou konzistentní s předchozími pozorováními vědecké skupiny Pellicciari et al. (2004), které ukázaly, že C22-žlučová kyselina (22,23-dinor-CDCA, č. T74) mající kratší postranní řetězec než C24-žlučové kyseliny nevykazovala FXR vazebnou aktivitu. OH-skupina alkoholu nebo karboxylu

v postranním řetězci žlučových kyselin tvoří vodíkovou vazbu s argininovým zbytkem R328 ligand-vazebné kapsy a tato vazba stabilizuje interakci mezi FXR a jeho ligandem. Pro formování této vodíkové vazby je potřebná přítomnost atomu kyslíku ve vhodné vzdálenosti od jádra. Tímto je vysvětlen fakt, proč C-22 žlučové kyseliny či alkoholy žlučových kyselin s kratším postranním řetězcem nemohou interagovat se zbytkem R328 LBD FXR (Iguchi et al. 2010, Pellicciari et al. 2004).

Tab. 10 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v postranním řetězci (odlišná délka postranního řetězce) na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T70	-	24-nor-5 β -cholan-3 α ,7 α ,12 α ,23-tetrol
T71	-	5 β -cholan-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol
T72	-	26,27-dinor-5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,25-tetrol
T73	-	27-nor-5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol
T74	22,23-dinor-CDCA	22,23-dinor-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina

Rovněž byl studován efekt počtu hydroxylových skupin v postranním řetězci na aktivaci FXR. Za tímto účelem Iguchi et al. (2010) testovali sérii alkoholů žlučových kyselin (viz Obr. 25): ze žluče kapra izolovaný alkohol se dvěma OH- skupinami v postranním řetězci 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol (č. T19) a jeho analog bez OH- skupiny v poloze C-27 (č. T47); alkohol se dvěma OH- skupinami v postranním řetězci 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol (č. T46) a jeho analog bez OH- skupiny v poloze C-27 (č. T48). Dále se jednalo o sérii 5 α -alkoholů žlučových kyselin (viz Obr. 22): alkohol se dvěma OH- skupinami v postranním řetězci 5 α -cholestan-3 α ,7 α ,12 α ,26,27-pentol (5 α -cyprinol, č. T17) a jeho analog bez OH- skupiny v poloze C-27 (č. T24); alkohol se dvěma OH- skupinami v postranním řetězci 5 α -cholestan-3 α ,7 α ,26,27-tetrol (č. T23) a jeho analog bez OH- skupiny v poloze C-27 (č. T22). Výsledky testů poukazují na skutečnost, že zvýšení počtu hydroxylových skupin v postranním řetězci vede k poklesu FXR agonistické aktivity. Nicméně u alkoholů se dvěma OH- skupinami v postranním řetězci 5 α -cyprinolu (č. T17) a 5 α -bufolu (č. T18) prokázali Nishimaki-Mogami et al. (2006) FXR antagonistickou aktivitu, zatímco výsledky s jejich 5 β -epimery (č. T19, č. T20) ukázaly, že 5 β -cyprinol a 5 β -bufol účinkují jako silní agonisté FXR. Pro úplné objasnění vztahu struktury a aktivity alkoholů žlučových kyselin s vyšším počtem OH- skupin v postranním řetězci bude potřeba dalšího testování (Iguchi et al. 2010, Nishimaki-Mogami et al. 2006).

V rámci snahy objevit nové účinné a selektivní ligandy FXR receptoru byla provedena analýza efektu po nahrazení 24-karboxylové skupiny strukturně odlišnou skupinou na aktivaci FXR. Přesná role koncové karboxylové skupiny žlučových kyselin byla testována na sloučeninách, u kterých byly do pozice C-23 či C-24 zavedeny skupiny s odlišnými elektrostatickými a stericnými vlastnostmi, schopnostmi vázat vodík a s různými pKa profily. Jedná se o sulfátovou a sulfonátovou skupinu, aminoskupinu, ethylkarbamátovou skupinu, oxazolidin-3,5-dion, cinnamylkarbamátovou skupinu a benzylketon. Při studiu jiných kyselých skupin než karboxylových testovali Fujino et al. (2003) syntetickou sloučeninu CDC-sulfonát (látka č. T75) vzniklou zavedením sulfonátové skupiny na místo 24-karboxylové skupiny u CDCA. Bylo zjištěno, že CDC-sulfonát je ligandem FXR s mírou odpovědi srovnatelnou s CDCA. Tyto výsledky později potvrdili Pellicciari et al. (2004). Ti dále testovali látku CDC-sulfát (látka č. T76) vzniklou zavedením sulfátové skupiny na místo 24-karboxylové skupiny u CDCA. CDC-sulfát aktivoval FXR v menší míře, a vykazoval tedy parciálně agonistické vlastnosti. Skupina Rizzo et al. (2010) testovala sloučeninu INT-767 (látka č. T77), která je 23-sulfátovým derivátem 6-ECDC. INT-767 vykazovala mírně vyšší účinnost na FXR aktivaci, než 6-ECDC a CDCA. 24-sulfátový derivát 6-ECDC (látka č. T78) také popsali Sepe et al. (2016). Tato látka vykazovala srovnatelnou aktivaci FXR jako 6-ECDC i jako příslušná karboxylová kyselina (Fujino et al. 2003, Pellicciari et al. 2004, Rizzo et al. 2010, Sepe et al. 2016).

Dále byly syntetizovány látky obsahující aminoskupinu v postranním řetězci, které byly následně hodnoceny pro svou schopnost aktivovat FXR. Pellicciari et al. (2004) substitucí distální karboxylové skupiny aminoskupinou vytvořili derivát (látka č. T79), který byl překvapivě stejně účinný jako CDCA. Substitute karboxylátu aminoskupinou totiž výrazně ovlivňuje jak elektrostatický profil, tak i donor/akceptorové vlastnosti molekuly pro vodíkovou vazbu. I ostatní substitute mají nepředvídatelný efekt: Derivát CDCA získaný substitucí 24-karboxylové skupiny ethylkarbamátovou skupinou (látka č. T80) je parciálním agonistou FXR, zatímco derivát získaný zavedením oxazolidin-3,5-dionové skupiny (látka č. T81) do polohy C-23 vykazoval vysokou aktivitu. Vědecká skupina Gioiello et al. (2011) u cinnamylkarbamátových derivátů CDCA a 6-ECDC prokázala, že sloučenina č. T82 s 6 α -ethylovou skupinou (derivát 6-ECDC) vykazuje velmi vysokou agonistickou aktivitu vůči FXR receptoru, zatímco derivát CDCA (látka č. T83) se jeví být pouze parciálním agonistou FXR (Gioiello et al. 2011, Pellicciari et al. 2004).

Výše uvedené výsledky poukazují na fakt, že přítomnost 24-karboxylové skupiny v postranním řetězci není nezbytná pro aktivaci FXR receptoru, tato karboxylová skupina

může být substituována strukturně odlišnou skupinou, a díky tomu může být dosaženo různých funkčních efektů od plné agonistické aktivity až k parciální agonistické aktivitě. Tyto výsledky navrhuji, že k aktivaci FXR není třeba žádného negativně nabitého náboje v postranním řetězci (Merk et al. 2012a, Pellicciari et al. 2004).

Tab. 11 Přehled látek, na kterých byl studován vliv modifikací žlučových kyselin v postranním řetězci (nahrazení 24-karboxylové skupiny strukturně odlišnou skupinou) na aktivaci FXR.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T75	CDC-sulfonát	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-sulfonát
T76	CDC-sulfát	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-sulfát
T77	INT-767	6 α -ethyl-3 α ,7 α ,23-trihydroxy-24-nor-5 β -cholan-23-sulfát
T78	-	6 α -ethyl-7 α -hydroxy-5 β -cholan-24-sulfát
T79	-	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amin
T80	-	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ethylkarbamát
T81	-	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oxazolidin-3,5-dion
T82	-	23- <i>N</i> -(karbocinnamyloxy)-3 α ,7 α -dihydroxy-6 α -ethyl-24-nor-5 β -cholan-23-amin
T83	-	23- <i>N</i> -(karbocinnamyloxy)-3 α ,7 α -dihydroxy-24-nor-5 β -cholan-23-amin

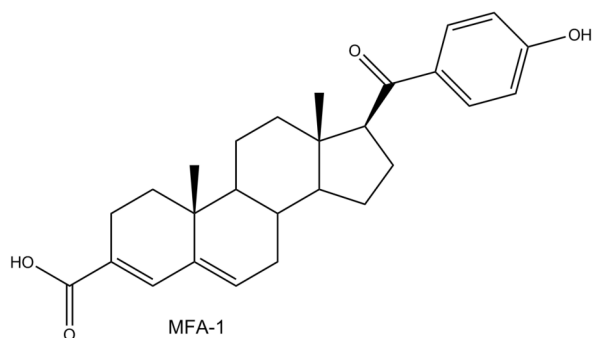
Další steroidní agonisté

Vedle žlučových kyselin a sloučenin od nich odvozených byla FXR agonistická aktivita také pozorována u steroidních látek ze skupiny oxysterolů a steroidních hormonů a u syntetické sloučeniny MFA-1. Deng et al. (2006) popsali, že oxysterol (22*R*)-hydroxycholesterol (látka č. T84) vystupuje jako duální agonista pro LXR a FXR, neboť již dříve bylo známo, že oxysteroly (včetně (22*R*)-hydroxycholesterolu) jsou přírodními endogenními ligandy LXR receptoru, který reguluje skupinu cílových genů důležitých pro metabolismus a transport cholesterolu. Oxysteroly jsou meziprodukty syntézy žlučových kyselin a steroidních hormonů z cholesterolu a slouží jako biologické senzory pro hladinu cholesterolu v těle. Naproti tomu žlučové kyseliny jsou skupinou metabolitů cholesterolu a prostřednictvím aktivace FXR receptoru dochází k regulaci řady cílových genů podílejících se na syntéze, transportu a eliminaci žlučových kyselin. FXR signalizace je tudíž funkčně spojena se signalizací LXR a tyto dráhy koordinovaně regulují své cílové geny za účelem

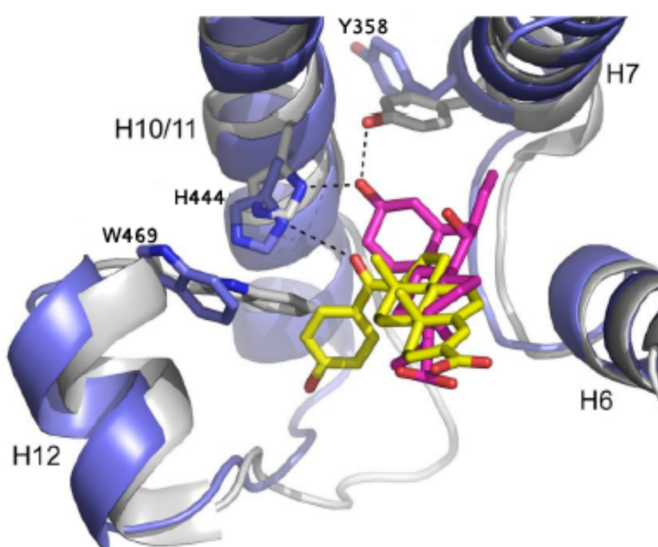
udržení homeostázy žlučových kyselin a cholesterolu. Na základě studií krystalové struktury LBD FXR v komplexu s (22*R*)-hydroxycholesterolem a mutací vybraných aminokyselinových zbytků bylo zjištěno, že se tento oxysterol váže na FXR s určitými odlišnostmi oproti CDCA: např. argininový zbytek R351 se nepodílí na vazbě s tímto oxysterolem, naopak leucinový zbytek L340 hraje důležitou roli v (22*R*)-hydroxycholesterolem zprostředkované aktivaci FXR (Deng et al. 2006).

Wang et al. (2006) objevili, že androsteron (látka č. T85), produkt metabolismu testosteronu, je ligandem agonistou FXR a přímo aktivuje LBD FXR způsobem podobným přirozeným žlučovým kyselinám. Od CDCA se odlišuje nepřítomností 7*α*-hydroxylové skupiny, u které se předpokládá, že interaguje s tyrozinovým zbytkem Y369 FXR receptoru. Druhá hlavní strukturní odlišnost oproti CDCA je nepřítomnost 5uhlíkového karboxylového řetězce v pozici C17, u kterého se předpokládá, že vytváří vodíkovou vazbu s argininovým zbytkem R262. Očekává se, že tyto interakce budou u androsteronu chybět, tudíž lze předpokládat, že se androsteron váže na FXR LBD mírně odlišně než CDCA. Nicméně studie krystalové struktury naznačují, že androsteron, stejně jako žlučové kyseliny, zaujímá v ligand-vazebné kapse FXR obrácenou orientaci, oproti vazbě jiných steroidních hormonů na své příslušné jaderné receptory. Dále bylo prokázáno, že také etiocholanolon (látka č. T86), 5*β*-izomer androsteronu, aktivuje FXR receptor. Jedná se tedy o endogenní ligandy FXR produkované nadledvinkami. Abu-Hayyeh et al. (2013) popsali, že 3*β*-sulfatovaný metabolit progesteronu (epiallopregnanolon sulfát, látka č. T87) vystupuje jako parciální agonista farnesoidního X receptoru (Abu-Hayyeh a Williamson 2015, Abu-Hayyeh et al. 2013, Wang et al. 2006).

V neposlední řadě byl skupinou Soisson et al. (2008) objeven účinný steroidní ligand FXR MFA-1 (látka č. T88, viz Obr. 26), jehož postranní řetězec je, oproti žlučovým kyselinám, nahrazen benzylketonem, kruhy A a B jsou nenasycené. Tato látka navíc postrádá hydroxylové skupiny v polohách C-3, C-7 a C-12, namísto toho je do polohy C-3 zavedena karboxylová skupina. Zajímavé je, že studie krystalové struktury komplexu LBD FXR s MFA-1 objasnily, že se MFA-1 váže do LBD odlišně od přirozeně se vyskytujících žlučových kyselin a většiny látek od nich odvozených: steroidní kruhový systém je natočen přibližně o 180° a kruh D směřuje směrem k helixu 12 (AF-2), karboxylová skupina na kruhu A je v pozici karboxylové skupiny postranního řetězce přirozených žlučových kyselin (viz Obr. 27). Interakce s MFA-1 s FXR receptorem se liší od interakcí s přirozenými ligandy tak, že dochází k přímé vazbě mezi ligandem a helixy 3, 11 a 12 (Soisson et al. 2008).



Obr. 26 Chemická struktura látky MFA-1. Sloučenina MFA-1 (17 β -(4-hydroxybenzoyl)-androsta-3,5-dien-3-karboxylová kyselina) je účinným steroidním ligandem farnesoidního X receptoru (FXR), který se váže do ligand-vazebné kapsy odlišně od přirozeně se vyskytujících se žlučových kyselin. Modifikováno dle: Soisson et al. 2008.



Obr. 27 Srovnání vazby MFA-1 a 6-ECDCA do ligand-vazebné kapsy FXR. Látka MFA-1 (vyobrazena žlutě) se váže do ligand vazebné kapsy farnesoidního X receptoru (FXR) a aktivuje jej odlišně od přirozeně se vyskytujících se žlučových kyselin a většiny jejich derivátů. Fialovou barvou je vyobrazena 6-ethylchenodeoxycholová kyselina (6-ECDCA), která představuje orientaci přirozených žlučových kyselin: mezi hydroxylovou skupinou v poloze C-3 a histidinovým zbytkem H444 a tyrozinovým zbytkem Y358 se tvoří vodíkové vazby. Oproti 6-ECDCA je steroidní kruhový systém MFA-1 natočen přibližně o 180°, karboxylová skupina na kruhu A MFA-1 je v pozici karboxylové skupiny postranního řetězce přirozených žlučových kyselin a kruh D směřuje směrem k helixu H12, kde dochází k přímému kontaktu s H12 prostřednictvím van der Waalových sil mezi aromatickým kruhem MFA-1 a tryptofanovým zbytkem W469. Vysvětlivky: H6–12 (helixy 6–12). Modifikováno dle: Soisson et al. 2008.

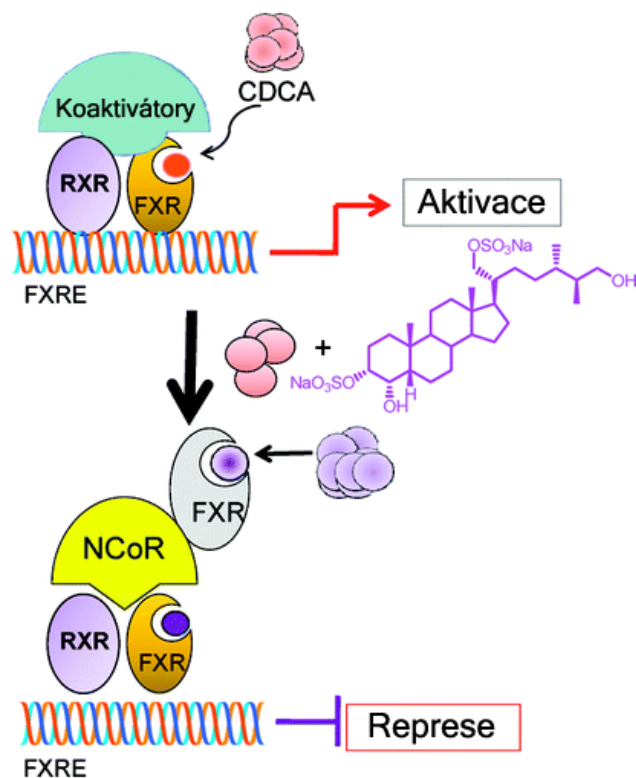
Tab. 12 Přehled dalších steroidních látek, u kterých byla pozorována FXR agonistická aktivita.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T84	-	(22 <i>R</i>)-hydroxycholesterol
T85	androsteron	3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-on
T86	etiocholanolon	3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-on
T87	epiallopregnanolon sulfát	20-oxo-5 α -pregnan-3 β -ester kyseliny sulfonové
T88	MFA-1	17 β -(4-hydroxybenzoyl)-androsta-3,5-dien-3-karboxylová kyselina

3.5.2. Steroidní ligandy antagonisté

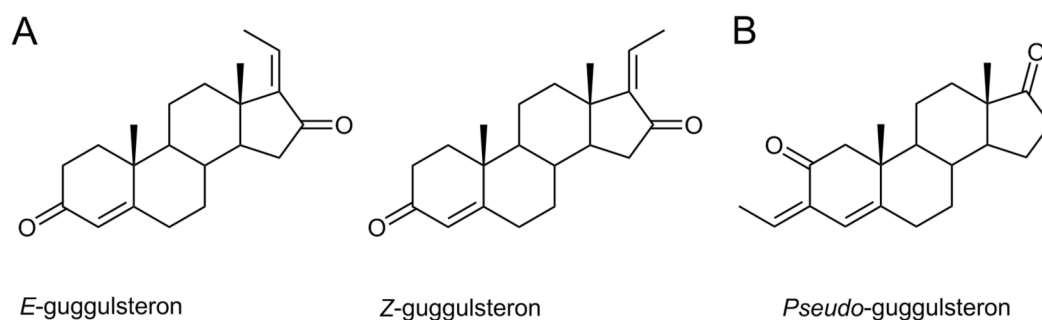
Počet doposud objevených antagonistů FXR je výrazně nižší než množství agonistů, a to i navzdory intenzivnímu výzkumu věnovanému této oblasti. Někteří FXR antagonisté byli dokonce vyvinuti pouze za výzkumnými účely i přesto, že jejich potenciální terapeutické využití bylo nejisté. Většina těchto ligandů s antagonistickou aktivitou má, jako základ struktury, steroidní jádro.

Antagonisté FXR jsou molekuly, které se do LBD receptoru váží s vysokou afinitou, ale neaktivují ho, a tudíž nevyvolávají fyziologický efekt FXR aktivace. Navíc jsou antagonisté schopni inhibovat aktivaci receptoru zprostředkovanou ligandy agonisty (viz Obr. 28). K tomuto jevu dochází díky kompetitivní vazbě antagonisty do LBD s vysokou afinitou, ale bez stabilizace AF-2 helixu v aktivní konformaci a prostřednictvím stabilizace těchto komplexů FXR s korepresory, např. s jaderným korepresorem NCoR (z angl. nuclear corepressor). Následkem je bránění rekrutmentu koaktivátoru, a tudíž nedochází k FXR aktivaci (Merk et al. 2012a).



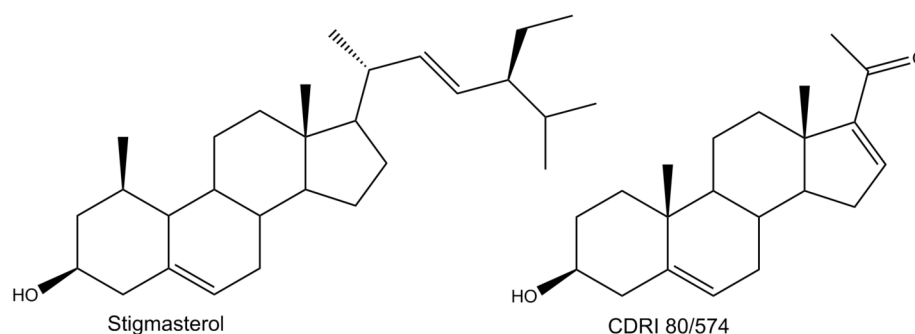
Obr. 28 Schématické znázornění schopnosti antagonistů inhibovat aktivaci FXR receptoru zprostředkovanou ligandy agonisty. Antagonisté (jako příklad je zobrazen sulfátovaný sterol izolovaný z mořského organismu *Ophiolepis superba*) jsou schopni inhibovat aktivaci farnesoidního X receptoru (FXR) zprostředkovanou agonisty (jako příklad je uvedena kyselina chenodeoxycholová, CDCA). Komplex FXR s antagonistou je stabilizován interakcí s korepresorem, např. s jaderným korepresorem (NCoR). Vysvětlivky: RXR (retinoidní X receptor), FXRE (responzivní element FXR). Modifikováno dle: Sepe et al. 2011.

Prvním v literatuře popsáným FXR antagonistou byl guggulsteron (viz Obr. 29 A). V roce 2002 Urizar et al. (2002) objevili, že tato steroidní sloučenina, izolovaná z pryskyřice stromu *Commiphora mukul*, je velice účinným antagonistou FXR receptoru. Guggulsteron se vyskytuje ve formě dvou izomerů *E*-guggulsteron (č. T89) a *Z*-guggulsteron (č. T90) a vykazuje antagonistickou aktivitu na mnoho dalších nukleárních receptorů včetně estrogenních receptorů (ER), glukokortikoidního receptoru (GR), mineralokortikoidního receptoru (MR) a pregnanového receptoru (PR). Pracovní skupina Park et al. (2011) syntetizovala sloučeninu *pseudo*-guggulsteron (č. T91) (viz Obr. 29 B), u které prokázala, že je také antagonistou FXR receptoru (De Marino et al. 2012, Merk et al. 2012a, Park et al. 2011, Urizar et al. 2002).



Obr. 29 Chemická struktura guggulsteronu a *pseudo*-guggulsteronu. A) Guggulsteron se vyskytuje se formě dvou izomerů: *E*-guggulsteron a *Z*-guggulsteron, a je steroidním antagonistou farnesoidního X receptoru (FXR) přírodního původu. B) *Pseudo*-guggulsteron je syntetickým steroidním antagonistou FXR. Modifikováno dle: Park et al. 2011, Urizar et al. 2002.

Dále bylo popsáno několik dalších steroidních FXR antagonistů. Carter et al. (2007) objevili, že látka přírodního původu stigmasterol (č. T92) (viz Obr. 30), fytosterol vyskytující se v sóji (*Glycine max*), je účinným antagonistou FXR receptoru. Jak již bylo popsáno v kapitole 3.5.1., Nishimaki-Mogami et al. (2006) prokázali, že některé 5α -alkoholy žlučových kyselin mohou vystupovat jako antagonisté FXR. Jedná se o 5α -cyprinol (č. T17), který byl původně získán ze žluči asijského kapra *Cyprinus carpi* a 5α -bufol (č. T18), který byl izolován ze žluči zástupců podtřídy dvojdyšných (*Dipnoi*) a některých druhů žab. *Trans*-orientace kruhu A dána konfigurací C- 5α destabilizuje agonistickou konformaci helixu 12, a proto patrně nedochází k interakci mezi koaktivátorem a receptorem. Později byla skupinou Verma et al. (2010) popsána látka CDRI 80/574 (č. T93) strukturně odvozená od žlučových kyselin jako antagonist FXR (Carter et al. 2007, Huang et al. 2012, Nishimaki-Mogami et al. 2006, Verma et al. 2010).



Obr. 30 Chemická struktura stigmasterolu a CDRI 80/574. Tyto látky jsou steroidními antagonisty farnesoidního X receptoru (FXR). Stigmasterol je přírodního původu a CDRI 80/574 je odvozena od žlučových kyselin. Modifikováno dle: Carter et al. 2007, Huang et al. 2012.

