

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2013**

**David Klíč**

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



**Vliv aktivace receptoru pro vitamín D (VDR)  
na expresi biotransformačních enzymů UGT1A**

**Bakalářská práce**

**David Klíč**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D. & Ph.D.**

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem řádně citoval veškeré použité zdroje uvedené v seznamu citované literatury.

V Prostějově dne: .....

.....

David Klíč

## **SOUHRN**

Uridin-5-difosfát-glukuronosyltransferázy (UGT) jsou enzymy II. fáze biotransformace podílející se na konjugaci kyseliny glukuronové s lipofilními sloučeninami. Následně jsou tyto polární sloučeniny eliminovány např. močí. Předmětem zájmu je rodina enzymů UGT1A a její izoformy, u kterých byla popsána indukovatelnost dioxinem, ligandem aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). Nicméně role receptoru pro vitamín D (VDR) v regulaci exprese UGT1A nebyla dosud přesně popsána. K objasnění jeho role bylo užito následné metodiky: inducibilita enzymů byla sledována na komerční linii LS174T izolované z lidského adenokarcinomu tlustého střeva. Jako negativní kontrola byl přidán dimethylsulfoxid jako pozitivní dioxin. Aktivní forma vitamínu D, kalcitriol, byl použit v koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l. Po 24 a 48 hodinové kultivaci došlo k vyizolování proteinů a jejich následné specifické detekci metodou Western blotting. Zvýšená hladina enzymů UGT1A byla podmíněna přidavkem samotného kalcitriolu, avšak v kombinaci s induktorem, zde v podobě dioxinu, byla indukce více patrná. Nicméně s rostoucím stářím buněčné linie se účinek kalcitriolu samotného nebo v kombinaci dioxinu vytrácel. Tento výsledek naznačuje, že buněčná linie LS174T není vhodným modelem ke sledování vlivu VDR na rodinu UGT1A enzymů.

## **SUMMARY**

Uridine-5-diphosphate-glucuronosyltransferases (UGT) are enzymes of phase II biotransformation which are involved in the conjugation of glucuronic acid with lipophilic compounds. Subsequently, these polar compounds are eliminated e.g. in urine. The focus of the study is UGT1A family and its isoforms. These enzymes were described as inducible by dioxin, which binds aryl hydrocarbon receptor (AhR). However, the role of vitamin D receptor (VDR) in the regulation of expression UGT1A hasn't been accurately described. The subsequent methodology was used to clarify the role: inducibility of the enzymes was observed on commercial line LS174T isolated from human colon adenocarcinoma. Dimethylsulfoxide was added as a negative control and as a positive dioxin. The active form of vitamin D, calcitriol, was used in concentrations of 10, 75 and 150 nmol/l. After 24 and 48 hours of cultivation, proteins were isolated. Western blotting was used for specific detection of these proteins. The cause of increased level of UGT1A proteins was calcitriol itself, but in case of addition of the inductor, here in the form of dioxin, the induction was more evident. However, the effect of calcitriol itself or combined with dioxin was less evident at later stages of the cell line. This result indicates that cell line LS174T isn't a suitable model for monitoring the impact of VDR on UGT1A family of enzymes.

### **Poděkování**

Rád bych zde poděkoval vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. & Ph.D. za rady, ochotu a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Zvláštní poděkování patří rovněž kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie. V neposlední řadě též děkuji mé rodině, přátelům a přítelkyni za podporu během studia.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	8
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	10
<b>2.1 Biotransformace</b> .....	10
2.1.1 I. fáze biotransformace.....	10
2.1.1.1 <i>Cytochromy P450 (CYP)</i> .....	10
2.1.1.2 <i>Flavinové monooxygenázy (FMO)</i> .....	11
2.1.2 II. fáze biotransformace.....	12
2.1.2.1 <i>Glukuronidace</i> .....	13
2.1.2.2 <i>Konjugace s glutathionem</i> .....	14
2.1.2.3 <i>Sulfatace</i> .....	14
2.1.3 III. fáze biotransformace.....	14
<b>2.2 Regulace enzymů metabolizujících xenobiotika</b> .....	15
2.2.1 Aryl uhlovodíkový receptor (AhR).....	18
2.2.2 Pregnanový X receptor (PXR).....	19
2.2.3 Konstitutivní androstanový receptor (CAR).....	20
2.2.4 Receptor vitamínu D (VDR).....	21
2.2.4.1 <i>Vitamín D</i> .....	23
2.2.4.2 <i>Žlučové kyseliny</i> .....	24
2.2.4.3 <i>Interakce mezi AhR a VDR</i> .....	25
<b>2.3 UDP-glukuronosyltransferázy (UGT)</b> .....	18
2.3.1 Nomenklatura UGT.....	28
2.3.2 Struktura UGT.....	28
2.3.3 Genové rodiny UGT.....	29
2.3.3.1 <i>Genová rodina UGT1</i> .....	30
2.3.3.2 <i>Genová rodina UGT2</i> .....	31
2.3.3.3 <i>Genová rodina UGT3</i> .....	31
2.3.3.4 <i>Genová rodina UGT8</i> .....	32
2.3.4 Regulace UGT.....	32
2.3.4.1 <i>UGT1A1</i> .....	32
2.3.4.2 <i>UGT1A3</i> .....	33
2.3.4.3 <i>UGT1A4</i> .....	33

2.3.4.4	<i>UGT1A5</i>	33
2.3.4.5	<i>UGT1A6</i>	33
2.3.4.6	<i>UGT1A7</i>	34
2.3.4.7	<i>UGT1A8</i>	34
2.3.4.8	<i>UGT1A9</i>	34
2.3.4.9	<i>UGT1A10</i>	34
<b>3.</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	36
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	37
4.1	<b>Materiál</b>	37
4.1.1	Chemikálie	37
4.1.2	Roztoky	38
4.1.3	Laboratorní přístroje	40
4.1.4	Biologický materiál	40
4.2	<b>Metody</b>	40
4.2.1	Rozmrazení buněk	40
4.2.2	Trypsinizace a počítání buněk	41
4.2.3	Inkubace buněk s kalcitriolem	41
4.2.4	Izolace proteinů	42
4.2.5	Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)	43
4.2.6	Western blotting	43
4.2.7	Imunodetekce	44
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	45
5.1	Vliv kalcitriolu na expresi enzymů <i>UGT1A</i>	45
5.2	Vliv kalcitriolu na expresi enzymu <i>CYP24A1</i>	49
<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b>	50
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	52
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b>	53
8.1	Vědecké publikace	53
8.2	Internetové zdroje	64
<b>9.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b>	65



## 1. ÚVOD

Organismy představují otevřený systém, který interaguje s velkým množstvím substancí ze svého okolí. Na jedné straně se může jednat např. o přijaté živiny, minerály nebo vitamíny, tedy o látky sloužící jako zdroj energie nebo „stavební materiál“. Na druhé straně stojí značné množství cizorodých látek (xenobiotik). Jako zástupce těchto exogenních látek lze zmínit např. fenolické látky, nitrosloučeniny a polyaromatické uhlovodíky. Expozice našeho organismu těmto sloučeninám je podmíněna především provozem tepelných elektráren, zpracování uhlí, výrobou svítíplynu, dehtů, průmyslových barviv, hnojiv, pesticidů a výbušnin. V České republice stejně jako jinde ve světě čelí lidstvo problému kontaminace prostředí. K tomuto jevu přispívá nemalou měrou proces industrializace. Další skupinou poměrně nenápadně vyhlížejících xenobiotik mohou být léčiva, kosmetické přípravky a potravní aditiva. I když jsou mnohé sloučeniny syntetizovány s dobrým úmyslem, jejich stinnou stránkou může být narušení fyziologických pochodů a tím pozměnění vnitřní homeostázy jednotlivce, tak i rovnováhy celého ekosystému.

Naše organismy si v průběhu evoluce vytvořily propracovaný defenzivní systém v podobě inducibilních enzymů a efluxních transportérů. Poté co xenobiotikum překoná prvotní bariéry (kůži, střevní a plicní mukózu), přicházejí na řadu biotransformační enzymy. Jejich jednoduchá strategie spočívající v omezení biologické aktivity signifikantně urychluje eliminaci xenobiotika, čímž zkracuje dobu expozice jeho možných škodlivých účinků. Enzymy se nevyvinuly až jako odpověď na industrializaci, ale byly generovány už u našich předků jako evoluční adaptace na toxiny např. jedovatých žab a rostlin. V této tiché válce, která trvá již tisíce let, hraje klíčovou roli regulace genové exprese na transkripční úrovni. Tato regulace je zprostředkována receptory vystupujícími jako ligandem aktivované transkripční faktory.

Biotransformaci xenobiotik lze rozdělit do třech fází. Během I. fáze dochází ke katalýze např. oxidace, redukce a hydrolýzy zprostředkované hlavně cytochromy P450 a flavinovými monooxygenázami. Tato interakce vyústí ve vznik polárnější sloučeniny. II. fáze vede ke konjugaci molekuly xenobiotika s kyselinou glukuronovou, glutationem anebo jinými endogenními látkami. Vznikají polární metabolity, které se snadno rozpouští ve vodě a následně eliminují močí nebo fekáliemi. III. fáze umožňuje transfer modifikovaného xenobiotika pomocí transportérů vně buňku. II. fáze je zprostředkována

celou škálou enzymů, avšak předmětem této bakalářské práce budou pouze UDP-glukuronosyltransferázy. Průběh glukoronidace, tedy konjugace xenobiotika s kyselinou glukoronovou, je zprostředkován čtyřmi rodinami enzymů. Členy první rodiny jsou právě enzymy UGT1A.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na studium vlivu aktivovaného receptoru pro vitamín D na expresi enzymů UGT1A. Úplná absence nebo snížená exprese těchto enzymů může být asociována i s tak závažnými patologickými stavy, jako je např. Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu, hepatitida nebo karcinogeneze. Případná up-regulace těchto enzymů po podání vitamínu D by mohla mít vážné důsledky pro metabolismus endogenních, tak i exogenních sloučenin.

## **2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Biotransformace**

Živé organizmy jsou neustále exponovány xenobiotikům. Jedná se o synonymum pro látky cizorodé, též exogenní, které nemají nutriční hodnotu a ani neslouží jako „stavební materiál“. Pod tímto pojmem si lze představit látky jako jsou potravní doplňky, léky, kosmetické přípravky, enviromentální polutanty, produkty průmyslu atd. Exogenní látky mohou představovat potencionální riziko, jelikož mohou interferovat s endogenními procesy a narušit tak homeostázu vnitřního prostředí (Skálová *et al.*, 2011).

Obranný mechanismus proti cizorodým látkám zprostředkovávají enzymy metabolizující xenobiotika. Funkcí těchto enzymů je pozměnění struktury, která má za následek zpolárnění xenobiotika a tím urychlení eliminace. Výsledný metabolit je exkretován např. ve formě moči nebo fekálií (Skálová *et al.*, 2011).

Biotransformaci lze rozdělit do třech dílčích biotransformačních fází. I. fáze zodpovídá za vznik hydrofilnější sloučeniny odkrytím nebo vnesením funkční skupiny. Během II. fáze dochází k interakcím mezi xenobiotikem a endogenní sloučeninou. III. fáze zprostředkovává transport modifikovaného xenobiotika vně buňku (Skálová *et al.*, 2011).

#### **2.1.1 I. fáze biotransformace**

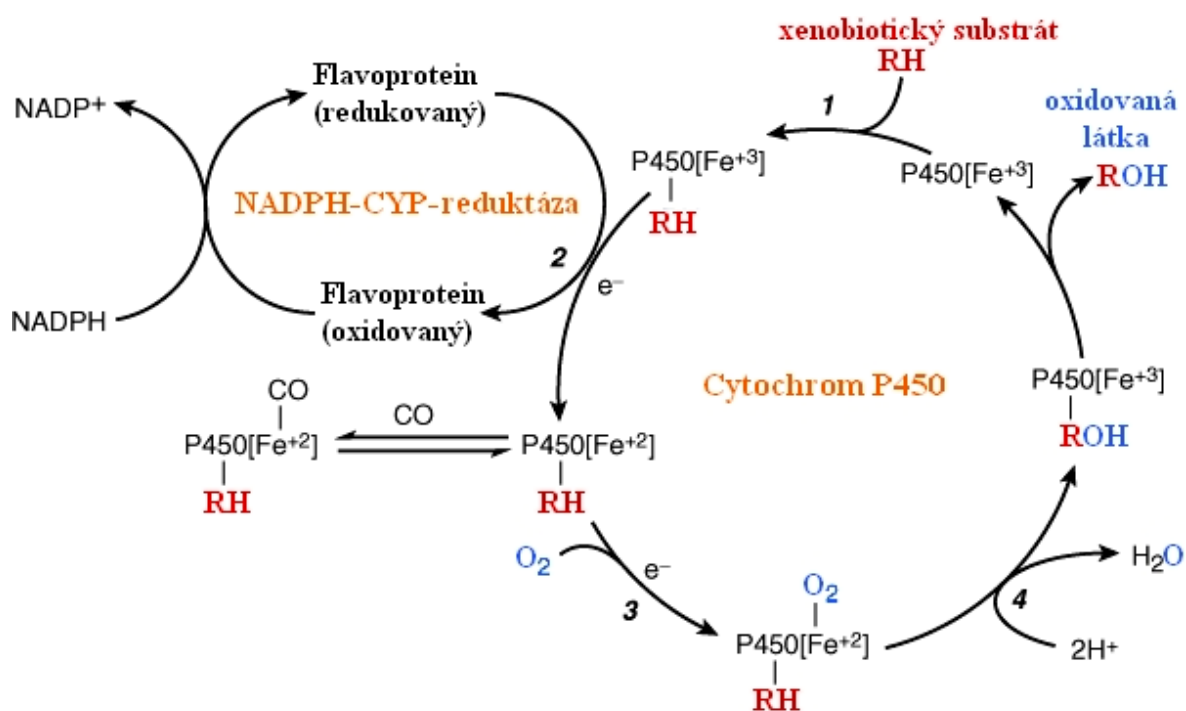
Vznik více polární sloučeniny bývá doprovázen četnými chemickými reakcemi, které jsou zajištěny přítomností enzymů. Za biotransformaci exogenních látek zodpovídají chemické reakce jako je oxidace, redukce, hydrolýza, hydratace a izomerace. U vyšších organismů je preferována oxidační cesta. V její katalýze hrají nezastupitelnou úlohu hlavně cytochromy P450 a flavinové monooxygenázy (Skálová *et al.*, 2011).

##### **2.1.1.1 Cytochromy P450 (CYP)**

I. fáze biotransformace se účastní hned několik enzymových systémů katalyzující četné reakce. Avšak prioritní reakcí celého procesu je monooxygenace katalyzována CYP. CYP mohou být zodpovědné za detoxikaci, ale rovněž za bioaktivaci obrovského množství cizorodých chemických látek. Rovněž mohou provádět účelně reakce, které zahrnují N- a O-dealkylaci, alifatické a aromatické hydroxylace, deaminace, N- a S-oxidace. Příklady toxických látek, které jsou metabolizovány v tomto systému jsou např. nikotin

a paracetamol, stejně jako prokarcinogenní látky, např. benzen a polycyklické aromatické uhlovodíky (Klingenberg, 1958).

Pro monooxygenaci je nezbytný transport elektronu z nikotinamidadenin-dinukleotidfosfátu (NADPH) prostřednictvím NADPH-CYP-reduktázy. Jedná se o flavoprotein tvořený jedním flavinmononukleotidem (FMN) a jedním flavinadenindinukleotidem (FAD). Po předání elektronu do katalytického cyklu CYP dochází ke kaskádě, která vede k oxidaci substrátu (Obr. 1) (Skálová *et al.*, 2011).



**Obr. 1: Schéma katalytického cyklu CYP-monoxygenace**

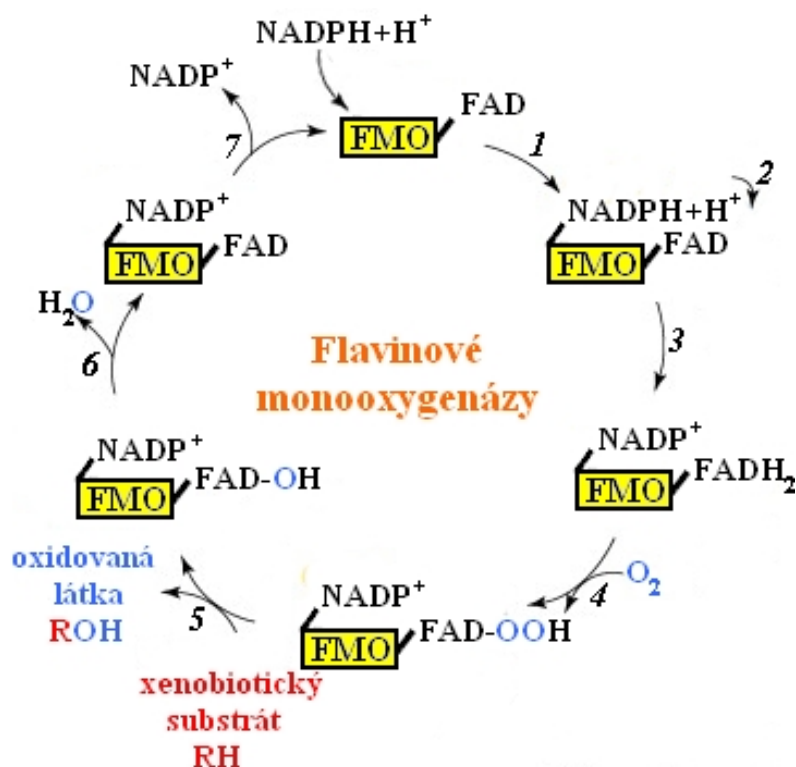
Upraveno podle [http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter\\_4\\_drug\\_biotransformation.html](http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter_4_drug_biotransformation.html)  
(staženo dne 27. 2. 2013)

### 2.1.1.2 Flavinové monoxygenázy (FMO)

Vedle CYP jsou nejvýznamnějšími enzymy podílející se na oxidaci xenobiotik. Enzymy se vyznačují prezencí jedné molekuly koenzymu flavinadenindinukleotidu (FAD). Cílem katalýzy bývají nukleofilní heteroatomy (S a N) nebo také anorganické ionty (HS<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, CNS<sup>-</sup>) (Skálová *et al.*, 2011).

