UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

Interakce léčiv s nukleárními receptory při regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů

Disertační práce

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

Hradec Králové, 2013 Mgr. Alice Nová

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

V Hradci Králové, srpen 2013 ……..……

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli **Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D.** za vedení mého PGS studia a za jeho podporu a trpělivost.

Poděkování patří i spolupracovníkům **PharmDr. Marcelovi Špulákovi, Ph.D**. a kolegům z Katedry anorganické a organické chemie a **Prof. RNDr. Zdeňku Dvořákovi, Ph.D.** z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Děkuji **PharmDr. Lucii Krausové, Ph.D**. za spolupráci a všem pracovníkům a postgraduálním studentům z Katedry farmakologie a toxikologie, kteří mi byli v průběhu mého postgraduálního studia nápomocni a vytvářeli zde přátelské pracovní prostředí.

Moje poděkování směřuje také Grantové agentuře České republiky (GAČR 304/10/0149, 303/07/0128) a Specifickému vysokoškolskému výzkumu (SVV-261-003), které zajišťovaly moji práci po stránce finanční.

Za rodinné zázemí, podporu a pohodu děkuji svým rodičům a Zbyňkovi.

Obsah

1 Abstrakt ... 6

2 Abstract ... 8

3 Úvod ... 14

4 Obecná část – přehled současného stavu řešené problematiky ... 15

4.1 Biotransformace xenobiotik ... 15

4.2 Nukleární receptory ... 16

4.2.1 Pregnanový X receptor (PXR) ... 20

4.2.2 Glukokortikoidní receptor ... 23

4.2.3 Konstitutivní androstanový receptor ... 26

4.3 Biotransformační enzymy ... 28

4.4 Transportéry ... 30

4.4.1 Transportér organických kationtů 1 ... 33

5 Experimentální část – použité metody a chemikálie ... 36

5.1 Chemikálie ... 36

5.2 Buněčné linie ... 40

5.3 DNA konstrukty ... 41

5.4 Molekulárně biologické metody ... 43

5.4.1 Metoda gene reporter assay ... 43

5.4.2 Metoda two-hybrid assay ... 45

5.4.3 Metoda RT-PCR ... 46

5.4.4 MTS test viability/cytotoxicity ... 50

5.4.5 Statistická analýza ... 51

6 Cíle práce ... 52

7 Výsledky a diskuze ... 53

7.1 Vliv stereoselektivních interakcí enantiomerů warfarinu s PXR na genovou regulaci hlavních léčiva metabolizujících enzymů ... 53

7.2 Regulace OCT1 glukokortikoidním receptorem prostřednictvím HNF4α ... 61

7.3 Hledání ligandů konstitutivního androstanového receptoru ze skupiny chinazolinových derivátů ... 66

8 Závěr 76

9 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací 78

10 Seznam použité literatury 80

11 Přílohy – odborné publikace s tématikou dizertační práce 95

1 Abstrakt

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra:	Farmakologie a toxikologie
Kandidát:	Mgr. Alice Nová
Školitel:	Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.
Název dizertační práce:	Interakce léčiv s nukleárními receptory při regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů

Biotransformační enzymy metabolizující xenobiotika hrají klíčovou roli v metabolismu, eliminaci a detoxifikaci xenobiotik, která se dostanou do kontaktu s organismem a chrání tak organismus před potenciálními škodlivými účinky xenobiotik, i některých endobiotik. Ve většině tkání se nacházejí biotransformační enzymy fáze I, II i lékové transportéry, které jsou exprimovány na bazální úrovni nebo jsou inducibilní a jejich exprese se zvyšuje po vystavení organismu xenobiotikům. Ovlivnění exprese a aktivity biotransformačních enzymů a lékových transportérů může vyústit v nepředvídatelnou tkáňovou a systémovou distribuci podaných léčiv, nežádoucí účinky nebo selhání terapie.

Indukce biotransformačních enzymů a lékových transportérů je zprostředkována především orphan nukleárními receptory - pregnanovým X receptorem (PXR) a konstitutivním androstanovým receptorem (CAR), a transkripčním faktorem aryl hydrokarbonovým receptorem AhR.

Tato dizertační práce předkládá výsledky tří studií, zabývajících se studiem genové regulace léčiv metabolizujících enzymů a lékových transportérů prostřednictvím nukleárních receptorů.

V první části dizertační práce se zabýváme studiem stereoselektivních interakcí enantiomerů warfarinu s PXR a ovlivněním regulace genové exprese nejdůležitějších biotransformačních enzymů cytochromu P450. Warfarin, široce používané antikoagulans, je v praxi dostupný jako racemická směs R a S enantiomerů, přičemž S-warfarin vykazuje asi 5x vyšší antikoagulační aktivitu, než R- warfarin. V této studii

jsme ukázali, že R-warfarin interaguje s PXR a jeho prostřednictvím indukuje expresi *CYP3A4* a *CYP2C9* mRNA v primárních lidských hepatocytech a ve střevní adenokarcinomové buněčné linii LS174T, zatímco S-warfarin vykazoval nižší schopnost transaktivovat cílové geny prostřednictvím PXR. Navíc jsme zjistili, že 4´- a 10-hydroxywarfariny jsou také ligandy PXR a indukují *CYP3A4* a *CYP2C9* mRNA v lidských hepatocytech a tím pádem by 4´- a 10-hydroxymetabolity R-warfarinu mohly být aktivními ligandy PXR. Tyto výsledky nabízejí otázku, zda by použití S-warfarinu společně s genotypizací VKORC1 a CYP2C9 bylo bezpečnější variantou antikoagulační terapie v souvislosti s nežádoucími farmakokinetickými lékovými interakcemi, než současné používání racemátu warfarinu.

Ve druhé části této dizertační práce, zabývající se studiem regulace organického kationtového transportéru OCT1 jsme zjistili, že OCT1 je transaktivován prostřednictvím indukce HNF4α glukokortikoidním receptorem (GR) v primárních lidských hepatocytech, ale ne v modelových hepatomových liniích HepG2 a MZ-Hep1. Tyto rozdíly mohou být způsobeny ovlivněním transkripčních faktorů podílejících se na regulaci OCT1 vlivem odlišných signálních kaskád v normálních hepatocytech a hepatokarcinomových buněčných liniích. V 1,7 kb promotorové sekvenci jsme nenašli žádný funkční GR responzivní element a OCT1 tedy s největší pravděpodobností není přímo transaktivován GR, ale nelze vyloučit přítomnost GR responzivního elementu v jiných pozicích promotoru OCT1

Poslední část dizertační práce se zabývá hledáním nových ligandů CAR ze skupiny chinazolinových derivátů. Z 20 nově nasyntetizovaných derivátů chinazolinu jsme u tří látek, CHP4, CHP5 a CHP6 popsali jejich interakci s vazebnou doménou CARu. Ukázali jsme, že tyto tři látky transaktivují pBREM/2B6 promotor prostřednictvím sestřihových variant CARu CAR1 i CAR3 v buněčné linii COS-1. Interakce s CAR3 variantou jsou schopny pouze přímé aktivátory. CHP4, CHP5 i CHP6 signifikantně potencovaly interakci mezi C- a N-terminálními regiony CAR ligand vazebné domény, čehož jsou schopné pouze přímé aktivátory CARu. Testované látky také transaktivovaly *CYP2B6* mRNA v lidských hepatocytech a buněčné linii HepG2. Nalezení modelového ligandu CAR by mohlo pomoci detailněji prostudovat funkce tohoto receptoru, jehož role v organismu není v současné době zcela objasněná.

2 Abstract

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmacology and Toxicology

Candidate: Alice Nová, MSc

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Drug interactions with nuclear receptors in the regulation of drug metabolizing enzymes and drug transporters

Drug metabolizing enzymes play a key role in metabolism, elimination and detoxification of xenobiotics exposed to the body and protect the organism from potentially harmful effect of xenobiotics as well as certain endobiotics. Phase I and II drug metabolizing enzymes and drug transporters are expressed in most tissues in basal level or may be induced after exposure to xenobiotics. Affecting of expression or activity of drug metabolizing enzymes and drug transporters may result in unpredictable tissue and systemic drug distribution, to side effects or therapy failure. Up-regulation of drug metabolizing enzymes and drug transporters mediates mainly orphan nuclear receptors - pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) and transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR).

This doctoral thesis presents the results of three studies dealing with the gene regulation of drug metabolizing enzymes and drug transporters via nuclear receptors.

In the first part of this thesis we examined whether warfarin enantiomers stereoselectively interact with PXR to up-regulate main drug metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily. Warfarin, a widely used anticoagulant, is administered as racemic mixture of R- and S-warfarin. S-warfarin has five times greater anticoagulant potency than R-warfarin. We found that R-warfarin interacts with PXR and transactivates *CYP3A4* and *CYP2B6* mRNA in primary human hepatocytes and LS174T intestinal tumor derived cell line. S-warfarin showed lower potency to transactivate target genes via PXR. Furthermore, we found that 4´- and 10-hydroxywarfarines are potent ligands of PXR and inducers of CYP3A4 and CYP2C9

mRNA in primary human hepatocytes and therefore 4´- and 10-hydroxymetabolites of R-warfarin may be also ligands of PXR. These results raise the consideration whether the use of S-warfarin together with *VKORC1* and *CYP2C9* genotyping would be safer alternative of anticoagulant therapy in relation to drug-drug interactions than the current use of racemic warfarin.

Next part of this thesis is focused on glucocorticoid receptor regulation of organic cation transporter 1 (OCT1) expression via HNF4α up-regulation in primary human hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines HepG2 and MZ-Hep1. We found that OCT1 is transactivated via HNF4α up-regulation via GR in primary human hepatocytes, but not in model cell lines. This discrepancy may be caused by affecting of transcription factors involved in regulation of OCT1 due to different signaling pathways in normal hepatocytes and tumor derived cell lines. We did not found any GR response element (GRE) within 1,7 kb OCT1 promoter sequence and therefore OCT1 is unlikely transactivated via GR.

The last part of this thesis is focused on finding of novel CAR ligands among newly synthetized quinazoline derivates. We have tested 20 compouds, three of them, namely CHP4, CHP5 and CHP6, were found to interact with ligand binding domain of CAR. We showed, that CHP4, CHP5 and CHP6 transactivate pBREM/2B6 promoter via both CAR1 and CAR3 splice variants in the COS-1 cell line. CAR3 exhibits affinity to direct activators. CHP4, CHP5 and CHP6 significantly enhanced the interaction between C- and N-region of CAR LBD showing these compouds are direct CAR activators. Finally, CHP4, CHP5 and CHP6 up-regulated CAR target gene *CYP2B6* mRNA in primary human hepatocytes and HepG2 cell line. New model CAR ligands might help us to elucidate physiologic functions and the role of this receptor in organism.

Seznam zkratek

ABC	ATP binding cassette transporters
AD	aktivační doména
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AhR	aryl hydrokarbonový receptor
ATP	adenosintrifosfát
Aldh	aldehyddehydrogenáza
AP-1	aktivátorový protein 1
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
ASC-2	apoptotic speck protein 2
BCRP	breast cancer resistance protein
BSEP/SPGP	bile salt export pump/sister of P-glycoprotein
C/EBPα	CCAAT/enhancer binding proteins α
C/EBPβ	CCAAT/enhancer binding proteins β
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CBP	cAMP response element binding protein
CREB	cAMP response element-binding protein
cDNA	kódující DNA
CITCO	6-(4-chlorofenyl)imidazol[2,1-b] [1,3]thiazol-5-karbaldehyd O-(3,4-dichlorobenzyl) oxim
Cmax	maximální plazmatická koncentrace
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA vazebná doména
Dex	dexametazon
DM2	diabetes mellitus 2. typu
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DR	direct repeat
DRIP/TRAP	vitamin D receptor interacting protein/thyroid hormone associated protein complex

ECACC	European Collection of Cell Cultures
ER	everted repeat
FBS	fetální hovězí sérum
FoxO1	fork-head insulin-responsive transcription factor 1
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FXR	farnesoid X receptor
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	glucocorticoid-response element
GRIP	glucocorticoid receptor-interacting protein
GST	glutathion-S-transferáza
Gsta	glutathion-S-trabsferáza A
Gstm	glutathion-S-transferáza Mu
hCAR	lidský konstitutivní androstanový receptor
HNF	hepatocyte nuclear factor
hPXR	lidský pregnanový X receptor
HSP90	heat shock protein 90
LBD	ligand vazebná doména
LEFT	liver-enriched transcription factors
MATE	multidrug and toxin extrusion transporter
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
MPP	1-methyl-4-fenylpyridium
mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1
NcoR	nuclear receptor co-represor
NF-κB	nuclear factor kappaB
NTCP	sodium taurocholate cotransporting peptide
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporter polypeptide
OCT	organic cation transporter
OCTN	novel organic cation transporter

p/CAF	p300/CBP-associated protein
P300/CBP	p300/CREB binding protein cointegrators
PBRE	phenobarbital-response element
PBREM	phenobarbital-responsive enhancer modul
PEPCK1	fosfoenolpyruvátkarboxykináza
PEPT	oligopeptide transporter
PES	fenazin ethosulfát
PGC-1α	peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α
P-gp	P-glykoprotein
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	pregnanový X receptor
PXRE	PXR-response element
PXR-RE	PXR-response element
R	relativní poměr exprese
RG	referenční gen (reference gene)
rOCT1	potkaní OCT1
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RXRα	retinoid X receptor-α
SHP	small heterodimer partner
SLC	solute carrier transporter
SMRT	silencing mediator of retionoid and thyroid receptors
SNP	single nucleotide polymorphism, bodová mutace
SRC-1	steroid receptor coactivator 1
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
SULT	sulfotransferáza
SWI/SNF	switching/sucrose nonfermenting complex
SXR	steroidní X receptor
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzen
TEA	tertaethylamonium
TG	cílový gen (target gene)
TIF2	transcription intermediary factor 2
UASG	upstream activation sequence of GAL
UDP	uridindifosfát
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza

VDR	vitamínový D receptor
VKORC1	vitamín K epoxid reduktázový komplex 1
ΔCt	rozdíl v počtu cyklů kontroly a vzorku

3 Úvod

Lékové interakce neboli schopnost léčiva ovlivnit farmakokinetické procesy současně podaných léčiv je závažným problémem farmakoterapie v mnoha farmakoterapeutických skupinách. O to naléhavější je nutnost porozumět molekulární podstatě interakcí léčiv s biotransformačními enzymy I. a II. fáze biotransformace i s transportéry na úrovni mechanizmů, které řídí genovou expresi biotransformačních enzymů a transportérů.

V této doktorské práci se zaměřím především na transkripční regulaci genové exprese prostřednictvím pregnanového X receptoru (PXR, *syn.* steroidní xenobiotický receptor, SXR), konstitutivního androstanového receptoru (CAR), a glukokortikoidního receptoru α (GR). Tyto nukleární receptory a transkripční faktory jsou nejdůležitějšími faktory řídící regulaci exprese genů, jako jsou cytochromy P450 CYP3A4, CYP2C9, CYP1A1, enzymy II. fáze biotransformace UGT (UDP-glukuronosyltransferáza UGT1A1) a transportérů P-glykoproteinu a MRP2 (*angl.* Multidrug resistence-associated protein 2) (Urquhart et al. 2007; Tirona a Kim 2005).

Ve své doktorské práci předkládám výsledky 3 výzkumných projektů.

V první části experimentální části doktorské práce předkládám výsledky týkající se interakce enantiomerů warfarinu s pregnanovým X receptorem při regulaci nejdůležitějších biotransformačních enzymů a P-glykoproteinového transportéru. Výsledky byly publikovány v *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.

Ve druhé části předkládám výsledky týkající se studia regulace organického kationtového transportéru 1 (OCT1/SLC22A1) prostřednictvím glukokortikoidního receptoru. Výsledky byly akceptovány v časopise *Pharmacological Reports*.

Ve třetí části prezentuji výsledky týkající se hledání ligandů konstitutivního androstanového receptoru ze skupiny chinazolinových derivátů. Výsledky jsou připravovány k publikaci.

Všechny tyto projekty mají společné studium genových regulací prostřednictvím různých nukleárních receptorů. Přestože předkládané experimentální výsledky jsou součástí základního výzkumu *in vitro,* experimenty by mohly obohatit také klinickou aplikaci studovaných léčiv při regulaci cílových genů a jejich substrátů.

4 Obecná část – přehled současného stavu řešené problematiky

4.1 Biotransformace xenobiotik

Všechny živé organismy jsou neustále v kontaktu s potenciálně toxickými látkami, které jsou jak endogenního, tak exogenního původu. Z endogenních látek lze jmenovat žlučové soli, cholesterol, steroidní hormony, bilirubin, mastné kyseliny, z exogenních (xenobiotik), toxiny, karcinogeny, polutanty, léčiva, potravinová aditiva, komponenty kosmetických přípravků i rostlinných léčivých přípravků. Aby si organismus pod tlakem toxického působení xenobiotik a endobiotik zachoval homeostázu, vyvinul se komplexní a precizní obranný mechanismus, detoxifikační systém.

Detoxifikační proces, zahrnující indukovatelné metabolické enzymy a také efluxní transportéry, je lokalizován především v játrech, ale také v gastrointestinálním traktu, plicích, ledvinách, mozku i placentě. Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik je primární obranná reakce organismu zabraňující akumulaci potenciálně toxických lipofilních sloučenin. Cílem organismu je pomocí chemických reakcí – označovaných jako biotransformace, změnit strukturu a tím fyzikálně-chemické vlastnosti xenobiotik, jejich biologickou aktivitu a v neposlední řadě urychlit exkreci škodlivých chemických látek (Skálová et al. 2011; di Masi et al. 2009). Obranná strategie organismu vůči xenobiotikům, mimo biotransformace a transportu xenobiotik, zahrnuje také rozpoznání xenobiotik a škodlivých endogenních molekul pomocí tzv. xenosenzorů, což je vlastně prvním krokem detoxifikačního mechanismu. Jako xenosenzory jsou označovány pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR), náležící do rodiny nukleárních receptorů (Moreau et al. 2008), a také aryl hydrokarbonový receptor (AhR) z rodiny transkripčních faktorů (Francis et al. 2003).

Biotransformační proces xenobiotik se dělí do dvou fází - fáze I a II. Fáze I metabolismu se označuje jako konverze, kdy jsou do struktury xenobiotika vneseny funkční skupiny. Reakce fáze I zahrnují především oxidoredukční reakce. Do fáze II se řadí konjugační reakce, kdy tzv. primární metabolit, vniklý pomocí reakcí fáze I, reaguje s endogenní sloučeninou. Hlavní konjugační reakce xenobiotik jsou konjugace s UDP-glukuronovou kyselinou, sulfonace, konjugace s glutathionem, konjugace s aminokyselinami, acetylace a metylace (Skálová a kol, 2011). Vzniklé konjugáty jsou většinou hydrofilnější a méně biologicky aktivní než parentní látka a obecně se

urychluje jejich exkrece žlučí nebo ledvinami. Mohou ovšem vzniknout i toxické metabolity (Schilter et al. 1993, Chen et al. 2000, Plant 2007, Zhou et al. 2009).

Pomocí dvou fází biotransformace z lipofilní sloučeniny tedy nejčastěji vzniká stabilnější, ve vodě rozpustný metabolit, který je vhodnějším substrátem pro transportéry zprostředkovanou eliminaci, která se někdy označuje jako fáze III. Transportéry fáze III jsou především efluxní ABC transportéry P-glykoprotein (P-gp, MDR1, *angl*. multidrug resistant protein-1), BCRP (*angl.* breast cancer resistence protein) a transportéry MRPs (Kim 2003, Mizuno et al. 2003, Zhou et al. 2009, di Masi et al. 2009)

Zásadním objevem na konci milénia byl objev regulačních mechanizmů genové exprese a především nukleárních receptorů, které řídí řadu genů účastnících se biotransformace a detoxifikace. Tento systém nelze tedy chápat jako statický, ale dynamický, schopný být regulovaný podle aktuální potřeby. Genová exprese, tj. přepis genetické informace uložené v sekvenci genomové DNA do mRNA a posléze translace mRNA do struktury funkčního proteinu, je regulována na několika úrovních. Dominantním mechanizmem genové regulace enzymů I. a II. fáze biotransformace a významných lékových transportérů je transkripční regulace prostřednictvím nukleárních receptorů (tzv. *trans* faktorů) aktivovaných jejich ligandy, které nasedají na specifické responzivních *cis* elementy (*angl.* response element) v promotorových regulačních sekvencích genů. Tento proces se také označuje jako indukce, a mezi indukované geny náleží geny účastnící se biotransformace nebo eliminace xenobiotik i endogenních látek. Tímto způsobem organizmus čelí toxickému poškození xenobiotiky (Xie et al. 2004, Xu et al. 2005, Urquhart et al. 2007, Köhle a Bock 2009).

4.2 Nukleární receptory

Nukleární receptory jsou transkripční faktory, které působí jako senzory extracelulárních i intracelulárních signálů, mají důležitou roli nejen v udržení metabolické homeostázy a ochrany proti stresu indukovanému xenobiotiky, jak již bylo zmíněno, ale i ve vývoji a diferenciaci i v mnoha dalších buněčných procesech (di Masi et al. 2009, Gao a Xie 2012).

U člověka bylo identifikováno 48 nukleárních receptorů, které jsou rozděleny do tří tříd podle ligand vazebné specifity (Sonoda et al. 2008, Li a Wang 2010). Endokrinní

receptory, jako například androgenní, estrogení a glukokortikoidní receptor, jsou citlivé vůči odpovídajícím steroidním hormonům. Významnou skupinu tvoří tzv. „orphan“ receptory (sirotčí receptory), reprezentující receptory s typickou strukturou a sekvenční podobností odpovídající nukleárním receptorům, ovšem bez identifikovaných selektivních endogenních ligandů. Ty orphan receptory, u kterých byl identifikován endogenní ligand, se překlasifikují jako „adopted orphan“ receptory. Zatímco pro endokrinní receptory platí, že jsou schopné vazby s unikátním endogenním ligandem, který má vysokou afinitu, a tudíž jsou aktivovány endogenními ligandy v nanomolárních koncentracích, orphan receptory naopak postrádají vysokoafinitní ligandy a je pro ně typické, že jsou aktivovány širokou škálou nízkoafinitních lipofilních ligandů v koncentracích mikromolárních (Tzameli et al. 2000, Nagy a Schwabe 2004, Li a Wang 2010). Do této druhé skupiny nukleárních receptorů se vedle CAR řadí i PXR receptor.

Unikátní funkce CAR a PXR jako xenosenzorů, je odlišuje od klasických receptorů steroidních hormonů nebo hormonů štítné žlázy. PXR a CAR také vyvolávají pleiotropní efekty na orgánové funkce. Rovněž je popsán cross-talk mezi xenosenzory a jinými nukleárními receptory nebo transkripčními faktory ovlivňujícími endogenní signální kaskády, zahrnující metabolismus lipidů a udržování glukózové homeostázy (Moore et al. 2003, Lim a Huang 2008). Takový cross-talk může vyústit v narušení fyziologických funkcí xenobiotiky a může vést, mimo jiné, k porušení endokrinní rovnováhy vyvolané léčivy (di Masi et al. 2009). Nejdůležitější ligandy aktivované nukleární receptory v genové regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1. Nejdůležitější ligandy aktivované nukleární receptory v genové regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů.

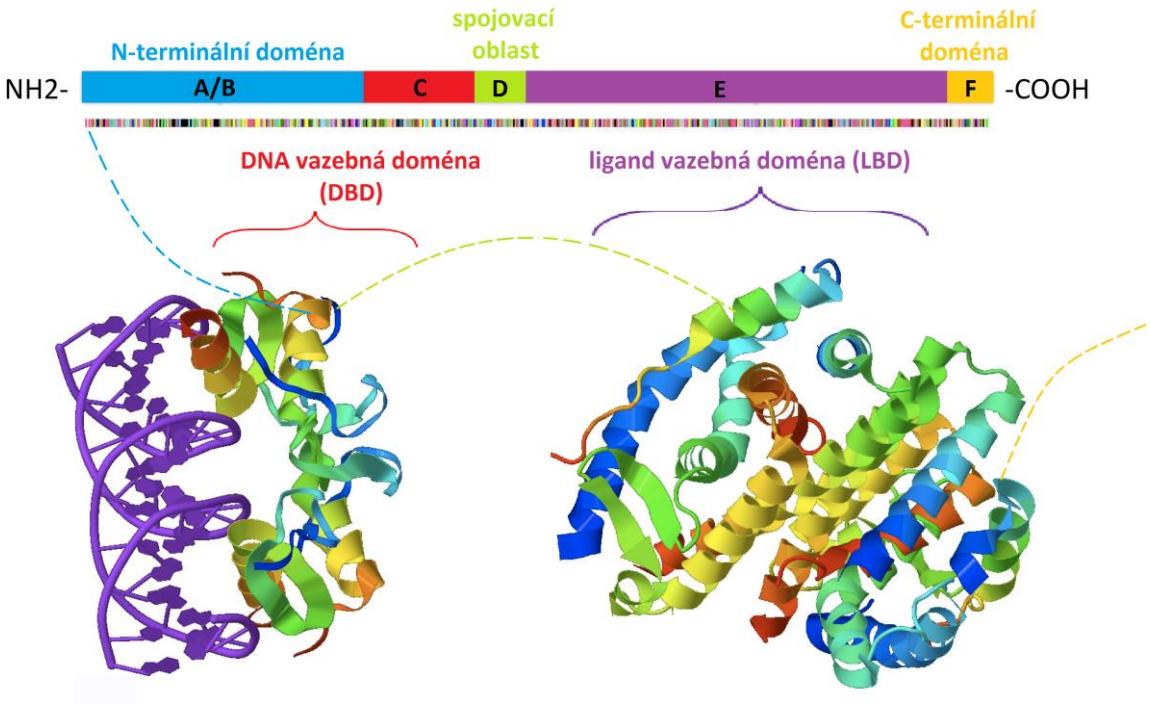
Nukleární receptor	Gen/Lokalizace	Nejdůležitější orgán exprese	Cílové geny	
Pregnanový X receptor (PXR)	NR1I2 3q13-q21	Játra, tenké střevo, lymfocyty	Aldh1a1 Aldh1a7 CYP1A2 Cyp2b10 CYP2B6 CYP2C9 CYP3A4/5 CYP3A7 Cyp3a11 Cyp3a13 Cyp3a23	CYP7A1 Gsta1,2,4 Gstm1,2 MDR1 Mrp3 Oatp2 SULT2A1 UGT1A1,3,4
Konstitutivní androstanový receptor (CAR)	NR1I3 1q23.1	Játra	Cyp2c29 CYP2C9,19 CYP3A4 CYP2A6 Cyp2b2 Cyp2b10 CYP2B6	Mrp3,Mrp4 MDR1 Sult2a1,9 UTG1A1
Glukokortikoidní receptor	NR3C1 12q23.3	Všechny typy buněk	CYP2C9 CYP2B6 CYP3A4 CYP3A5 MDR1 CAR PXR	

Nukleární receptor	Gen/Lokalizace	Nejdůležitější orgán exprese	Cílové geny
Vitamínový D receptor (VDR)	NR1I1 12q12-q14	Tenké střevo placenta	CYP2C9 CYP3A4 SULT2A1

Malými písmeny jsou označeny geny hlodavců. Převzato a upraveno z práce: Tirona a Kim 2005.