Tab. 13 Přehled steroidních látek přírodního i syntetického původu, u kterých byla pozorována FXR antagonistická aktivita.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T89	<i>E</i> -guggulsteron	(17 <i>E</i>)-pregna-4,17(20)-dien-3,16-dion
T90	<i>Z</i> -guggulsteron	(17 <i>Z</i>)-pregna-4,17(20)-dien-3,16-dion
T91	<i>pseudo</i> -guggulsteron	3-ethyliden-androst-4-en-2,17- dion
T92	stigmasterol	stigmast-5,22-dien-3 β -ol
T93	CDRI 80/574	3 β -hydroxy-5,16-dien-pregnan-20-on

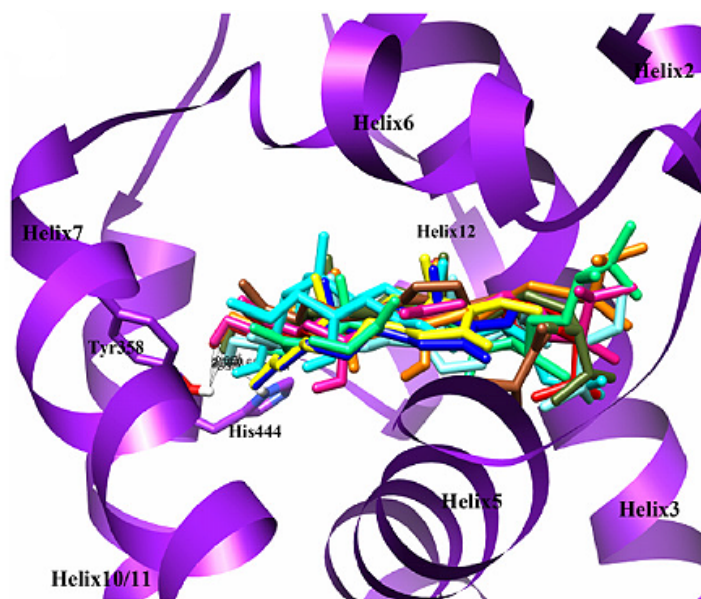
Z mořských organismů bylo izolováno více než 1600 nových steroidních látek a řada z nich byla studována, zda jsou ligandy FXR receptoru. Sepe et al. (2011) testovali sérii **sulfátovaných sterolů** izolovaných z mořských živočichů třídy hadice (*Ophiuroida*). Studované steroly mají společné charakteristické rysy: jedná se o *cis* konformaci spojení kruhů A/B, negativní náboj v postranním řetězci a polární skupina v α -pozici kruhu A. Všechny testované sloučeniny obsahují sulfátovou skupinu v poloze C3 a C21. Nejúčinnější byl sulfátovaný sterol (č. T94) (viz Obr. 28) izolovaný z mořského organismu *Ophiolepis superba*, který má delší a objemnější postranní řetězec než žlučové kyseliny, navíc obsahuje hydroxylovou skupinu v poloze C26, která se zdá být rozhodující pro FXR antagonistickou aktivitu. Tento sterol téměř úplně inhiboval efekt FXR aktivity prostřednictvím CDCA, pravděpodobně prostřednictvím stabilizace komplexu s nukleárním korepresorem NCoR (viz Obr. 28) (Fiorucci et al. 2012, Merk et al. 2012a, Sepe et al. 2011).

O rok později Sepe et al. (2012a) popsali, že dva sulfátované steroly solomonsterol A (č. T95) a solomonsterol B (č. T96) izolované z mořského živočicha *Theonella swinhoei* jsou antagonisty FXR. Ačkoli spojení kruhů A/B je v *trans* konformaci narušeno od CDCA, bylo prokázáno, že se tyto sloučeniny váží do LBD FXR tak, že jsou schopny tvořit triádu vodíkových vazeb s tyrozinovým zbytkem Y358, histidinovým zbytkem H444 a tryptofanovým zbytkem W446 (Sepe et al. 2012a).

Tab. 14 Přehled sulfátovaných sterolů izolovaných z mořských živočichů, u kterých byla pozorována FXR antagonistická aktivita.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T94	-	24 α -methyl-4,26-dihydroxy-5 β -cholestan-3,21-disulfát
T95	solomonsterol A	5 α -cholan-2,3,24-trisulfát
T96	solomonsterol B	24-nor-5 α -cholan-2,3,23- trisulfát

De Marino et al. (2011) testovali sérii 10 polyhydroxylovaných steroidů s methylenovou skupinou v poloze C4, které byly izolovány z mořského živočicha *Theonella swinhoei*. Látky byly označeny jako theonellasteroly B-H (č. T98-104) a conicasteroly B-D (č. T107-109). Sepe et al. (2012b) popsali dvě sloučeniny theonellasterol (č. T97) a conicasterol (č. T106) pocházející z *Theonella swinhoei*, tedy parentní sloučeniny pro další **4-methylensteroly**. Později byl skupinou Sepe et al. (2012a) zkoumán conicasterol E (č. T110) a De Marino et al. (2012) studovali conicasteroly G-K (č. T111-115) a theonellasterol J (č. T105). Bylo pozorováno, že tyto 4-methylensteroly antagonizovaly transaktivaci FXR indukovanou prostřednictvím CDCA. I přesto, že spojení kruhů A/B je v *trans* orientaci a OH skupina s poloze C3 je v β -pozici, se tyto látky váží do LBD FXR obdobným způsobem jako přirozené žlučové kyseliny, tedy mezi helixy H2-3, H5-7 a H10/11, a steroidní jádro má podobnou prostorovou orientaci jako u přirozených žlučových kyselin. Díky hydroxylové skupině v poloze C3 jsou tyto 4-methylensteroly schopny tvořit vodíkové vazby s tyrozinovým zbytkem Y358 na helixu H7, histidinovým zbytkem H444 na helixu H10/11 a s tryptofanovým zbytkem W446 na helixu 12. Další interakce se různí v závislosti na substituci steroidního jádra i postranního řetězce (viz Obr. 31) (De Marino et al. 2011, De Marino et al. 2012, Sepe et al. 2012a, Sepe et al. 2012b).



Obr. 31 Srovnání vazby 6-ECDCA, guggulsteronu a vybraných 4-methylensterolů izolovaných z *Theonella swinhoei* do ligand-vazebné kapsy FXR. Tmavě modrou barvou je znázorněna kyselina obeticholová (6-ECDCA), která reprezentuje orientaci přirozených žlučových kyselin. Modře je vyobrazen *E*-guggulsteron a žlutě *Z*-guggulsteron. Oranžová barva představuje conicasterol G, růžová conicasterol J, tmavě zelená barva reprezentuje conicasterol K, světle modře je znázorněn theonellasterol J, červeně je vyobrazen conicasterol, hnědě dehydroconicasterol a zelenou barvou je vyobrazen nesteroidní swinhosterol B. Všechny vyobrazené steroidní sloučeniny zaujímají v ligand-vazebné kapse farnesoidního X receptoru (FXR) obdobnou orientaci steroidního jádra jako přirozené žlučové kyseliny. Přítomny mohou být mj. vodíkové vazby s tyrozinovým zbytkem Tyr358 a histidinovým zbytkem His444. Modifikováno dle: De Marino et al. 2012.

Tab. 15 Přehled 4-methylensterolů izolovaných z mořských živočichů, u kterých byla pozorována FXR antagonistická aktivita.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T97	theonellasterol	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-14-en-3 β -ol
T98	theonellasterol B	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-7,9(11),14-trien-3 β -ol
T99	theonellasterol C	4-methylen-3 β -hydroxy-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-8(9)-en-15-on
T100	theonellasterol D	4-methylen-9 α -methoxy-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β ,15 β -diol
T101	theonellasterol E	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β ,9 α ,15 β -triol
T102	theonellasterol F	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β ,7 α ,15 β -triol
T103	theonellasterol G	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β ,11 β ,14 α ,15 α -tetrol
T104	theonellasterol H	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β ,11 α ,14 α ,15 α -tetrol

T105	theonellasterol J	4-methylen-(24 <i>S</i>)-ethyl-5 α -cholest-7,14(15)-dien-3 β -ol
T106	conicasterol	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-14-en-3 β -ol
T107	conicasterol B	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-7,9(11),14-trien-3 β -ol
T108	conicasterol C	4-methylen-9 α -methoxy-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β ,15 β -diol
T109	conicasterol D	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β ,9 α ,15 β -triol
T110	conicasterol E	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β ,7 α ,15 β -triol
T111	conicasterol G	4-methylen-3 β ,15 α -dihydroxy-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-8(14)-en-7-on
T112	conicasterol H	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-7-en-3 β ,14 α -diol
T113	conicasterol I	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β ,11 β ,14 α ,15 α -tetrol
T114	conicasterol J	4-methylen-3 β ,7 α -dihydroxy-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-8(14)-en-15-on
T115	conicasterol K	4-methylen-(24 <i>R</i>)-methyl-5 α -cholest-7,14(15)-dien-3 β -ol

V rámci snahy objevit nové přírodní FXR antagonisty z mořských organismů popsali Shin et al. (2012) dvě steroidní sloučeniny 12 β -hydroxy-cholest-1,22-dien-3-on (č. T116) a 20 β -hydroxy-cholest-1,4-dien-3-on (č. T117) izolované z korálu *Dendronephthya gigantea*. Obě tyto látky vykazovaly silnou FXR agonistickou aktivitu. Také Putra et al. (2012) objevili další ligandy antagonisty FXR původem z mořských korálů. Jedná se o steroidní látku gorgosterol (č. T118) a sloučeninu č. T119 s 24-methylcholestanovým základním skeletem, které byly izolované z korálů rodu *Sinularia*. U obou těchto látek byla pozorována FXR antagonistická aktivita (Fiorucci et al. 2012, Putra et al. 2012, Shin et al. 2012).

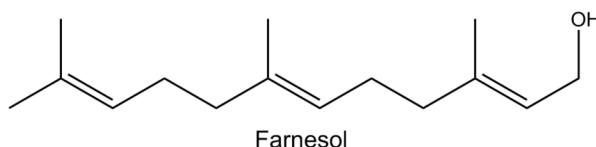
Tab. 16 Přehled dalších steroidních látek izolovaných z mořských živočichů, u kterých byla pozorována FXR antagonistická aktivita.

Číslo	Zkratka/Název	Chemická struktura
T116	-	12 β -hydroxy-cholest-1,22-dien-3-on
T117	-	20 β -hydroxy-cholest-1,4-dien-3-on
T118	gorgosterol	3 β -gorgost-5-en-3-ol
T119	-	(24 <i>S</i>)-methyl-5 α -cholestan-1 α ,3 β -diol

3.5.3. Nesteroidní ligandy agonisté

Výzkum nesteroidních ligandů FXR započal zanedlouho po jeho objevu, neboť steroidní látky jsou spojeny s vysokým potenciálem nežádoucích účinků. Žlučové kyseliny aktivují vedle FXR i pregnanový X receptor (PXR), receptor pro vitamin D (VDR) a další jaderné receptory. Dále interagují s transportem solí žlučových kyselin a vazebnými proteiny. Na základě těchto skutečností bylo potřeba objevit více selektivní ligandy, což vedlo ke studiu přírodních látek i k syntéze nových sloučenin (Merk et al. 2012a).

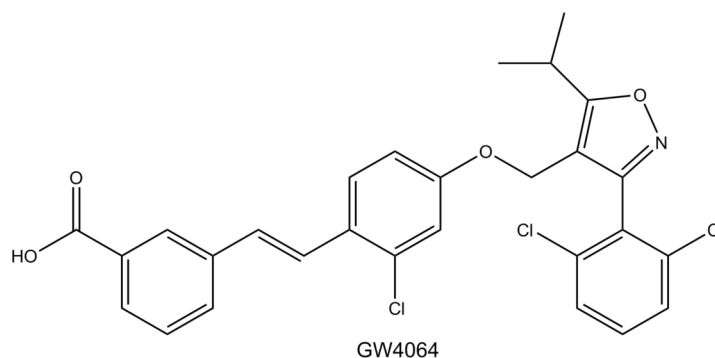
V roce 1995 bylo vědeckou skupinou Forman et al. (1995) popsáno, že FXR receptor je aktivován meziproduktem metabolické dráhy mevalonátu farnesolem (viz Obr. 32), odtud získal receptor svůj název. FXR je dále aktivován také některými metabolity farnesolu (Forman et al. 1995, Modica et al. 2010).



Obr. 32 Chemická struktura farnesolu. Farnesol je prvním objeveným endogenním agonistou farnesoidního X receptoru (FXR). Modifikováno dle: Forman et al. 1995.

Syntetická nesteroidní agonisté

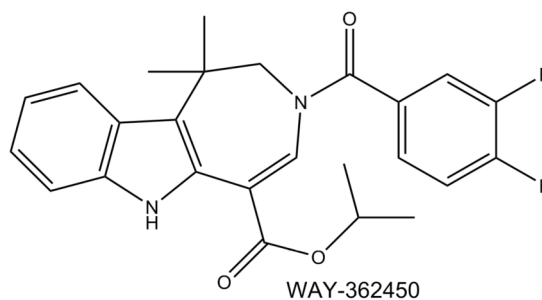
Jako první nesteroidní a vysoce selektivní ligand FXR byl skupinou Maloney et al. (2000) objeven isoxazolový derivát GW4064 (viz Obr. 33), který je v současné době nejdůležitější pomůckou pro studium molekulárních a fyziologických charakteristik FXR receptoru. Vykazuje výrazně silnější aktivaci FXR, než je pozorováno u CDCA. Nicméně kvůli nízké biologické dostupnosti a toxicitě není látka GW4064 vhodná ke klinickému použití. Dále byla od GW4064 odvozena celá řada derivátů isoxazolu (např. GW9047 objevený skupinou Maloney et al. (2000), GSK8062 popsáný skupinou Akwabi-Ameyaw et al. (2008), GSK2324 nalezený skupinou Bass et al. (2011)), oxazolidinonové deriváty, 4-isopropylový a pyrazolový derivát, které popsali Smalley et al. (2015) a další, jež vykazují FXR agonistickou aktivitu. Žádný z nich však není silnějším agonistou než původní sloučenina (Akwabi-Ameyaw et al. 2008, Bass et al. 2011, Maloney et al. 2000, Merk et al. 2012a, Smalley et al. 2015).



Obr. 33 Chemická struktura GW4064. Sloučenina GW4064 je syntetickým agonistou farnesoidního X receptoru (FXR) s velice vysokou afinitou. Modifikováno dle: Maloney et al. 2000.

Syntetická aromatická látka fexaramin byla vědeckou skupinou Downes et al. (2003) popsána jako agonista FXR s afinitou téměř tak vysokou, jako vykazuje GW4064. Nicolaou et al. (2003) dále objevili několik látek odvozených od fexaraminu (fexaren, fexarin, fexaramat a fexarchloramid), které vystupují jako ligandy agonisté FXR (Downes et al. 2003, Merk et al. 2012a, Nicolaou et al. 2003).

Dále byl skupinou Flatt et al. (2009) objeven agonista FXR účinnější než GW4064 a fexaramin. Jedná se o syntetickou látku WAY-362450 (FXR-450, neboli XL335, viz Obr. 34), která se dostala až do dvou klinických studií fáze I, nicméně jeden z nich byl předčasně ukončen z důvodu nevhodných farmakokinetických vlastností (nikoli z důvodu bezpečnosti a tolerance), neboť sloučenina WAY-362450 je špatně rozpustná ve vodě, a díky tomu má nízkou biologickou dostupnost. Na základě těchto skutečností byly syntetizovány další deriváty této látky s FXR agonistickou aktivitou (Flatt et al. 2009, Merk et al. 2012a, Search of: WAY-362450 2017).



Obr. 34 Chemická struktura WAY-362450. Sloučenina WAY-362450 (FXR-450, XL335) je syntetickým agonistou farnesoidního X receptoru (FXR) s velice vysokou afinitou. Modifikováno dle: Flatt et al. 2009.

Mezi další popsané agonisty FXR se řadí syntetická aromatická sloučenina TTNPB (reportovali Parks et al. (1999)), která není vhodným ligandem FXR, neboť je i ligandem RXR. Od ní Dussault et al. (2003) odvodili látky AGN29 a AGN31, které mají zachovanou

afinitu k FXR, ale nižší afinitu k RXR (Dussault et al. 2003, Merk et al. 2012a, Parks et al. 1999).

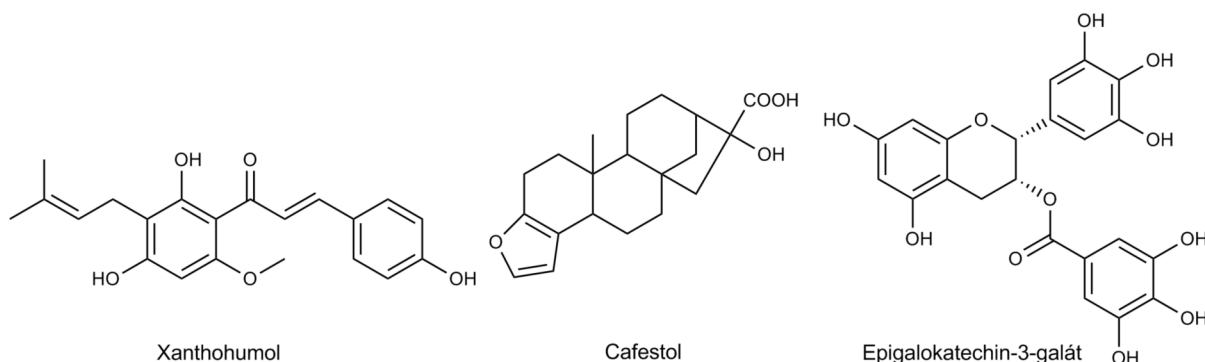
Dále byli nalezeni agonisté FXR receptoru se základní strukturou: pyrrazolidin-3,5-dion (popsali Deng et al. (2008)), benzimidazol (publikovali Richter et al. (2011)), pyrrol[2,3-*d*]azepin (objevili Mehlmann et al. (2009)), estery 1,1-bisfosfonátů (demonstrovali Niesor et al. (2001)), pyrazol[3,4-*e*][1,4]thiazepin-7-on (reportovali Marinozzi et al. (2012)), difenylmethan (nalezli Kainuma et al. (2006)), kyselina anthranilová (popsali Merk et al. (2014a) a Merk et al. (2014b)) a další (Deng et al. 2008, Kainuma et al. 2006, Marinozzi et al. 2012, Matsubara et al. 2013, Mehlmann et al. 2009, Merk et al. 2012a, Merk et al. 2014a, Merk et al. 2014b, Niesor et al. 2001, Richter et al. 2011).

Přírodní nesteroidní agonisté

Jedním z prvních nesteroidních agonistů FXR přírodního původu byl popsán skupinou Howard et al. (2000): forskolin, diterpenoid izolovaný z rostliny *Coleus forskholii*. Suzuki et al. (2008) dále demonstrovali, že přírodní aromatické látky marchantin A a marchantin E, izolované z rostliny *Marchantia paleacea*, a aromatická kyselina ginkgolová, pocházející z rostliny *Ginkgo biloba*, jsou ligandy agonisty FXR. Lin et al. (2014) popsali, že sloučeniny cryptochinony A-D izolované z rostliny *Cryptocarya chinensis* se chovají jako FXR agonisté. Vědeckou skupinou Cermanová et al. (2015) byla objasněna schopnost boldinu, alkaloidu z listů a kůry stromu *Peumus boldus*, aktivovat FXR receptor. Takahashi et al. (2008) prováděli screening sloučenin vyskytujících se v potravinách a zjistili, že coumestrol, fytoestrogen přítomný v sójových klíčcích (*Glycine max*), je silným agonistou FXR (Cermanová et al. 2015, Howard et al. 2000, Lin et al. 2014, Suzuki et al. 2008, Takahashi et al. 2008).

Zajímavostí je, že schopnost aktivovat FXR vykazují i přírodní látky nacházející se v hojně konzumovaných nápojích jako je pivo, káva a čaj. Přírodní látka prenylovaný flavonoid xanthohumol (viz Obr. 35), vyskytující se téměř výhradně ve chmelu (*Humulus lupulus*) odkud částečně přechází i do piva, byla objevena vědcem Nozawa (2005) jako agonista FXR. Cafestol (viz Obr. 35), diterpén přítomný v nefiltrovaných kávových nápojích pocházejících z kávových zrn, tedy ze semen kávovníku (*Coffea arabica* a *Coffea robusta*), vykazuje aktivační vlastnosti na FXR receptor, jak demonstrovali Ricketts et al. (2007). Epigalokatechin-3-galát (EGCG, viz Obr. 35), polyfenolická sloučenina přítomná v čaji (v největší míře v zeleném čaji) pocházející z rostliny *Camellia sinensis*, byla skupinou Li et

al. (2012) popsána jako agonista FXR receptoru (Jelínek et al. 2013, Li et al. 2012, Nozawa 2005, Ricketts et al. 2007, Speer a Kölling-Speer 2006).



Obr. 35 Chemická struktura xanthohumolu, cafestolu a epigalokatechin-3-galátu. Jedná se o agonisty farnesoidního X receptoru (FXR) přírodního původu přítomné v nápojích jako je pivo, káva a čaj. Modifikováno dle: Li et al. 2012, Nozawa 2005, Speer a Kölling-Speer 2006.

Agonisté z jiných skupin léčiv

Vysoká diverzita ligandů FXR poukazuje na fakt, že LBD tohoto nukleárního receptoru je schopna vázat velké množství strukturně odlišných sloučenin. Lze tedy předpokládat, že léčiva z jiných skupin, zejména ty, které působí na ostatní jaderné receptory, mohou také aktivovat FXR receptor. Z tohoto důvodu byla vybraná léčiva hodnocena pro jejich schopnost aktivovat či modulovat FXR. Některé z nich vystupují jako slabé FXR ligandy, nicméně to neznamená, že tato schopnost je farmakologicky relevantní (Merk et al. 2012a).

Léčiva ze skupiny glitazonů, tedy agonisty PPAR γ receptorů se strukturním základem v podobě thiazolididionu, popsala vědecká skupina Kaimal et al. (2009). U troglitazonu pozorovala schopnost modulovat FXR, zatímco u testovaného rosiglitazonu a pioglitazonu vliv na FXR pozorován nebyl. Léky ze skupiny statinů, tedy inhibitory HMG-CoA reductázy (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductázy), byly studovány skupinou Howe et al. (2011). Fluvastatin, simvastatin a lovastatin vykazovaly slabou FXR agonistickou aktivitu. Rovněž u derivátů sulfonylurey glibenklamidu a glimepiridu byla zjištěna schopnost modulovat farnesoidní X receptor. Vědecká skupina Jin et al. (2013) pozorovala u léčiva ze skupiny antiparazitik ivermektinu schopnost modulace FXR receptoru (Howe et al. 2011, Jin et al. 2013, Kaimal et al. 2009, Merk et al. 2012a).

3.5.4. Nesteroidní ligandy antagonisté

Oproti širokému spektru agonistů farnesoidního X receptoru bylo doposud objeveno pouze malé množství antagonistů, z nichž větší význam mají dříve popsané sloučeniny se steroidním strukturním základem. Nicméně v posledních letech bylo popsáno několik tříd nesteroidních látek, které mají potenciál být ligandy antagonisty FXR.

Vědecká skupina Choi et al. (2011) demonstrovala, že tuberatolidy, tedy přírodní terpenoidy izolované z mořských živočichů *Botryllus tuberatus*, jsou silnými antagonisty FXR. Také skupina Di Leva et al. (2013) se věnovala zkoumání látek pocházejících z mořských organismů a objevila, že sesterterpen suvanin (izolovaný z *Coscinoderma mathewsi*) a jeho další deriváty vystupují jako antagonisté FXR. Výzkumná skupina Nam et al. (2006) popsala, že scalaranové sesterterpeny izolované z korejských mořských organismů rodu *Spongia* vykazují FXR agonistickou aktivitu. Rovněž z přírodních zdrojů získali Tsai et al. (2012) dva seskviterpenoidy atractylenolid II a III izolované z rostliny čeledi *Asteraceae* (*Atractylodes macrocephala*) a pozorovali u nich schopnost antagonizovat aktivaci FXR způsobenou CDCA (Di Leva et al. 2013, Choi et al. 2011, Nam et al. 2006, Tsai et al. 2012).

Prostřednictvím virtuálního screeningu chemických knihoven sloučenin identifikovala vědecká skupina Huang et al. (2012) deriváty 1,3,4-trisubstituovaného-pyrazolonu a skupina Song et al. (2015) látku 3-(tert-butyl)-4-hydroxyfenyl benzoát a deriváty benzamidu jako silné nesteroidní antagonisty FXR. Skupina Yu et al. (2014) dále pozorovala schopnost antagonizovat FXR receptor u heterocyklických sloučenin se základní strukturou substituovaný-pyrazol-4-karboxamid. Vědecká skupina Liu et al. (2014) popsala deriváty hydroxyacetofenonu jako silné antagonisty FXR receptoru (Huang et al. 2012, Liu et al. 2014, Song et al. 2015, Yu et al. 2014).

Výzkumná skupina Lu et al. (2015) pozorovala FXR antagonistickou aktivitu u některých léčiv ze skupiny nesteroidních antiflogistik (ibuprofen, indometacin a další) (Lu et al. 2015).

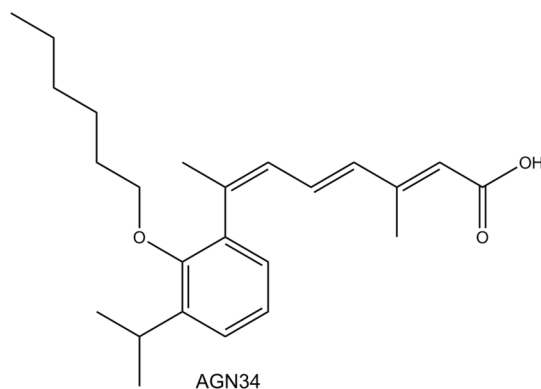
3.5.5. Modulátory farnesoidního X receptoru

Vývoji steroidních i nesteroidních sloučenin za účelem objevení silných agonistů FXR bylo věnováno velké úsilí, nicméně potenciální závažné nežádoucí účinky agonistů FXR limitují jejich využití v klinické praxi. Proto se další výzkum zaměřuje na vývoj selektivních FXR modulátorů nazývaných jako SBARMS (z angl. selective bile acid receptor modulators). Jedná se o látky schopné regulovat jednotlivé cílové geny FXR nebo jejich skupiny. Aktivace

FXR receptoru agonisty nebo inhibice antagonisty má prospěšný efekt, ale i vedlejší účinky. Plný FXR agonismus (neboli transaktivace všech FXR cílových genů v plném rozsahu) může, vedle požadovaného efektu, mj. inhibovat i fyziologickou syntézu a transport žlučových kyselin, což může narušit homeostázu cholesterolu. Proto je výzvou do budoucna objevit silné genově selektivní FXR modulátory, které budou moci indukovat (nebo naopak inhibovat) jen určitou podskupinu FXR cílových genů při zachování neutrálního či antagonistického (nebo naopak agonistického) vlivu na jiné cílové geny. SBARMs by umožnili snížit pleiotropismus receptorového účinku, a tím omezit nežádoucí účinky plných FXR agonistů (Bijsmans et al. 2015, Gioiello et al. 2011, Huang et al. 2010, Merk et al. 2012a).