V nepřítomnosti substrátu tvoří FMO komplex s NADPH. Následně se váže O<sub>2</sub> za vzniku hydroperoxyflavinu (FAD-OOH). V této reaktivní konformaci je enzym připraven pro vazbu se substrátem. Jakmile se substrát vyskytne v aktivním místě enzymu,

je jedním ze dvou atomů kyslíku oxidován, zatímco druhý atom kyslíku reaguje za vzniku vody. Oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP) se uvolní a opětovná vazba s NADPH začíná nový cyklus oxidace (Eswaramoorthy *et al.*, 2006). FMO vážou substrát pouze v jednom kroku reakce, ale NADP je vázán téměř po celou dobu katalýzy. Tím je samotný průběh odlišný od interakce mezi substrátem a CYP (Obr. 2) (Skálová *et al.*, 2011).



Obr. 2: Schéma katalýzy flavinovými monooxygenázami při oxidaci substrátu

Nakresleno podle Schlaich, 2007

### 2.1.2 II. fáze biotransformace

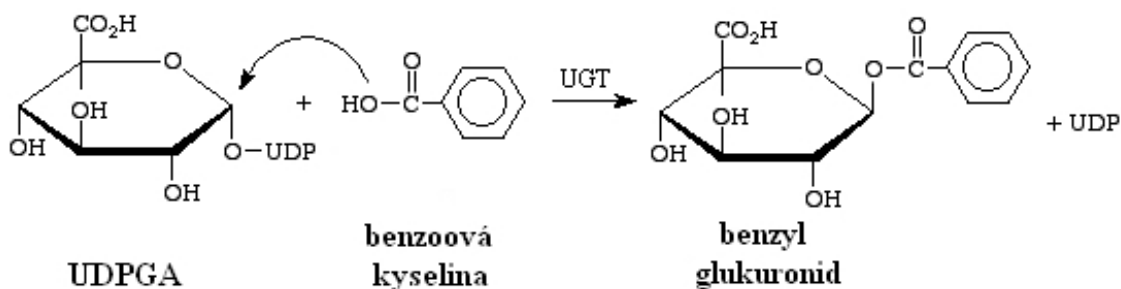
II. fáze biotransformace je zajištěna tzv. konjugačními enzymy. Ve většině případů jsou tyto enzymy lokalizovány v cytozolu nebo mikrozomech hepatocytů, ale v menším množství jsou přítomné téměř ve všech tkáních. Během této části detoxikace dochází ke vzniku konjugátu reakcí produktů fáze I. s konjugačním činidlem. Konjugační činidla jsou endogenní látky. Podmínkou reakce je splnění energetických nároků a to vazbou s makroergním kofaktorem (Skálová *et al.*, 2011). Za reakce zprostředkovávající konjugaci lze považovat glukoronidace, sulfatace, acetylace, metylace, konjugace s

glutathionem a aminokyselinami. Tyto reakce jsou zodpovědné za vznik hydrofilnější sloučeniny, kterou doprovází i snížená aktivita a toxicita. Konjugáty mají omezenou schopnost pasivní difúze přes membránu, a tak dochází ke snazší eliminaci z organismu. Některé konjugáty vykazují značnou nestabilitu. Hydrolytickým štěpením může dojít k opětovnému vzniku původního nebo ještě více toxického xenobiotika. Jako příklady lze uvést některé aminy a karboxylové kyseliny: morfin, diklofenak, tolmetin a kyselina acetylsalicylová. (King *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2006).

### 2.1.2.1 Glukuronidace

Glukuronidace představuje hlavní konjugační reakci. Konjugace probíhá mezi řadou endogenních i exogenních látek a glukuronovou kyselinou pocházející z kofaktoru. Kofaktorem nejčastěji bývá uridin-5-difosfo-glukuronová kyselina (UDPGA). V dalších případech lze zmínit UDP glukózu, UDP xylózu a UDP galaktózu. Ke konjugaci dochází u nukleofilních center molekuly jako je kyslík (např. alkoholy, fenoly nebo karboxylové kyseliny), dusík (např. aminy), síra (např. thioly) a v některých případech i uhlík. Po konjugaci je generován glukuronid a uridin-5-difosfát (UDP). Od předešlé konformace  $\alpha$  se vzniklé glukuronidy vyznačují konformací  $\beta$ . UDP-glukuronosyltransferázy (UGT) jsou enzymy odpovědné za katalýzu transferu glukuronové kyseliny na substrát (Obr. 3) (King *et al.*, 2000; Mackenzie *et al.*, 2005).

Ve většině případů dochází ke vzniku glukuronidů, které jsou polárnější a je usnadněna jejich exkrece do moči nebo žluči. Močí jsou vylučovány glukuronidy s nižší molekulovou hmotností. Pokud je molekulová hmotnost větší než  $350 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , tak jsou glukuronidy exkretovány žlučí (Guillemette, 2003; Skálová *et al.*, 2011). Na druhou stranu glukuronidace může vést i ke vzniku reaktivnějšího produktu jako v případě morfin-6-glukuronidu, který je 50x reaktivnější než morfin. Dalším případem mohou být glukuronidy steroidů jako je testosteron a estriol, které mohou způsobit cholestázu, tedy poruchu vylučování žluči do dvanáctníku (King *et al.*, 2000).



**Obr. 3: Mechanismus glukuronidace**

Nakresleno podle <http://www.studydroid.com/index.php?page=studyPack&packId=88330>

(staženo dne 6. 2. 2013)

### 2.1.2.2 Konjugace s glutathionem

Hlavní roli hraje konjugační činidlo s názvem glutathion. K jeho vzniku dochází dvoustupňovou syntézou glutamátu, cysteinu a glycinu. Vznik konjugátu je podmíněn přítomností elektrofilního metabolitu. Předmětem zájmu bývají epoxidy, ketony, isokyanáty, alkyl- a arylhalogenidy. Konjugace s glutathionem je independentní na předchozí aktivaci. Tím se odlišuje od glukuronidace a sulfatace. Reakce může být urychlena přítomností enzymů tzv. glutathion-S-transferáz (GST) (Skálová *et al.*, 2011).

### 2.1.2.3 Sulfatace

Jedná se o chemickou reakci katalyzovanou konjugačními enzymy sulfotransferázami. Dochází k transferu sulfátové skupiny ( $\text{SO}_3^-$ ) z 3'-fosfoadenozin-5'fosfosulfátu na nukleofilní skupinu akceptorové molekuly. Právě záporný náboj dává akceptorové molekule charakteristické vlastnosti. Nově získaná hydrofilnější povaha se uplatňuje při interakci s receptory a transportními proteiny (Skálová *et al.*, 2011).

### 2.1.3 III. fáze biotransformace

Dlouhou dobu se o biotransformaci hovořilo jako o dvoufázovém procesu. V poslední době se proces transportu xenobiotika z buňky považuje za III. fázi biotransformace (Vrzal *et al.*, 2004). Důležitou roli v této fázi hrají transportéry zprostředkávající přenos substance přes lipidovou membránu (Skálová *et al.*, 2011).

Prvním objeveným lékovým transportérem byl P-glykoprotein považovaný za prvního člena *ATP binding cassette* (ABC) lékových transportérů. Vzniká expresí genu

*MDR1* a zodpovídá za mnohočetnou lékovou rezistenci. ABC transportéry vystupují jako primární transportéry, které potřebnou energii k transportu získávají hydrolyzou adenosin-5'-trifosfátu (ATP). Trans-epiteliálním effluxem jsou různé léky transportovány z buňky ven. Snižuje se intracelulární koncentrace, která je potřebná k požadovanému účinku léčiva (Schinkel *et al.*, 2003).

Konjugáty vzniklé během II. fáze jsou z buňky exkretovány sekundárními přenašeči. Jedními z nich jsou transportní peptidy organických aniontů (OATP). Zde je přenos zajištěn získanou energií z antiportu nebo kontransportu iontů. Analogicky k OATP, existuje transportní systém nazvaný transportéry organických kationtů (OCT). Tímto způsobem je zajištěn přenos např. N-methyl-nikotinamidu, thiaminu, cholinu, dopaminu, cimetidinu, serotoninu, histaminu, adrenalinu a noradrenalinu. Je třeba brát v potaz, že se ve většině jedná o přenašeče endogenních látek a iontů, nikoli xenobiotik (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004).

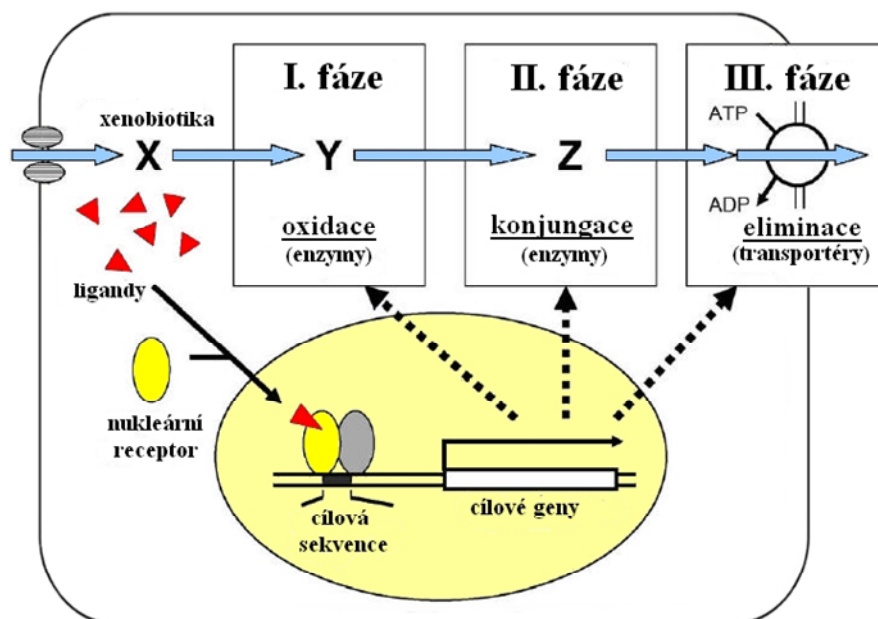
## **2.2 Regulace enzymů metabolizujících xenobiotika**

Regulace exprese genů se odehrává na několika úrovních. Je závislá na rychlosti syntézy a degradaci enzymů, koncentraci substrátů, podmínkách reakce (teplota a pH), přítomnosti aktivátorů a inhibitorů. Mezi nejdůležitější prvky regulace I., II. a III. patří nukleární receptory, které vystupují jako ligandem aktivované transkripční faktory (Obr. 4) (Skálová *et al.*, 2011). Po interakci ligandu s receptorem v cytozolu následuje konformační změna receptoru. Změna konformace je doprovázena translokací komplexu do jádra, kde se váže na cílovou sekvenci DNA (Vrzal *et al.*, 2004).

Mezi xenoreceptory, tedy receptory aktivovatelné xenobiotiky patří hlavně aryl uhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), dále také receptor pro kyselinu *cis*-retinovou (RXR), receptor pro kyselinu *trans*-retinovou (RAR), receptor vitamínu D (VDR) a glukokortikoidní receptor (GR). Přehled některých receptorů, jejich cílových genů, agonistů a antagonistů je uveden v Tab. I (Nakata *et al.*, 2006; Vrzal *et al.*, 2004).

Produkty exprese genů jsou esenciální pro embryonální vývoj a udržení diferenciovaných celulárních fenotypů. Dysfunkce receptoru může korelovat s obezitou, infertilitou, diabetes mellitus II. typu, hyperlipidemií, hypertenzí, aterosklerózou a apoptózou buněk (Gronemeyer *et al.*, 2004).





**Obr. 4: Regulace I., II. a III. fáze biotransformace**

Překresleno podle Nakata *et al.*, 2006

Tab. I: Přehled jednotlivých receptorů

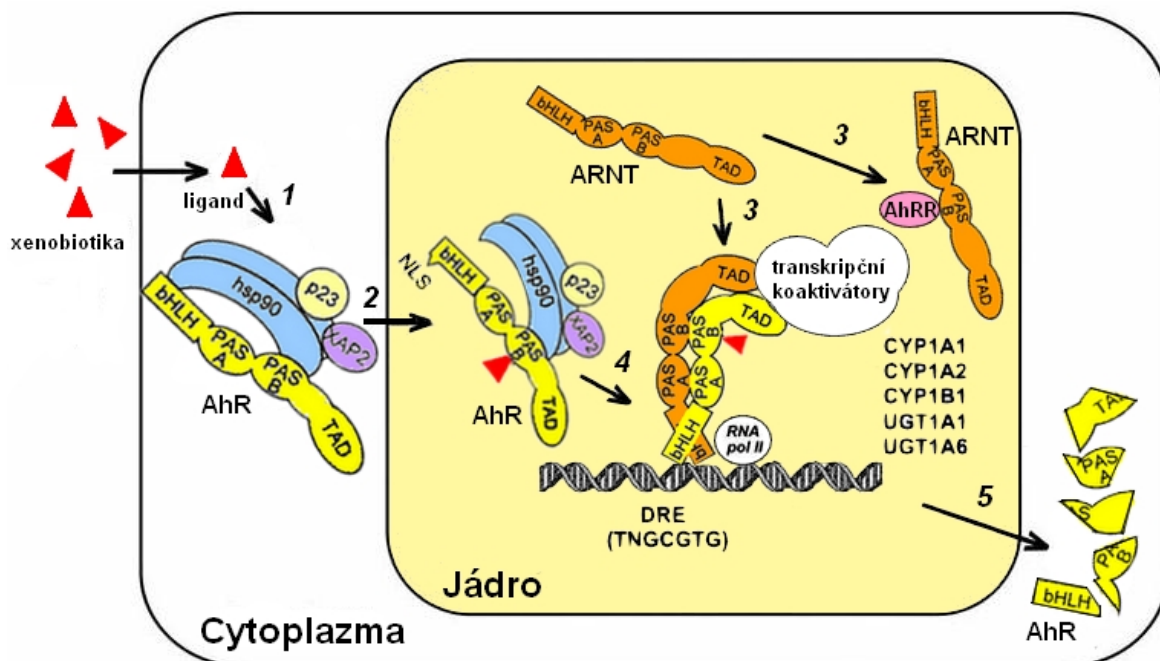
receptor	cílové geny	agonisté	antagonisté				
<b>AhR</b>	ABCG2 <sup>[4]</sup> CYP1A1,2 <sup>[4]</sup> CYP1B1 <sup>[4]</sup> GSTA1 <sup>[10]</sup> UGT1A1,6,9 <sup>[4]</sup>	7-ketocholesterol <sup>[2]</sup> 3-metylcholantren <sup>[2]</sup> β-naftoflavon <sup>[2]</sup> Benzo(a)pyren <sup>[2]</sup> Bilirubin <sup>[2]</sup> Dibenzoylmetan <sup>[2]</sup>	Indirubin <sup>[2]</sup> Indigo <sup>[2]</sup> Kurkumin <sup>[2]</sup> Omeprazol <sup>[2]</sup> Prostaglandin <sup>[2]</sup> TCDD <sup>[2]</sup>	Apigenin <sup>[1]</sup> Baicalein <sup>[1]</sup> Chrysin <sup>[1]</sup> Morin <sup>[1]</sup> Genistein <sup>[1]</sup> Kaempferol <sup>[1]</sup>	Kapsaicin <sup>[1]</sup> Karnosol <sup>[1]</sup> Kasuarinin <sup>[1]</sup> Kurkumin <sup>[1]</sup> Resveratrol <sup>[1]</sup> Tilirosid <sup>[1]</sup>		
<b>PXR</b>	CYP1A2 <sup>[4]</sup> CYP2B6,10 <sup>[4,7]</sup> CYP2C9,19 <sup>[4,7]</sup> CYP3A4,5,7 <sup>[4,7]</sup> CYP3A11,13,23 <sup>[10]</sup> CYP7A1 <sup>[4]</sup>	SULT2A1 <sup>[4]</sup> UGT1A1,3,4 <sup>[4]</sup> GSTM1,2 <sup>[5]</sup> ABCB1,11 <sup>[4]</sup> ABCC1,2,3 <sup>[4]</sup> ABCG2 <sup>[4]</sup>	OATP2 <sup>[7]</sup> MRP3 <sup>[7]</sup>	Cyproteron <sup>[5]</sup> Fenobarbital <sup>[5]</sup> Gemfibrozil <sup>[5]</sup> Glutethimid <sup>[5]</sup> Haloperidol <sup>[7]</sup> Klotrimazol <sup>[5]</sup>	Lovastatin <sup>[7]</sup> Loratadin <sup>[5]</sup> Nifedipin <sup>[5]</sup> Rifampicin <sup>[5]</sup> Ritonavir <sup>[5]</sup> Tamoxifen <sup>[5]</sup>	Taxol <sup>[7]</sup> Terbinafim <sup>[7]</sup>	Ketokonazol <sup>[7]</sup>
<b>CAR</b>	CYP2A6 <sup>[4]</sup> CYP3A4 <sup>[6]</sup> CYP2B1,2,10 <sup>[4,10]</sup> CYP2C9,19,29 <sup>[4,10]</sup> UGT1A1 <sup>[4]</sup>	SULT1A1 <sup>[10]</sup> SULT2A1,9 <sup>[7]</sup> MRP3,4 <sup>[7]</sup> ABCB1 <sup>[7]</sup> ABCC2,3,4 <sup>[4]</sup>		CITCO <sup>[5]</sup> Fenobarbital <sup>[5]</sup> Fenytoin <sup>[5]</sup> Statiny <sup>[7]</sup> Valproát <sup>[7]</sup>	Žlučové kyseliny <sup>[3]</sup>	Androstanol <sup>[5]</sup> Androstenol <sup>[5]</sup> Klotrimazol <sup>[5]</sup>	
<b>VDR</b>	CYP3A4 <sup>[10]</sup> CYP24A1 <sup>[8]</sup> CYP27A1 <sup>[8]</sup> CYP27B1 <sup>[8]</sup> CYP2B6 <sup>[4]</sup>	CYP2C9 <sup>[4]</sup> SULT2A1 <sup>[4]</sup> ABCC2 <sup>[4]</sup>		22-oxakalcitriol <sup>[9]</sup> 1α,25-dihydroxy- dihydrotachysterol <sup>[9]</sup> 25-hydroxy- doxercalciferol <sup>[12]</sup>	Kalcitriol <sup>[11]</sup> Kalcipotriol <sup>[12]</sup> Karikalcitol <sup>[9]</sup> Seokalcitol <sup>[12]</sup> Žlučové kyseliny <sup>[7]</sup>	(23S)-25-dehydro- 1α-hydroxycholecalciferol- 26,23-lakton <sup>[11]</sup> 22S-butyl-25,26,27-trinor-1α,24- dihydroxycholecalciferol <sup>[11]</sup>	

