

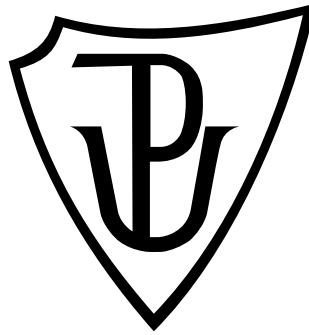
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Michaela Frýbortová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Úloha c-Jun-N-terminální kinasy v regulaci CYP3A4

Diplomová práce

Michaela Frýbortová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Zdeňka Dvořáka, Ph.D a uvedla jsem veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 20. 4. 2010

podpis:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Zdeňkovi Dvořákovi, Ph.D za rady, inspiraci, podporu a čas strávený při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D za cenné připomínky, trpělivost a pomoc při získávání a zpracování výsledků experimentální části diplomové práce.

SOUHRN

Cytochromy P450 jsou zapojeny v metabolismu široké řady léčiv a xenobiotik. CYP3A4 je dominantním enzymem v lidských játrech, kde je transkripčně regulován množstvím transkripčních faktorů a hormonů a je zapojen v metabolismu více než 50% klinicky užívaných léčiv. Mezi nejdůležitější regulátory patří nukleární receptory. Pregnanový X receptor je jeden ze členů těchto receptorů a u člověka způsobuje xenobiotiky (například rifampicinem) zprostředkovanou indukci CYP3A4. PXR se váže do responzivního elementu v 5'-flanking regionu genu CYP3A4. Do tohoto regionu se váže také transkripční faktor AP-1 tvořený heterodimery jun a fos, jejichž upstreamem je c-Jun-N-terminální kináza zapojená do systému signální transdukce MAP kináz.

Předložená diplomová práce se zabývá úlohou JNK v regulaci CYP3A4 využívající expresní plasmid PXR, reportérový plasmid obsahující kompletní promotorovou oblast cytochromu 3A4 a plasmid, který neobsahuje oblast CLEM4, do které se váže transkripční faktor AP-1, jež je součástí signální dráhy JNK.

SUMMARY

Cytochromes P450 are involved in the metabolism of broad range of drugs and xenobiotics. CYP3A4 is a dominant enzyme in human liver where it is transcriptionally regulated by various transcription factors and hormones. It is also involved in the metabolism of more than 50% clinically used drugs. Among the most important regulators are nuclear receptors. Pregnant X receptor belongs to one of the members of these receptors and it causes induction of CYP3A4 by xenobiotics (e.g. rifampicin) in humans. PXR binds to the responsive element in 5'-flanking region of CYP3A4 gene. Transcription factor AP-1 also binds within this region. The transcription factor consists of jun and fos heterodimers whose upstream is c-Jun-N-terminal kinase integrated in the system of MAP kinase signal transduction.

The presented diploma thesis deals with the regulation of CYP3A4 by JNK using expression plasmid PXR, a reporter plasmid containing complete promoter region of cytochrome 3A4 and a plasmid which does not contain CLEM4 region capable of binding AP-1 transcription factor. This transcription factor is part of JNK signal pathway.

OBSAH

1 Úvod	10
2 Metabolismus xenobiotik	11
2.1 I. Fáze	11
2.2 II. Fáze	13
2.3 III. Fáze	14
3 Cytochromy P450	15
3.1 Názvosloví	16
3.2 Cytochrom 3A4	16
3.2.1 Regulace CYP3A4	17
4 Nukleární receptory	18
4.1 Nomenklatura	19
4.2 Struktura a funkce	19
4.3 Intracelulární lokalizace	21
4.4 Koregulační proteiny	22
4.5 Post – translační modifikace	22
4.6 Pregnanový X receptor	23
4.6.1 Schématická transaktivace pregnanového X receptoru	24
5 Transkripční regulace CYP3A4	25
6 Proteinkinázy aktivované mitogeny	27
6.1 ERK	29
6.2 p38	30
6.3 JNK	30
6.3.1 Transkripční faktor c-Jun	33
7 Úloha c-jun-N-terminální kinázy v regulaci CYP3A4	35
7.1 Materiál a metody	35
7.1.1 Biologický materiál	35
7.1.2 Chemikálie	35
7.1.3 Laboratorní přístroje	37
7.1.4 Metody	37
7.2 Výsledky	41

7.2.1 Časová optimalizace a výběr plasmidů	41
7.2.2 Vliv farmakologické aktivace a inhibice JNK na transaktivaci plasmidů	
<i>A.-luc</i> a <i>3A4-luc</i>	42
7.2.3 Aktivace JNK sorbitolem v bezsérovém médiu	44
7.3 Diskuze	45
7.4 Závěr	47
8. Seznam použitých zkratk	48
9. Seznam použité literatury	49

CÍLE PRÁCE

- Zpracování rešerše na téma regulace biotransformačních enzymů
- Optimalizace gene reporter assay pro různé typy reportérových plasmidů. Byly využity tři plasmidy označené *A.-luc*, obsahující kompletní promotorovou oblast cytochromu 3A4, *3A4-luc*, který neobsahuje oblast CLEM4 a *ER6-luc*, šestinukleotidová sekvence, která je součástí proximálního promotoru CYP3A4 (prPXRE)
- Vliv farmakologické aktivace a inhibice JNK na transaktivaci těchto plasmidů

1 Úvod

Před 3500 miliony lety byly fotosyntetizující a anaerobní bakterie závislé na H_2S , H_2 nebo organických molekulách fungujících jako dárci elektronu ve fotosystému-I.

Ve fotosystému-II, který využívaly Archean cyanobacteria byla dárce elektronu voda. Z důvodu obrovského zvýšení atmosferického kyslíku zhruba před 2200 milióny lety se byly prokaryotní organismy nuceny adaptovat na nový způsob života a docházelo k evoluci symbiotických eukaryotních organismů stejně jako k evoluci enzymu CYP, schopného detoxikace atmosferického kyslíku.

Z hlediska evoluce je cytochrom P450 (CYP450) považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než např. hemoglobin (Nerbert *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1996) a je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jednoho genu cytochromu P450 archebakterií více než před 1,5 miliardami let se do dnešní doby vyvinulo velké množství odlišných genů kódujících cytochromy prokaryontních i eukaryontních organismů.

V průběhu evoluce začal cytochrom P450 plnit i funkce v biosyntéze např. barviv květů, mastných kyselin, kyseliny skořicové, steroidních hormonů, vitamínu D a prostaglandinů (Stiborová *et al.*, 1999).

Zhruba před 800 miliony lety docházelo u rostlin ke vzniku ochranných mechanismů, například fytotoxinů, jimiž se bránili před živočichy živící se rostlinnou stravou. Živočichové reagovaly na přítomnost těchto látek markantním vývojem různých forem cytochromu P450 z důvodu jejich detoxikace a eliminace (Nerbert *et al.*, 1989). Podobná situace, ještě ve větším rozsahu nastala v době, kdy člověk začal syntetizovat nové umělé sloučeniny a vnášet je do životního prostředí. Pro eliminaci xenobiotik z lidského těla se v průběhu evoluce vyvinul detoxikační systém, zahrnující rozsáhlou skupinu enzymů.

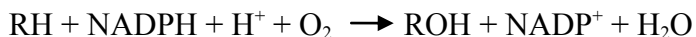
2 Metabolismus xenobiotik

Aby se léčivo dostalo do místa svého účinku, musí projít přes řadu buněčných membrán a to buď prostou (pasivní) difuzí nebo různými transportními procesy zprostředkovanými specifickými přenašeči. Biotransformace xenobiotik se dělí do 2 fází. V první fázi detoxikace se zvyšuje polarita xenobiotika a tvoří se funkční skupiny (-OH, -COOH, -NH₂, -SH). Je-li metabolit dostatečně polární, může být snadno vyloučen vyloučen cestou renální exkrece (ledvinami) nebo biliární sekrecí. Některé málo polární produkty vstupují do fáze II, při níž dochází ke konjugaci s polárním nízkomolekulárním ligandem (kyselina glukuronová, sírová, octová, nebo aminokyseliny glycin či glutamin) za vzniku vysoce polárního metabolitu. Po této biotransformaci je většina látek eliminována močí nebo stolicí. Po dlouhou dobu byla biotransformace dělena pouze do dvou fází, některé zdroje však uvádějí fázi III, transmembránový export (Dostálek, 2006).

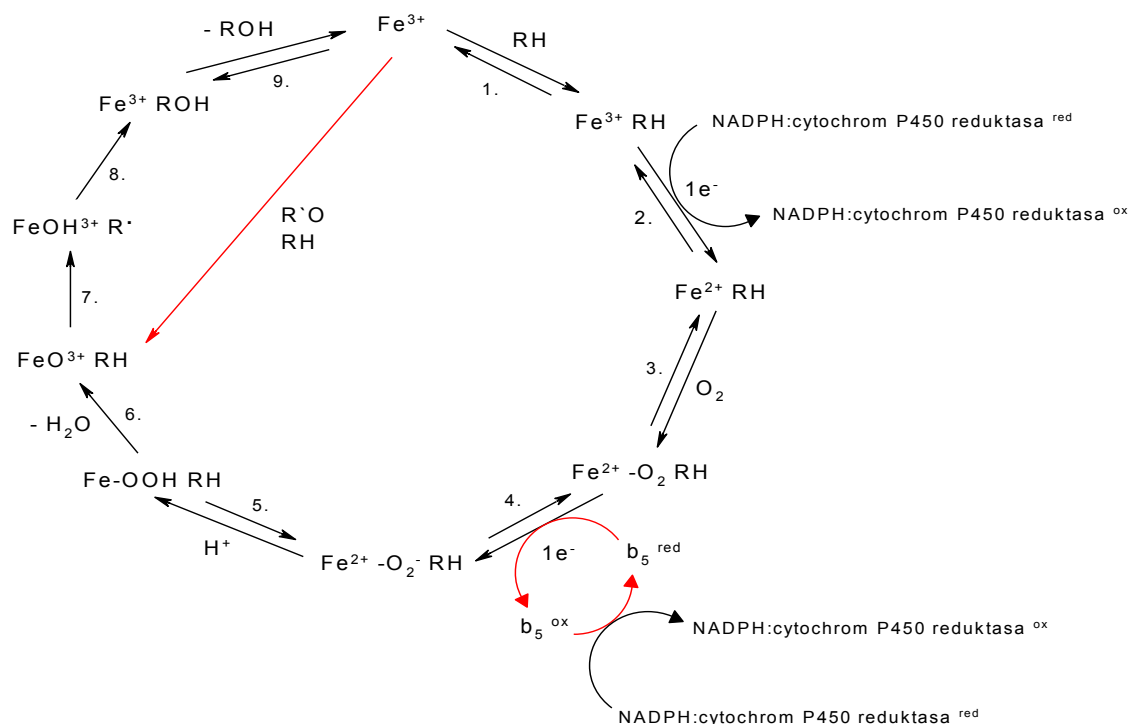
2.1 I. Fáze

V I. fázi biotransformace dochází k odkrytí nebo zavedení polární funkční skupiny (-OH, -COOH, -NH₂, -SH) do molekuly léčiva. Enzymy, účastníci se biotransformace xenobiotik, se nachází v lipofilních membránách endoplasmatického retikula jater a dalších tkání. Mezi reakce I. fáze jsou řazeny oxidace, představující většinu biotransformací, kdy dochází k zavedení hydroxylové skupiny do molekuly xenobiotika. Tyto reakce, zahrnující například hydroxylace, o-dealkylace (přeměna kodeinu na morfin), o-deaminace (přeměna amfetaminu na fenypropanon), N-oxidace a oxidace alifatických alkoholů jsou lokalizovány výhradně v endoplasmatickém retikulu (ER). Reduktivní reakce mají u člověka malý význam, vyskytují se převážně v ER a cytoplazmě a patří mezi ně azo-, nitro- a keto- redukce. Hydrolytické reakce jsou lokalizovány mimo ER, mezi nejvýznamnější substráty hydroláz patří estery a amidy. CYP450, součást mikrosomálního monooxygenázového systému se smíšenou funkcí (MFO-mixed function oxidases) hraje významnou roli v první fázi detoxikace organismu.

Funkci tohoto systému, kdy je jeden atom kyslíku zabudován do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody, lze vyjádřit následující rovnicí:



MFO systém obsahuje 3 hlavní složky: flavoproteinový enzym NADPH:cytochrom P450 reductasu sloužící jako dělič elektronového páru, hemthiolátový enzym cytochrom P450 a jeho biologickou membránu. Lipidy membrány způsobují konformační změny cytochromu P450 vedoucí ke zvýšení afinity k substrátu.



Obr. 1: Mechanismus aktivace kyslíkového atomu (upraveno podle Guengerich, 2007)

Reakční cyklus cytochromů P450 se skládá alespoň z osmi kroků (schématicky znázorněno na obr. 1) a probíhá uspořádaným mechanismem. Hemové železo je v klidovém stavu s oxidačním číslem III v nízkospinovém stavu. Šestá valence je obsazena inertním (aminokyselinovým) ligandem nebo kyslíkem vody. Po vzniku substrátu $[\text{RH}]$ do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane ve vysokospinovém stavu a zároveň ke konformační změně v molekule enzymu. Tato změna má za následek i změnu spektrálních vlastností cytochromu P450 (posunem absorpčního pásu hemu). Vazbou substrátu je umožněna jedoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:cytochrom P450

reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na Fe^{2+} , přičemž zůstává stále pentakoordinováno (vysokospinový stav). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy. Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří ternární ferrisuperoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované a v nízkospinové formě. Tento nepřilíš stabilní komplex je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b_5 reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion. Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody, zatímco druhý zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex. Ten je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu [ROH], jenž je z enzymu uvolněn (Stiborová *et al.*, 2004).

2.2 II. Fáze

Do druhé fáze detoxikace vstupují produkty z fáze první, ale také látky nezměněné, pokud obsahují vhodné funkční skupiny. V této fázi dochází k navázání malé, většinou polární molekuly na funkční skupinu substrátu, čímž se zvýší polarita metabolitu xenobiotika a usnadní se jeho exkrece. Většina konjugačních reakcí je katalyzována enzymy ze třídy transferáz (UDP - glukuronosyltransferázy, glutathion-S-transferázy, sulfotransferázy). Mezi nejdůležitější a nejčastější reakce II. fáze patří glukuronidace, neboli konjugace s kyselinou glukuronovou za katalýzy UDP - glukuronosyltransferázou, která je lokalizována do jater, ledvin, plic a placenty. Zajímavá je aktivita UDP - glukuronosyltransferázy během života. Téměř inaktivní je v plodu (Theresa *et al.*, 2004), kdy je navíc inhibována pregnadiolem, což vede ke sníženému vylučování bilirubinu a k tzv. novorozenecké žloutence. Její aktivita roste s věkem. Mezi další syntetické reakce patří sulfatace, N-acetylace, metylace, konjugace s glutathionem a aminokyselinami, nejčastěji s glycinem za vzniku hippurových kyselin.

2.3 III. fáze

Přeměněné xenobiotikum se dostává z buněk do krve a vylučuje se z organismu stolicí, močí, potem a vydechaným vzduchem. Nemetabolizovaná xenobiotika nebo konjugáty, vytvořené ve druhé fázi, transportují z buňky transmembránové proteiny. Nejznámější protein je P - glykoprotein (multidrug resistant protein, MDR1), který transportuje hydrofobní neutrálně nebo pozitivně nabitě molekuly z buňky do extracelulárního prostředí a hraje významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci léčiv (Ito a Alcorn, 2003). Buňky se tímto chrání před vysokou koncentrací xenobiotika v cytoplazmě. Když koncentrace léčiva v krvi stoupá, zvyšuje se rychlost eliminace ledvinami. P - glykoproteiny jsou ATP - dependentní membránové přenašeče organických iontů (Zhang *et al.*, 1998) a plní tedy funkci ochrany organismů před vlivy toxických látek v jejich organismu. MDR1 vytváří velký vodní kanál, který je uzavřený směrem k cytoplazmě a otevřený do extracelulárního prostoru (Rosenberg *et al.*, 1997). V cytosolu se nachází dvě domény vázající nukleotidy, kde se uskutečňuje hydrolýza ATP za uvolnění energie využívané k transportu substrátů (Pechandová *et al.*, 2006). S MDR1 interaguje velmi rozsáhlé množství chemicky i funkčně odlišných látek. Je zajímavé, že P - glykoprotein a CYP3A4 mají překrývající se substrátovou specifitu a kvůli podobnosti induktorů a inhibitorů, mnoho lékových interakcí ovlivní jak CYP3A4, tak P-glykoprotein (Lin a Yamazaki, 2003). Konjugáty s kyselinou glukuronovou, sulfáty nebo glutation jsou vyloučeny z buňky exportními pumpami OATP (Organic anion transporting polypeptides). OATP je genová „superrodina“ transportující amfipatické organické roztoky. Většina z nich jsou exprimovány v plicích, srdci, stěvě, ledvinách, placentě, ale některé z nich i v játrech (Hagenbuch a Meier, 2003). Na transportu se dále podílí systém OCT (organic cation transporters) u člověka exprimované převážně v játrech (Faber *et al.*, 2003), transportující malé organické kationty, jako dopamin, adrenalin, noradrenalin, thiamin, cholin a serotonin.

