

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Natália Sirotová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vplyv metabolitov črevnej
mikroflóry na transkripčnú aktivitu
pregnánového X receptora (PXR)**

Bakalářská práce

**Natália
Sirotová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: RNDr. Peter Illés, Ph.D.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Natália Sirotová
Názov práce	Vplyv metabolitov črevnej mikroflóry na transkripčnú aktivitu pregnánového X receptora (PXR)
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedúci práce	RNDr. Peter Illés Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Kľúčové slová	metabolity črevnej mikroflóry, deriváty indolu, pregnánový X receptor, transkripčná aktivita
Počet strán	46
Počet príloh	0
Jazyk	slovenský

Súhrn

Pregnánový X receptor (PXR) patrí do skupiny nukleárných receptorov a funguje ako ligandom aktivovaný transkripčný faktor. PXR je zaradovaný medzi receptory podieľajúce sa na metabolizme xenobiótik. Okrem toho však zohráva dôležitú úlohu v rôznych fyziologických procesoch a ako ukazujú výsledky nedávnych štúdií, je aj cieľom metabolických produktov črevnej mikroflóry.

V predkladanej bakalárskej práci bol študovaný vplyv vybraných katabolitov tryptofánu, vznikajúcich pôsobením črevných mikroorganizmov, na transkripčnú aktivitu PXR v ľudskej črevnej bunkovej línii LS180. Stanovením viability buniek po pôsobení skúmaných látok sa zistilo, že testované deriváty indolu, s výnimkou samotného indolu, nemali cytotoxický vplyv na bunky LS180. Na určenie transkripčnej aktivity PXR bola využitá luciferázová reportérová esej. Bolo zistené, že po aplikácii indol-3-acetamidu a indolu došlo k výraznej indukcii transkripčnej aktivity PXR, ktorá bola závislá od koncentrácie testovaných látok. Pri kombinovanom pôsobení indol-3-acetamidu a indolu spolu s modelovým agonistom PXR rifampicínom, bol pozorovaný synergický efekt a došlo k potenciácii transkripčnej aktivity.

Získané výsledky naznačujú, že indol-3-acetamid a indol majú agonistické účinky na transkripčnú aktivitu ľudskeho PXR a mohli by sa tak podieľať na indukcii expresie génov regulovaných prostredníctvom PXR v črevných bunkách.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Natália Sirotová
Title	Effects of gut microbiota metabolites on transcriptional activity of pregnane X receptor (PXR)
Type of thesis (bachelor, master)	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	RNDr. Peter Illés Ph.D.
The year of presentation	2020
Keywords	gut microbiota metabolites, indol derivatives, pregnane X receptor, transcriptional activity
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Slovak

Summary

The pregnane X receptor (PXR) belongs to the group of nuclear receptors and it acts as a ligand-activated transcription factor. The PXR is a member of the receptors that are involved in the metabolism of xenobiotics. Besides this function, it plays an important role in various physiological processes. As the result of recent studies show, the PXR is also the target of metabolic products of intestinal microbiota.

In the present bachelor thesis, the effects of selected tryptophan catabolites produced by gut microbial metabolism on the transcriptional activity of PXR in the human intestinal cell line LS180 were studied. Determination of the cell viability after the treatment with investigated compounds revealed that tested indole derivatives, with the exception of indole, did not have any cytotoxic effects on the LS180 cells. Luciferase reporter assay was used to estimate the transcriptional activity of PXR. It was found that the application of indole-3-acetamide and indole significantly induced the PXR transcriptional activity and this effect was concentration-dependent. After the combined treatment of indole-3-acetamide and indole with the PXR model agonist rifampicin, a synergistic effect of both compounds with rifampicin occurred and the potentiation of transcriptional activity was observed.

The results obtained indicate that indole-3-acetamide and indole have agonistic effects on the transcriptional activity of human PXR and thus might be involved in the induction of gene expression of the PXR-regulated genes in intestinal cells.

Prehlasujem, že bakalársku prácu som vypracovala samostatne a použitú literatúru som uviedla v zozname literatúry. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 12.6.2020

Veľká vďaka patrí vedúcemu mojej bakalárskej práce, RNDr. Petrovi Illésovi, Ph.D., za jeho pomoc, vedenie práce a trpezlivosť. Taktiež by som rada poďakovala laboratóriu molekulárnej farmakológie a toxikológie za ich pomoc a rady pri práci. Ďakujem aj mojej rodine a blízkym priateľom za ich podporu a pochopenie.

OBSAH

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK	VIII
ZOZNAM OBRÁZKOV	X
1 ÚVOD	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHĽAD	3
3.1 Pregnánový X receptor	3
3.2 Aktivácia PXR	5
3.3 Úloha PXR v metabolizme xenobiotík	6
3.3.1 Enzýmy fázy I	6
3.3.2 Enzýmy fázy II	7
3.3.3 Transportná fáza	8
3.3.4 Medziliekové interakcie a rezistencia na chemoterapiu	8
3.4 Úloha PXR v metabolizme látok endogénneho pôvodu	9
3.4.1 Metabolizmus glukózy	9
3.4.2 Metabolizmus lipidov	9
3.4.3 Metabolizmus cholesterolu	10
3.4.4 Metabolizmus žlčových kyselín a bilirubínu	10
3.4.5 Metabolizmus hormónov	11
3.4.6 Metabolizmus vitamínov a minerálov kostí	11
3.4.7 Metabolizmus kyseliny retinovej	12
3.5 Funkcia PXR pri zápalových ochoreniach	12
3.6 Črevná mikroflóra	13
3.6.1 Mikroflóra tenkého čreva	14
3.6.2 Mikroflóra hrubého čreva	14
3.6.3 Metabolity črevnej mikroflóry	14
3.6.3.1 Metabolizmus tryptofánu – dráha kyseliny kynurenovej	15
3.6.3.2 Metabolizmus tryptofánu – serotonínová dráha	16
3.6.3.3 Metabolizmus tryptofánu – indolová dráha	16
4 MATERIÁL A METÓDY	19
4.1 Biologický materiál	19
4.2 Plazmidy	19
4.3 Použité chemikálie a roztoky	19

4.4 Laboratórne pomôcky	20
4.5 Prístroje	21
4.6 Použité metódy	21
4.6.1 Kultivácia a pasážovanie buniek	21
4.6.2 Príprava buniek na experiment	22
4.6.3 Tranzientná transfekcia	22
4.6.4 Aplikácia derivátov indolu na bunky LS180	22
4.6.5 Test cytotoxicity (MTT test)	23
4.6.6 Luciferázová reportérová esej	24
4.6.7 Štatistické vyhodnotenie	25
5 VÝSLEDKY	26
5.1 Stanovenie cytotoxických účinkov derivátov indolu na bunky LS180	26
5.2 Vplyv derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR – agonistický mód	29
5.3 Vplyv derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR – antagonistický mód	30
6 DISKUSIA	34
7 ZÁVER	36
8 LITERATÚRA	37

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

5-HT	5-hydroxytryptamín
ABC	ATP binding cassette proteins
AhR	aryl-uhl'ovodíkový receptor
ApoA-I	apolipoproteín A-I
AR	androgénny receptor
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
BCRP	breast cancer resistance protein
CCRP	CAR cytoplasmic retention protein
CD36	platelet glycoprotein 4
CoA	koenzým A
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CYP	cytochróm P450
DBD	doména viažuca DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	ditiotreitol
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FBS	fetálne bovinné sérum
FBS-CS	hormonálne inaktivované fetálne bovinné sérum
FOXO1	forkhead transcription factor 1
G6P-áza	glukóza-6-fosfatáza
GABA	kyselina gama-aminomaslová
GST	glutathion S-transferáza
HDL	high-density lipoprotein
HNF-4	hepatocyte nuclear factor 4
Hsp90	heat shock protein
I3-ACE	indol-3-acetamid
I3-ACR	indol-3-akrylát
I3-ALD	indol-3-aldehyd
I3-EtOH	indol-3-etanol
I3-LAC	indol-3-laktát
I3-PYR	indol-3-pyruvát
IBD	idiopatický črevný zápal

IDO	indolamín-2,3-dioxygenáza
IND	indol
IPA	kyselina indol-propionová
LAPC-4	bunková línia odvodená od ľudského karcinómu prostaty
LBD	doména viažuca ligand
LXR	liver X receptor
MRP	multidrug resistance associated protein
MTT	metyltetrazóliová soľ
NAD	nikotínamid adenín dinukleotid
NcoR	nuclear receptor co-repressor
NF- κ B	nukleárny factor kappa B
OATP	organic anion transporting polypeptide
PBS	fosfátový pufor
PEPCK1	fosfoenolpyruvátcarboxykináza 1
PGC-1 α	peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α
PK	proteínkináza
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RA	kyselina retinová
RAR	receptor kyseliny retinovej
RIF	rifampicín
RXR	retinový X receptor
SCFA	nižšie nasýtené mastné kyseliny
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
SRC-1	steroid receptor coactivators
SRE	sterol regulatory element
SREBP-1	sterol regulatory element binding protein 1
SULT	sulfotransferáza
SXR	steroidný a xenobiotický receptor
TDO	tryptofán-2,3-dioxygenáza
TNF- α	tumor necrosis factor α
UDP-GA	uridín-5'-difosfoglukoronová kyselina
UGT	UDP-glukoronyl transferáza
VDR	receptor pre vitamín D
XRE	xenobiotic responsive element

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Funkcie pregnánového X receptoru v organizme.

Obr. 2: Vplyv korepresoru a koaktivátoru na transkripčnú aktivitu PXR po aktivácii rifampicínom.

Obr. 3: Vplyv pôsobenia derivátov indolu na viabilitu buniek LS180 po 24-hodinovej aplikácii.

Obr. 4: Vplyv kombinovaného pôsobenia derivátov indolu a RIF ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na viabilitu buniek LS180 po 24-hodinovej aplikácii.

Obr. 5: Vplyv pôsobenia derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR v bunkách LS180 po 24-hodinovej aplikácii.

Obr. 6: Vplyv kombinovaného pôsobenia derivátov indolu a RIF ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na transkripčnú aktivitu PXR v bunkách LS180 po 24-hodinovej aplikácii.

1 ÚVOD

Pregnánový X receptor (PXR) patrí medzi jadrové receptory a plní funkciu tzv. xenosenzoru. Je to ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý hrá významnú úlohu v množstve fyziologických procesov prebiehajúcich v ľudskom organizme. PXR sa podieľa najmä na metabolizme xenobiotík, ale aj látok endogénneho pôvodu, ovplyvňuje reguláciu metabolizmu tukov a sacharidov, udržiava homeostázu niektorých steroidných hormónov a veľmi dôležitú úlohu zohráva pri detoxifikácii žlčových kyselín a bilirubínu. Tento receptor má taktiež dôležitú funkciu pri imunitných a zápalových procesoch v organizme.

PXR má pomerne veľké množstvo ligandov, medzi ktoré spadajú rôzne liečivá, cytostatiká, antimykotiká, antidepresíva, ale aj rôzne pesticídy a polutanty. Medzi endogénne aktívatory patria hlavne látky steroidnej povahy a žlčové kyseliny. Výsledky štúdií z posledných rokov však ukazujú, že PXR je aj významným cieľom metabolitov črevnej mikrobioty.

Črevná mikrobiota zohráva veľmi dôležitú funkciu v metabolizme endogénnych látok, ako je napríklad metabolizmus tryptofánu. Katabolity tryptofánu, najmä látky indolovej povahy, majú rôzne účinky na ľudský organizmus. Väčšinou sa v organizme vyskytujú v nízkych koncentráciách a ich rozsah pôsobenia je široký, od stimulácie a maturácie imunitného systému až po ovplyvňovanie nervového systému. Aj keď je pomerne dobre preštudovaný účinok týchto látok na aktiváciu ďalšieho zo skupiny xenoreceptorov – AhR, komplexnejšie údaje o ich vplyve na transkripčnú aktivitu PXR chýbajú. Hlavným cieľom predkladanej bakalárskej práce je preto doplnenie poznatkov o potenciálnom účinku známych katabolitov tryptofánu na transkripčnú aktivitu PXR.

2 CIELE PRÁCE

1. Vypracovanie literárnej rešerše na zadanú tému bakalárskej práce
2. Určenie vplyvu vybraných derivátov indolu na viabilitu buniek ľudskej črevnej línie LS180
3. Stanovenie účinkov vybraných derivátov indolu na transkripčnú aktivitu ľudskeho pregnánového X receptoru v bunkovej línii LS180

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Pregnánový X receptor

Pregnánový X receptor (PXR) bol objavený roku 1998 Stevenom Kliewerom a Ronom Evansom. Tento objav predstavoval revolúciu vo farmakológii a vývoji liečiv. Pôvodný názov receptoru bol steroidný a xenobiotický receptor (SXR), následne sa však premenoval na pregnánový X receptor, podľa pregnánu, steroidnej zlúčeniny aktivujúcej PXR (Kliewer *et al.*, 1998).

PXR, taktiež označovaný ako NR1I2, je jadrový receptor. Patrí do rodiny nukleárných receptorov NR, podrodina 1, skupina I, člen 2. Jadrové receptory sú tzv. superrodiny transkripčných faktorov, ktoré majú rôzne fyziologické funkcie, od regulácie vývinových procesov v organizme, až po detoxifikáciu a udržovanie homeostázy rozličných látok. Sú aktivované ligandom a pozostávajú z viacerých štruktúrnych a funkčných častí, ktoré sú nevyhnutné k iniciácii transkripcie cieľových génov a tým aj vzniku daných produktov (di Masi *et al.*, 2009).

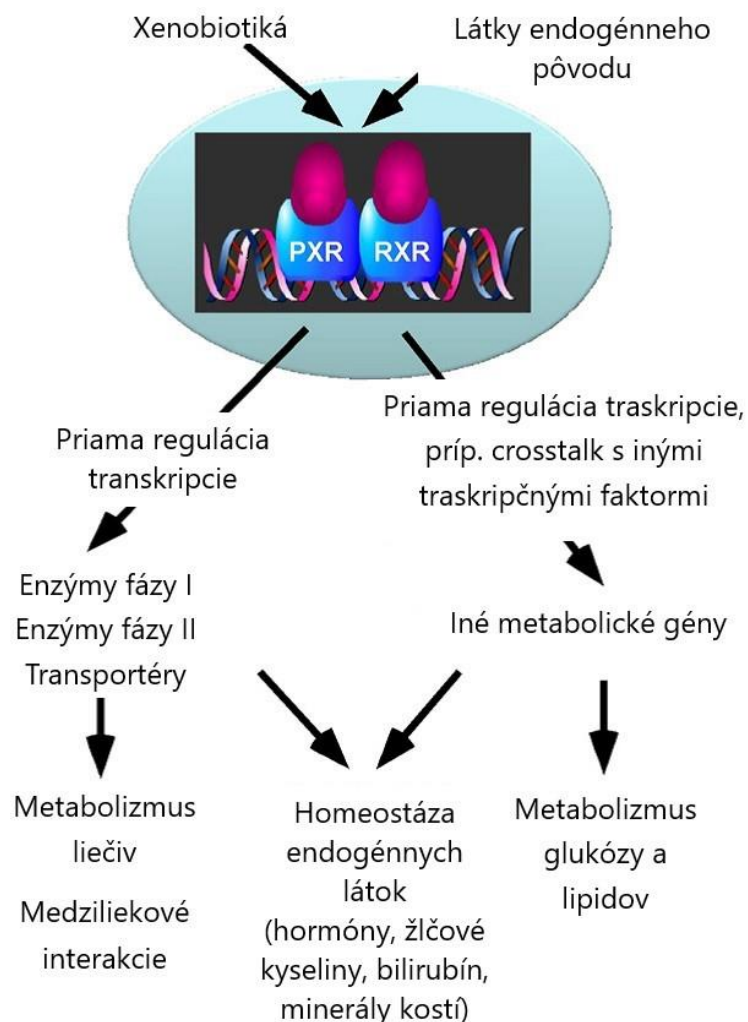
Pregnánový X receptor je produktom génu *NR1I2*, ktorý je umiestnený na chromozóme číslo 3, na dlhom ramene, lokus 3q11 – q13.3. Gén *NR1I2* zahŕňa 10 exónov, ktoré sú oddelené deviatimi intrónmi (Hustert *et al.*, 2001). Alternatívnym zostrihom exónov vznikajú dve izoformy PXR, pričom iba jedna je bežne exprimovaná a aktívna v ľudskom tele. PXR polymorfizmus má istý súvis s výskytom a závažnosťou rôznych chorôb, ako aj malígnych a benígnych nádorov (Zhang *et al.*, 2001).

