

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



**Testování potenciálních ligandů konstitutivního androstanového receptoru CAR**

Rigorózní práce

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

Hradec Králové, 2010

Mgr. Vojtěch Zadák

Chtěl bych tímto poděkovat panu Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za pomoc při orientaci v teorii i na poli experimentu k poznání malého zlomku snad i našeho nekonečného světa.

Chtěl bych dále poděkovat svým rodičům za podporu a jistotu v době mého studia. Také děkuji svojí ženě a dětem za pozitivní energii, čas a relativní klid, které mi umožnily tuto práci dokončit.

Rád bych také poděkoval společnosti Zentiva a panu Ing. Miroslavu Kuchařovi za poskytnutí testovaných látek.

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem zde čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

	<b>Obsah</b>	
1.	<b>Cíl práce</b> .....	8
2.	<b>Úvod</b> .....	9
3.	<b>Obecná část</b>	
	3.1 CAR - klasifikace nukleárního receptoru.....	10
	3.2 CAR - organizace genu a struktura proteinu.....	11
	3.2.1 CAR - organizace genu .....	11
	3.2.2 CAR - struktura proteinu.....	13
	3.3 CAR - architektura LBD.....	14
	3.4 CAR - exprese .....	16
	3.5 CAR - ligandy a aktivátory.....	17
	3.6 CAR - aktivace.....	22
	3.7 CAR - funkce nukleárního receptoru.....	25
	3.7.1 Detoxifikace prostřednictvím CAR.....	26
	3.7.2 CAR jako rizikový faktor.....	29
	3.7.3 Úloha CAR v metabolismu bilirubinu .....	30
	3.7.4 Úloha CAR v homeostáze žlučových kyselin.....	30
	3.7.5 Úloha CAR v homeostáze steroidních a tyroidních hormonů.....	31
	3.7.6 Úloha CAR v glukoneogenezi a lipidovém metabolismu.....	32
	3.7.6.1 CAR a glukoneogeneze.....	33
	3.7.6.2 CAR a lipidový metabolismus.....	34
	3.7.7 CAR a metabolická kostní onemocnění .....	39
	3.7.8 Extrahepatická úloha CAR .....	39
4.	<b>Experimentální část</b>	
	4.1 Reagencie a buněčné linie.....	40
	4.2 Testované látky a jejich koncentrace.....	42
	4.3 Metoda MTT assay.....	43
	4.4 Metoda gene reporter assay.....	46
	4.5 Metoda two-hybrid assay .....	50
	4.6 Metoda one-hybrid assay .....	54
	4.7 Statistická analýza .....	55
5.	<b>Výsledky</b>	
	5.1 Metoda MTT assay.....	56
	5.2 Metoda gene reporter assay .....	58
	5.3 Metoda two-hybrid assay .....	62
	5.4 Metoda one-hybrid assay .....	64
6.	<b>Diskuze</b> .....	66
7.	<b>Závěr</b> .....	71
8.	<b>Abstrakt</b> .....	73
9.	<b>Literatura</b> .....	75
10.	<b>Seznam obrázků</b> .....	79

## Zkratky

ACE	angiotenzin konvertující enzym
AD	aktivační doména
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AhR	aryl hydrokarbonový receptor
ALDH1A1	aldehyd dehydrogenáza 1A1
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza
ApoA-I	apolipoprotein A-I
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCRP	cytoplasmic CAR retention protein
cDNA	kódující DNA
CITCO	6-(4-chlorofenyl)imidazol[2,1-b] [1,3]thiazol-5-karbaldehyd O-(3,4-dichlorobenzyl) oxim
CPT1A	karnitin palmitoyl transferáza 1A
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA vazebná doména
DR	direct repeat
DMSO	dimethylsulfoxid
EC50	koncentrace látky, při které je dosaženo 50% maximálního účinku
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	estrogenní receptor
FoxO1	fork-head insulin-responsive transcription factor 1
FoxA2	winged helix/fork-head transcription factor
FXR	farnesoid X receptor
G6Páza	glukóza-6-fosfatáza
GDP	guanosindifosfát
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	glucocorticoid-response element

GST	glutathion-S-transferáza
GSTPí	glutathion-S-transferáza-pí
<i>gt</i> PBREM	phenobarbital-responsive enhancer modul <i>UGT1A1</i> genu
hCAR	lidský konstitutivní androstanový receptor
HDL	high density lipoproteins
HFD	high fat diet
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-koenzym A
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntáza 2
HNF4 $\alpha$	hepatocyte nuclear factor-4- $\alpha$
HNF4-RE	HNF4 $\alpha$ -response element
hPXR	lidský pregnanový X receptor
Hsp20	heat shock protein 90
IAD	injekční antidiabetika
iNOS	indukovatelná NO syntáza
IRS	insulin-response sekvence
LBD	ligand vazebná doména
LXR	liver X receptor
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
MR	mineralokortikoidní receptor
mCAR	myší konstitutivní androstanový receptor
mPXR	myší pregnanový X receptor
mRNA	messenger RNA
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NR	nukleární receptor
OATP	organic anion transporter polypeptide
PAD	perorální antidiabetika
PAPSS2	3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát syntáza 2
PB	fenobarbital
PBRE	phenobarbital-response element
PBREM	phenobarbital-responsive enhancer modul
PCR	polymerázová řetězová reakce

PEPCK	fosfoenolpyruvátcarboxykináza
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
PP2A	proteinová fosfatáza 2A
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PR	progesteronový receptor
PXR	pregnanový X receptor
PXRE	PXR-response element
RAREs	retinoic acid response elements
RE	response element - responzivní vazebný element promotorové DNA
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RXR $\alpha$	retinoid X receptor- $\alpha$
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCD1	stearoyl-CoA desaturáza 1
SNP	single nucleotide polymorphism - bodová mutace
SRC-1	steroid receptor coactivator 1
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
SULT	sulfotransferáza
TCA	citrátový cyklus
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzen
TH	tyroidní hormon
THR	thyroid hormone receptor
TIF2	transcription intermediary factor 2
TSH	tyrotropin
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
UASG	aktivační sekvence GAL
VDR	vitamin D receptor
VLDL	very low density lipoproteins
XREM	xenobiotic-responsive enhancer modul

## 1. Cíl práce

Cílem této experimentální rigorózní práce je testování potenciálních ligandů konstitutivního androstanového receptoru ze zadané skupiny 16 látek definované struktury.

U těchto látek bude nejdříve testována cytotoxicita na buněčných liniích HepG2 a MZ-Hep1 metodou MTT assay ve dvou koncentracích látek 4 a 20  $\mu\text{M}$ .

Dále se látky budou testovat pomocí metod gene reporter assay, two-hybrid assay a one-hybrid assay k prokázání možné interakce těchto látek s lidským konstitutivním androstanovým receptorem (hCAR), a to také ve dvou výše uvedených koncentracích s použitím zmíněných buněčných linií.

Pozitivní výsledky této práce by mohly předznamenat další studium konkrétních látek, např. testování dalších koncentrací, testování indukce genů cytochromu P450 a in vivo experimenty na zvířecím modelu s diabetem II. typu, obezitou a hyperlipidémií. Tato práce by mohla event. vyústit i v syntézu nových látek podobné chemické struktury.



## 2. Úvod

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) je zástupcem nukleárních receptorů (NRs), které tvoří superrodinu ligandem-aktivovaných transkripčních faktorů ovlivňujících expresi cílových genů.

Některé nukleární receptory nemají známé selektivní fyziologické ligandy, proto jsou označovány jako „orphan“ receptory (receptory sirotci). Pokud jsou pro tyto receptory objeveny funkční ligandy, jsou tyto receptory zařazeny do kategorie „adopted“ orphan receptory. V této skupině je vedle CAR zařazen i PXR - pregnanový X receptor. Nukleární receptor CAR vykazuje, na rozdíl od jiných nukleárních receptorů, v nepřítomnosti ligandu určitou konstitutivní aktivitu.

CAR (NR1I3) a PXR (NR1I2) působí jako tzv. „senzory“ toxických endogenních metabolitů i exogenních chemických látek. Tato jejich unikátní funkce je odlišuje od receptorů steroidních hormonů nebo hormonů štítné žlázy. V minulém desetiletí byl CAR receptor spolu s PXR, nejdůležitějším xenoreceptorem, studován především v souvislosti s indukcí biotransformačních enzymů, kterou způsobují léčiva nebo jiná xenobiotika. V posledních několika letech se však výzkum soustřeďuje nejen na CAR a PXR coby xenosenzory, které koordinovaně regulují clearance xenobiotik, ale je také zkoumán jejich význam v modulování hormonální, lipidové a energetické homeostázy, nádorového bujení a jaterní steatózy. Poslední studie naznačují, že by agonisté CAR mohly být používány k terapii obezity, diabetu II. typu a dyslipidémie.

## Obecná část

### 3.1 CAR - klasifikace nukleárního receptoru

Lidský CAR (hCAR) byl objeven v roce 1994 jako orphan receptor MB67 (Baes a kol., 1994). Byl popsán jako heterodimerický partner retinoid X receptoru (RXR). Bylo zjištěno, že hCAR je schopný vazby k retinoic acid response elementům (RAREs), ale rozsah aktivace je mnohem nižší než u RXR (*pozn.* Původně zkratka CAR představovala označení receptoru constitutive activator of retinoid response). Izolace a charakterizace myšího CAR (mCAR) byla provedena v roce 1997. V té době se předpokládalo, že CAR receptor je zaměřen na RAREs elementy, a nebyl tehdy znám jeho význam pro regulaci cytochromů P450 (CYPs), enzymů fáze I biotransformace (di Masi a kol., 2009).

Následně byl CAR studován především v souvislosti s indukcí genů pro CYP2B subrodinu cytochromu P450 prostřednictvím fenobarbitalu (PB) nebo podobně působících induktorů (např. chlorpromazin, fenytoin, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridiloxyl)]benzen (TCPOBOP) a polychlorované bifenyly) a byla odhalena jeho funkce jakožto nukleárního receptoru - xenosenzoru. Vyvinutí mCAR knockout myšího kmenu potvrdilo, že je mCAR nezbytný pro indukci *Cyp2b10* prostřednictvím induktorů a umožnilo identifikovat mnoho dalších genů, které tento receptor reguluje (Swales a Negishi, 2004).

Mezitím byl v roce 1998 identifikován myší PXR (mPXR). Byl pojmenován pregnane X receptor, protože se ukázalo, že je aktivován deriváty dexametazonu a pregnenolonu. V roce 1998 byl také klonován lidský steroid X receptor, který se ukázal příbuzný s CAR a vitamin D receptorem (VDR) (Blumberg a kol., 1998). Prokázalo se, že se jedná o lidský homolog mPXR a byl přejmenován na hPXR. Vzhledem k široké funkci nukleárních receptorů - xenosenzorů v homeostáze steroidních hormonů vznikla hypotéza, že prapůvodní protein nukleárních receptorů mohl fungovat jako senzor endobiotik a od tohoto hypotetického předchůdce receptorů pokračoval vývoj dalším rozšiřováním spektra ligandů i regulovaných genů (di Masi a kol., 2009).

V současnosti je CAR (NR1I3) klasifikován do první podrodiny nukleárních receptorů (receptory podobné thyroid hormone receptoru), skupiny I - receptory podobné vitamin D receptoru.

Role CAR v organismu není zatím zcela objasněná zejména díky nedostatku dobrých modelů a ligandů tohoto receptoru. CAR má schopnost ovlivnit mnoho signalizačních cest prostřednictvím přímé modulace exprese genů a prostřednictvím interference s dalšími NR signalizačními cestami. To vytváří unikátní integrovaný systém,

který řídí metabolismus nejen xenobiotik, ale i endogenně produkovaných steroidů a dietárních faktorů. Na rozdíl od svého nejbližšího příbuzného receptoru PXR, u něhož se jeho funkce opírá výhradně o vazbu ligandu, CAR funguje nezávisle na ligandu a může být regulovaný přímou vazbou ligandu nebo nepřímými aktivačními procesy. V této souvislosti jsou další studie mechanistických aspektů CAR aktivace, nukleární translokace a transkripční aktivity velmi důležité nejen pro objasnění signalizačních cest, ale i vymezení CAR vůči PXR. Budoucí výzkum zřejmě bude směřovat také ke zkoumání vztahů CAR s ostatními nukleárními receptory (jako jsou např. farnesoid X receptor (FXR), liver X receptor (LXR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), estrogenní receptor (ER) a glukokortikoidní receptor (GR)), k poznání struktury resp. funkce vazebné domény pro ligandy (LBD, z *angl.* ligand binding domain) na základě krystalografie, ke studiu a identifikaci cílových genů CAR pomocí metod DNA-microarray a RT-PCR, a ke zkoumání funkce CAR v extrahepatických tkáních jako např. ve střevě a ledvinách (di Masi a kol., 2009).

Na začátku nového století byl zájem o CAR receptor velmi nízký (jenom 27 článků citovaných v PubMed databázi od roku 1994 do ledna 2000), ale v posledních letech výrazně vzrostl (481 článků citovaných v PubMed databázi od roku 2000 do konce roku 2008) (di Masi a kol., 2009).

## **3.2. CAR - organizace genu a struktura proteinu**

### **3.2.1 CAR - organizace genu**

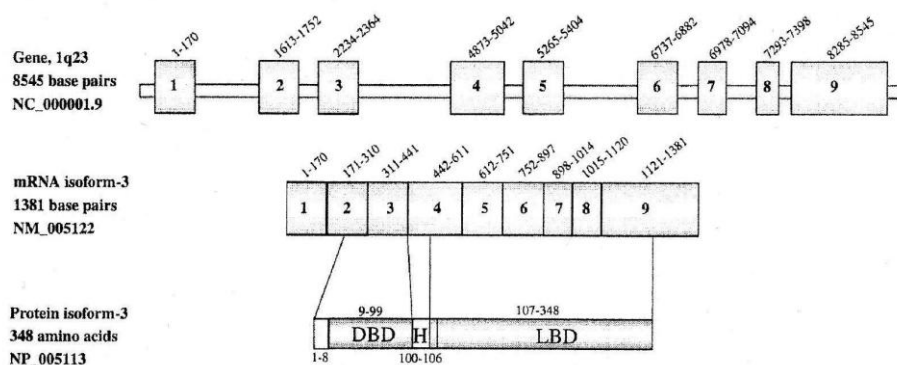
Pro mnoho genů, včetně genů nukleárních receptorů, je obvyklé, že prochází procesem alternativního sestřihu (splicing) (*pozn.* tj. alternativní sestřih prekurzorové mRNA na izofomy mRNA) za vzniku několika tzv. splice variant. Alternativní sestřih se odráží v proteinových izoformách, které se mohou lišit nejen ve struktuře, ale i ve funkčních vlastnostech (di Masi a kol., 2009).

Podobně také polymorfizmy (single nucleotide polymorphisms, SNPs), které způsobují proteinové varianty, mohou ovlivnit konstitutivní (bazální neboli na ligandu nezávislou) nebo indukovanou (na ligandu závislou) aktivitu nukleárního receptoru. Například při studii mezi japonskou populací bylo nalezeno 30 SNPs v *NR1I3* genu (Ikeda a kol., 2003). Bylo prokázáno, že varianty CAR a PXR hrají roli v interindividuální variabilitě exprese *CYP* genů a mohou být zapojené do vzácných atypických lékových

odpovědí a změněné citlivosti vůči karcinogenům (di Masi a kol., 2009).

hCAR je produktem *NR1I3* genu, který je lokalizován na chromozomu 1, locus 1q23 (Thigpen, 2004). *NR1I3* gen je složen z 8545 bps (párů bází) a zahrnuje 9 exonů rozdělených 8 introny. Bylo identifikováno 22 unikátních hCAR variant mRNA obsahujících různé kombinace alternativního sestřihu (např. delece exonů 2,4,5 a 7, částečná delece exonu 9, a inzerce 12 nebo 15 bps z intronů 6 nebo 7). Ačkoli některé CAR mRNA varianty vznikají jedním alternativním sestřihem, většina izoform CAR mRNA pochází z více alternativních sestřihů v různých kombinacích. Několik CAR mRNA variant (tj. izoformy -17, -18, -19, -20, a -21) je nevhodných ke kódování funkčních proteinů, protože mají předčasné terminační kodóny pocházející z *nonsense* mutací a zřejmě může dojít k rychlé degradaci. Ostatní CAR mRNA varianty by mohly kódovat unikátní CAR proteiny. Zatímco v lidských hepatocytech bylo objeveno mnoho mRNA transkriptů, tak pouze jediná CAR mRNA varianta byla detekována v tenkém střevě (izoforma-6), srdci (izoforma-22) a prostatě (izoforma-10) (Lamba a kol., 2004) (di Masi a kol., 2009).

Izoforma-3 je považována za tzv. wild-type formu CAR. Tato izoforma kóduje xenosenzor dlouhý 348 aminokyselin. DNA vazebná doména (DBD, z *angl.* DNA binding domain) je kódována exony 2 a 3, H region (hinge region) je kódován částí exonu 4, ligand vazebná doména (LBD) je kódována exony 4-9 (di Masi a kol., 2009).



Obr. 1

### **Schéma lidského genu pro CAR, CAR mRNA a CAR protein-izoformy-3**

*NR1I3* gen je složen z 8545 párů bází a zahrnuje 9 exonů rozdělených 8 introny. Izoforma-3 je považována za wild-type formu. Tato izoforma kóduje xenosenzor dlouhý 348 aminokyselin. DBD (DNA vazebná doména) je kódována exony 2 a 3, H region (hinge region) je kódován částí exonu 4, LBD (ligand vazebná doména) je kódována exony 4-9 (převzato z di Masi a kol., 2009).

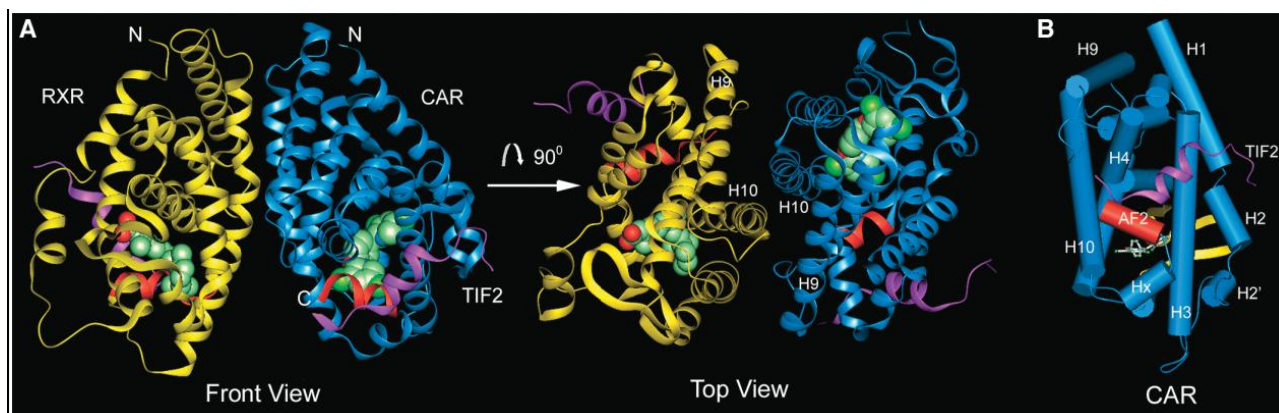
### 3.2.2 CAR - struktura proteinu

Protein nukleárního receptoru se skládá ze čtyř částí: z N-terminální aktivační funkce 1 (AF-1, *angl.* activation function 1) (*pozn.* AF-1 u receptorů CAR a PXR schází.), z DNA vazebné domény (DBD), spojovací oblasti (H region), ligand vazebné domény (LBD) a C-terminální aktivační funkce (AF-2). AF-1 umožňuje aktivaci nezávislou na ligandu, rozpoznává další transkripční faktory a koaktivátory. DBD svojí specifitou k promotorové sekvenci konkrétních genů určuje škálu genů, které jsou regulovány. LBD je zodpovědná za vazbu ligandů, jako jsou hormony, žlučové kyseliny, lipidy, léčiva a jiná xenobiotika (Tirona a Kim, 2005; Urquhart a kol., 2007). LBD tvoří jakousi kapsu, ve které ligandy nekovalentně interagují s aminokyselinovými skupinami LBD domény na základě jejich chemické struktury. Mechanismus aktivace nukleárních receptorů je velmi komplikovaný proces, spoluúčastní se ho dále represorové proteiny, řada koaktivátorů i proteiny s enzymovou aktivitou ovlivňující chromatinovou strukturu DNA (Pávek a kol., 2005).

Sekvence hCAR a hPXR jsou velmi blízké a prokazují, že vznikly relativně nedávno ze společného progenitoru. Identita a podobnost aminokyselin u hCAR izoformy-3 a hPXR izoformy-2 je 37,9% resp. 53,3%. Většina ze zbytků aminokyselin, které se účastní vazby DNA, je v DBD hCAR a hPXR receptorů zachovaná nebo částečně zachovaná. DBD bývá nejvíce neměnnou oblastí nukleárních receptorů. Naproti tomu H region, spojující DBD s LBD, se vyznačuje velice nízkou totožností a podobností aminokyselin, což může odrážet odlišné subcelulární rozmístění a regulaci intracelulárními signálními kaskádami u receptorů hCAR a hPXR. LBD má mírně zachovanou sekvenci, to reflektuje jiné vlastnosti těchto receptorů vázat ligandy. Nicméně okraj C-terminálu LBD, který odpovídá transaktivační doméně a je zapojen do vazby kofaktorů, má sekvenci různou (di Masi a kol., 2009).

Bylo identifikováno několik přirozených mutací hCAR a hPXR. His246Arg a Leu308Pro varianty redukují konstitutivní (tj. na ligandu nezávislou) transaktivační aktivitu hCAR, což by mohlo být způsobeno konformačními změnami transaktivační domény AF-2. Zatímco hCAR polymorfní varianta His246Arg ve srovnání s *wild-type* receptorem hCAR vykazuje zřetelně redukovanou aktivitu v přítomnosti agonisty 6-(4-chlorofenyl)imidazol [2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim (CITCO), varianta Leu308Pro zůstává vůči tomuto ligandu vnímavá. Nízká afinita CITCO k His246Arg variantě hCAR

odráží rozhodující roli tohoto aminokyselinového zbytku pro navázání ligandu, je totiž umístěn v  $\alpha 7$  helixu účastnícím se formování LBD ligand vazací kapsy. Další Val133Gly a Asn323Ser polymorfnní varianty hCAR vykazují míry konstitutivní aktivity a vnímavosti vůči CITCO podobné těm, které má *wild-type* receptor hCAR (di Masi a kol., 2009).



**Obr. 2**

### **Konstitutivní androstanový receptor CAR**

(A) Struktura mCAR/hRXR $\alpha$  heterodimeru ve dvou pohledech otočených o 90°. hRXR $\alpha$  je zobrazen žlutou barvou, mCAR modrou kromě AF2 helixů, které jsou červené. Dva koaktivátory TIF2 jsou fialové. mCAR váže TCPOBOP, hRXR $\alpha$  kyselinu retinovou.

(B) mCAR-LBD strukturu tvoří čtyřvrstvý helixový sendvič ( $\alpha$ -helixy jsou zobrazeny jako modré válce,  $\beta$ -struktury jako žluté stužky)

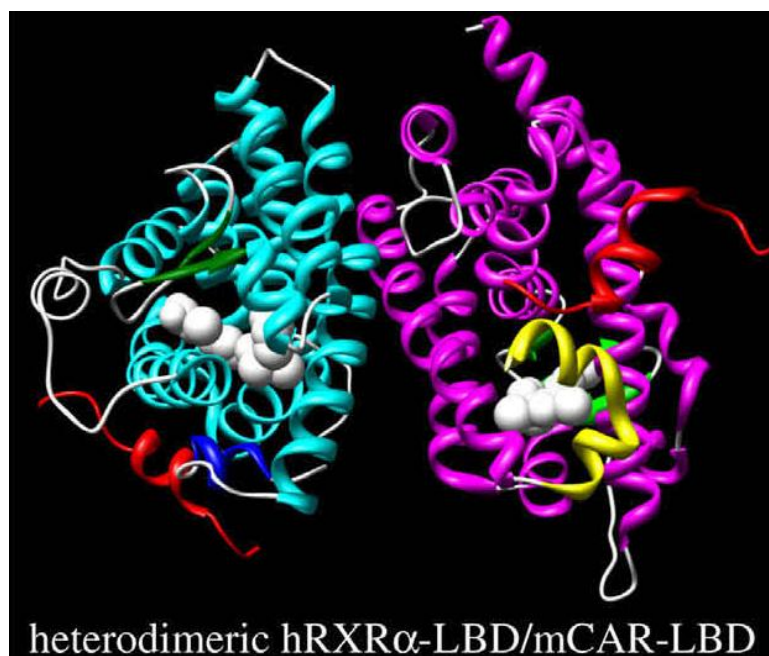
Zkratky: AF-2, aktivační funkce 2; LBD, ligand vazebná doména; RXR $\alpha$ , retinoid X receptor- $\alpha$ ; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzen; TIF2, transcription intermediary factor 2 (převzato ze Suino a kol., 2004).

### **3.3 CAR - architektura LBD**

Trojrozměrné struktury CAR-LBD a PXR-LBD sdílí základní NR-LBD  $\alpha$ -helixový sendvičový fold („záhyb“), ve kterém lze rozlišit oblasti klíčové pro vazbu ligandu, poznání koregulátoru a dimerizaci (di Masi a kol., 2009).

Flexibilní ligand vazací kapsy CAR-LBD a PXR-LBD umožňují vázat širokou řadu strukturálně nepodobných endogenních a exogenních ligandů. CAR-LBD a PXR-LBD AF-2 doména váže Leu-Xxx-Xxx-Leu-Leu (pozn. Xxx reprezentuje různé zbytky aminokyselin) struktury transkripčních koaktivátorů a Ile/Leu-Xxx-Xxx-Ile/Val-Ile motivy přítomné v korepresorech. Nicméně u CAR-LBD a PXR-LBD dimerizace bylo popsáno odlišné uspořádání. Helix  $\alpha 10$  obsahuje sekvenci bohatou na Leu, která se zdá být nezbytná pro translokaci xenosenzoru z cytozolu do jádra (di Masi a kol., 2009).

Struktura hCAR-LBD se skládá z jedenácti  $\alpha$ -helixů, dvou  $\beta$ -struktury (označených  $\alpha 2$  a  $\alpha 2'$ ) a třech  $\beta$ -struktur. Tvar  $\alpha X$  helixu v hCAR-LBD a mCAR-LBD přispívá ke konstitutivní aktivitě CAR vytvořením rigidní struktury mezi helixy  $\alpha 10$  a  $\alpha AF$ . Ligand vázající kapsa CAR-LBD je orámována helixy  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$  a  $\beta$ -strukturami 3 a 4, s objemem okolo  $600 \text{ \AA}^3$  (di Masi a kol., 2009).

