

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

Olomouc 2015

Ondřej Ženata

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Tkáňově specifické rozdíly v regulaci exprese
biotransformačního enzymu UGT2B7
receptorem pro vitamín D (VDR).**

Diplomová práce
Ondřej Ženata

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Doc. Ing. Radim Vrzal, Ph. D.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

Ondřej Ženata

Souhrn:

Přítomnost UGT2B7 a VDR byla potvrzena téměř ve všech tkáních lidského těla. Jelikož VDR reguluje mnoho biotransformačních enzymů včetně UGT2B15 a UGT2B17, u kterých se společně s UGT2B7 předpokládá společný ancestrální předchůdce, je možné, že regulace exprese UGT2B7 je ovlivněna receptorem pro vitamín D.

Pro ověření této hypotézy byl k aktivaci VDR použit kalcitriol a to ve třech fyziologicky relevantních koncentracích a sledovaný čas 24h byl použit pro detekci mRNA. Detekce proteinu byla stanovena za 48h. Téměř ve všech sledovaných tkáních (LS180, MDA MB231, CaCo-2, HepG2, MCF-7, A172, A549) byl prokázán funkční VDR, který po aktivaci kalcitriolem mnohonásobně zvýšil hladinu mRNA CYP24A1. Ve většině systémů, kde byl VDR aktivovaný kalcitriolem, došlo ke snížení hladiny mRNA UGT2B7. Nicméně se tento pokles neprojevil na hladině proteinu. Resveratrol, předpokládaný induktor exprese, měl v některých studovaných liniích represivní efekt (CaCo-2 a MCF-7). Sulforafan se jako induktor neprojevil ani v jedné ze studovaných tkání. Lze tedy říci, že kalcitriol negativně reguluje expresi mRNA UGT2B7 a ve střevní a prsní tkáni (LS180, CaCo-2, MDA MB 231, MCF-7), ale nijak neovlivňuje množství samotného proteinu (LS180 a HepG2).

Summary:

A presence of UGT2B7 and VDR was confirmed in almost all tissues of the human body. Because VDR regulates many biotransformation enzymes including UGT2B15 and UGT2B17 for which, along with UGT2B7, a common ancestral predecessor is assumed, it is possible that regulation of the expression of UGT2B7 is influenced by vitamin D receptor.

To verify this hypothesis, calcitriol was used for activation of VDR, namely in three physiologically relevant concentrations and 24h observation was used to detect mRNA. Detection of protein was set in 48h. In almost all the observed tissues (LS180, MDA MB231, CaCo-2, HepG2, MCF-7, A172, A549) was demonstrated functional VDR, which activated by calcitriol greatly increased level of mRNA CYP24A1. In most systems, where VDR was activated by calcitriol, levels of mRNA UGT2B7 decreased. However, this decline was not reflected on the level of protein. Resveratrol, assumed inductor of expression, had a repressive effect in some studied lines (CaCo-2 and MCF-7). Sulforaphane as an inductor did not reflect in any of the studied tissues. Therefore we can say, that calcitriol negatively regulate expression of mRNA UGT2B7 and in intestinal and breast tissue (LS180, CaCo-2, MDA MB 231, MCF-7), but it does not influence an amount of the protein itself.

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli, docentu Vrzalovi, za podporu a cenné rady, jenž mi při mé diplomové práci dal a za čas, který mi věnoval.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Lidská UGT2B7 (E. C. 2.4.1.17).....	9
3. Receptor pro vitamín D (VDR; NR1H1).....	22
4. Cíl práce.....	27
5. Materiál a přístroje.....	28
6. Metodika.....	31
7. Výsledky.....	33
8. Diskuze.....	44
9. Závěr.....	46
10. Seznam použitých zkratk.....	47
11. Seznam použité literatury.....	49

1. Úvod:

Biotransformace je komplikovaný a několikastupňový děj, který z těl organismů odstraňuje endogenní i exogenní látky. Může se jednat jak o látky přijaté ze vzduchu, tak i o sloučeniny obsažené ve stravě případně nebo látky vytvořené organismem, které jsou dále nepotřebné či toxické. Po vstupu do těla podléhá látka třem fázím biotransformace. V první fázi je pouze zavedena či odkryta polární skupina, aby se k ní mohl v další fázi připojit některý z rozmanitých endogenních substrátů. Ve třetí fázi působí už jen rozličné transportéry, které usnadňují vyloučení transformované molekuly ven z organismu.

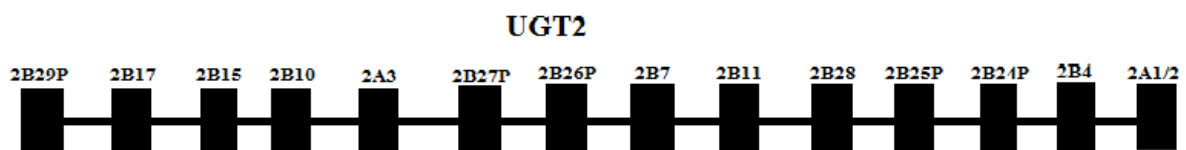
Ve druhé fázi jsou nejvýznamnější skupinou UDP-glukuronosyl transferasy, které katalyzují konjugaci cukerné části kyseliny uridin 5'-difosfoglukuronové a substrátu. V této reakci je glukuronid navázán na molekulu z první fáze a zbytek kyseliny je využit pro jiné biochemické reakce. Jedním z enzymů je i UGT2B7, který hraje důležitou roli v metabolizaci léků a některých endogenních sloučenin. Jelikož se jedná o složitý proces, musí být také regulován a regulace probíhá převážně na úrovni transkripce pomocí ligandem aktivovaných transkripčních faktorů a jedním z nich je i receptor pro vitamín D (VDR).

VDR se váže do promotorové oblasti mnoha genů a tím transkripčně ovlivňuje řadu biochemických procesů v lidském těle. Jelikož byl prokázán jeho vliv na UGT2B15 a UGT2B17, u kterých se předpokládá společný ancestrální předchůdce, je tedy možné, že stejná regulace bude i v případě UGT2B7.

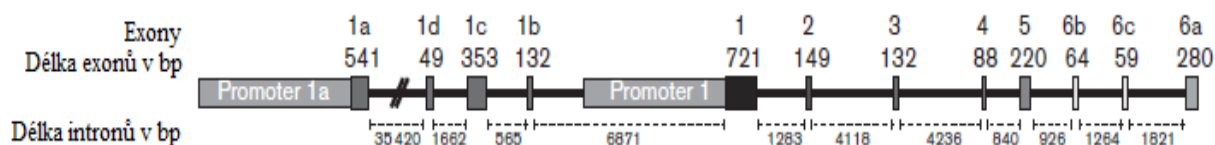
2. Lidská UGT2B7 (E. C. 2.4.1.17):

UGT2 je jedna ze čtyř rodin náležejících do genové superrodiny UDP-glukuronosyl transferas (UGT) a sama se dále dělí na dvě podrodiny a to UGT2A a UGT2B. Gen pro UGT2B7 náleží mezi sedm funkčních genů a pět pseudogenů (sekvenováním byl odhalen předčasný STOP kodon) patřících do této podrodiny a nachází se na chromozomu 4q13 společně se třemi zástupci podrodiny UGT2A (UGT2A1, UGT2A2 a UGT2A3) a zbytkem podrodiny UGT2B. Jejich uspořádání na chromozomu je znázorněno na obrázku č. 1. Členové podrodiny UGT2B nebyli nalezeni jen u člověka, ale sedm jejich zástupců bylo identifikováno v myším genomu na chromozomu 5E1 a u křesy na chromozomu 14p21. V obou případech také se třemi zástupci podrodiny *Ugt2a* (Mackenzie *et al.* 2005).

Samotný lokus pro UGT2B7 se rozprostírá po délce přibližně 61 926 bp, obsahuje dva promotory (Promotor 1a, Promotor 1) a šest exonů, přičemž exon 1 má pět variant (1, 1a, 1b, 1c, 1d) a exon 6 tři varianty (6a, 6b, 6c), celkově tedy 12 exonů. Toto uspořádání je velmi důležité při alternativním sestřihu, o kterém bude řeč později. Struktura genu UGT2B7 je naznačena na obrázku č. 2 (Ménard *et al.*, 2013; Ménard *et al.*, 2011). Za povšimnutí také stojí, že exony u všech funkčních členů podrodiny UGT2B jsou vysoce konzervovány (každý zástupce UGT2 má shodu v aminokyselinové sekvenci větší než 70%) a vysoký stupeň zachování genomové organizace u členů UGT2B7, UGT2B15 a UGT2B17 podporuje hypotézu, že se vyvinuli ze společného ancestrálního genu (Mackenzie *et al.*, 2005; Carrier *et al.*, 2000).



Obr. č. 1: Vzájemná poloha genů rodiny UGT2 na chromozomu 4q13 u člověka. Gen UGT2A1 a UGT2A2 mají variabilní první exon a exony 2 – 6 jsou sdílené. Písmeno P na konci genu značí pseudogen. Překresleno podle Mackenzie *et al.*, 2005.



Obr. č. 2: Struktura genu UGT2B7. Obsahuje 12 exonů (pět variant exonu 1 a tři varianty exonu 6) a dále dva promotory. Jsou znázorněny délky exonů i intronů v párech bází. Převzato z Ménard *et al.*, 2013.

UGT2B7 se vyskytuje v mnoha tkáních. Zdaleka největší množství bylo detekováno v játrech, tenkém a tlustém střevě, ledvinách, močovém měchýři a děloze. V minimálním množství byl však nalezen i ve většině ostatních tkání, jako jsou třeba varlata, vaječníky, prsa, nadledvinky, plíce, žaludek a mozek. Výskyt ve tkáni ovšem nemusí vždy přesně korelovat s odvozenými rakovinnými liniemi, na kterých se výzkum často provádí. V linii HEK293 se UGT2B7 téměř nevyskytuje a přitom je odvozena od embryonálních ledvin a stejně tak v linii HeLa odvozené od rakoviny děložního hrdla je téměř nedetekovatelné množství (Nakamura *et al.*, 2008a; King *et al.*, 1999). Jedním z možných vysvětlení nízké hladiny UGT2B7 v embryonálních ledvinách je změna exprese společně s vývojem člověka.

Bylo prokázáno, že fetální játra mají přibližně 10x menší expresi UGT2B7 než játra dospělého člověka. Při porovnání fetálních jater s fetálními plícemi a ledvinami byla exprese největší v plících (téměř 8x větší než v játrech) a zvětšená v ledvinách (5x větší než v játrech). Přitom u dospělého člověka jsou hlavním místem metabolizačních procesů právě játra, kde je exprese těchto enzymů ve většině případů větší než v ostatních tkáních. Je tedy možné, že dospělé ledviny mají vyšší hladinu UGT2B7 než embryonální ledviny. Tato vývojově specifická regulace exprese není jedinečná jen pro UGT2B7 ale byla pozorována i u jiných zástupců podrodiny 2B a to například u UGT2B15 a UGT2B17 (Ekström *et al.*, 2013).

Subcelulární lokalizace UGT2B7 je převážně v endoplazmatickém retikulu, ale v malém množství byl enzym nalezen na vnitřní i vnější jaderné membráně. Společně s ním se v jaderné membráně vyskytuje také UGT1A6 (Radomynska-Pandya *et al.*, 2002).

Substrátová specifita enzymů podrodiny UGT2B se většinou překrývá, ale pokud se jedná o UDP-glukuronosyl transferasy, tak metabolismus přeměny morfinu (analgetikum) na morfin 6-glukuronid a zidovudinu (antiretrovirový lék) zajišťuje pouze UGT2B7 (Coffman *et al.*, 1996; Barbier *et al.*, 2000). Při metabolismu morfinu pomocí UGT dochází ke tvorbě dvou metabolitů: morfin 3- glukuronidu (M3G) a morfin 6-glukuronidu (M6G). Tvorbu M3G zajišťují, kromě UGT2B7, další glukuronosyl transferasy jako třeba UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9 a UGT1A10. Naproti tomu M6G je aktivní látka a její tvorba je vázána

výhradně na UGT2B7 (Stone *et al.*, 2003). Její analgetický účinek na lidské tělo je přibližně 50 – 100x větší než efekt morfinu samotného (Paul *et al.*, 1989; King *et al.*, 1999). Největší význam má pravděpodobně v mozku, protože M6G je v něm tvořen z morfinu a nemůže procházet hematoencefalickou bariérou tak snadno jako morfin. Jeho prostupnost hematoencefalickou bariérou je až 57x nižší ve srovnání s morfinem. M6G tedy déle setrvává v mozku a svou vazbou na μ -opioidní receptory (MOR) vyvolává požadovaný analgetický účinek (King *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1997).

Některé výzkumy prokázaly, že M6G je nejen transportován z mozku přes hematoencefalickou bariéru, ale že může být transportován dovnitř a to například pomocí OATP2 nebo GLUT-1. Tento jev je logický, protože hlavním místem výskytu UGT2B7 a metabolizací morfinu jsou játra, kde je z celkového podaného množství morfinu přeměněno na M6G přibližně 10%. Pokud by se většina M6G vyskytovala v krvi, nemohl by se vázat na μ -opioidní receptory v mozku (Bourasset *et al.*, 2003; De Gregori *et al.*, 2012; Sattari *et al.*, 2011).

Morfin se do lidského těla nemusí dostat pouze ze stravy, kde je obsažen velmi hojně (kromě primárních rostlinných původců jako je mák setý, kde se jeho výskyt očekává, byl také detekován v hlávkovém salátu, kravském mléce či seně), ale bylo prokázáno, že lidské tělo je schopno si ho vytvářet. Na lidských neuroblastomech (buněčná linie SH-SY5Y) byla za pomoci radioaktivních izotopů zjištěna metabolická dráha, která zahrnuje nejméně 19 kroků. Je velmi podobná chemické dráze tvorby morfinu v máku setém, ale zásadním rozdílem je tvorba klíčového meziprojektu (S)-reticulinu. Zatímco u máku jeho tvorba postupuje přes (S)-norcoclaurin, u lidských buněk je zahrnut (S)-norlaudanolin (Boettcher *et al.*, 2005).

Poměr tvorby M6G/M3G pomocí UGT2B7 není pevně daný a může být endogenně regulován pomocí CYP3A4 (biotransformační enzym první fáze). CYP3A4 specificky interaguje s UGT2B7 v mikrosomální membráně a snižuje množství vytvořeného M3G enzymem UGT2B7. Naproti tomu však stoupá množství vytvořeného M6G. Toto zjištění ukazuje, že tvorba multiproteinových komplexů CYP3A4 s UGT2B7 v endoplazmatickém retikulu a jaderném obalu není jen za účelem detoxikace organismu, ale má i regulační funkci (Takeda *et al.*, 2005; Jacqueline *et al.*, 2005; Fremont *et al.*, 2005). V nedávné době se M6G dostává značné pozornosti a to díky zjištění, že změny v jeho hladině mohou být relevantními patologickými markery například pro Parkinsonovu nemoc či sepsi. Dokonce byla vytvořena protilátka proti M6G, kterou by bylo možno použít při ELISA testech s vysokou účinností a

relativně dobrou specifitou, naneštěstí se váže i na kodein-6-glukuronid a morfin-3,6-glukuronid (Laux-Biehlmann *et al.*, 2014).

UGT2B7 metabolizuje množství jak exogenních látek, mezi něž patří například léky, složky stravy a environmentální polutanty, tak i velké množství endogenních sloučenin. Některé z exogenních substrátů jsou vypsány v tabulce č. 1. Přehled vybraných endogenních substrátů je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Vybrané exogenní substráty UGT2B7 (Coffman *et al.*, 1996^[1]; Barbier *et al.*, 2000^[2]; Jeong *et al.*, 2014^[3]; Jin *et al.*, 1993^[4]; Zhang *et al.*, 2013^[5]; Precht *et al.*, 2013^[6]; Innocenti *et al.*, 2013^[7]; Gibson *et al.*, 2013^[8]; Grosse *et al.*, 2013^[9]; Foti *et al.*, 2005^[10]; Al Saabi *et al.*, 2013^[11]; Picard *et al.*, 2005^[12]; Ciotti *et al.*, 1999^[13]; Strahm *et al.*, 2013^[14]; Mano *et al.*, 2007[1]^[15]; Mano *et al.*, 2007[2]^[16]; Innocenti *et al.*, 2001^[17]; Blevins-Primeau *et al.*, 2009^[18]; Court *et al.*, 2003^[19]; Vandenbossche *et al.*, 2014^[20]).

Název	Funkce/výskyt
Morfin ^[1]	Analgetikum
Zidovudin ^[2]	Lék proti HIV
Fimasartan ^[3]	Lék na hypertenzi
Deriváty 2-acetylaminofluorenu ^[4]	Environmentální polutanty
Deriváty benzo(a)pyrenu ^[4,5]	Environmentální polutanty
Letrozol ^[6]	Inhibitor aromatasy (léčba rakoviny prsu)
ABT-751 ^[7]	Testovaný lék na rakovinu (neuroblastom)
Laropiprant ^[8]	Lék na regulaci hladiny cholesterolu
Bikalutamid ^[9]	Lék na karcinom prostaty
Ethanol ^[10,11]	Základní složka alkoholických nápojů
Kyselina mykofenolová ^[12]	Antibiotikum, imunosupresivum
Benzidin ^[13]	Karcinogen 1 skupiny, využití v průmyslu
Nadrolon ^[14]	Látka používaná při dopingů
Gemfibrozil ^[15]	Lék na snížení hladiny lipidů
Flurbiprofen ^[16]	Protizánětlivý lék
Epirubicin ^[17]	Lék na rakovinu prsu
Tamoxifen ^[18]	Látka používaná při léčbě rakoviny prsu
Kodein ^[19]	Analgetikum
Hydromorfon ^[20]	Analgetikum

Tabulka č. 2: Vybrané endogenní substráty UGT2B7 (King *et al.*, 1999^[1]; Sten *et al.*, 2009^[2]; Lépine *et al.*, 2004^[3]; Gall *et al.*, 1999^[4]; Boettcher *et al.*, 2005^[5]).