Pôvodne bol tento receptor charakterizovaný ako kľúčový transkripčný faktor aktivujúci gény, ktoré kódujú enzýmy podieľajúce sa na metabolizme širokej škály liečiv, prípadne sa na ich transporte z bunky (Kliewer *et al.*, 2002). PXR ochraňuje organizmus pred škodlivými exogénnymi toxikantmi, alebo endogénnymi látkami, ktoré taktiež môžu mať toxický účinok na ľudské telo.

PXR má veľké množstvo ligandov, medzi ktoré patria rôzne liečivá, ako napríklad rifampicín, dexametazón, indinavir, omeprazol, taxol, warfarín, ďalej rôzne cytostatiká (tamoxifén), antimykotiká (klotrimazol) alebo antidepresíva (hyperforín) (Lemaire *et al.*, 2006). Patria sem aj látky pesticídovej povahy (chlórdan) a environmentálne polutanty (polychlórované bifenyly). Avšak PXR je aktivovaný taktiež endogénnymi zlúčeninami ako napríklad látkami steroidnej povahy, medzi ktoré patria kortikosterón, 17 α -hydroxypregnenolón, 17 β -estradiol, 5 α -pregnán-3,20-dion,

žlčové kyseliny a mnohé iné. V neposlednom rade sú to aj produkty metabolickej činnosti črevnej mikroflóry (di Masi *et al.*, 2009).

Okrem detoxifikačnej úlohy hrá PXR dôležitú rolu aj v rôznych ďalších fyziologických procesoch. Zapája sa do metabolizmu glukózy a lipidov, udržiava homeostázu niektorých steroidných hormónov, účastní sa detoxifikácie žlčových kyselín a bilirubínu, ktorých nadbytok má cytotoxické účinky. Taktiež sa zapája do metabolizmu vitamínov (napríklad vitamín K2 a vitamín E) a prispieva k homeostáze vápniku a iných látok potrebných pre správne fungovanie kostí. Okrem toho sa PXR zapája aj do metabolizmu kyseliny retinovej (RA). Tento receptor zohráva významnú úlohu pri zápalových ochoreniach organizmu a pri imunitnej odpovedi organizmu (Obr. 1).



Obr. 1: Funkcie pregnánového X receptora v organizme (upravené podľa Ihunnah *et al.*, 2010)

PXR je bežne exprimovaný v bunkách pečene a bunkách hrubého čreva, avšak v menšom množstve sa nachádza aj v obličkách, pľúcach, žalúdku, maternici, vaječníkoch, kostnej dreni, monocytoch periférnej krvi a v niektorých častiach mozgu (Pavek a Dvorak, 2008).

Rovnako ako iné jadrové receptory, aj PXR sa skladá z viacerých funkčných častí, nazývaných tiež domény. Receptor pozostáva z N-koncovej domény, domény viažucej DNA (DBD; DNA-binding domain), H-regiónu, alebo pántovej oblasti a ligand viažucej domény (LBD; ligand-binding domain), ktorá sa nachádza na C-konci. PXR-DBD je potrebná na viazanie špecifickej sekvencie DNA. H-región, alebo pántová oblasť je flexibilná doména spájajúca DBD s LBD. Po aktivácii receptora tvorí PXR heterodimér s RXR a vzniká tak transkripčne aktívny komplex (Blumberg *et al.*, 1998).

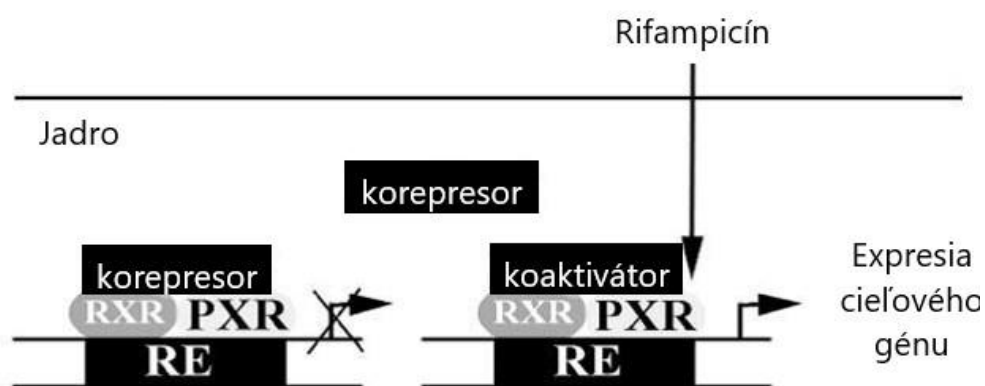
Doména viažuca ligand je pomerne flexibilná a preto umožňuje viazanie pomerne širokého okruhu látok, ktoré si nemusia byť navzájom štruktúrne podobné a môžu byť ako exogénneho tak aj endogénneho pôvodu. Táto oblasť sa skladá z troch štruktúr α -helixu a piatich antiparalelne usporiadaných β -listov (Watkis *et al.*, 2001). Toto usporiadanie je špecifické pre PXR a umožňuje tým viazanie veľkého množstva odlišných ligandov. LBD pozostáva z asi 28 aminokyselín, z čoho 8 má polárny charakter alebo nabitú vedľajšiu reťazec. Je zakončená krátkym helixom, ktorý je potrebný pre štruktúrnu organizáciu celej oblasti a zároveň sa zúčastňuje na väzbe transkripčných koregulátorov, ktoré môžu byť koaktivátormi alebo korepresormi. Koaktivátory hrajú dôležitú úlohu pri fixovaní ligandu v LBD (Lazar, 2003; Rosenfeld *et al.*, 2009).

3.2 Aktivácia PXR

Neaktívny PXR sa nachádza v cytozole v multi-proteínovom komplexe s CCRP (CAR cytoplasmic retention protein) a Hsp90 (heat shock protein 90). Po aktivácii ligandom sa tento komplex rozpadá a PXR sa premiestňuje do jadra. V jadre následne tvorí heterodimér s retinoidným X receptorom (RXR). Vzápätí sa komplex PXR/RXR viaže na DNA responzívny element. Tento proces je uskutočnený pomocou dvoch zinkových prstov, ktoré dovoľujú väzbu na xenobiotický responzívny element (XRE; xenobiotic responsive element), ktorý je lokalizovaný v oblasti promótoru. Responzívny element obsahuje sekvencie, ktoré sú tvorené buď priamymi repetíciami alebo obrátenými repetíciami (Orans *et al.*, 2005).

Samotný receptor je schopný viazať pomerne veľké množstvo koaktivátorov. Koaktivátory sú proteíny slúžiace na reguláciu transkripcie (Rosenfeld *et al.*, 2006) a patria medzi ne napríklad SRC-1 (steroid receptor coactivator 1) alebo PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α). Tieto proteíny sú zodpovedné za rozvoľňovanie chromatinu za účelom iniciácie transkripcie (Mangelsdorf a Evans, 1995; McKenna *et al.*, 1999). Interakcia koaktivátoru a PXR je uskutočnená vďaka fosforylácii receptora, za ktorú je zodpovedná proteínkináza A (PKA). Proteínkináza C (PKC) naopak mení fosforylačný status PXR a posilňuje interakciu s korepresormi.

Korepresory sa správajú ako tzv. utlmovače transkripcie, stabilizujú chromatin a tým zabraňujú spusteniu expície génov. Medzi korepresory patria napríklad proteíny SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) a NcoR (nuclear receptor co-repressor) (Orans *et al.*, 2005). Po aktivácii ligandom a vzniku heterodiméru PXR/RXR sa korepresor uvoľňuje a nahrádza ho koaktivátor. Týmto krokom sa spúšťa transkripcia cieľových génov (Obr. 2).



Obr. 2: Vplyv korepresoru a koaktivátoru na transkripčnú aktivitu PXR po aktivácii rifampicínom (upravené podľa di Masi *et al.*, 2009)

3.3 Úloha PXR v metabolizme xenobiotík

3.3.1 Enzýmy fázy I

Výsledkom expície génov regulovanej prostredníctvom PXR je celá škála enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme xenobiotík. Ide najmä o detoxifikačné enzýmy a transportéry. V prvej fáze metabolizmu sa jedná o cytochrómy P450, označované ako CYP. Tieto enzýmy patria do superrodiny hem-dependentných

monooxygenáz a ich úlohou je polarizovanie molekuly xenobiotika (Poulos, 1988). Všeobecne je známych asi 18 rodín CYP, avšak najväčšie uplatnenie v metabolizme xenobiotík majú rodiny CYP1, 2 a 3. Využívajú reakcie ako napríklad hydroxylácia a oxidácia, čím sa xenobiotiká stávajú viac rozpustnými vo vode, čo uľahčuje exkréciu z tela. Medzi CYP na regulácii expresie ktorých sa podieľa PXR patria najmä CYP3A4, CYP3A23, CYP3A11, CYP2B6, CYP2B9, CYP2C55, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A (Miki *et al.*, 2005).

3.3.2 Enzýmy fázy II

Okrem enzýmov fázy I, sa PXR zúčastňuje aj na expresii enzýmov fázy II. V tejto fáze ide o konjugáciu xenobiotika s endogennými metabolitmi, ktoré predstavujú napríklad sulfáty, glutathion, kyselina glukurónová, rôzne aminokyseliny a iné látky. Cieľom je opäť zníženie toxicity a zvýšenie polariry. Medzi tieto enzýmy patrí UDP-glukuronyl transferáza (UGT), sulfotransferáza (SULT) a glutathion S-transferáza (GST) (Xu *et al.*, 2005).

UGT enzýmy sú kľúčovými enzýmami fázy II v metabolizme xenobiotík. Eliminujú najmä lipofilné látky a tento proces pozostáva z pridávania UDP-glukurónovej kyseliny (UDP-GA; uridín-5'-difosfoglukurónová kyselina) na molekulu xenobiotika. Rovnako ako CYP, aj UGT enzýmy majú viaceré rodiny, ktoré sa podieľajú na metabolizme xenobiotík. Medzi najčastejšie patria UGT1A1, UGT1A6, UGT1A3 a UGT1A4 (Bock, 2010). Tvorba UGT však nemusí byť podmienená iba expresiou regulovanou pomocou PXR. Ich substráty tvorí široká škála zlúčenín, ktoré často nie sú ligandmi tohto receptoru. Sú to napríklad olanzapín, imipramín, acetaminofén, nikotín, 4-nitrofenol a benzo(a)pyrén (Borlak *et al.*, 2006; Linnet, 2002).

SULT enzýmy reprezentujú ďalšiu možnosť v procese metabolizmu xenobiotík. Ich úlohou je katalyzovať pridávanie sulfátových konjugátov na molekuly xenobiotika, čím zvyšujú jeho rozpustnosť vo vode. Zatiaľ je u človeka známa iba jedna izoforma, a to SULT2A1 (Bian *et al.*, 2007).

GST enzýmy sú dôležité hlavne v ochrane buniek. Ochraňujú nielen samotné bunky, ale aj organely a makromolekuly pred oxidatívnym stresom a látkami s elektrofilnou povahou. Dochádza k tomu vďaka redukovanému glutathionu, ktorý sa správa ako nukleofilná zlúčenina a tým pádom je schopný znížiť reaktivitu xenobiotika s elektrofilným uhlíkom. V prípade aktivácie PXR bývajú exprimované tri izoformy GST, a to GSTA1, GSTA2 a GSTM1 (Naspinski *et al.*, 2008).

3.3.3 Transportná fáza

Poslednou fázou metabolizmu xenobiotík je ich transport a vylúčenie z bunky. Na to slúžia rôzne transportéry, ktoré spolupracujú v súlade s enzýmami fázy I a II. Medzi hlavné xenobiotické transportéry v súvislosti s PXR patria ABC proteíny (ATP binding cassette proteins). Tieto proteíny sú exprimované v hepatocytoch, enterocytoch, bunkách obličiek a hematoencefalickej bariéry. Medzi ne patria napríklad MRP proteíny (multidrug resistance associated proteins), BCRP (breast cancer resistance protein) a OATP (organic anion transporting polypeptide), ktorých expresia je taktiež regulovaná pregnánovým X receptorom (Hagenbuch a Meier, 2004).

3.3.4 Medziliekové interakcie a rezistencia na chemoterapiu

Tak ako pri iných jadrových receptoroch, aj pri PXR môže dochádzať k medziliekovej interakcii, tzv. drug-drug interaction. Ide o proces, kedy jedno liečivo ovplyvňuje metabolizmus druhého liečiva, čo môže viesť k nepriaznivému účinku a riziku systematickej toxicity (Fuhr, 2000). Je možné, že podiel na tomto procese majú aj detoxifikačné enzýmy CYP. Podrodina CYP3A je jedným z najhojnejšie sa vyskytujúcich enzýmov v bunkách pečene a disponuje širokou škálou substrátov. Enzýmy sú zodpovedné za metabolizmus asi 50% liečiv, pričom PXR je hlavný transkripčný regulátor tejto podrodiny (Kliewer *et al.*, 2002). Bolo zistené, že pri dlhodobom účinku rifampicínu, ktorý je agonistom PXR, klesla účinnosť lieku verapamil. Tento liek sa používa pri liečbe vysokého krvného tlaku a rifampicín môže mať zásadný vplyv na jeho metabolizmus. Následne, po súčasnom požití verapamilu a rifampicínu bol u pacientov pozorovaný anti-hypertenzný efekt (Fuhr, 2000).

Liečba rakoviny je sprostredkovaná chemoterapeutikami, ktorých je dnes už veľké množstvo a ich zoznam sa naďalej rozširuje. Najväčším problémom liečby rakoviny je však stúpajúca rezistencia k chemoterapii. S týmto procesom sú úzko spojené enzýmy metabolizmu liečiv, medzi ktoré patria enzýmy I a II fázy metabolizmu xenobiotík, transportéry a enzýmy zodpovedné za opravy DNA. Expresia veľkej časti z týchto enzýmov je regulovaná pomocou PXR, presnejšie ide o MRP, CYP3A, UGT a GST (Harmsen *et al.*, 2007). Chemoterapeutiká ako napríklad cyklofosfamid, tamoxifén a taxol sú zároveň ligandmi PXR (Ma a Lu, 2008). Z toho vyplýva, že enzýmy, ktoré sa podieľajú na detoxifikácii a transporte xenobiotík, môžu byť zodpovedné za elimináciu týchto liečiv a následne za rastúcu rezistenciu. Rezistencia

na chemoterapiu v súvislosti s funkciou PXR bola zistená u rakoviny prsníka, prostaty, karcinómu endometria a osteosarkómu (di Masi *et al.*, 2009).