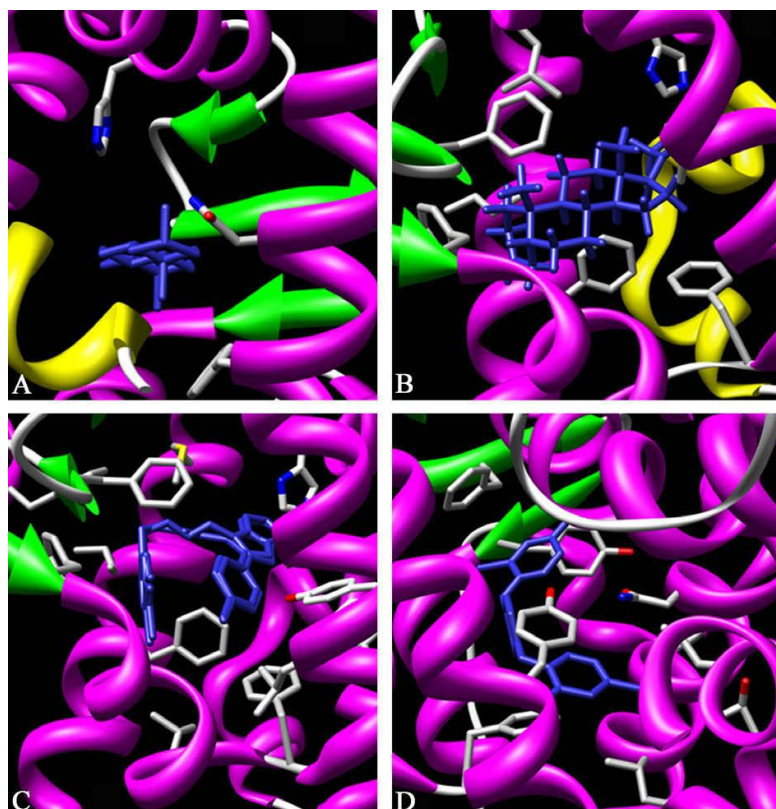


**Obr. 3**

**3-D struktura heterodimeru hRXR $\alpha$ -LBD/mCAR-LBD vázané s TCPOBOP a koaktivátorem TIF2**

*hRXR $\alpha$ -LBD:  $\alpha$ -helixy - azurová barva,  $\beta$ -struktury - tmavě zelená,  $\alpha AF$  helix - modrá, ligand kyselina retinová – bílá, TIF2 koaktivátor – červená; mCAR-LBD:  $\alpha$ -helixy - fialová,  $\beta$ -struktury - zelená,  $\alpha X$  a  $\alpha AF$  helixy - žlutá, ligand TCPOBOP - bílá, TIF2 koaktivátor – červená (převzato z di Masi a kol., 2009)*

Obecná architektura CAR-LBD/hRXR $\alpha$ -LBD back-to-back heterodimeru je podobná jiným RXR $\alpha$  heterodimerickým strukturám v aktivních konformacích. Velký heterodimerizační interface (okolo  $1000 \text{ \AA}^2$ ) napomáhá asociaci, která hraje klíčovou roli v CAR/RXR aktivaci a signalizaci (di Masi a kol., 2009).



**Obr. 4**

***Způsoby vazby ligandů ke CAR-LBD***

***A- Způsob vazby 5α-androst-16-en-3α-olu k mCAR-LBD***

***B- Způsob vazby (5β)-pregnan-3,20-dionu k hCAR-LBD***

***C- Způsob vazby CITCO k hCAR-LBD***

***D- Způsob vazby TCPOBOP k mCAR-LBD***

*Ligand je znázorněn modrou barvou, zbytky aminokyselin pak jako tyčinky vybarvené podle typu atomu (převzato z di Masi a kol., 2009).*

### **3.4 CAR - exprese**

Vzhledem k jejich roli v ochraně živých organismů před exogenním ohrožením není překvapením exprese xenosenzorů CAR a PXR v místech vstupu a metabolismu xenobiotik. Exprese CAR je vysoká v játrech a v epitelálních buňkách klků tenkého střeva. Mimo to je CAR v nízké míře exprimován v myším i lidském srdci, kosterním svalu, mozku, ledvinách a v lidských plicích. Fyziologická role CAR v těchto tkáních nebyla ale zatím zcela prozkoumána (di Masi a kol., 2009).



### 3.5 CAR - ligandy a aktivátory

Při ohlédnutí do historie byly ligandy nukleárních receptorů identifikovány pomocí cell-based reporter metod, ve kterých je expresní plazmid kódující zkoumaný receptor vložen do buněk spolu s plazmidem obsahujícím reportérový gen. Tyto metody umožnily identifikovat množství látek, které mají schopnost aktivovat CAR a PXR, ale tato metoda se zdá být poněkud zavádějící, když popisuje interakce s CAR a PXR. Např. typický aktivátor CAR fenobarbital se neváže přímo ke CAR, ale vyvolává nukleární translokaci a následně transkripční aktivitu CAR. Nicméně ligand-binding techniky ukazují, že CAR a PXR vázají strukturálně rozmanitou skupinu látek a specifita ligandů těchto receptorů je druhově závislá. CAR a PXR, podobně jako ostatní „adopted“ nukleární receptory, které hrají úlohu ve vnímavosti k dietárním lipidům (tj. PPAR), oxysterolům (tj. LXR) a žlučovým kyselinám (tj. FXR), mají nižší ligandové afinity než klasické receptory steroidních hormonů (např. ERs). Hodnoty EC<sub>50</sub> pro vazbu ligandů ke CAR a PXR jsou v mikromolárním pásmu na rozdíl od nanomolárních hodnot u klasických receptorů steroidních hormonů. To vedlo k revizi názoru na vlastnosti rozpoznání ligandů pomocí xenoreceptorů a formování konceptu nízké afinity a specifity, ale vysoké kapacity indukovat buněčné signalizace (di Masi a kol., 2009).

Charakteristika CAR jako orphan receptoru vedla k hledání endogenního ligandu, zvláště z důvodu zjevné konstitutivní aktivity receptoru. Dva androstanové metabolity 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol (androstenol) a 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol (androstanol) byly identifikovány jako ligandy CAR, které potlačují konstitutivní aktivitu CAR (Swales a Negishi, 2004). Stále platí, že endogenní ligand s vysokou afinitou ke CAR je dosud neznámý a CAR by měl být považovaný za orphan receptor s mnoha endogenními ligandy, jako jsou výše zmíněné androstanové metabolity a (5 $\beta$ )-pregnan-3,20-dion, a s exogenními ligandy, jako chlorpromazin, klotrimazol, *o,p'*-DDT, uhlovodíky (např. 2,3,3',4',5',6-hexachlorobifenyl, CITCO a TCPOBOP), methoxychlor a kyselina retinová. Ligandová afinita ke CAR se významně liší mezi druhy a některé případy ligandové vazby ke CAR zůstávají dosud předmětem diskuzí. TCPOBOP a CITCO jsou jedinými látkami, u kterých je prokázáno, že se specificky vážou k mCAR resp. k hCAR (di Masi a kol., 2009).

PXR se ve srovnání s CAR jeví jako mnohem více ligandově širokospektrý. Některé ligandy PXR by mohly působit také jako agonisté CAR. Mnoho různých chemických látek, které aktivují CAR a PXR, přímo váže LBD těchto receptorů. Některé z těchto ligandů mohou ale také vázat LBD ostatních nukleárních receptorů, jako jsou ERs, FXR, LXR, androgenní receptor (AR), GR, VDR, mineralokortikoidní receptor (MR), progesteronový

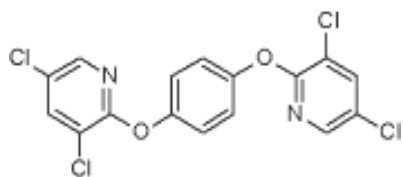
receptor (PR) a thyroid hormone receptor (THR), čímž se zvětší reakce organismu na potenciální toxicitu endobiotik a xenobiotik. Nicméně CAR a PXR jsou schopné vázat nápadně různorodou skupinu látek s molekulárními hmotnostmi v rozmezí od méně než 250 kDa do více než 800 kDa. Tato širokospektrnost, nebývalá v rodině nukleárních receptorů, je zaručená strukturálními vlastnostmi LBD těchto receptorů. V kontrastu s jinými nukleárními receptory, které váží několik ligandů s vysokou afinitou, má PXR receptor rozvinutou schopnost odpovědět na různorodou řadu ligandů s nízkou afinitou (di Masi a kol., 2009).

**Tabulka 1**

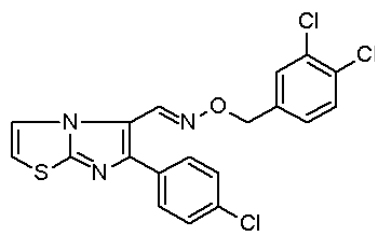
***Ligandová afinita agonistů ke CAR receptoru***

Ligand	Receptor	EC50 (nM)	Účinek	Reference
5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol	hCAR mCAR	EC50 = 1000->10000 EC50 = 250 - 1500	inverzní agonista inverzní agonista	Moore a kol. (2000) Moore a kol. (2000) Tzamelis a kol. (2000) Forman a kol. (1998)
5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol	mCAR	EC50 = 400--5000	inverzní agonista	Forman a kol. (1998) Kawamoto a kol. (2000) Shan a kol. (2004)
CITCO	hCAR	EC50 = 25-304	agonista	Maglich a kol. (2003)
klotrimazol	hCAR	EC50 = 50--1000	inverzní agonista	Maglich a kol. (2003) Moore a kol. (2000)
di(2-ethylhexyl) ftalát	hCAR	EC50 = 211	agonista	DeKeyser a kol. (2009)
17 $\beta$ -estradiol	mCAR	EC50 = 1000	agonista	Kawamoto a kol. (2000)
estron	mCAR	EC50 = 1000	agonista	Kawamoto a kol. (2000)
meklizin	hCAR mCAR	EC50 = ~500-1000 EC50 = 25	inverzní agonista agonista	Huang a kol. (2003) Huang a kol. (2003)
(5 $\beta$ )-pregnan-3,20-dion	hCAR mCAR	EC50 = 670-3000 EC50 = >10000 >> 10000	agonista slabý agonista inverzní agonista	Moore a kol. (2000) Maglich a kol. (2003) Kawamoto a kol. (2000)
progesteron	mCAR	EC50 = ~3000	inverzní agonista	Kawamoto a kol. (2000)
TCPOBOP	mCAR	EC50 = 20-100	agonista	Suino a kol. (2004) Moore a kol. (2000) Tzamelis a kol. (2000)
testosteron	mCAR	EC50 = ~7000	inverzní agonista	Kawamoto a kol. (2000)

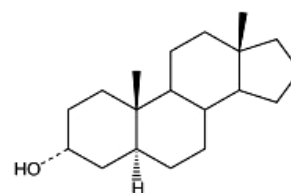
(částečně převzato z di Masi a kol., 2009, a doplněno)



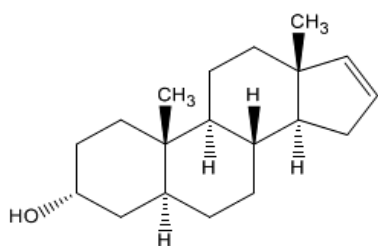
**TCPOBOP**



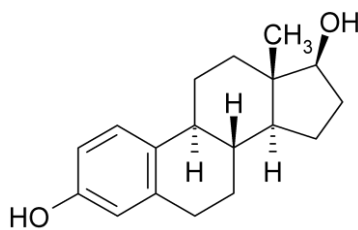
**CITCO**



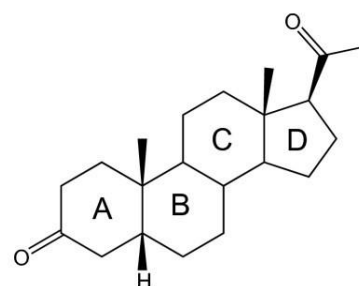
**5α-androstan-3α-ol**



**5α-androst-16-en-3α-ol**



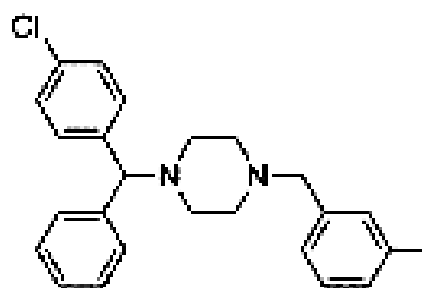
**17β-estradiol**



**(5β)-pregnan-3,20-dion**



**klotrimazol**

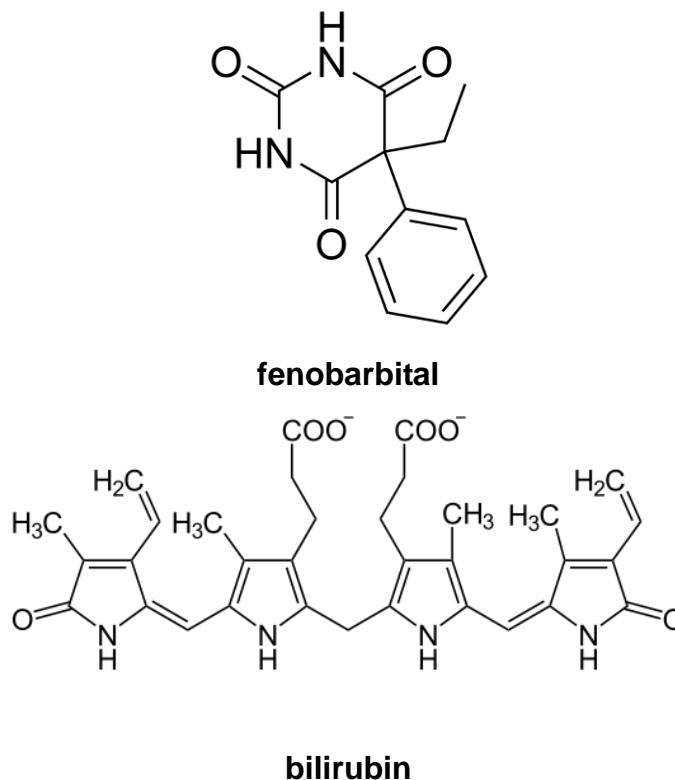


**meklizin**

**Obr. 5**

**Chemické struktury ligandů hCAR a mCAR receptorů**

Některé chemické sloučeniny neaktivují CAR jako ligandy přímou vazbou s LBD, ale podporují nukleární translokaci CAR zatím neznámým mechanismem a nazývají se aktivátory. Mezi aktivátory CAR se řadí fenobarbital a bilirubin.

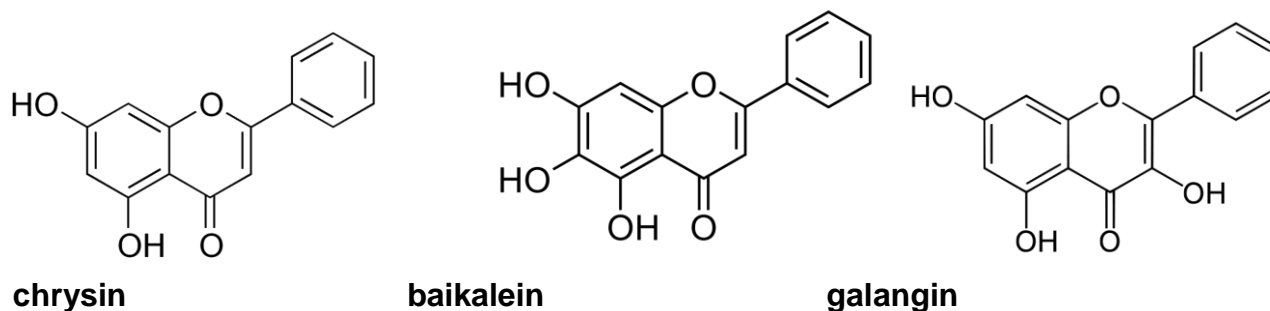


Obr. 6

**Chemické struktury fenobarbitalu a bilirubinu – aktivátorů CAR receptoru**

### Flavonoidy jako aktivátory CAR nukleárního receptoru

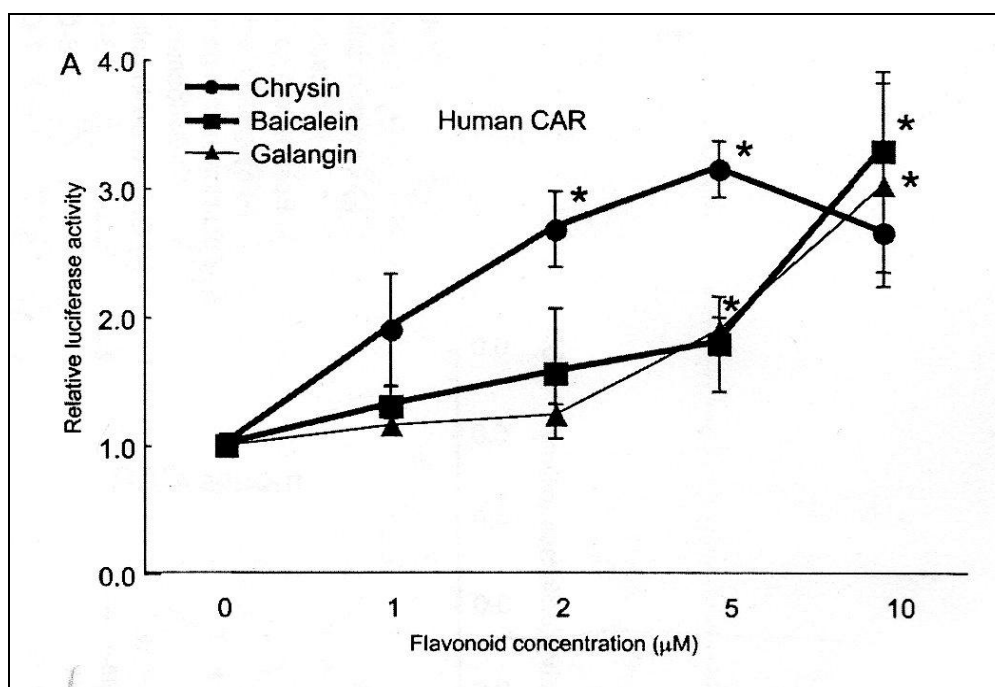
V nedávno provedené studii byla testována skupina polyfenolů z hlediska schopnosti modulovat aktivitu CAR. Tato studie je zajímavá nejen proto, že používala podobné metody jako experimentální část této práce, ale především, že přináší nové významné téma vztahu CAR a látek, které tvoří součást naší potravy a např. jsou i obsaženy v potravních doplňcích.



Obr. 7

**Chemické struktury flavonů**

Tato studie testovala skupinu flavonů, katechinů a dalších bioaktivních polyfenolů, které působily na HepG2 buňky transfekované CAR expresním plazmidem a reportérovým plazmidem obsahujícím regulační místo lidského *CYP2B6* genu. Tato studie prokázala, že baikalein (5,6,7-hydroxyflavon) je silný aktivátor lidského i myšího CAR. Katechingalláty také aktivovaly lidský a myší CAR. Dále byl kontrolním (wild-type) a CAR knockout myším podáván baikalein a chrysin (5,7-hydroxyflavon) a jejich jaterní mRNA byla analyzována pomocí real-time RT-PCR. Signifikantní zvýšení množství *Cyp2b10* mRNA (pozn. *Cyp2b10* je cílový gen mCAR, CAR se váže na phenobarbital-responsive enhancer modul (PBREM) umístěný na pozicích -2339/-2289 bp myšího *Cyp2b10* genu.) bylo pozorováno jen u *wild-type* myší krměných dietou obsahující chrysin. Tyto výsledky naznačují, že dietární flavonoidy regulují CAR aktivitu a proto urychlují detoxifikaci i energetický metabolismus (Yao a kol., 2010).



**Obr. 8**

### **Aktivace hCAR závislá na dávce flavonoidů**

*Chrysin, baikalein a galangin (3,5,7-hydroxyflavon) byly testovány z hlediska schopnosti aktivovat CAR v závislosti na dávce. Hvězdičkami byla označena signifikantní zvýšení relativní luciferázové aktivity ve srovnání s dimethylsulfoxid (DMSO) kontrolami. Na rozdíl od chrysinu, který maximálně aktivoval CAR při 5μM, baikalein a galangin prokazovali konstantní zvýšení CAR aktivity závislé na dávce u 10μM a nižších koncentrací. Je ale možné, že aktuální aktivita chrysinu v této zkoušce byla podhodnocena buněčnou toxicitou ve vyšších koncentracích, protože se snížením relativní luciferázové aktivity se současně objevilo i snížení aktivity kontrolního reportéru (Renilla luciferáza) (převzato z Yao a kol., 2010).*

Většina potravin obsahuje fyto látky, těmi jsou např. flavony a katechiny. Rostliny produkují tyto polyfenoly k prvotní obraně proti ultrafialovému záření, tvorbě kyslíkových radikálů a/nebo napadení organismy. Z hlediska člověka pak mohou tyto sloučeniny mít pozitivní účinek na zdraví tím, že zabraňují ateroskleróze a modulují imunitní odpověď. Navíc některé z těchto fyto látek působí na specifické buněčné proteiny a prokazují tedy tzv. „food functionality“. V Číně se již dlouho používá čaj Yin Chin jako tradiční způsob léčby novorozenecké žloutenky způsobené akumulací bilirubinu. Účinnou složkou čaje Yin Chin je dimethylskuletin, který má strukturu připomínající A a C kruhy flavonoidů. Ukázalo se, že tato sloučenina prostřednictvím CAR indukuje geny odpovědné za solubilizaci a exkreci bilirubinu (Yao a kol., 2010).

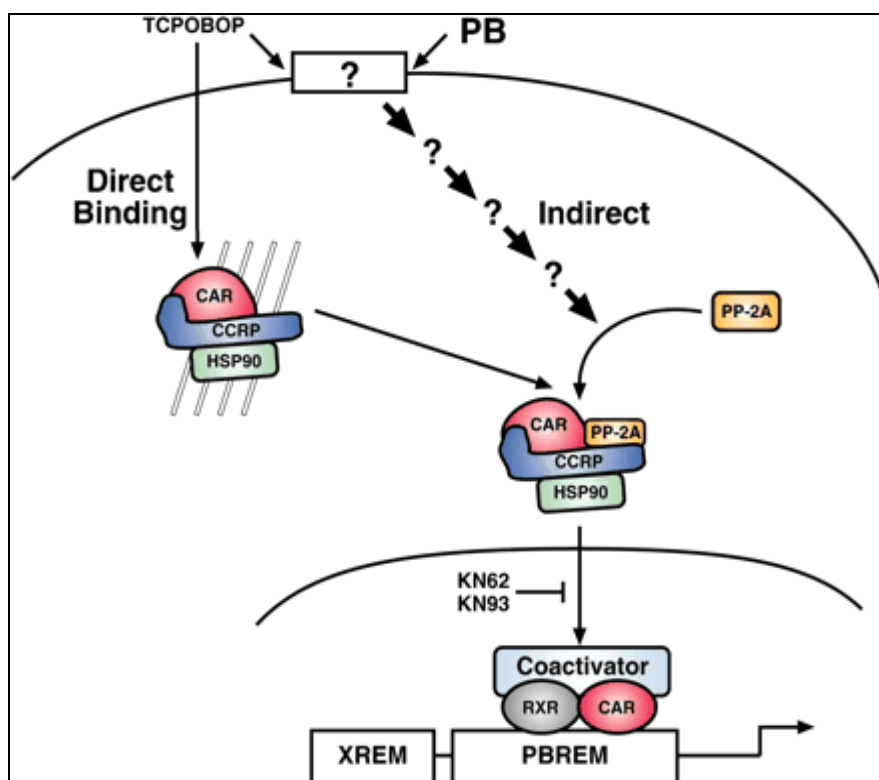
### 3.6 CAR - aktivace

V myších hepatocytech se CAR nachází v přirozeném stavu v cytoplasmě (*pozn.* na rozdíl od většiny orphan nukleárních receptorů, které se nachází v jádře, a naopak podobně jako klasické nukleární receptory steroidních hormonů - např. GR). Retence v cytoplasmě zabraňuje chronické aktivaci CAR cílových genů a umožňuje odpovídající regulaci aktivity receptoru. Nedávno byla zjištěna další vlastnost CAR aktivace, kterou je translokace receptoru k membráně, což zvyšuje možnost zapojení signalizačních komponent důležitých pro CAR aktivaci a uložených v membráně. Na rozdíl od aryl hydrokarbonového receptoru (AhR), který je aktivován přímou vazbou ligandu, nukleární translokace CAR nevyžaduje nutně přímou vazbu ligandů. Bylo prokázáno, že fenobarbital a bilirubin jsou aktivátory CAR, ale přitom se nezdá, že by přímo interagovali s CAR-LBD (Moore a kol., 2000). Silný fenobarbitalu podobný aktivátor TCPOBP se váže přímo k mCAR a translokuje receptor do jádra. Ačkoli se nezdá, že by hCAR vázal TCPOBP, je tento xenosenzor v játrech humanizovaných myší, ve kterých má nadměrnou expresi, translokován do jádra (*pozn.* u humanizovaných myší je mCAR nahrazen hCAR a ty slouží jako farmakologické a toxikologické modely ke studiu lékových odpovědí) (Swales a Negishi, 2004). Aktivátory tedy mohou vyvolat nukleární translokaci CAR nezávisle na schopnosti vazby k receptoru (di Masi a kol., 2009).

S regulací CAR translokace je také spojena defosforylace. Okadaická kyselina (*angl.* okadaic acid), inhibitor proteinové fosfatázy, totiž blokuje fenobarbitalem indukovanou expresi cílového genu a zabraňuje nukleární akumulaci CAR. Současná nadměrná exprese proteinové fosfatázy 2A (PP2A) a mCAR zvyšuje nukleární translokaci

mCAR indukovanou TCPOBOP v HepG2 buňkách. Defosforylace CAR vytváří tedy rozhodující signál pro jeho uvolnění z cytozolického komplexu po zapůsobení aktivátoru (di Masi a kol., 2009).

CAR je navázán v cytozolu v multiproteinovém komplexu, který obsahuje nedávno identifikovaný protein označený cytoplasmic CAR retention protein (CCRP) a chaperon Hsp90 (heat shock protein 90). Nadměrná exprese CCRP v buňkách lidského hepatomu vlastně usnadní akumulaci CAR v cytozolu, a proto dojde po stimulaci TCPOBOP k větší nukleární translokaci receptoru. Toto zdůrazňuje roli, kterou hraje CCRP v mechanismu nukleární translokace CAR receptoru. Kromě toho komplex Hsp90:CAR také přibírá PPA2, která katalyzuje mCAR Ser202 defosforylaci. Ser202Asp mutace, napodobující fosforylaci, ruší nukleární akumulaci CAR indukovanou fenobarbitalem, na rozdíl od mutace Ser202Ala, která podporuje akumulaci CAR v jádře (di Masi a kol., 2009).



**Obr. 9**

### **Mechanismus aktivace CAR receptoru**

CAR se v cytozolu nachází v multiproteinovém komplexu obsahujícím cytoplasmic CAR retention protein (CCRP) a Hsp20 (heat shock protein 90). Po navázání CAR ligandu TCPOBOP je k makromolekulárnímu komplexu přibírána proteinová fosfatáza PP2A. PP2A katalyzuje CAR Ser202 defosforylaci, která následně podpoří nukleární akumulaci CAR. Fenobarbital (PB), který je aktivátor CAR, ale ne ligand, aktivuje PP2A zatím neznámým mechanismem čili podporuje translokaci CAR do jádra prostřednictvím ligandově nezávislé cesty. Po translokaci do jádra prochází CAR dalšími kroky aktivace, které zahrnují působení  $Ca^{2+}$ /kalmudin-dependentní kinázy (KN62 a KN93 jsou její inhibitory), CAR/RXR $\alpha$  heterodimerizaci, vazbu CAR-DBD k phenobarbital-responsive enhancer modulu (PBREM) nacházejícímu se v promotorech cílových genů a přibírání koaktivátorů (převzato ze Swales a Negishi, 2004).