Nicméně vzhledem k tomu, že FXR kontroluje nepřehledné množství genů, je nalezení syntetických ligandů se správným genově selektivním profilem málo pravděpodobné. Zvyšovat šance na nalezení správné molekuly pomáhá kombinace velkých chemických knihoven a stovek či tisíců testovatelných chemických látek, spolu s moderními vysoce výkonnými screeningovými metodami. Výzkum vedoucí k získání SBARMs může být také zaměřen na interakce ligandu se specifickými oblastmi LBD, které způsobí odlišný rekrutment koaktivátoru či korepresoru. Ke studiu těchto interakcí mezi ligandem a ligand-vazebnou kapsou mohou přispět již popsání agonisté či antagonisté FXR a jejich vztah struktury a účinku (SAR). Doposud byly ve studiích krystalové struktury objasněny desítky komplexů ligandů s FXR. Získané poznatky mohou být přínosné pro navrhování nových selektivních FXR modulátorů s odlišnými biologickými funkcemi a profily genové exprese, které by byly vhodné k terapeutickému využití (Bijsmans et al. 2015, Gioiello et al. 2011, Huang et al. 2010, Merk et al. 2012a, Suzuki et al. 2008).

Doposud jedinou sloučeninou označenou jako selektivní FXR modulátor je syntetická látka AGN34 (viz Obr. 36), která zvyšuje CYP7A1 (cytochrom P450 isoforma 7A1) expresi a zároveň snižuje expresi ileálního vazebného proteinu žlučových kyselin IBABP (z angl. ileal bile acid-binding protein), zatímco ostatní FXR cílové geny, jako je např. SHP (malý heterodimerický partner, z angl. small/short heterodimer partner), nejsou ovlivněny. Tato sloučenina má také vysokou afinitu k RXR, a k tomu, aby byla účinná je vyžadována přítomnost FXR/RXR heterodimeru. Zajímavostí je, že se AGN34 neváže do klasické FXR ligand-vazebné kapsy. Tato sloučenina je tudíž považována za allosterický modulátor FXR a nemůže přispět k studiu SAR dalších ligandů FXR (Dussault et al. 2003, Merk et al. 2012a).



Obr. 36 Chemická struktura AGN34. Syntetická látka AGN34 je doposud jedinou sloučeninou označenou jako selektivní modulátor farnesoidního X receptoru (FXR). Modifikováno dle: Merk et al. 2012a.

V literatuře byly popsány i další látky, u kterých je navrženo, že by mohly vykazovat vlastnosti selektivních FXR modulátorů. Jedná se např. o mometason fuorát, kyselinu oleanovou, polynenasycené mastné kyseliny a další. Výzkumná skupina Bijmans et al. (2015) se zaměřila na vývoj selektivních FXR modulátorů s protizánětlivým účinkem, který však nebude interferovat s molekulárními mechanismy, jejichž prostřednictvím FXR reguluje své metabolické funkce. Tato skupina pozorovala u mometason fuorátu vlastnosti genově selektivního FXR modulátoru, neboť tato sloučenina potlačovala expresi prozánětlivých genů *CXCL2* (Chemokine (C-X-C motif) ligand 2) a *IL8* (interleukin 8) prostřednictvím redukce aktivity NFκB (nukleární faktor kappa B), zatímco geny zodpovědné za ostatní metabolické účinky farnesoidního X receptoru zůstaly neovlivněny. Mometason fuorát, jako selektivní protizánětlivý modulátor FXR, však není k terapeutickému využití vhodný, a to kvůli nanomolární afinitě ke glukokortikoidnímu receptoru (GR). Liu a Wong (2010) publikovali, že kyselina oleanová, pentacyklický triterpenoid přirozeně se vyskytující v rostlinách (i v některých potravinách, např. v olivovém oleji), inhibuje aktivaci FXR způsobenou CDCA, ale na druhou stranu zvyšuje expresi SHP a zároveň pozoruhodně neovlivňuje další cílový gen FXR, OST-β (z angl. organic solute transporter β). Proto autoři navrhují, že by kyselina oleanová mohla být selektivním modulátorem FXR. Parciálně antagonistické vlastnosti na FXR pozorovala u této látky i skupina Chen et al. (2015). Vědecká skupina Zhao et al. (2004) popsala, že polynenasycené mastné kyseliny (kyselina arachidonová, dokosahexaenová a linolenová) inhibují aktivaci FXR receptoru zprostředkovanou ligandem agonistou, v kontrastu s tím ale regulují dva FXR cílové geny protichůdným způsobem: zvyšují genovou expresi exportní pumpy pro žlučové kyseliny (BSEP, z angl. bile salt export pump) a snižují expresi kininogenu. Z tohoto důvodu je navrženo, že by polynenasycené

mastné kyseliny mohly být FXR selektivními modulátory (Bijsmans et al. 2015, Chen et al. 2015, Liu a Wong 2010, Zhao et al. 2004).

Výše uvedené výsledky poukazují na slibný potenciál v oblasti selektivních FXR modulátorů, nicméně na tomto poli výzkumu bude potřeba ujit velice dlouhou cestu, která povede k prozkoumání nových terapeutických možností SBARMs, jež nemohou být využity při použití plných agonistů FXR.

3.6. Steroidní sloučeniny

Steroidy tvoří skupinu strukturně podobných, fyziologicky účinných a biochemicky dynamických sloučenin, které jsou ve velkém rozsahu přítomny jak v živočišné, tak i v rostlinné říši. Mezi živočišné steroidy patří tři důležité skupiny sloučenin: steroly, žlučové kyseliny a steroidní hormony. Zejména v rostlinách se nacházejí farmakologicky významné látky se steroidní strukturou: steroidní alkaloidy, digitaloidy a saponiny (Kar 2006, Koolman a Röhm 2012).

Všem steroidům je společné základní steranové jádro složené ze čtyř nenasycených cyklů. Důležitá je vzájemná orientace kruhů, jádro může být částečně nebo úplně hydrogenované a mnoho steroidů má také ke steroidnímu jádru připojený postranní řetězec (Kar 2006, Koolman a Röhm 2012).

V naší práci jsme studovali sloučeniny, které jsou svou strukturou podobné žlučovým kyselinám, látky ze skupiny steroidních hormonů, látky jim strukturně podobné, neuroaktivní steroidy a další steroidní sloučeniny.

Žlučové kyseliny mají strukturu odvozenou od cholesterolu, vznikají z něj v játrech. Typický je postranní řetězec zkrácený o tři uhlíky, kdy poslední uhlíkový atom je oxidován na karboxylovou skupinu. Dvojná vazba v kruhu B je redukována a kruhy A a B jsou v orientaci *cis*. Steroidní jádro nese jednu až tři OH-skupiny nejčastěji v poloze α , v pozicích 3, 7 a 12 (více viz kapitola 3.5.1.). Žlučové kyseliny udržují cholesterol v roztoku ve formě micel a v tenkém střevě napomáhají trávení lipidů. V našem experimentu jsme testovali látku 12-oxo-5 β -cholan-24-ovou kyselinu, která je strukturně podobná žlučovým kyselinám (Koolman a Röhm 2012).

Steroidní hormony jsou poměrně vzácnou, pokud jde o množství v organismu, ale fyziologicky velmi významnou skupinou signálních látek, které regulují mj. metabolismus, růst a reprodukci. Dle biologické aktivity se steroidní hormony dělí na kortikoidy (mineralokortikoidy a glukokortikoidy) a na pohlavní hormony, které se dále člení na androgeny, estrogeny a gestageny. Do skupiny steroidních hormonů také náleží kalcitriol,

steroid s otevřeným kruhem. Steroidní hormony vznikají přeměnou cholesterolu (Koolman a Röhm 2012).

Steroidní hormony účinkují prostřednictvím vazby na své příslušné intracelulární receptory, které následně změní svou konformaci disociací z chaperonových molekul (např. proteiny teplotního šoku) a translokují se do jádra, kde se vážou do svých responzivních elementů (RE) lokalizovaných v regulačních oblastech cílových promotorů. Receptory pro steroidní hormony tedy vystupují jako transkripční faktory v regulaci genové exprese (Biggio a Purdy 2001).

V našem experimentu jsme testovali mj. dihydrotestosteron (DHT), 5 α -androstandion, androsteron a epiandrosteron. DHT je v mnoha tkáních (prostata, skrotum, penis, kost a kůže) vlastní účinnou formou testosteronu. Konverzi testosteronu na dihydrotestosteron katalyzuje enzym 5 α -reduktáza (Kittnar 2011).

5 α -androstandion je prekurzorem testosteronu a estronu (Showing metabocard for Androstanedione 2016).

Androsteron je steroidní hormon ze skupiny 17-ketosteroidů, vykazuje slabší androgenní účinek. Epiandrosteron je neúčinný izomer androsteronu, vyskytuje se v normální lidské moči, v tkáni testes a ovarií (Androsteron 2017, Epiandrosteron 2017).

Neuroaktivní steroidy jsou steroidní sloučeniny, které modulují excitabilitu neuronů prostřednictvím interakce s neurotransmiterovými membránovými receptory a iontovými kanály. Jedná se zejména o receptory GABA_A (γ -amino máselná kyselina, z angl. γ -amino butyric acid), v menší míře o *N*-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a glutamátové receptory. Neuroaktivní steroidy mohou být jak pozitivními, tak i negativními regulátory receptorů. Oproti genomickému účinku steroidních hormonů, který trvá minuty až hodiny, je non-genomický účinek velmi rychlý, trvá milisekundy až sekundy (Biggio a Purdy 2001, Reddy 2010).

Steroidy produkované různými žlázami s vnitřní sekrecí mají lipofilní povahu, a tak mohou snadno prostupovat hematoencefalickou bariérou. Neuroaktivní steroidy, které jsou tvořené přímo v mozku, se označují jako **neurosteroidy**. Jako prekurzory pro syntézu neurosteroidů slouží cirkulující steroidní hormony, které jsou produkovány v hipokampu a v jiných částech mozku (Biggio a Purdy 2001, Reddy 2010).

Neuroaktivní steroidy mohou být, na základě strukturních vlastností, klasifikovány do základních skupin: pregnanové (např. allotetrahydrodeoxykortikosteron a námi testované allopregnanolon, pregnanolon, epipregnanolon, epiallopregnanolon, 5 α -dihydroprogesteron, 5 β -dihydroprogesteron), androstanové (např. androstenol a námi testované 3 α -androstandiol,

etiocholanon, androsteron) a sulfatované (pregnanolon sulfát a dehydroepiandrosteron sulfát) (Bičíková a Hampl 2007, Biggio a Purdy 2001, Evans et al. 2005, Kaminski et al. 2006, Reddy 2010).

Biosyntéza neuroaktivních steroidů zahrnuje několik kroků, v nichž z cholesterolu vzniká pregnenolon, z něj progesteron a redukcí progesteronu a deoxykortikosteronu katalyzovanou enzymy 5 α -reduktáza a 5 β -reduktáza vznikají 5 α - či 5 β -pregnanové steroidy. Tyto reakce jsou u savců ireverzibilní. Pregnanolon je také prekurzorem pro dehydroepiandrosteron (DHEA). Progesteron a DHEA jsou konvertovány na androstendion, který je prekurzorem testosteronu. Estradiol je tvořen prostřednictvím enzymu aromatázy jak z testosteronu, tak i z androstendionu (Biggio a Purdy 2001).

K účinkům neuroaktivních steroidů lze obecně říci, že nekonjugované deriváty 3 α -hydroxy-pregnanu, jako jsou například allopregnanolon, pregnanolon a allotetrahydrodeoxykortikosteron, převážně pozitivně moduluji GABA_A receptory, vykazují tedy inhibiční efekt na neurotransmisi a mají sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní účinky. Obecně platí, že sulfatací se neuroaktivní steroidy stávají GABA_A negativními modulátory s účinkem opačným, tedy excitačním na neurotransmisi. Zároveň mohou působit jako pozitivní modulátory NMDA receptorů. Pregnanolon sulfát a dehydroepiandrosteron sulfát zvyšují paměť a mají anxiogenní efekt. Syntetické neuroaktivní steroidy, které mají lepší farmakokinetický i účinnostní profil, jsou hodnoceny za účelem sedativního a anxiolytického, anestetického a antiepileptického terapeutického efektu (Bičíková a Hampl 2007, Reddy 2010).

4. Cíl práce

Cílem této experimentální rigorózní práce je studium interakcí vybraných 44 steroidních sloučenin (ze skupiny steroidních hormonů, neuroaktivních steroidů, látek odvozených od žlučových kyselin a dalších) s lidským farnesoidním X receptorem (FXR) za použití lidské hepatomové buněčné linie HepG2.

V této práci nejdříve otestujeme vliv vybraných 44 steroidních sloučenin na buněčnou viabilitu prostřednictvím metody MTT assay na buněčné linii HepG2.

Dále použijeme metodu gene reporter assay s využitím reportérového luciferázového DNA vektoru s responzivním elementem pro FXR receptor (FXRE) na buněčné linii HepG2 za účelem otestování možné interakce studovaných látek s FXR receptorem.

Experimentální výsledky této práce by mohly předznamenat existenci nových ligandů FXR receptoru ze skupiny steroidních hormonů, neuroaktivních steroidů, látek odvozených od žlučových kyselin či dalších látek a mohly by poskytnout užitečný pohled při vývoji nových léčiv cílených na FXR receptor.

5. Experimentální část

5.1. Materiál

5.1.1. Buněčná linie HepG2

Jako modelovou buněčnou linii jsme pro náš experiment použili linii HepG2, která byla získána z buněk lidského jaterního karcinomu. Tato linie je odvozena z jaterní tkáně 15letého bělocha, který měl dobře diferencovaný hepatocelulární karcinom. Morfologie HepG2 buněk je epiteliální, tyto buňky mají 55 párů chromozomů a scenerují mnoho plazmatických proteinů, jako je např. transferin, fibrinogen, plasminogen či albumin. HepG2 buňky mohou být stimulovány lidským růstovým hormonem. Tyto buňky jsou adherentní a rostou v jedné vrstvě v malých agregátech (HepG2 cell culture, stable transfection protocol 2016).

Buněčnou linii jsme kultivovali v tzv. plném médiu – DMEM obsahující 2 mM glutaminu, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin. Buňky jsme inkubovali v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C v atmosféře 5% CO₂. HepG2 buňky byly pasážovány při 70–80% konfluenci za použití 0,25% trypsinu. Na kultivační destičky jsme HepG2 linii nasazovali v koncentraci 20 000 – 30 000 buněk na 1 cm² plochy kultivačního plata.

5.1.2. Pomůcky, přístroje a reagentie

Pomůcky, přístroje

12jamkové destičky (Nunclon™ Delta Surface)

48jamkové destičky (Nunclon™ Delta Surface)

96jamkové destičky (Nunclon™ Delta Surface)

automatická pipeta (FastPette™)

destičkový spektrofotometr-luminometr (BioTek Synergy 2)

inkubátor (New Brunswick an Eppendorf Company Galaxy 170 S)

kahan (Fuego SCS basic)

kultivační lahve (TPP®)

laminární box (Telstar Bio II Advance, Telstar Clean Air® EF/S)

mikropipety (Eppendorf Research)

mikroskop (DHM)

odsávačka (Knf Lab Laboport)

plastové mikroskopavky (BIOplastics BV)

plastové zkumavky (CAPP®)
skleněné Pasteurovy pipety (Hirschmann®)
třepačka (MS2 Minishaker IKA®)
vodní lázeň (Memmert)

Reagencie

CDCA (chenodeoxycholová kyselina) (Generi BioTech)
DMEM (z angl. Dulbecco's modified Eagles's medium) (Gibco)
DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma Aldrich)
fetální bovinní sérum (PAA)
glutamin (Sigma Aldrich)
GW4064 (Generi BioTech)

Luciferase Assay Reagent II – obsahuje:

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

MTT labeling reagent (Sigma Aldrich)

neesenciální aminokyseliny (Sigma Aldrich)

Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Gibco)

Passive lysis buffer (Promega)

PBS (fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline) (Sigma Aldrich)

plasmidy:

- pFXRE-luc2P (plasmid byl připraven v laboratoři prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D.)
- pRL-TK (Promega)
- pSG5-FXR (Addgene)
- pSG5-hRXR α (Addgene)

SDS (dodecylsulfát sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate) (Serva)

Solubilization solution (Sigma Aldrich)

Stop & Glo® Reagent – obsahuje:

- Stop & Glo® Buffer (Promega)
- Stop & Glo® Substrate (Promega)

testované látky č. 1–52 (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky)

TransFectin™ Lipid Reagent (Bio-Rad)

0,25% trypsin (Sigma Aldrich)

5.1.3. Testované látky a jejich koncentrace

Studovanými látkami v této práci bylo celkem 44 sloučenin se steroidním základem struktury, které jsme získali od Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (skupina Mgr. Evy Kudové, Ph.D.). V této experimentální práci jsme se soustředili zejména na testování steroidních sloučenin, které jsou oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám pomyslně modifikovány na steroidním jádru a zároveň v postranním řetězci. Studované steroidy jsme si, dle pomyslných modifikací, rozdělili do následujících skupin:

a) Modifikace jen na steroidním jádru: tato skupina obsahuje pouze jedinou látku (č. 42), která se odlišuje od LCA absencí 3α -OH, a má navíc v pozici C-12 oxoskupinu (viz Tab. 17 a Obr. 37).

b) Modifikace v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru: tato skupina se, dle charakteru postranního řetězce, dále dělí na následující podskupiny:

Postranní řetězec zcela chybí: základní strukturou těchto sloučenin je tedy androstan. Do této podskupiny se řadí látka č. 1, která je analogem LCA bez postranního řetězce; a dále sloučeniny č. 4, 3, 5, 18 (5β -izomer androstenolu) a 47, u kterých je zároveň modifikováno i steroidní jádro (viz Tab. 17 a Obr. 38).

Místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 karboxylová skupina: základní strukturou je androstan. Tato podskupina obsahuje testovanou látku č. 43, která se dále vyznačuje i modifikacemi steroidního jádra (viz Tab. 17 a Obr. 39).

Místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 β hydroxyskupina: steroidním skeletem těchto sloučenin je androstan. Tato podskupina čítá studované látky č. 13 (5β -izomer 3α -androstandiolu), která je analogem LCA s OH-skupinou místo postranního řetězce, 27 (3α -androstandiol), 9 (5β -dihydrotestosteron), 10 (5α -dihydrotestosteron) a 15 (viz Tab. 17 a Obr. 40).

Místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 oxoskupina: základní strukturou sloučenin této podskupiny je androstan. Řadí se sem látka č. 17, tedy etiocholanon, který je pomyslnou modifikací LCA s oxoskupinou místo postranního řetězce, a dále sloučeniny s rozmanitými modifikacemi i postranního řetězce i steroidního jádra: č. 20 (epietiocholanon), 19 (epiandrosteron), 22 (androsteron), 14, 12 (dehydroepiandrosteron), 23, 30 (5β -androstandion), 21 (5α -androstandion), 28 a 46 (viz Tab. 17 a Obr. 41).

Postranní řetězec je zkrácen na 1 uhlík, v polohách C-17 β /20 je epoxid: základní strukturou je tedy androstan. Tato podskupina obsahuje testovanou látku č. 16, která je $17\beta/20$ epoxy steroidem (viz Tab. 17 a Obr. 42).

Postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 α je hydroxyskupina: steroidním skeletem je tedy pregnan. Tato podskupina obsahuje studovanou látku č. 26 (viz Tab. 17 a Obr. 43).

Postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 je oxoskupina: základní strukturou těchto sloučenin je pregnan. Do této podskupiny se řadí látka č. 11, tedy pregnanolon, který se od LCA liší pouze v postranním řetězci. Dále se jedná o látky s různorodými odlišnostmi na steroidním skeletu č. 25 (allopregnanolon), 6 (epipregnanolon), 8 (epiallopregnanolon), 7 (pregnandion), 2 (5 α -dihydroprogesteron), 51, 35, 29, 41, 38, 37, 34, 44, 31, 36, 52 a 50 (viz Tab. 17 a Obr. 44 a 45).

Tab. 17 Chemická struktura studovaných steroidních látek.

Studovaná látka č.	Název/zkratka	Chemická struktura
a) Modifikace jen na steroidním jádru		
42	-	12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina
b) Modifikace v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru		
Postranní řetězec zcela chybí		
1	-	5 β -androstan-3 α -ol
4	-	5 β -androstan-3 β -ol
3	-	5 α -androstan-3 β -ol
5	-	5 β -androstan-3-on
18	5 β -izomer androstenolu	5 β -androst-16-en-3 α -ol
47	-	5 β -androst-16-en-3-on
Místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 karboxylová skupina		
43	-	3 β -hydroxyandrost-5-en-17-karboxylová kyselina
Místo postranního řetězce je na uhlíku C-17β hydroxyskupina		
13	5 β -izomer 3 α -androstandiolu	5 β -androstan-3 α ,17 β -diol
27	3 α -androstandiol	5 α -androstan-3 α ,17 β -diol
9	5 β -dihydrotestosteron	17 β -hydroxy-5 β -androstan-3-on
10	dihydrotestosteron/DHT	17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on
15	-	5 β -androst-1-en-17 α -ol

Místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 oxoskupina

17	etiocholanon	3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-on
20	epietiocholanon	3 β -hydroxy-5 β -androstan-17-on
19	epiandrosteron	3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-on
22	androsteron	3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-on
14	-	5 α -androstan-17-on
12	dehydroepiandrosteron/DHEA	3 β -hydroxyandrost-5-en-17-on
23	-	17-oxoandrost-5-en-3 β -ester kyseliny octové
30	5 β -androstandion	5 β -androstan-3,17-dion
21	5 α -androstandion	5 α -androstan-3,17-dion
28	-	3 α -karboxymethyl-5 β -androstan-17-on
46	-	3 α -ethoxykarbonylmethyl-5 β -androstan-17-on

Postranní řetězec je zkrácen na 1 uhlík, v polohách C-17 β /20 je epoxid

16	-	17 β /20-epoxy-17 α -methyl-5 β -androstan-3 α -ol
----	---	--

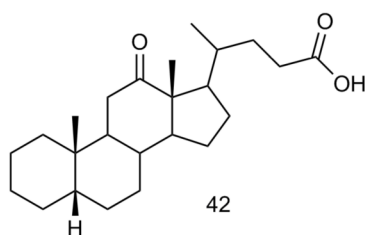
Postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 α je hydroxyskupina

26	-	5 α -pregn-2-en-20 α -ol
----	---	--

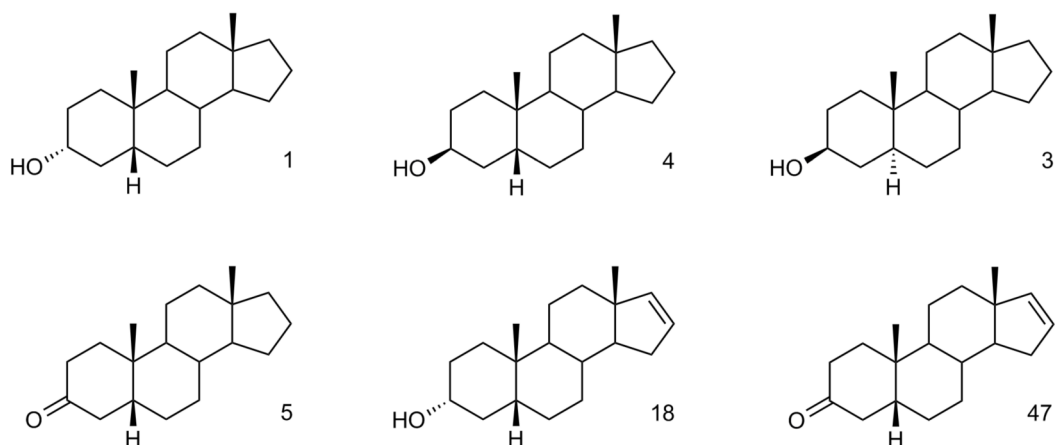
Postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 je oxoskupina

11	pregnanolon	3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-on
25	allopregnanolon	3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on
6	epipregnanolon	3 β -hydroxy-5 β -pregnan-20-on
8	epiallopregnanolon	3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-on
7	5 β -dihydroprogesteron/ 5 β -DHP	5 β -pregnan-3,20-dion
2	5 α -dihydroprogesteron/ 5 α -DHP	5 α -pregnan-3,20-dion
51	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -karboxylová kyselina
35	-	3 α -karboxymethyl-5 β -pregnan-20-on
29	-	3 α -ethoxykarbonylmethyl-5 β -pregnan-20-on
41	-	3 α -karboxyethyl-5 β -pregnan-20-on
38	-	3 α -karboxypropyl-5 β -pregnan-20-on
37	-	3 β -karboxypropyl-5 β -pregnan-20-on
34	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny šťavelové

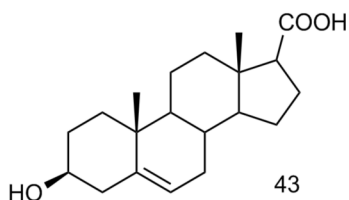
44	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny malonové
31	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny jantarové
36	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny glutarové
52	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny adipové
50	-	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny pimelové



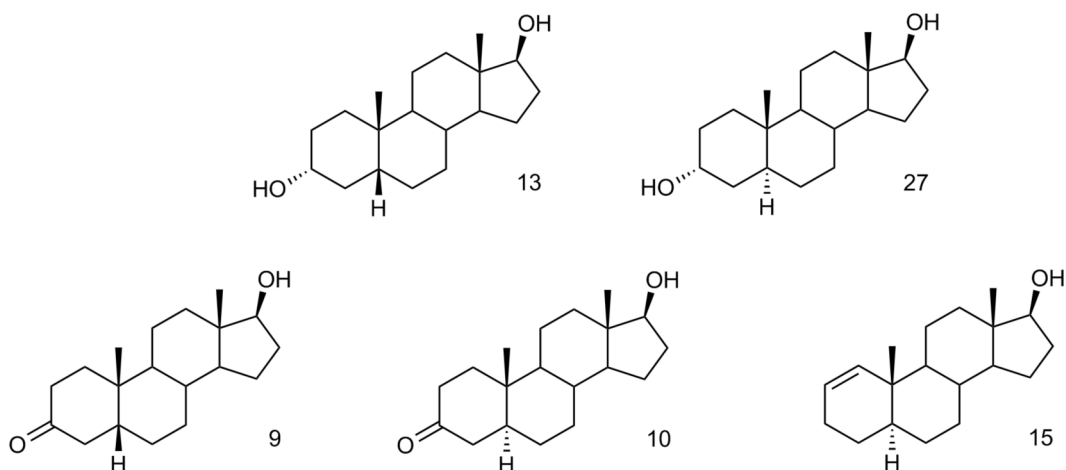
Obr. 37 Chemická struktura studované steroidní látky s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, jen na steroidním jádru. Jedná se o látku č. 42.