Název	Funkce
5-hydroxytryptamin ^[1]	Neurotransmitter
Testosteron ^[2]	Pohlavní hormon
Epitestosteron ^[2]	17 α -epimer testosteronu
Estradiol a jeho hydroxyderiváty ^[3]	Ženský pohlavní hormon
Hydroxyderiváty estronu ^[3]	Ženský pohlavní hormon
Litocholová kyselina ^[4]	Sekundární žlučová kyselina
Hyodeoxycholová kyselina ^[4]	Sekundární žlučová kyselina
Morfin ^[5]	Produkt metabolické dráhy

Je známo několik látek inhibujících aktivitu enzymu UGT2B7. Jako specifický inhibitor byl zatím prokázán pouze flukonazol (Uchaipichat *et al.*, 2006). Několik vybraných inhibitorů a jimi inhibovaných UGT enzymů je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Vybrané inhibitory UGT2B7 (Uchaipichat *et al.*, 2006^[1]; Barnes *et al.*, 2014^[2]; Xu *et al.*, 2014^[3]; Jeong *et al.*, 2014^[4]).

Název	Inhibované glukuronosyltransferasy
Flukonazol ^[1]	UGT2B7
Benzylalkohol ^[2]	UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7
<i>p</i> -Cresol ^[2]	UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7
Indoxylsulfát ^[2]	UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7
Kyselina hippurová ^[2]	UGT1A1, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7
Bacuchiol ^[3]	UGT2B7, UGT2B15, UGT2B17
HS-23 ^[4]	UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7

Také bylo zjištěno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP) vyskytujících se v exonech genu pro enzym UGT2B7, z nichž některé jsou klinicky významné. Jsou zobrazeny v tabulce č. 4. Mnoho dalších SNP pro UGT2B7 lze najít na stránkách <http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/files/content/sites/pharmacogenomics/files/Nomenclature/dbsnp/UGT2B7.htm> (zjištěno dne 15.3.2015).

Tabulka č. 4. SNP v exonových oblastech genu pro enzym UGT2B7 (Kim *et al.*, 2014; Saeki *et al.*, 2004; Hirota *et al.*, 2003; Holthe *et al.*, 2003).

Umístění SNP	Aminokyselinová záměna	Alelová záměna
Exon 1	Ala71Ser*	G>T
Exon 1	Arg124Arg	A>G
Exon 1	Glu225Lys*	G>A
Exon 2	Thr245Thr	A>G
Exon 2	Pro267Pro	T>A
Exon 2	His268Tyr*	C>T
Exon 3	Val305Val	G>A
Exon 4	Leu353Leu	G>C
Exon 4	Tyr354Tyr	C>T
Exon 5	Asp398Asn*	G>A

Jak je vidět v tabulce č. 4, pouze u 4 z 10 zjištěných SNP v exonových oblastech genu UGT2B7 se jedná o mutace substituční a mají největší klinický význam (v tabulce označeny hvězdičkou). Zbýlých šest mutací je označováno jako synonymní mutace, ale bylo prokázáno, že v některých případech mohou mít také vliv na výsledný protein, i když pořadí aminokyselin zůstává nezměněno. Například u genu pro MDR1 protein je známo, že synonymní SNP mutace může vést ke změně konformace výsledného proteinu (Kimchy-Safarty *et al.*, 2007).

Dále bylo zjištěno několik SNP vyskytujících se v promotorové oblasti a několik dalších SNP bylo detekováno v intronech 2, 3 a 4 (Kim *et al.*, 2014; Saeki *et al.*, 2004). U některých mutací v promotorové oblasti bylo zaznamenáno až dvojnásobné zvýšení transkripční aktivity při testech na jaterní a střevní buněčné linii (linie HepG2 a CaCo-2). Genetická variace na pozici -79 měla za následek 7mi násobné snížení promotorové aktivity v buněčné linii HepG2 a 2,5 násobné snížení aktivity ve střevní linii CaCo-2. Oproti tomu jiná mutace, která se nachází v pozici -66, byla bez zjevného efektu na aktivitu promotoru (Duguay *et al.*, 2004).

Nejdéle známým a nejvíce prozkoumaným polymorfismem je SNP His268Tyr. Tato mutace je spojována s vyšším rizikem rakoviny močového měchýře u lidí vystavených benzidinu (Lin *et al.*, 2005), nebo s vyšším rizikem kolorektálního karcinomu (Logt *et al.*, 2009). Naopak u rakoviny prsu léčené epirubicinem může mít pozitivní účinky,

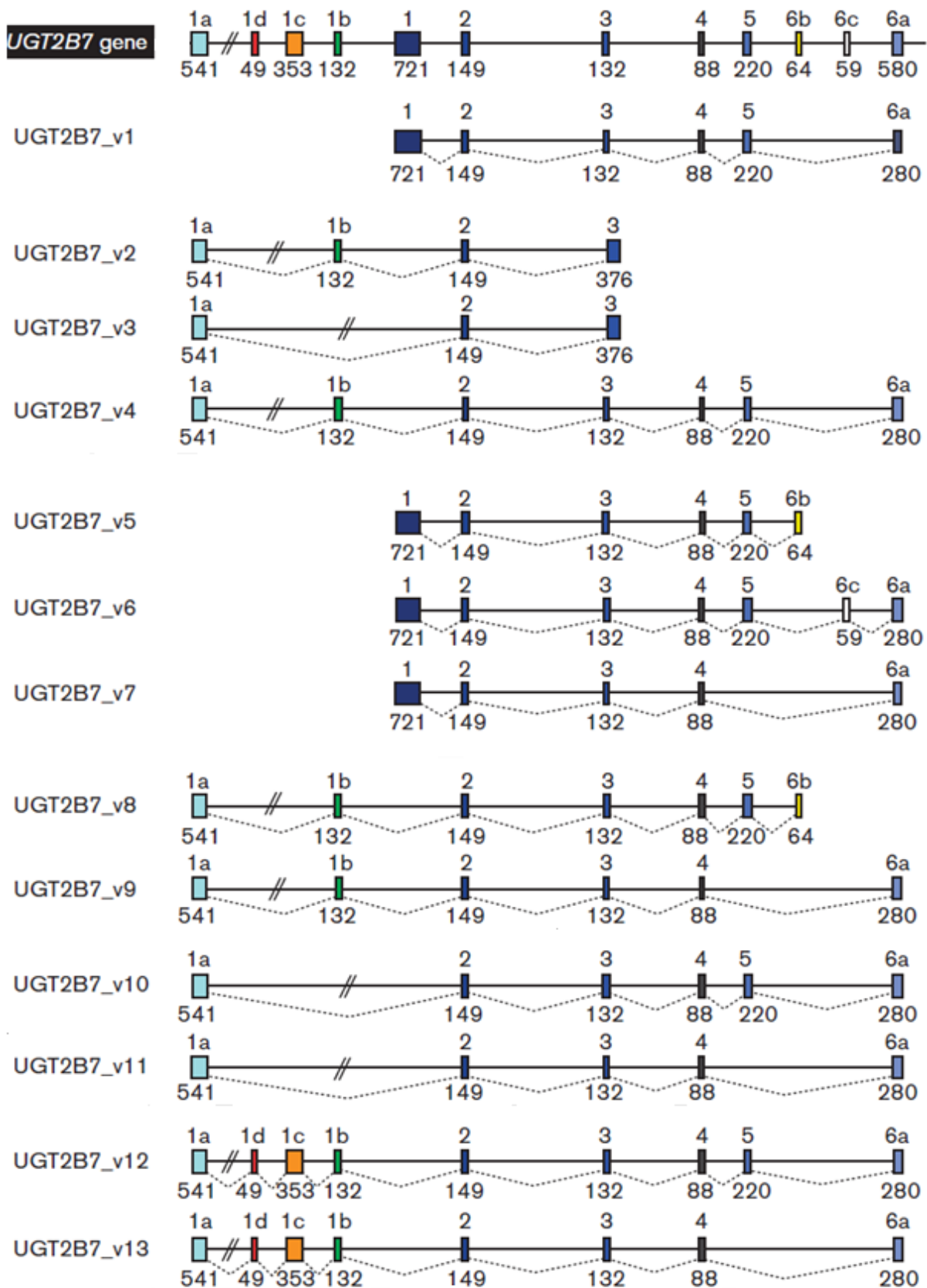
pravděpodobně kvůli pomalejší metabolizaci léku a jeho delšímu působení v těle pacienta (Parmar *et al.*, 2011), i když při laboratorních testech nebyly hlášeny rozdíly v rychlosti metabolizace epirubicinu mezi normální formou UGT2B7 a mutovanou variantou His268Tyr (Innocenti *et al.*, 2001). Naopak bylo zjištěno, že rychlost metabolizace látek, jako je například flurbiprofen (Wang *et al.*, 2011), nebo tamoxifen (Blevins-Primeau *et al.*, 2009) je výrazně snížena. Avšak u mnoha léků nemá tato mutace žádný klinický význam, jako třeba u hydromorfonu při současném podávání naltrexonu (Vandenbossche *et al.*, 2014), nadrolonu (Strahm *et al.*, 2013), kodeinu, morfinu či zidovudinu (Court *et al.*, 2003; Holthe *et al.*, 2002). O ostatních polymorfismech v exonových oblastech toho zatím není známo tolik jako o His268Tyr, ale do budoucna lze také předpokládat jejich klinický význam, jelikož u polymorfismů Ala71Ser a Asp398Asn byla rovněž zaznamenána snížená rychlost glukuronidace flurbiprofenu (Wang *et al.*, 2011).

Některé látky mohou zvyšovat hladinu UGT2B7, mezi ně patří například již zmiňovaný epirubicin a to prostřednictvím aktivace proteinu p53, který se po aktivaci váže na p53 responzivní element (p53RE) nacházející se v promotorové oblasti pro UGT2B7. Hladina mRNA byla zvýšena 23-krát a hladina proteinu 2,7-krát v buňkách HepG2 vystavených epirubicinu po 24h vůči buňkám samotným. Stejně tak byla zvýšena katalytická aktivita. Rychlost tvorby M3G byla 5-ti násobná a tvorba M6G byla 8-krát vyšší (Hu *et al.*, 2014). Další látkou, u které bylo potvrzeno zvýšení transkripční aktivity genu UGT2B7 je terciální butylhydrochinon (TBHQ), který ve střevní linii (Caco-2) zvýšil hladinu mRNA UGT2B7 10ti násobně (Münzel *et al.*, 1999) nebo přírodní antioxidant sulforafan, který zvýšil jak hladinu mRNA UGT2B7 tak i hladinu samotného proteinu (Nakamura *et al.*, 2008). Látka s opačným účinkem je kyselina lithocholová, u níž bylo zaznamenáno snížení transkripční aktivity (Lu *et al.*, 2005).

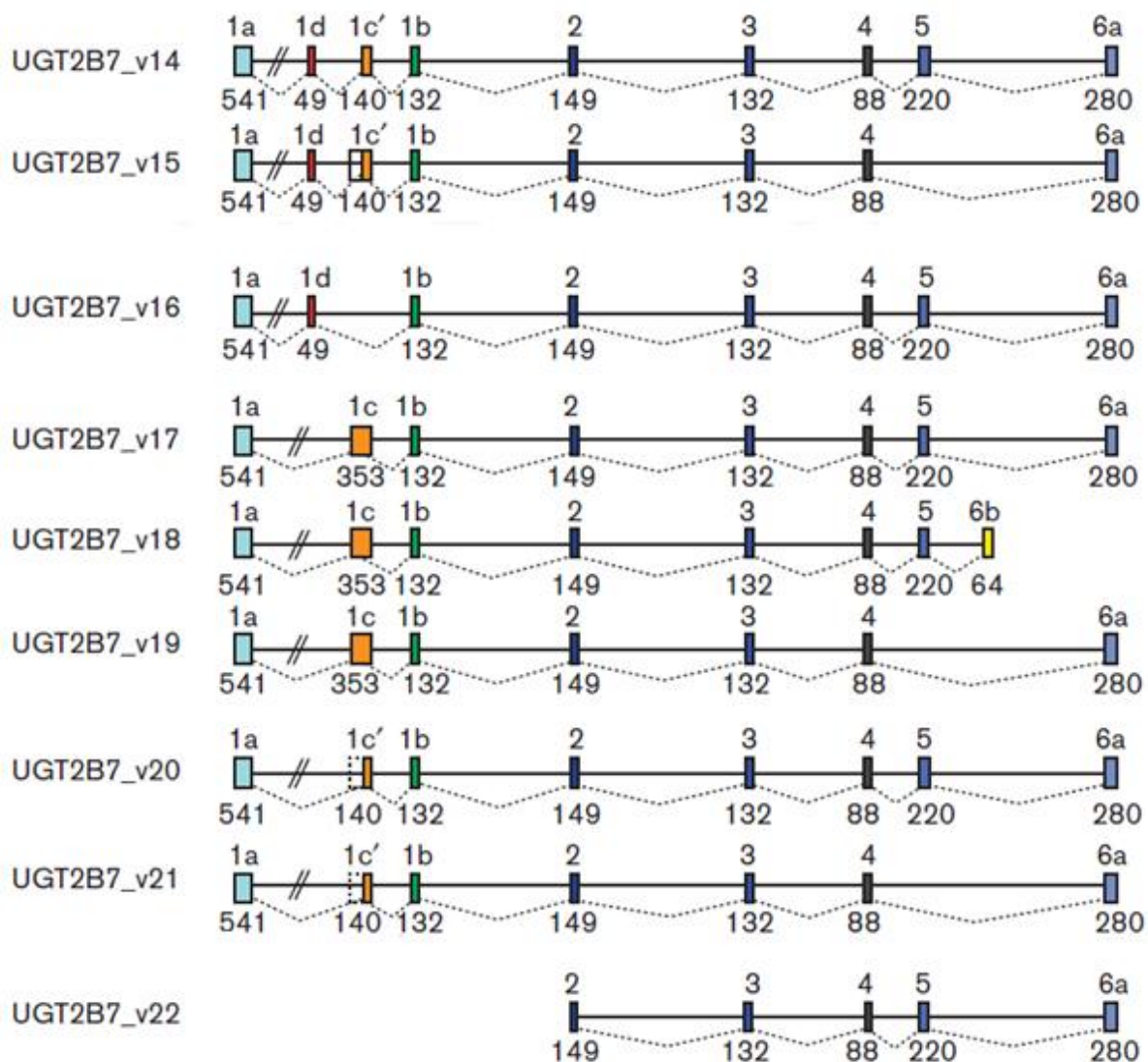
Členové genové superrodiny UGT však nejsou ovlivňováni pouze SNP, ale i posttranslačními modifikacemi, například N-glykosylace napomáhá správnému složení enzymu UGT1A9 při translaci (Nakajima *et al.*, 2010). Tato posttranslační modifikace byla prokázána u UGT2B7 i několika dalších glukuronosyl transferas jako třeba UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B15, UGT2B17 (Nakajima *et al.*, 2010; Barbier *et al.*, 2000). Efekt N-glykosylace na UGT2B7 byl prokázán na buněčné linii HEK293 (lidské embryonální ledviny). Ze tří potenciálně glykosylovaných míst (asparagin na pozici 67, 68 a 315) se glykosylace prokázala pouze na pozicích 68 a 315. Při deglykosylaci těchto pozic došlo ke snížení afinity pro zidovudin a zvýšení pro morfin, ale bez jakéhokoliv efektu na rychlost reakce (Nagaoka *et al.*, 2012).

Další důležitou posttranslační modifikací je fosforylace (adice fosfátové skupiny na aminokyselinu). V nedávné době bylo prokázáno, že valná část zástupců podrodiny UGT1 a UGT2 je fosforylováno protein kinasou C (PKC). Mezi UGT fosforylované PKC patří UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7 a UGT2B15 (Basu *et al.*, 2008). V této práci sice bylo ukázáno, že PKC má výrazný vliv na aktivitu UGT2B7, jenže použitý inhibitor (kurkumin) blokuje nejen PKC ale také Src kinasu. Naopak Mitra *et al.*, 2009 prokázala, že mutanti UGT2B7 pro místa fosforylované PKC měli v podstatě normální aktivitu, zatímco mutace v pozicích 236 a 438 (obě dvě pozice normálně obsahují tyrosin fosforylovaný Src kinasou) měla za následek téměř nulovou aktivitu enzymu UGT2B7. V téže studii zkoušeli autoři i účinek nadměrné exprese Src kinasu a aktivita enzymu UGT2B7 se zvýšila o 50% (Mitra *et al.*, 2009). Src kinasa však nemá účinek jen na aktivitu enzymu, ale i na preferovaný substrát. Experiment provedený v buněčné linii COS-1 ukazuje, že je-li UGT2B7 fosforylovaný Src kinasou, může metabolizovat 4-OH-estradiol a 4-OH estron, nikoliv však 17 β -estradiol. Pokud je fosforylace zprostředkována jinou kinasou, metabolizační reakce probíhají na všech třech sloučeninách (Mitra *et al.*, 2010). Další posttranslační modifikace, jako třeba ubiquitinace, sumoylace či neddylace, zatím nebyly u UGT2B7 zjištěny.

Ve studii, kterou provedl Holthe *et al.*, 2003, již však bylo naznačeno, že veškerou interindividuální variabilitu v metabolizaci nemůžou způsobovat pouze polymorfismy (Holthe *et al.*, 2003). Posttranslační modifikace sice modulují účinek UGT2B7, ale také nejsou odpovědí na všechny variace v metabolizaci sloučenin. Značná část interindividuální variability je totiž způsobena rozdílným sestřihem. Jak již bylo naznačeno na obrázku č. 1, UGT2B7 může mít několik variabilních 5' začátků a stejně tak i 3' konců. Případně může dojít k vystřižení vnitřního exonu číslo 4 nebo 5, popřípadě obou. První popis dalších variant exonů přinesl výzkum v roce 2008, při kterém byly popsány dva nové exony (1a a 1b) (Innocenti *et al.*, 2008). Doposud bylo odhaleno 22 sestřihových variant, přičemž varianta 1 je pokládána za normální typ UGT2B7. Všechny známé varianty sestřihu jsou zobrazeny na obrázku č. 3.