3.4 Úloha PXR v metabolizme látok endogénneho pôvodu

3.4.1 Metabolizmus glukózy

Ako už bolo spomenuté, PXR neslúži iba ako xenosenzor, ale dôležitú úlohu hrá aj v metabolizme látok endogénnej povahy. Pomerne významnú funkciu plní pri metabolizme glukózy. Hladina glukózy v krvi je regulovaná hormonálne inzulínom a glukagónom. Podľa ich vplyvu na bunky, sa glykémia buď zvyšuje alebo znižuje, čo súvisí s glukoneogenezou, glykogenolýzou a glykogenézou. V týchto procesoch zohrávajú dôležitú úlohu enzýmy glukóza-6-fosfatáza (G6P-áza) a fosfoenolpyruvátcarboxykináza 1 (PEPCK1). Gény pre tieto enzýmy sú regulované pomocou glukagónu a glukokortikoidov. Regulácia transkripcie je podmienená cAMP-responzívnym elementom viažuci proteín (CREB; cAMP-responsive element binding protein) (Herzig *et al.*, 2001). V prípade inzulínu ide o faktor FOXO1 (forkhead transcription factor 1), ktorý slúži ako aktivátor pre oba enzýmy (Nakae *et al.*, 2001).

V tomto prípade sa PXR uplatňuje najmä v glukoneogenéze, ktorá prebieha v pečňových bunkách. Bolo preukázané, že PXR interaguje s CREB a tým zabraňuje iniciácii transkripcie pre G6P-ázu (Kodama *et al.*, 2007). To isté platí aj pre FOXO1, keďže po aktivácii PXR nedošlo k naviazaniu tohto faktoru na promótor a následne neprebehla expresia génov. Dá sa preto predpokladať, že PXR sa správa ako korepresor CREB a FOXO1 a tým reguluje glukoneogenezu v pečeni (Kodama *et al.*, 2004).

3.4.2 Metabolizmus lipidov

Pri metabolizme lipidov sa po hlavných krokoch štiepenia tukov, ukladajú lipidy vo forme triglyceridov v pečeni. Predstavujú zdroj energie pre organizmus a v takom prípade dochádza k β -oxidácii a ketogéze. Metabolizmus lipidov súvisí aj s lipogenezou, kedy sa naopak tuky tvoria a ukladajú do zásoby. Hlavným regulátorom lipogenézy je SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein 1). Mnohé receptory, ako napríklad LXR, HNF-4, regulujú transkripčnú aktivitu tohto proteínu (Yoshikawa *et al.*, 2001; Misawa *et al.*, 2003).

SREBP-1 spúšťa transkripciu skupiny génov, ktorých produkty sú potrebné k syntéze cholesterolu a triglyceridov. Viaže sa na SRE (sterol regulatory element) v promotore lipogénnych génov. Bolo pozorované, že SREBP-1 tlmí tvorbu CYP.

Dochádza k tomu pri nízkej hladine inzulínu a cholesterolu, kedy je potlačená transkripčná aktivita PXR formou kompetície SREBP-1 a koaktivátorov (Roth *et al.*, 2008).

Okrem iného sa však PXR podieľa na transkripčnej regulácii receptora CD36. CD36 je označovaný ako scavenger receptor a jeho úlohou je vychytávanie voľných mastných kyselín z krvného obehu (Febbraio a Silverstein, 2007). Veľké množstvo tohto receptora môže prispievať k vzniku choroby steatóza pečene, kedy sa do buniek ukladá príliš veľké množstvo mastných kyselín a triglyceridov. Preto je potrebná pomerne prísna regulácia transkripcie CD36. Expresia CD36 je kontrolovaná práve pregnánovým X receptorom, ale podieľať sa na tom môže aj LXR a PPAR γ .

3.4.3 Metabolizmus cholesterolu

Cholesterol je potrebný pri stavbe bunkovej membrány, je súčasťou žlčových kyselín a steroidných hormónov. Na druhej strane sú však jeho oxidované metabolity cytotoxické a môže spôsobovať aterosklerózu (Leonarduzzi *et al.*, 2002). Aby sa mohlo telo brániť proti vysokým hladinám cholesterolu, je potrebná jeho detoxifikácia. Mitochondriálny enzým sterol-27-hydroxyláza (CYP27A1) je zodpovedný za hydroxyláciu cholesterolu. Regulácia expresie tohto enzýmu je podmienená aktiváciou PXR, rovnako ako je to aj v prípade transportérov ABCA1 a ABCG1 (Li *et al.*, 2007). K aktivácii dochádza pomocou HDL a jeho hlavnej zložky apolipoproteínu A-I (ApoA-I), ktorý sa správa ako agonista PXR.

3.4.4 Metabolizmus žlčových kyselín a bilirubínu

Žlčové kyseliny sú koncovými produktmi metabolizmu cholesterolu. Predstavujú primárnu cestu eliminácie cholesterolu z tela (Fiorucci *et al.*, 2007). Sú tvorené v pečeni, skladované v žlčníku a exkretované do dvanástnika. Ich hlavnou funkciou je podporovať absorpciu cholesterolu a vitamínov rozpustných v tukoch. Nadbytok žlčových kyselín má však cytotoxické účinky a môže viesť k cholestáze (Hofmann, 1999). Aj z tohto dôvodu je tvorba a detoxifikácia žlčových kyselín veľmi prísne regulovaná. K detoxifikácii slúžia enzýmy CYP3A a SULT2A, ktorých expresiu iniciuje práve PXR. CYP3A hydroxyluje žlčové kyseliny (Staudinger *et al.*, 2001) a SULT2A sa podieľa na ich detoxifikácii (Sonoda *et al.*, 2002). Okrem týchto enzýmov reguluje PXR aj expresiu transportérov MRP2 a OATP2 (Staudinger *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002).

Bilirubín je produktom rozpadu hemových proteínov a sám o sebe je neurotoxický. Jeho toxicitu znižuje konjugácia s UGT za vzniku bilirubín glukoronidu. Presnejšie sa na tomto procese podieľa enzým UGT1A1, ktorého transkripciu spúšťa PXR (Sugatani *et al.*, 2005). Tento receptor takisto reguluje aj expresiu transportérov OATP2 a MRP2 (Staudinger *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002). OATP2 riadi vychytávanie bilirubínu z krvi a transportuje ho do pečene, kde MRP2 podporuje exkréciu konjugovaného bilirubínu do žlčových kanálikov.

3.4.5 Metabolizmus hormónov

PXR má dôležitú funkciu aj v homeostáze steroidných hormónov. Bolo dokázané, že po aktivácii PXR bola zvýšená hladina kortikosterónu a aldosterónu. Tento proces bol sprevádzaný aktiváciou adrenálnych steroidogénnych enzýmov ako CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2 a 3- β -hydroxysteriod dehydrogenáza (Zhai *et al.*, 2007). Kortikosterón a aldosterón patria do skupiny steroidných hormónov a sú produkované v kôre nadobličiek. Ich vplyv na organizmus má veľmi široké rozpätie, účastia sa na glykogenolýze, vstrebávaní iónov v obličkách, indukujú stresovú odpoveď organizmu, podieľajú sa taktiež na rovnováhe solí v organizme a potlačujú imunitnú odpoveď a zápal.

Signalizácia androgénnych receptorov (AR) hrá dôležitú úlohu v iniciácii a progresii rakoviny prostaty. Ako účinná terapia sa používa buď inaktivácia AR alebo jeho úplná degradácia. K tomuto procesu prispievajú enzýmy CYP3A a SULT2A1, ktoré metabolicky deaktivujú androgéne hormóny. CYP3A je kľúčový enzým katalyzujúci hydroxyláciu testosterónu a progesterónu (Niwa *et al.*, 1998). PXR sa podieľa na regulácii expresie oboch týchto enzýmov. Bolo zistené, že po aktivácii PXR poklesla androgénna aktivita a v bunkovej línii LAPC-4 došlo k prerušeniu androgén-dependentnej proliferácie. Vďaka tomuto objavu by teoreticky mohlo byť ovplyvňovanie aktivity PXR súčasťou liečby a prevencie hormón-dependentnej rakoviny prostaty (Zhang *et al.*, 2010).

3.4.6 Metabolizmus vitamínov a minerálov kostí

Vitamín K2 je potrebný pre správne formovanie kostí a býva súčasťou liečby osteoporózy. Bolo zistené, že K2 môže aktivovať PXR a stimulovať expresiu génov. Po vystavení buniek osteosarkómu pôsobeniu vitamínu K2 bol zaznamenaný nárast expresie mRNA rôznych produktov, ako napríklad alkalická fosfatáza, osteoprotegerín,

osteopontín a matrixový Gla proteín (Tabb *et al.*, 2003). Ďalej bolo zistené, že po aktivácii PXR vitamínom K2 bola spustená expresia transkripčného faktoru Msh homeobox 2, ktorý je dôležitý pri diferenciácii osteoblastov (Igarashi *et al.*, 2007).

Vápnik je potrebný pre udržanie zdravých kostí a podieľa sa na ich výstavbe. Jeho absorpcia a exkrécia v organizme je regulovaná hormonálne a pomocou vitamínu D. Aktívny metabolit vitamínu D 1,25-dihydroxyvitamín D sa viaže na receptor pre vitamín D (VDR) (Jones *et al.*, 1998). VDR následne aktivuje enzým 25-hydroxyvitamín D (3)-24-hydroxyláza, ktorý patrí do rodiny CYP24. Výsledky ohľadom regulácie expresie tohto enzýmu sú kontroverzné. V jednom prípade došlo k expresii CYP24 po aktivácii PXR (Pascussi *et al.*, 2005), avšak v druhom prípade išlo o inhibíciu transkripcie CYP24 (Zhou *et al.*, 2006a). Podľa týchto výsledkov by sa dalo predpokladať, že PXR sa môže potenciálne podieľať na homeostáze minerálov kostí.

Vitamín E je známy najmä ako antioxidant. Je metabolizovaný pomocou CYP enzýmov, ktorých expresia je regulovaná prostredníctvom PXR. Ide hlavne o oxidáciu a následne o konjugáciu zahrňujúcu glukuronidáciu a sulfatáciu. Posledným krokom je exkrécia (Brigelius-Flohe a Traber, 1999). Enzýmy a transportéry podieľajúce sa na tomto procese sú výsledkom génovej expresie regulovanej PXR. Receptor môže byť aktivovaný aj niektorými formami vitamínu E, ako napríklad γ -tokotrienol, ktorý indukuje expresiu CYP3A4 (Landes *et al.*, 2003).

3.4.7 Metabolizmus kyseliny retinovej

Kyselina retinová (RA) predstavuje metabolit vitamínu A a aktivuje receptor kyseliny retinovej (RAR). RAR následne tvorí heterodimér s RXR za vzniku komplexu RAR/RXR. Výsledkom aktivácie je spustenie expresie génov, ktorých produkty sa podieľajú na inhibícii bunkového delenia, regulácie apoptózy a inhibícii bunkového rastu počas bunkového cyklu (Altucci *et al.*, 2001). RA má protinádorové účinky a je využívaná v liečbe niektorých onkologických ochorení. Problémom je však rastúca rezistencia receptoru voči RA. Jedným z riešení by mohlo byť spolupôsobenie PXR. Aktivovaný PXR spúšťa expresiu CYP3A a transportérov MDR1A, MRP3 a OATP2. Tieto produkty urýchľujú metabolizmus kyseliny retinovej, zintenzívnenie eliminácie RA by tak mohlo čiastočne prispieť k zníženiu rezistencie (Wang *et al.*, 2008).

3.5 Funkcia PXR pri zápalových ochoreniach

Dlho sa predpokladalo, že infekčné a zápalové ochorenia majú negatívny vplyv

na metabolizmus liečiv (Gu *et al.*, 2006). Bolo zistené, že po pôsobení rifampicínu a aktivácii PXR, došlo k utlmeniu NF- κ B proteínov. Tieto proteíny sú kľúčové regulátory zápalu a imunitnej odpovede organizmu. Medzi PXR a NF- κ B dochádza k procesu, ktorý sa nazýva negatívny crosstalk. Aktivácia NF- κ B inhibuje aktivitu PXR, čo môže byť súčasťou mechanizmu reakcie na zápal, tým že sa inhibuje metabolizmus xenobiotík. Naopak inhibícia NF- κ B, zvyšuje expresiu génov, riadenú PXR. Dá sa tým pádom povedať, že ligandy PXR môžu mať imunosupresívny efekt (Zhou *et al.*, 2006b).

Idiopatický črevný zápal (IBD; inflammatory bowel disease) spadá medzi ochorenia s neznámou príčinou a postihuje najmä črevá. Toto ochorenie sa prejavuje hlavne v dvoch formách, ako Crohnova choroba a ulcerózna kolitída. Crohnova choroba často postihuje oblasť tenkého čreva, ale môže sa vyskytnúť v celom tráviacom trakte. Ulcerózna kolitída je spájaná najmä so sliznicou hrubého čreva (di Masi *et al.*, 2009). Bolo zistené, že gén pre PXR by mohol mať istú spojitosť s náchylnosťou k vzniku týchto chorôb u človeka. U pacientov s IBD sa ukázalo, že expresia génu pre PXR a samotná prítomnosť receptora v bunkách je pomerne nízka, rovnako ako aj prítomnosť enzýmov a iných proteínov ktorých expresia je regulovaná pomocou PXR (Dring *et al.*, 2006; Langmann *et al.*, 2004).

3.6 Črevná mikroflóra

Mikroflóra ľudského tela sa skladá z viac ako 30 triliónov mikroorganizmov a tvoria ju baktérie, vírusy a kvasinky (Sender *et al.*, 2016). Bežne sa mikroflóra nachádza na koži, v ústnej dutine, gastrointestinálnom trakte, v dýchacích cestách a pľúcach, vo vylučovacom systéme a v orgánoch rozmnožovacej sústavy.

Mikroflóra v gastrointestinálnom trakte je veľmi dynamická a funkčná. Jej zostava a efektivita závisí od mnohých faktorov, ako je napríklad zdravie a vek jedinca, kvalita stravy a životné prostredie (Flint, 2012). Zdravá mikroflóra je daná aj inými vplyvmi, keďže jej zloženie sa jemne odlišuje počas vývoja človeka. U novorodencov je pomerne dôležitým faktorom pre vývin správnej mikroflóry dojčenie. Počas ranného obdobia života sa mikroflóra ešte len vytvára a dominanciu tvoria baktérie rodu *Bifidobacteria* (Marcobal a Sonnenburg, 2012). Toto obdobie má vplyv aj na vývin imunitného systému a všeobecnú efektivitu tráviaceho traktu. Počas puberty sa následne mikroflóra stabilizuje a u dospelých jedincov ovplyvňuje jej rozmanitosť najmä životný štýl (Hollister *et al.*, 2015).

3.6.1 Mikroflóra tenkého čreva

Tenké črevo sa skladá z troch častí: duodenum, jejunum a ileum. Je miestom adsorpcie živín z potravy a metabolizmu jednoduchých cukrov a aminokyselín. Mikroflóra sa skladá najmä z fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov. Sú to hlavne zástupcovia kmeňa *Proteobacteria* a radu *Lactobacillales* (Gu *et al.*, 2013). Črevná mikroflóra je však unikátna a viaceré štúdie poukazujú na fakt, že medzi jednotlivými jedincami sa môže zloženie mikroflóry odlišovať. Najčastejšie sa však jedná o skupinu streptokokov, laktobacilov, *Gammaproteobacteria*, skupinu *Enterococcus* a *Bacteroides* (Hayashi *et al.*, 2005). Môžu sa vyskytovať aj rody ako napríklad *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella* a *Citrobacter* (Sundin *et al.*, 2017). Ako ileum postupne prechádza do hrubého čreva, stáva sa mikroflóra komplexnejšou a zvyšuje sa jej diverzita.