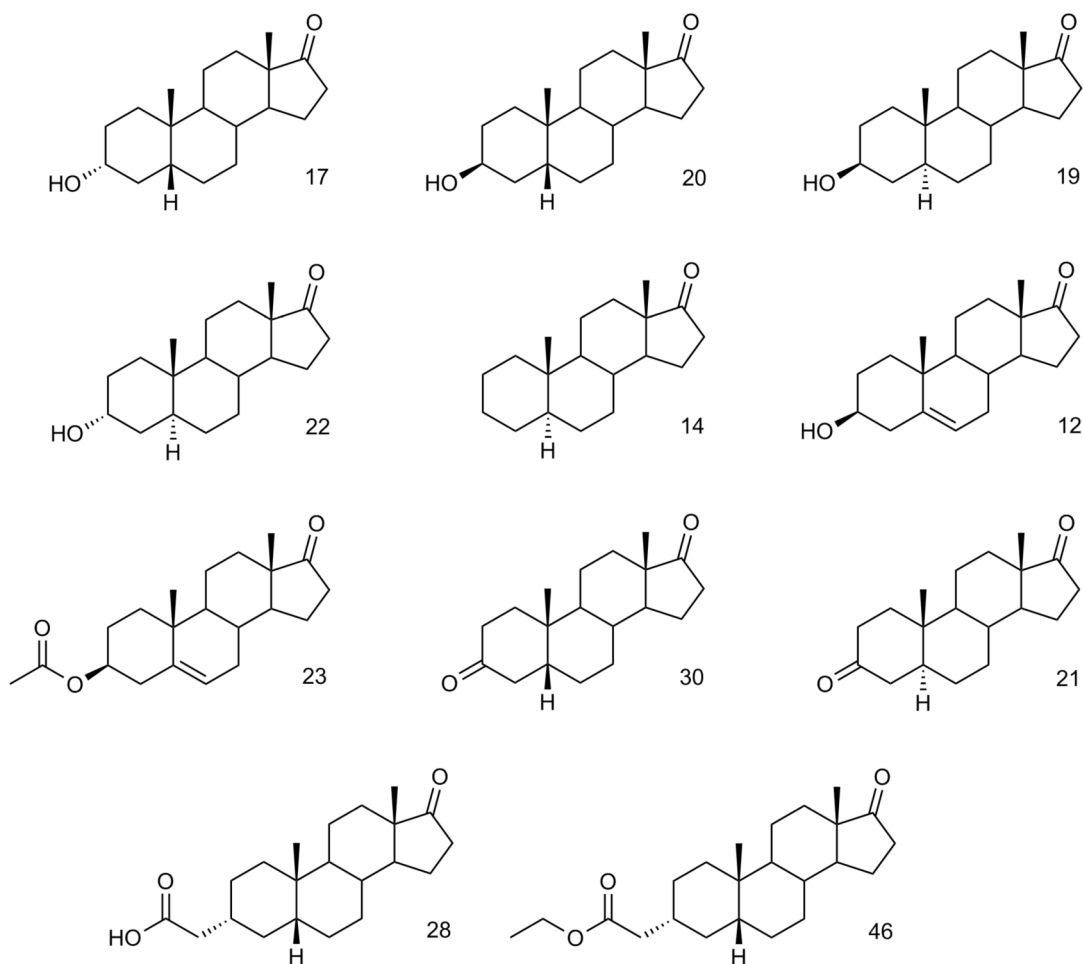
Obr. 38 Chemická struktura studovaných steroidních látek s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru – postranní řetězec zcela chybí. Jedná se o látky č. 1, 4, 3, 5, 18 a 47.



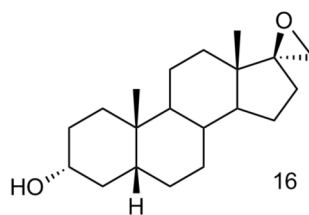
Obr. 39 Chemická struktura studované steroidní látky s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci i na steroidním jádru – místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 karboxylová skupina. Jedná se o látku č. 43.



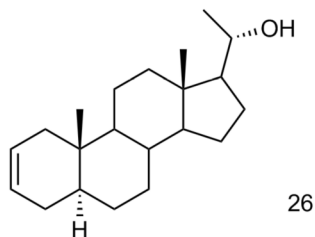
Obr. 40 Chemická struktura studovaných steroidních látek s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru – místo postranního řetězce je na uhlíku C-17β hydroxyskupina. Jedná se o látky č. 13, 27, 9, 10 a 15.



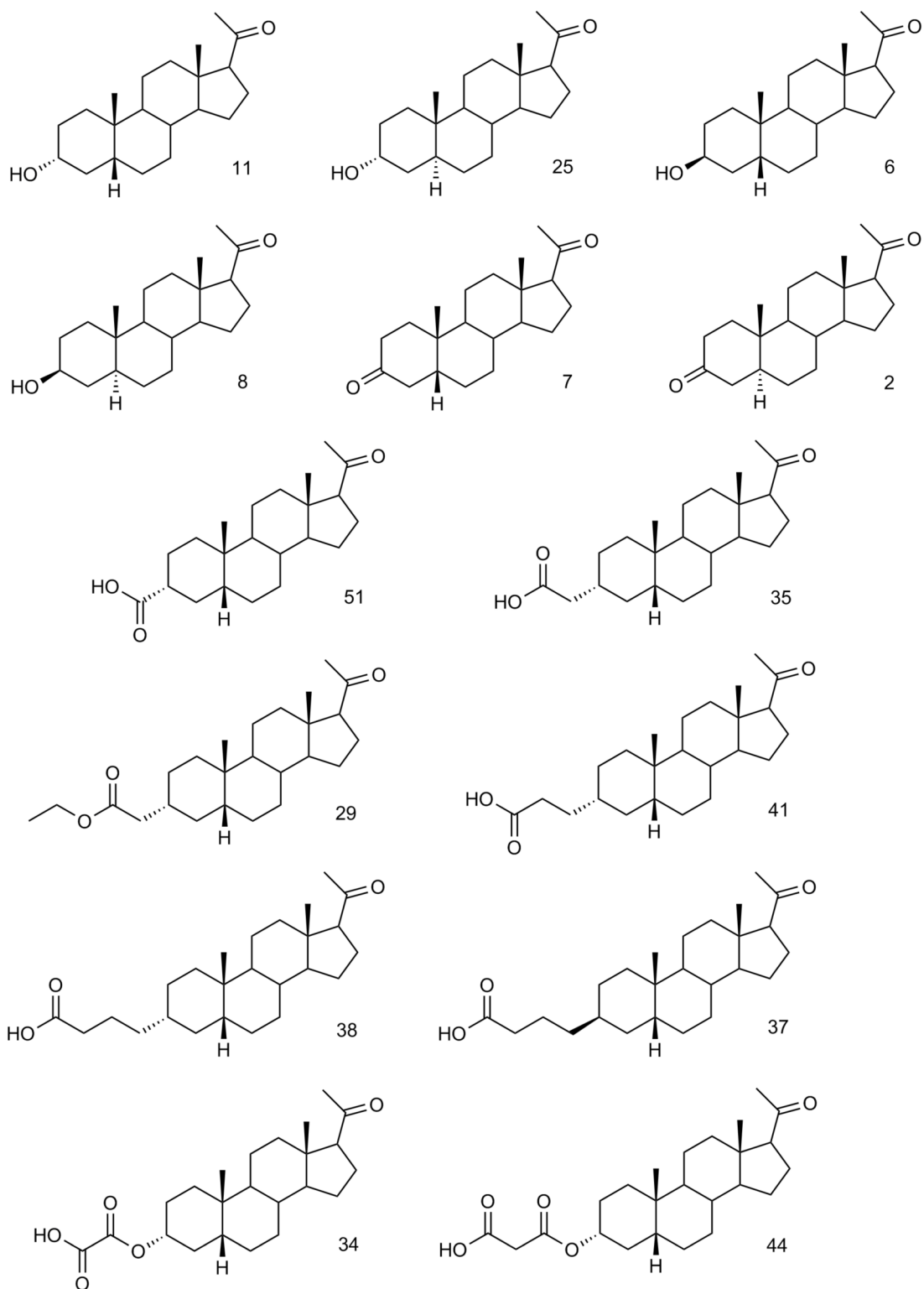
Obr. 41 Chemická struktura studovaných steroidních látek s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru – místo postranního řetězce je na uhlíku C-17 oxoskupina. Jedná se o látky č. 17, 20, 19, 22, 14, 12, 23, 30, 21, 28 a 46.



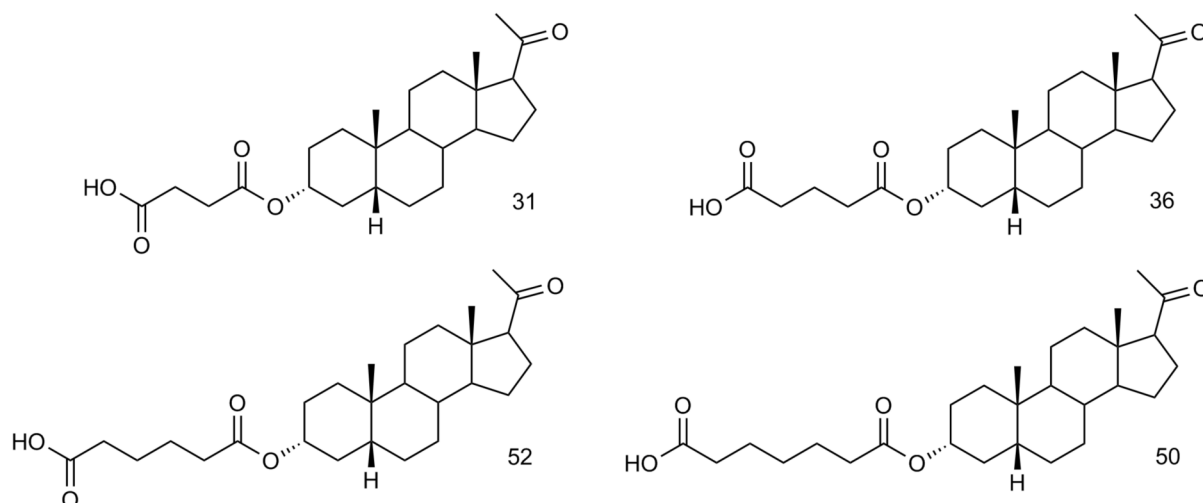
Obr. 42 Chemická struktura studované steroidní látky s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci – postranní řetězec je zkrácen na 1 uhlík, v polohách C-17 β /20 je epoxid. Jedná se o látku č. 16.



Obr. 43 Chemická struktura studované steroidní látky s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci i na steroidním jádru – postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 α je hydroxyskupina. Jedná se o látku č. 26.



Obr. 44 Chemická struktura studovaných steroidních látek s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru – postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 je oxoskupina. Jedná se o látky č. 11, 25, 6, 8, 7, 2, 51, 35, 29, 41, 38, 37, 34 a 44.



Obr. 45 Chemická struktura studovaných steroidních látek s pomyslnou modifikací, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, v postranním řetězci i na steroidním jádru – postranní řetězec je zkrácen na 2 uhlíky, v poloze C-20 je oxoskupina. Jedná se o látky č. 31, 36, 52 a 50.

Studované látky jsme rozpouštěli v DMSO s cílem získat roztoky o koncentraci 30 mM. Vzhledem ke steroidnímu charakteru jsou tyto látky špatně rozpustné ve vodných roztocích, a tudíž nebylo možno některé steroidy rozpustit na požadovanou koncentraci. Proto jsme u těchto špatně rozpustných sloučenin postupně přidávali rozpouštědlo DMSO za účelem získání roztoku testovaných látek o koncentraci 20 mM a 10 mM. V koncentraci 30 mM jsme získali látky č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 41, 46, 50 a 52 (viz Tab. 18). V koncentraci 20 mM jsme obdrželi látky č. 4, 5, 7, 11, 14, 16, 25, 37, 44, 47 a 51. Na koncentraci 10 mM se nám povedlo rozpustit látky č. 1, 2, 3, 8, 13, 15, 18, 23, 26, 29, 42 a 43.

Tab. 18 Přehled maximálních získaných koncentrací studovaných látek.

Koncentrace	Studovaná látka č.
30 mM	6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 41, 46, 50, 52
20 mM	4, 5, 7, 11, 14, 16, 25, 37, 44, 47, 51
10 mM	1, 2, 3, 8, 13, 15, 18, 23, 26, 29, 42, 43

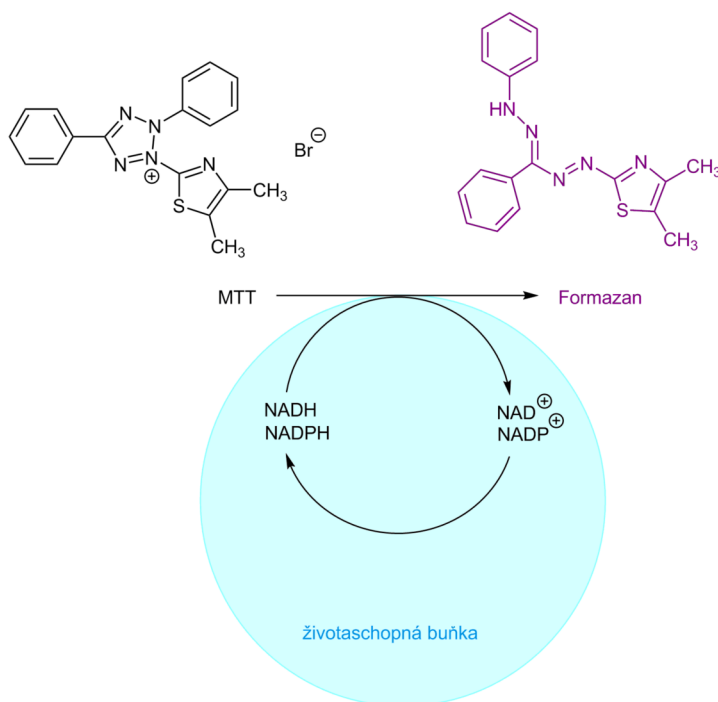
5.2. MTT assay

5.2.1. Princip

MTT assay je *in vitro* metoda, která měří metabolickou aktivitu životaschopných buněk a je vhodná pro kvantifikaci buněčné životaschopnosti a proliferace v závislosti na růstových faktorech, cytokinech, mitogenech a nutrientech. Rovněž se tato metoda používá

k testování cytotoxického efektu sloučenin (Apoptosis, cell death and cell proliferation 2016, In vitro toxicology assay kit MMT based 2016).

Principem této kolorimetrické metody je přeměna nažloutlé tetrazoliové soli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na fialové krystaly formazanu prostřednictvím mitochondriálních dehydrogenáz životaschopných buněk. Pouze životaschopné buňky prostřednictvím systému sukcinát-tetrazolium reduktáza, který náleží do mitochondriálního dýchacího řetězce, štěpí za účasti pyridinových nukleotidových kofaktorů NADH a NADPH tetrazoliový kruh MTT, čímž vznikají fialové krystaly formazanu nerozpustné ve vodných roztocích (viz Obr. 46). Po rozpuštění krystalů vzniká purpurový roztok, ve kterém lze formazan kvantifikovat spektrofotometricky při vlnové délce 550–600 nm (maximální absorbance při 570 nm). Snížení počtu životaschopných buněk způsobí následné snížení vytvořeného množství formazanu, což může poukazovat na stupeň cytotoxicity způsobené zkoušeným materiálem. Naopak nárůst počtu živých buněk vede ke zvýšení jejich metabolické aktivity ve vzorku a k následnému zvýšení množství vzniklého formazanu (Apoptosis, cell death and cell proliferation 2016, In vitro toxicology assay kit MMT based 2016, MTT Cell Proliferation Assay 2011).



Obr. 46 Přeměna MTT na fialový formazan prostřednictvím mitochondriálních dehydrogenáz životaschopných buněk. Vysvětlivky: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid), NAD⁺ (oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid), NADP⁺ (oxidovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát), NADH (redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid), NADPH (redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát). Modifikováno dle: Apoptosis, cell death and cell proliferation 2016.

5.2.2. Pracovní postup

1. Buněčnou linii HepG2 jsme nasadili na 96jamkovou destičku v počtu 10 000 buněk na jednu jamku. Do každé jamky jsme přidali 100 μ l plného média, tzn. DMEM, které obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin a 2 mM glutaminu.
2. Buňky jsme nechali inkubovat po dobu 24 hodin v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂.
3. Po 24 hodinách jsme z buněk odsáli plné médium. Následně jsme do každé jamky přidali 100 μ l předem připraveného roztoku testovaných látek. Tyto roztoky se skládaly z jednotlivých testovaných látek rozpuštěných v DMSO v daných koncentracích a z média DMEM. Pro kontrolu jsme použili roztok DMSO v médiu DMEM o koncentraci 1 %. Dále jsme za účelem kontroly použili roztok SDS o koncentraci 1 %.
4. Buňky jsme inkubovali 24 hodin při 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂.
5. Poté jsme přidali 10 μ l MTT labeling reagent (MTT o koncentraci 5 mg/ml v PBS) do každé jamky.
6. Buňky jsme nechali inkubovat 4 hodiny při 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂. Během této inkubační doby se vytvořily fialové krystaly formazanu nerozpustné ve vodném roztoku.
7. Do každé jamky jsme přidali 100 μ l Solubilization solution (10% SDS v 0,01M HCl) za účelem rozpuštění krystalů formazanu.
8. Buňky jsme nechali 1 hodinu inkubovat při 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂.
9. Zkontrolovali jsme, že jsou krystaly fialového formazanu kompletně rozpuštěny a spektrofotometricky jsme měřili absorbanci vzorků s použitím destičkového spektrofotometru-luminometru BioTek Synergy 2. Pro měření absorbance formazanu jsme použili vlnovou délku 575 nm.
10. Získané výsledky jsme vyhodnotili.

5.3. Gene reporter assay

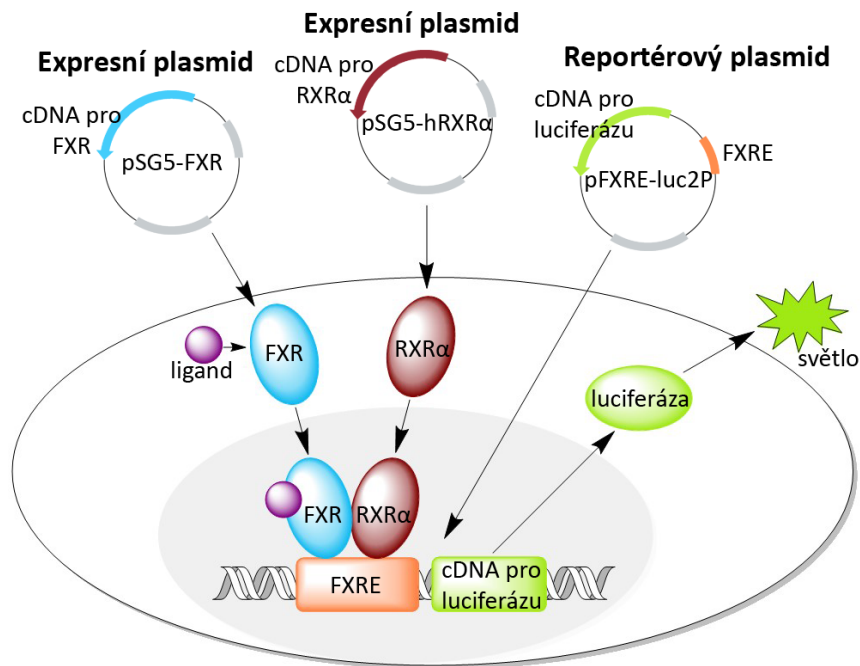
5.3.1. Princip

Metoda gene reporter assay se používá ke studiu genové exprese a buněčných dějů spojených s genovou expresí u eukaryotických buněk. Tuto metodu lze aplikovat na výzkum receptorové aktivity (tak, jako v našem experimentu), transkripčních faktorů, buněčné

signalizace, úprav mRNA (informační/mediátorová RNA, z angl. messenger RNA) či skládání proteinů (Allard a Kopish 2008, Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).

Principem této metody je transfekce expresního vektoru, který zajistí expresi genu pro studovaný receptor do hostitelských buněk, a transfekce reportérového plasmidu, který obsahuje ve své struktuře specifickou vazebnou promotorovou sekvenci pro studovaný receptor, jež je zaklonovaná těsně před reportérový gen. Míra exprese reportérového genu koreluje s transkripční aktivitou sledovaného receptoru. Expresi reportérového genu lze kvantifikovat, a tím vyjádřit aktivitu sledovaného receptoru. Jako hostitelské buňky se nejčastěji používají nádorové buněčné linie, které jsou transientně (přechodně) či stabilně (trvale) transfekovány reportérovým plasmidem (Kameníčková 2012).

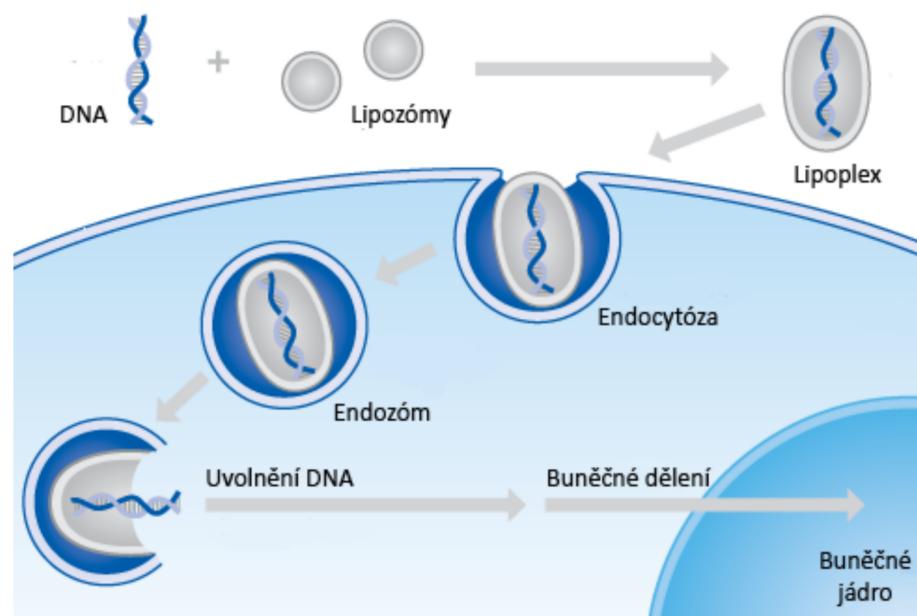
V naší práci jsme metodu gene reporter assay využili pro studium interakcí testovaných steroidů s FXR receptorem. Do buněk linie HepG2 jsme transfekovali dva expresní plasmidy: plasmid pSG5-FXR nesoucí cDNA (kódující/komplementární DNA) lidského nukleárního receptoru FXR a expresní vektor pSG5-hRXR α , který obsahoval kódující DNA sekvenci lidského jaderného retinoidního X receptoru α (RXR α) (viz Obr. 47). Farnesoidní X receptor je ligandy-agonisty aktivovaný transkripční faktor, který se váže na svůj responzivní element FXRE (z angl. FXR responsive elements) jako monomer nebo jako heterodimer s receptorem RXR. FXRE byl obsažen ve struktuře reportérového plasmidu pFXRE-luc2P, který nesl i reportérový gen pro enzym luciferázu pocházející ze světlušek. Po nasednutí transkripčního faktoru se zahajuje exprese reportérového genu pro luciferázu a po dodání substrátu luciferinu dochází k luminiscenci (viz Obr. 47). Pro náš experiment jsme použili systém duálních reportérů Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Vedle tzv. experimentálního reportérového plasmidu pFXRE-luc2P jsme do buněk kotransfekovali také tzv. kontrolní reportérový plasmid pRL-TK nesoucí reportérový gen pro *Renilla* luciferázu (viz Obr. 49). Kvantifikaci luminiscence jsme ověřovali, zda došlo ke zvýšení exprese genu pro luciferázu, která je výsledkem zvýšené transkripční aktivity FXR receptoru aktivovaného ligandem-agonistou.



Obr. 47 Schéma našeho experimentu metodou gene reporter assay. Do buňky jsme transfekovali dva expresní plasmidy: pSG5-FXR nesoucí cDNA farnesoidního X receptoru (FXR) a expresní vektor pSG5h-RXRα, který obsahoval cDNA retinoidního X receptoru α (RXRα) a dva reportérové vektory, z nichž experimentálním plasmidem byl pFXRE-luc2P nesoucí responzivní element FXR (FXRE) a cDNA pro světluškovou luciferázu. FXR aktivovaný ligandem se váže do FXRE jako dimer s RXRα a zahajuje expresi reportérového genu. Vysvětlivky: cDNA (kódující/komplementární deoxyribonukleová kyselina).

Transfekce – lipofekce

Pro transfekci, tedy zavedení cizího genetického materiálu do eukaryotických buněk, lze využít mnoha technik, my jsme zvolili metodu transientní transfekce pomocí kationických lipidů – lipofekci. Principem je tvorba lipozómů s lipidovou dvojvrstvou ve vodných roztocích, do nichž jsou uzavřeny nukleové kyseliny. Vzniklé útvary se nazývají lipoplexy, které aktivně pronikají do buňky endocytózou ve formě endozomů. DNA, která je takto zavedena do cytosolu, ale nemůže proniknout do buněčného jádra. Přístup do jádra je možný až v případě, že se jaderná membrána rozpouští během mitózy (viz Obr. 48) (Transfection 2016).