Obr. č. 3: Známé varianty sestříhu UGT2B7.



Obr. č. 3 pokračování: Známé varianty sestřihu UGT2B7. Prerušovaná čára znázorňuje místa sestřihu. Promotorové oblasti nejsou zobrazeny. Čísla nahoře označují exony a čísla dole označují počet párů bází exonů. Obrázek převzat z Ménard *et al.*, 2011.

Doména vázající substrát se nachází v exonu 1, takže katalytickou činnost může teoreticky vyvíjet kromě varianty 1 (brána jako referenční sekvence) i varianty 5, 6 a 7, které mají pouze zkrácený C-konec proteinu. Ovšem glukuronidační aktivita byla v laboratorních testech prokázána pouze u varianty 1 pro zidovudin a 4-hydroxy-estron. Nicméně, při současné expresi varianty 1 s proteinem vzniklým z varianty 2 nebo 4 (izoforma i2 a i4, viz tabulka č. 5), došlo ke snížení glukuronidační aktivity až o 56%, což naznačuje úlohu těchto izoform jako negativních regulátorů enzymové aktivity (Ménard *et al.*, 2011). Tato negativní regulace je známá i u izoform UGT1A, které samotné postrádají enzymovou aktivitu, ale působí jako negativní regulační jednotky na ostatní členy podrodiny UGT1A (Bellemare *et al.*, 2010).

Na základě in-silico analýz a in-vitro translačních experimentů bylo zjištěno, že transkripty postrádající exon 1 začínají translaci až v exonu 2, v kodonu ATG. To celkově dává pouze 7 izoform enzymu UGT2B7 (tabulka č. 5) (Ménard *et al.*, 2011).

Tabulka č. 5: Znamé izoformy UGT2B7 (Ménard *et al.*, 2011)

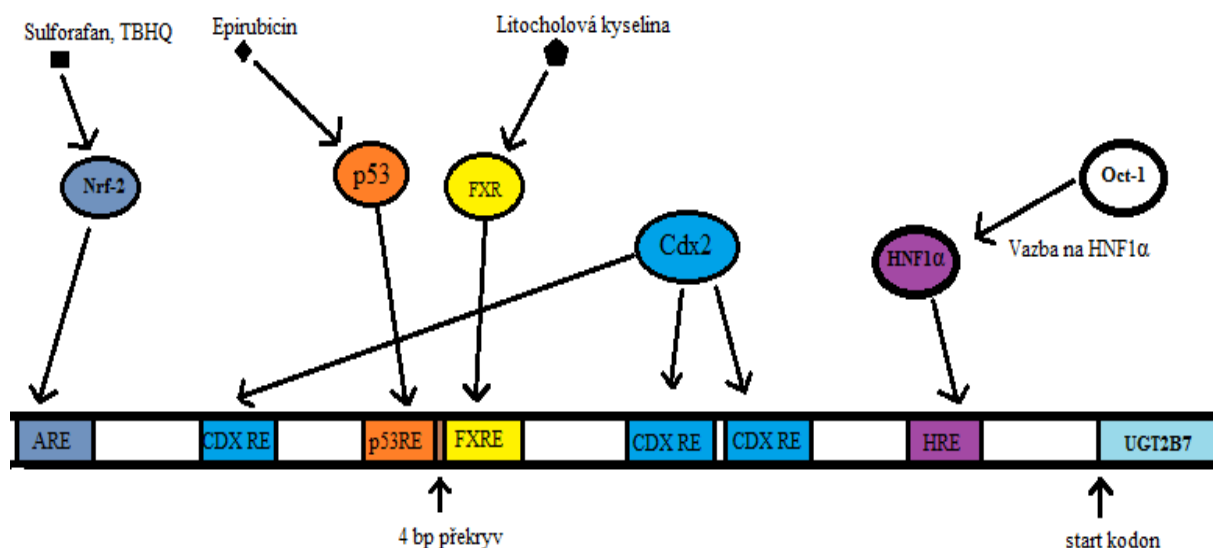
Varianta sestřihu	Izoforma	Délka proteinu	Hmotnost proteinu
UGT2B7_v1	UGT2B7_i1	529 AMK	60,7 kDa
UGT2B7_v5	UGT2B7_i2	457 AMK	51,9 kDa
UGT2B7_v6	UGT2B7_i3	450 AMK	51,3 kDa
UGT2B7_v7	UGT2B7_i4	369 AMK	42,7 kDa
UGT2B7_v4, v10, v12, v14, v16, v17, v20, v22	UGT2B7_i5	280 AMK	31,7 kDa
UGT2B7_v8, v18	UGT2B7_i6	208 AMK	22,9 kDa
UGT2B7_v9, v11, v13, v15, v19, v21	UGT2B7_i7	120 AMK	13,6 kDa

Rozdílný je i výskyt jednotlivých izoform. V gastrointestinálním traktu, játrech a ledvinách je hojně exprimována UGT2B7_i1 a další izoformy obsahující exon 1. Výskyt ostatních izoform je většinou extrahepatální a silně tkáňově specifický. Například v ledvinách byly nalezeny všechny izoformy UGT2B7, ale ve varlatech byly prokázány kromě normální izoformy pouze UGT2B7_i5 a UGT2B7_i6 (Ménard *et al.*, 2013; Ménard *et al.*, 2011). Kromě tkáňové specifity bylo prokázáno, že tento regulačně kontrolní proces odpovídající za expresi jednotlivých variant mRNA se velmi mění s vývojem člověka (přechod od prenatálního období až do dospělosti) a také je rozdílný mezi normální a rakovinou tkání. Při porovnávání rakoviny ledvin s normálními ledvinami byla transkripce variant neobsahující exon 1 až 2,9-krát vyšší než v normální tkáni a současně došlo ke snížení exprese transkriptů obsahujících exon 1. Ve zdravých ledvinách obsahuje 58% všech transkriptů UGT2B7 exon 1, ale v rakovinné tkáni pouze 30%. Při porovnávání enzymové aktivity na specifickém substrátu UGT2B7 zidovudinu dosahovali normální ledviny až 52-krát větší rychlosti než rakovinná tkáň (Ménard *et al.*, 2013).

Kromě již výše zmíněných posttranslačních modifikací nebo modulací izoformami, probíhá regulace genu UGT2B7 převážně pomocí regulace transkripce ligandem

aktivovanými transkripčními faktory. Jeden z nich je i jaterní jaderný faktor 1 α (HNF1 α , hepatic nuclear factor 1 α), který se váže do promotorové oblasti UGT2B7 a pozitivně ovlivňuje transkripční aktivitu (Ishi *et al.*, 2000). Působí společně s oktamerním transkripčním faktorem-1 (Oct-1, octamer transcription factor-1), jehož vazebné sekvence byly nalezeny v promotoru UGT2B7 (Carrier *et al.*, 2000), ale jeho vazba do těchto motivů stále nebyla prokázána. Jediný vliv Oct-1 na transkripční aktivitu UGT2B7, je jeho vazba na HNF1 α a společně tak zvyšují transkripční aktivitu. Jelikož je vazebné místo pro HNF1 α nejbližší počátečnímu místu transkripce ze všech známých transkripčních faktorů regulujících UGT2B7 a Oct-1 může vázat TFIIB (protein nezbytný pro zahájení transkripce), je možné, že tento transkripční faktor působí jako jakýsi prostředník a přestože se sám neváže na DNA, zvyšuje transkripční aktivitu UGT2B7 genu vazbou na HNF1 α a asociuje s proteiny nezbytnými pro zahájení transkripce (Ishi *et al.*, 2000). Další z transkripčních faktorů je farnesoidní X receptor (FXR, farnesoid X receptor), který je aktivován žlučovými kyselinami a negativně reguluje transkripci UGT2B7 (Lu *et al.*, 2005).

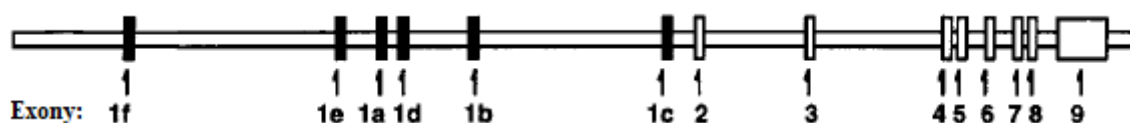
Transkripční faktor protein 53 (p53) je velmi známý tumorový supresor, který ovlivňuje mnoho genů vazbou do p53 responzivního elementu (p53RE). Hu *et al.* zjistil jeho roli v aktivaci UGT2B7 jako reakci na genotoxické sloučeniny, kterou v tomto případě zastupoval epirubicin, jeden z protirakovinných léků. Je zajímavé, že p53RE se částečně překrývá (4 bp) s responzivním elementem pro FXR. Vazba p53 do promotorové oblasti UGT2B7 několikanásobně zvýší transkripci tohoto genu a tím je snaha odbourat genotoxické látky z organismu, což v případě protirakovinných léků jako je epirubicin může mít nežádoucí následky (Hu *et al.*, 2014). Dalším transkripčním faktorem je NF-E2 p45 související faktor 2 (Nrf2, NF-E2 p45-related factor 2), který může být aktivován sulforafanem nebo terciálním butylhydrochinonem. Po jeho aktivaci pozitivně zvyšuje expresi UGT2B7 (Nakamura *et al.*, 2008[b]). Poslední z transkripčních faktorů, který se prokazatelně váže do promotorové oblasti UGT2B7 je koncově související homeodoméní protein 2 (Cdx2, caudal-related homeodomain protein 2), aktivovaný například 4-hydroxitamoxifenem (Gregory *et al.*, 2006). Pro transkripční faktory jako je Oct-1, Pxb-1 a C/EBP byla nalezena sekvence, do které by se mohly vázat, ale jejich vazba do promotorové oblasti nebyla potvrzena (Carrier *et al.*, 2000). Transkripční faktory, které se prokazatelně váží do promotorové oblasti UGT2B7 jsou zobrazeny na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Transkripční faktory, které se prokazatelně váží do promotorové oblasti UGT2B7. FXRE - FXR responzivní element, CDX RE - Cdx2 responzivní element, HRE - HNF1 α responzivní element, p53RE - p53 responzivní element, ARE - antioxidant responzivní element, TBHQ - terciální butylhydrochinon. Schéma bylo sestaveno na základě publikací Ishi *et al.*, 2000; Carrier *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2014.

3. Receptor pro vitamín D (VDR; NR1I1)

Receptor pro vitamín D (VDR, vitamin D receptor) byl poprvé objeven v roce 1969 jako protein, který má schopnost vazby biologicky aktivního vitamínu D (Haussler *et al.*, 1969). Od tohoto objevu uplynulo mnoho času a dnes již víme, že se jedná o ligandem aktivovaný transkripční faktor patřící do superrodiny jaderných receptorů, který je kódován genem ležícím v centromerické oblasti (12cen-q12) na chromozomu 12 (Taymans *et al.*, 1999). Tento gen se skládá ze 14-ti exonů rozprostírajících se po délce větší než 60 kb (obrázek č. 5), přičemž první exon má 6 variant, uplatňujících se při alternativním sestřihu (Crofts *et al.*, 1998).



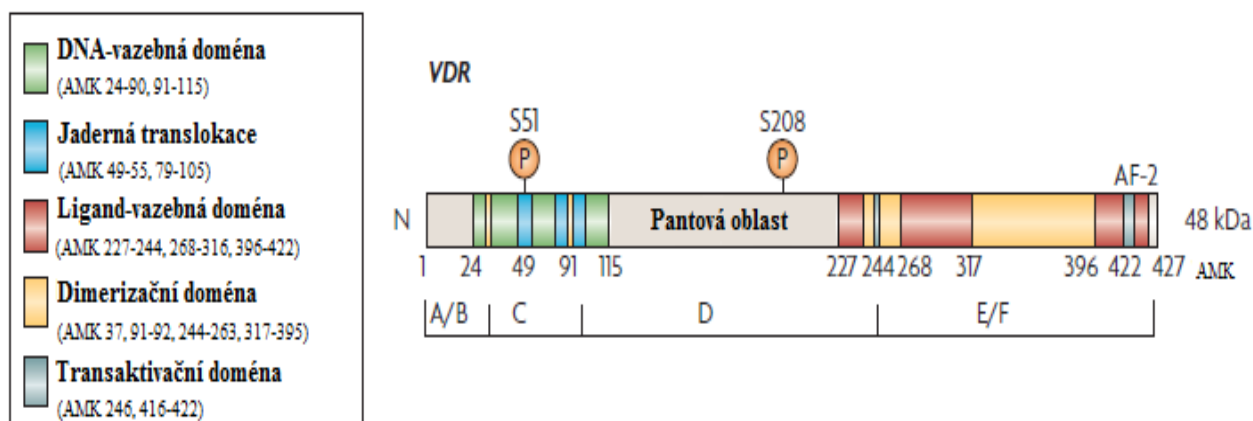
Obrázek č. 5: Struktura genu VDR. Obsahuje 14 exonů (šest variant exonu 1) a rozprostírá se v oblasti přibližně 60 kb. Promotor není zakreslen. Převzato z Crofts *et al.* 1998.

Alternativním sestřihem genu pro VDR vzniká 14 transkriptů, které začínají buď exonem 1a, 1d nebo 1f (přičemž formy začínající exony 1a a 1d jsou nejčastější). Exony 2 – 9 jsou společné všem transkriptům a ty se liší pouze v dalších variantách exonu 1, které jsou buď přítomny, nebo vynechány ve výsledné mRNA (Crofts *et al.*, 1998). Ze všech 14-ti transkriptů však byly prokázány pouze 2 izoformy VDR (VDRA a VDRB1). Nejčastějším proteinem vznikají z transkriptů je izoforma označovaná jako VDRA, obsahující 427 aminokyselin (velikost 48 kDa). Druhá izoforma (VDRB1) je prodloužena na N-terminálním konci o 50 aminokyselin (477 AMK) s hmotností 54 kDa (Sunn *et al.*, 2001; Crofts *et al.*, 1998). Prodloužení způsobuje rozdílnou reakci na ligand, zejména na $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 a lithocholovou kyselinu. V rakovinné buněčné linii COS1 je indukce promotoru CYP24A1 na stejné úrovni u obou izoform po aktivaci lithocholovou kyselinou, ale například v HEK293 nebo Caco-2 je snížena až o 36% u VDRB1. Avšak po aktivaci pomocí $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v linii COS1 je aktivace promotoru CYP24A1 vyšší až o 48% u VDRB1, což společně s dalšími výzkumy naznačuje, že aktivace této izoformy receptoru závisí na druhu ligandu, tkáni a ostatních faktorech (Esteban *et al.*, 2005).

Po translaci exonů 2 – 9 vzniká 6 domén (A – F), které dohromady vytváří celkovou strukturu VDR a její nejdůležitější části jsou DNA-vazebná doména (DBD, DNA-binding domain: umožňuje VDR vazbu na DNA ve vitamín D responzivním elementu (VDRE)), dimerizační doména (heterodimerizace VDR s retinoidním X receptorem (RXR) po aktivaci

VDR ligandem), ligand-vazebná doména (LBD, ligand-binding domain: slouží k navázání ligandu), transaktivační doména (TAD, trans-activating domain: umožňuje vazbu koregulačních proteinů) a doména umožňující jadernou translokaci (Deeb *et al.*, 2007).

Na rozdíl od ostatních jaderných receptorů má VDR natolik zkrácenou A/B oblast, že postrádá oblast aktivační funkce 1 (AF1, activation function 1), označovaná také jako ligand nezávislá doména, která se normálně nachází na N konci receptoru. VDR tak má pouze aktivační funkci 2 (AF2, activation function 2) na C konci označovanou jako na ligandu závislá doména (Nagpal *et al.*, 2001; Sone *et al.*, 1991). V DBD se vyskytují zinkové prsty (Znf, zinc finger), což jsou struktury tvořené centrálním atomem zinku vázajícího se k 4 dalším aminokyselinám (v tomto případě má Znf motiv C2-C2, což je propojení přes cysteiny) a tato strukturní změna napomáhá lepšímu cílení VDR do VDRE (Nagpal *et al.*, 2001). Struktura VDRA je zobrazena na obr. č. 6.



Obr. č. 6: Struktura proteinu VDRA s jednotlivými doménami. Čísla zobrazují jednotlivé aminokyseliny. S51 a S208 jsou místa fosforylace na serinu pro stabilizaci komplexu VDR-1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$. AF2 je oblast na C konci proteinu a probíhá na ní interakce s koregulačními proteiny. Obrázek převzat z Deeb *et al.*, 2007.

VDR je po translaci přítomen v cytoplasmě i jádře většiny buněk lidského těla a to i bez navázaného ligandu (Berger *et al.*, 1988). Dřívější experimenty, které ukazovaly většinovou distribuci VDR v jádře, byly vyvráceny pomocí fluorescenčně značeného ligandu VDR (BODIPY-kalcitriol). Při experimentech se syntetickým ligandem bylo zjištěno, že až 50% z celkového množství VDR přítomného v buňce je zároveň v cytoplasmě a při navázání ligandu dojde k ustavení rovnováhy v distribuci přibližně za 5 minut (Barsony *et al.*, 1997). Výjimku tvoří specializované buňky jako například Purkyňovy buňky v mozečku a neurony Meynertova jádra, u kterých zatím nebyla přítomnost VDR prokázána (Eyles *et al.*, 2005).

Po navázání ligandu na ligand-vazebnou doménu dochází ke konformačním změnám a VDR poté podstupuje fosforylaci pomocí PKC na serinu 51 (S51). Protein VDR s mutací v tomto místě, která znemožňuje fosforylaci, vykazuje velmi sníženou transkripční aktivaci VDR pomocí ligandu $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a tím i ovlivnění cílových genů (Hsieh *et al.*, 1991). Stejně důležitá je i fosforylace na pozici 208 (S208), způsobená kasein kinasou II (CK-II), která také moduluje účinnost transkripční regulace VDR (Jurutka *et al.*, 1993).