CAR nukleární translokace nevede nutně k zvýšení transkripce cílového genu. Translokace CAR do jádra by měla být následována CAR/RXR $\alpha$  asociací (tj. heterodimerizací), navázáním CAR-DBD k RE a přibíráním koaktivátorů (např. TIF2, peroxisome proliferative activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) a steroid receptor coactivator 1 (SRC-1)). V tomto signalizačním schématu slouží translokace CAR do jádra jako první důležitý krok k regulaci transkripční aktivity xenosenzoru (di Masi a kol., 2009).

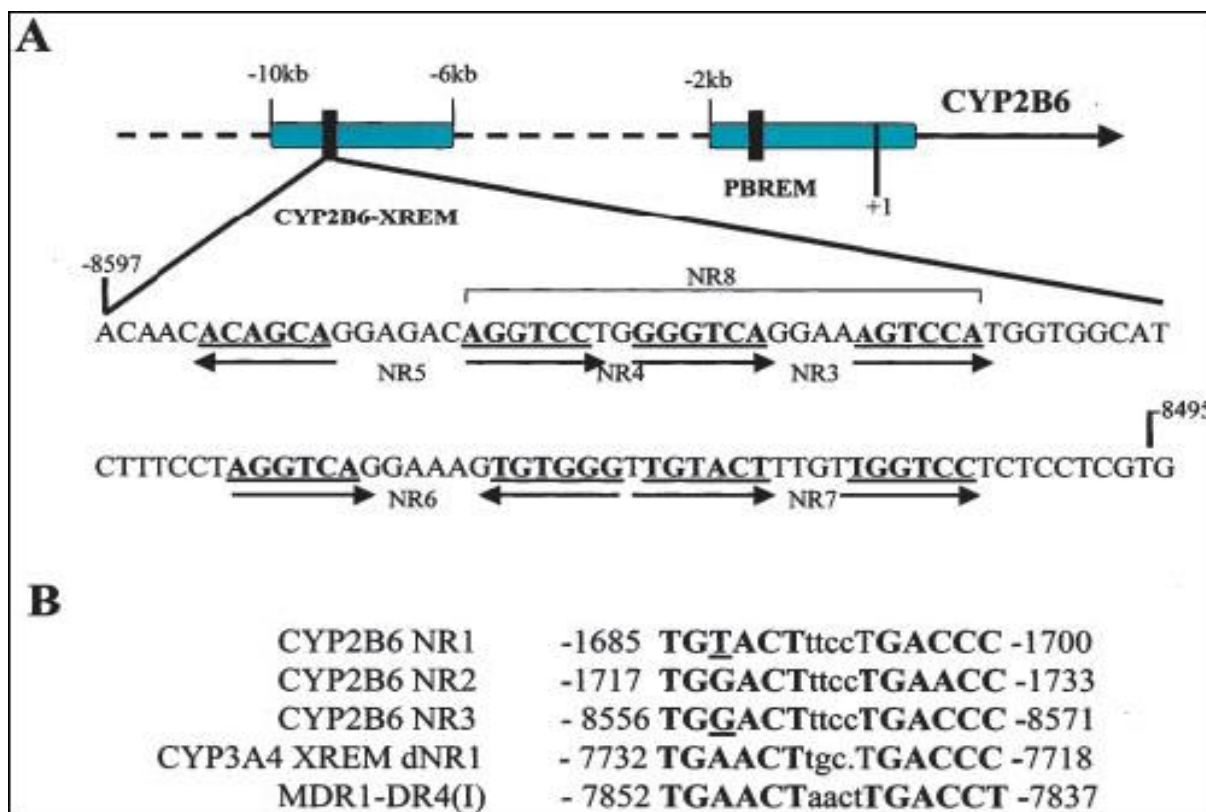
Vzhledem ke korelaci nukleární translokace s indukcí cílového genu a konstitutivní aktivitou CAR se zpočátku předpokládalo, že nukleární translokace vede k aktivaci CAR. Novější studie prokázaly, že KN-62, inhibitor Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní kinázy, potlačuje indukcí *Cyp2b10* mRNA stejně jako aktivaci NR1-reportérového luciferázového konstruktu, které jsou v myších primárních hepatocytech vyvolané prostřednictvím PB a TCPOBOP. Tento inhibitor ale nezabraňuje indukované nukleární akumulaci CAR prostřednictvím fenobarbitalu, což naznačuje, že CAR může prodělat v jádře zřetelný aktivační proces (Swales a Negishi, 2004).

### **Vazebná místa CAR v promotorech cílových genů**

CAR aktivuje transkripci prostřednictvím vazby obecně především k DR4 motivům, jako jsou např. dvě NR-vazebná místa, které obklopují místo nukleárního faktoru 1 uvnitř 51-bp PB-responsive enhancer modulu (PBREM) *Cyp2b10* genu. CAR má také schopnost aktivovat 290-bp fragment *gtPBREM* (-3483/-3194) *UGT1A1* genu. Původně byly v *gtPBREM* lokalizovány dva DR4 (direct repeat 4) a jeden DR3 element (označené NR4, *gtNR1* a NR3), z nichž *gtNR1* poskytoval hlavní CAR vazebné a aktivační místo, ačkoli další dvě místa byla potřebná pro optimální *gtPBREM* aktivitu. Později byl nalezen v *gtPBREM* hned pod NR4 další DR3 element, ke kterému by se mohly vázat CAR i PXR (Swales a Negishi, 2004).

Pro maximální indukci exprese *CYP2B6* genu je vedle PBREM nepostradatelný také xenobiotic-responsive enhancer modul (XREM) v distální oblasti promotoru *CYP2B6* genu. K vazebným motivům *CYP2B6*-XREM (specificky k NR3 a NR8) se váží heterodimery CAR/RXR $\alpha$  a PXR/RXR $\alpha$  (Wang a kol., 2003).





**Obr. 10**

### **Lokalizace a sekvence CYP2B6-XREM**

Tento CYP2B6-XREM byl identifikován pomocí počítačového vyhledávání v -10 kb oblasti promotoru CYP2B6 genu. Mezi -8.5 a -8.6 kb byl identifikován klastr odpovídajících polovin vazebných míst. V návaznosti na NR1 a NR2 motivy v PBREM byly tyto motivy označeny NR3 - NR8 (A). Dále jsou srovnány sekvence NR3 a další známých vazebných motivů spjatých s PXR/CAR cílovými geny (B) (převzato z Wang a kol., 2003).

## **3.7 CAR - funkce nukleárního receptoru**

Člověk a zvířata jsou vystaveny potenciálně toxickým chemickým látkám endogenního i cizího původu včetně žlučových kyselin, cholesterolu a oxysterolů, steroidních hormonů, bilirubinu a mastných kyselin (endobiotik), jakož i toxinů, karcinogenů, polutantů, léčiv, dietárních složek a bylinných přípravků (xenobiotik). Za účelem čelit toxickým inzultům a udržet homeostatickou rovnováhu v důležitých metabolických cestách došlo k vyvinutí obranných mechanismů zahrnujících enzymy a transportní proteiny schopné biotransformačních reakcí a následné eliminace

endobiotických a xenobiotických metabolitů. Studie za použití CAR/PXR knockout a transgenních myšších modelů prokázaly překrývající se skupinu cílových genů těchto receptorů, jejichž exprese je klíčová při odpovědi na potenciálně škodlivé chemické látky. CAR a PXR fungují jako senzory toxických vedlejších produktů z endogenních metabolických sloučenin a exogenních chemických látek s cílem usnadnit jejich eliminaci. Oba receptory, CAR a PXR, jsou aktivovány některými stejnými ligandy, regulují podmnožinu společných genů a sdílí stejné nebo podobné response elementy pro vazbu těchto nukleárních receptorů (di Masi a kol., 2009).

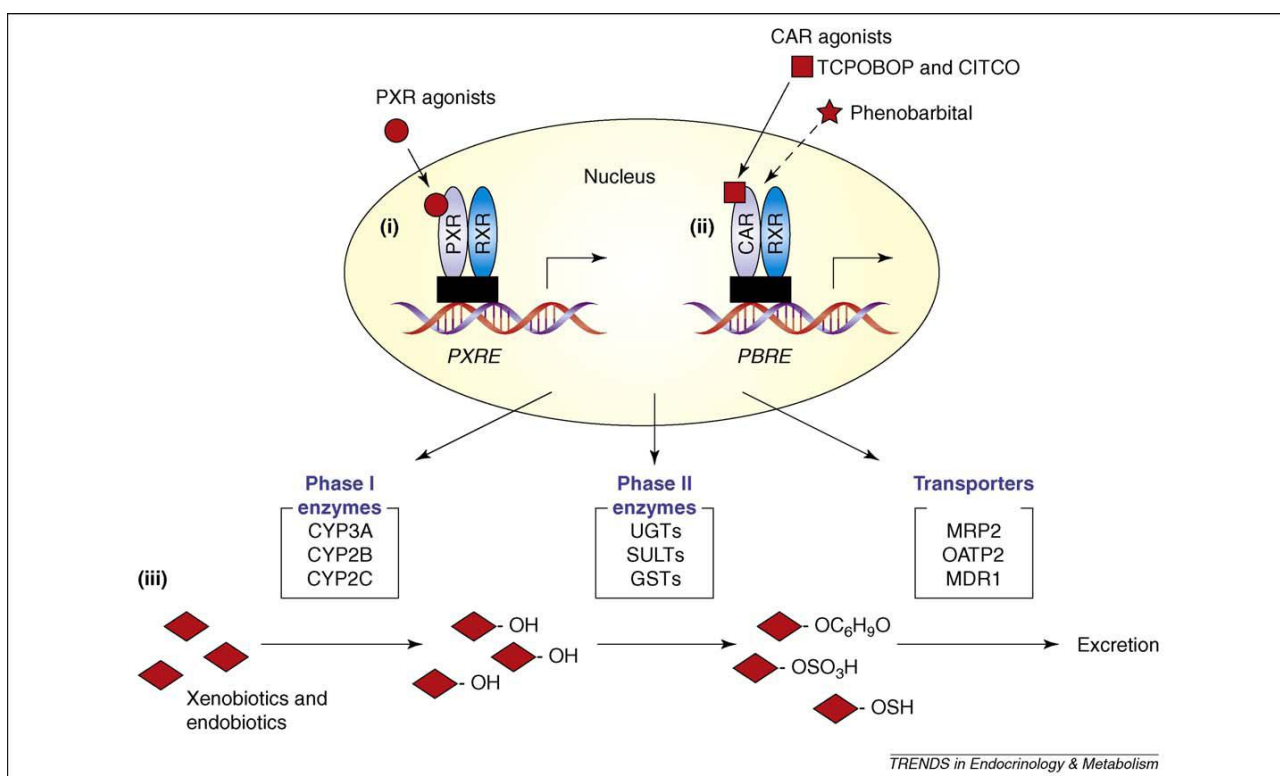
Ačkoli byly PXR a CAR nejprve identifikovány jako „xenobiotické receptory“, přibývá důkazů, které naznačují, že tyto receptory mají stejně důležitou roli v homeostáze endobiotik. PXR a CAR přispívají k energetické homeostáze prostřednictvím svých účinků na jaterní lipogenezi,  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin a glukoneogenezi. Také se objasnilo, že při inhibici lipogeneze a glukoneogeneze nepůsobí PXR a CAR samostatně, ale spíše interagují s mnoha dalšími transkripčními faktory a koregulátory včetně PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor-4- $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), fork-head insulin-responsive transcription factor 1 (FoxO1) a winged helix/fork-head transcription factor (FoxA2) (Wada a kol., 2009).

V rámci odpovědi na vystavení xenobiotikům receptory CAR a PXR chrání tělo tím, že indukují geny fází detoxifikace I, II a III. Tyto receptory jsou známé i tím, že urychlují spotřebu energie prostřednictvím regulování genů spojených s metabolismem lipidů a cukrů. Tento druh integrované genové regulace je logický, jelikož se detoxifikační procesy skládají z oxidace, konjugace a membránového transportu, které jsou svázané se spotřebou energie z NADPH a ATP (Yao a kol., 2010).

### **3.7. Detoxifikace prostřednictvím CAR**

Biotransformační proces xenobiotik se dělí do dvou fází - fáze I a II. Hlavní reakce ve fázi I jsou oxidace (např. hydroxylace a deaminace), redukce (např. přijetí vodíkových atomů) a hydrolýza (např. štěpení esterových a amidových vazeb). Jednou z nejdůležitějších charakteristik reakcí fáze I je, že toxikant může získat funkční skupinu, jako -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH nebo -SH, čímž se vytvoří produkt zvaný primární metabolit. Reakce fáze II jsou zato syntetické nebo konjugační reakce, které kombinují toxikanty nebo primární metabolity přímo s endogenními substancemi (např. Gly, Cys, glutathion, sulfáty a kyselina glukuronová). NADPH-cytochrom P450 (CYP), systém flavinové

oxygenázy se smíšenou funkcí, je nejdůležitější enzymatický systém mezi oxidačními reakcemi fáze I. Zástupci CYP superrodiny (hemdependentní mono-oxygenázy) jsou exprimovány v játrech, střevech a ledvinách, tj. primárních orgánech pro vylučování, metabolismus a exkreci xenobiotik. CYP mikrozomální enzymy reprezentují supergenovou rodinu hemoproteinů, které katalyzují metabolickou přeměnu udivující škály xenobiotik i endogenních substrátů (např. steroidní hormony) na více polární deriváty. V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé izoformy CYP, které lze zařadit do 18 rodin a 43 podrodin. Pro metabolismus léčiv jsou nejdůležitější izoformy CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 a CYP1A2 (di Masi a kol., 2009).



Obr. 11

### Regulace enzymů fází I a II a transportérů fáze III prostřednictvím nukleárních receptorů CAR a PXR

Aktivace CAR a PXR vede ke koordinovanému regulování metabolizujících enzymů fází I a II a transportérů fáze III. (i) PXR agonisté se vážou přímo k receptoru. (iii) Mezi agonisty CAR je u CITCO a TCPOBOP prokázáno, že se vážou přímo k hCAR resp. k mCAR receptoru, zatímco fenobarbital se k receptoru neváže. Fenobarbital aktivuje PP2A (proteinová fosfatáza 2A) a disociuje CAR od CCRP (cytoplasmic CAR-retention protein), což ve k (iii) nukleární translokaci CAR a transkripci genů kódujících metabolizující enzymy fází I a II a transportéry fáze III. Zkratky: CITCO, 6-(4-chlorofenyl)imidazol[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd O-(3,4-dichlorobenzyl) oxim; CYP, cytochrom P450; GST, glutathion-S-transferáza; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; OATP, organic anion transporter polypeptide; PBRE, phenobarbital-response element; PXRE, PXR-response element; RXR, retinoid X receptor; SULT, sulfotransferáza; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzen; UGT, UDP-glukuronosyltransferáza (převzato z Wada a kol., 2009).

## Tabulka 2

### Některé CAR cílové geny zapojené ve fázích I, II a III detoxifikace

Fáze	Cílový gen	Organismus	Účinek na cílový gen
I	<i>Aldh1A1</i>	myš	↑
I	<i>Aldh1A7</i>	myš	↑
I	<i>CYP1A1</i>	myš	↑
I	<i>CYP2A4</i>	myš	↑
I	<i>CYP2A6</i>	člověk	↑
I	<i>CYP2B1</i>	potkan	↑
I	<i>CYP2B2</i>	potkan	↑
I	<i>CYP2B6</i>	člověk	↑
I	<i>CYP2B10</i>	myš, člověk	↑
I	<i>CYP2C6</i>	potkan	↑
I	<i>CYP2C7</i>	potkan	↑
I	<i>CYP2C9</i>	člověk	↑
I	<i>CYP2C19</i>	člověk	↑
I	<i>CYP3A1</i>	potkan	↑
I	<i>CYP3A4</i>	člověk	↑
I	<i>CYP3A11</i>	myš, člověk	↑
II	<i>GSTA1</i>	myš, potkan	↑
II	<i>GSTA2</i>	myš, potkan	↑
II	<i>GSTA3</i>	myš, potkan	↑
II	<i>Gstm1</i>	myš, potkan	↑
II	<i>Gstm2</i>	myš	↑
II	<i>UGT1A1</i>	myš, člověk	↑
II	<i>UGT2B1</i>	potkan	↑
III	<i>MDR1A</i>	myš, člověk	↑
III	<i>MRP1</i>	myš	↑
III	<i>MRP2</i>	myš, potkan, člověk	↑
III	<i>MRP3</i>	myš, člověk	↑
III	<i>MRP4</i>	myš	↑
III	<i>OATP2</i>	myš, potkan	↑

Pozn.: ↑-indukce (up-regulace) genu (převzato z di Masi a kol., 2009)

Na rozdíl od CYP enzymů, lokalizovaných především v hladkém endoplazmatickém retikulu, enzymy fáze II jsou situovány v cytoplazmatické matrix. Metabolizující nebo

konjugační enzymy fáze II patří do mnoha superrodin zahrnujících sulfotransferázy (SULT), UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy, NAD(P)H-menadion reduktázy, epoxid hydrolázy, glutathion-S-transferázy (GST) a N-acetyltransferázy. Zvýšená hydrofilita xenobiotik, získaná pomocí reakcí katalyzovaných enzymy fáze II, obecně zlepšuje jejich exkreci žlučí a/nebo močí (di Masi a kol., 2009).

Důležitým rysem regulace enzymů fáze I a II, jakož i transportérů tzv. „fáze III“, je, že mohou být indukovány na vyšší úroveň exprese po expozici specifickým substrátům i strukturálně různorodým sloučeninám. Celkově regulace genové exprese různých metabolizujících enzymů fází I, II a transportérů „fáze III“ má potenciální vliv na metabolismus, eliminaci, farmakokinetiku, farmakodynamiku, toxikokinetiku, toxikodynamiku a lékové interakce, čímž chrání lidský organizmus před vystavením zdraví škodlivým xenobiotikům. CAR koordinuje regulaci mnoha genů, což vede ve většině případů k metabolické detoxifikaci pomocí CYP enzymů a transferáz uvnitř hepatocytů a následně k úplnému odstranění metabolitů z krve pomocí transportérů, kterými jsou především P-glykoprotein (P-gp, také známý jako multidrug resistance protein-1 – MDR1), multidrug resistance-associated proteins (MRPs) a organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2) (di Masi a kol., 2009).

### 3.7.2 CAR jako rizikový faktor

Obrana vůči toxicitě pomocí zvýšení metabolismu může často naopak podpořit tuto toxicitu, které by měla zabránit. CAR byl nedávno identifikován jako klíčový regulátor metabolismu a hepatotoxicity acetaminofenu. Kromě známých GSTs, které jsou indukovány fenobarbitalem, CAR také reguluje glutathion-S-transferázu-pí (GSTPí), enzym, který zvyšuje depleci glutathionu a tak podporuje toxicitu acetaminofenu. Toxicita vyvolaná vysokými dávkami acetaminofenu se objevila u *wild-type* myší, ale ne u mCAR knockout (mCAR-null) myší, což je v souladu s rezistencí vůči této toxicitě, která byla u GSTPí-null myší. Podobně CAR aktivátory PB a TCPOBOP senzibilizovaly myši vůči kokainové hepatotoxicitě, která scházela u mCAR-null myší. Oxid dusnatý (NO) může chránit buňky vůči takové xenobiotiky indukované toxicitě pomocí svých antioxidačních vlastností, které mohou ukončit lipidovou peroxidací a oxidativní stres. CAR reguluje gen lidské indukovatelné NO syntázy (iNOS) prostřednictvím DR4 elementu. Nicméně prodloužená expozice vůči NO posune buněčný redoxní stav znovu do oxidované formy cestou oxidace thiolů např. glutathionu. Chronická aktivace CAR tedy může podpořit hepatotoxické účinky (Swales a Negishi, 2004).

### 3.7.3 Úloha CAR v metabolismu bilirubinu

Bilirubin, konečný oxidativní produkt katabolizmu hemu, je jedním z nejvíce toxických přirozených rozkladných produktů v těle. Jeho akumulace je spojená se žloutenkou, která může chronicky vést k neurotoxicitě a event. k fatální encefalopatii. Glukuronidace pomocí uridin-5'-difosfát-glukuronosyltransferázy 1A1 (UGT1A1) je hlavní detoxifikační cestou bilirubinu a tento konjugát je secernován přes kanalikulární membránu hepatocytů do žluči aktivním transportérem MRP2. Dlouhou dobu bylo známo, že by fenobarbital mohl snižovat zvýšené hladiny bilirubinu. Nyní je vysvětleno, že to způsobuje CAR, který je schopen podpořit exkreci bilirubinu indukci UGT1A1, OATP1, MRP2 a GSTA1. Další žlučový transportér MRP3, jehož substrátová specifita se překrývá s MRP2, je také indukovatelný fenobarbitalem, ale tato indukce se zdá být na CAR nezávislá a role CAR v regulaci MRP3 tedy není zřejmá (di Masi a kol., 2009).

### 3.7.4 Úloha CAR v homeostáze žlučových kyselin

Žlučové kyseliny, které jsou produkovány játry, jsou nezbytné pro eliminaci nadbytečného cholesterolu z těla a solubilizaci, absorpci a transport dietárních lipidů ve střevě. Homeostáza žlučových kyselin je citlivě regulována, protože žlučové kyseliny jsou detergenty, které mohou být extrémně toxické, pokud se zvýší jejich hladiny. Navíc sekrece žluči je důležitou cestou pro eliminaci velkých hydrofobních endobiotik a xenobiotických metabolitů zahrnujících mnoho konjugátů s velkou molekulovou hmotností.

Jak bylo prokázáno u myší, mCAR indukuje enzymy a transportéry spojené s eliminací žlučových kyselin, jmenovitě Cyp3a11, Sult2a1 a transportér Mrp3. Proto tato protektivní role CAR přispívá k udržení normálních hladin cholesterolu nepřímo přes regulaci homeostázy žlučových kyselin. Tato funkce CARu se objevuje při absenci klíčových sensorů žlučových kyselin – receptorů FXR a PXR. Bylo prokázáno u FXR/PXR double knockout myší, že kyselina cholová vedla k vyšším hodnotám exprese CAR a Cyp2b mRNA, a také že předchozí podání fenobarbitalu nebo TCPOBOP indukovalo skupinu cílových genů, jejichž přepis vyústil v ochranu proti toxicitě bilirubinu s redukcí sérových koncentrací žlučových kyselin a bilirubinu. Zdá se tedy, že CAR, PXR a FXR spolupracují na ochraně proti toxicitě jaterních žlučových kyselin (di Masi a kol., 2009).

### 3.7.5 Úloha CAR v homeostáze steroidních a tyroidních hormonů

Jako první endogenní modifikátory CAR aktivity byly identifikovány steroidy androstanol a androstenol, které inhibují aktivitu receptoru disociací interakce mezi CAR a SRC-1. Obdobně progesteron a testosteron potlačují konstitutivní aktivitu CAR. Naproti tomu farmakologické hladiny estradiolu, estronu i pregnan-3,20-dionu (metabolit progesteronu) mohou aktivovat CAR u hlodavců resp. u člověka. Protože CYP2B, hlavní cíl CAR aktivace, metabolizuje estrogény i androgeny a CAR regulovaná UGT1A1 glukuroniduje estrogény, tak by indukce těchto enzymů způsobená aktivací CAR pomocí xenobiotik a endobiotik mohla zvýšit katabolismus steroidních hormonů. Mimo to může CAR zvýšit sulfataci steroidů za účasti fenobarbitalu prostřednictvím transaktivace genu 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát syntázy 2 (PAPSS2). Xenobiotika tudíž prostřednictvím CAR mohou ovlivnit různé úrovně homeostázy steroidů indukci CYPs a transferáz spjatých s metabolismem estrogenů a jejich steroidních prekurzorů (di Masi a kol., 2009).

Další důkaz, že CAR může být spojený s metabolismem steroidních hormonů, se objevil, když byl v lidském genu pro CAR identifikován distální glucocorticoid-response element (GRE), 4.4 kb nad místem transkripčního startu. Tato skutečnost přináší do endokrinní homeostázy další rozměr komplexnosti (*Pozn.* Zůstává zajímavou otázkou, jakými dalšími způsoby je regulována exprese samotného CAR jako transkripčního faktoru.) (Swales a Negishi, 2004).

Tyroidní hormon (TH) má mimo jiné významnou úlohu v jaterní regeneraci a využití energie. Hladiny TH jsou kontrolovány vyvažováním jeho syntézy, metabolismu a sekrece. Tyotropin (TSH) zvyšuje syntézu neaktivního 3-5-3'-5'-tetrajodtyroninu (tyroxin, T4) ve štítné žláze, který je pak přeměněn na různé formy TH dejodázami periferních cílových tkáních, jako jsou játra a ledviny. Je prokázáno, že chronická léčba fenobarbitalem podporuje hypertrofii štítné žlázy u lidí a potkanů. Fenobarbitalem indukovaná CAR aktivace snižuje sérovou hladinu celkového T4, zatímco nebyly naměřeny změny sérových hladin aktivního trijodtyroninu (T3). Také chronická léčba CAR aktivátorem fenytoinem vedla ke snížení sérových hladin celkového T4 a podporovala hypertrofii štítné žlázy. Od té doby, co je známo, že TH je sulfatován a glukuronidován kvůli clearanci a exkreci, se předpokládá, že enzymy fáze II (tj. UGT1A1 a SULT1A1) jsou určujícími faktory odpovědnými za pokles T4. Nicméně zůstává neobjasněno, jestli UGT1A1 a SULT1A1 jsou hlavními enzymy konjugujícími TH a proč tyto enzymy efektivněji konjugují T4 ve srovnání s T3 (di Masi a kol., 2009).

V souvislosti s úlohou CAR v energetické homeostáze je prokázáno, že během dlouhodobého půstu dochází k jeho indukci, a proto se předpokládá, CAR reaguje na nutriční stres. U CAR deficitních myší se projevuje porucha půstové adaptace a při kalorickém omezení ztrácí tyto myši více hmotnosti. Fyziologické důsledky CAR aktivace během dlouhodobého půstu nejsou plně objasněny. Jedním z možných mechanismů, kterým CAR ovlivňuje reakce na půst, je regulace metabolismu TH prostřednictvím jeho metabolizujících enzymů fáze II, jako jsou Ugt1a1, Sultn, Sult1a1 a Sult2a1. Nicméně změny hladin TH během půstu jsou aspoň částečně nezávislé na CAR, protože podávání CAR agonistů nepostačovalo k ovlivnění sérových hladin aktivního tyroidního hormonu T3 (Wada a kol., 2009).

### **3.7.6 Úloha CAR v glukoneogenezi a lipidovém metabolismu**

Játra jsou nepostradatelným orgánem z hlediska metabolické homeostázy. Narušení lipidového a glukózového metabolismu v játrech může způsobit různé kardiovaskulární a metabolické nemoci např. aterosklerózu, diabetes 2. typu, obezitu a inzulinovou rezistenci. Játra udržují homeostázu triglyceridů pomocí ukládání cirkulujících mastných kyselin ve formě triglyceridů, oxidace mastných kyselin a sekrece triglyceridů formou VLDL. Za normálních podmínek játra produkují triglyceridy přeměněné z mastných kyselin a glukózu jako hlavní zdroje energie, kterými se zajišťuje energetická homeostáza celého organismu. Aby se uspokojila potřeba energie během hladovění nebo cvičení, jsou z adipocytů uvolňovány mastné kyseliny a v játrech je produkována glukóza, které jsou pak využity kosterním svalstvem (di Masi a kol., 2009).