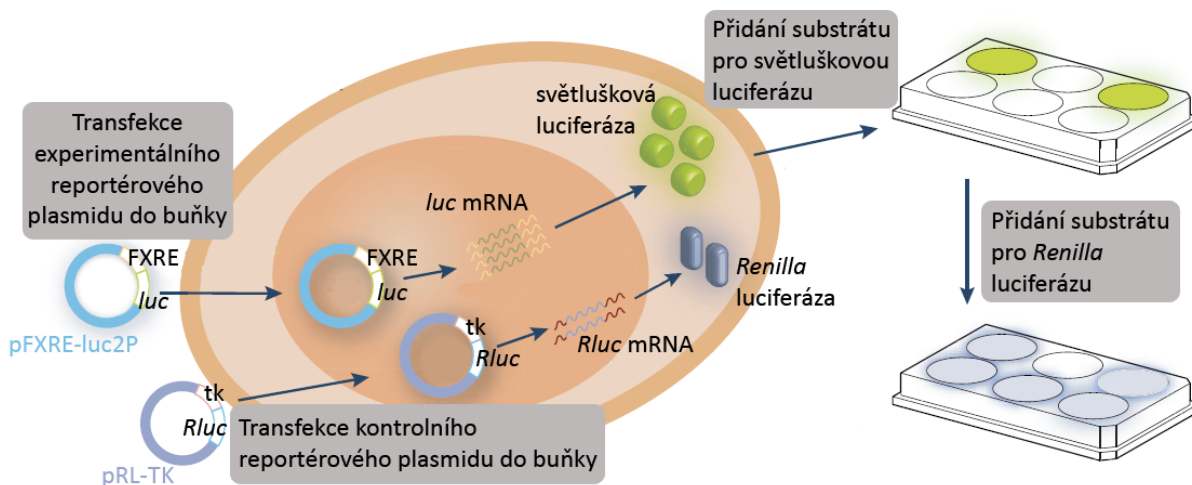
Obr. 48 Transfekce – lipofekce. DNA je uzavřena uvnitř lipozomu, vzniklý lipoplex proniká do buňky endocytózou a DNA se dostává z endozómů do buněčného jádra během buněčného dělení. Vysvětlivky: DNA (deoxyribonukleová kyselina). Modifikováno dle: Transfection 2016.

Pro vložení plasmidových vektorů do hostitelských buněk jsme v našem experimentu použili metodu transientní lipofekce s využitím transfekčního činidla transfectinu (TransFectin™ Lipid Reagent firmy Bio-Rad). Jedná se o kationické lipidové činidlo složené z kationických sloučenin a co-lipidu DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin), které se používá pro transfekci nukleových kyselin do savčích buněk. Komplexy DNA a transfectinu se přidávají přímo na buňky v kultivačním médiu se sérem (ale i bez něj), které mají 40–90% konfluenci. Pro tvorbu komplexů se doporučuje poměr DNA (μg) a transfectaminu (μl) v rozmezí 1 : 2 až 1 : 3 (TransFectin™ Lipid Reagent 2016a, TransFectin™ Lipid Reagent 2016b).

System duálních reportérů

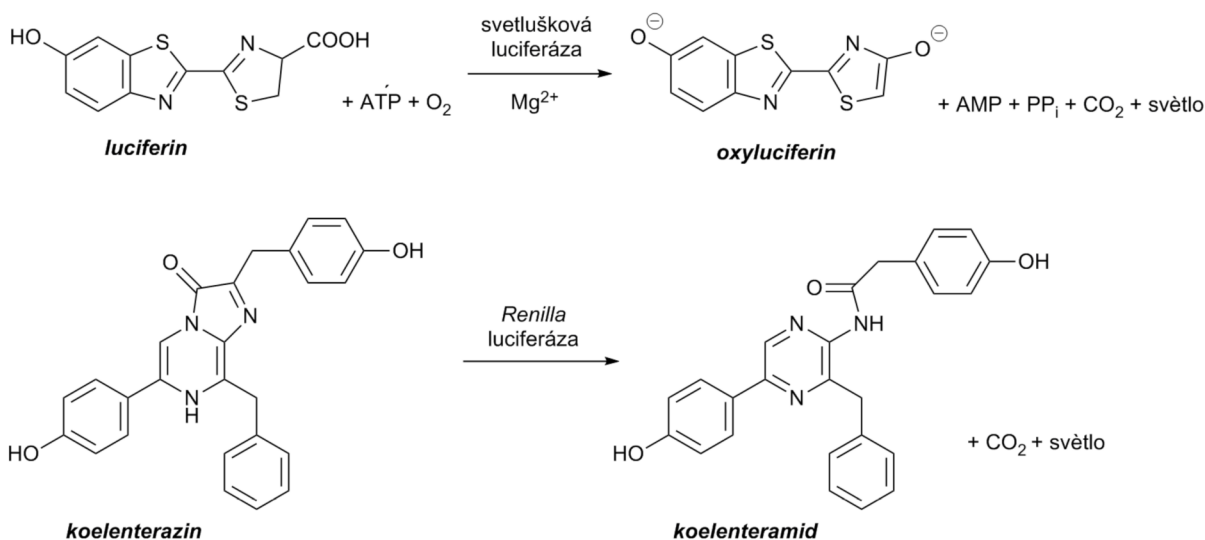
System duálních reportérů Dual-Luciferase® Reporter Assay System umožňuje simultánní expresi a měření dvou samostatných reportérových enzymů (luciferáz) v jednom vzorku (viz Obr. 49) za účelem dosažení přesnějších výsledků. Aktivita experimentálního reportéru koreluje s transkripční aktivitou FXR receptoru, zatímco aktivita kotransfekovaného kontrolního reportéru slouží jako systém vnitřní kontroly. Normalizace aktivity experimentálního reportéru k aktivitě vnitřní kontroly (stanovením jejich poměru) minimalizuje variabilitu experimentu způsobenou rozdíly v buněčné viabilitě, v účinnosti

transfekce, v pipetování objemů či v účinnosti lýzy buněk (Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).



Obr. 49 Systém duálních reportérů. Do buněk jsme transfekovali dva reportérové plasmidy: experimentální (pFXRE-luc2P), nesoucí responzivní element farnesoidního X receptoru (FXRE) a gen pro světluškovou luciferázu (*luc*), a kontrolní vektor (pRL-TK), obsahující gen pro *Renilla* luciferázu (*Rluc*) a konstitutivní promotor (tk). Po nasednutí farnesoidního X receptoru (FXR) do FXRE došlo k zahájení exprese reportérového genu pro světluškovou luciferázu a po dodání substrátu došlo k luminiscenci, kterou jsme kvantifikovali. Po přidání substrátu pro *Renilla* luciferázu jsme luminiscenční signál rovněž detekovali za účelem vnitřní kontroly. Modifikováno dle: Allard a Kopish 2008.

První reportérový vektor, tzv. experimentální reportérový plasmid, obsahuje v těsné blízkosti specifické vazebné promotorové oblasti pro studovaný receptor reportérový gen pro enzym luciferázu pocházející ze světlušek (*Photinus pyralis*). Enzym světlušková luciferáza je 61kDa monomerní protein, který katalyzuje oxidační reakci za vzniku světelného záblesku. Emise fotonu je dosaženo prostřednictvím oxidace světluškového luciferinu. Tato reakce vyžaduje přítomnost Mg^{2+} , ATP (adenosintrifosfát) a O_2 (viz Obr. 50). Světlušková luciferáza pro svou enzymovou aktivitu nevyžaduje post-translační modifikaci, a tudíž účinkuje jako genový reportér ihned po translaci (Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).



Obr. 50 Luminiscenční reakce katalyzované enzymy světluškovou luciferázou a *Renilla* luciferázou. Vysvětlivky: ATP (adenosin trifosfát), AMP (adenosin monofosfát), PP_i (difosfátový P₂O₇⁴⁻ ion). Modifikováno dle: Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).

Druhý reportérový vektor, tzv. kontrolní reportérový plasmid, obsahuje reportérový gen pro enzym *Renilla* luciferázu, který je původem ze svítivých korálnatců renil fialových (*Renilla reniformis*). Enzym *Renilla* luciferáza je 36kDa monomerní protein, který katalyzuje oxidaci koelenterazinu za vzniku světla. Tato autoluminiscenční reakce vyžaduje přítomnost O₂ (viz Obr. 50). *Renilla* luciferáza rovněž nevyžaduje post-translační modifikaci, a tudíž účinkuje jako genový reportér ihned po translaci. Světlušková a *Renilla* luciferáza jsou rozdílného evolučního původu, a proto mají tyto enzymy odlišnou strukturu a odlišné požadavky na substrát. Tyto rozdíly umožňují měření luminiscence světluškové luciferázy a následně luminiscence *Renilla* luciferázy, přičemž jednotlivé signály lze selektivně rozlišit (Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2015).

Expresi obou genů pro enzymy luciferázy lze postupně detekovat chemoluminiscenčně. Vyzařované světlo má v případě světluškové luciferázy vlnovou délku 560 nm a zelenožlutou barvu, v případě *Renilla* luciferázy 480 nm a modrou barvu. Intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná ke koncentraci enzymu luciferázy (Using the Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader to Run the Dual-Luciferase® Reporter Assay System 2006).

V našem experimentu jsme nejdříve měřili luminiscenci světluškové luciferázy. Stabilizovaný luminiscenční signál vznikl po přidání Luciferase Assay Reagentu II – substrátu pro světluškovou luciferázu. Po kvantifikaci jsme tento signál v jednom kroku zhasili a zároveň přidali substrát pro *Renilla* luciferázu pomocí Stop & Glo® Reagentu. Takto vznikl

druhý luminiscenční signál, který jsme opět změřili. Kvantifikací exprese reportérového genu jsme vyjádřili aktivitu FXR receptoru, respektive míru interakce studovaných ligandů s FXR receptorem (Dual-Luciferase® Reporter Assay and Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay Systems 2009).

Materiál

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

pSG5-hRXR α – expresní plasmid nesoucí cDNA lidského retinoidního X receptoru α (RXR α)

pFXRE-luc2P – experimentální 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 – kontrolní reportérový plasmid obsahující reportérový gen pro Renilla luciferázu

5.3.2. Pracovní postup

1. Buněčnou linii HepG2 jsme nasadili na 48jamkovou destičku v počtu 40 000 buněk na jednu jamku (o ploše 1 cm²). Přidali jsme do každé jamky 250 μ l plného média, tzn. DMEM, jež obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin a 2 mM glutaminu.
 2. Buňky jsme nechali inkubovat po dobu 24 hodin v buněčném inkubátoru temperovaném na teplotu 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂.
 3. Před transfekcí jsme vyměnili staré plné médium za nové plné médium (200 μ l).
 4. Vypočítali jsme si potřebné množství DNA plasmidů a transfektinu.
 5. Pro vlastní transfekci jsme si připravili 60 μ l transfekční směsi na jamku, ta se skládala ze dvou částí:
 - a) První část byla složena z 30 μ l média Opti-MEM s obsahem plasmidů pSG5-FXR (90 ng na jamku), pSG5-hRXR α (40 ng na jamku), pFXRE-luc2P (150 ng na jamku) a pRL-TK (40 ng na jamku).
 - b) Druhá část obsahovala 30 μ l Opti-MEM média a transfektinu (v poměru 2 : 1 k DNA plasmidům).
- Po pěti minutách jsme obě části smíchali a nechali inkubovat 20 minut za pokojové teploty s občasným protřepáním. Následně jsme pipetovali 60 μ l této transfekční směsi na jamku.
6. Inkubovali jsme 24 hodin při 37 °C, v atmosféře 5% CO₂.

7. Po inkubaci jsme odstranili médium, přidali 150 μ 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 ‰.
8. Poté následovala 24 hodinová inkubace v temperovaném buněčném CO₂ inkubátoru.
9. Následně jsme odstranili z buněk roztoky a opláchli buňky pomocí destilované vody.
10. Přidali jsme Passive lysis buffer o objemu 100 μ l na jamku a nechali jsme destičku zmrazit. Vzniklé krystaly zlyzovaly buňky.
11. Na 96jamkovou destičku jsme po rozmrazení z každé jamky pipetovali 40 μ l lyzátu a 40 μ l Luciferase Assay Reagentu II, neboli luminolu (připraveného z 10 ml Luciferase Assay Buffer II a lyofylizátu Luciferase Assay Substrate).
12. Následovala analýza chemiluminiscence na destičkovém spektrofotometru-luminometru (BioTek Synergy 2). Jako první jsme analyzovali luminiscenci světluškové luciferázy.
13. Přidali jsme 20 μ l Stop & Glo® Reagentu (připraveného z Stop & Glo® Buffer a Stop & Glo® Substrate v poměru 49 : 1). Následně jsme analyzovali chemoluminiscenci Renilla luciferázy na destičkovém spektrofotometru-luminometru (BioTek Synergy 2).
14. Získaná data jsme vyhodnotili.

5.4. Statistická analýza dat

Pro statistické vyhodnocení výsledků z metody gene reporter assay (*I. experiment*) jsme použili program *GraphPad Prism 6.01 Trial* (2012).

Použili jsme analýzu rozptylu (ANOVA) s post-Dunnettovým testem. Statistická významnost na úrovni $p < 0,0001$ je vyznačena v grafech *.

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

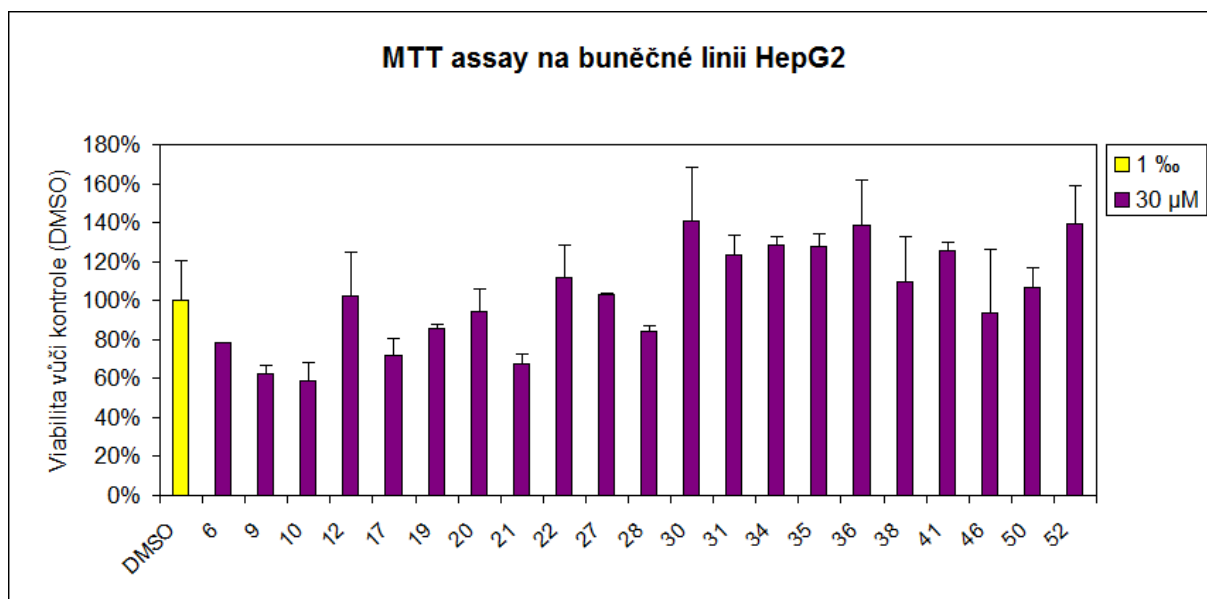
6. Výsledky

6.1. MTT assay

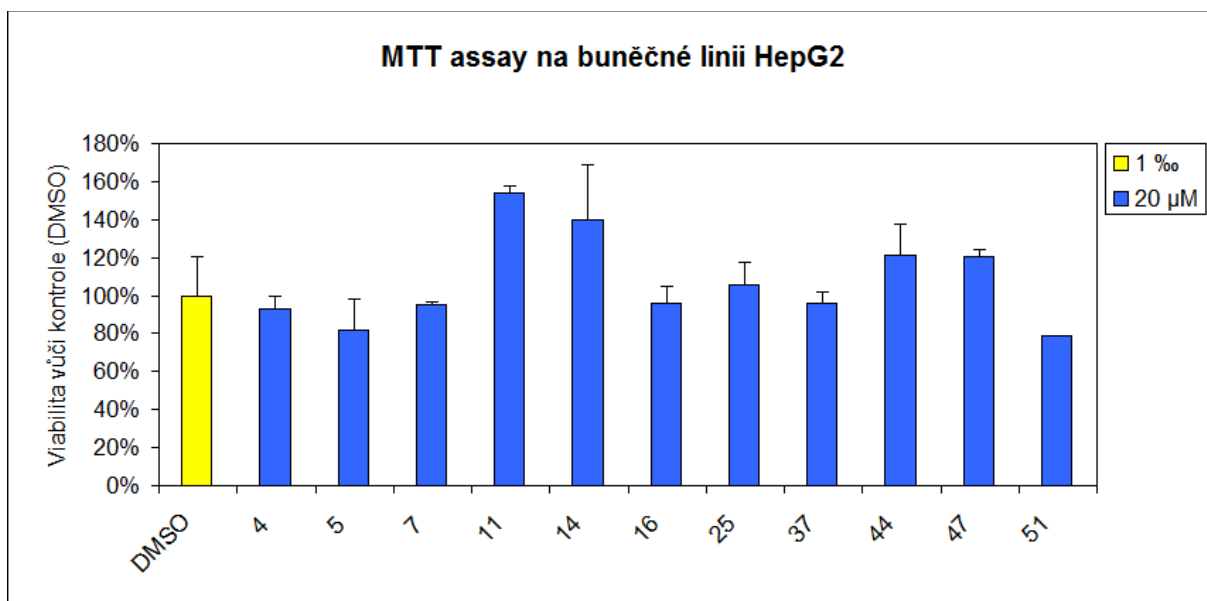
Pomocí testu MTT assay jsme hodnotili u studovaných sloučenin vliv na buněčnou životaschopnost a proliferaci buněk či cytotoxický efekt na buněčné linii HepG2 (viz Obr. 51, 52 a 53).

Testované látky jsme umístili na 96jamkovou destičku v duplikátu, vždy v nejvyšší dosažené koncentraci: 30 μ M (látky č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 41, 46, 50, 52), 20 μ M (látky č. 4, 5, 7, 11, 14, 16, 25, 37, 44, 47, 51) a 10 μ M (látky č. 1, 2, 3, 8, 13, 15, 18, 23, 26, 29, 42, 43). Jako kontrolní vzorek jsme použili roztok DMSO v médiu DMEM o koncentraci 1 ‰ ve čtyřech jamkách. Buňky byly vystaveny vlivu testovaných látek po dobu 24 hodin.

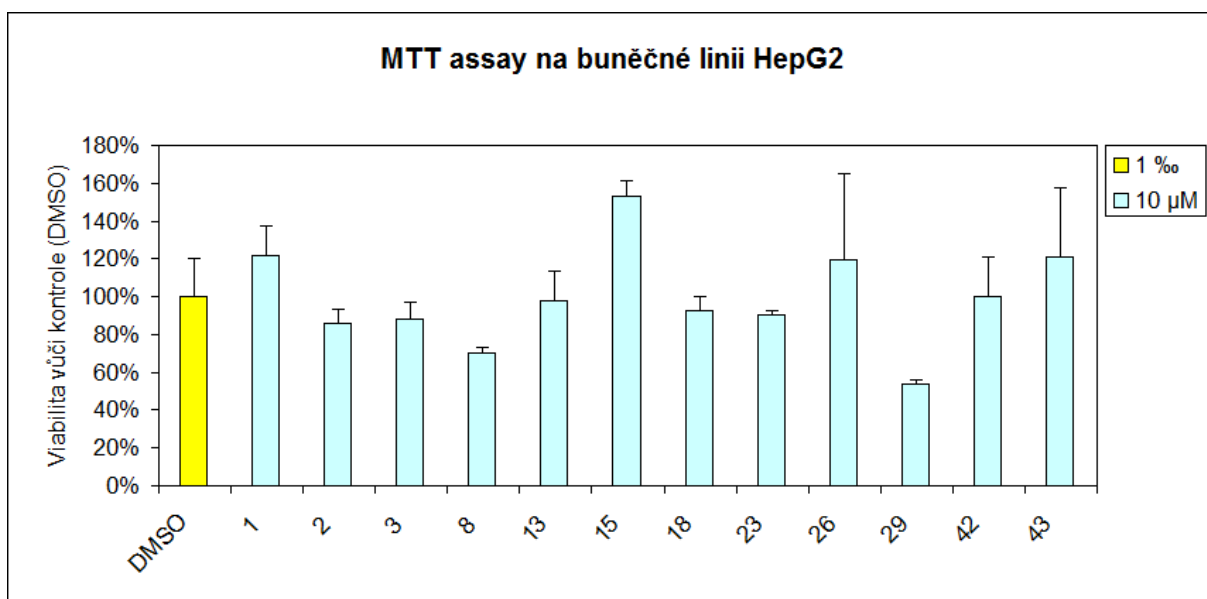
Výsledky tohoto experimentu nebyly podrobeny statistické analýze, neboť měly pouze informativní charakter pro další experiment. Experiment byl proveden jednou.



Obr. 51 Test metodou MTT assay u látek (č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 41, 46, 50 a 52) na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchylky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid).



Obr. 52 Test metodou MTT assay u látek (č. 4, 5, 7, 11, 14, 16, 25, 37, 44, 47 a 51) na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchytky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid).



Obr. 53 Test metodou MTT assay u látek (č. 1, 2, 3, 8, 13, 15, 18, 23, 26, 29, 42 a 43) na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchytky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: DMSO (dimethylsulfoxid), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid).

V tomto experimentu jsme pozorovali pokles viability buněk (vzhledem ke kontrole s 1 ‰ DMSO) u látek č. 6, 9, 10, 17, 19, 20, 21, 28 a 46 (30 μM); u látek č. 4, 5, 7, 16, 37 a 51

(20 μM) a u látek č. 2, 3, 8, 13, 18, 23 a 29 (10 μM). Naopak zvýšená viabilita buněk nad 140 % vůči kontrole byla zjištěna u látek č. 30 (30 μM), 11 (20 μM) a 15 (10 μM).

I přes pozorovaný pokles viability buněk u výše uvedených studovaných látek jsme přikročili k jejich dalšímu testování, neboť u většiny látek v uvedených koncentracích a při době expozice 24 hodin (v následujících experimentech je v pracovních postupech stanovena doba expozice rovněž 24 hodin) nebyl pozorovaný pokles buněčné životaschopnosti výrazný.

6.2. Gene reporter assay

Metodu gene reporter assay jsme využili pro dva experimenty provedené na buněčné linii HepG2. V prvním experimentu jsme testovali všech 44 studovaných látek v jedné maximální získané koncentraci. Účelem tohoto experimentu bylo zjistit, zda po inkubaci buněk s testovanými látkami došlo ke zvýšení transkripční aktivity exprimovaného receptoru FXR (resp. luminiscence luciferázy z reportérového plasmidu) ve srovnání s kontrolou (DMSO o koncentraci 1 %), tedy jestli testované látky mají potenciál být ligandy-agonisty FXR receptoru. Tento první experiment nám posloužil jako tzv. základní screening a na základě výsledků tohoto experimentu jsme provedli výběr látek do dalšího testování.

V druhém experimentu jsme ověřovali, zda jsou vybrané testované látky č. 4 a 42 ligandy-agonisté FXR receptoru a pozorovali, zda je jejich účinek závislý na koncentraci.

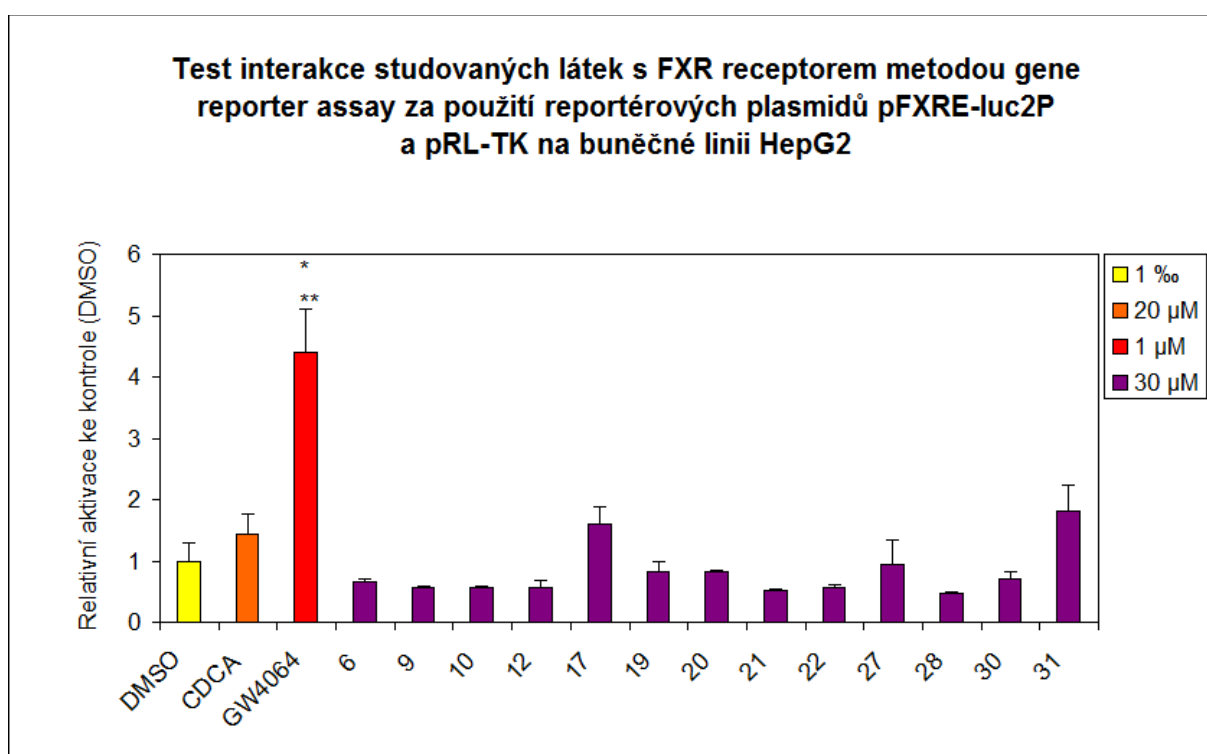
I. experiment – základní screening

Realizovali jsme sérii experimentů za použití buněčné linie HepG2 a 48jamkových destiček. Do přítomných buněk jsme vždy transfekcí vnesli oba expresní vektory pSG5-FXR kódující gen pro lidský nukleární FXR receptor a pSG5-hRXR α nesoucí cDNA lidského retinoidního X receptoru α (RXR α) i oba reportérové plasmidy pFXRE-luc2p a pRL-TK.

