

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2012**

**Romana Bukvová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



## **Role PPARs ve vyvíjejícím se lidském střevě**

**Diplomová práce**

**Romana Bukvová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Jiřího Ehrmanna, Ph.D. na základě uvedených literárních zdrojů.

Dne

Podpis .....

Tímto bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a za pomoc při zpracování výsledků. Také bych chtěla poděkovat pracovníkům imunohistochemické laboratoře a laboratoře tkáňových kultur na Ústavu histologie a embryologie LF UP v Olomouci.

## Souhrn

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs) jsou jaderné receptory, které hrají důležitou roli při vývoji a diferenciaci orgánů. Tyto receptory se po aktivaci navázáním specifických ligandů mohou podílet na regulaci genů zapojených v celé řadě biologických procesů, jako je metabolismus, apoptóza či nádorová transformace. Jedny z možných genů, na jejichž regulaci by se tyto receptory mohly podílet, jsou ABC transportéry způsobující mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR).

Tato diplomová práce se zabývá distribucí izoformy PPAR- $\gamma$  v embryonálním lidském střevě v různých fázích nitroděložního vývoje a rolí těchto receptorů (a specifického ligandu ciglitazonu) v nádorové buněčné linii HT-29 odvozené od adenokarcinomu střeva. Současně je studován i vliv receptorů na regulaci ABC transportérů u téže linie.

Pro detekci PPAR- $\gamma$  v embryonálním lidském střevě v různých fázích nitroděložního vývoje byla zvolena dvoustupňová imunohistochemická metoda, díky níž se podařilo zjistit, že k expresi těchto receptorů dochází již v 7. týdnu vývoje a že míra jejich exprese je závislá na jednotlivých stádiích nitroděložního vývoje. Na základě provedeného testu životaschopnosti buněk byl potvrzen antiproliferační účinek ciglitazonu na nádorovou buněčnou linii HT-29. K poklesu životnosti buněk došlo v závislosti na použité dávce ciglitazonu. Western blot analýzou byla prokázána zvyšující se exprese PPAR- $\gamma$  u nádorových buněk ovlivněných ciglitazonem oproti kontrolním neovlivněným buňkám. Změna exprese ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 u stejných buněk nebyla pozorována.

## Summary

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) are nuclear transcription factors that play an important role in development and differentiation of organs. These receptors are activated by specific ligands and they participate in regulation of genes involved in many biological processes such as metabolism, apoptosis and neoplastic transformation. One of the possible genes which can be regulated by PPARs are ABC transporters that causes Multi-Drug Resistance (MDR).

This diploma thesis is focused on the distribution of the isoform PPAR- $\gamma$  in the human embryonic intestine at different stages of intrauterine development (IUD) and the role of these receptors (and their specific ligand ciglitazone) in the tumor cell line HT-29 derived from human colon adenocarcinoma. At the same time this thesis studied the influence of these receptors on the regulation of ABC transporters in the same cell line.

Detection of PPAR- $\gamma$  in human embryonic intestine at different stages of IUD was performed by two-step immunohistochemical method by which was found that the expression of PPAR- $\gamma$  occurs in the 7th week of development and the rate of their expression depends on various stages of IUD. The anti-proliferative effect of ciglitazone on human tumour cell line HT-29 was confirmed by the cell viability assay. Ciglitazone inhibited cell viability in a dose-dependent manner. Western blot analysis demonstrated the increased expression of PPAR- $\gamma$  in tumor cells affected by ciglitazone compared with control un-treated cells. Changes in expression of ABCG2/BCRP and ABCC1/MRP1 in the same cells was not observed.

## Obsah

1	CÍLE PRÁCE.....	8
2	ÚVOD.....	9
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	11
3.1	Jaderné receptory .....	11
3.2	Klasifikace jaderných receptorů .....	12
3.3	PPARs .....	13
3.4	PPARs ve vyvíjejícím se lidském střevě.....	20
3.5	PPARs v dospělém střevě .....	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
4.1	Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$ v lidském embryonálním střevě .....	26
4.1.1	Biologický materiál.....	26
4.1.2	Přístrojové vybavení .....	26
4.1.3	Chemikálie .....	26
4.1.4	Pufry.....	27
4.1.5	Protilátky.....	27
4.1.6	Pracovní postup.....	27
4.2	Experimentální ovlivnění exprese PPAR- $\gamma$ , ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 v nádorové buněčné linii HT-29.....	29
4.2.1	Biologický materiál.....	29
4.2.2	Podmínky kultivace .....	29
4.2.3	Přístrojové vybavení .....	29
4.2.4	Chemikálie .....	29
4.2.5	Pufry a roztoky.....	30
4.2.6	Test životaschopnosti buněk .....	31
4.2.7	SDS-PAGE a Western blot analýza.....	32

5	VÝSLEDKY .....	35
5.1	Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$ v lidském embryonálním střevě.....	35
5.2	Experimentální ovlivnění exprese PPAR- $\gamma$ , ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 v buněčné linii HT-29 .....	39
5.2.1	Test životaschopnosti buněk .....	39
5.2.2	Příprava buněčných lyzátů a stanovení koncentrace proteinů .....	42
5.2.3	Western blot analýza .....	43
6	DISKUSE.....	45
7	ZÁVĚR .....	49
8	SEZNAM ZKRATEK.....	50
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	52



# 1 Cíle práce

Cílem teoretické části této diplomové práce je vypracování literární rešerše na téma Role PPARs ve vyvíjejícím se lidském střevě.

Cílem experimentální části diplomové práce je imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$  v embryonální tkáni střeva (porovnání exprese v různých stádiích nitroděložního vývoje) a ovlivnění exprese tohoto receptoru ve střevní nádorové buněčné linii prostřednictvím agonisty PPAR- $\gamma$ . Současně byla experimentální část zaměřena na posouzení účinku agonisty PPAR- $\gamma$  na regulaci ABC transportérů podílejících se na vzniku mnohočetné lékové rezistence.

## 2 Úvod

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs) patří do skupiny jaderných receptorů, která se podílí na regulaci celé řady biologických funkcí. Jaderné receptory představují jednu z nejrozšířenějších skupin transkripčních regulátorů u mnohobuněčných organismů.

PPARs byly poprvé identifikovány v 90. letech a název dostaly podle jejich schopnosti proliferovat peroxizomy. Skupina PPARs zahrnuje tři izoformy – PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  a PPAR- $\gamma$ . Jednotlivé izoformy se liší tkáňovou distribucí, biologickou funkcí i specifitou k ligandům. PPARs jsou ligandy aktivované transkripční faktory a díky tomu se podílí na regulaci důležitých procesů, jako je vývoj, metabolismus, apoptóza, nádorové bujení nebo regenerace tkání. K aktivaci receptorů dochází po navázání specifického ligandu a vytvoření heterodimeru s receptorem pro retinoid X, který se poté váže na specifickou sekvenci DNA cílového genu. Mezi přírodní ligandy aktivující PPARs patří například kyselina linoleová, prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>) nebo prostaglandin J<sub>2</sub> (15-d-PGJ<sub>2</sub>). Nejvýznamnější skupinu syntetických ligandů představují tzv. thiazolidindiony (TZD), mezi něž patří například triglitazon, rosiglitazon či ciglitazon. TZD jsou v současné době používány k léčbě metabolického syndromu a cukrovky 2. typu. Všechny tři izoformy PPARs jsou exprimované v buňkách ektodermálního, mezodermálního i entodermálního embryonálního původu, přičemž jejich exprese u dospělých jedinců je odlišná v čase i v prostoru. Přestože je zřejmá důležitá role těchto receptorů během diferenciaci a vývoje orgánů, o jejich distribuci a přesné funkci ve vyvíjejících se tkáních není dosud příliš známo.

Kolorektální karcinom (CRC) je jedno z nejrozšířenějších nádorových onemocnění v České Republice. Ve srovnání s ostatními zeměmi světa zaujímá ČR v incidenci CRC jednu z čelních příček. Vysoká exprese receptorů PPAR (PPAR- $\gamma$ ) byla prokázána u mnoha nádorů, včetně kolorektálního karcinomu. Současně jsou tyto receptory schopny po aktivaci některými specifickými ligandy inhibovat proliferaci, zastavit buněčný cyklus či indukovat apoptózu nádorových buněk. Tato skutečnost by mohla být v budoucnu využita k léčbě nádorových onemocnění prostřednictvím PPARs.

Jedna z hlavních příčin selhání chemoterapeutické léčby nádorových onemocnění je mnohočetná léková rezistence (MDR), na jejímž vzniku se podílí i skupina transmembránových proteinů, označovaných jako ABC-transportéry. Tyto

proteiny jsou schopny exportovat toxické látky (včetně cytostatik) ven z těla a tím odolávají cytotoxickému účinku protinádorových léčiv. Na základě několika málo studií se nabízí možnost regulovat tyto proteiny prostřednictvím aktivace PPARs.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Jaderné receptory

Jaderné receptory jsou jednou z nejrozšířenějších skupin transkripčních regulátorů u mnohobuněčných organismů. Rodina jaderných receptorů je charakteristická vysokou funkční různorodostí, přičemž si tyto receptory zachovávají jednotnou strukturní organizaci (Wahli *et* Martinez, 1991). Jaderné receptory regulují celou řadu funkcí, jako je reprodukce, diferenciacce, vývoj, metabolismus, metamorfóza a homeostáze. Fungují jako ligandy aktivované transkripční faktory, a tvoří tak přímé spojení mezi signálními molekulami (řídícími tyto procesy) a transkripční odpovědí (Gronmeyer *et* Laudet, 1995).

Superrodina jaderných receptorů zahrnuje jaderné hormonální receptory (Nuclear Hormone Receptors, NHRs), jejichž ligandy jsou známy, a jaderné orfánové receptory (Nuclear Orphan Receptors), pro které nebyly jejich přirozené ligandy doposud identifikovány (Escriva *et* al., 2000). NHRs představují skupinu fylogeneticky příbuzných proteinů a zahrnují receptory pro hydrofóbní molekuly, jako jsou steroidní hormony (estrogeny, glukokortikoidy, progesteron, mineralokortikoidy, vitamin D3, oxysteroly atd.), kyselina retinová, thyroïdní hormony, mastné kyseliny a prostaglandiny (Gronmeyer *et* Laudet, 2002).

Jaderné receptory jako transkripční faktory mohou ovlivňovat transkripci genů prostřednictvím různých mechanismů (Tsai *et* al., 1994; Horwitz *et* al., 1996; Li *et* al., 1997). NHRs mohou inhibovat nebo naopak zvyšovat transkripci cílových genů, a to navázáním řady proteinů, tzv. korepresorů a koaktivátorů, na transkripční komplex. První kompletní strukturu jaderného receptoru poskytla analýza genu kódujícího glukokortikoidní receptor (Weinberger *et* al., 1985), která rovněž odhalila i příbuznost genů kódujících steroidní receptory s virovým *erbA* onkogenem. Typický jaderný receptor se skládá z několika funkčních domén: NH<sub>2</sub>-terminální oblast (A/B), DNA vázající doména (DBD, oblast C), variabilní oblast D, oblast E s ligand vázající doménou (LBD) a COOH-terminální oblast F (Krust *et* al., 1986; Evans, 1988; Mangelsdorf *et* al., 1995; Aranda *et* Pascual, 2001).

### 3.2 Klasifikace jaderných receptorů

Jaderné receptory můžeme na základě fylogenetických studií rozdělit do šesti různých podskupin (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999; Germain, 2006) (viz Tab. I). Fylogenetická pozice receptorů je dána strukturními vlastnostmi DNA vázající domény a schopností dimerizace. První podskupinu představuje velká skupina receptorů zahrnující receptory pro thyroïdní hormony (Thyroid Hormone Receptors, TRs), receptory pro retinovou kyselinu (Retinoic Acid Receptors, RARs), receptory pro vitamin D (Vitamin D Receptors, VDRs), receptory aktivované proliferátory peroxizomů (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPARs) a některé orfánové receptory. Druhou podskupinu reprezentují například receptory pro retinoid X (RXRs) a hepatocytární jaderný faktor 4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4, HNF4). Třetí skupina je tvořena steroidními receptory, jako je androgenový receptor (Androgen Receptor, AR), glukokortikoidní receptor (Glucocorticoid Receptor, GR), progesteronový receptor (Progesterone Receptor, PR) a estrogenový receptor (Estrogen Receptor, ER). Do čtvrté, páté a šesté skupiny řadíme především orfánové receptory.

**Tab. I: Rozdělení jaderných receptorů do jednotlivých podskupin (upraveno dle Aranda *et Pascual*, 2001)**

	Označení receptoru	Český název receptoru
<b>I. podskupina</b>	TR	Receptor pro thyroïdní hormony
	RAR	Receptor pro retinovou kyselinu
	VDR	Receptor pro vitamin D
	PPAR	Receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů
	PXR	Pregnanový X receptor
	CAR	Konstitutivní androstanový receptor
	LXR	Jaterní X receptor
	FXR	Farnesoid X receptor
	RevErb	Reverzní <i>erbA</i>
	RZR	Receptor pro retinoid Z
UR	Ubikvitinový receptor	
<b>II. podskupina</b>	RXR	Receptor pro retinoid X
	COUP TF	*
	HNF-4	Hepatocytární jaderný faktor 4
	TLX	*
	PNR	*

	Označení receptoru	Český název receptoru
	TR2	Testikulární receptor 2
III. podskupina	GR	Glukokortikoidní receptor
	AR	Androgenový receptor
	PR	Progesteronový receptor
	ER	Estrogenový receptor
	ERR	Estrogen-related receptor
IV. podskupina	NGFI-B	NGF-indukovaný klon B
V. podskupina	SF-1	Steroidogenní faktor 1
VI. podskupina	GCNF	Jaderný faktor zárodečných buněk

Legenda: \* = pro tyto receptory není zaveden český název

### 3.3 PPARs

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPARs) jsou ligandy aktivované transkripční faktory, které řadíme do skupiny jaderných receptorů (Laudet *et al.*, 1992). Hrají důležitou roli v regulaci celé řady biologických procesů, jako je metabolismus lipidů, buněčná diferenciace, vývoj, apoptóza, nádorové bujení, udržování homeostáze glukózy, regulace zánětů a regenerace tkání.

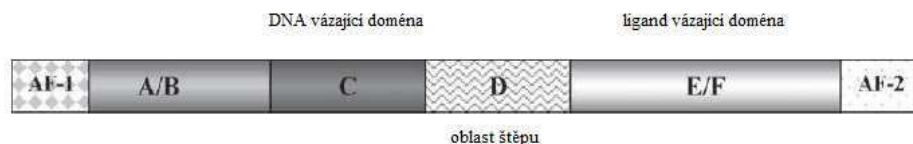
Tyto receptory byly poprvé identifikovány na počátku 90. let u hlodavců a název dostaly podle jejich schopnosti stimulovat proliferaci peroxizomů (Isseman *et Green*, 1990). Peroxizomy jsou malé buněčné organely, ohraničené jednoduchou membránou, vyskytující se hojně v tkáních zapojených v metabolismu tuků. Pojem peroxizom byl zaveden v roce 1966 (de Duve *et Baudhuin*, 1966) z toho důvodu, že v těchto organelách dochází působením enzymů kataláz a oxidáz současně ke tvorbě i k degradaci peroxidu vodíku. Peroxizomy se účastní  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, metabolismu prostaglandinů, syntézy cholesterolu a žlučových kyselin. Proliferátory peroxizomů představují různorodou skupinu látek, které zvyšují počet i velikost peroxizomů a indukují enzymy zapojené v metabolismu mastných kyselin. Při proliferaci peroxizomů dochází k drastickým změnám v morfologii, počtu i v enzymatické aktivitě peroxizomů (Lock *et al.*, 1989). S peroxizomy rovněž souvisí celá řada dědičných chorob, které mohou být způsobeny ztrátou funkce enzymu přítomného v peroxizomu, nebo neschopností tvořit peroxizomy (Singh, 1997).

## Struktura PPARs

PPAR se skládá z několika funkčních a strukturních domén, které jsou typické pro většinu jaderných receptorů (Evans, 1988). Tyto receptory obsahují čtyři hlavní domény, které jsou kódovány šesti exony (A-F) (Obr. 1). N-koncová A/B doména je nejvariabilnější oblastí jaderných receptorů a její součástí je i na ligandu nezávislá aktivační doména označovaná jako AF-1 (Ligand-Independent Activation Function 1), jejíž přítomnost byla poprvé prokázána Wermanem *et al.* (1997). DNA vázající doména (DNA-Binding Domain, DBD) je naopak vysoce konzervovanou doménou, díky níž receptor rozpoznává specifickou sekvenci DNA, na kterou se poté váže (tzv. PPAR Response Element, PPRE). DBD hraje rovněž roli při tvorbě heterodimerů s receptory pro retinoid X (Ijpenberg *et al.*, 1997). 3D struktura této domény byla odvozena na základě krystalografických a magnetických analýz prováděných u glukokortikoidních a estrogenových receptorů (Härd *et al.*, 1990; Schwabe *et al.*, 1990; Luisi *et al.*, 1991). DNA vázající doména je tvořena 71 aminokyselinami formujícími dva zinkové prsty, kde čtyři cysteinové zbytky obklopují zinkový iont. Motiv zinkových prstů je pro jaderné receptory typický a nevyskytuje se u žádných jiných proteinů vázajících se k DNA.

Variabilní oblast D představuje tzv. oblast čepu (hinge region), která slouží jako spojka mezi DNA vázající doménou a ligand vázající doménou. Ligand vázající doména neboli doména E (Ligand-Binding Domain, LBD) představuje multifunkční doménu, která umožňuje vazbu ligandu a aktivaci receptoru, zprostředkovává homo a heterodimerizaci a interaguje s heat-shock proteiny (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Aranda *et al.*, 2001). LBD doména obsahuje COOH-koncovou doménu AF-2 (Ligand-Dependent Activation Function 2), která je zodpovědná za transkripční aktivitu a je důležitá pro interakce s koaktivátory (Wurtz *et al.*, 1996). Ligand vázající doména vytváří trojvrstvou strukturu, která je tvořena dvanácti  $\alpha$ -helixy označenými H1 až H12 a jedním  $\beta$ -skládaným listem (Moras *et al.*, 1998). Součástí struktury je i ligand vázající kapsa (Ligand-Binding Pocket), do které se váže ligand.

PPAR- $\gamma$  (jedna z izoform PPARs) se svou strukturou výrazně liší od ostatních jaderných receptorů. Nolte *et al.* (1998) zjistili na základě krystalografické analýzy, že PPAR- $\gamma$  má ve své struktuře jeden  $\alpha$ -helix navíc (označený jako H2'). Odlišné uspořádání třinácti  $\alpha$ -helixů tak umožňuje lepší přístupnost pro ligand.



**Obr. 1: Schématické znázornění struktury PPARs (upraveno dle Kota *et al.*, 2005)**

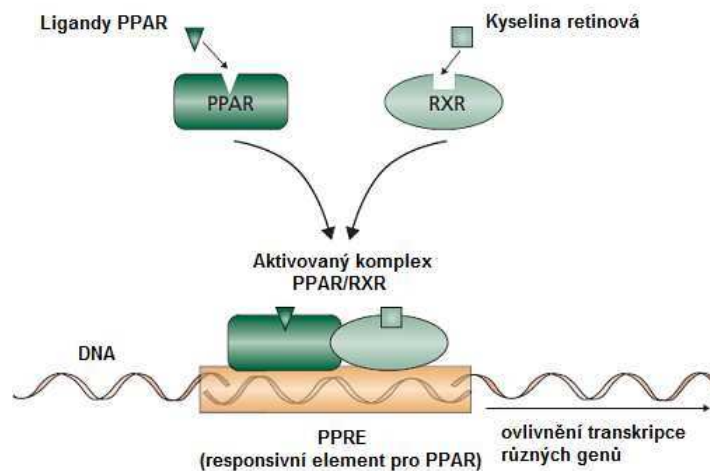
### Aktivace a mechanismus působení PPARs

K aktivaci těchto receptorů dochází po navázání exogenního či endogenního ligandu, a po tvorbě heterodimeru s receptorem pro retinoid X (RXR) (Obr. 2). Heterodimer PPAR/RXR se poté váže do promotorové oblasti cílového genu na specifickou DNA sekvenci označovanou jako responzivní element pro PPAR (PPAR Response Element, PPRE). Sekvence PPRE byla poprvé identifikována Ijpenbergem *et al.* (1997). Jedná se o dva opakující se hexanukleotidy AGGTCA, které jsou oddělené jedním nukleotidem (označení DR-1) (Ijpenberg *et al.*, 1997).

PPARs bez navázaného ligandu interagují s korepresorovým komplexem, který obsahuje histondeacetylázu (Peters *et al.*, 2012). V tomto komplexu brání korepresor receptorům vazbě na DNA a inhibuje transkripci genu. Po vazbě ligandu dojde ke konformačním změnám, které způsobí uvolnění tohoto represoru a PPAR vytvoří heterodimer s receptorem pro retinoid X (RXR). Tento heterodimer se po vazbě RNA polymerázy II a koaktivátoru s histonacetyltransferázovou aktivitou naváže na DNA cílového genu prostřednictvím PPRE, dojde k přestavbě chromatinu a ke zvýšené transkripci tohoto genu. Mezi korepresory bránící vazbě PPAR na DNA patří např.: jaderný korepresor receptorů (NcoR), tlumící mediátor pro retinoidy a thyroïdní receptor (SMRT) nebo transkripční represor BCL-6 (Hörlein *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995). Mezi koaktivátory patří koaktivátor steroidních receptorů (SRC-1), PPAR vázající protein (PBP) nebo PPAR interakční protein (PRIP) (Oñate *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2000).

Jsou známy i alternativní mechanismy vedoucí k aktivaci PPAR, a to aktivace prostřednictvím fosforylace či aktivace heterodimeru po navázání ligandu na RXR (Desvergne *et al.*, 1999).





**Obr. 2: Mechanismus působení receptorů PPAR (upraveno dle Štulc *et* Češka)**

### Izoformy PPARs

Do rodiny PPARs v současné době zahrnujeme tři izoformy, a to PPAR- $\alpha$  (neboli NR1C1), PPAR- $\beta$  (někdy rovněž označovaný jako PPAR- $\delta$ , NR1C2) a PPAR- $\gamma$  (NR1C3). Receptory se vzájemně liší svojí úlohou ve fyziologických procesech, mírou exprese v různých tkáních i specifitou k ligandům. Izoformy jsou kódované odlišnými geny, jejichž lokalizace na chromozomech byla definována u myši i u člověka. Jones *et al.* (1995) lokalizovali geny pro PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$ , a PPAR- $\gamma$  na myších chromozomech 15, 17 a 6. Gen pro lidský PPAR- $\alpha$  byl lokalizován na chromozomu 22 v oblasti 22q12 – q13.1 a gen pro PPAR- $\gamma$  byl lokalizován na chromozomu 3 v pozici 3p25 (Greene *et al.*, 1995). Jako poslední se podařilo identifikovat pozici genu pro lidský PPAR- $\beta/\delta$ , a to na 6. chromozomu v oblasti 6p21.1 – p21.2 (Yoshikawa *et al.*, 1996). V dalších letech bylo zjištěno, že myši i lidský gen pro PPAR- $\gamma$  obsahuje tři různé promotory, a rozlišujeme tak tři další izoformy PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 a PPAR- $\gamma$ 3 (Fajas *et al.*, 1997; Fajas *et al.*, 1998).

### Tkáňová distribuce a fyziologická funkce

Receptory PPARs jsou hojně exprimované ve tkáních a orgánech po celém těle a jsou častými cílovými transkripčními faktory mnoha signálních drah. Díky tomu mohou regulovat transkripci genů zapojených v celé řadě důležitých biologických procesů, například genů energetického metabolismu (Kota *et al.*, 2005). Všechny tři izoformy PPARs jsou zapojeny především v metabolismu lipidů a glukózy a jejich

role byla prokázána i při vývoji nádorů. PPAR- $\alpha$  je nejvíce exprimován ve tkáních, ve kterých ve velké míře probíhá  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, jako jsou hnědá tuková tkáň, játra, srdce, ledviny, jícn či svalová tkáň. Hlavní funkcí těchto receptorů je regulace exprese genů zapojených v metabolismu lipidů a genů pro kontrolu homeostáze v játrech. Například během hladovění (nebo při zvýšeném fyzickém či psychickém stresu) dochází k uvolnění adrenokortikoidního hormonu, ten stimuluje uvolnění glukokortikoidů, což vede ke zvýšené expresi PPAR- $\alpha$  v játrech (Kota *et al.*, 2005).

PPAR- $\beta/\delta$  je exprimován ve všech tkáních, přičemž hladina jeho exprese není ve tkáních konstantní a do značné míry se může lišit. Tento izotyp rovněž reguluje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin a zpětný transport cholesterolu, metabolismus glukózy a lipoproteinů nebo proliferaci a diferenciaci keratinocytů v průběhu hojení ran (Kota *et al.*, 2005).

Exprese PPAR- $\gamma$  se liší podle typu izoformy a typu tkáně. Izoformu PPAR- $\gamma$ 1 můžeme najít v mnoha tkáních, zatímco izoforma PPAR- $\gamma$ 2 je striktně exprimovaná pouze v tukové tkáni. PPAR- $\gamma$ 3 je hojně zastoupen v tlustém střevě, v bílé tukové tkáni a v makrofázích (Kota *et al.*, 2005). Tyto receptory se podílí na ukládání lipidů v tukové tkáni, mají důležitou roli v diferenciaci a v metabolismu adipocytů, a rovněž v inzulínové signalizaci. Mimo to byl u těchto receptorů prokázán i protizánětlivý a antiproliferační účinek. S poruchou funkce PPAR- $\alpha$  a PPAR- $\gamma$  souvisí několik metabolických chorob, jako je ateroskleróza, cukrovka či obezita (Tan *et al.*, 2005)

### **Ligandy PPARs**

Do dnešní doby byla identifikována celá řada přírodních (endogenních) a farmakologických (syntetických) ligandů aktivujících PPARs (Obr. 3). Krystalografická analýza ligand vázající domény odhalila, že ligand vázající kapsa je u receptorů PPAR- $\gamma$  a PPAR- $\beta/\delta$  mnohem větší než u jiných jaderných receptorů (Xu *et al.*, 2001). Tato skutečnost je tak jedním z možných vysvětlení schopnosti těchto receptorů vázat tak rozmanitou skupinu přírodně se vyskytujících i syntetických látek.

## **Přírodní ligandy**

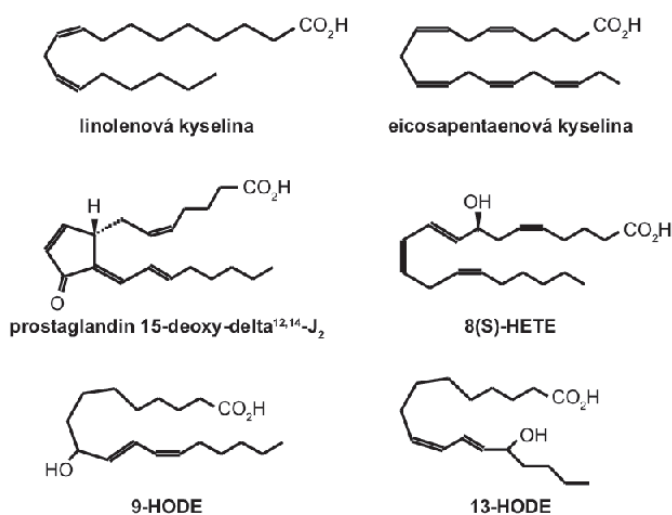
Mezi přírodní ligandy vázající se ke všem třem izoformám PPARs patří celá řada mastných kyselin a jejich derivátů (Desvergne *et* Wahli, 1999). PPAR- $\alpha$  a PPAR- $\beta$  jsou aktivovány nasycenými i nenasycenými mastnými kyselinami, jako je kyselina linolenová, arachidonová či kyselina palmitová. Přírodním ligandem PPAR- $\alpha$  je například 8-hydroxyeicosatetraenová kyselina (8-HETE), leukotrien B4 (LTB4) nebo prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>). Endogenními ligandy PPAR- $\gamma$  jsou 9- a 13-hydroxyoktadekadienová kyselina (9-HODE, 13-HODE), 12- a 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina (12-HETE, 15-HETE), prostaglandin15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ , prostaglandin J2 (15-d-PGJ2) nebo prostaglandin D2 (PGD2) (Desvergne *et* Wahli, 1999).

## **Syntetické ligandy**

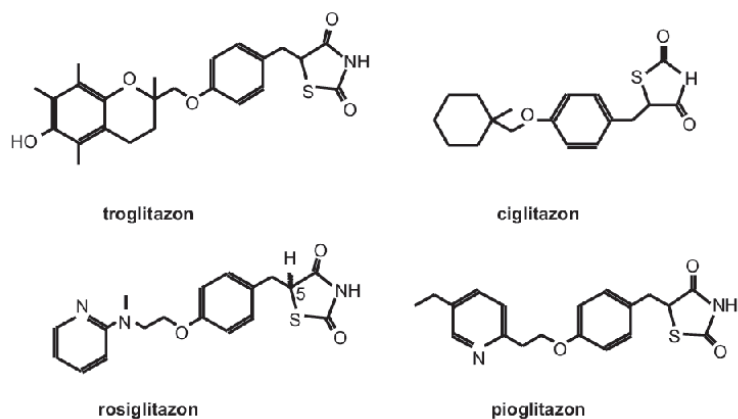
Syntetické ligandy se začaly vyrábět zejména za účelem léčby chronických onemocnění, jako je metabolický syndrom či cukrovka. Existuje však i řada chemikálií a látek kontaminujících prostředí, které PPARs rovněž aktivují - např.: ftaláty, trichlorethylen či kyselina perfluorooctanová. Nejrozmanitější skupinu syntetických ligandů představují thiazolidindiony (TZD) působící stimulačně na PPAR, přičemž většina thiazolidindionů jsou selektivními ligandy receptorů PPAR- $\gamma$  (Lehmann *et* al., 1995). Mezi TZD řadíme pioglitazon, rosiglitazon, troglitazon, ciglitazon a další. TZD představují skupinu látek, která zvyšuje inzulínovou resistenci, snižuje hladinu glukózy v krvi a krevní tlak u pacientů s cukrovkou 2. typu. U ciglitazonu a troglitazonu byl prokázán i antiproliferační účinek u buněčných linií odvozených od celé řady nádorů (Kubota *et* al., 1998, Tsubouchi *et* al., 2000). Výzkumy v dalších letech odhalily, že PPAR- $\gamma$  mohou být aktivovány i látkami s mnohem vyšší afinitou (např.: aryl-tyrosinovými deriváty), které se strukturně zcela liší od TZD (Brown *et* al., 1999).