Játra hrají důležitou roli v přizpůsobení metabolického procesu vzhledem k dennímu cyklu přijímání potravy a půstu. Glukóza a inzulin jsou u lidí a myší pod vlivem cirkadiálních rytmů. Provedené studie prokázaly, že jaterní exprese CAR vykazuje cirkadiální rytmus. Konkrétně CAR a cílové geny CAR jsou u myší během dne vysoce exprimovány, ale v noci je exprese menší. Nicméně glukoneogeneze, glykolýza a metabolismus mastných kyselin vrcholí v noci. Zůstává tedy objasnit, jestli doba a rozsah detoxifikace potravních složek zprostředkovaná CAR souvisí s poruchami ukládání energie (Wada a kol., 2009).



### 3.7.6.1 CAR a glukoneogeneze

Jaterní glukoneogeneze obstarává důležitý zdroj energie, je citlivě regulována inzulínem a glukagonem, a hraje zásadní roli pro přežití během půstu nebo hladovění. Enzymy spojené s glukoneogenezí zahrnují zejména glukóza-6-fosfatázu (G6Pázu) a fosfoenolpyruvátcarboxykinázu (PEPCK). G6Páza je klíčový enzym, který reguluje sérovou hladinu glukózy katalyzováním defosforylace glukóza-6-fosfátu generovaného z glukoneogeneze i glykogenolýzy. PEPCK katalyzuje vytvoření fosfoenolpyruvátu z oxalacetátu za uvolnění oxidu uhličitého a GDP. V játrech je glukoneogeneze pozitivně regulována glukokortikoidy, cAMP a glukagonem, a negativně regulována inzulínem a glukózou (Konno a kol., 2008).

Mezi mechanismy účinků inzulínu a xenobiotik existují funkční vazby. Je dlouho známo, že léčba látkami, které jsou nyní nazývané aktivátory CAR a PXR, potlačuje jaterní glukoneogenní enzymy a geny. Bylo prokázáno, že fenobarbital snižuje plazmatickou hladinu glukózy u diabetických pacientů. Ačkoli zůstává nejasný přesný mechanismus, většina dosud získaných dat silně nasvědčuje tomu, že aktivace CAR a PXR potlačuje glukoneogenezi interferováním s transkripčními faktory nebo kofaktory spojenými s transkripční regulací těchto glukoneogenních enzymů. Regulace glukoneogeneze prostřednictvím fork-head insulin-responsive transcription factor 1 (FoxO1) může být také ovlivněna CAR receptorem. FoxO1 je klíčový regulátor, který pozitivně reguluje glukoneogenní enzymy během půstu (když se snižují hladiny inzulínu), což je důležité pro glukózovou homeostázu. Ukázalo se, že - podobně jako inzulín - CAR potlačuje vazbu FoxO1 k insulin-response sekvencím v promotorech genů glukoneogenních enzymů, tedy oslabuje schopnost FoxO1 stimulovat glukoneogenní geny, jako je PEPCK. To poskytuje pravděpodobné vysvětlení, jakým způsobem léčba fenobarbitalem zlepšuje inzulínovou senzitivitu u non-inzulín-dependentního diabetu (diabetu II. typu). Přímá interakce mezi CAR a PXR s FoxO1 se zdá být zásadním mechanismem potlačujícím geny pro G6Pázu a PEPCK1 při odpovědi na xenobiotika. Ačkoli jiným molekulárním mechanismem než je u inzulínu, interakce CAR a PXR s FoxO1 vede k potlačení glukoneogeneze. Mimo to je CAR spojený s peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), transkripčním kofaktorem indukovaným při půstu, který reguluje energetický metabolismus (di Masi a kol., 2009).

Indukce CAR při půstu by snad mohla vyžadovat koaktivátor PGC-1 $\alpha$ , protože PGC-1 $\alpha$  zvyšuje CAR aktivitu v ligand-independentním režimu i zesiluje transkripční aktivitu CAR v přítomnosti jeho agonistů. Byl identifikován evolučně zachovaný HNF4 $\alpha$ -response element (HNF4-RE) umístěný v proximálním promotorovém regionu genu CAR, což by snad mohlo vysvětlit koordinovanou indukci PGC-1 $\alpha$  a CAR během půstu (Wada a kol., 2009).

Ve studii používající myši, kterým byl podáván fenobarbital, se prokázala suprese jaterních glukoneogenních enzymů PEPCCK a G6Pázy, a tato suprese byla CAR dependentní. To připomíná supresi stejných glukoneogenních enzymů u myší s aktivovaným PXR. HNF4 $\alpha$  je pozitivní regulátor glukoneogeneze. Zdá se, že CAR inhibuje expresi genů glukoneogenních enzymů prostřednictvím inhibice HNF4 $\alpha$ , která je dosažena kompeticí CAR s HNF4 $\alpha$  při vazbě k DR1 (direct repeat 1) motivu v promotorovém regionu genů glukoneogenních enzymů. Tento kompetiční mechanismus by dále mohl fungovat i při vazbě koaktivátorů jako např. TIF2 a PGC-1 $\alpha$ . Pokud tomu tak opravdu je, mohlo by to vysvětlit inhibiční účinek CAR na další klíčové geny spojené s glukózovým a lipidovým metabolismem (Wada a kol., 2009).

Vztah mezi CAR a AMPK (AMP-aktivovaná proteinová kináza) by snad mohl mít také vliv na energetickou homeostázu. CAR aktivátor fenobarbital může zvýšit aktivitu AMPK. AMPK je indikátor stavu energie buňky a funguje jako energetický senzor. Tato stimulace AMPK je nezbytná k tomu, aby fenobarbital mohl indukovat expresi CAR cílových genů. Farmakologický inhibitor AMPK nebo dominantně negativní forma AMPK ruší tyto účinky fenobarbitalu, zatímco agonista AMPK zvyšuje fenobarbital-responzivní aktivaci CAR cílových genů a nukleární translokaci CAR v myších játrech (Rencurel a kol., 2006; Wada a kol., 2009).

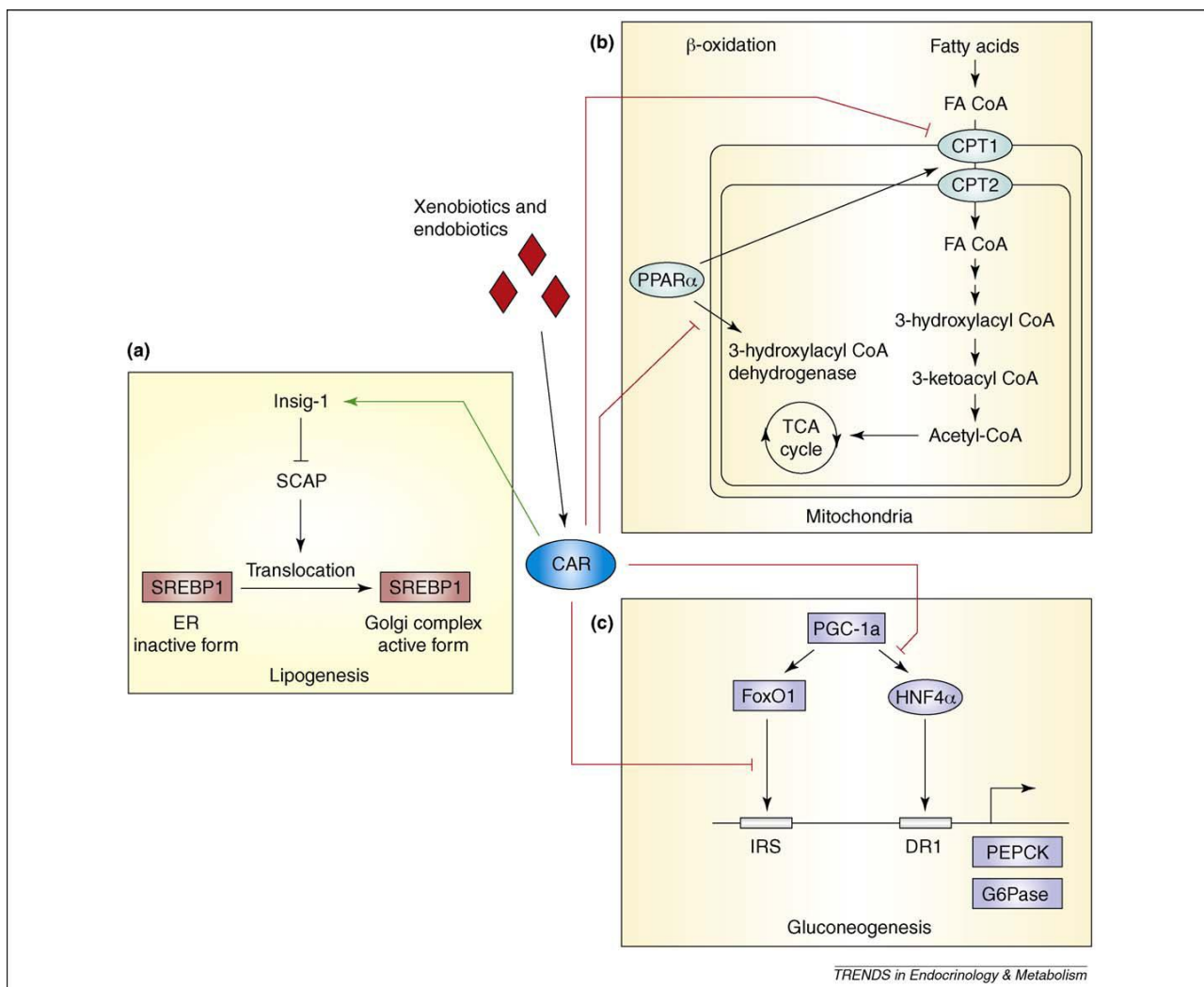
### **3.7.6.2 CAR a lipidový metabolismus**

Jaterní lipidový metabolismus zahrnuje syntézu lipidů (lipogenezi), oxidaci mastných kyselin ( $\beta$ -oxidaci) a sekreci lipidů. Lipogeneze je definována jako syntéza lipidů de novo a zahrnuje syntézu mastných kyselin a jejich následnou přeměnu na triglyceridy v játrech a tukové tkáni. Zvýšená jaterní lipogeneze může vést k steatóze manifestované nadměrným hromaděním triglyceridů. Lipogeneze je efektivně regulovaná mnoha způsoby včetně hormonů, genetických faktorů a výživy. Vedle syntézy mastných kyselin de novo je

další cestou lipogeneze v játrech vychytávání mastných kyselin z cirkulace a jejich přeměna na triglyceridy, což nastává při nadbytku cirkulujících mastných kyselin (např. při inzulinové rezistenci a obezitě) (Wada a kol., 2009).

Jaterní lipidový metabolismus hraje hlavní roli v přežití během půstu a/nebo během dlouhého cvičení. Když jsou hladiny glykémie nízké, játra zvyšují  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin a ketogenezi, aby zásobily extrahepatické tkáně ketolátkami. Současně játra snižují lipogenezi, aby snížili jaterní ukládání triglyceridů. Za těchto podmínek jsou up-regulovány karnitin palmitoyl transferáza 1A (CPT1A) a mitochondriální 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntáza 2 (HMGCS2), které jsou klíčovými enzymy v  $\beta$ -oxidaci resp. ketogenezi. Kdežto stearoyl-CoA desaturáza 1 (SCD1), klíčový enzym pro syntézu nenasycených mastných kyselin, je up-regulována glukózou a fruktózou. Při absenci inzulinu stimuluje winged helix/fork-head transcription factor (FoxA2) expresi CPT1A a HMGCS2. Inzulin potlačuje tyto dva geny inaktivací FoxA2 prostřednictvím AKT-dependentní signální cesty. Inzulin také zvyšuje transkripci *SCD1* genu zejména aktivací sterol regulatory element-binding protein (SREBP) (*pozn.* SREBP je transkripční faktor, jehož cílovými geny jsou především geny pro LDL receptor a HMG-CoA reduktázu) (di Masi a kol., 2009).

Poslední studie prokázaly spojení CAR s lipidovým metabolismem. Aktivace CAR (a PXR) může potlačovat lipidový metabolismus a snižovat sérové hladiny triglyceridů prostřednictvím redukování hladin SREBP-1, hlavního regulátoru lipidového metabolismu. Inhibiční účinky CAR mohou být také přičteny indukci Insig-1, proteinu s antilipogenními vlastnostmi. Insig-1 je protein endoplazmatického retikula, který blokuje proteolytickou aktivaci SREBPs. Když jsou vysoké hladiny buněčného cholesterolu, Insig proteiny váží a zadržují SREBP cleavage-activating protein (SCAP) v endoplazmatickém retikulu a zabraňují mu, aby doprovodil SREBPs do Golgiho komplexu k jejich proteolytické aktivaci. Naopak SREBP-1 aktivace inzulinem nebo cholesterolem (*pozn.* při jeho nedostatku) v myších játrech nebo v primárních lidských hepatocytech inhibuje transkripční aktivity PXR a CAR. V tomto smyslu funguje SREBP-1 jako inhibitor, který neváže DNA, ale blokuje interakci PXR a CAR s kofaktory jako např. SRC-1. Další studie ukazují, že CAR může být spojený s patogenezí nealkoholické steatohepatitidy, s regulací sérových hladin triglyceridů za podmínek metabolického stresu a s regulací HDL (high-density lipoproteins) u *wild-type* myší a transgenních myší s lidským apolipoproteinem A-I (apoA-I) (*pozn.* aktivace CAR vedla u myší ke snížení cirkulujícího HDL, pravděpodobně na základě down-regulace exprese *ApoA-I* genu) (Wada a kol., 2009).



**Obr. 12**

### **Schéma role CAR receptoru v jaterní energetické homeostáze**

CAR působí jako negativní regulátor lipidového metabolismu,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a glukoneogeneze. (a) CAR inhibuje lipogenezi indukci Insig-1, proteinu, který má roli v regulaci lipogenních genů pomocí SREBP. Insig proteiny váží a zadržují SCAP v ER a zabraňují mu, aby doprovázel SREBPs na místo proteolytické aktivace v Golgiho komplexu. (V Golgiho komplexu jsou SREBPs rozštěpené dvěma proteázami a bHLH-Zip doména SREBPs postupuje od membrány do jádra, aby se navázala k sterol-response elementům v promotorovém regionu cílových genů.) (b) CAR inhibuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. CAR soutěží s PPAR $\alpha$  o jeho vazebné místo v promotoru genu 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy. Aktivace CAR také snižuje expresi CPT1, rychlost limitujícího enzymu  $\beta$ -oxidace. (c) CAR inhibuje glukoneogenezi. CAR se váže k FoxO1, což potlačuje expresi FoxO1 cílových genů. CAR také soutěží s HNF4 $\alpha$  o jeho vazebné místo (DR1) a s HNF4 $\alpha$  také soutěží o NR koaktivátory. V schématu šipky označují pozitivní regulaci neboli aktivaci a zářezky označují negativní regulaci neboli represí. Zkratky: CPT1, karnitin palmitoyl transferáza 1; DR-1, direct repeat rozložený jedním nukleotidem; ER, endoplazmatické retikulum; FoxO1, forkhead transcription factor O1; G6Páza, glukóza-6-fosfatáza; HNF4 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor-4- $\alpha$ ; IRS, insulin-response sekvence (FoxO1-vazebná místa); PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ; PEPCK, fosfoenolpyruvátkarboxykináza; SCAP, SREBP cleavage-activating protein; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; TCA, citrátový cyklus (převzato z Wada *akol.*, 2009).

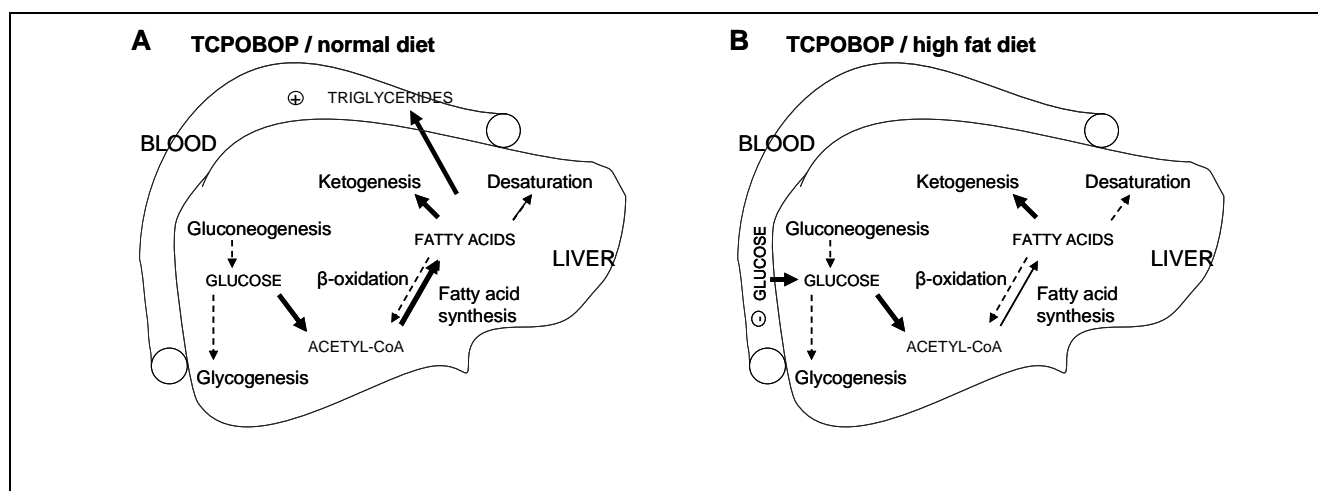
Účinek CAR na energetickou homeostázu by snad mohl být také založen na funkčním propojení s PPAR $\alpha$ , nukleárním receptorem, který má významnou roli při mobilizaci energie během půstu. Bylo popsáno, že PPAR $\alpha$  agonista WY 14643 indukuje expresi CAR genu PPAR $\alpha$ -dependentním způsobem a také zesiluje fenobarbitalem

indukovanou transkripcí *CYP2B1*, který je prototypickým cílovým genem CAR. CAR indukce při půstu scházela u PPAR $\alpha$ -deficientních myší. V promotoru genu CAR byl identifikován DR1 motiv, který se ukázal, že je nezbytný pro CAR indukci. Proto by mohla platit hypotéza, že jelikož jsou volné mastné kyseliny přirozenými ligandy PPAR $\alpha$  receptorů, jejich zvýšení způsobené půstem by mohlo indukovat CAR (Wieneke a kol., 2007). Nicméně nedávná publikovaná studie uvádí kontroverzní výsledky ukazující, že tento PPAR $\alpha$  agonista WY 14643 způsoboval translokaci CAR z cytoplazmy do jádra, tedy nezbytný krok pro CAR aktivaci. Navíc PPAR $\alpha$  ligandy jako WY 14643 a ciprofibrát by snad mohly fungovat jako CAR inverzní agonisté pomocí přímé vazby k receptoru (Guo a kol., 2007). V souladu s představou, že CAR interaguje s PPAR $\alpha$  během půstu, bylo prokázáno, že CAR interferuje s metabolismem mastných kyselin prostřednictvím vazby k DNA elementům, které se překrývají s PPAR $\alpha$  vazebným místem v promotorovém regionu 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy, důležitého enzymu v peroxizomální  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Navíc u *wild-type* myší fenobarbital snižuje expresi mitochondriální CPT1, rychlost limitujícího enzymu  $\beta$ -oxidace, a tento účinek nebyl pozorovaný u mCAR knockout myší (Wada a kol., 2009).

Při nedávno provedené studii CAR byla odhalena jeho nečekaná role v prevenci obezity a zmírnění diabetu 2. typu. Při použití modelu obezity indukované vysoce tučnou dietou (high fat diet – HFD) se ukázalo, že podávání CAR agonisty TCPOBOP *wild-type* myším účinně zabraňovalo vzniku obezity nebo vedlo k zpětnému redukování dříve vyvolané obezity. Léčba TCPOBOP zlepšila inzulinovou senzitivitu u modelových myší s diabetem 2. typu indukovaným HFD i u geneticky modifikovaných obézních (leptin deficientních *ob/ob*) myší. V kontrastu s tím se u CAR-null myší na normální dietě zjistila spontánní inzulinová insenzitivita, která nemůže být odstraněna léčbou TCPOBOP. Steatóza jater u HFD myší a *ob/ob* myší byla zřetelně snížena léčbou TCPOBOP. Metabolické přínosy CAR aktivace mohou být výsledkem kombinace toho, že dochází k inhibici lipogeneze, k inhibici sekrece VLDL (very low density lipoproteins) a exportu triglyceridů, a k inhibici glukoneogeneze. Zároveň působí i zvýšení energetického výdeje hnědé tukové tkáně (BAT – brown adipose tissue) a zvýšení periferní tukové mobilizace. Tato studie odhalila důležité metabolické funkce CAR receptoru a může z tohoto „xenobiotického receptoru“ vytvořit nový terapeutický cíl z hlediska terapie obezity a diabetu 2. typu (Gao a kol., 2009).

Další studie účinků aktivace CAR sledovala vliv podávání TCPOBOP na sérové hladiny lipidů a glukózy, a jaterní transkriptom u myší, které byly buď na normální dietě

nebo dietě obsahující 1% cholesterolu a navozující hyperlipidémii (resp. vyšší sérové hladiny celkového, LDL i HDL cholesterolu, triglyceridů a glukózy). Podávání TCPOBOP ve skupině na normální dietě vedlo ke snížení celkového sérového cholesterolu (na základě aktivace LDL uptake z cirkulace a represe HDL exportu, potvrzených i analýzou transkriptomu), k zvýšení sérové hladiny triglyceridů a ke statisticky nesignifikantnímu snížení sérové hladiny glukózy. Při analýze transkriptomu v této skupině byla potvrzena up-regulace genů spojených se syntézou mastných kyselin, ketogenezí a tvorbou acetyl-CoA (substrátu pro syntézu cholesterolu a mastných kyselin) a down-regulace genů spojených s degradací mastných kyselin, syntézou jaterního glykogenu a glukoneogenezí. Ve skupině myší s hyperlipidémií vedlo podávání TCPOBOP opět ke snížení celkového sérového cholesterolu (na základě aktivace LDL uptake z cirkulace a represe HDL exportu, potvrzených i analýzou transkriptomu), ke snížení sérové hladiny glukózy a ke statisticky nesignifikantnímu snížení sérové hladiny triglyceridů. Při analýze transkriptomu v této skupině byla potvrzena up-regulace genů spojených se syntézou cholesterolu, ketogenezí, tvorbou acetyl-CoA, uptake glukózy a down-regulace genů spojených s degradací mastných kyselin, syntézou jaterního glykogenu a glukoneogenezí. Exprese genů spojených se syntézou mastných kyselin byla v této skupině beze změny. Zajímavý byl především účinek z hlediska cholesterolu, protože při podávání TCPOBOP došlo k velmi výraznému odstranění nadměrného dietárního cholesterolu ze séra i jater za současného zvýšení syntézy cholesterolu (bez zvýšení SREBP2), což lze vysvětlit zejména up-regulací LDL uptake a aktivací syntézy žlučových kyselin a efluxu žluči (Režen a kol., 2009).



**Obr. 13**

### Účinky TCPOBOP a cholesterolové diety na jaterní metabolismus glukózy a triglyceridů

A. Účinky TCPOBOP při normální dietě. B. Účinky TCPOBOP při dietě obsahující 1% cholesterolu.

Tučně nepřerušované šipky - nárůst, nepřerušované šipky - beze změny, přerušované šipky – pokles (převzato z Režen a kol., 2009).

Vzhledem ke skutečnosti, že CAR inhibuje glukoneogenezi a lipogenezi (*pozn.* v případě lipogeneze jsou zatím závěry studií nejednotné a kontroverzní), vyvstává zásadní otázka, jestli CAR aktivace nabízí terapeutické přínosy u obézních a diabetických pacientů, kteří často trpí současně hyperglykemií a hyperlipidemií. Je prokázáno, že CAR agonista fenobarbital zlepšuje inzulínovou senzitivitu a zlepšuje glukózový a lipidový metabolismus u diabetických potkanů a diabetických pacientů. Ačkoli je známo, že fenobarbital ovlivňuje CAR, stále zbývá determinovat, jestli je antidiabetický efekt fenobarbitalu na CAR závislý a jestli i ostatní CAR agonisté mají podobný antidiabetický účinek. Další studie endobiotické role CAR zřejmě posunou tento „starý“ receptor do nové éry (Wada a kol., 2009).

### **3.7.7 CAR a metabolická kostní onemocnění**

Protože CAR ligandy mohou regulovat metabolismus a ovlivnit homeostázu vitamínu D, měla by být také zvažena role CAR z hlediska osteomalacie vyvolané léky. CAR ovlivňující látky fenytoin a fenobarbital jsou mnohem častěji spojené s osteomalácií než ligand PXR rifampicin. PXR byl zkoumán v souvislosti s homeostázou vitamínu D a metabolickým kostními onemocněními, jeho role ovšem zůstává nejasná (di Masi a kol., 2009).

### **3.7.8 Extrahepatická úloha CAR**

Vedle jater je CAR také velmi exprimován v epitelálních buňkách klků tenkého střeva. Jelikož CAR působí jako xenosenzor k ochraně před exogenními inzulty, je jeho exprese v místě vstupu do těla pochopitelná. Klinické studie orálně podávaných léčiv demonstrovaly, že intestinální metabolismus léčiv může významně redukovat orální biodostupnost. CAR zprostředkovaná indukce Cyp2b10, GSTs  $\mu$ 1 a  $\theta$ 1, a široce specifické efluxní pumpy/transportéru Mdr1a ve střevě může zvýšit first-pass metabolismus xenobiotik (Swales a Negishi, 2004).

## 4. Experimentální část

### 4.1 Reagencie a buněčné linie

#### Reagencie

PBS fosfátový pufr

0,25% Trypsin (Sigma-Aldrich)

MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Sigma-Aldrich)

DMSO dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich)

neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich)

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

Opti-MEM (Minimum Essential Medium) I Reduced Serum Medium (GIBCO/ Invitrogen)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) - obsahuje:

- Luciferase Assay Buffer II
- Luciferase Assay Substrat (Lyophilized Product)
- Stop&Glo Buffer
- Stop&Glo Buffer Substrate, 50x
- Passive Lysis Buffer, 5x



## **Buněčné linie**

### **1. Buněčná linie HepG2**

#### Popis buněčné linie

HepG2 adherentní buněčná linie byla izolována z jater patnáctiletého bělocha, z dobře diferenciovaného hepatocelulárního karcinomu. Povrchové antigeny viru hepatitidy B nebyly detekovány. Buňky odpovídají na stimulaci lidským růstovým hormonem.

#### Kultivace linie

Linie byla kultivována v DMEM médiu obsahujícím glutamin ve 2 mM koncentraci, 1% neesenciálních aminokyselin a 10% fetálního bovinního séra. HepG2 buňky byly pasážovány při konfluenci (70-80%) s použitím 0,25% trypsinu nebo trypsinu/EDTA v poměru 1:3 až 1:6. Na kultivační plata byly nasazeny v koncentraci 2-30 000 buněk na cm<sup>2</sup> plochy kultivačního plata.