Jako u mnoha jiných genů, i u genů kódujících nukleární receptory, je popsáno několik sestřihových (transkripčních) variant, vzniklých inzercí nebo delecí aminokyselinových zbytků, posunem čtecího rámce nebo vnesení prematurovaných terminálních kodonů (di Masi et al. 2009). Asi 80% sestřihových variant vytváří izoformy proteinu, které se liší ve struktuře nebo funkčních vlastnostech (Modrek a Lee 2002, Lamba et al. 2004). Dále jednonukleotidové polymorfismy SNP (*angl.* single nucleotid polymorphism) umožňují vznik variant proteinů, které mohou mít pozměněnou buď konstitutivní (bazální, na ligandu nezávislou) aktivitu nebo inducibilní (na ligandu závislou) aktivitu. Navíc varianty CARu a PXR hrají roli v interindividuální variabilitě exprese genů izoforem cytochromu P450, a mohou tak způsobit vzácné atypické reakce na podaná léčiva (Hustert et al. 2001, Koyano et al. 2004, Lin et al. 2009, di Masi et al. 2009).

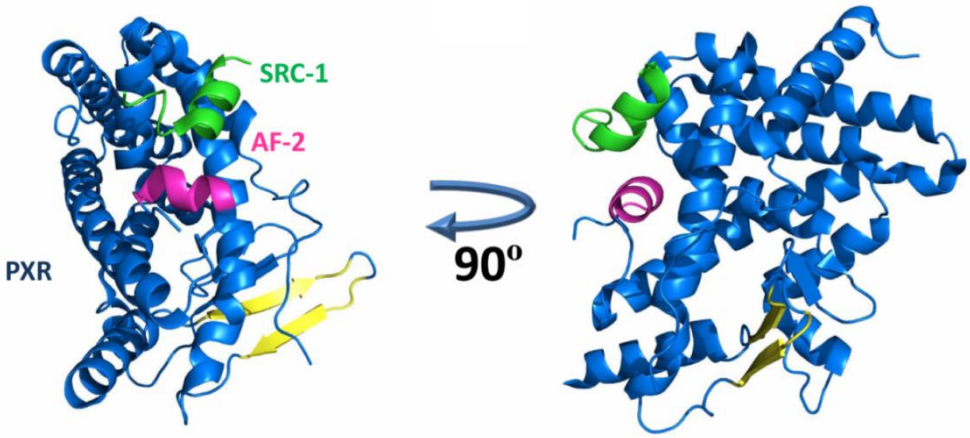
Proteiny nukleárních receptorů se skládají z následujících částí (viz Obr. 1): z N-terminální aktivační funkce 1 (AF-1, *angl*. activation function-1) (funkce AF-1, umožňující aktivaci nezávislou na ligandu, která u receptorů CAR a PXR schází), z DNA vazebné domény (DBD, *angl*. DNA binding domain), spojovací oblasti (H region), ligand vazebné domény (LBD, *angl*. ligand binding domain) a C-terminální aktivační funkce (AF-2). AF-1 rozpoznává a interaguje s dalšími transkripčními faktory a koaktivátory. DBD vykazuje specifitu k responzivní promotorové sekvenci cílových genů, které jsou regulovány. LBD je zodpovědná za vazbu ligandů nukleárních receptorů, jako jsou hormony, žlučové kyseliny, lipidy, léčiva a jiná xenobiotika (Tirona a Kim 2005, Urquhart et al. 2007, di Masi et al. 2009). LBD tvoří vazebnou kapsu, ve které ligandy nekovalentně interagují s aminokyselinovými skupinami LBD na základě jejich chemické struktury.



Obr. 1 Struktura nukleárních receptorů. Převzato a upraveno z: Huevel 2013

4.2.1 Pregnanový X receptor (PXR)

Pregnanový X receptor je kódován genem složeným z 38 kb genomové DNA nacházejícím se na 3 chromozómu (3q12-q13.3). Gen NR1I2 obsahuje 10 exonů oddělených 9 introny a kóduje protein s 434 aminokyselinami (Hustert et al. 2001; Kliewer et al. 2002). Zatím bylo identifikováno 28 sestřihových a polymorfických variant lidského PXR (Hustert et al. 2001). Trojrozměrná struktura PXR je na obrázku 2.



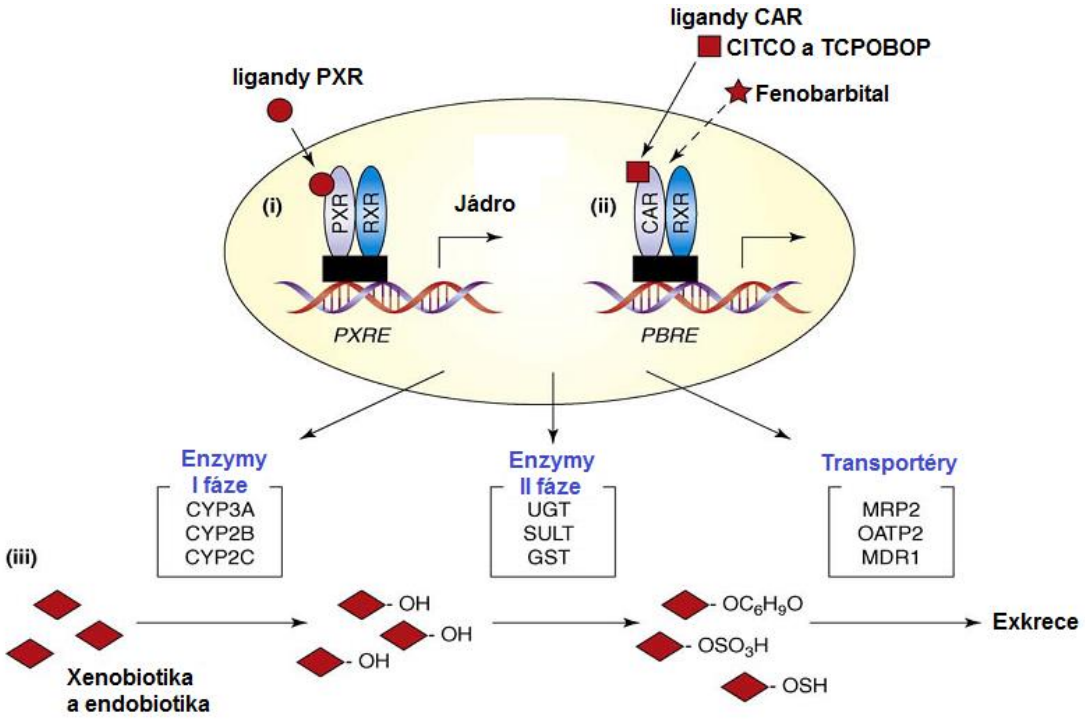
Obr. 2 3D struktura ligand vazebné domény PXR. PXR LBD je zobrazena modře, A F2 region růžově a koaktivátor SRC-1 zeleně. Žlutě jsou zbarveny β1 a β1 řetězce unikátní pro PXR Převzato z: Wang et al. 2012

Aktivace PXR

Přestože je PXR lokalizován především v jádře, byla popsána také cytoplazmatická lokalizace a translokace PXR z cytoplazmy do jádra během aktivace. Po aktivaci PXR ligandem dojde k uvolnění korepresorů SMRT (*angl.* silencing mediator of retionoid and thyroid receptors) a NcoR (*angl.* nuclear receptor co-represor) a umožní se navázání koaktivátorů GRIP (*angl.* glucocorticoid receptor-interacting protein) a SRC-1 (*angl.* steroid receptor co-regulator 1). Zatímco SMRT a NcoR stabilizují chromatin a následně zabraňují transkripci, koaktivátory např. SRC-1 a GRIP chromatin destabilizují, a tím usnadňují transkripčnímu mechanismu přístup k DNA (Harmsen et al. 2007). PXR tvoří dimer s retinoidním receptorem α (RXRα) a společně rozeznávají specifické sekvence promotorové DNA regulovaných genů označované PXR-RE (PXR responzivní element). PXR se váže především na DR4 a DR5 responzivní elementy základní sekvence AGGTCA (di Masi et al. 2009).

Role PXR v organismu

PXR je klíčovým transkripčním regulátorem podrodiny enzymů cytochromu P450 3A (Kliewer et al. 2002). Exprese PXR a CYP3A v tkáních se překrývá a PXR je aktivován CYP3A induktory (di Masi et al. 2009). PXR také reguluje další enzymy biotransformace xenobiotik, GST (glutathion-S-transferázy), UGT, SULT (sulfotransferázy), transportéry P-gp, MRP, OATP2 (*angl*. organic anion transporter polypeptide 2) (viz Obr. 3) (di Masi et al. 2009). PXR má navíc ochrannou funkci proti toxickému působení žlučových kyselin prostřednictvím regulace genů, které je metabolizují nebo transportují (Ma et al. 2008), podílí se na regulaci homeostázy steroidních hormonů, a ovlivňuje glukoneogenezi a metabolismus lipidů (di Masi et al. 2009).

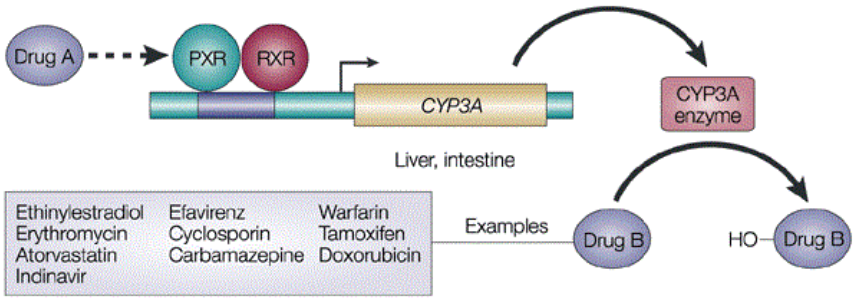


Obr. 3 Regulace biotransformačních enzymů fáze I a II a transportérů prostřednictvím nukleárních receptorů PXR a CAR. (i) agonisté PXR se váží přímo na receptor. (ii) Z agonistů CAR se přímo váží na receptor jen TCOBOP a CITCO, fenobarbital se neváže přímo na receptor. (iii) translokace CARu do jádra a transkripce genů kódujících metabolizující enzymy fáze I a II a lékové transportéry. 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, SLCO1B1), 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 et al. 2009

PXR a farmakokinetické interakce

Významným klinickým následkem aktivace PXR je výskyt farmakokinetických lékových interakcí (nejčastěji u pacientů postižených tuberkulózou, rakovinou, AIDS, kardiovaskulárními chorobami a diabetem). Indukce exprese izoenzymu cytochromu P450 CYP3A4 představuje základ skupiny lékových interakcí, ve kterých jedno léčivo urychluje metabolismus druhého (viz Obr. 4). Klinickým projevem těchto interakcí je

snížení účinnosti terapeutického efektu (di Masi et al. 2009). Vysvětlení mechanismů genové exprese CYP3A je důležité pro vývoj bezpečnější preskripce (Pávek et al. 2005, Kliewer et al. 2002)



Obr. 4 Molekulární podstata lékových interakcí zprostředkovaných PXR. PXR jako transkripční faktor reguluje expresi genu CYP3A v játrech a tenkém střevu. Po vazbě léčiva A (drug A) na PXR vzniká heterodimer PXR-RXR, dochází k indukci exprese enzymu a tím k urychlení metabolismu léčiva B (drug B), které je substrátem CYP3A. OH, hydroxylová skupina. Převzato z: Willson a Kliewer 2002.

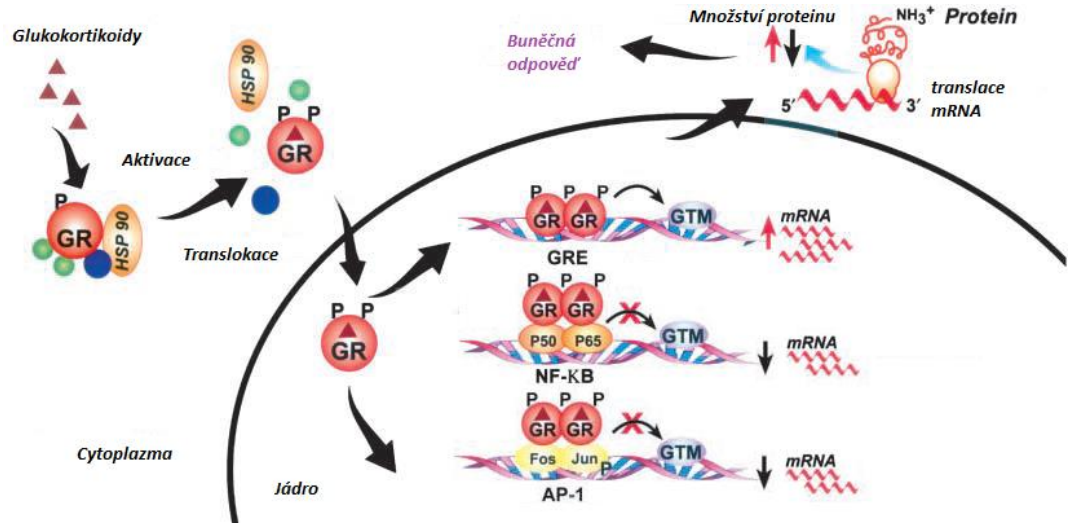
4.2.2 Glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidní receptor (GR) je kódován genem NR3C1 lokalizovaným na chromozómu 5 (5q31). Gen o délce přesahující 157 kb s 9 exony vytváří mRNA pro protein o 777 aminokyselinách (aktivní forma GRα). Sestřihová varianta GRβ (viz dále) je o 35 aminokyselin kratší a neaktivní (Charmandari et al. 2004). Mutace genu pro GR mohou narušit transdukci signálu glukokortikoidů pozměněnou odezvou tkání vůči GR, projevující se od asymptomatických až po závažné stavy (Charmandari a Kino 2007). Protein GR se skládá z variabilní N-terminální domény, dvou hormonálně nezávislých aktivačních domén (AF1 a 2), DBD, H regionu a C-terminální LBD (Gross a Cidlowski 2008, Revollo a Cidlowski 2009).

Aktivace GR

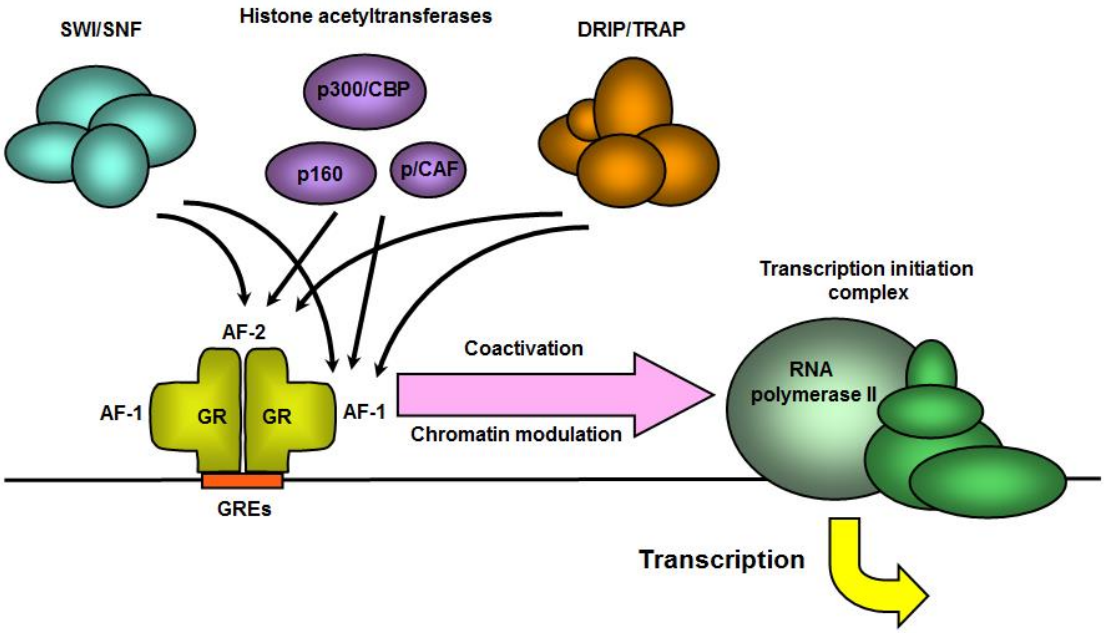
Inaktivní GR je v cytosolu vázán k proteinovému komplexu se dvěma podjednotkami heat shock proteinu HSP90, které jako chaperony zabraňují

neobsazenému GR translokaci do jádra. Po vazbě ligandu na GR v cytosolu se GR uvolňuje z chaperonového komplexu s HSP90 a imunofiliny, dochází k jeho fosforylaci, a glukokortikoidní receptor následně translokuje do jádra a jako homodimer se váže na vazebné responzivní místo promotorové DNA (GRE responzivní element). GR je také schopen modulovat genovou expresi nezávisle na GRE, a to pomocí přímých protein-proteinových interakcí s dalšími transkripčními faktory, jako jsou AP-1 (aktivátorový protein-1) a NF-κB (*ang*. nuclear factor kappaB) (Jonat et al. 1990, Scheinman et al. 1995, Charmandari et al. 2004) (viz Obr. 5).



Obr. 5. **Regulace transkripce prostřednictvím glukokortikoidního receptoru**. Glukokortikoidní receptor po navázání ligandu disociuje z chaperonového komplexu a translokuje do jádra. Dimer GR s navázaným ligandem nasedá na responzivní místo (GRE) promotorové DNA a aktivuje transkripci cílového genu, nebo fyzicky interaguje s p65 podjednotkou NF-κB a potlačuje NF-κB regulovanou genovou expresi nebo fyzicky interaguje s c-Jun podjednotkou AP-1 komplexu a inhibuje AP-1 modulovanou genovou expresi. AP-1 (aktivátorový protein 1), GRE (GR responzivní elemnet), NF-κB (nuclear factor kappa B). Převzato a upraveno z: Necela a Cidlowski 2004.

GR interaguje skrze AF-1 a AF-2 s koaktivátory, jako např. CBP (*angl.* cAMP response element binding protein), SRC-1, TIF-2 (*angl.* transcriptional intermediary protein-2), p300/CBP kointegračním proteinem, a GRIP-1, což způsobí acetylaci histonů, rozvinutí DNA, remodelaci chromatinu a nasednutí transkripčního komplexu na DNA (Jenkins et al. 2001, Rosenfeld a Glass, 2001, Hayashi et al. 2004). (viz Obr. 6)



Obr. 6 Schéma interakce koaktivátorů s AF-1 a AF-2 doménami glukokortikoidního receptoru a jejich role v regulaci transkripce. AF (aktivační funkce); GR (glukokortikoidní receptor); GRE (glukokortikoid-responzivní element), SWI/SNF (*angl.* switching/sucrose nonfermenting complex); DRIP/TRAP (*angl.* vitamin D receptor interacting protein/thyroid hormone associated protein complex); p300/CBP (*angl.* p300/CREB binding protein cointegrators), p/CAF (*angl.* p300/CBP-associated protein). Převzato z: Charmandari et al. 2004.

Role GR v organismu

GRα je lokalizován ubikvitně ve všech typech buněk a reprezentuje klasický GR, který účinkuje jako ligand-dependentní transkripční faktor. GRβ je taktéž ubikvitně exprimován ve všech tkáních, ale neváže glukokortikoidy a není transkripčně aktivní. GRβ je dominantní inhibitor GRα-zprostředkované transaktivace cílových genů (Oakley et al. 1999, Charmandari et al. 2004). Glukokortikoidy řídí mnoho základních procesů na buněčné, tkáňové i orgánové úrovni. Mezi jejich biologické funkce náleží především hormonální regulace glukózové homeostázy, metabolizmu tuků a proteinů, apoptózy, růstu, chování aj. Kromě toho se glukokortikoidy podílí na imunitní odpovědi buněk prostřednictvím regulace exprese mnoha genů imunitního systému, jako jsou cytokiny,

chemokiny, adhezní molekuly, transkripční faktory a další geny zapojené do řízení imunitní odpovědi (Necela a Cidlowski 2004, Gross a Cidlowski 2008).

Abnormality v citlivosti na glukokortikoidy lze rozdělit do dvou hlavních skupin – rezistence a hypersenzitivita. Rezistence vůči glukokortikoidům může být přechodná, trvalá, kompenzovaná nebo nekompenzovaná (Charmandari et al. 2004). Kompletní rezistence vůči glukokortikoidům je neslučitelná se životem, jak demonstruje studie s GR deficientními zvířaty, která se sice rodí živá, ale záhy po narození na základě respiratorního selhání umírají (Cole et al. 1995). Klinicky se glukokortikoidy používají jako protizánětlivé léky a imunosupresiva, a jejich nežádoucí účinky plynoucí z dlouhodobého užívání mohou vyústit v závažné stavy jako je Cushingův syndrom, stav připomínající chorobu vyvolanou endogenním nadbytkem glukokortikoidů.

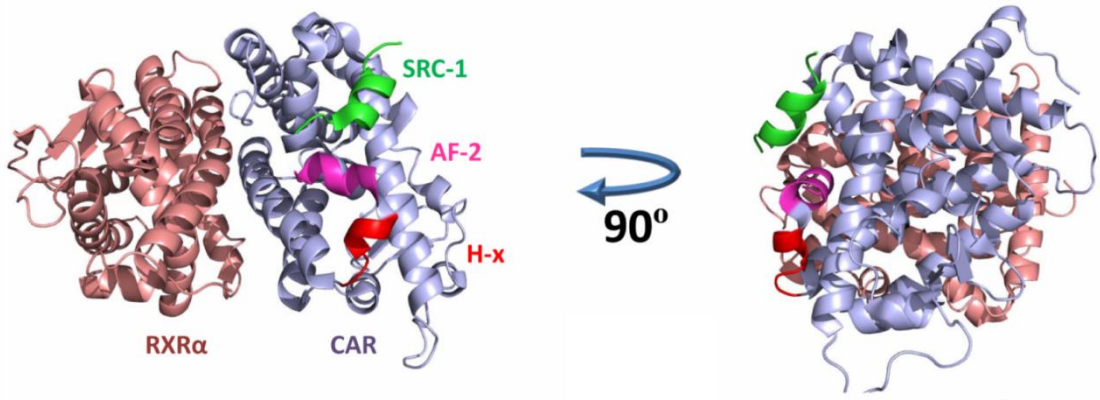
Glukokortikoidy ovlivňují mnoho jiných transkripčních faktorů, signálních kaskád (viz přehledový článek Adcocka et al. 2004). GR se také podílí na transkripční regulaci cytochromů CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, (El-Sankary et al. 2002; Tirona a Kim 2005) a transportéru P-gp (Pávek et al. 2007). Neméně důležitý je cross-talk fenomén nukleárních receptorů PXR a CAR s GR, při němž glukokortikoidy indukují expresi těchto nukleárních receptorů (Urquhart et al. 2007; Pascussi et al. 2007).

4.2.3 Konstitutivní androstanový receptor

Gen kódující CAR s označením NR1I3 je lokalizován na chromozómu 1 (1q23). CAR se skládá se z 9 exonů oddělených 8 introny a kóduje protein o 352 aminokyselinách (Auerbach et al. 2003, Savkur et al. 2003). Doposud 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 bp z intronů 6 nebo 7) (Auerbach et al. 2003, Lamba et al. 2004). Některé CAR mRNA varianty vznikají jedním alternativním sestřihem, avšak většina izoforem CAR mRNA pochází z více alternativních sestřihů v různých kombinacích (di Masi et al. 2009). Sestřihové varianty CAR2 a CAR3 tvoří až jednu třetinu CAR transkriptů přítomných v lidských hepatocytech, a předpokládá se, že tvoří funkční proteiny bez výraznější konstitutivní aktivity (DeKeyser et al. 2009, Omiecinski et al. 2011).

Aktivace CAR

Nukleární receptor CAR vykazuje, na rozdíl od jiných nukleárních receptorů, v nepřítomnosti ligandu určitou konstitutivní aktivitu (Xu et al. 2004). Translokace CAR do jádra nevyžaduje přímou vazbu ligandu (viz odstavec Ligandy konstitutivního androstanového receptoru). Na regulaci procesu translokace se také podílí defosforylace (di Masi et al. 2009) Translokace samotná nevede nutně ke zvýšení transkripce cílových genů (Swales a Negishi 2004). Po translokaci tvoří CAR heterodimer s RXRα viz (Obr. 7) a interaguje s koaktivátory ASC-2 (*angl*. apoptotic speck protein 2), SRC-1, NCOA1 (*angl.* nuclear receptor coactivator 1), FoxO-1 (*angl.* forkhead box protein 1), GRIP1 a PGC-1 (*angl.* PPARγ co-activator 1) (Kodama et al. 2004, di Masi et al. 2009). CAR se váže především na DR4, DR3, ER6 a ER8 responzivní elementy v promotorových oblastech cílových genů (Sueyoshi a Negishi 2001, Kast et al. 2002).