V tabulce jsou zahrnuty informace z následujících publikací: [1] Amakura *et al.*, 2003; [2] Denison *et al.*, 2003; [3] Guengerich, 1999; [4] Nakata *et al.*, 2006; [5] Pávek *et al.*, 2005; [6] Pospěchová *et al.*, 2009; Skálová *et al.*, 2011; [8] Smolders *et al.*, 2009a; [9] Steddon *et al.*, 2001; [10] Tirona *et al.*, 2005; [11] Yoshimoto *et al.*, 2012; [12] <http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=187884#UVWz5zdoovb> (staženo dne 29. 3. 2013)

### 2.2.1 Aryl uhlovodíkový receptor (AhR)

Tento receptor spolu se svým represorem (AhRR) a nukleárním translokátorem (ARNT) je členem rodiny bHLH-PAS transkripčních faktorů (Tirona *et al.*, 2005). Již bylo identifikováno více než 400 exogenních ligandů, mezi něž patří např. polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, indoly, flavonoidy, žlučová barviva, deriváty mastných kyselin a aminokyselin. Jeho nejznámější a nejvíce toxický ligand je nepochybně 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) (Ditrich *et al.*, 2010). Expozice TCDD je doprovázena teratogenezí, karcinogenezí, hepatotoxicitou, epiteliální hyperplazií a indukcí enzymů (Nakata, 2006). Aktivace receptoru vede ke zvýšení hladiny enzymů CYP (CYP1A, CYP1B), UDP-glukuronosyltransferáz (UGT1A) a GST (Mimura *et al.*, 1999).

V nepřítomnosti ligandu je AhR udržován v cytoplasmě v latentním komplexu se dvěma proteiny teplotního šoku (hsp90), proteinem XAP2 a p23. Hsp90 interaguje s AhR prostřednictvím jak bHLH domény, tak PAS B, která obsahuje ligand vazebnou oblast. Konformační změna je zodpovědná za odkrytí jaderného lokalizačního signálu (NLS), vyskytujícího se na N-konci receptoru. Následně dochází k iniciaci jaderného importu. Po průchodu do jádra jsou hsp90, XAP2 a p23 vyměněny za protein ARNT, který dimerizuje s AhR prostřednictvím bHLH a PAS domén. Heterodimer ARNT/AhR se váže na cílové sekvence tzv. xenobiotické nebo také dioxinové responzivní elementy (XRE/DRE). Tyto responzivní elementy obsahují specifickou sekvenci v promotorové oblasti cílových genů 5'-TNGCGTG-3', kde N je libovolný nukleotid. Pro iniciaci transkripce je nezbytné navázání transkripčních koaktivátorů přes transaktivační domény (TAD) ARNT a AhR (Kewley *et al.*, 2004). K samotnému přepisu genů dochází prostřednictvím RNA polymerázy II. Následně je AhR transportován do cytozolu, kde je 26S proteazomem degradován (Obr. 5) (Pávek *et al.*, 2008).



**Obr. 5: Schéma signální transdukce po aktivaci aryl uhlovodíkového receptoru**

Nakresleno podle Kewley *et al.*, 2004; Pávek *et Dvořák* 2008

### 2.2.2 Pregnanový X receptor (PXR)

Receptor bývá někdy nazýván jako sirotčí nukleární receptor. I když je PXR poměrně promiskuitní, jeho primární endogenní ligand není doposud znám (Pávek *et al.*, 2005). Ligandy bývají především farmaceutické substance, enviromentální kontaminanty, steroidy a žlučové kyseliny. PXR je klíčový v regulaci exprese genů *CYP3A*. Izoforma *CYP3A4* je zodpovědná za biotransformaci více jak 50 % léčiv (Guengerich, 1999). PXR zodpovídá za indukci biotransformačních enzymů fáze I, II a transportérů fáze III. Tyto, ale také mnoho dalších dějů vedou ke zpolárnění sloučeniny a následné exkreci. Aktivace receptoru chrání např. před hepatotoxickým efektem vysokých koncentrací žlučových kyselin během stravování (Nakata *et al.*, 2006).

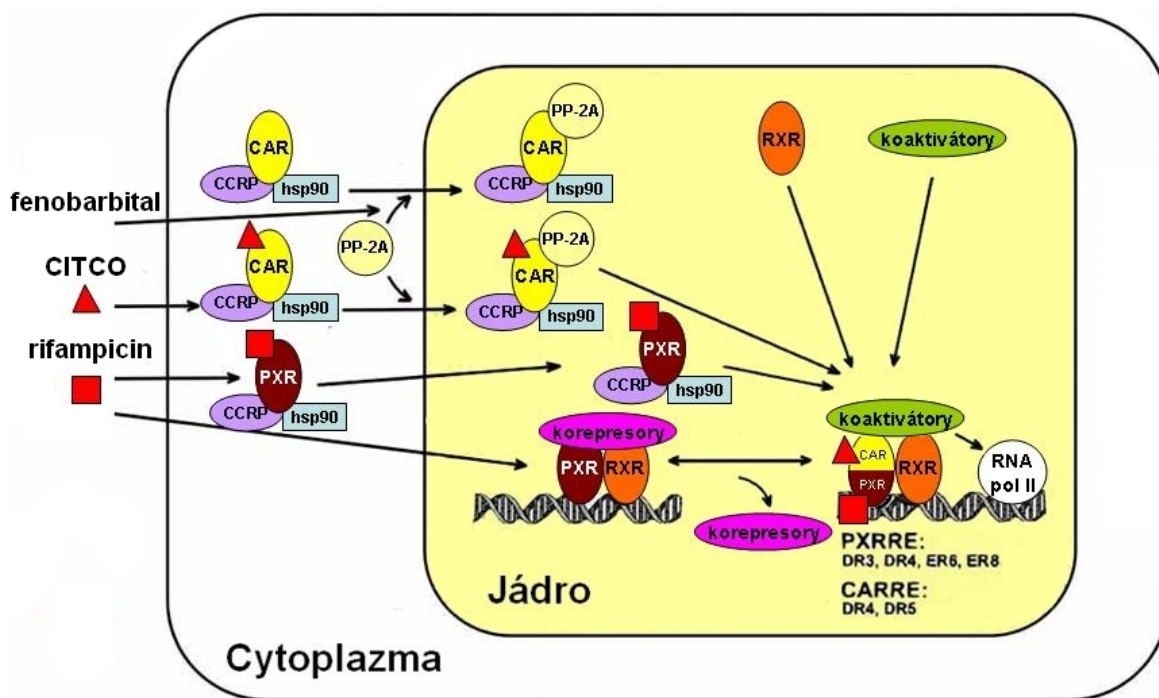
Hojně se PXR vyskytuje v játrech, méně v tenkém a tlustém střevě, žaludku a ledvinách. Lokalizace je prioritně nukleární, ale existují i zmínky o cytoplazmatické lokalizaci a přemístění receptoru PXR z cytoplazmy do jádra během aktivace po vazbě s ligandem. Celý proces je poměrně složitý. Účastní se ho korepresorové proteiny, koaktivátory i proteiny s enzymovou aktivitou ovlivňující strukturu chromatinu. Dimerizace PXR s receptorem pro kyselinu *cis*-retinovou (RXR) slouží k rozpoznání

specifické promotorové DNA sekvence cílových genů. Tato sekvence bývá označována jako PXR responzivní element (PXR-RE) (Obr. 6) (Schuetz, 2004).

### 2.2.3 Konstitutivní androstanový receptor (CAR)

CAR je další receptor patřící do skupiny sirotčích nukleárních receptorů. Aktivace CAR koreluje s pochody metabolismu, regulací buněčného cyklu, hypertrofií jater, hepatokarcinogenezí a s léky indukovaným poškozením jater. Cílové geny CAR kódují enzymy I. a II. fáze biotransformace, tak i transportéry podílející se na detoxikaci xenobiotik i endogenních látek jako jsou žlučové kyseliny, hormony štítné žlázy, steroidní hormony a mastné kyseliny. Přítomnost těchto látek souvisí s expresí cílových genů např. *UGT1A1*, *CYP2B6*, *CYP3A4* a *CYP2C9*, *SULT2A9*, *MRP3* a *OATP2* (Goodwin *et al.* 2004; Imai *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004).

Cytoplazmatický komplex tvořený cytoplazmatickým CAR retenčním proteinem (CCRP) a hsp90 zaručuje inaktivní stav receptoru. K aktivaci receptoru může dojít dvěma způsoby. Přímá aktivace je podmíněna vazbou ligandu na CAR, přičemž dochází k nukleární translokaci. Modelovou látkou u člověka je 6-(4-chlorofenyl)imidazol [2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim tzv. CITCO. Nejznámějšími induktory podstupující nepřímou aktivaci jsou fenobarbital a fenytoin. Jedná se o kaskádu, při níž se tvoří komplex CAR, fosfatázy 2A (PP-2A), CCRP, a hsp90. Tento komplex po přechodu do jádra spouští transaktivaci genů bez vazby ligandu na receptor. V obou případech komplex kooperuje s responzivní sekvencí (CAR-RE) v promotorové oblasti cílových genů. Přítomnost RNA polymerázy II iniciuje transkripci (Obr. 6) (Goodwin *et al.* 2004).



Obr. 6: Schéma transkripční regulace exprese genů řízené receptory PXR a CAR

Nakresleno podle Pávek *et Dvořák* 2008

#### 2.2.4 Receptor vitamínu D (VDR)

Receptor vitamínu D je dalším členem rodiny jaderných receptorů, který vystupuje jako ligand-dependentní transkripční faktor (Dusso *et al.*, 2005). Lidský VDR je produkt genu, který je lokalizován na chromozomu 12. VDR stereospecificky váže  $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol (kalcitriol). Dalšími agonisty je početná skupina homologů kalcitriolu. Bylo již syntetizováno tisíce těchto homologů, avšak pouze asi deset z nich bylo začleněno do klinické léčby (Kubodera, 2010; Yoshimoto *et al.*, 2012). VDR může být aktivován i endogenními látkami jako jsou žlučové kyseliny (Pospěchová *et al.*, 2009).

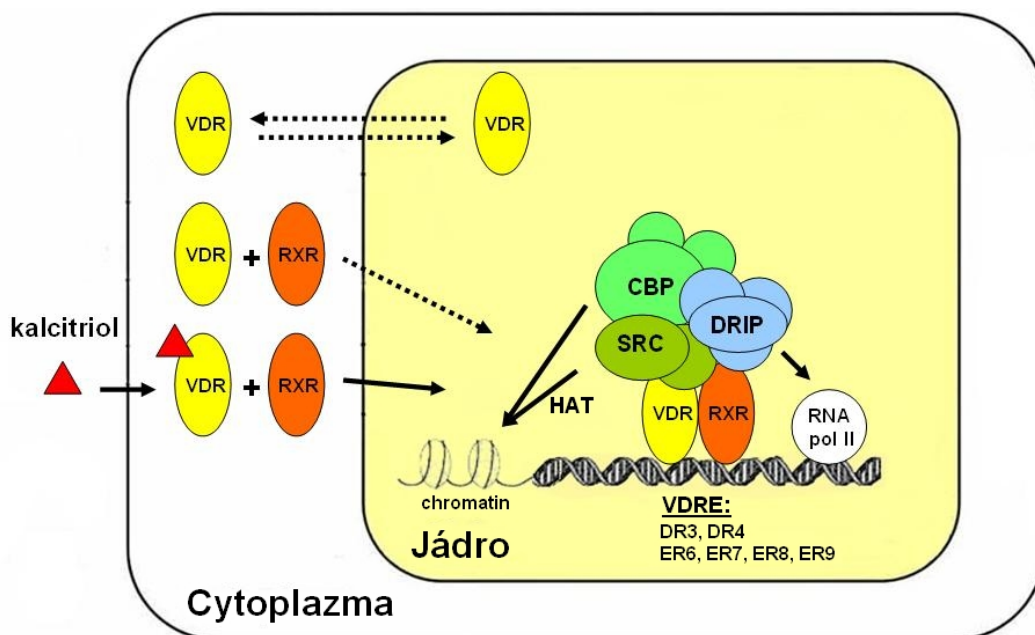
VDR je hojně přítomen především v ledvinách, střevě a kostech, ale na nižší úrovni je přítomen téměř ve většině ostatních tkání. Kromě toho je VDR exprimován i v nádorových buňkách (Han *et Chiang*, 2009; Wu *et Sun*, 2011; Berger *et al.*, 1988).

VDR reguluje četné fyziologické procesy, z nichž nejvýznamnější jsou metabolismus vápníku a fosfátu v kostech, imunita, kardiovaskulární funkce, buněčný růst a diferenciace. Přírodní a syntetické VDR ligandy inhibují nebo také indukují proliferaci různých typů nádorových buněk (Matsunawa *et al.*, 2012; Pospěchová *et al.*, 2009).

Při absenci ligandu se VDR pohybuje mezi cytoplazmou a jádrem. Může dimerizovat s RXR, ale tento heterodimer se vyznačuje nízkou stabilitou a afinitou

k responzivnímu elementu VDR (VDRE) (Smolders *et al.*, 2009b). Po vazbě VDR s ligandem dochází ke konformačním změnám, které vyústí v dynamickou interakci s RXR. Aby došlo k iniciaci transkripce je třeba přítomnosti transkripčních faktorů a koaktivátorů. K nejvýznamnějším koaktivátorům patří komplex proteinů interagujících s receptorem pro vitamín D (DRIP). Bývá hlavním terčem jaderných receptorů a transkripčních faktorů, které interagují s RNA polymerázou II. Dalším důležitým je komplex skládající se z koaktivátorů steroidních receptorů (SRC) a vazebného proteinu pro CREB (CBP). CREB je vazebný protein pro cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP). Tento komplex nese charakter histonové acetyltransferázy (HAT), která dodává acetylové skupiny k histonům, čímž dochází k rozvolnění sbalené DNA. Korepresory vystupují jako histonové deacetylázy (HDAC) a acetylové skupiny odstraňují (Bannister *et Kouzarides*, 2005; Matsunawa *et al.*, 2012; Rachez *et Freedman*, 2000). Korepresor se váže na VDR-RXR heterodimer v absenci ligandu. Přítomnost ligandu snižuje afinitu korepresorů a zvyšuje afinitu ke koaktivátorům. VDR-RXR heterodimer váže přednostně vitamín D responzivní element (VDRE), který se skládá ze dvou přímých hexanukleotidových repetitiv (AGGTCA) oddělených třemi nebo čtyřmi nukleotidy (DR3, DR4) (Carlberg, 1995; Drocourt *et al.*, 2002). Předmětem zájmu bývají také sekvence s obráceným pořadím nukleotidů, oddělené šesti, sedmi, osmi, nebo devíti nukleotidy (ER6, ER7, ER8, ER9) (Obr. 7) (Barwick *et al.*, 1996; Haussler *et al.*, 1998; Matsunawa *et al.*, 2012).

Jestliže dojde k vazbě mezi VDR-RXR heterodimerem a ER6 vazebným elementem, dochází ke kompetici mezi PXR, CAR a VDR. Následkem bývá např. exprese enzymů metabolizujících léčiva (CYP2B6, CYP2C9 a CYP3A4) (Berger *et al.*, 1988; Drocourt *et al.*, 2002; Thummel *et al.*, 2011). Koregulace může probíhat i obráceně. PXR aktivovaný léky moduluje genovou expresi *CYP24A1* vazbou do VDRE, čímž následně dochází k inaktivaci vitamínu D. Tato nespecifická vazba může být příčinou léky způsobené osteomalacie (Pascussi *et al.*, 2005).



**Obr. 7: Schéma transkripční regulace exprese genů řízené nukleárním VDR**

Nakresleno podle Smolders *et al.*, 2009b; Rachez *et Freedman*, 2000

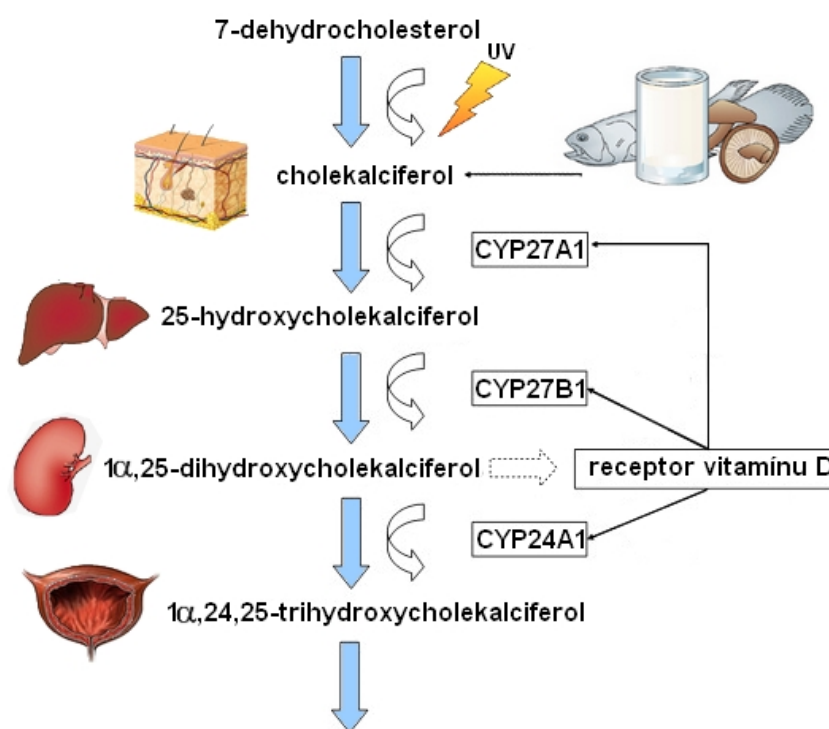
#### 2.2.4.1 Vitamín D

Tento vitamín rozpustný v tucích se ve větším množství vyskytuje např. v rybím tuku, játrech, vaječném žloutku, mléce a vzniká v kůži po expozici slunečnímu záření. Jeho hlavní význam spočívá v resorpci vápníku a fosfátu ze střeva do krve. Avitaminóza koreluje s prezencí rakoviny, měknutí kostí (křivice), diabetes mellitus II. typu, Crohnovy choroby, psychických a neurologických poruch (Brown *et al.*, 2012; Wu *et Sun*, 2011).

V kůži dochází k fotochemické syntéze vitamínu D (cholecalciferol) z provitamínu D (7-dehydrocholesterol) za přítomnosti ultrafialového záření. Rovněž může být cholecalciferol přijat formou potravy a po střevní absorpci se dostává do krve, kde je proteinem vázající vitamín D (DBP) transportován do jater (Deeb *et al.*, 2007). Aktivace vitamínu D je zahájena v játrech, kde je hydroxylován enzymem CYP27A1 za vzniku 25-hydroxycholecalciferolu (kalcidiol), který je pak převeden v ledvinách na aktivní formu 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (kalcitriol) konverzí enzymu CYP27B1 (Lechner *et al.*, 2007). V této nové konfiguraci interaguje s VDR, čímž dochází k aktivaci receptoru. Jedním z cílových genů VDR je *CYP24A1*. Enzym katalyzuje hydroxilaci kalcitriolu v poloze 24 čímž ho inaktivuje. Následně je tedy 1 $\alpha$ ,24,25-trihydroxycholecalciferol vyloučen do moči (Obr. 8) (Avila *et al.*, 2007; Smolders *et al.*, 2009a).



Hladina vitamínu D je definována koncentrací kalcidiolu. Tato koncentrace se u zdravého člověka pohybuje v rozmezí 50-75 nmol/l. Nižší hodnoty bývají označovány jako avitaminóza. Na druhou stranu jedinci s častou expozicí slunečnímu záření mohou lehce vykazovat suprafyziologické hodnoty vyšší než 150 nmol/l (Lips, 2010; Vieth, 2009).



**Obr. 8: Model metabolizace vitamínu D**

Nakresleno podle Deeb *et al.*, 2007; Smolders *et al.*, 2009a

#### 2.2.4.2 Žlučové kyseliny

Dalšími hlavními ligandy VDR jsou žlučové kyseliny. Významnými zástupci jsou např. kyselina lithocholová a chenodeoxycholová (Makishima *et al.*, 2002). Vznikají jako metabolity cholesterolu a jsou potřebné pro transport vitamínů rozpustných v tucích, lipidů a steroidů, dále pak pro střevní absorpci a detoxikaci metabolitů, léků a xenobiotik. Žlučové kyseliny jsou vysoce toxické molekuly a jejich nahromadění může vyústit až k rakovině tlustého střeva. (Chiang, 2003).

### 2.2.4.3 Interakce mezi AhR a VDR

Novodobé studie provedené na liniích monocytů a makrofágů hovoří o možné interakci mezi AhR a VDR. Tyto linie byly ošetřeny přidavkem kalcitriolu, tak i benzo[a]pyrenu a inkubovány 24 hodin. V případě samotného kalcitriolu nebyla zaznamenána zvýšená indukce na úrovni mediátorové RNA (mRNA) ani proteinů CYP1A1. Nicméně po ošetření samotným benzo[a]pyrenem k této indukci došlo. Kombinace obou ligandů zapříčinila vyšší indukci než v případě samotného benzo[a]pyrenu. V tomto případě byla odhalena nespecifická vazba heterodimeru VDR-RXR do ER8 v *CYP1A1* promotoru. Promotor genu *CYP1A1* je považován jako cílový pro AhR a přímá interakce mezi tímto promotorem a VDR nebyla doposud zaznamenána. Spekuluje se o tom, že by kombinace ligandů mohla zvýšit expresi *CYP1A1* nepřímou interakcí AhR s VDR přes koregulační proteiny. Bude ještě třeba dalších studií, aby došlo k úplnému pochopení molekulárních mechanismů mezi VDR a cílovým promotorem AhR (Matsunawa *et al.*, 2012).

### 2.3 UDP-glukuronosyltransferázy (UGT)

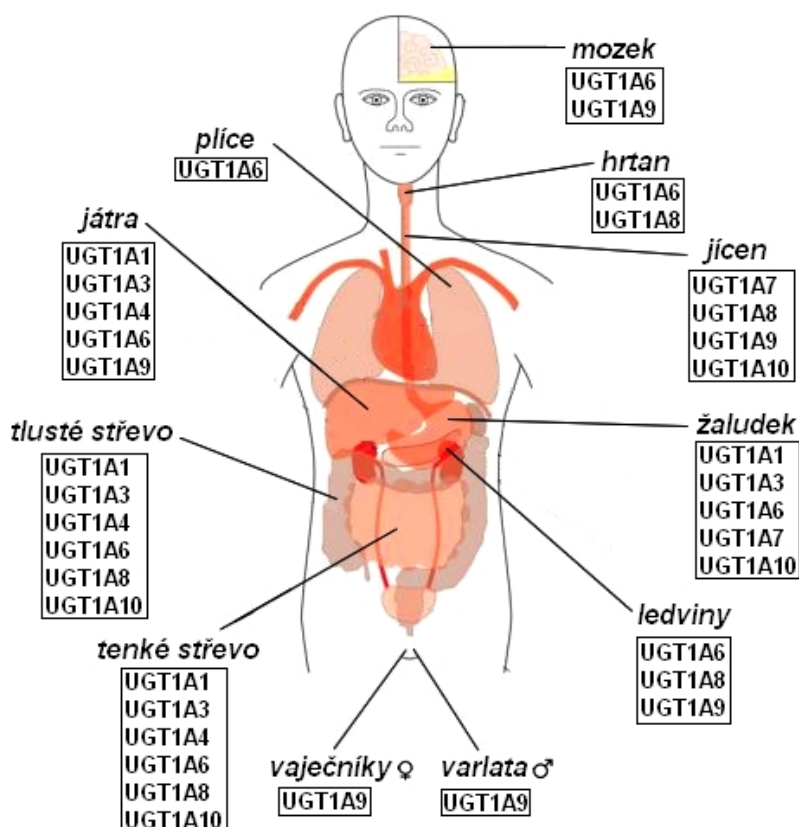
Jak již bylo řečeno dříve, UGT jsou konjugační enzymy odpovědné za katalýzu transferu glukuronové kyseliny na substrát. Tato katalýza probíhá v mnoha organizmech od bakterií až po člověka s výjimkou kočkovitých šelem (Court *et Greenblatt*, 2000).

UGT jsou lokalizovány v lumenu endoplazmatického retikula (ER). Toto umístění má své pro i proti. Jako výhoda se jeví přímý přístup enzymů k metabolitům vzniklých během I. fáze biotransformace. Nicméně lokalizace je nevýhodná pro přístup substrátů a kofaktorů do aktivních míst UGT. Omezení přístupu je jedním z faktorů, který signifikantně down-reguluje aktivitu enzymů (Kiang *et al.*, 2005). Ačkoliv jsou játra považována za hlavní dějiště glukuronidace, tohoto procesu se účastní nespočet dalších orgánů a tkání jako je tenké a tlusté střevo, plíce, mozek, žaludek, varlata, vaječníky a ledviny (Obr. 9) (Guillemette, 2003).

Za posledních několik málo desetiletí bylo detekováno obrovské množství možných substrátů. Některé z nich jsou steroidní hormony, hormony štítné žlázy, žlučové kyseliny, bilirubin, vitamíny rozpustné v tucích a tisíce xenobiotik. Xenobiotika v sobě zahrnují přibližně 200 léčiv, z nichž některé jsou uvedeny v Tab. II. Dále sem patří karcinogeny, environmentální polutanty a potravní doplňky (Court *et Greenblatt*, 2000; Kiang *et al.*, 2005; Tukey *et Strassburg*, 2000).

UGT jsou nejvýznamnější konjungační enzymy a podílejí se na 35 % všech konjungačních reakcí. Při výskytu dvou a více xenobiotik v organismu je vysoká pravděpodobnost kompetice. Léčiva, ke kterým mají UGT vyšší afinitu mohou kompetitivně inhibovat detoxikaci jiných současně podaných léčiv (Guillemette, 2003). Indukce enzymů je zajištěna prostřednictvím ligandem aktivovaných receptorů např. CAR, PXR a AhR (Zhou *et al.*, 2005).

Nedostatečná exprese nebo snížená aktivita UGT může vést k patologickým stavům jako je Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu, hepatitida nebo karcinogeneze. Crigler-Najjarův syndrom vzniká mutací genu, který exprimuje UGT. Z toho důvodu dochází k částečné nebo úplné absenci enzymu zprostředkovávajícího konjugaci bilirubinu s UDPGA. Tímto je znemožněna exkrece bilirubinu žlučí z těla (Tukey *et Strassburg*, 2000; Zhou *et al.*, 2005).



**Obr. 9: Expres UGT1A v lidských orgánech**

Vytvořeno podle Tukey *et Strassburg* 2000; Desai *et al.*, 2003;

<http://www.tutorvista.com/science/diagram-of-internal-organs#>

(staženo dne 14. 3. 2013)

**Tab. II: Léčiva podléhající glukuronidaci katalyzované UGT1A**

<b>izoforma</b>	<b>konjugované léčivo</b>		
<b>UGT1A1</b>	Acetaminofen Buprenorfin Etoposid Ethinylestradiol Ezetimib	Irinotekan Karvedilol Kyselina mykofenolová Morfin Naltrexon	Retigabin Tamoxifen Thiokoralin Troglitazon
<b>UGT1A3</b>	Amitriptylin Buprenorfin Ciprofibrát Cyproheptadin Diklofenak Ezetimib	Fenoprofen Ibuprofen Imipramin Ketoprofen Ketotifen Klofibrát	Klonixin Klozapin Kyselina valproová Morfin Naproxen Pitavastatin
<b>UGT1A4</b>	Amitriptylin Cyproheptadin Difenhydramin Doxepin Chlorpromazin Imipramin	Irinotekan Ketotifen Klozapin Kotinin Nikotin Olanzapin	Posakonazol Retigabin Tamoxifen Trifluoperazin
<b>UGT1A6</b>	Acetaminofen Irinotekan	Kyselina valproová Morfin	
<b>UGT1A7</b>	Irinotekan Kyselina mykofenolová		
<b>UGT1A8</b>	Kyselina mykofenolová Kyselina niflumová Morfin	Naloxon Naltrexon Propofol	Raloxifen
<b>UGT1A9</b>	Acetaminofen Almokalant Diklofenak Entakampon Flavopiridol Flurbiprofen Gemfibrazol	Ibuprofen Irinotekan Kotinin Kyselina mykofenolová Kyselina niflumová Kyselina valproová Morfin	Nikotin Oxazepam Propofol Raloxifen Tamoxifen Thiokoralin Tolkapon
<b>UGT1A10</b>	Kyselina mykofenolová Kyselina niflumová	Morfin Raloxifen	Troglitazon

Tabulka byla vytvořena podle Kiang *et al.*, 2005

### 2.3.1 Nomenklatura UGT

Na základě sekvenční identity a odlišného evolučního vývoje exonů došlo k pojmenování jednotlivých členů superrodiny *UGT*. Každý název genu obsahuje třípísmennou zkratku UGT. Následuje arabské číslo reprezentující genovou rodinu. Další v pořadí je písmeno A nebo B, které je příznačné pro podrodinu. Další arabské číslo blíže specifikuje konkrétní gen, např. *UGT1A8*. Stejně čísla a písmena jak u genu se doporučuje uvádět i pro odpovídající genový produkt jako je komplementární DNA (cDNA), mRNA nebo enzymy. Názvy psané kurzívou odpovídají genům např. *UGT1A8*. Názvy psané bez kurzívy jsou pak příznačné pro cDNA, mRNA, a enzymy např. UGT1A8. V názvech se nevyskytují mezery mezi písmeny ani číslicemi. Geny zástupců hlodavců by měly být psány malými písmeny po prvním velkém (*Ugt1a8*) (Mackenzie *et al.*, 1997). Poslední aktualizace nomenklatury UGT byla provedena v roce 2005 (Mackenzie *et al.*, 2005).

### 2.3.2 Struktura UGT

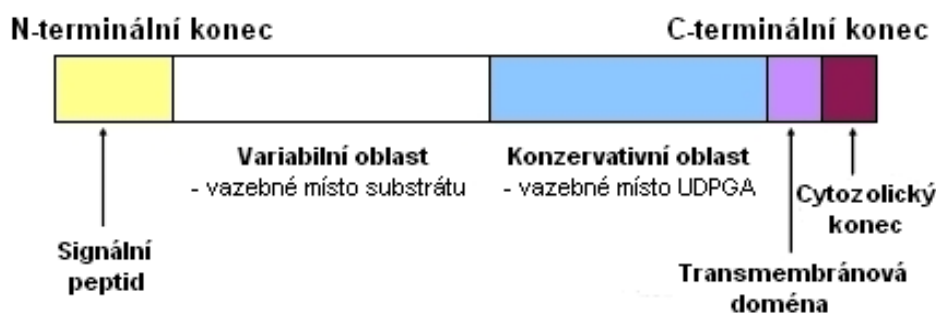
UGT jsou syntetizovány jako proteinové prekurzory, jejichž délka se pohybuje v rozmezí od 527 do 534 aminokyselin o molekulové hmotnosti 50-57 kDa. Samotná aktivní část proteinu pak čítá přibližně 505 aminokyselin (Obr. 10) (Tukey *et Strassburg*, 2000; Guillemette, 2003).

N-terminální konec je tvořený v průměru 280 aminokyselinami. Na tomto úseku se vyskytuje několik vysoce konzervativních domén, které jsou nezbytné pro membránový přenos a aktivitu enzymu (Wooster *et al.*, 1993). Je zde situován signální peptid, který zprostředkovává inkorporaci polypeptidového řetězce do lumenu ER. Po transferu proteinu je signální peptid rozštěpen. S výjimkou UGT1A10 se signální peptid vyskytuje u všech UGT (Burchell *et Coughtrie*, 1989; Ritter *et al.*, 1992; Tukey *et Strassburg*, 2000). Tento úsek je kódovaný exony 1 a obsahuje substrát vazebnou doménu. Na základě specifického uspořádání aminokyselin ve vazebném místě substrátu je umožněna interakce s konkrétním substrátem. Několik studií sice popsalo překrývající se substrátovou specifitu UGT, nicméně tyto transferázy vykazují vysokou specifitu a to i v případě, kdy je homologie mezi *UGT* stejné podrodiny 95 % (Guillemette, 2003).

Přestože jsou UGT1 enzymy kódovány pěti exony a UGT2 enzymy kódovány šesti exony, tak je zde patrný vysoký stupeň similarity karboxylových konců (Strassburg *et al.*, 1997). C-terminální konec obsahuje vazebné místo pro kofaktor UDPGA (Tukey *et Strassburg*, 2000). Na tomto úseku se rovněž vyskytuje i hydrofobní sekvence, která

kotví protein na cytoplazmatické straně membrány ER (Burchell *et Coughtrie*, 1989; Ritter *et al.*, 1992).

Katalytická jednotka je tvořena dimerizací UGT monomerů. Substrát difunduje přes membránu ER a váže se na aktivní místo vytvořené interakcí dvou monomerů na N-terminálním konci. Stabilita dimeru je podmíněna prezencí substrátu. UDPGA vzniká v cytozolu, avšak transportéry je transportována přes proteinové kanály do lumenu ER. Transport je zprostředkován pravděpodobně jako antiport s UDP nebo nově vzniklým glukuronidem zpět do cytozolu (Skálová *et al.*, 2011; Bossuyt *et Blanckaert* 1996). Po konjugaci je glukuronid vyloučen do cytozolu přes stejné kanály jak pro vstup UDPGA. Odstranění glukuronidu podporuje rozdělení dimeru a umožňuje následné párování se stejným nebo jiným monomerem (Radominska-Pandya *et al.*, 1999).

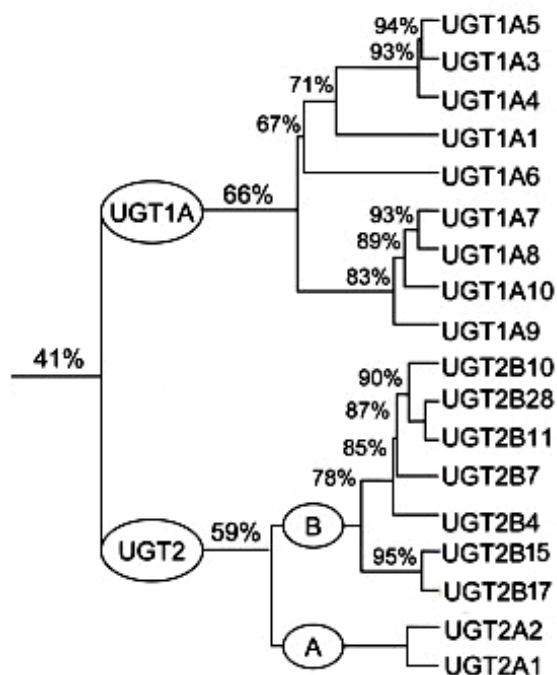


**Obr. 10: Struktura enzymů UGT**

Překresleno podle Nagar *et Rimmel*, 2006

### 2.3.3 Genové rodiny UGT

Na základě sekvenční homologie lze tuto superrodinu *UGT* rozdělit do čtyř rodin a to na *UGT1*, *UGT2*, *UGT3* a *UGT8* (Obr. 11). Ty se dále dělí na podrodiny *UGT1A*, *UGT2A*, *UGT2B*, *UGT3A* a *UGT8A*. Proteiny vzniklé expresí genů *UGT1* rodiny jsou produkty jednoho specifického exonu a dalších čtyř exonů, které jsou sdíleny geny této rodiny. Exonové sdílení je také patrné u ostatních genových rodin. Enzymy *UGT2* vznikají důsledkem exprese šesti exonů. U rodin *UGT3* dochází k expresi sedmi exonů a pět exonů je exprimováno u rodiny *UGT8* (Mackenzie *et al.*, 2005).



**Obr. 11: Fylogenetický strom lidských genových rodin *UGT1* a *UGT2***

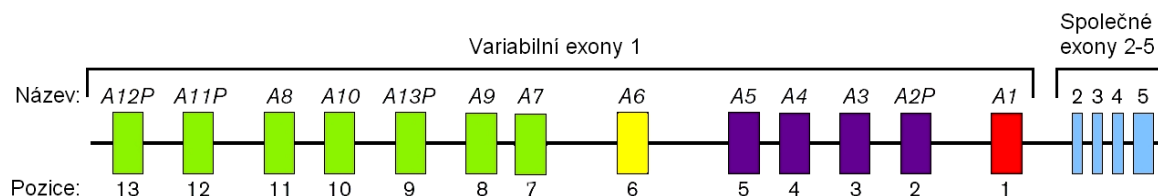
Překresleno podle Barbier *et* Bélanger, 2008

### 2.3.3.1 Genová rodina *UGT1*

Rodina lidských *UGT1* genů je lokalizována na chromozomu 2q37. Jejich přibližná velikost je 200 kb. Každý gen je tvořen pěti exony, tedy jedním unikátním a dalšími čtyřmi 2-5, které jsou společné všem genům této rodiny. Každý gen obsahuje promotor, který slouží jako vazebné místo pro transkripční faktory a RNA polymerázu II. Jejich celkový počet je třináct: *UGT1A1*, *UGT1A2P*, *UGT1A3-UGT10*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P* a *UGT1A13P*. Přepisem jednotlivých genů by potenciálně mohlo být generováno třináct transkriptů. Nicméně, čtyři z třinácti lidských exonů 1 (*UGT1A2P*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P* a *UGT1A13P*) obsahují mutace a jsou označeny jako pseudogeny. V průběhu evoluce vznikly exony 2-5 současně spolu s ancestrálními exony *1A1*, *1A6* a předky současných exonových klastrů *1A2P-1A5* a *1A7-1A13P*. Současné uspořádání genů *UGT1* se pravděpodobně vyvinulo jako důsledek dvou divergentních duplikací (Mackenzie *et al.*, 2005).

Původní záměr byl pojmenovat geny podle jejich umístění, tedy *1A1* je nejbližší a *1A13P* nejvíce vzdálený od sady exonů 2-5. Toto rozhodnutí bylo učiněno na základě dostupných sekvenčních informací tehdejší doby. Avšak díky novému kompletnímu

sekvenování genů *UGT1* bylo stanoveno nové pořadí, které lépe odráží umístění lokusů vzhledem k exonům 2-5. Správné 3'-5' uspořádání je tedy: *UGT1A1*, *1A2P*, *1A3*, *1A4*, *1A5*, *1A6*, *1A7*, *1A9*, *1A13P*, *1A10*, *1A8*, *1A11P* a *1A12P* (Obr. 12) (Mackenzie *et al.*, 2005).



**Obr. 12: Lokus *UGT1***

Překresleno podle Mackenzie *et al.*, 2005

### 2.3.3.2 Genová rodina *UGT2*

Lidská genová rodina *UGT2* se nachází na chromozomu 4q13 a zahrnuje tři členy podrodiny *UGT2A* a dvanáct členů (sedm genů a pět pseudogenů) *UGT2B* podrodiny (Mackenzie *et al.*, 2005). Na rozdíl od rodiny *UGT1*, každý gen *UGT2* sestává z šesti exonů. Jeden je specifický v závislosti na exprimovaném proteinu a dalších pět exonů je společných všem členům rodiny *UGT2*. Proměnlivé exony nejsou sdíleny až na jednu výjimku (*UGT2A1* a *2A2*). Alternativním sestřihem primárního transkriptu vznikají různé formy mRNA. Z toho důvodu mohou být z jednoho genu syntetizovány různé izoformy proteinu (Mackenzie *et al.*, 1997).

Podobně jako *UGT1A* enzymy i zde vzniklé proteiny mají variabilní N-terminální konce a identické C-terminální konce čítající 288 aminokyselin (Mackenzie *et al.*, 2005). Jednotlivé sekvence genů *UGT2* jsou více než ze 70 % homologní, a tak je obtížné určit mezidruhovou ortologii. Proto je rovněž systémové označení založeno na pořadí, kdy byly jednotlivé izoformy objeveny (Mackenzie *et al.*, 1997).

### 2.3.3.3 Genová rodina *UGT3*

Rodina *UGT3* je tvořena dvěma členy a to *UGT3A1* a *3A2*, kteří jsou situováni na chromozomu 5p13.2. Geny rodiny *UGT3* jsou přibližně z 30 % homologní se sekvencí genů rodin *UGT1*, *UGT2* a *UGT8*. Nicméně na rozdíl od těchto tří rodin není známa katalytická a fyziologická funkce a ani jejich distribuce v buněčných kompartmentech.



Pravděpodobně jsou geny složeny ze sedmi exonů, které jsou od sebe vzdáleny asi 76 kb. Geny kódují protein čítající 523 aminokyselin (Mackenzie *et al.*, 2005).

#### **2.3.3.4 Genová rodina UGT8**

Rodina *UGT8* má jediného představitele. Tento gen je lokalizován na chromozomu 4q26 a skládá se z pěti protein-kódujících exonů (Mackenzie *et al.*, 2005). Jedná se o enzym UDP-galaktosyltransferázu, který katalyzuje vznik galaktosylceramidu. Galaktosylceramid je hlavním glykosfingolipidem myelinu podílející se na strukturní a signalizační funkci centrálního nervového systému (Dziegiel *et al.*, 2010; Marcus *et Popko*, 2002).

#### **2.3.4 Regulace UGT**

Důležitou roli v regulaci genové exprese UGT hrají genetické polymorfizmy, alternativní sestřih, epigenetická dědičnost a transkripční faktory. Exprese UGT enzymů je regulována mnoha receptory, z nichž nejvýznamnější je regulace pomocí CAR, PXR a AhR. Tyto receptory se vážou do různých míst promotoru jako jsou např. sekvence DR3, DR4, DR5, ER6 a ER8 v případě CAR a PXR nebo DRE vazebného místa pro AhR (Sugatani *et al.*, 2005; Pávek *et Dvořák* 2008). Mutace v těchto cílových sekvencích snižují hladinu enzymu v průměru kolem 50%. Zásadní vliv na expresi enzymu mají i mutace v TATA boxu, tedy v místě vazby RNA polymerázy II. Zvyšující se počet dinukleotidových repetitiv (TA) v TATA boxu je přímo úměrný down-regulaci exprese proteinů (Beutler *et al.*, 1998; Bosma *et al.*, 1995).

##### **2.3.4.1 UGT1A1**

Enzym UGT1A1 je snad nejvíce prozkoumaný ze všech UGT. Již je známo více než třicet genetických variant tohoto enzymu. Promotor je cílový pro receptory PXR, CAR, AhR a receptor  $\alpha$  aktivovaný peroxizomovými proliferátory (PPAR $\alpha$ ) (Bock, 2010). Enzym katalyzuje glukuronidaci celé řady exogenních, tak i endogenních substrátů, z nichž je největší pozornost věnována bilirubinu. Mutace v TATA boxu participují s onemocněním jako je Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu nebo invazivní karcinom prsu (Desai *et al.*, 2003). Crigler-Najjarův syndrom je asociován se zvýšeným počtem repetitiv TA. V tomto případě se v TATA boxu vyskytuje sedm repetitiv A(TA)<sub>7</sub>TAA. Tento

genetický polymorfismus vede až k 70% down-regulaci exprimovaných proteinů potřebných k metabolizaci bilirubinu (Beutler *et al.*, 1998; Bosma *et al.*, 1995).

#### **2.3.4.2 UGT1A3**

Pro expresi enzymu je nezbytná vazba aktivovaného receptoru PXR, VDR, CAR, farnesoidního X receptoru (FXR) nebo estrogenního receptoru (ER) (Erichsen *et al.*, 2010). I tento enzym je při snížené aktivitě nebo expresi zodpovědný za hyperbilirubinémii (Iwai *et al.*, 2004). Jedněmi ze substrátů UGT1A3 jsou estrogény. Jejich nedostatečná glukuronidace je asociována s rakovinou prsu nebo dělohy. Existují zmínky o genetických polymorfizmech způsobené substitucemi nukleotidů. Tyto mutace mají za následek kódování odlišných aminokyselin v signálních peptidech. Studie japonské populace odhalila až 30% snížení aktivity enzymů. V jiných případech byla efektivita glukuronidace i 370 % v závislosti na lokalizaci substituce (Iwai *et al.*, 2004).

#### **2.3.4.3 UGT1A4**

Jedná se o enzym, jehož exprese je regulována na transkripční úrovni vazbou receptoru především AhR a ER. Důležitou roli mohou hrát mutace v promotorové oblasti ve vzdálenosti 40-36 bp od start kodonu ATG. Oblast je lokalizována v místě DRE vazebného motivu pro AhR. Tyto polymorfizmy zjištěné přibližně u 8 % populace jsou zodpovědné za snížení exprese enzymu až o 70 %. Down-regulace koreluje s karcinomem plic nebo cholestázou (Chen *et al.*, 2009; Erichsen *et al.*, 2008).

#### **2.3.4.4 UGT1A5**

Ještě donedávna byl tento gen považován jako nefunkční, jelikož nebyl UGT1A5 na úrovni mRNA ani proteinů detekován. Nové studie zaznamenaly výskyt UGT1A5 na úrovni mRNA v případě induktorů 3-metylcholantrenu a rifampicinu. Z toho důvodu lze uvažovat o regulaci receptory AhR a PXR. Nicméně bude třeba dalších studií, aby byl mechanismus regulace plně pochopen (Finel *et al.*, 2005).

#### **2.3.4.5 UGT1A6**

Exprese UGT1A6 je podmíněna přítomností aktivovaných receptorů AhR a PXR (Bock *et al.*, 2005). V bělošské populaci byly identifikovány alely nesoucí mutace na kodonech 181 a 184 v kódující oblasti genu. Tento polymorfismus snižuje efektivitu

glukuronidace některých substrátů UGT1A6. Na druhou stranu tak může být zvýšen účinek některých léčiv jako např. aspirinu. Pozitivní modulace účinku participuje se sníženým rizikem karcinomu tlustého střeva (Bigler *et al.*, 2001; Ciotti *et al.*, 1997).

#### **2.3.4.6 UGT1A7**

Jelikož jsou předními substráty polyaromatické uhlovodíky, tak není divu, že je enzym regulován především AhR (Tukey *et Strassburg*, 2000). Doposud bylo v lidské populaci identifikováno devět alel nesoucích různé mutace v genu *UGT1A7*. Snad nejvyšší riziko představuje tento polymorfismus pro kuřáky. Snížená aktivita enzymu je často spojována s orofaryngeálním karcinomem a karcinomem tlustého střeva (Guillemette, 2003; Strassburg *et al.*, 2002).

#### **2.3.4.7 UGT1A8**

Osekvenováním exonu 1 byly zjištěny substituce v poloze 173 a 277. Substituce v poloze 173 nemá zásadnější vliv na snížení katalytické aktivity enzymu, kdežto substituce v poloze 277 ano. Snížena glukuronidace substrátů je zapříčiněna spíše strukturální změnou enzymu než jeho omezenou expresí. Klinické důsledky jednotlivých variant *UGT1A8* nebyly doposud důkladně monitorovány (Huang *et al.*, 2002).

#### **2.3.4.8 UGT1A9**

Doposud nebyl polymorfismus genu *UGT1A9* charakterizován, přestože to odlišné účinky flavopiridolu naznačují (Innocenti *et al.*, 2000). Promotor genu je cílový pro aktivované receptory AhR a PPAR $\alpha$  (Bock, 2010), nicméně byly popsány i jiné transkripční faktory, které se účastí exprese. V tomto případě se jedná o jaterní nukleární faktor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) a *caudal-related homeobox 2* (Cdx2). Tyto transkripční faktory se účastní exprese i u jiných izoform expimovaných v játrech. V jejich přítomnosti je indukce enzymů až 3x zvýšena (Gregory *et al.*, 2004).

#### **2.3.4.9 UGT1A10**

U tohoto genu byl zjištěn jednonukleotidový polymorfismus na pozici kodonu 139 v kódující oblasti. Jelikož je tato izoforma nezbytná v detoxikaci některých karcinogenů, například obsažených v cigaretovém kouři (benzo[a]pyren), jsou proto jedinci s tímto

polymorfizmem více vystavení riziku orofaryngeálního karcinomu (Dellinger et al., 2006). Dále byla monitorována rozsáhlá delece úseku mezi nukleotidy 191 až 1854 v oblasti promotoru. Provedené testy poukazují až na trojnásobné zvýšení genové exprese v případě delece. Delecí pravděpodobně dochází k odstranění vazebných míst pro represory (Balliet *et al.*, 2010)

### **3. CÍLE PRÁCE**

- 1) Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
- 2) Detekce UGT1A enzymů metodou Western blotting ve střevní línii.
- 3) Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Tab. III: Seznam použitých chemikálií

reagencie	firma	Katalogové číslo
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	ULTRA Scientific	48599
Akrylamid/bis-akrylamid 40 %	Bio Basic	A0007
Bovinní sérový albumin (BSA)	Bio Basic	AD0023
Bradfordovo činidlo	Sigma-Aldrich	B6916
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich	B0126
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich	30970
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner	30016-APO
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	43819
Dodecylsíran sodný (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner	30061-APO
<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i> médium (DMEM)	Sigma-Aldrich	D6546
Fetální bovinní sérum (FBS)	PAA	A15-144
Glycerol	BioBasic	GB0232
Chlorid draselný	Lach-Ner	30383-APO
Chlorid sodný	Lach-Ner	30093-APO
Izopropanol	Lach-Ner	20037-ATO
Kalcitriol	Sigma-Aldrich	D1530
Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin]-ethansulfonová (HEPES)	Sigma-Aldrich	H3375
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich	E6511
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner	10033-A35
Kyselina octová	Lach-Ner	10047-A80
L-glutamin	Sigma-Aldrich	G8540
Marker molekulové hmotnosti	Thermo Scientific	26619
Methanol 99,9 %	Lach-Ner	20038-ATO
Neesenciální aminokyseliny	Sigma-Aldrich	M7145
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio Basic	TB0508
Odblokovací roztok ( <i>Stripping</i> pufř)	Milipore	2504

reagencie	firma	Katalogové Číslo
Oktylfenol etoxylát (Triton X-100)	Serva	37240
Penicilin-streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333
Persulfát amonný (APS)	Sigma-Aldrich	A3678
Polyoxyethylen(20)sorbitan monolaurát (Tween20)	Sigma-Aldrich	P137-9
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504
Protilátka primární: aktin (I-19), koží polyklonální IgG UGT1A (B-4) myší monoklonální IgG CYP24 (C-18) koží polyklonální IgG	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz Biotechnology	sc-1616 sc-271268 sc-32166
Protilátka sekundární: koží proti myší IgG-HRP králičí proti koží IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz Biotechnology	sc-2005 sc-2768
Substrát pro křenovou peroxidázu	Santa Cruz Biotechnology	sc-2048
Sušené mléko 1,3 % Laktino	Promil	————
Tris-glycin pufr 10x	Bio Basic	A0029
Tris-glycin-SDS pufr 10x	Bio Basic	A0031
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Bio Basic	TB0194
Tris pufr 10x (TBS)	Bio Basic	A0025
Trypanová modř	Sigma-Aldrich	T6146
Trypsin-EDTA 0,25%	Sigma-Aldrich	T4049

#### 4.1.2 Roztoky

##### *4x dělicí pufr (pH = 8,8):*

72,6 g Tris  
400 ml deonizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)

##### *10x fosfátový pufr (PBS, pH = 7,4-7,5):*

40 g chlorid sodný  
1 g chlorid draselný  
16,05 g dodekahydrát hydrogen-  
fosforečnanu sodného  
1 g dihydrogenfosforečnan draselný  
500 ml dH<sub>2</sub>O

##### *kultivační médium:*

500 ml DMEM  
5 ml L-glutamin  
5 ml neesenciální aminokyseliny  
5 ml penicilin-streptomycin  
50 ml FBS

**lyzační pufr:**

50 mmol/l HEPES  
5 mmol/l EDTA  
150 mmol/l chlorid sodný  
1% Triton X-100

**2x loading pufr (LB):**

2,5 ml 4x zaostřovací pufr  
4 ml 10% SDS  
2 ml glycerol  
2 mg bromfenolová modř  
0,31 g DTT  
10 ml dH<sub>2</sub>O

**1x migrační pufr:**

100 ml 10x Tris-glycin-SDS pufr  
900 ml dH<sub>2</sub>O

**Ponceau S Rouge:**

0,5 g Ponceau S  
5 ml kyselina octová  
100 ml dH<sub>2</sub>O

**10x TBS (pH = 7,5):**

15,1 g Tris  
58,4 g chlorid sodný  
500ml dH<sub>2</sub>O

**1x TBS/Tween:**

100 ml 10x TBS  
0,5 ml Tween20  
900 ml dH<sub>2</sub>O

**1x transferový pufr:**

100 ml Tris-glycin pufr 10x  
200 ml metanol  
700 ml dH<sub>2</sub>O

**4x zaostřovací pufr (pH = 6,8):**

24 g Tris  
400 ml dH<sub>2</sub>O



### 4.1.3 Laboratorní přístroje

Tab. IV: Seznam použitých laboratorních přístrojů

název a typ přístroje	firma
Analytické váhy ABS 80-4	Kern & Sohn
Centrifuga 5415 R	Eppendorf
Laminární flowbox Bio II Advance	Telstar
Magnetické míchadlo Hei-Mix S	Heidolph
Minicentrifuga Z100 M	Hermle
Inkubátor Mitre 4000 Series	Contherm Scientific
Mikroskop HT-NIB-100	All Pro Corporation
Proudový zdroj CS-500V	Cleaver Scientific
Spektrofotometr Infinite M200	Tecan
Termoblok MD-02N	Major Science
Třepačka Mini Rocket MR-1	Biosan
Vodní lázeň LCB 22D	Labtech
Vortex Reax top	Heidolph
Vyvolávací automat XR 24 PRO	Dürr Dental

### 4.1.4 Biologický materiál

Jako biologický materiál byla použita komerční buněčná linie LS174T, která je odvozena od adenokarcinomu tlustého střeva ženy (58 let). Linie byla použita pro stanovení hladiny proteinů UGT1A. Tyto buňky mají tendenci vytvářet jedno nebo vícevrstevné buněčné kompartmenty. Buňky produkují poměrně značné množství odpadních látek.