3.6.2 Mikroflóra hrubého čreva

Hrubé črevo začína slepým črevom (cecum), pokračuje vzostupnou časťou, priečnou a zostupnou časťou a končí sigma úsekom, ktorý ústí do konečníku. Je vyplnené lymfoidným tkanivom a je to miesto, kde už neprebíha trávenie, ale vstrebávanie vody a živín. Okrem iného v hrubom čreve prebiehajú fermentačné procesy komplexných uhlíkovodíkov, na čom sa podieľajú mikroorganizmy hrubého čreva (Scheithauer *et al.*, 2016). Ich zostava sa mierne odlišuje vo vzostupnej a zostupnej časti, vo všeobecnosti však platí, že jej hlavnými zástupcami sú kmene *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, rodiny *Clostridiaceae* a *Lachnospiraceae* (Vasapolli *et al.*, 2019)

V tenkom aj hrubom čreve sa vyskytuje vrstva hlienu, ktorá je v hrubom čreve charakteristická svojou vrstevnatosťou. Najväčší podiel hlienu sa nachádza v priečnej časti. Skladá sa z vnútornej a vonkajšej vrstvy. Vnútornej vrstvy je zodpovedná za vylučovanie mikroorganizmov do vonkajšej vrstvy a zároveň vďaka rôznym imunitným faktorom kontroluje ich množstvo. Vonkajšia vrstva má tekutejšiu formu a umožňuje kolonizáciu mikroorganizmov po celom povrchu čreva (Johansson *et al.*, 2011).

3.6.3 Metabolity črevnej mikroflóry

Metabolickými procesmi mikroorganizmov nachádzajúcich sa v čreve dochádza ku vzniku širokej škály biologicky aktívnych látok. Medzi najznámejšie môžeme

zaradiť napríklad kyselinu gama-aminomaslovú (GABA), katabolity tryptofánu, polyamíny a histamín (Pokusaeva *et al.*, 2016). Tieto metabolity majú rôznu funkciu a účinok na ľudský organizmus, od stimulácie a maturácie imunitného systému, regulácie pH a sekrécie hlienu až po ovplyvňovanie nervového systému (Ventura *et al.*, 2012). V rámci fermentácie uhlíkov vznikajú nižšie nasýtené mastné kyseliny (SCFA; short-chain fatty acids) ako napríklad kyselina octová, maslová a propionová. Okrem týchto procesov, prebieha prostredníctvom črevnej mikrobioty aj produkcia vitamínov ako napríklad biotín (B7), kobalamín (B12), kyselina listová (B9), niacín (B3), kyselina pantoténová (B5), pyridoxín (B6) a riboflavín (B2) (Said, 2013).

Tryptofán je esenciálna aromatická aminokyselina. K tretej pozícii indolu sa viaže β -uhlík a aminokyselinová skupina. Je to dôležitý prekursor biosyntézy mikrobiálnych metabolitov a do organizmu je prijímaný potravou (Alkhalaf a Ryan, 2015). Jeho metabolizmus prebieha najmä v mikroorganizmoch, ale zúčastňovať sa ho môžu aj epitelové a enterochromafínne bunky čreva. Metabolizmus tryptofánu prebieha v troch dráhach: dráha kyseliny kynurenovej, serotonínová dráha a indolová dráha.

3.6.3.1 Metabolizmus tryptofánu – dráha kyseliny kynurenovej

V tejto metabolickej dráhe sa spotrebuje asi 95% stráveného tryptofánu. Prebieha v epitelových bunkách, ale aj za pomoci mikroorganizmov črevnej mikrobioty. Táto dráha je regulovaná enzýmami tryptofán-2,3-dioxygenáza (TDO) a indolamín-2,3-dioxygenáza (IDO) (Peters, 1991). Stravou prijatý tryptofán je degradovaný za vzniku kynurenínu. Hydroxyláciou pomocou kynurenínhydroxylázy vzniká 3-hydroxykynurenín, ktorý môže byť ďalej spracovávaný dvomi cestami. Prvou cestou je jeho premena na kyselinu antranilovú pomocou kynureninázy a následne za účinku kynurenínaminotransferázy vzniká kyselina kynurenová. Druhou možnosťou metabolizmu 3-hydroxykynurenínu je vznik kyseliny 3-hydroxyantranilovej, ktorá je konvertovaná na kyselinu chinolinovú a ďalšími úpravami vzniká aj kyselina nikotínová, nikotínamid adenín dinukleotid (NAD), niacín a iné molekuly (Badawy, 2015).

Kyselina kynurenová má pomerne dôležité pôsobenie v organizme, podieľa sa na imunoregulácii a bolo preukázané, že má taktiež protektívnu funkciu vo vrstvách hlienu v tráviacom trakte. Produkty metabolizmu tryptofánu dráhou kyseliny kynurenovej majú zase vplyv v zápalových reakciách, imunitných odozvách a slúžia aj ako neurotransmitery (Agus *et al.*, 2018).

3.6.3.2 Metabolizmus tryptofánu – serotonínová dráha

Serotonín, alebo aj 5-hydroxytryptamín (5-HT), sa bežne vyskytuje v centrálnej nervovej sústave, tráviacom trakte a v menšom množstve v krvi. Metabolizmus serotonínu začína hydroxyláciou tryptofánu pomocou tryptofánhydroxylázy. Vzniká tak 5-hydroxytryptofán, ktorý je ďalej metabolizovaný na 5-HT účinkom 5-hydroxytryptofándekarboxylázy (Gao *et al.*, 2018). Metabolizmus prebieha v enterochromafínných bunkách a túto dráhu podstupuje zhruba 1–2% tryptofánu. Takto vzniknutý serotonín neprechádza hematoencefalickou bariérou v mozgu, ale podieľa sa na regulácii fyziologických procesov v gastrointestinálnom trakte, kde pôsobí na peristaltiku svalstva, motilitu a sekréciu. Je taktiež dôležitý pri vazodilatácii a adsorpcii živín. Koncovým produktom serotonínovej dráhy môže byť aj melatonín, ktorý vzniká acetyláciou a metyláciou 5-HT. Uplatňuje sa hlavne pri regulácii imunitnej homeostázy (Agus *et al.*, 2018).

3.6.3.3 Metabolizmus tryptofánu – indolová dráha

V tejto dráhe končí približne 4–6% prijatého tryptofánu a metabolizmus prebieha najmä v mikroorganizmoch črevnej mikroflóry. Spracovanie tryptofánu sa skladá z viacerých reakcií a v porovnaní s predchádzajúcimi metabolickými dráhami vzniká viac výsledných produktov.

Prvou možnosťou metabolizmu je dekarboxylácia tryptofánu za vzniku tryptamínu. Druhú možnosť predstavuje enzým tryptofanáza, ktorý metabolizuje tryptofán na kyselinu indol-pyruvátovú. Kyselina indol-pyruvátová ďalej slúži ako prekursor mnohých ďalších metabolitov. Jej spracovanie môže viesť tromi cestami. Najjednoduchšou je opätovný metabolizmus pomocou tryptofanázy za vzniku indolu.

Kyselina indol-pyruvátová môže byť ďalej redukovaná na indol-laktát a následnou dehydratáciou vzniká kyselina indol-akrylová. Jej opätovnou redukciou sa tvorí kyselina indol-propiónová (IPA) (Smith a Macfarlane, 1997). Kyselina indol-akrylová môže podliehať aj konjugácii s glycínom, za vzniku glycín indol-akrylátu.

Dekarboxyláciou kyseliny indol-pyruvátovej vzniká indol-acetaldehyd, ktorý môže byť ďalej upravovaný dvomi spôsobmi. Prvý zahŕňa jeho premenu na kyselinu indol-octovú (IAA). Ak je táto kyselina dekarboxylovaná, vzniká zlúčenina skatol. Rovnako ako kyselina indol-akrylová, aj kyselina indol-octová môže podliehať konjugácii, v tomto prípade však s glutamínom za vzniku glutamín indol-acetátu. Druhá možnosť metabolizmu indol-acetaldehydu je jeho premena na tryptofol pomocou

alkoholdehydrogenázy (Gao *et al.*, 2018).

Indol je dôležitá signálna molekula, ktorú produkujú baktérie druhu *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Paracolobactrum coliforme*, *Achromobacter liquefaciens* a *Bacteroides* (Keszthelyi *et al.*, 2009). Ovplyvňuje reguláciu bakteriálnej motility, tvorbu biofilmu, rezistenciu voči antibiotikám a faktory virulencie, ktoré sú dôležité pri invázii hostiteľa baktériami neschopnými produkovať indol (napríklad *Salmonella enterica* alebo kvasinky) (Li a Young, 2013). V zdravej mikroflóre sa nachádza indol v pomerne hojnom množstve a pozitívne ovplyvňuje zdravie (Bansal *et al.*, 2010). V epiteliálnych bunkách zlepšuje priebeh zápalu a spomaľuje inváziu a kolonizáciu enterickými baktériami tým, že znižuje expresiu génov zodpovedných za ich patogenitu (Gao *et al.*, 2018). Avšak príliš veľké koncentrácie indolu majú negatívny vplyv na mikroflóru, môže dôjsť až k inhibícii bunkového delenia a ohrozeniu stability plazmidov (Li a Young, 2013).

Skatol, alebo 3-metylindol, sa obvykle vyskytuje v nízkych koncentráciách a produkujú ho baktérie rodu *Lactobacillus*, *Clostridium* a *Bacteroides* (Cook *et al.*, 2007). Môže ovplyvňovať rast a reprodukciu črevnej mikroflóry, má však bakteriostatické účinky na gramnegatívne enterobaktérie. Okrem iného skatol predstavuje inhibičný faktor pre CYP11A1, čím pôsobí na hladinu pregnenolónu, ktorý je prekursorom tvorby mineralokortikoidov a glukokortikoidov (Mosa *et al.*, 2016). Hladiny skatolu v tele ovplyvňuje najmä strava bohatá na tryptofán, glykémia a antibiotiká (Engberg *et al.*, 2000).

Ostatné deriváty metabolitov indolu majú rozličné pôsobenie v organizme. Kyselina indol-akrylová má protizápalové účinky, typtamín slúži hlavne ako neurotransmitter a môže indukovať sekréciu iónov v epiteliálnych bunkách (Wlodarska *et al.*, 2015). Niektoré metabolity môžu mať však nepriaznivé pôsobenie, ako napríklad kyselina indol-octová, ktorá má bakteriostatické účinky na gramnegatívne baktérie a iné metabolity môžu napríklad narúšať permeabilitu buniek epitelu (Keszthelyi *et al.*, 2009).

V poslednom období sa hromadia dôkazy o tom, že cieľom metabolitov črevnej mikroflóry sú často receptory podieľajúce sa na metabolizme xenobiotík, kam je zaradovaný aj PXR. Podrobne bol opísaný účinok katabolitov tryptofánu na transkripčnú aktivitu AhR (Vyhlidalova *et al.*, 2020b) a bolo zistené, že viaceré z týchto látok majú agonistické účinky. Podobné komplexné informácie o úlohe metabolitov tryptofánu na aktivitu PXR však chýbajú. Bakalárska práca je preto

zameraná na štúdium vplyvy indolu a jeho derivátov, ktoré vznikajú metabolizmom tryptofánu pôsobením črevných mikroorganizmov, na transkripčnú aktivitu PXR.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

LS180 – bunková línia odvodená od ľudského karcinómu hrubého čreva (kat. č. ECACC 87021202)

4.2 Plazmidy

pSG5-hPXR expresný plazmid – plazmid obsahujúci cDNA sekvenciu ľudského PXR (+1/+1608) zaklonovanú do pSG5 expresného vektoru (Lehmann *et al.*, 1998). Plazmid bol poskytnutý Dr. Kliewerom (University of Texas, Dallas, USA).

p3A4-luc reportérový plazmid – chimérický plazmid obsahujúci bazálny promótor s proximálnym PXR responzívnym elementom (-362/+53) a distálny xenobiotický responzívnym enhancerovým modul (-7836/-7208) CYP3A4 génu zaklonovaný do pGL4.10[luc2] reportérového vektoru (Pavek *et al.*, 2010). Plazmid bol pripravený Dr. Pávkom (Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika) v spolupráci s Katedrou buněčné biologie a genetiky, PřF, UPOL.

4.3 Použité chemikálie a roztoky

- kultivačné médium DMEM-CS: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540), 50 ml hormonálne inaktívneho fetálneho bovinného séra (FBS-CS; Fetal Bovine Serum Charcoal Stripped, Sigma-Aldrich, kat. č. F6765) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, kat. č. 11140-035)
- kultivačné médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 5 ml roztoku antibiotík penicilínu a streptomycínu (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540), 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS; Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, kat. č. F6178) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, kat. č. 11140-035)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. T4049)
- 0,04% roztok trypanovej modrej v H₂O (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)
- fosfátový pufo (PBS, Gibco, kat. č. 10010031)

- oktylfenol etoxylát (Triton X-100, Serva, kat. č. 37240)
- dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, kat. č. D8418)
- metyltetrazóliová soľ (MTT, Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- lyzačný pufoľ (Promega, kat. č. E3971)
- substrát pre luciferázu: 5 mg D-luciferín (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504), 9,6 mg adenosín-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A6419), 6,83 mg koenzým A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C4282), 168 mg dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, kat. č. 43819), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufoľ 1 mol·l⁻¹ (pH 7,8) (Sigma-Aldrich, kat. č. T8280), 1,23 mg kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E6511), 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, kat. č. M5921) doplnené do 30 ml destilovanou H₂O
- použité deriváty indolu:
 - indol-3-pyruvát (I3-PYR, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-218597), indol-3-laktát (I3-LAC, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-489732), indol-3-akrylát (I3-ACR, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-272496), indol-3-aldehyd (I3-ALD, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-257609), indol-3-acetamid (I3-ACE, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-255213), indol-3-etanol (I3-EtOH, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-256394), indol (IND, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-257606)
- rifampicín (RIF, Sigma-Aldrich, kat. č. R3501)
- FuGENE HD (Promega, kat. č. E2312)

4.4 Laboratórne pomôcky

- automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10 µl, 30 – 300 µl, 10 – 100 µl (Eppendorf)
- plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- pipetor FastPette (Labnet)
- sterilné plastové pipety s objemami 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- plastové kultivačné fľaše (TPP)
- 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- 96 jamková biela doštička na meranie luminiscencie (NUNC)
- Petriho misky (TPP)

- mikroskúmavky s objemami 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics)
- plastové skúmavky s objemami 15 ml, 50 ml a 60 ml (TPP)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky
- buničina (Tork)

4.5 Prístroje

- laminárny box Labculture (ESCO)
- inkubátor Mitre 4000 Series (Contherm)
- svetelný mikroskop (Novel Optics)
- vortex Reax top (Heidolph)
- zariadenie na meranie luminiscencie Infinite 200 (Tecan)
- skriňový mraziaci box MDF-U53V (Sanyo)
- trepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan)
- aspirátor FTA-1 (Biosan)
- vodný kúpeľ LCB 22D (Daihan Labtech)

4.6 Použité metódy

4.6.1 Kultivácia a pasážovanie buniek

Bunky LS180 boli kultivované v plastovej kultivačnej fľaši v sterilnom prostredí pri teplote 37 °C, 95% vlhkosti a v atmosfére 5% CO₂. Na kultiváciu bolo použité DMEM kultivačné médium. Pri pasážovaní buniek bola fľaša prenesená do laminárneho boxu. Kultivačné médium, fosfátový pufor (PBS) a 0,25% trypsín boli zohriate vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C. Médium bolo odsaté z kultivačnej fľaše a bunky sa opatrne premyli 5 ml PBS. PBS sa opäť odsalo a k bunkám sa napipetoval 1 ml 0,25% trypsínu-EDTA. Trypsinizácia prebiehala 4 minúty v inkubátore pri teplote 37 °C. Po uplynutí tejto doby, bola kultivačná fľaša opäť presunutá do laminárneho boxu. K bunkám sa pridalo 9 ml kultivačného média a následne boli bunky rozsuspendované a prenesené do sterilnej plastovej skúmavky. Približne 2 ml buniek boli napipetované opätovne do kultivačnej fľaše a doplnené 13 ml kultivačného média. Bunky boli opäť vrátené do inkubátoru. Pasážovanie prebiehalo každé 3 až 4 dni.

