

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Ondřej Ženata

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Úloha receptoru pro vitamín D (VDR) v expresi biotransformačního enzymu UGT2B7

Bakalářská práce

Ondřej Ženata

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

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

Ondřej Ženata

Souhrn:

UDP-glukuronosyl transferasa 2B7 je biotransformační enzym metabolizující množství exogenních i endogenních sloučenin. Největší exprese tohoto enzymu byla zjištěna v játrech, ale jeho přítomnost byla potvrzena i ve střevní tkáni, stejně tak jako receptoru pro vitamín D, který je ve střevní tkáni exprimován ve velkém množství.

Tato práce se zaměřila na prozkoumání možného vlivu aktivovaného receptoru pro vitamín D na UDP-glukuronosyl transferasu 2B7. Ke zkoumání byly použity tři koncentrace kalcitriolu reprezentující tři stavy (hypovitaminóza, fyziologická hladina a hypervitaminóza) organismu a přirozený antioxidant resveratrol jako induktor, vyskytující se v množství denně konzumovaných pokrmů. Exprese UDP-glukuronosyl transferasy 2B7 byla zkoumána ve dvou časech (24h a 48h) na střevní nádorové linii. Po aktivaci receptoru kalcitriolem byl zjištěn statisticky významný pokles hladiny mRNA pro UDP-glukuronosyl transferasu a indukce po působení resveratrolu.

Summary:

UDP-glucuronosyl transferase 2B7 is a biotransformation enzyme which metabolises very many exogenous and endogenous compounds. The greatest expression of this enzyme was detected in the liver, but its presence has been confirmed in the intestinal tissue, as well as the receptor for vitamin D, which is highly expressed in large quantities in the intestinal tissue.

This work has focused on the examination of the possible influence of the activated vitamin D receptor on UDP-glucuronosyl transferase 2B7. Three concentrations of calcitriol were used to represent the three conditions (hypovitaminosis, physiological level and hypervitaminosis) of the organism and the natural antioxidant resveratrol as an inductor, occurring in a number of daily consumed foods. The expression of UDP-glucuronosyl transferase 2B7 was examined in two times (during 24h and 48h) for an intestinal cancer line. After the receptor activation by calcitriol a statistically significant decrease was detected a statistically significant decrease in the levels of mRNA for UDP-glucuronosyl transferases and the induction stimulated by resveratrol.

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli, docentu Vrzalovi, za podporu a cenné rady, jenž mi při mé bakalářské práci dal a za čas, který mi věnoval. Také bych tímto chtěl poděkovat i zbytku zaměstnanců laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za jejich rady a pomoc.

Obsah

1. Úvod	8
2. Biotransformace	9
2. 1. Fáze I	10
2. 2. Fáze II	12
2. 3. Fáze III	15
3. UDP-glukuronosyl transferasy (UGT)	16
3. 1. UGT2B7	29
4. Regulace biotransformačních enzymů	21
5. Receptor pro vitamín D (VDR; NR1H1)	24
5. 1. Vitamín D	27
6. Cíl práce	29
7. Materiál a přístroje	30
8. Metodika	32
9. Výsledky	38
10. Diskuze	41
11. Závěr	43
12. Literatura	44
13. Seznam použitých zkratk a symbolů	53

1. Úvod:

Již po tisíce let se v každodenním životě setkáváme s množstvím chemických sloučenin, které působí na náš organismus. Setkáváme se s nimi ve vzduchu, vodě i v potravě. Může jít o různá potravní aditiva, léky, nebo znečištění ovzduší. Lidské tělo si tedy muselo vyvinout různé mechanismy pro odstranění látek, které jsou tělu cizí.

V lidském těle se vyvinuly specializované proteiny, které odbourávají nejrozličnější xenobiotika. Nazývají se biotransformační enzymy a biotransformace sama má tři fáze. V první fázi způsobí enzymy zpolarizování sloučeniny několika způsoby: zavedením/odkrytím polární skupiny, desulfurací, oxidací nebo i redukcí. Působí tak různé flavin obsahující monooxygenasy (FMO), cyklooxygenázy nebo i široká skupina cytochromů P450.