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Rozmrazení buněk

Je nutné dodržovat sterilní podmínky při práci ve flowboxu. Používané roztoky, tak i pomůcky musí být rovněž sterilní. Kultivační médium DMEM obohacené o další složky, 1x PBS a trypsin jsou vždy před samotnou prací ohřáty na 37 °C ve vodní lázni.

Pokud byly buňky dlouhodobě skladovány např. v mrazáku (-80 °C) nebo tekutém dusíku, je nezbytné pro další manipulaci jejich rozmrazení. Jestliže došlo k vytažení buněk z dusíku, je nezbytné odvětrání par ve flowboxu. U buněk vytažených z mrazáku tento krok potřebný není. Následně se vložila mikrozkuhavka s buněčnou suspenzí do vodní

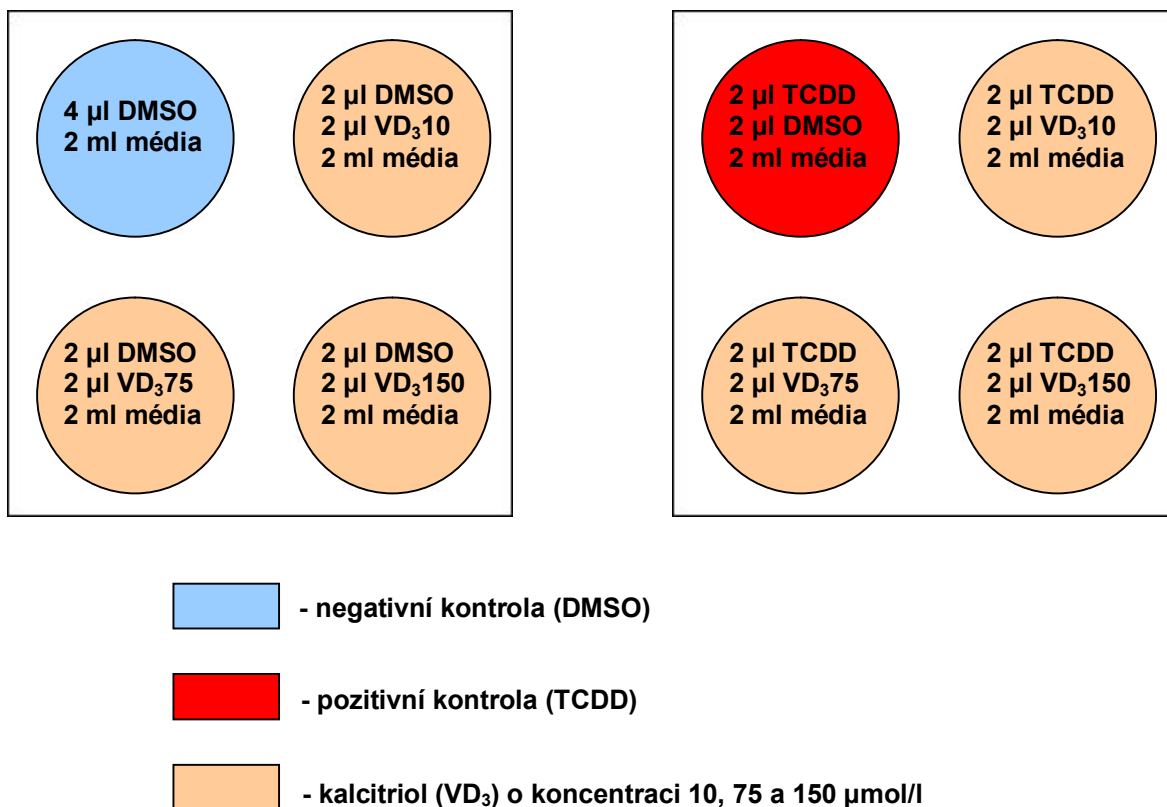
lázně na dobu 2 minut. Do předem připravené malé, sterilní kultivační láhve se 4 ml média byla přepipetována buněčná suspenze spolu s 1 ml média. Kultivační láhev byla přenesena do inkubátoru (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C a 95% vlhkost). Následující den je nezbytná výměna média.

#### **4.2.2 Trypsinizace a počítání buněk**

Tyto kroky vedou k obnovení příliš konfluentní kolonie buněk. Trypsinizaci nebo také pasážování je nezbytné provádět přibližně každé 3 dny. Před započítáním práce ve flowboxu se zkontrolovala morfologie buněk pod mikroskopem. Následně došlo k odsátí kultivačního média. Adherované buňky na dně kultivační láhve byly promyty 1x PBS (37 °C) za opětovného odsátí. K rozrušení adherentních vztahů mezi buňkami a dnem láhve se přidal 1ml trypsinu. Po 3 minutové inkubaci (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C a 95% vlhkost) se přidal 9 ml média, čímž došlo k neutralizaci trypsinu. Shluky buněk se resuspendovaly opětovným nasáváním pomocí pipetovacího sérologického nástavce. Z takto připravené suspenze bylo přeneseno 10 µl do 0,5 ml mikrozkušavky a poté se přidal 90 µl trypanové modři. Cca 10 µl bylo přepipetováno do Bürkerovy komůrky a překryto podložním sklíčkem. Buňky se počítaly v nejméně deseti velkých čtvercích. Výsledné množství buněk v 1 ml bylo získáno vydělením součtu buněk počtem sledovaných čtverců za následného vynásobení 10<sup>5</sup>. Poté se provedlo ředění tak, aby bylo v kultivační láhvi přítomno 3-5 milionů buněk ve 25 ml média. Pro výsev buněk do kultivačních desek je postup velice podobný s tím rozdílem, že je potřebné, aby došlo ke kultivaci 1 milionu buněk spolu se 2 ml média na 1 jamku kultivační desky. Kultivační desky za těchto kultivačních podmínek byly umístěny na 12 hodin do inkubátoru, čímž byly vytvořeny adherentní vztahy mezi buňkami a dnem kultivační desky.

#### **4.2.3 Inkubace buněk s kalcitriolem**

Buněčná kultura byla promyta 1x PBS (37 °C), který se následně odsál. Poté byla ošetřena 2 ml média spolu s 2 µl kalcitriolu o koncentraci 10, 75 nebo 150 µmol/l. Tímto krokem se kalcitriol zředil na výslednou koncentraci 10, 75 nebo 150 nmol/l. Testované koncentrace byly zvoleny tak, aby reprezentovaly různé hladiny suplementace aktivním vitamínem D u různých jedinců (Lips, 2010; Vieth, 2009). Rovněž byly buňky ošetřeny 0,1% DMSO. Ten byl použit jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky ošetřené médiem obsahujícím TCDD o koncentraci 5 nmol/l (Obr. 13). Takto ošetřené kultury byly inkubovány 24 a 48 hodin pro izolaci proteinů.



**Obr. 13: Pipetovací schéma 4-jamkové kultivační desky**

#### 4.2.4 Izolace proteinů

Od této fáze již není nutno pracovat ve sterilních podmínkách laminárního flowboxu. Po 24 a 48 hodinové kultivaci buněk došlo k odstranění média. Buněčná kultura byla promyta ledově chladným 1x PBS za následného odsátí. Poté byl přidán 1 ml 1x PBS do každé jamky kultivační desky. Buněčná suspenze spolu s 1x PBS byla seškrábána a přenesena do 1,5 ml mikrozkušavek. Ty byly centrifugovány (4000 rpm, 2 min, 4 °C). Další úkony je třeba provádět výhradně na ledu. Supernatant byl opatrně odsát. Po tomto kroku je možné mikrozkušavky s peletem zamrazit (-80 °C). K peletu se přidalo 150 µl lyzačního pufru. Celý obsah mikrozkušavky byl zhomogenizován propipetováním. Následně došlo k vortexování po dobu 10 minut a centrifugaci (13000 rpm, 13 min, 4 °C). Stanovení koncentrace proteinů v supernatantu bylo provedeno metodou Bradfordové. Na základě hodnot získaných ze spektrofotometru byly vzorky proteinů naředěny dH<sub>2</sub>O spolu s 20 µl 2x LB tak, aby bylo ve všech mikrozkušavkách konstantní množství proteinů, tedy 10 µg pro vzorky UGT1A a 25 µg pro vzorky CYP24A1. Nově naředěné vzorky byly vortexovány, centrifugovány a na závěr inkubovány v termobloku (5 min, 95 °C).

#### 4.2.5 Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Nejdříve byl připraven gel pro SDS-PAGE smícháním jednotlivých reagensů (Tab. V). TEMED a APS je přidán až na závěr, aby nedošlo k předčasnému zesíťování gelu. Po nalití dělicího gelu mezi speciální skla bylo sníženo povrchového napětí gelu přidávkou 500  $\mu$ l izopropanolu. Tímto krokem se docílilo rovnoměrného povrchu a odstranění bublin z gelu. Po zaschnutí gelu je nutné izopropanol důkladně vymýt dH<sub>2</sub>O. Následně byl nalit i zaostřovací gel. Na závěr došlo ke vložení hřebínku do aparatury.

**Tab. V: Reagencie pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu**

reagencie	dělicí gel	zaostřovací gel
	množství pro dva gely	
dělicí/zaostřovací pufr	4 ml	1,5 ml
akrylamid	3,2 ml	0,6 ml
dH <sub>2</sub> O	8,6 ml	3,84 ml
10% SDS	160 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	16 $\mu$ l	6 $\mu$ l
10% APS	160 $\mu$ l	45 $\mu$ l

Připravené gely byly přeneseny do elektroforetické aparatury za následného zalití migračním pufrům. V dalším kroku došlo k napipetování 2  $\mu$ l markru pro odečtení molekulové hmotnosti separovaných proteinů do jamky v zaostřovacím gelu. Do dalších jamek se napipetovaly vzorky s vyzolovanými proteiny o celkovém objemu 40  $\mu$ l. Poté byla elektroforetická aparatura zapojena do elektrického pole. Separace probíhala zprvu při proudu 15 mA/gel do té doby, než se zakoncentrovaly proteiny na rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. Poté došlo k přenastavení aparatury na 30 mA/gel. Proteiny se separovaly dalších 70 minut.

#### 4.2.6 Western blotting

Nejdříve došlo k hydrataci membrány z polyvinylidendifluoridu (PVDF) v methanolu po dobu 1 minuty a dalších 10 minut v dH<sub>2</sub>O. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty. Z nich bylo třeba odstranit zaostřovací gel. Dělicí gel byl vložen do tzv. sendviče v blotovací aparatuře. Tento sendvič sestával z několika vrstev filtračních papírů, dělicího gelu a PVDF membrány. Po zhotovení sendviče byly všechny jeho vrstvy

navlhčeny transferovým pufrém. Po přiklopení víka se aparatura zapojila do elektrického pole s přednastaveným proudem 400 mA. Následný transfer proteinů k anodě probíhal 75 minut. Po uplynuté době byla PVDF membrána 3x promyta v dH<sub>2</sub>O. Pro kontrolu, zda došlo k úspěšnému transferu proteinů, byla membrána reverzibilně obarvena v roztoku Ponceau S Rouge. Následně se membrána opětovně 3x promyla v dH<sub>2</sub>O a vysušila na filtračním papíře. Z PVDF membrány byla vyříznuta oblast odpovídající proteinům o molekulové hmotnosti 35-75 kDa. Podle potřeby je možno PVDF membránu zatavit do fólie.

#### 4.2.7 Imunodetekce

Nejdříve bylo nutno PVDF membránu rehydratovat v methanolu po dobu 20 sekund. Následně byla membrána blokována 5% roztokem sušeného mléka a 1x TBS/Tween za současné inkubace na třepačce po 80 minut. Poté došlo k zatavení membrány do fólie spolu s 5% roztokem BSA, 1x TBS/Tween a primární protilátkou proti UGT1A (Tab. VI). Následná inkubace na třepačce trvala 90 minut. Po uplynuté době byla membrána promyta v dH<sub>2</sub>O 3x po 5 minutách. V dalším kroku došlo k vystavení membrány sekundární protilátce s křenovou peroxidázou (Tab. VI) obsažené v roztoku 2,5% sušeného mléka spolu s 1x TBS/Tween. Inkubace na třepačce probíhala po dobu 45 minut. Poté došlo k opětovnému promytí 3x 5 minut, nyní v 1x TBS/Tween. Membrána byla překryta 500 µl substrátu křenové peroxidázy. Po 2 minutové expozici byl přebytečný substrát odstraněn za následného vložení membrány do vyvolávací kazety. Signál byl detekován fotografickou fólií a vyvolán pomocí automatu v temné místnosti. Pro verifikaci experimentu je doporučeno provést také detekci aktinu (Tab. VI), čímž se zjistí, zda bylo ve všech vzorcích stejné množství proteinů. Před další imunodetekcí byla membrána odblokována *stripping* pufrém. Imunodetekce byla rovněž provedena s protilátkou proti CYP24A1 (Tab. VI).

**Tab. VI: Ředící poměr protilátek proti jednotlivým proteinům**

detekované proteiny	primární protilátka	sekundární protilátka
	ředící poměr	
aktin	1:1000	1:5000
CYP24A1	1:500	1:2000
UGT1A	1:750	1:2000

## 5. VÝSLEDKY

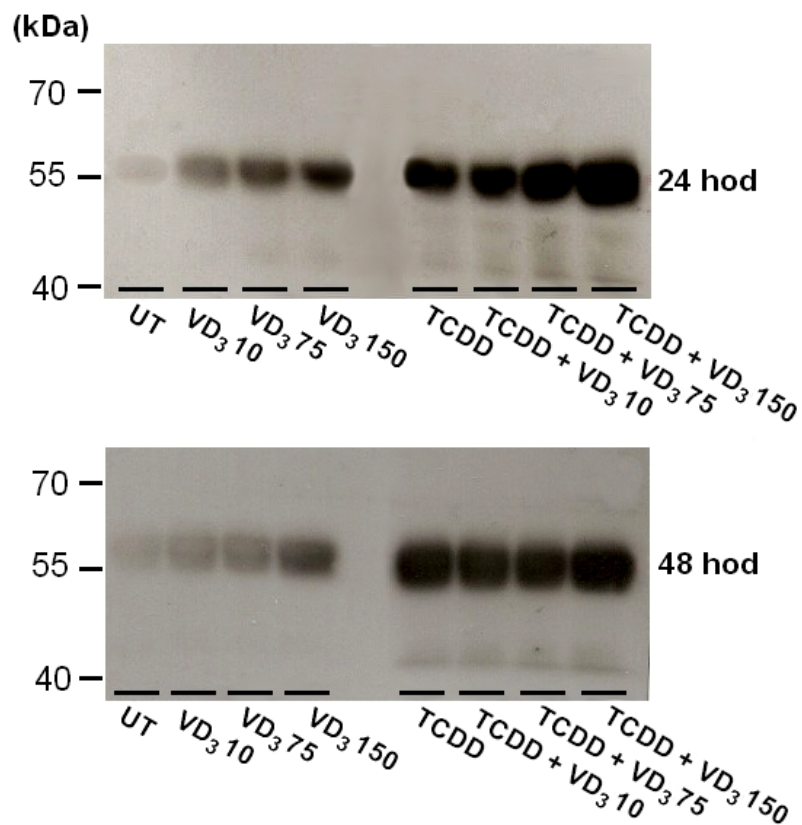
### 5.1 Vliv kalcitriolu na expresi enzymů UGT1A

Buněčná linie LS174T odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva byla ošetřena přídatkem kalcitriolu o koncentracích 10, 75 a 150 nmo/l. Jako pozitivní kontrola byl zvolen modelový induktor dioxin (TCDD) o koncentraci 5 nmol/l. Změna hladiny proteinů byla pozorována oproti negativní kontrole 0,1% DMSO, v níž byl kalcitriol rozpuštěn. Následně byly buňky inkubovány 24 a 48 hod. Byl sledován účinek na úrovni proteinů po expresi cílových genů UGT1A. Výsledné množství exprimovaných proteinů je tedy společné následujícím genům: *UGT1A1*, *1A3*, *1A4*, *1A5*, *1A6*, *1A7*, *1A8*, *1A9* a *1A10*. Experiment byl proveden ve třech na sobě nezávislých opakováních. Bylo provedeno ověření konstantního množství proteinů ve všech vzorcích imunodetekcí aktinu. Jelikož nebyly výsledky příliš konzistentní, z toho důvodu bude na každý experiment pohlíženo samostatně.