4.6.2 Príprava buniek na experiment

V prípravnom kroku na experiment boli bunky LS180 spásážované, s tým rozdielom, že bolo použité DMEM-CS kultivačné médium. Po homogenizácii sa zo suspenzie buniek odobralo 10 μl . K tomuto objemu sa pridalo 90 μl 0,04% trypanovej modrej a po premiešaní sa nanieslo 10 μl do Bürkerovej komôrky. Po spočítaní buniek bola stanovená hustota suspenznej kultúry. Následne bola suspenzná kultúra buniek zriedená pomocou DMEM-CS tak, aby sa v jednej jamke na 96 jamkovej kultivačnej doštičke nachádzalo $4 \cdot 10^4$ buniek v 200 μl kultivačného média. Takto bol pripravený objem suspenznej kultúry buniek zodpovedajúci potrebám experimentu. Bunky určené na test cytotoxicity (MTT test) boli vysiate na 96 jamkové kultivačné doštičky priamo, bunky určené na luciferázovú reportérovú esej boli tranzientne transfekované a následne vysiate na 96 jamkové kultivačné doštičky. Bunky v doštičkách boli inkubované pri teplote 37 °C, 95% vlhkosti a v atmosfére 5% CO₂ po dobu 24 hodín. Po uplynutí tejto časovej periódy bolo kultivačné médium z jamiek odsaté a nahradené médiom s testovanými látkami.

4.6.3 Tranzientná transfekcia

Bunky LS180 boli transfekované reportérovým plazmidom p3A4-luc a expresným plazmidom pSG5-hPXR pomocou FuGENE HD. Bola pripravená transfekčná zmes, ktorá obsahovala 100 ng reportérového plazmidu, 30 ng expresného plazmidu, 0,39 μl FuGENE HD (pomer FuGENE HD:DNA = 3:1) a 5 μl čistého Dulbecco's Modified Eagle's Medium na jednu jamku na 96 jamkovej kultivačnej doštičke. Adekvátne množstvo takto pripravenej transfekčnej zmesi sa inkubovalo po dobu 15 minút pri izbovej teplote a po uplynutí tohto času bolo pridané do vopred pripravenej suspenznej kultúry LS180 buniek. Následne boli bunky vysiate na 96 jamkové kultivačné doštičky.

4.6.4 Aplikácia derivátov indolu na bunky LS180

Vybrané deriváty indolu (I3-PYR, I3-LAC, I3-ACR, I3-ALD, I3-ACE, I3-EtOH) boli rozpustené v DMSO a nariedené na koncentrácie 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 1 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 10 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 25 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 50 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 100 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 200 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. V prípade indolu (IND) išlo o koncentrácie 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 1 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 10 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 100 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 1 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 2,5 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Takto pripravené roztoky boli pred nanášaním 1000-krát riedené DMEM-CS

kultivačným médiom, čiže výsledné koncentrácie aplikovaných látok boli v prípade derivátov indolu 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹, 100 nmol·l⁻¹, 1 μmol·l⁻¹, 5 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹, 25 μmol·l⁻¹, 50 μmol·l⁻¹, 100 μmol·l⁻¹, 200 μmol·l⁻¹. Výsledné koncentrácie indolu boli 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹, 100 nmol·l⁻¹, 1 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹, 100 μmol·l⁻¹, 1 mmol·l⁻¹, 2,5 mmol·l⁻¹.

Aplikácia testovaných látok prebiehala v dvoch experimentálnych schémach. Agonistický mód – bunky boli vystavené pôsobeniu jednotlivých látok samostatne a antagonistický mód – skúmané látky boli na bunky aplikované v kombinácii s RIF vo výslednej koncentrácii 0,5 μmol·l⁻¹. Ako modelový ligand PXR bol v agonistickom móde použitý RIF v koncentrácii 10 μmol·l⁻¹. V antagonistickom móde bola výsledná koncentrácia RIF, ako modelového ligandu PXR, 0,5 μmol·l⁻¹, čo predstavuje hodnotu EC₈₀. RIF bol pripravený rozpustením v DMSO v koncentráciách 10 mmol·l⁻¹ a 0,5 mmol·l⁻¹ a pred aplikáciou na bunky bol opäť 1000-krát riedený pomocou DMEM-CS kultivačného média. V luciferázovej reportérovej eseji slúžilo preto v agonistickom móde experimentov ako pozitívna kontrola DMEM-CS kultivačné médium obsahujúce 10 μmol·l⁻¹ RIF. V antagonistickom móde bolo ako pozitívna kontrola použité DMEM-CS kultivačné médium s obsahom 0,1% DMSO a RIF v koncentrácii 0,5 μmol·l⁻¹. Negatívnu kontrolu predstavovalo DMEM-CS kultivačné médium obsahujúce 0,1% DMSO (agonistický mód) a 0,2% DMSO (antagonistický mód). V prípade MTT testu slúžilo ako negatívna kontrola DMEM-CS kultivačné médium s obsahom 0,1% DMSO (agonistický mód), alebo 0,2% DMSO (antagonistický mód) a ako pozitívna kontrola DMEM-CS kultivačné médium obsahujúce 2% Tritonu X-100.

Testované látky boli spolu s kontrolami nanosené na 96 jamkové kultivačné doštičky obsahujúce bunky v kvadruplikátoch, v objeme 200 μl na jednu jamku. Bunky boli následne inkubované po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C, 95% vlhkosti a v atmosfére 5% CO₂.

4.6.5 Test cytotoxicity (MTT test)

Pri MTT teste ide o štúdium účinku toxikantu na viabilitu buniek. Bunky sú inkubované s roztokom metyltetrazóliovej soli, ktorá sa pôsobením mitochondriálnych dehydrogenáz mení zo žltej zlúčeniny na fialovú (formazán). Je teda zrejmé, že mŕtve bunky nebudú schopné tohto metabolizmu a iba živé bunky vyprodukujú fialovo sfarbené kryštály. Takto vzniknuté zafarbenie sa meria sepktrofotometricky a na základe intenzity zafarbenia sa stanoví viabilita buniek.

Po 24-hodinovej inkubácii sa kultivačné médium s pôsobiacimi látkami opatrne vylialo a kultivačná doštička sa osušila buničinou. Bunky v jednotlivých jamkách boli premyté 100 μl PBS. Po opätovnom vyliatí PBS sa do jamiek napipetovalo 100 μl MTT, ktoré bolo riedené DMEM-CS kultivačným médiom na koncentráciu 0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Kultivačná doštička sa nechala inkubovať pri teplote 37 $^{\circ}\text{C}$, 95% vlhkosti a v atmosfére 5% CO_2 po dobu približne 20 minút. Obsah doštičky sa opäť vylial a jemne osušil. Fialové kryštály vzniknutého formazánu sa rozpustili v 100 μl DMSO. Po dôkladnom premiešaní sa zmerala absorbancia pomocou spektrofotometra Infinite 200 pri vlnovej dĺžke 570 nm. Následne bola určená viabilita buniek, ktorá bola stanovená percentuálne vo vzťahu k negatívnej kontrole (DMSO), pričom negatívna kontrola predstavovala 100%.

4.6.6 Luciferázová reportérová esej

Luciferázová reportérová esej je metóda založená na meraní emitovaného svetla, ktoré vzniká oxidáciou luciferínu (substrátu). Táto reakcia je sprostredkovaná enzýmom luciferázou, od ktorého je aj odvodený tento druh experimentu (Smale, 2010). Aby bola zabezpečená funkčnosť takéhoto reportérového systému, je potrebné mať v danej bunkovej línii prítomný gén pre luciferázu, ktorého expresia je riadená vhodne navrhnutým regulačným elementom. Preto bolo pred každým experimentom nevyhnutné vykonať tranzientnú transfekciu pomocou špecifického reportérového plazmidu.

Po 24-hodinovej inkubácii buniek bolo kultivačné médium so skúmanými látkami vyliate a kultivačná doštička sa jemne osušila pomocou buničiny. Jamky boli premyté 100 μl PBS a po opätovnom vyliatí sa do jednotlivých jamiek napipetovalo 20 μl lyzačného pufru. Doštičky boli umiestnené do mraziaceho boxu (-80°C) na dobu minimálne 60 minút. Následne sa doštičky nechali rozmraziť a 10 μl lyzátu z každej jamky sa prepipetovalo do 96 jamkovej bielej doštičky, ktorá bola určená na meranie luminiscencie. K lyzátu sa do každej jamky pridalo 40 μl substrátu pre luciferázu. Meranie luminiscencie prebiehalo na prístroji Infinite 200. Namerané hodnoty luminiscencie boli prepočítané a výsledná luciferázová aktivita bola vyjadrená v prípade agonistického módu ako FOLD indukcia vo vzťahu k negatívnej kontrole (0,1% DMSO). V antagonistickom móde bola výsledná luciferázová aktivita stanovená percentuálne vo vzťahu k pozitívnej kontrole (0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF + 0,1% DMSO), pričom pozitívna kontrola predstavovala 100%.

4.6.7 Štatistické vyhodnotenie

Všetky experimenty sa uskutočnili v štyroch nezávislých opakovaníach. Štatisticky preukazné rozdiely výsledkov v porovnaní s kontrolou boli stanovené pomocou Student's *t*-test. Rozdiely boli považované za signifikantné na hladine pravdepodobnosti $p < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

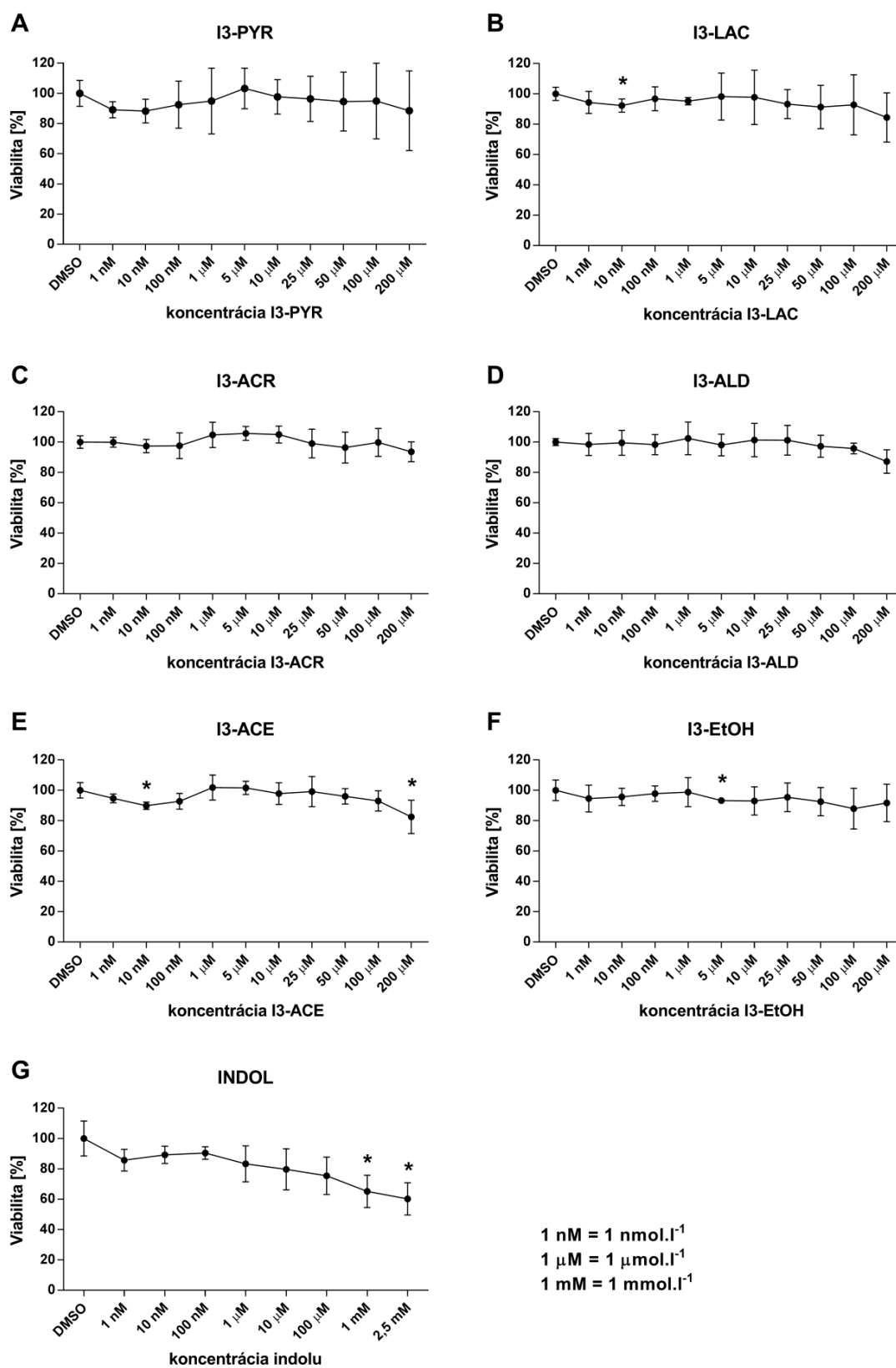
5.1 Stanovenie cytotoxických účinkov derivátov indolu na bunky LS180

Cytotoxické účinky indolu a jeho vybraných derivátov na bunkovú líniu LS180 bol stanovený pomocou MTT testu. Bunky LS180 boli vystavené pôsobeniu I3-PYR, I3-LAC, I3-ACR, I3-ALD, I3-ACE a I3-EtOH vo výsledných koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a indolu v koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Látky boli na bunky aplikované v kultivačnom médiu po dobu 24 hodín. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s obsahom 0,1% DMSO (agonistický mód), alebo 0,2% DMSO (antagonistický mód) a ako pozitívna kontrola kultivačné médium obsahujúce 2% Triton X-100. Vplyv jednotlivých látok na viabilitu buniek bol stanovovaný v dvoch experimentálnych schémach – agonistický a antagonistický mód. V agonistickom móde boli bunky vystavené pôsobeniu jednotlivých látok samostatne, zatiaľ čo v antagonistickom móde boli skúmané látky aplikované v kombinácii s RIF vo výslednej koncentrácii $0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Viabilita buniek bola stanovená percentuálne vo vzťahu k negatívnej kontrole, pričom negatívna kontrola predstavovala 100%. Výsledné hodnoty uvádzané v grafoch sú priemerom štyroch nezávislých experimentov.