Obr. 7 3D struktura ligand vazebné domény hCAR. Zobrazení dimerizace RXRα aCAR LBD. CAR LBD je zobrazena modře, AF2 region růžově a koaktivátor SRC-1 zeleně. Převzato z: Wang et al. 2012.

Role CAR v organismu

CAR ovlivňuje metabolismus bilirubinu indukcí biliárních transportérů UGT1A1, OATP2, MRP2 a GSTA1 (di Masi et al. 2009; Wada et al. 2009). Nepřímo prostřednictvím regulace homeostázy žlučových kyselin přispívá k udržení fyziologických hladin cholesterolu (di Masi akol., 2009; Wada et al. 2009). Během dlouhodobého hladovění dochází k indukci CARu, a proto se předpokládá, že CAR

reaguje na nutriční stres (Wada et al. 2009). CAR potlačuje glukoneogenezi, fyzicky se váže k FoxO1 a tím potlačuje jeho transkripční aktivitu tak, že mu zabraňuje ve vazbě k inzulin responzivním elementům v promotorech cílových genů enzymů glukoneogeneze (glukózo-6-fosfatáza a fosfofenolpyruvát karboxykináza, PEPCK1) (Kodama et al. 2004). CAR může také inhibovat HNF4α (*angl.* hepatocyte nuclear factor 4α) zprostředkovanou glukoneogenezi kompeticí o DR1 vazebný motiv v promotorech cílových genů (Miao et al. 2006)

Aktivace CAR (a PXR) může potlačovat lipidový metabolizmus a snižovat sérové hladiny triglyceridů prostřednictvím redukování hladin SREBP-1 (*angl.* sterol regulatory element-binding protein), hlavního regulátoru lipidového metabolizmu (Wada et al. 2009). Antiobezitní efekt aktivace CARu byl popsán na myších modelech ve dvou studiích (Gao a Xie 2012; Masuyama a Hiramatsu 2012).

Ligandy a aktivátory CARu

Mezi první identifikované aktivátory CARu se řadí fenobarbital, který byl později identifikován jako nepřímý aktivátor CARu, neinteraguje přímo s LBD, ale vyvolává nukleární translokaci a následně CAR transkripční aktivitu (Moore et al. 2000, di Masi et al. 2009). Dva metabolity androstanu, 5α-androst-16-en-3α-ol (androstenol) a 5α-androstan-3α-ol (androstanol) byly identifikovány jako ligandy CAR s nízkou afinitou, které potlačují konstitutivní aktivitu CAR (tzv. inverzní agonisté) (Swales a Negishi 2004). Endogenní ligand s vysokou aktivitou není dosud znám a CAR je proto stále řazen mezi orphan receptory (di Masi et al. 2009).

Přestože mnoho látek bylo identifikováno jako aktivátory lidského CARu, např. endogenní (5β)-pregnan-3,20-dion (s velmi nízkou afinitou), a exogenními ligandy jako chlorpromazin, fenytoin, β-naftoflavon, meklizin, klotrimazol, *o,p´*-DDT, flavonoidy chrysin, baikalein, galangin (di Masi et al. 2009, Yao et al. 2010), pouze CITCO je jediný ligand, u kterého byla prokázána specifická vazba k CARu (di Masi et al. 2009).

4.3 Biotransformační enzymy

NADPH-cytochrom P450 (CYP) systém hem-dependentních mono-oxygenáz je nejdůležitější enzymatický systém mezi oxidačními reakcemi I. fáze biotransformace. V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé izoformy CYP, ale

až 90% léčiv je biotransformováno pouze několika enzymy z rodin 1 až 3 (Guengerich 2006, Crettol et al. 2010), nejdůležitější izoformy jsou CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 a CYP1A2 (di Masi et al. 2009). Mezi inducibilní enzymy patří CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C9 a CYP2C19. Zástupci CYP superrodiny jsou exprimováni především v játrech, střevě, méně v ledvinách, plicích, placentě nebo jiných orgánech.

Na rozdíl od enzymů cytochromu P450 lokalizovaných především v hladkém endoplazmatickém retikulu, enzymy fáze II se nachází hlavně v cytoplazmě. Mezi konjugační enzymy fáze II patří SULT, UGT, GST a N-acetyltransferázy (Xu et al. 2005, di Masi et al. 2009).

Inducibilní biotransformační enzymy fáze I

Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4)

CYP3A4 je z hlediska exprese cytochromů P450 nejvíce rozšířen a biotransformuje více než 50% předepisovaných léčiv. CYP3A4 je vysoce exprimován v klíčových místech biotransformace xenobiotik, v játrech a tenkém střevě. Variabilita exprese nebo funkce CYP3A4 může mít dramatický dopad na terapeutický efekt mnoha léčiv (Urquhart et al. 2007). Interindividuální rozdíly v enzymatické aktivitě CYP3A4 mohou být až 20 násobné (Flockhart a Rae 2003).

Exprese CYP3A4 je regulována nukleárními receptory CAR, GR, HNF4α, farnesoidním X receptorem (FXR) a vitaminovým D receptorem (VDR), přičemž nejvýznamnější je indukce CYP3A4 prostřednictvím PXR (Urquhart et al. 2007).

Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9)

Druhým nejvíce rozšířeným cytochromem P450 v játrech je forma CYP2C9 (Miners a Birkett, 1998, Urquhart et al. 2007). Metabolizuje asi 16% předepisovaných léčiv (Chen et al. 2004). Podobně jako u CYP3A4 je i u CYP2C9 jeho exprese regulována prostřednictvím PXR, CAR, GR a HNF4α (Chen et al. 2004, Chen et al. 2005, Gerbal-Chaloin et al. 2002).

Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19)

CYP2C19 metabolizuje několik široce používaných léčiv, např. inhibitor protonové pumpy omeprazol a anxiolytikum diazepam. CYP2C19 vykazuje interindividuální variabilitu a k míře této variability pravděpodobně přispívá i regulace exprese CYP2C19 prostřednictvím GR, CAR a PXR (Urquhart et al. 2007).

Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6)

CYP2B6 tvoří asi 5% všech cytochromů P450, ale jeho exprese dosahuje až 100 násobné interidividuální variability (Zanger et al. 2007). CYP2B6 je inhibován klopidogrelem a tiklopidinem, a indukován prostřednictvím CAR a PXR (Zanger et al. 2007, Crettol et al. 2010).

4.4 Transportéry

Membránové transportéry hrají důležitou roli v absorpci, distribuci a exkreci řady léčiv. V současnosti bylo identifikováno několik desítek membránových přenašečových proteinů (transportérů), které transportují xenobiotika a farmaka přes lipidovou dvojvrstvu cytoplazmatické membrány (Tsuji 2006). Nejdůležitější lékové transportéry náležející do rodin ABC transportérů (*angl*. ATP Binding Cassette transporters) a SLC (*angl*. Solute Carrier transporters) jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Nomenklatura nejvýznamnějších lékových transportérů.

Označení transportéru	anglický název	Symbol[a]
ABC transportéry		
MDR1/P-gp	Multidrug resistant gene/P-glycoprotein	*ABCB1*
BSEP/SPGP	Bile salt export pump/sister of P-glycoprotein	*ABCB11*
MRP1	Multidrug resistance associated protein 1	*ABCC1*
MRP2/cMOAT	Multidrug resistance associated protein 2	*ABCC2*
MRP3	Multidrug resistance associated protein 3	*ABCC3*
MRP4	Multidrug resistance associated protein 4	*ABCC4*

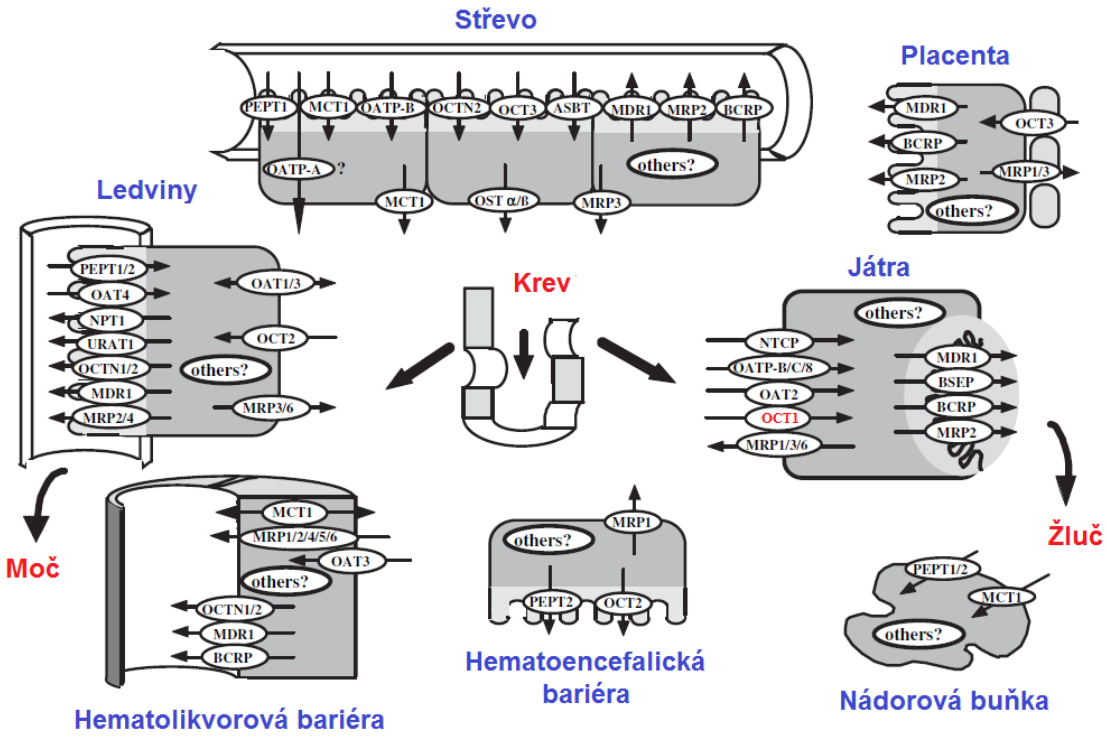
Označení transportéru	anglický název	Symbol[a]
BCRP	Breast cancer resistance protein	*ABCG2*
SLC transportéry		
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting peptide	*SLC10A1*
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter	*SLC10A2*
PEPT1	Oligopeptide transporter 1	*SLC15A1*
PEPT2	Oligopeptide transporter 2	*SLC15A2*
OATP1A2	Organic anion transporting polypeptide-A	*SLC21A3*
OATP1B1	Organic anion transporting polypeptide-C	*SLC21A6*
OATP1B3	Organic anion transporting polypeptide 8	*SLC21A8*
OATP2B1	Organic anion transporting polypeptide-B	*SLC21A9*
OATP3A1	Organic anion transporting polypeptide-D	*SLC21A11*
OATP4A1	Organic anion transporting polypeptide-E	*SLC21A12*
OATP1C1	Organic anion transporting polypeptide-F	*SLC21A14*
OATP4C1	Organic anion transporting polypeptide-H	*SLC21A20*
OCT1	Organic cation transporter 1	*SLC22A1*
OCT2	Organic cation transporter 2	*SLC22A2*
OCT3	Organic cation transporter 3	*SLC22A3*
OCTN1	Novel organic cation transporter 1	*SLC22A4*
OCTN2	Novel organic cation transporter 2	*SLC22A5*
OAT1	Organic anion transporter 1	*SLC22A6*
OAT2	Organic anion transporter 2	*SLC22A7*
OAT3	Organic anion transporter 3	*SLC22A8*
OAT4	Organic anion transporter 4	*SLC22A9*
MATE1	Multidrug and toxin extrusion transporter 1	*SLC47A1*
MATE2-K	Multidrug and toxin extrusion transporter 2	*SLC47A2*

Názvy transportérů nemají v českém jazyce ekvivalenty, proto jsou uvedeny anglické názvy. Převzato z: Mizuno et al. 2003. Doplněno z: Yonezawa a Inui 2011.

Transportéry se dělí na primární, sekundární a terciární podle toho, jak získávají energii nutnou k transmembránovému transportu substrátů. Podle tohoto kritéria jsou ABC transportéry (MDR, MRP a BCRP) považovány za primární transportéry, získávající energii nutnou k transportu hydrolýzou ATP (Schinkel a Jonker 2003,

Mizuno et al. 2003). Sekundární a terciární transportéry, např. OAT, OATP, NTCP, OCT, OCTN a PEPT získávají energii z kotransportu nebo antiportu iontů nebo jiných látek (Mizuno et al. 2003). Podle směru transmembránového transportu jsou transportéry děleny na tzv. „uptake“ transportéry přenášející substráty do buňky (např. OCT nebo OATP transportéry) a na „efluxní“ transportéry vypuzující substráty z buňky (ABC transportéry) (Muller a Fromm 2011). Podle epiteliální lokalizace se transportéry dělí na apikálně a bazálně lokalizované. Lokalizace nejdůležitějších transportérů v hepatocytech, renálním a střevním epitelu, hematoencefalické, hematolikvorové a placentární bariéře je znázorněna na obrázku 8.

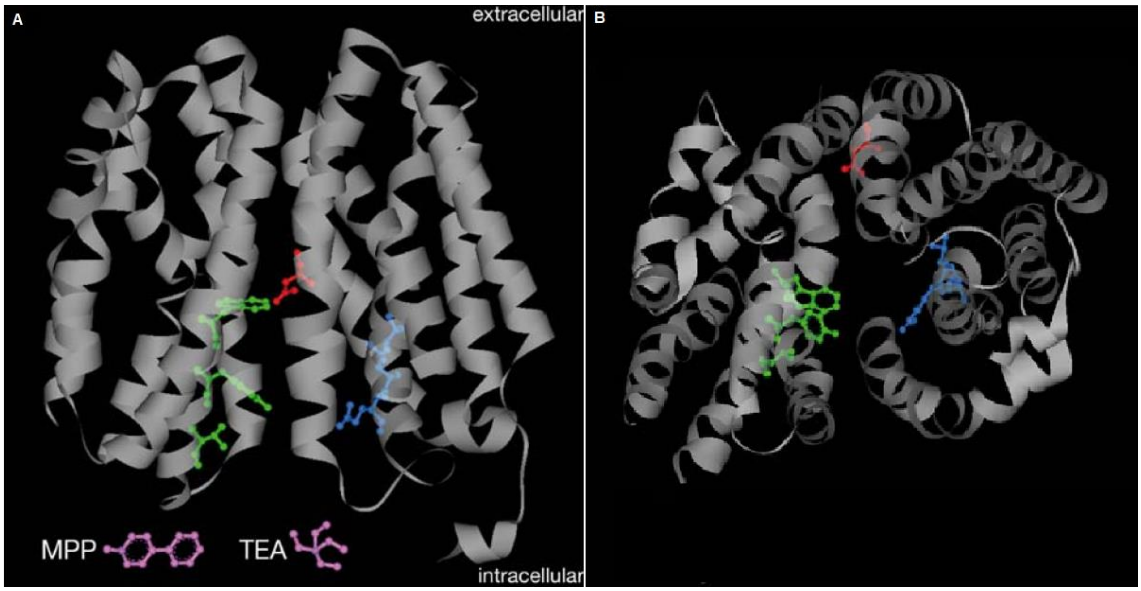
Indukce nebo inhibice transportérů přenášejících léčiva je důležitým mechanismem lékových interakcí (Muller a Fromm 2011).



Obr. 8 Lokalizace nejdůležitějších transportérů v hepatocytech, renálním a střevním epitelu, hematoencefalické, hematolikvorové a placentární bariéře. Modifikováno dle: Tsuji 2006.

4.4.1 Transportér organických kationtů 1

Transportér organických kationtů 1 (OCT1, *angl.* Organic cation transporter 1,) (struktura na obr. 9) je kódován genem SLC22A1 a je spolu s geny kódujícími OCT2 a OCT3 lokalizován v klastru na chromozomu 6 (6q26-7) (Koehler et al. 1997). Gen o délce přesahující 36 kb s 11 exony vytváří mRNA pro protein o 554 aminokyselinách. Polymorfismy (SNP) OCT1 mohou vést k snížené nebo zvýšené aktivitě transportu nebo mohou zapříčinit změnu selektivity OCT1 k substrátům (Kerb et al. 2002, Shu et al. 2003, Koepsell et al. 2007).

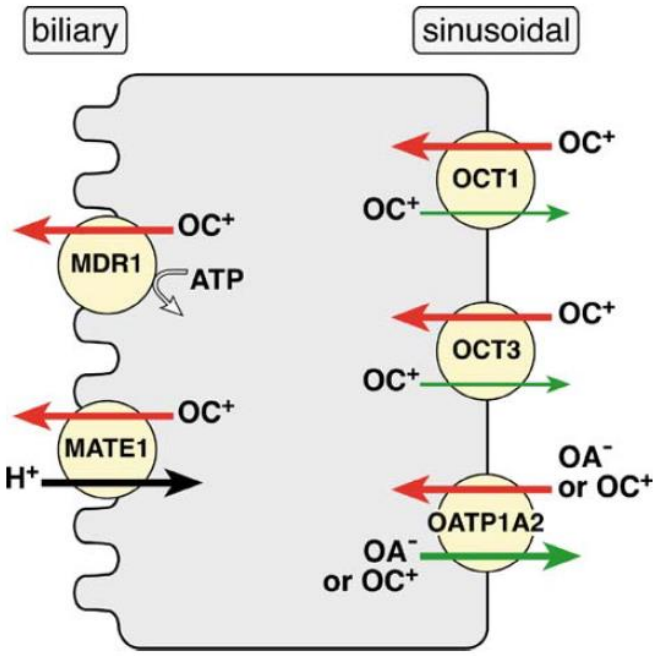


Obr. 9 3D struktura potkaního rOCT1. A. boční pohled, B. pohled z intracelulární strany membrány. Molekulární struktury TEA a MPP jsou zobrazeny ve stejné škále jako rOCT1. Barevně jsou vyznačeny aminokyseliny, které jsou lokalizovány v substrát vazebné oblasti. TEA (tertaethylamonium), MPP (1-methyl-4-fenylpyridium) Převzato z: Koepsell et al. 2007.

OCT1 náleží do rodiny membránových transportních proteinů (SLC, solute carrier family). OCT1 je exprimován ve většině tkání a byl detekován v mnoha orgánech, ale u člověka je nejvíce zastoupen v játrech, kde je lokalizován na sinusoidální membráně hepatocytů (Obr. 10) (Koepsell et al. 2007). OCT1 se podílí na importu, „uptake“, organických kationtových sloučenin z krve do hepatocytů a je tedy zodpovědný za transport řady léčiv do hepatocytů (Nies et al. 2011, Zhang et al. 1997).

Substráty OCT1

Většina substrátů přenášených OCT1 transportérem jsou organické kationty a slabé baze, které jsou při fyziologickém pH kladně nabity, ale OCT1 je schopen přenést i některé nenabité sloučeniny (Koepsell et al. 2007). Transportované substráty zahrnují endogenní substráty (cholin, acetylcholin), léčiva (metformin, aciklovir, ganciklovir, chinidin, chinin, deriváty platiny) a také modelové látky (1-methyl-4-fenylpyridium, MPP a tertaethylamonium, TEA). Některá léčiva (antagonista glutamátového receptoru fencyklidin, antagonisté histaminových receptorů difenylhydramin a ranitidin, a antidepresivum desipramin) inhibují OCT1 transportér, ale nejsou samy přenášeny. Substráty, které transportuje OCT1, vykazují vzájemnou inhibici, která je kompetitivní a koncentračně závislá (Koepsell et al. 2007).



Obr. 10.Lokalizace OCT1 a dalších transportérů organických kationtů v hepatocytu. Zelená šipka vyznačuje přestup organických kationtů z hepatocytu do sinusoidy (krevní kapiláry). U OCT transportérů je v přítomnosti normálního membránového potenciálu (60 mV) preferován uptake kationtů (tlustá šipka). OCT transportéry mohou zprostředkovat i eflux kationtů, pokud je itracelulární koncentrace daného kationtu asi 10x vyšší než extracelulární koncentrace. Převzato z: Koepsell et al. 2007.

Regulace OCT1 prostřednictvím HNF4α

V promotorové oblasti genu pro OCT1 se nacházejí dva DNA responzivní elementy (DR-2) pro HNF-4α (Saborowski et al. 2006). HNF-4α interakcí s těmito responzivními elementy aktivuje transkripci OCT1. HNF4α je transkripční faktor, který také náleží do rodiny nukleárních receptorů. HNF4α spolu s dalšími transkripčními faktory C/EBPα a C/EBPβ (*angl.* CCAAT/enhancer binding proteins α a β), HNF1α (*angl.* hepatocyte nuclear factor 1α) a HNF3γ (*angl.* hepatocyte nuclear factor 3γ) náleží do rodiny transkripčních faktorů označovaných jako LEFT (*angl.* liver-enriched transcription factors). LEFT mají důležitou roli v regulaci jaterních funkcí a diferenciaci hepatocytů, a také v transkripční regulaci jaterních léčiva-metabolizujících enzymů a transportérů (Schrem et al. 2002, Kamiyama et al. 2007, Watt et al. 2003, Rulcova et al. 2013).

Aktivace OCT1 prostřednictvím HNF4α je inhibována chenodeoxycholovou kyselinou prostřednictvím komponentu SHP (*angl.* small heterodimer partner) transkripčního represoru inducibilního žlučovými kyselinami (Saborowski et al. 2006). Exprese OCT1 v hepatocytech se snižuje během cholestázy (Koepsell et al. 2007).

5 Experimentální část – použité metody a chemikálie

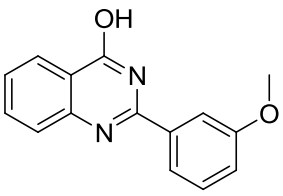
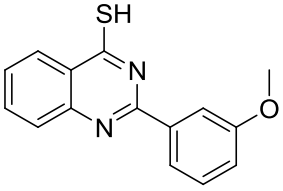
5.1 Chemikálie

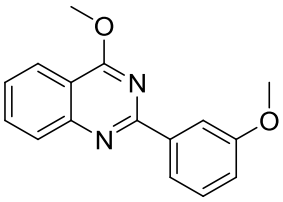
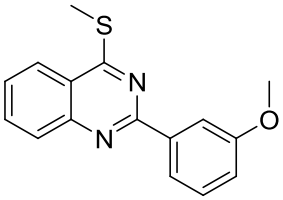
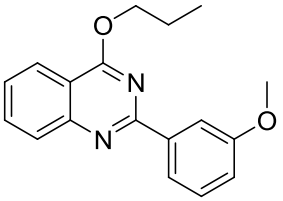
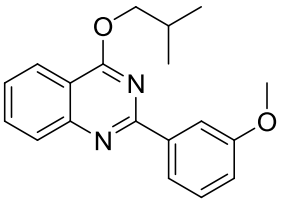
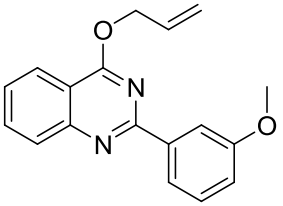
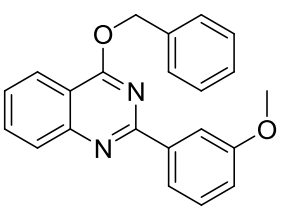
(S)-(-)-warfarin a (R)-(+)-warfarin, dimethyl sulfoxid (DMSO), rifampicin, dexametazon, 1α,25-dihydroxyvitamin D3, RU486, 5α-androstan-3β-ol byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (ST. Louis, MO, USA), racemické 4´-, 6-, 7-, 8- and 10-hydroxywarfariny od firmy Toronto Research Chemical (Toronto, Kanada), CITCO (6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd o-(3,4-dichlorobenzyl) oxim) od firmy BIOMOL Research, SRN. TRIZOL Reagent, Lipofectamin 2000 a médium Opti-MEM byly zakoupeny od Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

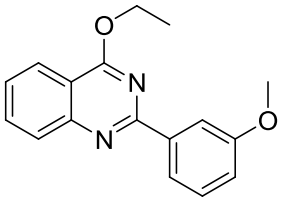
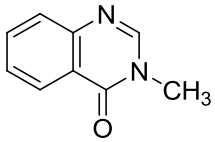
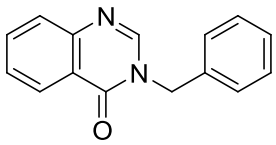
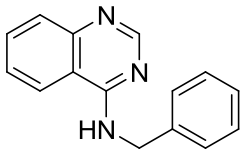
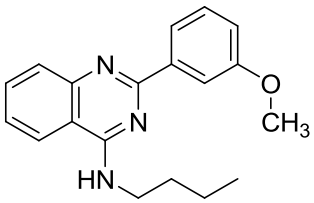
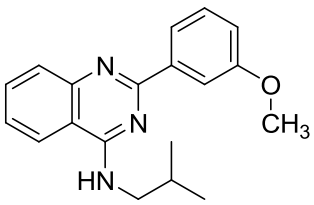
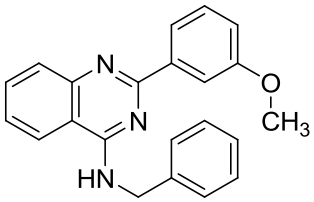
Chinazolinové driváty

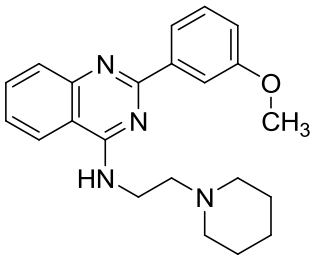
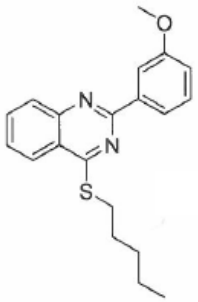
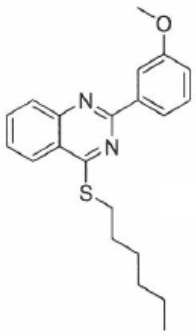
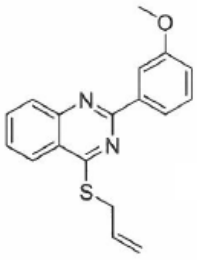
Chinazolinové deriváty (tabulka 3) byly připraveny PharmDr. Marcelem Špulákem, Ph.D. ve spolupráci s Katedrou anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

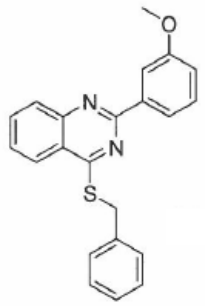
Tabulka 3. Struktury a názvy chinazolinových derivátů.