U experimentu č. 1 (Obr. 14) pozitivní kontrola indukovala UGT1A enzymy podle očekávání. Byla zaznamenána zvýšená hladina UGT1A u vzorků s rostoucí koncentrací kalcitriolu. Podobný trend byl zachován i u buněk inkubovaných s kalcitriolem a induktorem TCDD za 24 hodin. U buněk inkubovaných 48 hodin byla korelace mezi koncentrací kalcitriolu a nárůstem hladiny proteinů rovněž zachována. Tento jev není příliš patrný u buněk ošetřených kalcitriolem v kombinaci s TCDD. Zdá se, že vliv na zvýšenou hladinu enzymů má přídatěk samotného kalcitriolu, avšak v kombinaci s induktorem je indukce více patrná.

Zvýšená indukce u experimentu č. 2 (Obr. 15) je také zřejmá, ale méně výrazná než u 1. experimentu. Zvyšující se koncentrace kalcitriolu měla vliv na indukci UGT1A proteinů jen u vzorků inkubovaných 24 hodin bez přidání induktoru. V ostatních případech nemá vliv na indukci enzymů přídatěk samotného kalcitriolu a to ani v kombinaci s TCDD.

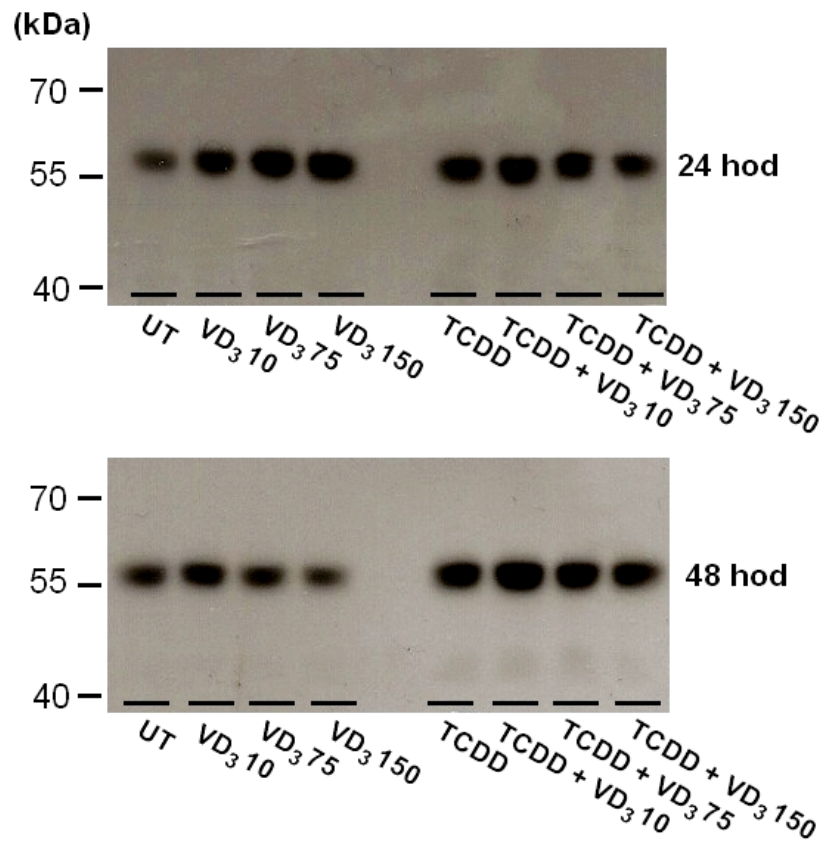
Výsledky experimentu č. 3 (Obr. 16) ukazují, že přídatěk kalcitriolu neměl zásadnější vliv na zvýšení hladiny proteinů u buněk inkubovaných 24 nebo 48 hodin. Nicméně i zde byl TCDD slabým induktorem.



**Obr. 14: Experiment č. 1 (expoziční buněk po 5. pasáži)**

**Expres proteinů UGT1A po 24 a 48 hodinové inkubaci**

Horní western blot analýza reprezentuje expresi proteinů po 24 hodinové inkubaci. Zleva do prava UT - negativní kontrola (z anglického *untreated*), VD<sub>3</sub> 10, 75 a 150 - kalcitriol o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l, TCDD - kultivace s TCDD, TCDD + VD<sub>3</sub> 10, 75, 150 - expoziční TCDD a kalcitriolu o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l. Analogicky byly označeny vzorky inkubované 48 hodin.

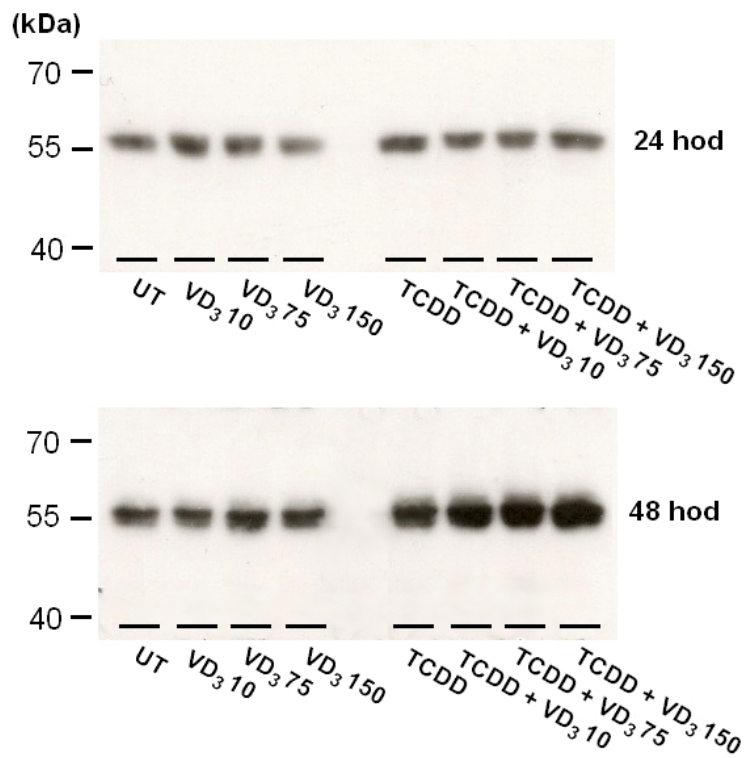


**Obr. 15: Experiment č. 2 (expoziční buněk po 6. pasáži)**

**Expresie proteinů UGT1A po 24 a 48 hodinové inkubaci**

Horní western blot analýza reprezentuje expresi proteinů po 24 hodinové inkubaci. Zleva do prava UT - negativní kontrola (z anglického *untreated*), VD<sub>3</sub> 10, 75 a 150 - kalcitriol o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l, TCDD - kultivace s TCDD, TCDD + VD<sub>3</sub> 10, 75, 150 - expoziční TCDD a kalcitriolu o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l. Analogicky byly označeny vzorky inkubované 48 hodin.





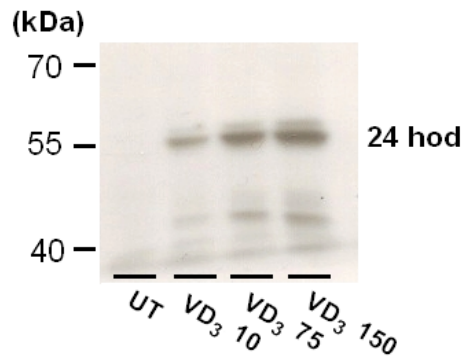
**Obr. 16: Experiment č. 3 (expoziční buněk po 7. pasáži)**

**Expres proteinů UGT1A po 24 a 48 hodinové inkubaci**

Horní western blot analýza reprezentuje expresi proteinů po 24 hodinové inkubaci. Zleva do prava UT - negativní kontrola (z anglického *untreated*), VD<sub>3</sub> 10, 75 a 150 - kalcitriol o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l, TCDD - kultivace s TCDD, TCDD + VD<sub>3</sub> 10, 75, 150 - expoziční TCDD a kalcitriolu o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l. Analogicky byly označeny vzorky inkubované 48 hodin.

## 5.2 Vliv kalcitriolu na expresi enzymu CYP24A1

Jelikož je enzym CYP24A1 silně inducibilní kalcitriolem, byl proto použit pro verifikaci funkčnosti VDR. Zvyšující se hladina proteinů CYP24A1 o velikosti 55 kDa v závislosti na koncentraci kalcitriolu prokazuje funkčnost VDR (Obr. 17).



**Obr. 17: Verifikace funkčnosti VDR**

Western blot analýza reprezentuje expresi proteinů CYP24A1 po 24 hodinové inkubaci. Zleva do prava UT - negativní kontrola (z anglického *untreated*), VD<sub>3</sub> 10, 75 a 150 – expozice kalcitriolu o koncentracích 10, 75 a 150 nmol/l.

## 6. DISKUZE

V praktické části bakalářské práce byl sledován vliv kalcitriolu na hladinu biotransformačních enzymů UGT1A. K objasnění interakcí byla použita komerční buněčná linie LS174T odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva. K této volbě došlo na základě snahy sledovat vliv VDR na indukci UGT1A enzymů. Jejich geny jsou známy jako cílové pro AhR, avšak stále není známo, zda existuje nějaké kooperativní chování mezi AhR a VDR. Indukce proteinů byla zkoumána ve dvou časech. Tento strategický krok byl učiněn na základě předešlých studií. Existují zmínky o nízké indukci enzymů UGT2A13 v buňkách izolovaných z králíčích jater po 24 hodinové inkubaci s 4-hydroxybifenylem, ačkoliv maximální hladiny bylo dosaženo až po 48 hodinách (Nguyen *et Tukey*, 1997). Maximální indukci enzymů bylo rovněž možné očekávat i po delší inkubaci. U experimentů provedených na buněčné linii Caco-2 odvozené od lidského adenokarcinomu tlustého střeva byla sledována hladina mRNA UGT1A během 24-72 hodin. Nicméně ke zvýšení katalytické aktivity enzymů došlo až po 96 hodinové inkubaci (Münzel *et al.*, 1999).

Normálně je hladina vitamínu D definována koncentrací kalcidiolu. Jelikož však samotné buňky nejsou schopny metabolizovat kalcidiol na aktivní formu, byly proto ošetřeny přídatkem kalcitriolu. Testované koncentrace byly zvoleny tak, aby reprezentovaly suplementaci vitamínem D u různých jedinců. Koncentrace 75 nmol/l odpovídá hladině průměrného člověka. Koncentrace 10 nmol/l simuluje stav jedince s avitaminózou. Suprafyziologické hodnoty vitamínu D o koncentraci 150 nmol/l byly zjištěny u jedinců s častou expozicí slunečnímu záření (Lips, 2010; Vieth, 2009). Poté co je kalcidiol metabolizován na aktivní kalcitriol, dochází k indukci enzymu CYP24A1. Tyto enzymy katalyzují inaktivaci kalcitriolu, což ve výsledku vede ke snížení jeho množství. Z toho důvodu byly koncentrace použity i během experimentů za předpokladu, že budou dostatečné pro simulaci fyziologických hodnot.

Výsledky všech tří experimentů vykazují do jisté míry podobný trend v tom ohledu, že enzymy UGT1A byly inducibilní po ošetření TCDD. Z výsledků experimentu č. 1 lze soudit, že vliv na zvýšenou expresi enzymů má přídatek samotného kalcitriolu, avšak v kombinaci s induktorem je indukce více patrná. Podobný jev byl pozorován i u dřívější studie, kdy byla sledována exprese CYP1A1 na buněčných liniích odvozených od monocytů a makrofágů po přídatku kalcitriolu. Tyto linie byly ošetřeny přídatkem

kalcitriolu, tak i benzo[a] pyrenu a inkubovány 24 hodin. V případě samotného kalcitriolu nebyla zaznamenána zvýšená indukce. Nicméně kombinace obou ligandů způsobila vyšší indukci než v případě samotného benzo[a]pyrenu. V tomto případě byla odhalena nescifická vazba heterodimeru VDR-RXR do ER8 v *CYP1A1* promotoru, který je považován jako cílový pro AhR. Zde byla zvýšená exprese *CYP1A1* vysvětlena nepřímou interakcí AhR s VDR za účasti koregulačních proteinů (Matsunawa *et al.*, 2012). Jelikož oba experimenty vykazují vysoké známky similarity, proto je důvodné se domnívat, že došlo k podobným interakcím i u experimentu č. 1. U vzorků inkubovaných 48 hodin a ošetřených přídatkem kalcitriolu i TCDD není zvýšená exprese oproti kontrole patrná. Pravděpodobně jsou zde limitní faktory, které po dosažení maxima další expresi už neumožňují.

Byla zaznamenána snižující se indukovatelnost v závislosti na stáří buněčné linie. U experimentu č. 1 (expozice po 5. pasáži) byla pozorována signifikantní indukce v porovnání s kontrolou. Experiment č. 2 (expozice po 6. pasáži) vykazoval podobný jev, ovšem ne s tak výraznou indukcí. V případě experimentu č. 3 (expozice po 7. pasáži) byl indukční účinek kalcitriolu i TCDD nejmenší v porovnání s ostatními experimenty. Snižující se sensitivita buněčné linie na přídatvek kalcitriolu může korelovat s její nestabilitou. Už dříve byla pozorována diferenciací buněčné linie LS174T. Tento fakt byl podložen zvýšeným procentem posunových mutací v pozdějších stádiích (Yashiro *et al.*, 2010). Pro verifikaci hypotézy by bylo zapotřebí dalšího zopakování testů, aby ji bylo možno statisticky potvrdit či vyvrátit. Pokud by se tato hypotéza ukázala jako validní, nebylo by dále vhodné buněčnou linii LS174T při těchto studiích používat.

## 7. ZÁVĚR

V této studii byl zkoumán vliv aktivace VDR na expresi biotransformačních enzymů UGT1A metodou Western blotting. Tato podrodina zahrnuje enzymy UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 a 1A10. Výsledné množství detekovaných proteinů tedy odpovídá společné expresi těchto genů. Pro objasnění interakcí byla buněčné linie LS174T odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva ošetřena přídatkem kalcitriolu. Výsledná exprese byla porovnávána s modelovým induktorem TCDD a negativní kontrolou 0,1% DMSO. Takto ošetřené buňky byly inkubovány 24 a 48 hodin.

Byly provedeny tři na sobě nezávislé experimenty s nepříliš konzistentními výsledky. Všechny experimenty vykazovaly inducibilitu enzymů po přídatku TCDD. V raných stádiích buněčné linie byla sledována zvýšená hladina enzymů. Enzymy byly inducibilní samotným kalcitriolem, avšak v kombinaci s induktorem byla indukce více patrná. Výsledná exprese byla přímo úměrná koncentraci kalcitriolu. Po 48 hodinové kultivaci buněk ošetřených kalcitriolem i TCDD nebyla zvýšená exprese oproti kontrole patrná. Tato fakta se stávala méně validní u experimentů prováděných se staršími buněčnými liniemi. S vyšším číslem pasáže buněčné linie LS174T rostla její nestabilita, což mělo za následek sníženou sensitivitu vůči kalcitriolu. Z důvodu obtížnosti reprodukovat konzistentní výsledky byla buněčná linie LS174T shledána nevhodnou pro studium vlivu VDR na indukci UGT1A enzymů.

## **8. LITERATURA**

### **8.1 Vědecké publikace**

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Yoshida, T., Maitani, T. (2003): Screening of the inhibitory effect of vegetable constituents on the aryl hydrocarbon receptor-mediated activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26(12): 1754 - 1760.

Avila, E., Díaz, L., Barrera, D., Halhali, A., Méndez, I., González, L., Zuegel, U., Steinmeyer, A., Larrea, F. (2007): Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103(1): 90 - 96.

Balliet, R. M., Chen, G., Dellinger, R. W., Lazarus, P. (2010): UDP-glucuronosyltransferase 1A10: activity against the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, and a potential role for a novel UGT1A10 promoter deletion polymorphism in cancer susceptibility. *Drug Metabolism and Disposition* 38(3): 484 - 490.

Bannister, A. J., Kouzarides, T. (2005): Reversing histone methylation. *Nature* 436(7054): 1103 - 1106.

Barbier, O., Bélanger, A. (2008): Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferases in the human prostate. *Best Practise and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism* 22(2): 259 - 270.

Barwick, J. L., Quattrochi, L. C., Mills, A. S., Potenza, C., Tukey, R. H., Guzelian, P. S. (1996): Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes. *Molecular Pharmacology* 50(1): 10 - 16.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67(3): 607 - 13.

Beutler, E., Gelbart, T., Demina, A. (1998): Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95(4): 8170 - 8174.

Bigler, J., Whitton, J., Lampe, J. W., Fosdick, L., Bostick, R. M., Potter, J. D. (2001): CYP2C9 and UGT1A6 genotypes modulate the protective effect of aspirin on colon adenoma risk. *Cancer Research* 61(9): 3566 - 3569.

Bock, K. W. (2010): Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochemical Pharmacology* 80(6): 771 - 777.

Bock, K. W., Köhle, C. (2005): UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods in Enzymology* 400: 57 - 75.

Bosma, P. J., Chowdhury, J. R., Bakker, C., Gantla, S., de Boer, A., Oostra, B. A., Lindhout, D., Tytgat, G. N., Jansen, P. L., Oude Elferink, R. P., Chowdhury N. R. (1995): The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *The New England Journal of Medicine* 333(18): 1171 - 1175.

Bossuyt, X., Blanckaert, N. (1996): Uridine diphosphoxylose enhances hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity by stimulating transport of UDP-glucuronic acid across the endoplasmic reticulum membrane. *The Biochemical Journal* 315(1): 189 - 193.