Fibráty jsou syntetické ligandy PPARs fungující jako hypolipidemika a způsobující nízkou koncentraci HDL-cholesterolu (Vamecq *et* Latruffe, 1999). Mezi fibráty řadíme klofibrát, fenofibrát, bezofibrát a řadu dalších. Klofibrát spolu s fenofibrátem jsou ligandy PPAR- $\alpha$  i PPAR- $\gamma$ , avšak afinita k PPAR- $\alpha$  je několikanásobně vyšší. Bezofibrát aktivuje všechny tři izotypy těchto receptorů. Velmi účinným selektivním ligandem pro PPAR- $\alpha$  ze skupiny fibrátů je WY14643 (Fruchart *et* al., 1999).

Glitazary jsou látky, které současně působí na oba typy receptorů - PPAR- $\alpha$  a PPAR- $\gamma$ , kombinují vlastnosti fibrátů a thiazolidindionů, a jsou proto označovány jako duální agonisté PPARs (Nomura *et al.*, 1999). Mezi glitazary patří mura-, raga-, tesa- a faglitazary. Tyto látky se liší svou afinitou k receptorům, a tím i svým konečným účinkem (Tenenbaum *et al.*, 2005).



**Obr. 3a: Endogenní PPAR ligandy (upraveno dle Escher *et Wahli*, 2000)**



**Obr. 3b: Syntetické ligandy-TZD**

### **3.4 PPARs ve vyvíjejícím se lidském střevě**

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů jsou zapojeny v rozličných biologických mechanismech probíhajících v celé řadě tkání a orgánů, avšak o distribuci a fyziologické funkci těchto receptorů ve vyvíjejících se tkáních není příliš známo. Všechny tři izoformy PPARs jsou exprimované v různých typech buněk embryonálního původu, přičemž jejich exprese je odlišná jak v čase, tak i v prostoru. Dosavadní výsledky poukazují na důležitou roli těchto receptorů v regulaci diferenciaci tkání a vývoje orgánů.

#### **Prenatální vývoj**

Prenatální vývoj je pojem, který označuje vývoj zárodka organismu (embrya) a plodu (fétu) v těle matky až do doby, kdy je schopen samostatného života. Embryonální období zahrnuje fáze od rozdělení zygoty na dvoubuněčné embryo až po konec osmého týdne (Malinský *et* Lichnovský, 2006). V tomto období dochází k výrazným morfologickým změnám, při kterých vzniknou tři zárodečné listy, z nichž se postupně diferencují tkáně a orgány. Embryonální období končí okolo 56. dne, kdy jsou vytvořeny základy všech orgánů, jimiž je člověk v dospělosti vybaven. Počátkem devátého týdne začíná období fetální, ve kterém pokračují změny započaté v embryonálním vývoji procesem histogeneze. Tyto změny se projevují především morfologickým a funkčním dozríváním, maturací či diferenciací tkání a orgánů. Ve fetálním období se orgány chovají často odlišně než u narozených jedinců, protože se plod nachází v prostředí plodové vody a výměna dýchacích plynů a látek se děje prostřednictvím placenty.

#### **Embryonální vývoj střeva**

Všechny tkáně a orgány v lidském těle vznikají ze tří základních zárodečných listů – ektodermu, entodermu a mezodermu. Z entodermu vzniká střevní epitel a žlázy, zatímco vazivo, svalovina či peritoneum střeva vznikají ze splanchnopleury (Sadler, 2004). Diferenciaci střeva a jeho derivátů závisí na vzájemných interakcích mezi entodermem a mezenchymem (Sadler, 2004). Epitelo-mezenchymová interakce je zahájena prostřednictvím exprese proteinu Sonic Hedgehog (SHH) ve střevní trubici, která následně vede k expresi HOX genů (homeobox geny). Široké spektrum HOX genů určuje identitu jednotlivých oddílů střeva a jejich derivátů.

Ve 4. týdnu se vytváří primitivní střevo a část žloutkového váčku je vtahována do těla zárodku. Ve 4. týdnu rovněž dochází k determinaci, ve který oddíl se konkrétní část střevní trubice vyvine. Na primitivním střevě se dají velmi brzo rozpoznat tři úseky, a to přední, střední a zadní střevo. Přední střevo tvoří základ jícnu, žaludku a dvanáctníku až k vyústění žlučovodu. Ze středního střeva vzniká část dvanáctníku, pupeční klička, část příčného tračnicku a appendix. Mezi 6. a 7. týdnem IUD dochází k vysunutí střevní kličky mimo břišní dutinu (tzv. fyziologická pupeční hernie). V průběhu 8. a 12. týdne dochází k opětovnému návratu (repozici), přičemž klička rotuje o 270° a vytváří tak tvar písmene U. Ze zadního střeva se zakládá druhá část příčného tračnicku, tračník sestupný, esovitý úsek análního kanálu a rektum. Anální kanál je v prvních fázích přerušen kloakální membránou, ta se však na konci 8. týdne rozpadá (Sadler, 2004).

Od 5. týdne vývoje dochází v epitelu a v přiléhajícím mezenchymu střevních kliček ke změnám, které vedou k tvorbě specifických útvarů tenkého (prenatálně i tlustého) střeva – střevních klků (Sadler, 2004). Klky vytvářejí víceřadý cylindrický (u báze klků) a jednoduchý cylindrický epitel (v horní části). Ve 13. týdnu se začíná vyvíjet slizniční svalovina, která ve 20. týdnu zformuje funkční sliznici.

### **Expresie PPAR ve vyvíjejícím se střevě**

První experimenty prováděné za účelem zjistit expresi PPARs v embryonálních tkáních byly prováděny u hlodavců, přesněji na myších a krysách (Braissant *et al.*, 1996; Braissant *et Wahli*, 1998). Experimenty prováděné u těchto druhů poukazují na stejné výsledky. K expresi PPAR- $\alpha$  a PPAR- $\gamma$  během zárodečného vývoje dochází v pozdějších stádiích než k expresi PPAR- $\beta/\delta$ . PPAR- $\alpha$  byl přítomen v játrech, v ledvinách, ve střevě, v srdci, ve svalech i ve slinivce. PPAR- $\gamma$  byl přítomen výhradně v hnědé tukové tkáni a v centrální nervové soustavě a poslední z receptorů PPAR- $\beta/\delta$  byl exprimován ve velké míře ve všech zkoumaných orgánech.

V dalších letech se výzkum zaměřil na expresi PPARs ve vyvíjejícím se lidských tkáních. Huin *et al.* (2000) studovali distribuci všech tří izotypů PPARs v průběhu vývoje lidského trávicího traktu pomocí imunohistochemické detekce se specifickými polyklonálními protilátkami. Pro experiment si vybrali vzorky žaludku, jícnu a střeva ze dvaceti tří lidských plodů ve věku 7 až 22 týdnů. V tlustém střevě došlo k rozdílné distribuci všech tří izotypů. Izotypy PPAR- $\alpha$  a PPAR- $\beta/\delta$  byly

v časných stádiích lokalizovány v jádře i v cytoplazmě buněk, v pozdějších stádiích byly lokalizovány pouze v jádře. Mírná exprese PPAR- $\alpha$  ve střevě byla detekována v 8. týdnu v epitelových buňkách, ve 14. týdnu byla detekována slabá exprese v klcích střeva a ve 20. týdnu byla exprese již velmi slabá, přičemž pozitivní buňky byly velmi nerovnoměrně rozptýleny. Exprese PPAR- $\beta/\delta$  byla dobře pozorovatelná v různých vrstvách střeva v 8. i 20. týdnu vývoje, avšak ve 14. týdnu byly tyto receptory exprimované ve velmi malé míře. Pro detekci PPAR- $\gamma$  bylo použito více protilátek (pro PPAR- $\gamma$ , PPAR- $\gamma_1/\gamma_2$  a PPAR- $\gamma_2$ ), které poskytly stejné výsledky v distribuci v průběhu vývoje. K výrazné expresi PPAR- $\gamma$  ve střevě došlo v 8. i ve 14. týdnu ve většině jader epitelových a mezenchymových buněk, ve 20. týdnu vývoje byla exprese vyšší, a to především v buňkách tvořících lumen střeva. Exprese PPAR- $\gamma$  i v ostatních orgánech (s výjimkou žaludku) byla ze všech tří izotypů nejvyšší, a tak se předpokládá jeho prominentní role ve vývoji trávicího traktu včetně tenkého a tlustého střeva. Rozdílná exprese tří izotypů PPARs v jednotlivých strukturách a stádiích vývoje střeva tak poukazuje i na jejich rozdílné funkce ve střevě.

Skupina vědců kolem Barbary D. Abbott (Abbott *et al.*, 2010) se zaměřila na sledování exprese PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  a PPAR- $\gamma$  mRNA a proteinů v lidských tkáních pomocí q-PCR a western blottingu. V tomto experimentu byly použity různé tkáně lidských embryí/plodů (žaludek, játra, ledviny, střevo atd.) ve věku 54 až 125 dní. Proteiny a mRNA pro všechny tři izotypy byly detekovány ve všech zkoumaných tkáních. Exprese PPAR- $\alpha$  a PPAR- $\gamma$  mRNA v lidském střevě se neměnila se zvyšujícím se věkem plodů, zatímco exprese PPAR- $\beta/\delta$  měla klesající tendenci (ke snížené expresi došlo u třiceti dvou plodů ve věku 54 až 120 dní). Naproti tomu exprese proteinu PPAR- $\alpha$  se s rostoucím věkem zvyšovala, zatímco exprese proteinů PPAR- $\beta/\delta$  a PPAR- $\gamma$  zůstala u většiny plodů nezměněna. Hladina exprese PPAR mRNA u plodů a mRNA tenkého či tlustého střeva dospělého jedince nevykazovala signifikantní rozdíly.

### **3.5 PPARs v dospělém střevě**

Do dnešní doby bylo prokázáno, že PPAR- $\gamma$  má klíčovou roli v procesu adipogeneze, stejně tak se podílí na regulaci metabolismu lipidů ve zralých adipocytech. Tento fakt souvisí s objevem vysoce afinitních ligandů PPAR- $\gamma$ , tzv. thiazolidindionů, které se využívají především jako léky pro léčbu cukrovky (Lehmann

*et al.*, 1995). Izoforma PPAR- $\gamma$  je ve vysoké míře exprimována v trávicím traktu, avšak funkce těchto receptorů v tenkém a tlustém střevě není dosud známa. Lefebvre *et al.* (1999) zjišťovali hladinu exprese PPAR- $\gamma$  mRNA, a to v lidských epitelových buňkách tenkého a tlustého střeva. Exprese PPAR- $\gamma$  mRNA byla detekována v tenkém i tlustém střevě, přičemž hladina exprese v tenkém střevě byla podstatně nižší než ve střevě tlustém. Nejvyšší hladina exprese PPAR- $\gamma$  byla detekována v epitelových buňkách proximálního tlustého střeva, zatímco ve střední a koncové části tlustého střeva byla hladina exprese nižší (Lefebvre *et al.*, 1999).

Su *et al.* (2007) se zaměřili na imunohistochemickou detekci PPAR- $\gamma$  v epitelových buňkách izolovaných z myšího proximálního a distálního střeva. V tomto případě byl PPAR- $\gamma$  detekován rovněž napříč celým tlustým střevem, s velmi výrazným barvením proximální části. V této části byla výrazná pozitivní jádra i cytoplazma všech vysoce diferencovaných buněk nacházejících se ve střevních kryptách. Oproti tomu barvení v distální části tlustého střeva poskytlo slabý signál u epitelových buněk (na stejné úrovni diference) jen v bazální vrstvě střevních krypt.

### **PPARs a kolorektální karcinom**

Kolorektální karcinom je civilizační onemocnění, které je nejvíce rozšířené především ve vyspělých zemích. Až 95% kolorektálních karcinomů vzniká z adenomových polypů v průběhu dlouhého období 10 až 15 let. Současné statistiky (dostupné k roku 2008) uvádějí v České Republice incidenci 79 případů/100 000 obyvatel a mortalitu 41 případů/100 000 obyvatel. Tato data se v průběhu několika let prakticky nemění a Česká republika tak zaujímá přední místa mezi Evropskými státy (Urban *et al.*, 2008; Zavoral *et al.*, 2011).

Receptory PPARs jsou hojně exprimované v celé řadě nádorů a na základě dosavadních studií se nabízí možnost využívat je jako potenciální cíle při léčbě nádorových onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu. Do současnosti bylo publikováno několik prací dokládajících zvýšenou expresi PPARs, konkrétně PPAR- $\gamma$ , v nádorových buňkách střeva, přičemž role těchto receptorů je stále kontroverzní (DuBois *et al.* 1998; Brockman *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2002 a Shen *et al.*, 2007). Sarraf *et al.* v roce 1999 jako první demonstrovali, že rakovina tlustého střeva souvisí se somatickými mutacemi vedoucími ke ztrátě funkce tohoto receptoru (Sarraf *et al.*, 1999).



Mnoho autorů provádějících studie *in vitro* prokázalo antiproliferační účinek některých specifických ligandů PPAR- $\gamma$  (jako je ciglitazon či rosiglitazon), kdy aktivací PPAR- $\gamma$  prostřednictvím těchto ligandů dochází k inhibici proliferace, k zastavení buněčného cyklu nebo k indukci apoptózy u střevních nádorových linií (Brockman *et al.*, 1998; Sarraf *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2002 a Shen *et al.*, 2007). Agonisté PPAR- $\gamma$  modulují expresi rozličných regulátorů buněčného cyklu a proteinů účastnících se signálních drah vedoucích k apoptóze. Příkladem může být regulace exprese cyklinu D1, inhibitorů cyklin-dependentních kináz p21 a p27, nádorového supresoru PTEN, apoptických genů BAX a BCL-2 či inhibice aktivity PI3 kinázové dráhy (Peters *et al.*, 2012).

### **PPARs a léková rezistence**

PPARs se jakožto transkripční faktory podílí na regulaci celé řady důležitých genů, včetně genů kódujících lékové transportéry (ABC transportéry), jejichž zvýšená exprese vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence. Mnohočetná léková rezistence (Multi-Drug Resistance, MDR) je buněčný mechanismus, pomocí něhož je nádorová buňka schopna odolávat cytotoxickému účinku skupině strukturně a funkčně nesourodých látek současně (Dean *et al.*, 2001). Léková rezistence tak představuje jednu z největších překážek v léčbě nádorů prostřednictvím chemoterapie. Na lékové rezistenci vůči protinádorovým léčivům se podílí celá řada faktorů, které zahrnují aktivaci detoxifikačních enzymů, zvýšený odtok („eflux“) léčiv z buňky prostřednictvím membránových transportérů, aktivaci DNA reparačních mechanismů či změny v buněčném cyklu a zablokování apoptózy.