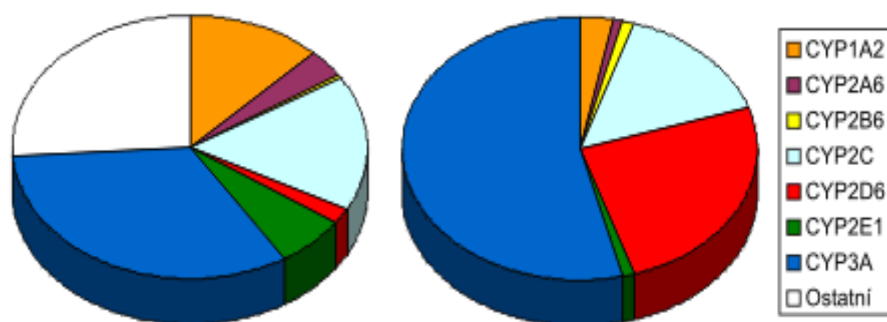
3 Cytochromy P450

Cytochromy P450, monooxygenázy se systematickým označením 1.14.14.1 (Zuber *et al.*, 2002) tvoří „superrodinu“ hemthiolátových enzymů zapojených v metabolismu široké řady léčiv a xenobiotik. Tyto proteiny byly objeveny Klingenbergem v roce 1958 a pojmenovány o 3 roky později (Omura *et al.*, 1962). Jedná se o pigment (odtud zkratka „P“), který po redukci hemového železa v komplexu s CO (oxidem uhelnatým) absorbuje při 450 nm (Omura a Sato, 1962; 1964).

Cytochromy P450 se vyskytují v lidském těle převážně v játrech, také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, placentě a nadledvinkách. Vyskytují se prakticky ve všech typech savčích buněk s výjimkou erytrocytů a svalových buněk.

Množství cytochromů P450 je závislé na mnoha faktorech jako je např. genetický polymorfismus, vliv vnějších podmínek (environmentální polutanty chemické ev. fyzikální povahy), výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu a působení podávaných léčiv (Stephens *et al.*, 1994; Guengerich, 1995; Daly, 1995). Polymorfismus je definován jako geneticky podmíněná odlišnost postihující alespoň 2 % uvažované populace (Guengerich, 1995). Změny, které se vyskytují méně často, se obvykle nazývají „genetická deficience“ nebo „vrozené chyby metabolismu“. Polymorfismus cytochromů P450 se také liší u různých lidských ras a populací (Guengerich, 1995).

U člověka bylo identifikováno 57 různých forem CYP450 (Gonzales, 2005) „superrodina“ lidských P450 se člení na 4 rodiny enzymů (CYP1, CYP2, CYP3 a CYP4), které jsou zapojeny do metabolismu xenobiotik (Gonzales *et al.*, 1998).



Graf 1: Průměrný podíl jednotlivých isoformů na celkovém P450 v játrech (vlevo), průměrný podíl jednotlivých isoformů na metabolismu léčiv (vpravo) (upraveno podle www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm).

3.1 Názvosloví

V 70. letech bylo mnoho forem CYP450 purifikováno z potkaních a králičích jater (Haugen *et al.*, 1975; Johnson a Schwab, 1984; Ryan *et al.*, 1978; Guengerich, 1987), později z jater lidských (Distlerath a Guengerich, 1987; Guenderich, 1995). V 80. letech došlo k velkému pokroku v oblasti metod využívajících rekombinantní DNA a následnému utvoření jednotné nomenklatury.

V současné době je užívané názvosloví založené na podobnosti aminokyselinové sekvence vytvořené Nebertem a jeho spolupracovníky (Nebert *et al.*, 1987; 1989; Nelson *et al.*, 1993). Nejdůležitější oblast je oblast okolí cysteinu, který je ligandem železa hemu. Všechny cytochromy se řadí mezi členy tzv. „superrodiny“. Příslušnost k „superrodině“ se označuje zkratkou CYP (CYtochrome P450). Do stejné rodiny patří cytochromy mající sekvenční homologii větší než 40 % označené arabskou číslicí (CYP3), stejnou podrodinu určuje primární struktura identická z více jak 60 % označená velkým písmenem (CYP3A) a poslední arabská číslice charakterizuje jednotlivý enzym (CYP 3A4).

3.2 Cytochrom 3A4

Nejvíce zastoupená forma CYP450 v lidských játrech, která zaujímá asi 30% veškerého CYP450 je CYP3A (Shimada *et al.*, 1994). Původně byl tento enzym nazýván podle schopnosti oxidovat nifedipin jako P450NF a pod tímto názvem byl také poprvé izolován (Brian *et al.*, 1990). Zprostředkování metabolismu a obecně přeměn endogenních steroidů převážně v játrech, střevě a mozku, byla zřejmě jeho původní role (Thummel a Wilkonson, 1998). Genová rodina 3A (CYP3A) cytochromu P450 u člověka zahrnuje 4 geny, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43, které jsou lokalizovány v tandemovém uspořádání na chromozomu 7 (Gellner *et al.*, 2001). Podrodina CYP3A usnadňuje eliminaci mnoha léčiv, dalších xenobiotik a endogenních molekul jako androgenů, estrogenů a vitamínu D, z těla (Lambda *et al.*, 2002). CYP3A4 je u dospělého člověka dominantním enzymem v lidských játrech a tenkém střevě, CYP3A5 a CYP3A7 je exprimován převážně v játrech fetálních (Hakkola *et al.*, 2001). CYP3A4 je zapojen v metabolismu více než 50% klinicky užívaných léčiv, jako cyklosporin, nifedipin, erythromycin a endogenních látek (Wrighton a Stevens, 1992; Guengerich, 1999), katalyzuje 6β - hydroxylaci testosteronu a kortizolu (Brian *et al.*, 1990) a je součástí bioaktivace environmentálních karcinogenů, jako aflatoxin B1 (Schimada *et al.*, 1989).

3.2.1 Regulace CYP3A4

V játrech exprimovaný CYP3A4 je transkripčně regulován množstvím transkripčních růstových faktorů a hormonů (např. glukokortikoidy, triiodothyronin (Schuetz *et al.*, 1993; Liddle *et al.*, 1998) a xenobiotiky fenobarbitalem, clotrimazolem a rifampicinem (Daujat *et al.*, 1991; Schuetz *et al.*, 1993; Kocarek *et al.*, 1995).

Po podání určitých látek, tzv. iduktorů (barbituráty, některé steroidy - dexamethazon, rifampicin a extrakt z třezalky tečkované (Guengerich, 1997)), se jeho hladiny zvyšují. Důsledkem tohoto typu interakcí je snížení hladiny metabolizované látky a vzrůst hladiny metabolitu. Látkami, které jsou buď současně substráty (statiny, blokátory vápníkových kanálů), nebo látkami, které pevně obsadí vazebné místo enzymu a znemožní tak účinnou eliminaci léčiva (azoly, některá makrolidová antibiotika), případně jinými mechanizmy (složky grapefruitového džusu), dochází k inhibici a snížení aktivity CYP3A4. Některé induktory a inhibitory CYP3A4 jsou uvedeny v tabulce (viz tab. 1). Velmi častým typem lékových interakcí je kompetice dvou nebo více látek, vázajících se na CYP3A4, o vazebné místo na tomto enzymu, což vede ke zvýšení hladiny „znevýhodněného“ léčiva. Farmakokinetické interakce na základě popsaných principů měly v řadě případů závažné důsledky včetně selhání léčby nebo nežádoucích a toxických účinků vedoucích až k úmrtí pacienta (v důsledku významného zvýšení hladiny jednoho léčiva nebo obou současně podávaných léčivých přípravků) (Guengerich, 1997). Tato skutečnost je významná při lékových interakcích, čímž se CYP3A4 dostává do oblasti zájmu výzkumu.

induktory CYP3A4
barbituráty, phenytoin, carbamazepin, griseofulvin, primidon, rifampicin dexamethason, sexuální steroidy
inhibitory CYP3A4
blokátory kalciového kanálu: diltiazem, mibefradil antimykotika: itraconazol, ketoconazol, fluconazol makrolidová antibiotika: erythromycin, clarithromycin, azithromycin kortikosteroidy antiestrogeny: tamoxifen antiulceróza: cimetidin antidepresiva: fluoxetin, fluvoxamin hypnotika: midazolam imunosupresiva: cyklofosfamid grapefruitová šťáva (popř. flavonoidy i jiného původu)

Tab. I: Některé induktory a inhibitory cytochromu 3A4 (převzato z <http://nova.medicina.cz/odborne>)

Klinické studie se substráty CYP3A4 indikují, že přibližně 90 % interindividuální variability v aktivitě hepatického CYP3A4, je determinované geneticky (Özdemir *et al.*, 2000). Interindividuální variabilita v jeho aktivitě může také ovlivňovat individuální predispozice k nádorům (rakovina jater a žaludku) způsobených environmentálními karcinogeny (Forrester *et al.*, 1990; Paolini *et al.*, 1999).

4 Jaderné receptory

První jaderný receptor (v anglické terminologii nukleární receptor, NR) byl identifikován biochemickými postupy roku 1960 (Jensen a Khan, 2004). Teprve před 25 lety byl klonován lidský glukokortikoidní receptor (GR, NR3C1) Evansem a jeho spolupracovníky a estrogenový receptor (ER, podtyp alfa NR3A1) Chambonem a Greenem (Hollenberg *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1986). Při fylogenetických studiích bylo dokázáno, že se NR objevují již při evoluci časných mnohobuněčných živočichů, dlouho před divergencí obratlovců a bezobratlých (Escriva *et al.*, 1997; Owen a Zelent, 2000).

Nukleární receptory (NR) patří mezi jednu z největších skupin transkripčních faktorů se 48 členy. Z doposud známých 48 NR byl identifikován endogenní ligand pouze pro 24 receptorů (Germain *et al.*, 2006). Tyto klasické receptory jsou na ligandu závislé transkripční faktory a odpovídají přímo na různé druhy metabolických intermediátů a látek hormonální povahy (Germain *et al.*, 2006), čímž je kontrolována jejich aktivita. Receptor, který sdílí stejnou strukturu s dalšími receptory, ale jehož endogenní ligand ještě nebyl identifikován, se nazývá orphanový (sirotčí) receptor.

V lidském genomu regulují NR odlišné biologické procesy zahrnující metabolismus, homeostázi, vývoj a reprodukci (Maglich *et al.*, 2001).

4.1 Nomenklatura

Lidská rodina nukleárních receptorů je členěna na základě sekvenční podobnosti a fylogenetického stromu do 6 evolučních skupin (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999; Escriva *et al.*, 2000; Thornton a DeSalle, 2000):

1. Tato velká skupina obsahuje receptory TRs, RARs, VDR (NR1I1), a PPARs, také orphanové (sirotčí) receptory RORs, Rev-erbs, CAR (NR1I3), PXR (NR1I2), LXRs a další.
2. Skupina zahrnuje RXRs, COUP-TF, a HNF-4.
3. Subrodina zahrnuje steroidní receptory ERs, GRs, PRs, a ARs a ERRs.
4. Tato malá skupina obsahuje nervovým růstovým faktorem indukovaný klon B skupinu orphanových receptorů NGFI-B (NR4A1), NURR1 (NR4A2) a NOR1 (NR4A3).
5. Další malá skupina zahrnuje steroidogenní faktor 1 (NR5A1) a receptory příbuzné *Drosophila* FTZ-F1.
6. Subrodina obsahuje pouze receptor GCNF1 (NR6A1), který se nehodí mezi žádné uvedené subrodiny.

4.2 Struktura a funkce

Všechni členové NR sdílí několik konzervovaných strukturních domén (většinou 5 nebo 6 označených A-F od N-konce k C-konci), které jsou pro funkci receptoru nezbytné (Kumar *et al.*, 2004). Na C-konci se vyskytuje ligand-vazebná doména (ligand binding domain, LBD), mezi

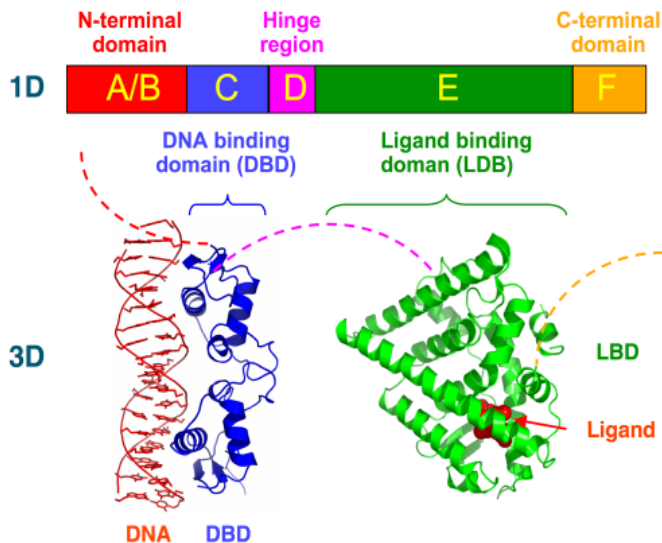
různými NR je mírně konzervovaná v sekvenci, zato vysoce konzervovaná ve struktuře. Dovoluje vazbu ligandu a dimerizaci. LBD obsahuje 4 strukturálně odlišné, ale funkčně spojené povrchy:

- dimerizační, jež zprostředkovává interakce s partnerem LBD,
- ligand-binding pocket (LBP), interaguje s odlišnými malými lipofilními molekulami v případě navázání ligandu na NR,
- koregulační vazebný povrch, který se váže ke komplexu regulačních proteinů, jež modulují pozitivně nebo negativně transkripční aktivitu a
- aktivační funkční helix (AF-2). Po vazbě ligandu dochází ke konformačním změnám, jež způsobí vazbu koaktivátorů do AF-2 regionu (Glass a Rosenfeld, 2000).

LBD je spojena s doménou rozpoznávající specifické sekvence promotorové DNA, tzv. DNA-vazebnou doménou (DNA-binding domain, DBD) nekonzervovanými závěsnými oblastmi, D regionem (Hinge region – tzv. pant). D region je velmi málo konzervovaná doména, která dovoluje rotaci C regionu, čímž zaujímá odlišné konformace. DBD je nejvíce konzervovaná doména. *In vitro* studie ukazují, že se NR váží přes tuto doménu k hormonálnímu responzibilnímu receptoru (HRE) (Kumar *et al.*, 1986). DBD obsahuje 2 alfa řetězce a 2 zinkové prsty bohaté na cystein, účastní se také v post-translační modifikaci, je zapojena v jaderné lokalizaci a v interakci s transkripčními faktory a koaktivátory.

Většina NR jsou aktivní jako dimery, buď jako homodimery, nebo heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR). U obratlovců existují 3 odlišné geny RXR, RXR α , β , γ , čímž vzniká mnoho proteinových produktů v důsledku odlišných promotorů a alternativního sestřihu.

N-terminální oblast A/B regionu je v sekvenci a délce vysoce variabilní, všechny NR však obsahují region AF-1 (activation function 1), který funguje nezávisle na ligandu (Nagpal *et al.*, 1993). Transkripční aktivace AF-1 je normálně velmi nízká, spolupracuje ale s AF-2 doménou v LBD za produkce silnější upregulace genové exprese.



Obr. 2: Strukturální organizace nukleárního receptoru. Nahoře: schématická 1D aminokyselinová sekvence nukleárního receptoru. Dole: 3D struktura DBD (vazba k DNA) a LBD (vazba hormonu) oblasti nukleárního receptoru. Uváděná struktura je struktura estrogenního receptoru. A/B = N-terminální doména, C = DNA binding domain, D = hinge region, E = Ligand binding domain, F = C-terminální doména (www.wikipedia.org).

4.3 Intracelulární lokalizace

Studie, zabývající se subcelulární lokalizací pregnanového X receptoru (PXR), poskytují konfliktní výsledky. Dvě skupiny vědců prohlašují, že PXR je lokalizovaný v jádře bez ohledu na vazbu ligandu. V jedné takové studii Kawana *et al.* (2003) za využití transientní exprese v HeLa buňkách dokázali, že PXR byl lokalizovaný v jádře v absenci ligandu. Identifikovali také jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLS) v DBD pregnanového receptoru. Odstranění DBD mělo za následek výhradně cytoplazmatickou lokalizaci a mutace v předpokládaném NLS zapříčinila lokalizaci jednak v cytoplazmě, ale také v jádře. Tento výsledek byl shodný s druhou prací za použití imunobarvení, kdy bylo dokázáno, že lidský PXR se vyskytuje výhradně v jádře buď v absenci ligandu, nebo ve vazbě (Koyano *et al.*, 2004). Další studie jsou opačného názoru. PXR z myších jater se vyskytoval v cytoplazmě a translokoval do jádra pouze po ovlivnění PCN (pregnenolone-16 α -carbonitrile), nebo dalšími agonisty (Kawana *et al.*, 2003; Squires *et al.*, 2004). Tyto rozpory v názorech mohou být zapříčiněny v odlišných typech PXR (myší vs. lidský), nebo v povaze experimentu (*in vivo* vs. *in vitro*).