Tyto fosforylace pomáhají stabilizovat komplex VDR/ligand (Hsieh *et al.*, 1991; Jurutka *et al.*, 1993), který se poté váže na jeden z podtypů RXR a to RXR α , RXR β nebo RXR γ . RXR musí být bez navázaného ligandu, jinak heterodimerizace není možná (Kato *et al.*, 2000; Sánchez-Martínez *et al.*, 2008). Po vytvoření heterodimeru VDR/RXR může začít docházet k vazbě dalších proteinů (korepresorů či koaktivátorů). U ostatních receptorů (například PPARs) dochází po vazbě antagonisty k navázání korepresorů a při vazbě agonisty se navazují spíše koaktivátory (Sánchez-Martínez *et al.*, 2008). U VDR však byla prokázána vazba korepresorů jako je jaderný receptorový korepresor (N-CoR, nuclear receptor corepressor) (Dwivedi *et al.*, 1998), nebo umlčující mediátor pro receptory retinoidních a tyroidních hormonů (SMRT, silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) (Tagami *et al.*, 1998) bez navázaného ligandu. Nicméně schopnost potlačení genové exprese bez navázaného ligandu je minimální, i když jsou přítomny oba korepresory. Tato zjištění naznačují, že SMRT a N-CoR negativně regulují VDR zprostředkovanou transkripci a bez navázaného ligandu nemají téměř žádný účinek na cílové geny. V minulosti se uvažovalo pouze o modelu, při kterém oba korepresory disociují z VDR po navázání ligandu $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a tento model je běžný u jiných jaderných receptorů (Sánchez-Martínez *et al.*, 2008).

Komplex VDR/RXR může ovlivňovat genovou expresi dvěma způsoby. První a nejčastější způsob je, že se váže do promotorové oblasti cílových genů na VDRE, který má motiv přímých opakování hexanukleotidové sekvence AGGTCA oddělené od sebe třemi nukleotidy (DR3, direct repeats 3) (Nagpal *et al.*, 2001). Do VDRE se ovšem váží nespécificky ještě další dva receptory a to konstitutivní androstanový receptor (CAR, constitutive androstane receptor) (Moreau *et al.*, 2007) a pregnanový X receptor (PXR, pregnane X receptor), což při aktivaci těchto receptorů vede k ovlivněním enzymů normálně aktivovaných vitamínem D (Pascussi *et al.*, 2005). Druhým způsobem je antagonizace účinku určitých transkripčních faktorů, jako je třeba jaderný faktor aktivovaných T buněk (NFAT, nuclear factor of activated T cells) (Takeuchi *et al.*, 1998) nebo jaderný faktor kappa B (NF-

κ B, nuclear factor kappa B), ale tento mechanismus akce VDR/RXR heterodimeru je minoritní (Harant *et al.*, 1997).

Mezi nejvýznamnější koaktivátory VDR, které umožňují spuštění transkripce cílových genů, patří například koaktivátory steroidních receptorů p160 (SRC/p160, steroid receptor coactivators p160) nebo s receptorem pro vitamín D interagující protein (DRIP, vitamin D receptors interacting proteins) (Rachez *et Freedman*, 2000). Jejich přítomnost však není stálá a mění se s vývojem buněk. Například v proliferujících keratinocytech byl identifikován DRIP 205 (jedna z podjednotek DRIP komplexu) společně s SRC-3, který patří do SRC/p160, jako hlavní koaktivátor VDR. Ale v již diferenciovaných keratinocytech ztratil DRIP 205 účinek, což poukazuje na vývojovou a tkáňovou specifitu koaktivátorů VDR (Oda *et al.*, 2004). Po vazbě na jaderný receptor začne SRC/p160 vázat další koaktivátory jako je CREB vázající protein (CBP, CREB-binding protein), p300/CBP asociovaný faktor (PCAF, p300/CBP-associated factor) a koaktivátor asociovaný s argininovou metyltransferasou (CARM, coactivator associated arginine methyltransferase), které usnadňují transkripci díky asociaci histonové acetyltransferasy (HAT, histone acetyltransferase) a metyltransferasy. Tento sled událostí způsobí destabilizaci chromatinu a umožní zahájení transkripce (Oda *et al.*, 2004; Rachez *et Freedman*, 2000; Leo *et Chen*, 2000).

Samotná transkripce je komplexní proces a koaktivátory nejsou jediné prvky, které jsou vyžadovány pro její úspěšné zahájení. Po vazbě koaktivátorů dochází ke tvorbě preiniciačního komplexu DNA dependentní RNA polymerázy II, který se skládá z několika základních transkripčních faktorů jako TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF a TFIIF (Nagpal *et al.*, 2001; Roeder, 1996). Zde byla prokázána přímá interakce ligand vazebné domény VDR s TFIIB (MacDonald *et al.*, 1995) a u TFIIA byla prokázána přímá reakce s heterodimerem VDR/RXR, která je navíc silně stimulována ligandem VDR, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃ (Lemon *et al.*, 1997).

Kromě koaktivátorů však musíme brát v potaz i korepresory. Nejznámějšími korepresory vázající se na komplex VDR/RXR jsou N-CoR a SMRT. Tyto korepresory se však neváží jen za přítomnosti antagonistů, jak je zvykem u ostatních jaderných receptorů a bylo zmíněno výše. V nedávné době bylo zjištěno, že výše zmíněné korepresory byly navázány na VDR spolu s koaktivátory SRC1, CBP a MED1 (mediator 1) a to po vazbě agonisty $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃, nikoli antagonisty (Meyer *et Pike*, 2013). Mezi další korepresory, které se váží na VDR, patří „bezvlasý“ (Hr, hairless), u něžž bylo prokázáno, že mutantní verze postrádají korepresorovou aktivitu. Hr si své jméno vysloužil právě proto, že je velmi důležitý při růstu vlasů (Mi *et al.*, 2011).

Mezi přirozené ligandy VDR patří již zmiňovaný vitamín D, který má v přírodě dvojitě zastoupení. Vitamín D₃ neboli cholekalciferol si ve velkém množství tvoří převážná většina suchozemských živočichů z pre-vitamínu D₃ (7-dehydrocholesterolu) působením UV záření o vlnové délce 290 – 315 nm (Holick, 2003). Samozřejmě existují i výjimky. Například ryponyš damarský (*Fukomys damarensis*) má jen minimální množství vitamínu D v krvi a regulace vápníku je nezávislá na vitamínu D (Pitcher *et al.*, 1994). Další raritou jsou psi a kočky, jejichž tvorba vitamínu D je minimální oproti ostatním podobným živočichům (How *et al.*, 1994). Vitamín D₂ (ergokalciferol) je pravděpodobně jeden z nejstarších hormonů na světě a je rostlinného původu. Byl nalezen u jednobuněčné mořské řasy *Emiliana huxleyi*, která existuje v nezměněné podobě nejméně 750 milionů let (Holick, 2003).

Ať už se jedná o rostlinný nebo živočišný vitamín D, každý z nich musí být dvakrát hydroxylován a to prvně na pozici 25 za vzniku 25-hydroxyvitamin D_{2/3}. Za tuto hydroxylaci je odpovědných sedm cytochromů P450 (CYP27A1, CYP2R1, CYP2J2/3, CYP3A4, CYP2D25 a CYP2C11 (Zhu *et DeLuca*, 2012). Poslední hydroxylace na pozici 1 α , která vede k tvorbě metabolitu schopného vazby na VDR, je zprostředkovávána CYP27B1, jehož hladina je přísně regulována (Zhu *et DeLuca*, 2012). Dalším známým přirozeným ligandem VDR je sekundární žlučová kyselina. Litocholová kyselina (LCA, lithochol acid) působí jako aktivátor VDR, který poté zvyšuje expresi enzymu CYP3A4, který metabolizuje LCA a zabraňuje tak jejímu hepatotoxickému a potenciálně karcinogennímu účinku (Makishima *et al.*, 2002).

Vzhledem k biologické důležitosti VDR je zřejmé, že byla snaha syntetizovat mnoho umělých ligandů VDR, z nichž některé by šlo použít při léčbě různých onemocnění. Jedním z takovýchto přípravků je i tacalcitol, který užívají pacienti trpící lupénkou (Gollnick *et Menke*, 1998) nebo alfakalcidol používaný při léčbě osteoporózy (Nagpal *et al.*, 2001).

Pomocí VDR je na transkripční úrovni regulováno mnoho genů náležejících do jedné ze tří fází biotransformace. Z genů první fáze se jedná například o CYP3A4 (Makishima *et al.*, 2002), CYP2B6, CYP2C9 (Drocourt *et al.*, 2002) a samozřejmě enzym CYP24A1, který je odpovědný za hydroxylaci vitamínu D na pozici 24 a tím způsobí jeho biologickou deaktivaci (Tashiro *et al.*, 2007). Z enzymů druhé fáze je zastoupen například enzym SULT2A1 (Echchgadda *et al.*, 2004) nebo SULT2B1b (jedna ze dvou izoform enzymu SULT2B1), který se ukazuje jako důležitý faktor v regulaci proliferace rakoviny prostaty (Seo *et al.*, 2013). Z transportérů třetí fáze biotransformace regulovaných pomocí VDR lze jmenovat OATP1A2 (Eloranta *et al.*, 2012).

4. Cíl práce

Cílem této práce bylo porovnat tkáňově specifické rozdíly v regulaci enzymu UGT2B7 v několika tkáních lidského těla a soustředit se na dvě biotransformačně nejvýznamnější oblasti a to játra a střevo. Porovnání bylo provedeno převážně na hladině mRNA, pouze u vybraných tkání i na hladině proteinu. Dále byly připraveny vzorky pro měření katalytické aktivity.

5. Materiál a přístroje

Materiál a chemikálie:

- plastové špičky 0,1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l a 100 - 1000 μ l (Eppendorf)
- Dublecco's modified Eagle's medoum (DMEM, Sigma Aldrich, D6546)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, G8540),
- neesenciální aminokyseliny (Sigma Aldrich, M7145),
- fetálně bovinní sérum (
-penicilin a streptomycin (Penicilin-10000 units/ml; Streptomycin-10000 mg/ml) (Gibco, 1221644)
- buničina (Vitrum)
- ddH₂O
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- 1x PBS (Gibco, 1613686)
- izopropanol (Lab-Nev s.r.o., 20037-AT0)
- 75% etanol (Sigma Aldrich, 459844)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- sérologické pipety 0,1 - 2 ml, 1 - 5 ml, 1 - 10 ml, 1 - 25 ml (TPP Biotech)
- 6-ti jamkové kultivační destičky (TPP Biotech)
- 96-ti jamkové bílé PCR destičky (Roche)
- UPL sondy 86 (Roche, 04689119001) a 60 (Roche, 04688589011)
- trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- Primery pro UGT2B7 viz tabulka č. 6 (Generi Biotech)
- Primery pro GAPDH viz tabulka č. 6 (Generi Biotech)
- Primery pro CYP24A1 viz tabulka č. 6 (IDT)
- 10x reakční pufr (Biolabs, F-572B)
- dNTP 10 mM (dCTP (B1058A); dTTP (B1048A); dCTP (B1050A); dATP (B1053A) TaKaRa)
- inhibitory RNAs (Biolabs, M0307L)
- M-MuLV (reverzní transkriptáza (200000 U/ml), Biolabs, M0253L)
- střední kultivační láhev o obsahu 25 cm² (TPP Biotech)
- plastová škrabka (Cell scraper, Sigma Aldrich)
- TRI reagent (Sigma Aldrich, T9424)
- random Primers (TaKaRa, N2201FA)

- kalcitriol (Sigma Aldrich, D1530)
- resveratrol (Sigma Aldrich, R5010)
- dimethylsulfoxid (Lach-Ner s.r.o., 20022-CT0)
- Probes Master (Roche, 04707494001)
- lyzační pufr pro proteiny (50mM HEPES, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% TRITON, pH=7,5)
- Naloxon (Sigma Aldrich, N7758)
- Sulforafan (Sigma Aldrich, S4441)
- protilátka proti UGT2B7 (BD Gentest, 04-20022)
- protilátka proti Aktinu (Santa Cruz Biotechnology, A2513)
- sekundární protilátka anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, J2811)
- sekundární protilátka anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, J0713)
- lauryl síran sodný (Sigma Aldrich, L3771)
- acrylamid (Bio Basic Canada INC., UN2810)
- TEMED (Bio Basic INC., TB0508)
- metanol (lach:ner, 20038-AT0)
- acetonitril (Bio Basic Canad INC., AC1400)
- odtučněné sušené mléko (Laktino)
- persíran amonný (Sigma Aldrich, A3678)
- HEPES (Sigma Aldrich, H3375)
- EDTA (Sigma Aldrich, E9884)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich, T6146)
- NaCl (lach:ner, 02150)
- TRITONTM X-100 (Sigma Aldrich, X100)
- substrát pro peroxidasu (C-dígit, 926-95000)

Tabulka č. 6: Sekvence primerů pro různé geny

Gen	Sekvence primeru (Forward)	Sekvence primeru (Reverse)
UGT2B7	ACCAAATGTTGATTTTGTGGA	CACCACAACACCATTTTCTCC
GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTGAC	ACGACCAAATCCGTTGACTC
CYP24	TCATCATGGCCATCAAACA	GCAGCTCGACTGGAGTGAC

Přístroje:

- laminární box Bio II Advance 4 (TELSTAR Technologies)
- nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- stolní centrifuga Z 100 M (Hermle)
- termoblok dry bath incubator MD-02N (BioTech)
- vodní lázeň LCB22D (LabTech)
- LightCycler 480 II (Roche)
- mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- Pipety reference 0,1 - 2,5 μ l, 1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 2 - 20 μ l, 100 - 1000 μ l (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld)
- FastPette (LabNet)
- aparatura pro SDS-PAGE (BioRad)
- detekční skenr Li-COR model 3600 (C-Digit)
- infinite M200PRO (TECAN)

Buněčné linie:

- LS180: Human Caucasian colon adenocarcinoma (ECACC; 87021202)
- CaCo-2: Human Caucasian colon adenocarcinoma (ECACC; 86010202)
- HepG2: Human Caucasian hepatocyte carcinoma (ECACC; 85011430)
- MDA MB231: Human Caucasian breast adenocarcinoma (ECACC; 92020424)
- MCF-7: Human Caucasian breast adenocarcinoma (ECACC; 86012803)
- A172: Human glioblastoma (ECACC; 88062428)
- A549: Human Caucasian lung carcinoma (ECACC; 86012804)

6. Metodika:

Izolace RNA, reverzní transkripce a PCR

Celková buněčná RNA byla izolována pomocí TRI Reagent® podle návodu výrobce. cDNA byla syntetizována z 1000 ng celkové buněčné RNA za použití M-MuLV reverzní transkriptázy a chemikálií uvedených v tabulce č. 7 po dobu 1 hodiny při 42 °C. Na provedení q-PCR byly použity primery uvedené v tabulce č. 6 a Universal Probes Library systém podle pokynů výrobce. Použité chemikálie a časy jednotlivých cyklů jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka č. 7: Množství látek v reakční směsi pro jeden vzorek.

Použitá chemikálie	Objem [μl]
M-MuLV (reverzní transkriptáza)	0,6
Inhibitor RNAas	0,3
dNTP (nukleotidy)	0,6
10x reakční pufr	1,2
dd H ₂ O	3,3

Tabulka č. 8: Chemikálie a nastavení PCR reakce

Objemy chemikálií pro 1 jamku na 96-ti jamkové desce			
Chemikálie	Objem [μl]		
Směs primerů F + R pro zájmový gen	0,8		
UPL pro zájmový gen	0,2		
Probes Master	5		
Voda	1		
cDNA vzorku	3		
Nastavení PCR			
Formát detekce	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Prob		
Objem	10 μl		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
<i>Preinkubace</i>	95	10 min	1
<i>Amplifikace</i>	95	10 s	45
	60	30 s	
<i>Chlazení</i>	40	30 s	1

Western blotting

Celkový buněčný lyzát každého vzorku byl získán z jedné jamky z 6-ti jamkových desek. Po opláchnutí ve vychlazeném 1x PBS, byly buňky seškrábnuty do vychlazeného PBS a centrifugovány 3000 g po dobu 2 minut při 4 °C. Pelet byl následně resuspendován ve 120 µl lyzačního pufru, vortexován 5 minut a centrifugován 13 000g po dobu 15 minut při 4 °C. Supernatant byl použit pro další pokusy a obsah proteinů v supernatantu byl zjištěn pomocí metody Bratfordové (Bratford Reagent, podle pokynů výrobce). 10% SDS-PAGE gel byl použit v aparatuře od firmy BioRad za standardních podmínek podle pokynů výrobce a proteiny z gelu byly poté přeneseny na PVDF membránu pomocí blotovací aparatury (BioRad). Membrána byla poté umístěna na 1 hodinu do 5% roztoku odtučněného mléka v 1x TBS/Tween pufru při laboratorní teplotě a poté inkubována s primární protilátkou proti detekovanému proteinu (UGT2B7 nebo aktin). Primární protilátka proti UGT2B7 byla ředěna 1:1000 v 5% roztoku BSA v TBS/Tween a inkubována 3 hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka proti aktinu byla ředěna 1:500 a použita stejně jako za předchozích podmínek. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána opláchnuta 3x 5 minut v 20 ml 1x TBS/Tween a poté inkubována se specifickou protilátkou ředěnou 1:5000 v 2,5% odtučněném mléku rozpuštěném v 1X TBS/Tween. Detekce byla provedena pomocí Western blotting Luminol kit podle pokynů výrobce a detekována na skeneru Li-COR model 3600. K vyhodnocení dat byl použit software dodávaný výrobcem skeneru (Image Studio Digits v 3.1).