### **2. Buněčná linie MZ-Hep1**

#### Popis buněčné linie

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

#### Kultivace linie

Linie byla kultivována v DMEM médiu obsahujícím glutamin ve 2 mM koncentraci, 1% neesenciálních aminokyselin, 1% pyruvátu sodného a 10% fetálního bovinního séra. MZ-Hep1 buňky byly pasážovány při konfluenci (70-80%) s použitím 0,25% trypsinu nebo trypsinu/EDTA v poměru 1:3 až 1:6. Na kultivační plata byly nasazeny v koncentraci 2-30 000 buněk na cm<sup>2</sup> plochy kultivačního plata.

## 4.2 Testované látky a jejich koncentrace

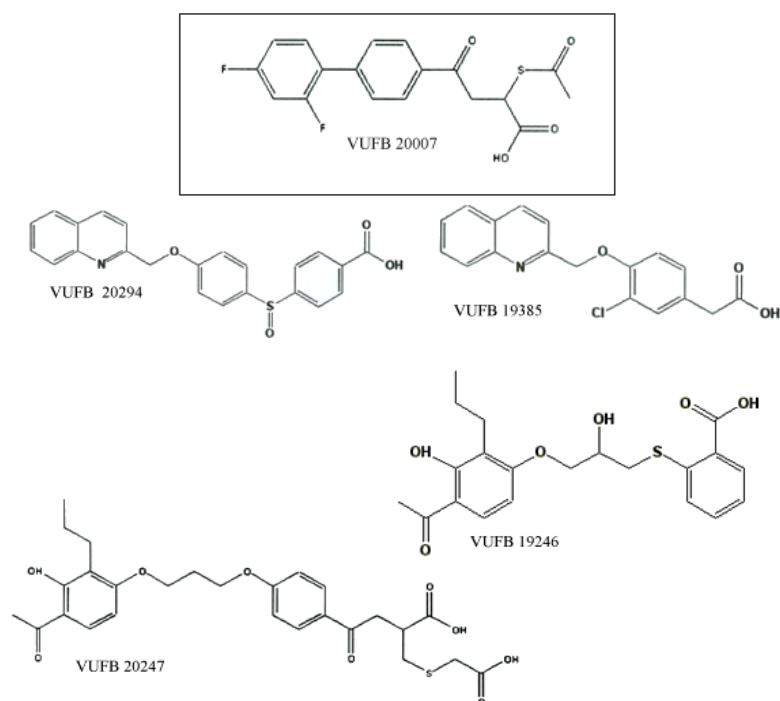
K experimentům této práce bylo použito celkem 16 látek ve formě zásobních roztoků látek v DMSO, které byly v různých vyšších koncentracích. Látky byly syntetizovány ve VÚFB a náleží společnosti Zentiva. Látkám označeným pětímístným kódem byla přidělena čísla 1-17B, pod kterými pak byla vedena v dalších postupech. Před dalšími experimenty bylo nutno naředit tyto roztoky DMEM médiem, aby byly získány testované koncentrace 4  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ . Z důvodu validity dat bylo u roztoků testovaných látek doplněno rozpouštědlo DMSO tak, aby bylo všude v 1‰ v/v koncentraci.

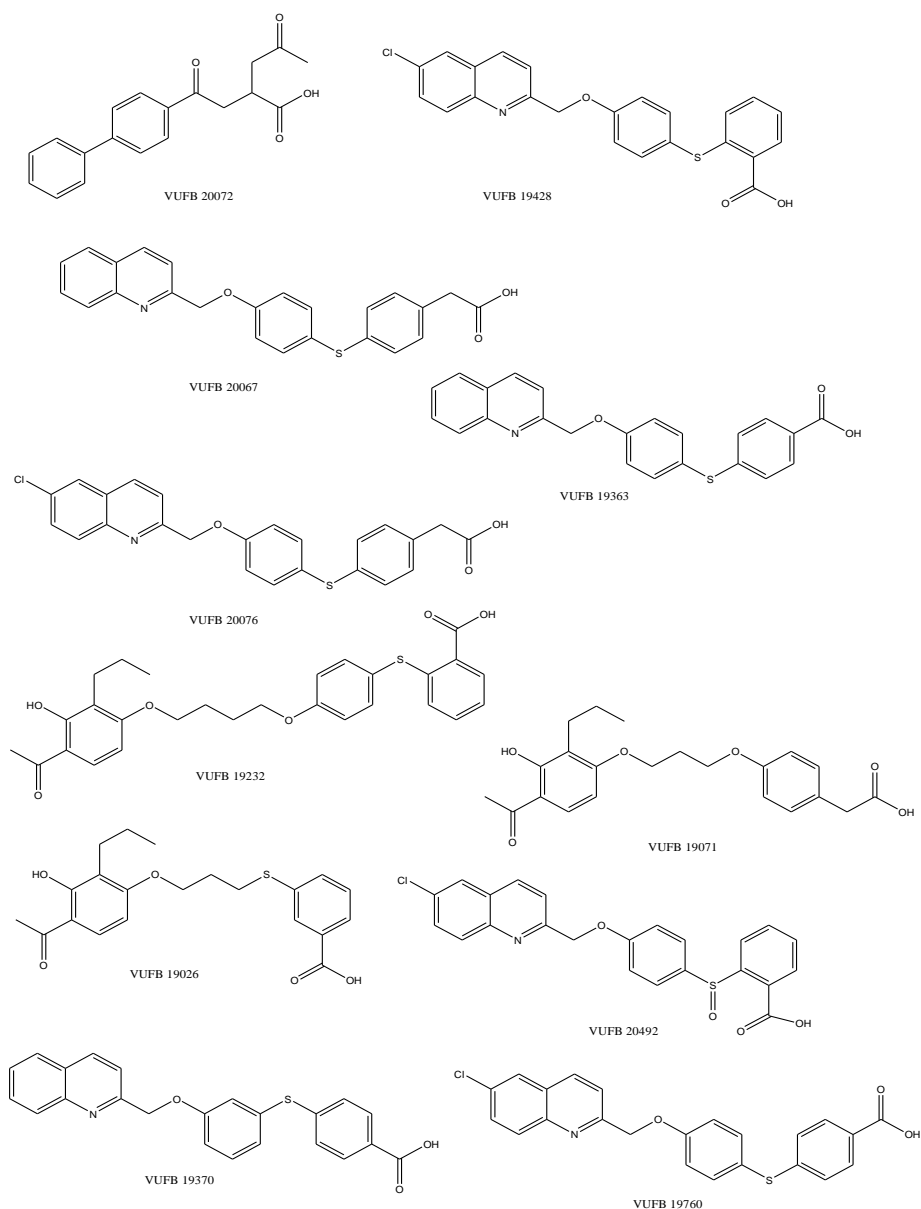
Při všech experimentálních metodách byla jako kontrola použita jamka s 1‰ v/v DMSO v DMEM médiu. Jako standard pro srovnání interakce s CAR receptorem byl při testování zadaných látek použit modelový agonista CITCO v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci. Vedle testování zadaných 16 látek byl v experimentech testován i klotrimazol, inverzní agonista CAR receptoru, a to také v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci.

Tabulka 3

*Čísla v experimentech a kódy testovaných látek*

<b>1</b>	<b>19232</b>	<b>6B</b>	<b>20072</b>	<b>10B</b>	<b>19026</b>	<b>14</b>	<b>20076</b>
<b>2</b>	<b>19428</b>	<b>7</b>	<b>19385</b>	<b>11B</b>	<b>20492</b>	<b>15</b>	<b>19363</b>
<b>3B</b>	<b>20247</b>	<b>8B</b>	<b>20067</b>	<b>12B</b>	<b>19370</b>	<b>16B</b>	<b>19246</b>
<b>4B</b>	<b>20007</b>	<b>9</b>	<b>20294</b>	<b>13</b>	<b>19760</b>	<b>17B</b>	<b>19071</b>





**Obr. 14**

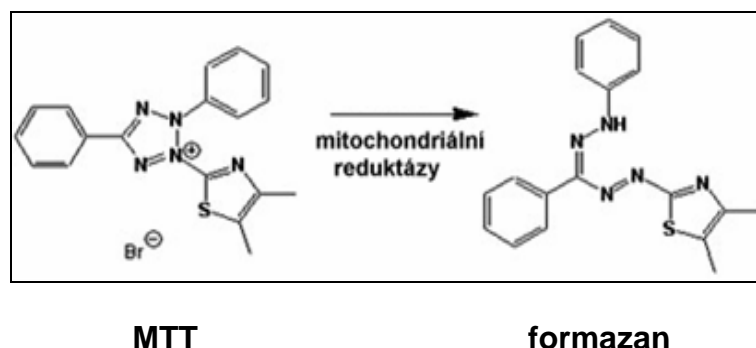
***Chemické struktury testovaných látek***

**4.3 Metoda MTT assay**

MTT assay umožňuje spektrofotometrickou neradioaktivní kvantifikaci buněčného růstu a viability. Tato metoda bez použití radioaktivních izotopů je založena na metabolizaci tetrazoliové soli MTT. MTT test je využíván ke kvantifikaci buněčné proliferace v závislosti na růstových faktorech, cytokinech a nutrientech. Dále se, jako

v našem experimentu, používá i k testování cytotoxicity. Ve srovnání s metodami používajícími radioaktivní izotopy je bezpečnější, přesná (změřená absorbance silně koreluje s počtem buněk), citlivá (zachycuje malé množství buněk), rychlá, jednoduchá (není potřeba dalších reagentů).

Tento test je založen na rozštěpení žluté tetrazoliové soli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na fialové nerozpustné krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami. MTT je přeměněn na formazan enzymem sukcinát-tetrazolium reduktázou, která patří k mitochondriálnímu dýchacímu řetězci a je aktivní pouze u životaschopných buněk. Redukce vyžaduje koenzymy NADH a NADPH. Jelikož je tetrazoliová sůl redukována na formazan pouze metabolicky aktivními buňkami, metoda detekuje výhradně životaschopné buňky. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny a výsledný barevný roztok je kvantifikován spektrofotometricky při 590 nm (Roche Applied Science, Cell Proliferation Kit I (MTT), 2002).



**Obr. 15**

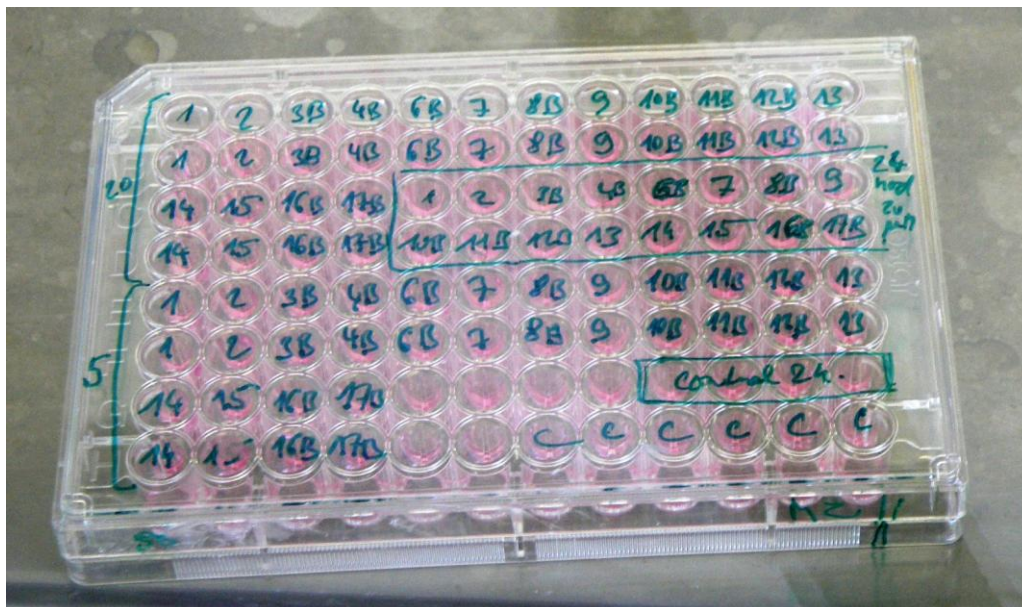
***Přeměna žlutého MTT na fialový formazan mitochondriálními reduktázami***  
(převzato z Rulcová, 2009)

#### Základní kroky MTT testu

1. Buňky rostoucí v 96-jamkové destičce se inkubují se žlutým roztokem MTT 4 hodiny.
2. Během inkubační doby se tvoří fialové krystaly formazanu. Tyto krystaly jsou nerozpustné ve vodném roztoku, rozpouštějí se po přidání rozpouštědla (DMSO).
3. Rozpuštěný formazan se kvantifikuje spektrofotometricky. Nárůst počtu živých buněk vede ke zvýšení celkové metabolické aktivity buněk ve vzorku. A toto zvýšení pak přesně koreluje s množstvím fialových krystalů formazanu, které je monitorováno pomocí absorbance. Jako kontrola je použit 1% v/v DMSO v DMEM médiu.

## Pracovní postup

1. Buňky inkubovat 24 hodin (resp. 48 hodin) v 96-jamkové destičce při 37°C, v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Na jamku nejprve přidat 100 µl připravených roztoků testovaných látek v kultivačním médiu (o koncentracích 4 µM a 20 µM).
2. Navážit MTT a připravit ve zkumavce žlutý roztok MTT o koncentraci 5 mg/ml rozpuštěním v PBS. Po uplynutí inkubace přidat 10 µl roztoku MTT do každé jamky.
3. Inkubovat 4 hodiny při 37°C, v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.
4. Odstranit médium odsátím.
5. Přidat 30 µl DMSO do každé jamky.
6. Nechat destičku míchat na Thermomixeru, dokud nedojde k rozpuštění fialových krystalů.
7. Měření absorbance při 590 nm na destičkovém spektrofotometru/luminometru Genius Plus (Tecan).
8. Vyhodnocení dat.



Obr. 16

**96-jamková destička s testovanými látkami v MTT experimentu**

#### 4.4 Metoda gene reporter assay

Metoda gene reporter assay je široce používána ke studiu genové exprese eukaryot a buněčné fyziologie. Její využití zahrnuje studium receptorové aktivity, transkripčních faktorů, intracelulární signalizace, mRNA processingu a skládání proteinů.

Princip metody gene reporter assay spočívá ve vložení cirkulární DNA tzv. reportérového plazmidu do buňky. Tento reportérový plazmid obsahuje regulační oblasti a reportérový gen (v našem případě gen pro světluškovou luciferázu). Tento reportérový gen je prostřednictvím regulačních oblastí plazmidu a s nimi interagujících buněčných transkripčních faktorů transkribován na mRNA luciferázy. Po transkripci a translaci reportérového genu je jeho exprese detekována enzymatickou reakcí nebo chemiluminiscenčně. Současně může být do buňky vložen transkripční faktor (například nukleární receptor) interagující s regulačními oblastmi reportérového plazmidu. Vložení tohoto transkripčního faktoru se uskutečňuje pomocí expresního plazmidu s patřičnou kódující DNA, která vstupuje do procesu transkripce a translace.

V našem experimentu vkládáme do buněk expresní plazmid pro nukleární receptor hCAR současně s reportérovým plazmidem obsahujícím gen pro světluškovou luciferázu a ověřujeme, zda po inkubaci buněčné linie s roztokem testovaných látek nedošlo k zvýšení transkripční aktivity exprimovaného receptoru hCAR (resp. luminiscence luciferázy z reportérového konstruktů) ve srovnání s kontrolou, tj. jestli testované látky nejsou ligandy-agonisté hCAR receptoru. V našem experimentu obě použité linie téměř neexprimují endogenní CAR - výše zmíněný postup je proto velmi selektivní.

V reportérových systémech se ke zvýšení přesnosti běžně používají duální reportéry. Tento způsob vychází ze simultánní exprese a měření dvou individuálních reportérových enzymů v jednom systému. „Experimentální“ reportér koreluje s efektem specifických experimentálních podmínek, zatímco aktivita kotransfekovaného „kontrolního“ reportéru slouží jako vnitřní kontrola. Normalizace aktivity experimentálního reportéru k aktivitě vnitřní kontroly minimalizuje experimentální variabilitu, způsobenou rozdíly v buněčné viabilitě nebo účinnosti transfekce. I ostatní zdroje variability, jako rozdíly v pipetovaných objemech, efektivitě buněčné lýzy a efektivitě testu, mohou být takto účinně eliminovány. Systém duálních reportérů tak umožňuje spolehlivější interpretaci experimentálních dat pomocí redukce vnějších vlivů. Kontrolní reportér je vložen pomocí expresního plazmidu s patřičnou kódující DNA, která vstupuje do procesu transkripce a translace.

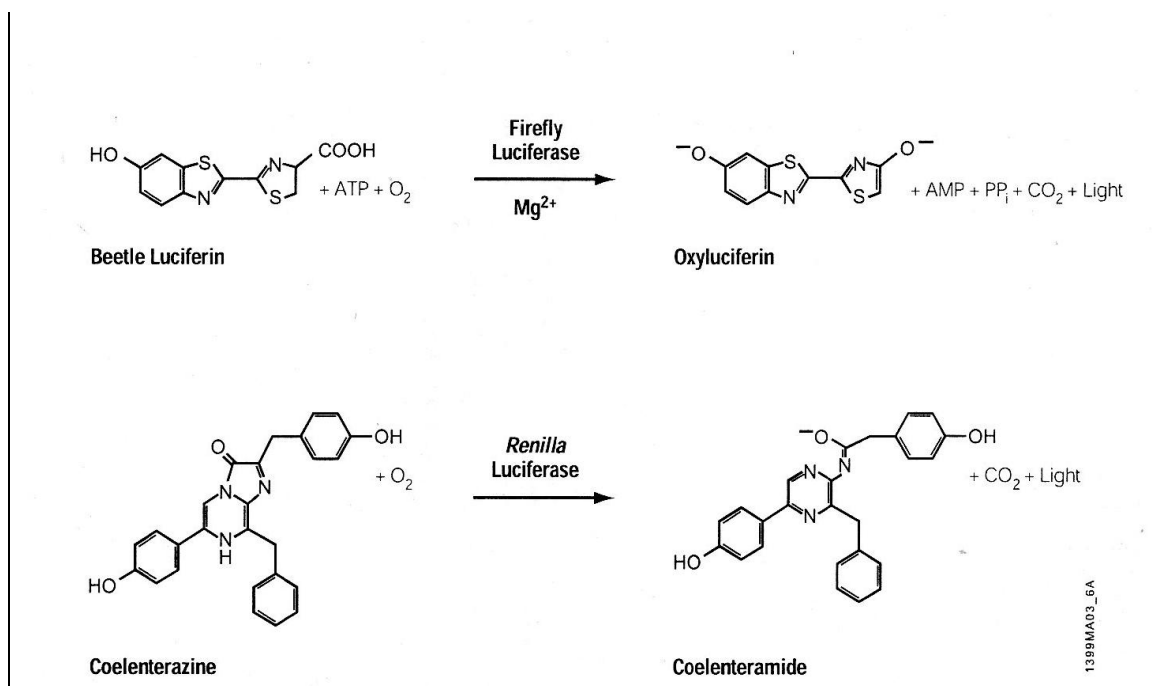
V našich experimentech (i v metodách two-hybrid assay a one-hybrid assay) používáme Dual-Luciferase® Reporter Assay System od firmy Promega.

### **Princip Dual-Luciferase® Reporter Assay System**

Aktivita firefly (světluška *Photinus pyralis*) a *Renilla* (*Renilla reniformis*) luciferáz jsou měřeny postupně po sobě v jednom vzorku. Nejdříve je měřen firefly luciferázový reportér po přidání Luciferase Assay Reagentu II (připraveného z Luciferase Assay Buffer II a Luciferase Assay Substrate), kdy následně vzniká luminiscenční signál. Po kvantifikaci luminiscence je signál zhasnut přidáním Stop&Glo Reagentu (připraveného z Stop&Glo Buffer a Stop&Glo Substrate, 50x) a současně je iniciována reakce *Renilla* luciferázy přidáním substrátu pro *Renilla* luciferázu. Reakce *Renilla* luciferázy produkuje také stabilizovaný luminiscenční signál, který po ukončení měření pomalu slábne. Vzhledem k tomu, že firefly a *Renilla* luciferázy mají odlišný evoluční původ, mají různé enzymové struktury i odlišné substrátové požadavky. Tyto rozdíly umožňují selektivně rozlišit jejich po sobě jdoucí bioluminiscenční reakce. To také dovoluje, aby při použití Dual-Luciferase Reporter Assay byla najednou zastavena luminiscence reakce firefly luciferázy a současně aktivována luminiscence reakce *Renilla* luciferázy.

Firefly luciferáza je 61 kDa monomerní protein, který nevyžaduje posttranslační modifikaci pro svou enzymatickou aktivitu. Působí tak jako genový reportér ihned po translaci. Emise fotonu je dosaženo prostřednictvím oxidace luciferinu. Tato reakce vyžaduje ATP,  $Mg^{2+}$  a  $O_2$ . Výsledkem je generování záblesku, který rychle slábne po smíchání enzymu a substrátu.

*Renilla* luciferáza je 36 kDa monomerní protein, u něhož, obdobně jako u firefly luciferázy, není nutná posttranslační modifikace pro jeho funkci. Luminiscenční reakce katalyzovaná *Renilla* luciferázou spotřebovává kyslík a koelenterazin za emise fotonu. Podstatnou vlastností koelenterazinu je, že emituje ve vodných roztocích slabou autoluminiscenci. Dual-Luciferase Reporter Assay System obsahuje chemikálie, které redukují autoluminiscenci na úroveň, která není detekovatelná (Promega Technical Manual No. 040, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, 2009).



**Obr. 17**

***Bioluminiscenční reakce katalyzované firefly a Renilla luciferázami***

*(převzato z Promega Technical Manual No. 040, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, 2009).*

**Transfekce**

Základem genových reportérových metod je transfekce, tj. vnesení nukleových kyselin do eukaryotických buněk pomocí lipozomů. Lipozomy jsou dvouvrstevné koloidní částice obsahující kationické lipidy. Na základě elektrostatických interakcí tvoří komplex s nukleovou kyselinou a buněčnou membránou, čímž umožňují inkorporaci nukleové kyseliny do buňky (Rulcová, 2009).

Lipofectamine 2000 je patentovaný preparát firmy Invitrogen vhodný pro transfekci nukleových kyselin do eukaryotických buněk. Vykazuje vysokou efektivitu transfekce. Komplexy DNA-Lipofectamine se mohou přidávat přímo k buňkám v kultivačním médiu. Poměr DNA (v µg):Lipofectamine 2000 (v µl) při použití k tvorbě komplexů by měl být 1:2 až 1:3 u většiny buněčných linií. V době transfekce je doporučena konfluencce buněk 90-95% k dosažení vysoké účinnosti a exprese. Pro naředění reagentie Lipofectamine 2000 se doporučuje Opti-MEM I Reduced Serum Medium – u sérových médií by mohlo dojít k tvorbě komplexů s DNA obsaženou v těchto médiích (Invitrogen, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, 2006).



## Zásobní roztoky plazmidů

**pRL-TK** – expresní plazmid pro *Renilla* luciferázu

**pCR3-hCAR** – expresní plazmid pro lidský nukleární receptor CAR

a

**p(ER6)3-tata-luc** – reportérový plazmid obsahující tři sekvence ER6 s vazebnými místy pro hCAR (z *CYP3A4* genu), TATA box (vazebné místo Pol II a bazálních transkripčních faktorů) a reportérový gen pro firefly luciferázu

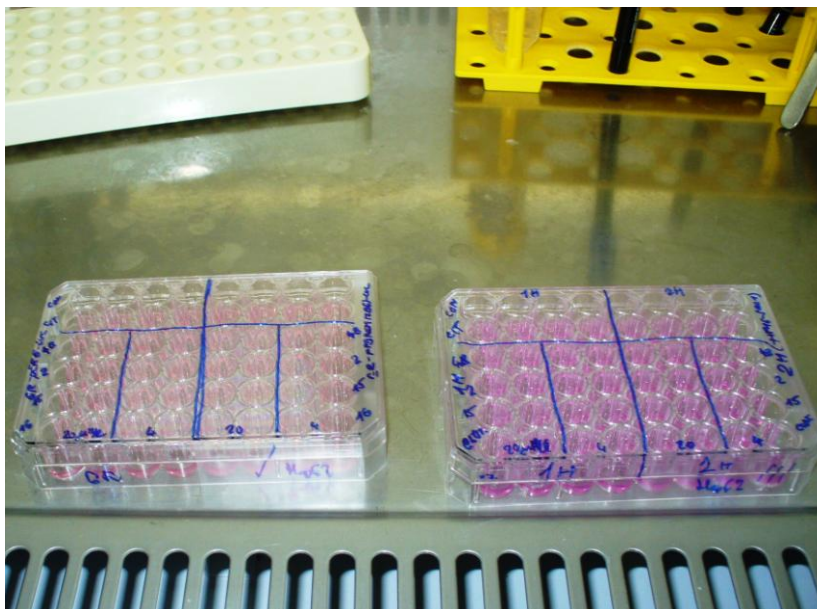
nebo

**pPBREM(CYP2B6)-luc** - reportérový plazmid obsahující PBREM s vazebnými místy pro hCAR (z *CYP2B6* genu), virový SV40 promotor s vazebným místem Pol II a bazálních transkripčních faktorů, a reportérový gen pro firefly luciferázu

## Pracovní postup metody gene reporter assay

1. Nasadit 48-jamkovou destičku s 20 000 buňkami na jamku (plocha 1 cm<sup>2</sup>). Přidat 250 µl média na jamku, inkubovat 24 hodin.
2. Vypočítat množství plazmidů a Lipofectaminu potřebných k experimentu.
3. Připravit na jamku 30 µl Opti-MEM média s obsahem DNA:
  - a) reportérového plazmidu 250 ng na jamku
  - b) expresního plazmidu pCR3-hCAR 50ng na jamku
  - c) expresního plazmidu pRL-TK 30ng na jamku.
4. Připravit na jamku 30 µl Opti-MEM média s Lipofectaminem 2000 v poměru 2,3:1 k DNA plazmidům. Po 5 minutách smíchat s plazmidy, inkubovat 20 minut za pokojové teploty. Z 48-jamkové destičky odstranit médium, nahradit novým médiem (200 µl) na jamku, přidat 60 µl transfekční směsi na jamku. Inkubace 24 hodin.
5. Po 24 hodinách odstranit médium. Přidat roztoky testovaných látek v požadovaných koncentracích, 100 µl na jamku. Jako negativní kontrola slouží 1‰ v/v DMSO. 24 hodinová inkubace v temperovaném buněčném CO<sub>2</sub> inkubátoru.
6. Opláchnout destičku pomocí PBS.
7. Přidat 100µl Passive lysis buffer do každé jamky, destičku nechat zmrznout – krystaly lyzují buňky.
8. Z každé jamky přenést 40 µl lyzátu na 96-jamkovou destičku, přidat 30 µl Luciferase Assay Reagentu II.

9. Analýza chemiluminiscence prostřednictvím firefly luciferázy na destičkovém spektrofotometru/luminometru Genios Plus (Tecan).
10. Připravit Stop&Glo Reagent ze Stop&Glo Substrate, 50x a Stop&Glo Buffer v poměru 1:50. Přidat 25  $\mu$ l na jamku.
11. Analýza chemiluminiscence prostřednictvím *Renilla* luciferázy na destičkovém spektrofotometru/luminometru Genios Plus (Tecan).
12. Vyhodnocení dat.