Jaderná lokalizace NR je regulována dimerizací s RXR nebo interakcí s koregulátory (Baumann *et al.*, 2001). V cytoplazmě se NR váží s heat shock proteiny a tato asociace zabrání transportu receptoru jadernými póry (DeFranco *et al.*, 1998).

4.4 Koregulační proteiny

Celková aktivita NR závisí na rozsáhlém počtu koregulačních proteinů, které se neváží k DNA přímo, ale mají zřetelný efekt na výslednou expresi genu (Glass *et al.*, 2000). Neligandové NR vytváří komplex s korepresory, které inhibují transkripční aktivitu, často vazbou dalších kofaktorů, jež mají HDAC (histon deacetylase) aktivitu. HDAC váže chromatinovou strukturu, což vede ke kompakci chromatinu a transkripční represi genů. Po aktivaci NR vazbou ligandu nebo fosforylací, dochází k indukci konformačních změn, které způsobí disociaci komplexu korepresoru a následnou vazbu komplexu koaktivátoru. Vazbou komplexu, majícího HAT (histon acetylase) aktivitu, se zvýší transkripce genů. Koregulační proteiny tím poskytují sekundární specifitu v modulaci exprese genů skrz NR. Mnoho koaktivátorů nukleárních receptorů preferenčně interagují s NR na C-terminální AF-2 doméně přes -LXXLL-motiv který představuje prototypický NR-interakční motiv (Staudinger a Lichti, 2007).

4.5 Post - translační modifikace

Transkripční aktivita NR je modulovaná mnohými post-translačními modifikacemi receptoru samotného, nebo jeho koregulačních proteinů. Fosforylace, acetylace, SUMOylace, ubiquitinace a metylace mají vliv na funkci NR a představují důležitý buněčný integrační mechanismus (Kouzarides, 2000; Wang *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2002; Perissi a Rosenfeld, 2005). NR jsou fosfoproteiny a převážná většina fosforylačních míst leží uvnitř aminoterminálního A/B regionu, další místa jsou lokalizovaná také v DBD a LBD (Rochette-Egly *et al.*, 1995; Delmotte *et al.*, 1999). Nejvíce modifikovaná residua v A/B doméně jsou seriny obklopené proliny. Proto korespondují se souhlasnými místy pro prolin-dependentní kinázy, jež zahrnují cyklin-dependentní kinázy a MAPK (Morgan, 1995; Chang a Karin, 2001; Pearson *et al.*, 2001). Také některé koaktivátory a korepresory (SRC-1, TIF2, RAC3, PGC-1, p300, CBP, NCoR a SMRT) jsou fosfoproteiny, které jsou samy cíleny ve funkci mnoha kináz (Font de Mora a Brown, 2000; Rowan *et al.*, 2000; Yuan a Gambee, 2000; Knutti *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2001; Vo

a Goodman, 2001). Fosforylace může zvýšit interakce koaktivátorů s NR, schopnost rekrutovat HAT komplex a enzymatickou aktivitu.

4.6 Pregnanový X receptor

PXR patří do "ligandem aktivované" rodiny transkripčních faktorů. Do této rodiny dále náleží CAR (konstitutivní androstanový receptor), VDR (receptor pro vitamín D), GR (glukokortikoidní receptor), ER (estrogenní receptor) a další (Giguere, 1999).

U člověka PXR způsobuje xenobiotiky zprostředkovanou indukci CYP3A4 (Bertilsson, *et al.*, 1998; Blumberg, *et al.*, 1998; Lehmann, *et al.*, 1998), CYP3A7 (Pascussi *et al.*, 1999; Bertilsson *et al.*, 2001) CYP2B6 (Goodvin *et al.*, 2001), CYP2C8 a CYP2C9 (Gerbai-Chaloin *et al.*, 2001; Synold *et al.*, 2001; Gerbai-Chaloin *et al.*, 2002). PXR kontroluje expresi genů kódujících UDP-glucuronosyltransferázu a glutathion-S-transferázu (Madhu a Klaassen, 1991; Hosokava *et al.*, 1993; Liu a Klaassen 1996; Dunn *et al.*, 1999; Runge-Morris *et al.*, 1999) zapojených ve II. fázi metabolismu xenobiotik a transmembránové proteiny MDR1 a MDR2 (Synold *et al.*, 2001; Geick *et al.*, 2001; Dussault *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002) nezbytné pro fázi III. Tím se PXR stává důležitým a účinným regulátorem exprese genů, zapojených ve všech fázích metabolismu xenobiotik a jejich exkreci. Kromě významné úlohy v metabolismu cizorodých látek se PXR účastní také regulace fyziologických a patofyziologických procesů, jakými jsou kostní, cholesterolová, lipidová, mineralo- a glukokortikoidní homeostáza či zánětlivá odpověď (Ma *et al.*, 2008).

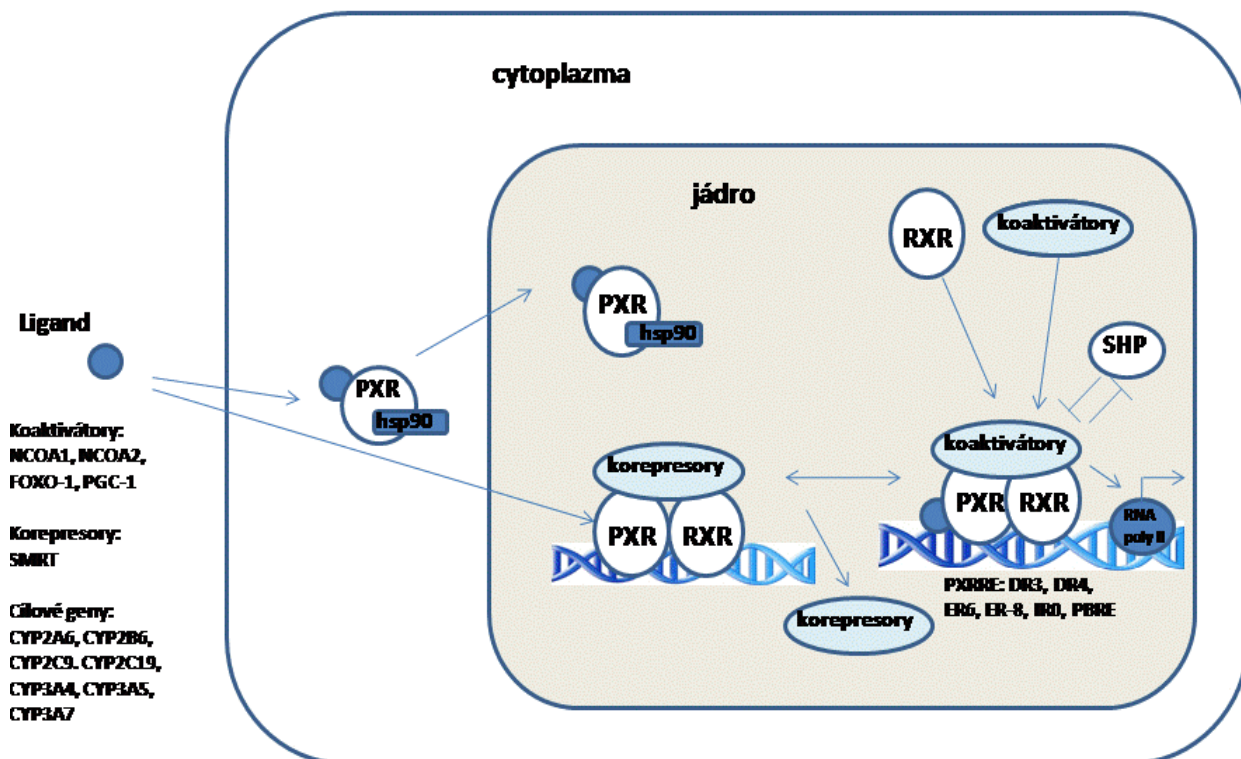
PXR interaguje s jeho příbuzným responzivním elementem v 5'-flanking regionu cílových genů formací heterodimeru s RXR. Některé z těchto elementů jsou rozpoznávané také CAR (Sueyoshi *et al.*, 1999) a VDR (Thummel *et al.*, 2001; Drocourt *et al.*, 2002) taktéž po heterodimerizaci s RXR. PXR a CAR sdílí překrývající se funkčnost ve vazbě ligandu a aktivaci genů. Moore *et al.*, (2000) zjistili, že oba receptory mohou být aktivovány stejnými xenobiotiky, příkladně rifampicinem a fenobarbitalem.

PXR je exprimovaný v játrech, tenkém a tlustém střevě (Lehmann *et al.*, 1998). Tento receptor většinou s nízkou afinitou váže široký rozsah strukturálně odlišných exogenních a endogenních chemikálií zahrnující léčiva rifampicin, fenobarbital, nifedipin, clotrimazol, mifepriston, metyrapon (Bertilsson *et al.*, 1998; Blumberg *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998; Ogg *et al.*, 1999; Moore a Kliewer, 2000; El-Sankari *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2000; Drocourt

et al., 2001) a steroidní hormony jako progesteron, estrogeny a kortikosterony (Moore a Kliewer, 2000). Při analýze krystalové struktury bylo zjištěno, že doména vázající ligand je vysoce hydrofóbní a flexibilní, a proto se molekuly odlišné velikosti mohou vázat v různých orientacích (Watkins *et al.*, 2001).

4.6.1 Schématická transaktivace pregnanového X receptoru

Ligand vstupuje do buňky pasivní difúzí, nebo pomocí transportérů a váže se k nukleárnímu receptoru v cytosolu. PXR v cytoplazmě je v komplexu s chaperony, jako je hsp90 (heat shock 90 kDa). Ligandovaný nukleární receptor disociuje z multiproteinového komplexu a translokuje do jádra, kde se váže s RXR nukleárním receptorem za vzniku heterodimeru PXR/RXR. K heterodimeru se připojí koaktivátory a komplex se váže do regulačního regionu (PXRRE) cílových genů. Za přítomnosti RNA polymerázy II (RNA pol II) dochází k expresi genů. Koaktivátory mají histon acetyltransferázovou aktivitu, která dovolí dekompakci chromatinu a následnou aktivaci genů. V jádře může být PXR v asociaci s komplexem korepresorů. Komplex obsahuje korepresor SMRT (NCOR2) s histon deacetylázovou aktivitou. Deacetylace histonů vede ke kompakci chromatinu a transkripční represí genů. Vazba ligandu k nukleárnímu receptoru PXR v jádře způsobí uvolnění korepresoru, následnou vazbu komplexu koaktivátorů a transkripční aktivaci exprese genů. SHP (Short/Small heterodimer partner; small heterodimer partner, NR0B2) inhibuje PXR-zprostředkovanou transaktivaci CYP3A4, aktivovaný PXR inhibuje expresi SHP, čímž je redukována exprese SHP a aktivovaná transkripce CYP3A4 (Pávek a Dvořák, 2008).



Obr. 3: Schématická transaktivace nukleárního receptoru PXR. PXR, Pregnanový X receptor; RXR, retinoidní receptor; hsp90, heat shock protein 90; SHP, Short/Small heterodimer partner; small heterodimer partner, NROB2; RNA poly II, RNA polymeráza II.

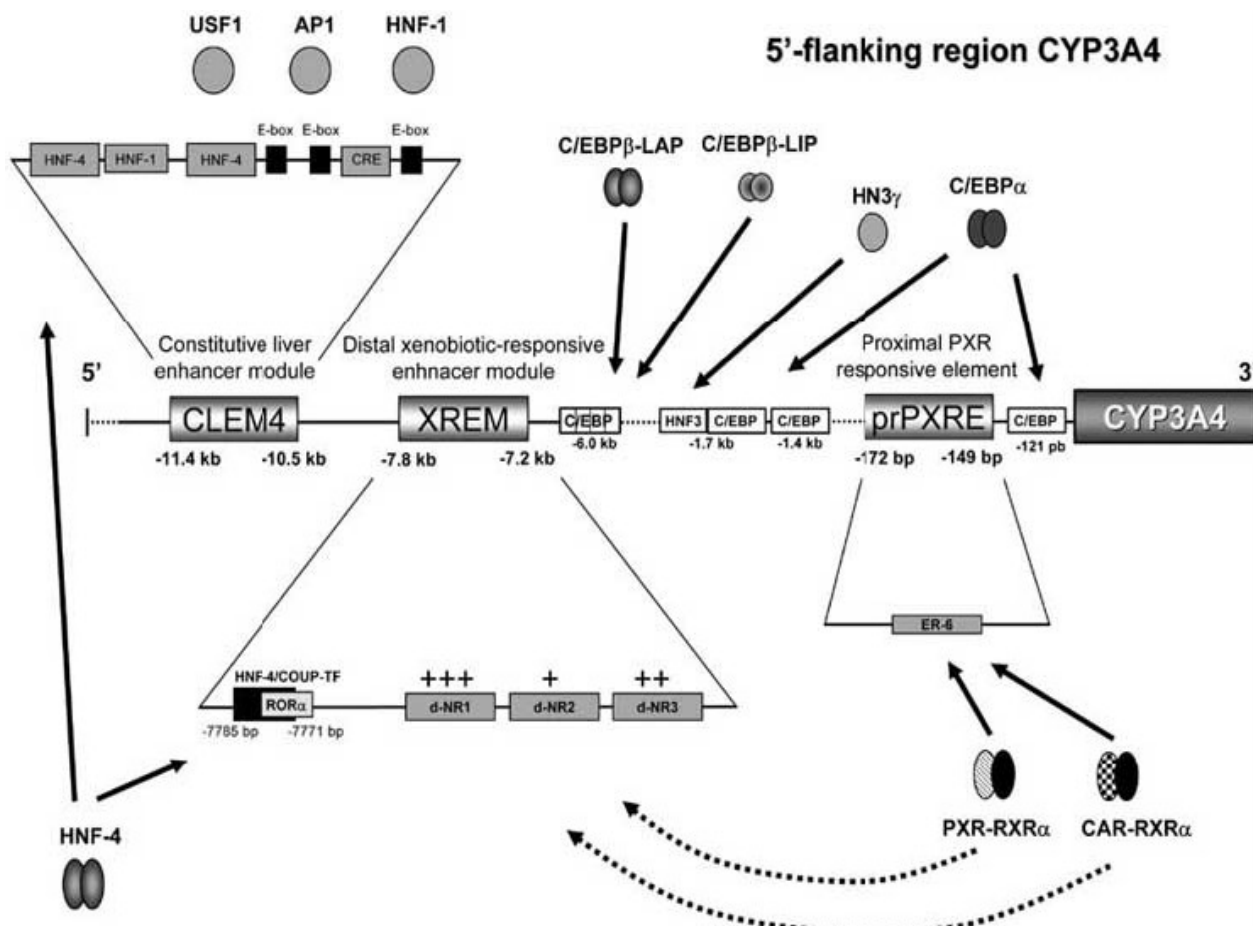
5 Transkripční regulace CYP3A4

Exprese lidského CYP3A4 je také regulovaná nukleárním receptorem PXR. Heterodimer PXR/RXR se váže do responzivního elementu [repetice AG(G/T)TCA] v 5'-flanking regionu genu CYP3A4 a po působení induktory dochází ke stimulaci jeho transkripce (Bertilsson *et al.*, 1998; Blumberg *et al.*, 1998; Kliewer *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998). Jones *et al.* (2000) popsal, že spousta sloučenin, které indukují expresi CYP3A se váží přímo k PXR. Také genetické variace PXR mohou mít dramatický dopad na expresi CYP3A4 (Eichelbaum a Burk, 2001).

Proximální CYP3A4 promotor (báze -362 až +53), obrácená repetice AG(G/T)TCA hexamer oddělený šesti nukleotidy (ER-6), vystupuje jako minimální promotor (prPXR). Druhý, distální enhancer modul (XREM) lokalizovaný mezi -7,8 a -7,2 kb, upstream začátku transkripce, je ve spojení s elementy v regionu proximálního promotoru, kam se váže PXR

a CAR, zprostředkujícího transaktivaci CYP3A4 (Goodwin *et al.*, 1999; 2002).