Buněčné linie

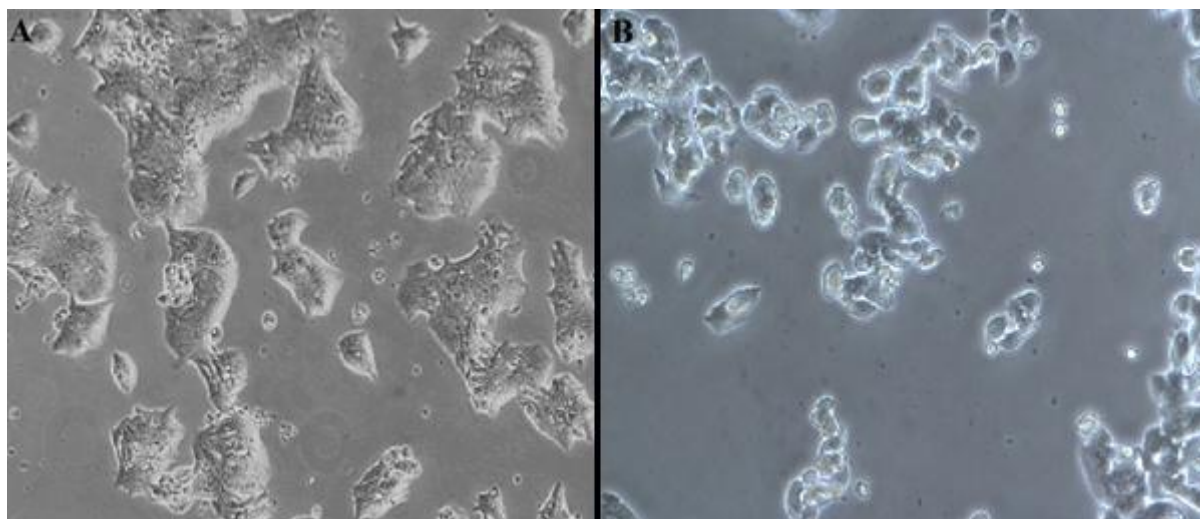
Všechny buněčné linie byly kultivovány v Dublecco's modified Eagle's medoum (DMEM) obohaceném o 100U/ml streptomycin, 4 mM L-glutamin, 10% fetální bovíní sérum, 100U/ml streptomycin a 1% neesenciálních aminokyselin v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a nasycené vzdušné vlhkosti. Buňky byly vystaveny chemikáliím po 24h (RNA) nebo 48h (proteiny a katalytická aktivita). Jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid (DMSO) a buňky byly vystaveny kalcitriolu (VD3), resveratrolu (RVT), sulforafanu (SFN) nebo terciálnímu butylhydrochinonu (TBHQ).

Katalytická aktivita

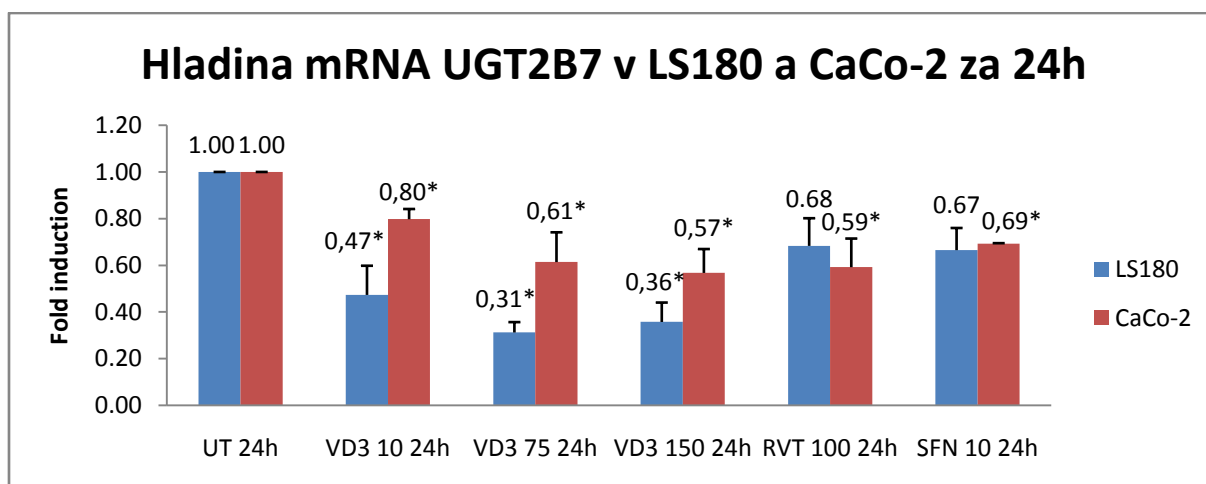
Příprava vzorků pro detekci katalytické aktivity UGT2B7 byla provedena podle Donato *et al.*, 2010 beze změny.

7. Výsledky:

Již dlouho je známo, že ligandem aktivované transkripční faktory ovlivňují hladinu biotransformačních enzymů pomocí regulace transkripce. U kalcitriolu, ligandu VDR, byl prokázán vliv na transkripci i translaci UGT2B15 a UGT2B17. Snížení hladiny mRNA a proteinu obou genů bylo prokázáno po oba sledované časy a to 24h a 96h (Kaeding et al., 2008). Jak již bylo zmíněno výše, u UGT2B15, UGT2B17 a UGT2B7 se předpokládá společný ancestrální předchůdce, ze kterého se tyto tři geny vyvinuly (Carrier *et al.*, 2000). Proto se lze domnívat, že by u UGT2B7 mohla být podobná regulace na úrovni transkripce i translace jako u dvou pravděpodobně příbuzných genů a že UGT2B7 bude ovlivněn po vystavení kalcitriolu. Tato práce také navazuje na mou předešlou bakalářskou práci (Ženata O., bakalářská práce 2013), v níž lze na základě výsledků alespoň předpokládat, že UGT2B7 je regulován za pomoci VDR. Na základě těchto dat jsem se rozhodnul prověřit možnou regulaci UGT2B7 v jiných tkáních než jen ve střevní tkáni, která byla použita v bakalářské práci. Zároveň jsem střevní tkáň rozšířil o další dvě rakovinné buněčné linie odvozené od střevní tkáně, a to LS180 (LS174T a LS180 jsou obě připraveny z tkáně stejné pacientky, ale linie LS174T byla připravena trypsinizací a je mezi liniemi vidět i rozdílná morfologie, viz obr. č. 7) a CaCo-2 (od prvně dvou jmenovaných linií se liší tím, že byla odebrána jinému pacientovi za použití techniky explantátových kultur). Naměřené výsledky po vystavení těchto dvou linií koncentracím kalcitriolu a dvě dalším látkám (resveratrol a sulforafan) jsou vidět na grafu č. 1.



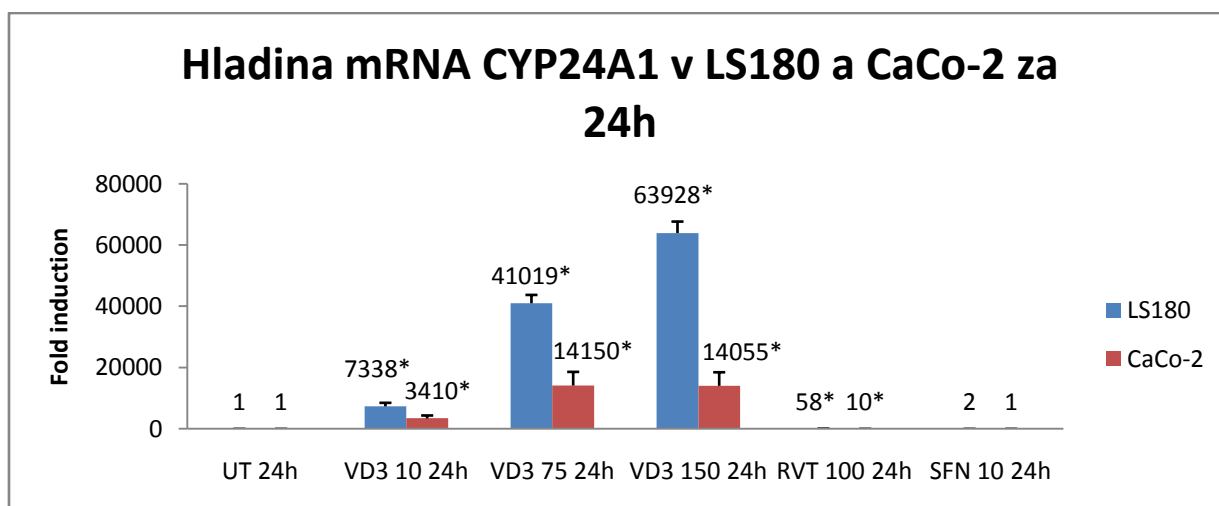
Obr. č. 7: Porovnání morfologie LS174T (na snímku A) a LS180 (na snímku B). Linie LS174T byla připravena za použití trypsinu a linie LS180 byla pouze odebrána. Obě linie pochází ze stejné pacientky.



Graf č. 1. : Expres mRNA UGT2B7 v LS180 a CaCo-2 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT, untreated cells). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

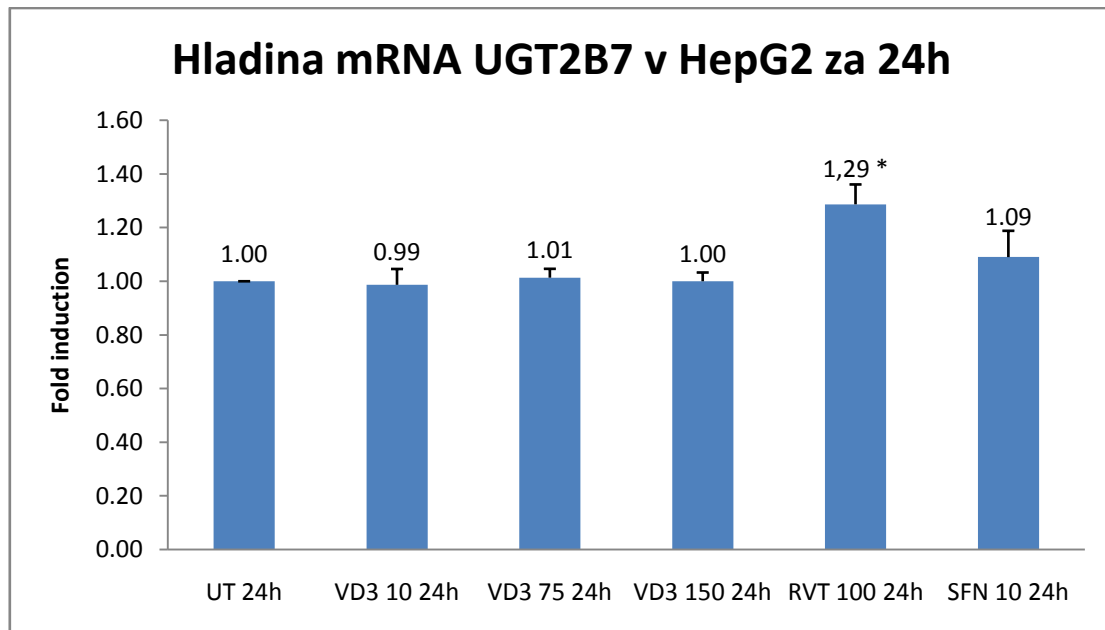
V grafu č. 1 je vidět u obou linií stejný trend a to pokles hladiny mRNA UGT2B7 po ošetření buněk kalcitriolem již za 24h. Snížení hladiny mRNA bylo u obou linií statisticky významné a tento pokles se shoduje s daty v bakalářské práci, kde jak za 24h tak za 48h došlo ke snížení mRNA UGT2B7 v rakovinné buněčné linii LS174T. Za 24h byl pokles přibližně o 50% pro všechny koncentrace kalcitriolu. V případě delšího testovacího času 48h došlo ke snížení až o 70% (Ženata O., Bakalářská práce, 2013). Co se týče resveratrolu, tak v LS174T působil slabě pozitivně na indukci exprese UGT2B7 a za 24h byla hladina mRNA vyšší 1,3-krát, za 48h dokonce 3,1-krát (Ženata O., Bakalářská práce, 2013). V případě buněčné linie LS180 byl pozorován trend inhibice exprese, který však nebyl na hladině statistické významnosti. U CaCo-2 byla transkripce UGT2B7 resveratrolem signifikantně snížena o 41%. Sulforafan snížil hladinu u obou linií, ale statisticky významná data byla získána pouze u linie CaCo-2.

Dále bylo potřeba ověřit, jestli dané snížení mRNA opravdu souvisí s VDR. Mnohokrát bylo prokázáno, že aktivovaný VDR pozitivně ovlivňuje expresi CYP24A1 svou vazbou do promotorové oblasti tohoto genu a poté dochází k mnohonásobně zvýšené indukci exprese mRNA CYP24A1. Toto měření je vidět na grafu č. 2.

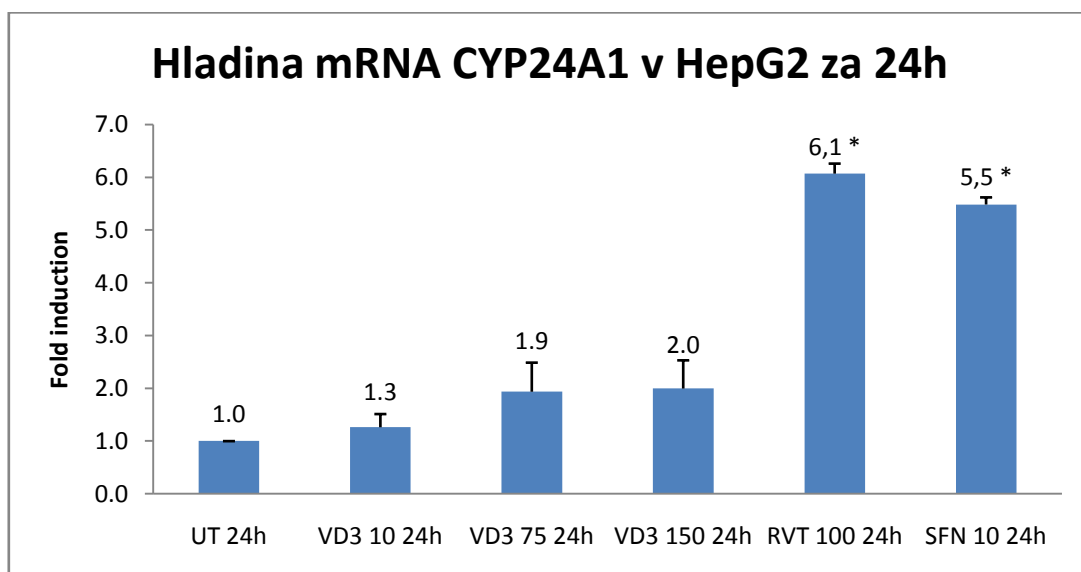


Graf č. 2. : Expres mRNA CYP24A1 v LS180 a CaCo-2 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

Jak je vidět na grafu č. 2, v obou případech došlo k mnohonásobnému zvýšení mRNA hladiny CYP24A1 v buňkách vystavených kalcitriolu oproti buňkách, ke kterým bylo přidáno jen DMSO. Tím jsem prokázal, že VDR signalizační dráha je v těchto buněčných systémech funkční a lze tedy předpokládat, že snížení exprese genu UGT2B7 může souviset s VDR. Nejdůležitějším orgánem z hlediska biotransformace jsou však játra a proto jsem provedl stejné experimenty i na linii HepG2 (odvozené od karcinomu jater). Na grafu č. 3 je vidět hladina mRNA UGT2B7 a na grafu č. 4 hladina CYP24A1 v linii HepG2.



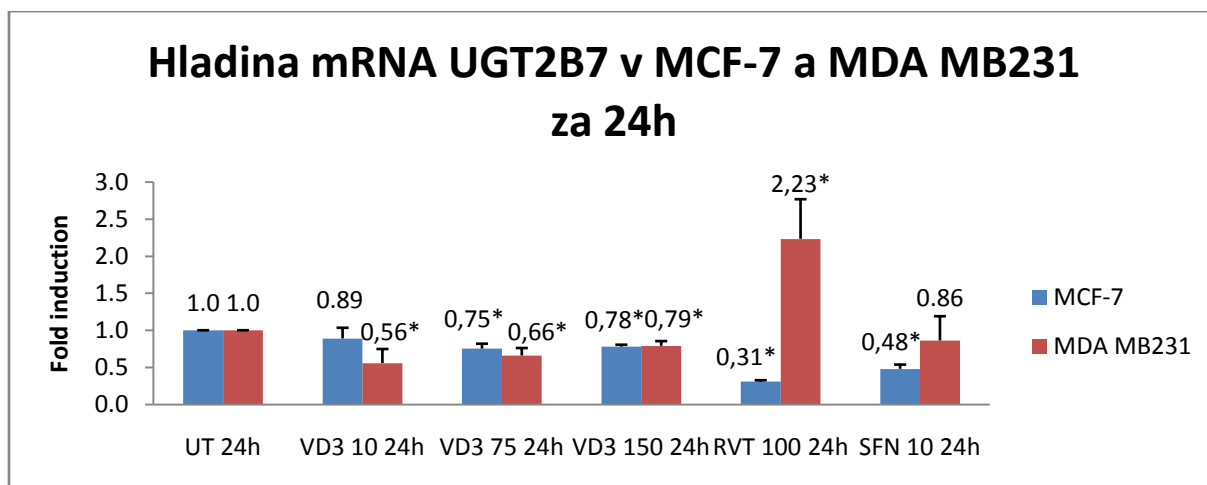
Graf č. 3. : Expresí mRNA UGT2B7 v HepG2 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).