Obr. 18

**48-jamkové destičky s testovanými látkami v gene reporter, one-hybrid a two-hybrid experimentech**

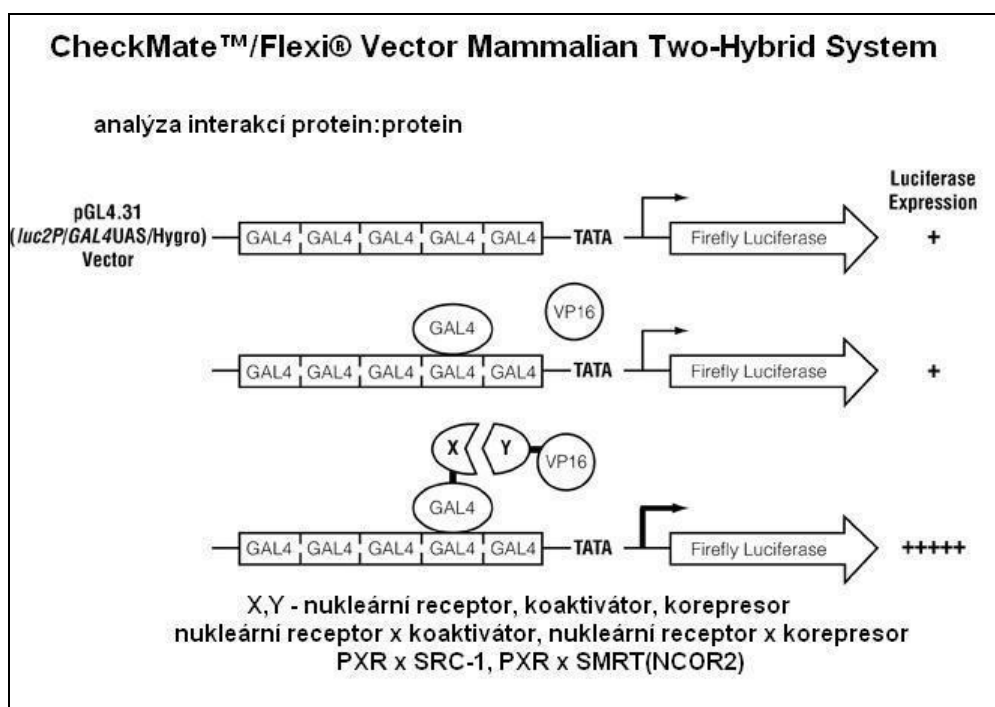
#### 4.5 Metoda two-hybrid assay

Two-hybrid systém umožňuje charakterizovat interakce mezi dvěma proteiny v buněčném prostředí (např. interakce mezi nukleárním receptorem a koaktivátorem). V případě CAR receptoru je míra interakce CAR-LBD s koaktivátorem závislá na přítomnosti ligandu CAR. Two-hybrid systémy využívají dvě různé domény se specifickou funkcí: DNA vazebnou doménu (DBD), která je schopna vazby na DNA a aktivační doménu (AD, *angl.* activation domain), která umožňuje aktivaci transkripce prostřednictvím polymerázy. V two-hybrid assay jsou vytvořeny dva fúzní proteiny:

- 1) fúzní protein složený z „návnady“ (*angl.* bait protein; X) a DNA-vazebné domény

2) jeho potenciální vazebný partner, fúzní protein složený z „kořisti“ (*angl.* prey protein; Y) a aktivační domény.

Fúzní proteiny jsou do buňky opět transfekovány pomocí expresních plazmidů, které vstupují do procesu transkripce a translace. Pokud protein X interaguje s proteinem Y, jejich vazba zformuje funkční transkripční faktor vázající se na promotorovou DNA a zároveň aktivující transkripci reportérového genu, jehož produkt, protein, lze detekovat. Exprese reportérového genu je měřítkem interakce mezi proteiny. Tuto expresi v našem experimentu detekujeme opět pomocí Dual-Luciferase® Reporter Assay System.



**Obr. 19**

### **Schéma two-hybrid systému**

(převzato z Rulcová, 2009)

Two-hybrid system se opírá o tři plazmidy, které jsou současně transfekovány do buněk linie. Každý plazmid má specifické vlastnosti. Jeden plazmid kóduje DBD a bait protein (DBD-X). Druhý plazmid kóduje transkripční aktivační doménu a prey protein (AD-Y). Třetí plazmid je reportérový, má čtyři až pět DNA vazebných míst (UASG), za kterými následuje TATA box před specifickým reportérovým genem (v našem případě firefly luciferázy).

Obvyklé uspořádání two-hybrid systému je takové, že DNA-vazebnou doménu v DBD-X tvoří GAL4 protein, transkripční aktivační doména v AD-Y je nejčastěji z VP16 proteinu viru herpes simplex a reportérový plazmid obsahuje čtyři až pět GAL4 vazebných míst umístěných před TATA boxem a specifickým reportérovým genem (Promega, Protein Interaction Guide, 2007; Wildová a Rumlová, 2008). GAL4 protein je transkripční aktivátor *Saccharomyces cerevisiae*. Jeho DBD se váže na UASG (upstream activation sequence of GAL), část promotoru reportérového genu.

V našem experimentu vkládáme do buněk expresní plazmid pro fúzní protein složený z GAL4 DBD a z LBD nukleárního receptoru CAR (tj. bait proteinu, X) a současně pro *Renilla* luciferázu, a expresní plazmid pro fúzní protein obsahující transkripční AD (VP16) a koaktivátor SRC-1 (tj. prey protein, Y).

V našem experimentu ověříme, zda po inkubaci buněčné linie s roztokem testovaných látek nedošlo (ve srovnání s kontrolou - 1% v/v DMSO) k nárůstu exprese reportérového genu (resp. luminiscence), který by vycházel ze zvýšené transkripční aktivity exprimované LBD receptoru hCAR interagující s koaktivátorem v přítomnosti ligandu, tj. jestli testované látky nejsou ligandy-agonisté hCAR receptoru. Pro srovnání používáme vedle 1  $\mu$ M roztoku CITCO i 1  $\mu$ M roztok klotrimazolu, inverzního agonisty, který by měl z důvodu, že hCAR receptor vyvíjí bez vazby ligandu konstitutivní aktivitu, snížit transkripční aktivitu receptoru v porovnání s kontrolou.

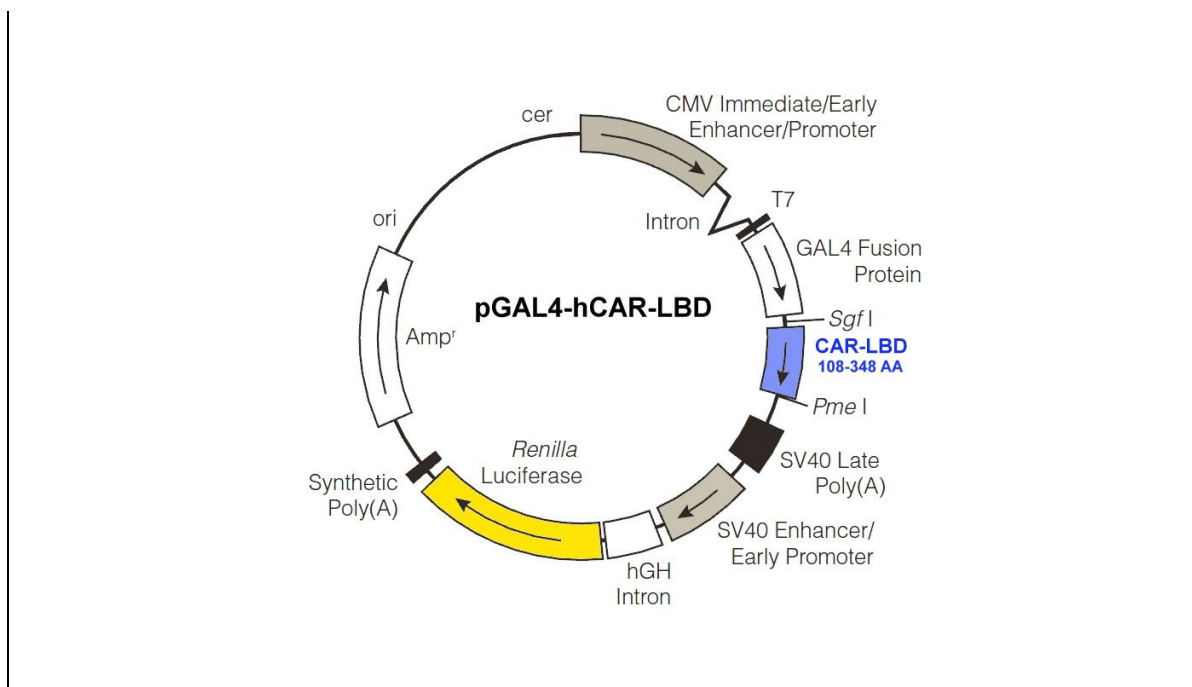
### **Zásobní roztoky plazmidů**

**pGL5-luc** – reportérový plazmid obsahující pět vazebných míst GAL4 a reportérový gen pro firefly luciferázu

**pGAL4-hCAR-LBD** - expresní plazmid pro fúzní protein obsahující GAL4 DBD a LBD nukleárního receptoru hCAR. Tento plazmid současně obsahuje kódující DNA (cDNA) pro *Renilla* luciferázu

**VP16-SRC-1** – expresní plazmid pro fúzní protein obsahující transkripční AD (VP16) a koaktivátor SRC-1

Protože konstrukt **pGAL4-hCAR-LBD** již obsahuje cDNA pro *Renilla* luciferázu, odpadá přidání čtvrtého plazmidu pRL-TK a metoda se tak zjednodušuje.



**Obr. 20**

**Mapa DNA konstruktů pGAL4-hCAR-LBD**

Zkratky: CMV - cytomegalovirový promotor, Amp - ampicilinová rezistence v *E. coli*, SV40 - simian virus 40 promotor, SV40 late Poly(A) - polyadenylační konec, T7 - promotor pro *in vitro* transkripci

**Pracovní postup metody two-hybrid assay**

1. Nasadit 48-jamkovou destičku s 20 000 buňkami na jamku (plocha 1 cm<sup>2</sup>). Přidat 250 µl média na jamku, inkubovat 24 hodin.
2. Vypočítat množství plazmidů a Lipofectaminu potřebných k experimentu.
3. Připravit na jamku 30 µl Opti-MEM média s obsahem DNA:
  - a) reportérového plazmidu pGL5-luc 200 ng na jamku
  - b) expresního plazmidu pGAL4-hCAR-LBD 100ng na jamku
  - c) expresního plazmidu VP16-SRC-1 100ng na jamku.
4. Připravit na jamku 30 µl Opti-MEM média s Lipofectaminem 2000 v poměru 2,3:1 k DNA plazmidům. Po 5 minutách smíchat plazmidy s Lipofectaminem 2000, inkubovat 20 minut za pokojové teploty. Z 48-jamkové destičky odstranit médium, nahradit novým médiem 200 µl na jamku, přidat 60 µl transfekční směsi do každé jamky. Inkubace 24 hodin.

5. Odstranit médium. Přidat roztoky testovaných látek v požadovaných koncentracích, 100  $\mu$ l na jamku. Jako negativní kontrola slouží 1% v/v DMSO. 24 hodinová inkubace v temperovaném buněčném CO<sub>2</sub> inkubátoru.
6. Opláchnout destičku pomocí PBS.
7. Přidat 100 $\mu$ l Passive lysis buffer do každé jamky, destičku nechat zmrznout – krystaly lyzují buňky.
8. Z každé jamky přenést 40  $\mu$ l lyzátu na 96-jamkovou destičku, přidat 30  $\mu$ l Luciferase Assay Reagentu II.
9. Analýza chemiluminiscence prostřednictvím firefly luciferázy na destičkovém spektrofotometru/luminometru Genios Plus (Tecan).
10. Připravit Stop&Glo Reagent ze Stop&Glo Substrate, 50x a Stop&Glo Buffer v poměru 1:50. Přidat 25  $\mu$ l na jamku.
11. Analýza chemiluminiscence prostřednictvím *Renilla* luciferázy na destičkovém spektrofotometru/luminometru Genios Plus (Tecan).
12. Vyhodnocení dat.

#### 4.6 Metoda one-hybrid assay

Tato metoda je obměnou two-hybrid assay s tím rozdílem, že se v ní používá jen jeden fúzní protein. V našem případě ten, který je složený z GAL4 DBD a z LBD nukleárního receptoru hCAR (tj. bait proteinu, X). Fúzní protein složený z AD a prey proteinu schází. Jeho funkce při aktivaci transkripce je nahrazena endogenními koaktivátory, které jsou přítomny v buňkách linie.

##### Zásobní roztoky plazmidů

**pGL5-luc** – reportérový plazmid obsahující pět vazebných míst GAL4 a reportérový gen pro firefly luciferázu

**pGAL4-hCAR-LBD** - expresní plazmid pro fúzní protein obsahující GAL4 DBD a LBD nukleárního receptoru hCAR. Tento plazmid současně obsahuje cDNA pro *Renilla* luciferázu.

##### Pracovní postup

Pracovní postup je zcela stejný jako u two-hybrid assay, ale v bodě 3 vypustit přidání expresního plazmidu VP16-SRC-1 (3.c).

## 4.7 Statistická analýza

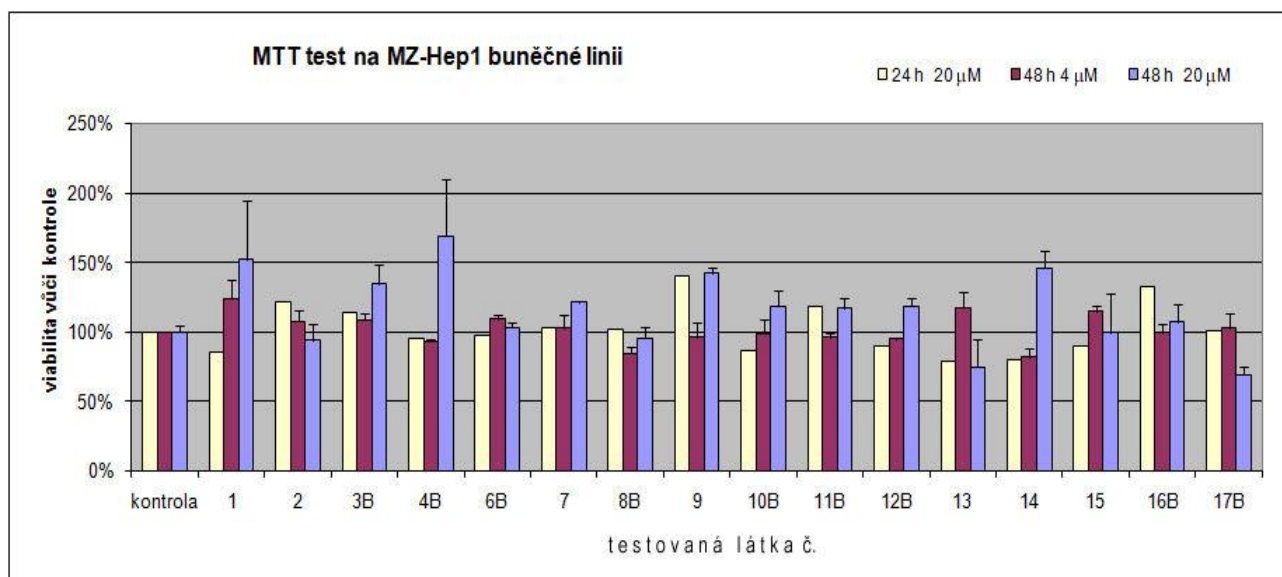
Analýza rozptylu (ANOVA) a Dunettův test byly použity, za pomoci softwaru GraphPad Prism, ke statistickému vyhodnocení dat z metod gene reporter assay, two-hybrid assay a one-hybrid assay. Statistická významnost na úrovni  $p < 0.05$  je vyznačena \*, na úrovni  $p < 0.01$  pak \*\*.

## 5. Výsledky

### 5.1 Metoda MTT assay

Pomocí metody MTT assay jsme testovali cytotoxicitu 16 zadaných látek definované struktury ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na buněčných liniích MZ-Hep 1 a HepG2.

#### A.



Obr. 21

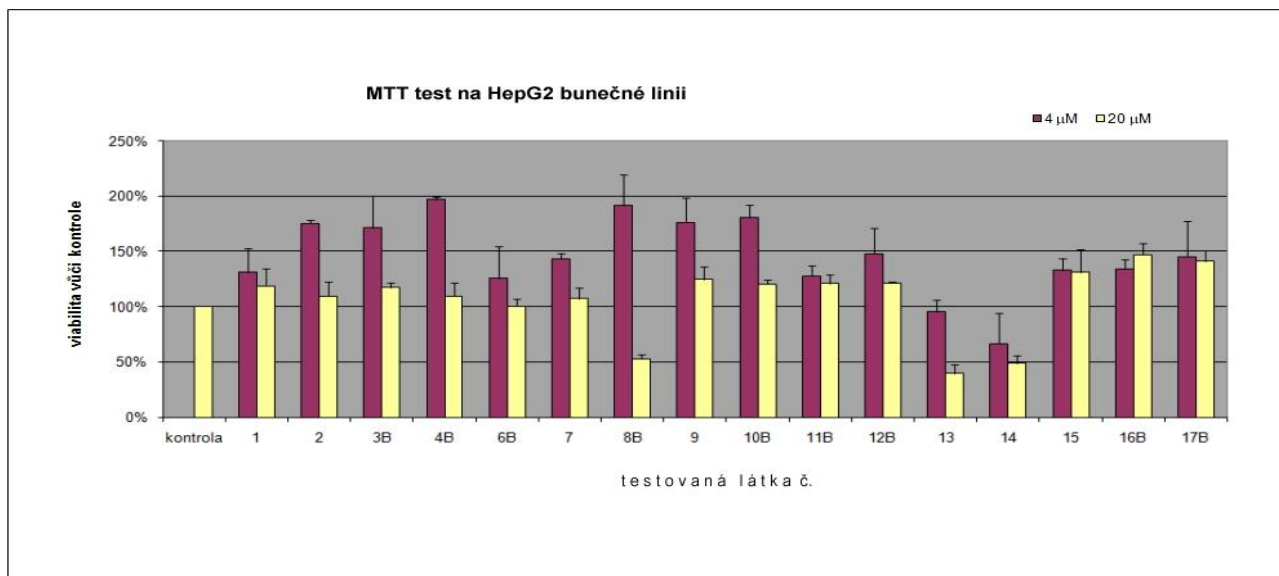
#### **MTT test na MZ-Hep1 buněčné linii**

Buňky linie MZ-Hep1 byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 20  $\mu\text{M}$ ) a 48 hodin (koncentrace 4 a 20  $\mu\text{M}$ ). MTT metoda byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.3, str.43. Měřítkem cytotoxicity testované látky je poměr viability buněk stanovené po uvedené inkubaci spektrofotometrickou kvantifikací vytvořeného fialového formazanu vůči kontrole s 1% v/v DMSO .

V prvním MTT experimentu jsme testovali látky ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na buněčné linii MZ-Hep 1 s dobou expozice 48 hodin a v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  i s dobou expozice 24 hodin. Výsledky tohoto experimentu nebyly podrobeny statistické analýze, protože nejsou cílem této rigorózní práce a mají pouze informativní charakter pro další experimenty. V této zkoušce se prokázal výraznější pokles viability buněk (vzhledem ke kontrole s 1% v/v DMSO) u látek č. 13 (v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a expozici 24 a 48 hodin), č. 14 (v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a expozici 24 hodin, a v koncentraci 4  $\mu\text{M}$  a expozici 48 hodin) a č. 17 (v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a expozici 48 hodin). Naopak zvýšená viabilita buněk nad 150% vůči kontrole byla zjištěna u látek č. 1 a 4B v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a expozici 48 hodin.



## B.



**Obr. 22**

### ***MTT test na HepG2 buněčné linii***

*Buňky linie HepG2 byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 4 a 20 μM). MTT metoda byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.3, str.43. Měřítkem cytotoxicity testované látky je poměr viability buněk stanovené po uvedené inkubaci spektrofotometrickou kvantifikací vytvořeného fialového formazanu vůči kontrole s 1% v/v DMSO.*

V druhém MTT experimentu jsme testovali látky ve dvou koncentracích 4 a 20 μM na buněčné linii HepG2 s dobou expozice 24 hodin. Výsledky tohoto experimentu opět nebyly podrobeny statistické analýze, protože nejsou cílem této rigorózní práce a mají pouze informativní charakter pro další experimenty. V této zkoušce se prokázal výraznější pokles viability buněk (vzhledem ke kontrole s 1% v/v DMSO) u látek č. 8B a 13 v koncentraci 20 μM, a u látky č. 14 v obou koncentracích 4 a 20 μM. Naopak zvýšená viabilita buněk nad 150% vůči kontrole byla zjištěna u látek č. 2, 3B, 4B, 8B, 9 a 10B v koncentraci 4 μM.

*Pozn.* U fenobarbitalu a TCPOBOP bylo prokázáno, že u myší silně podporují tumorigenezi. Zvyšují proliferaci hepatocytů, potlačují apoptózu a podporují jaterní hyperplazii (Režen, 2009).

**Většina látek v uvedených koncentracích a při uvedených dobách expozice (v dalších metodách je v pracovních postupech stanovena doba inkubace 24 hodin) nepůsobila cytotoxicky, což umožnilo jejich další testování.**

## 5.2 Metoda gene reporter assay

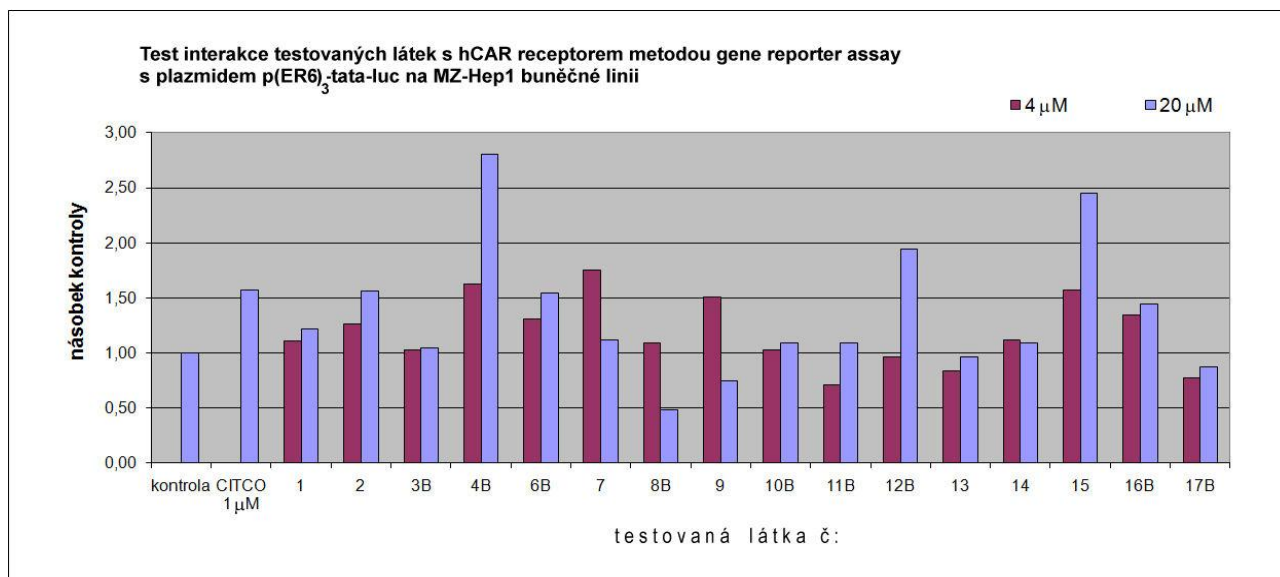
1)

Po provedení dvou MTT experimentů jsme testovali všech 16 látek v koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  metodou gene reporter assay za použití reportérového plazmidu **p(ER6)3-tata-luc a buněčné linie MZ-Hep1**.

Touto metodou jsme ověřovali, zda po inkubaci buněčné linie s testovanými látkami nedošlo ke zvýšení transkripční aktivity exprimovaného receptoru hCAR (resp. luminiscence luciferázy z reportérového konstrukt) ve srovnání s kontrolou (1‰ v/v DMSO), tj. jestli testované látky nejsou ligandy-agonisté hCAR receptoru.

Tato metoda nám posloužila u skupiny testovaných látek jako **základní screening** z hlediska interakce s CAR receptorem a umožnila nám provést selekci testovaných látek pro další experimenty. Výsledky tohoto experimentu opět nebyly podrobené statistické analýze, protože měly pouze informativní charakter pro další experimenty.

A.



Obr. 23

### **Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou gene reporter assay s plazmidem p(ER6)3-tata-luc na MZ-Hep1 buněčné linii.**

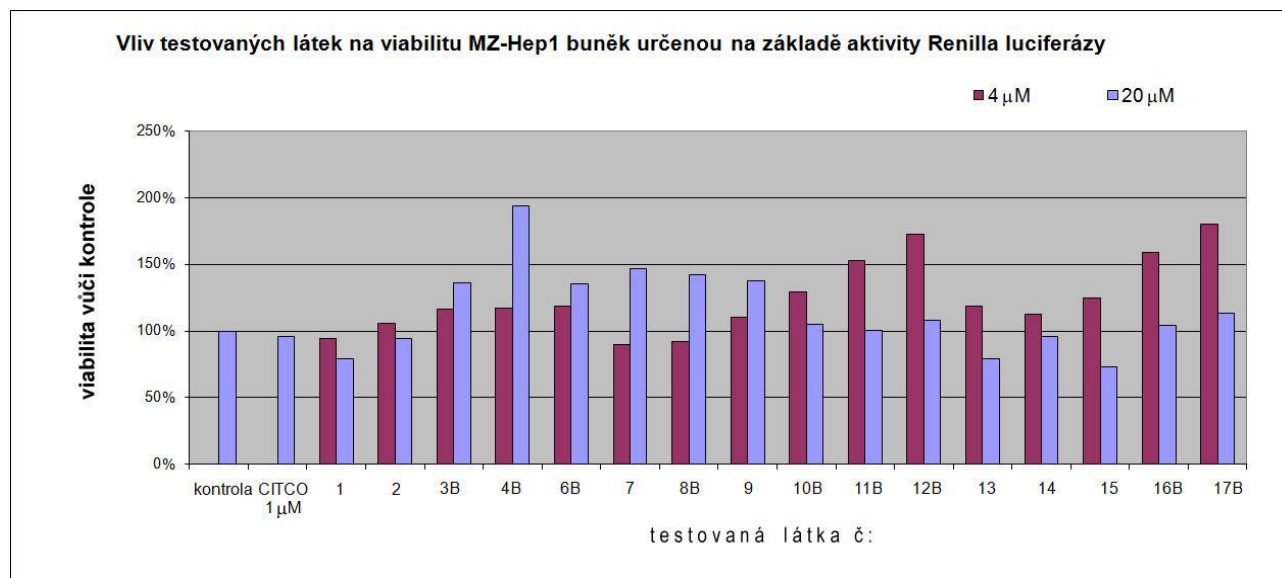
Buňky linie MZ-Hep1 byly po předchozí plazmidové transfekci inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 4 a 20  $\mu\text{M}$ ). Metoda gene reporter assay byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.4, str.46. Měřítkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscenci firefly a Renilla luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1‰ v/v DMSO .