Kód	Vzorec	Mr	Název
CHP3		252,27	2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-ol
CHP4		268,33	2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol

Kód	Vzorec	Mr	Název
CHP5		266,29	4-methoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CHP6		282,36	2-(3-methoxyfenyl)-4-methylsulfanylchinazolin
CHP7		294,35	2-(3-methoxyfenyl)-4-propoxychinazolin
CHP8		208,37	4-isobutoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CHP9		292,33	4-allyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CHP10		342,39	4-benzyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Kód	Vzorec	Mr	Název
CHP11		280,32	4-ethoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
CHP13		160,17	3-methyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on
CHP14		236,27	3-benzyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on
CHP18		235,28	4-benzylaminochinazolin
CHP19		307,39	4-butylamino-2-(3-methoxyfenyl)-chinazolin
CHP20		307,39	4-isobutylamino-2-(3-methoxyfenyl)-chinazolin
CHP21		341,41	4-benzylamino-2-(3-methoxyfenyl)-chinazolin

Kód	Vzorec	Mr	Název
CHP22		362,47	2-(3-methoxyfenyl)-4-[2-(piperidin-1-yl)ethylamino]chinazolin
21		338,47	2-(3-methoxyfenyl)-4-pentylsulfanylchinazolin
22		352,49	4-hexylsulfanyl-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin
23		308,40	4-allylsulfanyl-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Kód	Vzorec	Mr	Název
24		358,46	4-benzylsulfanyl-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

5.2 Buněčné linie

Buněčné linie **HepG2** a **MZ-Hep1** jsou adherentní linie odvozené z hepatocelulárního karcinomu, linie **LS174T** je odvozena z adenokarcinomu tlustého střeva a jako jedna z mála z lidských buněčných linií obsahuje inducibilní CYP3A4 a relativně vysokou expresi PXR (Burk et al. 2005, Cerveny et al. 2007). Buněčná linie **COS-1** je adherentní linie odvozená z buněk ledvin kočkodana zeleného (Chlorocebus sabaeus), byla získána z buněk CV-1 imortalizací defektním virem SV40, který je schopen produkovat T antigen, ale není schopen genomické replikace. Buněčné linie HepG2, LS174T a COS-1 byly zakoupeny z Evropské kolekce buněčných kultur ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Linie HepG2, MZ-Hep1, LS174T a COS-1 byly kultivovány v DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s medium), ke kterému bylo přidáno 10% fetálního hovězího séra (FBS), 1% sodium pyruvátu a 1% neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich) (detailní informace jsou v přiložených publikacích). Všechny linie byly kultivovány bez přítomnosti antibiotik a nebyly používány déle než do 25. pasáže. Experimenty byly provedeny v médiu bez fenolové červeně (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) se stripovaným FBS. Finální koncentrace rozpouštědla DMSO v médiích buněčných kultur ve všech experimentech byla 0,1% (v/v).

Primární kultury lidských hepatocytů. Hepatocyty byly izolovány z jaterních segmentů, získaných lobektomií z dospělých pacientů, prováděnou z léčebných důvodů nesouvisejících s naším výzkumem. Vzorky lidských hepatocytů pro studii zabývající se

interakcemi warfarinu s PXR byly získány ze dvou pacientů: LH 28 (žena, 69 let) a LH 29 (žena, 46 let). Izolace hepatocytů byla provedena na pracovišti Prof. RNDr. Zdeňka Dvořáka, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Odběr a zpracování biologického materiálů byly provedeny v souladu s požadavky příslušné etické komise. Izolace a kultivace hepatocytů je popsána v publikacích Cerveny et al. 2007, Svecova et al. 2008. Hepatocyty byly z důvodu stabilizace 48 h před experimenty kultivovány v médiu bez séra. Pro další experimenty byly také použity komerčně dostupné kultury lidských primárních hepatocytů (Biopredic International, Rennes, Francie).

5.3 DNA konstrukty

p3A4-luc	reportérový plazmid obsahující dvě důležitá regulační místa lidského genu CYP3A4. Konkrétně plazmid obsahuje sekvenci bazálního promotoru (-361/+53) s vazebným místem pro PXR (ER6) a distální, tzv. **X**enobiotic **R**esponsive **E**nhancer **M**odule (XREM) lokalizovaný mezi bázemi -7835 a -7208 promotoru CYP3A4 genu.
pSG5-hPXR	expresní plazmid pro nukleární receptor PXR
pRL-TK	expresní vektor pro *Renilla* luciferázu – normalizace metody a transfekce buněk.
pGL5-luc	reportérový plazmid obsahující pět vazebných míst GAL4
pM-GAL4-PXRwt	fúzní konstrukt pro wild type PXR
pM-GAL4-PXRmut(S247W/C284W)	fúzní konstrukt pro konstitutivně aktivní S247W/C284W dvojitě mutovaný nukleární receptor PXR
pVP16-SRC-1	fúzní expresní konstrukt pro koaktivátor SRC-1
pSG-hGRα	expresní plazmid pro glukokortikoidní receptor
pCR3-CAR	expresní plazmid pro nukleární receptor CAR
p$(ER6)_3$-tata-luc	reportérový plazmid obsahující tři sekvence ER6 odvozené z CYP3A4 promotoru s vazebnými místy pro CAR

GAL4-CAR-LBD	fúzní plazmid pro GAL4 vazebnou doménu a ligand vazebnou doménu CAR
pTCMV2-CAR3	expresní plazmid pro nukleární receptor CAR3
pBREM/2B6-luc	reportérový plazmid obsahující sekvence phenobarbital-responsive enhancer modul promotoru CYP2B6
hCAR-C/pACT	fúzní plazmid kódující VP16 aktivační doménu a C-terminální region CAR
hCAR-N/pBIND	fúzní plazmid kódující GAL4-DNA vazebnou doménu a N-terminální region CARu

5.4 Molekulárně biologické metody

5.4.1 Metoda gene reporter assay

Různé reportérové systémy jsou široce používány ke studiu genové exprese eukaryot a buněčné fyziologie. Využití nacházejí též ve studiu receptorové aktivity, transkripčních faktorů, intracelulární signalizace a mRNA processingu.

Princip metody spočívá ve vložení plazmidové cirkulární DNA do buňky, která obsahuje regulační oblasti a cDNA pro reportérový gen (v našem případě *Firefly* luciferázu), který je regulačními oblastmi plazmidu a s nimi interagujícími buněčnými transkripčními faktory transkribován na mRNA. 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 pomocí expresního vektoru s patřičnou kódující DNA (Allard a Kopish 2008, Rulcová 2009).

Duální reportéry se běžně používají ke zvýšení přesnosti. Termín „duální reportér“ se odkazuje na simultánní expresi a měření dvou individuálních reportérových enzymů v jednom systému. „Experimentální“ reportér je vztažen k efektu specifických experimentálních podmínek, zatímco aktivita kotransfekovaného „kontrolního“ reportéru poskytuje vnitřní kontrolu, která slouží jako základní odpověď. Normalizace aktivity experimentálního reportéru k aktivitě vnitřní kontroly minimalizuje experimentální variabilitu, způsobenou rozdíly v buněčné viabilitě nebo efektivitě transfekce. Ostatní zdroje variability, jako rozdíly v pipetovaných objemech, efektivita buněčné lýze, mohou tak být eliminovány.

Princip Dual-luciferase reporter metody

Aktivita *firefly* (světluška *Photinus pyralis*) a *Renilla* (*Renilla reniformis*) luciferáz je měřena následně v jednom vzorku. *Firefly* luciferázový reportér je měřen jako první přidáním Luciferase Assay Regentu II a generováním stabilizovaného luminiscenčního signálu. Po kvantifikaci luminiscence je signál „zhasnut“ přidáním Stop&Glo Reagentu a současně je iniciována reakce *Renilla* luciferázy přidáním substrátu pro *Renilla* luciferázu. Vzhledem k tomu, že *Firefly* a *Renilla* luciferázy mají odlišný evoluční původ, obsahují různé enzymové struktury a mají odlišné substrátové

požadavky. Tyto rozdíly umožňují selektivní rozlišení mezi jejich příslušnými bioluminiscenčními reakcemi. Tak může být při použití Dual-luciferase reporter assay inhibována luminiscence reakce *Firefly* luciferázy a současně aktivována luminiscence reakce *Renilla* luciferázy.

Firefly luciferáza je monomerní protein, který nevyžaduje posttranslační modifikaci pro enzymatickou aktivitu. Působí tak jako genový reportér ihned po translaci. Emise fotonu je dosaženo během oxidace luciferinu v reakci vyžadující ATP, Mg^{2+} a O_2. Výsledkem je generování záblesku, který rychle slábne po smíchání enzymu a substrátu.

Renilla luciferáza je 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. Základní vlastností koelenterazinu je, že emituje nízkou úroveň autoluminiscence ve vodných roztocích. Dual-Luciferase Reporter Assay System obsahuje chemikálie, které redukují autoluminiscenci na úroveň, která není detekovatelná (Sherf et al. 1996, Rulcová 2009).

Transfekce

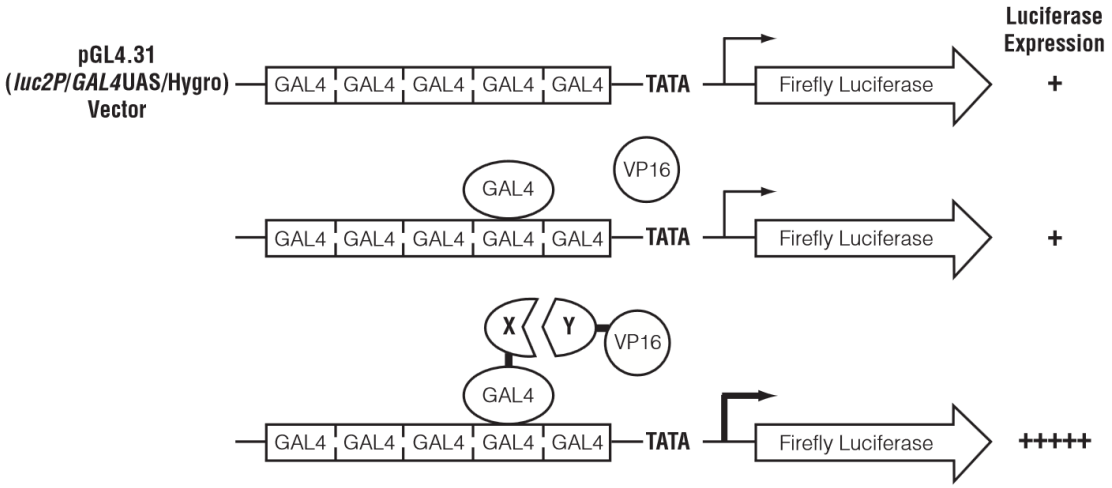
Transfekce umožňuje vnesení nukleových kyselin do eukaryotních buněk pomocí lipozomů. Lipozomy jsou dvouvrstevné koloidní částice obsahující katonické lipidy. Na základě elektrostatických interakcí tvoří komplex s nukleovou kyselinou a buněčnou membránou, čímž umožňují inkorporaci nukleové kyseliny do buňky.

Lipofectamine 2000 je patentovaný preparát firmy Invitrogen vhodný pro transfekci nukleových kyselin do eukaryotních buněk. Vykazuje vysokou efektivitu transfekce. Komplexy DNA – Lipofectamine 2000 se přímo přidávají k buňkám v kultivačním médiu.

Poměr DNA (v μg):Lipofectamine 2000 (v μl) při použití pro tvorbu komplexů by měl být 1:2 až 1:3. V době transfekce je doporučena konfluence buněk 90-95% k dosažení vysoké účinnosti a exprese. Pro metodu gene reporter assay je však optimálnější nižší konfluence. Pro ředění reagencie Lipofectamine 2000 se doporučuje Opti-MEM I Reduced Serum Medium, aby se předešlo tvorbě komplexů DNA s fetálním sérem (Invitrogen 2005).

5.4.2 Metoda two-hybrid assay

Savčí *two-hybrid system* umožňuje popis interakcí mezi dvěma proteiny v prostředí savčí buňky. 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. V two-hybrid assay jsou vytvořeny dva fúzní proteiny: protein „návnada“ (angl. bait protein, X), který je zkonstruován tak, aby měl DNA-vazebnou doménu na N-konci, a jeho potenciální vazebný partner, „kořist“ (angl. prey protein, Y), který je spojen s aktivační doménou. 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. Aktivita reportérového plazmidu je měřítkem interakce mezi proteiny (viz Obr. 11).



Obr. 11 Schématické znázornění savčího two-hybrid systému – analýza protein-proteinových interakcí. X,Y – bait a prey protein (např. nukleární receptor, koaktivátor, korepresor). VP-16 – aktivační doména, GAL4 – transkripční aktivátor. Převzato z: Promega 2009.

Obvyklé uspořádání two-hybrid systému se skládá z jednoho vektoru obsahujícího DNA-vazebnou doménu - GAL4 protein, další vektor obsahující aktivační doménu (nejčastěji viru herpes simplex VP16) a třetí vektor obsahující pět GAL4 vazebných míst umístěných před specifickým reportérovým genem (v našem případě *Firefly* luciferázy) (Rulcová 2009).

GAL4 protein je transkripční aktivátor *Saccharomyces cerevisiae*, jeho DBD se váže na UASG (*angl.* upstream activation sequence of GAL), část promotoru reportérového genu, a AD aktivuje transkripci.

5.4.3 Metoda RT-PCR

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí – RT-PCR je laboratorní technikou pro amplifikaci určitého segmentu molekuly RNA. Její řetězec je nejprve (reverzně) celý přepsán do komplementární DNA a poté následuje amplifikace specifické DNA pomocí PCR metody.

RT-PCR poskytuje vysoce citlivou techniku, která umožňuje detekovat velmi malý počet kopií RNA molekul. Kvantifikace specifických RNA molekul v buňkách a tkáních vyjadřuje míru genové exprese. Hlavní význam detekce mRNA konkrétního genu tkví v možnosti posouzení prvního kroku exprese, tj. transkripce z DNA. Ve farmakologii tak nabízí důležitou informaci, jak sledované léčivo ovlivňuje transkripci konkrétních genů (Mičuda et al. 2007, Rulcová 2009).

PCR

Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce) je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*, pro nějž jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3´a 5´-koncovým sekvencím úseku, jenž má být amplifikován. Tato metoda poskytuje až 10^6 násobné pomnožení během 2-3 hodin. Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku (teoreticky by měla stačit jediná molekula DNA nebo RNA). Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován. Velmi důležitým předpokladem pro úspěšnou reakci je navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Primery jsou dva syntetické jednovláknové oligonukleotidy, obvykle 17-30 nukleotidů dlouhé, ohraničující replikovaný úsek. Nukleotidová sekvence cílové DNA tedy nemusí být známá, ale musí být známé alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích cílové amplifikované DNA. Primery, které hybridizují na obou stranách cílové DNA, řídí syntézu nových vláken. Jejich syntézu katalyzuje termostabilní DNA

polymeráza (např. *Taq* z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*) od 5´konce ke 3´konci (Průša 1997, Rulcová 2009).

Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují:

1) denaturaci templátu: Tohoto efektu je dosaženo zvýšením teploty vzorku na 95°C. DNA je denaturována zpravidla 1 – 5 minut. Je důležité, aby došlo ke kompletní denaturaci (oddělení) obou vláken. Jinak by totiž mohlo dojít k velmi rychlé renaturaci celé molekuly, což by zabránilo interakci s primery.

2) připojení primerů (annealing): Tímto druhým stupněm je vlastně renaturace, při níž je reakční směs ochlazena na zvolenou teplotu, která se (dle teploty charakterizující stabilitu duplexu DNA-primer) pohybuje kolem 60°C. Teplota vhodná pro tuto reakci závisí na délce oligonukleotidu a na zastoupení A-T a G-C párů (tři vodíkové můstky fixující G-C zvyšují stabilitu a tím denaturační teplotu) (Rumlová et al. 2003, Rulcová 2009).

3) extensi připojených primerů DNA polymerasou: V této fázi jsou připojovány jednotlivé deoxynukleotidy ve směru 5´→ 3´. Teplota je v případě použití Taq polymerázy při tomto kroku zvýšena na 75°C, což je teplotní optimum tohoto enzymu. Výtěžek je závislý na vhodných reakčních podmínkách, které je často třeba optimalizovat. Jedná se zejména o koncentraci Mg^{2+} iontů a annealing teplotu.

Izolace celkové RNA

Fenol-chloroformová metoda extrakce ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru) a dochází k denaturaci proteinů. Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze, horní vodnou s rozpuštěnými nukleovými kyselinami a dolní chloroformovou. Protřepáváním dochází k mísení fází, při kterém fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Po precipitaci izopropylalkoholem a centrifugaci se vytvoří peleta. S nukleovými kyselinami se srážejí (koprecipitují) i soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin a dávají peletě bílé zbarvení, a které se odmývají 75% etanolem. Peleta se rozpustí v RNase free vodě. DNA se odstraní působením DNázy (Raclavský 2004, Rulcová 2009).

Koncentrace a čistota RNA se stanoví spektrofotometricky. Vyhodnocení čistoty se provádí na základě poměru absorbancí A_{260}/A_{280}, vyhovující hodnoty se nacházejí v rozmezí 1,8-2,0.

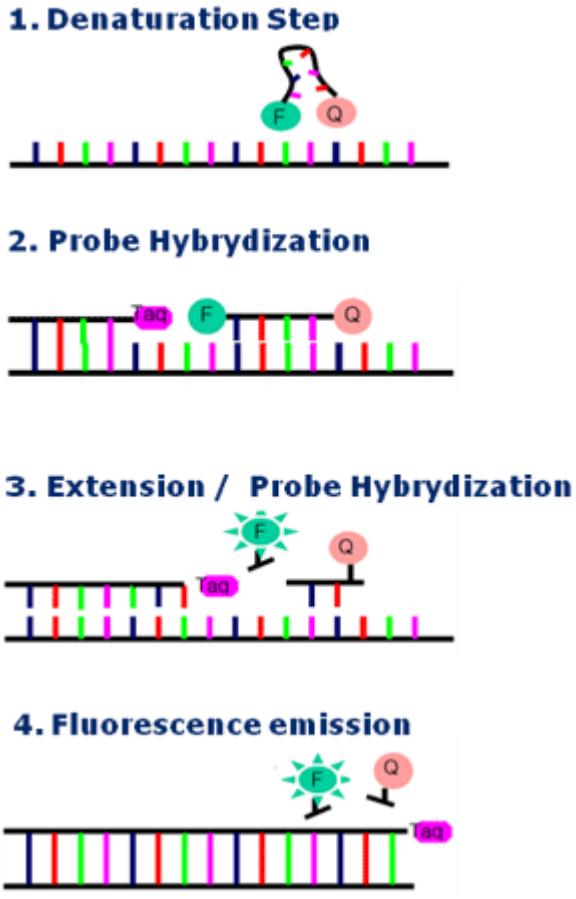
Reverzní transkripce

V prvním kroku RT-PCR, někdy nazývaném „first strand reaction“, je vytvořen řetězec komplementární DNA z templátu (matrice) messengerové RNA za použití deoxyribonukleotidů (ve formě trifosfátů – dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a RNA-dependentní DNA-polymerázy (reverzní transkriptázy) během procesu reverzní transkripce. M-MuLV je reverzní transkriptáza izolovaná z Moloneyeho myšího leukemického viru *(Moloney murine leukemia virus)*. Vzorek po extrakci obsahuje celkovou RNA, tzn. mRNA, rRNA a tRNA. Molekuly mRNA mají polyA konec na 3´konci. Pro reverzní transkripci se využívá oligo(dT) řetězec jako primer, který se naváže na polyA konec mRNA molekul a zajistí tak replikaci mRNA reverzní transkriptázou, která potřebuje duplexní řetězec pro nasednutí a syntézu (Mičuda et al. 2007, Průša 1997, Rulcová 2009).

RT-PCR

Po dokončení reverzní transkripce, tj. poté, co byla vytvořena komplementární DNA z původní jednořetězcové mRNA, je zahájena standardní PCR. Do směsi je přidána termostabilní DNA polymeráza (*Taq*), přímé (forward-upstream) a zpětné (reverse-downstream) DNA primery. Primery nesmí tvořit dimery ani vlásenky, tzn. nesmí mít vzájemně komplementární sekvence. Pro usnadnění vazby DNA primerů na cDNA (annealing) je reakce zahřátá na teplotu specifickou pro strukturu/sekvenci primerů (cca 50-70°C). Další zahřívání (65-75°C) umožňuje termostabilní DNA polymeráze tvorbu dvouřetězcové DNA z primerů navázaných na cDNA (elongace/extenze). Reakce je poté zahřáta přibližně na 95°C pro denaturaci a separaci DNA řetězců. Směs je poté opět ochlazena na teplotu, která umožní vazbu primerů a cyklus se opakuje. Opakování těchto kroků (zpravidla 40 cyklů) vede k syntéze segmentu definovaného primery, které jsou inkorporovány do nově vznikajících molekul. Fragmenty délky řetězce vymezené primery tvoří hlavní produkt reakce (Mičuda et al. 2007, Rulcová 2009).

K detekci reakce se používají sondy, fluorescenční látky uvolňující záření v přítomnosti PCR produktu. Specifické sondy obsahují ve své struktuře oligonukleotidový řetězec, kterým hybridizují s PCR amplifikonem. Pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor) a zhášečem (quencher) (obr. 12). Nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvýšením relativní vzdálenosti mezi molekulou fluorescenčního barviva a molekulou zhášeče. Intenzita fluorescence roste s počtem cyklů a je zaznamenána analyzátorem (real-time PCR) (Didenko 2001, Rulcová 2009).



Obr. 12 Schéma RT-PCR s využitím hybridizačních FRET sond. Převzato z: Gene expression, qPCR array service 2013.

K zjištění ovlivnění exprese enzymů je nutné vyhodnotit kromě sledovaného genu také expresi tzv. housekeepingového genu, který je exprimován ve všech buňkách. Jedná se o skupinu genů kódujících proteiny, jejichž aktivita je nezbytná pro udržení buněčných funkcí. Exprese housekeepingových genů je v buňce stabilní bez ohledu na

přítomnost látek ovlivňujících genovou expresi. Jako příklad lze uvést HPRT (hypoxantinfosforibosyltransferáza), enzym metabolismu purinů. Detekce mRNA housekeepingových genů se také využívá jako interní kontroly PCR, kterou mohou ovlivnit rozdíly v množství RNA vnesené do reakce, efektivita reverzní transkripce a amplifikace (Thellin et al. 1999, Rulcová 2009).

Pro analýzu hladiny exprese je nutné určit linii treshold (prahovou hodnotu) a počet cyklů C_t (počet cyklů, ve kterých fluorescence dosáhne treshold hodnoty). Výpočet relativní exprese cílového genu vztažená k referenčnímu (housekeepingovému) genu vychází z počtu cyklů a efektivity reakce.

$$R = \frac{(E_{TG})^{\Delta C_t TG(kontrola-vzorek)}}{(E_{RG})^{\Delta C_t RG(kontrola-vzorek)}}$$

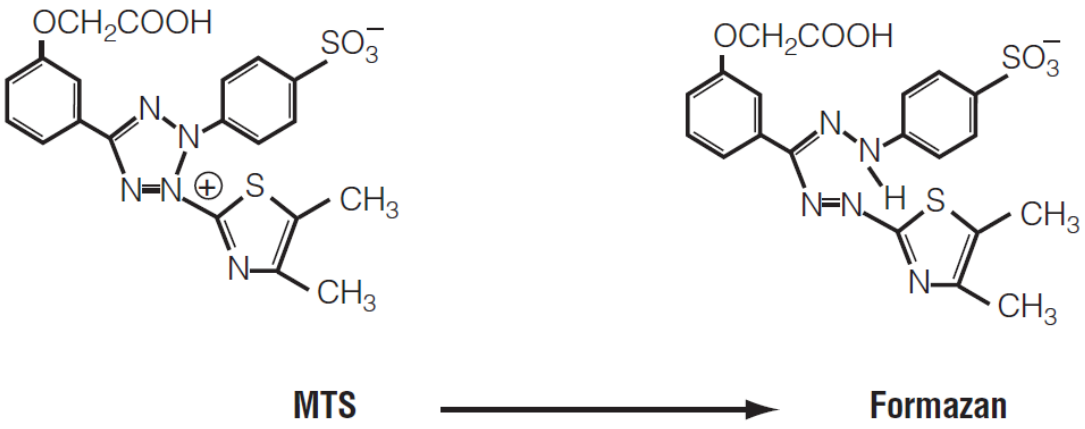
R relativní poměr exprese
E efektivita reakce
TG cílový gen (target gene)
RG referenční gen (reference gene)
ΔC_t rozdíl v počtu cyklů kontroly a vzorku
(Pfaffl 2006)

5.4.4 MTS test viability/cytotoxicity

MTS test je určen pro kolorimetrickou kvantifikaci buněčného růstu a viability. Metoda využívá tetrazoliovou sůl MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, vnitřní sůl) a fenazin ethosulfát (PES). MTS přijímá elektrony od PES a to umožňuje MTS tvořit stabilní roztok. Tato metoda je dále široce užívána ke kvantifikaci buněčné proliferace v závislosti na růstových faktorech, cytokinech a nutrientech a také ke studiu cytotoxicity chemickými látkami.