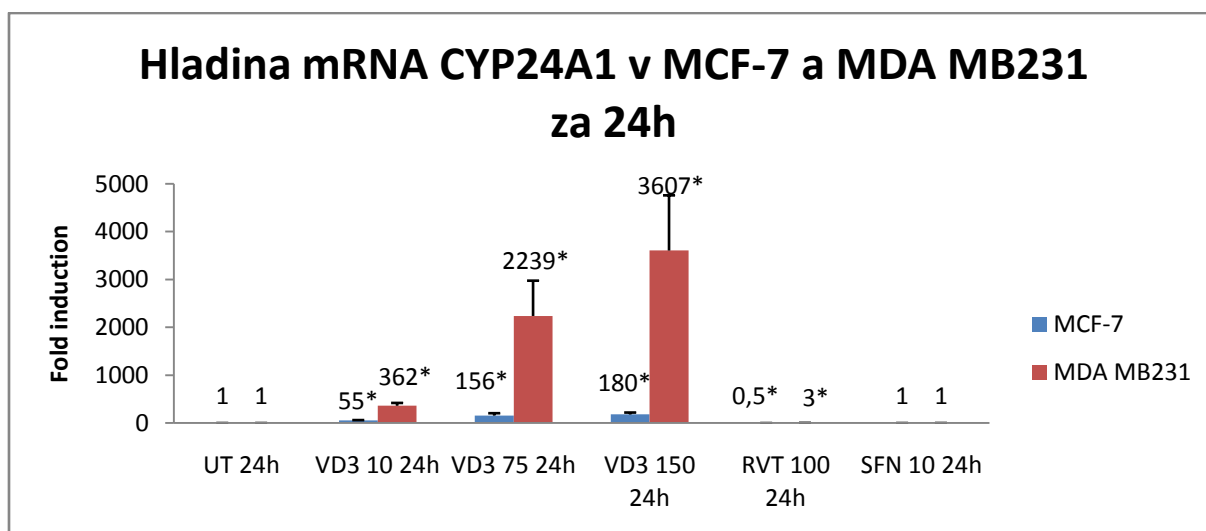
Graf č. 4. : Expresí mRNA CYP24A1 v HepG2 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

Jak je vidět na grafu č. 5, tak jediná statisticky významná změna, bylo lehké zvýšení exprese UGT2B7 po použití resveratrolu. Přítomnost kalcitriolu měla nulový vliv na hladinu UGT2B7 mRNA, stejně tak i sulforafan. Při měření hladiny mRNA CYP24A1 také nebyla zjištěna statisticky významná indukce při vystavení buněk kalcitriolu, což ukazuje jen na minimální nebo nulovou přítomnost funkčního VDR v linii HepG2. Nicméně resveratrol se v případě buněčné linie HepG2 projevil jako induktor CYP24A1, stejně tak i sulforafan. Obě látky však dokázaly zvýšit hladinu mRNA CYP24A1 pravděpodobně jinou než VDR dependentní dráhou.

Protože byla exprese VDR a UGT2B7 detekována takřka ve všech tkáních celého těla, rozhodl jsem se ověřit vzájemný vztah v jiných liniích než těch odvozených od jater či střeva. Další buněčné linie na které jsem zaměřil svoji pozornost jsou odvozeny od rakoviny prsu (MCF-7 a MDA MB231), glioblastomu (A172) a plicního karcinomu (A549). Výsledky vlivu kalcitriolu, sulforafanu a resveratrolu na hladinu mRNA UGT2B7 v těchto liniích jsou vidět na grafech č. 5, 7 a 8. Měření hladiny mRNA CYP24A1 pro potvrzení aktivace VDR je na grafech č. 6, 9 a 10.

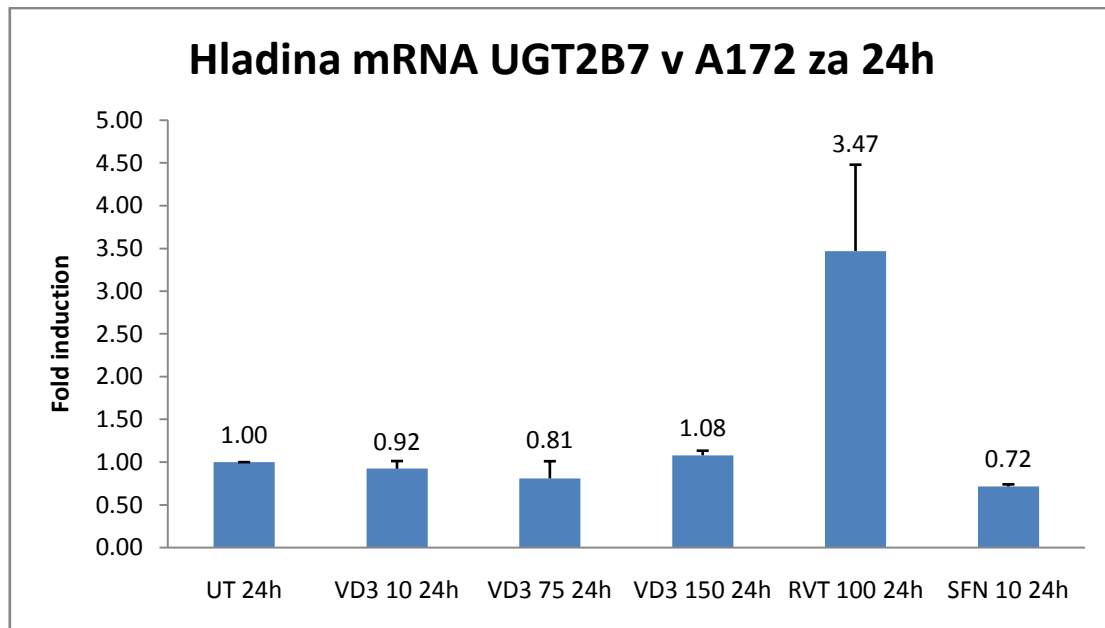


Graf č. 5. : Expese mRNA UGT2B7 v MCF-7 a MD MB231 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

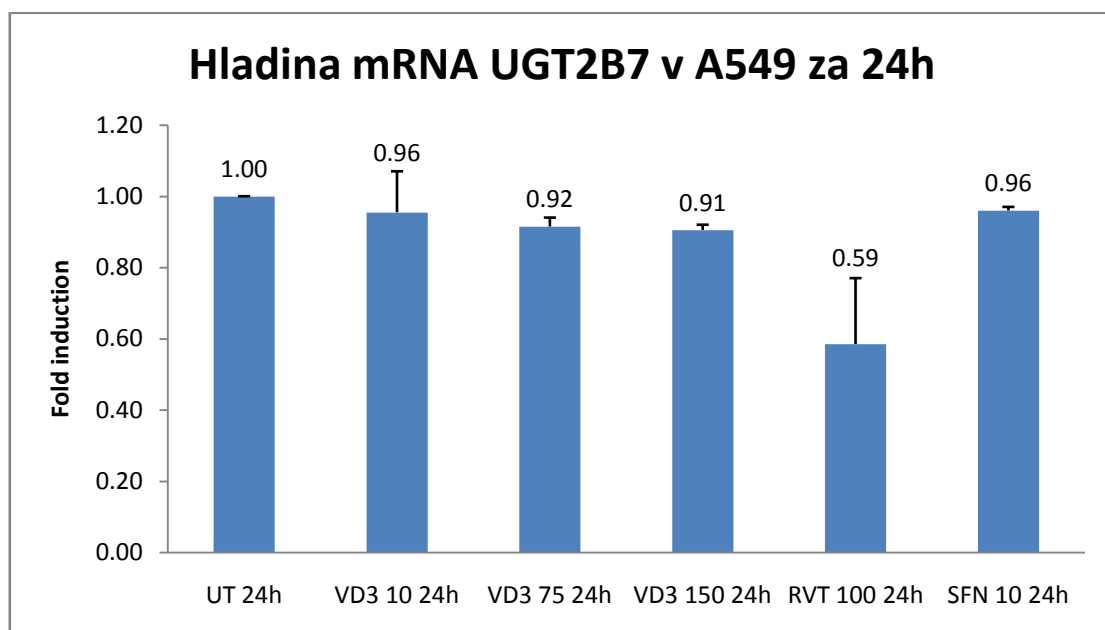


Graf č. 6. : Expres mRNA CYP24A1 v MCF-7 a MDA MB231 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

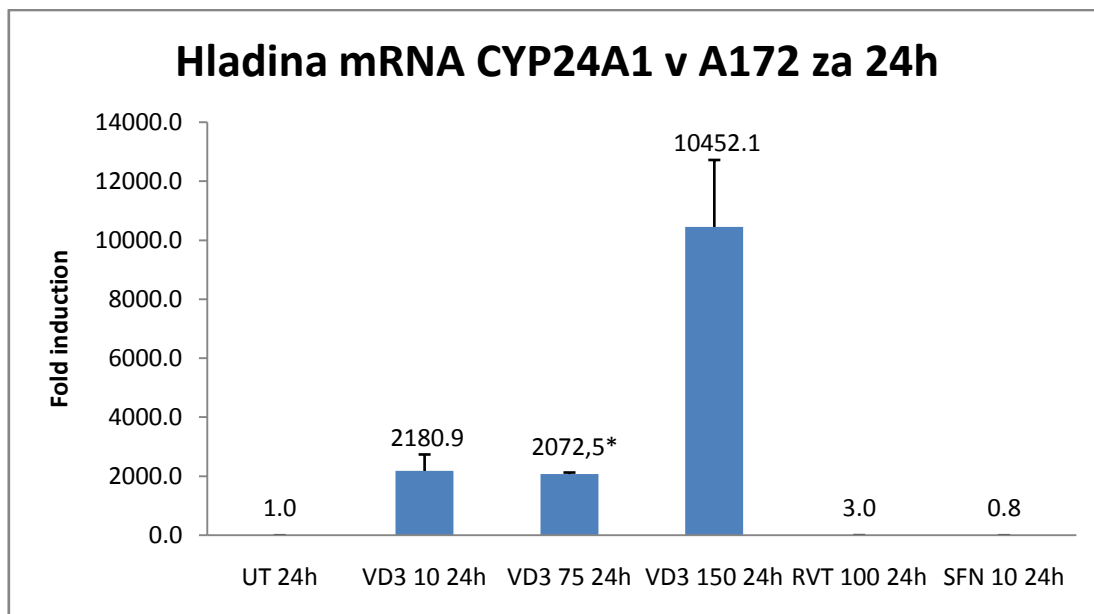
Jak je vidět na grafu č. 5, kalcitriol snížil hladinu mRNA UGT2B7 u obou prsních linií (výrazněji u MDA MB231). Podstatná změna v regulaci genové exprese je u resveratrolu, který u linie MCF-7 snižuje transkripci téměř o 70%, ale u linie MDA MB231 zvyšuje expresi a to více než dvojnásobně. Snížení genové exprese UGT2B7 pomocí sulforafanu bylo výraznější u MCF-7, kde pokles přesáhl 50%. Po podání kalcitriolu byl VDR v obou případech aktivovaný, jak je vidět na grafu č. 6 s mnohonásobně zvýšenou transkripcí genu CYP24A1 oproti kontrolnímu vzorku.



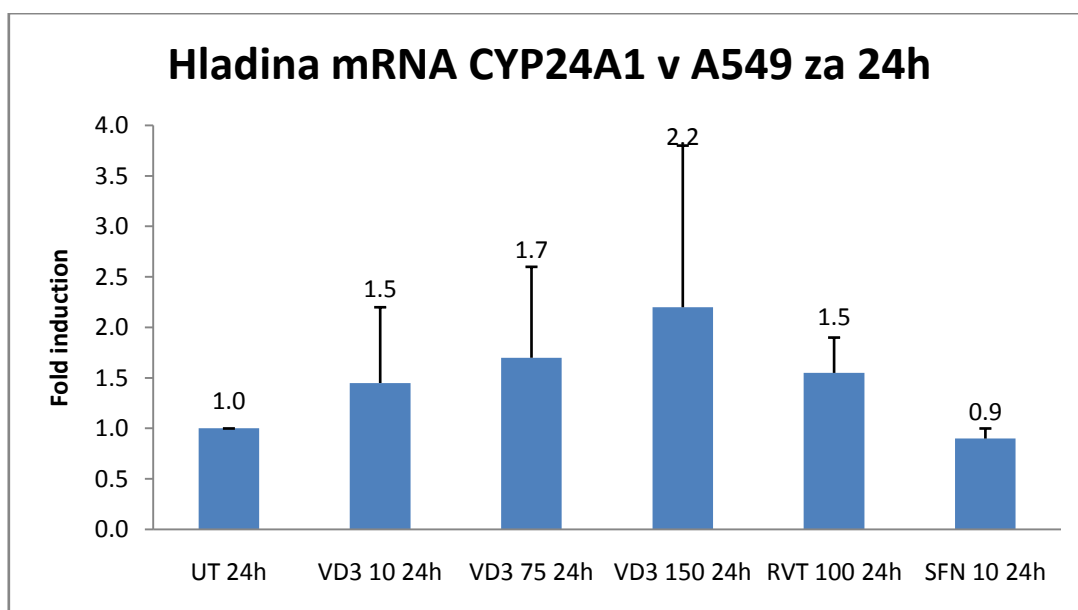
Graf č. 7. : Expres mRNA UGT2B7 v A172 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).



Graf č. 8. : Expres mRNA UGT2B7 v A549 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze dvou nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).



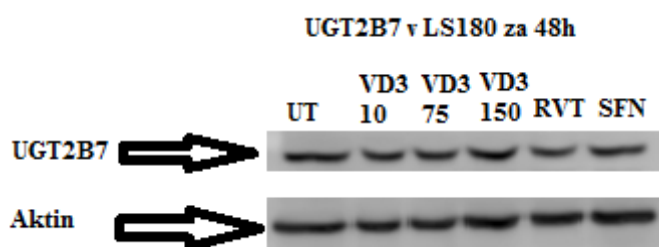
Graf č. 9. : Expres mRNA CYP24A1 v A172 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).



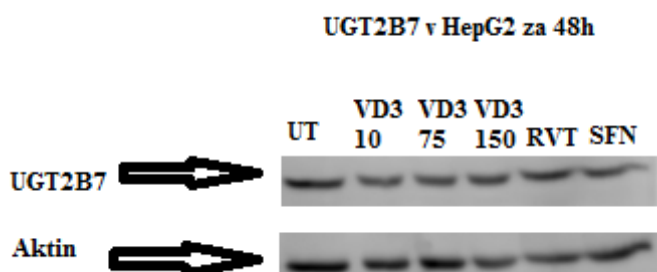
Graf č. 10. : Expres mRNA CYP24A1 v A549 za 24h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze dvou nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

Co se týče linie A172 a A549 (graf č. 7 a 8), tak po podání kalcitriolu nebyla zaznamenána jakákoliv statisticky významná změna exprese mRNA UGT2B7. Pozorovaný trend (indukce exprese) po podání resveratrolu se u linie A172 nepodařilo statisticky prokázat a sulforafan byl u obou linií také bez účinku. U linie A172 byla exprese mRNA CYP24A1 pozorována a statisticky potvrzena pouze pro koncentraci 75 nM (graf. č. 9) z důvodu vysoké mezi experimentální variability, která způsobila nemožnost vyhodnocení indukce pomocí T-testu jako statisticky významnou. Nicméně funkčnost VDR v tomto systému neměla žádný vliv na hladinu mRNA UGT2B7 (graf č. 7). Za nulový vliv kalcitriolu u A549 může pravděpodobně minimální přítomnost funkčního VDR jelikož stejně jako u linie HepG2 nebyl pozorován statisticky významný nárůst mRNA CYP24A1 (graf č. 10).

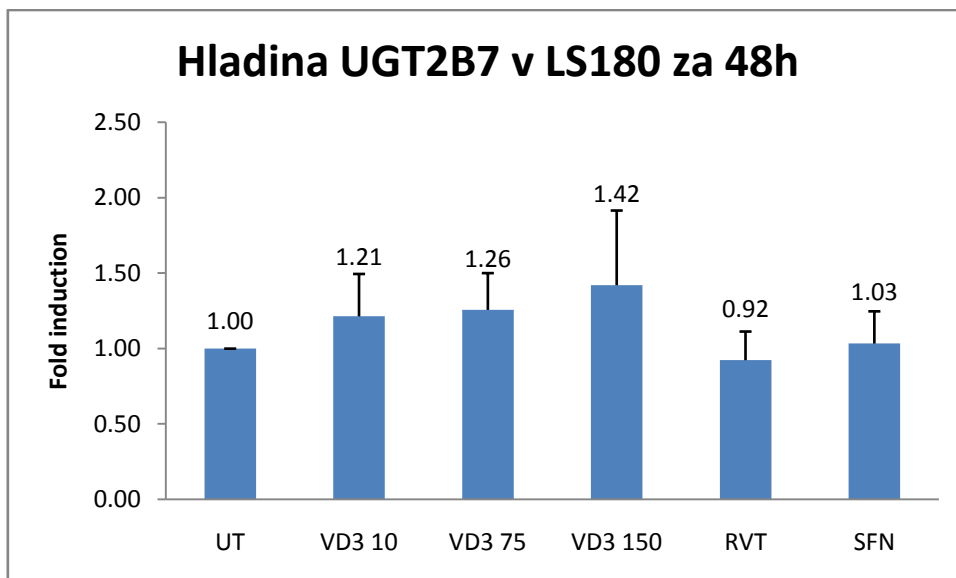
Protože jsem pozoroval pokles UGT2B7 mRNA v linii LS180, kde VDR byl funkční, rozhodl jsem se jako další krok detekovat hladinu proteinu UGT2B7 pomocí specifické protilátky. Sledovaný čas byl 48h a detekce proběhla v LS180 a HepG2. Reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů pro LS180 je na obrázku č. 8 a pro HepG2 na obrázku č. 9. Statistické promítnutí kvantifikovaných dat pomocí detekčního programu Image Studio Digits v 3.1 je vidět v grafu č. 11 pro LS180 a č. 12 pro HepG2.