Brown, J., Ignatius, A., Amling, M., Barvencik, F. (2012): New perspectives on vitamin D sources in Germany based on a novel mathematical bottom-up model of 25(OH)D serum concentrations. *European Journal of Nutrition*. doi: 10.1007/s00394-012-0477-3.

Burchell, B., Coughtrie, M. W. (1989): UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacology and Therapeutics* 43(2): 261 - 289.

Carlberg, C. (1995): Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D3. Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling. *European Journal of Biochemistry* 231(3): 517 - 527.

Chen, H., Yang, K., Choi, S., Fischer, J. H., Jeong, H. (2009): Up-regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 by 17beta-estradiol: a potential mechanism of increased lamotrigine elimination in pregnancy. *Drug Metabolism and Disposition* 37(9): 1841 - 1847.

Chiang, J. Y. (2003): Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *American Journal of Physiology* 284(3): G349 - 356.

Ciotti, M., Marrone, A., Potter, C., Owens, I. S. (1997): Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP-glucuronosyltransferase: pharmacological implications. *Pharmacogenetics* 7(6): 485 - 495.

Court, M. H., Greenblatt, D. J. (2000): Molecular genetic basis for deficient acetaminophen glucuronidation by cats: UGT1A6 is a pseudogene, and evidence for reduced diversity of expressed hepatic UGT1A isoforms. *Pharmacogenetics* 10(4): 355 - 369.

Deeb, K. K., Trump, D. L., Johnson, C. S. (2007): Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 7(9): 684 - 700.

Dellinger, R. W., Fang, J. L., Chen, G., Weinberg, R., Lazarus, P. (2006): Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 (UGT1A10) in the detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: decreased glucuronidative activity of the UGT1A10139Lys isoform. *Drug Metabolism and Disposition* 34(6): 943 - 949.



- Denison, M. S, Nagy, S. R. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43: 309 - 334.
- Desai, A. A., Innocenti, F., Ratain, M. J. (2003): UGT pharmacogenomics: implications for cancer risk and cancer therapeutics. *Pharmacogenetics* 13(8): 517 - 523.
- Ditrich, C., Kaina, B. (2010): The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* 31(8): 1319 - 1328.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* 277(28): 25125 - 25132.
- Dusso, A. S., Brown, A. J., Slatopolsky, E. (2005): Vitamin D. *American Journal of Physiology* 289(1): F8 - 28.
- Dzięgiel, P., Owczarek, T., Plazuk, E., Gomułkiewicz, A., Majchrzak, M., Podhorska-Okołów, M., Driouch, K., Lidereau, R., Ugorski, M. (2010): Ceramide galactosyltransferase (UGT8) is a molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastases. *British Journal of Cancer* 103(4): 524 - 531.
- Erichsen, T. J., Aehlen, A., Ehmer, U., Kalthoff, S., Manns, M. P., Strassburg, C. P. (2010): Regulation of the human bile acid UDP-glucuronosyltransferase 1A3 by the farnesoid X receptor and bile acids. *Journal of Hepatology* 52(4): 570 - 578.
- Erichsen, T. J., Ehmer, U., Kalthoff, S., Lankisch, T. O., Müller, T. M., Munzel, P. A., Manns, M. P., Strassburg, C. P. (2008): Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230(2): 252 - 260.

Eswaramoorthy, S., Bonanno, J. B., Burley, S. K., Swaminathan, S. (2006): Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103(26): 9832 - 9837.

Finel, M., Li, X., Gardner-Stephen, D., Bratton, S., Mackenzie, P. I., Radominska-Pandya, A. (2005): Human UDP-glucuronosyltransferase 1A5: identification, expression, and activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315(3): 1143 - 1149.

Guengerich, F. P. (1999): Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 1 - 17.

Guillemette, C. (2003): Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *The Pharmacogenomics Journal* 3(3): 136 - 158.

Goodwin, B., Moore, J. T. (2004): CAR: detailing new models. *Trends in Pharmacological Sciences* 25(8): 437 - 441.

Gregory, P. A., Lewinsky, R. H., Gardner-Stephen, D. A., Mackenzie, P. I. (2004): Coordinate regulation of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A8, 1A9, and 1A10 genes by hepatocyte nuclear factor 1alpha and the caudal-related homeodomain protein 2. *Molecular Pharmacology* 65(4): 953 - 963.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., Laudet, V. (2004): Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Review Drug Discovery* 3(11): 950 - 964.

Han, S., Chiang, J. Y. (2009): Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 37(3): 469 - 478.

Hausler, M. R., Whitfield, G. K., Hausler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick S. H., Dominguez, C. E., Jurutka, P. W. (1998): The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research* 13(3): 325 - 349.

- Huang, Y. H., Galijatovic, A., Nguyen, N., Geske, D., Beaton, D., Green, J., Green, M., Peters, W. H., Tukey, R. H. (2002): Identification and functional characterization of UDP-glucuronosyltransferases UGT1A8\*1, UGT1A8\*2 and UGT1A8\*3. *Pharmacogenetics* 12(4): 287 - 297.
- Imai, J., Yamazoe, Y., Yoshinari, K., (2004): Novel cell-based reporter assay system using epitope-tagged protein for the identification of agonistic ligands of constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* doi: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-112.
- Innocenti, F., Stadler, W. M., Iyer, L., Ramírez, J., Vokes, E. E., Ratain, M. J. (2000): Flavopiridol metabolism in cancer patients is associated with the occurrence of diarrhea. *Clinical Cancer Research* 6(9): 3400 - 3405.
- Iwai, M., Maruo, Y., Ito, M., Yamamoto, K., Sato, H., Takeuchi, Y. (2004): Six novel UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity. *Journal of Human Genetics* 49(3): 123 - 128.
- Jakoby, W. B., Ziegler, D. M. (1990): The enzymes of detoxication. *The Journal of Biological Chemistry* 265(34): 20715 - 20718.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., Chapman-Smith, A. (2004): The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(2): 189 - 204.
- Kiang, T. K., Ensom, M. H., Chang, T. K. (2005): UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacology and Therapeutics* 106(1): 97 - 132.
- King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., Tephly, T. R. (2000): UDP-glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism* 1(2): 143 - 161.
- Klingenberg, M.(1958): Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75(2): 376-386.

Kubodera, N. (2010): Pharmaceutical studies on vitamin D derivatives and practical syntheses of six commercially available vitamin D derivatives that contribute to current clinical practice. *Heterocycles* 80: 83 - 98.

Lechner, D., Kállay, E., Cross, H. S. (2007): 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 263(1-2): 55 - 64.

Lips, P. (2010): Worldwide status of vitamin D nutrition. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121(1-2): 297 - 300.

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. *Pharmacogenetics and Genomics* 15(10): 677 - 685.

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(4): 255 - 269.

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(5571): 1313 - 1316.

Marcus, J., Popko, B. (2002): Galactolipids are molecular determinants of myelin development and axo-glial organization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573(3): 406 - 413.

Matsunawa, M., Akagi, D., Uno, S., Endo-Umeda, K., Yamada, S., Ikeda, K., Makishima, M. (2012): Vitamin D receptor activation enhances benzo[a]pyrene metabolism

via CYP1A1 expression in macrophages. *Drug Metabolism and Disposition* 40(11): 2059 - 2066.

McLaughlin, L., Burchell, B., Pritchard, M., Wolf, C. R., Friedberg, T. (1999): Treatment of mammalian cells with the endoplasmic reticulum-proliferator compactin strongly induces recombinant and endogenous xenobiotic metabolizing enzymes and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in vitro. *Journal of Cell Science* 112(4): 515 - 523.

Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1999): Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes and Development* 13(1): 20 - 25.

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 Metabolism and Disposition* 27(5): 569 - 73.

Nagar, S., Remmel, R. P. (2006): Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25(11): 1659 - 1672.

Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., Ishikawa, T. (2006): Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21(6): 437 - 457.

Nguyen, N., Tukey, R. H. (1997): Baculovirus-directed expression of rabbit UDP-glucuronosyltransferases in *Spodoptera frugiperda* cells. *Drug Metabolism and Disposition* 25(6): 745 - 749.

Omicinski, C. J., Vanden Heuvel, J. P., Perdew, G. H., Peters, J. M. (2011): Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological Science* 120(1): 49 - 75.

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. *The Journal of Clinical Investigation* 115(1): 177 - 186.

Pávek, P., Červený, L., Mičuda, S., Štand, F., Novotná-Čečková, M., Fendrich Z. (2005): Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* 15(4-5): 406 - 409.

Pávek, P., Dvořák, Z. (2008): Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 9(2): 129 - 143.

Pospěchová, K., Rozehnal, V., Stejskalová, L., Vrzal, R., Pospíšilová, N., Jamborová, G., May, K., Siegmund, W., Dvořák, Z., Nachtigal, P., Semecký, V., Pávek, P. (2009): Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299(2): 178 - 187.

Powers, H. J. (2003): Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77(6): 1352 - 1360.

Rachez, C., Freedman, L. P. (2000): Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* 246(1-2): 9 - 21.

Radomska-Pandya, A., Czernik, P. J., Little, J. M., Battaglia, E., Mackenzie, P. I. (1999): Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism Reviews* 31(4): 817 - 899.

Ritter, J. K., Yeatman, M. T., Ferreira, P., Owens, I. S. (1992): Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. *The Journal of Clinical Investigation* 90(1): 150 - 155.

Schinkel, A. H., Jonker, J. W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(1): 3 - 29.

Schlaich, N. L. (2007): Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends in Plant Science* 12(9): 412 - 418.

Schuetz E. G. (2004): Lessons from the CYP3A4 Promoter. *Molecular Pharmacology* 65(2): 279 - 281.

Skálová, L., Boušová, I., Machala, M., Pávek, P., Podlipná, R., Souček, P., Szotáková, B., Vondráček, J., Wsól, V., *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2011.-162 s. 978-80-246-1917-0.

Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P., Tervaert, J. W., Hupperts, R. (2009a): Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 207(1-2): 117 - 121.

Smolders, J., Peelen, E., Thewissen, M., Menheere, P., Tervaert, J. W., Hupperts, R., Damoiseaux, J. (2009b): The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 8(7): 621 - 626.

Steddon, S. J., Schroeder, N. J., Cunningham, J. (2001): Vitamin D analogues: how do they differ and what is their clinical role? *Nephrology Dialysis, Transplantation* 16(10): 1965-1967.

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

Strassburg, C. P., Oldhafer, K., Manns, M. P., Tukey, R. H. (1997): Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Molecular Pharmacology* 52(2): 212 - 220.

Strassburg, C. P., Vogel, A., Kneip, S., Tukey, R. H., Manns, M. P. (2002): Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* 50(6): 851 - 856.

Sugatani, J., Nishitani, S., Yamakawa, K., Yoshinari, K., Sueyoshi, T., Negishi, M., Miwa, M. (2005): Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Molecular Pharmacology* 67(3): 845 - 855.

Thummel, K. E., Brimer, C., Yasuda, K., Thottassery, J., Senn, T., Lin, Y., Ishizuka, H., Kharasch, E., Schuetz, J., Schuetz, E. (2001): Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3. *Molecular Pharmacology* 60(6): 1399 - 1406.

Tirona, R. G., Kim, R. B. (2005): Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(6): 1169 - 1186.

Tukey, R. H., Strassburg, C. P. (2000): Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40: 581-616.

Vieth, R. (2009): Vitamin D and cancer mini-symposium: the risk of additional vitamin D. *Annals of Epidemiology* 19(7): 441 - 445.

Vrzal, R., Ulrichová, J., Dvořák, Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers* 148(1): 3 - 10.

Wooster, R., Ebner, T., Sutherland, L., Clarke, D., Burchell, B. (1993): Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology* 82(1-3): 119 - 129.



Wu, S., Sun, J. (2011): Vitamin D, vitamin D receptor, and macroautophagy in inflammation and infection. *Discovery Medicine* 11(59): 325 - 335.

Yashiro, M., Hirakawa, K., Boland, C. R. (2010): Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC cancer* doi: 10.1186/1471-2407-10-303.

Yoshimoto, N., Sakamaki, Y., Haeta, M., Kato, A., Inaba, Y., Itoh, T., Nakabayashi, M., Ito, N., Yamamoto, K. (2012): Butyl pocket formation in the vitamin D receptor strongly affects the agonistic or antagonistic behavior of ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* 55(9): 4373 - 4381.

Zhang, J., Juany, W., Qatanani, M., Evans, R. M., Moore, D. D. (2004): The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 279(47): 49517 - 49522.

Zhou, J., Zhang, J., Xie, W. (2005): Xenobiotic nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyl-transferases. *Current Drug Metabolism* 6(4): 289 - 298.

## **8.2 Internetové zdroje:**

Access Medicine. Basic and Clinical Pharmacology [online]. [cit. 2013-02-27].

Dostupné z: [http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter\\_4\\_drug\\_biotransformation.htm](http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter_4_drug_biotransformation.htm)

StudyDroid. [online]. [cit. 2013-02-6].

Dostupné z: <http://www.studydroid.com/index.php?page=studyPack&packId=88330>

Diagram of Internal Organs. TutorVista [online]. [cit. 2013-03-14].

Dostupné z: <http://www.tutorvista.com/science/diagram-of-internal-organs#>

VDR-like Receptors. Tocris [online]. [cit. 2013-03-29].

Dostupné z: <http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=187884#.UVWz5z doovb>

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>ABC</b>	ATP vazebná doména ( <i>ATP binding cassette</i> )
<b>AhR</b>	aryl uhlovodíkový receptor
<b>AhRR</b>	represor aryl uhlovodíkového receptoru
<b>APS</b>	persulfát amonný
<b>ARNT</b>	nukleární translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
<b>ATP</b>	adenozin-5'-trifosfát
<b>bHLH</b>	bazický helix-smyčka-helix
<b>BSA</b>	bovinní sérový albumin
<b>cAMP</b>	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
<b>Caco-2</b>	buněčná linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva
<b>CAR</b>	konstitutivní androstanový receptor
<b>CBP</b>	vazebný protein pro CREB
<b>CAR-RE</b>	responzivní element konstitutivního androstanového receptoru
<b>CCRP</b>	cytoplazmický retenční protein konstitutivního androstanového receptoru
<b>cDNA</b>	komplementární deoxyribonukleová kyselina
<b>Cdx2</b>	<i>caudal-related homeobox 2</i>
<b>CITCO</b>	6-(4-chlorofenyl)imidazol[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl) oxim
<b>CREB</b>	vazebný protein pro cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>DBP</b>	protein vázající vitamín D
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	deonizovaná voda
<b>DMEM</b>	komerční médium ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> )
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>DRE</b>	dioxinový responzivní element
<b>DRIP</b>	komplex proteinů interagujících s receptorem pro vitamín D.
<b>DR3, 4</b>	přímé repetice oddělené třemi nebo čtyřmi rozdílnými nukleotidy
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	etylendiamintetraoctová kyselina
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum/estrogenní receptor
<b>ER6, 7, 8, 9</b>	obrácené repetice oddělené šesti, sedmi, osmi nebo devíti nukleotidy

<b>FAD</b>	flavinadenindinukleotid
<b>FAD-OOH</b>	hydroperoxyflavin
<b>FBS</b>	fetální bovinní sérum
<b>FMN</b>	flavinmononukleotid
<b>FMO</b>	flavinové monooxygenázy
<b>FXR</b>	farnesoidní X receptor
<b>GR</b>	glukokortikoidní receptor
<b>GST</b>	glutathion-S-transferáza
<b>HAT</b>	histonová acetyltransferáza
<b>HDAC</b>	histonová deacetyláza
<b>Hsp90</b>	protein teplošokového šoku o velikosti 90 kDa ( <i>heat shock protein</i> )
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin]-ethansulfonová kyselina
<b>HNF1<math>\alpha</math></b>	jaterní nukleární transkripční faktor regulující expresi UGT
<b>LB</b>	<i>loading</i> pufr
<b>LS174T</b>	buněčná linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva
<b>LXR</b>	jaterní X receptor
<b>MDR1</b>	gen kódující P-glykoprotein ( <i>multidrug resistance</i> )
<b>mRNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina
<b>NADP</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfátu - oxidovaná forma
<b>NADPH</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfátu - redukováná forma
<b>NLS</b>	jaderný lokalizační signál
<b>OATP</b>	transportní peptid organických aniontů
<b>OCT</b>	transportér organických kationů
<b>p23</b>	prostaglandin E syntáza 3
<b>PAS</b>	Per-ARNT-Sim doména
<b>PBS</b>	fosfátový pufr s přísávkem chloridu sodného
<b>PP-2A</b>	proteinová fosfatáza 2A
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory
<b>PVDF</b>	polyvinylidendifluorid
<b>PXR</b>	pregnanový X receptor
<b>PXR-RE</b>	responzivní element pregnanového X receptoru
<b>RAR</b>	receptor pro kyselinu <i>trans</i> -retinovou
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RXR</b>	receptor pro kyselinu <i>cis</i> -retinovou

<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný
<b>SDS-PAGE</b>	polyakrilamidová elektroforéza v přítomnosti SDS
<b>SULT</b>	sulfotransferáza
<b>SRC</b>	komplex koaktivátorů steroidních receptorů
<b>TAD</b>	transaktivační doména
<b>TBS</b>	Tris pufr
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
<b>Tris</b>	tris (hydroxymethyl) aminomethan
<b>Tween20</b>	polyoxyethylen(20)sorbitan monolaurát
<b>UGT</b>	UDP-glukuronosyl transferáza
<b>UDP</b>	uridin-5-difosfát
<b>UDPGA</b>	uridin-5-difosfo-glukuronová kyselina
<b>UT</b>	negativní kontrola ( <i>untreated</i> )
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>VD<sub>3</sub></b>	kalcitriol
<b>VDR</b>	receptor vitamínu D
<b>VDRE</b>	vitamín D responzivní element
<b>XAP2</b>	X-asociovaný protein 2
<b>XRE</b>	xenobiotický responzivní element