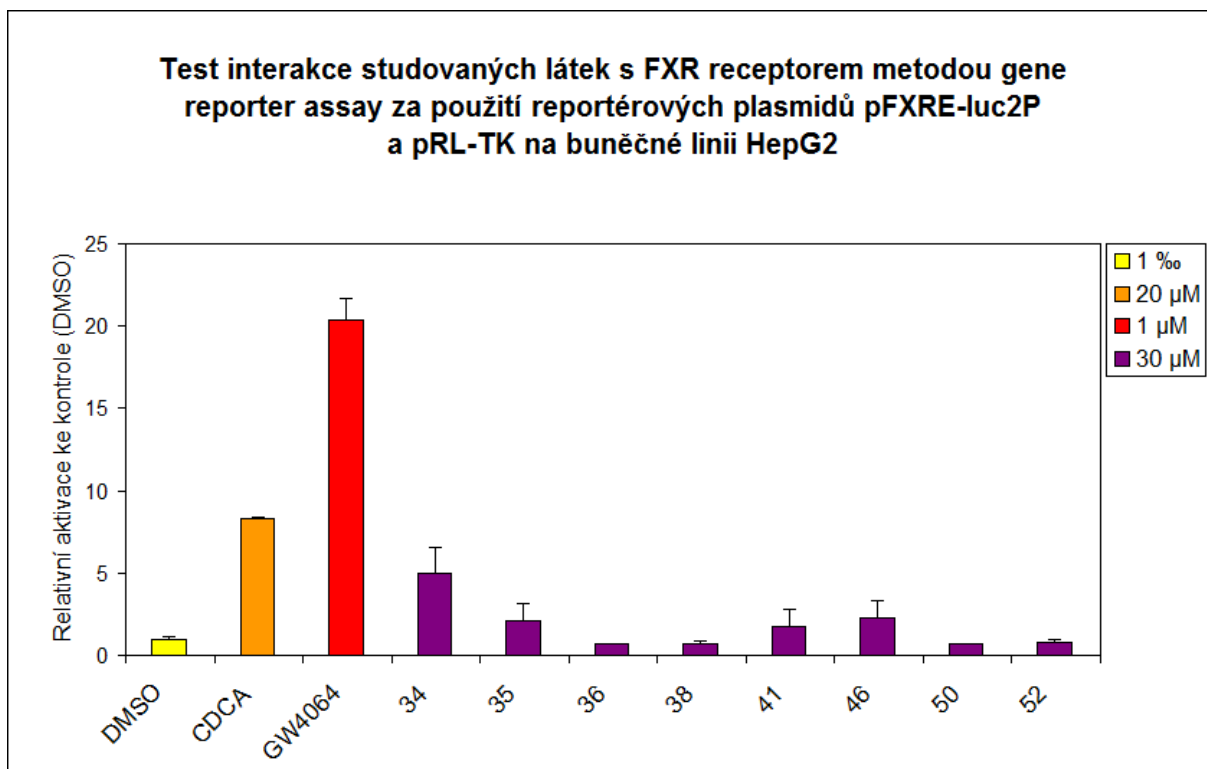
Studované látky jsme testovali v triplicátech (látky č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31) či v duplikátech (ostatní látky), vždy v jedné maximální získané koncentraci: 30 μM (látky č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 41, 46, 50, 52), 20 μM (látky č. 4, 5, 7, 11, 14, 16, 25, 37, 44, 47, 51) a 10 μM (látky č. 1, 2, 3, 8, 13, 15, 18, 23, 26, 29, 42, 43). U každého experimentu jsme jako pozitivní kontrolu použili dvě látky, které jsou známými ligandy-agonisty FXR receptoru. Jednalo se o sloučeninu GW4064 v koncentraci 1 μM a o látku CDCA (kyselina chenodeoxycholová) v koncentraci 20 μM . Tyto látky jsme testovali v duplikátu či triplicátu. Jako kontrolní vzorek jsme rovněž použili roztok DMSO v DMEM médiu o koncentraci 1 %, také v duplikátu či triplicátu. Buňky byly

vystaveny vlivu testovaných látek po dobu 24 hodin. Měřítkem interakce testovaných látek s FXR receptorem je poměr luminiscencí světluškové a *Renilla* luciferázy u testovaných látek vzhledem k tomuto poměru u kontroly – 1‰ DMSO (viz Obr. 54, 55, 56, 57 a 58).

Statistickou analýzu bylo možno provést jen u prvního ze série experimentů (viz Obr. 54), kde byly látky (č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30 a 31) testovány v triplicátech. U dalších experimentů nebylo možno statistické vyhodnocení provést, neboť látky byly testovány v duplikátech. Všechny experimenty byly provedeny jednou.

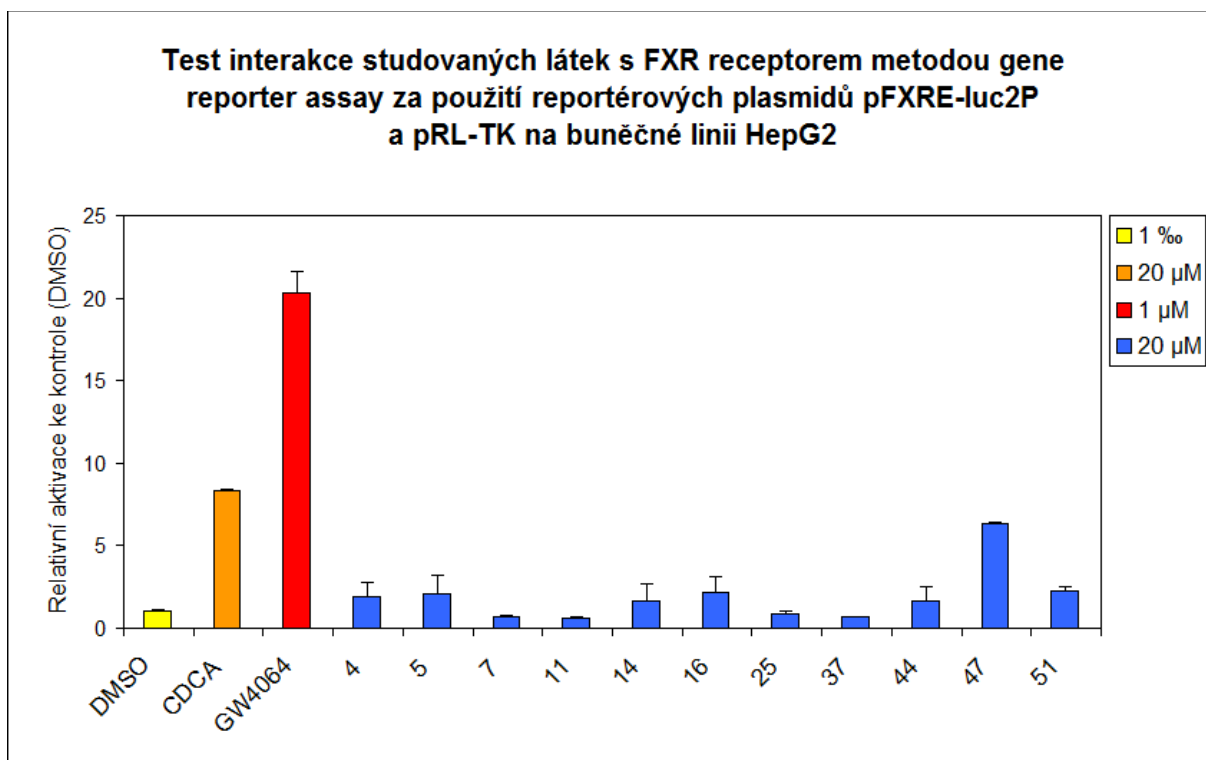


Obr. 54 Test interakce studovaných látek (č. 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30 a 31) s FXR receptorem metodou gene reporter assay za použití reportérových plasmidů pFXRE-luc2P a pRL-TK na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchytky v grafu představují směrodatnou odchytku. Statistická významnost na úrovni $p < 0,0001$ je značena * (ANOVA) a na úrovni $p < 0,05$ ** (nepárový t-test). Vysvětlivky: FXR (farnesoidní X receptor), DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).



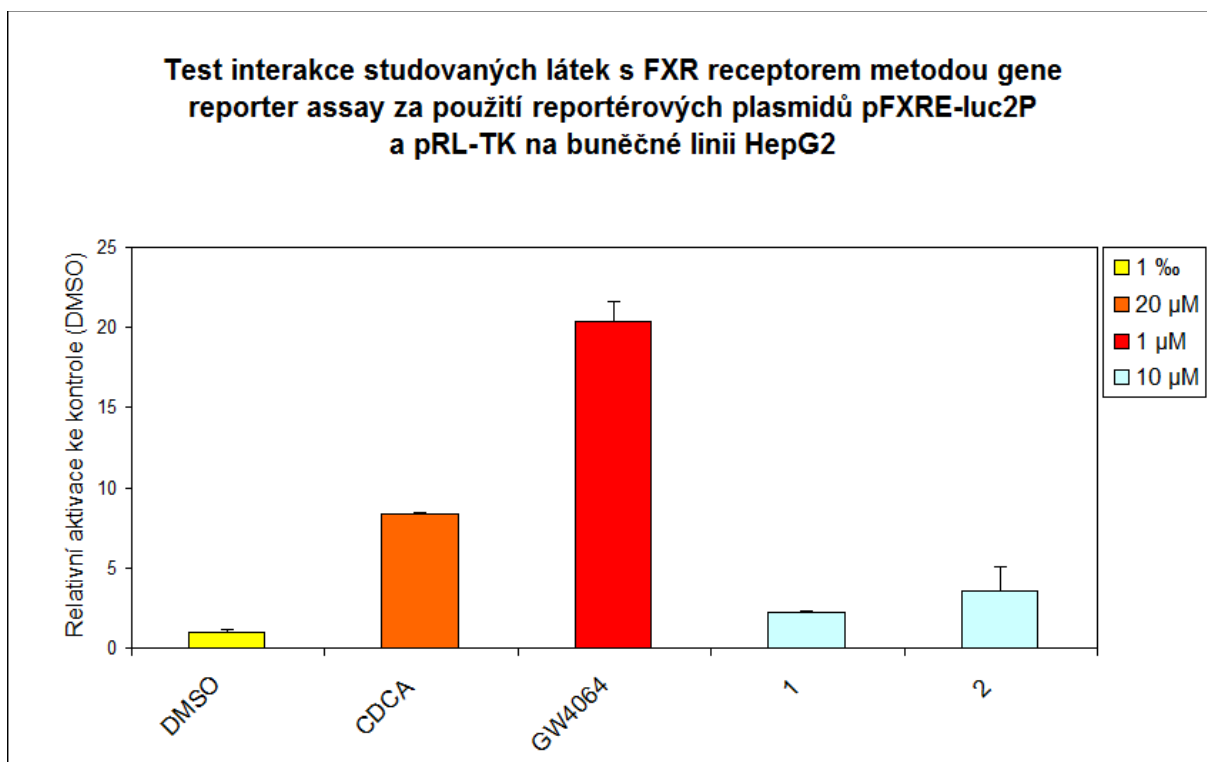
Obr. 55 Test interakce studovaných látek (č. 34, 35, 36, 38, 41, 46, 50 a 52) s FXR receptorem metodou gene reporter assay za použití reportérových plasmidů pFXRE-luc2P a pRL-TK na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchylky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: FXR (farnesoidní X receptor), DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).

Zvýšenou transkripční aktivitu lidského nukleárního receptoru FXR (oproti kontrole 1‰ DMSO) jsme pozorovali u několika testovaných sloučenin získaných v maximální koncentraci 30 µM. Jedná se o látky č. 17, 31, 34, 35, 41 a 46.

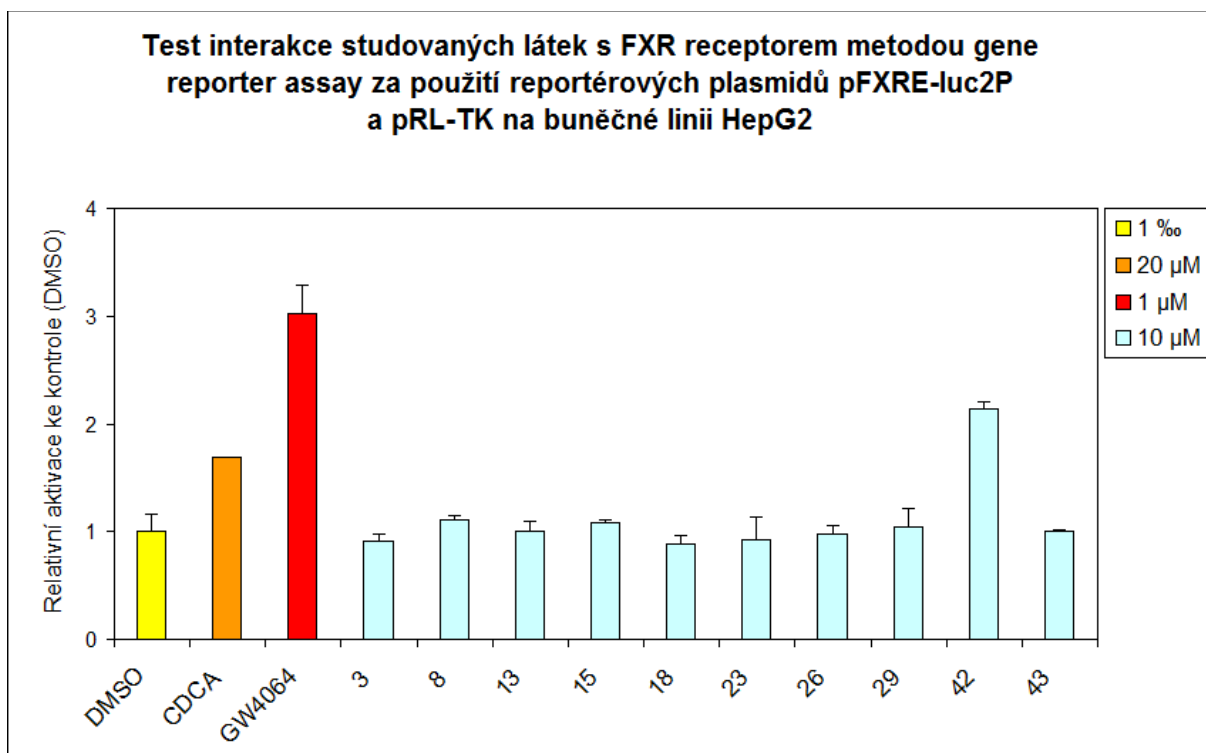


Obr. 56 Test interakce studovaných látek (č. 4, 5, 7, 11, 14, 16, 25, 37, 44, 47 a 51) s FXR receptorem metodou gene reporter assay za použití reportérových plasmidů pFXRE-luc2P a pRL-TK na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchylky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: FXR (farnesoidní X receptor), DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).

V experimentu, ve kterém byly testovány látky získané v maximální koncentraci 20 μM, jsme pozorovali zvýšení transkripční aktivity FXR receptoru (vzhledem ke kontrole s 1‰ DMSO) u látek č. 4, 5, 14, 16, 44, 47 a 51.



Obr. 57 Test interakce studovaných látek (č. 1 a 2) s FXR receptorem metodou gene reporter assay za použití reportérových plasmidů pFXRE-luc2P a pRL-TK na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchylky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: FXR (farnesoidní X receptor), DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).



Obr. 58 Test interakce studovaných látek (č. 3, 8, 13, 15, 18, 23, 26, 29, 42 a 43) s FXR receptorem metodou gene reporter assay za použití reportérových plasmidů pFXRE-luc2P a pRL-TK na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchytky v grafu představují směrodatnou odchytku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: FXR (farnesoidní X receptor), DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).

V následujících experimentech, v nichž byly testovány látky získané v maximální koncentraci 10 μM, jsme pozorovali aktivaci reportérových plasmidů prostřednictvím nukleárního receptoru FXR (oproti kontrole 1‰ DMSO) u látek č. 1, 2, 8, 15, 29 a 42.

V tomto *I. experimentu* jsme identifikovali látky, které interagují s lidským FXR a mohly by vystupovat jako jeho ligandy-agonisté. Zajímavé byly hodnoty u testovaných látek č. 17 a 31 (v koncentraci 30 μM) a především u látky č. 42 (v koncentraci 10 μM), které převyšovaly míru aktivace FXR receptoru způsobenou jeho známým agonistou CDCA v koncentraci 20 μM. Nicméně výsledky u látek č. 17 a 31 nebyly statisticky signifikantní a v experimentu s látkou č. 42 nemohla být provedena statistická analýza. Přesto však byla látka č. 42, na základě pozoruhodně vysoké míry aktivace FXR, vybrána pro další testování.

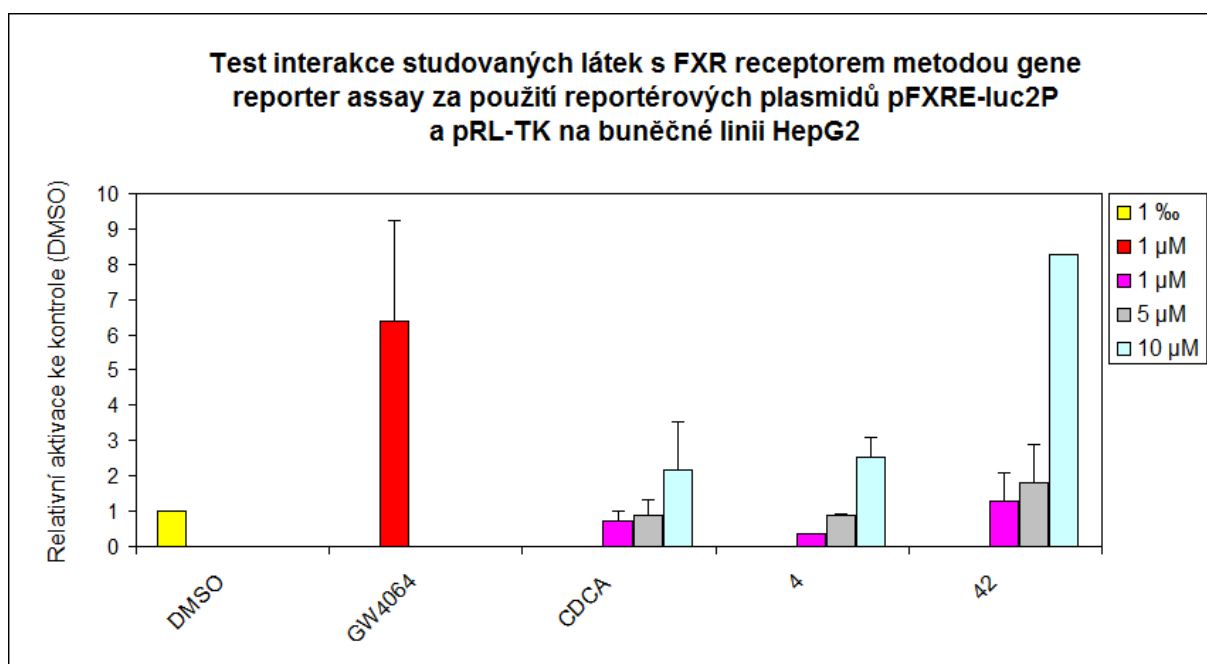
II. experiment – koncentrační závislost

Metodu gene reporter assay jsme následně využili k otestování účinku závislém na koncentraci u vybraných studovaných látek (č. 4 a 42). Látka č. 42 byla vybrána na základě základního screeningu látek, který jsme provedli v *I. experimentu*. Látka č. 4 byla vybrána na

základě pozorované schopnosti aktivovat FXR v *I. experimentu* a zejména na základě chemické struktury. Pro tento experiment byly použity opět buňky linie HepG2 na 48jamkových destičkách, do kterých byly transfekovány expresní plasmidy pSG5-FXR a pSG5-hRXR α i oba reportérové plasmidy pFXRE-luc2p a pRL-TK.

Látky jsme studovali v koncentraci 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M vždy v duplikátu. Pro kontrolu jsme použili látku GW4064 v koncentraci 1 μ M, která je známým ligandem-agonistou FXR receptoru, pipetovali jsme ji do dvou jamek. Dále jsme jako pozitivní kontrolu použili známého agonistu FXR receptoru kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA) rovněž ve třech koncentracích 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M, opět v duplikátu. Pro kontrolu jsme použili roztok DMSO v DMEM o koncentraci 1 ‰ také ve dvou jamkách. Buňky byly vystaveny vlivu testovaných látek po dobu 24 hodin (viz Obr. 59).

U *II. experimentu* nebylo možno provést statistickou analýzu, neboť látky byly testovány v duplikátech. Experiment byl proveden jednou.



Obr. 59 Test interakce studovaných látek (č. 4 a 42) s FXR receptorem v závislosti na jejich koncentraci metodou gene reporter assay za použití reportérových plasmidů pFXRE-luc2P a pRL-TK na buněčné linii HepG2. Buňky byly exponovány testovaným látkám 24 hodin v koncentracích uvedených v grafu. Odchylky v grafu představují směrodatnou odchylku. Statistická analýza nebyla provedena. Vysvětlivky: FXR (farnesoidní X receptor), DMSO (dimethylsulfoxid), CDCA (kyselina chenodeoxycholová).

V tomto *II. experimentu* zaměřeném na testování interakcí studovaných látek s FXR receptorem v závislosti na jejich koncentraci jsme pozorovali zvýšení transkripční aktivity

FXR receptoru u látky č. 4 v koncentraci 10 μM a u látky č. 42 ve všech testovaných koncentracích (1 μM , 5 μM , 10 μM) vzhledem ke kontrole s 1% DMSO. Naměřená hodnota u látky č. 4 v koncentraci 10 μM převyšovala míru aktivace FXR způsobenou CDCA v příslušné koncentraci (10 μM) a nepatrné zvýšení transkripční aktivity FXR jsme také pozorovali v koncentraci 5 μM vzhledem k CDCA v dané koncentraci (5 μM). Zvlášť zajímavé jsou výsledky u látky č. 42, která v každé ze tří testovaných koncentrací (1 μM , 5 μM a 10 μM) převyšovala míru aktivace FXR receptoru způsobenou kyselinou chenodeoxycholovou v odpovídajících koncentracích (1 μM , 5 μM a 10 μM). U látky č. 42 v koncentraci 10 μM lze také pozorovat hodnotu pozoruhodně převyšující míru aktivace FXR receptoru způsobenou agonistou GW4064 (v koncentraci 1 μM).

7. Diskuze

Cílem této experimentální rigorózní práce bylo studium interakcí vybraných 44 steroidních sloučenin (ze skupiny steroidních hormonů, neuroaktivních steroidů, látek odvozených od žlučových kyselin a dalších) s lidským farnesoidním X receptorem (FXR) na lidské hepatomové buněčné linii HepG2. Pro tento cíl byla využita metoda gene reporter assay, pomocí níž jsme realizovali dva experimenty: *I. experiment*, který posloužil jako tzv. základní screening interakcí s FXR receptorem a *II. experiment*, ve kterém jsme testovali účinek závislý na koncentraci u vybraných látek. Vliv jednotlivých steroidních sloučenin na buněčnou viabilitu jsme testovali pomocí metody MTT assay na buněčné linii HepG2.

FXR receptor je ligandy-aktivovaný transkripční faktor patřící do superrodiny nukleárních receptorů. FXR se váže na svůj responzivní element (FXRE) jako monomer nebo jako heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), což vede k aktivaci transkripce cílových genů. FXR pozitivně či negativně reguluje širokou škálu cílových genů účastnících se udržování homeostázy žlučových kyselin, cholesterolu, lipidů a metabolismu glukózy. FXR dále transkripčně reguluje geny podílející se na regulaci imunitní odpovědi, na rozvoji zánětu, na udržení intestinální bariérové funkce a geny kontrolující koagulaci a remodelaci cévní stěny (Adorini et al. 2012, Carr a Reid 2015, Hollman et al. 2012).

Farnesoidní X receptor získal své pojmenování na základě výzkumu skupiny vědců Forman et al. (1995), která objevila, že je aktivován farnesolem, a stal se tedy adoptovaným sirotčím receptorem. Teprve později bylo třemi na sobě nezávislými vědeckými skupinami (Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999) objasněno, že endogenními ligandy FXR jsou žlučové kyseliny, neboť aktivují FXR ve fyziologických koncentracích, a FXR tedy získal nové označení BAR (receptor pro žlučové kyseliny, z angl. bile acid receptor) (Forman et al. 1995, Makishima et al. 1999, Parks et al. 1999, Wang et al. 1999).

Vzhledem k tomu, že aktivita FXR je regulována ligandy, které mohou snadno prostupovat buněčnou membránou, je tento receptor ideálním cílem léčiv. Četné studie vedly k identifikaci dalších jak přírodních, tak i (polo)syntetických ligandů agonistů i antagonistů se steroidním i nesteroidním strukturním základem.

V naší práci jsme studovali řadu látek ze skupiny steroidních sloučenin, které jsou svou strukturou podobné žlučovým kyselinám, steroidní hormony, látky jim strukturně podobné, neuroaktivní steroidy a další steroidní sloučeniny.