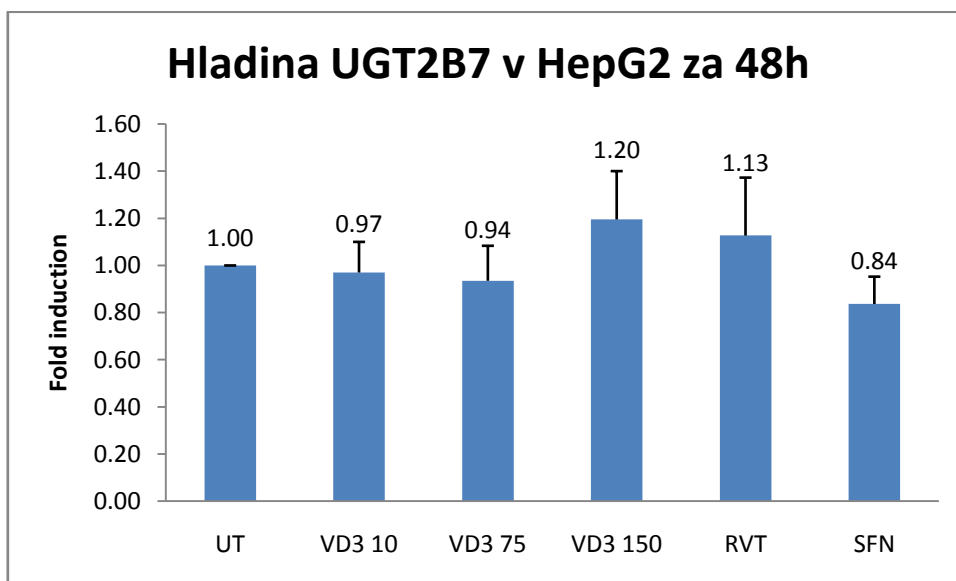
Obr. č. 8: Hladina UGT2B7 proteinu v LS180 za 48h. Je zobrazen reprezentativní výsledek z nejméně tří nezávislých experimentů. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μ M (100 μ M RVT a 10 μ M SFN).



Obr. č. 9: Hladina UGT2B7 proteinu v HepG2 za 48h. Je zobrazen reprezentativní výsledek z nejméně tří nezávislých experimentů. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μ M (100 μ M RVT a 10 μ M SFN).



Graf č. 11. : Expres UGT2B7 v LS180 za 48h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi aktinu. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).



Graf č. 12. : Expres UGT2B7 v HepG2 za 48h. Data jsou průměrem vždy alespoň ze tří nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) porovnávaných s kontrolním vzorkem (UT). Data jsou normalizována na expresi aktinu. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT. Kalcitriol byl použit v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol a sulforafan byl použit v koncentraci μM (100 μM RVT a 10 μM SFN).

Po vystavení buněk kalcitriolu je statisticky významné snížení hladiny mRNA UGT2B7 u LS180, avšak hladina proteinu není nijak ovlivněna, spíše dochází k 20-40% nárůstu, i když statisticky nevýznamnému. V linii HepG2 hladina mRNA koreluje s proteinem a buňky nejsou kalcitriolem nijak ovlivněny. Ani resveratrol se sulforafanem neměli na hladinu proteinu jakýkoliv vliv.

8. Diskuze:

V této práci jsem zjišťoval vliv aktivovaného VDR na expresi UGT2B7 v několika tkáních, jelikož oba proteiny jsou exprimovány v mnoha částech lidského těla. Jako aktivátor VDR jsem zvolil kalcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxycholekalCIFerol), který je běžně přítomen v lidském těle a je považován za jeden z nejúčinnějších aktivátorů VDR.

Mezi nejvýznamnější tkáně z hlediska biotransformace patří játra a střevo. Z tohoto důvodu byly použity dvě střevní (CaCo-2 a LS180) a jedna hepatocytární (HepG2) nádorová linie na detekci exprese genu jak na úrovni mRNA tak i proteinu. Buňky obou střevních linií ošetřené kalcitriolem vykazovaly mnohonásobné zvýšení hladiny mRNA CYP24A1, což svědčí o funkčním a aktivovaném VDR v systému. Zároveň došlo i k poklesu mRNA UGT2B7. Nicméně, tento pokles se neprojevil na hladině samotného proteinu, u kterého překvapivě došlo k jeho mírnému nárůstu, ale toto zvýšení nebylo statisticky významné. V jaterní linii nedošlo po přidání kalcitriolu k žádné statisticky relevantní události. Hladina mRNA UGT2B7 a stejně tak i CYP24A1 zůstala beze změny, což v tomto buněčném systému poukazuje na nefunkční VDR. Hladina proteinu UGT2B7 byla též beze změny.

Trend poklesu genové exprese UGT2B7 na úrovni mRNA po ošetření buněk kalcitriolem podporují i data z prsních linií (MCF-7 a MDA MB231) u kterých také došlo k výraznému snížení exprese UGT2B7 a zároveň k nárůstu mRNA CYP24A1. Tato data naznačují, že VDR by mohl být zapojen do regulace transkripce UGT2B7. I když doposud nebylo objeveno vazebné místo v promotorové oblasti genu UGT2B7 (obr. č. 4), neznamená to, že se na jeho regulaci nemůže podílet. Například Oct-1 se také neváže přímo na DNA v promotorové oblasti, ale svou vazbou na HNF1 α pomáhá modulovat transkripční aktivitu (Ishi *et al.*, 2000). Tento typ regulace není u biotransformačních enzymů ojedinělý, ale byl například pozorován u CYP2A6. Glukokortikoidní receptor (GR) se přímo neváže na DNA, ale podle dostupných informací zvyšuje genovou expresi CYP2A6 kooperací s jaterním jaderným faktorem 4 α (HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4 α) (Onica *et al.*, 2007). Je tedy možné, že VDR reguluje UGT2B7 stejným mechanismem a ač zatím nebyl nalezen VDRE promotorové oblasti UGT2B7, může po své aktivaci kalcitriolem fungovat na stejném principu jako GR nebo Oct-1.

Výše zmíněné věci jsou ovšem v rozporu s daty z linie A172. Jedná se o glioblastomovou linii, u které sice buňky po přidání kalcitriolu vykazovaly zvýšení mRNA CYP24A1, ale hladina mRNA UGT2B7 zůstala nezměněná. Nicméně regulace v mozku se může lišit od ostatních tkání a mohou tu být jiné kontrolní mechanismy zabraňující snížení

hladiny mRNA UGT2B7. Jak již bylo řečeno, UGT2B7 nemá v mozku jen detoxikační funkci, ale aktivně se podílí na tvorbě M6G, který působí jako velmi silné analgetikum (Paul *et al.*, 1989; King *et al.*, 1999) a je zároveň transportován do mozku přes hematoencefalitickou bariéru (Bourasset *et al.*, 2003). Lze tedy předpokládat, že UGT2B7 má více tkáňově specifických regulačních mechanismů, které zabraňují snížení hladiny mRNA. Vzhledem k tomu, že na lidských neuroblastomech (buněčná linie SH-SY5Y) byla prokázána schopnost lidského těla vytvářet si morfin (Boettcher *et al.*, 2005) je možné, že UGT2B7 je konečný enzym v biochemické dráze, jejímž cílem je vznik M6G, látky mnohonásobně účinnější než je samotný morfin, a proto je jeho hladina v mozku regulována více než v ostatních tkáních. Na potvrzení vazby VDR buď do sekvence na DNA, nebo na kooperaci s některým z dalších transkripčních faktorů by samozřejmě bylo potřeba více molekulárně mechanistických studií.

Dalším rozporem nalezeným v této práci je hladina proteinu UGT2B7, která nekoreluje se snížením hladiny mRNA UGT2B7 v LS180, ale naopak vykazovala statisticky nevýznamné zvýšení. Důvod může být stabilita proteinu UGT2B7. Ve studii, kterou provedl Turgeon *et al.*, 2001 zjistili, že buňky HEK293 stabilně exprimující sledovaný biotransformační enzym nebyl po ošetření cykloheximidem žádný pokles v expresi UGT2B7 ani po 12 hodinách. Oproti tomu UGT2B17 měl sníženou genovou expresi na úrovni proteinu již po 1 hodině (Turgeon *et al.*, 2001). Je tedy možné, že UGT2B7 je vysoce stabilní protein a snížená hladina mRNA neovlivní hladinu samotného proteinu. Nicméně, i v tomto případě bude třeba více studií. Je možné, že izoformy UGT2B7 mají vliv na stabilitu metabolicky aktivní izoformy 1, jelikož ovlivňují samotnou aktivitu této izoformy jako negativní regulační jednotky. Navíc je jejich distribuce velmi tkáňově i věkově specifická (Ménard *et al.*, 2013; Ménard *et al.*, 2011), což poukazuje na další možné regulace UGT2B7.

9. Závěr:

V teoretické části této práce je detailně popsán lidský enzym UGT2B7 a receptor pro vitamín D (VDR). U obou proteinů jsou kromě základních informací i poznatky o postranlačních modifikacích či izoformách vznikajících alternativním sestřihem.

V praktické části práce jsem se věnoval vlivu aktivovaného VDR na expresi UGT2B7. Ve střevních a prsních liniích došlo ke snížení hladiny mRNA UGT2B7 za 24h. V ostatních sledovaných liniích (HepG2, A172 a A549) nebyl žádný statisticky významný rozdíl u buněk vystavených kalcitriolu oproti normálním buňkám. Aktivace VDR byla potvrzena pomocí měření hladiny CYP24A1 mRNA. Kromě linie HepG2 a A549 došlo k jejímu mnohonásobnému zvýšení, které značí, že VDR je ve studovaném systému funkční a aktivovaný. Pozorovaný vliv kalcitriolu byl testován i na hladinu proteinu, kde se však efekt neprojevil a hladinu proteinu nesnížil. Nalezená data podporují skutečnost, že VDR je zapojen do regulace UGT2B7 a toto podezření by bylo v budoucnu vhodné ověřit molekulárně-genetickými metodami.

10. Seznam použitých zkratek:

VDR – receptor pro vitamín D
M3G – morfin 3 glukuronid
M6G – morfin 6 glukuronid
MOR – μ -opioidní receptor
SNP – jednonukleotidový polymorfismus
p53RE – p53 responzivní element
TBHQ – terciální butylhydrochinon
RVT – resveratrol
SFN – sulforafan
PKC – protein kinasa C
HNF1 α – jaterní jaderný faktor 1 α
HNF4 α – jaterní jaderný faktor 4 α
Oct-1 – oktamerní transkripční faktor
TFIIB – transkripční faktor II B
FXR – farnesoidní X receptor
FXRE – FXR responzivní element
p53 – tumorový supresorový protein 53
Nrf2 – NF-E2 p45 související faktor 2
Cdx2 – homeodoméní protein 2
CDX RE – CDX responzivní element
HRE – HNF1 α responzivní element
ARE – antioxidant responzivní element
C/EBP – CCAAT/zesilovač vázající protein
VDRA – receptor pro vitamín D izoforma A
VDRB1 – receptor pro vitamín D izoforma B1
DBD – DNA-vazebná doména
LBD – ligand vazebná doména
TAD – transaktivační doména
AF1 – aktivační funkce 1
AF2 – aktivační funkce 2
VDRE – VDR responzivní element
RXR α , β , γ – retinoidní x receptor α , β , γ

SMRT – umlčující mediátor pro receptory retinoidních a tyroidních hormonů
N-CoR – umlčující receptorový korepresor
PPARs – peroxizomový proliferátorem aktivovaný receptor
DR3 – přímé opakování 3
CAR – konstitutivní androstanový receptor
PXR – pregnanový X receptor
NFAT – jaderný faktor aktivovaných T buněk
NF- κ B – jaderný faktor kappa B
SRC/p160 – koaktivátory steroidní receptorů p160
DRIP – s receptorem pro vitamín D interagující protein
CBP – CREB vázající protein
PCAF – p300/CBP asociovaný faktor
CARM – koaktivátor asociovaný s argininovou metyltransferasou
HAT – histonová acetyltransferasa
MED1 – mediátor 1
Hr – bezvlasý
UV – ultrafialové záření
LCA – lithocholová kyselina
GR – glukokortikoidní receptor

11. Seznam použité literatury:

Al Saabi A., Allorge D., Sauvage F. L., Tournel G., Gaulier J. M., Marquet P., Picard N. (2013): Involvement of UDP-glucuronosyltransferases UGT1A9 and UGT2B7 in ethanol glucuronidation, and interactions with common drugs of abuse. *Drug Metab Dispos.* 41:568-74

Barbier O., Turgeon D., Girard C., Green M. D., Tephly T. R., Hum D. W., Bélanger A. (2000): 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). *Drug Metab Dispos.* 28:497-502.

Barbier O., Girard C., Breton R., Bélanger A., Hum D. W. (2000): N-glycosylation and residue 96 are involved in the functional properties of UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Biochemistry.* 39:11540-52.

Barnes K. J., Rowland A., Polasek T. M., Miners J. O. (2014): Inhibition of human drug-metabolising cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities in vitro by uremic toxins. *Eur J Clin Pharmacol.* 70:1097-106

Barsony J., Renyi I., McKoy W. (1997): Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. *J Biol Chem.* 272:5774-82.

Basu N. K., Kole L., Basu M., Chakraborty K., Mitra P. S., Owens I. S. (2008): The major chemical-detoxifying system of UDP-glucuronosyltransferases requires regulated phosphorylation supported by protein kinase C. *J Biol Chem.* 283:23048-61

Bellemare J., Rouleau M., Girard H., Harvey M., Guillemette C. (2010): Alternatively spliced products of the UGT1A gene interact with the enzymatically active proteins to inhibit glucuronosyltransferase activity in vitro. *Drug Metab Dispos.* 38:1785-9

Berger U., Wilson P., McClelland R. A., Colston K., Haussler M. R., Pike J. W., Coombes R.C. (1988): Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 67:607-13.

Blevins-Primeau A. S., Sun D., Chen G., Sharma A. K., Gallagher C. J., Amin S., Lazarus P. (2009): Functional significance of UDP-glucuronosyltransferase variants in the metabolism of active tamoxifen metabolites. *Cancer Res.* 69:1892-900

Boettcher C., Fellermeier M., Boettcher C., Dräger B., Zenk M. H. (2005): How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8495-500

Bourasset F., Cisternino S., Tamsamani J., Scherrmann J. M. (2003): Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem.* 86:1564-7.

Carrier J. S., Turgeon D., Journault K., Hum D. W., Bélanger A. (2000): Isolation and characterization of the human UGT2B7 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 272:616-21.

Ciotti M., Lakshmi V. M., Basu N., Davis B. B., Owens I. S., Zenser T. V. (1999): Glucuronidation of benzidine and its metabolites by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and pH stability of glucuronides. *Carcinogenesis.* 20:1963-9.

Coffman B. L., Rios G. R., King C. D., Tephly T. R. (1997): Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos.* 25:1-4.

Court M. H., Krishnaswamy S., Hao Q., Duan S. X., Patten C. J., Von Moltke L. L., Greenblatt D. J. (2003): Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos.* 31:1125-33.

Crofts L. A., Hancock M. S., Morrison N. A., Eisman J. A. (1998): Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10529-34.

De Gregori S., De Gregori M., Ranzani G. N., Allegri M., Minella C., Regazzi M. (2012): Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis.* 27:1-5.

Deeb K. K., Trump D. L., Johnson C. S. (2007): Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 7:684-700.

Donato M. T., Montero S., Castell J. V., Gómez-Lechón M. J., Lahoz A. (2010): Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: inhibition and induction studies. *Anal Bioanal Chem.* 396:2251-63.

Drocourt L., Ourlin J. C., Pascussi J. M., Maurel P., Vilarem M. J. (2002): Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem.* 277:25125-32.

Duguay Y., Báár C., Skorpen F., Guillemette C. (2004): A novel functional polymorphism in the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 promoter with significant impact on promoter activity. *Clin Pharmacol Ther.* 75:223-33.

Dwivedi P. P., Muscat G. E., Bailey P. J., Omdahl J. L., May B. K. (1998): Repression of basal transcription by vitamin D receptor: evidence for interaction of unliganded vitamin D receptor with two receptor interaction domains in RIP13delta1. *J Mol Endocrinol.* 20:327-35.

Echchgadda I., Song C. S., Roy A. K., Chatterjee B. (2004): Dehydroepiandrosterone sulfotransferase is a target for transcriptional induction by the vitamin D receptor. *Mol Pharmacol.* 65:720-9.

- Ekström L., Johansson M., Rane A. (2013): Tissue distribution and relative gene expression of UDP-glucuronosyltransferases (2B7, 2B15, 2B17) in the human fetus. *Drug Metab Dispos.* 41:291-5.
- Eloranta J. J., Hiller C., Jüttner M., Kullak-Ublick G. A. (2012): The SLCO1A2 gene, encoding human organic anion-transporting polypeptide 1A2, is transactivated by the vitamin D receptor. *Mol Pharmacol.* 82:37-46.
- Esteban L. M., Fong C., Amr D., Cock T. A., Allison S. J., Flanagan J. L., Liddle C., Eisman J. A., Gardiner E. M. (2005): Promoter-, cell-, and ligand-specific transactivation responses of the VDRB1 isoform. *Biochem Biophys Res Commun.* 334:9-15.
- Eyles D. W., Smith S., Kinobe R., Hewison M., McGrath J. J. (2005): Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 29:21-30.
- Foti R. S., Fisher M. B. (2005): Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int.* 153:109-16.
- Fremont J. J., Wang R. W., King C. D. (2005): Coimmunoprecipitation of UDP-glucuronosyltransferase isoforms and cytochrome P450 3A4. *Mol Pharmacol.* 67:260-2
- Gall W. E., Zawada G., Mojarrabi B., Tephly T. R., Green M. D., Coffman B. L., Mackenzie P. I., Radominska-Pandya A. (1999): Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 70:101-8.
- Gibson C. R., Lu P., Maciolek C., Wudarski C., Barter Z., Rowland-Yeo K., Stroh M., Lai E., Nicoll-Griffith D. A. (2013): Using human recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms and a relative activity factor approach to model total body clearance of laropiprant (MK-0524) in humans. *Xenobiotica.* 43:1027-36.
- Gregory P. A., Gardner-Stephen D. A., Rogers A., Michael M. Z., Mackenzie P. I. (2006): The caudal-related homeodomain protein Cdx2 and hepatocyte nuclear factor 1alpha cooperatively regulate the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene promoter. *Pharmacogenet Genomics.* 16:527-36.
- Grosse L., Campeau A. S., Caron S., Morin F. A., Meunier K., Trottier J., Caron P., Verreault M., Barbier O. (2013): Enantiomer selective glucuronidation of the non-steroidal pure anti-androgen bicalutamide by human liver and kidney: role of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A9 enzyme. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 113:92-102.
- Harant H., Andrew P. J., Reddy G. S., Foglar E., Lindley I. J. D. (1997): $1\alpha,25$ Dihydroxyvitamin D₃ and a variety of its natural metabolites transcriptionally repress nuclear-factor- κ B-mediated interleukin-8 gene expression. *Eur. J. Biochem.* 250:63-71
- Haussler M. R., Norman A. W. (1969): Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 62:155-62.