Test je založen redukci MTS metabolicky aktivními buňkami za vzniku fialového formazanu, který je rozpustný v kultivačním médiu (obr. 13). Této přeměny na formazan je dosaženo prostřednictvím dehydrogenázových enzymů v metabolicky aktivních buňkách. Redukce vyžaduje pyridinové kofaktory NADH a NADPH. Protože

je tetrazoliová sůl redukována na formazan pouze metabolicky aktivními buňkami, tato metoda detekuje výhradně životaschopné buňky. Výsledný barevný roztok je kvantifikován spektrofotometricky při 490 nm (Berridge et al. 2005, Promega 2012).



Obr. 13 Struktura MTS a redukovaného produktu formazanu. Převzato z: Promega 2012

5.4.5 Statistická analýza

Analýza rozptylu (ANOVA) a Dunettův test byly použity pro statistické vyhodnocení dat z metody gene reporter assay a two-hybrid assay pomocí softwaru GraphPad Prism. Statistická významnost na úrovni $p<0,05$ je vyznačena *, $p<0,01$ je vyznačena **, $p<0,001$ je vyznačena***.

6 Cíle práce

1. Studium interakcí warfarinu a jeho enantiomerů s pregnanovým X receptorem v transkripční regulaci biotransformačního enzymu cytochromu P450 CYP3A4 v hepatomové linii HepG2 a v primárních lidských hepatocytech.

2. Studium regulace organického kationtového transportéru OCT1 prostřednictvím indukce HNF4α glukokortikoidním receptorem v primárních lidských hepatocytech a v hepatomových liniích HepG2 a MZ-Hep1.

3. Hledání ligandů konstitutivního androstanového receptoru ze skupiny chinazolinových derivátů

7 Výsledky a diskuze

Kapitola výsledky a diskuze je dělena na tři části. První část shrnuje výsledky týkající se stereoselektivních interakcí enantiomerů warfarinu s PXR a vliv těchto interakcí na genovou regulaci hlavních léčiva metabolizujících enzymů (více informací v příloze P1). Druhá část shrnuje výsledky týkající se regulace OCT1 glukokortikoidním receptorem prostřednictvím HNF4α (více informací v příloze P2). Ve třetí části jsou předloženy výsledky zabývající se hledáním nových přímých ligandů CARu z nově syntetizovaných derivátů chinazolinu.

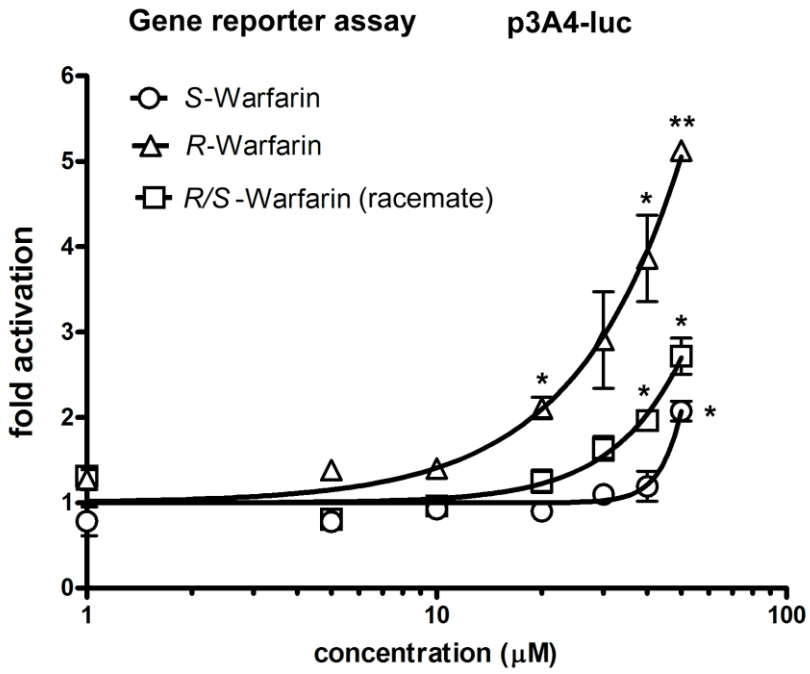
7.1 Vliv stereoselektivních interakcí enantiomerů warfarinu s PXR na genovou regulaci hlavních léčiva metabolizujících enzymů

Warfarin je antikoagulans široce používané v terapii a prevenci tromboembolických příhod (Rettie a Tai 2006). Warfarin má úzký terapeutický index a širokou interidividuální variabilitu, hlavně díky genetickým polymorfismům CYP2C9 a VKORC1 (vitamín K epoxid reduktázový komplex 1) genů. Terapie warfarinem i titrace dávek je do značné míry nepředvídatelná a představuje riziko krvácení z předávkování nebo naopak tromboembolické komplikace při nedostatečném dávkování.

V praxi se podává racemická směs R a S enantiomerů warfarinu, přičemž za hlavní podíl terapeutického efektu je zodpovědný S enantiomer (Kaminski a Zhang 1997). V této studii jsme se zaměřili na otázku, zda R a S enantiomery warfarinu interagují s PXR a jeho prostřednictvím transaktivují enzymy cytochromu P450 CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6 a P-glykoprotein v kultuře primárních lidských hepatocytů, hepatocelulární linii HepG2 a střevní linii LS174T. Interference warfarinu s metabolickými (nebo transportními) aktivitami cílových genů prostřednictvím PXR může způsobovat farmakokinetické lékové interakce vedoucí k toxicitě a nežádoucím účinkům, nebo naopak selhání terapie u léčiv podaných současně s warfarinem.

Transaktivace CYP3A4 luciferázového reportérového konstruktu R-, S- a racemickým warfarinem

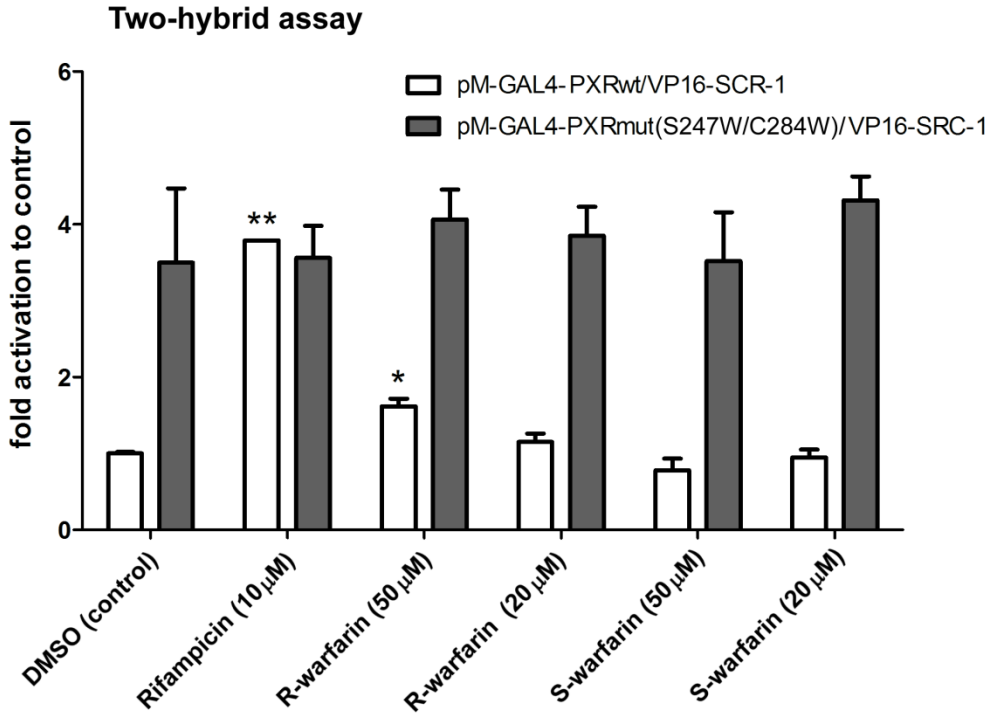
Ke zjištění, zda R-, S-warfarin a racemická směs enantiomerů warfarinu transaktivují promotor genu *CYP3A4* prostřednictvím PXR, jsme zvolili metodu gene reporter assay (obr. 14). V tomto experimentu byl do buněk linie HepG2 pomocí transfekce vnesen PXR expresní plazmid a *CYP3A4* luciferázový reportérový plazmid. Zjistili jsme, že po 24 hodinové inkubaci R-warfarin v koncentraci 20 μM signifikantně aktivuje *CYP3A4* promotor. S-warfarin a racemát vykazují aktivaci reportérového plazmidu v menší míře v porovnání s R-warfarinem. S-warfarin signifikantně aktivoval reportérový konstrukt až při koncentraci 50 μM. Míra aktivace u racemátu se pohybuje mezi hodnotami aktivace S a R enantiomeru warfarinu (Rulcová 2009).



Obr. 14 Vliv enantiomerů warfarinu na transaktivaci promotoru CYP3A4 luciferázového reportérového konstruktu prostřednictvím PXR. Do buněk linie HepG2 byly transfekcí vneseny PXR expresní plazmid, p3A4-luc reportérový plazmid a pRL-TK kontrolní plazmid, použitý pro normalizaci transfekce. Buňky byly inkubovány 24 h s S-, R- a racemátem warfarinu. Po inkubaci byly buňky lyzovány a byly analyzovány aktivity *firefly* i *Renilla* luciferázy. Data reprezentují průměr ze tří experimentů ± SD a jsou vyjádřena jako násobek aktivace luciferázové aktivity v poměru ke kontrole (0,1% DMSO). *P<0,05, **P<0,01.

Identifikace R-warfarinu jako ligandu PXR

Ke zjištění, zda R- a S- warfarin interagují s LBD PXR, jsme použili metodu savčí two-hybrid assay, pomocí které jsme testovali vliv enantiomerů warfarinu na konstitutivně aktivní S247W/C284W dvojitě mutovaný PXR konstrukt v porovnání s wild-type PXR expresním plazmidem. Do buněk linie HepG2 byly transfekcí vneseny fúzní plazmidy pM-GAL4-PXRwt nebo pM-GAL4-PXRmut s VP-16-SRC fúzním plazmidem a reportérový plazmid pG5-luc. Jako prototypový ligand PXR jsme použili rifampicin. Z obrázku 15 je patrné, že R-warfarin v koncentraci 50 μM signifikantně aktivuje reportérový plazmid pG5luc prostřednictvím GAL4-PXRwt fúzního konstruktu (1,6-násobek aktivace, P<0,5). S-warfarin neaktivuje signifikantně tento konstrukt. Ani jeden enantiomer warfarinu neaktivoval mutovaný PXR v porovnání s kontrolou. Z těchto výsledků vyplývá, že R-warfarin interaguje s LBD PXR. R- i S-warfarin se v buňkách HepG2 akumulují ve stejném množství (Malakova et al. 2009), takže výsledky v našem experimentu nejsou ovlivněny rozdílným vstupem enantiomerů do buněk.



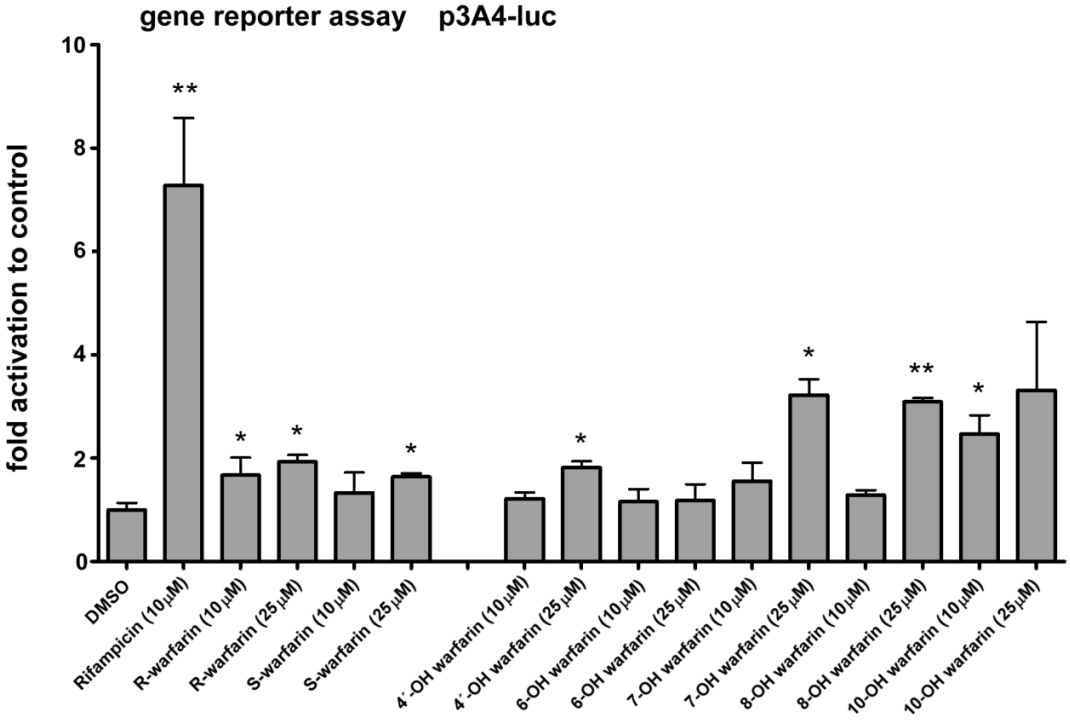
Obr. 15 Identifikace R-warfarinu jako ligandu PXR pomocí metody savčí two-hybrid assay. Fúzní expresní konstrukty pM-GAL4-PXRwt nebo pM-GAL4-PXRmut(S247W/C284W) byly transfekovány s VP16-SRC-1 fúzním plazmidem a pG5luc reportérovým plazmidem do buněk

HepG2. Buňky byly inkubovány 24 h s 50 μM R-, S-warfarinem nebo rifampicinem jako prototypovým ligandem PXR. Po inkubaci byly buňky lyzovány a následně analyzována *firefly* a *Renilla* luciferázová aktivita. Data reprezentují průměr ze tří experimentů ± SD a jsou vyjádřena jako násobek aktivace luciferázové aktivity v poměru ke kontrole (0,1% DMSO). *P<0,05, **P<0,01.

Enantiomery warfarinu jsou odlišně metabolizovány stereoselektivním metabolismem (Kaminski a Zhang 1997). Hlavní kroky biotransformace warfarinu prostřednictvím cytochromu P450 vedou ke vzniku monohydroxylovaných metabolitů (Kaminski a Zhang 1997). S-warfarin je v terapeutických koncentracích metabolizován převážně CYP2C9 na 7- a 6-hydroxymetabolity, zatímco R-warfarin metabolizují hlavně CYP3A4 a CYP1A2 za vzniku 4´-, 6-, 8- a 10- hydroxymetabolitů (Kaminski a Zhang 1997, Miller et al. 2009). Zaměřili jsme se tedy také na studium vlivu hydroxymetabolitů warfarinu na indukci cílových genů PXR.

Hydroxywarfariny transaktivují CYP3A4 luciferázový reportérový konstrukt prostřednictvím PXR

Pomocí metody gene reporter assay provedené v HepG2 buňkách jsme zkoumali, zda hydroxywarfariny interagují s PXR v transaktivaci CYP3A4. Zjistili jsme, že 4´-, 7-, 8- a 10-hydroxymetabolity warfarinu signifikantně aktivují reportérový konstrukt, jak je patrné na obrázku 16. 7-, 8- a 10-hydroxywarfarin se dokonce ukazují jako účinnější aktivátory než R-warfarin v ekvimolárních koncentracích. 6-hydroxywarfarin neaktivoval signifikantně reportérový konstrukt, a proto jsme jej nezahrnuli do dalších experimentů provedených v primárních lidských hepatocytech.

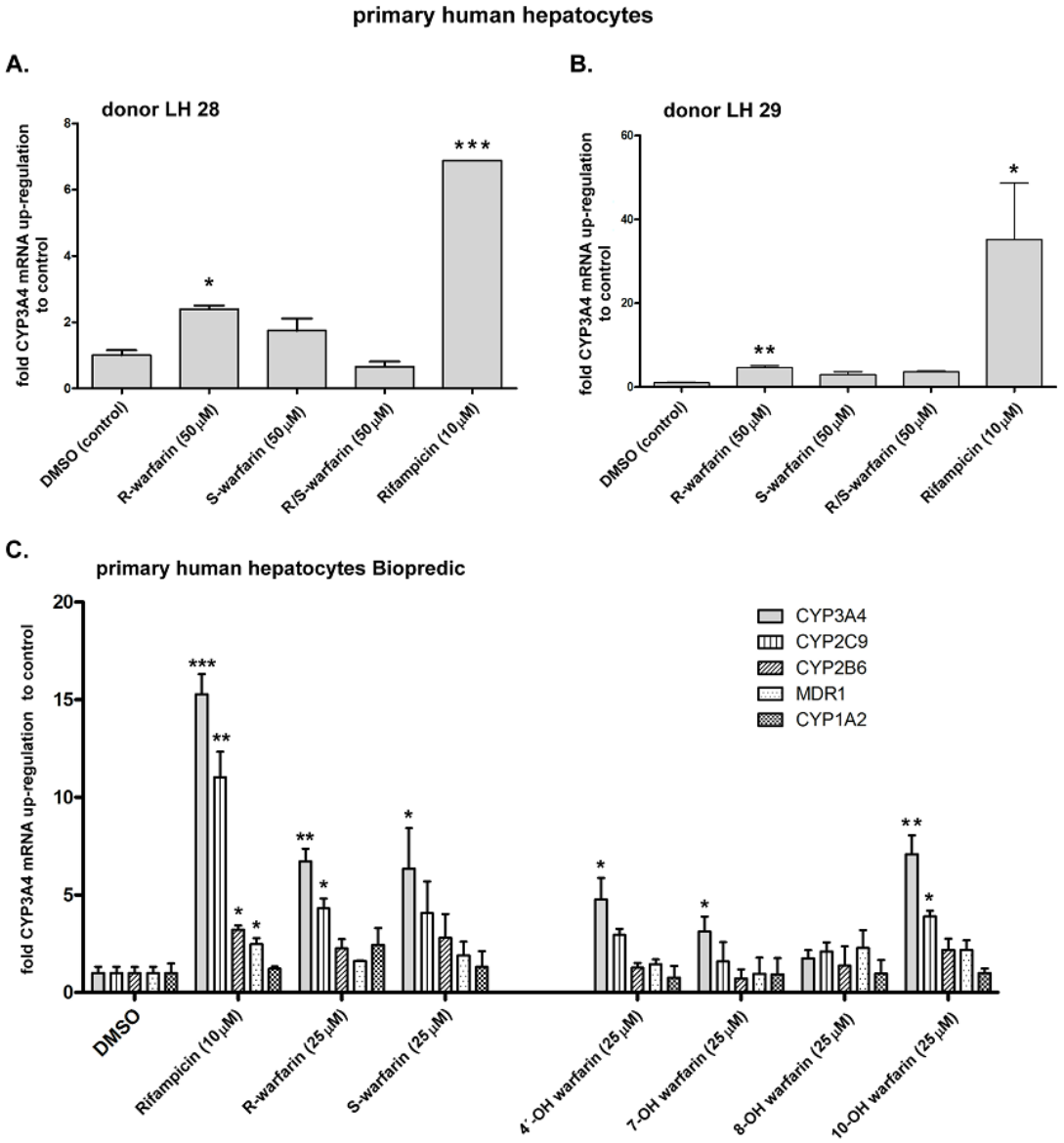


Obr. 16 Vliv hlavních metabolitů warfarinu na transaktivaci CYP3A4 promotor luciferázového reportérového konstruktu prostřednictvím PXR. HepG2 buňky byly transfekovány PXR expresním plazmidem s p3A4-luc reportérovým plazmidem a pRL-TK kontrolním plazmidem použitým pro normalizaci transfekce. Buňky byly inkubovány 24 h s 10 a 25 μM enantiomery warfarinu, hydroxywarfariny a 10 μM rifampicinem. Po inkubaci byly buňky lyzovány a proběhla analýza *firefly* i *Renilla* luciferázové aktivity. Data reprezentují průměrné hodnoty ± SD tří experimentů a jsou reprezentovány jako násobek aktivace luciferázové aktivity v poměru ke kontrole (0,1% DMSO). *P<0,05, **P<0,01.

Vliv R-, S- a racemického warfarinu na expresi *CYP3A4* mRNA v kultuře primárních lidských hepatocytů a LS174T buněčné linii

V těchto experimentech jsme se zaměřili na studium vlivu R- a S-warfarinu na expresi *CYP3A4* mRNA v primárních lidských hepatocytech a v buněčné intestinální linii LS174T pomocí metody qRT-PCR. Zjistili jsme, že R-warfarin signifikantně zvýšil expresi *CYP3A4* mRNA v lidských primárních hepatocytech (Obr. 17). Navíc R-warfarin signifikantně indukoval expresi dalšího cílového genu, a to *CYP2C9* (Obr. 17 C). S-warfarin indukoval expresi mRNA *CYP3A4* a *CYP2C9* v menší míře a tato

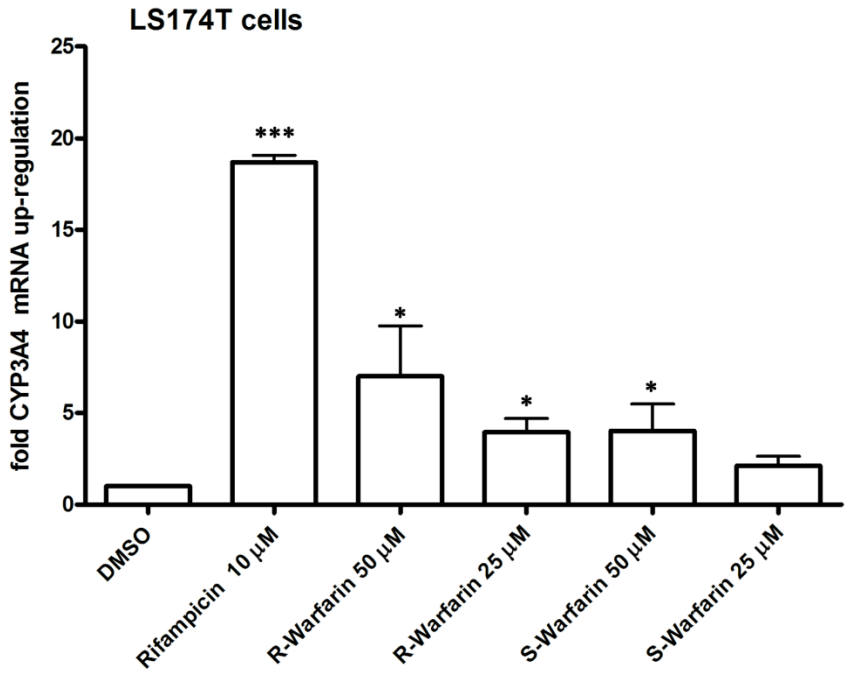
indukce nebyla signifikantní ve všech kulturách lidských primárních hepatocytech. Důležitým zjištěním je, že 10-, 4´- a 7-hydroxywarfarin signifikantně indukovaly mRNA genů *CYP3A4* a *CYP2C9* v lidských primárních hepatocytech (Obr. 17 C). 10-hydroxywarfarin vykazuje vyšší indukční aktivitu než jeho parentní látka R-warfarin. Lze tedy shrnout, že 10-, 4´- a 7- hydroxymetabolity warfarinu jsou ligandy PXR a indukují jeho cílové geny. Rifampicin, R- i S-warfarin navíc indukovaly expresi mRNA dalších genů regulovaných prostřednictvím PXR, a to *CYP2B6* a *MDR/*P-glykoproteinu, ale signifikantní indukci lze pozorovat pouze u rifampicinu (Obr. 17 C).



Obr. 17 Vliv R-, S- a racemického warfarinu na expresi *CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, CYP1A1* a *MDR1* mRNA v primárních lidských hepatocytech. Tři kultury primárních lidských hepatocytů (A-C) byly 24 h inkubovány s enantimery warfarinu, racemátem warfarinu a 4´-, 7-, 8- a 10-hydroxymetabolity warfarinu. Po inkubaci byla izolována celková RNA a kvantifikace mRNA byla provedena pomocí metody qRT-PCR. Účinky testovaných látek na cílové geny jsou vyjádřeny jako násobky exprese mRNA vztažené ke kontrole (buňky inkubované s 0,1% DMSO). Data reprezentují průměr tří experimentů ± SD. * P<0,05, **P<0,01 a *** P<0,001.

V experimentu, ve kterém byla použita buněčná linie LS174T, je možné po 48 h inkubaci s 50 a 25 μM R-warfarinem pozorovat indukci *CYP3A4* mRNA (7- a 4-

násobek, P<0,05), zatímco S-warfarin signifikantně indukoval *CYP3A4* mRNA pouze v koncentraci 50 μM (Obr. 18).



Obr. 18 Vliv R-, S- a racemického warfarinu na expresi *CYP3A4* mRNA v buněčné linii LS174T. Buňky linie LS174T byly inkubovány 48 h s 10 μM enantiomery warfarinu a rifampicinem. Po inkubaci byla izolována celková RNA a kvantifikace mRNA byla provedena pomocí metody qRT-PCR. Účinky testovaných látek na *CYP3A4* mRNA jsou vyjádřeny jako násobky exprese mRNA vztažené ke kontrole (buňky inkubované s 0,1% DMSO). Data reprezentují průměr tří experimentů ± SD. * P<0,05, *** P<0,001.

Zjistili jsme, že 10- a 4´-hydroxywarfariny vykazují vysoký potenciál indukovat CYP3A4 a CYP2C9 v primárních lidských hepatocytech, a tudíž 10- a 4´-hydroxymetabolity R-warfarinu mohou být účinnými ligandy PXR. Tento fakt je důležitý proto, že 10- a 4´-hydroxywarfariny a R-warfarin samotný mají schopnost inhibovat CYP2C9 v klinicky relevantních plazmatických koncentracích (Jones et al. 2010), 10-hydroxywarfarin je druhý nejčastěji se vyskytující metabolit v plazmě (Locatelli et al. 2005), CYP3A4 vykazuje širokou inter- a intraindividuální variabilitu exprese a aktivity v populaci. Navíc CYP1A1 a CYP1A2 přispívající k metabolismu R-

warfarinu na 6- a 8-hydroxymetabolity, jsou inducibilní enzymy prostřednictvím AhR. R-warfarin je také metabolizován polymorfními a široce variabilními izoenzymy P450 CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19 a CYP3A5. Všechna tato fakta poukazují na vysoký potenciál vzniku farmakokinetických lékových interakcí způsobených R-warfarinem, pokud je warfarin podáván jako racemát, a také variabilitu biotransformace S-warfarinu způsobenou R-warfarinem. Nabízí se otázka, zda by použití S-warfarinu společně s genotypizací *CYP2C9 a VKORC1* byla bezpečnější varianta antikoagulační terapie v souvislosti s nepředvídatelnými a nežádoucími farmakokinetickými lékovými interakcemi, než dosavadní používání racemátu warfarinu. Tato hypotéza ovšem vyžaduje další preklinické *in vivo* testy se zvířecími modely, např. myš s knock-outovaným Pxr, než by byla vzata v úvahu pro klinický výzkum a farmakoterapii.

V této studii jsme zkoumali vliv enantiomerů warfarinu a jeho metabolitů v klinicky relevantních koncentracích. Průměrné plazmatické koncentrace R- a S-warfarinu jsou 3,1 a 1,6 μM (Locatelli et al. 2005). V jiné studii byly zjištěny koncentrace v plazmě c_{max} R- a S-warfarinu 2,9 a 2,8 μM (McAleer et al. 1997). Maximální plazmatické koncentrace 10- a 7-hydroxymetabolitů dosahují hodnot 1,5 μM (Locatelli et al. 2005). Předpokládáme tedy, že po perorálně podané jednotlivé dávce může být koncentrace enantiomerů warfarinu v hepatocytech dostatečná k tomu, aby vyvolala indukci enzymů cytochromu P450. Vycházíme z faktu, že léčiva dosahují po perorálním podání vyšších koncentrací v portální žíle, než systémové cirkulaci (Kwan 1997). Na druhou stranu, metabolity warfarinu pravděpodobně nedosahují dostatečných plazmatických koncentrací, aby byly schopné ovlivnit expresi cílových genů PXR.

7.2 Regulace OCT1 glukokortikoidním receptorem prostřednictvím HNF4α

Transportér OCT1 je exprimován pouze v normálních lidských hepatocytech a jeho exprese je regulována hlavně prostřednictvím HNF4α (Saborowski et al. 2006).

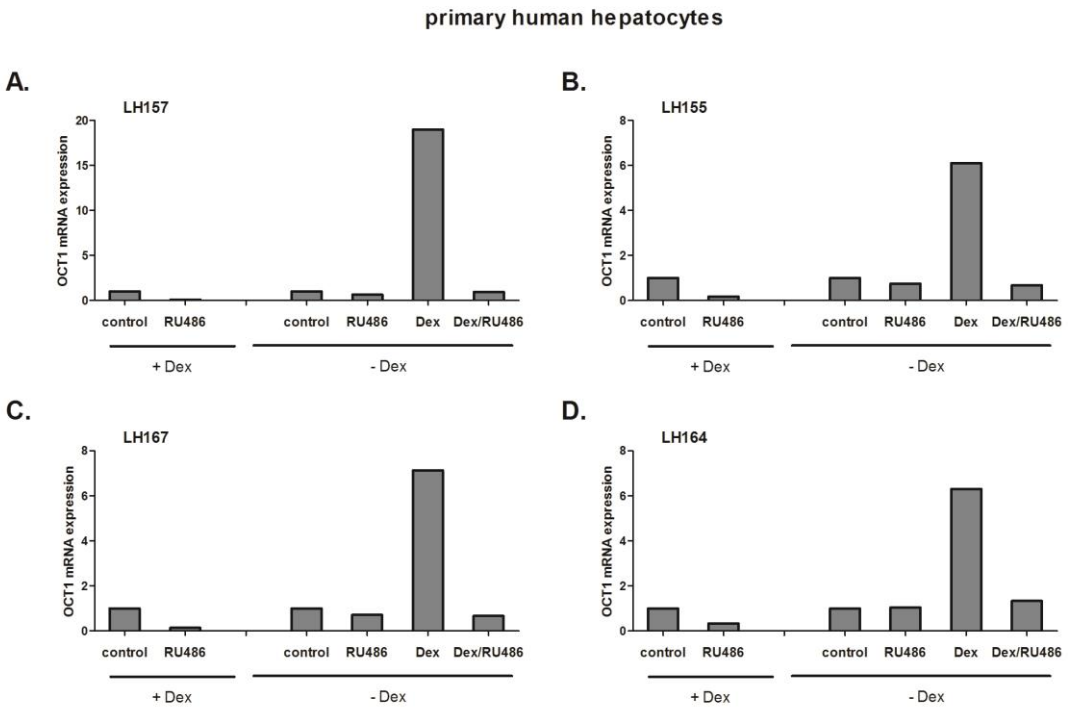
Ve spolupráci s Dr. Lucií Krausovou jsme studovali vliv GR na aktivaci a inhibici HNF4α v kultuře primárních lidských hepatocytů. Vliv aktivace GR na expresi *HNF4α* mRNA už byl popsán. Indukce HNF4α mRNA dexametazonem byla zcela inhibována antagonistou glukokortikoidního receptoru RU486 (Vrzal et al. 2009). Zvýšení exprese *HNF4α* mRNA glukokortikoidy byla popsána v potkaních i v primárních lidských hepatocytech (Onica et al. 2008, Oyadomari et al. 2000), ale

Onica et al. (2008) neprokázali indukci exprese HNF4α na úrovni proteinu. Prokázali jsme indukci exprese HNF4α proteinu v lidských primárních hepatocytech po 48 h inkubace s dexametazonem (Rulcova et al. 2013), což je v rozporu s dříve publikovanými daty (Onica et al. 2008). Tento rozpor může být způsoben interindividuální variabilitou v odpovědi na aktivaci GR.

RNA interference s použitím HNF4α-siRNA ovlivňuje expresi lékových transportérů, z nich nejvíce expresi OCT1 (Kamiyama et al. 2007). Stimulace transkripční aktivity HNF4α by tedy mohla primárně ovlivnit expresi a transport kationtových substrátů do jater. Proto jsme se v této studii zaměřili na otázku, zda glukokortikoidy mohou nepřímo indukovat genovou expresi OCT1 prostřednictvím upregulace HNF4α zprostředkované glukokortikoidním receptorem.

Dexametazon indukuje expresi OCT1 v primárních lidských hepatocytech.

Následující experiment byl proveden ve spolupráci s Dr. Lucií Krausovou. Čtyři kultury primárních lidských hepatocytů byly kultivovány s glukokortikoidem dexametazonem (Dex 100 nM), RU486 (1 μM, mifepriston, antagonista GR), kombinací dexametazonu a RU486, a to buď ve standardním Isom médiu s glukokortikoidy (+Dex médium), nebo v médiu bez glukokortikoidů (-Dex médium). Z obr. 19 je patrné, že RU486 signifikantně potlačil expresi *OCT1* mRNA ve všech čtyřech kulturách primárních lidských hepatocytů kultivovaných ve standardním +Dex médiu. V –Dex médiu dexametazon signifikantně indukoval expresi *OCT1* mRNA, a tato indukce byla potlačena RU486. RU486 samotný neměl žádný efekt na expresi *OCT1* mRNA v primárních lidských hepatocytech kultivovaných v –Dex médiu.



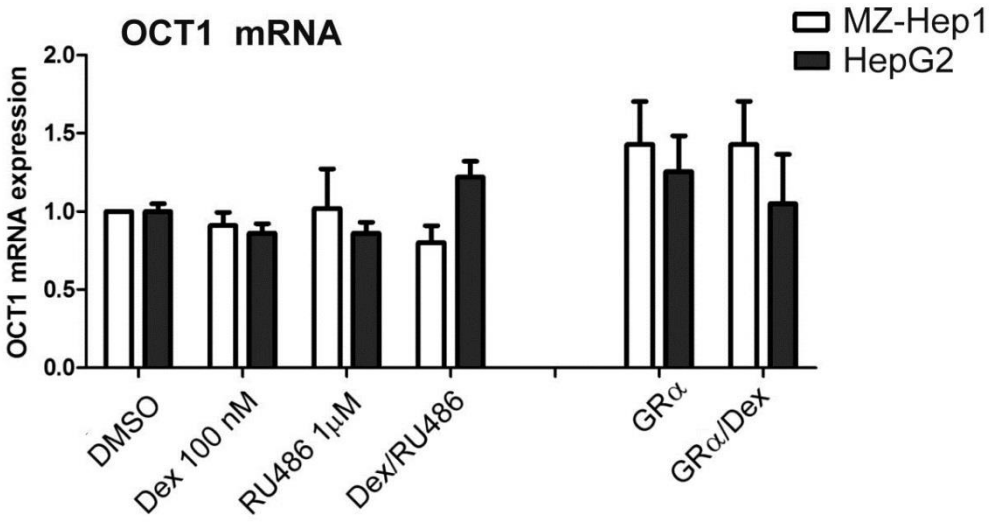
Obr. 19 Vliv dexametazonu na expresi OCT1 mRNA. Čtyři kultury primárních lidských hepatocytů (A-D) byly kultivovány 16 h ve standardním Isom médiu (+Dex médium) nebo v médiu bez dexametazonu (-Dex médium) a následně inkubovány 24 h s 1 μM RU486, 100 nM Dex, kombinací dexametazonu a RU486 nebo 0,1% DMSO. Po inkubaci byla izolována celková RNA a kvantifikace mRNA byla provedena pomocí metody qRT-PCR. Účinky testovaných látek na *OCT1* mRNA jsou vyjádřeny jako násobky exprese mRNA vztažené ke kontrole (buňky kultivované v +Dex médiu a inkubované s 0,1% DMSO). Data reprezentují průměr tří experimentů.

Navíc dexametazon indukoval expresi OCT1 na úrovni proteinu ve třech kulturách primárních lidských hepatocytů (Rulcova et al. 2013)

Dexametazon neindukuje expresi *OCT1* mRNA v buněčných liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu.

V dalších experimentech jsme použili hepatokarcinomové buněčné linie HepG2 a MZ-Hep1. Obě linie byly inkubovány 24 h s dexametazonem (Dex 100 nM), RU486 (1 μM), jejich kombinací nebo 0,1% DMSO. Zjistili jsme, že dexametazon neindukuje

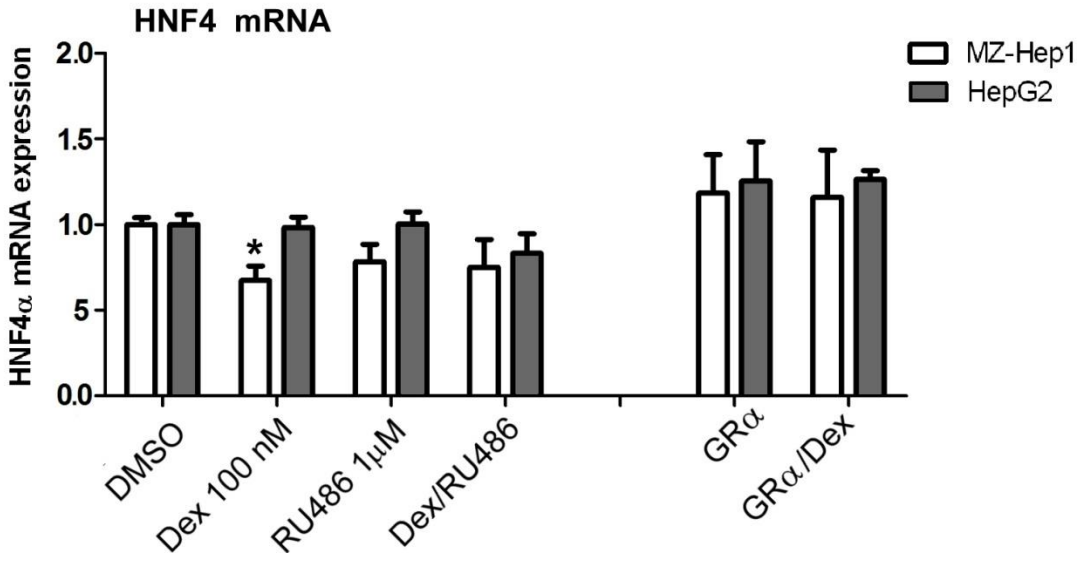
expresi *OCT1* mRNA, ani když jsou HepG2 a MZ-Hep1 buňky transfekovány s GR expresním plazmidem (obrázek 20A). Navíc v buňkách HepG2 neaktivoval dexametazon ani luciferázový reportérový konstrukt obsahující sekvenci (-1649/+102) genu *OCT1* s oběma DR-2 HNF4α responzními elementy, a to ani po kotransfekci s GR expresním plazmidem (obrázek 20B).



Obr. 20 Vliv dexametazonu na expresi OCT1 v buněčných liniích MZ-Hep1 a HepG2. Buňky MZ-Hep1 (A) nebo HepG2 (B) byly v indikovaných případech transfekovány s GRα expresním konstruktem a následně inkubovány 24 h s dexametazonem (Dex, 100 nM), mifepristonem (RU486, 1 μM), kombinací dexametazonu a mifepristonu nebo 0,1% DMSO. Po inkubaci byla izolována celková RNA a kvantifikace mRNA byla provedena pomocí metody qRT-PCR. Účinky testovaných látek na *OCT1* mRNA jsou vyjádřeny jako násobky exprese mRNA vztažené ke kontrole (buňky inkubované s 0,1% DMSO) a nastaveny na hodnotu 1.

Dexametazon neindukuje expresi HNF4α v buněčných liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu.

Buňky linie HepG2 a MZ-Hep1 byly inkubovány s dexametazonem (100 nM), RU486 (1 μM), jejich kombinací, nebo 1% DMSO. V těchto buněčných liniích dexametazon neindukuje *HNF4α* mRNA (obrázek 21). Ani kotransfekce s GR expresním plazmidem neměla vliv na expresi *HNF4α* mRNA.



Obr. 21 Vliv dexametazonu na expresi HNF4α v buněčné linii MZ-Hep1 a HepG2. Buňky Mz-Hep1 (A) nebo HepG2 (B) byly v indikovaných případech transfekovány s GRα expresním konstruktem a následně inkubovány 24 h s dexametazonem (Dex, 100 nM), mifepristonem (RU486, 1 μM), kombinací dexametazonu a mifepristonu nebo 0,1% DMSO. Po inkubaci byla izolována celková RNA a kvantifikace mRNA byla provedena pomocí metody qRT-PCR. Účinky testovaných látek na *HNF4α* mRNA jsou vyjádřeny jako násobky exprese mRNA vztažené ke kontrole (buňky inkubované s 0,1% DMSO) a nastaveny na hodnotu 1.

Nepozorovali jsme vliv dexametazonu na reportérový luciferázový plazmid s HNF4α responzivními elementy transfekovaný do HepG2 a MZ-Hep1 buněk. Dexametazon neovlivnil expresi HNF4α na úrovni proteinu ani v jedné z obou linií (Rulcova et al. 2013).

Rozdíly ve vlivu dexametazonu na expresi OCT1 v lidských primárních hepatocytech a hepatokarcinomových liniích, může být způsoben epigenetickým silencingem OCT1 v těchto liniích. Schaeffeler et al. (2011) zjistili, že metylace OCT1 promotoru v hepatocelulárním karcinomu je zvýšená v porovnání s normálními hepatocyty. Metylace promotoru OCT1 by mohla potlačit jeho transaktivaci prostřednictvím GR, nicméně žádná studie epigenetickou regulaci OCT1 v hepatokarcinomových liniích nepopisuje. Jiným vysvětlením by mohly být rozdíly v signálních kaskádách v normálních hepatocytech a hepatokarcinomových liniích, které mohou mít vliv na aktivitu transkripčních faktorů zahrnutých v regulaci OCT1.

Na základě těchto výsledků lze říci, že v 1,7 kb promotorové sekvenci *OCT1* genu není žádný funkční GR responzivní element, a OCT1 tedy nejspíš není přímo

transaktivován GR. Nelze ale vyloučit přítomnost GR responzivního elementu v jiných pozicích genu *OCT1*. Souhrnně, data získaná z této studie potvrzují hypotézu, že OCT1 je nepřímo regulován aktivací HNF4α prostřednictvím GR v lidských primárních hepatocytech.

7.3 Hledání ligandů konstitutivního androstanového receptoru ze skupiny chinazolinových derivátů

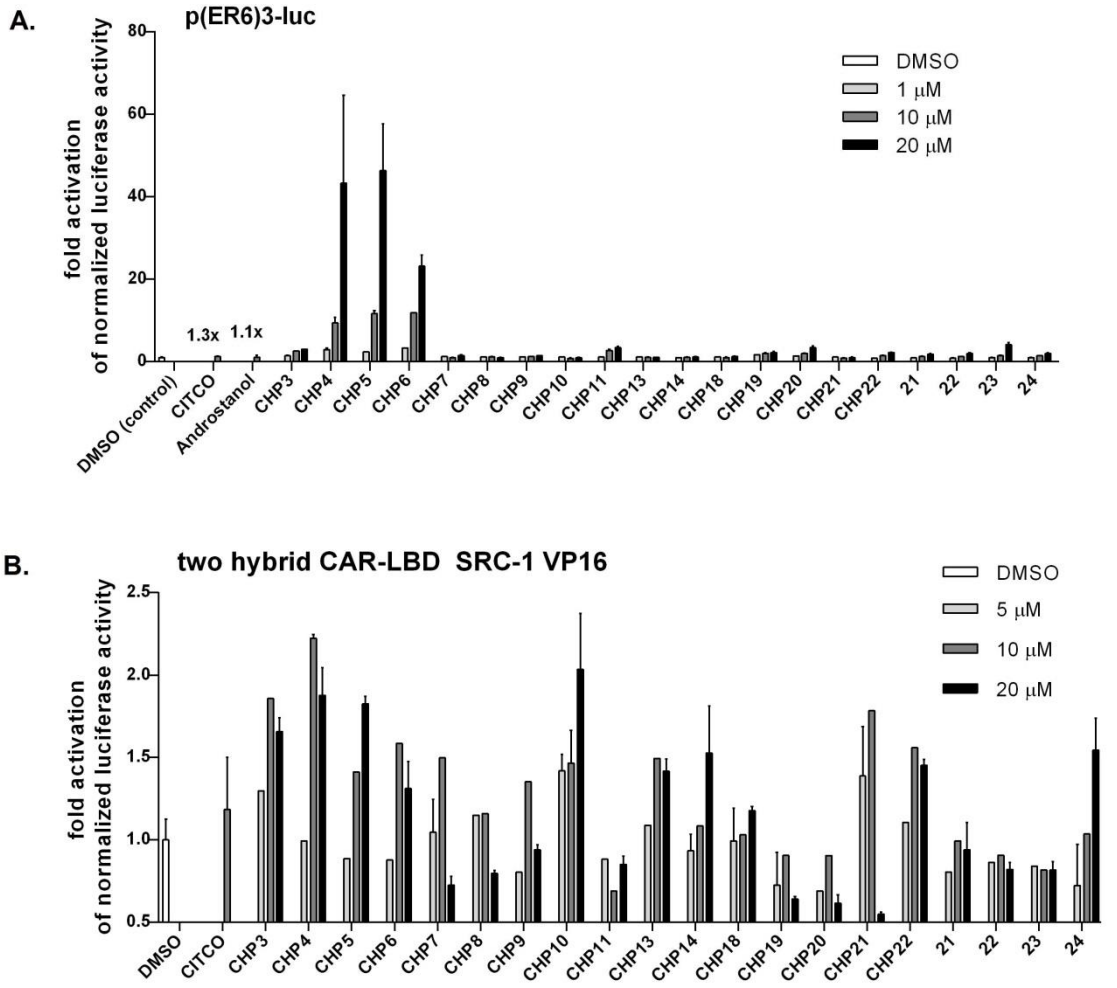
Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je chronické onemocnění charakterizované nekontrolovanou hyperglykemií způsobenou inzulinovou rezistencí v iniciální fázi, následované selháním pankreatických β buněk v pozdějším stádiu. Potlačení jaterní glukoneogeneze je účinná strategie v léčbě DM2. V poslední době se věnuje pozornost cross-talku mezi glukoneogenezí v játrech a PXR a CAR. Např. fenobarbital zlepšuje glykemický profil a zvyšuje citlivost k inzulinu u pacientů s DM2 (Sotaniemi a Karvonen 1989, Gao a Xie 2012). Nedávno byla popsána suprese glukoneogeneze prostřednictvím CAR (Dong et al. 2009, Gao et al. 2009). Metabolický benefit aktivace CARu byl popsán u myšího modelu gestačního diabetu, kde podání agonisty CARu vedlo ke zlepšení glukózové tolerance a gestační hyperglykémie a s ní asociované hypertenze a proteinurie (Masuyama a Hiramatsu 2012). Mechanistickým vysvětlením může být CAR receptorem zprostředkované potlačení klíčových transkripčních faktorů zapojených v glukoneogenezi (Gao a Xie 2012).

K možnému využití potenciálu agonistů CARu v terapii metabolických onemocnění v humánní medicíně je potřeba přesně charakterizovat lidský CAR i jeho biologické funkce. Většina informací o tomto receptoru a jeho vlivu na metabolismus pochází ze studií na myším orthologu Car a ze studií na myších modelech. Funkce myšího a lidského CARu se pravděpodobně v jistých ohledech budou lišit, tak jak je tomu např. i u PXR. Pro studium a charakterizaci lidského CARu je nutné mít možnost použití přímého ligandu, agonisty. V současné době je možnost použít v *in vitro* metodách ke studiu hCARu jeho přímý aktivátor CITCO, tato látka je ale málo aktivní a nevykazuje ideální profil referenční látky (např. nevykazuje klasický profil dávka – účinek). V následující studii jsme provedli screening potenciálních ligandů hCARu ze skupiny nově syntetizovaných chinazolinových derivátů, a látky z užšího výběru jsme podrobili detailnímu studiu jejich interakce s CARem.

Vliv testovaných chinazolinových derivátů na transaktivaci luciferázového reportérového plazmidu obsahujícího ER6 responzivní element prostřednictvím CAR a interakci s LBD CAR

Následující dva experimenty jsme použili jako základní screening pro všechny testované chinazolinové deriváty ke zjištění, zda interagují s CAR receptorem a jeho prostřednictvím transaktivují reportérový plazmid p(ER6)3-tata-luc, obsahující tři sekvence ER6 odvozené z CYP3A4 promotoru s vazebnými místy pro CAR (Obr. 22 A) a zda interagují s LBD CARu (Obr 22 B). Ke studiu, zda testované látky prostřednictvím CAR transaktivují p(ER6)3-tata-luc, jsme použili metodu gene reporter assay (Obr. 22 A). Buňky HepG2 byly transfekovány CAR expresním plazmidem a reportérovým plazmidem p(ER6)3-tata-luc. Po 24 h inkubace s testovanými látkami jsme pozorovali výraznou aktivaci p(ER6)3-tata-luc u látek CHP4, CHP5, CHP6 a CHP12, a to v koncentračně závislém charakteru.

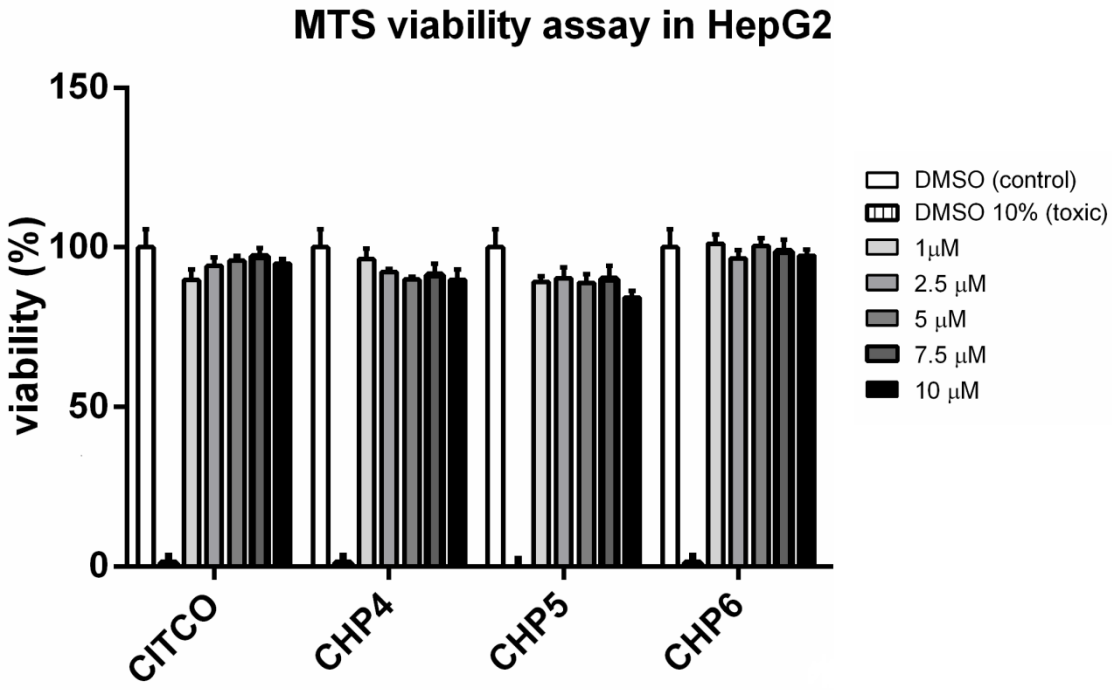
Pomocí metody two-hybrid assay jsme zkoumali interakci testovaných látek s LBD CAR. Do buněk HepG2 byl transfekcí vnesen plazmid kódující fúzní protein GAL4-CAR-LBD, plazmid VP-16-SRC-1 kódující fúzní protein složený z aktivační domény VP-16 a koaktivátoru CARu SRC-1 a reportérový plazmid pGL5-luc. Po 24 h inkubace s testovanými látkami jsme pozorovali aktivaci reportérového plazmidu látkami CHP3, CHP4, CHP5, CHP6, CHP10, CHP12, CHP14, CHP22 a 24. Pro následující experimenty jsme díky výsledkům těchto experimentů vybrali látky CHP4, CHP5, CHP6 a CHP12, které transaktivovaly p(ER6)3-tata-luc reportérový plazmid, a současně interagovaly s LBD CARu.



Obr. 22 Vliv testovaných chinazolinových derivátů na transaktivaci luciferázového reportérového plazmidu obsahujícího ER6 responzivní element prostřednictvím CAR a interakci s LBD CAR. **A**. Buňky HepG2 byly transfekovány pCR3-CAR expresním plazmidem a pER6-luc reportérovým luciferázovým plazmidem. Buňky HepG2 byly inkubovány 24 h s testovanými chinazolinovými deriváty o koncentracích 1, 10 a 20 μM, CITCO nebo androstanolem. **B. Interakce testovaných látek s LBD CAR.** Fúzní expresní konstrukt GAL4-CAR-LBD a fúzní plazmid VP-16-SRC-1byly transfekovány s pG5luc reportérovým plazmidem do buněk HepG2. Buňky byly inkubovány 24 h s testovanými látkami o koncentracích 2, 10 a 20 μM nebo s prototypovým ligandem CAR CITCO. Po inkubaci byly buňky lyzovány a následně analyzována *firefly* a *Renilla* luciferázová aktivita. Data reprezentují průměr ze tří experimentů ± SD a jsou vyjádřena jako násobky aktivace luciferázové aktivity v poměru ke kontrole (0,1% DMSO).

Vliv testovaných chinazolinových derivátů na viabilitu buněk HepG2

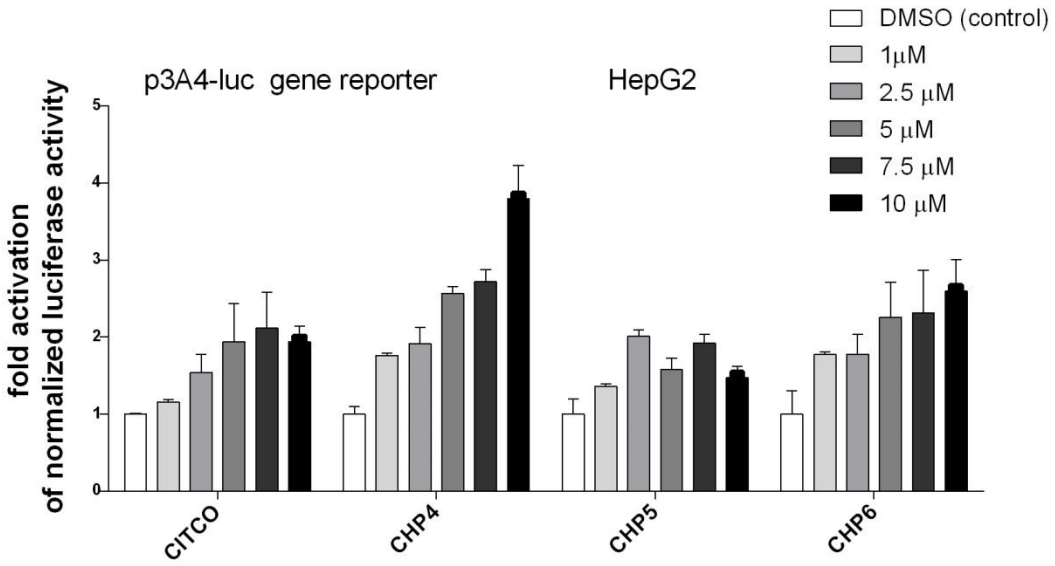
V následujícím experimentu jsme zkoumali, zda testované látky vykazují cytotoxický účinek na buněčné linii HepG2 pomocí MTS testu (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) (obr. 23). Zjistili jsme, že po 24 h expozice testovaných látek ve všech použitých koncentracích nedošlo k významnému poklesu viability buněk. Tyto výsledky naznačují, že testované chinazolinové deriváty nevykazují antiproliferativní nebo cytotoxický účinek v buněčné linii HepG2.



Obr. 23 MTS test viability/cytotoxicity vybraných chinazolinových derivátů v buněčné linii HepG2. Buňky HepG2 byly inkubovány 24 h s chinazolinovými deriváty CHP4, CHP5, CHP6, CHP12 a látkou CITCO v indikovaných koncentracích, 0,1% DMSO a 10% DMSO, které byly použity jako kontroly. Buňky byly inkubovány s MTS (CellTiter96) a podrobeny analýze absorbance. Data reprezentují průměr ze tří experimentů ± SD a vyjadřují viabilitu buněk (100% viabilita pro 0,1% DMSO jako kontrolu).

Transaktivace CYP3A4 luciferázového reportérového konstruktu vybranými chinazolinovými deriváty

Ke zjištění, zda vybrané chinazolinové deriváty transaktivují promotor genu *CYP3A4* prostřednictvím CAR, jsme zvolili metodu gene reporter assay. Do buněk linie HepG2 byl pomocí transfekce vnesen CAR expresní plazmid a *CYP3A4* luciferázový reportérový plazmid (obr. 24). Zjistili jsme, že po 24 hodinové inkubaci CH4 a CH5 aktivují *CYP3A4* promotor výrazněji, než CITCO, a míra aktivace je koncentračně závislá. CH5 vykazuje aktivaci reportérového plazmidu v menší míře.



Obr. 24 Transaktivace p3A4-luc reportérového plazmidu chinazolinovými deriváty prostřednictvím CAR. Buňky linie HepG2 byly transfekovány expresním plazmidem pCR3-CAR, reportérovým plazmidem p3A4-luc a kontrolním plazmidem pRL-TK, použitým k normalizaci transfekce. Buňky byly inkubovány 24 h s vybranými chinazolinovými deriváty a CITCO. Po inkubaci proběhla analýza *firefly* i *Renilla* luciferázy. Data reprezentují průměr tří experimentů ± SD a jsou vyjádřena jako násobky aktivace luciferázové aktivity v poměru ke kontrole (0,1% DMSO).

.

Sestřihová varianta CAR3, na rozdíl od wild type varianty CAR1, vykazuje nižší konstitutivní aktivitu, ale citlivost vůči stejným přímým ligandům CAR1 a navíc není aktivována nepřímými aktivátory typu fenobarbital (Omiecinski et al. 2011).

CAR taktéž vykazuje jedinečné mechanismy aktivace v porovnání s ostatními nukleárními receptory, a to jak translokaci do jádra, tak nukleární aktivaci. Translokace do jádra může být iniciována jak nepřímými aktivátory typu fenobarbital, tak agonisty typu CITCO, takže translokace se považuje za iniciální krok aktivace transkripce prostřednictvím CAR. V intaktních játrech je CAR v nepřítomnosti aktivátoru lokalizován hlavně v cytoplazmě, ale po expozici s látkami typu fenobarbital se akumuluje v jádru (Wang et al. 2004, Li et al. 2008). V imortalizovaných buněčných liniích se CAR akumuluje spontánně v jádru. Přestože translokace není jedinou podmínkou aktivace transkripce regulovanou CARem, do jisté míry spontánní akumulace CARu komplikuje vysvětlení mechanismu aktivace CARu v metodách používajících buněčné linie (Li et al. 2008).

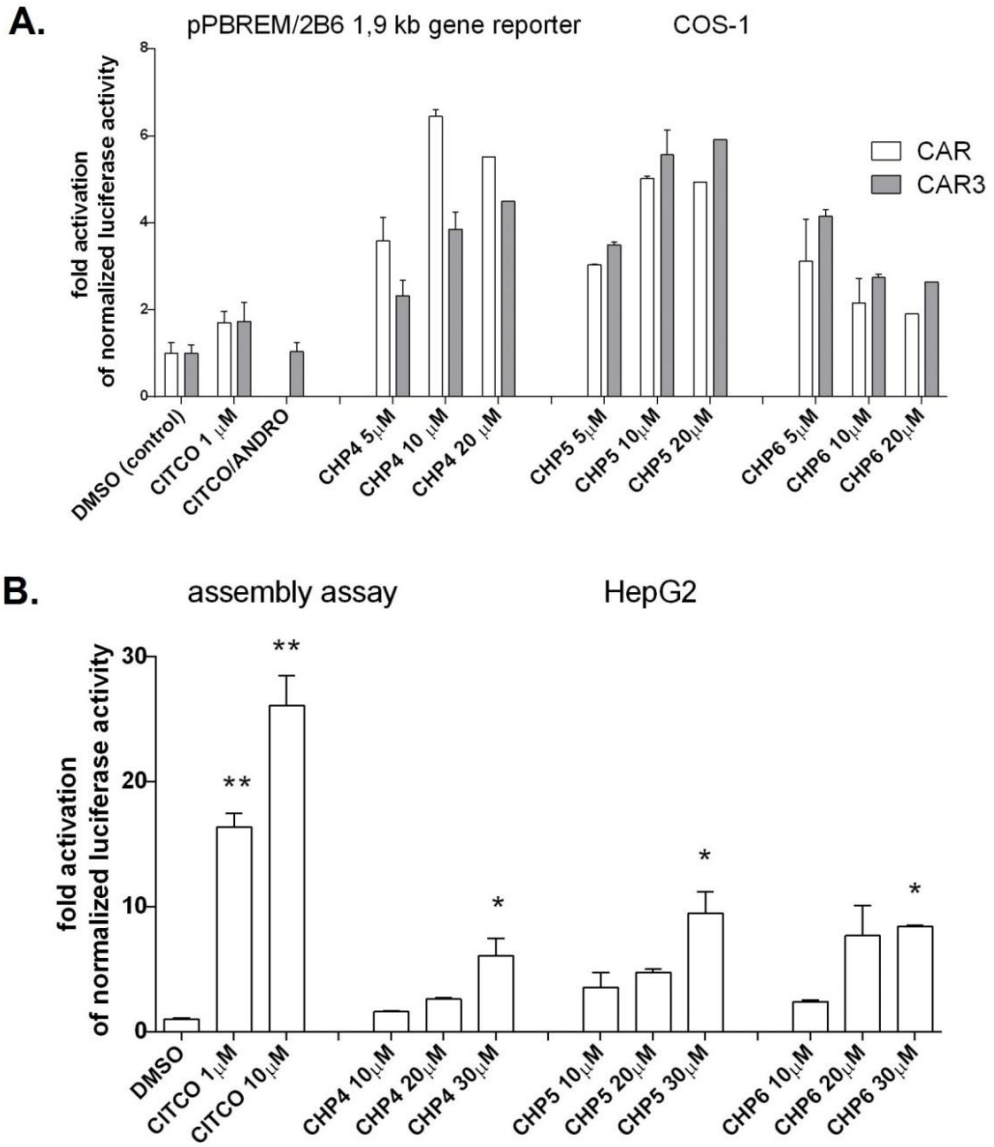
K dalšímu studiu interakce testovaných látek s CARem jsme zvolili metody umožňující studovat interakci testovaných látek s CAR3 sestřihovou variantou, a tzv. „assembly assay“, ve které se do buněk transfekcí vnesou C- a N-terminální regiony CAR LBD a pouze v přítomnosti přímého aktivátoru CAR se tyto domény spojí ve funkční celek schopný aktivace reportérového plazmidu.

Transaktivace pBREM/2B6 luciferázového reportérového konstruktu chinazolinovými deriváty a jejich identifikace jako ligandů CAR

Pro zjištění, zda testované chinazolinové deriváty aktivují CAR přímo nebo nepřímo a jak jeho prostřednictvím transaktivují pBREM/2B6, jsme zvolili CAR1-CAR3 komparativní assay s použitím CAR1 a CAR3 expresních plazmidů transfekovaných do buněk linie COS-1. Na obrázku 25 A je vidět, že po 24 hodinové inkubaci CHP4, CHP5 i CHP6 transaktivují pBREM/2B6 promotor výrazněji, než CITCO, a to prostřednictvím CAR1 i CAR3. CHP6, na rozdíl od CHP4 a CHP5 nevykazuje aktivaci reportérového plazmidu v koncentrační závislosti. Inverzní agonista CARu androstanol v kombinaci s CITCO inhibuje aktivitu CITCO v případě CAR1, ale neinhibuje takto výrazně aktivitu CITCO v případě CAR3.

K potvrzení, že vybrané chinazolinové deriváty aktivují CAR přímo, jsme použili i metodu „assembly assay“, pomocí které jsme zkoumali interakci mezi N- a C-terminálními regiony LBD CAR za přítomnosti testovaných derivátů. Do buněk HepG2 byly transfekcí vneseny expresní plazmid hCAR-N/pBIND kódující fúzní protein GAL4-DNA vazebné domény a N-terminální region CARu, expresní plazmid hCAR-

C/pACT kódující fúzní protein s VP16 aktivační doménou a C-terminálním regionem CARu společně s pG5-luc reportérovým plazmidem. Na obrázku 25 B je vidět, že CHP4, CHP5 i CHP6 v koncentraci 30 μM signifikantně potencují interakci mezi C- a N- terminálními regiony CARu.



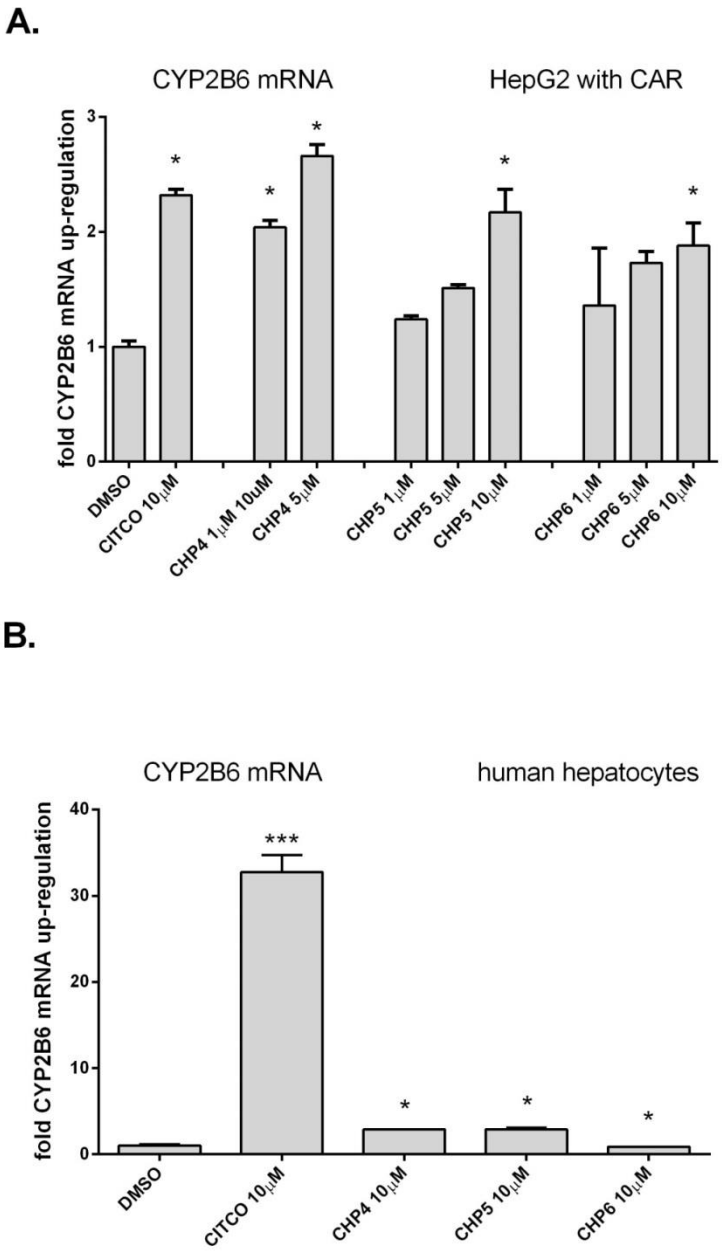
Obr. 25 Identifikace vybraných chinazolinových derivátů jako přímých aktivátorů CAR. ***A.*** Transaktivace pBREM/2B6 reportérového luciferázového plazmidu chinazolinovými deriváty prostřednictvím CAR1 a CAR3 variantami v buněčné linii COS-1. Buňky linie COS-1 byly transfekovány pCR3-CAR nebo pTCMV2-CAR3 expresním plazmidem a pBREM/2B6-luc reportérovým plazmidem. Buňky byly inkubovány 24 h s vybranými chinazolinovámi deriváty v indikovaných koncentracích CITCO nebo kombinací CITCO s androstanolem. ***B.*** Ligand dependentní interakce chinazolinových derivátů mezi N- a C-terminálními regiony LBD CAR.

Buňky linie HepG2 byly transfekovány expresními plazmidy hCAR-C/pACT a hCAR-N/pBIND a pG5-luc reportérovým plazmidem. Buňky byly inkubovány 24 h s vybranými chinazolinovými deriváty v indikovaných koncentracích a 1 a 10 μM CITCO. Po inkubaci byly buňky lyzovány a proběhla analýza *firefly* i *Renilla* luciferázové aktivity. Data reprezentují průměrné hodnoty ± SD tří experimentů a jsou prezentována jako násobky aktivace luciferázové aktivity v poměru ke kontrole (0,1% DMSO). *P<0,05, **P<0,01.

Vliv testovaných chinazolinových derivátů na expresi *CYP2B6* mRNA v buněčné linii HepG2 a v kultuře primárních lidských hepatocytů

V těchto experimentech jsme se zaměřili na studium CHP4, CHP5 a CHP6 na expresi *CYP2B6* mRNA v buněčné linii HepG2 a v primárních lidských hepatocytech pomocí metody qRT-PCR. Buňky HepG2 byly transfekovány CAR expresním plazmidem. Po 24 h inkubaci s CHP4 lze pozorovat signifikantní indukci *CYP2B6* mRNA v koncentracích 1 i 5 μM, zatímco CHP5 a CHP6 signifikantně indukovaly *CYP2B6* mRNA pouze v koncentraci 10 μM (Obr. 26 A).

V experimentu, ve kterém byla použita kultura lidských primárních hepatocytů, jsme u látek CHP4, CHP5 i CHP6 v koncentraci 10 μM pozorovali signifikantní indukci *CYP2B6* mRNA (Obr. 26 B).



Obr. 26 Vliv testovaných derivátů chinazolinu na expresi *CYP2B6* mRNA v buněčné linii HepG2 a kultuře lidských primárních hepatocytů. A. Buňky linie HepG2 byly transfekovány expresním plazmidem pCR3-hCAR. HepG2 (A) a primární lidské hepatocyty (B) byly 24 h inkubovány s vybranými chinazolinovými deriváty v indikovaných koncentracích a látkou CITCO o koncentraci 10 μM. Po inkubaci byla izolována celková RNA a kvantifikace mRNA byla provedena pomocí metody qRT-PCR. Účinky testovaných látek na *CYP2B6* mRNA jsou vyjádřeny jako násobky exprese mRNA vztažené ke kontrole (buňky inkubované s 0,1% DMSO). Data reprezentují průměr tří experimentů ± SD. * P<0,05, *** P<0,001.

Studie zabývající se aktivací CARu poukazují na jeho benefit v charakteristických znacích metabolického syndromu, včetně hyperglykémie, dyslipidémie i hypertenze, což poukazuje na žádané vlastnosti aktivace CARu jako potenciálního terapeutického cíle v metabolických onemocněních. Je ale nutné vzít v potaz otázku bezpečnosti aktivátorů CARu z hlediska terapie metabolických chorob. Aktivace CARu fenobarbitalem nebo jeho derivátem TCPOBOP u myší zvyšuje jaterní toxicitu paracetamolu (Zhang et al 2002). Aktivace CARu také vede k jaterní hyperplazii (Gao a Xie 2012). Zatím není známo, zda je možné metabolický benefit aktivace CARu oddělit od jeho nežádoucích účinků. Mnoho chemických látek obsažených v bylinných přípravcích a polyfenoly v alkoholických nápojích aktivují CAR přímo nebo nepřímo (Chang 2009, Li et al. 2009, Yao et al. 2010), a většina z nich je používána bez zjevné toxicity (Gao a Xie 2012).

Vzhledem k tomu, že role CAR v regulaci léčiv metabolizujících enzymů je prozkoumána na vyšší úrovni, je nasnadě otázka vzniku potenciálních farmakokinetických lékových interakcí aktivátorů CAR se současně podanými léčivy. Další nezbytnou součástí studia aktivátorů CAR bude také testování jejich vlivu na indukci exprese enzymů I a II fáze biotransformace.

8 Závěr

Tato dizertační práce v obecné části shrnuje současné poznatky z oblasti biotransformace xenobiotik, popisuje roli nukleárních receptorů v regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů, jejich roli v metabolismu lipidů a glukózy a věnuje se i lékovým transportérům.

V první části experimentální části dizertační práce, zabývající se studiem stereoselektivních interakcí enantiomerů warfarinu s PXR a následným ovlivněním genové regulace nejdůležitějších metabolických enzymů jsme zjistili, že R-warfarin je ligandem PXR a jeho prostřednictvím indukuje expresi CYP3A4 a CYP2C9 na úrovni mRNA v lidských primárních hepatocytech. Naopak farmakodynamicky aktivnější S enantiomer vykazuje nižší afinitu k PXR a méně účinně transaktivuje cílové geny PXR. Dále jsme ukázali, že racemické 10-, 4´- a 7-hydroxywarfariny indukují expresi *CYP3A4* a *CYP2C9* mRNA v lidských primárních hepatocytech, a také aktivují CYP3A4 luciferázový reportérový konstrukt v buněčné linii HepG2.

Většina chirálních léčiv se v praxi používá jako racemická směs dvou nebo více diastereoizomerů, které mohou vykazovat rozdílné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. V naší studii jsme ukázali vůbec první příklad, kdy mají enantiomery široce používaného léčiva rozdílnou schopnost aktivovat PXR, důležitý regulátor biotransformačních enzymů. Předpokládáme velký potenciál R-warfarinu a jeho metabolitů způsobovat farmakokinetické lékové interakce a navíc ovlivnit metabolismus S-warfarinu. Nabízí se otázka, zda R-warfarin není jen „enantiomerní zátěž“ v terapii warfarinem.

V experimentální části věnující se studiu regulace organického kationtového transportéru OCT1, jsme zjistili, že OCT1 je transaktivován prostřednictvím upregulace HNF4α glukokortikoidním receptorem v primárních lidských hepatocytech, zatímco v modelových hepatokarcinomových liniích HepG2 a MZ-Hep1 GR neovlivnil expresi OCT1 ani HNF4α. Rozdíly ve vlivu dexametazonu na indukci genové exprese OCT1 v primárních lidských hepatocytech a hepatokarcinomovými liniemi může způsobovat epigenetický silencing OCT1 v hepatokarcinomových liniích nebo vliv odlišných signálních kaskád v normálních hepatocytech a hepatokarcinomových liniích na aktivitu transkripčních faktorů podílejících se na regulaci OCT1.

V této studii jsme zjistili, že dexametazon má signifikantní vliv na indukci OCT1 na úrovni mRNA i proteinu v lidských primárních hepatocytech, ale OCT1 promotor v reportérovém konstruktu přímo transaktivován dexametazonem nebyl. V 1,7

kb promotorové sekvenci *OCT1* genu tedy není žádný funkční GR responzivní element, a OCT1 tedy nejspíš není přímo transaktivován GR, ale nelze vyloučit přítomnost GR responzivního elementu v jiných pozicích promotoru OCT1.

Lze tedy shrnout, že gen *SLC22A1* kódující jaterní transportér OCT1 je transaktivován glukokortikoidy prostřednictvím HNF4α v primárních lidských hepatocytech, ale ne v hepatokarcinomových buněčných liniích. Zjištění vlivu glukokortikoidů na akumulaci substrátů OCT1 v játrech, i na další geny regulované HNF4α vyžaduje další studie.

Poslední část experimentální části se zabývá hledáním ligandů konstitutivního androstanového receptoru ze skupiny chinazolinových derivátů. 20 nově nasyntetizovaných derivátů chinazolinu jsme nejprve podrobili testu, zda transaktivují reportérový promotor obsahující tři sekvence ER6 odvozené z CYP3A4 promotoru s vazebnými místy pro CAR a také jsme zkoumali, zda interagují s LBD CAR pomocí metody two-hybrid assay provedené na buňkách HepG2. Do dalších experimentů jsme vybrali tři látky (CHP4, CHP5 a CHP6) a zjistili jsme, že transaktivují CYP3A4 promotor v buňkách HepG2 prostřednictvím CAR, transaktivují pBREM/2B6 promotor v buňkách COS-1 prostřednictvím CAR1 i CAR3 sestřihové varianty, která je aktivována pouze přímými ligandy. Pomocí metody two-hybrid assay jsme také zjistili, že CHP4, CHP5 i CHP6 signifikantně potencují interakci mezi N- a C- terminálními regiony CAR LBD v buňkách HepG2, čehož jsou schopny jen přímé aktivátory CAR. V buňkách HepG2 transfekovaných CAR expresním plazmidem, i primárních lidských hepatocytech jsme pozorovali signifikantní indukci *CYP2B6* mRNA po 24 h inkubaci s testovanými látkami. Souhrnem, tři chinazolinové deriváty CHP4, CHP5 a CHP6 jsou přímé aktivátory CAR, přičemž látka CHP4 vykazuje některé vlastnosti (např. profil indukce v závislosti dávka – účinek) lepší než modelová látka CITCO.

Role CAR v organizmu není zatím zcela objasněna pravděpodobně díky nedostatku dobrých modelů a ligandů tohoto receptoru. Nalezení modelového ligandu CAR s lepšími vlastnostmi, než dosud používané CITCO, by mohlo pomoci lépe prostudovat funkce tohoto receptoru.

9 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

První autor

P1) **Rulcova A**., Prokopova I., Krausova L., Bitman M., Vrzal R., Dvorak Z., Blahos J., Pavek P. Stereoselective interactions of warfarin enantiomers with the pregnane X nuclear receptor in gene regulation of major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *J. Thromb. Haemost*., 2010, roč. 8, č. 12, s. 2708-17 (IF_{2009} 6,069)

P2) **Rulcova A**., Krausova L., Smutny T., Vrzal R., Dvorak Z., Jover R., Pavek P. Glucocorticoid receptor regulates organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) expression via HNF4α up-regulation in primary human hepatocytes. *Pharmacol. Rep*., [přijato k publikaci] 2013 (IF_{2012} 1,965)

Spoluautor

S1) Stejskalova L., Vrzal R., **Rulcova A**., Dvorak Z., Pavek P. Effects of glucocorticoids on cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) expression in isolated human placental trophoblast. *J. Appl. Biomed.*, 2013, roč. 11, č. 3, s. 163-172 (IF_{2012} 0,978)

Posterové prezentace a abstrakty publikované ve sbornících

1) **Rulcova A**., Prokopova I., Svecova L, Bitman M, Vrzal R, Dvorak Z., Blahos J., Pavek P. *Stereospecific interactions of warfarin enantiomers with pregnane X receptor in CYP3A4 gene regulation*, 60. farmakologické dny, 15.-17. září 2010, Hradec Králové

2) Blahos J., Kumpost J., Hrubos O., D. Frankova D., Hajkova A., Techlovska S., **Rulcova A**. *Relationship between metabotropic glutamate receptor 1 splice variants*, 60. farmakologické dny, 15.-17. září 2010, Hradec Králové

3) Blahos J., Kumpost J., Hrubos O., Frankova D., Hajkova A., Techlovska S., **Rulcova A**., Prezeau L., Pin J.P. *Relationship between metabotropic glutamate*

receptor 1 splice variants, Program No. 643.5/F6 2010 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online

4) **Rulcova A**., Krausova L., Pavek P. *The Human Organic Cation Transporter 1 Gene Transactivation by Glucocorticoid Receptor,* MDO ISSX (19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting), 17.-21. června 2012, Nizozemsko, Noordwijk aan Zee

5) Smutny T., **Rulcova A**., Pavek P. Complex *Effects of Dietary Phytochemical Sulforaphane on CYP3A4 Gene Expression*, MDO ISSX (19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting), 17.-21. června 2012, Nizozemsko, Noordwijk aan Zee

6) Hájková A., Techlovská Š., Rafferty N., **Rulcová A**., Kumpošt J., Franková D., Dvořáková M., Blahoš J. *Heterodimerizace sestřihových variant metabotropního glutamátového receptoru 1*, Vědecká konference 2. lékařské fakulty, 28.-29. března 2012, Praha

7) **Rulcová A**., Nekvindová J., Grim J., Pávek P. *Pharmcogenetics of UGT1A1 and SLCO1B1 genes in the treatment of colorectal cancer with irinotecan*, 2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, 31. Ledna – 1. Února 2012, Hradec Králové

10 Seznam použité literatury

Allard S.T.M, Kopish K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell notes*, 2008, roč. 21, s. 23-6

Auerbach S.S. Ramsden R., Stoner M.A., Verlinde C., Hassett C., Omiecinski C.J. Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor. *Nucleic Acids Res*., 2003, roč. 31, č. 12, s. 3194-207

Adcock I.M., Ito K., Barnes P.J. Glucocorticoids: effects on gene transcription. *Proc. Am. Thorac. Soc.,*. 2004, roč. 1, č.3, s. 247-54

Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev*., 2005, roč. 11, s. 127-52

Burk O., Arnold K.A., Nussler A.K., Schaeffeler E., Efimova E., Avery B.A., Avery M.A., Fromm M.F., Eichelbaum M. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2005, roč. 67, č. 6, s. 1954-65

Cerveny L., Svecova L., Anzenbacherova E., Vrzal R., Staud F., Dvorak Z., Ulrichova J., Anzenbacher P., Pavek P. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab. Dispos*., 2007, roč. 35, č. 7, s. 1032-41

Cole T.J., Blendy J.A., Monaghan A.P., Krieglstein K., Schmid W., Aguzzi A., Fantuzzi G., Hummler E., Unsicker K., Schütz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.*, 1995, roč. 9, č. 13, s. 1608-21

Crettol S., Petrovic N., Murray M. Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr. Pharm. Des.*., 2010, roč. 16, č. 2, s.204-19

DeKeyser J.G., Stagliano M.C., Auerbach S.S., Prabhu K.S., Jones A.D., Omiecinski C.J. Di(2-ethylhexyl) phtalate is highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant, CAR2. *Mol. Pharmacol*., 2009, roč. 75, č. 5, s. 1005-13

Didenko V.V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 2001, roč. 31, č. 5, s. 1106-16

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

Dong B., Saha P.K., Huang W., Chen W., Abu-Elheiga L.A., Wakil S.J., Stevens R.D., Ilkayeva O., Newgard C.B., Chan L., Moore D.D. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A*., 2009, roč. 106, č. 44, s. 18831-6

El-Sankary W., Bombail V., Gibson G.G., Plant N. Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metab. Dispos*., 2002, roč. 30, č. 9, s. 1029-34

Flockhart D.A. a Rae J.M. Cytochrome P450 3A pharmacogenetics: the road that needs traveled. *Pharmacogenomics J*., 2003, roč. 3, č. 1, s. 3-5.

Francis G.A., Fayard E., Picard F., Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev. Physiol*., 2003, roč. 65, s. 261-311

Gene expression, qPCR array service. In: *web Bioneer*. 2013. Dostupné na URL: http://eng.bioneer.com/products/GeneExpression/qPCRArrayService-detection.aspx. Přístup 28. 72 2013

Gao J., He J, Zhai Y., Wada T., Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem*., 2009, roč. 284, č. 38, s. 25984-92

Gao J., Xie W. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases. Trends Pharmacol. Sci., 2012, roč. 33, č. 10, s. 552-8

Gerbal-Chaloin S., Daujat M., Pascussi J.M., Pichard-Garcia L., Vilarem M.J., Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem*., 2002, roč. 277, č. 1, s. 209-17

Gross K.L., Cidlowski J.A. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab*., 2008, roč. 19, č. 9, s. 331-9

Guengerich F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.*, 2006, roč. 8, č. 1, s. 101-11

Harmsen S., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H. The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treat. Rev.*, 2007, roč. 33, č. 4, s. 369-80

Hayashi R., Wada H., Ito K., Adcock I.M. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol*., 2004, roč. 500, č. 1-3, s. 51-62

Hustert E., Zibat A., Presecan-Siedel E., Eiselt R., Mueller R., Fuss C., Brehm I., Brinkmann U., Eichelbaum M., Wojnowski L., Burk O. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.*, 2001; roč. 29, č. 11, s. 1454-9

Chang T.K. Activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines. *AAPS J*., 2009, roč. 11, č. 3, s. 590-601

Charmandari E., Kino T. Novel causes of generalized glucocorticoid resistance. *Horm. Metab. Res*., 2007, roč. 39, č. 6, s.445-50

Charmandari E., Kino T., Chrousos G.P. Familial/sporadic glucocorticoid resistance: clinical phenotype and molecular mechanisms. *Ann. N Y Acad. Sci*., 2004, roč. 1024, s. 168-81

Chen C., Yu R., Owuor E.D., Kong A.N. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch. Pharm. Res*., 2000, roč. 23, č. 6, s. 605-12

Chen Y., Ferguson S.S., Negishi M., Goldstein J.A. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther*., 2004, roč. 308, č. 2, s. 495-501

Chen Y, Kissling G, Negishi M, Goldstein JA. The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4alpha to synergistically activate the human CYP2C9 promoter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, roč. 314, č. 3, s. 1125-33

Invitrogen manual, LipofectamineTM 2000. In: *web Invitrogen, Life Technologies*. 2005. Dostupné na URL: http://tools.invitrogen.com/Content/SFS/ProductNotes/F_Lipofectamine%202000b-040923-RD-MKT-TL-HL050602.pdf. Přístup 28.7.2013

Jenkins B.D., Pullen C.B., Darimont B.D. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab*., 2001, roč. 12, č. 3, str. 122-6

Jones D.R., Kim S.Y., Guderyon M., Yun C.H., Moran J.H., Miller G.P. Hydroxywarfarin metabolites potently inhibit CYP2C9 metabolism of S-warfarin. *Chem. Res. Toxicol*., 2010 roč., 23, č. 5, s. 939-45

Jonat C., Rahmsdorf H.J., Park K.K., Cato A.C., Gebel S., Ponta H., Herrlich P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 1990, roč. 62, č.6, s. 1189-204

Kaminsky L.S., Zhang Z.Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol. Ther*., 1997, roč. 73, č. 1, s. 67-74

Kamiyama Y., Matsubara T., Yoshinari K., Nagata K., Kamimura H., Yamazoe Y. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes

and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2007, roč. 22, č. 4, s. 287-98

Kast H.R., Goodwin B., Tarr P.T., Jones S.A., Anisfeld A.M., Stoltz C.M., Tontonoz P., Kliewer S., Willson T.M., Edwards P.A. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.*, 2002, roč. 277, č. 4, s. 2908-15

Kerb R., Brinkmann U., Chatskaia N., Gorbunov D., Gorboulev V., Mornhinweg E., Keil A., Eichelbaum M., Koepsell H.. Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*., 2002, roč. 12, č. 8, s. 591-5

Kim R.B. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur. J. Clin. Invest*., 2003, roč. 33, Suppl. 2, s. 1-5

Kliewer S.A., Goodwin B., Willson T.M. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Rev*., 2002, roč. 23, č. 5, s. 687-702

Kodama S., Koike C., Negishi M., Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell Biol*., 2004, roč. 24, č. 18, s. 7931-40

Koehler M.R., Wissinger B., Gorboulev V., Koepsell H., Schmid M. The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1997, roč. 79, č. 3-4, s. 198-200

Koepsell H., Lips K., Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res*., 2007 roč. 24, č. 7, s. 1227-51

Köhle C., Bock K.W. Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, roč. 77, č. 4, s. 689-99

Koyano S., Kurose K., Saito Y., Ozawa S., Hasegawa R., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Nakajima T., Matsumoto K., Akasawa A., Saito H., Sawada J.. Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region. *Drug Metab. Dispos.*, 2004; roč. 32, č. 1, s. 149-54

Kwan K.C. Oral bioavailability and first-pass effects. *Drug Metab. Dispos*, 1997, roč. 25, č. 12, s. 1329-36

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*., 2004, roč. 311, č. 2, s. 811-21

Li L., Chen T., Stanton J.D., Sueyoshi T., Negishi M., Wang H. The peripheral benzodiazepine receptor ligand 1-(2-chlorophenyl-methylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide is a novel antagonist of human constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2008, roč. 74, č. 2, s. 443-53

Li L., Stanton J.D., Tolson A.H., Luo Y., Wang H. Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways. *Pharm. Res.*, 2009, roč. 26, č. 4, s. 872-82

Li H., Wang H. Activation of xenobiotic receptors: driving into the nucleus. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*., 2010, roč. 6, č. 4, s. 409-26

Lim Y.P., Huang J.D. Interplay of pregnane X receptor with other nuclear receptors on gene regulation. *Drug Metab. Pharmacokinet*., 2008, roč. 23, č. 1, s. 14-21

Lin Y.S., Yasuda K., Assem M., Cline C., Barber J., Li C.W., Kholodovych V., Ai N., Chen J.D., Welsh W.J., Ekins S., Schuetz E.G. The major human pregnane X receptor (PXR) splice variant, PXR.2, exhibits significantly diminished ligand-activated transcriptional regulation. *Drug Metab. Dispos*., 2009, roč. 37, č. 6, s. 1295-304

Locatelli I., Kmetec V., Mrhar A., Grabnar I. Determination of warfarin enantiomers and hydroxylated metabolites in human blood plasma by liquid chromatography with achiral and chiral separation. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*., 2005, roč. 818, č. 2, s. 191-8

Ma X., Idle J.R., Gonzalez F.J. The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2008, roč. 4, č. 7, s. 895-908

Malakova J., Pavek P., Svecova L., Jokesova I., Zivny P., Palicka V. New high-performance liquid chromatography method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin using chiral separation on a glycopeptide-based stationary phase. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*., 2009, roč. 877, č. 27, s. 3226-30

Masuyama H., Hiramatsu Y. Treatment with constitutive androstane receptor ligand during pregnancy prevents insulin resistance in offspring from high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2012, roč. 303, č. 2, s. E293-300

McAleer S.D., Foondun A.S., Feely M., Chrystyn H. Steady-state clearance rates of warfarin and its enantiomers in therapeutically dosed patients. *Chirality*, 1997, roč. 9, č. 1, s. 13-6

Miao J., Fang S., Bae Y., Kemper J.K. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.*, 2006, roč. 281, č. 21, s. 14537-46

Mičuda S., Fuksa L., Brčáková E., Cermanová J., Geršl V. Molekulárně biologické metodiky ve frmakologii. In: web Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. 2007. Dostupné na URL: http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/mRNA.htm. Přístup 26.7.2013

Miller G.P., Jones D.R., Sullivan S.Z., Mazur A., Owen S.N., Mitchell N.C., Radominska-Pandya A., Moran J.H. Assessing cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase

contributions to warfarin metabolism in humans. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, roč. 22, č. 7, s. 1239-45

Miners J.O., Birkett D.J. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol*., 1998, roč. 45, č. 6, s. 525-38

Mizuno N., Niwa T., Yotsumoto Y., Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol. Rev*., 2003, roč. 55, č. 3, s. 425-61

Modrek B., Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet*., 2002, roč. 30, č. 1, s. 13-9

Moore J.T., Moore L.B., Maglich J.M., Kliewer S.A. Functional and structural comparison of PXR and CAR. *Biochim. Biophys. Acta*., 2003, roč. 1619, č.3, s. 235-8

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*., 2000, roč. 275, č. 20, s.15122-7

Moreau A., Vilarem M.J., Maurel P., Pascussi J.M. Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Mol. Pharm*., 2008, roč. 5, č. 1, s. 35-41

Müller F., Fromm M.F. Transporter-mediated drug-drug interactions. *Pharmacogenomics*, 2011, roč. 12, č. 7, s. 1017-37

Nagy L., Schwabe J.W. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci*., 2004, roč. 29, č. 6, s. 317-24

Necela B.M., Cidlowski J.A. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc. Am. Thorac. Soc*., 2004, roč. 1, č. 3, s. 239-46

Nies A.T., Koepsell H., Damme K., Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2011, č. 201, s. 105-67

Huevel J.V., Nuclear receptor resource. In: *Nuclear receptor resource web*. 2013. Dostupné na URL: http://nrresource.org/general_information/general_information.html. Přístup 24.7.2013

Oakley R.H., Jewell C.M., Yudt M.R., Bofetiado D.M., Cidlowski J.A. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Bio.l Chem.*, 1999, roč. 274, č. 39, s. 27857-66

Omiecinski C.J., Coslo D.M., Chen T., Laurenzana E.M., Peffer R.C. Multi-species analyses of direct activators of the constitutive androstane receptor. *Toxicol. Sci*., 2011 , roč. 123, č. 2, s. 550-62

Onica T., Nichols K., Larin M., Ng L., Maslen A., Dvorak Z., Pascussi J.M., Vilarem M.J., Maurel P., Kirby G.M. Dexamethasone-mediated up-regulation of human CYP2A6 involves the glucocorticoid receptor and increased binding of hepatic nuclear factor 4 alpha to the proximal promoter. *Mol. Pharmacol*., 2008, roč. 73, č. 2, s. 451-60

Oyadomari S., Matsuno F., Chowdhury S., Kimura T., Iwase K., Araki E., Shichiri M., Mori M., Takiguchi M. The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver. *FEBS Lett*., 2000, roč. 478, č. 1-2, s. 141-6

Pascussi J.M., Robert A., Moreau A., Ramos J., Bioulac-Sage P., Navarro F., Blanc P., Assenat E., Maurel P., Vilarem M.J. Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms. *Hepatology*, 2007, roč. 45, č. 5, s. 1146-53

Pávek P., Červený L., Mičuda S., Štaud F., Novotná-Čečková M., Fendrich Z. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí, *Remedia*, 2005, roč. 15, č. 4-5, s. 380-83

Pavek P., Cerveny L., Svecova L., Brysch M., Libra A., Vrzal R., Nachtigal P., Staud F., Ulrichova J., Fendrich Z., Dvorak Z. Examination of Glucocorticoid receptor alpha-mediated transcriptional regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 genes in placental trophoblast cell lines. *Placenta*, 2007, roč. 28, č. 10, s. 1004-11

Pfaffl M.W., Relative quantification. In *Real-time PCR*, International University Line, 2006. Kapitola 3, s. 63-82

Plant N. The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, roč. 1770, č. 3, s. 478-88

Promega, CheckMate™/Flexi Vector Mammalian Two-Hybrid System, Technical Manual, 2009

Promega, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Technical Bulletin, 2012

Průša R., *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*, 1. vydání, Praha: 2. lékařská fakulta a Lambda Bio-Med spol s.r.o., 1997, 45 s.

Raclavský V., Metody molekulární genetiky. In: *web Univerzity Palackého v Olomouci*. 2004. Dostupné na URL: http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm. Přístup 24.7.2013

Rettie A.E., Tai G. The pharmocogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol. Interv.,* 2006, roč. 6, č. 4, s. 223-7

Revollo J.R., Cidlowski J.A. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann. N Y Acad. Sci., 2009*, roč. 1179, s. 167-78

Rosenfeld M.G., Glass C.K. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem*., 2001, roč. 276, č. 40, s. 36865-8

Rulcová A. Využití molekulárně biologických in vitro metod pro interpretaci mechanizmů vybraných lékových interakcí warfarinu. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2009, 48 s.

Rulcova A., Krausova L., Smutny T., Vrzal R., Dvorak Z., Jover R., Pavek P. Glucocorticoid receptor regulates organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) expression via HNF4α up-regulation in primary human hepatocytes. *Pharmacol. Rep*., [přijato k publikaci] 2013

Rumlová M., Pačes V., Ruml T., *Základní metody genového inženýrství*, 1. vydání, Praha: JPM Tisk, s. r. o., 2003, 54 s.

Saborowski M., Kullak-Ublick G.A., Eloranta J.J. The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J. Pharmacol. Exp. Ther*., 2006, roč. 317, č. 2, s. 778-85

Savkur R.S., Wu Y., Bramlett K.S., Wang M., Yao S., Perkins D., Totten M., Searfoss G. 3rd, Ryan T.P., Su E.W., Burris T.P. Alternative splicing within the ligand binding domain of the human constitutive androstane receptor. *Mol. Genet. Metab*., 2003, roč. 80, č. 1-2, s. 216-26

Sherf B.A., Navarro S.L., Hannah R.R., Wood K.V. Dual-Luciferase reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. *Promega Notes,*1996, č. 57, s. 2–9

Shu Y., Leabman M.K., Feng B., Mangravite L.M., Huang C.C., Stryke D., Kawamoto M., Johns S.J., DeYoung J., Carlson E., Ferrin T.E., Herskowitz I., Giacomini K.M. Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2003, roč. 100, č. 10, s. 5902-7

Schaeffeler E., Hellerbrand C., Nies A.T., Winter S., Kruck S., Hofmann U., van der Kuip H., Zanger U.M., Koepsell H., Schwab M. DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med*., 2011, roč. 3, č. 12, str 82

Scheinman R.I., Gualberto A., Jewell C.M., Cidlowski J.A., Baldwin A.S. Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell Biol*., 1995, roč. 15, č. 2, s. 943-53

Schilter B., Turesky R.J., Juillerat M., Honegger P., Guigoz Y. Phase I and phase II xenobiotic reactions and metabolism of the food-borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in aggregating liver cell cultures. *Biochem. Pharmacol*., 1993, roč. 45, č. 5, s. 1087-96

Schinkel A.H., Jonker J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev*., 2003, roč. 55, č. 1, s. 3-29

Schrem H., Klempnauer J., Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol. Rev*., 2002, roč. 54, č. 1, s. 129-58

Skálová L., Boušová I. et al. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, 1. Vydání, Praha: Karolinum, 2011, 162 s.

Sonoda J., Pei L., Evans R.M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett*., 2008, roč. 582, č.1, s. 2-9

Sotaniemi E.A., Karvonen I. Glucose tolerance and insulin response to glucose load before and after enzyme inducing therapy in subjects with glucose intolerance and patients with NIDDM having hyperinsulinemia or relative insulin deficiency. *Diabetes Res*., 1989 roč. 11, č. 3, s. 131-9

Sueyoshi T., Negishi M. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, roč. 41, s. 123-43

Svecova L., Vrzal R., Burysek L., Anzenbacherova E., Cerveny L., Grim J., Trejtnar F., Kunes J., Pour M., Staud F., Anzenbacher P., Dvorak Z., Pavek P. Azole antimycotics differentially affect rifampicin-induced pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression. *Drug Metab. Dispos*., 2008, roč. 36, č. 2, s. 339-48

Swales K., Negishi M. CAR, driving into the future. *Mol. Endocrinol*., 2004, roč. 18, č. 7, s. 1589-98

Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar .T, Igout A., Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol*., 1999, roč. 75, č. 2-3, s. 291-5

Tirona R. G., Kim R. B. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J. Pharm. Sci.*, 2005, roč. 94, č. 6, s. 1169-86

Tsuji A. Impact of transporter-mediated drug absorption, distribution, elimination and drug interactions in antimicrobial chemotherapy. *J. Infect. Chemother*., 2006, roč. 12, č. 5, s. 241-50

Tzameli I., Pissios P., Schuetz E.G., Moore D.D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzen is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell Biol*., 2000, roč.20, č. 9, s. 2951-8

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*., 2007, roč. 47, č. 5, s. 566-78

Vrzal R, Stejskalova L., Monostory K., Maurel P., Bachleda P., Pavek P., Dvorak Z. Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact*., 2009, roč. 179, č. 2-3, s. 288-96

Wada T., Gao J., Xie W. PXR a CAR in energy metabolism, Trends Endocrinol. Metab., 2009, roč. 20, č. 6, s.273-9

Wang H., Faucette S., Moore R., Sueyoshi T., Negishi M., LeCluyse E. Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *J. Biol. Chem.*, 2004, roč. 279, č. 28, s. 29295-301

Wang Y.M., Ong S.S., Chai S.C., Chen T. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*., 2012, roč. 8, č. 7, s. 803-17

Watt A.J., Garrison W.D., Duncan S.A. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*, 2003, roč. 37, č. 6, s. 1249-53

Willson T.M., Kliewer S.A. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov*., 2002, roč. 1, č. 4, s. 259-66

Wu B., Li S., Dong D. 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotic receptors CAR, PXR and VDR. *Drug Discov. Today*, 2013, roč. 18, č. 11-12, s. 574-81

Xie W., Uppal H., Saini S.P., Mu Y., Little J.M., Radominska-Pandya A., Zemaitis M.A. Orphan nuclear receptor-mediated xenobiotic regulation in drug metabolism. *Drug Discov. Today*, 2004, roč. 9, č.10, s. 442-9

Xu C., Li C.Y., Kong A.N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res*., 2005, roč. 28, č. 3, s. 249-68

Xu R.X., Lambert M.H., Wisely B.B., Warren E.N., Weinert E.E., Waitt G.M., Williams J.D., Collins J.L., Moore L.B., Willson T.M., Moore J.T. A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXRalpha heterodimer. *Mol. Cell*., 2004, roč. 16, č. 6, s. 919-28

Yao R., Yasuoka A., Kamei A., Kitagawa Y., Rogi T., Taieishi N., Tsuruoka N., Kiso Y., Misaka T., Abe K. Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor CAR. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 2011, roč. 75, č. 8, str. 1635-7

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*., 2010, roč. 58, č. 4, s. 2168-73

Yonezawa A., Inui K. Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *Br. J. Pharmacol*., 2011, roč. 164, č. 7, s. 1817-25

Zanger U.M., Klein K., Saussele T., Blievernicht J., Hofmann M.H., Schwab M. Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics*, 2007, roč. 8, č. 7, s. 743-59

Zhang J., Huang W., Chua S.S., Wei P., Moore D.D. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science*, 2002, roč. 298, č. 5592, s. 422-4

Zhang L., Dresser M.J., Gray A.T., Yost S.C., Terashita S., Giacomini K.M. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol. Pharmacol*., 1997, roč. 51, č. 6, s. 913-21

Zhou C., Verma S., Blumberg B. The steroid and xenobiotic receptor (SXR), beyond xenobiotic metabolism. *Nucl. Recept. Signal.*, 2009; roč. 7, e001

11 Přílohy – odborné publikace s tématikou dizertační práce