Žlučové kyseliny jsou konečnými produkty katabolismu cholesterolu. Udržují cholesterol v roztoku ve formě micel a v tenkém střevě napomáhají trávení lipidů. U člověka jsou přítomny primární žlučové kyseliny: kyselina chenodeoxycholová (CDCA) a kyselina

cholová (CA), které jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech, sekundární žlučové kyseliny: kyselina deoxycholová (DCA) a kyselina lithocholová (LCA), které jsou tvořeny střevními bakteriemi z primárních žlučových kyselin a jedna terciární žlučová kyselina: kyselina ursodeoxycholová (UDCA), která je syntetizována v játrech z příslušné sekundární žlučové kyseliny. Žlučové kyseliny jsou endogenními ligandy FXR receptoru ve fyziologických koncentracích, nejsilněji jej aktivuje CDCA. Pro aktivaci FXR je klíčová základní steroidní kostra (5 β -cholan-24-ová kyselina), s typicky *cis*-orientovaným kruhem A díky atomu vodíku orientovanému v β -konfiguraci v poloze C-5. Kvůli tomu nemá steroidní kostra žlučových kyselin plochou strukturu, naopak mají jednu konvexní (vypouklou) hydrofobní a druhou konkávní (dutou) hydrofilní stranu, což jim umožňuje těsně zapadnout do ligand-vazebné kapsy FXR. Žlučové kyseliny zaujímají v ligand-vazebné kapse FXR obrácenou orientaci oproti vazbě jiných steroidních hormonů na své příslušné jaderné receptory (Huang et al. 2010, Koolman a Röhm 2012, Lew et al. 2004, Modica et al. 2010, Mi et al. 2003, Wang et al. 1999).

Z přirozených žlučových kyselin se jako léčiva pro léčbu onemocnění jater a dalších souvisejících nemocí používají kyselina ursodeoxycholová, kyselina cholová a kyselina chenodeoxycholová. Modifikacím žlučových kyselin byl v posledních letech věnován intenzivní výzkum s cílem získat více selektivní a účinnější agonisty FXR, které by měly jako léčiva lepší vlastnosti. Z analogů žlučových kyselin se v současné době jako lék v klinické praxi používá kyselina obeticholová. První léčivý přípravek s kyselinou obeticholovou byl v Evropské Unii (včetně České republiky) zaregistrován v roce 2016 jako tzv. orphan drug, a to k léčbě primární biliární cholangitidy (označované též primární biliární cirhóza) v kombinaci s kyselinou ursodeoxycholovou (UDCA) u dospělých pacientů s nedostatečnou odpovědí na UDCA, nebo jako monoterapie u dospělých pacientů, kteří netolerují léčbu UDCA. S kyselinou obeticholovou dále v současné době probíhá řada klinických studií pro léčbu primární sklerotizující cholangitidy, nealkoholické steatózy až steatofibrózy jater (NAFLD, z angl. nonalcoholic fatty liver disease), nealkoholické steatohepatitidy (NASH), alkoholické hepatitidy, průjmu při malabsorpci žlučových kyselin, familiární parciální lipodystrofie a dalších onemocnění (Search of: obeticholic acid 2017, Souhrn údajů o přípravku Ocaliva 2016).

V našem experimentu jsme testovali kyselinu 12-oxo-5 β -cholan-24-ovou, která je modifikací kyseliny lithocholové.

Steroidní hormony vznikají přeměnou cholesterolu a slouží v organismu jako signální látky, které regulují mj. metabolismus, růst a reprodukci. Steroidní hormony účinkují

prostřednictvím vazby na své příslušné receptory, které stejně jako FXR patří do superrodiny jaderných receptorů. Výzkumná skupina Huang et al. (2010) popsala, že se steroidní hormony váží do ligand-vazebných kapes svých příslušných receptorů s obrácenou prostorovou orientací steroidního jádra, než je tomu u vazby žlučových kyselin do ligand-vazebné kapsy FXR receptoru. Vědecká skupina Mi et al. (2003) poukázala na to, že steroidní hormony navíc neodpovídají neplanárnímu tvaru žlučových kyselin a nemají jejich amfipatické vlastnosti spojené s jejich α a β stranami, které jsou určující pro vazbu na FXR receptor. Např. estrogeny mají aromatický kruh A, a proto u nich není možná *cis-trans* izomerie na uhlíku C-5. Progesteron, testosteron, aldosteron a glukokortikoidy mají v kruhu B dvojnou vazbu v poloze 5, a tudíž nemají vodík v poloze C-5 β potřebný pro orientaci spojení kruhů A/B do polohy *cis*. Na základě těchto faktů lze předpokládat, že výše zmíněné steroidní hormony nebudou ligandy FXR receptoru. Nicméně vědecká skupina Wang et al. (2006) objevila, že androsteron, produkt metabolismu testosteronu (bez dvojné vazby v poloze 5), je ligandem-agonistou FXR, neboť jeho steroidní jádro zaujímá v ligand-vazebné kapse FXR stejnou orientaci jako žlučové kyseliny (Huang et al. 2010, Koolman a Röhm 2012, Mi et al. 2003, Wang et al. 2006).

Na základě těchto skutečností jsme v našem experimentu testovali vybrané látky ze skupiny steroidních hormonů, které odpovídají výše uvedeným strukturním požadavkům pro vazbu do ligand-vazebné kapsy FXR. Jednalo se např. o dihydrotestosteron (DHT), 5 α -androstandion, androsteron, epiandrosteron a další.

Neuroaktivní steroidy jsou steroidní sloučeniny, které modulují excitabilitu neuronů prostřednictvím interakce s neurotransmitterovými membránovými receptory (zejména s receptory GABA_A (γ -amino máselná kyselina)) a s iontovými kanály. Neuroaktivní steroidy vznikají z cholesterolu a jejich biosyntéza zahrnuje několik kroků. Neuroaktivní steroidy mohou být, na základě strukturních vlastností, klasifikovány do základních skupin: pregnanové, androstanové a sulfatované (Biggio a Purdy 2001, Reddy 2010).

U některých neuroaktivních steroidů byla pozorována schopnost aktivovat FXR: tento účinek pozorovala u androstanového neuroaktivního steroidu etiocholanolonu vědecká skupina Wang et al. (2006) a u sulfatovaného pregnanového neuroaktivního steroidu epiallopregnanolon sulfátu výzkumná skupina Abu-Hayyeh et al. (2013) (Abu-Hayyeh et al. 2013, Wang et al. 2006).

My jsme v našem experimentu studovali látky obdobné struktury ze skupiny pregnanových neuroaktivních steroidů (allopregnanolon, pregnanolon, epipregnanolon, epiallopregnanolon, 5 α -dihydroprogesteron, 5 β -dihydroprogesteron), androstanových

neuroaktivních steroidů (3 α -androstadiol, etiocholanon, androsteron) a další látky jim strukturně podobné.

V naší práci jsme testovali studované látky v koncentraci 30 μ M, 20 μ M nebo 10 μ M. Tyto koncentrace nebyly zvoleny cíleně, naším záměrem bylo testovat látky v koncentraci 30 μ M (dle odborné literatury), nicméně vzhledem k hydrofóbnímu charakteru studovaných sloučenin nebylo možno některé látky na tuto koncentraci rozpustit. Proto jsme nemohli získat data u všech látek v koncentraci 30 μ M a dané špatně rozpustné steroidy byly testovány v maximální získané koncentraci (20 μ M nebo 10 μ M). Podobný problém byl zaznamenán i v odborné literatuře, vědecká skupina Suzuki et al. (2008) pozorovala, že kyselina 5 β -cholan-24-ová se při koncentraci 30 μ M rychle vylučovala z roztoku, a proto koncentrace použitá v experimentech byla omezena na 10 μ M (Suzuki et al. 2008).

Nejdříve jsme testovali vliv jednotlivých steroidních látek na buněčnou viabilitu prostřednictvím metody **MTT assay**. Pozorovali jsme pokles viability HepG2 buněk (vzhledem ke kontrole s 1% DMSO) u testovaných látek č. 6, 9, 10, 17, 19, 20, 21, 28 a 46 (30 μ M); u látek č. 4, 5, 7, 16, 37 a 51 (20 μ M) a u látek č. 2, 3, 8, 13, 18, 23 a 29 (10 μ M). Pokles buněčné životaschopnosti může poukazovat na možný cytotoxický efekt studovaných látek. I přesto jsme přistoupili k dalšímu testování steroidních látek metodou gene reporter assay, neboť většina látek v uvedených koncentracích a při době expozice 24 hodin nepůsobila výrazně cytotoxicky, nebo se neprojevil účinek na viabilitu či proliferaci buněk. V dalším testování pomocí metody gene reporter assay jsme stanovili dobu expozice studovaným látkám rovněž 24 hodin. Navíc jsme v obou experimentech metodou gene reporter assay využili systém duálních reportérů Dual-Luciferase® Reporter Assay System, který umožňuje simultánní expresi a měření dvou samostatných reportérových enzymů (luciferáz) v jednom vzorku za účelem dosažení přesnějších výsledků. Tato metoda využívá dvou reportérových plasmidů, kdy aktivita kontrolního reportérového plasmidu pRL-TK slouží jako systém vnitřní kontroly. Normalizace aktivity experimentálního reportérového vektoru pFXRE-luc2P k aktivitě vnitřní kontroly (stanovením jejich poměru) minimalizuje variabilitu experimentu způsobenou mj. rozdíly v buněčné viabilitě. U látek č. 4 a 42, u kterých jsme v *II. experimentu* provedeném metodou gene reporter assay testovali účinek závislý na koncentraci, nebyl pozorován výrazný pokles viability buněk, proto lze vyloučit ovlivnění a zkreslení dat v důsledku potenciálního cytotoxického působení těchto látek.

Následně jsme použili molekulárně biologickou metodu **gene reporter assay** pro dva experimenty. V *I. experimentu*, který sloužil jako tzv. základní screening, jsme testovali všech 44 studovaných látek v jedné maximální získané koncentraci (30 μ M, 20 μ M nebo 10 μ M).

Jako pozitivní kontrolu jsme použili dvě látky, které jsou známými ligandy-agonisty FXR receptoru. Jednalo se o látku GW4064 a kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA). Zvýšenou transkripční aktivitu receptoru FXR (oproti kontrole 1% DMSO) jsme pozorovali u látek v koncentraci 30 μ M: č. 17 (etiocholanon), 31 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny jantarové), 34 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny šťavelové), 35 (3 α -karboxymethyl-5 β -pregnan-20-on), 41 (3 α -karboxyethyl-5 β -pregnan-20-on) a 46 (3 α -ethoxykarbonylmethyl-5 β -androstan-17-on); u látek v koncentraci 20 μ M: č. 4 (5 β -androstan-3 β -ol), 5 (5 β -androstan-3-on), 14 (5 α -androstan-17-on), 16 (17 β /20-epoxy-17 α -methyl-5 β -androstan-3 α -ol), 44 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny malonové), 47 (5 β -androst-16-en-3-on) a 51 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -karboxylová kyselina) a u látek v koncentraci 10 μ M: č. 1 (5 β -androstan-3 α -ol), 2 (5 α -dihydroprogesteron), 8 (epiallopregnanolon), 15 (5 β -androst-1-en-17 α -ol), 29 (3 α -ethoxykarbonylmethyl-5 β -pregnan-20-on) a 42 (12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina). Naše výsledky naznačují, že by tyto látky mohly být ligandy-agonisty FXR receptoru.

Zajímavé byly výsledky u látek č. 17 (etiocholanon) a 31 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny jantarové) v koncentraci 30 μ M a především u látky č. 42 (12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina) v koncentraci 10 μ M, které převyšovaly míru aktivace FXR receptoru způsobenou jeho známým agonistou CDCA v koncentraci 20 μ M. Nicméně výsledky u látek č. 17 a 31 nebyly statisticky signifikantní a v experimentu s látkou č. 42 nemohla být provedena statistická analýza. Nemožnost provedení statistické analýzy u několika ze série testování v *I. experimentu* vyplývala ze skutečnosti, že studované látky byly použity pouze v duplikátu z důvodu nedostatku materiálu. Neprovedení statistické analýzy a fakt, že experimenty byly provedeny pouze jednou, je limitací tohoto *I. experimentu*, a pro plné objasnění této problematiky bude zapotřebí dalšího testování.

Přesto však byla látka č. 42 (12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina), na základě pozoruhodně vysoké míry aktivace FXR v *I. experimentu*, vybrána pro další testování v *II. experimentu*. Do *II. experimentu* byla také vybrána látka č. 4 (5 β -androstan-3 β -ol), a to na základě schopnosti aktivovat FXR receptor pozorované v *I. experimentu* a zejména na základě chemické struktury, kterou jsme chtěli blíže otestovat, jako zástupce skupiny steroidních látek, jejichž základ tvoří androstan a kterým, oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, zcela chybí postranní řetězec. V tomto *II. experimentu* jsme pomocí metody gene reporter assay otestovali účinek na aktivaci FXR receptoru závislý na koncentraci (1 μ M, 5 μ M a 10 μ M) u těchto dvou vybraných steroidních látek. Pro kontrolu jsme použili látku GW4064 a přirozenou žlučovou kyselinu CDCA, které jsou známými ligandy-agonisty FXR receptoru. Látka č. 4 (5 β -androstan-3 β -ol) vykazovala v koncentracích 5 μ M a 10 μ M

aktivaci FXR receptoru výraznější než CDCA rovněž v koncentracích 5 μM a 10 μM . Zvláště zajímavé výsledky byly pozorovány u látky č. 42 (12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina), neboť ve všech třech koncentracích (1 μM , 5 μM a 10 μM) aktivovala FXR receptor výrazněji než CDCA v odpovídajících koncentracích (1 μM , 5 μM a 10 μM). Kyselina 12-oxo-5 β -cholan-24-ová v koncentraci 10 μM rovněž aktivovala receptor FXR pozoruhodně výrazněji než agonista GW4064 (v koncentraci 1 μM).

Na základě našich výsledků předpokládáme, že 12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina (látky č. 42) a 5 β -androstan-3 β -ol (látky č. 4) jsou ligandy-agonisty lidského FXR receptoru. Kyselina 12-oxo-5 β -cholan-24-ová se jeví být silnějším agonistou, než je přirozená žlučová kyselina CDCA.

Limitací tohoto *II. experimentu* je opět neprovedení statistické analýzy z důvodu, že studované látky byly použity pouze v duplikátu kvůli nedostatku materiálu. A dále skutečnost, že tento *II. experiment* byl proveden pouze jednou. Pro ověření našich výsledků bude potřeba dalšího testování.

Expresí cílových genů FXR receptoru (a tedy terapeutický účinek léčiv ligandů FXR) je závislá na mnoha faktorech včetně struktury jednotlivých agonistů a od ní se odvíjejícího způsobu vazby do ligand-vazebné kapsy receptoru, která následně má vliv na rekrutment koaktivátoru či korepresoru a stabilitu receptoru po navázání ligandů. Proto je znalost vztahů struktury ligandů a jejich funkce velice důležitá. Testované steroidní látky jsme si, dle pomyslných modifikací oproti přirozeně se vyskytujícím žlučovým kyselinám, rozdělili na a) modifikace jen na steroidním jádru a b) modifikace v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru.

Skupina látek s **modifikací jen na steroidním jádru** obsahovala pouze jednu sloučeninu 12-oxo-5 β -cholan-24-ovou kyselinu (látky č. 42), která má základní steroidní kostru (5 β -cholan-24-ová kyselina), odlišuje se od LCA absencí 3 α -OH a má navíc v pozici C-12 oxoskupinu. Dle dostupné literatury nebyly doposud zaznamenány interakce této látky s FXR receptorem, ani sloučeniny odvozené od žlučových kyselin s oxoskupinou v pozici C-12. Naše výsledky potvrdily závěry vědeckých skupin Pellicciari et al. (2004) a Suzuki et al. (2008), že 3 α -hydroxylová skupina není zodpovědná za aktivaci FXR. Naše výsledky jsou rovněž v souladu s pozorováním skupiny Suzuki et al. (2008), tedy že eliminace 3 α -hydroxylové skupiny vedla ke zvýšení potenciálu aktivovat FXR. Ověřili jsme také pozorování skupiny Iguchi et al. (2010), která demonstrovala, že přítomnost OH-skupiny na C-12 není pro aktivaci FXR nezbytná. Naše výsledky poukazují na to, že záměna OH- na oxo-

skupinu v poloze C-12 nesnižuje účinek, naopak by mohla mít pozitivní vliv na aktivaci FXR (Iguchi et al. 2010, Pellicciari et al. 2004, Suzuki et al. 2008).

Skupina látek s **modifikacemi v postranním řetězci nebo i na steroidním jádru** byla oproti první skupině testovaných látek výrazně obsáhlejší. Zajímavé bylo pozorování u sloučenin, kterým **postranní řetězec zcela chybí** – jejich základní strukturou je tedy androstan. U žádné z námi testovaných látek nebyla aktivace FXR, dle dostupné literatury, doposud popsána. Z této skupiny látek byla pozorována zvýšená transkripční aktivita receptoru FXR u 5 β -androstan-3 α -olu (látka č. 1), 5 β -androstan-3 β -olu (látka č. 4), 5 β -androstan-3-onu (látka č. 5) a 5 β -androst-16-en-3-onu (látka č. 47). Naše výsledky jsou v souladu s objevem skupiny vědců Wang et al. (2006), kteří na látce androsteron demonstrovali, že i přes nepřítomnost 5uhlíkového karboxylového řetězce v pozici C-17 aktivuje FXR. Nicméně ne všechny námi testované látky z této skupiny vykazovaly aktivaci FXR, a tudíž pro objasnění této problematiky bude zapotřebí dalších experimentů (Wang et al. 2006).

Interakce látek s FXR, které mají **místo postranního řetězce na uhlíku C-17 karboxylovou skupinu**, nebyly doposud v dostupné odborné literatuře zaznamenány. My jsme testovali 3 β -hydroxyandrost-5-en-17-karboxylovou kyselinu (látka č. 43) a zvýšenou transkripční aktivitu FXR jsme nepozorovali. Na základě těchto výsledků by bylo možno očekávat, že odstraněním postranního řetězce žlučových kyselin a zavedením karboxylové skupiny na C-17 se účinek ztrácí.

Interakce látek s FXR receptorem, které mají **místo postranního řetězce na uhlíku C-17 β hydroxyskupinu**, nebyly, dle dostupné literatury, prozatím pozorovány. My jsme z této skupiny látek testovali dihydrotestosteron (látka č. 10) a jeho 5 β -izomer (látka č. 9), 3 α -androstandiol (látka č. 27) a jeho 5 β -izomer (látka č. 13) a 5 β -androst-1-en-17 α -ol (látka č. 15). Zvýšenou transkripční aktivitu FXR jsme pozorovali jen u 5 β -androst-1-en-17 α -olu. Pro objasnění vztahu struktury a schopnosti aktivovat FXR bude u této skupiny látek potřeba dalšího výzkumu.

Dále jsme studovali látky, u kterých se **místo postranního řetězce na uhlíku C-17 nalézají oxoskupina**. Jednalo se o řadu látek včetně etiocholanonu (látka č. 17), epietiocholanonu (látka č. 20), androsteronu (látka č. 22), epiandrosteronu (látka č. 19), dehydroepiandrosteronu (látka č. 12), 5 β -androstandionu (látka č. 30), 5 α -androstandionu (látka č. 21) aj. Pozoruhodně vysokou aktivaci FXR receptoru, která převyšovala míru aktivace FXR receptoru způsobenou CDCA, jsme pozorovali u etiocholanonu. Tento výsledek odpovídá předchozímu objevu vědecké skupiny Wang et al. (2006). Naopak odlišný

výsledek jsme získali u androsteronu (5α -izomer etiocholanonu), v našem experimentu nevykazoval žádnou aktivaci FXR, zatímco Wang et al. (2006) tento účinek pozorovali. Dále jsme sledovali zvýšenou transkripční aktivitu FXR u 5α -androstan-17-onu (látka č. 14) a 3α -ethoxykarbonylmethyl- 5β -androstan-17-onu (látka č. 46). Ostatní sloučeniny studovaný účinek neměly. Tímto experimentem jsme nepotvrdili pozorování popsané v odborné literatuře, že u sloučenin, u kterých se místo postranního řetězce na uhlíku C-17 nalézá oxoskupina, nedochází ke ztrátě aktivačního účinku na FXR. Tato problematika bude pravděpodobně komplexnější, a pro její objasnění bude potřeba dalšího výzkumu (Wang et al. 2006).

Interakce látek s FXR receptorem, které mají **postranní řetězec zkrácen na 1 uhlík a v polohách C-17 β /20 mají epoxid** nebyly doposud v dostupné odborné literatuře zaznamenány. My jsme testovali 17 β /20-epoxy-17 α -methyl- 5β -androstan-3 α -ol (látka č. 16), který způsoboval zvýšenou transkripční aktivitu FXR.

O interakcích látek s FXR, které mají **postranní řetězec zkrácen na 2 uhlíky a v poloze C-20 α mají hydroxyskupinu**, jsme v dostupné odborné literatuře nenašli zmínky. My jsme testovali 5 α -pregn-2-en-20 α -ol (látka č. 26) a nepozorovali jsme u něj zvýšenou transkripční aktivitu FXR.

Dále jsme studovali řadu látek, u kterých byl oproti žlučovým kyselinám **postranní řetězec zkrácen na 2 uhlíky a v poloze C-20 byla oxoskupina**. Jednalo se mj. o pregnanolon (látka č. 11), allopregnanolon (látka č. 25), epipregnanolon (látka č. 6), epiallopregnanolon (látka č. 8), 5β -dihydroprogesteron (látka č. 7), 5α -dihydroprogesteron (látka č. 2) a další sloučeniny včetně řady esterů steroidů s 3α -OH skupinou a dikarboxylových kyselin. Sledovali jsme, že epiallopregnanolon aktivoval FXR receptor. Tento výsledek je v souladu s pozorováním výzkumné skupiny Abu-Hayyeh et al. (2013), která popsala, že epiallopregnanolon sulfát vystupuje jako parciální agonista FXR. Naopak žádná ze sloučenin podobných epiallopregnanolonu nevykazovala aktivaci FXR a tento účinek není ani zmíněn v dostupné odborné literatuře. Ani interakce dalších námi studovaných látek nejsou v dostupné literatuře popsány. Dále jsme pozorovali zvýšenou transkripční aktivitu FXR u 5α -dihydroprogesteronu, naproti tomu jeho 5β -izomer tento účinek nevykazoval. Také jsme zaznamenali zvýšenou transkripční aktivitu FXR u 20-oxo- 5β -pregnan-3 α -karboxylové kyseliny (látka č. 51), 3α -karboxymethyl- 5β -pregnan-20-onu (látka č. 35), 3α -ethoxykarbonylmethyl- 5β -pregnan-20-onu (látka č. 29), 3α -karboxyethyl- 5β -pregnan-20-onu (látka č. 41), 20-oxo- 5β -pregnan-3 α -esteru kyseliny šťavelové (látka č. 34), 20-oxo- 5β -pregnan-3 α -esteru kyseliny malonové (látka č. 44) a výrazně vysoké hodnoty

u 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -esteru kyseliny jantarové (látka č. 31). Na základě těchto výsledků by bylo možno velmi obecně usuzovat, že s objemným substituentem v poloze C-3 α nedochází ke ztrátě účinku aktivace FXR receptoru, nicméně tato problematika bude pravděpodobně mnohem komplexnější, a pro její objasnění bude třeba dalšího výzkumu (Abu-Hayyeh et al. 2013).

Naše výsledky naznačují, že 12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina (látka č. 42), látka strukturně podobná přirozené žlučové kyselině LCA, je silnějším agonistou FXR, než je endogenní žlučová kyselina CDCA. Na základě našich výsledků dále předpokládáme, že steroid 5 β -androstan-3 β -ol (látka č. 4) je rovněž ligandem-agonistou FXR. Dále jsme nastínili nové, doposud nepopsané vztahy závislosti aktivity FXR na struktuře vybraných steroidních sloučenin (ze skupin steroidních hormonů a látek jim strukturně podobných, neuroaktivních steroidů, látek strukturně podobných žlučovým kyselinám a dalších steroidních sloučenin). I přesto, že pro plné objasnění této problematiky bude potřeba dalšího rozsáhlého výzkumu, by mohly naše výsledky poskytnout užitečný pohled při vývoji nových léčiv, které interagují s FXR receptorem.

8. Závěr

Cílem této experimentální rigorózní práce bylo studium interakcí vybraných 44 steroidních sloučenin (ze skupiny steroidních hormonů, neuroaktivních steroidů, látek odvozených od žlučových kyselin a dalších) s lidským FXR za použití lidské hepatomové buněčné linie HepG2.

Nejdříve jsme otestovali vliv jednotlivých steroidních látek na buněčnou viabilitu prostřednictvím metody MTT assay na buněčné linii HepG2. Pozorovali jsme pokles buněčné viability u 22 z 44 testovaných látek. I přesto jsme přistoupili k dalšímu testování steroidních látek metodou gene reporter assay, neboť většina látek v uvedených koncentracích a při době expozice 24 hodin nepůsobila výrazně cytotoxicky, nebo se neprojevil účinek na viabilitu či proliferaci buněk.

Následně jsme využili molekulárně biologickou metodu gene reporter assay pro dva experimenty. V *I. experimentu*, který sloužil jako tzv. základní screening, jsme pozorovali zvýšenou transkripční aktivitu receptoru FXR u látek v koncentraci 30 μM : č. 17 (etiocholanon), 31 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny jantarové), 34 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny šťavelové), 35 (3 α -karboxymethyl-5 β -pregnan-20-on), 41 (3 α -karboxyethyl-5 β -pregnan-20-on) a 46 (3 α -ethoxykarbonylmethyl-5 β -androstan-17-on); u látek v koncentraci 20 μM : č. 4 (5 β -androstan-3 β -ol), 5 (5 β -androstan-3-on), 14 (5 α -androstan-17-on), 16 (17 β /20-epoxy-17 α -methyl-5 β -androstan-3 α -ol), 44 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -ester kyseliny malonové), 47 (5 β -androst-16-en-3-on) a 51 (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -karboxylová kyselina) a u látek v koncentraci 10 μM : č. 1 (5 β -androstan-3 α -ol), 2 (5 α -dihydroprogesteron), 8 (epiallopregnanolon), 15 (5 β -androst-1-en-17 α -ol), 29 (3 α -ethoxykarbonylmethyl-5 β -pregnan-20-on) a 42 (12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina).