Hirota T., Ieiri I., Takane H., Sano H., Kawamoto K., Aono H., Yamasaki A., Takeuchi H., Masada M., Shimizu E., Higuchi S., Otsubo K. (2003): Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy. *Drug Metab Dispos.* 2003 31:677-80

Holick M. F. (2003): Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem.* 88:296-307.

Holick M. F. (2004): Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 79:362-71.

Holthe M., Klepstad P., Zahlsen K., Borchgrevink P. C., Hagen L., Dale O., Kaasa S., Krokan H. E., Skorpen F. (2002): Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the UGT2B7 H268Y and UGT1A1*28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy. *Eur J Clin Pharmacol.* 58:353-6.

Holthe M., Rakvåg T. N., Klepstad P., Idle J. R., Kaasa S., Krokan H. E., Skorpen F. (2003): Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 3:17-26.

How K. L., Hazewinkel H. A., Mol J. A. (1994): Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *Gen Comp Endocrinol.* 96:12-8.

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 D. G., Rogers A., Mackenzie P. I. (2014): Epirubicin upregulates UDP glucuronosyltransferase 2B7 expression in liver cancer cells via the p53 pathway. *Mol Pharmacol.* 85:887-97.

Innocenti F., Iyer L., Ramírez J., Green M. D., Ratain M. J. (2001): Epirubicin glucuronidation is catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Drug Metab Dispos.* 29:686-92.

Innocenti F., Liu W., Fackenthal D., Ramírez J., Chen P., Ye X., Wu X., Zhang W., Mirkov S., Das S., Cook E. Jr, Ratain M. J. (2008): Single nucleotide polymorphism discovery and functional assessment of variation in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene. *Pharmacogenet Genomics.* 18:683-97

Innocenti F., Ramírez J., Obel J., Xiong J., Mirkov S., Chiu Y. L., Katz D. A., Carr R. A., Zhang W., Das S., Adjei A., Moyer A. M., Chen P. X., Krivoshik A., Medina D., Gordon G. B., Ratain M. J., Sahelijo L., Weinshilboum R. M., Fleming G. F., Bhathena A. (2013): Preclinical discovery of candidate genes to guide pharmacogenetics during phase I development: the example of the novel anticancer agent ABT-751. *Pharmacogenet Genomics.* 23:374-81

Ishii Y., Hansen A. J., Mackenzie P. I. (2000): Octamer transcription factor-1 enhances hepatic nuclear factor-1 α -mediated activation of the human UDP glucuronosyltransferase 2B7 promoter. *Mol Pharmacol.* 57:940-7

Fremont J. J., Wang R. W., King C. D. (2005): Coimmunoprecipitation of UDP-glucuronosyltransferase isoforms and cytochrome P450 3A4. *Mol Pharmacol.* 67:260-2

Jeong E. S., Kim Y. W., Kim H. J., Shin H. J., Shin J. G., Kim K. H., Chi Y. H., Paik S. H., Kim D. H. (2014): Glucuronidation of fimasartan, a new angiotensin receptor antagonist, is mainly mediated by UGT1A3. *Xenobiotica.* 18:1-9.

Jeong H. U., Lee J. Y., Kwon S. S., Kim J. H., Kim Y. M., Hong S. W., Yeon S. H., Lee S. M., Cho Y. Y., Lee H. S. (2015): Metabolism-mediated drug interaction potential of HS-23, a new herbal drug for the treatment of sepsis in human hepatocytes and liver microsomes. *Arch Pharm Res.* 38:171-7.

Jin C.J., Miners J. O., Burchell B., Mackenzie P. I. (1993): The glucuronidation of hydroxylated metabolites of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis.* 14:2637-9.

Juge N., Mithen R. F., Traka M. (2007): Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64:1105-27.

Jurutka P. W., Hsieh J. C., MacDonald P. N., Terpening C. M., Haussler C. A., Haussler M. R., Whitfield G. K. (1993): Phosphorylation of serine 208 in the human vitamin D receptor. The predominant amino acid phosphorylated by casein kinase II, in vitro, and identification as a significant phosphorylation site in intact cells. *J Biol Chem.* 268:6791-9.

Kaeding J., Bélanger J., Caron P., Verreault M., Bélanger A., Barbier O. (2008): Calcitriol (1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃) inhibits androgen glucuronidation in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 7:380-90

Kato S. (2000): The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J Biochem.* 127:717-22.

Kim J. Y., Cheong H. S., Park B. L., Kim L. H., Namgoong S., Kim J. O., Kim H. D., Kim Y. H., Chung M. W., Han S. Y., Shin H. D. (2014): Comprehensive variant screening of the UGT gene family. *Yonsei Med J.* 55:232-9

Kimchi-Sarfaty C., Oh J. M., Kim I. W., Sauna Z. E., Calcagno A. M., Ambudkar S. V., Gottesman M. M. (2007): A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 315:525-8

King C. D., Rios G. R., Assouline J. A., Tephly T. R. (1999): Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys.* 365:156-62.

Laux-Biehlmann A., Chung H., Mouheiche J., Vérièpe J., Delalande F., Lamshöft M., Welters I. D., Soldevila S., Bazin H., Lamarque L., Van Dorsselaer A., Poisbeau P., Schneider F., Goumon Y., Garnerio P. (2014): Endogenous morphine-6-glucuronide (M6G) is present in the

plasma of patients: validation of a specific anti-M6G antibody for clinical and basic research. *Biofactors*. 40:113-20

Lemon B. D., Fondell J. D., Freedman L. P. (1997): Retinoid X receptor: vitamin D₃ receptor heterodimers promote stable preinitiation complex formation and direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent cell-free transcription. *Mol Cell Biol*. 17:1923-37.

Leo C., Chen J. D. (2000): The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*. 245:1-11.

Lépine J., Bernard O., Plante M., Têtu B., Pelletier G., Labrie F., Bélanger A., Guillemette C. (2004): Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphosphoglucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:5222-32.

Lin G. F., Guo W. C., Chen J. G., Qin Y. Q., Golka K., Xiang C. Q., Ma Q. W., Lu D. R., Shen J. H. (2005): An association of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C802T (His268Tyr) polymorphism with bladder cancer in benzidine-exposed workers in China. *Toxicol Sci*. 85:502-6.

van der Logt E. M., te Morsche R. H., Groenendaal N., Roelofs H. M., de Metz M., van der Stappen J. W., Nagengast F. M., Peters W. H. (2009): Genetic polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase 2B7 and colorectal cancer risk. *Oncol Res*. 17:323-9.

Lu Y., Heydel J. M., Li X., Bratton S., Lindblom T., Radominska-Pandya A. (2005): Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: a potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug Metab Dispos*. 33:937-46

MacDonald P. N., Sherman D. R., Dowd D. R., Jefcoat S. C. Jr, DeLisle R. K. (1995): The vitamin D receptor interacts with general transcription factor IIB. *J Biol Chem*. 270:4748-52

Mackenzie P. I., Owens I. S., Burchell B., Bock K. W., Bairoch A., Bélanger A., Fournel-Gigleux S., Green M., Hum D. W., Iyanagi T., Lancet D., Louisot P., Magdalou J., Chowdhury J. R., Ritter J. K., Schachter H., Tephly T. R., Tipton K. F., Nebert D. W. (1997): The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*. 7:255-69

Mackenzie P. I., Bock K. W., Burchell B., Guillemette C., Ikushiro S., Iyanagi T., Miners J. O., Owens I. S., Nebert D. W. (2005): Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics*. 15:677-85

Makishima M., Lu T. T., Xie W., Whitfield G. K., Domoto H., Evans R. M., Haussler M. R., Mangelsdorf D. J. (2002): Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*. 296:1313-6

Mano Y., Usui T., Kamimura H. (2007) [1]: The UDP-glucuronosyltransferase 2B7 isozyme is responsible for gemfibrozil glucuronidation in the human liver. *Drug Metab Dispos*. 35:2040-4

- Mano Y., Usui T., Kamimura H. (2007) [2]: Predominant contribution of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in the glucuronidation of racemic flurbiprofen in the human liver. *Drug Metab Dispos.* 35:1182-7
- Ménard V., Eap O., Roberge J., Harvey M., Lévesque E., Guillemette C. (2011): Transcriptional diversity at the UGT2B7 locus is dictated by extensive pre-mRNA splicing mechanisms that give rise to multiple mRNA splice variants. *Pharmacogenet Genomics.* 21:631-41
- Ménard V., Lévesque E., Chen S., Eap O., Joy M. S., Ekström L., Rane A., Guillemette C. (2013): Expression of UGT2B7 is driven by two mutually exclusive promoters and alternative splicing in human tissues: changes from prenatal life to adulthood and in kidney cancer. *Pharmacogenet Genomics.* 23:684-96
- Meyer M. B., Pike J. W. (2013): Corepressors (NCoR and SMRT) as well as coactivators are recruited to positively regulated $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃-responsive genes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 136:120-4
- Mi Y., Zhang Y., Shen Y. F. (2011): Mechanism of JmjC-containing protein Hairless in the regulation of vitamin D receptor function. *Biochim Biophys Acta.* 1812:1675-80
- Mitra P. S., Basu N. K., Owens I. S. (2009): Src supports UDP-glucuronosyltransferase-2B7 detoxification of catechol estrogens associated with breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 382:651-6
- Mitra P. S., Basu N. K., Basu M., Chakraborty S., Saha T., Owens I. S. (2011): Regulated phosphorylation of a major UDP-glucuronosyltransferase isozyme by tyrosine kinases dictates endogenous substrate selection for detoxification. *J Biol Chem.* 286:1639-48
- Moreau A., Maurel P., Vilarem M. J., Pascussi J. M. (2007): Constitutive androstane receptor-vitamin D receptor crosstalk: consequence on CYP24 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 360:76-82
- Münzel P. A., Schmohl S., Heel H., Kälberer K., Bock-Hennig B. S., Bock K. W. (1999): Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by *t*-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 27:569-73
- Nagaoka K., Hanioka N., Ikushiro S., Yamano S., Narimatsu S. (2012): The effects of N-glycosylation on the glucuronidation of zidovudine and morphine by UGT2B7 expressed in HEK293 cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27:388-97
- Nagpal S., Lu J., Boehm M. F. (2001): Vitamin D analogs: mechanism of action and therapeutic applications. *Curr Med Chem.* 8:1661-79.
- Nakajima M., Koga T., Sakai H., Yamanaka H., Fujiwara R., Yokoi T. (2010): N-Glycosylation plays a role in protein folding of human UGT1A9. *Biochem Pharmacol.* 79:1165-72.

Nakamura A., Nakajima M., Yamanaka H., Fujiwara R., Yokoi T. (2008) [1]: Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab Dispos.* 36:1461-4

Nakamura A., Nakajima M., Higashi E., Yamanaka H., Yokoi T. (2008) [2]: Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 affect the Nrf2-dependent transcriptional regulation. *Pharmacogenet Genomics.* 18:709-20

Oda Y., Sihlbom C., Chalkley R. J., Huang L., Rachez C., Chang C. P., Burlingame A. L., Freedman L. P., Bikle D. D. (2004) : Two distinct coactivators, DRIP/mediator and SRC/p160, are differentially involved in VDR transactivation during keratinocyte differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 90:273-6

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

Parmar S., Stingl J. C., Huber-Wechselberger A., Kainz A., Renner W., Langsenlehner U., Krippel P., Brockmüller J., Haschke-Becher E. (2011): Impact of UGT2B7 His268Tyr polymorphism on the outcome of adjuvant epirubicin treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 13:R57

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.

Paul D., Standifer K. M., Inturrisi C. E., Pasternak G. W. (1989): Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther.* 251:477-83.

Picard N., Ratanasavanh D., Prémaud A., Le Meur Y., Marquet P. (2005): Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos.* 33:139-46.

Pitcher T., Pettifor J. M., Buffenstein R. (1994): The effect of dietary calcium content and oral vitamin D3 supplementation on mineral homeostasis in a subterranean mole-rat *Cryptomys damarensis*. *Bone Miner.* 1994 Nov;27(2):145-57.

Precht J. C., Schroth W., Klein K., Brauch H., Krynetskiy E., Schwab M., Mürdter T. E. (2013): The letrozole phase 1 metabolite carbinol as a novel probe drug for UGT2B7. *Drug Metab Dispos.* 41:1906-13.

Radomska-Pandya A., Pokrovskaya I. D., Xu J., Little J. M., Jude A. R., Kurten R. C., Czernik P. J. (2002): Nuclear UDP-glucuronosyltransferases: identification of UGT2B7 and UGT1A6 in human liver nuclear membranes. *Arch Biochem Biophys.* 399:37-48

Rachez C., Freedman L. P. (2000): Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene.* 246:9-21

Roeder R. G. (1996): The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* 21:327-35

Saeki M., Saito Y., Jinno H., Tanaka-Kagawa T., Ohno A., Ozawa S., Ueno K., Kamakura S., Kamatani N., Komamura K., Kitakaze M., Sawada J. (2004): Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos.* 32:1048-54

Sánchez-Martínez R., Zambrano A., Castillo A. I., Aranda A. (2008): Vitamin D-dependent recruitment of corepressors to vitamin D/retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol.* 28:3817-29

Sattari M., Routledge P., Mashayekhi S. (2011): The influence of active transport systems on morphine -6-glucuronide transport in MDCKII and MDCK-PGP cells. *Daru.* 19:412-6

Seo Y. K., Mirkheshti N., Song C. S., Kim S., Dodds S., Ahn S. C., Christy B., Mendez-Meza R., Ittmann M. M., Abboud-Werner S., Chatterjee B. (2013): SULT2B1b sulfotransferase: induction by vitamin D receptor and reduced expression in prostate cancer. *Mol Endocrinol.* 27:925-39.

Sone T., Kerner S., Pike J. W. (1991): Vitamin D receptor interaction with specific DNA. Association as a 1,25-dihydroxyvitamin D₃-modulated heterodimer. *J Biol Chem.* 266:23296-305

Sten T., Bichlmaier I., Kuuranne T., Leinonen A., Yli-Kauhaluoma J., Finel M. (2009): UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and UGT2B17 display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly. *Drug Metab Dispos.* 37:417-23

Stone A. N., Mackenzie P. I., Galetin A., Houston J. B., Miners J. O. (2003): Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos.* 31:1086-9

Strahm E., Sjöberg U., Garle M., Rane A., Ekström L. (2013): Implication of Human UGT2B7, 2B15, and 2B17 in 19-Norandrosterone Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4:75.

Sunn K. L., Cock T. A., Crofts L. A., Eisman J. A., Gardiner E. M. (2001): Novel N-terminal variant of human VDR. *Mol Endocrinol.* 15:1599-609

Tagami T., Lutz W. H., Kumar R., Jameson J. L. (1998): The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:358-63

Takeda S., Ishii Y., Iwanaga M., Mackenzie P. I., Nagata K., Yamazoe Y., Oguri K., Yamada H. (2005): Modulation of UDP-glucuronosyltransferase function by cytochrome P450: evidence for the alteration of UGT2B7-catalyzed glucuronidation of morphine by CYP3A4. *Mol Pharmacol.* 67:665-72

Takeuchi A., Reddy G. S., Kobayashi T., Okano T., Park J., Sharma S. (1998): Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol.* 160:209-18.

Tashiro K., Ishii C., Ryoji M. (2007): Role of distal upstream sequence in vitamin D-induced expression of human CYP24 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 358:259-65

Taymans S. E., Pack S., Pak E., Orban Z., Barsony J., Zhuang Z., Stratakis C. A. (1999): The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J Bone Miner Res.* 14:1163-6

Turgeon D., Carrier J. S., Lévesque E., Hum D. W., Bélanger A. (2001): Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology.* 2001 142:778-87.

Uchaipichat V., Winner L. K., Mackenzie P. I., Elliot D. J., Williams J. A., Miners J. O. (2006): Quantitative prediction of in vivo inhibitory interactions involving glucuronidated drugs from in vitro data: the effect of fluconazole on zidovudine glucuronidation. *Br J Clin Pharmacol.* 61:427-39

Vandenbossche J., Richards H., Francke S., Van Den Bergh A., Lu C. C., Franc M. A. (2014): The effect of UGT2B7*2 polymorphism on the pharmacokinetics of OROS® hydromorphone in Taiwanese subjects. *J Clin Pharmacol.* 54:1170-9

Wang H., Yuan L., Zeng S. (2011): Characterizing the effect of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and UGT1A9 genetic polymorphisms on enantioselective glucuronidation of flurbiprofen. *Biochem Pharmacol.* 82:1757-63.

Wu D., Kang Y. S., Bickel U., Pardridge W. M. (1997): Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab Dispos.* 25:768-71.

Xu Y., Li P., Zhang X., Wang J., Gu D., Wang Y. (2014): In vitro evidence for bakuchiol's influence towards drug metabolism through inhibition of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7. *Afr Health Sci.* 14:564-9

Zhang Y., Talalay P., Cho C. G., Posner G. H. (1992): A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:2399-403

Zhang L., Huang M., Blair I. A., Penning T. M. (2013): Interception of benzo[a]pyrene-7,8-dione by UDP glucuronosyltransferases (UGTs) in human lung cells. *Chem Res Toxicol.* 26:1570-8.

Zhu J., DeLuca H. F. (2012): Vitamin D 25-hydroxylase - Four decades of searching, are we there yet? *Arch Biochem Biophys.* 523:30-6

Ženata O. (2013). Úloha receptoru pro vitamín D (VDR) v expresi biotransformačního enzymu UGT2B7. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci.