

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2016**

**Bc. Nikola Juračková**

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



**Sledování účinku inhibice mTOR signální dráhy na pregnanový X receptor**

**Diplomová práce**

**Bc. Nikola Juračková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

**Vedoucí práce: Mgr. Aneta Vávrová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, v průběhu navazujícího magisterského studia, pod vedením Mgr. Anety Vávrové, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

## Abstrakt

Pregnanový X receptor (PXR) je významným regulátorem exprese širokého spektra enzymů, které se přímo podílejí na biotransformaci nebo exkreci xenobiotik a je tak považován za jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících farmakokinetiku mnoha léčiv prostřednictvím eliminačních procesů. Aktivita tohoto receptoru je významně ovlivňována jak vazbou ligandu, tak i jeho post-translačními modifikacemi a asociací s koregulátory transkripce. Významnou roli v buněčné signalizaci hraje dráha mTOR, která po aktivaci reguluje mnohé základní pochody v buňce. Fosforylací svých substrátů navozuje změny, které ovlivňují energetický metabolismus, proliferaci a růst buňky, autofagii a apoptózu.

Tato práce se zaměřila na vliv rapamycinu, inhibitoru mTORC1, na aktivitu PXR a následnou expresi jeho cílových genů *CYP3A4* a *ABCB1*. Nejprve byla sledována schopnost PXR aktivovat promotor genu *CYP3A4* metodou reporter gene assay v buněčné linii HEK293T. Poté byla sledována exprese genů *CYP3A4* a *ABCB1* na úrovni mRNA a proteinů metodami qRT-PCR, SDS-PAGE a immunoblotingu v buněčné linii LS174T. Rapamycin (Rap) byl aplikován ve dvou netoxických koncentracích buď samostatně, nebo v kombinaci s aktivátorem PXR rifampicinem (Rif). Tato kombinace látek výrazně snižovala transkripční aktivitu PXR a také hladinu *CYP3A4* mRNA. Hladina exprese *ABCB1* mRNA nevykazovala nijak významné změny, avšak na úrovni proteinu byl stanoven výrazný pokles po aplikaci Rap s Rif. Výsledky naznačují, že mTOR kináza významně ovlivňuje signalizaci PXR v přítomnosti jeho aktivátoru rifampicinu.

## Abstract

The pregnane X receptor is an important expression regulator of wide variety of enzymes which play key roles in a biotransformation and excretion of xenobiotics. Through elimination processes, PXR is considered as one of the most important factor affecting pharmacokinetics of many drugs. An activity of this receptor is influenced by a ligand binding post-translational modifications and the association with transcriptional coregulators. The mammalian TOR signalling pathway plays an important role in a cell signalling and activation of this pathway leads to regulation of many principal processes in the cell. Phosphorylation of mTOR substrates induces changes which affect an energy metabolism, proliferation, cell growth, autophagy and apoptosis.

This thesis focused on the influence of selective inhibitor of mTORC1, rapamycin, on the PXR activity and the PXR-target genes *CYP3A4* and *ABCB1* expression. By using a reporter gene assay was monitored the ability of PXR to activate *CYP3A4* promoter in HEK293T cell line. After that the expression of *CYP3A4* and *ABCB1* of mRNA and proteins was monitored by qRT-PCR, SDS-PAGE and immunoblotting in LS174T cell line. Rapamycin (Rap) was used in two nontoxic concentrations and also in combination with rifampicin (Rif) – an activator of the PXR. This combination significantly reduced the PXR transcriptional activity and *CYP3A4* mRNA quantity. Even though the expression of *ABCB1* mRNA did not change, the application of Rap in combination with Rif significantly reduced the level of protein. The results suggest the mTOR kinase affects PXR signalisation in presence of rifampicin.

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce Mgr. Anetě Vávrové, Ph.D. za věnovaný čas, odbornou pomoc, cenné rady a připomínky, které mi poskytla a děkuji také kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a farmakologie za ochotu a pomoc.

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	CÍLE PRÁCE .....	9
3	BIOTRANSFORMACE .....	10
3.1	Fáze I.....	10
3.1.1	Cytochromy P450.....	11
3.1.2	Cytochrom P450 3A4.....	13
3.2	Fáze II .....	14
3.3	Fáze III .....	15
3.3.1	P-glykoprotein.....	16
3.4	Jaderné receptory .....	18
3.5	Pregnanový X receptor (PXR) .....	22
3.5.1	DNA-vazebné vlastnosti .....	23
3.5.2	Cílové geny .....	24
3.5.3	Post-translační modifikace .....	25
4	mTOR SIGNALIZAČNÍ DRÁHA .....	29
4.1	Komplexy mTORC1 a mTORC2.....	30
4.2	Rapamycin .....	32
5	MATERIÁL A METODY .....	34
5.1	Chemikálie, přístrojové vybavení a biologický materiál.....	34
5.2	Metody .....	38
6	VÝSLEDKY .....	45
6.1	Viabilita buněčné linie HEK293T a LS174T po aplikaci rapamycinu.....	45
6.2	Vliv rapamycinu na aktivitu receptoru PXR v buněčné linii HEK293T .....	46
6.3	Studium exprese genů <i>CYP3A4</i> a <i>ABCB1</i> v buněčných liniích LS174T a LS180...48	
6.4	Vliv rapamycinu na expresi genů <i>CYP3A4</i> a <i>ABCB1</i> .....	53
7	DISKUZE.....	59
8	ZÁVĚR .....	62
9	SEZNAM ZKRATEK.....	63
10	SEZNAM LITERATURY .....	66

# 1 ÚVOD

Každý živý organismus je neustále vystavován různým chemikáliím, jako jsou přírodní látky: alkaloidy, sekundární metabolity rostlin nebo například toxiny produkované plísněmi, ale i průmyslově vyráběné látky: pesticidy, polutanty, léčiva aj. Ty mohou být absorbovány kůží, plícemi nebo gastrointestinálním traktem. Zpravidla se jedná o látky lipofilní povahy, které mohou snadno procházet plazmatickou membránou buňky a mohou být distribuovány tělními tekutinami do tkání celého těla.

S těmito látkami se organismus snaží vyrovnat a eliminovat je procesem biotransformace. V rámci jednotlivých fází biotransformace dochází ke změnám fyzikálních vlastností xenobiotik za účelem snadnější eliminace z organismu. V první fázi dochází k přeměně parentální sloučeniny na polárnější metabolity vnesením nebo odkrytím polární skupiny. Tyto reakce katalyzují především cytochromy P450. Ve druhé fázi se polarita sloučeniny dále zvyšuje konjugačními reakcemi s endogenní molekulou a výsledkem těchto reakcí jsou hydrofilní metabolity, které jsou v rámci třetí fáze biotransformace transportovány ven z buňky a dochází k jejich exkreci.

Na regulaci biotransformačních procesů v buňce se významně podílí jaderné receptory. Tyto ligandem aktivované transkripční faktory se vážou do regulačních oblastí svých cílových genů a ovlivňují tak jejich expresi. Pregnanový X receptor (PXR) je významným modulátorem exprese mimo jiné cytochromu P450 3A4, významného katalyzátoru reakcí první fáze biotransformace, a p-glykoproteinu, který zajišťuje transport metabolitů ven z buňky. Aktivita tohoto receptoru může být významně regulována na úrovni vazby ligandu, dále na úrovni iniciace transkripce cílových genů (vlivem koregulatorů transkripce), a také post-translačními modifikacemi PXR (především fosforylací). Aktivace metabolismu léčiv skrze PXR se může podílet na vzniku různých mezilékových interakcí, lékové rezistenci a toxickém účinku v lidském organismu.



## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledování změn aktivity pregnanového X receptoru po inhibici mTOR signalizační dráhy na úrovni exprese genů *CYP3A4* a *ABCB1* v buněčných liniích HEK293T a LS174T. Pro toto testování byly použity metody Reporter gene assay, kvantitativní Real-time PCR a Western blotting s imunodetekcí proteinů CYP3A4 a p-glykoproteinu.

### 3 BIOTRANSFORMACE

S cizorodými látkami, xenobiotiky, případně endogenními látkami, které vznikly v buňce a mohou být jakkoliv nebezpečné pro její integritu, se organismus snaží vyrovnat. Snaží se tyto látky především eliminovat. Zpravidla se jedná o látky, které mohou snadno procházet plazmatickou membránou do buňky a mohou být distribuovány tělními tekutinami do tkání celého těla. Vnitřní hladina těchto látek v organismu je předmětem farmakokinetiky, ta studuje jejich absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci (ADME).

Důležitým procesem v buňce je biotransformace. V rámci biotransformace jsou změněny fyzikální vlastnosti xenobiotik, látky jsou převedeny na hydrofóbní metabolity, které jsou snadněji eliminovatelné. Bez biotransformace by byla většina xenobiotik vylučována velmi pomalu a mohla by tak významně poškodit organismus. Proces biotransformace je možné rozčlenit do několika fází. Zpravidla jsou uváděny dvě fáze, které zahrnují biotransformaci v pravém slova smyslu, nicméně se mluví i o třetí fázi, která popisuje transport metabolitů xenobiotika ven z buňky.

Rozdíly mezi jedinci v metabolické aktivitě fáze I a II organismu mohou být způsobeny věkem, pohlavím, nemocemi a genetickými predispozicemi, a neméně také životospřávou jedince (kouření, strava, léky) a vnějším prostředím.

#### 3.1 Fáze I

Fáze I je charakterizována chemickými reakcemi, při kterých dochází k přeměně parentální sloučeniny na polárnější metabolity. Základem této transformace je odkrytí funkční skupiny (např.  $-OH$ ,  $-HN_2$ ,  $-SH$ ) nebo její vytvoření *de novo*. V rámci tohoto procesu dochází k reakcím: oxidace, redukce, hydrolýza, hydratace a izomerace (Sono *et al.*, 1996).

#### Enzymy katalyzující první fázi biotransformace

Katalýzu reakcí první fáze biotransformace zajišťují enzymy lokalizované v endoplasmatickém retikulu, mitochondriích a jádře buňky. Významně se na těchto reakcích podílí široké spektrum oxidáz, reduktáz a hydroláz. Oxidační reakce první fáze biotransformace jsou katalyzovány mnohými enzymy (např. peroxidázami, mono-

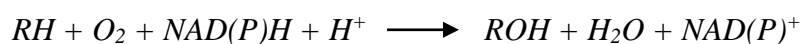
aminoxidázami, alkohol-dehydrogenázami a aldehyd-dehydrogenázami). Z nich nejvýznamnější jsou flavinové monooxygenázy. Předmětem zájmu mnoha studií jsou však především enzymy z rodiny cytochromů P450.

Flavinové monooxygenázy (FMO) působí v mnoha reakcích spolu s cytochromy P450. Jejich kofaktory jsou NADPH a atomární kyslík. FMO katalyzují oxidaci nukleofilního dusíku, síry a fosforu v molekulách xenobiotik. Na pět forem FMO je exprimováno v lidských játrech, nejvíce jsou zastoupeny FMO3, FMO4 a FMO5 (Sevior et al., 2012)

### 3.1.1 Cytochromy P450

Ze všech enzymů schopných metabolizovat xenobiotika jsou cytochromy P450 těmi nejdůležitějšími, ať už z hlediska jejich hojnosti, tak i univerzálnosti. Pod názvem cytochromy P450 (CYP450) je zahrnuta celá skupina enzymů, jejichž společným znakem je přítomnost hemové skupiny. Redukovaný komplex má spektrální vlastnosti pro tvorbu typického absorpčního píku v oblasti 450 nm a písmeno „P“ značí, že se jedná o pigment.

Svou funkcí patří CYP450 mezi monooxygenázy – vážou jeden atom kyslíku, kterým tvoří molekulu vody a druhý atom kyslíku pro vazbu se substrátem. Aby byly katalyticky aktivní, vyžadují přítomnost redukčních ekvivalentů z NADH/NADPH (Omura and Sato, 1964a, Omura and Sato, 1964b).



Za nepřítomnosti vhodného substrátu mohou některé redukované CYP450 enzymy produkovat reaktivní formy kyslíku (ROS), které u savců mohou vést až k indukci apoptózy (Bernhardt, 2006).

### Role CYP450 v organismu

Významné jsou tyto enzymy zejména z hlediska metabolismu léčiv a většiny protoxikantů a pro-karcinogenů. Cytochromy P450 jsou odpovědné za 80 % metabolismu xenobiotik v první fázi biotransformace (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). Katalýza enzymy CYP450 vede ke snížení plazmatické koncentrace léčiva a koncentrace léčiva

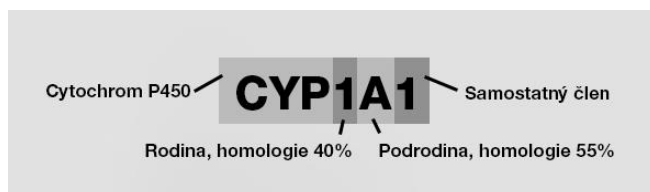
v cílovém místě. Oxidací substrátů může však docházet k tvorbě aktivnějších a reaktivnějších forem, než byla parentální sloučenina a toxicita látky se může zvýšit také inhibicí P450 enzymů (Guengerich, 2001).

Vedle xenobiotik katalyzují CYP450 enzymy metabolismus a biosyntézu mnohých endogenních látek, jako například steroidních hormonů, cholesterolu, mastných kyselin, žlučových kyselin a prostaglandinů, dále pak komponenty zbarvení a ochrany u rostlin a katabolismus sloučenin jako zdroje uhlíku pro savce (Sono *et al.*, 1996, Bernhardt, 2006).

Substráty cytochromů P450 jsou hydrofobní povahy (Graham-Lorence *et al.*, 1997). Široká substrátová specifita CYP450 enzymů umožňuje kompetici mezi substráty jednoho enzymu. V závislosti na různých substrátech může docházet k mezilékovým interakcím. Vazbou inhibitoru do aktivního místa enzymu může docházet ke klinicky významné odpovědi, ale na základě povahy CYP450 může být tato odpověď do jisté míry zvrácena (Sevior *et al.*, 2012).

CYP450 byly nalezeny od bakterií až po člověka a mohou být členěny do dvou skupin: mitochondriální/bakteriální (rozpuštěné formy, obsažené v cytoplasmě) a mikrozomální (membránově vázané) (Bernhardt, 2006). Většina z CYP450 enzymů je lokalizována v játrech (Omura and Sato, 1964b) (mimo CYP1A1 a -1B1), nicméně mnoho jich je také v mimojaterních tkáních. Obzvláště v tkáních, které jsou vstupní branou pro exogenní sloučeniny, jako jsou plíce a gastrointestinální trakt. Tyto tkáně jsou významné především z toho důvodu, že reaktivní produkt není schopný migrovat mezi buňkami. Každá tkáň obsahuje unikátní profil enzymů CYP450 (Guengerich, 2001, Ding and Kaminsky, 2003).

Na základě sekvenční shody minimálně ze 40 % mezi dvěma proteiny CYP450 mohou být členěny do proteinových rodin. Členové podrodin mají u savců identickou sekvenci většinou z více než 55%. Schématické znázornění názvosloví cytochromů P450:



## Polymorfismus CYP450

Polymorfizmy v kódujících genech pro enzymy CYP450 tvoří rozdíly ve funkci enzymů či úplnou ztrátu jeho aktivity. Významnými změnami jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP), inserce, duplikace a částečné nebo úplné genové delece (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007, Sevier *et al.*, 2012). Polymorfismus enzymů CYP450 hraje významnou roli v léčbě onemocnění. Metabolismus většiny popsaných léčiv (až 75%) katalyzují rodiny enzymů CYP3A, CYP2D6 a CYP2C. Jejich aktivita může být ovlivněna životosprávou jedince (strava, kouření), fyziologickými faktory, či užíváním jiných léčiv (van Schaik, 2008, Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). Na základě počtu aktivních genů pro tyto enzymy lze populaci klasifikovat do skupin: ultrarychlí metabolizátoři (s více, než dvěma aktivními geny kódujícími určitý CYP450), extenzivní metabolizátoři (nesoucí 2 funkční geny), přechodní metabolizátoři (s jednou funkční a jednou nefunkční alelou nebo dvěma částečně defektními alelami) a pomalí metabolizátoři s chybějícím funkčním enzymem (nesou defektní nebo deletovaný gen) (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

### 3.1.2 Cytochrom P450 3A4

Podrodina enzymů CYP3A katalyzuje metabolismus přibližně 50 % všech léčiv. Tato největší podrodina CYP450 je kódována na chromozomu 7q21-7q22.1. Zde jsou geny pro *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* a *CYP3A43* (van Schaik, 2008).

Nejdůležitějším enzymem v metabolismu léčiv u člověka je CYP3A4. Velmi hojně je tento enzym exprimován v játrech a ve střevech (McKinnon *et al.*, 1995), dále pak v ledvinách, placentě, plicích a mozku. V buňce se nachází jak v rozpustné formě, tak i membránově vázaný (Sevrioukova and Poulos, 2015).

V důsledku velkého a ohebného aktivního místa enzymu CYP3A4 a také díky schopnosti katalyzovat různé chemické reakce je tento protein schopný biotransformovat širokou škálu endogenních a exogenních sloučenin různých velikostí a chemických struktur. Tvorbou 3D modelů struktury enzymu CYP3A4 bylo zjištěno, že má velké aktivní místo, které je schopné v jednu dobu pojmout více, než jeden substrát (Harlow and Halpert, 1998). Vazbou mnohých sloučenin do aktivního místa se často projevuje součinnost substrátů (Harlow and Halpert, 1998, Sevrioukova and Poulos, 2015).

V mikrozomech lidských jater metabolizuje CYP3A4 až 50 % klinicky užívaných léčiv (Guengerich, 1990, Lehmann *et al.*, 1998). Vazbou různých látek na CYP3A4 může docházet k modulaci jeho celkové aktivity a mezilékovým interakcím *in vivo*, vedoucím k nežádoucím účinkům, až selhání terapie (Sevrioukova and Poulos, 2015). Interakcí různých substrátů může být zvýšena aktivita CYP3A4, například jedno léčivo indukuje aktivitu enzymu a tím může ovlivnit metabolismus jiného léčiva. Mezi aktivátory CYP3A4 patří například  $\alpha$ -naphthoflavon (ANF), steroidy (Harlow and Halpert, 1998), quinidine (Ngui *et al.*, 2001) a mnohá jiná léčiva. Naopak inhibice metabolismu léčiva vede ke zvýšení koncentrace léčiva v buňce, která může být toxická pro organismus. Dobře známá je modulace CYP3A4 flavonoidy obsaženými v grepovém džusu (Bailey, 2010) nebo například ketoconazolem (Engels *et al.*, 2004).

Aktivita enzymu CYP3A4 je regulována také skrze ligandem indukované transkripční faktory. Již od konce dvacátého století je známo, že se tyto receptory váží do regulačních oblastí cílového genu a regulují tak jeho expresi (Bertilsson *et al.*, 1998). Expresi CYP3A4 velmi významně ovlivňuje například pregnanový X receptor (viz kap. 3.2.1.1.), konstitutivní androstanový receptor (CAR), receptor pro vitamin D (VDR) a receptor aktivovaný proliferátory peroxisomů  $\alpha$  (*PPAR* $\alpha$ ).

## 3.2 Fáze II

Základem druhé fáze biotransformace jsou konjugační reakce katalyzované různými transferázami. Dochází k reakcím xenobiotika nebo metabolitu první fáze biotransformace s endogenní sloučeninou za účelem snížení toxicity a biologické aktivity látky, tedy k inaktivaci farmakologicky aktivních látek. Produkty druhé fáze biotransformace jsou typicky více hydrofobní, než parentální sloučenina a tím může dojít k jejich snadnější exkreci do žluče a moči. Konjugace ovšem není výhradně reakcí metabolismu xenobiotik, velmi významně ovlivňuje metabolismus endogenních látek (hormonů, cholesterolu, žlučových kyselin, aj).

Reakce druhé fáze biotransformace u člověka zahrnují především konjugaci s kyselinou UDP-glukuronovou (UDP: uridindifosfo-), sulfonaci, methylaci, acetylaci, konjugaci s glutathionem a s aminokyselinami (Jancova *et al.*, 2010). Obecně, enzymy fáze II jsou rozpustné, nejsou uloženy v membráně, ale v cytoplasmě buňky a zahrnují

především UDP-glukuronyltransferázy, sulfotransferázy, N-acetyltransferázy, glutathion S-transferázy, a methyltransferázy (např. COMT).

Konjugaci širokého množství sloučenin a produktů reakcí první fáze biotransformace zajišťují UDP-glukuronyltransferázy (UGT: uridindifosfoglukuronyltransferázy). UGT jsou velmi významnými enzymy druhé fáze biotransformace a podílí se na odstranění bilirubinu, léčiv a xenobiotik z těla. U člověka jich je exprimováno 16 a jsou lokalizovány v hladkém endoplazmatickém retikulu (ER) a tak mají možnost katalyzovat své substráty dříve, než se začnou šířit vnitřním prostředím ER a dále do buňky (Sevior *et al.*, 2012).

Mnoho léčiv, steroidů a xenobiotik získává alkoholovou nebo aminovou skupinu jako důsledek reakce s enzymy CYP450. Na substrát s těmito funkčními skupinami může být přenesena sulfátová skupina z donorové molekuly 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy ze skupiny sulfotransferáz (SULT) (Sevior *et al.*, 2012). Sulfonací mohou být naopak prokarcinogeny konvertovány (bioaktivovány) na vysoce reaktivní meziprodukty schopné fungovat jako chemické karcinogeny a mutageny (Surh, 1998).

Na xenobiotika obsahující ve své struktuře aromatický amin nebo hydrazinovou skupinu přenáší enzym N-acetyltransferáza (NAT) acetylovou skupinu z acetylkoenzymu A (Jancova *et al.*, 2010).

Mezi produkty enzymů první fáze biotransformace patří i halogenové aromáty, lipidové peroxidy, aj, které jsou katalyzovány glutathion S-transferázami (GST). Tyto enzymy hrají důležitou roli při ochraně buňky proti oxidativnímu stresu (Jancova *et al.*, 2010) a jsou důležité také jako transportéry (Sevior *et al.*, 2012).

### 3.3 Fáze III

Aktivní transportéry v buňce zajišťují import a export sloučenin přes plazmatickou membránu a tím se podílí na homeostáze. Metabolismus xenobiotik je vedle biotransformačních enzymů zajišťován transportními proteiny (tzv. *drug transporters*), které přenáší tyto exogenní sloučeniny a jejich metabolity ven z buňky. Základem pro zkoumání fáze III byl objev p-glykoproteinu, prvního popsaného membránového

transportéru (Juliano and Ling, 1976). Výzkum p-glykoproteinu a následně dalších membránových receptorů vedl k částečnému objasnění principu resistance rakovinových buněk na chemoterapeutika. V anglické literatuře se toto označuje jako *multidrug resistance* (MDR) (Scotto, 2003).

Vhodnými substráty těchto transportérů jsou mnohá dnes využívaná léčiva, proto jsou velmi významné při absorpci, distribuci do tkání a eliminaci těchto léčiv. O tom svědčí i jejich lokalizace, především jsou exprimovány v játrech, střevech a ledvinách. Předmětem zájmu mnoha studií jsou především *efflux* transportéry MDR1 (*multidrug resistance 1*) a MRPs (*MDR-associated proteins*) a *influx* transportéry OATPs (*organic anion transporting polypeptides*) a OCTs (*organic cation transporters*).

### 3.3.1 P-glykoprotein

P-glykoprotein (Pgp), produkt genu ABCB1 (také známý jako MDR1: *multidrug resistance 1*) ležícího na chromozomu 7 (Fromm, 2002), je důležitým buněčným transportérem přenášejícím molekuly mezi tkáněmi a krví.

Pgp patří do skupiny *efflux* ATP-vazebných transportérů (*ATP-binding cassette; ABC*) uložených v lipidové dvojvrstvě buňky. Ty obsahují vysoce konzervovanou ATP-vazebnou doménu a energii z hydrolyzy ATP využívají pro transport ven z buňky proti koncentračnímu gradientu. Pgp je složen ze dvou velmi podobných polovin, kdy každá obsahuje 6 transmembránových segmentů, intracelulární ATP-vazebné místo a 2 nukleotid-vazebné domény (Higgins, 1992, Loo and Clarke, 1999, Schinkel and Jonker, 2003)

Pgp hraje důležitou roli v ochraně organismu před útokem mnohých toxinů z okolního prostředí. Může být indukován mnoha léčivy a hormony (Greiner *et al.*, 1999). Je exprimován v různých savčích tkáních. Již v roce 1998 bylo pomocí Pgp-deficientních myší prokázáno, že je Pgp součástí hematoencefalitické bariéry a je zodpovědný za průnik léčiva do mozku (Kim *et al.*, 1998). Nejvíce je tento transportér zastoupen v epitheliálních buňkách střeva, hematoencefalické bariéry, varlatech a neméně významný je i v játrech, v placentě a ledvinách (Kim *et al.*, 1998, Schinkel and Jonker, 2003, König *et al.*, 2013).



Široké spektrum substrátů Pgp zahrnuje různá léčiva: imunosupresiva, protirakovinná léčiva, antibiotika, statiny, léky na srdce a  $\beta$ -blokátory. Zpravidla mají substráty hydrofobní povahu, tudíž mohou pasivně difundovat přes buněčnou membránu. Nicméně, než projdou přes vnitřní membránu lipidové dvojvrstvy, jsou rychle pumpovány ven z buňky. Takto extrudované substráty jsou vyloučeny z těla jako odpadní metabolity.

Pgp exprimovaný v membráně enterocytů limituje vstup léčiva do organismu po jeho orálním podání. Jestliže se léčivo dostalo do krevního řečiště, Pgp podněcuje eliminaci tohoto léčiva, příp. metabolitů fáze I a II biotransformace do žluče a moči, protože je exprimován také v membráně hepatocytů a proximálních tubulů ledvin. Navíc, Pgp limituje penetraci léčiv z krevního řečiště do cílových orgánů (Fromm, 2004, Konig *et al.*, 2013). Spolu s enzymy metabolizujícími xenobitika (např. CYP450) tvoří Pgp důležitý ochranný mechanismus organismu proti toxickým agens.

Modulace funkce Pgp je známá příčina mezilékových interakcí. Je známo mnoho induktorů a inhibitorů tohoto receptoru, jejichž efekt může být tkáňově specifický. Na základě překrývající se substrátové specifity Pgp a CYP3A4 dochází k mnohým interakcím léčiv, které zahrnují oba tyto proteiny (Greiner *et al.*, 1999, Fromm, 2004). Rifampicin, například, indukuje v lidských střevech Pgp a zároveň enzym CYP3A4 (Greiner *et al.*, 1999). Tento efekt je buněčně specifický. Byl prokázán v mnoha tkáních se sekreční funkcí, ale nebyl prokázán v lymfocytech (Becquemont *et al.*, 2000). Polymorfismus buněčných transportérů má dopad na jejich četnost a afinitu k substrátu a tím i na pohyb léčiva v organismu. Bylo zjištěno 15 genetických variant lidského genu ABCB1 (Eichelbaum *et al.*, 2006). *Overexpres*e Pgp v nádorových buňkách zajišťuje jejich ochranu před nádorovou terapií a naopak jeho blokace vede k zefektivnění léčby (Greiner *et al.*, 1999). Za tímto záměrem jsou zkoumány různé modulátory Pgp.

### 3.4 Jaderné receptory

Jak již bylo zmíněno, enzymy katalyzující biotransformační reakce jsou regulovány vazbou s xenobiotiky, které tak aktivují své metabolizátory a buněčné transportéry. Navíc, metabolismus jednoho léčiva může být ovlivněn kompetitivní vazbou jiné chemické struktury. Regulace biotransformačních enzymů probíhá také na úrovni transkripce pomocí ligandy aktivovanými transkripčními faktory.

Jaderné receptory jsou velkou skupinou ligandem aktivovaných transkripčních faktorů, které regulují expresi genů účastnících se buněčného metabolismu, homeostázy, vývoje a reprodukce (lidského) organismu. V lidském genomu je 48 nukleárních receptorů rozdělených do šesti skupin. Podle jejich vazebného charakteru je možné je rozdělit do dvou skupin – receptory endokrinní pro endokrinní hormony a sirotčí (*orphan*) receptory. Do první skupiny jsou řazeny receptory, jejichž ligandy byly zpravidla objeveny mnohem dříve, než samotné receptory – např. glukokortikoidní receptor (GR $\alpha$ ), estrogení receptor (ER), receptor pro vitamin D (VDR) a další. Druhou skupinu tvoří sirotčí jaderné receptory, u kterých fyziologický ligand není znám, popř. byl objeven později než samotný receptor – tzv. adoptované sirotčí receptory – např. farnesoidní X receptor (FXR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový/aktivovaný receptor (CAR).

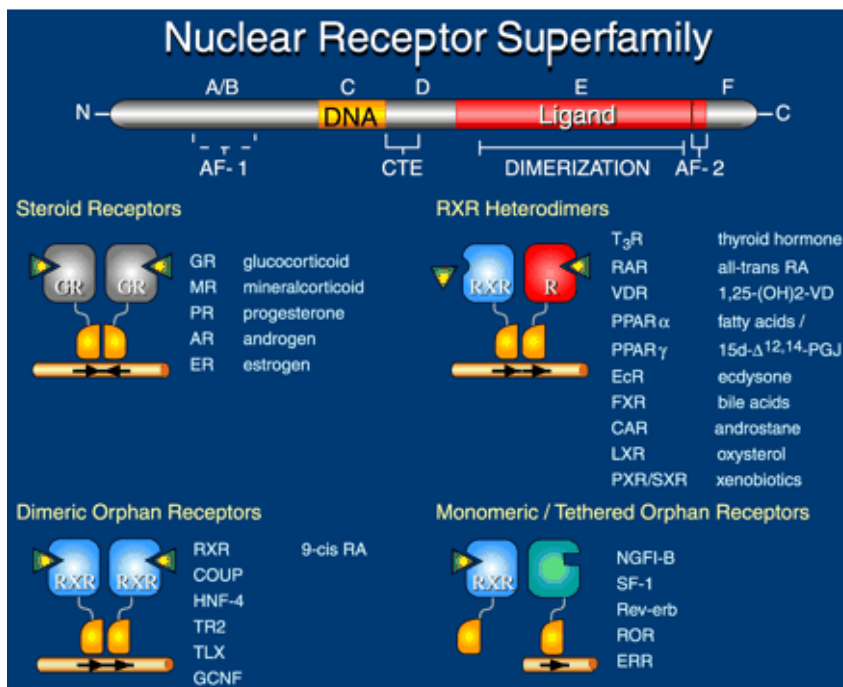
Členové jednotlivých skupin (rodin) vykazují velmi podobnou strukturu. Jaderné receptory mohou mít různé funkce v závislosti na různé aktivaci, nicméně v jejich vysoce konzervované struktuře lze rozlišit funkčně důležité domény (viz obr. č. 1). C-konec proteinu obsahuje vazebnou doménu pro ligandy (LBD: *ligand-binding domain*, označena E) a na N-konci je DNA-vazebná doména (DBD: *DNA-binding domain*, ozn. C), která je důležitá pro specifickou vazbu receptoru do sekvence DNA v promotoru cílových genů (Ribeiro *et al.*, 1995). Tyto oblasti jsou spojeny pantovou oblastí (ozn. D). Po vazbě ligandu do LBD dochází ke konformačním změnám v proteinu, k disociaci korepresorů (NCoR: *nuclear receptor corepressor* a SMRT: *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*), případně tvorbě heterodimeru a otevírá se místo AF-2 (*activation function 2*) pro vazbu koaktivátorů (např. SRC-1) v této oblasti (Glass and Rosenfeld, 2000). Na N-konci (ozn. A/B) většiny jaderných receptorů je oblast AF-

1, která je variabilní v délce a sekvenci, nezávislá na vazbě ligandu a ovlivňována růstovými faktory. Tuto sekvenci PXR neobsahuje (Pondugula *et al.*, 2009b).

Aktivace jaderných receptorů je komplikovaný proces, kterého se účastní ligandy, korepresorové proteiny, koaktivátory a další proteiny. Obvykle jsou receptory aktivovány malými lipofilními ligandy, jako jsou hormony, mastné kyseliny, žlučové kyseliny a xenobiotika. Lokalizace jaderných receptorů je buď výhradně v jádře, nebo dočasně v cytoplasmě a po vazbě ligandu dochází k jejich translokaci do jádra (např. AR, PXR a AhR). Po aktivaci se receptory váží do krátké promotorové sekvence cílových genů jako monomery, homodimery nebo heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR) (viz obr. č. 1) (Olefsky, 2001).

Na základě evoluční shody lze jaderné receptory členit do šesti skupin. Nejvíce receptorů patří do první skupiny NR1 (*Nuclear Receptor 1*), která zahrnuje mimo jiné receptor pro vitamin D (VDR), CAR a PXR. Ty interagují se stejným heterodimerizačním partnerem RXR (*Nuclear Receptors Nomenclature*, 1999).

Obrázek č. 1: Schématické znázornění struktury jaderných receptorů.



(Převzato z: Olefsky, 2001)

### **Konstitutivní androstanový/aktivovaný receptor (CAR)**

CAR v savčím organismu pozitivně reguluje proteiny podílející se na metabolismu léčiv a steroidů, naopak potlačuje oxidaci mastných kyselin a syntézu glukózy po indukci fenobarbitalem (Ueda *et al.*, 2002). K aktivaci tohoto receptoru není nutná vazba ligandu, protože CAR vykazuje silnou bazální transkripční aktivitu i při absenci ligandů (Chen *et al.*, 2012). CAR tvoří heterodimer s RXR a společně se váží do responzivních elementů RARE (*retinoic acid response elements*) v promotorech cílových genů. Receptor CAR reguluje expresi velkého množství enzymů metabolizujících léčiva. Cílovými geny CAR jsou například členové podrodin enzymů CYP2B a CYP2C (Sueyoshi *et al.*, 1999, Ueda *et al.*, 2002), dále enzym CYP3A4, transferázy UGT (Sugatani *et al.*, 2001) a lékové transportéry MRP2, Pgp a OATP2 (Kast *et al.*, 2002). CAR je blízké příbuzný s PXR a jejich role v metabolismu xenobiotik se částečně překrývají (dochází k překryvu signálních drah). Oba tyto receptory se váží do DR-3, DR-4 a DR-6 responzivních elementů rodin enzymů CYP3A a CYP2B (Xie *et al.*, 2000).

### **Aryl-uhlovodíkový receptor (AhR)**

AhR ovlivňuje biologickou odpověď na mnohá xenobiotika, polutanty, léčiva a environmentální kontaminanty, které se dostaly do organismu. Po vazbě halogenových a polycyklických ligandů dochází k aktivaci AhR, ale endogenní ligandy AhR nejsou dosud známy. AhR kontroluje xenobiotiky vyvolanou expresi CYP1 enzymů (CYP1A1, 1A2 a 1B1) a enzymů fáze II (UGT1A1, GSTA2, aj). Je to transkripční faktor z rodiny bHLH/PAS (*basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim*), který po vazbě ligandu tvoří heterodimer s AhR-jaderným translokátorem (ARNT: *Ahr nuclear translocator*). Heterodimer se následně může vázat do příbuzných DNA sekvencí označovaných jako XRE (*xenobiotic response elements*) nebo DRE (*digoxin response elements*), které jsou sekvencně odlišné od responzivních elementů členů rodiny NRI1 (Elbi *et al.*, 2002).

## Receptor pro vitamin D (VDR)

Do skupiny ligandem aktivovaných receptorů patří i receptor pro vitamin D, který je přítomen ve většině buněk lidského těla. Vysoká afinita VDR k 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> (kalcitriol) a jeho příbuzným analogům vede k regulaci homeostázy vápníku a fosforu. Po vazbě ligandu je VDR fosforylován, čímž je tento komplex stabilizován (Hsieh *et al.*, 1991). Aktivovaný VDR poté tvoří heterodimer s jedním z volných podtypů RXR (RXR $\alpha$ , - $\beta$  nebo - $\gamma$ ). Tento komplex se váže do sekvence VDRE (*Vitamin D responsive element*) v promotorech cílových genů např. *CYP24A1*, *CYP2B6*, *CYP3A4* aj.

Projevem nedostatku vitaminu D je onemocnění skeletu, např. osteomalacie. Je známo, že při dlouhodobém užívání některých léků, např. rifampicinu nebo fenobarbitalu, dochází ke zvýšenému metabolismu vitaminu D, což může mít zejména u pacientů s nízkou hladinou tohoto vitaminu patofyziologické důsledky. Není znám přesný mechanismus, avšak bylo prokázáno, že aktivované receptory CAR a PXR mohou transaktivovat VDRE v *CYP24A1* promotoru (Pascussi *et al.*, 2005) a to i při absenci tohoto vitaminu (Konno *et al.*, 2009).

### 3.5 Pregnanový X receptor (PXR)

Na základě sekvenční homologie s dalšími jadernými receptory v databázích ESTů (EST: *expressed sequence tag*) byl roku 1998 identifikován pregnanový X Receptor (PXR). Svůj název dostal na základě aktivace pregnanovými steroidy (21C; například PCN: *pregnenolon 16 $\alpha$ -carbonitril*) (Kliewer *et al.*, 1998, Bertilsson *et al.*, 1998), nicméně je aktivován i některými steroidy s menším počtem uhlíků. Je lokalizován v cytoplasmě v komplexu s chaperonovým proteinem Hsp90 a CCRP (*cytoplasmic CAR retention protein*).

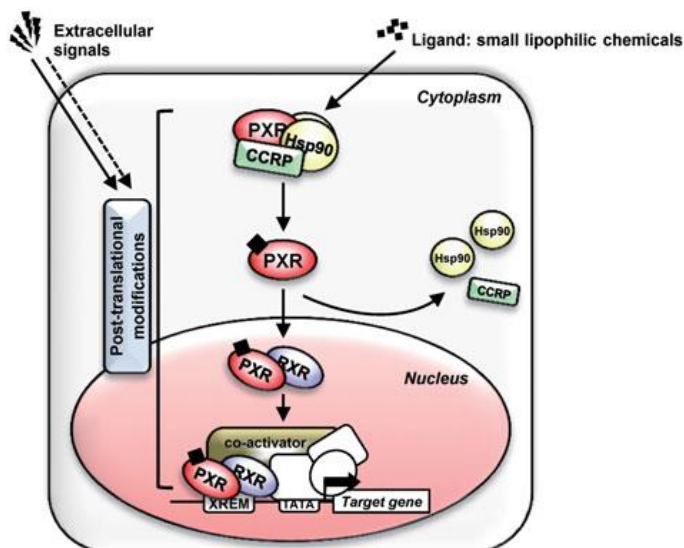
Spolu s CAR a VDR patří do stejné podrodiny receptorů (podrodina NR1I). PXR a CAR byly společně charakterizovány jako primární senzory xenobiotik účastníci se ochrany organismu před škodlivými účinky cizorodých látek. Pozitivní regulací exprese enzymů metabolizujících xenobiotika ovlivňuje PXR detoxifikaci škodlivých látek, ale i aktivaci *prodrug* a zajišťuje homeostázu endobiotik, jako jsou steroidní hormony, cholesteroly a žlučové kyseliny (Kodama and Negishi, 2013). Primárně a nejvíce je PXR exprimován v játrech a v tenkém a tlustém střevě, ale jeho mRNA je detekovatelná i v různých jiných orgánech, jako jsou ledviny, plíce, vaječníky, žaludek a prsní tkáň (Lehmann *et al.*, 1998, Kodama and Negishi, 2013).

PXR je aktivován širokým spektrem strukturně odlišných ligandů. Často se jedná o hydrofóbní sloučeniny, které jsou vázány s poněkud nízkou afinitou (typicky mikromolární). Mezi ně patří různá léčiva (antibiotika, protinádorová léčiva, léky proti diabetu 2. typu, aj), přírodní látky, doplňky stravy (vitamin K2, vitamin E), environmentální polutanty (např. pesticidy) a endobiotika (žlučové kyseliny, estrogeny) (Watkins *et al.*, 2001, Kliewer *et al.*, 2002). Významnými aktivátory PXR jsou například rifampicin, clotrimazol a dexamethazon (Kliewer *et al.*, 1998, Lehmann *et al.*, 1998). Léčiva, která jsou ligandy PXR a indukují expresi enzymů metabolizujících tato a jiná léčiva, mohou navozovat mezilékové interakce. V důsledku toho může docházet k nepříznivým projevům podávaných léčiv (Zhang *et al.*, 2008).

### 3.5.1 DNA-vazebné vlastnosti

Po vazbě ligandu dochází mimo jiné k translokaci PXR do jádra a regulaci exprese cílových genů. Na obrázku č. 2 je schématické znázornění tohoto procesu. Aktivovaný PXR tvoří heterodimer s RXR $\alpha$  (*9-cis retinoid acid X receptor alpha*, NR2B1) a společně se vážou do regulačních oblastí cílových genů rozpoznávaných jako responzivní elementy PXRE (*PXR responsive element*) (Goodwin *et al.*, 1999). Základní sekvencí v těchto oblastech je AG(G/T)CA, které jsou v repeticích uspořádány buď za sebou (DR: *direct repeats*), od sebe (ER: *everted repeats*) nebo palindromaticky proti sobě (IR: *inverted repeats*). Počet nukleotidů, který tyto repetice odděluje, je uveden za zkratkou responzivního elementu. Heterodimer PXR-RXR $\alpha$  rozpoznává motivy DR-3, ER-6 a také DR-4, DR-5 (Kliwer *et al.*, 2002). Nejdříve bylo prokázáno, že se tento heterodimer účinně váže na DR-3 typ přítomný v promotorech genů *CYP3A23* a *CYP3A2* (Kliwer *et al.*, 1998). Později bylo prokázáno, že se váže do DR-3 a ER-6 v *CYP3A4* (Lehmann *et al.*, 1998, Goodwin *et al.*, 1999) a dále do DR-4 a DR-5 (Blumberg *et al.*, 1998). Sekvence DR-4 byla nalezena také u *ABCB1* (Geick *et al.*, 2001).

Obrázek č. 2: Schématické znázornění aktivace PXR a následné exprese cílových genů.



(Převzato z: Kodama et Negishi, 2013).

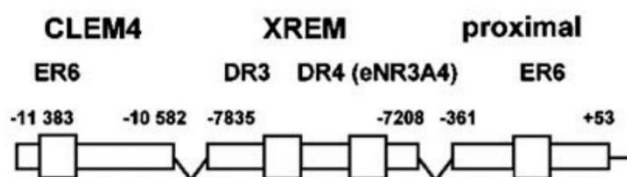
### 3.5.2 Cílové geny

Po vazbě ligandu zprostředkovává PXR aktivaci exprese enzymů I. – III. fáze biotransformace (Maglich *et al.*, 2002, Rosenfeld *et al.*, 2003, Albermann *et al.*, 2005). Dále ovlivňuje metabolismus glukózy, lipidů a žlučových kyselin (Staudinger *et al.*, 2001, Nakamura *et al.*, 2007).

Mezi cílové geny PXR první fáze biotransformace patří především *CYP3A4*. Bylo prokázáno, že PXR je klíčovým regulátorem exprese *CYP3A4*, jelikož je aktivován širokým spektrem léčiv zvyšujících hladinu tohoto enzymu (Lehmann *et al.*, 1998, Goodwin *et al.*, 1999). Mezi další cílové geny v rámci této fáze patří např. *CYP2B6* a *CYP2C9* (Pascussi *et al.*, 2008).

Na obrázku č. 3 je znázorněna promotorová oblast genu *CYP3A4* (Pavek *et al.*, 2010). Sekvence CLEM4 (*constitutive liver enhancer module of CYP3A4*) je esenciální pro konstitutivní aktivaci genu *CYP3A4* a obsahuje ER-6 responzivní element (Matsumura *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2008). Sekvence XREM (*xenobiotic-responsive enhancer module*) obsahuje dva responzivní elementy DR oddělené třemi a čtyřmi nukleotidy (DR-3, DR-4) (Goodwin *et al.*, 1999, Toriyabe *et al.*, 2009) a *upstream* nejbliže k počátku transkripce je proximální sekvence s responzivním elementem ER-6 (Bertilsson *et al.*, 1998).

Obrázek č. 3: Struktura promotoru genu *CYP3A4* v konstruktu s genem pro luciferázu.



(Převzato z: Pávek *et al.*, 2009)

PXR je regulátorem také mnoha enzymů účastnících se II. fáze biotransformace. Mezi ně patří například GSTA1 (GST $\alpha$ ) (Maglich *et al.*, 2002), GSTA4, UGT1A, a jiné glutation-, glukoronosyl-, sulfo-, methyl- a acyl-transferázy (Rosenfeld *et al.*, 2003)

Neméně významný je PXR při regulaci transkripce buněčných transportérů, jako jsou MRD1b a MRP2 (Maglich *et al.*, 2002). Velmi významným *efflux* transportérem je



p-glykoprotein. Na základě lokalizace vazebného místa (DR-4 element) pro PXR v *upstream* sekvenci genu *ABCB1* bylo potvrzeno, že ligandem aktivovaný lidský PXR podporuje expresi p-glykoproteinu v lidských buněčných liniích (Geick *et al.*, 2001, Synold *et al.*, 2001).

Míra exprese cílových genů pregnanového X receptoru je významně ovlivňována účastí regulátorů transkripce, koaktivátorů a korepresorů. Ligandem aktivovaný PXR se váže do regulační sekvence cílového genu a za účasti koaktivátorů spouští transkripci. Aktivaci zajišťují SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), HNF4 $\alpha$  (*hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* ), PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$* ) a vazebný protein p300. Naopak k utlumení transkripce dochází při vazbě korepresorů na sekvenci DNA. Příkladem takových korepresorů jsou NCoR, SMRT a RIP140 (*receptor-interacting protein 140*) (Tirona *et al.*, 2003, Tian, 2013).

### 3.5.3 Post-translační modifikace

Aktivita jaderných receptorů je primárně ovlivňována na úrovni vazby ligandu a navíc může být významně modulována také prostřednictvím post-translačních modifikací, jako jsou fosforylace, ubiquitinace, acetylace a SUMOylace. Vedle post-translačních modifikací přímo v PXR jsou zásadní také interakce s koregulátory (koaktivátory a korepresory) ovlivňujícími funkci PXR .

#### ***Fosforylace:***

V eukaryotické buňce dochází především k fosforylaci aminokyselinových zbytků serinu (Ser), threoninu (Thr) a tyrosinu (Tyr). Post-translační modifikace jaderných receptorů ovlivňují jejich funkci v lidských buňkách a tím mohou být signifikantně asociovány s různými onemocněními. Fosforylace hraje rozhodující roli ve vývoji rakoviny plic, vaječníků a prostaty (Rochette-Egly, 2003).

Bylo dokázáno, že PXR existuje jako fosfoprotein *in vivo*. Inkubací buněk se značeným fosfátem a cAMP nebo cGMP a za přítomnosti rifampicinu byl pomocí autoradiografie detekován fosforylovaný PXR (Lichti-Kaiser *et al.*, 2009b). Tvorbou

specifických mutací ve fosforylačních místech PXR bylo zjištěno, že tyto modifikace mají vliv na transkripční aktivitu PXR, buněčnou lokalizaci receptoru, na vazbu ligandu, tvorbu heterodimeru s RXR $\alpha$ , vazbu do DBD a interakci PXR s transkripčními kofaktory (Lichti-Kaiser *et al.*, 2009a, Lichti-Kaiser *et al.*, 2009b).

Na regulaci transkripční aktivity PXR se podílí série kinázových signálních kaskád, jako jsou například p70 S6K, cyklická AMP-dependentní protein kináza A (PKA), Protein kináza C (PKC), Cyklin-dependentní kináza 2 (Cdk2) a Cdk5 (Pondugula *et al.*, 2009b, Lichti-Kaiser *et al.*, 2009a, Smutny *et al.*, 2013). Cílem mnoha kináz je především AF-1 doména jaderných receptorů, která obsahuje plno fosforylačních míst. Dále může docházet k fosforylaci v pantové oblasti a pouze minimálně jsou post-translačně modifikovány LBD a DBD (Staudinger and Lichti, 2008).

Aktivita CYP enzymů a jejich exprese v játrech je značně potlačována při zánětlivých procesech. Při akutních zánětech se zvyšuje aktivita PKA a PKC, která ovlivňuje transkripční aktivitu lidského PXR a jím zprostředkovanou expresi cytochromů P450. Signalizace přes PKC $\alpha$  zvyšuje sílu vazby mezi PXR a korepresorem NCoR a zároveň potlačuje interakci mezi receptorem a koaktivátorem SRC1 (Ding and Staudinger, 2005b). Po aktivaci PKA například forskolinem (extrakt z rostliny *Coleus forskohlii*) dochází v hepatocytech k indukci exprese genu pro CYP3A přes aktivaci PXR (Ding and Staudinger, 2005a). Po Aktivaci PKA je modulována i schopnost PXR interagovat s proteinovými kofaktory. Vliv PKA na PXR může být specifický v různých organismech. Bylo zjištěno, že v lidských jaterních buňkách má PKA signalizace tlumící vliv na expresi genů zprostředkovanou přes PXR. V jaterních buňkách myši byl naměřen opačný efekt (Lichti-Kaiser *et al.*, 2009b).

Aktivita PXR je regulována také mitogeny-aktivovanými protein kinázami (MAPKs). Tyto serin/threoninové kinázy přenášejí extracelulární signály z aktivovaných membránových receptorů na cílové buněčné struktury a některé jsou schopné přímo fosforylovat PXR. Například, aktivované kinázy MEK1 nebo MEK2 (*mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase*) negativně ovlivňují transkripční aktivitu PXR v buňkách hepatocelulárního karcinomu (HepG2) (Smutny *et al.*, 2013).

S aktivací Cdk2, jednoho z klíčových regulátorů buněčného cyklu, dochází v závislosti na fázi buněčného cyklu k negativnímu ovlivnění exprese CYP3A4.

*Overexpress* Cdk5 vede k represi PXR aktivity, což může být způsobeno fosforylací PXR v Ser350 (Lin *et al.*, 2008, Dong *et al.*, 2010).

PXR je *in vitro* substrátem také ribozomální p70 S6 kinázy (Pondugula *et al.*, 2009a), která je *downstream* substrátem PI3K/Akt/mTOR signální dráhy (viz níže). P70 S6K přímo fosforyluje PXR v DBD (v Thr57), v jednom z kritických aminokyselinových residuí pro aktivitu PXR. Tvorbou mutantů bylo zjištěno, že fosfomimetická mutace v Thr57 (Thr57Aps) vedla ke ztrátě transkripční aktivity PXR v transfekovaných buněčné linii HepG2. Patrně byla narušena schopnost PXR vázat se do promotorové sekvence genu *CYP3A4* (Pondugula *et al.*, 2009a). Spolu s fosforylací Thr57 jsou pro správnou funkci PXR důležité například změny na úrovni Ser8, Ser208, Ser305, Ser350, Thr408 (Lichti-Kaiser *et al.*, 2009a), Thr248 a Thr422 (Doricakova *et al.*, 2013).

### ***Acetylace PXR***

Je známo, že PXR podléhá změnám v acetylaci proteinu, ale ještě donedávna nebylo zcela jasné, která lysinová rezidua v PXR podléhají acetylaci, a které histon acetyltransferázy jsou za to odpovědné (Staudinger *et al.*, 2011, Biswas *et al.*, 2011). Zcela významným objevem (Pasquel *et al.*, 2016) byla identifikace lysinu (Lys109) v pantové oblasti, jako hlavního místa acetylace ve struktuře PXR. Tuto post-translační modifikaci katalyzuje p300 acetyltransferáza a výsledným projevem je utlumení transkripční aktivity PXR. Receptor poté není schopen tvořit heterodimer s RXR $\alpha$  a vázat se tak do responzivních elementů v DNA (Pasquel *et al.*, 2016)

### ***Ubiquitinace a SUMOylace PXR***

Ubiquitinace PXR vede, stejně jako u dalšího proteinů, k degradaci proteazomem. Tento proces je řízen třemi enzymy (E1, E2 a E3), které zaručují kovalentní vazbu ubiquitinu na aminokyselinu histidin (His). Je známo málo o degradaci PXR, nicméně je známo, že inhibicí 26S proteazomu (po aplikaci MG132) dochází ke zvýšení hladiny ubiquitovaného PXR (Staudinger *et al.*, 2011). Za přítomnosti progesteronu byla zjištěna interakce mezi myším PXR a proteazomem, konkrétně komponentem proteazomu SUG1 (*suppressor for gal 1*). Na základě zjištění Masuyama *et al.* (2002) se

předpokládá, že interakce mezi PXR a SUG1 je součástí procesu degradace proteazomem. Navíc, degradace PXR proteazomem byla potvrzena po aplikaci inhibitorů proteazomu, což mělo za následek výrazné zvýšení hladiny proteinu PXR (Masuyama *et al.*, 2002). Konkrétní ubiquitin E3 ligáza, která interaguje s lidským PXR, je například RBCK1 (*Ring-box-coiled-coil protein interacting with protein kinase C-1*). Ta váže ubiquitiny na hPXR a tím ho může cílit při degradaci proteazomem (Rana *et al.*, 2013).

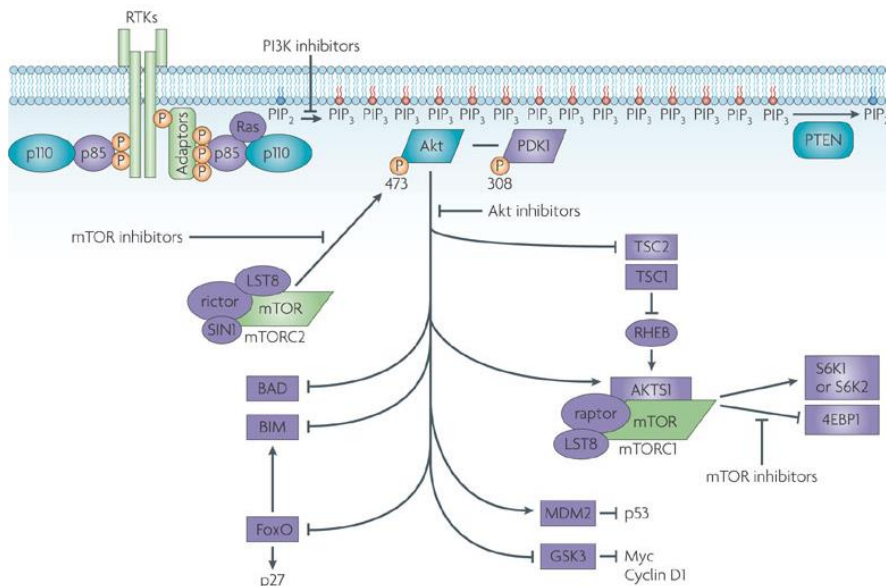
Modulace funkce PXR je zprostředkována také malými signálními proteiny SUMO (*small ubiquitin related modifier*). Enzymy zapojené do procesu SUMOylace zajišťují konjugační a dekonjugační procesy, které jsou podobné procesu ubiquitinace, nicméně nevedou k degradaci proteinů (Hu *et al.*, 2010, Staudinger *et al.*, 2011). Jisté pojitko mezi PXR-zprostředkovanou aktivací genů, metabolismem léčiv a zánětlivými procesy přinesli Hu *et al.* (2010). V odpovědi na zánět v jaterních buňkách dochází k ovlivnění SUMOylace v ligandem aktivovaném PXR. V lidském genomu jsou tři funkční geny, které kódují SUMO1 – 3 podílejících se na tomto procesu. Při expozici organismu xenobiotikům se na PXR preferenčně váže SUMO3 a dochází k potlačení imunitní odpovědi v jaterních buňkách (Hu *et al.*, 2010). Vliv SUMOylace na PXR byl zkoumán také na úrovni exprese CYP3A4 a Pgp. Po aktivaci receptoru rifampicinem byla SUMOylací potlačena exprese cílových genů na úrovni mRNA i proteinů. Předpokládá se, že změny na úrovni SUMOylace PXR mohou ovlivnit metabolismus léčiv (CYP3A4) a jejich transport z buňky ven (Pgp) (Tan *et al.*, 2015).

## 4 mTOR SIGNALIZAČNÍ DRÁHA

Savčí varianta TOR kinázy, označovaná mTOR (*mammalian target of rapamycin*) nebo například FRAP (*FKBP12 and rapamycin-associated protein*) je serin/threoninová kináza, která hraje důležitou roli v mnoha buněčných procesech. V závislosti na množství živin a růstových faktorech v okolí buňky, ovlivňuje mTOR energetický metabolismus, syntézu proteinů, proliferaci a buněčný růst, autofagii a apoptózu (Jacinto *et al.*, 2004, Wullschleger *et al.*, 2005, Sarbassov *et al.*, 2005a). Dosud jsou známy dvě hlavní funkce mTOR. První je aktivace kinázy p70 S6 a druhou je aktivace eukaryotického iniciačního faktoru eIF-4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*). Obě cesty vedou v konečném důsledku k syntéze proteinů a přechodu buňky do S-fáze buněčného cyklu.

Protein kináza mTOR je součástí PI3K/Akt signální dráhy (PI3K: *Phosphoinositide-3-kinase*), která je schematicky znázorněna na obrázku 4. Za fyziologických podmínek je PI3K/Akt/mTOR signální dráha aktivována vazbou ligandů na receptor (např. tyrozin-kinázový receptor). Aktivovaný receptor přenáší signál do intracelulárního prostoru tak, že PI3K se váže do buněčné membrány, kde může fosforylovat fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3). PIP3, jako druhý posel, ovlivňuje Akt signální dráhu. Akt je aktivována fosforylací na dvou místech: v katalytické doméně na Thr308 a v regulační doméně na Ser473. Katalytickou doménu fosforyluje PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) a regulační doménu fosforyluje mTOR komplex 2 (Sarbassov *et al.*, 2005b). Plně aktivovaná Akt reguluje své substráty a tím dochází, mimo jiné, k aktivaci mTOR komplexu 1.

Obr. č. 4: Schématické znázornění signální dráhy PI3K/Akt/mTOR.



Převzato z: (Engelman, 2009).

#### 4.1 Komplexy mTORC1 a mTORC2

Označení mTOR zahrnuje dva multiproteinové komplexy (mTORC1 a mTORC2) (Sarbassov et al., 2005a). Oba komplexy sdílí katalytickou podjednotku mTOR a protein mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*), také známý jako GβL, dále obsahují protein DEPTOR interagující s mTOR a komplex Tti1/Tel2 (Jacinto et al., 2004, Peterson et al., 2009, Kaizuka et al., 2010).

Součástí mTOR komplexu 1 (mTORC1) jsou navíc proteiny RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*) (Hara et al., 2002) a k němu se vázající PRAS40 (Sancak et al., 2007). Důležitými efektory tohoto komplexu jsou ribozomální protein kinázy S6 (S6K) a 4E-BPs (*4E-eIF4E-binding proteins*). Jejich regulací může mTORC1 ovlivňovat syntézu proteinů a buněčný růst. Aktivní mTORC1 podněcuje syntézu proteinů a lipidů a energetický metabolismus, zatímco tlumí autofagii a tvorbu lysozomů.

Klíčovým regulátorem mTORC1 je komplex proteinů TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis 1/2*), které inhibují GTPázu Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) a ta přímo

interaguje a aktivuje mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003). Protein 4E-BP1 je aktivovaným mTORC1 fosforylován, tím dochází k jeho disociaci z komplexu s eIF4E (iniciační faktor eukaryotní translace) a může dojít k translaci mRNA (Beretta *et al.*, 1996). Transkripční faktor eIF4E je důležitý pro vazbu specifické čepičky na mRNA při iniciaci eukaryotní translace. Translace je tedy regulována především na úrovni iniciace. Kinázovou aktivitu p70 S6 kinázy *in vivo* nejvíce ovlivňuje fosforylace Thr389 (Weng *et al.*, 1998). Cíleně fosforylovaná S6K1 zpětně reguluje PI3K, nicméně jejími hlavními substráty jsou ribozomální S6 protein a regulátory translace eEF2 a eIF4B (Wang *et al.*, 2001, Raught *et al.*, 2004).

Vedle proteinů, které sdílí oba mTOR komplexy, se v rámci mTORC2 uplatňují ještě proteiny RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSin1 a protor 1/2 (Jacinto *et al.*, 2004, Jacinto *et al.*, 2006, Pearce *et al.*, 2007). Substrátem mTORC2 je kináza Akt/PKB (fosforyluje ji v Ser473), která je důležitá pro přežití buňky (Hresko and Mueckler, 2005, Sarbassov *et al.*, 2005b). mTORC2 ovlivňuje také PKC a cytoskeletání aktin (Sarbassov *et al.*, 2004), protože v odpovědi na množství živin v okolí buňky dokáže signalizovat přes Rho-GTPázy v aktinovém cytoskeletu (Jacinto *et al.*, 2004).

Špatná regulace mTOR signální dráhy je často společným znakem mnoha onemocnění. Hyperaktivita této dráhy, spolu se ztrátou senzitivity na rapamycin, může vést k aktivaci signálních drah, které nemají být aktivní (Kopelovich *et al.*, 2007). Často je pozorována ztráta funkce genu pro tumorsupresor PTEN (*phosphate and tensin homolog*) a následná amplifikace PIK3 a Akt, které vedou k rakovinovému bujení (Thompson and Thompson, 2004). Inhibicí mTOR je indukována smrt rakovinových buněk přes mechanismu autofagie a apoptózy (Fasolo and Sessa, 2012). Tím je mTOR signalizace zohledňována jako potencionální cíl v léčbě mnohých typů rakovin a malé molekuly, které cílí mTOR, nabývají na zájmu mnoha studií. Příkladem je imunosupresivum rapamycin a jeho analogy, jehož efekt na mTOR signální dráhu je vysvětlen níže.

## 4.2 Rapamycin

Rapamycin je makrolidové fungicidní antibiotikum (izolované z bakterie *Streptomyces hygroscopicus*) užívané dnes jako imunosupresivum, zejména u pacientů po transplantacích. Inhibice klíčové proteinkinázy mTOR blokuje řadu nitrobuněčných procesů. Bylo dokázáno, že rapamycin negativně ovlivňuje funkci mTORC1, nikoli však mTORC2 (Jacinto *et al.*, 2004, Sarbassov *et al.*, 2004). Efekt, kterým rapamycin a jeho analogy ovlivňuje mTOR signalizaci, je komplexní a zahrnuje tvorbu komplexu rapamycinu s intracelulárním proteinem FKBP12 (*12-kDa FK506-binding protein*). Komplex rapamycin-FKBP12 inhibicí kinázy mTORC1 a mTORC2 zabrání přechodu buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu (Sehgal, 1998). Tento komplex přímo interaguje a inhibuje mTORC1: rapamycin se váže do specifické domény v komplexu mTORC1 a tím dochází ke konformačním změnám v jeho aktivním místě a alosterické inhibici jeho katalytické funkce (Brown *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1995). Inhibice mTORC1 přímo souvisí s defosforylací proteinu 4E-BP1 (Beretta *et al.*, 1996). Rapamycin je ve výsledku inhibitorem translace závislé na čepičce ve většině eukaryotických buněk. Choo *et al.* (2008) potvrdili, že rapamycin inhibuje mTORC1 a tím i translaci mechanismem, při kterém zcela inhibuje aktivitu proteinů S6K, nicméně inhibiční efekt na 4E-BP1 se vytratil v průběhu 6 hodin. Takže je možné, že 4E-BP1 je ovlivněn ne přímo rapamycinem, ale proteiny mTOR, RAPTOR a komplexem mTORC1 (Choo *et al.*, 2008)

Bylo dokázáno, že rapamycin může v mnoha typech buněk ovlivňovat i mTORC2, a to přes modulaci Akt/PKB (Sarbassov *et al.*, 2006). Testováno na myších, vysoké dávky rapamycinu (20 mg/kg) redukuje fosforylaci Akt (v Ser473), která je *downstream* cíl mTORC2 (Yang *et al.*, 2015).

Často je v nádorových buňkách pozorována rezistence na rapamycin. Jedním z vysvětlení je, že inhibicí mTORC1 dochází k aktivaci IRS1 (*insulin receptor substrate*) a následkem toho k signalizaci PI3K/Akt a mTORC2 a snížení účinnosti rapamycinu a jeho analogů (O'Reilly *et al.*, 2006). Proto jsou zkoumány tzv. mTOR inhibitory druhé generace, které cílí buďto oba komplexy (mTORC1 i mTORC2), nebo mTOR spolu s PI3K. Tyto malé molekuly se reverzibilně váží do ATP-vazebného místa v kinázové doméně nebo do těsně přilehlé oblasti a tím blokuje katalytickou doménu kinázy. Takto



je efektivněji blokována buněčná proliferace rakovinových buněk (Liu and Gray, 2006, Shor *et al.*, 2009).

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Chemikálie, přístrojové vybavení a biologický materiál

#### Chemikálie a roztoky

- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich)
- 75% ethanol (Sigma-Aldrich)
- Acrylamid (Bio Basic Canada INC.)
- Činidlo Bradfordové (B6916, Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Lach-Ner s.r.o.)
- dNTP 10 mmol (dCTP, dTTP, dCTP, dATP; TaKaRa)
- Duplecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Expresní vektor pro lidský PXR (pSG5-hPXR, od Dr. S. Kliewera, Univerzita v Texasu, Dallas)
- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich)
- FuGENE® HD transfection reagent (Roche Diagnostic Corporation)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol (Lab-Nev s.r.o)
- Inhibitor fosfatáz PhosSTOP (Roche Diagnostic Corporation)
- Inhibitor proteáz cOmplete (Roche Diagnostic Corporation)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Lach:ner)
- M-MuLV (reverzní transkriptáza; 200000 U/ml, Biolabs)
- NaCl (Lach:ner)
- Náhodné primery (TaKaRa, N2201FA)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich)
- Odtučněné sušené mléko (Laktino)
- PBS (pH = 7,4; Gibco)
- Penicilin (Penicilin, 10000 U/ml, Gibco)
- Persíran amonný (Sigma-Aldrich)
- Primární protilátka Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (2855; rabbit monoclonal, Cell signaling technology)

- Primární protilátka proti Phospho-p70 S6 kinase (Ser371) (9234, 9208; rabbit monoclonal, Cell signaling technology)
- Primární protilátka proti ABCB1 (sc-55510, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Primární protilátka proti  $\beta$ -Aktinu (sc-47778; mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Primární protilátka proti CYP3A4 (sc-53850; mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Primery pro *ABCB1* (konc. 0,1 mmol; R: 1064U5, F: 1064U4, Generi Biotech)
- Primery pro *CYP3A4* (konc. 0,1 mmol; R: 836P6, F: 836P5, Generi Biotech)
- Primery pro *GAPDH* (konc. 0,1 mmol; R: 836P8, F: 836P7, Generi Biotech)
- Primery pro *RPS18* (konc. 0,1 mmol; R: 1064U7, F: 1064U6, Generi Biotech)
- Probes Master (Roche)
- Rapamycin (Sigma-Aldrich)
- Reportérový plasmid s promotorovou oblastí genu *CYP3A4* (p3A4-luc, Promega)
- Rifampicin (Sigma-Aldrich)
- RNA inhibitor (Biolabs)
- Sekundární protilátka proti  $\beta$ -Aktinu, CYP3A4 a ABCB1 (sc-2005; goat anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology)
- Sekundární protilátka pro detekci Phospho-4E-BP1 a 6S kinázy (7074; goat anti-rabbit, Cell signaling technology)
- Streptomycin (Streptomycin, 10000 U/ml, Gibco)
- Western Blotting Luminol Reagent (100ml Kit, Li-Cor, Santa Cruz Biotechnology)
- TEMED (Bio Basic INC.)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (98%; Sigma-Aldrich)
- TRI Reagent (Sigma-Aldrich, T9424)
- TRITON X-100 (Sigma-Aldrich)
- UPL sonda pro *ABCB1* (101705, Roche Diagnostic Corporation)
- UPL sonda pro *CYP3A4* (č. 38; 144035, Roche Diagnostic Corporation)
- UPL sonda pro *GAPDH* (č. 60; 105132, Roche Diagnostic Corporation)
- UPL sonda pro *RPS18* (č. 70; 144409, Roche Diagnostic Corporation)

### **LB pufr pro SDS-PAGE**

- 65,8 mmol/l TRIS (pH = 6,8)
- 2,1% SDS
- 26,3% (w/v) glycerol
- 0,01% bromfenolová modř

### **Lyzační pufr pro Reporter gene assay**

- 5x lyzační pufr
- ddH<sub>2</sub>O

### **Lyzační pufr pro izolaci proteinů**

- 1 tbl. inhibitoru proteázy
- 1 tbl. inhibitoru fosfatázy
- 10 ml RIPA pufr

### **10x PBS v 500 ml - fosfátový pufr (pH 7,4 - 7,5)**

- 40 g NaCl
- 1 g KCl
- 16,05 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O
- 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O

*Ze sterilního 10x PBS si připravujeme 1x PBS.*

### **TBS/TWEEN**

- 1 litr 1x TBS
- 500 µl TWEEN

### **RIPA pufr**

- 150mmol/l NaCl
- 10mmol/l TRIS (pH 7,2)
- 0,1% SDS
- 1% TRITON X-100
- 1% deoxycholát
- 5mmol/l EDTA

### **Substrát pro luciferázu**

- 5 mg D-luciferinu
- 9,6 mg ATP
- 6,38 mg koenzymu A
- 168 mg DTT
- 1,32 ml 1mol/l TRIS-acetátu (pH 7,8)
- 1,23 mg EDTA
- 30,3 mg MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

*Doplníme do 30 ml ddH<sub>2</sub>O a zamrazíme v -20 °C.*

### **Přístrojové vybavení**

- Blotovací přístroj Trans-Blot, SD Semi-Dry transfer cell (Biorad, USA)
- Casy Innovatis (Roche, Švýcarsko)
- Centrifuga (5415R, Eppendorf, ČR)
- Centrifuga Mini (Labnet International, USA)
- Culture incubator Mitre 4000 series (Contherm, Nový Zéland)
- Deep Freezer VXE 380 (Jouan, Francie)
- Dry bath incubator (Major science, USA)
- Elektroforetická komůrka pro SDS-PAGE (Biorad, USA)
- Laminární box Labculture® Class II Type A2 (ESCO, USA)
- Lednice A+ (Gorenje, Slovinsko)
- Light Cyclor 2.0 (Roche, Švýcarsko)

- Mikroskop (Olympus)
- NanoDrop LITE Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Skener (Li-Cor, USA)
- Spektrofotometr Infinite M200 PRO (Tecan, Schoeller, ČR)
- Váhy (KERN ABS, USA)
- Vodní lázeň (LabTech Co., LTD; ČR)
- Vortex (Heidolph, Germany)
- Výrobek šupinkového ledu F100 (Compact, ČR)
- Zdroj napětí (CS-500V; Cleaver Scientific LTD, VB)

### **Biologický materiál a plasmidy**

Adherentní buněčná linie LS174T odvozená od lidského adenokarcinomu tlustého střeva a linie HEK293T odvozená z lidských embryonálních buněk ledvin byly kultivovány v Duplecco's modified Eagle's medium (DMEM) obohaceném o 100 U/ml streptomycin a penicilin, 4 mM L-glutamin, 10% fetální bovinní sérum, a 1% neesenciální aminokyseliny. Podmínky kultivace v inkubátoru byly nastaveny na 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> a nasycené vzdušné vlhkosti.

Pro detekci aktivity luciferázy byl do buněčné linie HEK293T vnesen savčí expresní plasmid pSG5-hPXR od dr. S. Kliewera (Univerzita v Texasu, Dallas) a dále reportérový vektor p3A4-luc. Tento vektor byl připraven z reportérového vektoru pGL4.10, do kterého byla vložena bazální (-361/+53) a distální (Xrem, -7835/-7208) oblast promotoru genu *CYP3A4* s vazebnými místy pro PXR (Promega, Madison) (Pavek *et al.*, 2010).

## **5.2 Metody**

### **Kultivace buněčných linií**

Z kultivační lahve s buněčnou linií bylo odsáto médium a přidáno PBS. To bylo také odsáto a na buňky byl aplikován roztok 0,25% trypsinu. Po uvolnění buněk ze dna kultivační lahve bylo přidáno DMEM médium s fetálním bovinním sérem přečištěným

pomocí aktivního uhlí. Buňky byly spočítány pomocí přístroje Casy (Roche) a vysety na kultivační desku.

### Aplikace látek

Na buněčné linie byly po 16–24 hod od vysetí buněk aplikovány látky (viz tabulka č. 1), které byly předem rozpuštěny v DMSO. Po dalších 24 hod byl experiment ukončen, respektive v případě následné izolace proteinů byl ukončen až po 48 hod. K buňkám sloužícím jako negativní kontrola bylo přidáno kultivační médium doplněné pouze o DMSO, bez testovací látky. Výsledná koncentrace DMSO nepřesáhla 0,2 %. Látky spolu s DMSO byly před aplikací na buněčné linie přidány do 2 ml kultivačního média doplněného o fetální bovinní sérum přečištěné pomocí aktivního uhlí.

Tabulka č. 1: Přehled látek a jejich výsledných koncentrací aplikovaných na buněčné linie.

	Negativní kontrola	Rif 10 $\mu\text{mol/l}$	Rap 1 ng/ml	Rap 20 ng/ml	Rif 10 $\mu\text{mol/l}$ +	
					Rap 1 ng/ml	Rap 20 ng/ml
Testovaná látka [ $\mu\text{l}$ ]	0	2	2	2	2 + 2	2 + 2
DMSO [ $\mu\text{l}$ ]	4	2	2	2	0	0

*pozn. Pro metodu Reporter gene assay byly látky aplikovány v tetraplikátu, tzn. pracovní roztok připravený dle tabulky č. 1 byl rozpipetován do 4 jamek 24jamkové desky.*

Po uplynutí doby nutné pro působení látek byly buňky promyty 1 ml vychlazeného 1xPBS. Pro detekci aktivity luciferázy a izolaci proteinů byl k buňkám přidán lyzační pufr specifický pro danou metodu. V případě následné qRT-PCR byl na buňky aplikován TRI Reagent a dle pokynů výrobce izolována celobuněčná RNA.

### MTT test

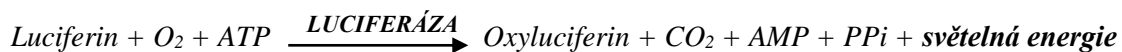
Ke stanovení toxického účinku rapamycinu na buněčné linie HEK293T a LS174T byl použit MTT test. Tato kalorimetrická metoda je založena na faktu, že metabolicky aktivní buňky (se zdravými mitochondriemi) jsou schopné metabolizovat (enzymem

sukcinátdehydrogenázou) žlutý roztok 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na fialovo-modrý nerozpustný formazán. Krystalky formazánu jsou následně uvolněny z buněk a rozpuštěny pomocí silného detergentu. Spektrofotometricky je stanovena absorbance roztoku formazánu, jejíž hodnoty jsou úměrné životaschopnosti buněk po působení testované látky. Čím jsou hodnoty absorbance vyšší, tím vyšší je množství živých buněk.

Buněčné linie HEK293T a LS174T byly vysety na 96jamkovou desku ( $2,5 \times 10^4$  buněk/jamku). Další den bylo k buňkám přidáno živné médium obohacené o 1% rapamycin v koncentračním rozmezí od 0,1 – 40 ng/ml. Následující den bylo médium odstraněno, buňky byly promyty 1x PBS a byly inkubovány (cca 30 min) s 10% roztokem MTT (konc. 3 mg/ml deionizované vody) v živném médiu. Po inkubaci byl roztok MTT odstraněn a vzniklé krystalky formazánu byly za velmi mírného třepání rozpuštěny v DMSO. Míra zabarvení čirého roztoku byla detekována spektrofotometricky, stanovením absorbance při vlnové délce 540 nm.

### **Reporter Gene Assay**

Tato metoda je využívána ke studiu genové exprese na úrovni transkripce. Do buněčné linie je transfekován expresní vektor nesoucí regulační oblast (promotor) genu, který je zkoumán. Dále je součástí vektoru reportérový gen (např. gen pro luciferázu) s lehce měřitelnou aktivitou, jehož exprese je tímto promotorem regulována. Aktivací promotoru dochází k expresi genu pro luciferázu a funkční enzym katalyzuje oxidaci specifického substrátu za vzniku energie. Tato energie je vyzařována ve formě světla a je možné velmi citlivě detekovat luminiscenci při vlnové délce 560 nm. Míra vyprodukovaného světelného záření je úměrná aktivitě luciferázy, tedy transkripční aktivitě promotoru.



Buněčná linie HEK293T byla transientně transfekována lipofekcí. Pomocí FuGENE® HD byl do buněk vnesen reportérový plasmid p3A4-luc (0,3 µg/jamku) a expresní vektor pSG5-hPXR (0,1 µg/jamku). Následně byla linie vyseta na 24jamkovou desku ( $10^5$  buněk/jamku). Po 16hod stabilizaci bylo médium vyměněno za médium



obsahující jednotlivé látky o výsledné koncentraci (viz tabulka č. 1) a buňky byly takto inkubovány dalších 24 hod. Další den byly buňky zbaveny média a promyty vychlazeným PBS. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l lyzačního pufru pro Reporter gene assay a kulturační deska byla na minimálně 15 min uložena do  $-80$  °C.

Po rozmražení buněčné suspenze při pokojové teplotě bylo odebráno 7  $\mu$ l buněčné suspenze a k ní přidáno 70  $\mu$ l luciferázového substrátu. Na základě spektrofotometrických měření byla detekována aktivita genu pro luciferázu.

### **Kvantitativní Real-Time polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)**

Tato velice citlivá, rychlá a specifická metoda má základ v klasické PCR. S použitím speciálního termocykléru umožňuje sledovat průběh reakce v reálném čase. Množství amplikonů je detekováno na základě měření emitované fluorescence, kterou vyzařují interkalační barviva nebo próby navázané v/na molekule templátu. Touto metodou je možné sledovat kvalitativní i kvantitativní změny na úrovni molekuly nukleové kyseliny. Za použití vnitřního standardu (referenčního genu, *housekeeping* genu) lze porovnávat hladiny amplikonů mezi standardem a vzorkem a tím určovat relativní kvantifikaci. Je však možné stanovit i absolutní kvantifikaci pomocí křivky tání, kterou vyhodnotí termocyklér. Templátem pro qRT-PCR může být DNA, cDNA nebo RNA.