Z výsledkov v agonistickom usporiadaní experimentov je zrejmé, že po pôsobení vybraných derivátov indolu nedošlo k výrazným zmenám vo viabilite buniek (Obr. 3A-F). Výnimku tvoril I3-ACE, kde bol pri najvyššej koncentrácii ($200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zaznamenaný mierny, avšak štatisticky preukazný pokles viability buniek až na hodnotu $82,38\% \pm 11,01\%$ (Obr. 3E). K výraznejšiemu poklesu viability buniek došlo po aplikácii indolu. Pokles bol závislý na narastajúcej koncentrácii indolu a pri najvyššej koncentrácii ($2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) dosahovala viabilita $60,16\% \pm 10,68\%$ viability kontrolných buniek (Obr. 3G).

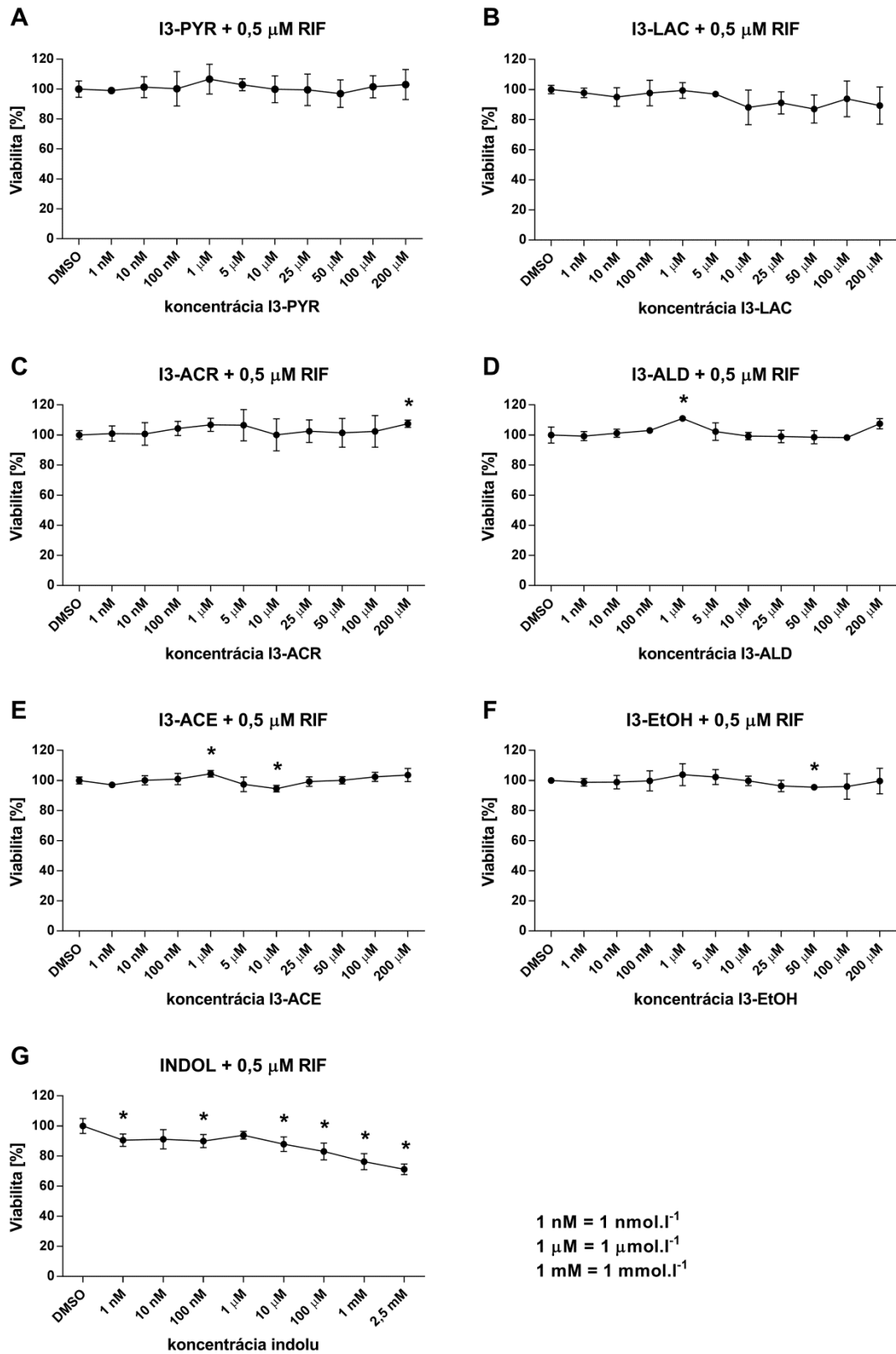
Podobne, ani po aplikácii jednotlivých derivátov indolu v kombinácii s RIF neboli zaznamenané výraznejšie zmeny vo viabilite buniek (Obr. 4A-F). Avšak, rovnako ako v agonistickom móde, pôsobenie indolu spolu s RIF malo za následok štatisticky preukazné zníženie viability buniek v závislosti od koncentrácie indolu. Pri najvyššej koncentrácii ($2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) klesla viabilita buniek až na hodnotu $71,22\% \pm 3,49\%$ viability kontrolných buniek (Obr. 4G).

Viabilita buniek po pôsobení derivátov indolu



Obrázok 3: Vplyv pôsobenia derivátov indolu na viabilitu buniek LS180 po 24-hodinovej aplikácii. * označuje štatisticky preukazné rozdiely ($p < 0,05$) v porovnaní s negatívnou kontrolou (DMSO).

Viabilita buniek po pôsobení derivátov indolu a rifampicínu



Obrázok 4: Vplyv kombinovaného pôsobenia derivátov indolu a RIF (0,5 μmol.l⁻¹) na viabilitu buniek LS180 po 24-hodinovej aplikácii. * označuje štatisticky preukazné rozdiely ($p < 0,05$) v porovnaní s negatívnou kontrolou (DMSO).

Štatisticky preukazné rozdiely boli pozorované aj po pôsobení určitých koncentrácií niektorých ďalších derivátov indolu, ako v agonistickom, tak aj v antagonistickom usporiadaní experimentov (Obr. 3, 4). Dané hodnoty viability sa však v porovnaní s kontrolnými bunkami pohybovali v rozmedzí 10%, čo je prejavom iba veľmi mierneho účinku.

Na základe týchto zistení môžeme tvrdiť, že vybrané deriváty indolu nemali cytotoxický účinok na bunkovú líniu LS180, či už pri samostatnom pôsobení, alebo po aplikácii v kombinácii s $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF. Výnimku predstavovala najvyššia testovaná koncentrácia I3-ACE ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pri ktorej bol zaznamenaný mierny cytotoxický vplyv. Cytotoxicita indolu bola v porovnaní s jeho derivátmi vyššia, ako v agonistickom, tak aj v antagonistickom móde, čo sa prejavilo výraznejším poklesom viability buniek LS180.

5.2 Vplyv derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR – agonistický mód

Transkripčná aktivita PXR bola stanovená pomocou luciferázovej reportérovej eseje. V prvom kroku experimentu boli bunky LS180 tranzientne transfekované pomocou reportérového plazmidu p3A4-luc a expresného plazmidu pSG5-hPXR. Po uplynutí 24 hodín bola transfekčná zmes odstránená a na bunky boli aplikované I3-PYR, I3-LAC, I3-ACR, I3-ALD, I3-ACE, I3-EtOH a indol. Roztoky derivátov indolu v kultivačnom médiu boli použité v koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a indolu v koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ako pozitívna kontrola slúžilo kultivačné médium s obsahom RIF v koncentrácii $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a ako negatívna kontrola kultivačné médium s obsahom 0,1% DMSO. Po 24 hodinách pôsobenia skúmaných látok boli bunky zlyzované a bola prevedená luciferázová reportérová esej. Namerané hodnoty luminiscencie boli prepočítané a výsledná luciferázová aktivita bola vyjadrená ako FOLD indukcia vo vzťahu k negatívnej kontrole (0,1% DMSO). Grafy uvádzané na Obr. 5 predstavujú reprezentatívne výsledky zo štyroch nezávislých experimentov.

Na základe meraní bolo zistené, že po aplikácii I3-ACE došlo k výraznému zvýšeniu luciferázovej aktivity a bola pozorovaná závislosť medzi nárastom FOLD indukcie a koncentráciou skúmanej látky. Najvyššia indukcia luciferázovej aktivity bola zaznamenaná pri koncentrácii $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a dosahovala hodnotu $15,11 \pm 2,60$ FOLD, aj keď štatisticky preukazné rozdiely boli identifikované už pri koncentrácii $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

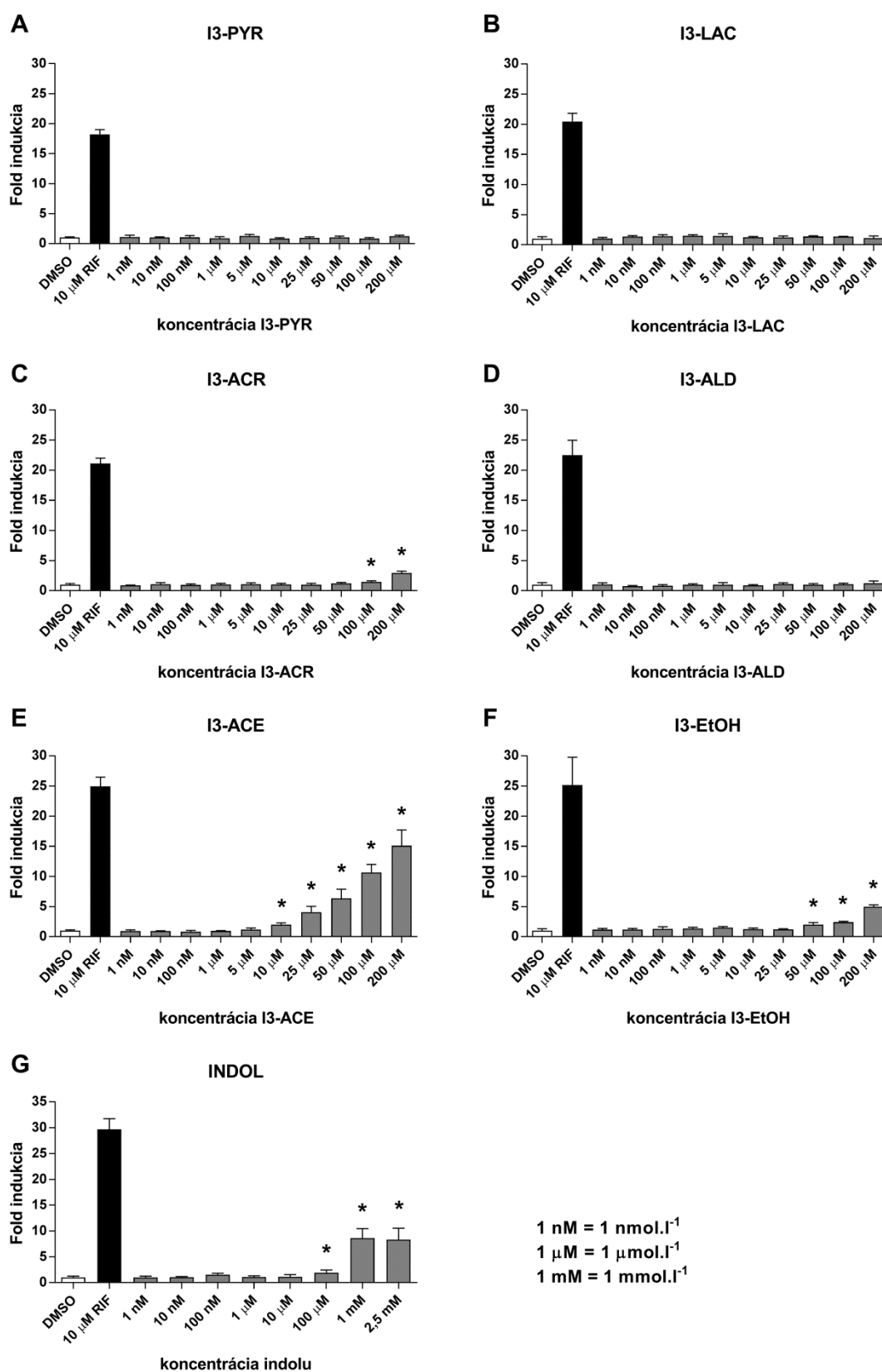
(Obr. 5E). Podobné výsledky boli pozorované aj po pôsobení indolu, kedy však nebola indukcia luciferázovej aktivity natoľko vysoká ako v prípade I3-ACE. Najvýraznejší nárast bol zaznamenaný pri koncentrácii $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, kedy hodnota luciferázovej aktivity dosahovala $8,61 \pm 1,86 \text{ FOLD}$. Pri najvyššej koncentrácii bol pozorovaný mierny pokles na hodnotu $8,34 \pm 2,19 \text{ FOLD}$ (Obr. 5G). Po aplikácii ostatných derivátov indolu nebol zistený výraznejší nárast luciferázovej aktivity s výnimkou I3-EtOH a I3-ACR (Obr. 5). Obe látky iba mierne indukovali luciferázovú aktivitu. V prípade I3-EtOH boli dosiahnuté hodnoty $4,98 \pm 0,30 \text{ FOLD}$ (Obr. 5F) a v prípade I3-ACR $2,96 \pm 0,28 \text{ FOLD}$ (Obr. 5C). Tieto výsledky boli pozorované pri najvyššej použitej koncentrácii $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V bunkách vystavených pôsobeniu RIF v koncentrácii $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (pozitívna kontrola) sa pohybovali hodnoty indukcie luciferázovej aktivity v rozmedzí $18,23 \pm 0,79 - 29,69 \pm 2,03 \text{ FOLD}$.

Zo získaných výsledkov je zrejmé, že pôsobením I3-ACE a indolu došlo v bunkách LS180 k relatívne výraznej indukcii transkripčnej aktivity PXR, ktorá bola závislá na koncentrácii týchto látok. Z ďalších testovaných derivátov indolu sa mierne agonistické účinky na aktivitu PXR prejavili ešte u I3-EtOH a I3-ACR.

5.3 Vplyv derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR – antagonistický mód

Transkripčná aktivita PXR bola stanovená pomocou luciferázovej reportérovej eseje. Rovnako ako v predchádzajúcom experimente, bunky LS180 boli tranzientne transfekované reportérovým plazmidom p3A4-luc a expresným plazmidom pSG5-hPXR. Po 24 hodinách bola transfekčná zmes odstránená a bunky boli ovplyvnené I3-PYR, I3-LAC, I3-ACR, I3-ALD, I3-ACE, I3-EtOH a indolom, v koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (deriváty indolu) a $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (indol). Všetky látky boli na bunky aplikované v kultivačnom médiu v kombinácii s RIF v koncentrácii $0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s obsahom 0,2% DMSO a ako pozitívna kontrola kultivačné médium s obsahom 0,1% DMSO a RIF v koncentrácii $0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po 24 hodinách boli bunky zlyzované a bola prevedená luciferázová reportérová esej. Namerané hodnoty luminiscencie boli prepočítané a výsledná luciferázová aktivita bola stanovená percentuálne vo vzťahu k pozitívnej kontrole ($0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF + 0,1% DMSO), pričom pozitívna kontrola predstavovala 100%. Výsledky sú priemerom štyroch nezávislých experimentov.

Transkripčná aktivita PXR po pôsobení derivátov indolu

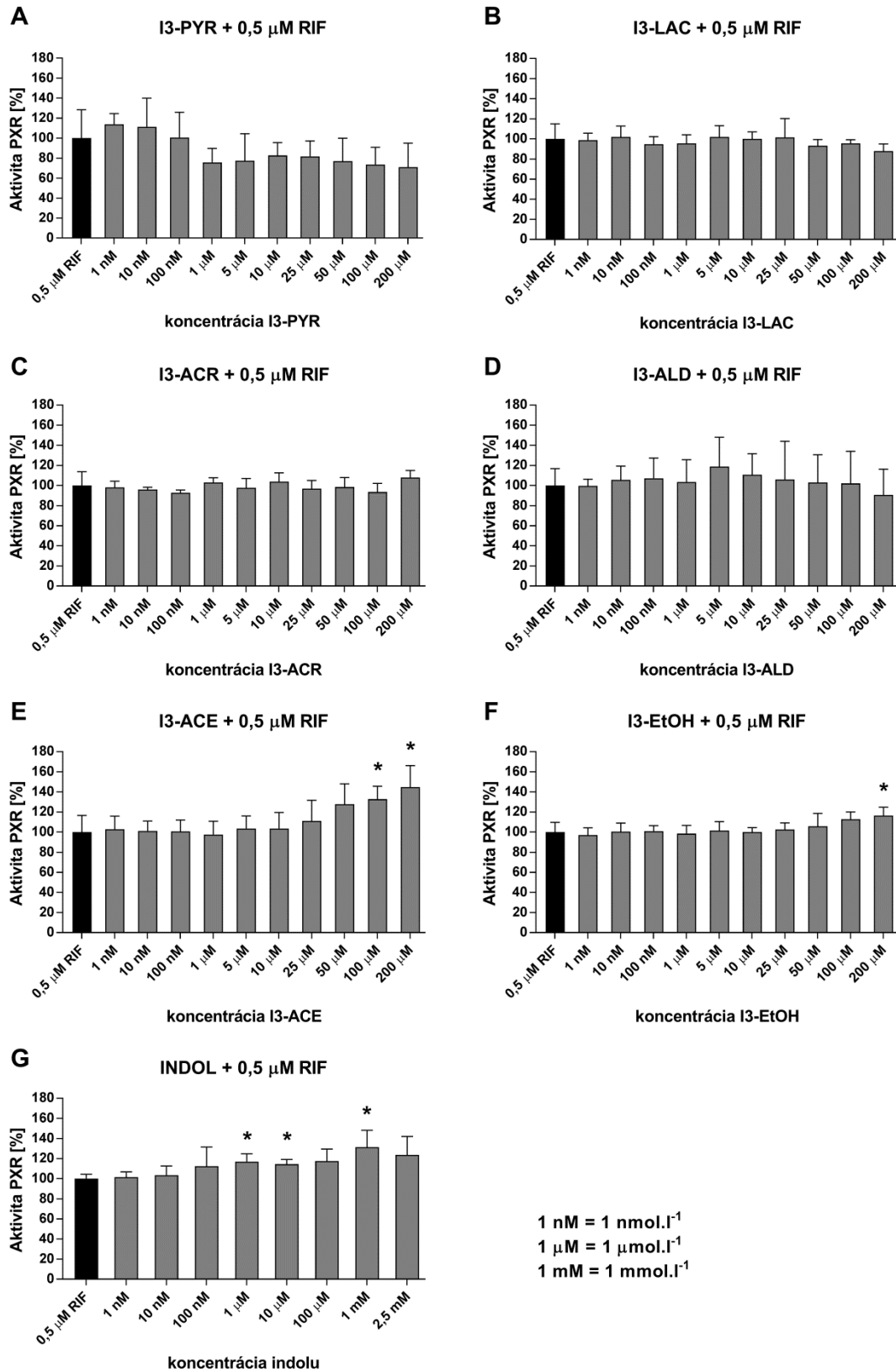


Obrázok 5: Vplyv pôsobenia derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR v bunkách LS180 po 24-hodinovej aplikácii. * označuje štatisticky preukazné rozdiely ($p < 0,05$) v porovnaní s negatívnou kontrolou (DMSO).

Z výsledkov meraní vyplýva, že I3-LAC, I3-ACR a I3-ALD v kombinácii s RIF v koncentrácii $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nemali vplyv na indukciu luciferázovej aktivity v porovnaní s bunkami vystavenými účinkom samotného $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF (Obr. 6B – D). U buniek ovplyvnených kombináciou $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF a I3-ACE, I3-EtOH a indolu došlo, v porovnaní s pozitívnou kontrolou ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF), k zvýšeniu luciferázovej aktivity, ktoré bolo závislé od koncentrácie skúmaných látok (Obr. 6E – G). Najvyšší nárast bol pozorovaný po aplikácii I3-ACE v koncentrácii $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kedy hodnoty luciferázovej aktivity dosahovali $144,7 \pm 21,5\%$ hodnoty nameranej v bunkách vystavených pôsobeniu $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF (Obr. 6E). Menej intenzívne zvýšenie luciferázovej aktivity bolo zistené po ovplyvnení buniek indolom, s maximálnou hodnotou $131,3 \pm 16,8\%$ pri koncentrácii $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 6G). V prípade I3-EtOH bol pozorovaný iba mierny nárast luciferázovej aktivity pri najvyššej testovanej koncentrácii ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Indukcia dosahovala $116,4 \pm 8,4\%$ v porovnaní s pozitívnou kontrolou (Obr. 6F). Naopak, inhibičným účinkom na indukciu luciferázovej aktivity sa prejavil I3-PYR. Pokles luciferázovej aktivity bol zaznamenaný po pôsobení $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ RIF v kombinácii s I3-PYR v koncentráciách $1 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnoty luciferázovej aktivity sa pohybovali v rozmedzí $82,6 \pm 13,0\%$ ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) – $71,0 \pm 24,0\%$ ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) aktivity indukovanej samotným RIF ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Tieto výsledky však neboli štatisticky preukazné (Obr. 6A).

Na základe týchto zistení je možné konštatovať, že I3-ACE a indol, v menšej miere taktiež I3-EtOH, boli schopné potenciovať transkripčnú aktivitu PXR v bunkách LS180, indukovanú modelovým agonistom RIF. Naopak, I3-PYR sa prejavil miernymi antagonistickými účinkami na transkripčnú aktivitu PXR, aj keď tieto výsledky neboli štatisticky preukazné.

Transkripčná aktivita PXR po pôsobení derivátov indolu a rifampicínu



Obrázok 6: Vplyv kombinovaného pôsobenia derivátov indolu a RIF (0,5 μmol.l⁻¹) na transkripčnú aktivitu PXR v bunkách LS180 po 24-hodinovej aplikácii. * označuje štatisticky preukazné rozdiely ($p < 0,05$) v porovnaní s pozitívnou kontrolou (RIF).

6 DISKUSIA

Štúdiu metabolitov črevnej mikroflóry sa v posledných dekádach venuje pomerne veľká pozornosť. Hromadia sa dôkazy o tom, že cieľom produktov metabolizmu mikroorganizmov osídľujúcich tráviaci trakt sú často receptory podieľajúce sa na metabolizme xenobiotík. Jedným z nich je aj PXR.

Metabolity črevnej mikroflóry tvoria pomerne široké spektrum biologicky aktívnych látok. Jednu zo skupín predstavuje indol a jeho deriváty, ktoré sú produktmi katabolizmu tryptofánu. Doposiaľ bolo opísaných 12 katabolitov tryptofánu vznikajúcich pôsobením črevných mikroorganizmov (Agus *et al.*, 2018). Podrobnejšie bol preštudovaný účinok týchto látok na transkripčnú aktivitu ďalšieho zo skupiny xenoreceptorov – AhR (Vyhlidalova *et al.*, 2020b). Autori zistili, že viaceré z derivátov indolu sa vyznačovali agonistickými účinkami. Je známe, že množstvo agonistov AhR má duálne účinky a sú schopné aktivovať takisto PXR. Avšak úlohe derivátov indolu pri aktivácii PXR sa doposiaľ nevenovala príliš veľká pozornosť. Pozornosť bola zameraná predovšetkým na štúdium účinkov kyseliny indol-3-propiónovej, indolu a skatolu (Venkatesh *et al.*, 2014, Vyhlidalova *et al.*, 2020a). V predkladanej bakalárskej práci som sa preto zamerala na štúdium vplyvu vybraných derivátov indolu na transkripčnú aktivitu PXR. Transkripčná aktivita bola sledovaná v ľudskej bunkovej línii LS180, odvodenej od karcinómu hrubého čreva.

V prvej časti experimentov bol stanovený vplyv skúmaných látok na viabilitu buniek. Výsledky MTT testu ukázali, že všetky testované koncentrácie derivátov indolu nemali zásadný vplyv na viabilitu buniek ako v agonistickom móde, tak ani v antagonistickom móde. To znamená, že transkripčná aktivita PXR nebola negatívne ovplyvnená prípadnými cytotoxickými účinkami študovaných látok. Avšak, po aplikácii indolu došlo k výraznejšiemu poklesu viability buniek a cytotoxický efekt narastal so zvyšujúcou sa koncentráciou. Pri najvyššej testovanej koncentrácii ($2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) klesla viabilita buniek až na hodnotu zhruba 60% v agonistickom móde a 71% v antagonistickom móde. Aj keď sa jednalo o pomerne vysokú koncentráciu, toto zistenie bolo mierne prekvapivé, nakoľko fekálna koncentrácia indolu sa pohybuje v rozmedzí $0,25 - 2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Roager a Licht, 2018).

Na určenie agonistického a antagonistického pôsobenia derivátov indolu bola použitá luciferázová reportérová esej. Ako modelový ligand PXR slúžil rifampicín. V agonistickom móde bol použitý v koncentrácii $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v antagonistickom móde

v koncentrácii $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Táto koncentrácia zodpovedala hodnote EC_{80} . Stanovenie EC_{80} pre rifampicín nebolo súčasťou experimentálnej časti bakalárskej práce, hodnota bola prevzatá z predchádzajúcich experimentov prebiehajúcich na pracovisku (Pečinková, nepublikované údaje).

Z výsledkov experimentov je zrejmé, že z celej skupiny sledovaných látok mali na transkripčnú aktivitu PXR vplyv iba I3-ACE, I3-EtOH a samotný indol. Výrazným agonistickým pôsobením sa prejavili I3-ACE a indol, v prípade I3-EtOH boli preukázané iba mierne agonistické účinky. Podobný efekt bol zaznamenaný aj pri štúdiu metylovaných derivátov indolu (Vyhlidalova *et al.*, 2020a). Autori zistili, že 1-metyl-indol a 2-metyl-indol výrazne indukovali expresiu *CYP3A4* a *MDR1*, génov regulovaných prostredníctvom PXR, v bunkovej línii LS180. Naopak, pôsobenie indolu a kyseliny indol-3-propiónovej na transkripčnú aktivitu PXR v ľudskej bunkovej línii 293T odvodenej od embryonálnych ľadvinových buniek, malo iba mierny aktivačný účinok (Venkatesh *et al.*, 2014). Výrazný agonistický efekt autori pozorovali až pri spoločnom pôsobení kombinácie týchto látok. Výsledky mojich experimentov ukázali, že v prípade indolu bola najvyššia indukcia zaznamenaná pri koncentrácii $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Avšak, pri koncentrácii $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hodnoty indukcie mierne klesli. Dôvodom tohto poklesu mohli byť cytotoxické účinky indolu, keďže pri tejto koncentrácii bol pozorovaný aj výraznejší pokles viability buniek. Na základe získaných výsledkov je však zrejmé, že koncentrácia indolu potrebná na aktiváciu PXR v intestinálnych bunkách LS180 sa pohybovala v rádoch jednotiek $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri kombinovanom pôsobení derivátov indolu s RIF boli v prípade I3-ACE a indolu zaznamenané výraznejšie synergistické účinky s modelovým ligandom, po aplikácii I3-EtOH bol tento efekt opäť menej intenzívny. Spoločným pôsobením týchto látok s RIF tak dochádzalo k potenciácii transkripčnej aktivity PXR. Naopak, po aplikácii RIF v kombinácii s I3-PYR došlo k slabému zníženiu transkripčnej aktivity PXR. Aj keď zmeny neboli štatisticky preukazné, tieto výsledky ukazujú, že I3-PYR by mohol mať mierny antagonistický vplyv na aktivitu PXR. Získané výsledky naznačujú, že I3-ACE a indol majú pomerne výrazné agonistické účinky na transkripčnú aktivitu ľudskeho PXR a mohli by sa tak potenciálne podieľať na indukcii expresie génov regulovaných prostredníctvom PXR v črevných bunkách.

7 ZÁVER

V predkladanej bakalárskej práci bol skúmaný vplyv vybraných metabolitov črevnej mikrobioty na transkripčnú aktivitu PXR v ľudskej črevnej bunkovej línii LS180. Bolo testovaných spolu 6 derivátov indolu – I3-PYR, I3-LAC, I3-ALD, I3-EtOH, I3-ACR, I3-ACE a samotný indol.

V literárnom prehľade boli opísané a charakterizované funkcie PXR, vrátane jeho štruktúry, regulácie transkripčnej aktivity a úlohy v ľudskom organizme. Ďalej bola opísaná ľudská črevná mikrobiota a metabolity, ktoré jej prostredníctvom vznikajú a ich vplyv na fyziologické procesy v organizme s akcentom na úlohu PXR.

V experimentálnej časti bakalárskej práce boli prevedené dva typy experimentov. Pomocou MTT testu bola stanovená cytotoxicita jednotlivých látok. Pre účely luciferázovej reportérovej eseje boli študované látky nanášané na bunky LS180, ktorá boli pred každým experimentom tranzientne transfekovaná pomocou reportérového plazmidu p3A4-luc a expresného plazmidu pSG5-hPXR. Na oba experimenty boli používané deriváty indolu v koncentráciách 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹, 100 nmol·l⁻¹, 1 μmol·l⁻¹, 5 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹, 25 μmol·l⁻¹, 50 μmol·l⁻¹, 100 μmol·l⁻¹, 200 μmol·l⁻¹. Výsledné koncentrácie indolu boli 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹, 100 nmol·l⁻¹, 1 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹, 100 μmol·l⁻¹, 1 mmol·l⁻¹, 2,5 mmol·l⁻¹. Okrem indolu nevykazovala žiadna zo sledovaných látok výrazné cytotoxické účinky. Indol znižoval viabilitu buniek v najvyššej testovanej koncentrácii (2,5 mmol·l⁻¹) na hodnotu 60,16% ± 10,68% viability kontrolných buniek. Zníženie viability buniek malo za následok aj pôsobenie indolu v kombinácii s RIF, kedy viabilita klesla na hodnotu 71,22% ± 3,49% viability kontrolných buniek.

Prípadné agonistické a antagonistické účinky skúmaných látok na transkripčnú aktivitu PXR boli zisťované pomocou luciferázovej reportérovej eseje. Ako pozitívna kontrola bol použitý modelový ligand PXR – rifampicín. Najvyššia indukcia transkripčnej aktivity PXR bola zaznamenaná pri pôsobení I3-ACE a indolu, kedy hodnoty indukcie stúpali úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou látok. Miernu indukciu spôsoboval taktiež I3-EtOH. V kombinácii s RIF boli potvrdené synergické účinky všetkých týchto troch látok. Antagonistický účinok bol pozorovaný iba pri pôsobení I3-PYR, tieto výsledky však neboli štatisticky preukazné.

8 LITERATÚRA

- Agus A., Planchais J., Sokol H. (2018): Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host & Microbe* 23, 716–724.
- Alkhalaf L.M., Ryan K.S. (2015): Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: pathways and mechanisms. *Chemistry & Biology* 22, 317–328.
- Altucci L., Rossin A., Raffelsberger W., Reitmair A., Chomienne C., Gronemeyer H. (2001): Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nature Medicine* 7, 680–686.
- Badawy A. A. (2015): Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. *Bioscience Reports* 35, e00261.
- Bansal T., Alaniz R. C., Wood T. K., Jayaraman A. (2010): The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 107, 228–233.
- Bian H.S., Ngo S.Y., Tan W., Wong C.H., Boelsterli U.A., Tan T.M. (2007): Induction of human sulfotransferase 1A3 (SULT1A3) by glucocorticoids. *Life Sciences* 81, 1659–1667.
- Blumberg, B., Sabbagh, W.Jr., Juguilon, H., Bolado, J.Jr., van Meter, C.M., Ong, E. S., Evans R.M. (1998): SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Development* 12, 3195–3205.
- Bock K.W. (2010): Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyl-transferases (UGTs): mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochemical Pharmacology* 80, 771–777.
- Borlak J., Gasparic A., Locher M., Schupke H., Hermann R. (2006): N-Glucuronidation of the antiepileptic drug retigabine: results from studies with human volunteers, heterologously expressed human UGTs, human liver, kidney, and liver microsomal membranes of Crigler-Najjar type II. *Metabolism* 55, 711–721.
- Brigelius-Flohe R., Traber M.G. (1999): Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal* 13, 1145–1155.

- Cook K. L., Rothrock M. J. Jr., Loughrin J. H., Doerner K. C. (2007): Characterization of skatole-producing microbial populations in enriched swine lagoon slurry. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 329–340.
- di Masi A., DeMarinis E., Ascenzi P., Marino M. (2009): Nuclear receptors CAR and PXR: molecular, functional, and biomedical aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 297–343.
- Dring M.M., Goulding C.A., Trimble V.I., Keegan D., Ryan A.W., Brophy K.M., Smyth C.M., Keeling P.W., O’Donoghue D., O’Sullivan M., O’Morain C., Mahmud N., Wikstrom A.C., Kelleher D., McManus R. (2006): The pregnane X receptor locus is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 130, 341–348.
- Engberg R. M., Hedemann M. S., Leser T. D., and Jensen B. B. (2000): Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science* 79, 1311–1319.
- Febbraio M., Silverstein R.L. (2007): CD36: implications in cardiovascular disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 2012–2030.
- Fiorucci S., Rizzo G., Donini A., Distrutti E., Santucci L. (2007): Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends in Molecular Medicine* 13, 298–309.
- Flint HJ. (2012): The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews* 70, 10–13.
- Fuhr U. (2000): Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clinical Pharmacokinetics* 38, 493–504.
- Gao J., Xu K., Liu H., Liu G., Bai M., Peng C., Li T., Yin Y. (2018): Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8, 1–22.
- Gu S., Chen D., Zhang J.N., Lv X., Wang K., Duan L.P., Nie Y., Wu L.W. (2013): Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS one* 8, 74957.
- Gu X., Ke S., Liu D., Sheng T., Thomas P.E., Rabson A.B., Gallo M.A., Xie W., Tian Y. (2006): Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene

expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *Journal of Biological Chemistry* 281, 17882–17889.

- Hagenbuch B., Meier P.J. (2004): Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 447, 653–665.
- Harmsen S., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H. (2007): The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug–drug interactions in oncology. *Cancer Treatment Reviews* 33, 369–380.
- Hayashi H., Takahashi R., Nishi T., Sakamoto M., Benno Y. (2005): Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology* 54, 1093–1101.
- Herzig S., Long F., Jhala U.S., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., Montminy M. (2001): CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179–183.
- Hofmann A.F. (1999): The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of Internal Medicine* 159, 2647–2658.
- Hollister E.B., Riehle K., Luna R.A., Weidler E.M., Rubio-Gonzales M., Mistretta T., Raza S., Doddapaneni H.V., Metcalf G.A., Muzny D.M., Gibbs R.A., Petrosino J.F., Shulman R.J., Versalovic J. (2015): Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* 3, 36.
- Hustert E., Zibat A., Presecan-Siedel E., Eiselt R., Mueller R., Fuss C., Brehm I., Brinkmann U., Eichelbaum M., Wojnowski L., Burk O. (2001): Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metabolism and Disposition* 29, 1454–1459.
- Igarashi M., Yogiashi Y., Mihara M., Takada I., Kitagawa H., Kato S. (2007): Vitamin K induces osteoblast differentiation through pregnane X receptor-mediated transcriptional control of the *Msx2* gene. *Molecular and Cellular Biology* 27, 7947–7954.
- Johansson M.E., Larsson J.M., Hansson G.C. (2011): The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator

of host-microbial interactions. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 108, 4659–4665.

- Jones G., Strugnell S.A., DeLuca H.F. (1998): Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews* 78, 1193–1231.
- Kast H.R., Goodwin B., Tarr P.T., Jones S.A., Anisfeld A.M., Stoltz C.M., Tontonoz P., Kliewer S., Willson T.M., Edwards P.A. (2002): Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *Journal of Biological Chemistry* 277, 2908–2915.
- Keszthelyi D., Troost F. J., Masclee A. A. (2009): Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology and Motility* 21, 1239–1249.
- Kliewer S.A., Goodwin B., and Willson T.M. (2002): The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrinology Reviews* 23, 687–702.
- Kliewer S.A., Moore J.T., Wade L., Staudinger J.L., Watson M.A., Jones S.A., McKee D.D., Oliver B.B., Willson T.M., Zetterström R.H., Perlmann T., Lehmann J.M. (1998): An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92, 73–82.
- Kodama S., Koike C., Negishi M., Yamamoto Y. (2004): Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7931–7940.
- Kodama S., Moore R., Yamamoto Y., Negishi M. (2007): Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. *Biochemical Journal* 407, 373–381.
- Landes N., Pfluger P., Kluth D., Birringer M., Rühl R., Bül G.F., Glatt H., Brigelius-Flohé R. (2003): Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochemical Pharmacology* 65, 269–273.
- Langmann T., Moehle C., Mauerer R., Scharl M., Liebisch G., Zahn A., Stremmel W., Schmitz G. (2004): Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 127, 26–40.

- Lazar M.A. (2003): Nuclear receptor corepressors. *Nuclear Receptor Signaling* 1, e001.
- Lehmann J.M., McKee D.D., Watson M.A., Willson T.M., Moore J.T., Kliewer S.A. (1998): The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *The Journal of Clinical Investigation* 102, 1016–1023.
- Lemaire G., Mnif W., Pascussi J.M., Pillon A., Rabenoelina F., Fenet H., Gomez E., Casellas C., Nicolas J.C., Cavailles V., Duchesne M.J., Balaguer P. (2006): Identification of new human PXR ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicological Sciences* 91, 501–509.
- Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G. (2002): Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 700–710.
- Li G., Young K. D. (2013): Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology* 159, 402–410.
- Li T., Chen W., Chiang J.Y. (2007): PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine. *Journal of Lipid Research* 48, 373–384.
- Linnet K. (2002): Glucuronidation of olanzapine by cDNA-expressed human UDPglucuronosyltransferases and human liver microsomes. *Human Psychopharmacology* 17, 233–238.
- Ma Q., Lu A.Y. (2008): The challenges of dealing with promiscuous drug metabolizing enzymes, receptors and transporters. *Current Drug Metabolism* 9, 374–383.
- Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (1995): The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.
- Marcobal A., Sonnenburg J.L. (2012): Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 12–15.
- McKenna N.J., Lanz R.B., O'Malley B.W. (1999): Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20, 321–344.
- Miki Y., Suzuki T., Tazawa C., Blumberg B., Sasano H. (2005): Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene

1 in human adult and fetal tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 231, 75–85.

- Misawa K., Horiba T., Arimura N., Hirano Y., Inoue N., Shimano H., Shimizu M., Sato R. (2003): Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36176–36182.
- Mosa A., Gerber A., Neunzig J., Bernhardt R. (2016): Products of gut-microbial tryptophan metabolism inhibit the steroid hormonesynthesizing cytochrome P450 11A1. *Endocrine* 53, 610–614.
- Nakae J., Kitamura T., Silver D.L., Accili D. (2001): The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *Journal of Clinical Investigation* 108, 1359–1367.
- Naspinski C., Gu X., Zhou G.D., Mertens-Talcott S.U., Donnelly K.C., Tian Y. (2008): Pregnane X receptor protects HepG2 cells from BaP-induced DNA damage. *Toxicological Sciences* 104, 67–73.
- Niwa T., Yabusaki Y., Honma K., Matsuo N., Tatsuta K., Ishibashi F., Katagiri M. (1998): Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica* 28, 539–547.
- Orans J., Teotico D.G., Redinbo M.R. (2005): The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges. *Molecular Endocrinology* 19, 2891–2900
- Pascussi J.M., Robert A., Nguyen M., Walrant-Debray O., Garabedian M., Martin P., Pineau T., Saric J., Navarro F., Maurel P., Vilarem M.J. (2005): Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *Journal of Clinical Investigation* 115, 177–186.
- Pavek P., Pospeschova K., Svecova L., Syrova Z., Stejskalova L., Blazkova J., Dvorak Z., Blahos J. (2010): Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Biochemical Pharmacology* 79, 277–287.
- Pavek, P., Dvorak, 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.

- Peters, J. C. (1991): Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 294, 345–358.
- Pokusaeva K., Johnson C., Luk B., Uribe G., Fu Y., Oezguen N., Matsunami R.K., Lugo M., Major A., Mori-Akiyama Y., Hollister E.B., Dann S.M., Shi X.Z., Engler D.A., Savidge T., Versalovic J. (2017): GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology and Motility* 29, 12904.
- Poulos T.L. (1988): Cytochrome P450: molecular architecture, mechanism, and prospects for rational inhibitor design. *Pharmaceutical Research* 5, 67–75.
- Roager H.M., Licht T.R. (2018): Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications* 9, 3294.
- Rosenfeld M.G., Lunyak V.V., Glass C.K. (2006): Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & Development* 20, 1405–1428.
- Roth A., Looser R., Kaufmann M., Meyer U.A. (2008): Sterol regulatory element binding protein 1 interacts with pregnane X receptor and constitutive androstane receptor and represses their target genes. *Pharmacogenetics Genomics* 18, 325–337.
- Said H.M. (2013): Recent advances in transport of water-soluble vitamins in organs of the digestive system: a focus on the colon and the pancreas. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 305, 601–610.
- Sender R., Fuchs S., Milo R. (2016): Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology* 19, 14
- Scheithauer T.P., Dallinga-Thie G.M., de Vos W.M., Nieuwdorp M., van Raalte D.H. (2016): Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Molecular Metabolism* 5, 759–770.
- Smale C.T. (2010): Luciferase assay. *Cold Spring Harbor* 5, 5421
- Smith E. A., Macfarlane G. T. (1997): Formation of phenolic and indolic compounds by anaerobic bacteria in the human large intestine. *Microbial Ecology* 33, 180–188.
- Sonoda J., Xie W., Rosenfeld J.M., Barwick J.L., Guzelian P.S., Evans R.M. (2002): Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X

receptor (PXR). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 13801–13806.

- Staudinger J.L., Goodwin B., Jones S.A., Hawkins-Brown D., MacKenzie K.I., LaTour A., Liu Y., Klaassen C.D., Brown K.K., Reinhard J., Willson T.M., Koller B.H., Kliewer S.A. (2001): The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 3369–3374.
- Sugatani J., Nishitani S., Yamakawa K., Yoshinari K., Sueyoshi T., Negishi M., Miwa M. (2005): Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Molecular Pharmacology* 67, 845–855.
- Sundin O.H., Mendoza-Ladd A., Zeng M., Diaz-Arévalo D., Morales E., Fagan M., Ordonez J., Velez P., Antony N., McCallum R.W. (2017): The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology* 17, 160.
- Tabb M.M., Sun A., Zhou C., Grün F., Errandi J., Romero K., Pham H., Inoue S., Mallick S., Lin M., Forman B.M., Blumberg B. (2003): Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *Journal of Biological Chemistry* 278, 43919–43927.
- Vasapolli R., Schutte K., Schulz C. Vital M., Schomburg D., Pieper D.H., Vichez-Vargas R., Malfertheiner P. (2019): Analysis of transcriptionally active bacteria throughout the gastrointestinal tract of healthy individuals. *Gastroenterology* 157, 1081-1092.
- Venkatesh M., Mukherjee S., Wang H., Li H., Sun K., Benechet A.P., Qiu Z., Maher L., Redinbo M.R., Phillips R.S., Fleet J.C., Kortagere S., Mukherjee P., Fasano A., Le Ven J., Nicholson J.K., Dumas M.E., Khanna K.M., Mani S. (2014): Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity* 41, 296–310.
- Ventura M., Turrone F., Motherway M.O., MacSharry J., van Sinderen D. (2012): Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends in Microbiology* 20, 467–476.

- Vyhliadalova B., Bartonkova I., Jiskrova E., Li H., Mani S., Dvorak Z. (2020a): Differential activation of human pregnane X receptor PXR by isomeric mono-methylated indoles in intestinal and hepatic in vitro models. *Toxicology Letters* 324, 104–110.
- Vyhliadalova B., Krasulova K., Pecinkova P., Marcalikova A., Vrzal R., Zemankova L., Vanco J., Travnicek Z., Vondracek J., Karasova M., Mani S., Dvorak Z. (2020b): Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2614.
- Wang T., Ma X., Krausz K.W., Idle J.R., Gonzalez F.J. (2008): Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324, 674–684.
- Watkins R.E., Wisely G.B., Moore L.B., Collins J.L., Lambert M.H., Williams S. P., Willson T.M., Kliewer S.A., Redinbo M.R. (2001): The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* 292, 2329–2333.
- Wlodarska M., Kostic A. D., Xavier R. J. (2015): An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 17, 577–591.
- Xu C., Li C.Y., Kong A.N. (2005): Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* 28, 249–268.
- Yoshikawa T., Shimano H., Amemiya-Kudo M., Yahagi N., Hastay A.H., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2001): Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and Cellular Biology* 21, 2991–3000.
- Zhai Y., Pai H.V., Zhou J., Amico J.A., Vollmer R.R., Xie W. (2007): Activation of pregnane X receptor disrupts glucocorticoid and mineralocorticoid homeostasis. *Molecular Endocrinology* 21, 138–147.

- Zhang B., Cheng Q., Ou Z., Lee J.H., Xu M., Kochhar U., Ren S., Huang M., Pflug B.R., Xie W. (2010): Pregnane X receptor as a therapeutic target to inhibit androgen activity. *Endocrinology* 151, 5721–5729.
- Zhang J., Kuehl P., Green E.D., Touchman J.W., Watkins P.B., Daly A., Hall S.D., Maurel P., Relling M., Brimer C., Yasuda K., Wrighton S.A., Hancock M., Kim R.B., Strom S., Thummel K., Russell C.G., Hudson J.R. Jr, Schuetz E.G., Boguski M.S. (2001): The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* 11, 555–72.
- Zhou C., Assem M., Tay J.C., Watkins P.B., Blumberg B., Schuetz E.G., Thummel K.E. (2006a): Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *Journal of Clinical Investigation* 116, 1703–1712.
- Zhou C., Tabb M.M., Nelson E.L., Grün F., Verma S., Sadatrafiei A., Lin M., Mallick S., Forman B.M., Thummel K.E., Blumberg B. (2006b): Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2280–2289.