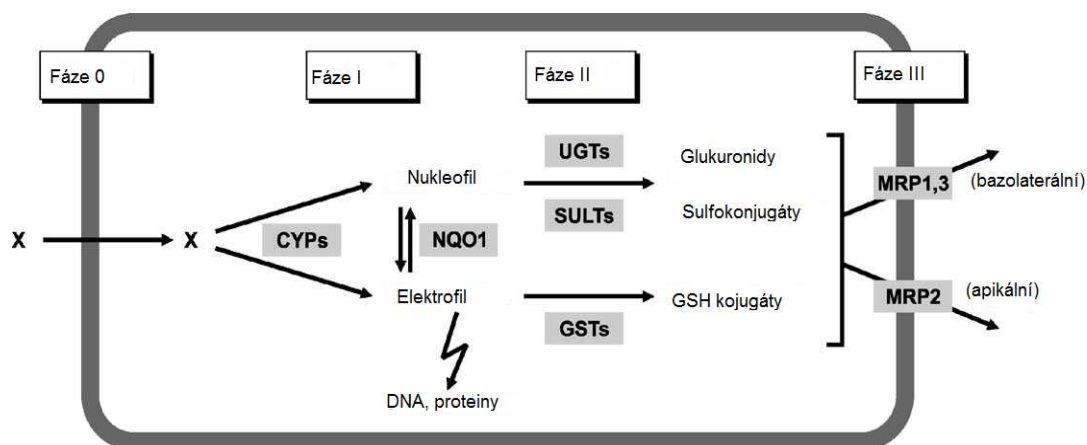
V druhé fázi dochází ke konjugaci molekuly, která byla zpolarizována v první fázi, s některou z mnoha látek (cukry, aminokyseliny, sulfáty, CH_3 - skupina,...), aby se zvýšila její rozpustnost ve vodě a mohla tak být snáze přijata do moči a vyloučena ven z těla. V třetí fázi dochází k samotnému transportu ven z buňky, na čemž se podílí množství membránových transportérů (OATP, OCT,...).

Některé z těchto enzymů či transportérů jsou regulovány aktivovanými transkripčními faktory, třeba receptorem pro vitamín D. Ovlivnění hladiny těchto enzymů může být závažné a je proto nutné prozkoumat tyto vzájemné interakce a zabránit tak nežádoucím účinkům.

2. Biotransformace:

Biotransformace je velice důležitý a specializovaný děj na odstranění nežádoucích látek ven z těla. Může jít jak o látky endogenního původu tak i různá xenobiotika jako léčiva, vzdušné polutanty a nejrůznější chemické látky přijímané v potravě. Lze ji dělit až na čtyři fáze.

Ve fázi 0 dochází k transportu lipofilní látky do buňky pomocí přenašečů nebo samovolnou difúzí. V podstatě je shodná s fází 3, jen se netransportují látky ven ale dovnitř (Bock 2003). Poté, co je látka transportována do buňky, dochází k jejímu zpolarizování několika způsoby. Tento děj je označován jako fáze I. Ve fázi II dochází k navázání endogenního substrátu a ve většině případů k snížení fyziologických a biochemických účinků, ovšem existují i výjimky, například u morfinu (Saskia a kol 1999; Eissing a kol., 2012). V třetí fázi jde o transport molekuly ven z buňky a její sekreci do moči. Tyto fáze jsou ukázány na obrázku číslo 1



Obr. č. 1: Znárodnění biotransformační fáze 0 až III v probíhající v buňce (obrázek převzat z Bock 2003).

2. 1. Fáze I:

V první fázi biotransformace, je látka zpolarizována mnoha způsoby a velkým množstvím enzymů. Dvě největší skupiny jsou cytochromy P450 a flavin obsahující monooxygenasy.

Cytochromy P450:

Cytochromy P450 (CYP) jsou široká skupina hemových enzymů, které byly nalezeny ve spoustě druhů od bakterií, přes rostliny až po hmyz a zvířata (Nelson a kol., 1996). CYP mají mnohá uplatnění, mezi něž patří jak biosyntéza látek (uplatňují se při biosyntéze cholesterolu a mnoha dalších látek), tak i detoxikace organismu od mnohých xenobiotik a endobiotik, s nimiž se můžeme často setkávat. Některé významné látky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Názvosloví cytochromů P450 je založeno na základě homologie v aminokyselinových sekvencích, jak je ukázáno na schématu č. 1 (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Nelson a kol., 1996).