Pro izolaci RNA byly buňky vysety na 6jamkovou desku v množství  $10^6$  buněk/jamku. Po 24 hod byly na buňky aplikovány látky (dle tabulky č. 1). Po dalších 24 hod byly buňky promyty pomocí vychlazeného roztoku 1xPBS. Celobuněčná RNA byla izolována pomocí TRI Reagentu a dle pokynů výrobce.

Do roztoku RNA o koncentraci 200 ng/ $\mu$ l byly přidány náhodné primery a společně inkubovány při 65 °C/5 min. S použitím M-MuLV reverzní transkriptázy byla syntetizována cDNA. Složení kompletního mixu je uvedeno v tabulce č. 2. Následným ředěním v ddH<sub>2</sub>O byla získána cDNA.

Pro kvantitativní Real-Time PCR byla tato cDNA pipetována v triplicátu do 96jamkové desky spolu s PCR mixem. Jednotlivé složky PCR mixu spolu s objemy jsou uvedeny v tabulce č. 3. Jako referenční (*housekeeping*) gen sloužil *GAPDH* gen.

Sekvence primerů pro geny *GAPDH*, *CYP3A4*, *ABCB1* a *RPS18* jsou uvedeny v tabulce č. 4. Podrobný průběh PCR reakce je v tabulce č. 5.

Tabulka č. 2: Složení mixu pro přepis RNA do cDNA.

<b>Reagencie</b>	<b>Množství pro jeden vzorek (1000 ng cDNA)</b>
M-MuLV (reverzní transkriptáza)	0,6
RNase inhibitor	0,3
dNTP (10mM)	0,6
10x reakční pufr	1,2
ddH <sub>2</sub> O	3,3
<b>Celkem</b>	<b>6</b>

Tabulka č. 3: Složení a objemy jednotlivých složek PCR mixu.

<b>Reagencie</b>	<b>Objem [μl/jamku]</b>
Probes Master	5
Proba	0,2
Primery R + F (0,1 mmol/l)	0,8
ddH <sub>2</sub> O	2
cDNA	2

Tabulka č. 4: Sekvence primerů pro geny *GAPDH*, *CYP3A4*, *ABCB1* a *RPS18*.

	Sekvence primeru (forward)	Sekvence primeru (reverse)
<b>CYP3A4</b>	TGTGTTGGTGAGAAATCTGAGG	CTGTAGGCCCCAAAGACG
<b>GAPDH</b>	CTCTGCTCCTCTGTTCGAC	ACGACCAAATCCGTTGACTC
<b>ABCB1</b>	CCTGGAGCGGTTCTACGA	TGAACATTCAGTCGCTTTATTCT
<b>RPS18</b>	CGCTCTCTTCCACAGGAG	GCAGTGATGGCAAAGGCTAT

Tabulka č. 5: Průběh Real-Time PCR

Formát detekce	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL probes			
	Preinkubace	Amplifikace		Chlazení
<b>Cyklus</b>				
<b>Teplota [°C]</b>	95	95	60	40
<b>Čas</b>	10 min	10 s	30 s	30 s
<b>Počet cyklů</b>	1	45		1
<b>Celkový objem reakce</b>	10 µl			

### SDS-PAGE a Western blotting

Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS) je velmi citlivá metoda, která umožňuje rozdělit proteiny dle elektroforetické mobility v gelu, což odpovídá rozdělení dle jejich molekulových hmotností. Každá molekula proteinu je obalena vrstvou SDS, který tak celé molekule udává relativně rovnoměrný negativní náboj. Proteiny jsou vlivem elektrického pole unášeny k anodě a při průchodu gelem jsou zachytávány jako na sítu. Větší molekuly se zpomalují dříve než menší, které doputují v gelu dále. Následně jsou metodou western blotting proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu. Přenos na membránu probíhá taktéž v elektrickém poli. Proteiny na membráně jsou detekovány pomocí specifických protilátek a vizualizovány po přidavku substrátu.

Každý vzorek pro detekci proteinů obsahoval lyzát buněk z jedné jamky 6jamkové desky, na kterou bylo vyseto  $10^6$  buněk. Látky byly aplikovány (viz tabulka č. 1) po 24 hod od vysetí a působily po dobu 48 hod. Poté byly buňky promyty roztokem

1xPBS a mechanicky seškrabány ze dna kultivační desky. Suspenze buněk byla centrifugována při 4500 rpm/5 min a získaný pelet byl rozpuštěn ve 150 µl lyzačního pufru pro izolaci proteinů. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 13000 rpm/13 min. Supernatant byl odebrán a použit pro měření koncentrace proteinů spektrofotometrickou metodou Bradfordové při 595 nm. K lyzátům byl přidán dávkovací pufr 2x LB a při 95 °C byly 5 min denaturovány.

Připravené vzorky proteinů byly separovány v SDS-polyakrylamidovém gelu. Do gelu bylo nanášeno 15 µg proteinového vzorku ve směsi s vodou a LB puftrem. Pro separaci v 4% zaostřovacím gelu byl nastaven konstantní elektrický proud 15 mA. Na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu se proteiny fokusují. Pro dělení proteinů v 10% separačním gelu byl nastaven konstantní elektrický proud 30 mA a doba separace cca 1,5 hod.

Poté byly proteiny z gelu přeneseny na membránu pomocí metody western blotting. Podmínky pro blotování byly nastaveny na konstantní elektrický proud 350 mA a napětí max. 25 V po dobu 1,5 hod.

Membrána s proteiny byla nejprve hydratována metanolem a následně 1 hod blokována pomocí 5% roztoku mléka v TBS/TWEEN pufru. Následně byla membrána promývána 3 x 5 min v TBS/TWEEN pufru a poté byl na ni aplikován roztok 5% BSA v TBS/TWEEN s primární protilátkou. Po 24hod inkubaci byla membrána opět promývána - 3 x 5 min v TBS/TWEEN. Po dobu 1 hod byla membrána inkubována s roztokem 2,5% BSA v TBS/TWEEN se sekundární protilátkou a opět promývána 3 x 5 min. Po dobu 5 min byl na membránu aplikován chemiluminiscenční substrát a následně byly pomocí skeneru detekovány proteinové obrazy pro CYP3A4, p-glykoprotein a aktin. Výsledky imunodetekce byly kvantifikovány pomocí softwaru Image Studio Digits a následně normalizovány na aktin.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Viabilita buněčné linie HEK293T a LS174T po aplikaci rapamycinu

Na buněčných liniích HEK293T a LS174T bylo testováno cytotoxické působení rapamycinu pomocí MTT testu. Metabolicky aktivní buňky dokážou metabolizovat žlutý roztok MTT na fialový formazán. Míra fialového zbarvení roztoku je dána poměrem živých a mrtvých buněk - čím méně je roztok fialový, tím méně buněk je životaschopných a to vypovídá o větší toxicitě testované látky. Buněčná linie byla inkubována s rapamycinem v koncentračním rozmezí 0,1 – 40 ng/ml a po 24 hod byl k buňkám přidán roztok MTT.

Pozitivní kontrolou byl vzorek buněčné linie s přídatkem 2% roztoku tritonu. Jako negativní kontrola byl měřen vzorek buněčné linie po aplikaci rapamycinu v nejnižší testované koncentraci. Spektrofotometricky byla stanovena absorbance při vlnové délce 570 nm a hodnoty získané pro rapamycin byly srovnávány s negativní kontrolou, která vykazuje 100% viabilitu buněk. Látky byly aplikovány v osmi opakováních. Viabilita buněk byla odečtena jako rozdíl výsledné absorbance pro testované látky a absorbance pozitivní kontroly, a tato hodnota byla nadále ještě dělena rozdílem hodnot negativní a pozitivní kontroly.

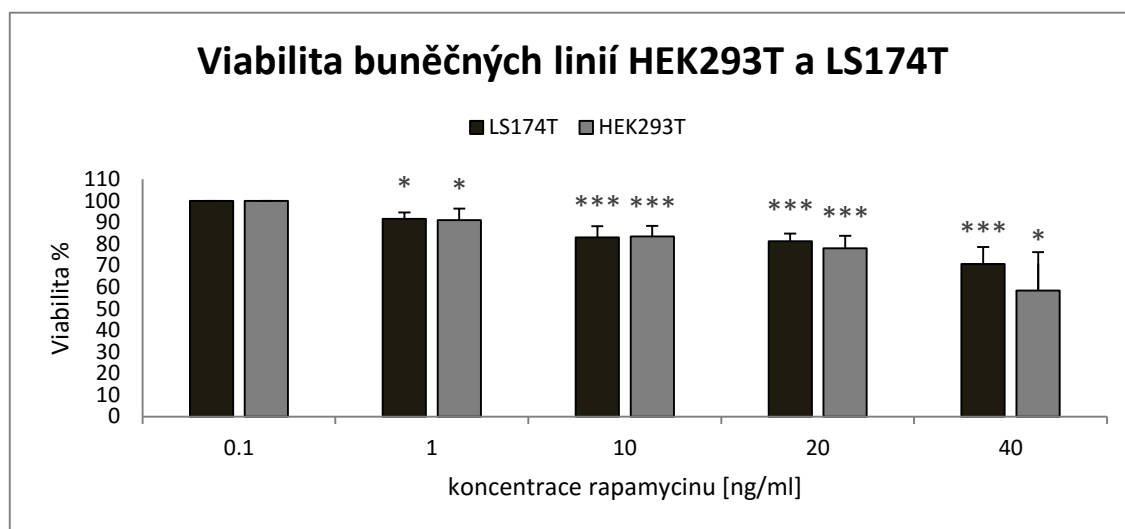
$$Viabilita (\%) = \frac{Abs(tl) - Abs(poz)}{Abs(neg) - Abs(poz)} \times 100$$

\*pozn.: **tl** – testovaná látka, **poz** – pozitivní kontrola, **neg** – negativní kontrola

U většiny testovaných koncentrací nebyl zaznamenán výrazný pokles viability buněk. Působením rapamycinu o koncentraci 1 ng/ml vykazovaly obě buněčné linie stejnou viabilitu (91 %). Po působení rapamycinu (Rap) o koncentraci 10 ng/ml byla naměřena viabilita 83 % pro obě buněčné linie. Ke změnám v průměrné viabilitě mezi buněčnými liniemi HEK293T a LS174T dochází až při testování Rap 20 ng/ml. V rámci buněčné linie HEK293T byla naměřena viabilita 78 % a v linii LS174T 81 %. Jednalo se o přibližně 20% pokles, který byl vyhodnocen jako statisticky významný a tato hraniční koncentrace je ještě považována za netoxickou. Výraznější pokles viability byl pozorován

u koncentrace 40 ng/ml. Výsledky ukazují, že tato látka vykazuje toxický účinek na obě buněčné linie. U linie HEK293T klesla životaschopnost o 42 % a u linie LS174T o 30 %. Na základě těchto zjištění byla v následujících měřeních použita koncentrace 1 a 20 ng/ml. Vzhledem k tomu, že linie HEK293T byla na rapamycin citlivější, byla u metody Reporter gene assay provedena normalizace na stanovenou viabilitu. Hodnoty v grafu č. 1 jsou statisticky významné a jsou průměrem z 3 nezávislých měření.

**Graf č. 1: Vliv rapamycinu na viabilitu buněčné linie LS174T a HEK293T.**



Rapamycin byl aplikován na buňky v koncentračním rozmezí od 0,1 - 40 ng/ml a po 24 hodinách působení byla pomocí MTT testu detekována viabilita těchto buněk. Data jsou průměrem ze tří nezávislých měření  $\pm$  SD a viabilita buněčné linie byla vztažena k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu buněk. Na základě studentova *t*-testu jsou hodnoty označené [\*] statisticky významné - \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,005$ .

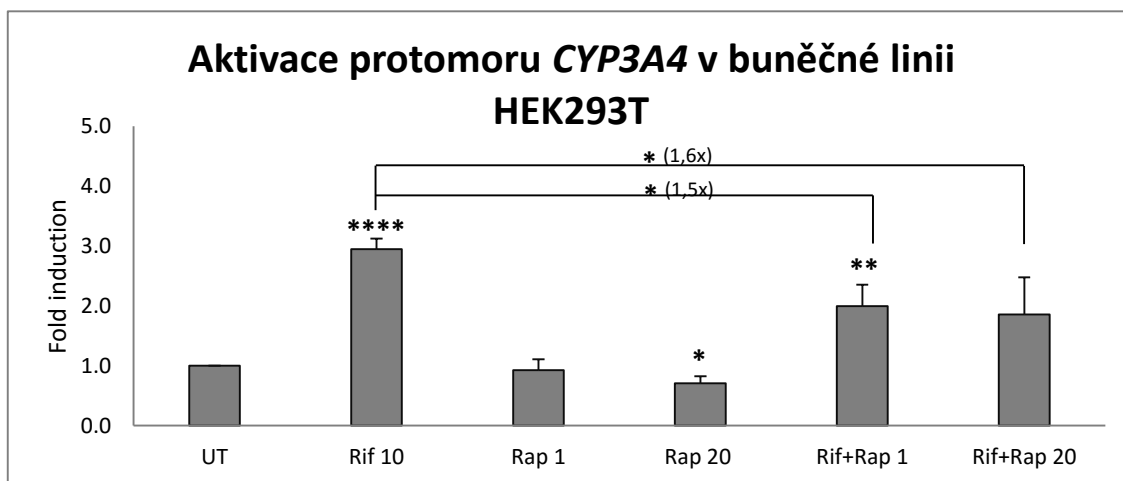
## 6.2 Vliv rapamycinu na aktivitu receptoru PXR v buněčné linii HEK293T

Vliv rapamycinu na aktivitu PXR byl nejprve testován na buněčné linii HEK293T pomocí metody Reporter gene assay. Po vnesení reportérového vektoru p3A4-luc, obsahujícího mimo jiné promotor genu *CYP3A4* a gen pro luciferázu, byla sledována intenzita luminiscence, která je přímo úměrná transkripční aktivitě, tzn. množství genového produktu. Předmětem zájmu bylo sledovat vliv Rap (koncentrace 1 a 20 ng/ml), a kombinace Rap s Rif 10  $\mu$ mol/l, na transkripční aktivitu PXR. Jako negativní kontrola (UT) byl použit roztok 0,2% DMSO, jako pozitivní kontrola Rif (koncentrace 10  $\mu$ mol/l), který je ligandem PXR.

Aktivace PXR byla vyjádřena pomocí tzv. fold induction (FI). Tato hodnota byla vypočítána jako podíl aktivity enzymu luciferázy pro testované látky a negativní kontroly. Výsledné hodnoty u testovaných koncentrací tedy odpovídají násobkům hodnoty negativní kontroly. Jelikož byl zaznamenán hraniční pokles viability u koncentrace 20 ng/ml, výsledné hodnoty FI byly znormalizovány na hodnoty viability. Hodnoty v grafu č. 2 jsou průměrem z 3 nezávislých měření.

Aplikací rifampicinu (Rif) na buněčnou linii HEK293T po dobu 24 hodin došlo k signifikantní indukci promotoru genu *CYP3A4* (graf č. 2). Rifampicin indukuje 2,9krát vyšší expresi luciferázy oproti negativní kontrole. Na bazální úrovni Rap 1 ng/ml dosahoval fold indukce 0,9 a Rap 20 ng/ml dosahoval signifikantní indukce pouze 0,7krát (v porovnání s UT). Kombinací Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  a Rap dochází ke snížené expresi luciferázy. Aplikací Rif spolu s Rap 1 ng/ml se signifikantně snižuje aktivace PXR 1,5krát (o 31 %), kombinací s Rap 20 ng/ml je aktivita PXR snižována 1,6krát (o 36 %) v porovnání s pozitivní kontrolou. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že rapamycin výrazně snižuje aktivitu studovaného receptoru a následně také aktivaci cílového promotoru genu *CYP3A4*.

Graf č. 2: Vliv rapamycinu na aktivaci promotoru *CYP3A4* v buněčné linii HEK293T.



Data jsou průměrem ze tří nezávislých měření  $\pm$  SD a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) v porovnání s kontrolním vzorkem (UT- untreated cells). Na základě studentova *t*-testu jsou hodnoty označené [\*] statisticky významné - \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,005$ ; \*\*\*\* $P < 0,0005$ . Rapamycin byl aplikován v koncentracích ng/ml, rifampicin v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ .

### 6.3 Studium exprese genů *CYP3A4* a *ABCB1* v buněčných liniích LS174T a LS180

Pro stanovení míry exprese genů *CYP3A4* a *ABCB1* na úrovni mRNA byly nejprve vybrány dvě střevní buněčné linie LS174T a LS180, které jsou odvozeny od kolorektálního adenokarcinomu. Buněčná linie LS174T byla získána trypsinizací a vykazuje relativně vysokou expresi PXR a hladinu mRNA *CYP3A4* (Burk *et al.*, 2005).

Cílem bylo najít vhodnou buněčnou linii a stanovit náležité podmínky pro studium exprese studovaných genů. V rámci obou linií byla sledována exprese genů pro *CYP3A4* a *ABCB1* v časovém rozmezí 24 až 96 hod. Jako pozitivní kontrola byl použit Rif, který byl testován ve dvou koncentracích 10  $\mu\text{mol/l}$  a 20  $\mu\text{mol/l}$ . Byla provedena relativní kvantifikace metodou delta-delta-Ct vůči referenčním genům *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa) a *RPS18* (ribosomální protein 18). Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty fold induction (FI) v grafech č. 3 a 4. Dále je hodnota FI rifampicinu vztažena k hodnotě FI negativní kontroly (UT). V grafech č. 3 a 4 jsou uvedeny výsledky vždy jednoho ze tří nezávislých experimentů.

#### Buněčná linie LS174T

Z grafu č. 3 je patrné, že pozitivní kontrola Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  aktivoval PXR a tím došlo ke zvýšené expresi *CYP3A4* mRNA. Tato exprese se v porovnání s kontrolním vzorkem (UT) s časem zvyšovala.

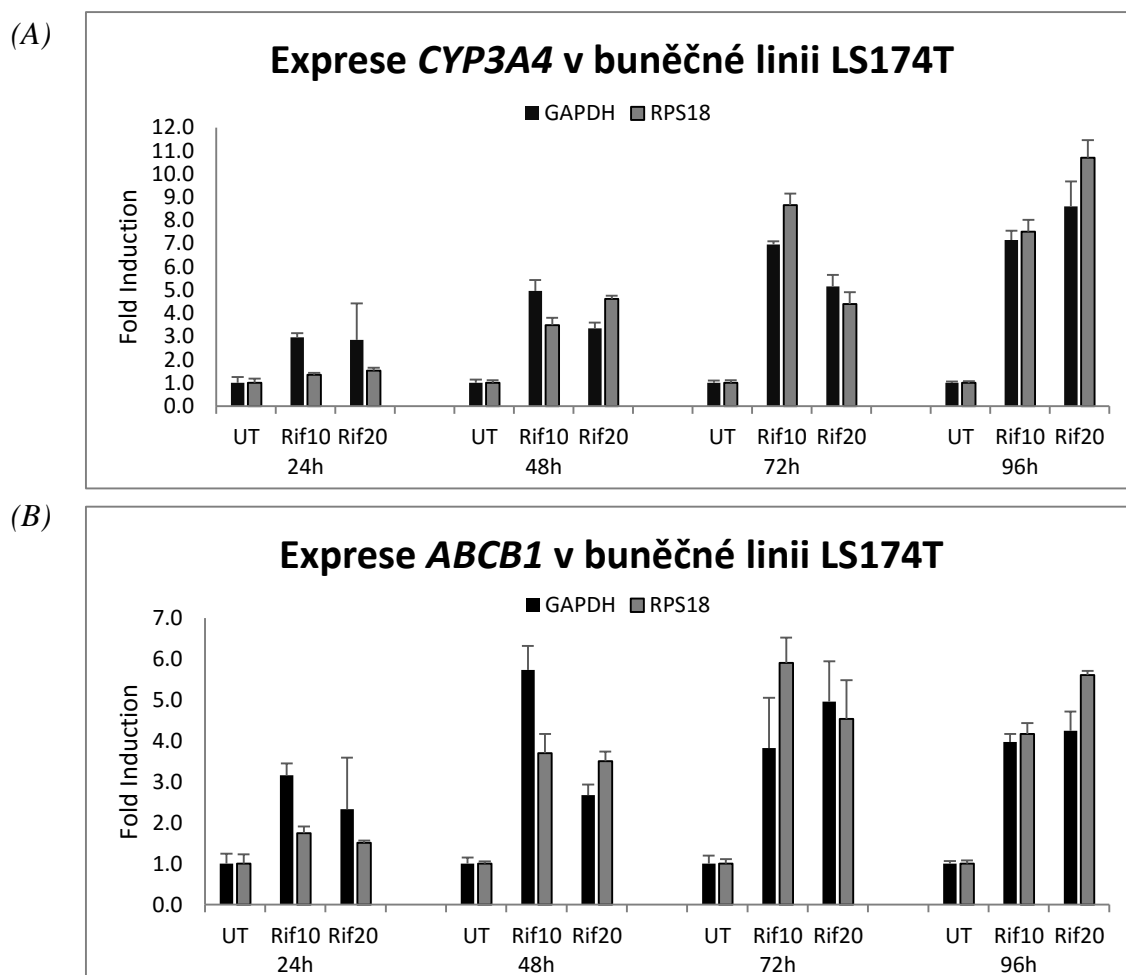
Z výsledků normalizovaných na *GAPDH* je zjevné, že koncentrace Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  byla plně dostačující pro aktivaci receptoru, jelikož při koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  již dochází k saturaci a hodnoty FI se již nestupňovaly. Působením Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  po dobu 24 hod docházelo ke zvýšení indukce exprese genu pro *CYP3A4* 3,2krát a po 48 hod 4,9krát. Po 72 hod působení látek se indukce vyšplhala až na pětinašobek v porovnání s UT. Po 96hod působení se indukce zvýšila 7,2krát.

Hodnoty získané normalizací na referenční gen *RPS18* byly za 24 a 48 hod nižší oproti normalizaci na *GAPDH*. Indukce genu pro *CYP3A4* se zvýšila v průměru 1,7krát za 24 hod a 3,3krát za 48 hod. Naopak vyšší indukci v porovnání s normalizací na



*GAPDH* vykazoval Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  po 72hod působení, a to až 8krát. Po 96hod působení byla naměřena indukce Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  8krát a Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  více, než 11krát vyšší (graf č. 3A).

Graf č. 3: Vliv rapamycinu na expresi genů *CYP3A4* a *ABCB1* v buněčné linii LS174T v časovém rozmezí 24 - 96 hod.



Hodnoty jsou průměrem ze tří naměřených hodnot  $\pm$  SD a jsou vyjádřeny jako násobek indukce (fold induction, FI). Hodnota FI je normována s FI hodnotou referenčního genu a vztažena k FI hodnotě kontrolního vzorku (UT). Látky byly aplikovány v koncentracích  $\mu\text{mol/l}$ .

Dále jsme studovali expresi genu *ABCB1* kódující p-glykoprotein, který je také regulován PXR (graf č. 3. B). I zde byla koncentrace Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  plně dostačující k aktivaci receptoru vedoucí ke zvýšení expresi cílového genu *ABCB1*. Výsledky získané po 24hod inkubaci buněk s testovanými látkami (po srovnání s expresí genu *GAPDH*)

ukazují, že Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  indukuje více než třikrát (3,1krát), po 48 hod téměř šestkrát (5,7krát) a po 72 a 96 hod se již hodnoty příliš nestupňovaly.

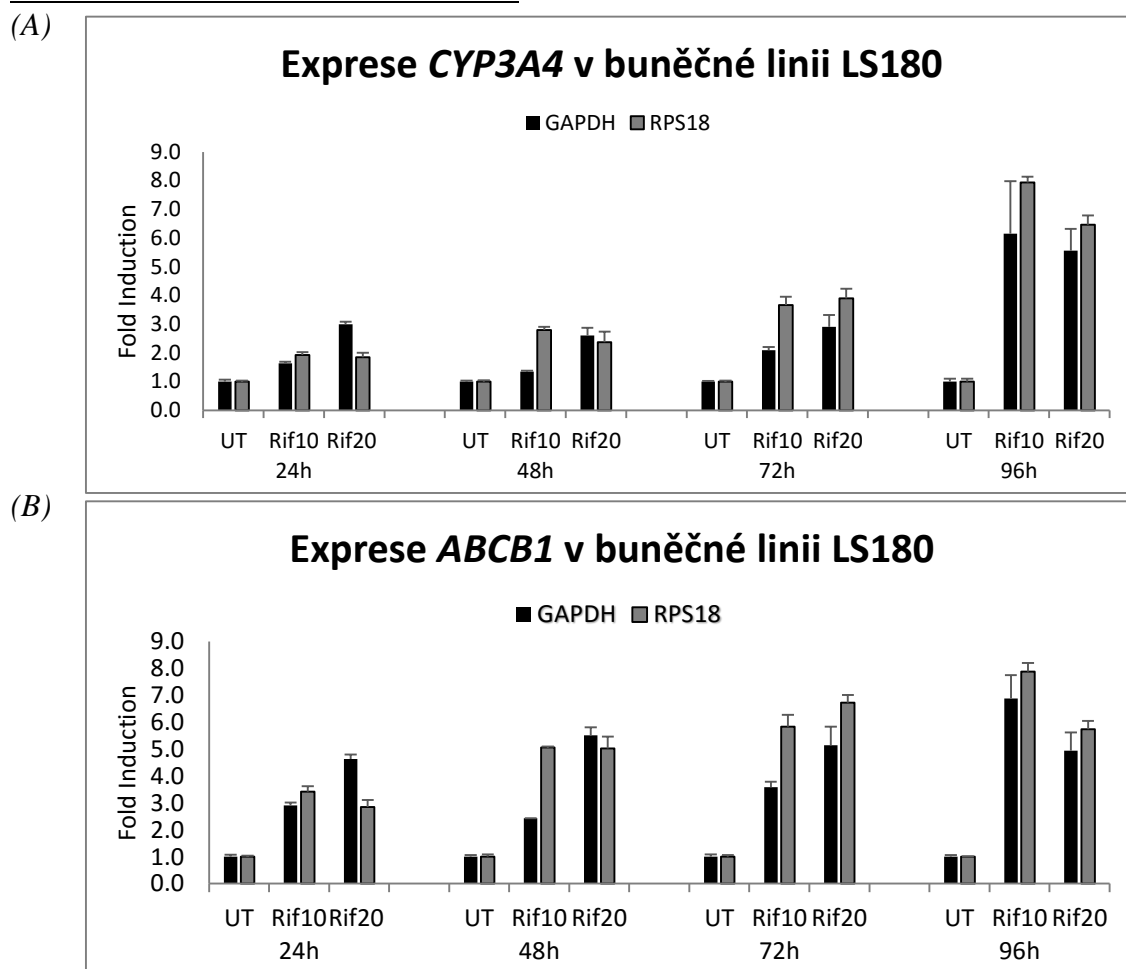
Normalizace na expresi genu *RPS18* (viz graf č. 3B) měla podobný trend jako v případě studia exprese *CYP3A4* (viz graf č. 3A). I zde byly výsledné hodnoty FI nižší, než v případě normalizace na *GAPDH*. Za 24 hod byla naměřena indukce pouze dvakrát pro obě koncentrace testované látky. Po 48 hod dosahovala indukce Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  hodnot 3,7krát vyšších a Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  indukoval expresi genu *ABCB1* pouze 3,5krát více, než UT. Po 72 hod byla detekována indukce 5,9krát (Rif 10) a 4,5krát (Rif 20) vyšší. Po 96 hod byla detekována vzrůstající indukce s rostoucí koncentrací rifampicinu, indukce Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  byla čtyřikrát a Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  až 5,6krát vyšší.

### **Buněčná linie LS180**

Obecně byly pro linii LS180 naměřeny nižší hodnoty indukce exprese genu *CYP3A4*, než v linii LS174T. Normalizací na gen *GAPDH* je vidět trend vzestupu indukce se zvyšující se koncentrací rifampicinu v čase (24 – 72 hod). V tomto časovém rozmezí byly pro jednotlivé koncentrace testované látky naměřeny velmi podobné hodnoty FI. Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  indukoval expresi genu maximálně dvakrát (1,6x po 24 hod, 1,3x po 48 hod, 2,1x po 72 hod). Indukce Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  se pohybovala v rozmezí 2,6x – 3x. Po 96hod působení látek byla hodnota FI 6,2 (Rif 10 ng/ml) a 5,6 (Rif 20 ng/ml) (graf č. 4A).

Normalizací na *RPS18* byly naměřeny vyšší indukce, než na *GAPDH* (graf č. 4A). Pro časové rozmezí 24 – 72 hod nebyla naměřena nijak výrazná změna mezi indukce Rif 10 a 20  $\mu\text{mol/l}$ . Po 24 hod indukoval v průměru dvakrát, po 48 hod téměř třikrát a po 72 hod čtyřikrát. Při 96hod působení Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  byla naměřena nejvyšší indukce (8krát) exprese genu *CYP3A4* a působením Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  se snížila na šestinásobek v porovnání s UT.

Graf č. 4 (A), (B): Vliv rapamycinu na expresi genů *CYP3A4* a *ABCB1* v buněčné linii LS180 v časovém rozmezí 24 – 96 hod.



Hodnoty jsou průměrem ze tři naměřených hodnot  $\pm$  SD a jsou vyjádřeny jako násobek indukce (fold induction, FI). Hodnota FI je normována s FI hodnotou referenčního genu a vztažena k FI hodnotě kontrolního vzorku (UT). Látky byly aplikovány v koncentracích  $\mu\text{mol/l}$ .

V grafu č. 4B lze vidět, že rifampicin zvyšoval expresi genu *ABCB1* s přibývajícím časem působení v porovnání s kontrolou (UT). Normalizací na *GAPDH* v časovém rozmezí 24 – 72 hod byly pro Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  naměřeny nižší indukce exprese, než pro Rif 20  $\mu\text{mol/l}$ . Po 24 hod byla indukce Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  třikrát, po 48 hod pouze 2,4krát a po 72 hod 3,6krát. Po 96 hod se indukce výrazně zvýšila (7krát). Zvýšená exprese genu *ABCB1* v průměru 5krát byla naměřena po působení Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  pro 24 – 96 hod.

Obecně vyšší hodnoty FI byly naměřeny po normalizaci na *RPS18*. Po 24 hod byla indukce Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  3,5krát a Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  2,9krát. Po 48 hod byla naměřena totožná

indukce (pětkrát) pro obě koncentrace. Po 72 hod indukoval Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  šestkrát a Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  až 6,7krát. Výrazně vyšší indukci vykazoval Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  po 96 hod (7,9krát), Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  zvyšoval expresi genu *ABCB1* v tomto případě téměř šestkrát.

Pro další testování byla vybrána buněčná linie LS174T. Tato linie vykazovala obecně vyšší indukce rifampicinem (po 24 a 48 hod), než linie LS180. V rámci genu *CYP3A4* (*GAPDH*) byla indukce Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  3 – 5krát vyšší, zatímco u buněčné linie LS180 byla indukce maximálně dvakrát vyšší. Pro gen *ABCB1* se indukce rifampicinem pohybovala v rozmezí 3 – 6násobku v buněčné linii LS174T. V rámci linie LS180 byla tato indukce maximálně třikrát vyšší, než u kontrolního vzorku.

Na základě získaných výsledků byla pro další testování zvolena koncentrace Rif 10  $\mu\text{mol/l}$ , která se jevila jako plně dostačující pro aktivaci receptoru. V rámci buněčné linie LS174T vykazoval rifampicin v této koncentraci zpravidla vyšší indukci exprese zkoumaných genů. Je možné, že působením Rif 20  $\mu\text{mol/l}$  byl PXR již zcela saturovaný a tudíž nedocházelo k další indukci exprese.

Standardně se v naší laboratoři provádí experimenty s působením testovaných látek po dobu 24 a 48 hod. V mém případě tomu nebylo jinak, pro další testování byla vybrána aplikace látek po dobu 24 hod v případě následné qRT-PCR a pro testování změny hladiny proteinů jsem aplikovala látky po dobu 48 hod. Na základě grafů č. 3 a 4 byla získána nejvyšší indukce rifampicinem až při působení této látky po dobu 72 a 96 hod. Avšak při tak dlouhém experimentu už se nemusí jednat o indukci zprostředkovanou bezprostředně rifampicinem, ale mohou zde hrát důležitou roli i další transkripční faktory, které nejsou předmětem mého zkoumání.

S ohledem na výsledky získané po působení testované látky po dobu 24 a 48 hod byl pro další testování vybrán referenční gen *GAPDH*. Zpravidla byla naměřena vyšší indukce exprese genů *CYP3A4* a *ABCB1* po působení rifampicinu při normalizaci na tento gen, a to pro obě buněčné linie. Při sledování indukce exprese genu *CYP3A4* (po 24 a 48 hod) dosahovaly indukce troj- až pětínásobku po normalizaci na *GAPDH* gen. Při sledování indukce exprese genu *ABCB1* dosahovaly indukce hodnot až téměř 6násobku. Naopak při normalizaci na gen *RPS18* se hodnoty indukce exprese obou genů pohybovaly v rozmezí od dvou- do maximálně pětínásobku indukce v porovnání s UT.

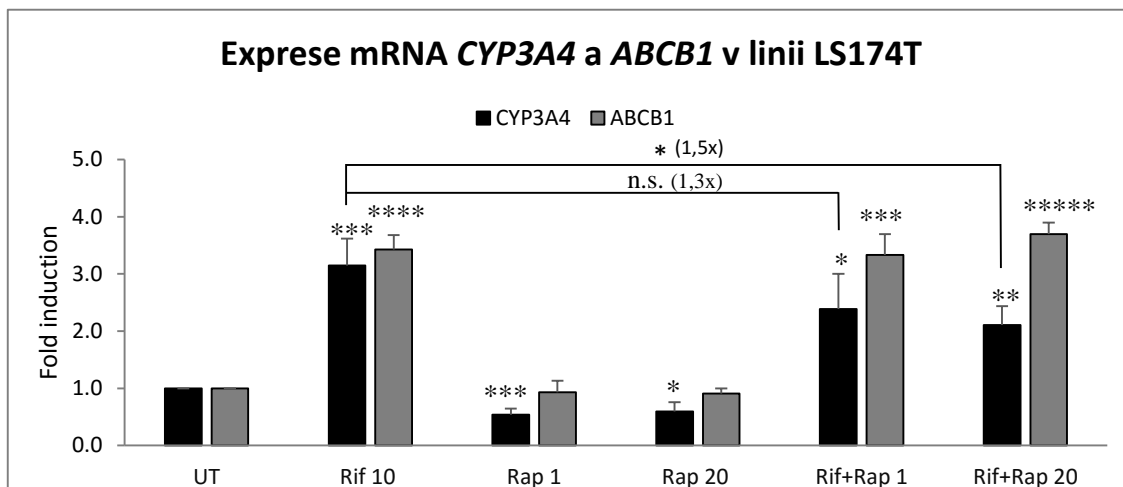
#### 6.4 Vliv rapamycinu na expresi genů *CYP3A4* a *ABCB1*

Metodou Reporter gene assay bylo zjištěno, že rapamycin ovlivňuje aktivitu receptoru PXR (graf č. 2). Tyto změny v aktivitě byly dále studovány na úrovni transkripce cílových genů PXR. Byla sledována změna hladiny mRNA *CYP3A4* a *ABCB1* v buněčné linii LS174T (graf č. 5). Jako pozitivní kontrola byl použit Rif 10  $\mu\text{mol/l}$ , jako negativní kontrola (UT) sloužily buňky bez testovaných látek, pouze s přidaným rozpouštědlem (0,2% DMSO). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze 3 nezávislých měření a jsou statisticky významné.

V grafu č. 5 lze vidět, že Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  zvyšoval hladinu *CYP3A4* mRNA více, než 3krát v porovnání s negativní kontrolou. Po aplikaci Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  v kombinaci s Rap docházelo ke snížení hladiny mRNA *CYP3A4*, zřejmě v důsledku snížené aktivity PXR ovlivněné rapamycinem. V porovnání s pozitivní kontrolou docházelo ke snížení hladiny mRNA 1,3krát (o 22,6 %) a 1,5krát (o 32,3 %).

Změny exprese genu *ABCB1* vykazují po působení rifampicinu 10  $\mu\text{mol/l}$  signifikantní zvýšení hladiny mRNA tohoto genu 3,3krát při porovnání s UT (graf č. 5). Po aplikaci Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  v kombinaci s Rap se neprojevila nijak výrazná změna v expresi genu *ABCB1*, hodnoty indukce byly statisticky významné.

Graf č. 5: Změna exprese mRNA *CYP3A4* a *ABCB1* v buněčné linii LS174T po 24hod působení látek.

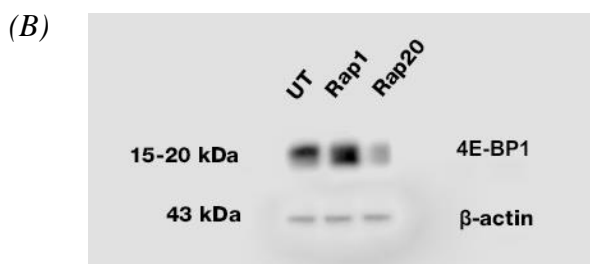
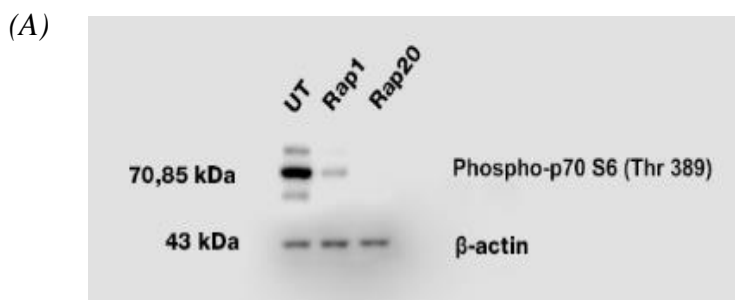


Data jsou průměrem ze tří nezávislých měření  $\pm$  SD a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) v porovnání s kontrolním vzorkem (UT). Exprese genů *CYP3A4* a *ABCB1* je porovnána s expresí referenčního genu *GAPDH*. Na základě studentova *t*-testu jsou hodnoty označené [\*] statisticky významné - \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,005$ ; \*\*\*\* $P < 0,0005$ ; \*\*\*\*\* $P < 0,00005$ . [n.s.] označuje nesignifikantní změnu. Rapamycin byl aplikován v koncentracích ng/ml, rifampicin v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Data získaná na úrovni mRNA byla dále ověřena na úrovni proteinů pomocí Western blottingu. Proteiny izolované z lyzátů buněk a separované pomocí SDS-PAGE elektroforézy byly detekovány substrátem pomocí specifických protilátek na nitrocelulosové membráně. Pro vyhodnocení velikosti proteinů v gelu byl nanášen standard molekulové hmotnosti. Následnou kvantifikaci bylo možné provést na základě detekce aktinu ve všech vzorcích.

Pro potvrzení, že je mTOR signalizační dráha inhibována rapamycinem byla použita protilátka proti fosforylované formě p70 S6K (na Thr389) a 4E-BP1. Rapamycin byl aplikován 30 min a se zvyšující se koncentrací byl detekován jeho inhibiční vliv na hladinu těchto fosfoproteinů. Z obrázku č. 5A je patrné, že při koncentraci Rap 20 ng/ml již nebyl viditelný žádný band odpovídající proteinu o dané velikosti. Taktéž v případě proteinu 4E-BP1 došlo se zvyšující se koncentrací inhibitoru k poklesu fosforylované formy tohoto proteinu (obr. č. 5B).

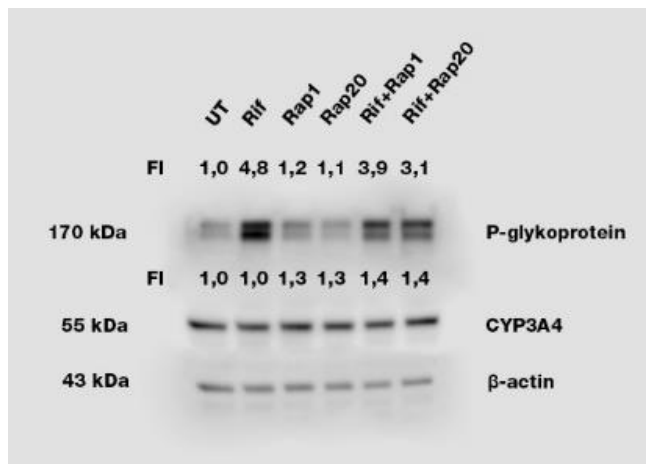
Obrázek č. 5 (A), (B): Hladina proteinu fosfo-p70 S6 kinázy a fosfo-4E-BP1 proteinu v lyzátu buněk LS174T po 30minutové aplikaci rapamycinu.



*Je zobrazen reprezentativní výsledek jednoho z více, než tří nezávislých experimentů. Rapamycin byl použit v koncentraci 1 a 20 ng/ml.*

Následně byly detekovány změny v hladinách zkoumaných proteinů CYP3A4 a p-glykoproteinu. Na buněčnou linii LS174T byly aplikovány látky dle schématu (tabulka č. 1) a po 48hod inkubaci byl získán lyzát buněk. Z vyizolovaných proteinů byla detekována exprese CYP3A4 a p-glykoproteinu. Na reprezentativním obrázku č. 6 jednoho z více, než tří nezávislých měření lze vidět, že hladina p-glykoproteinu se po aplikaci Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  zvyšovala (4,8krát). Působením Rap byla hladina proteinu na úrovni negativní kontroly (UT). Kombinací Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  s Rap 1 ng/ml byla hladina p-glykoproteinu nižší o 19 % a kombinací s Rap 20 ng/ml byla hladina o 35 % nižší v porovnání s pozitivní kontrolou (Rif 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Hladina proteinu CYP3A4 se po aplikaci Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  ani Rap nijak výrazně neměnila. Látky velmi mírně zvyšovaly hladinu tohoto proteinu (fold indukce 1,3 a 1,4), bez výrazných rozdílů, po srovnání s negativní a pozitivní kontrolou.

Obrázek č. 6: Hladina proteinů p-glykoproteinu a CYP3A4 po aplikaci rifampicinu a rapamycinu v buněčné linii LS174T.

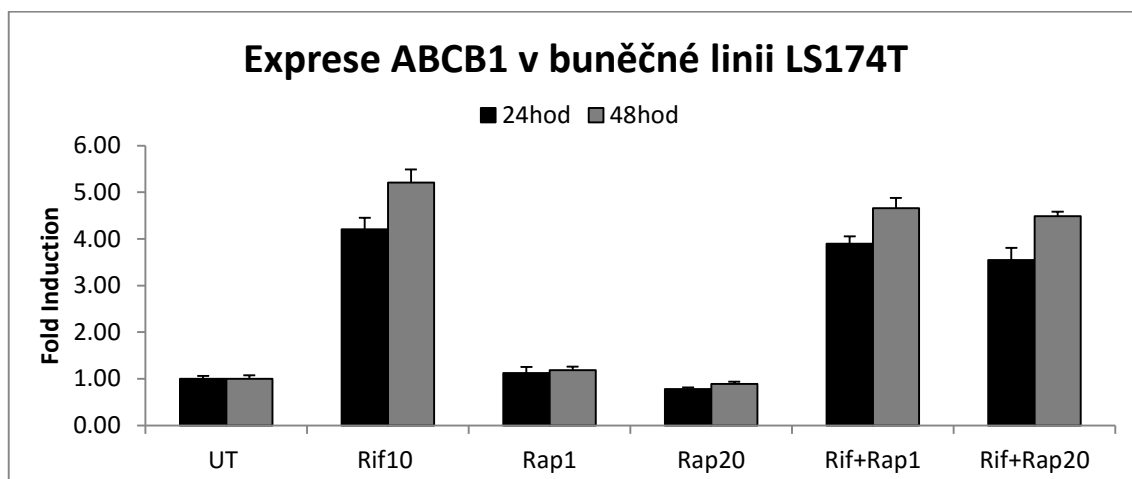


Je zobrazen reprezentativní výsledek jednoho z více, než tří nezávislých experimentů. Rapamycin byl použit v koncentraci 1 a 20 ng/ml, rifampicin v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Z výše uvedených výsledků je patrné, že po 24hod aplikaci rapamycinu v kombinaci s rifampicinem nedochází k nijak výrazné změně exprese genu *ABCB1* na úrovni mRNA (graf č. 5). Nicméně po 48 hod dochází k významnému poklesu hladiny p-glykoproteinu na úrovni proteinu. Na základě těchto dat byla dodatečně měřena změna exprese genu *ABCB1* po 24- a 48hod působení látek (graf č. 6). Z grafu je patrné, že ani po 48hod inkubaci s Rap nedošlo k významnému poklesu exprese tohoto genu, ale naopak k jejímu zhruba 20% navýšení. Vzorky byly připraveny v triplikátu a v reprezentativním grafu č. 6 jsou uvedeny hodnoty jednoho z tří nezávislých měření.



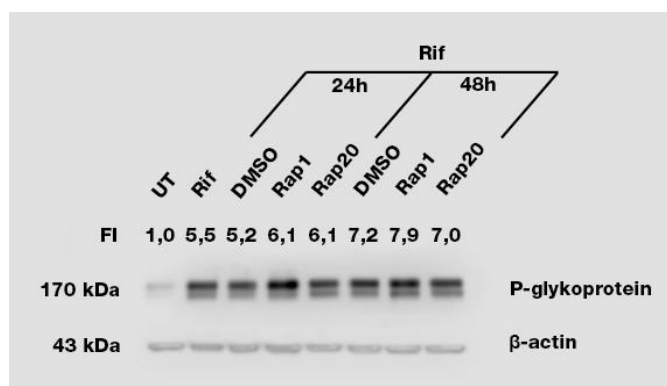
Graf č. 6: Změna exprese genu *ABCB1* v buněčné linii LS174T za 24 a 48 hod.



Hodnoty jsou průměrem ze tří naměřených hodnot  $\pm$  SD a jsou vyjádřeny jako násobek indukce (fold induction, FI). Hodnota FI je normována s FI hodnotou referenčního genu (*GAPDH*) a vztahena k FI hodnotě kontrolního vzorku (UT). Rapamycin byl aplikován v koncentracích ng/ml a rifampicin v koncentraci 10  $\mu$ mol/l.

Rozdíly na úrovni exprese genu *ABCB1* a hladiny p-glykoproteinu po aplikaci rapamycinu vedly k dalšímu experimentu, a to zjistit, zda má rapamycin vliv na zvýšenou degradaci tohoto proteinu. Na buněčnou linii LS174T byl aplikován Rif 10  $\mu$ mol/l (pozitivní kontrola) a 0,2% DMSO (negativní kontrola, UT) po dobu 24 hodin. Následně bylo médium odsáto a na buňky byly aplikovány látky: DMSO (0,2%), Rap 1 ng/ml a 20 ng/ml. Po 24 a 48 hod byly získány lyzáty buněk a detekována hladina p-glykoproteinu ve vzorcích (Obr. č. 7).

Obrázek č. 7: Hladina p-glykoproteinu po aplikaci rifampicinu a rapamycinu na buněčnou linii LS174T.



Na buněčnou linii bylo aplikováno DMSO a rifampicin. Médium s Rif bylo po 24 hod vyměněno za médium s DMSO nebo rapamycinem a inkubováno dalších 24 a 48 hod. Rapamycin byl aplikován v koncentracích ng/ml, rifampicin v koncentraci 10  $\mu$ mol/l a DMSO 0,2% v médiu.

Na obrázku č. 7 lze vidět, že hladina p-glykoproteinu se po působení Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  vzhledem k negativní kontrole zvýšila. Po 24hod působení Rif 10  $\mu\text{mol/l}$  byla naměřena hladina 5,5krát vyšší. Po dalších 24 hod, kdy již na buňky působilo 0,2% DMSO, se hladina proteinu nijak výrazně nezměnila, ale při působení Rap došlo ke zvýšení hladiny proteinu (6,1 fold oproti UT). Pokud byly látky (DMSO, rapamycin) aplikovány po dobu dalších 48 hod, došlo ke zvýšení hladiny proteinu i na úrovni kontroly (0,2% DMSO, 48 hod; fold 7,2). Po aplikaci Rap 1 ng/ml se hladina zvýšila až 7,9krát oproti UT a Rap 20 ng/ml vykazoval zvýšenou hladinu (fold 7,0) proteinu na úrovni kontroly (0,2% DMSO, 48 hod).

## 7 DISKUZE

Pregnanový X receptor je jedním z hlavních regulátorů homeostázy endobiotik a buněčné odpovědi na přítomnost xenobiotik. Jeho aktivita ovlivňuje expresi mnoha významných proteinů, které se podílí mimo jiné na ochraně organismu před škodlivými vlivy z vnějšího prostředí. Mezi tyto proteiny patří například CYP3A4, hlavní biotransformační enzym většiny předepisovaných léčiv, a p-glykoprotein, významný *efflux* transportér, který zajišťuje eliminaci xenobiotik a jejich metabolitů ven z buňky. Regulace PXR po aktivaci ligandem je dnes velmi dobře prostudována, ovšem v posledních letech nabývá na významu regulace tohoto receptoru pomocí post-translačních modifikací. Kináza mTOR je součástí komplexní signální dráhy (PI3K/Akt/mTOR), která reguluje velké množství buněčných procesů a její dysregulace je společným znakem mnoha onemocnění. Tím je mTOR signalizace potencionálním cílem v léčbě mnohých typů rakovin a malé molekuly, které cílí mTOR, nabývají na zájmu mnoha studií.

Cílem této práce bylo sledovat vliv inhibice mTOR signalizační dráhy na aktivitu pregnanového X receptoru a s ní spojenou indukci cílových genů, enzymu CYP3A4 a transportéru léčiv p-glykoproteinu. Testy byly prováděny na buněčných liniích odvozených od adenokarcinomu tlustého střeva (LS174T) a lidských embryonálních buněk ledvin (HEK293T). Jako pozitivní kontrola byl použit agonista PXR – rifampicin. Inhibice mTOR dráhy byla zajištěna aplikací rapamycinu, selektivního inhibitoru mTOR komplexu 1 (Jacinto *et al.*, 2004, Sarbassov *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2015).

Byl sledován vliv rapamycinu na transaktivaci promotoru genu *CYP3A4* a na indukci cílových genů *CYP3A4* a *ABCB1* na úrovni mRNA a proteinu. Samotný rapamycin nevykazoval žádný účinek na transkripční aktivitu PXR ani hladinu mRNA studovaných genů, ovšem v kombinaci s rifampicinem došlo k výraznému snížení transkripční aktivity PXR a také hladiny *CYP3A4* mRNA. V případě *ABCB1* se hladina mRNA významně neměnila ani po prodloužení časového intervalu působení testovaných látek. Data získaná na úrovni mRNA byla ověřena na úrovni proteinů. Hladina proteinu CYP3A4 se nijak významně neměnila, dokonce ani při působení pozitivní kontroly.

Hladina p-glykoproteinu (produkt genu *ABCB1*) se po aplikaci Rif výrazně zvýšila, což se shoduje s výsledky Geick *et al.* (2001) a Greiner *et al.* (1999). Samotný

rapamycin neměnil hladinu proteinu, ale po působení kombinace Rif s Rap se hladina p-glykoproteinu snižovala.

Je známo, že post-translační modifikace, především fosforylace, významně ovlivňují aktivitu pregnanové X receptoru a tím i následnou expresi jeho cílových genů (Lichti-Kaiser *et al.*, 2009a, Lichti-Kaiser *et al.*, 2009b, Doricakova *et al.*, 2013). Fosforylace/defosforylace je řízena kinázami, které jsou součástí signálních drah odpovídajících na různé procesy v buňce. Významným regulátorem energetického metabolismu, buněčného cyklu a apoptózy, proliferace, růstu buňky, transkripce a translace proteinů je komplexní signalizační dráha PI3K/Akt/mTOR.

Vliv mTOR signalizační dráhy na aktivitu PXR byl pozorován již v dřívější studii zaměřené na modulaci signálních drah při zánětlivých procesech (Ng *et al.*, 2011). Tato studie prokázala, že inhibicí mTOR rapamycinem dochází ke snížené expresi PXR mRNA a zároveň k aktivaci kinázy JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*). Taktéž stimulace TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) vedla ke zvýšení hladiny PXR mRNA. Toto pozorování vedlo k závěru, že mTOR je inhibítozem protizánětlivých procesů v buňce zprostředkovaných TNF $\alpha$ , kde hrají důležitou úlohu také PXR a LXR (*Liver X receptor*) (Ng *et al.*, 2011).

V bakalářské práci Poulikova (2015) zabývající se vlivem mTOR signalizační dráhy na indukovatelnou expresi enzymu CYP1A1 v buněčné linii HepG2 vedla inhibice mTOR ke zvýšení hladiny mRNA CYP1A1, cílového genu AhR receptoru (Poulikova, 2015). Naopak podobný trend jako u PXR byl pozorován např. u receptoru VDR (výsledky ještě nebyly publikovány), který spadá do stejné skupiny jaderných receptorů (NR1) a který taktéž interaguje se stejným heterodimerizačním partnerem (RXR $\alpha$ ).

Negativní regulace PXR po inhibici mTOR signalizační dráhy může mít spojitost se změnou fosforylačního statutu buď samotného PXR a nebo jiného člena signalizace. Jedna ze studií zaměřených na fosforylaci PXR označila Thr57 za významné fosforylační místo ovlivňující funkci tohoto receptoru (Pondugula *et al.*, 2009a). Mimo jiné bylo zjištěno, že p70 S6K, která je součástí mTOR signalizační dráhy, fosforyluje PXR *in vitro* a negativně ovlivňuje jeho transkripční funkci. V této práci byl pozorován opačný efekt, naznačující, že regulace aktivity PXR je mnohem složitější proces, ve kterém hraje důležitou roli celá řada faktorů ovlivňující fosforylaci nejen samotného PXR, ale i např.

heterodimerizačního partnera RXR. Kromě toho, fosforylace není jedinou post-translační modifikací, která ovlivňuje aktivitu PXR .

Další post-translační modifikací, která moduluje aktivitu PXR, je ubiquitinace. Již bylo prokázáno, že PXR interaguje s různými komponenty ubiquitin-proteozomálního systému, např. RBCK1 (Rana *et al.*, 2013), SUG1 (Masuyama *et al.*, 2001, Masuyama *et al.*, 2002), DYRK2 a UBR5 (Ong *et al.*, 2014), čímž je regulována jeho stabilita a aktivita. V této práci byla pozorována snížená hladina p-glykoproteinu, což následně vedlo k hypotéze, že tento pokles může být způsoben zvýšenou degradací PXR. Tuto hypotézu také potvrzuje další publikace, v níž je uvedeno, že fosforylace PXR pomocí p70 S6 kinázy může zvýšit stabilitu tohoto receptoru (Pondugula *et al.*, 2009a). Zablokováním mTOR signalizační dráhy tedy může být tato stabilita opravdu narušena. Hypotéza, která měla prokázat, že rapamycin ovlivňuje stabilitu PXR (výsledek je prezentován na obr. č. 3), nebyla prokázána, jelikož nebyl pozorován pokles v hladině p-glykoproteinu. Předpokladem bylo, že pokud dojde k aktivaci PXR rifampicinem a poté k inhibici mTOR rapamycinem, tak se hladina p-glykoproteinu sníží v porovnání s negativní kontrolou, kdy k aktivovanému PXR bylo namísto rapamycinu přidáno pouze DMSO.

## 8 ZÁVĚR

Tato diplomová práce sledovala vliv inhibice mTOR signální dráhy na aktivitu pregnanového X receptoru (PXR) v buněčných liniích HEK293T a LS174T. Předmětem zájmu byla změna aktivity PXR a exprese jeho cílových genů (*CYP3A4* a *ABCB1*) po aplikaci rapamycinu – selektivního inhibitoru mTOR komplexu 1.

Metodou Reporter gene assay bylo dokázáno, že rapamycin v kombinaci s rifampicinem (aktivátorem PXR) inhibuje aktivitu PXR receptoru. Bylo naměřeno až 36% snížení aktivity PXR v porovnání s pozitivní kontrolou. Stejný trend byl vyhodnocen i při sledování změn v expresi *CYP3A4* metodou kvantitativní Real-Time PCR, kdy se při stejném působení látek hladina mRNA snížila až o 32 %. Nicméně, na hladině proteinu *CYP3A4* nebyly detekovány žádné významné změny.

V případě p-glykoproteinu nebyly pozorovány změny v expresi na úrovni mRNA. Naopak, na hladině p-glykoproteinu byla naměřena snížená indukce až o 35 % v porovnání s pozitivní kontrolou. Nebylo prokázáno, že by tento pokles hladiny p-glykoproteinu byl způsoben zvýšenou degradací tohoto proteinu (např. ubiquitinací).

V této práci byl prokázán negativní vliv inhibice mTOR signální dráhy na aktivitu PXR. Výsledky naznačují, že mTOR kináza významně ovlivňuje signalizaci PXR v přítomnosti jeho ligandů, ovšem přesný mechanismus působení vyžaduje podrobnější studii.

## 9 SEZNAM ZKRATEK

4E-BP1	4E-eIF4E-binding protein 1
ABC	ATP-binding cassette (ATP-vazebné transportéry)
ADME	Absorbce, Distribuce, Metabolismus a Eliminace
AF	Activation function
AhR	Aryl uhlovodíkový receptor
Akt (PKB)	Protein kináza B
ANF	$\alpha$ -naphthoflavone
AR	Androgenový receptor
ARNT	AhR nuclear translocator
ATP	Adenosintrifosfát
bHLH/PAS	Basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim
BSA	Bovinní sérový albumin
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
CCRP	Cytoplasmic CAR retention protein
Cdk2/-5	Cyklin dependentní kináza 2/-5
cDNA	Komplemetární deoxyribonukleová kyselina
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
COMT	Katechol O-methyltransferáza
CYP450	Cytochrom P450
DBD	DNA-binding domain
Deptor	DEP domain containing mTOR-interacting protein
DMEM	Dublecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR-	Direct repeats
DTT	1,4-dithiotreitol
E1 - E3	Označení enzymů podílejících se na ubiquitinaci proteinů v buňce
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ER-	Everted repeats
ER	Estrogenový receptor
FI	Fold induction
FKBP12	12kDa FK506-binding protein
FMO	Flavinová monooxygenáza
FRAP	FKBP12 and rapamycin-associated poein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GST	Glutathion-S-transferáza
HAT	Histonacetyltransferáza
HEK293T	Buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvin
HepG2	Buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu

HNF $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
hPXR	Lidský pregnanový X receptor
Hsp90	90kDa heat-shock protein
IR-	Inverted repeats
JNK1	c-Jun N-terminální kináza 1
LB	Nanášecí pufr
LBD	Ligand-binding domain
LS174T	Buň. linie odvozená od lidského adenokarcinomu tlustého střeva
LXR	Liver X receptor
MAPKs	Mitogeny aktivované protein kinázy
MDR	Multidrug resistance
MEK	Mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase
mLST8	Mammalian lethal with sec-13 protein 8
M-MuLV	Reverzní transkriptáza
MRPs	MDR-asociované proteiny
mSin1	40 kDa proline-rich Akt substrate
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
NADH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát - oxidovaná forma
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát - redukována forma
NAT	N-acetyltransferáza
NCoR	Nuclear receptor corepresor
NRI	Nuclear receptor I
OATPs	Organic anion transporting polypeptides
OCTs	Organic cation transporters
p70 S6K	70 kDa ribosomal protein S6 kinase
PBS	Fosfátový pufr
PCN	Pregnenolon 16 $\alpha$ -carbonitril
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
Pgp	P-glykoprotein
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	Fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PKA	Cyklická AMP-dependentní protein kináza A
PKC	Protein kináza C
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	Phosphate and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PXR	Pregnanový X receptor
PXRE	PXR-responsive element
qRT-PCR	Kvantitativní Real-Time polymerázová řetězová reakce



Rap	Rapamycin
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RARE	Retinoic acid response element
RBCK1	Ring-box-coiled-coil protein interacting with protein kinase C-1
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
Rif	Rifampicin
RIP140	Receptor-interacting protein 140
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
RPS18	Ribosomální protein S18
RXR	Retinoidní X receptor
SDS	Dodecylsulfát sodný
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SRC-1	Steroid receptor coactivator 1
SUG1	Supressor for gal 1
SULT	Sulfotransferáza
SUMO-	Malé, ubiquitinu podobné modulátory
TBS	Tris pufr
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TOR	Target of rapamycin
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
TSC1/2	Tuberous sclerosis 1/2
UDP-	Uridindifosfo-
UGT	Uridindifosfoglukuronyltransferáza
UT	Untreated cells
VDR	Receptor pro vitamin D
VDRE	Vitamin D responsive element
XRE	Xenobiotic response element

## 10 SEZNAM LITERATURY

- Albermann, N., Schmitz-Winnenthal, F. H., Z'graggen, K., Volk, C., Hoffmann, M. M., Haefeli, W. E. & Weiss, J. 2005. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol*, 70, 949-58.
- Bailey, D. G. 2010. Fruit juice inhibition of uptake transport: a new type of food-drug interaction. *Br J Clin Pharmacol*, 70, 645-55.
- Becquemont, L., Camus, M., Eschwege, V., Barbu, V., Rey, E., Funck-Brentano, C. & Jaillon, P. 2000. Lymphocyte P-glycoprotein expression and activity before and after rifampicin in man. *Fundam Clin Pharmacol*, 14, 519-25.
- Beretta, L., Gingras, A.-C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N. & Sonenberg, N. 1996. Rapamycin block the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *The EMBO Journal*, 15, 658 - 664.
- Bernhardt, R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol*, 124, 128-45.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P. & Berkenstam, A. 1998. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12208-13.
- Biswas, A., Pasquel, D., Tyagi, R. K. & Mani, S. 2011. Acetylation of pregnane X receptor protein determines selective function independent of ligand activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 406, 371-6.
- Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr., Juguilon, H., Bolado, J., Jr., Van Meter, C. M., Ong, E. S. & Evans, R. M. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev*, 12, 3195-205.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369, 756-8.
- Burk, O., Arnold, K. A., Nussler, A. K., Schaeffeler, E., Efimova, E., Avery, B. A., Avery, M. A., Fromm, M. F. & Eichelbaum, M. 2005. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol*, 67, 1954-65.
- Ding, X. & Kaminsky, L. S. 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 149-73.
- Ding, X. & Staudinger, J. L. 2005a. Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 849-56.
- Ding, X. & Staudinger, J. L. 2005b. Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C. *Biochem Pharmacol*, 69, 867-73.
- Dong, H., Lin, W., Wu, J. & Chen, T. 2010. Flavonoids activate pregnane x receptor-mediated CYP3A4 gene expression by inhibiting cyclin-dependent kinases in HepG2 liver carcinoma cells. *BMC Biochem*, 11, 23.
- Doricakova, A., Novotna, A., Vrzal, R., Pavek, P. & Dvorak, Z. 2013. The role of residues T248, Y249 and T422 in the function of human pregnane X receptor. *Arch Toxicol*, 87, 291-301.
- Eichelbaum, M., Ingelman-Sundberg, M. & Evans, W. E. 2006. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*, 57, 119-37.

- Elbi, C., Misteli, T. & Hager, G. L. 2002. Recruitment of dioxin receptor to active transcription sites. *Mol Biol Cell*, 13, 2001-15.
- Engelman, J. A. 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9, 550-62.
- Engels, F. K., Ten Tije, A. J., Baker, S. D., Lee, C. K., Loos, W. J., Vulto, A. G., Verweij, J. & Sparreboom, A. 2004. Effect of cytochrome P450 3A4 inhibition on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacol Ther*, 75, 448-54.
- Fasolo, A. & Sessa, C. 2012. Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr Pharm Des*, 18, 2766-77.
- Fromm, M. F. 2002. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 1295-310.
- Fromm, M. F. 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 423-9.
- Geick, A., Eichelbaum, M. & Burk, O. 2001. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*, 276, 14581-7.
- Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, 121-41.
- Goodwin, B., Hodgson, E. & Liddle, C. 1999. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol*, 56, 1329-39.
- Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J. A., Falck, J. R., Wei, S., Helvig, C. & Capdevila, J. H. 1997. An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem*, 272, 1127-35.
- Greiner, B., Eichelbaum, M., Fritz, P., Kreichgauer, H. P., Von Richter, O., Zundler, J. & Kroemer, H. K. 1999. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest*, 104, 147-53.
- Guengerich, F. P. 1990. Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene. *Chem Res Toxicol*, 3, 363-71.
- Guengerich, F. P. 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 14, 611-50.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J. & Yonezawa, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177-89.
- Harlow, G. R. & Halpert, J. R. 1998. Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6636-41.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113.
- Hresko, R. C. & Mueckler, M. 2005. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 280, 40406-16.
- Hsieh, J. C., Jurutka, P. W., Galligan, M. A., Terpening, C. M., Haussler, C. A., Samuels, D. S., Shimizu, Y., Shimizu, N. & Haussler, M. R. 1991. Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9315-9.
- Hu, G., Xu, C. & Staudinger, J. L. 2010. Pregnane X receptor is SUMOylated to repress the inflammatory response. *J Pharmacol Exp Ther*, 335, 342-50.
- Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4947-51.

- Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D. & Nie, D. 2012. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem Pharmacol*, 83, 1112-26.
- Choo, A. Y., Yoon, S. O., Kim, S. G., Roux, P. P. & Blenis, J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17414-9.
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A. & Rodriguez-Antona, C. 2007. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 116, 496-526.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K. L. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17, 1829-34.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J. & Su, B. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 127, 125-37.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A. & Hall, M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6, 1122-8.
- Jancova, P., Anzenbacher, P. & Anzenbacherova, E. 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154, 103-16.
- Juliano, R. L. & Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455, 152-62.
- Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S., Natsume, T. & Mizushima, N. 2010. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem*, 285, 20109-16.
- Kast, H. R., Goodwin, B., Tarr, P. T., Jones, S. A., Anisfeld, A. M., Stoltz, C. M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T. M. & Edwards, P. A. 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*, 277, 2908-15.
- Kim, R. B., Fromm, M. F., Wandel, C., Leake, B., Wood, A. J., Roden, D. M. & Wilkinson, G. R. 1998. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest*, 101, 289-94.
- Kliewer, S. A., Goodwin, B. & Willson, T. M. 2002. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev*, 23, 687-702.
- Kliewer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., Staudinger, J. L., Watson, M. A., Jones, S. A., McKee, D. D., Oliver, B. B., Willson, T. M., Zetterstrom, R. H., Perlmann, T. & Lehmann, J. M. 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, 92, 73-82.
- Kodama, S. & Negishi, M. 2013. PXR cross-talks with internal and external signals in physiological and pathophysiological responses. *Drug Metab Rev*, 45, 300-10.
- Konig, J., Muller, F. & Fromm, M. F. 2013. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev*, 65, 944-66.
- Konno, Y., Kodama, S., Moore, R., Kamiya, N. & Negishi, M. 2009. Nuclear Xenobiotic Receptor Pregnane X Receptor Locks Corepressor Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors (SMRT) onto the CYP24A1 Promoter to Attenuate Vitamin D3 Activation. *Mol Pharmacol*, 75, 265-271.
- Kopelovich, L., Fay, J. R., Sigman, C. C. & Crowell, J. A. 2007. The mammalian target of rapamycin pathway as a potential target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 1330-40.

- Lehmann, J. M., Mckee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T. & Kliewer, S. A. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest*, 102, 1016-23.
- Lichti-Kaiser, K., Brobst, D., Xu, C. & Staudinger, J. L. 2009a. A systematic analysis of predicted phosphorylation sites within the human pregnane X receptor protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 331, 65-76.
- Lichti-Kaiser, K., Xu, C. & Staudinger, J. L. 2009b. Cyclic AMP-dependent protein kinase signaling modulates pregnane x receptor activity in a species-specific manner. *J Biol Chem*, 284, 6639-49.
- Lin, W., Wu, J., Dong, H., Bouck, D., Zeng, F. Y. & Chen, T. 2008. Cyclin-dependent kinase 2 negatively regulates human pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression in HepG2 liver carcinoma cells. *J Biol Chem*, 283, 30650-7.
- Liu, F. J., Song, X., Yang, D., Deng, R. & Yan, B. 2008. The far and distal enhancers in the CYP3A4 gene co-ordinate the proximal promoter in responding similarly to the pregnane X receptor but differentially to hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Biochem J*, 409, 243-50.
- Liu, Y. & Gray, N. S. 2006. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol*, 2, 358-64.
- Loo, T. W. & Clarke, D. M. 1999. Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques. *Biochim Biophys Acta*, 1461, 315-25.
- Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T. & Kliewer, S. A. 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol*, 62, 638-46.
- Masuyama, H., Hiramatsu, Y., Mizutani, Y., Inoshita, H. & Kudo, T. 2001. The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. *Mol Cell Endocrinol*, 172, 47-56.
- Masuyama, H., Inoshita, H., Hiramatsu, Y. & Kudo, T. 2002. Ligands have various potential effects on the degradation of pregnane X receptor by proteasome. *Endocrinology*, 143, 55-61.
- Matsumura, K., Saito, T., Takahashi, Y., Ozeki, T., Kiyotani, K., Fujieda, M., Yamazaki, H., Kunitoh, H. & Kamataki, T. 2004. Identification of a novel polymorphic enhancer of the human CYP3A4 gene. *Mol Pharmacol*, 65, 326-34.
- Mckinnon, R. A., Burgess, W. M., Hall, P. M., Roberts-Thomson, S. J., Gonzalez, F. J. & Mcmanus, M. E. 1995. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*, 36, 259-67.
- Nakamura, K., Moore, R., Negishi, M. & Sueyoshi, T. 2007. Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver. *J Biol Chem*, 282, 9768-76.
- Ng, D., Tie, S., Ong, P., Lim, W., Muhammad, T., Choo, Q. & Chew, C. 2011. Rapamycin pretreatment abrogates Tumor Necrosis Factor-alpha down-regulatory effects on LXR-alpha and PXR mRNA expression via inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1 activation in HepG2 cells. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14, 9.
- Ngui, J. S., Chen, Q., Shou, M., Wang, R. W., Stearns, R. A., Baillie, T. A. & Tang, W. 2001. In vitro stimulation of warfarin metabolism by quinidine: increases in the formation of 4'- and 10-hydroxywarfarin. *Drug Metab Dispos*, 29, 877-86.
- Nuclear Receptors Nomenclature, C. 1999. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97, 161-3.

- O'reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., Baselga, J. & Rosen, N. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 66, 1500-8.
- Olefsky, J. M. 2001. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem*, 276, 36863-4.
- Omura, T. & Sato, R. 1964a. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem*, 239, 2370-8.
- Omura, T. & Sato, R. 1964b. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem*, 239, 2379-85.
- Ong, S. S., Goktug, A. N., Elias, A., Wu, J., Saunders, D. & Chen, T. 2014. Stability of the human pregnane X receptor is regulated by E3 ligase UBR5 and serine/threonine kinase DYRK2. *Biochem J*, 459, 193-203.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J. & Maurel, P. 2008. The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, 1-32.
- Pascussi, J. M., Robert, A., Nguyen, M., Walrant-Debray, O., Garabedian, M., Martin, P., Pineau, T., Saric, J., Navarro, F., Maurel, P. & Vilarem, M. J. 2005. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*, 115, 177-86.
- Pasquel, D., Dorcakova, A., Li, H., Kortagere, S., Krasowski, M. D., Biswas, A., Walton, W. G., Redinbo, M. M., Dvorak, Z. & Mani, S. 2016. Acetylation of lysine 109 modulates pregnane X receptor DNA binding and transcriptional activity. *Biochim Biophys Acta*.
- Pavek, P., Pospechova, K., Svecova, L., Syrova, Z., Stejskalova, L., Blazkova, J., Dvorak, Z. & Blahos, J. 2010. Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Biochem Pharmacol*, 79, 277-87.
- Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawlowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A. F., Gourlay, R., Magnuson, M. A. & Alessi, D. R. 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405, 513-22.
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S. & M., S. D. 2009. DEPTOR in an mTOR inhibitor whose frequent overexpression in multiple myeloma cells promotes their survival. *Cell*, 137, 873-886.
- Pondugula, S. R., Brimer-Cline, C., Wu, J., Schuetz, E. G., Tyagi, R. K. & Chen, T. 2009a. A phosphomimetic mutation at threonine-57 abolishes transactivation activity and alters nuclear localization pattern of human pregnane x receptor. *Drug Metab Dispos*, 37, 719-30.
- Pondugula, S. R., Dong, H. & Chen, T. 2009b. Phosphorylation and protein-protein interactions in PXR-mediated CYP3A repression. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 5, 861-73.
- Poulikova, K. 2015. *Vliv mTOR signalizační dráhy na indukovatelnou expresi biotransformačního enzymu CYP1A1 v lidském hepatocelulárním karcinomu*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Rana, R., Coulter, S., Kinyamu, H. & Goldstein, J. A. 2013. RBCK1, an E3 ubiquitin ligase, interacts with and ubiquitinates the human pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos*, 41, 398-405.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A. C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G. L., Polakiewicz, R. D., Sonenberg, N. & Hershey, J. W. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J*, 23, 1761-9.
- Ribeiro, R. C., Kushner, P. J. & Baxter, J. D. 1995. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med*, 46, 443-53.
- Rochette-Egly, C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*, 15, 355-66.

- Rosenfeld, J. M., Vargas, R., Jr., Xie, W. & Evans, R. M. 2003. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol Endocrinol*, 17, 1268-82.
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A. & Sabatini, D. M. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25, 903-15.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. 2005a. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 596-603.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L. & Sabatini, D. M. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22, 159-68.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. 2005b. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- Scotto, K. W. 2003. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, 22, 7496-511.
- Sehgal, S. N. 1998. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem*, 31, 335-40.
- Sevior, D. K., Pelkonen, O. & Ahokas, J. T. 2012. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 257-61.
- Sevrioukova, I. F. & Poulos, T. L. 2015. Current Approaches for Investigating and Predicting Cytochrome P450 3A4-Ligand Interactions. *Adv Exp Med Biol*, 851, 83-105.
- Shor, B., Gibbons, J. J., Abraham, R. T. & Yu, K. 2009. Targeting mTOR globally in cancer: thinking beyond rapamycin. *Cell Cycle*, 8, 3831-7.
- Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 3-29.
- Smutny, T., Mani, S. & Pavek, P. 2013. Post-translational and post-transcriptional modifications of pregnane X receptor (PXR) in regulation of the cytochrome P450 superfamily. *Curr Drug Metab*, 14, 1059-69.
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. & Dawson, J. H. 1996. Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev*, 96, 2841-2888.
- Staudinger, J. L., Goodwin, B., Jones, S. A., Hawkins-Brown, D., Mackenzie, K. I., Latour, A., Liu, Y., Klaassen, C. D., Brown, K. K., Reinhard, J., Willson, T. M., Koller, B. H. & Kliewer, S. A. 2001. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3369-74.
- Staudinger, J. L. & Lichti, K. 2008. Cell signaling and nuclear receptors: new opportunities for molecular pharmaceuticals in liver disease. *Mol Pharm*, 5, 17-34.
- Staudinger, J. L., Xu, C., Biswas, A. & Mani, S. 2011. Post-translational modification of pregnane x receptor. *Pharmacol Res*, 64, 4-10.
- Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. & Negishi, M. 1999. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*, 274, 6043-6.
- Sugatani, J., Kojima, H., Ueda, A., Kakizaki, S., Yoshinari, K., Gong, Q. H., Owens, I. S., Negishi, M. & Sueyoshi, T. 2001. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology*, 33, 1232-8.

- Surh, Y. J. 1998. Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation. *Chem Biol Interact*, 109, 221-35.
- Synold, T. W., Dussault, I. & Forman, B. M. 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*, 7, 584-90.
- Tan, H., Xu, C., Zeng, H., Wang, Y., Li, Y., Fan, X., Chen, P., Jiang, Y., Chen, X., Huang, M. & Bi, H. 2015. SUMOylation of pregnane X receptor suppresses rifampicin-induced CYP3A4 and P-gp expression and activity in LS174T cells. *J Pharmacol Sci*.
- Thompson, J. E. & Thompson, C. B. 2004. Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol*, 22, 4217-26.
- Tian, Y. 2013. Epigenetic regulation of pregnane X receptor activity. *Drug Metab Rev*, 45, 166-72.
- Tirona, R. G., Lee, W., Leake, B. F., Lan, L. B., Cline, C. B., Lamba, V., Parviz, F., Duncan, S. A., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Schuetz, E. G. & Kim, R. B. 2003. The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med*, 9, 220-4.
- Toriyabe, T., Nagata, K., Takada, T., Aratsu, Y., Matsubara, T., Yoshinari, K. & Yamazoe, Y. 2009. Unveiling a new essential cis element for the transactivation of the CYP3A4 gene by xenobiotics. *Mol Pharmacol*, 75, 677-84.
- Ueda, A., Hamadeh, H. K., Webb, H. K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. A., Lehmann, J. M. & Negishi, M. 2002. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol*, 61, 1-6.
- Van Schaik, R. H. 2008. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 11, 77-98.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R. & Proud, C. G. 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J*, 20, 4370-9.
- Watkins, R. E., Wisely, G. B., Moore, L. B., Collins, J. L., Lambert, M. H., Williams, S. P., Willson, T. M., Kliewer, S. A. & Redinbo, M. R. 2001. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science*, 292, 2329-33.
- Weng, Q. P., Kozlowski, M., Belham, C., Zhang, A., Comb, M. J. & Avruch, J. 1998. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem*, 273, 16621-9.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W. & Hall, M. N. 2005. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem*, 280, 30697-704.
- Xie, W., Barwick, J. L., Simon, C. M., Pierce, A. M., Safe, S., Blumberg, B., Guzelian, P. S. & Evans, R. M. 2000. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev*, 14, 3014-23.
- Yang, J., Zhao, X., Patel, A., Potru, R., Azizi-Ghannad, S., Dolinger, M., Cao, J., Bartholomew, C., Mazurkiewicz, J., Conti, D., Jones, D., Huang, Y. & Zhu, X. C. 2015. Rapamycin Inhibition of mTOR Reduces Levels of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 3 in Intestines of Mice and Humans, Leading to Diarrhea. *Gastroenterology*, 149, 151-62.
- Zhang, B., Xie, W. & Krasowski, M. D. 2008. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 9, 1695-709.