Zvýšenou transkripční aktivitu nukleárního receptoru po inkubační době 24 hodin (vzhledem ke kontrole s 1‰ v/v DMSO) jsme v obou koncentracích 4 a 20 µM zaznamenali u látek č. 2, 4B, 6B, 15 a 16B. Zajímavá byla především hodnota u testované látky č. 4B v koncentraci 20 µM.

**V dalších metodách jsme proto testovali jen látky 2, 4B, 15 a 16B.**

## B.

Výsledky chemiluminiscence prostřednictvím *Renilla* luciferázy získané touto zkouškou jsou dalším ukazatelem působení testovaných látek na viabilitu buněk a doplňují tak výše uvedené výsledky MTT experimentů.



**Obr. 24**

### ***Vliv testovaných látek na viabilitu MZ-Hep1 buněk určenou na základě aktivity Renilla luciferázy vůči kontrole v rámci gene reporter assay***

*Buňky linie MZ-Hep1 byly po předchozí plasmidové transfekci inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 4 a 20 µM). Metoda gene reporter assay byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.4, str.46. Měřítkem cytotoxicity testované látky je poměr viability buněk určené aktivitou Renilla luciferázy vůči kontrole s 1‰ v/v DMSO.*

Výraznější pokles viability buněk po inkubační době 24 hodin (vzhledem ke kontrole s 1‰ v/v DMSO) určené na základě aktivity *Renilla* luciferázy byl patrný u látek č. 1, 13 a 15 v koncentraci 20 µM. Naopak zvýšená viabilita buněk nad 150% vůči kontrole byla zjištěna u látek č. 4B v koncentraci 20 µM a u látek č. 11B, 12B, 16B a 17B v koncentraci 4 µM.

**Když se srovnají výsledky viability z tohoto experimentu a výše uvedených dvou MTT experimentů na buněčných liniích MZ-Hep1 a HepG2, ve všech metodách byl zaznamenán pokles viability buněk u látky č. 13, naopak vyšší viabilita buněk byla ve všech metodách zaznamenána u látky č. 4B.**

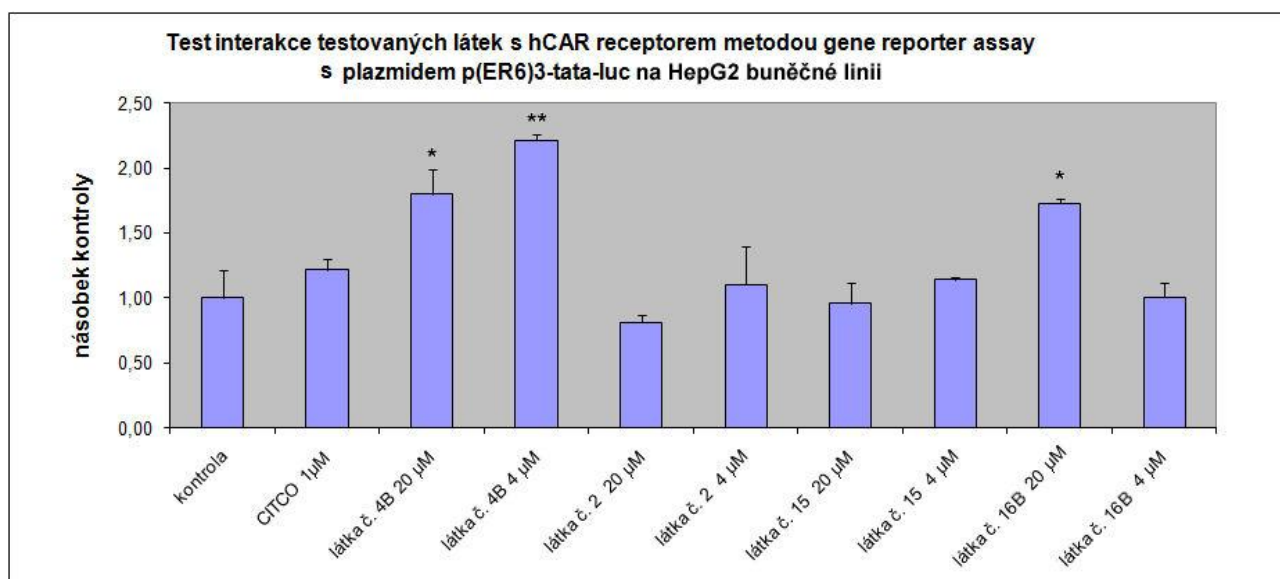
2)

V dalších gene reporter experimentech jsme testovali již jen látky 2, 4B, 15 a 16B ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na buněčné linii HepG2. První experiment byl proveden s reportérovým plazmidem p(ER6)3-tata-luc, druhý s reportérovým plazmidem pPBREM(CYP2B6)-luc.

A.

#### Gene reporter assay s reportérovým plazmidem p(ER6)3-tata-luc

V tomto experimentu byl použit p(ER6)3-tata-luc – reportérový plazmid obsahující tři sekvence ER6 s vazebnými místy pro hCAR (z CYP3A4 genu), TATA box (vazebné místo Pol II a bazálních transkripčních faktorů) a reportérový gen pro firefly luciferázu. Jako standard pro srovnání interakce s hCAR receptorem byl při testování zadaných látek použit modelový agonista CITCO v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci.



Obr. 25

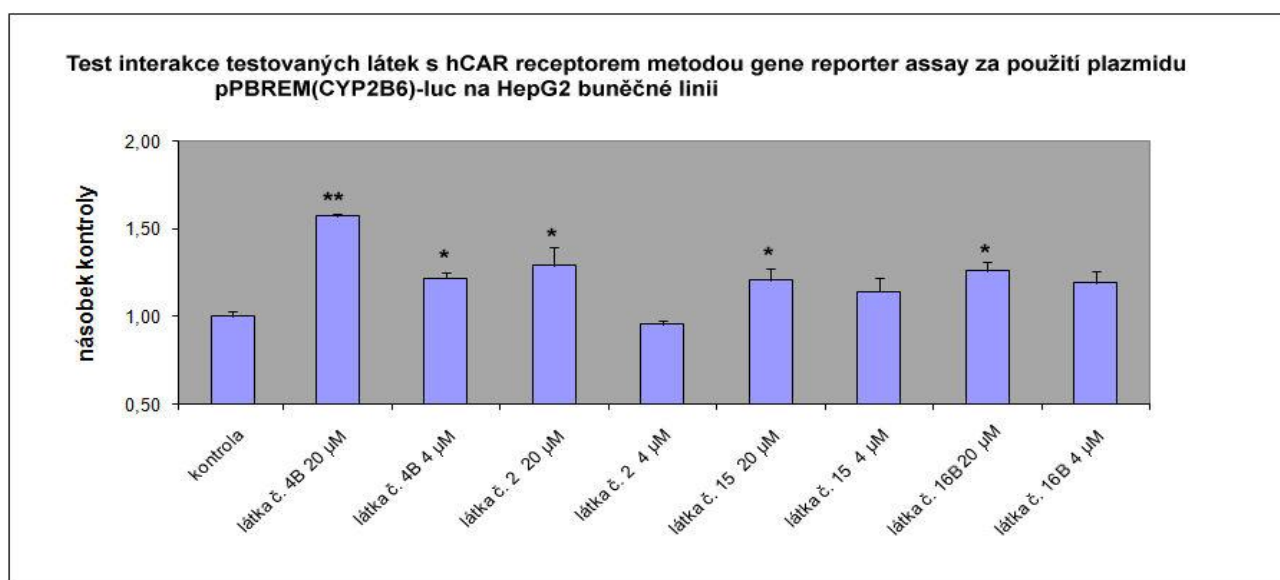
#### Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou gene reporter assay s plazmidem p(ER6)3-tata-luc na HepG2 buněčné linii.

Buňky linie HepG2 byly po předchozí plazmidové transfekci inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 4 a 20  $\mu\text{M}$ ). Metoda gene reporter assay byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.4, str.46. Měřitkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscenci firefly a Renilla luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1% v/v DMSO. Statistická významnost na úrovni  $p < 0.05$  je vyznačena \*, na úrovni  $p < 0.01$  pak \*\*.

Tímto experimentem s dobou inkubace 24 hodin bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity hCAR (vzhledem k 1% v/v DMSO) se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u látek 4B a 16B v koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Zvýšení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u látky č. 4B v koncentraci 4  $\mu\text{M}$ .

## B. Gene reporter assay s reportérovým plazmidem pPBREM(CYP2B6)-luc

V tomto experimentu byl použit **pPBREM(CYP2B6)-luc** - reportérový plazmid obsahující PBREM s vazebnými místy pro hCAR (z *CYP2B6* genu), virový SV40 promotor s vazebným místem Pol II a bazálních transkripčních faktorů, a reportérový gen pro firefly luciferázu.



Obr. 26

### **Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou gene reporter assay s plazmidem pPBREM(CYP2B6)-luc na HepG2 buněčné linii.**

Buňky linie HepG2 byly po předchozí plazmidové transfekci inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 4 a 20  $\mu$ M). Metoda gene reporter assay byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.4, str.46. Měřtkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscenci firefly a *Renilla* luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1‰ v/v DMSO. Statistická významnost na úrovni  $p < 0.05$  je vyznačena \*, na úrovni  $p < 0.01$  pak \*\*.

Tímto experimentem s dobou inkubace 24 hodin bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru (vzhledem ke kontrole s 1‰ v/v DMSO) se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u látky č. 4B v koncentraci 4  $\mu$ M a dále u látek č. 2, 15 a 16B v koncentraci 20  $\mu$ M. Zvýšení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u látky č. 4B v koncentraci 20  $\mu$ M.

Zvýšená luminiscence (stanovená poměrem luminiscenci firefly a *Renilla* luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1‰ v/v DMSO) byla odrazem zvětšené exprese reportérového genu na základě transkripční aktivity exprimovaného hCAR nukleárního receptoru, se kterým interagovala testovaná látka.

**Tato metoda prokázala interakci testovaných látek č. 2, 4B, 15 a 16B s nukleárním receptorem hCAR, tj. to, že jsou jeho ligandy – agonisté.**

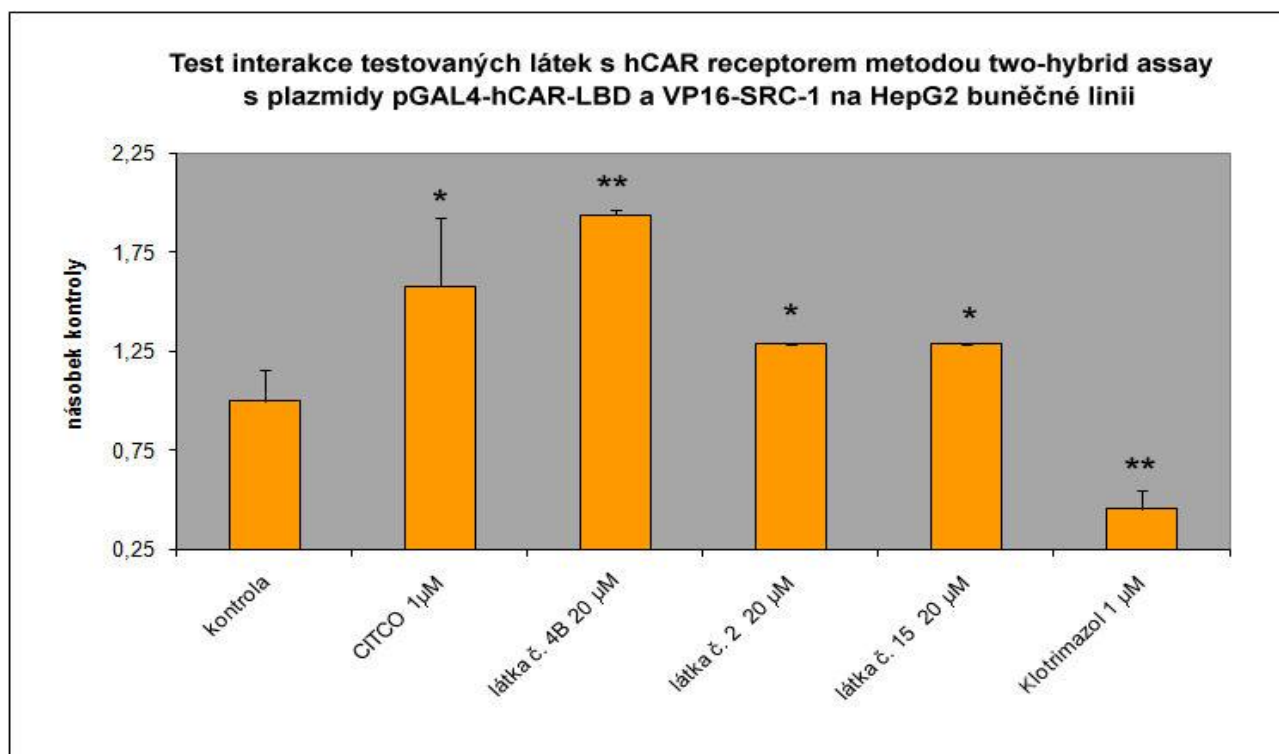
### **5.3 Metoda two-hybrid assay**

Metoda two-hybrid assay byla opět zvolena k prokázání interakce testovaných látek s nukleárním receptorem hCAR resp. s jeho vazebnou doménou (LBD) v případě zde použitého expresního plazmidu **pGAL4-hCAR-LBD**. V experimentu jsem ověřovali, zda po inkubaci buněčné linie s médiem obsahujícím testované látky nedošlo k nárůstu exprese reportérového genu (resp. luminiscence firefly luciferázy) ve srovnání s kontrolou, který by vycházel ze zvýšené transkripční aktivity exprimované LBD receptoru CAR interagující s koaktivátorem v přítomnosti ligandu, tj. jestli testované látky nejsou ligandy-agonisté hCAR receptoru.

Jako reportérový plazmid byl použit **pGL5-luc** obsahující pět vazebných míst GAL4 a reportérový gen pro firefly luciferázu. Dále byl použit **pGAL4-hCAR-LBD** (expresní plazmid pro fúzní protein obsahující GAL4 DBD a LBD nukleárního receptoru hCAR, a současně i pro *Renilla* luciferázu) a **VP16-SRC-1** (expresní plazmid pro fúzní protein obsahující transkripční aktivační doménu VP16 a koaktivátor SRC-1).

V tomto experimentu jsme testovali jen látky č. 2, 4B, 15 v jedné koncentraci 20  $\mu\text{M}$  na buněčné linii HepG2. Pro srovnání jsme vedle 1  $\mu\text{M}$  roztoku CITCO použili i 1  $\mu\text{M}$  roztok klotrimazolu, inverzního agonisty, který by měl z důvodu, že hCAR receptor vyvíjí bez vazby ligandu konstitutivní aktivitu, snížit transkripční aktivitu receptoru v porovnání s kontrolou. Doba inkubace byla opět 24 hodin.

Tímto experimentem s dobou inkubace 24 hodin bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru (vzhledem ke kontrole s 1% v/v DMSO) se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u CITCO (koncentrace 1  $\mu\text{M}$ ) a látek č. 2 a 15 (koncentrace 20  $\mu\text{M}$ ). Zvýšení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u látky č. 4B (koncentrace 20  $\mu\text{M}$ ). Snížení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u klotrimazolu (koncentrace 1  $\mu\text{M}$ ).



**Obr. 27**

**Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou two-hybrid assay s plazmidy pGAL4-hCAR-LBD a VP16-SRC-1 na HepG2 buněčné linii.**

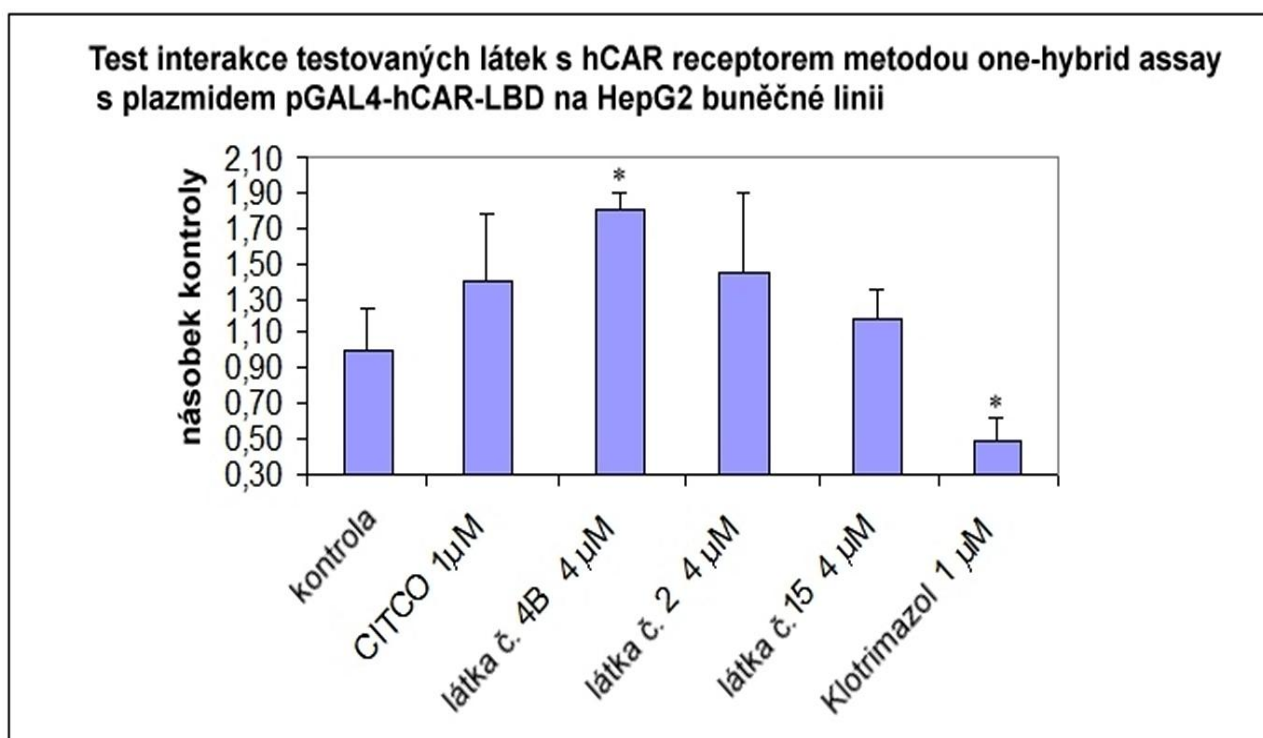
Buňky linie HepG2 byly po předchozí plazmidové transfekci inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 20 μM). Metoda two-hybrid assay byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.5, str.50. Měřtkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscencí firefly a Renilla luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1‰ v/v DMSO. Statistická významnost na úrovni  $p < 0.05$  je vyznačena \*, na úrovni  $p < 0.01$  pak \*\*.

Zvýšená resp. snížená luminiscence (stanovená poměrem luminiscencí firefly a Renilla luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1‰ v/v DMSO) byla odrazem zvětšené resp. zmenšené exprese reportérového genu na základě transkripční aktivity LBD nukleárního receptoru hCAR interagující s koaktivátorem SRC-1 v přítomnosti ligandu.

**Tato metoda prokázala interakci testovaných látek s nukleárním receptorem hCAR. Testované látky č. 2, 4B a 15 jsou podle výsledku tohoto experimentu, stejně jako modelová látka CITCO, ligandy – agonisté hCAR receptoru. Tento experiment dále potvrdil, že klotrimazol působí jako inverzní agonista hCAR receptoru.**

## 5.4 Metoda one-hybrid assay

Tato metoda byla obměnou two-hybrid assay s tím rozdílem, že byl vynechán VP16-SRC-1 (expresní plazmid pro fúzní protein obsahující transkripční aktivační doménu VP16 a koaktivátor SRC-1). Jeho funkce při aktivaci transkripce byla nahrazena endogenními koaktivátory. Reportérový plazmid **pGL5-luc** (obsahující pět vazebných míst GAL4 a reportérový gen pro firefly luciferázu) a plazmid **pGAL4-hCAR-LBD** (expresní plazmid pro fúzní protein obsahující GAL4 DBD a LBD nukleárního receptoru hCAR, a současně i pro *Renilla* luciferázu) zůstaly v této metodě zachovány.



**Obr. 28**

### **Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou one-hybrid assay s plazmidem pGAL4-hCAR-LBD na HepG2 buněčné linii.**

Buňky linie HepG2 byly po předchozí plazmidové transfekci inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek (koncentrace 4 μM). Metoda gene reporter assay byla provedena podle pracovního postupu uvedeného v oddíle 4.6, str.54. Měřítkem interakce testované látky s receptorem je poměr luminiscencí firefly a *Renilla* luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1% v/v DMSO. Statistická významnost na úrovni  $p < 0.05$  je vyznačena \*.

V tomto experimentu jsme testovali také jen látky č. 2, 4B, 15 v jedné koncentraci 4 μM na buněčné linii HepG2. Pro srovnání jsme opět použili 1 μM roztok CITCO a 1 μM roztok klotrimazolu. Doba inkubace byla opět 24 hodin.



Tímto experimentem bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru (vzhledem ke kontrole s 1‰ v/v DMSO) se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u látky č. 4B (koncentrace 4  $\mu\text{M}$ ). Snížení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  pak bylo zaznamenáno u klotrimazolu (koncentrace 1  $\mu\text{M}$ ).

Zvýšená resp. snížená luminiscence (stanovená poměrem luminiscencí firefly a *Renilla* luciferáz u testované látky vzhledem k tomuto poměru u kontroly - 1‰ v/v DMSO) byla odrazem zvětšené resp. zmenšené exprese reportérového genu na základě transkripční aktivity LBD nukleárního receptoru hCAR v přítomnosti ligandu.

**Tato metoda prokázala interakci testované látky č. 4B s nukleárním receptorem hCAR. Testovaná látka č. 4B je podle výsledku tohoto experimentu ligandem – agonistou hCAR receptoru. Tento experiment dále potvrdil, že klotrimazol působí jako inverzní agonista hCAR receptoru.**

## 6. Diskuze

Receptory jsou zodpovědné za selektivitu působení látek. Selektivita závisí na velikosti molekuly, tvaru a elektrickém náboji a tyto parametry určují, zda a s jakou intenzitou se určitá látka váže – mezi obrovským počtem chemicky odlišných vazebných míst dostupných v buňce – právě na určitý buněčný receptor. Změny v chemické struktuře látky proto mohou velmi výrazně zvýšit nebo snížit vazebnou afinitu v odlišných třídách receptorů a výsledkem je změna terapeutického nebo toxického účinku. Receptory podstatně určují kvantitativní vztahy mezi dávkou/koncentrací látky a farmakologickými účinky agonistů a zprostředkují i účinek farmakologických antagonistů. Stupeň selektivity léčiva, jak z pohledu cíleného zásahu v určité tkáni nebo orgánu, tak z pohledu spektra vyvolaných reakcí, může být vodítkem pro posouzení poměru mezi terapeutickou prospěšností a nežádoucími účinky (rizikem podávání) léčiva (Lincová a kol., 2007).

Molekulárně biologické přístupy posunuly výzkum izoformem již známých receptorů do oblasti identifikace stovek genů pro zcela nové, dosud u člověka neznámé receptory. Sekvenční analýza umožňuje zařadit mnoho z nich do již známých rodin receptorů. Jejich funkce jsou potvrzovány při použití selektivních ligandů těchto receptorů. Pro mnoho z nově objevených receptorů však nejsou žádné ligandy známy – proto je pro tyto receptory používán termín sirotčí receptory (orphan receptors). To je podnětem pro hledání jejich fyziologických funkcí a příslušných endogenních ligandů. I přes neznalost funkční úlohy jsou sirotčí receptory považovány za potenciálně zajímavou oblast ve vývoji léčiv (Lincová a kol., 2007).

Androstanový konstitutivní receptor je právě určitým prototypem sirotčích receptorů - a to nejen z hlediska své identifikace a hledání fyziologických funkcí a ligandů, ale i z aspektu možného terapeutického využití.

V současné době není v podstatě známa úplná funkce ani ligandy lidského CAR receptoru. Většina informací o CAR receptoru pochází z myšího knockout modelu za použití TCPOBOP a je velmi pravděpodobné, že funkce myšího a lidského CAR se bude v různých aspektech lišit podobně, jako je tomu např. u lidského a myšího PXR. V současnosti můžeme pro studium lidského CAR použít pouze nedokonalé a málo aktivní CITCO a fenobarbital s nepřímým a hodně nespecifickým účinkem ve vysokých dávkách.

Nalezení specifického agonisty CAR pro lidský ortholog by umožnilo vůbec definovat funkci lidského CAR receptoru. Na základě dat na zvířecích modelech lze zatím spíše spekulovat o terapeutické hodnotě agonistů CAR. Nalezení nových ligandů, k čemuž by snad mohla přispět i tato práce, by proto mohlo umožnit základní výzkum funkce

lidského CAR. Teprve následně se bude moci více uvažovat o možné farmakoterapeutické aplikaci agonistů CAR receptoru. Poznání všech funkcí lidského CAR by také mohlo osvětlit, jestli aktivace CAR nemůže být důvodem klinicky významných nežádoucích účinků a interakcí při podávání již registrovaných léčiv.

Co se týče možnosti terapie léčivy interagujícími s CAR receptorem, jsou tak nynější poznatky teprve ve fázi prvních studií. Tyto studie se soustřeďují nejen na již déle známou funkci CAR receptoru v biotransformaci a exkreci nežádoucích chemických látek (např. bilirubinu), ale nověji i na funkci receptoru v metabolismu glukózy a lipidů.

Z hlediska uplatnění interakce s CAR receptorem v terapii se v dnešní době zájem soustřeďuje na podávání inverzních agonistů CAR při non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (*pozn.* k snížení inhibice  $\beta$ -oxidace mastných kyselin v játrech), na podávání agonistů CAR k léčbě cholestázy a žloutenky, ale především na podávání agonistů CAR při léčbě diabetu II. typu, obezity a dyslipidémie. Je ale zřejmé, že tuto terapii by mohlo následovat (vedle např. hepatických nežádoucích účinků) riziko interakcí, neboť bylo prokázáno, že CAR indukuje expresi různých enzymů fází I a II biotransformace a transportérů fáze III (viz tabulka 2, str. 28). Nezbytnou součástí studie léčiv interagujících s CAR receptorem bude proto i testování a určení jejich indukčního profilu, zejména z hlediska enzymů fází I a II. Riziko interakcí a nežádoucích účinků by snad nebylo tak významné u krátkodobé léčby obezity, ale pro volbu dlouhodobé terapie diabetu II. typu a dyslipidémie je zásadní.

Na tomto místě bych se přesto odvážil „na tenký led“ diskuze a zamyslel se nad možným přínosem těchto léčiv primárně v terapii diabetu II. typu, protože pozitivní účinek na metabolismus glukózy byl jednoznačně prokázán, a dále bych pak uvedl eventuální interakce s často současně aplikovanými farmakologickými skupinami - antihypertenzivy a hypolipidemiky. Vedle toho, že je vliv CAR na metabolismus popsán jen několika studiemi na zvířecích modelech, jsem si také samozřejmě vědom i nesouladu při srovnání teoretického léčiva – agonisty CAR receptoru se současně používanými léčivy, nicméně v horizontu let se pravděpodobně farmakoterapie zcela zásadně nezmění.