CYP3A4 je obecně považován za jeden z nejdůležitějších cytochromů, jelikož metabolizuje velké množství léků (jsou jich známy desítky) a jeho indukce se v játrech může zvýšit o více než 60% (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). CYP3A4 je ovlivněn transkripčně mnoha receptory, mezi něž patří konstitutivní androstanový receptor (CAR), pregnanový X receptor (PXR) (Pávek a Dvořák, 2008) a aryl uhlovodíkový receptor (AhR) (Kumagai a kol., 2012).

Mnoho látek, které jsou metabolizovány CYPy také působí jako jejich induktory. Bylo zjištěno, že dioxin zvyšuje hladinu CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 (Bock a Köhle, 2006). Se spoustou induktorů se můžeme setkávat denně. Například nikotin zvyšuje hladinu CYP2B1 (Khokhar a kol., 2010; Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001) a ethanol CYP2E1 (Zhog a kol., 2012). Dalšími látkami jsou třeba barbituráty, které indukují hladinu CYP3A4 a CYP3A5 (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Tabulka č. 1: Několik substrátů metabolizovaných cytochromy P450 (Amin a kol., 2012^[1]; Zhong a kol., 2012^[2]; Anzenbacher a Anzenbacherová^[3], 2001; Vaynshteyn a Jeong 2012^[4]; Eissing a kol., 2012^[5]; Heit a kol., 2013^[6]; Chenoweth a kol., 2013^[7]).

Substrát	Vybrané enzymy metabolizující substrát
Nikotin	CYP2B6 ^[3] , CYP2A6 ^[7]
Etanol	CYP2E1 ^[2,6]
Morfin	CYP2B1 ^[3] , CYP2B2 ^[3] , CYP3A4 ^[5]
Kofein	CYP1A1 ^[1] , CYP1A2 ^[1,3,4]
Steroidy	CYP2A6 ^[3]
Diazepam	CYP2C19 ^[3]

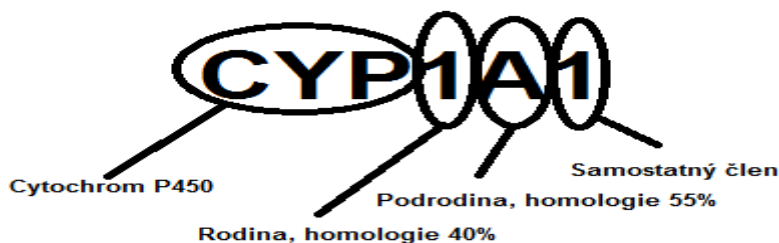


Schéma č. 1: Názvosloví cytochromů P450 (informace k vytvoření schématu převzaty z Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Flavin obsahující monooxygenasy (FMO):

Jedná se o další významnou část enzymů, které napomáhají v detoxifikaci organismu. Jsou to NADPH dependentní mikrosomální flavoproteiny (Cashman, 2000). V savcích se nachází pět podobných genů pro FMO označených jako FMO1 až FMO5. Některé izoformy FMO mohou mít v rané fázi vývoje vyšší aktivitu, jako třeba FMO1 má větší zastoupení při vývoji plodu (později aktivitu ztrácí) a FMO3 u dospělého člověka. FMO4 a FMO5 jsou vzácné izoformy (Eswaramoorthy a kol., 2006). Mezi substráty FMO patří třeba trimetylamín nebo nikotin (Anthony a kol., 2011; Treacy a kol., 1998).

Defekt ve FMO může vést k několika onemocněním, mimo jiné i k tzv. syndromu rybího zápachu. Je to způsobeno vylučováním trimetylamínu (normálně se vylučuje jeho oxidovaná forma), potem a dechem. Podstatou této poruchy jsou mutace v genetickém kódu FMO (Treacy a kol., 1998).

2. 2. Fáze II:

Druhá fáze biotransformace spojuje látky z první fáze s některými endogenními látkami a ve většině případů je činí méně toxickými a méně biologicky aktivními. Zároveň zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě a tím jejich snadnější odstranění z těla ven pomocí moči (Bock, 2003; Zhang a kol., 1998).