CLEM4 (constitutive liver enhancer module), region od -11,4 do -10,5 kb, má funkčnost konstitutivní aktivace CYP3A4 (Goodwin *et al.*, 2005). S CLEM4 interaguje řada transkripčních faktorů, příkladně HNF1 α , HNF4 α , USF1 a AP-1 (Goodwin *et al.*, 2002). V CLEM4 byl nalezen genetický polymorfismus obsahující třínukleotidové inserce TGT, jež ovlivní zvýšení aktivity genu CYP3A4 *in vitro* (Matsumura *et al.*, 2004). Další funkční vazebné místo HNF4 α bylo objeveno uvnitř distálního enhancer modulu (XREM) (Tirona *et al.*, 2003). Toto vazebné místo je zapojeno v indukci CYP3A4 kooperativní interakcí se sousedícím PXR místem (Tirona *et al.*, 2003). V 5'-flanking regionu genu CYP3A4 se nachází několik C/EBP responzibilních elementů. C/EBP α je také zapojen v konstitutivní transkripci CYP3A4 srkz tři proximální elementy na -121, -1393 and -1659 bp (Rodrigues-Antona *et al.*, 2003). Další distální enhancer zaujímající 288 bp v genu CYP3A4 tvoří dvě izoformy, C/EBP α -LAP (liver activating protein) a C/EBP α -LIP (liver inhibitory protein (Martinez-Jimenez *et al.*, 2005).



Obr. 4: Schématické znázornění regulace *CYP3A4* 5'-flanking regionu v jaterních buňkách specifickými transkripčními faktory (upraveno podle Martínez-Jiménez *et al.*, 2007).

6 Proteinkinázy ativované mitogeny

MAP kinázy (MAPK) jsou skupina serin/threoninových kináz zapojených do systému signální transdukce. Účastní se kontroly genové exprese, regulují proliferaci, diferenciaci, dělení a pohyb eukaryotických buněk. MAP kinázy jsou aktivované růstovými faktory, cytokiny, UV zářením, osmotickým šokem a oxidativním stresem (Ding *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Song a Lee, 2007).

Tyto kinázy fosforylují důležité transkripční faktory přímo, nebo přes down-streamové mitogeny aktivované proteinkinázy (Yang a Sharrocks, 2003).

MAPKKK jsou aktivované up-streamovou kinázou a dalšími faktory jako jsou členy Ras a Rho rodiny malých GTPáz (Nishida a Gotoh, 1993; Lewis a Shapiro, 1998; Avruch *et al.*, 2001;

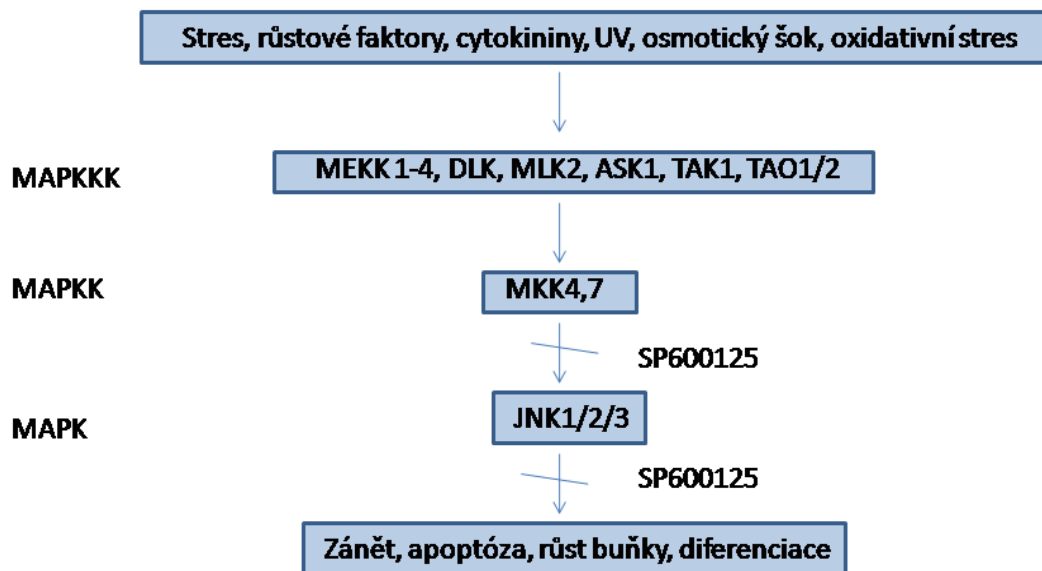
Kyriakis a Avruch, 2001) vazbou cytokinů na receptor TNF superrodiny (Davis, 2000; Kyriakis a Avruch, 2001). Existuje nejméně 20 MKKK a nejméně 14 z nich aktivují dráhu MKK4/MKK7-JNK/MAPK (viz obr. 4) Mezi takové MKK patří MLK (mixed lineage kinases), které jsou schopny fosforylace MKK4 a/nebo MKK7 (Gallo a Johnson, 2002). MKK7 je aktivovaná převážně cytokiny (tumor nekrosis faktor, TNF) a interleukin-1 (IL-1), zatímco MKK4 je primárně aktivovaná environmentálním stresem (Davis, 2000).

Proteinkinázy obsahují 11 konzervovaných subdomén. Subdoména I až VII MLK se při prvotním výzkumu podobala serin/threonin kinázám, zatímco subdoména VIII až XI byla více podobná tyrosin kinázám. Proto, po klonování genů pro MLK, byly tyto kinázy nazvány „mixed lineage kinases“.

Později biochemické studie ukázaly, že fungují jako serin/threonin kinázy. V minulých letech byly identifikovány tři podrodiny MLK obsahující 7 odlišných kináz: MLK1-MLK4, DLK, LZK a ZAK (Gallo a Johnson, 2002).

K autoinhibici kinázové aktivity MLK1-4 slouží amino-terminální Src-homologní - 3 doména (SH3) (Gallo a Johnson, 2002). Za touto doménou se nachází směrem k C-konci kinázová doména, obsahující katalytické místo pro fosforylaci. Následuje leucinový zip, zprostředkující dimerizace a oligomerizace proteinů (Gallo a Johnson, 2002). Za leucinovým zipem směrem k C-konci následuje Cdc42/Rac-interaktivní vazebný motiv (CRIB), který zprostředkovává interakce s Rho rodinou GTPáz. Karboxylový konec těchto proteinů je odlišný z důvodu rozdílných regulačních funkcí, všechny jsou ovšem bohaté na prolin. Funkce těchto sekvencí bohatých na prolin není zatím vysvětlena (Gallo a Johnson, 2002).

MAPKKK aktivuje down-streamovou MAPKK fosforylací na Ser/Thr, MAPKK fosforyluje MAPK na Thr183 a Tyr185 oddělené prolinem a poslední aktivovaná MAP kináza z této kaskády fosforyluje rozsáhlé množství substrátů na residuu serinu a threoninu.



Obr. 5: Signální dráha c-Jun-N-terminální kinázy. ASK, apoptosis signal-regulating kinase; DLK, dual leucine zipper-bearing kinase; JNK, c-Jun amino-terminal kinase; MEKK, MEK kinase; MLK, mixed-lineage protein kinase; TAK, transforming growth factor activated- β -protein kinase; TAO, 1001 amino acid; SP600125, 1,9-pyrazoloanthrone.

Mezi nejznámější a nejdůležitější MAPK patří:

- ERK - extracelulárními signály regulovaná kinasa
- JNK / SAPK - c-Jun N-terminalní kinázy / stresem aktivované proteinkinázy
- p38

6.1 ERK

ERK (extracelulárními signály regulovaná kinasa) zahrnuje 2 izofomy, ERK1 (44kD) a ERK2 (42 kD), které jsou aktivovány růstovými faktory, nebo mitogeny (Putz *et al.*, 1999) a podílí se na růstu buňky a diferenciaci. Tyto kinázy sdílí 83% podobnost v aminokyselinové sekvenci a jsou exprimovány prakticky ve všech typech tkání (Henklová, 2008). ERK jsou aktivované duální fosforylací na Thr202/Tyr204 (Sturgill *et al.*, 1988; Payne *et al.*, 1991).

6.2 p38 MAPK

Tento protein má velikost 38 kD a jeho klonováním byly identifikovány 4 izoformy. Je exprimován například v srdci, mozku, placentě a ledvinách (Jiang *et al.*, 1996). Všechny MAPK p38 jsou aktivovány MAPKK (MKK3 a MKK6) (Enslin *et al.*, 1998), jež zprostředkovávají fosforylaci Thr180 a Tyr182 (separovány glycinem). Typickými aktivátory jsou cytokiny (Jiang *et al.*, 1996), UV záření (Li *et al.*, 2007), osmotický stres a růstové faktory (Jiang *et al.*, 1996). MAP kináza p38 vystupuje v zánětlivých reakcích (Jiang *et al.*, 1996), apoptóze (Mchichi *et al.*, 2007) a buněčném cyklu.

6.3 JNK / SAPK

JNK byla poprvé identifikována v roce 1990 jako potkaní jaterní kináza pro s mikrotubuly asociovaný protein 2, který byl aktivovaný injekcí cykloheximidinu (Kyriakis a Avruch, 1990). Paralelní studie identifikovaly proteinkinázy o velikosti 46 a 55 kDa schopné fosforylace Ser 63 a 73 v regionu N-terminálního konce c-Jun, čímž potencovaly jeho transkripční funkci (Hibi *et al.*, 1993). Molekulárním klonováním SAPK a JNK bylo roku 1994 ukázáno, že jsou tato kinázy identické (Kyriakis *et al.*, 1994; Derijard *et al.*, 1994).

Enzymy JNK jsou přítomny v živočišných druzích od hlístic, octomilek až po člověka (Kawasaki *et al.*, 1999; David, 2000; Ramet *et al.*, 2002; Gallo a Johnson, 2002) JNK je zapojena v reakcích při buněčné smrti, přežití buněk a diferenciaci (David, 2000; Kyriakis a Avruch, 2001).

V rámci lidského genomu rodinu JNK kódují 3 geny (*Jnk1*, *Jnk2*, a *Jnk3*), lokalizované na odlišných chromozomech: 10q11.22, 5q35 a 4q21.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). V rámci alternativního sestřihu je produkováno více než 10 odlišných proteinů, velikost produktů jednotlivých genů se pohybuje v rozmezí od 46 kDa do 55 kDa (Robert *et al.*, 2005), přičemž sekvenční homologie je vyšší než 80 % (Barr a Bogoyevitch, 2001). Každá JNK je exprimovaná ve formě krátké (46 kDa) a dlouhé (54 kDa) (Pulverer *et al.*, 1991). Alternativní formy JNK1/2/3 se liší v jejich schopnosti vázat a fosforylovat odlišné substráty (Kallunki *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996). Zatímco JNK1 je exprimovaná v mnoha typech tkání, JNK3 je situovaná převážně do mozku (Gupta *et al.*, 1996). Isoformy JNK3 mají molekulovou hmotnost převážně vyšší díky jejich prodlouženému NH₂ konci.

JNK je aktivovaná duální fosforylací MAP kinázou MKK4 a MKK7. K aktivaci dráhy JNK vede vystavení buněk UV záření (Smeal *et al.*, 1991; 1992), hyperosmolaritě, (Kyriakis *et al.*, 1994) teplotnímu šoku (Behrens *et al.*, 1994), cytokininům (Pulverer *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1997) nebo růstovým faktorům (Kallunki *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996).

Dráha JNK je organizovaná dvěma odlišnými mechanismy:

- rozpoznání motivu mezi MKKK a MKK, MKK a MAPK
- Scaffold proteiny, které skládají dráhu MKKK-MKK-MAPK ve větší proteinový komplex

Scaffolding proteiny jsou schopny vázat specifické proteinové komponenty a řídit interakce mezi nimi. Mezi takové proteiny patří například scaffold protein JIP (JNK-interacting protein) (Dickens *et al.*, 1997), POSH (plenty of SH3s) (Tapon *et al.*, 1998), JLP (Lee *et al.*, 2002) a JSAP1 (Ito *et al.*, 1999).

Jako první JNK-interacting protein byl identifikován JIP1, který interaguje s JNK a neinteraguje s p38 a ERK (Dickens *et al.*, 1997). Je schopný vázat mnoho komponentů zapojených do aktivace JNK, mezi MAPKKK interaguje také s MLK3 a DLK, mezi MAPKK interaguje s MKK7. Koexprese JIP1 s MLK3 nebo MKK7 zvýší schopnost těchto kináz aktivovat JNK. Pokud je tento protein overexprimován, váže JNK a drží ji v cytoplazmě, čímž blokuje její aktivitu způsobenou příkladně UV zářením.

POSH byl poprvé identifikován jako Rac-interagující protein kvasinkovou two-hybrid metodou, interakce je závislá na GTP (Donovan *et al.*, 2002). Xu a spolupracovníci prokázali, že exprese POSH indukuje fosforylací JNK a apoptózu v nervových buňkách (Xu *et al.*, 2003). Mimoto je schopný přímé interakce s MLK, MKK4,7 a JNK. POSH je také další příklad scaffold proteinu způsobující buněčnou smrt skrz MAPK signální kaskádu.

JNK byla poprvé identifikována pro její schopnost fosforylovat transkripční faktor c-Jun, a tím zvyšovat její schopnost transaktivovat další geny (Hibi *et al.*, 1993). Tato fosforylace zesiluje transkripční aktivitu c-Jun při ztrátě represe způsobenou histondeacetylázou 3 (Weiss *et al.*, 2003). C-Jun dimerizuje sám se sebou a dalšími transkripčními faktory (jako c-Fos, ATF) k vytvoření activator protein-1 (AP-1) transkripčního faktoru, který reguluje expresi několika

genů odpovídajících na stres. N-terminální fosforylace c-Jun zvyšuje jeho stabilitu (Musti *et al.*, 1997). JNK také fosforyluje a aktivuje další AP-1 proteiny, zahrnující JunB, JunD a ATF2, FOXO4 (Essers *et al.*, 2004) a jaderné hormonální receptory jako glukokortikoidní receptor (Rogatsky *et al.*, 1998).

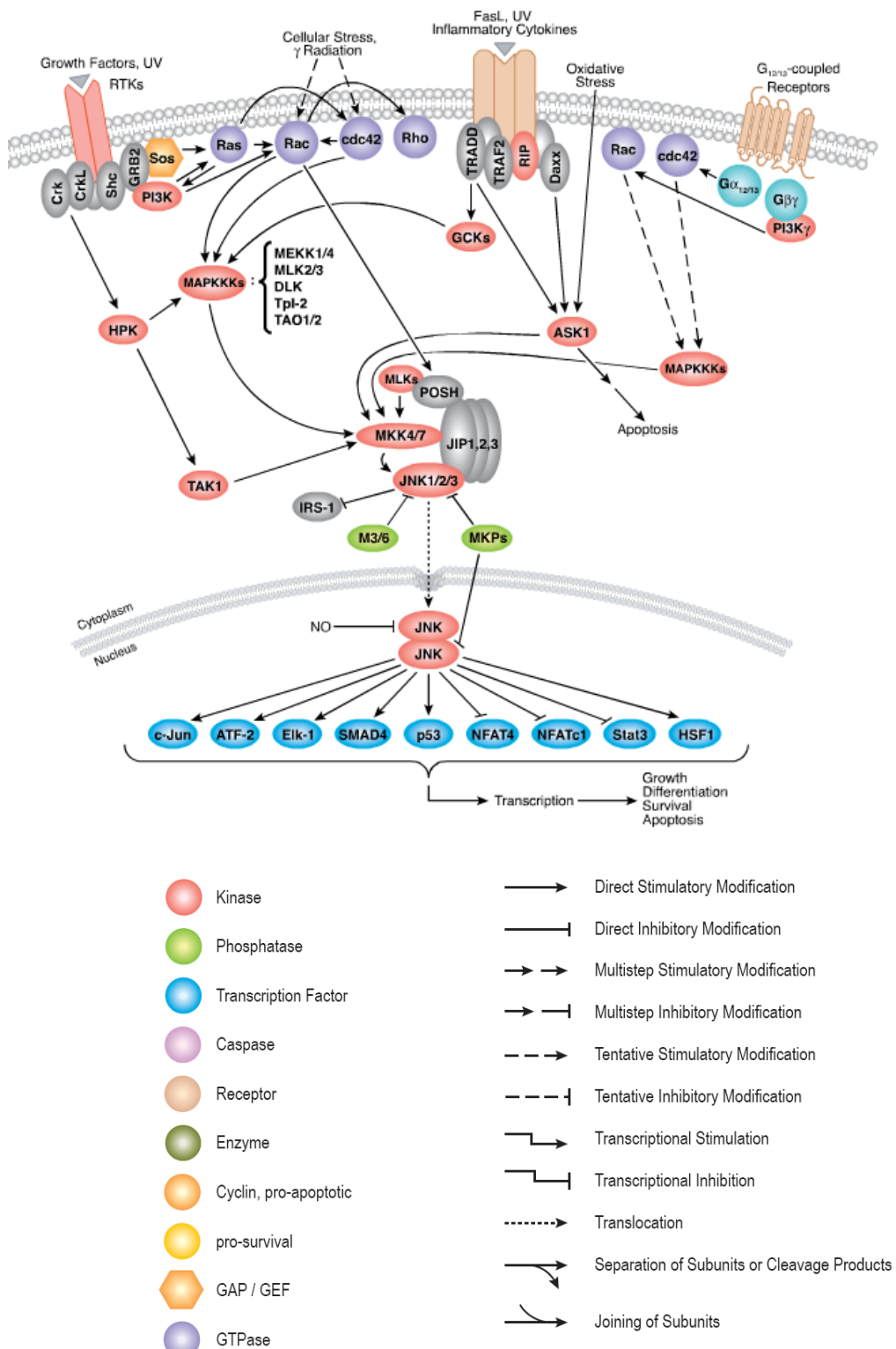
Substráty JNK byly nalezeny také v dalších buněčných kompartmentech, což rozšiřuje její funkci za transkripční děje. Tyto nejaderné substráty zahrnují s mikrotubuly asociovaný protein tau (Yoshida *et al.*, 2004), cytosolické proteiny jako E3 ligázu Itch (Gao *et al.*, 2004) a mitochondriální proteiny z rodiny bcl, Bad a Bim (Putchá *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004). Kharbanda *et al.* (2000) zaznamenali, že JNK může fosforylovat a zmenšit proapoptickou aktivitu obou Bcl-2 a Bcl-XL. Pozdější studie dokázaly, že indukce apoptózy ozářením je spojena s translokací JNK do mitochondrií a vazbou k Bcl-XL.

Donovan *et al.* (2002) pozorovali, že JNK je schopná také fosforylovat proapoptický protein Bad na serinu 128 a potencovat jeho proapoptický efekt. Podobně byla JNK pozorovaná ve schopnosti fosforylovat proapoptický protein Bim a Bmf, a tím způsobit jejich uvolnění z dyneinového motorového komplexu, který se translokuje do mitochondrií a následovně dochází k uvolnění mitochondriálních mediátorů buněčné smrti (Lei a Davis, 2003). Další transkripční faktor a substrát JNK je protein p53, který je fosforylovaný na Thr81 (Buschmann *et al.*, 2001). Po fosforylaci JNK p53 způsobuje apoptózu, což je ve shodě s jeho anti-onkogenní rolí. Na druhou stranu, když je JNK inaktivní, váže p53 mezi residui 97 a 116 a cílí p53 k degradaci do proteasomu. Tímto je JNK pravděpodobně schopná aktivovat transkripční a netranskripční mechanismy ke spuštění buněčné smrti.

Po objevení inhibitorů JNK bylo zřejmé, že JNK hraje rozhodující roli jako regulátor v nespočetných onemocněních jako diabetes, mrtvice, neurotrauma, Alzheimerova choroba, ztráta sluchu, přestože specifita těchto inhibitorů je stále v otázce (Xu *et al.*, 1996).

6.3.1 Transkripční faktor c-Jun

Nejintenzivněji studovaný transkripční faktor c-Jun patří do třídy bZip (basic region leucin zipper) proteinů, jelikož molekula dimerizuje přes formaci stočené spirály, leucinového zipu. Směrem k N-konci se nachází aktivační doména, která je fosforylovaná JNK na serinu 63 a 73. C-Jun může jednak homodimerizovat, nebo tvořit heterodimery s dalšími proteiny patřící k rodině c-Fos (cellular homolog of Finkel Biskis Jinkins murine osteosarcoma virus oncogene) nebo ATF2 (activating transcription factor) (Zoumpourlis *et al.*, 2000; Grosch *et al.*, 2003). Dimery se nazývají AP-1 (activator protein-1), rozpoznávají se a váží přes komplex makromolekulárních interakcí (mezi rezidui aminokyselin proteinu a hlavním žlábkem kladného řetězce DNA) k specifickým sekvencím DNA některých promotorů, jež obsahují AP-1 místa (pseudopalindromatická ATGACTCAT nebo různé varianty).



Obr. 6: Signální dráha c-Jun-N-terminální kinázy (upraveno podle www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp)

7 Úloha c-Jun-N-terminální kinasy v regulaci CYP3A4

7.1 Materiál a metody

7.1.1 Biologický materiál

Buňky lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2) byly kultivované v Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM) doplněném fetálním bovinním sérem na 10 % se 100 U/mL streptomycinu, 1 mg/mL penicilinu, 4 mM L-glutaminu a 1% neesenciálních aminokyselin. Buňky byly udržovány při 37°C a 5% CO₂ v inkubátoru.

7.1.2 Chemikálie

PBS 10x (NaCl 40g, KCl 1g, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 16,05g, KH₂PO₄ 1g)

0,25 % trypsin – EDTA, T4049, Sigma-Aldrich

trypanová modř, Trypan Blue, cell culture tested, T6146-256, Sigma-Aldrich

Fugene-HD, Transfection Reagent REF 04709691001, Roche

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), obohacené o antibiotika (penicillin, streptomycin) a 10 % fetálního bovinního séra, D5796, Sigma-Aldrich

Plasmidy: K vytvoření reporterového plasmidu s regionem CLEM4 byla použita metoda PCR využívající sense primer 3A4 -11.4s*KpnI* a antisense primer 3A4 -10.5*SacI*. Tento fragment byl vložen do p3A4(XREM/prox)-*luc* plasmidu za vytvoření p(3A4-CLEM4/XREM/prox)-*luc* plasmidu, označeného v této práci jako **A.-*luc***. Plasmid, označený jako **3A4-*luc***, obsahuje bazální promotor s proximálním PXR responzivním elementem ER6 a distálním enhancerem XREM 5' flanking regionu genu 3A4 vložený do reporterového vektoru pGL3-Basic reporter vector (Promega, Madison, WI) (Goodwin *et al.*, 1999), expresní plasmid PXR byl navržen Dr. S. Kliewerem (University of Texas, Dallas, TX). Ke konstrukci plasmidu **ER6-*luc*** byly syntetizovány komplementární páry oligonukleotidů obsahující tři tandemové kopie ER6 responzivního elementu promotoru *CYP3A4* oligonukleotidy byly klonované do pGL4.23 vektoru obsahující minimální promotor (Promega) (Švecová *et al.*, 2008)

Rifampicin 10 mM, R8883, Sigma-Aldrich

D-Sorbitol, DB0941, Bio BASIC INC.

SP600125, 25mM, S5567, Sigma-Aldrich

Reporter Gene Assay Lysis Buffer, 11897675001, Roche
Luciferázový pufr (D-Luciferin, 114K60503; Adenisin 5'-triphosphate, sigma, 055K7029),
Sigma-Aldich
Lyzační pufr RIPA (150 mM NaCl, 10mM Tris (pH = 7,2), 0,1% SDS, 1% Triton X- 100, 1%
deoxycholate Na, 5mM EDTA)
Bradfordovo činidlo (425 ml destilované vody, 15 ml 95% etanolu, 30 ml 88% kyseliny
fosforečné, 30 ml zásobního roztoku Bradford obsahující 100 ml 95% etanolu, 200 ml 88%
kyseliny fosforečné, 350 mg Serva Blue G)
Deionizovaná voda
40% bis Akrylamid, Lot: 080703, Bio BASIC INC.
Running pufr (1,5 Tris-HCl, pH = 8,8)
10% SDS, L4522, Sigma-Aldrich
10%APS, A3426, Sigma-Aldrich
TEMED, Bio BASIC INC., TB0508
Stacking pufr (0,5 Tris-HCl, pH = 6,8)
izopropanol, 20037-ATO, Lach Ner
Laemliho pufr (2,5 ml 4x stacking pufr, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerol, 2mg bromophenol blue,
0,31 g DTT, qsp voda 10 ml)
PVDF membrána, IPVH00010, Millipore
100 metanol, 30637, Lach Ner
Ponseau-S, P3504, Sigma-Aldrich
1x TBS tween20pufr
8% mléko, Laktino, odtučněné 1,3% tuku/hm, PROMIL
Albumin, AD0023, Bio BASIC INC.
WB Ladder, Page Ruler Prest.Prot., Fermentas
mléko, Laktino, odtučněné 1,3% tuku/hm, PROMIL
primární protilátky
 JNK- Thr183/Tyr185 Antibody Phospho SAPK/JNK, 9251S
 c-Jun- P-C-Jun(Ser63/73), D1007
sekundární protilátky
 goat anti-rabit IgG-HRP Cot#61708

rabbit-anti-goat IgG-HRP Lot#H2407

Substrát pro křenovou peroxidázu, sc – 3048, Santa Cruz

7.1.3 Laboratorní přístroje

Culture incubator, MITRE 4000, contherm; třepačka, yellow Line TTS2, Maneko; Napěťový zdroj POWER, Power station 300, Labnet; Box laminární biohazard, FASTER BH – EN2004, Chemos; Mikroskop Olympus T2, Sériové číslo 103411; dvojitá vertikální gelová elektroforéza, Scie - plast; elektroblotter TV100 – EBK, Scie – plast; centrifuga BR4i Jouan, sériové číslo 39905646; Digital Dry Bath, Accublock, Labnet; Váhy AFP 210L, Adam; autokláv PS21A, Chirana; Lednice Calex; Cyklér ELISA READER EL 800, Biotech; Výrobník šupinkového ledu F100, Compact; Box skříňový mrazicí SAN, Sanyo; Vyvolávací automat rentgenových snímků, Dürr XR 24PRO, Dürrdental; Deep freezer VXE380, Jouan, sériové číslo 50607016; Spectofotometr reader, Syngery HT, Bio – Tek.

7.1.4 Metody

Pasážování buněk

1. Médium z kultivační lahve jsem odsála, opláchla 5ml sterilního PBS.
2. Napipetovala jsem 1 ml trypsinu na 75 cm² a vložila do inkubátoru (2-3 min. při 37°C).
3. Dále jsem nepipetovala 9 ml sérového média a promíchala v homogenní roztok buněk.

Počítání buněk

1. Ze suspenze buněk jsem odebrala 10 μ l a smíchala s 90 μ l trypanové modři.
2. 10 μ l této směsi jsem pipetovala ke hraně krycího sklíčka Bürkerovy komůrky.
3. Spočítala jsem živé (neobarvené) buňky s pomocí mikroskopu v 10-ti čtvercích ohraničených trojčárkou, z těchto hodnot jsem vypočítala průměr. Rozměr čtverce je 1 mm x 1 mm, hloubka 0,1 mm = 0,1 mm³, tedy 10⁴ v cm³ (ml). Buněčná suspenze je 10krát

ředěna barvicí směsí, průměr je násoben faktorem 10^5 (počet buněk na 1 ml média suspenzní buněčné kultury).

Transfekce

1. Do jedné zkumavky z tvrdého plastu jsem napipetovala FuGENE pro všechny reakce ($0,6 \mu\text{l} \times$ počet reakcí) s bezsérovým médiem ($20 \mu\text{l} \times$ počet reakcí) a nechala stát 5 min. při pokojové teplotě.
2. Do druhé zkumavky jsem napipetovala potřebné množství roztoku plasmidu (50 ng vektoru lidského PXR / jamka, 150 ng reporterového plasmidu / jamka).
3. Roztok FuGENE jsem přepipetovala do zkumavky s plasmidem, promíchala a nechala stát 15-20 min při pokojové teplotě.
4. Do sterilní falkony jsem si připravila suspenzi buněk, použila jsem 70000 buněk na jednu jamku / reakci (24 jamková deska) a doplnila sérovým médiem.
5. Do falkony se suspenzní kulturou buněk v sérovém médiu jsem pipetovala směs plasmid/FuGENE, směs jsem promíchala převrácením a rozpipetovala po 0,5ml do jamek destičky.
6. Zkontrolovala jsem přítomnost buněk v náhodně vybraných jamkách pod mikroskopem, destičku popsala, ošetřila desinfekcí a vložila do inkubátoru při 37°C .

Inkubace

1. Druhý den jsem vyměnila v destičce médium za bezsérové a uložila na 5 hodin do inkubátoru.
2. Vytvořila jsem si roztoky pokusných látek v bezsérovém médiu do požadované koncentrace (1 ml bezsérového média s $1 \mu\text{l}$ dané látky, ředění 1000x).
3. Z jamek destičky jsem odsála bezsérové médium a připipetovala po stěně médium se zkoumanou látkou.
4. Vložila jsem do inkubátoru do 37°C a 5,5 % CO_2 na 6 hod, případně na 24 hod.

Lýza buněk

1. Zkontrolovala jsem buňky pod mikroskopem.
2. Vylila jsem médium z jamek 24jamkové desky a promyla jamky destičky PBS pufrem ze stříčky od proteinů obsažených v séru z média.
3. Pipetovala jsem 100 μ l 5x ředěného Lysis buffer (Roche) a vložila do -80°C na 15 - 20 min.
4. Destičku jsem umístila na třepačku a nechala buňky rozmrazit.
5. Zhomogenizovala jsem lyzát propipetováním obsahu a rozehrála jsem si luciferázový pufr skladovaný v mrazáku.
6. Do jamky měřicí destičky jsem pipetovala 70 μ l luciferázového pufru a 7 μ l lyzační směsi a změřila hodnotu aktivity luciferázy na luminometru.

Příprava buněčného extraktu a stanovení proteinů

1. Z 6ti jamkové desky jsem vylila médium do výlevky, propláchla 2x PBS a napipetovala 0,5 ml PBS.
2. Buňky jsem seškrabala scapperem a odpipetovala do eppendorfek. Práci jsem prováděla na ledu.
3. Centrifugovala jsem 2 min při 4°C při 5000 rpm, supernatant jsem odsála.
4. Na buněčný pelet jsem napipetovala 150 μ l lyzačního pufru RIPA a rozsuspendovala pipetováním v eppendorfci.
5. Každou eppendorfku jsem 10 min vortexovala.
6. Centrifugovala jsem 13 min při 4°C při 13000 rpm.
7. Supernatant jsem použila pro následnou Bradfordovu reakci.
8. 5 μ l vzorku jsem naředila 20 μ l deionizované vody, rozpipetovala po 10 μ l do průhledné 96ti jamkové desky a přidala 200 μ l Bradfordova činidla.
9. S pomocí programu Gene5program jsem na ELISA readru (Biotek) naměřila absorbanci při vlnové délce 580 nm , z níž jsem vypočítala koncentraci proteinu.

Western blott

1. Připravila jsem si gely podle rozpisu v tabulce (viz tab. 2). Dělicí (running) gel jsem pipetovala mezi skla a převrstvila izopropanolem pro vyrovnání povrchu.
2. Po ztuhnutí dělicího gelu jsem nalila gel zaostřovací (stacking), zasunula hřebínek a nechala polymerizovat v lednici do příštího dne.
3. Vzorky proteinů jsem smíchala s Laemliho pufrem, povařila 5 min v 95°C, nanasla na gel a separovala při 40 mA / 2gely asi 2 hodiny.
4. PVDF (Polyvinylidendifluoridovou) membránu jsem hydratovala v 100% metanolu a opláchla v destilované vodě a uložila do transblotačnín pufru až do samotného blottingu.
5. 2 vrstvy filtračnín papíru velikosti části dělicího gelu, která bude podrobena blotování, jsem navlhčila v blotovacím pufru a vložila na navlhčenou houbičku na černé dno blotovací aparatury.
6. Na filtračnín papíry jsem umístila membránu, gel, následně další 2 filtračnín papíry a navlhčenou houbičku.
7. Sendvič jsem uložila do blottovací aparatury, naplnila transfer pufrem a obložila ledem.
8. Proud jsem nastavila na 300 mA.
9. Membránu jsem opláchla v deionizované vodě, přidala ponceau S a uložila na třepačku na 5 min.
10. Membránu jsem vymyla 5krát deionizovanou vodou a nechala uschnout na filtračnín papíře.
11. Následující den jsem membránu rehydratovala v metanolu, opláchla deionizovanou vodou, transfer pufrem pro odstranění barvy a opět deionizovanou vodou.
12. Membránu jsem opláchla v 1x TBS Tween20 pufru, připravila si 8% mléko (odtučněné sušené mléko) v 1x TBS Tween20 pufru, uložila do něj membránu a nechala 1,5 hod na třepačce při pokojové teplotě.
13. Protilátky (c-jun, Santa Cruz, 1:500; JNK, Cell Signaling, 1:750) jsem pipetovala do 5% roztoku BSA albuminu v 1x TBS Tween20 a nechala přes noc na třepačce.
14. Membránu jsem promyla 3x po 10 min v 1x TBS Tween20.
15. Sekundární protilátku (1:4000) jsem inkubovala v 2,5% mléku a nechala 1,5 hod na třepačce.