Ve *II. experimentu*, ve kterém jsme testovali účinek na aktivaci FXR receptoru závislý na koncentraci, jsme u látky č. 4 (5 β -androstan-3 β -ol) v koncentracích 5 μM a 10 μM pozorovali vyšší aktivaci FXR receptoru než u kyseliny chenodeoxycholové (CDCA). Zvlášť zajímavé výsledky byly pozorovány u látky č. 42 (12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina), neboť ve všech třech koncentracích (1 μM , 5 μM a 10 μM) aktivovala FXR receptor výrazněji než CDCA. Kyselina 12-oxo-5 β -cholan-24-ová v koncentraci 10 μM rovněž aktivovala receptor FXR pozoruhodně výrazněji než agonista GW4064 (v koncentraci 1 μM). Na základě našich výsledků předpokládáme, že látka podobná přirozeným žlučovým kyselinám 12-oxo-5 β -cholan-24-ová kyselina a sloučenina 5 β -androstan-3 β -ol jsou ligandy-agonisty lidského FXR receptoru. Kyselina 12-oxo-5 β -cholan-24-ová se jeví být silnějším agonistou, než je přirozená žlučová kyselina CDCA.

Experimentální výsledky této práce by mohly předznamenat existenci nových ligandů FXR receptoru a mohly by poskytnout užitečný pohled při vývoji nových léčiv cílených na FXR receptor.

9. Literatura

Aagaard MM, Siersbaek R, Mandrup S. Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta*. [Review]. 2011 Aug;1812(8):824-35.

Abu-Hayyeh S, Papacleovoulou G, Lovgren-Sandblom A, Tahir M, Oduwole O, Jamaludin NA, et al. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy Levels of Sulfated Progesterone Metabolites Inhibit Farnesoid X Receptor Resulting in a Cholestatic Phenotype. *Hepatology*. 2013 Feb;57(2):716-26.

Abu-Hayyeh S, Williamson C. Progesterone Metabolites as Farnesoid X Receptor Inhibitors. *Dig Dis*. 2015;33(3):300-6.

Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov Today*. 2012 Sep;17(17-18):988-97.

Akwabi-Ameyaw A, Bass JY, Caldwell RD, Caravella JA, Chen L, Creech KL, et al. Conformationally constrained farnesoid X receptor (FXR) agonists: Naphthoic acid-based analogs of GW 4064. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Aug 1;18(15):4339-43.

Allard STM, Kopish K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research [online]. In: Promega Corporation, 2008 [citováno: 2016, 05, 01]. 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>

Androsteron [online]. In: Maxdorf: Velký lékařský slovník On-Line, 2017 [citováno: 2017, 01, 14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/androsteron>

Apoptosis, cell death and cell proliferation [online]. In: Roche, 2016 [citováno: 2016, 05, 20]. Dostupné z: http://download.bioon.com.cn/upload/201308/14100155_8995.pdf

Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1269-304.

Bass JY, Caravella JA, Chen L, Creech KL, Deaton DN, Madauss KP, et al. Conformationally constrained farnesoid X receptor (FXR) agonists: Heteroaryl replacements of the naphthalene. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Feb 15;21(4):1206-13.

Bičíková M, Hampl R. Neurosteroidy a jejich význam. *Čas. Lék. čes.* 2007;146:223-226.

Biggio G, Purdy RH, eds. *Neurosteroids and Brain Function*. Vyd. 1. San Diego: Academic Press, 2001:462-466.

Bijsmans ITGW, Guercini C, Pittol JMR, Omta W, Milona A, Lelieveld D, et al. The glucocorticoid mometasone furoate is a novel FXR ligand that decreases inflammatory but not metabolic gene expression. *Sci Rep*. 2015 Sep 15;5.

Brelivet Y, Rochel N, Moras D. Structural analysis of nuclear receptors: From isolated domains to integral proteins. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan;348(2):466-73.

Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Apr;13(4):213-24.

Campana G, Pasini P, Roda A, Spampinato S. Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: Role of the farnesoid X receptor. *Biochem Pharmacol*. 2005 Jun 15;69(12):1755-63.

Carr RM, Reid AE. FXR Agonists as Therapeutic Agents for Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2015 Apr;17(4).

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.

Cermanová J, Kadová Z, Zagorová M, Hroch M, Tomšík P, Nachtigal P, et al. Boldine enhances bile production in rats via osmotic and Farnesoid X receptor dependent mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 May 15;285(1):12-22.

Costantino G, Entrena-Guadix A, Macchiarulo A, Gioiello A, Pellicciari R. Molecular dynamics simulation of the ligand binding domain of farnesoid X receptor. Insights into helix-12 stability and coactivator peptide stabilization in response to agonist binding. *J Med Chem.* 2005 May 5;48(9):3251-9.

Costantino G, Macchiarulo A, Entrena-Guadix A, Camaioni E, Pellicciari R. Binding mode of 6ECDCA, a potent bile acid agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *Bioorg Med Chem Lett.* 2003 Jun 2;13(11):1865-8.

De Marino S, Ummarino R, D'Auria MV, Chini MG, Bifulco G, D'Amore C, et al. 4-Methylenesterols from *Theonella swinhoei* sponge are natural pregnane-X-receptor agonists and farnesoid-X-receptor antagonists that modulate innate immunity. *Steroids.* 2012 Apr;77(5):484-95.

De Marino S, Ummarino R, D'Auria MV, Chini MG, Bifulco G, Renga B, et al. Theonellasterols and Conicasterols from *Theonella swinhoei*. Novel Marine Natural Ligands for Human Nuclear Receptors. *J Med Chem.* 2011 Apr 28;54(8):3065-75.

Deng G, Li W, Shen J, Jiang H, Chen K, Liu H. Pyrazolidine-3,5-dione derivatives as potent non-steroidal agonists of farnesoid X receptor: Virtual screening, synthesis, and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 Oct 15;18(20):5497-502.

Deng RT, Yang DF, Yang J, Yan BF. Oxysterol 22(R)-hydroxycholesterol induces the expression of the bile salt export pump through nuclear receptor farnesoid X receptor but not liver X receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Apr;317(1):317-25.

Di Leva FS, Festa C, D'Amore C, De Marino S, Renga B, D'Auria MV, et al. Binding Mechanism of the Farnesoid X Receptor Marine Antagonist Suvanine Reveals a Strategy To Forestall Drug Modulation on Nuclear Receptors. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Ligands. *J Med Chem.* 2013 Jun 13;56(11):4701-17.

Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, et al. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell.* 2003 Apr;11(4):1079-92.

Dual-Luciferase® Reporter Assay and Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay Systems [online]. In: Promega Corporation, 2009 [citováno: 2016, 05, 01]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/~//media/files/resources/protcards/dual-luciferase%20reporter%20assay%20and%20dual-luciferase%20reporter%201000%20assay%20systems%20quick%20protocol.pdf>

Dual-Luciferase® Reporter Assay System [online]. In: Promega Corporation, 2015 [citováno: 2016, 05, 01]. Dostupné z: <http://www.promega.co.uk/~//media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Dual%20Luciferase%20Reporter%20Assay%20System%20Protocol.pdf>

Dufer M, Horth K, Krippeit-Drews P, Drews G. The significance of the nuclear farnesoid X receptor (FXR) in beta cell function. *Islets*. 2012 Sep-Oct;4(5):333-8.

Dussault I, Beard R, Lin M, Hollister K, Chen J, Xiao JH, et al. Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem*. 2003 Feb 28;278(9):7027-33.

Epiandrosteron [online]. In: Maxdorf: Velký lékařský slovník On-Line, 2017 [citováno: 2017, 01, 14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/epiandrosteron>

Evans SEG, Ross LE, Sellers EM, Purdy RH, Romach MK. 3 alpha-reduced neuroactive steroids and their precursors during pregnancy and the postpartum period. *Gynecol Endocrinol*. 2005 Nov;21(5):268-79.

Fiorucci S, Distrutti E, Bifulco G, D'Auria MV, Zampella A. Marine sponge steroids as nuclear receptor ligands. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Nov;33(11):591-601.

Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Nov;30(11):570-80.

Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med*. 2007 Jul;13(7):298-309.

Flatt B, Martin R, Wang T-L, Mahaney P, Murphy B, Gu X-H, et al. Discovery of XL335 (WAY-362450), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *J Med Chem*. 2009 Feb 26;52(4):904-7.

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 2;81(5):687-93.

Fujino T, Sato Y, Une M, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Shudo K, et al. In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 Dec;87(4-5):247-52.

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.

Gioiello A, Macchiarulo A, Carotti A, Filipponi P, Costantino G, Rizzo G, et al. Extending SAR of bile acids as FXR ligands: Discovery of 23-*N*-(carbocinnamyloxy)-3 α ,7 α -dihydroxy-6 α -ethyl-24-nor-5 β -cholan-23-amine. *Bioorg Med Chem*. 2011 Apr 15;19(8):2650-8.

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Nov;3(11):950-64.

Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, et al. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan;348(2):411-7.

HepG2 cell culture, stable transfection protocol [online]. In: HepG2 Cells, 2016 [citováno: 2016, 05, 20]. Dostupné z: <http://www.hepg2.com>

Hollman DAA, Milona A, van Erpecum KJ, van Mil SWC. Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: Insights into molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Nov;1821(11):1443-52.

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 1;163(2):195-202.

Howe K, Sanat F, Thumser AE, Coleman T, Plant N. The statin class of HMG-CoA reductase inhibitors demonstrate differential activation of the nuclear receptors PXR, CAR and FXR, as well as their downstream target genes. *Xenobiotica*. 2011 Jul;41(7):519-29.

Huang H, Yu Y, Gao Z, Zhang Y, Li C, Xu X, et al. Discovery and Optimization of 1,3,4-Trisubstituted-pyrazolone Derivatives as Novel, Potent, and Nonsteroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Selective Antagonists. *J Med Chem*. 2012 Aug 23;55(16):7037-53.

Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:247-72.

Chen P, Li JJ, Fan XM, Zeng H, Deng RR, Li DS, et al. Oleanolic acid attenuates obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice, possibly via activation of NRF2-MRPs and FXR antagonism. *Eur J Pharmacol*. 2015 Oct;765:131-9.

Choi H, Hwang H, Chin J, Kim E, Lee J, Nam S-J, et al. Tuberatolides, Potent FXR Antagonists from the Korean Marine Tunicate *Botryllus tuberatus*. *J Nat Prod*. 2011 Jan;74(1):90-4.

Iguchi Y, Kihira K, Nishimaki-Mogami T, Une M. Structure-activity relationship of bile alcohols as human farnesoid X receptor agonist. *Steroids*. 2010 Jan;75(1):95-100.

In vitro toxicology assay kit MTT based [online]. In: Sigma, 2016 [citováno: 2016, 05, 20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox1bul.pdf>

Jin L, Feng X, Rong H, Pan Z, Inaba Y, Qiu L, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nat Commun.* 2013 Jun;4.

Jelínek L, Karabín M, Kinčl T, Hudcová T, Kotlíková B, Dostálek P. Xanthohumol: Možnosti izolace a obohacování piva. *Chem. Listy* 2013;107:209-213.

Kaimal R, Song X, Yan B, King R, Deng R. Differential Modulation of Farnesoid X Receptor Signaling Pathway by the Thiazolidinediones. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Jul;330(1):125-34.

Kainuma M, Kasuga JI, Hosoda S, Wakabayashi KI, Tanatani A, Nagasawa K, et al. Diphenylmethane skeleton as a multi-template for nuclear receptor ligands: Preparation of FXR and PPAR ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Jun 15;16(12):3213-8.

Kameníčková A. Gene reporter assay [online]. In: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2012 [citováno: 2016, 05, 01]. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=219&t=0>

Kaminski RM, Marini H, Ortinski PI, Vicini S, Rogawski MA. The pheromone androstenol (5 alpha-androst-16-en-3 alpha-ol) is a neurosteroid positive modulator of GABA(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 May;317(2):694-703.

Kar A. Medicinal Chemistry. Vyd. 3. New Delhi: New Age International Publishers, 2006:600.

Kittnar O, eds. Lékařská fyziologie. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, 2011:550.

Koolman J, Röhm KH. Barevný atlas biochemie. Vyd. 4. Praha: Grada Publishing, 2012:46.

Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10638-47.

Lew JL, Zhao A, Yu JH, Huang L, de Pedro N, Pelaez F, et al. The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem*. 2004 Mar;279(10):8856-61.

Li G, Lin W, Araya JJ, Chen T, Timmermann BN, Guo GL. A tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, is a unique modulator of the farnesoid X receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Jan 15;258(2):268-74.

Lin H-R, Chou T-H, Huang D-W, Chen I-S. Cryptochinones from *Cryptocarya chinensis* act as farnesoid X receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Sep 1;24(17):4181-6.

Liu P, Xu X, Chen L, Ma L, Shen X, Hu L. Discovery and SAR study of hydroxyacetophenone derivatives as potent, non-steroidal farnesoid X receptor (FXR) antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2014 Mar 1;22(5):1596-607.

Liu W, Wong C. Oleanolic Acid is a Selective Farnesoid X Receptor Modulator. *Phytother Res*. 2010 Mar;24(3):369-73.

Lonard DM, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Oct;8(10):598-604.

Lu W, Cheng F, Jiang J, Zhang C, Deng X, Xu Z, et al. FXR antagonism of NSAIDs contributes to drug-induced liver injury identified by systems pharmacology approach. *Sci Rep*. 2015 Jan 29;5.

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.

Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, et al. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*. 2000 Aug;43(16):2971-4.

Marinozzi M, Carotti A, Sansone E, Macchiarulo A, Rosatelli E, Sardella R, et al. Pyrazole 3,4-e 1,4 thiazepin-7-one derivatives as a novel class of Farnesoid X Receptor (FXR) agonists. *Bioorg Med Chem*. 2012 Jun 1;20(11):3429-45.

Matsubara T, Li F, Gonzalez FJ. FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Apr;368(1-2):17-29.

Mehlmann JF, Crawley ML, Lundquist JT, Unwalla RJ, Harnish DC, Evans MJ, et al. Pyrrole 2,3-d azepero compounds as agonists of the farnesoid X receptor (FXR). *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Sep 15;19(18):5289-92.

Merk D, Gabler M, Gomez RC, Flesch D, Hanke T, Kaiser A, et al. Anthranilic acid derivatives as novel ligands for farnesoid X receptor (FXR). *Bioorg Med Chem*. 2014a Apr;22(8):2447-60.

Merk D, Lamers C, Ahmad K, Gomez RC, Schneider G, Steinhilber D, et al. Extending the Structure-Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives As Farnesoid X Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist. *J Med Chem*. 2014b Oct 9;57(19):8035-55.

Merk D, Schubert-Zsilavecz M. Nuclear receptors as pharmaceutical targets: rise of FXR and rebirth of PPAR? *Future Med Chem*. 2012b Apr;4(5):587-8.

Merk D, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M. Medicinal chemistry of farnesoid X receptor ligands: from agonists and antagonists to modulators. *Future Med Chem*. 2012a May;4(8):1015-36.

Mi LZ, Devarakonda S, Harp JM, Han C, Pellicciari R, Willson TM, et al. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):1093-100.

Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal*. [Review]. 2010 Nov 19;8:1-28.

MTT Cell Proliferation Assay [online]. In: American Type Culture Collection, 2011 [citováno: 2016, 05, 20]. Dostupné z: <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>

Nam S-J, Ko H, Shin M, Ham J, Chin J, Kim Y, et al. Farnesoid X-activated receptor antagonists from a marine sponge *Spongia* sp. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006 Oct 15;16(20):5398-402.

Nettles KW, Greene GL. Nuclear receptor ligands and cofactor recruitment: Is there a coactivator "On deck"? *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):850-1.

Nicolaou KC, Evans RM, Roecker AJ, Hughes R, Downes M, Pfefferkorn JA. Discovery and optimization of non-steroidal FXR agonists from natural product-like libraries. *Org Biomol Chem*. 2003 2003;1(6):908-20.

Niesor EJ, Flach J, Lopes-Antoni I, Perez A, Bentzen CL. The nuclear receptors FXR and LXR alpha: Potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases. *Curr Pharm Des*. 2001 Mar;7(4):231-59.

Nishimaki-Mogami T, Kawahara Y, Tamehiro N, Yoshida T, Inoue K, Ohno Y, et al. 5 alpha-Bile alcohols function as farnesoid X receptor antagonists. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 6;339(1):386-91.

Nozawa H. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 28;336(3):754-61.

Ordonez-Moran P, Munoz A. Nuclear receptors Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 2009 Jun;8(11):1675-80.

Park H, Ham J, Won DH, Chin J, Kang H. Synthesis of an Unnatural Steroid as a Farnesoid X Receptor Antagonist. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2011 Dec 20;32(12):4165-6.

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, Červený L, Mičuda S, Štaud F, Čečková-Novotná M, Fendrich Z. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia*. 2005;15:406-9.

Pávek P, Stejskalová L, Krausová L, Bitman M, Vrzal R, Dvořák Z. Rifampicin does not significantly affect the expression of small heterodimer partner in primary human hepatocytes. *Front Pharmacol*. 2012;3.

Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, Sadeghpour BM, Entrena A, Willson TM, et al. Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *J Med Chem*. 2004 Aug 26;47(18):4559-69.

Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, et al. 6 alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*. 2002 Aug 15;45(17):3569-72.

Public summary of opinion on orphan designation: Chenodeoxycholic acid for the treatment of inborn errors in primary bile acid synthesis [online]. In: European Medicines Agency: Committee for Orphan Medicinal Products, 2015 [citováno: 2017, 01, 07]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2015/02/WC500183233.pdf

Public summary of opinion on orphan designation: Cholic acid for the treatment of inborn errors in primary bile acid synthesis [online]. In: European Medicines Agency: Committee for Orphan Medicinal Products, 2013 [citováno: 2017, 01, 07]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/11/WC500014645.pdf

Public summary of opinion on orphan designation: Norursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis [online]. In: European Medicines Agency: Committee for

Orphan Medicinal Products, 2014 [citováno: 2017, 03, 19]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2014/07/WC500169894.pdf

Public summary of opinion on orphan designation: Obeticholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis [online]. In: European Medicines Agency: Committee for Orphan Medicinal Products, 2014 [citováno: 2017, 01, 07]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2014/03/WC500163577.pdf

Public summary of opinion on orphan designation: 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis [online]. In: European Medicines Agency: Committee for Orphan Medicinal Products, 2014 [citováno: 2017, 03, 19]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2010/08/WC500095691.pdf

Putra MY, Bavestrello G, Cerrano C, Renga B, D'Amore C, Fiorucci S, et al. Polyhydroxylated sterols from the Indonesian soft coral *Sinularia* sp and their effect on farnesoid X-activated receptor. *Steroids*. 2012 Apr;77(5):433-40.

Reddy DS. Neurosteroids: Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. Sex Differences in the Human Brain, Their Underpinnings and Implications. *Prog Brain Res*. 2010;186:113-37.

Ricketts M-L, Boekschoten MV, Kreeft AJ, Hooiveld GJEJ, Moen CJA, Mueller M, et al. The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Mol Endocrinol*. 2007 Jul;21(7):1603-16.

Richter HGF, Benson GM, Blum D, Chaput E, Feng S, Gardes C, et al. Discovery of novel and orally active FXR agonists for the potential treatment of dyslipidemia & diabetes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Jan;21(1):191-4.

Rizzo G, Passeri D, De Franco F, Ciaccioli G, Donadio L, Rizzo G, et al. Functional Characterization of the Semisynthetic Bile Acid Derivative INT-767, a Dual Farnesoid X Receptor and TGR5 Agonist. *Mol Pharmacol*. 2010 Oct;78(4):617-30.

Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. 2003 Feb;116(4):585-6.

Sabbatini P, Filipponi P, Sardella R, Natalini B, Nuti R, Macchiarulo A, et al. Synthesis and Quantitative Structure-Property Relationships of Side Chain-Modified Hyodeoxycholic Acid Derivatives. *Molecules*. 2013 Sep;18(9):10497-513.

Search of: obeticholic acid [online]. In: *ClinicalTrials.gov*, 2017 [citováno: 2017, 03, 19]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=obeticholic+acid+&Search=Search>

Search of: norursodeoxycholic acid [online]. In: *ClinicalTrials.gov*, 2017 [citováno: 2017, 03, 19]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=norursodeoxycholic+acid&Search=Search>

Search of: WAY-362450 [online]. In: *ClinicalTrials.gov*, 2017 [citováno: 2017, 01, 14]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=WAY-362450+&Search=Search>

Sepe V, Bifulco G, Renga B, D'Amore C, Fiorucci S, Zampella A. Discovery of Sulfated Sterols from Marine Invertebrates as a New Class of Marine Natural Antagonists of Farnesoid-X-Receptor. *J Med Chem*. 2011 Mar 10;54(5):1314-20.

Sepe V, Festa C, Renga B, Carino A, Cipriani S, Finamore C, et al. Insights on FXR selective modulation. Speculation on bile acid chemical space in the discovery of potent and selective agonists. *Sci Rep*. 2016 Jan 7;6.

Sepe V, Ummarino R, D'Auria MV, Chini MG, Bifulco G, Renga B, et al. Conicasterol E, a Small Heterodimer Partner Sparing Farnesoid X Receptor Modulator Endowed with a Pregnane X Receptor Agonistic Activity, from the Marine Sponge *Theonella swinhoei*. *J Med Chem*. 2012a Jan 12;55(1):84-93.

Sepe V, Ummarino R, D'Auria MV, Tagliatela-Scafati O, De Marino S, D'Amore C, et al. Preliminary Structure-Activity Relationship on Theonellasterol, a New Chemotype of FXR Antagonist, from the Marine Sponge *Theonella swinhoei*. *Mar Drugs*. 2012b Nov;10(11):2448-66.

Shin K, Chin J, Hahn D, Lee J, Hwang H, Won DH, et al. Sterols from a soft coral, *Dendronephthya gigantea* as farnesoid X-activated receptor antagonists. *Steroids*. 2012 Apr;77(5):355-9.

Showing metabocard for Androstenedione [online]. In: Human Metabolome Database Version 3.6, 2016 [citováno: 2016, 05, 07]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00899>

Smalley TL, Jr., Boggs S, Caravella JA, Chen L, Creech KL, Deaton DN, et al. Novel heterocyclic scaffolds of GW4064 as farnesoid X receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Jan 15;25(2):280-4.

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 8;105(14):5337-42.

Song K, Xu X, Liu P, Chen L, Shen X, Liu J, et al. Discovery and SAR study of 3-(tert-butyl)-4-hydroxyphenyl benzoate and benzamide derivatives as novel farnesoid X receptor (FXR) antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2015 Oct 1;23(19):6427-36.

Souhrn údajů o přípravku Ocaliva [online]. In: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2014 [citováno: 2017, 03, 19]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004093/WC500218418.pdf

Souhrn údajů o přípravku Ursodeoxycholová kyselina Strides [online]. In: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2014 [citováno: 2017, 01, 15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?>

file=SPC84949.pdf&type=spc&as=ursodeoxycholova-kyselina-strides-250-mg-tvrde-tobolky-spc

Souhrn údajů o přípravku Ursofalk [online]. In: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2014 [citováno: 2017, 01, 15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC74352.pdf&type=spc&as=ursofalk-spc>

Souhrn údajů o přípravku Ursosan [online]. In: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2014 [citováno: 2017, 01, 15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC58653.pdf&type=spc&as=ursosan-spc>

Speer K, Kölling-Speer I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J Plant Physiol.* 2006 03;18(1):201-16.

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. *J Pharmacol Sci.* 2008 Jul;107(3):285-94.

Takahashi M, Kanayama T, Yashiro T, Kondo H, Murase T, Hase T, et al. Effects of coumestrol on lipid and glucose metabolism as a farnesoid X receptor ligand. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Aug 1;372(3):395-9.

Teodoro JS, Rolo AP, Palmeira CM. Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2011 Nov;22(11):458-66.

TransFectin™ Lipid Reagent [online]. In: Bio-Rad Laboratories, 2016a [citováno: 2016, 05, 01]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/en-dk/product/transfectin-lipid-reagent?pcp_loc=catprod

TransFectin™ Lipid Reagent [online]. In: Bio-Rad Laboratories, 2016b [citováno: 2016, 05, 01]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106254A.pdf>

Transfection [online]. In: Biontex Laboratories GmbH, 2016 [citováno: 2016, 05, 02].
Dostupné z: http://www.biontex.com/con_4_6_4/cms/front_content.php?changelang=1&idart=198

Tsai C-J, Liang J-W, Lin H-R. Sesquiterpenoids from *Atractylodes macrocephala* act as farnesoid X receptor and progesterone receptor modulators. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Mar 15;22(6):2326-9.

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.

Using the Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader to Run the Dual-Luciferase® Reporter Assay System [online]. In: BioTek Instruments, 2006 [citováno: 2016, 05, 02].
Dostupné z: http://www.biotek.com/resources/docs/Using_Synergy_HT_to_Run_Dual_Luciferase_Assays_App_Note.pdf

Verma AK, Khemaria P, Gupta J, Singh DP, Joshi BS, Roy R, et al. Bio-transformation of FXR antagonist CDRI 80/574. *Arkivoc*. 2010 2010:1-11.

Wallace BD, Redinbo MR. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective. *Drug Metab Rev*. 2013 Feb;45(1):79-100.

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 S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB, Evans MJ. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology*. 2006 Sep;147(9):4025-33.

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

Yang CY, Li QR, Li Y. Targeting Nuclear Receptors with Marine Natural Products. *Mar Drugs*. 2014 Feb;12(2):601-35.

Yu DD, Lin W, Forman BM, Chen T. Identification of trisubstituted-pyrazol carboxamide analogs as novel and potent antagonists of farnesoid X receptor. *Bioorg Med Chem*. 2014 Jun 1;22(11):2919-38.

Yu JH, Lo JL, Huang L, Zhao A, Metzger E, Adam A, et al. Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31441-7.

Zhang T, Dong X-C, Chen M-B. Recognition of LXXLL by ligand binding domain of the Farnesoid X receptor in molecular dynamics simulation. *J Chem Inf Model*. 2006 Nov 27;46(6):2623-30.

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.