### **ABC transportéry**

Jedním z mechanismů, jak může buňka odolávat cytotoxickému účinku léčiva, je zvýšená exprese proteinů asociovaných s MDR. Prvním objeveným a klinicky nejvýznamnějším je membránový glykoprotein, nazývaný P-glykoprotein, který je kódován MDR1 genem (Riordan *et al.*, 1985). Tento glykoprotein je ATP-dependentní transmembránový protein, který je schopen exportovat toxické látky z buňky. P-glykoprotein spolu s ostatními transmembránovými proteiny, označovanými také jako MDR pumpy, patří do skupiny ABC transportních proteinů, která zahrnuje okolo padesáti proteinů. ABC transportéry mají širokou substrátovou specifitu a ve své

strukturu obsahují ATP-vazebnou doménu (ATP-Binding Casette, ABC) - odtud ABC transportéry.

Existuje 48 lidských genů kódujících ABC transportéry, které dělíme do sedmi skupin označovaných ABCA-G. Přímá souvislost s lékovou rezistencí byla nalezena u tří z těchto ABC transportérů, a to u ABCB1/Pgp/MDR1, ABCC1/MRP1 (Multi-Drug Resistance Protein) a ABCG2/MXR/BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Dean *et al.*, 2001).

### **Regulace ABC transportérů prostřednictvím PPARs**

Do dnešní doby bylo provedeno několik experimentů, které ukazují na to, že ABC transportéry mohou být aktivovány či deaktivovány i prostřednictvím PPARs. Szatmari *et al.* (2006) demonstrovali, že agonisté PPAR- $\gamma$  (rosiglitazon, troglitazon a T0901317) transkripčně indukují expresi ABCG2/BCRP v lidských dendritických a myeloidních buňkách. Pomocí experimentu identifikovali a charakterizovali konzervovanou oblast o velikosti 150 párů bází obsahující tři funkční responzivní elementy pro PPAR (PPRE), které jsou uloženy v protisměru od lidského ABCG2 genu a specificky vážou heterodimer PPAR- $\gamma$ /RXR (Szatmari *et al.*, 2006).

Ogata *et al.* se v roce 2009 zaměřili na ovlivnění genové exprese ABCA1. Pro ovlivnění si vybrali několik specifických PPAR agonistů (fenofibrát, bezafibrát, pioglitazon atd.), přičemž ke zvýšení hladiny exprese ABCA1 mRNA došlo po použití všech vybraných agonistů (Ogata *et al.*, 2009). Steenpaal *et al.* (2010) použili pro svůj experiment buňky lidské střešní a jaterní nádorové linie, aby zjistili, zda agonisté PPAR- $\alpha$  (Wy-14643 a GW-7647) ovlivňují expresi transportéru ABCC1/MRP1. Změněná hladina exprese tohoto transportéru nebyla prokázána a na regulaci MRP1 se tak agonisté PPAR- $\alpha$  zřejmě nepodílejí (Steenpaal *et al.*, 2010).

## 4 Experimentální část

### 4.1 Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$ v lidském embryonálním střevě

#### 4.1.1 Biologický materiál

Pro imunohistochemickou detekci PPAR- $\gamma$  byly vybrány vzorky lidského embryonálního střeva (fixované ve formolu nebo methacarnu a zalité do parafínu) v různých stádiích nitroděložního vývoje z archivu Ústavu histologie a embryologie LF UP v Olomouci. Označení vybraných parafinových bloků, přibližné stáří jednotlivých vzorků a použité fixativum je uvedeno v tabulce (Tab. II).

#### 4.1.2 Přístrojové vybavení

Mikrotom Ergostar HM 200 (Mikrom, Německo), mikrovlnný histoprocessor Histos Pro (Milestone, USA), orbitální třepačka OS-10 (BioSan, Lotyšsko), analytické váhy Alj220-4 (Kern, Německo), vortex PV-1 (P-Lab, ČR), laminární box CLF (Schoeller Instruments, ČR), vlhká komůrka Magnetic Immuno Staining Tray (CellPath, UK), mikropipety (Eppendorf, Německo), mikroskopická skla (Menzel-Gläser, Německo), mikroskop OLYMPUS BX40 (Olympus, Japonsko) + CCD kamera OLYMPUS DP71 (Olympus, Japonsko).

#### 4.1.3 Chemikálie

30% peroxid vodíku (Penta, ČR), 96% ethanol (Penta, ČR), xylén (Penta, ČR), aceton (Penta, ČR), 3,3' diaminobenzidin (DAB) (Liquid DAB+ substrate chromogen substrate, Dako, Dánsko), Antibody Diluent (Dako, Dánsko), parafín (Penta, ČR), Entellan<sup>®</sup> (Merck, USA), TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan (P-LAB, ČR), EDTA (P-LAB, ČR), Tween 20 (Dako, Dánsko), koncentrovaná HCl (P-LAB, ČR), destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O)

**kamencový hematoxylin:** 0,4g hematoxylin monohydrát (Merck, USA), 20 g síran hlinito-draselný, 0,08 g jodičnan sodný, 0,4 g kyselina vinná, 400 ml dH<sub>2</sub>O

#### 4.1.4 Pufry

**1x TRIS-EDTA pufr pH 8,6:** 1,21 g TRIS; 0,37 g EDTA; 500  $\mu$ l Tween 20; doplnit dH<sub>2</sub>O do 1 l; úprava pH pomocí konc. HCl na 8,6

**0,5 M TRIS-HCl pufr pH 7,6:** 61 g TRIS do 1 l dH<sub>2</sub>O; úprava pH pomocí konc. HCl na 7,6

#### 4.1.5 Protilátky

K detekci antigenu byla použita neznačená primární protilátka (PPAR- $\gamma$ , klon E-8, myší monoklonální IgG<sub>1</sub>, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) a polymer konjugovaný s peroxidázou, který nese protilátky proti králičím a myším imunoglobulinům (Dako REAL<sup>TM</sup> EnVision<sup>TM</sup> HRP Rabbit/Mouse, Dako, Dánsko)

#### 4.1.6 Pracovní postup

Bloky se vzorky střeva byly krájeny na mikrotomu na řezy o tloušťce 3  $\mu$ m. Řezy byly nanесeny na silanizovaná mikroskopická skla a inkubovány 1 den při 58 °C, aby dobře přilnuly. Skla s řezy byla postupně promyta ve dvou lázních xylenu po 5 minutách, v 100% a v 96% ethanolu (v každém 5 min), aby došlo k odparafinování a hydrataci řezů. Následně byly promyty v tekoucí vodě (5 min) a v destilované vodě (dH<sub>2</sub>O) po dobu 30 vteřin. Pro zpřístupnění epitopů pro primární protilátku (tzv. epitope retrieval) byla skla s tkáněmi převrstvena 250 ml TRIS-EDTA pufru a umístěna do speciálního mikrovlnného histoprocesoru k odmaskování antigenů. Následovalo ochlazení studenou vodou a skla byla opět promyta v dH<sub>2</sub>O. K inaktivaci endogenní peroxidázy byla skla inkubována v 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po třiceti minutách inkubace byla skla promyta nejprve v dH<sub>2</sub>O, a poté byla promyta dvakrát po 5 minutách v TRIS-HCl pufru (0,05 M, pH 7,6).

Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:100 a nanесena na skla s řezy. Skla byla umístěna do vlhké komůrky a inkubace s primární protilátkou probíhala 60 minut při RT. Po této době byla skla promyta v TRIS-HCl pufru (2x5 min). Na skla byl nanесen neředěný polymer konjugovaný s peroxidázou a inkubace ve vlhké komůrce probíhala 60 minut při RT. Po inkubaci byla skla opět promyta v TRIS-HCl pufru (2x5min).

K vizualizaci byl jako chromogen použit 3,3' diaminobenzidin, který se nechal

působit po dobu cca 10 minut. Skla byla poté vyjmuta z vlhčené komory, promyta v tekoucí vodě (5 min) a v dH<sub>2</sub>O, preparáty byly dobarveny pomocí kamencového hematoxylinu. Pro odvodnění preparátů byla skla promyta v 100% ethanolu a poté v acetonu (po dobu 3 min). K projasnění byla skla promyta ve dvou lázních xylenu (2x5 min). Na závěr byly tkáně montovány komerčním montovacím médiem Entellan<sup>®</sup> a překryty krycím sklíčkem. Jako negativní kontrola imunohistochemické detekce byl použit vzorek, na který nebyla nanesena primární protilátka, nýbrž pufr. Pro kontrolu správnosti provedeného barvení (pozitivní kontrola) byl použit řez placenty. Nabarvené preparáty byly pozorovány pod mikroskopem a zdokumentovány CCD kamerou Olympus DP71.

K hodnocení exprese PPAR- $\gamma$  ve vzorcích lidského embryonálního střeva byla použita semikvantitativní metoda, kdy symbol + odpovídal slabé pozitivitě, tzn. nízké expresi PPAR- $\gamma$ , symbol ++ a +++ odpovídal středně vysoké, resp. vysoké expresi PPAR- $\gamma$ . Za negativní byly označeny vzorky střeva bez zřetelné (detekovatelné) exprese PPAR- $\gamma$ .

**Tab. II: Označení parafinových bloků se vzorky lidského embryonálního střeva, přibližné stáří jednotlivých vzorků a použité fixativum**

Stáří vzorků [týden]	Označení bloků	fixace	Stáří vzorků [týden]	Označení bloků	fixace
5.	1324	formol	12.	2112/4A	methacarn
6.	1372	formol		2170/4	methacarn
7.	1077/1	formol		2172/21	methacarn
	1642/A1	formol		2196/5	methacarn
	1080/1	formol	13.	2151/42	methacarn
8.	2092/6	formol	14.	2086/2	formol
	1117	formol		2171/57	methacarn
	1274/2	formol	16.	1609/10	formol
2113/8B	methacarn	1609/29		formol	
9.	1159/2	formol		2043/2	formol
	2079/6	formol	17.	2047/3	formol
	2180/5	methacarn	18.	2128/2	methacarn
10.	2091/1	formol		2155/27	methacarn
	2158/1	methacarn		2188/3	formol
11.	2156/6	methacarn	19.	2095/3	formol
	2167/5	methacarn	20.	2187/3	formol

## **4.2 Experimentální ovlivnění exprese PPAR- $\gamma$ , ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 v nádorové buněčné linii HT-29**

### **4.2.1 Biologický materiál**

Pro experiment byla použita lidská buněčná linie HT-29, odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva. Tato linie byla zakoupena z American Type Culture Collection (ATCC, USA).

### **4.2.2 Podmínky kultivace**

Buňky byly kultivovány v RPMI-1640 Médiu (PAA, Rakousko) s 15% fetálním bovinním sérem, L-glutaminem o výsledné koncentraci 1 mmol/l, pyruvát sodným o výsledné koncentraci 1 mmol/l a s 0,01% roztokem antibiotik (penicilin a streptomycin) (vše Sigma-Aldrich, USA). Kultivace buněk probíhala v termostatu při 37°C a v 5% CO<sub>2</sub>. Pasáž buněk byla prováděna každé 3 dny.

### **4.2.3 Přístrojové vybavení**

Termostat Series II water jacket CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo Scientific, USA), sterilní box Mars safety class II (Scanlaf, Dánsko), centrifuga IEC CL31R Multispeed centrifuge (Thermo Scientific, USA), vodní lázeň (GFL, Německo), invertovaný mikroskop Primo Vert (Zeiss, Německo), Elisa reader Power wave XS (Bio Tek Instruments, Inc., USA), aparatura pro vertikální elektroforézu (Scie-Plas, UK), zdroj napětí EV 261 (Consort, Belgie), termoblok AccuBlock™- digital dry bath (LabNet, USA), transferová aparatura V10 SDB Semi-dry (Scie-Plas, UK), minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Německo), nitrocelulózová membrána Amersham Hybond™ ECL™, fotografický film (obojí GE Healthcare, UK)

### **4.2.4 Chemikálie**

5-{4-[(1-methylcyclohexyl)methoxy]benzyl}-1,3-thiazolidine-2,4-dione (Ciglitazon, Cayman Chemical Company, USA), [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] (WST-1, Roche, Švýcarsko), trypsin (PAA, Rakousko), pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA), TRIS hydroxymethylaminomethan (P-LAB, ČR), Tween 20 (Dako, Dánsko), Inhibitory proteáz Complete (Roche,

Švýcarsko), barvivo Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich, USA), SDS, N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED), glycin, amonium persulfát, 30% bis-akrylamid (vše Serva electrophoresis GmbH, Německo), vzorkovací roztok Tris-Glycine/SDS sample buffer (Sigma-Aldrich, USA), molekulový marker Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare, UK), 0,2% roztok Ponceau S solution for electrophoresis (Serva electrophoresis), chemiluminiscenční kit *SuperSignal* West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific, USA), vývojka, přerušovač, ustalovač (vše Agfa-Gevaert N.V, Belgie), methanol, absolutní ethanol, glycerol, kyselina o-fosforečná (vše Penta, ČR), dH<sub>2</sub>O

#### **4.2.5 Pufry a roztoky**

**10x PBS pufr pH 7,6 (10x):** 80 g NaCl; 2 g KCl; 32,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 g KHPO<sub>4</sub>; doplnit do 1 l dH<sub>2</sub>O

**Chro-IP lyzační pufr:** 20 ml Hepes-KOH 0,5 mol/l, pH 8,0; 400 µl 0,5 mol/l EDTA; 1 ml 0,1 mol/l EGTA; 28 ml NaCl; 20 ml 100% glycerolu; 1 ml NP-40; 500 µl Triton-X 100; doplnit do 200 ml dH<sub>2</sub>O

**1,0M TRIS-HCl pufr pH 6,8:** 121,1 g TRIS rozpustit v 1 l dH<sub>2</sub>O, upravit pH pomocí konc. HCl na 6,8

**1,5M TRIS-HCl pufr pH 8,8:** 181,65 g TRIS rozpustit v 1 l dH<sub>2</sub>O, upravit pH pomocí konc. HCl na 8,8

**5x ELFO pufr:** 15,1 g TRIS; 5,09 g SDS; 72 g glycinu; doplnit do 1 l dH<sub>2</sub>O

**20x transferový pufr:** 2,9 g glycinu; 5,8 g TRIS; 0,37 g SDS; 200 ml methanolu; doplnit do 1 l dH<sub>2</sub>O

**mléčný pufr (5% mléko v 1x PBS):** 50 g sušené odtučněné mléko, doplnit do 1 l 1x PBS pufrem

**blokovací pufr (5% mléko v 1x PBS + Tween 20):** 50 g sušené odtučněné mléko, 1 ml Tween20, doplnit do 1 l 1x PBS pufrem

**Bradfordové roztok:** 0,02 g Coomassie Brilliant Blue G250; 10 ml ethanolu; 20 ml kyseliny orthofosforečné; doplnit do 40 ml dH<sub>2</sub>O

#### **4.2.6 Test životaschopnosti buněk**

Pro posouzení účinku ciglitazonu na lidskou nádorovou buněčnou linii HT-29 a stanovení jeho inhibiční koncentrace (IC[50] a IC[90]) byla použita modifikovaná metoda kolorimetrického MTT testu s použitím tetrazoliové soli [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] (WST-1). MTT test slouží k měření cytotoxicity látek a podstatou testu je redukce tetrazoliové soli na barevný, ve vodě nerozpustný formazan. Přeměna probíhá pouze u metabolicky aktivních (živých) buněk za přítomnosti mitochondriálních enzymů, přičemž množství vznikajícího formazanu je přímo úměrné počtu buněk, které přežily. Intenzita zbarvení formazanu je měřena spektrofotometricky.

Buňky o koncentraci  $2 \times 10^5$  na jamku v 90  $\mu$ l média byly vysety na 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Po 24 hod od výsevu byl k buňkám přidán ciglitazon (o výsledné koncentraci ciglitazonu v roztoku: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 35  $\mu$ M, 40  $\mu$ M a 45  $\mu$ M) Do jamek sloužících jako kontrola (blank) bylo pipetováno pouze 10  $\mu$ l čistého kultivačního média. Inkubace probíhala 48 hod při 37°C. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu$ l WST-1 (dle pokynů výrobce) a následovala inkubace 1 hodinu. Absorbance byla měřena na Elisa readeru při vlnové délce 405 nm. Test životaschopnosti buněk byl proveden ve třech opakováních. Na základě získaných průměrných hodnot absorbancí byly stanoveny hodnoty IC[90] a IC[50] (koncentrace ciglitazonu, při které došlo k 10% a k 50% inhibici viability buněk). Ve všech třech opakováních byla rovněž zavedena pozitivní kontrola – tzn. buňky nebyly ovlivněny ciglitazonem.

#### **Práce s buněčnými lyzáty a příprava proteinových frakcí pro western blot analýzu**

Buňky byly vysety na Petriho misky (o průměru 3 cm) v koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk na 2 ml kultivačního média. Následující den byl k buňkám přidán ciglitazon



o koncentraci IC[90] a IC[50] ve 2 ml média. Do misek s buňkami sloužícími jako kontrola bylo pipetováno pouze 2 ml kultivačního média. Inkubace buněk probíhala 24, 48 a 72 hodin. Po inkubaci byly buňky 2x promyty 1x PBS pufrem a byl na ně nanesen Chro-IP lyzační pufr s inhibitory proteáz a fosfatáz (Complete, Roche). Buňky byly sesbírány do zkumavek a inkubace probíhala 1 hod na ledu. Vzorky byly centrifugovány při 4°C a 15 000 RPM po dobu 30 minut. Supernatant byl opatrně odpipetován do čistých zkumavek a takto připravené proteinové frakce byly uskladněny v – 80°C. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou Bradfordové. Absorbance byla měřena na Elisa readeru při vlnové délce 595 nm.

#### **4.2.7 SDS-PAGE a Western blot analýza**

Proteiny byly elektroforeticky separovány v 10% nebo 8% separačním a v 5% zaostřovacím gelu (Tab. IIIa, b). Jednotlivé vzorky byly smíchány se vzorkovacím roztokem v poměru 4:1. Do krajních jamek byly nejprve nanесeny 2 µl hmotnostního standardu (Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker; GE Healthcare, UK). Vzorky byly ředěny tak, aby v pipetovaném objemu bylo vždy 30 µg proteinu. Separace probíhala při napětí 111V po dobu 2,5 hodiny. Po separaci byl gel promýván 10 minut v transferovém pufru a proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí semi-dry blottingu. Blotting probíhal při napětí 11V 70, popř. 90 minut. Membrány byly 5 minut promývány v roztoku Ponceau S. Z membrány byly vyřezány úseky (stripy), které odpovídaly molekulovým hmotnostem detekovaných proteinů.

Membránové stripy byly blokovány 2,5 hodiny v blokovacím pufru. Primární protilátky byly ředěny mléčným pufrem a nanесeny na stripy. Inkubace s primární protilátkou probíhala ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Vybrané primární protilátky a jejich ředění jsou uvedeny v Tab. IVa. Následující den byly stripy promývány 1 hod v PBS+Tween 20 (0,1% Tween 20 v 1x PBS). Sekundární protilátka byla ředěna mléčným pufrem (Tab. IVb), nanесena na stripy, a inkubace probíhala 1 hod ve vlhčené komoře při RT. Po inkubaci byly stripy promývány 60 min v PBS+Tween 20, přičemž pufr byl měněn každých 15 minut. K vizualizaci byl použit chemiluminiscenční detekční kit, který se nechal působit 5 min ve tmě. Ve fotokomoře byl ke stripům přiložen fotografický film, který byl následně vyvolán a usušen.

**Tab. IIIa: Složení 10% a 8% separačního gelu (10 ml):**

	10% gel	8% gel
Složka	Objem [ml]	Objem [ml]
dH <sub>2</sub> O	4,0	4,6
30% akrylamid	3,3	2,7
1,5M TRIS (pH 8,8)	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1
10% amonium persulfát	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,006

**Tab. IIIb: Složení 5% zaostřovacího gelu (5 ml):**

Složka	Objem [ml]
dH <sub>2</sub> O	3,4
30% akrylamid	0,83
1,0M TRIS (pH 6,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% amonium persulfát	0,05
TEMED	0,005

**Tab. IVa: Primární protilátky**

Protilátka	Velikost [kDa]	Ředění	Výrobce
PPAR $\gamma$ <sup>1</sup>	54/57	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
MRP1 <sup>1</sup>	190	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
ABCG2 <sup>1</sup>	72	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
$\beta$ -aktin <sup>1</sup>	43	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Legenda: <sup>1</sup> = myší monoklonální

**Tab. IVb: Sekundární protilátka**

<b>Protilátka</b>	<b>Značení</b>	<b>Výrobce</b>
Goat anti-mouse IgG	křenová peroxidáza (HRP)	Santa Cruz Biotechnology, Inc

## 5 Výsledky

### 5.1 Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$ v lidském embryonálním střevě

Výsledky imunohistochemické detekce PPAR- $\gamma$  jsou přehledně shrnuty v tabulce (Tab. V) a v Grafu 1. Z celkového počtu 32 vzorků lidského embryonálního střeva v různých stádiích nitroděložního vývoje byla u 13 vzorků detekována exprese receptorů PPAR- $\gamma$  a tyto vzorky byly označeny za pozitivní. 19 vzorků bylo negativních, tzn. exprese PPAR- $\gamma$  nebyla u těchto vzorků detekována. U všech pozitivních vzorků se receptory PPAR- $\gamma$  nacházely v epitelových buňkách zakládajících se střevních klků. V časných stádiích embryonálního vývoje (7. týden) byly pozitivní receptory pozorovány pouze v cytoplazmě, od 8. do 13. týdne byly receptory exprimovány v jádrech i v cytoplazmě a od 14. týdne byly receptory exprimovány opět pouze v cytoplazmě epitelových buněk.

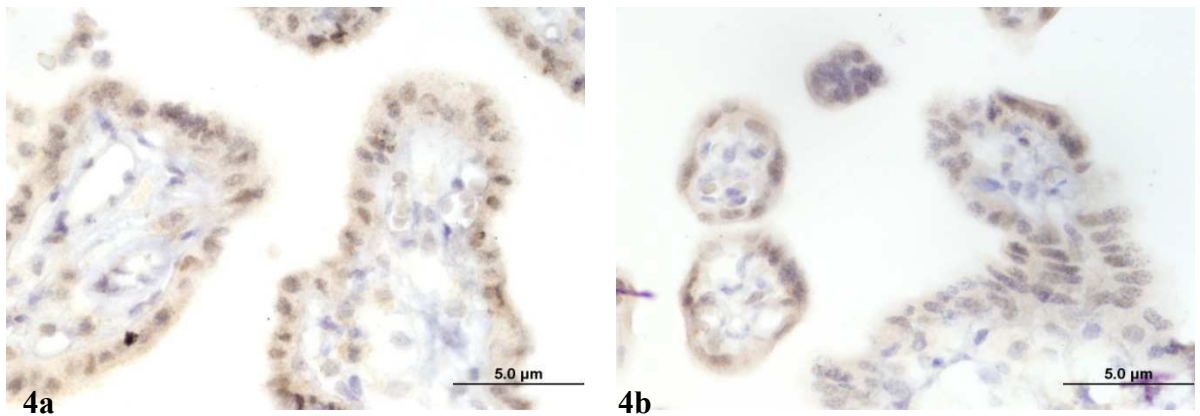
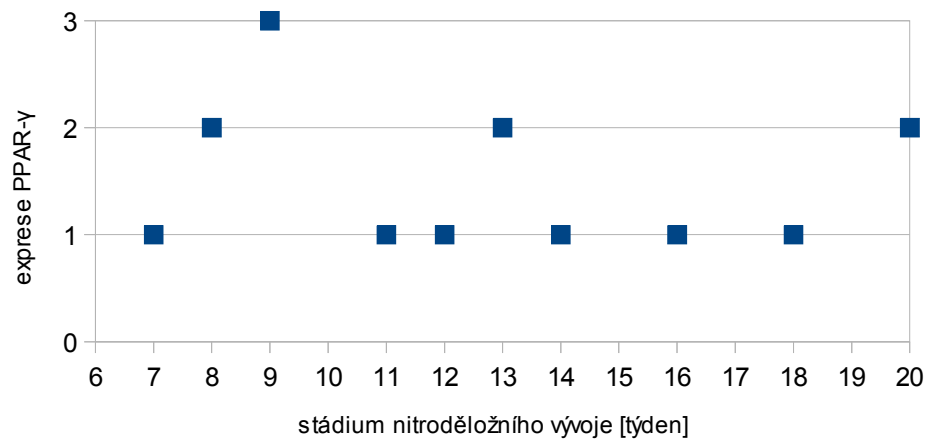
Nízká exprese PPAR- $\gamma$  byla detekována u 8 vzorků vyvíjejícího se lidského střeva. Receptory byly slabě exprimovány v 7., 11., 12., 14., 16. a v 18. týdnu vývoje. Středně vysoká exprese PPAR- $\gamma$  byla pozorována v 8., 13. a 20. týdnu embryonálního vývoje a vysoce exprimované receptory byly detekovány v 9. týdnu embryonálního vývoje. Z vybraných vzorků byly CCD kamerou Olympus DP71 pořízeny ilustrační fotografie při zvětšení 200x, resp. 400x. Vzhledem k nízkému počtu vzorků vykazujících pozitivitu, nebylo provedeno statistické hodnocení.

**Tab. V: Výsledky imunohistochemické detekce PPAR- $\gamma$  v lidském embryonálním střevě v různých stádiích nitroděložního vývoje**

Stáří vzorků [týden]	Označení vzorků	Expres PPAR- $\gamma$	Lokalizace pozitivních PPAR $\gamma$
5.	1324	-	
6.	1372	-	
7.	1077/1	-	
	1642/A1	-	
	1080/1	+	cytoplazma epitelových buněk
	2092/6	-	
8.	1117	-	
	1274/2	++	cytoplazma epitelových buněk
	2113/8B	++	jádra epitelových buněk
9.	1159/2	+++	jádra a cytoplazma epitelových buněk
	2079/6	-	
	2180/5	-	
10.	2091/1	-	
	2158/1	-	
11.	2156/6	-	
	2167/5	+	jádra a cytoplazma epitelových buněk
12.	2112/4A	+	jádra epitelových buněk (fokálně)
	2170/4	-	
	2172/21	-	
	2196/5	-	
13.	2151/42	++	jádra a cytoplazma epitelových buněk
14.	2086/2	+	cytoplazma epitelových buněk
	2171/57	+	cytoplazma epitelových buněk
16.	1609/10	+	cytoplazma epitelových buněk
	1609/29	+	cytoplazma epitelových buněk
	2043/2	-	
17.	2047/3	-	
18.	2128/2	-	
	2155/27	+	cytoplazma epitelových buněk (fokálně)
	2188/3	-	
19.	2095/3	-	
20.	2187/3	++	cytoplazma epitelových buněk

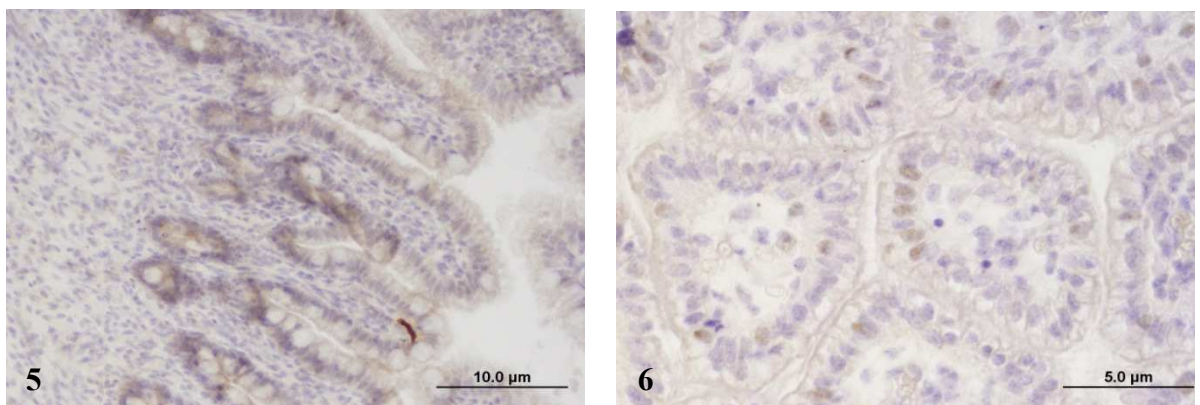
Legenda: + = slabá pozitivita, ++ = střední pozitivita, +++ = silná pozitivita, - = negativita

**Graf 1: Závislost exprese PPAR- $\gamma$  na stádiu nitroděložního vývoje**



**Obr. 4a,b: Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$  v placentě (pozitivní kontrola).**

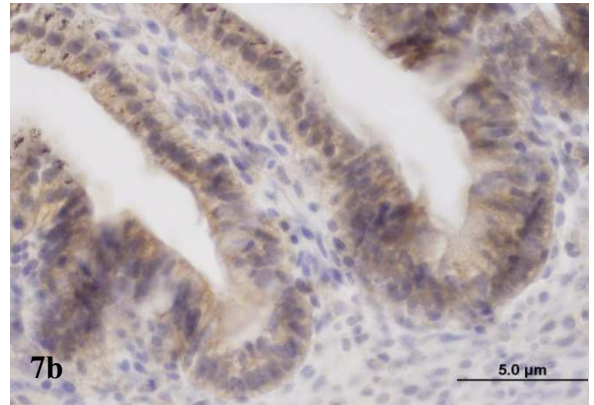
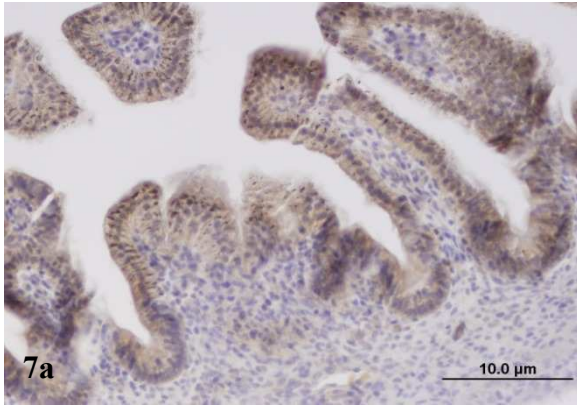
a: zvětšení 200x; b: zvětšení 400x



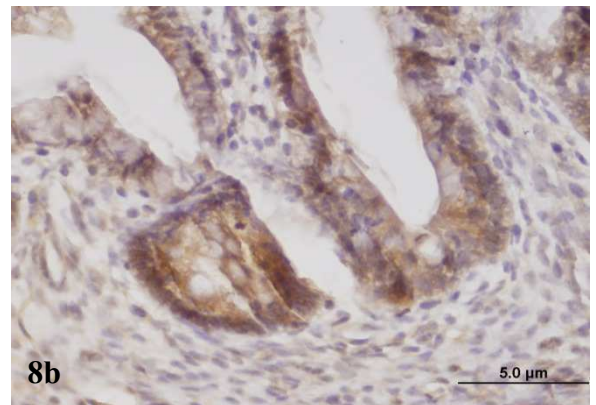
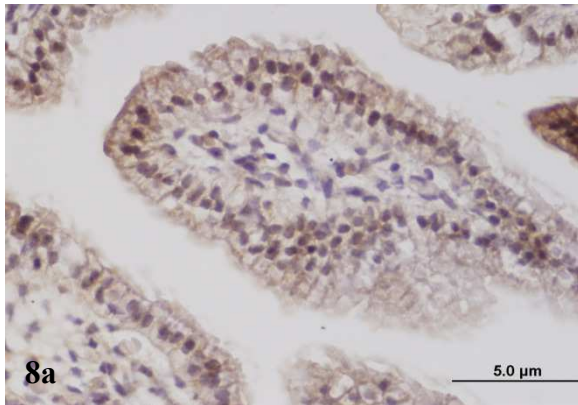
**Obr. 5, 6: Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$  v embryonálním střevě.**

5: 16. týden, vzorek 1609/10, slabě pozitivní cytoplazma, zvětšení 200x;

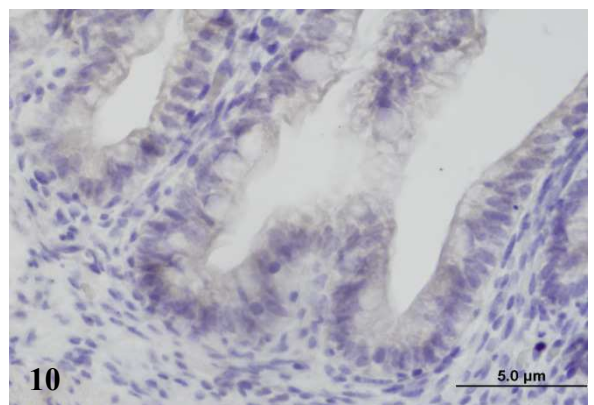
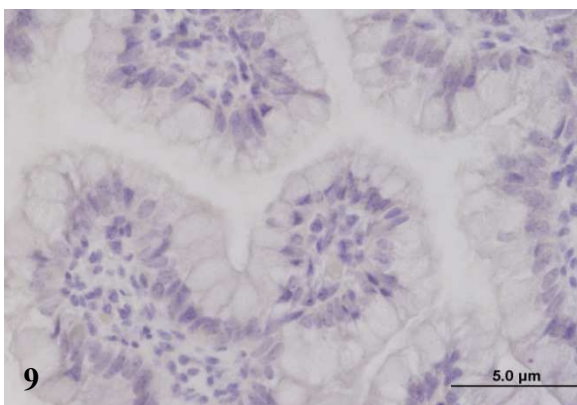
6: 12. týden, vzorek 2112/4A, slabě pozitivní jádra (fokálně), zvětšení 400x



**Obr. 7a,b: Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$  v embryonálním střevě. 8. týden, vzorek 1274/2, středně pozitivní cytoplazma**  
 a: zvětšení 200x; b: zvětšení 400x



**Obr. 8a,b: Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$  v embryonálním střevě. 9. týden, vzorek 1159/2, silně pozitivní cytoplazma**  
 a: zvětšení 200x; b: zvětšení 400x



**Obr. 9, 10: Imunohistochemická detekce PPAR- $\gamma$  v embryonálním střevě.**  
 9: 17. týden, vzorek 2047/3, negativní, zvětšení 400x;  
 10: 9. Týden, vzorek 2079/6, negativní, zvětšení 400x

## 5.2 Experimentální ovlivnění exprese PPAR- $\gamma$ , ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 v buněčné linii HT-29

### 5.2.1 Test životaschopnosti buněk

Test životaschopnosti buněk byl proveden ke stanovení hodnot IC[90] a IC[50] pro nádorovou buněčnou linii HT-29. Z průměrných hodnot naměřené absorbance při vlnové délce 405 nm byl stanoven počet přeživších buněk pro každou koncentraci (viz Tab.VI). Grafy 2a, 2b, 2c ukazují, že k inhibici viability buněk dochází v závislosti na použité koncentraci ciglitazonu. Z rovnice byla vypočtena hodnota IC[90], z této hodnoty byla poté vypočtena i hodnota IC[50]. Průměrná hodnota inhibiční koncentrace IC[90] ciglitazonu na nádorovou buněčnou linii HT-29 je 37,1  $\mu$ M. Průměrná hodnota inhibiční koncentrace ciglitazonu IC[50] na tuto linii je 66,8  $\mu$ M.

**Tab. VIa: Naměřené hodnoty absorbance při použití různých koncentrací ciglitazonu, počet přeživších buněk vyjádřený v %**

Koncentrace ciglitazonu	Absorbance naměřená v jednotlivých jamkách [A <sub>405</sub> ]			Ø absorbance [A <sub>405</sub> ]	Přeživší buňky <sup>1</sup> [%]
K <sup>+</sup>	1,320	1,010	1,303	1,211	100
1 $\mu$ M	1,655	1,496	1,574	1,575	130
5 $\mu$ M	1,531	1,497	1,515	1,514	125
10 $\mu$ M	1,277	1,334	1,134	1,248	103
20 $\mu$ M	0,930	1,258	1,487	1,225	101
30 $\mu$ M	0,959	1,102	1,396	1,152	95

Legenda: K<sup>+</sup> = pozitivní kontrola, <sup>1</sup> = hodnoty vztažené vzhledem ke K<sup>+</sup>, kde K<sup>+</sup> = 100 % přeživších buněk



**Tab. VIb: Naměřené hodnoty absorbance při použití různých koncentrací ciglitazonu, počet přeživších buněk vyjádřený v %**

Koncentrace ciglitazonu	Absorbance naměřená v jednotlivých jamkách [A <sub>405</sub> ]			Ø absorbance [A <sub>405</sub> ]	Přeživší buňky <sup>1</sup> [%]
<b>K<sup>+</sup></b>	1,440	1,894	1,964	1,766	<b>100</b>
<b>25 µM</b>	1,655	1,776	1,686	1,705	<b>97</b>
<b>30 µM</b>	1,664	1,611	1,693	1,656	<b>94</b>
<b>35 µM</b>	1,613	1,448	1,750	1,604	<b>91</b>
<b>40 µM</b>	1,570	1,422	1,714	1,570	<b>89</b>

Legenda: K<sup>+</sup> = pozitivní kontrola, <sup>1</sup> = hodnoty vztažené vzhledem ke K<sup>+</sup>, kde K<sup>+</sup> = 100 % přeživších buněk

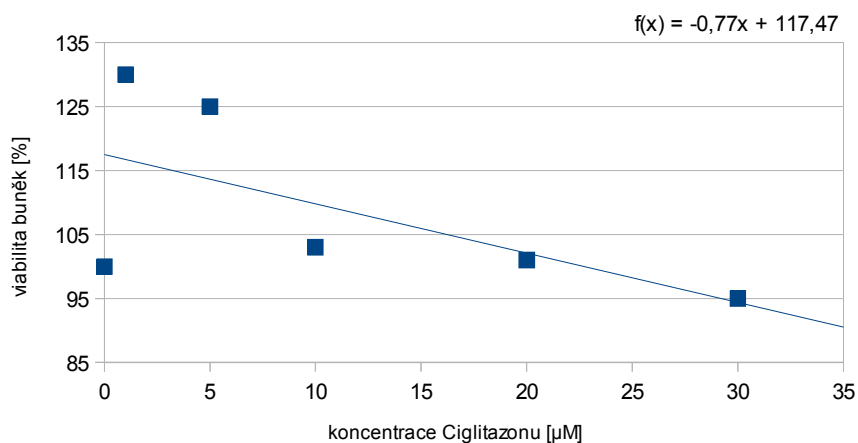
**Tab. VIc: Naměřené hodnoty absorbance při použití různých koncentrací ciglitazonu, počet přeživších buněk vyjádřený v %**

Koncentrace ciglitazonu	Absorbance naměřená v jednotlivých jamkách [A <sub>405</sub> ]		Ø absorbance [A <sub>405</sub> ]	Přeživší buňky <sup>1</sup> [%]
<b>K<sup>+</sup></b>	2,904	3,041	2,972	<b>100</b>
<b>30 µM</b>	2,283	2,147	2,215	<b>75</b>
<b>35 µM</b>	2,789	2,694	2,742	<b>92</b>
<b>40 µM</b>	2,833	2,523	2,678	<b>90</b>
<b>45 µM</b>	2,838	2,878	2,858	<b>96</b>

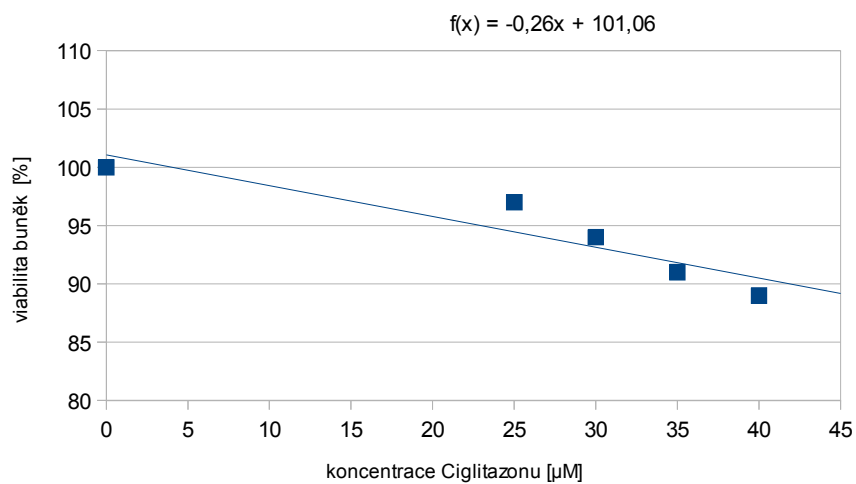
Legenda: K<sup>+</sup> = pozitivní kontrola, <sup>1</sup> = hodnoty vztažené vzhledem ke K<sup>+</sup>, kde K<sup>+</sup> = 100 % přeživších buněk

**Tab. VII: Průměrná inhibiční koncentrace ciglitazonu (IC[90] a IC[50])**

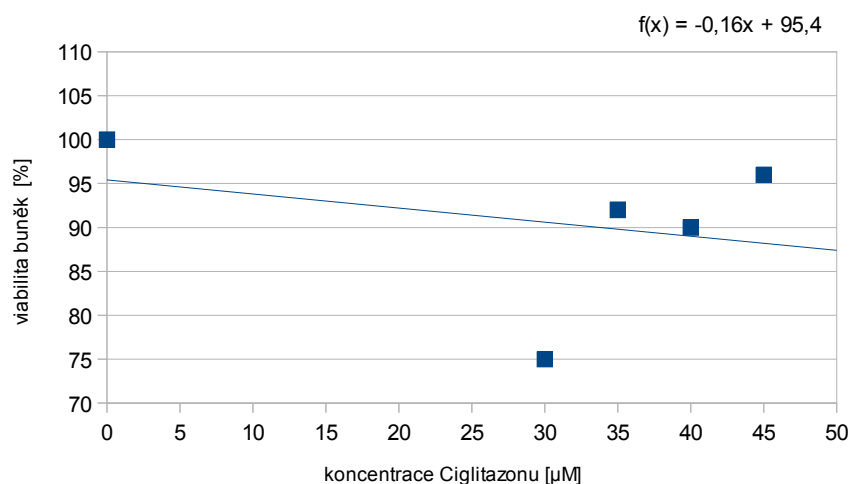
	Koncentrace ciglitazonu [ $\mu\text{M}$ ]
IC[90]	37,1
IC[50]	66,8



**Graf 2a: Závislost viability buněk HT-29 na koncentraci ciglitazonu**



**Graf 2b: Závislost viability buněk HT-29 na koncentraci ciglitazonu**



**Graf 2c: Závislost viability buněk HT-29 na koncentraci ciglitazonu**

### 5.2.2 Příprava buněčných lyzátů a stanovení koncentrace proteinů

Získané inhibiční koncentrace ciglitazonu byly použity pro ovlivnění buněk nádorové buněčné linie HT-29 a pro přípravu buněčných lyzátů. Koncentrace proteinů v těchto lyzátech byly stanoveny metodou Bradfordové. Naměřené hodnoty demonstruje Tab. VIII

**Tab. VIII: Hodnoty naměřených absorbancí a koncentrace proteinů ve vzorcích stanovené metodou Bradfordové, celkové objemy vzorků pro SDS-PAGE**

Vzorek	Absorbance [A <sub>595</sub> ]		Ø absorbance	Koncentrace proteinu [µg/ml]	Objem vzorku [µl]
<b>K<sup>+</sup> 24 hod</b>	0,551	0,524	<b>0,538</b>	1337,50	<b>22,43</b>
<b>K<sup>+</sup> 48 hod</b>	0,664	0,552	<b>0,608</b>	1925,00	<b>15,58</b>
<b>K<sup>+</sup> 72 hod</b>	0,775	0,764	<b>0,770</b>	3270,83	<b>9,17</b>
<b>IC[90] 24 hod</b>	0,547	0,547	<b>0,547</b>	1416,67	<b>21,18</b>
<b>IC[90] 48 hod</b>	0,662	0,649	<b>0,656</b>	2320,83	<b>12,93</b>
<b>IC[90] 72 hod</b>	0,758	0,695	<b>0,727</b>	2912,50	<b>10,30</b>
<b>IC[50] 24 hod</b>	0,583	0,580	<b>0,582</b>	1704,17	<b>17,60</b>
<b>IC[50] 48 hod</b>	0,596	0,574	<b>0,585</b>	1733,33	<b>17,31</b>
<b>IC[50] 72 hod</b>	0,676	0,617	<b>0,647</b>	2245,83	<b>13,36</b>

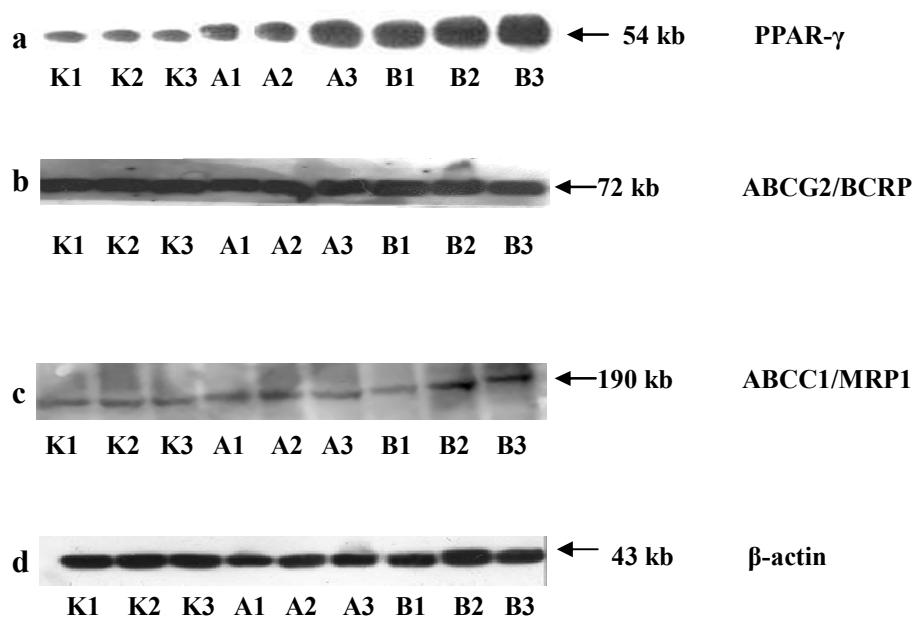
### 5.2.3 Western blot analýza

Pro hodnocení změny hladiny exprese u vybraných proteinů buněk nádorové buněčné linie HT-29 byla provedena western blot analýza. Exprese proteinů PPAR- $\gamma$ , ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 byla detekována pomocí příslušných specifických primárních a sekundárních protilátek (viz Tab. IVa a IVb). Detekce proteinu  $\beta$ -aktin byla provedena pro kontrolu stejného množství proteinů v jednotlivých proteinových frakcích (Obr. 11).

Expese proteinu PPAR- $\gamma$  byla detekována u všech proteinových frakcí, a to jak u kontrolních, tak i u ovlivněných buněk nádorové buněčné linie HT-29 (Obr. 11). Míra exprese tohoto proteinu u kontrolních, tzn. neovlivněných buněk byla po 24, 48 i 72 hodinách inkubace stejná. Při použití inhibiční koncentrace ciglitazonu IC[90] byla pozorována zvýšená exprese PPAR- $\gamma$  po 24, 48 i 72 hodinách od ovlivnění vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám. Nejvyšší hladina exprese PPAR- $\gamma$  byla pozorována po 72 hodinách od ovlivnění ciglitazonem. Při použití inhibiční koncentrace ciglitazonu IC[50] byla rovněž pozorována zvýšená exprese tohoto proteinu, a to u vzorků získaných po 24, 48 i 72 hodinách, přičemž nejvyšší hladina exprese PPAR- $\gamma$  byla pozorována po 72 hodinách od ovlivnění.

Expese proteinu ABCG2/BCRP byla detekována rovněž ve všech vzorcích, tzn. v kontrolních proteinových frakcích i ve frakcích po ovlivnění ciglitazonem (Obr. 11). Hladina exprese proteinu BCRP byla v případě kontrolních buněk stejná ve všech třech vzorcích (po 24, 48 a 72 hodinách inkubace). Po ovlivnění buněk a získání proteinových frakcí při použití inhibičních koncentrací ciglitazonu IC[90] a IC[50] nebyla pozorována změna hladiny exprese proteinu BCRP u žádného ze vzorků. Hladina exprese tohoto proteinu byla neměnná po 24, 48 i 72 hodinách od ovlivnění.

K expresi proteinu ABCC1/MRP1 došlo jak u kontrolních, tak i u ovlivněných buněk HT-29, přičemž změna hladiny exprese tohoto proteinu nebyla pozorována u žádné z proteinových frakcí (Obr. 11). Míra exprese proteinu MRP1 byla stejná po 24, 48 i 72 hodinách od ovlivnění ciglitazonem s použitím obou inhibičních koncentrací IC[90] a IC[50].



**Obr. 11: Expres PPAR- $\gamma$ , ABCG2/BCRP, ABCC1/MRP1 a  $\beta$ -actinu v proteinové frakci kontrolních buněk a buněk ovlivněných ciglitazonem**

Legenda: K1, K2, K3 = kontrolní buňky; A1, A2, A3 = buňky ovlivněné ciglitazonem IC[90] - 24, 48 a 72 hod od ovlivnění; B1, B2, B3 = buňky ovlivněné ciglitazonem IC[50] - 24, 48 a 72 hod od ovlivnění

## 6 Diskuse

Pro detekci receptorů PPAR- $\gamma$  ve vyvíjejícím se lidském střevě byla použita nepřímá dvojstupňová imunohistochemická metoda. Z celkového počtu 32 vzorků lidského embryonálního střeva v různých stádiích nitroděložního vývoje byla u 13 vzorků zaznamenána exprese PPAR- $\gamma$ , zatímco 19 vzorků bylo negativních (pozitivní reakci tedy poskytlo 41 % analyzovaných vzorků). Pozitivní detekce PPAR- $\gamma$  v embryonálním střevě potvrdila dřívější experimenty prováděné Braissant *et al.* (1996), Braissant *et Wahli* (1998), Huin *et al.* (2000) a Abbott *et al.* (2010), při kterých byly tyto receptory detekovány ve stejné tkáni.

Receptory PPAR- $\gamma$  jsou hojně exprimovány v tlustém i tenkém střevě, avšak o jejich distribuci ve vyvíjejícím se střevě nebylo dosud mnoho zjištěno. Primitivní střevo se zakládá ve čtvrtém týdnu embryonálního vývoje. V tomto experimentu byla první pozitivní reakce zaznamenána v 7. týdnu vývoje, kdy byly receptory PPAR- $\gamma$  exprimovány v epitelových buňkách zakládajících se střevních klků (Tab. V, Graf 1). **Skutečnost, že k expresi PPAR- $\gamma$  dochází v tak časných fázích vývoje střeva, poukazuje na důležitou roli těchto receptorů ve vývoji i ve fyziologii střeva.** Následně byly receptory detekovány v 8. až 14. týdnu, v 16., v 18. a ve 20. týdnu vývoje. Huin *et al.* (2000) imunohistochemickou detekcí (s použitím polyklonálních protilátek proti PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  a PPAR- $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2) prováděnou u 23 plodů ve stáří 7 až 22 týdnů rovněž prokázali, že k expresi receptorů PPAR dochází již v 7. týdnu vývoje. Další exprese PPAR- $\gamma$  byla v tomto případě detekována shodně v 8., 12., 14. i ve 20. týdnu IUD.

Receptory PPAR- $\gamma$  se u všech pozitivních vzorků nacházely v epitelových buňkách zakládajících se střevních klků. V 7. týdnu embryonálního vývoje byly pozitivní receptory pozorovány pouze v cytoplazmě, od 8. do 13. týdne byly receptory exprimovány v jádrech i v cytoplazmě a od 14. týdne byly receptory exprimovány opět pouze v cytoplazmě epitelových buněk. Huin *et al.* (2000) ve své práci uvádějí, že k expresi PPAR- $\gamma$  dochází v epitelových i mezenchymových buňkách a jsou lokalizovány ve většině jader těchto buněk.

Intenzita exprese pozitivních receptorů se měnila v závislosti na jednotlivých stádiích nitroděložního vývoje (viz Graf 1). Slabě exprimované receptory byly detekovány v 7., 11., 12., 14., 16., 18. a ve 20. týdnu vývoje (viz Tab. V). Středně vysoká exprese byla pozorována v 8., 13. a ve 20. týdnu, a silně exprimované byly

receptory v 9. týdnu vývoje. Změny v hladině exprese PPAR- $\gamma$  ve své práci potvrzují taktéž Huin *et al.* (2000). Abbott *et al.* (2010) studovali expresi PPAR v různých tkáních (včetně tenkého střeva) u plodů ve věku 54 až 125 dní embryonálního vývoje. Exprese PPAR- $\gamma$  ve vyvíjejícím se střevě byla v této práci prokázána, hladina exprese se však s rostoucím věkem neměnila. Imunohistochemické metody jsou jedny ze základních metod používaných k lokalizaci a vizualizaci příslušných tkáňových antigenů. Kritickým krokem imunohistochemického protokolu je fixace tkáně, která může významnou měrou ovlivnit výsledek detekce (Ramos-Vara, 2005). V našem případě byly tkáně embryonálního střeva fixovány ve dvou různých fixativech, a to ve formolu a v methacarnu. Zvolené fixativum na provedenou detekci nemělo výrazný vliv – pozitivní výsledky podaly jak vzorky fixované ve formolu, tak v methacarnu. K hodnocení exprese receptoru PPAR- $\gamma$  ve vyvíjejícím se střevě byla použita semikvantitativní metoda křížků. Hodnocení pomocí „H-skóre“ nebylo provedeno. Z důvodu malého počtu vzorků se taktéž neprovádělo statistické hodnocení. Posouzení intenzity zbarvení pozitivních buněk bývá v mnoha případech velmi subjektivní, což může být značnou nevýhodou.

PPARs jakožto ligandy aktivované transkripční faktory se účastní celé řady biologických procesů a jejich role byla prokázána mimo jiné i v rozvoji mnoha nádorů. Celá řada autorů svými pracemi prokázala schopnost některých ligandů PPARs potlačovat buněčný růst, proliferaci a diferenciaci nádorových buněk (Sarraf *et al.*, 1998; Tsubouchi *et al.*, 2000; Chang *et Szabo*, 2000; Yang *et Frucht*, 2001; James *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2004). Test životaschopnosti buněk byl proveden za účelem posouzení vlivu ciglitazonu na nádorovou linii střeva HT-29 a pro stanovení hodnot jeho inhibiční koncentrace IC[90] a IC[50] pro následné ovlivnění buněčné linie. Pro experiment byla vybrána buněčná linie HT-29. Tato linie je lidská buněčná linie odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva. Ciglitazon je syntetický ligand PPAR- $\gamma$ , který řadíme spolu s troglitazonem či rosiglitazonem mezi tzv. thiazolidindiony – syntetické ligandy, které jsou schopny aktivovat PPARs. Prostřednictvím testu se podařilo prokázat, že působením ciglitazonu dochází k poklesu životnosti nádorových buněk, a to v závislosti na použité dávce ciglitazonu (viz Graf 2a, 2b, 2c). Tímto jsme potvrdili dřívější experimenty prováděné Sarraf *et al.* (1998), Brockman *et al.* (1998), Kitamura *et al.* (1999) Yang *et Frucht* (2001), Shimada *et al.* (2002) nebo Shen *et al.* (2007), kteří rovněž popsali efekt ligandů PPARs na životnost

buněk u linií odvozených od nádorů tlustého střeva. Ve všech případech došlo při použití specifických ligandů k inhibici růstu nádorových buněk v závislosti na použité koncentraci (dávce) daného ligandu. Yang *et Frucht* (2001) také jako první popsali schopnost ciglitazonu indukovat apoptózu buněk nádorové buněčné linie HT-29. **Díky těmto výsledkům se tak nabízí možnost využívat receptory PPARs jako nové cíle pro prevenci a léčbu rakoviny tlustého střeva.**

Western blot analýza byla provedena za účelem sledování změny hladiny exprese PPAR- $\gamma$  po ovlivnění ciglitazonem ve střevní nádorové linii HT-29. Exprese PPAR- $\gamma$  v nádorových buňkách střeva byla prokázána již dříve (DuBois *et al.* (1998), Brockman *et al.* (1998), Sato *et al.* (2000), Gupta *et al.* (2001), Shimada *et al.* (2002) a Shen *et al.* (2007)). Naše výsledky ukazují, že k expresi PPAR- $\gamma$  ve střevní nádorové linii HT-29 po ovlivnění ciglitazonem (za použití obou inhibičních koncentrací) rovněž dochází (viz Obr. 11). Hladina exprese PPAR- $\gamma$  měla v obou případech zvyšující se tendenci, přičemž ke zvýšení hladiny exprese došlo po 24, 48 i 72 hodinách od ovlivnění. Tento výsledek potvrzuje, že ciglitazon funguje jako specifický ligand aktivující receptor PPAR- $\gamma$ .

Pomocí western blot analýzy jsme také sledovali změny v hladině exprese ABCG2/BCRP a ABCC1/MRP1 ve střevní nádorové linii HT-29 po ovlivnění ciglitazonem. Tyto proteiny označované jako ABC transportéry jsou zapojeny v MDR a jejich zvýšená exprese vede k rezistenci nádorových buněk vůči protinádorovým léčivům, a tím ke snížení úspěšnosti léčby nádorů (Dean *et al.*, 2001). Jedny z možných cílových genů, jejichž transkripce může být regulována prostřednictvím PPARs jsou geny kódující tyto proteiny. Regulaci ABC transportérů prostřednictvím ligandů PPARs prokázali ve svých experimentech Szatmari *et al.* (2006), Hirai *et al.* (2007) či Ogata *et al.* (2009). Steenpaal *et al.* (2010) naopak tyto výsledky svými experimenty nepotvrdili.

Exprese proteinů ABCG2/BCRP a ABCC/MRP1 byla v našem experimentu zaznamenána u všech analyzovaných vzorků, avšak hladina exprese u obou proteinů zůstala nezměněná, a to po 24, 48 i 72 hodinách od ovlivnění (při použití obou inhibičních koncentrací ciglitazonu) (viz Obr. 11). Naše výsledky se neshodují s výsledky publikovanými Szatmari *et al.* (2006), kteří demonstrovali, že troglitazon a rosiglitazon (syntetické ligandy patřící spolu s ciglitazonem do skupiny thiazolidindionů) transkripčně indukují expresi ABCG2/BCRP v lidských



dendritických a myeloidních buňkách. Naše data naopak podporují výsledky Steenpaal *et al.* (2010), jež vliv agonistů PPAR- $\alpha$  na regulaci exprese ABCC1/MRP1 neprokázali. Možnost regulace ABC transportérů v nádorových buňkách střeva prostřednictvím ciglitazonu nebyla našimi experimenty potvrzena. **Tímto se však nabízí možnost dalšího studia aktivity a působení těchto receptorů, například role koaktivátorů/korepresorů či role posttranskripčních modifikací.**

## 7 Závěr

K detekci receptorů PPAR- $\gamma$  v lidském embryonálním střevě v různých fázích nitroděložního vývoje byla použita imunohistochemická detekce. Touto metodou se podařilo prokázat, že k expresi těchto receptorů ve vyvíjejícím se střevě dochází od 7. týdne vývoje, přičemž míra exprese receptorů závisí na jednotlivých stádiích nitroděložního vývoje. Tyto výsledky, v korelaci s několika málo autory, kteří se rovněž zabývali distribucí a funkcí receptorů PPAR- $\gamma$  ve vyvíjejícím se střevě, poukazují na důležitost těchto receptorů při vývoji a diferenciaci střeva.

Test životaschopnosti buněk prokázal účinek ciglitazonu na životnost buněk lidské nádorové linie HT-29 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva. Působením ciglitazonu došlo k poklesu životnosti buněk, a to v závislosti na použité dávce ciglitazonu. Tento experiment tak potvrdil jeho antiproliferační účinek. Exprese receptorů PPAR- $\gamma$  byla detekována pomocí western blot analýzy u proteinových frakcí získaných lýzou buněk lidské nádorové linie HT-29 ovlivněných ciglitazonem. Tímto se potvrdilo, že ciglitazon funguje jako specifický ligand aktivující PPAR- $\gamma$ . Receptory PPAR- $\gamma$  mohou představovat nové cíle při léčbě rakoviny tlustého střeva.

Expese proteinů ABCG2/BCRP a ABCC/MRP1 u stejných vzorků byla rovněž western blot analýzou zaznamenána. Ke změně hladiny exprese těchto proteinů však působením ciglitazonu nedošlo. Tímto se nepodařilo potvrdit dřívější práce poukazující na regulaci ABC transportérů prostřednictvím receptorů PPARs, zůstává však velký prostor pro další výzkumy, například studium koaktivátorů a korepresorů nebo posttranslačních modifikací PPARs.

## 8 Seznam zkratek

12-HETE	12-hydroxyeicosatetraenová kyselina
13-HODE	13-hydroxyoktadekadienová kyselina
15-dPGJ2	Prostaglandin J2
15-HETE	15-hydroxyeicosatetraenová kyselina
8-HETE	8-hydroxyeicosatetraenová kyselina
9-HODE	9-hydroxyoktadekadienová kyselina
AR	Androgen Receptor (androgenový receptor)
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
DBD	DNA-Binding Domain (DNA vázající doména)
ER	Estrogene Receptor (estrogenový receptor)
GR	Glucocorticoid Receptor (glukokortikoidní receptor)
HFN4	Hepatocyte Nuclear Factor 4 (hepatocytární jaderný faktor 4)
HRE	Hormone Response Element (responzivní element pro hormony)
LBD	Ligand-Binding Domain (ligand vázající doména)
LTB4	Leukotrien B4
MDR	Multi-drug Resistance (mnohočetná léková rezistence)
MRP	Multi-drug Resistance protein
NcoR	Nuclear Receptor Co-repressor (jaderný korepresor receptorů)
NHR	Nuclear Hormone Receptor (jaderný hormonální receptor)

PBP	PPAR Binding Protein (PPAR vázající protein)
PGA2	Prostaglandin A2
PGD2	Prostaglandin D2
Pgp	P-glykoprotein
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor (receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů)
PPRE	PPAR Response Element (responzivní element pro PPAR)
PR	Progesterone Receptor (progesteronový receptor)
PRIP	PPAR Interacting Protein (PPAR interakční protein)
RAR	Retinoic Acid Receptor (receptor pro kyselinu retinovou)
RXR	Retinoid X Receptor (receptor pro retinoid X)
SHH	Sonic Hedgehog Homolog (protein Sonic hedgehog homolog)
SMRT	The Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors (tlumící mediátor pro retinoidy a thyroideální receptor)
SR	Steroid Hormone Receptor (steroidní hormonální receptor)
SRC-1	Steroid Receptor Co-activator (koaktivátor steroidních receptorů)
TR	Thyroid Receptor (thyroideální receptor)
TZDs	Thiazolidindions (thiazolidindiony)
VDR	Vitamin D Receptor (receptor pro vitamín D)

## 9 Seznam použité literatury

1. Abbott B. D., Wood C. R., Watkins A. M., Das K. P., Lau Ch. S. (2010): Peroxisome proliferator-activated receptors alpha , beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissues. *PPAR Research*, Vol. 2010: 1-19.
2. Aranda A., Pascual A. (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, Vol. 81: 1269-1304.
3. Braissant O., Fougère F., Scotto C., Dauca M., Wahli W. (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, Vol. 137: 354-366.
4. Braissant O., Wahli W. (1998): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  during rat embryonic development. *Endocrinology*, Vol. 139: 2748-2754.
5. Brockman J. A., Gupta R. A., DuBois R. N. (1998): Activation of PPAR- $\gamma$  leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, Vol. 115: 1049-1055.
6. Brown K. K., Henke B. R., Blanchard S. G., Cobb J. E., Mook R., Kaldor I., Klierer S. A., Lehmann J. M., Lenhard, J. M., Harrington W. W., Novak P. J., Faison W., Binz J. G., Hashim M. A., Oliver W. O., Brown H. R., Parks D. J., Plunket K. D., Tong W. Q., Menius J. A., Adkison K., Noble S. A., Willson T. M. (1999): *Diabetes*, Vol 48: 1415-1424.
7. De Duve C., Baudhuin P. (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, Vol. 46: 323-357.
8. Desvergne B., Wahli W. (1999): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews*, Vol. 20: 649-688.
9. Escriva H., Delaunay F., Laudet V. (2000): Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays*, Vol. 22: 717-727.
10. Evans R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, Vol. 240: 889-895.

11. Fajas L., Auboeuf D., Raspé E., Schoonjans K., Lefebvre A.-M., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart J.-Ch., Deeb S., Vidal-Puig A., Flier J., Briggs M. R., Staels B., Vidal H., Auwerx J. (1997): The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR $\gamma$  Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272: 18779-18789.
12. Fajas L., Fruchart J.-Ch., Auwerx J. (1998): PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters*, Vol. 438: 55-60.
13. Fruchart J., Duriez P., Staels B. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 10: 245-57.
14. Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. (2006): Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, Vol. 58: 685-704.
15. Gronemeyer H., Laudet V. (1995): Transcription factors 3: Nuclear receptors. In *Protein Profile*, Vol. 2. Sheterline P (ed). London, Academic Press. 1995.
16. Hard T., Kellenbach E., Boelens R., Maler B. A., Dahlman K., Freedman L. P., Carlstedt-Duke J., Yamamoto K. R., Gustafsson J. A., Kaptein R. (1990): *Science*, Vol. 249: 157-160.
17. Hirai T., Fukui Y., Motojima K. (2007): PPAR $\alpha$  agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 30: 2185-2190.
18. Horwitz K. B., Jackson T. A., Bain D. L., Richer J. K., Takimoto G. S., Tung L. (1996): Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Molecular Endocrinology*, Vol. 10: 1167-1177.
19. Hörlein A. J., Näär A. M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Södersröm M., Glass CH. K., Rosenfeld M. G. (1995): Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, Vol. 377: 397-404.

20. Huin C., Corriveau L., Bianchi A., Keller J. M., Collet P., Krémarik-Bouillaud P., Domenjoud L., Bécuwe P., Schohn H., Ménard D., Dauca D. (2000): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 48: 603-611.
21. Chang T. H., Szabo E. (2000): Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, Vol. 60: 1129–1138.
22. Chen J. D., Evans R. M. (1995): A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, Vol. 377: 454-457.
23. Ijpenberg A., Jeannin E., Wahli W., Desvergne B. (1997): Polarity and specific sequence requirements of Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272: 20108-20117.
24. Isseman I., Green S. (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, Vol. 347: 645-649.
25. James S. Y., Lin F., Kolluri S. K., Dawsom M. I., Zhang X. (2003): Regulation of retinoic acid receptor  $\beta$  expression by Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands in cancer cells. *Cancer Research*, Vol. 63: 3531-3538.
26. Jones P. S., Savory R., Barratt P., Bell A. R., Gray T. J., Jenkins N. A., Gilbert D. J., Copeland N. G., Bell D. R. (1995): Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 233: 219-226.
27. Kitamura S., Miyazaki Y., Shinomura Y., Kanayama S., Matsuzawa Y. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, Vol. 90:75–80.
28. Kota B. P., Huang T. H.-W., Roufogalis B. D. (2005): An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, Vol. 51: 85-94.

29. Krust A., Green S., Argos P., Kumar V., Walter P., Bornert J. M., Chambon P. (1986): The chicken estrogen receptor sequence: homology to v-erbA and the human estrogen and glucocorticoid receptors. *The EMBO Journal*, Vol. 5: 891-897.
30. Kubota T., Koshizuka K., Williamson E. A. (1998): Ligand for peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Research*, Vol. 58: 3344–3352.
31. Laudet V., Hänni C., Coll J., Catzeflis F., Stéhelin D. (1992): Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *The EMBO Journal*, Vol. 11: 1003-1013.
32. Laudet V. (1997): Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 19: 207-226.
33. Lehmann J. M., Moore L. B., Smith-Oliver T. A., Wilkison W. O., Willson T. M., Kliewer S. A. (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for the nuclear receptor PPAR $\gamma$ . *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270: 12953-12956.
34. Lefebvre A. M., Paulweber B., Fajas L., Woods J., McCrary C., Colombel J. F., Najib J., Fruchart J. C., Datz C., Vidal H., Desreumaux P., Auwerx J. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *Journal of Endocrinology*, Vol. 162: 331-340.
35. Leung W. K., Bai A. H. C., Chan V. Y. W., Yu J., Chan M. W. Y., To K.-F., Wu J.-R., Chan K.-K., Fu Y.-G., Chan F. K. L., Sung J. J. Y. (2004): Effect of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  ligands on growth and gene expression profiles of gastric cancer cells. *Gut*, Vol. 53: 331-338.
36. Li C., Schwabe J., Banayo E., Evans R. (1997): Coexpression of nuclear receptor partners increases their solubility and biological activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 94: 2278-2283.



37. Liu D., Zang Ch., Liu H., Possinger K., Fan S., Elstner E. (2004): A novel PPAR alpha/gamma agonist inhibits cell growth and induces apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Acta Pharmalogica Sinica*, Vol. 25: 1312-1319.
38. Lock E. A., Mitchell A. M., Elcombe C. R. (1989): Biochemical mechanizm of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annual review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 29: 145-163.
39. Luisi B. F., Xu W. X., Otwinowski Z., Freedman L. P., Yamamoto K. R., Sigler P. B. (1991): Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, Vol. 352: 497-505.
40. Malínský, J., Lichnovský, V.: *Přehled embryologie člověka v obrazech*. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2006. 200 s. ISBN 802441273X. pp. 76-81.
41. Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M. (1995): The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, Vol. 83: 835-839.
42. Moras D., Gronemeyer H. (1998): The nuclear ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 10: 384-391.
43. Nolte, R. T., Wisely G. B., Westin S., Cobbs J. E., Lambert M. H., Kurokawa R., Rosenfeldk M. G., Wilson T. M., Glass CH. K., Milburn M. V. (1998): Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature*, Vol. 395: 137-143.
44. Nomura M., Kinoshita S., Satoh H., Maeda T., Murakami K., Tsunoda M., Miyachi H., Awano K. (1999): (3-Substituted benzyl)thiazolidine-2,4-diones as structurally new antihyperglycemic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 9: 533-538.
45. Nuclear Receptor Nomenclature Committee (1999): A unified nomenclature systém for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, Vol. 97:161-163.
46. Ogata M., Tsujita M., Hossain M., Akita N., Gonzalez F., Staels B., Suzuki S., Fukutomi T., Kimura G., Yokoyama S. (2009): On the mechanizm for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. *Atherosclerosis*, Vol. 205: 413-419.

47. Oñate S. A., Tsai S. Y., Tsai M.-J., O'Malley B. W. (1995): Sequence and Characterization of a Coactivator for the Steroid Hormone Receptor Superfamily. *Science*, Vol. 270: 1354-1357.
48. Peters J. M., Shah Y. M., Gonzalez F. J. (2012): The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature*, Vol. 12: 181-195.
49. Ramos-Vara J. A. (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, Vol. 42: 405-426.
50. Riordan J. R., Deuchars K., Kartner N., Alon N., Trent J., Ling V. (1985): Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, Vol. 316: 817-819.
51. Sadler T. W. (2004): *Langman's Essentials medical embryology*. Lippincott Williams and Wilkins, 9th, ed., Philadelphia, 445 s., ISBN: 0683306502.
52. Sarraf P., Mueller E., Jones D., King F. J., DeAngelo D. J., Partridge J. B., Holden S. A., Chen L. B., Singer S., Fletcher C. and Spiegelman B. M. (1998): Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR- $\gamma$ . *Nature Medicine*, Vol. 4: 1046–1052.
53. Sarraf P., Mueller E., Smith W. M., Wright H. M., Kum J. B., Aaltonen L. A., de la Chapelle A., Spiegelman B. M. (1999): Loss-of-function mutations in PPAR- $\gamma$  associated with human colon cancer. *Molecular cell*, Vol. 3: 799-804.
54. Sato H., Ishihara S., Kawashima K., Moriyama N., Suetsugu H., Kazumori H., Okuyama T., Rumi M. A. K., Fukuda R., Nagasue N., Kinoshita Y. (2000): Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR $\gamma$  agonists. *British Journal of Cancer*, Vol. 83: 1394-1400.
55. Sher T., Yi H.-F., McBride W., Gonzales F. J. (1993): cDNA Cloning, Chromosomal Mapping, and Functional Characterization of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor. *Biochemistry*, Vol. 32: 5598-5604.
56. Shen D., Deng Ch., Zhang M. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgraduate Medicine*, Vol. 83: 414-419.

57. Shimada T., Kojima K., Yoshiura K., Hiraishi H., Terano A. (2002): Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*, Vol. 50: 658-664.
58. Schwabe J. W. R., Neuhaus D., Rhodes D. (1990): Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature*, Vol. 348: 458-461.
59. Singh I. (1997): Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 167: 1-29.
60. Van Steenpaal A., Hoekstra M., Geuken M., Faber K. N. (2010): MRP1 expression in human intestinal and hepatic epithelial cells is not suppressed by PPAR $\alpha$ . In *Function and regulation of the multidrug resistance associated protein 1 during inflammatory bowel disease and liver regeneration*, 91- 107, Gildeprint drukkerijen, Enschede.
61. Su W., Bush C. R., Necela B. M., Calcagno S. R., Murray N. R., Fields A. P., Thompson E. A. (2007): Differential expression, distribution and function of PPAR-  $\gamma$  in the proximal and distal colon. *Physiological genomics*, Vol. 30: 342-353.
62. Szatmari I., Vámosi G., Brazda P., Balint B., Benko S., Széles L., Jeney V., Özvegy-Laczka C., Szántó A., Barta E., Balla J., Sarkadi B., Nagy L. (2006): Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281: 23812-23823.
63. Štulc T., Češka R. (2006): Duální blokáda receptorů PPAR. *Farmakoterapie*, Vol. 1: 13-17.
64. Tan N. S., Michalik L., Desvergne B., Wahli W. (2005): Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, Vol. 93: 99–105.
65. Tenenbaum A., Motro M., Fishman EZ. (2005): Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovascular Diabetology*, Vol. 4: 14-8.

66. Tsai M. J., O' Malley B. W. (1994): Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 63: 451-486.
67. Tsubouchi Y, Sano H., Kawahito Y., Mukai S., Yamada R., Kohno M., Inoue K., Hla T., Kondo M. (2000): Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists through induction of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 270: 400-405.
68. Urban O. (2008): Diagnostika kolorektálního karcinomu, *Onkologie*, Vol. 2: 9-11.
69. Vamecq J., Latruffe N. (1999): Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*, Vol. 354: 141-148.
70. Wahli W., Martinez E. (1991): Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *The FASEB Journal*, Vol. 5: 2243-2249.
71. Weinberger C., Hollenberg S. M., Rosenfeld M. G., Evans R. M. (1985): Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the *v-erb-A* oncogene. *Nature*, Vol. 318: 670-672.
72. Werman A., Hollenberg A., Solanes G., Björbaek CH., Vidal-Puig A. J., Flier J. S. (1997): *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272: 20230-20235.
73. Wurtz J.-M., Bourguet W., Renaud J.-P., Vivat V., Chambon P., Moras D., Gronemeyer H. (1996): A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*, Vol. 3: 87-94.
74. Yang W.-L., Frucht H. (2001): Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells.
75. Yoshikawa T., Brkanac Z., Dupont B. R., Xing G.-Q., Leach R. J., Detera-Wadleigh S. D. (1996): Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, Vol. 35: 637-638.

76. Zavoral M., Suchánek Š., Vepřeková G., Májek O., Gregor J., Dušek L. (2011): Screening a včasný záchyt kolorektálního karcinomu – současný stav v jednotlivých krajích České republiky. *Onkologie*, Vol. 5: 210-214.
77. Zhu Y., Qi Ch, Jain S., Rao M. S., Reddy J. K. (1997): Isolation and Characterization of PBP, a Protein That Interacts with Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272: 25500-25506.
78. Zhu Y., Kan L., Qi Ch., Kanwar Y. S., Yeldandi A. V., Rao M. S., Reddy J. K. (2000): Isolation and Characterization of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Interacting Protein (PRIP) as a Coactivator for PPAR. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275: 13510–13516.