UDP-glukuronosyl transferasy (UGT):

Nejvýznamnější a nejpočetnější skupinou enzymů druhé fáze jsou UDP-glukuronosyl transferasy (UGTs), které používají nejčastěji endogenní sloučeninu uridin 5'-difosfoglukuronovou kyselinu (UDPGA) jako donora cukerné složky s endobiotiky i xenobiotiky (Bock, 2003). Podrobněji se jim budeme věnovat v kapitole 3.

Sulfotransferasy (SULT):

Mezi další významné enzymy druhé fáze patří sulfotransferasy (SULTs). První článek, který popisoval sulfátovou konjugaci, byl publikován v roce 1876 a od té doby byla identifikována superrodina genů označovaných jako SULT, které katalyzují přenos SO_3^- skupiny pomocí 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfátu (PAPS) na cílovou molekulu. Akceptorové molekuly mohou být jak endogenní substráty (dopamin, testosteron), tak i xenobiotika. Ovšem z některých xenobiotik se po navázání substrátu stávají mutageny a karcinogeny (Gamage a kol., 2006).

SULT se vyskytují buď vázané v membráně Golgiho aparátu, kde probíhá navázání SO_3^- skupiny na peptidy, nebo se vyskytují volně v cytoplazmě a jako substrát jim slouží rozličná xenobiotika a některá endobiotika jako steroidy, žlučové kyseliny a neurotransmitery (Gamage a kol., 2006; Negishi a kol., 2001).

Metyltransferasy:

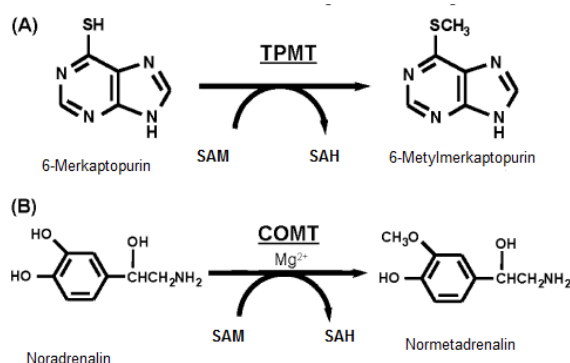
Existuje několik druhů methyltransferas, ale všechny katalyzují přenos CH_3^- skupiny na nejrůznější substráty a jsou nezbytné pro správné fungování organismu. Donorem CH_3^- je S-adenosyl methionin (SAM), který se po předání odštěpení CH_3^- skupiny mění na S-adenosyl homocystein (SAH) (Richard a Weinshilboum, 2006).

Mezi významné N-methyltransferasy patří nikotinamid N-methyltransferasa, přičemž výkyvy v její hladině mohou být indikátorem nádorového onemocnění jater jako je hepatocelulární karcinom (Kim a kol., 2009). Glycin N-methyltransferasa je důležitá

v regulaci hladiny S-adenosylmethioninu (SAM) a S-adenosylhomocysteinu (SAH) (Wang a kol., 2007). Histamin N-methyltransferasa je zase odpovědná za odbourávání převážné části histaminu v lidském těle (Kennedy a kol., 2008).

Dalšími zástupci jsou O-methyltransferasy. Katechol O-methyltransferasa (COMT) je důležitá v degradaci neurotransmiterů jako dopamin, adrenalin a noradrenalin (Šagud a kol., 2010). Chlorfenolová O-methyltransferasa se vyskytuje třeba v houbě *Trichoderma longibrachiatum*. Je zodpovědná za detoxifikaci chlorfenolů (Feltner a kol., 2010).

Významným zástupcem je též thiopurin S-methyltransferasa (TPMT). Tento cytosolický enzym katalyzuje S-metylaci nejrůznějších substrátů, mezi něž patří i azathiopurin a 6-merkaptopurin, což jsou dlouhodobě užívaná léčiva (Wang a Weinshilboum, 2006).



Obr. č. 2: Příklad metylace léku a hormonu pomocí methyltransferas TPMT a COMT (obrázek převzat z Richard a Weinshilboum, 2006).