16. Membránu jsem promyla 3x po 10 min v 1x TBS Tween20.
17. Na membránu jsem aplikovala substrát pro křenovou peroxidázu smícháním komerčních roztoků v poměru 1:1.
18. Membránu jsem osušila buničinou a uložila do čisté fólie.

	dělicí gel (8%)	zaostřovací gel
40% bisakrylamid	2 ml	0,4 ml
deionizovaná voda	5,4 ml	2,56 ml
Running/stacking pufr	2,5 ml	1 ml
10% SDS	100 μ l	40 μ l
10% APS	100 μ l	30 μ l
TEMED	10 μ l	4 μ l

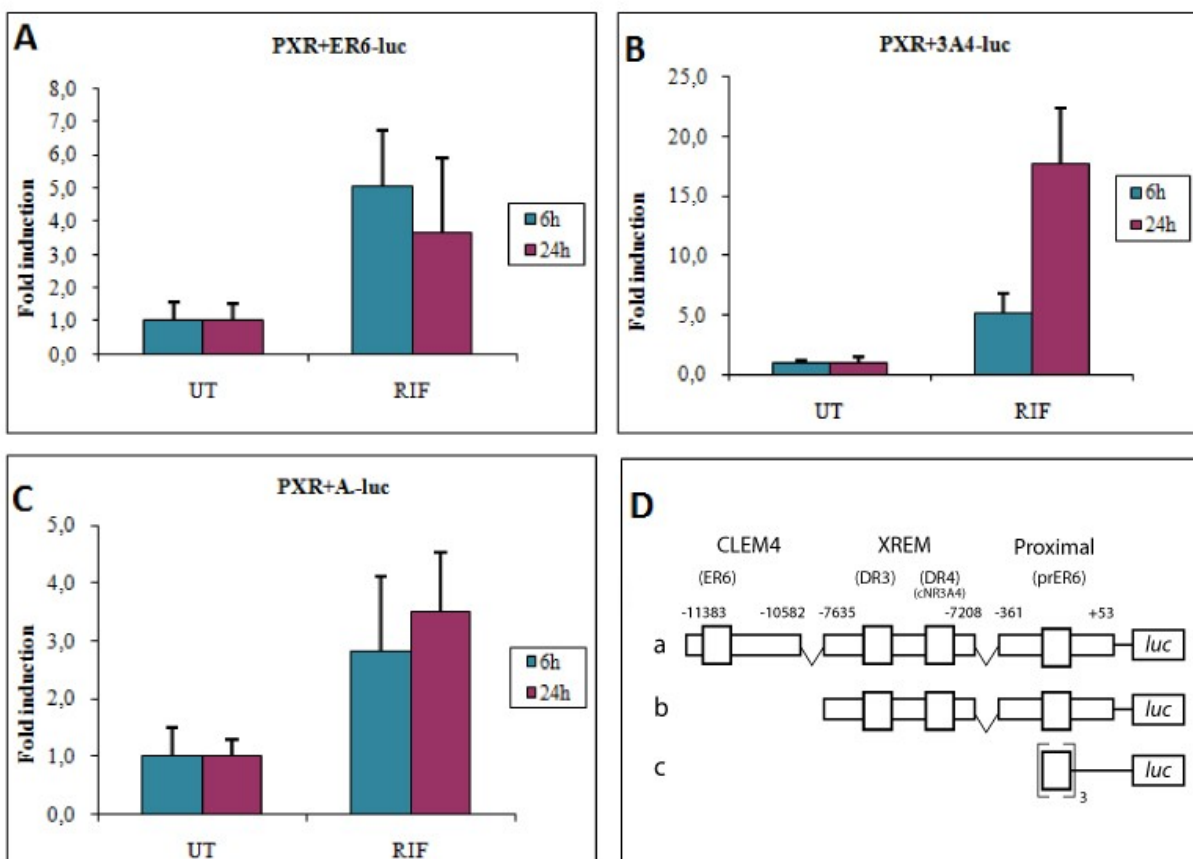
Tab. 2: Rozpis přípravy gelů pro Western blott

7.2 Výsledky

7.2.1 Časová optimalizace a výběr plasmidů

Pro svoji práci jsem využila 3 plasmidy označené **A.-luc**, obsahující kompletní promotorovou oblast cytochromu 3A4, **3A4-luc**, který neobsahuje oblast CLEM4 a **ER6-luc**, šestinukleotidová sekvence, která je součástí (PXR se váže přesně do ER6) proximálního promotoru CYP3A4 (prPXRE) (viz graf 2D). Všechny tyto reporterové plasmidy obsahují za promotorovou oblastí zaklonovaný gen pro luciferázu. Do HepG2 buněk jsem lipofekcí (lipofekční činidlo FuGene) vnesla expresní vektor pro lidský PXR (50 ng / jamka) a výše popsané reporterové plasmidy (150 ng / jamka). Pro zjištění odezvy jsem použila jeden z nejsilnějších aktivátorů PXR, rifampicin (RIF) v koncentraci 10 μ M. Intenzita transaktivace reportérových plasmidů **A.-luc** a **ER6-luc** byla po 6 i 24 hodinách inkubace srovnatelná (cca 3-5x) (graf 2A a 2C). Oproti tomu intenzita transaktivace reportérového plasmidu **3A4-luc** za dobu 24 hodin byla mnohem vyšší (cca 17x) (graf 2B). Protože vyšší hodnota indukce značí

vyšší citlivost stanovení, rozhodla jsem se nadále používat reportérový plasmid 3A4-*luc* a A-*luc*, který se liší přítomností CLEMové oblasti.



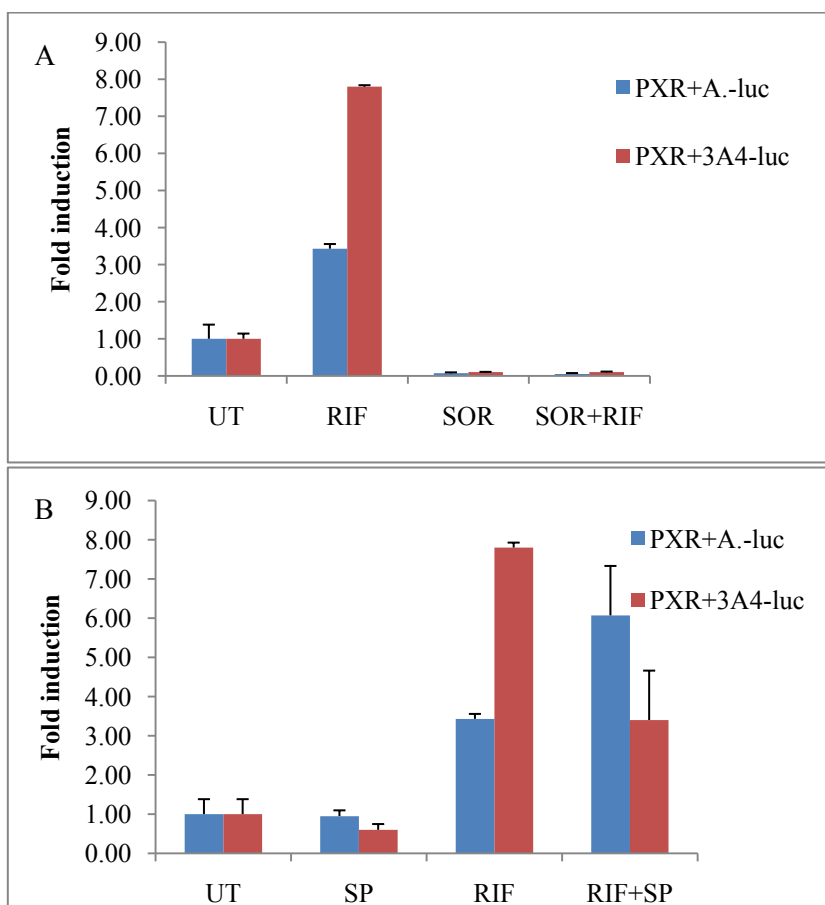
Graf 2: Časová optimalizace, výběr plasmidů a popis promotorů. Doba inkubace RIF v koncentraci 10 μ M byla 6 h a 24 h. A) Plasmid ER6-*luc* obsahuje dva hexamery obsahující obrácenou repetici separovanou šesti nukleotidy v proximálním promotoru CYP3A4 (prPXRE). B) Plasmid 3A4-*luc* neobsahuje CLEM4. C) Plasmid A-*luc* obsahuje kompletní promotorovou oblast CYP3A4. D) Promotorová oblast luciferázového konstruktů 5' flanking regionu CYP3A4. Písmena a, b, c označují jednotlivé konstrukty A-*luc*, 3A4-*luc* a ER6-*luc*. UT = negativní kontrola, DMSO (dimethylsulfoxid), RIF = Rifampicin, aktivátor PXR

7.2.2 Vliv farmakologické aktivace a inhibice JNK na transaktivaci plasmidů A-*luc* a 3A4-*luc*

Jeden z používaných aktivátorů JNK je sorbitol (SOR), který aktivuje JNK přes tvorbu hyperosmotického prostředí (Christoph *et al.*, 2001). Působení SOR o koncentraci 0,4 M výrazně

potlačilo jak bazální, tak RIF-indukovanou transaktivaci obou reportérových plasmidů (viz Graf 3A).

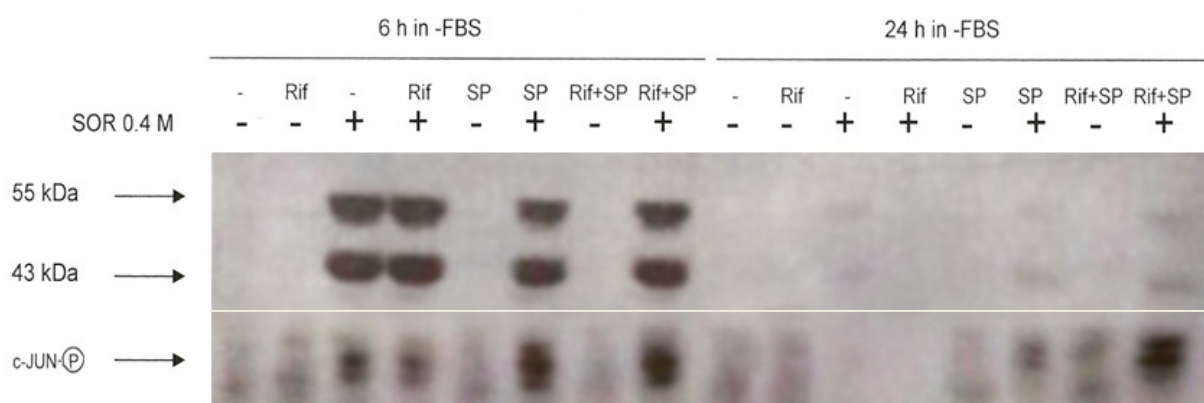
Farmakologický inhibitor JNK, SP600125 v koncentraci 25 μ M neovlivnil bazální transaktivaci u obou plasmidů, ale výrazně potencoval RIF-indukovanou transaktivaci u plasmidu *A.-luc*, ale inhiboval RIF-indukovanou transaktivaci u plasmidu *3A4-luc* (viz Graf. 3B). Účinek sorbitolu nebyl sloučeninou SP600125 potlačen.



Graf 3: PXR expresní plasmid s reportérovým plasmidem s kompletní promotorovou oblastí cytochromu 3A4 (*PXR+A.-luc*) a PXR expresní plasmid s reportérovým plasmidem s oblastí bez CLEM4 (*PXR+3A4-luc*) UT = negativní kontrola, RIF = rifampicin v koncentraci 10 μ M, SOR = sorbitol v koncentraci 0,4 μ M, SP = SP600125 v koncentraci 25 μ M. Buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin.

7.2.3 Aktivace JNK sorbitolem v bezsérovém médiu

Dále bylo třeba ověřit, zda SOR za našich experimentálních podmínek opravdu aktivuje JNK. Aktivaci JNK jsme sledovali jako fosforylaci JNK a jejího down-stream cíle c-Jun. Pozorovali jsme, že SOR v koncentraci 0,4 M aktivuje dráhu JNK po 6 hod, zatímco po 24 hod je aktivace JNK výrazně snižena (viz Obr. 7). RIF v koncentraci 10 μ M neovlivňuje aktivaci JNK po 6 ani 24 hod. Překvapivě inhibitor JNK, SP600125 v koncentraci 25 μ M nezabránil fosforylaci c-Jun, a pouze slabě snižoval fosforylaci JNK.



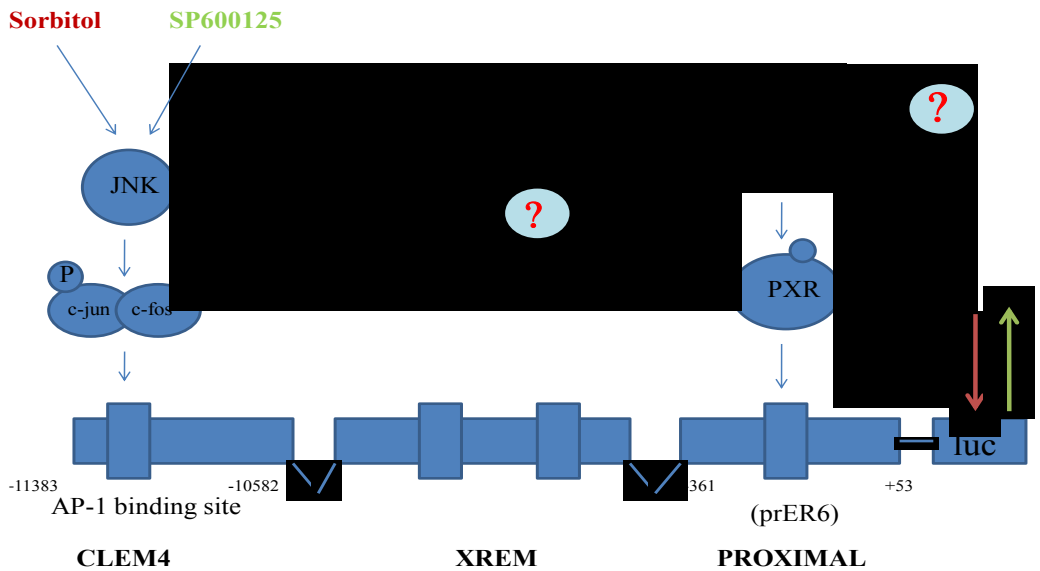
Obr. 7: Elektroforetogram JNK-P a c-Jun-P v proteinových extraktech z HepG2 buněk. Aktivace JNK sorbitolem v bezsérovém médiu za dobu 6 hodin (vlevo) a 24 hodin (vpravo). RIF = rifampicin v koncentraci 10 μ M SOR = sorbitol v koncentraci 0,4 μ M, SP = SP600125 v koncentraci 25 μ M. Protilátka proti JNK (nahore), protilátka proti fosforylované formě c-Jun (dole).

7.3 Diskuze

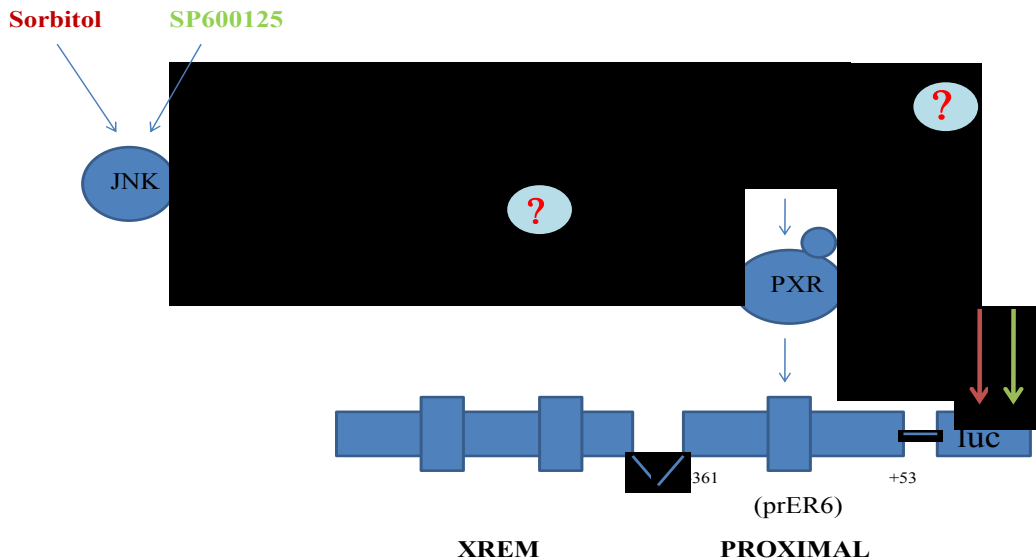
Cílem praktické části diplomové práce bylo zjištění úlohy c-Jun-N-terminální kinázy v regulaci CYP3A4. V této práci jsem zjistila, že SOR aktivuje JNK a jeho přítomnost potlačuje bazální i inducibilní transaktivaci obou promotorů. SP nezabránil sorbitolem vyvolané supresi, nicméně se mi nepodařilo dokázat funkčnost obecně používaného inhibitoru, SP600125 (viz. obr. 7).

Rozdílnost získaných dat může odrážet přítomnost enhancerové oblasti označované jako CLEM4 v jednom z plasmidu (*A.-luc*). Do této oblasti se váže transkripční faktor AP-1 složený ze dvou podjednotek c-Jun a c-Fos, fungující jako substráty JNK kinázy. Na základě mého pozorování jsem dokázala, že SOR aktivuje JNK, což se projeví poklesem transaktivace (viz obr. 8). Jako jednoduché vysvětlení je možné uvést hypotézu, že JNK fosforyluje PXR a tím zabrání jeho vazbě do promotoru. Po působení inhibitoru SP600125 došlo naopak ke zvýšené transaktivaci. Jelikož je sloučenina SP600125 kompetitivní ATP inhibitor, je možné, že se naváže do místa znemožňující kináze JNK fosforylovat PXR a heterodimer c-Jun a c-Fos tvořící komplex AP-1. Nedochází k inhibici PXR a komplex AP-1 se neváže do AP-1 binding site způsobující represi transaktivace, která v důsledku těchto skutečností vzroste.

V případě použití plasmidu *3A4-luc* SOR aktivuje JNK pouze na bazální úrovni. JNK může fosforylovat PXR a tím inhibovat jeho aktivitu, celková transaktivace je snižena. Při použití SP600125 je situace opačná, než u plasmidu *A.-luc*. Inhibitor SP600125 nezabraňuje aktivaci JNK a vykazuje stejný efekt jako SOR (viz obr. 9). Dvořák *et al.* (2008) dokázal, že sloučenina SP aktivuje i jiné signální dráhy, např. dráhu transkripčního faktoru aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). SP může mít tento účinek z důvodu různých interakcí, crosstalků, které mohou vést k tomu, že aktivace jedné signální dráhy odčerpá transkripční faktory signální dráhy jiné. Jeden promotor může být tedy aktivován a druhý inhibován.



Obr. 8: Účinek JNK na kaskádu PXR/CYP3A4 za použití plasmidu s kompletní promotorovou oblastí



Obr. 9: Účinek JNK na kaskádu PXR/CYP3A4 za použití plasmidu bez oblasti CLEM4

7.4 Závěr

Provedla jsem optimalizaci experimentálních podmínek s využitím tří plasmidů označených *A.-luc*, obsahujícího kompletní promotorovou oblast cytochromu 3A4, plasmidu *3A4-luc*, jež neobsahuje oblast CLEM4 a plasmidu *ER6-luc*, tj. šestinukleotidová sekvence, která je součástí proximálního promotoru CYP3A4 (prPXRE). Na základě intenzity odpovědi zaznamenané po aktivaci transientně transferovaného lidského PXR léčivem rifampicinem, jsem pro další práci zvolila dva plasmidy (*A.-luc* a *3A4-luc*).

Aplikace sorbitolu (aktivátor JNK) na HepG2 buňky, výrazně potlačila jak bazální, tak RIF-indukovanou transaktivaci obou reportérových plasmidů. Farmakologický inhibitor JNK, SP600125 bazální transaktivaci u obou plasmidů neovlivnil, výrazně však potencoval RIF-indukovanou transaktivaci u plasmidu *A.-luc*, ale inhiboval RIF-indukovanou transaktivaci u plasmidu *3A4-luc*. Účinek sorbitolu sloučenina SP600125 nepotlačila.

Následně jsem ověřila, že sorbitol za použitých experimentálních podmínek opravdu aktivuje JNK, a to sledováním fosforylace JNK a jejího down-stream cíle c-Jun technikou western blotting. Inhibitor JNK, SP600125 nezabránil fosforylaci c-Jun a pouze slabě snižoval fosforylaci JNK.

Jedním z možných vysvětlení pro diferenciální účinky sorbitolu a SP600125 na transkripční aktivitu PXR v systémech s různými plasmidy je duální účinek JNK na signální dráhy zapojené do indukce CYP3A4. Na jedné straně aktivovaná JNK fosforyluje c-Jun, který se ve své transkripčně aktivní podobě váže do AP-1 vazebného místa v CLEM-oblasti promotoru CYP3A4 a následně negativně moduluje expresi CYP3A4 genu. Na druhou stranu, JNK pravděpodobně fosforyluje PXR, případně jeho transkripční koaktivátory a moduluje takto pozitivně transkripční aktivitu PXR. Výsledný efekt JNK na expresi CYP3A4 je pak výslednicí těchto dvou mechanismů.

8 Seznam použitých zkratek

CYP 450	cytochrom P450
ER	endoplazmatické retikulum
MFO systém	mikrosomální monooxidázový systém se smíšenou funkcí
MDR1	P-glykoprotein
ATP	adenosintrifosfát
CYP3A4	cytochrom 3A4
GR	glukokortikoidní receptor
OATP	polypeptidy transportující organické anionty
OCT	polypeptidy transportující organické kationty
ER	estrogenní receptor
LBD	doména vázající ligand
LBP	ligand binding pocket
AF-2	aktivační funkční helix
DBD	DNA vazebná doména
HREs	hormonální responzibilní element
RXR	receptor pro kyselinu <i>cis</i> -retinovou
AF-1	aktivační funkce 1
NLS	jaderný lokalizační signál
HDAC	histon deacetyláza
HAT	histon acetyláza
MAPK	proteinkinasa aktivovaná mitogeny
PXR	pregnanový X receptor
CAR	konstitutivní androstanový receptor
VDR	receptor pro vitamín D
hsp90	heat shock protein (90 kDa)
SHP	short/small heterodimerizující partner
CLEM4	constitutive liver enhancer module of CYP3A4
XREM	xenobiotic responsive enhancer module
MLK	mixed lineage kinases
TNF	tumor nekrosis faktor
IL-1	interleukin-1
SH3	aminoterminální Src-homologní-3-doména
ERK	extracelulárními signály regulovaná kinasa
JNK/SAPK	c-Jun N-terminalní kinázy / stresem aktivované proteinkinázy
JIP	JNK-interagující protein
POSCH	plenty of SH3
bZip	basic region pro leucinový zip
AP-1	transkripční faktor AP-1

9 Seznam použité literatury

Avruch J., Khokhlatchev A., Kyriakis JM, Luo Z., Tzivion G., Vavvas D., Zhang XF. (2001): Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade, *Rec. Prog. Horm. Res.* 56, 127–155.

Barr RK., Bogoyevitch MA. (2001): The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol* 33:1047–1063.

Baumann CT., Maruvada P., Hager GL., Yen PM. (2001): Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J. Biol. Chem.*, 276 (14), 11237–45.

Bertilsson G., Heidrich J., Svensson K., Asman M., Jendeberg L., Sydow-Bäckman M., Ohlsson R., Postlind H., Blomquist P., Berkenstam A. (1998): Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (21) 12208–12213.

Bertilsson G., Berkenstam A., Blomquist P. (2001): Functionally conserved xenobiotic responsive enhancer in cytochrome P450 3A7, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (1), 139–244.

Blumberg B., Sabbagh W Jr., Juguilon H., Bolado J Jr., van Meter CM., Ong ES., and Evans RM. (1998): SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 12: 3195–3205.

Brian WR., Sari MA., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky LS., Guengerich FP. (1990): Catalytic activities of human liver cytochrome P-450IIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 29 (51), 11280-11292.

Brydon LB., Dennis TS., Brion WM., Eoin CO., Steve TS., Weiming Xu, Jim CL., Aparna M., Steve P., Yoshitaka S., Shripad SB. Anthony MM., David WA. (2001): SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Signal Research Division, Celgene Corporation, 5555 Oberlin Drive, San Diego, CA 92121.

Buschmann T., Potapova O., Bar-Shira A., Ivanov VN., Fuchs SY., Henderson S., Fried VA., Minamoto T., Alarcon_Vargas D., Pincus MR., Gaarde WA., Holbrook NJ., Shiloh Y., and Ronai Z. (2001): Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress, *Mol. Cell.Biol.*, 21, 2743_2754.

Daly AK. (1995): Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J. Mol. Med.* 73, 539-553.

Daujat M., Pichard L., Fabre I., Pineau T., Fabre G., Bonfils C., Maurel P. (1991): Induction Protocols For Cytochrome P450 IIIA in vivo and in Primary Cultures of Animal and Human Hepatocytes. *Methods Enzymol.*, 206 (345-353).

Davis RJ. (2000): Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell*, 103, 239-252.

DeFranco DB., Ramakrishnan C., Tang Y. (1998): Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65 (1–6), 51–8. Staudinger JL., Lichti K. (2007): *Cell Signaling and Nuclear Receptors: New Opportunities for Molecular Pharmaceuticals in Liver Disease*, University of Kansas, Department of Pharmacology and Toxicology.

Delmotte MH., Tahayato A., Formstecher P., Lefebvre P. (1999): Serine 157, a retinoic acid receptor α residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR/RAR α heterodimerization and transcriptional activity. *J Biol Chem* 274:38225–38231.

Derijard B., Hibi M., Wu IH. (1994): JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*; 76: 1025–1037.

Dickens M., Rogers JS., Cavanagh J. (1997): A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*; 277: 693–696.

Ding M., Li J., Leonard SS., Shi X., Costa M., Castranova V., Vallyathan V., Huang C. (2002): Differential role of hydrogen peroxide in UV-induced signal transduction, *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 81–90.

Distlerath LM., Guengerich FP. (1987): Enzymology of human liver cytochromes P450. In *Mammalian Cytochromes P-450, Volume 1*, Guengerich FP (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp.133-198.

Donovan N., Becker EB., Konishi Y., Bonni A. (2002): JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem*; 277: 40944–40949.

Dostálek M. (2006): *Farmakokinetika*, Grada Publishing a.s

Drocourt L., Pascussi JM., Assena TE., Fabre J., Maurel P., Vilarem M. (2001): Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes, *Drug Metab. Dispos.* 29 (10), 1325– 1331.

Drocourt L., Ourlin JC., Pascussi JM., Maurel P., Vilarem MJ. (2002): Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 277 (28), 25125– 25132.

Dunn RT., Gleason BA., Hartley DP., Klaassen CD. (1999): Postnatal ontogeny and hormonal regulation of sulfotransferase SULT1B1 in male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 290:319–324.

Dussault I., Lin M., Hollister K., Wang EH., Synold TW., Forman BM. (2001): Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. *J Biol Chem* 276:33309–33312.

Dvořák Z., Vrzal R., Henklová P., Jancová P., Anzenbacherová E., Maurel P., Švecová L., Pávek P., Ehrmann J., Havlík R., Bednář P., Lemr K., Ulrichová J. (2008): JNK inhibitor

SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 75(2):580-588.

Eichelbaum M., Burk O. (2001): CYP3A genetics in drug metabolism, *Nat Med* 7: 285–287.

El-Sankary W., Plant NJ., Gibson GG., Moore DJ. (2000): Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors, *Drug Metab. Dispos.* 28 (5), 493– 496.

Enslin H., Raingeaud J., Davis RJ. (1998): Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6, *J. Biol. Chem.* 273, 1741–1748.

Escriva H., Delaunay F., Laudet V. (2000): Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22:717–727.

Escriva H., Safi R., Hanni C., Langlois MC., Saumitou-Laprade P., Stehelin D., Capron A., Pierce R., Laudet V. (1997): Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6803–6808.

Essers MA., Weijzen S., de Vries-Smits AM., Saarloos I., de Ruiter ND (2004): FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 23: 4802–4812.

Faber KN., Muller M., Jansen PLM. (2003): Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 107–24.

Font de Mora J., Brown M. (2000): AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20: 5041–5047.

Forrester LM., Neal GE., Judah DJ., Glancey MJ., Wolf CR. (1990): Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8306–8310.

Fu M., Wang C., Wang J., Zhang X., Sakamaki T., Yeung YG., Chang C., Hopp T., Fuqua SA., Jaffray E. (2002): Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and transrepression function. *Mol Cell Biol* 22:3373–3388.

Gallo KA., Johnson GL. (2002): Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 663-672.

Gao M., Labuda T., Xia Y., Gallagher E., Fang D. (2004): Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 306:271–275.

Geick A., Eichelbaum M., Burk O. (2001): Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 276:14581–14587.

Gellner K., Eiselt R., Hustert E., Arnold H., Koch I., Haberl M., Deglmann CJ., Burk O., Buntfuss D., Escher S., Bishop C., Koebe HG., Brinkmann U., Klenk HP., Kleine K., Meyer UA., Wojnowski L. (2001): Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene, *Pharmacogenetics*, 11 (2), 111-121.

Gerbal-Chaloin S., Daujat M., Pascussi JM., Pichard-Garcia L., Vilarem MJ., Maurel P. (2002): Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (1), 209– 217.

Gerbal-Chaloin S., Pascussi JM., Pichard-Garcia L., Daujat M., Waechter F., Fabre JM., Carrère N., Maurel P. (2001): Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture, *Drug Metab. Dispos.* 29 (3), 242– 251.

German P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. (2006): Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors, *Pharmacol Rev* 58:685–704.

Giguere V. (1999): Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 20 (5): 689–725.

Glass CK., Rosenfeld MG. (2000): The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121–141.

Gonzales FJ. (1998): The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol Lett* 102-102, 161-6.

Gonzalez FJ. (2005): Role on cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1, *Mutation Research* 569.

Goodwin B., Hodgson E., D'Costa DJ., Robertson GR., Liddle C. (2002): Transcriptional Regulation of the Human CYP3A4 Gene by the Constitutive Androstane Receptor *Mol. Pharmacol.*, 62 (2), 359-365.

Goodwin B., Hodgson E., Liddle C. (1999): The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhance module. *Mol Pharmacol* 1999;56:1329-39.

Goodwin B., Moore LB., Stoltz CM., McKeeand DD., Kliewer SA. (2001): Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor, *Mol. Pharmacol.* 60 (3), 427– 431.

Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert JM., Argos P., Chambon P. (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature (Lond)* 320:134–139.

Grosch S., Tegeder I., Schilling K., Maier TJ., Niederberger E., Geisslinger G. (2003): Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers, *FASEB J.*, 17, 1316_1318.

Guengerich FP. (1987): Enzymology of rat liver cytochromes P450, In *mammalian dytochromes P-450*, Volume 1, Guengerich FP (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-54.

Guengerich FP. (1995): Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*, 2nd edition, Ortiz de Montellano PR (ed.), Plenum Press, New York, PP. 473-535.

Guengerich FP. (1999): Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 39:1–17.

Guengerich FP. (2007): Mechanisms of Cytochrome P450 Substrate Oxidation MiniReview, *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY* Volume 21, Number 4.

Gupta S., Barrett T., Whitmarsh AJ., Cavanagh J., Sluss HK., Derijard B., Davis RJ. (1996): Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO Journal*; 15: 2760–2770.

Hagenbuch B., Meier PJ. (2003): The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609, 1–18.

Hakkola J., Raunio H., Purkunen R., Saarikoski S., Vahakangas K., Pelkonen O., Edwards RJ., Boobis R., Pasanen M. (2001): Cytochrome P450 3A Expression in the Human Fetal Liver: Evidence that CYP3A5 Is Expressed in Only a Limited Number of Fetal Livers, *Biol. Neonate*, 80 (3), 193-201.

Harvey JL., Paine AJ., Maurel P., Matthew C., Wright MC. (2000): Effect of the adrenal 11-beta-hydroxylase inhibitor metyrapone on human hepatic cytochrome P-450 expression: induction of cytochrome P-450 3A4, *Drug Metab. Dispos.* 28 (1), 96–101.

Haugen DA., van der Hoefer TA., Coon MJ. (1975): Purified liver microsomal cytochrome P-450: Separation and characterization of multiple forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 3567-3570.

Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., Karin M. (1993): Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*; 7: 2135–2148.

Hollenberg SM., Weinberger C., Ong ES., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson EB., Rosenfeld MG., Evans RM. (1985): Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature (Lond)* 318:635–641.

Hosokawa M., Hattori K., Satoh T. (1993): Differential responses of rat hepatic microsomal carboxylesterase isozymes to glucocorticoids and pregnenolone 16 α -carbonitrile. *Biochem Pharmacol* 45:2317–2322.

Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature (Lond)* 410:37–40.

Christoph PB., Wen X., James EF. (2001): c-Jun N-terminal Kinase Activation in *Xenopus laevis* Eggs and Embryos, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 2, Issue of January 12, pp. 1459–1465.

Ito M., Yoshioka K., Akechi M., Yamashita S., Takamatsu N., Sugiyama K., Hibi M., Nakabeppu Y., Shiba T., Yamamoto KI. (1999): JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase

(JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway, *Mol. Cell. Biol.*, 19,7539-7548.

Ito S., Alcorn J. (2003): Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 653–65.

Jensen EV., Khan SA. (2004) A two-site model for antiestrogen action. *Mech Ageing Dev* 125:679–682.

Jiang Y., Chen C., Li Z., Guo W., Gegner JA., Lin S., Han J. (1996): Characterization of the structure and function of a new mitogenactivated protein kinase (p38beta), *J. Biol. Chem.* 271, 17920–17926.

Johnson EF., Schwab GE. (1984): Constitutive forms of rabbit-liver microsomal cytochrome P-450: enzymatic diversity, polymorphism and allosteric regulation. *Xenobiotica*, 14, 3-18.

Jones SA., Moore LB., Shenk JL., Wisely GB., Hamilton GA., McKee DD., Tomkinson NCO., LeCluyse EL., Lambert MH., Willson TM., Kliewer SA., and Moore JT. (2000): The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* 14: 27–39.

Kallunki T., Su B., Tsigelny I., Sluss HK., Derijard B., Moore G., Davis R., Karin M. (1994): JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes & Development*; 8: 2996–3007.

Kast HR., Goodwin B., Tarr PT., Jones SA., Anisfeld AM., Stoltz CM., Tontonoz P., Kliewer S., Willson TM., Edwards PA. (2002): 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* 277:2908–2915.

Kawana K., Ikuta T., Kobayashi Y., Gotoh O., Takeda K., Kawajiri K. (2003): Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. *Mol Pharmacol* 63:524–531.

Kawasaki M., Hisamoto N., Iino Y., Yamamoto M., Ninomiya Tsuji, J., Matsumoto, K. (1999): A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons, *EMBO J.*, 18(13):3604-15.

Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K. (2000): Translocation of SAPK/ JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem*; 275:322–327.

Kim MS., Kim YK., Eun HC., Cho KH., Chung JH. (2006): Alltrans retinoic acid antagonizes UV-induced VEGF production and angiogenesis via the inhibition of ERK activation in human skin keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 126, 2697–2706.

Kliewer SA., Moore JT., Wade L., Staudinger JL., Watson MA., Jones SA., McKee DD., Oliver BB., Willson TM., Zetterstrom RH. (1998): An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway, *Cell* 92: 73–82.

Knejzlok Z., Káš J., Ruml T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chem. Listy* 94, 913 n 918.

Knutti D., Kressler D., Kralli A. (2001): Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9713–9718.

Kocarek TA., Schuetz EG., Strom SC., Fisher RA., Guzelian PS. (1995): Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes, *Drug Metab. Dispos.*, 23 (3), 415–421.

Kouzarides T. (2000): Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 19:1176–1179.

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. (2004): 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* 32:149–154.

Kumar R., Johnson BH., Thompson EB. (2004): Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem.*, 40, 27–39.

Kumar R., Wang RA., Barnes CJ. (2004): Coregulators and chromatin remodeling in transcriptional control. *Mol Carcinog* 41: 221–230.

Kumar V., Green S., Staub A., Chambon P. (1986): Localisation of the oestradiolbinding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 5:2231–2236.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF., Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;369:156–160. Behrens A., Sibilio M., Wagner EF. (1999): Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature genetics*; 21: 326–329.

Kyriakis JM., Avruch J. (2001): Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation, *Physiol. Rev.*, 81, 807–869.

Kyriakis JM., Avruch J. (1990): pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem*; 265: 17355–17363.

Kyriakis JM., Avruch J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol. Rev.* 81, 807–869.

Kyriakis JM., Banerjee P., Nikolakaki E. (1994): The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*; 369: 156–160.

Lamba JK., Lin YS., Schuetz EG., Thummel KE. (2002): Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54 (10), 1271-1294.

Lee CM., Onesime D., Reddy CD., Dhanasekaran N., Reddy EP. (2002): A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14189-14194.

Lehmann JM., McKee DD., Watson MA., Willson TM., Moore JT., Kliewer SA. (1998): The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 102: 1016–1023.

Lei K., Davis RJ. (2003): JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 2432–2437.

Lewis TS., Shapiro PS., Ahn NG. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv. Cancer Res.* 74, 49–139.

Li B., Si J., Dewille JW. (2007): Ultraviolet radiation (UVR) activates p38 MAP kinase and induces post-transcriptional stabilization of the C/EBPdelta mRNA in G(0) growth arrested mammary epithelial cells, *J. Cell Biochem*, doi:10.1002/jcb.21554, in press.

Liddle C., Bryan J., Goodwin BJ., George J., Tapner M., Farrell GC. (1998): Separate and Interactive Regulation of Cytochrome P450 3A4 by Triiodothyronine, Dexamethasone, and Growth Hormone in Cultured Hepatocytes *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83 (7), 2411-2416.

Lin JH., Yamazaki M. (2003): Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 42, 59 –98.

Liu L., Klaassen CD. (1996): Regulation of hepatic sulfotransferases by steroidal chemicals in rats. *Drug Metab Dispos* 24:854–858.

Lopez GN., Turck CW., Schaufele F., Stallcup MR., Kushner PJ. (2001): Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem* 276: 22177–22182.

Ma X., Idle JR., Gonzales FJ. (2008): The Pregnane X receptor From Bench to Bedside. *Expert Opin Drug Metab Toxicology* 4(7): 895-908.

Madhu C., Klaassen CD. (1991): Protective effect of pregnenolone- 16-carbonitrile on acetaminophen-induced hepatotoxicity in hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* 109: 305–313.

Maglich JM., Sluder A., Guan X., Shi Y., McKee DD., Carrick K., Kamdar K., Willson TM., Moore JT. (2001): Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol.* 2 (8), 29.129.7.

Martinez-Jimenez CP., Gomez-Lechon MJ., Castell JV., Jover R. (2005): Transcriptional regulation of the human hepatic CYP3A4: identification of a new distal enhancer region responsive to CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms (liver activating protein and liver inhibitory protein). *Mol. Pharmacol.*, 67(6), 2088-2101.

Matsumura K., Saito T., Takahashi Y., Ozeki T., Kiyotani K., Fujieda M., Yamazaki H., Kunitoh H., Kamataki T. (2004): Identification of a Novel Polymorphic Enhancer of the Human CYP3A4 Gene, *Mol. Pharmacol.*, 65 (2), 326-334.

Meng F., Yamagiwa Y., Taffetani S., Han J., Patel T. (2005): IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C971–C981.

Mchichi BE., Hadji A., Vazquez A., Leca G.(2007): p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death, *Cell Death Differ.* 14, 1826–1836.

Moore JT., Kliewer SA. (2000): Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions, *Toxicology* 153 (1–3), 1–10.

Moore LB., Parks DJ., Jones SA., Bledsoe RK., Consler TG., Stimmel JB., Goodwin B., Liddle C., Blanchard SG., Willson TM., Collins JL., Kliewer SA. (2000): Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 275:15122–15127.

Morgan DO. (1995): Principles of CDK regulation. *Nature (Lond)* 374:131–134.

Musti AM., Treier M., Bohmann D. (1997): Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*; 275: 400–402.

Nagpal S., Friant S., Nakshatri H., Chambon P. (1993): RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.*,12 (6), 2349–60.

Nebert DW., Nelson DR., Feyereisen R. (1989): Evolution of the cytochrome P450 genes, *Xenobiotica* 79, 1149–1160.

Nelson DR., Kamataki T., Waxman DJ., Guengerich FP., Estabrook RW., Feyereisen R., Gonzalez FJ., Coon MJ., Gunsalus IC., Gotoh O., Okuda K., Nebert DW. (1993): The P450 superfamily: update of new sequencis, gene maping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12, 1-51.

Nelson DR., Koyamans L., Kamataki T., Stegeman JJ., Freyereisen R., Waxman DJ., Waterman MR., Gotoh O., Coon MJ., Estabrook RW., Gunsalus I., Nebert DW. (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1.

Nevert DW., Adesnik M., Coon MJ., Estabrook RW., Gonzalez FJ., Guengerich FP., Gunsalus IC., Johnson EF., Kember B., Levin W., Phillips IR., Sato R., Waterman MR. (1987): The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 6, 1-11.

Nevert DW., Nelson DR., Adesnik M., Coon MJ. Estabrook RW., Gonzalez FJ., Guengerich FP., Gunsalus IC., Johnson EF., Kember B., Levin W., Phillips IR., Sato R., Waterman MR. (1989): The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA*, 8, 1-13.

Nishida E., Gotoh Y. (1993): The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways, *Trends Biochem. Sci.* 18, 128–131.

Ozdemir V., Kalowa W., Tang BK., Paterson AD., Walker SE., Endrenyi L., Kashuba AD. (2000): Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* 10: 373–388.

Ogg MS., Williams JM, Tarbit M, Goldfarb PS, Gray TJ, Gibson GG. (1999): A reporter gene assay to assess the molecular mechanisms of xenobiotic-dependent induction of the human CYP3A4 gene in vitro, *Xenobiotica* 29 (3), 269– 279.

Omura T., Sato R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370-2378.

Omura T., Sato R. (1962): A new cytochrome in liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 1375-1376.

Owen GI., Zelent A. (2000): Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci* 57:809–827.

Paolini M., Cantelli-Forti G., Perocco P., Pedulli GF., Abdel-Rahman SZ., and Legator MS. (1999): Co-carcinogenic effect of beta-carotene, *Nature (Lond)* 398: 760–761.

Pascussi JM., Jounaidi Y., Drocourt L., Domergue J., Balabaud C., Maurel P., Vilarem MJ. (1999): Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (2), 377–381.

Patel RD., Kim DJ., Peters JM., Perdew GH. (2006): The aryl hydrocarbon receptor directly regulates expression of the potent mitogen epiregulin, *Toxicol. Sci.* 89, 75–82.

Pávek P., Dvořák Z. (2008): Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues, *Current Drug Metabolism*, 9, 129-143.

Pávek P., Pospěchová K., Švecová L., Surová Z., Stejskalová L., Blažková J., Dvořák Z., Blahoš J. (2010): Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene, *Biochemical Pharmacology*, Volume 79, Issue 2, 15 January 2010, Pages 277-287.

Payne DM., Rossomando AJ., Martino P., Erickson AK., Her JH., Shabanowitz J., Hunt DF., Weber MJ., Sturgill TW. (1991): Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase), *EMBO J.* 10, 885–892.

Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu BE., Karandikar M., Berman K., Cobb MH. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153–183.

Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F. (2006): Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein, *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), 2006, No. 4, p. 196–201.

Perissi V., Rosenfeld MG. (2005): Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:542–554.

Pulverer BJ., Kyriakis JM., Avruch J., Nikolakaki E., Woodgett JR. (1991): Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*; 353: 670–674.

Putchu GV., Le S., Frank S., Besirli CG., Clark K. (2003): JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38: 899–914.

Putz T., Culig Z., Ede IE., Nessler-Menardi C., Bartsch G., Grunicke H., Uberall F., Klocker H. (1999): Epidermal growth factor (EGF) receptor blockade inhibits the action of EGF, insulin-like growth factor I, and a protein kinase A activator on the mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cell lines, *Cancer Res.* 59, 227– 233.

Ramet M., Lanot R., Zachary D., and Manfrulli P.(2002): JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila* *Dev. Biol.*, 241, 145_156.

Rodriguez-Antona C., Bort R., Jover R., Tindberg N., Ingelman-Sundberg M., Gomez-Lechon MJ., Castell JV. (2003): Transcriptional regulation of human CYP3A4 basal expression by CCAAT enhancer-binding protein alpha and hepatocyte nuclear factor-3 gamma *Mol. Pharmacol.*, 63 (5), 1180-1189.

Rogatsky I., Logan SK., Garabedian MJ. (1998): Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2050–2055.

Rochette-Egly C., Oulad-Abdelghani M., Staub A., Pfister V., Scheuer I., Chambon P., Gaub MP. (1995): Phosphorylation of the retinoic acid receptor by protein kinase A. *Mol Endocrinol* 9:860–871.

Rosenberg, MF., Callaghan, R., Ford, RC., Higgins, CF. (1997): Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J. Biol. Chem.*, 272, 16, p. 10685–10694.

Rowan BG., Weigel NL., O'Malley BW. (2000): Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1: identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275: 4475–4483.

Runge-Morris M., Wu W., Kocarek TA. (1999): Regulation of rat hepatic hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2–40/41) gene expression by glucocorticoids: evidence for a dual mechanism of transcriptional control. *Mol Pharmacol* 56:1198–1206.

Ryan D., Lu AYH. and Levin W. (1978): Purification of cytochrome P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Methods in Enzymology*, 52 117-123.

Shimada T., Guengerich FP. (1989): Evidence for cytochrome P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (2), 462-465.

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich FP. (1994): Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 414–423.

Schuetz, EG., Schuetz JD., Strom SC., Thompson MT., Fisher RA., Molowa DT., Li D. and Guzelian PS. (1993): Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes, *Hepatology*, 18 (5), 1254-1262.

Smeal T., Binetruy B., Mercola D., Grover-Bardwick A., Heidecker G., Rapp UR., Karin M. (1992): Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Molecular and Cellular Biology*; 12: 3507–3513.

Smeal T., Binetruy B., Mercola DA., Birrer M., Karin M. (1991): Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*; 354: 494–496.

Song JJ., Lee YJ. (2007): Differential activation of the JNK signal pathway by UV irradiation and glucose deprivation, *Cell Signal*. 19, 563–572.

Squires EJ., Sueyoshi T., Negishi M. (2004): Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. *J Biol Chem* 279:49307–49314.

Stephens EA., Taylor JA., Kaplan N., Yang CH., Hsieh LL., Lucier GW., Bell D. A. (1994): Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 4, 185.

Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam vytochormů P450 pro lidské zdraví, *Chem. Listy* 93, 229 – 237.

Stiborová M., Hudeček J., Páca J., Martínek V. (2004): Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy* 98, 876-890.

Sturgill TW., Ray LB., Erikson E., Maller JL. (1988): Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II, *Nature* 334, 715– 718.

Sueyoshi T., Kawamoto T., Zelko I., Honkakoski P., Negishi M. (1999): The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene, *J. Biol. Chem.* 274 (10), 6043– 6046.

Synold TW., Dussault I., Forman BM. (2001): The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux, *Nat. Med.* 7 (5), 584– 590.

Švecová L., Vrzal R., Buryšek L., Anzenbacherová E., Cervený L., Grim J., Trentnar F., Kuneš J., Pour M., Staud F., Anzenbacher P., Dvořák Z., Pávek P. (2008): Azole Antimycotics Differentially Affect Rifampicin-Induced Pregnane X Receptor-Mediated CYP3A4 Gene Expression, *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, Vol. 36, No. 2, 36:339–348.

Tapon N., Nagata K., Lamarche N., Hall A. (1998): A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *EMBO J*; 17: 1395–1404.

Theresa MC., Tan C., Sit KH., Wong KP. (2004): UDP-glucuronosyltransferase activity toward harmol in human liver a human fetal liver cells in culture, *Analytical Biochemistry* 185 (1), 44-50.

Thornton JW., DeSalle R. (2000): A new method to localize and test the significance of incongruence: detecting domain shuffling in the nuclear receptor superfamily. *Syst Biol* 49:183–201.

Thummel KE., Brimer C., Yasuda K., Thottassery J., Senn T., Lin Y. (2001): Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3, *Mol. Pharmacol.* 60 (6), 1399–1406.

Thummel KE., Wilkinson GR. (1998): In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38: 389–430.

Tirona RG., Lee W., Leake BF., Lan LB., Cline CB., Lamba V., Parviz F., Duncan SA., Inoue Y., Gonzalez FJ., Schuetz EG., Kim RB. (2003): The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4, *Nat. Med.*, 9 (2), 220-224.

Vo N., Goodman RH. (2001): CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276: 13505–13508.

Wang C., Fu M., Angeletti RH., Siconolfi-Baez L., Reutens AT., Albanese C., Lisanti MP., Katzenellenbogen BS., Kato S., Hopp T., (2001): Direct acetylation of the estrogen receptor _hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 76:18375–18383.

Watkins RE., Wisely GB., Moore LB., Collins JL., Lambert MH., Williams SP., Willson TM., Kliewer SA., Redinbo MR. (2001): The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity, *Science* 292 (5525), 2329–2333.

Weiss C., Schneider S., Wagner EF., Zhang X., Seto E. (2003): JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J* 22: 3686–3695.

Wrighton SA., Stevens JC. (1992): The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol*; 22: 1–21.

www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm

www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp

Xu S., Robbins DJ., Christerson LB., English JM., Vanderbilt CA., Cobb MH. (1996): Cloning of rat MEK kinase 1 cDNA reveals an endogenous membrane-associated 195-kDa

protein with a large regulatory domain; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; p. 5291-5295.

Xu Z., Kukekov NV., Greene LA. (2003): POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J*; 22: 252–261.

Yang DD., Kuan CY., Whitmarsh AJ., Rincon M., Zheng TS., Davis RJ., Rakic P., Flavell RA. (1997): Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature*; 389: 865–870.

Yang SH., Sharrocks AD., Whitmarsh AJ. (2003): Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades, *Gene* 320, 3–21.

Yoshida H., Hastie CJ., McLauchlan H., Cohen P., Goedert M. (2004): Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 90: 352–358.

Yu C., Minemoto Y., Zhang J., Liu J., Tang F. (2004): JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13:329–340.

Yuan LW., Gambée JE. (2000): Phosphorylation of p300 at serine 89 by protein kinase C. *J Biol Chem* 275: 40946–40951.

Zhang L., Brett CM., Biacommini KM. (1998): Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination, *Pharmacol. Toxicol.*: 38, 431.

Zoumpourlis V., Papassava P., Linardopoulos S., Gillespie D., Balmain A., Pintzas A. (2000): High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model., *Oncogene*, 19, 4011-4021.

Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P. (2002): Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism, *Journal Cell. Mol. Med.* Vol 6, No 2.