Vedle inzulínu se k terapii diabetu používá celá řada dalších léčiv s hypoglykemizujícím účinkem, která lze podle cesty podání rozdělit na perorální antidiabetika (PAD) a injekční antidiabetika (IAD), podle chemické struktury a mechanismu účinku pak na biguanidy, glitazony, deriváty sulfonylurey, glinidy, inkretiny, inhibitory dipeptidylpeptidázy a inhibitory střevních  $\alpha$ -glukosidáz (Suchopár a kol., 2009).

Biguanidy zpomalují resorpci glukózy ze střeva a snižují glukoneogenezi v játrech.

Snižují glykémii postprandiální i nalačno. Neváží se na plazmatické bílkoviny, nepodléhají biotransformaci v játrech a z organismu se vylučují prakticky úplně močí. Biguanidy nezvyšují sekreci inzulínu a jejich podávání není spojeno s rizikem vzniku hypoglykémie. Metformin je v současné době perorálním antidiabetikem první volby. Je indikován v monoterapii u nemocných s diabetem 2. typu nedostatečně kompenzovaným dietou a dalšími režimovými opatřeními, vhodný je zejména u diabetiků s nadváhou a obezitou. Lze ho kombinovat s ostatními perorálními antidiabetiky i s inzulinem (Suchopár a kol., 2009).

Srovnání účinku agonisty nukleárního receptoru CAR s metforminem má odůvodnění nejen z hlediska mechanismu účinku (snížení jaterní glukoneogeneze), ale i z hlediska použití u diabetiků s nadváhou. Z hlediska interakcí s jinými současně podávanými léčivými metformin nepodléhá biotransformaci, naopak agonista CAR receptoru by zřejmě mohl vykazovat interakce a byl by pravděpodobně vhodný jen k méněčetné farmakoterapii. Možnou výhodou léčby diabetu II. typu agonistou CAR by snad mohlo být jeho současné ovlivnění metabolismu lipidů. Je ale právě otázkou, jak by především dlouhodobá terapie agonistou CAR ovlivnila plazmatické hladiny lipidů, protože poslední studie vlivu CAR aktivace na metabolismus (Gao a kol., 2009; Režen a kol., 2009) neposkytují zcela jednoznačné a pozitivní výsledky. V těchto studiích bylo ověřeno snížení sérové hladiny celkového, LDL, ale i HDL cholesterolu. Co se týče vlivu na sérové hladiny triglyceridů, účinek CAR aktivace souvisel s druhem diety použité v experimentu.

Interakce agonisty nukleárního receptoru CAR se současně podávanými léčivými lze předvídat z toho, že bylo prokázáno, že CAR indukuje několik hlavních jaterních CYPs spojených s metabolismem léčiv u člověka – především CYP2B6, CYP3A4 a CYP2C9. Jako téma úvahy o možných interakcích agonisty CAR receptoru, jako možného léčiva k terapii diabetu II. typu, se jednoznačně nabízí kombinace s dalšími léčivými podávanými při metabolickém syndromu - antihypertenzivy a hypolipidemiky.

Antihypertenzivy první volby jsou u diabetiků inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE) nebo sartany, při rozvinuté diabetické nefropatii je výhodné jejich současné podávání. Do kombinace s inhibitory ACE nebo sartany jsou nejvýhodnější metabolicky neutrální blokátory vápníkových kanálů. Za méně vhodná léčiva, především u diabetiků s metabolickým syndromem, jsou považovány  $\beta$ -blokátory a diuretika (Suchopár a kol., 2009).

ACE inhibitory podléhají v játrech extenzivní biotransformaci, ale nejsou substráty CYPs. Sartany telmisartan a valsartan se v játrech jen minimálně biotransformují na neúčinné metabolity. Losartan se z malé části biotransformuje v játrech prostřednictvím

CYP2C9 na 40x účinnější kyselinu losartanovou. Blokátory vápníkových kanálů se extenzivně biotransformují v játrech (některé i ve střevě) prostřednictvím CYP3A4 na neúčinné metabolity. K současnému podávání léčiva – agonisty CAR receptoru a antihypertenziva z výše uvedených skupin by zřejmě bylo možné zvolit vhodnou kombinaci bez interakce (telmisartan, valsartan). Při nutnosti podání dalšího antihypertenziva – blokátoru vápníkových kanálů by mohlo docházet ke snížení jeho plazmatických hladin, což lze za určitých podmínek vyvážit změnou dávkování.

Pokud by se spolu s terapií agonistou CAR uvažovalo o současném podání hypolipidemika ze skupiny statinů (inhibitorů hydroxymethylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy), lze na základě výše uvedených studií (Gao a kol., 2009; Režen a kol., 2009) usoudit, že aktivace CAR vede ke snížení sérové hladiny celkového a LDL cholesterolu, a to jinými mechanismy než u statinů, tudíž by zřejmě došlo k zesílení hypocholesterolemického účinku a podávání statinů by event. mohlo být nadbytečné. Nicméně při komedikaci agonisty CAR a statinů by prostřednictvím indukce CYPs mohlo docházet k snížení jejich plazmatických hladin, protože v současné době používané látky jsou substráty CYP3A4 (simvastatin, lovastatin a atorvastatin) a CYP2C9 (fluvastatin a rosuvastatin).

Při současném podávání fibrátů (působí jako aktivátory PPAR $\alpha$ , fenofibrát navíc mírně aktivuje i PPAR $\gamma$ , čímž mírně zlepšuje glukózovou toleranci a snižuje hladinu glykosylovaného hemoglobinu) by zřejmě docházelo i k protichůdnému farmakodynamickému působení a kompeticím. Je prokázáno, že CAR soutěží s PPAR $\alpha$  o jeho vazebné místo v promotoru genu 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy. Aktivace CAR snižuje a naopak aktivace PPAR $\alpha$  zvyšuje expresi CPT1, rychlost limitujícího enzymu  $\beta$ -oxidace. Mimo to peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) je transkripčním koaktivátorem nejen nukleárních receptorů PPAR, ale i nukleárního receptoru CAR. Studie, při které byl *wild-type* myším na HFD dietě 8 týdnů podáván TCPOBOP, prokázala signifikantní potlačení exprese PPAR $\alpha$  a jeho cílových genů spojených s  $\beta$ -oxidací v játrech i kosterních svalech (Gao a kol., 2009). Nicméně současné podávání fibrátů by pravděpodobně mohlo zmírnit negativní vliv aktivace CAR na hladinu HDL – cholesterolu a ukládání triglyceridů v játrech.

Další otázkou při použití agonisty CAR receptoru v terapii by byl jeho vliv na proliferaci hepatocytů event. jaterní hyperplazii, protože při experimentech na myších byly odhaleny právě tyto účinky u fenobarbitalu a TCPOBOP. V souvislosti s vlivem na játra by

bylo nutné zdokumentovat také účinek agonisty CAR receptoru na ukládání triglyceridů event. rozvoj NAFLD.

Dále lze i připomenout, že bylo prokázáno, že chronická léčba fenobarbitalem, aktivátorem CAR, podporuje hypertrofii štítné žlázy. Tento účinek se vysvětluje tím, že fenobarbitalem indukovaná CAR aktivace snižuje sérovou hladinu celkového T4 prostřednictvím up-regulace enzymů fáze II (tj. UGT1A1 a SULT1A1). Z toho by zřejmě mohla vyplývat i kontraindikace léčiva – agonisty CAR při hypotyreóze.

Protože CYP2B, hlavní cíl CAR aktivace, metabolizuje estrogény i androgeny a CAR regulovaná UGT1A1 glukuroniduje estrogény, indukce těchto enzymů způsobená podáváním agonisty CAR by mohla zvýšit katabolismus steroidních hormonů, což by mohlo např. prohloubit deficit estrogenů nebo vést k interakci se současnou hormonální substituční terapií event. kontracepcí.

Terapie agonisty CAR receptoru by zřejmě mohla být specifická a „zajímavá“ v tom, že by vedle diabetu II. typu, mohla mít i pozitivní vliv na nadváhu a hypercholesterolémii. Omezení nebo možné záporné účinky této terapie, zejména při dlouhodobém podávání, by zřejmě souvisely především se snížením sérové hladiny HDL-cholesterolu, interakcemi na základě indukce enzymů fází I a II biotransformace, jaterní hyperplazií, jaterní steatózou a zvýšením metabolismu steroidních a tyroidních hormonů. Z těchto důvodů je i možné, že by agonisté CAR receptoru mohly být indikovány pouze ke krátkodobé terapii obezity.

Orphan receptory jsou potenciálně zajímavou oblastí z hlediska vývoje nových léčiv. Vzhledem k tomu, že CAR receptor nejen současně moduluje metabolismus glukózy a lipidů, ale i indukuje expresi různých enzymů fází I a II biotransformace a transportérů fáze III, bude zásadní a nezbytnou součástí studií možných léčiv interagujících s CAR receptorem právě testování a určení jejich indukčního profilu, zejména z hlediska enzymů fází I a II. Tento indukční profil bude, vedle objasnění všech metabolických a nežádoucích účinků, pravděpodobně směrodatný pro další využití testovaných látek ve farmakoterapii.

## 7. Závěr

Cílem této experimentální rigorózní práce bylo testování potenciálních ligandů lidského konstitutivního androstanového receptoru ze zadané skupiny 16 látek definované struktury.

Nejprve jsme pomocí metody MTT assay testovali cytotoxicitu zadaných látek ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na buněčných liniích MZ-Hep1 (obr. 21, str.56) a HepG2 (obr. 22, str. 57). Současně v obou testech byla prokázána cytotoxicita u látek č. 13 a 14. Naopak zvýšenou viabilitu buněk (resp. proliferativní účinek testované látky) jsme zaznamenali současně v obou testech u látky č. 4B. Většina látek v uvedených koncentracích nepůsobila cytotoxicky, což umožnilo jejich další testování. V této i v dalších experimentech byl jako kontrola použit 1‰ v/v DMSO v DMEM médiu.

V dalších experimentech jsme již testovali možnou interakci zadaných látek s nukleárním receptorem hCAR. Nejprve jsme testovali všech 16 látek ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na buněčné linii MZ-Hep1 metodou gene reporter assay s použitím reportérového plazmidu p(ER6)3-tata-luc (obr. 23, str. 58). Tato metoda nám posloužila u skupiny testovaných látek jako základní screening z hlediska interakce s CAR receptorem. Na základě jejího výsledku jsme provedli selekci a v dalších metodách testovali jen látky č. 2, 4B, 15 a 16B. Aktivita *Renilla* luciferázy vůči kontrole zjištěná v rámci této metody byla dalším doplňujícím ukazatelem vlivu testovaných látek na viabilitu MZ-Hep1 buněk, kterým se potvrdily výsledky předchozích MTT testů resp. cytotoxicita látky č. 13 a proliferativní účinek látky č. 4B (obr. 24, str. 59).

Dalším krokem bylo testování látek č. 2, 4B, 15 a 16 ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na jiné buněčné linii HepG2 metodou gene reporter assay s použitím stejného reportérového plazmidu p(ER6)3-tata-luc (obr. 25, str. 60). Tímto experimentem s dobou inkubace 24 hodin bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u látek č. 4B a 16B v koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Zvýšení transkripční aktivity CAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u látky č. 4B v koncentraci 4  $\mu\text{M}$ .

Dále jsme testovali látky č. 2, 4B, 15 a 16 ve dvou koncentracích 4 a 20  $\mu\text{M}$  na buněčné linii HepG2 metodou gene reporter assay s použitím reportérového plazmidu pPBREM(CYP2B6)-luc (obr. 26, str. 61). Tímto experimentem s dobou inkubace 24 hodin bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u látky č. 4B v koncentraci 4  $\mu\text{M}$  a dále u látek č. 2, 15 a

16B v koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Zvýšení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u látky č. 4B v koncentraci 20  $\mu\text{M}$ .

Následně jsme metodou two-hybrid assay testovali látky č. 2, 4B, 15 v jedné koncentraci 20  $\mu\text{M}$  na buněčné linii HepG2 (obr. 27, str. 63). Pro srovnání byl použit vedle 1  $\mu\text{M}$  roztoku CITCO i 1  $\mu\text{M}$  roztok klotrimazolu, inverzního agonisty. Tímto experimentem s dobou inkubace 24 hodin bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u CITCO (koncentrace 1  $\mu\text{M}$ ) a látek č. 2 a 15 (koncentrace 20  $\mu\text{M}$ ). Zvýšení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u látky č. 4B (koncentrace 20  $\mu\text{M}$ ). Snížení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.01$  pak bylo zaznamenáno u klotrimazolu (koncentrace 1  $\mu\text{M}$ ).

Posledním experimentem byla metoda one-hybrid assay, kterou jsme testovali také jen látky č. 2, 4B, 15 v jedné koncentraci 4  $\mu\text{M}$  na buněčné linii HepG2 (obr. 28, str. 64). Pro srovnání jsme opět použili 1  $\mu\text{M}$  roztok CITCO a 1  $\mu\text{M}$  roztok klotrimazolu. Doba inkubace byla opět 24 hodin. Tímto experimentem bylo zjištěno zvýšení transkripční aktivity nukleárního receptoru hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  u látky č. 4B (koncentrace 4  $\mu\text{M}$ ). Snížení transkripční aktivity hCAR se statistickou významností na úrovni  $p < 0.05$  pak bylo zaznamenáno u klotrimazolu (koncentrace 1  $\mu\text{M}$ ).

V metodách two-hybrid assay a one-hybrid assay byl poprvé použit konstrukt pGAL4-hCAR-LBD, který tím, že sám již obsahuje cDNA pro *Renilla* luciferázu, zjednodušuje metodu, protože odpadá přidání dalšího plazmidu pRL-TK. Tento konstrukt byl primárně připraven pro tuto rigorózní práci, jeho funkčnost byla ověřena a lze ho použít v dalších studiích interakcí s hCAR receptorem.

Závěrem: za použití metod gene reporter assay, two-hybrid assay a one-hybrid assay jsme testovali potenciální ligandy lidského konstitutivního androstanového receptoru ze zadané skupiny 16 látek definované struktury. Výsledky experimentů prokázaly, že látky č. 2, 4B, 15 a 16B jsou ligandy-agonisté hCAR receptoru. Nevýraznější interakce s hCAR receptorem byla zjištěna u látky číslo 4B, kód 20007, chemickým názvem 2-(acetylsulfanyl)-4-(2',4'-difluorbifenyl-4-yl)-4-oxobutanová kyselina (chemická struktura viz obr. 14, str. 42). Výsledky této rigorózní práce naznačují, že tato látka by mohla být dále testována jako potenciální spolehlivý specifický agonista k dalšímu objasňování funkcí lidského konstitutivního androstanového receptoru nebo snad i jako potenciální léčivo, které by prostřednictvím aktivace tohoto zajímavého receptoru mohlo ovlivňovat lidský metabolismus.



## 8. Abstrakt

Konstitutivní androstanový receptor - CAR je zástupcem nukleárních receptorů, které tvoří superrodinu ligandem-aktivovaných transkripčních faktorů ovlivňujících expresi cílových genů.

V minulém desetiletí byl CAR studován především v souvislosti s indukcí biotransformačních enzymů léčivy nebo jinými xenobiotiky, ale v posledních několika letech se výzkum soustřeďuje i na jeho funkci v hormonální, lipidové a energetické homeostáze. Nedávno byly odhaleny důležité metabolické funkce CAR, které mohou z tohoto „xenobiotického receptoru“ vytvořit nový terapeutický cíl z hlediska terapie diabetu II. typu, obezity a dyslipidémie.

Cílem této experimentální rigorózní práce bylo testování potenciálních ligandů lidského CAR (hCAR) ze zadané skupiny 16 látek definované struktury.

Za použití metod gene reporter assay, two-hybrid assay a one-hybrid assay jsme testovali tuto skupinu z hlediska interakce s hCAR. Výsledky experimentů prokázaly, že čtyři z těchto látek jsou ligandy – agonisté hCAR. Nejvýraznější interakce s hCAR byla zjištěna u 2-(acetylsulfanyl)-4-(2',4'-difluorbifenyl-4-yl)-4-oxobutanové kyseliny. Výsledky této rigorózní práce naznačují, že tato látka by mohla být dále testována jako potenciální spolehlivý specifický agonista k dalšímu objasňování funkcí lidského konstitutivního androstanového receptoru nebo snad i jako potenciální léčivo, které by prostřednictvím aktivace tohoto zajímavého receptoru mohlo ovlivňovat lidský metabolismus.

## Abstract

The constitutive androstane receptor – CAR is a representative of nuclear receptors that form a super-family of ligand-activated transcription factors regulating expression of target genes.

In the last decade, CAR was mainly investigated in connection with an induction of biotransformation enzymes by remedies or other xenobiotics but in the past few years the research has also concentrated on a role of this receptor in hormone, lipid and energy homeostasis. Recently, there have been revealed some new important metabolic functions of CAR that may establish this „xenobiotic receptor“ as a new therapeutic target for treatment of type 2 diabetes, obesity and dyslipidemia.

The aim of this experimental rigorous thesis has been the examination of potential ligands of the human CAR (hCAR) from a given group of 16 chemicals with a defined structure.

Using methods gene reporter assay, two-hybrid assay and one-hybrid assay we have tested this group from the perspective of an interaction with hCAR. The results of our experiments have proved that four of these compounds are ligands – agonists of hCAR. The strongest interaction of hCAR has been identified with 2-(acetylsulfanyl)-4-(2',4'-difluorobiphenyl-4-yl)-4-oxobutanoic acid. The results of this rigorous thesis imply that this compound might be further examined as a potential reliable specific agonist helping to clarify the functions of the human constitutive androstane receptor or perhaps also as a potential remedy that might, via an activation of this interesting receptor, regulate human metabolism.

## 9. Literatura

Baes M., Gulick T., Choi H.S., Martinoli M.G., Simha D., Moore D.D., A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with subset of retinoic acid response elements, *Mol. Cell. Biol.* 14(3), 1994, str. 1544-1552

Blumberg B., Sabbagh W., Juguilon H., Balado J., van Meter C.M., Ono E.S., Evans R.M., SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor, *Genes Dev.* 12(20), 1998, str. 3195-3205

DeKeyser J.G., Stagliano M.C., Auerbach S.S., Prabu K.S., Jones A.D., Omiecinski C.J., Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2, *Mol. Pharmacol.* 75(5), 2009, str. 1005-1013

di Masi A., De Marinis E., Ascenzi P., Marino M., Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects, *Mol. Aspects Med.* 30(5), 2009, str. 297-343

Forman B.M., Tzamelis I., Choi H.S., Chen J., Simha D., Seol W., Evans R.M., Moore D.D., Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta, *Nature* 395(6702), 1998, str. 612-615

Gao J., He J., Zhai Y., Wada T., Xie W., CAR is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity, *J. Biol. Chem.* 284(38), 2009, str. 25984-25992

Guo D., Sarkar J., Suino-Powell K., Xu Y., Matsumoto K., Jia Y., Yu S., Khare S., Haldar K., Rao M.S., Foreman J.E., Monga S.P., Peters J.M., Xu H.E., Reddy J.K., Induction of nuclear translocation of constitutive androstane receptor by peroxisome proliferator-activated receptor alpha synthetic ligands in mouse liver, *J. Biol. Chem.* 282(50), 2007, str. 36766-36776

Huang W., Zhang J., Wei P., Schrader W.T., Moore D.D., Meclizine is an agonist ligand for mouse constitutive androstane receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR, *Mol. Endocrinol.* 18(10), 2004, str. 2402-2408

Ikeda S., Kurose K., Ozawa S., Sai K., Hasegawa R., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Nakajima T., Matsumoto K., Saito H., Goto Y., Kimura H., Katoh M., Sugai K., Minami N., Shirao K., Tamura T., Yamamoto N., Minami H., Ohtsu A.,

Yoshida T., Saijo N., Saito Y., Sawada J., Twenty-six novel single nucleotide polymorphisms and their frequencies of the NR113 (CAR) gene in a Japanese population, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 18(6), 2003, str. 413-418

Invitrogen, Lipofectamine™ 2000, 2006, firemní manuál

Kawamoto T., Kakizaki S., Yoshinari K., Negishi M., Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene, *Mol. Endocrinol.* 14(11), 2000, str. 1897-1905

Konno Y., Negishi M., Kodama S., The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 23(1), 2008, str. 8-13

Lamba J.K., Lamba V., Yasuda K., Lin Y.S., Assem M., Thompson E., Strom S., Schuetz E., Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311(2), 2004, str. 811-821

Lincová D., Farghali H. a kol., *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání, Praha : Galén, 2007, 672 str., ISBN 978-80-7262-373-0

Maglich J.M., Parks D.J., Moore L.B., Collins J.L., Goodwin B., Billin A.N., Stoltz C.A., Kliewer S.A., Lambert M.H., Willson T.M., Moore J.T., Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes, *J. Biol. Chem.* 278(19), 2003, str. 17277-17283

Moore L.B., Parks D.J., Jones S.A., Bledsoe R.K., Consler T.G., Stimmel J.B., Goodwin B., Liddle C., Blanchard S.G., Willson T.M., Collins J.L., Kliewer S.A., Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands, *J. Biol. Chem.* 275(20), 2000, str.15122-15127

Pávek P., Červený L., Mičuda S., Štaud F., Novotná-Čečková M., Fendrich Z., Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí, *Remedia* 15 (4-5), 2005, str. 380-383

Promega, *Protein Interaction Guide*, 2007, firemní publikace

Promega Technical Manual No. 040, *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*, 2009, firemní manuál

Rencurel F., Foretz M., Kaufmann M.R., Stroka D., Looser R., Leclerc I., da Silva Xavier G., Rutter G.A., Viollet B., Meyer U.A., Stimulation of AMP-activated protein kinase is essential for the induction of drug metabolizing enzymes by phenobarbital in human and mouse liver, *Mol. Pharmacol.* 70(6), 2006, str. 1925-1934

Režen T., Tamasi V., Lövgren-Sandblom A., Björkhem I., Meyer U.A., Rozman D., Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers, *BMC Genomics*, 2009, 10:384

Roche Applied Science, Cell Proliferation Kit I (MTT), Cat. No. 1 465 007, 2002, firemní manuál

Rulcová A., Využití molekulárně biologických in vitro metod pro interpretaci mechanismů vybraných lékových interakcí warfarinu: diplomová práce, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2009, 48 str., vedoucí diplomové práce Pávek P.

Shan L., Vincent J., Brunzelle J.S., Dussault I., Lin M., Ianculescu I., Sherman M.A., Forman B.M., Fernandez E.J., Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androstenediol: a molecular basis for inverse agonism, *Mol. Cell.* 16(6), 2004, str. 907-917

Suchopár J. a kol., *Remedia Compendium*, 4. vydání, Praha : Panax Co, s.r.o., 2009, 946 str., ISBN 978-80-902806-4-9

Suino K., Peng L., Reynolds R., Li Y., Cha J.Y., Repa J.J., Kliewer S.A., Xu H.E., The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization, *Mol. Cell.* 16(6), 2004, str. 893-905

Swales K., Negishi M., CAR, driving into the future, *Mol. Endocrinol.* 18(7), 2004, str. 1589-1598

Thigpen K.G., International sequencing consortium, *Environ. Health Perspect.* 112(7), 2004, str. 406

Tirona R. G., Kim R. B., Nuclear receptors and drug disposition gene regulation, *J. Pharm. Sci.* 94 (6), 2005, str. 1169-1186

Tzamelis I., Pissios P., Schuetz E.G., Moore D.D., The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR, *Mol. Cell. Biol.* 20(9), 2000, str. 2951-2958

Urquhart B.L., Tirona R.G., Kim R.B., Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs, *J. Clin. Pharmacol.* 47(5), 2007, str. 566-578

Wada T., Gao J., Xie W., PXR a CAR in energy metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 20(6), 2009, str. 273-279

Wang H., Faucette S., Sueyoshi T., Moore R., Ferguson S., Negishi M., LeCluyse E.L., A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression, *J. Biol. Chem.* 278 (16), 2003, str. 14146-14152

Wildová M., Rumlová M., Metody studia vzájemných interakcí proteinů, *Chem. listy* 102, 2008, str. 28-34

Wieneke N., Hirsch-Ernst K.I., Kuna M., Kersten S., Püschel G.P., PPARalpha-dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1i3 (CAR) in rat hepatocytes: potential role in starvation adaptation, *FEBS Lett.* 581(29), 2007, str. 5617-5626

Yao R., Yasuoka A., Kamei A., Kitagawa Y., Tateishi N., Tsuruoka N., Kiso Y., Sueyoshi T., Negishi M., Misaka T., Abe K., Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR), *J. Agric. Food Chem.*, 58(4), 2010, str. 2168-2173

## 10. Seznam obrázků

1.	Schéma lidského genu pro CAR, CAR mRNA a CAR protein-izoformy 3.....	12
2.	Konstitutivní androstanový receptor CAR.....	14
3.	3-D struktura heterodimeru hRXR $\alpha$ -LBD/mCAR-LBD vázané s TCPOBOP a koaktivátorem TIF2.....	15
4.	Způsoby vazby ligandů ke CAR-LBD.....	16
5.	Chemické struktury ligandů hCAR a mCAR receptorů.....	19
6.	Chemické struktury fenobarbitalu a bilirubinu - aktivátorů CAR receptoru.....	20
7.	Chemické struktury flavonů.....	20
8.	Aktivace hCAR závislá na dávce flavonoidů.....	21
9.	Mechanismus aktivace CAR receptoru.....	23
10.	Lokalizace a sekvence <i>CYP2B6</i> -XREM.....	25
11.	Regulace enzymů fází I a II a transportérů fáze III prostřednictvím nukleárních receptorů CAR a PXR.....	27
12.	Schéma role CAR receptoru v jaterní energetické homeostáze.....	36
13.	Účinky TCPOBOP a cholesterolové diety na jaterní metabolismus glukózy a triglyceridů.....	38
14.	Chemické struktury testovaných látek.....	43
15.	Přeměna žlutého MTT na fialový formazan mitochondriálními reduktázami.....	44
16.	96-jamková destička s testovanými látkami v MTT experimentu.....	45
17.	Bioluminiscenční reakce katalyzované firefly a <i>Renilla</i> luciferázami.....	46
18.	48-jamkové destičky s testovanými látkami v gene reporter, one-hybrid a two-hybrid experimentech.....	50
19.	Schéma two-hybrid systému.....	51
20.	Mapa DNA konstruktů pGAL4-hCAR-LBD.....	53
21.	MTT test na MZ-Hep1 buněčné linii.....	56
22.	MTT test na HepG2 buněčné linii.....	57
23.	Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou gene reporter assay s plazmidem p(ER6)3-tata-luc na MZ-Hep1 buněčné linii.....	58
24.	Vliv testovaných látek na viabilitu MZ-Hep1 buněk určenou na základě aktivity <i>Renilla</i> luciferázy vůči kontrole v rámci gene reporter assay.....	59

25. Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou gene reporter assay s plazmidem p(ER6)3-tata-luc na HepG2 buněčné linii.....	60
26. Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou gene reporter assay s plazmidem pPBREM(CYP2B6)-luc na HepG2 buněčné linii.....	61
27. Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou two-hybrid assay s plazmidy pGAL4-hCAR-LBD a VP16-SRC-1 na HepG2 buněčné linii..	63
28. Test interakce testovaných látek s hCAR receptorem metodou one-hybrid assay s plazmidem pGAL4-hCAR-LBD na HepG2 buněčné linii.....	64