Glutathion-S-transferasy:

Glutathion-S-transferasy (GST) katalyzují konjugaci elektrofilních sloučenin s glutathionem (GSH). Tato katalytická reakce byla poprvé popsána v roce 1961 (Booth a kol. 1961). Tyto enzymy (a množství jejich pseudogenů) se vyskytují u nejrůznějších živočichů (*Caenorhabditis elegans*) i rostlin (*Populus trichocarpa*) (Josephy, 2010; Brentner a kol., 2008).

V lidech se vyskytuje osm tříd těchto enzymů a mezi jejich substráty patří jak exogenní sloučeniny jako akrylaldehyd, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen nebo akrylamid tak i endogenní sloučeniny (peroxid vodíku nebo lipidové hydroperoxydy). Tyto enzymy mohou být cytosolické i membránově vázané (Josephy, 2010). Také mohou být ve formě

homodimeru nebo heterodimeru, přičemž heterodimer mohou tvořit jediné s podjednotkami stejné třídy (Armstrong, 1996).

Acetyltransferasy:

Pomocí acetylce se také může buňka zbavovat nežádoucích sloučenin. Arylamine N-acetyltransferasa je cytosolický enzym. Konjuguje xenobiotika s acetylovou skupinou, jejímž donorem je acetyl koenzym A. Mezi její substráty patří látky jako N-hydroxy-4-aminobifenyl a N-hydroxy-2-(acetylamino) fluor, které mají karcinogenní účinky (Sim a kol., 2008).

2. 3. Fáze III:

V třetí fázi fungují nejrůznější transportéry a přenašeče, které musí přenést sloučeniny ven z buňky. Velkou skupinu z nich tvoří MRP (z anglického multidrug resistance protein). Jedná se o ATP-dependentní glykoproteiny, které se vyskytují i u jiných druhů než je člověk, například u krysy (*Rattus rattus*), myši (*Mus musculus*) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). U člověka bylo identifikováno nejméně 6 členů rodiny MRP (MRP1 až MRP 6), přičemž pouze MRP1, MRP2, MRP3 a MRP5 přenáší sloučeniny konjugované s endogenními substráty z druhé fáze biotransformace (König a kol., 1999).

Mezi další přenašeče patří OATPs (organic anion transporting polypeptides), které zprostředkovávají transmembránový transport velkého množství amfipatických sloučenin a vyskytují se ve velkém množství tkání (plíce, játra, srdce, střevo, ledviny, placenta). Mezi přenášené sloučeniny patří žlučové soli, tyroidní hormony, aniontové polypeptidy, organická barviva a velké množství léků a jiných xenobiotik. Jedná se o 12-doménové transmembránové proteiny kódované superrodinou genů SLCO (Hagenbuch a Meyer, 2003).

Další významnou skupinou jsou OCTs (z anglického organic cation transporters), jež jsou nezávislé na gradientu sodíku (Na-independentní přenašeče). Vyskytují se v mnoha tkáních jako je mozek, ledviny, srdce, plíce, placenta, buňky imunitního systému, játra a střevo, kde plní důležitou roli přenašečů mnoha kladně nabitých látek. Může jít jak o endogenní kationty, tak o různá léčiva a toxiny (Koepsell 2007; Koepsell 1998). Tyto transportéry jsou zahrnuty ve velké rodině s označením SLC22. Patří sem jak tři typy (OCT1, OCT2 a OCT3) transportérů organických kationtů usnadňujících difúzi tak i transportéry kationtů a karnitinu, označovaných jako OCTN (Koepsell 2007).

3. UDP-glukuronosyl transferasy (UGT):

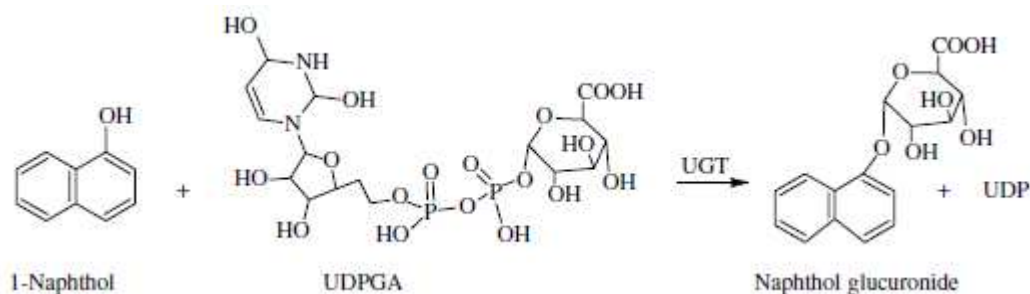
UDP-glukuronosyl transferasy jsou glykoproteiny nacházející se v endoplazmatickém retikulu (a někdy i v jaderném obalu) mnoha tkání, například v játrech, kůži, ledvinách, mozku a zažívacím traktu. Patří mezi hlavní enzymy zodpovědné za odstraňování nežádoucích lipofilních látek z těla tím, že zvyšují jejich polaritu, aby byly lépe eliminovány močí, a snižují jejich biochemickou aktivitu. Tyto látky mohou být jak exogenního tak i endogenního původu (Radominska-Pandya a kol., 1999). Některé z těchto látek jsou uvedeny v tabulce číslo 2.

Tabulka č. 2: Některé z látek metabolizovaných UDP-glukuronosyl transferasami (Rodrigues a kol., 2012^[1]; Senafi a kol., 1994^[2]; Court, 2005^[3]; Eissing a kol., 2012^[4]; Chatzistefandis a kol., 2012^[5]; Jin a kol., 1993^[6]; Jakobsson a kol., 2006^[7]; Chen a kol., 2012^[8])

Substrát	Enzym
Bilirubin	UGT1A1 ^[1,2]
Serotonin	UGT1A6 ^[3]
Trifluoroperazine	UGT1A4 ^[3]
Propofol	UGT1A9 ^[3]
Kyselina valproová	UGT1A3 ^[5] , UGT1A4 ^[5] , UGT1A6 ^[5] , UGT1A9 ^[5] , UGT2B7 ^[5]
S-oxazepam	UGT2B15 ^[3]
Morfin	UGT2B7 ^[4]
1-naftol	UGT2B11 ^[6]
Testosteron	UGT2B17 ^[7]
Trans-3'-hydroxycotinín	UGT2B10 ^[8]

U savců se vyskytuje 117 členů superodiny genů UGT rozdělených do čtyř rodin (UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8). V lidech se vyskytují jen dvě rodiny glukuronosyltransferas (UGT1 a UGT2). Enzymy patřící do rodiny UGT1 mají unikátní první exon z celkových pěti a další čtyři exony jsou sdílené. Geny pro UGT2 se skládají ze šesti exonů (pouze UGT2A1 a UGT2A2 vznikají odlišným sestřihem variabilního prvního exonu). Rodina UGT2 je rozdělena do dvou podrodin a to UGT2A a UGT2B, jejichž geny leží na chromosomu 4q13. Názvosloví UGT se tvoří stejně jako v případě P450 podle podobnosti sekvence aminokyselin

(Mackenzie a kol., 2005). Z farmakologického i fyziologického hlediska jsou to velmi důležité enzymy druhé fáze, které spojují endogenní a xenobiotické sloučeniny s uridin 5'difosfoglukuronovou kyselinou (UDPGA), jak je znázorněno na obrázku 3 (Saskia a kol., 1999).



Obr. č. 3: Příklad odbourávání 1-naftolu z organismu pomocí UDP-glukuronosyltransferas (obrázek převzat z knihy A textbook of modern toxicology, Ernest Hodgson, 3. edice, 2004).

Mezi endogenní molekuly, které jsou odbourávány, patří bilirubin, steroidy, žlučové kyseliny, a tyroxin (Bock 2003, Burchell a kol., 1995). Tyto enzymy z organismu odbourávají i mnoho xenobiotik, které do těla vstupují jako vzdušné polutanty, nebo jsou přijímány v potravě. Může jít o mnoho léků, jako třeba morfin nebo paracetamol, jež jsou velmi často používány v lékařství. V některých ojedinělých případech vede konjugace s UDPGA k nežádoucím účinkům, jako je třeba teratogeneze a karcinogeneze (Saskia a kol 1999).

Příkladem zvýšeného účinku látky může být morfin-6-glukuronid, vznikající z morfinu, který je používán jako analgetikum, antitusikum a při léčbě průjmových onemocnění. Vzniklý metabolit má 100x silnější účinky jako analgetikum než morfin (Saskia a kol., 1999; Paul a kol., 1989). Jeho potřebný čas k eliminaci ven z těla je prodloužený a to může vést k mnoha komplikacím. Z celkového množství morfinu, jež se dostane do těla, je na morfin-6-glukuronid metabolizováno (enzymem UGT2B7) jen 10%. 80% je metabolizováno na morfin-3-glukuronid, což je neaktivní látka. Dalších 5% je pomocí CYP3A4 přeměněno na normorfin a zbylá část je pomocí glomerulární filtrace vyloučena do moči v nezměněné podobě. Viz schéma číslo 2 (Eissing a kol., 2012, Saskia a kol., 1999).

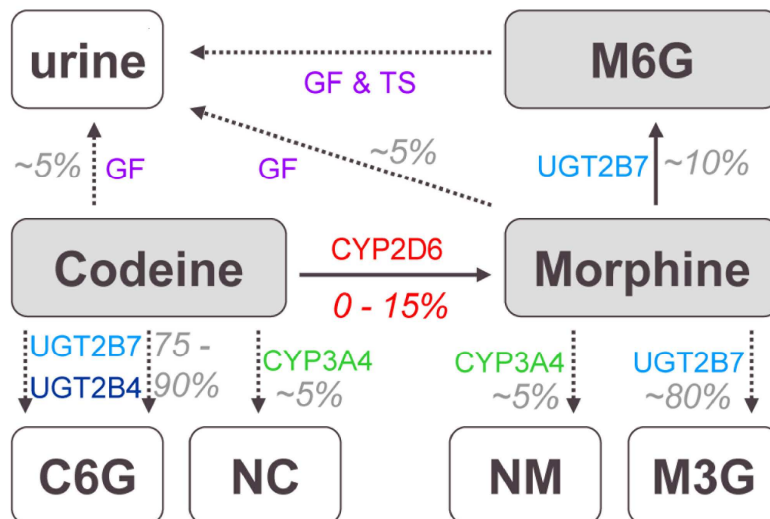


Schéma č. 2. Metabolismus morfinu a kodeinu (obrázek převzat z Eissing a kol., 2012).

Rodiny UGT1 a UGT2 využívají převážně endogenní sloučeninu UDPGA, jako donora cukerné složky, ale bylo prokázáno, že enzymy mohou použít i UDP-glukózu a UDP-xyulózu, ale za snížené rychlosti reakce. Rychlost reakce při použití UDPGA může být až desetinásobná oproti jiným UDP cukrům (Sahidan a kol., 1994).

3.1. UGT2B7:

UGT2B7 je individuální člen podrodiny UGT2B. U lidí se vyskytuje 7 funkčních členů této podrodiny a to UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15 a UGT2B28 (Mackenzie a kol., 2005). Gen pro UGT2B7 se skládá ze šesti exonů o celkové délce 16kb (Radomska-Pandya a kol., 2001). UGT2B7 se vyskytuje ve velkém množství tkání, jako jsou játra, tenké a tlusté střevo, močový měchýř, děloha, plíce, nadledviny nebo ledviny (Ekström a kol., 2013; Nakamura a kol., 2008). Hladina tohoto enzymu je výrazně ovlivněná věkem. Například ve fetálních plicích a ledvinách byla několikanásobně vyšší hladina UGT2B7 než ve fetálních játrech, ale játra dospělého člověka mají větší expresi než játra plodu (Ekström a kol., 2013). Tento enzym metabolizuje mnoho látek, z nichž některé jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Vybrané substráty UGT2B7. V tabulce jsou uvedeny některé z látek metabolizovaných enzymem UGT2B7 (Eissing a kol., 2012^[1]; Uchaipichat a kol., 2008^[2]; Bélanger a kol., 2009^[3]; Buchheit a kol., 2011^[4]; Chen a kol., 2010^[5]; Chatzistefanidis a kol., 2012^[6]; Tang, 2003^[7]; Bowalgaha a kol., 2005^[8]; Sadeque a kol., 2012^[9]).

Obchodní nebo triviální název	Použití
Morfin ^[1]	Analgetikum, antitusikum
Zidovudin ^[2]	Antiretrovirový lék
Efavirenz ^[3]	Antiretrovirový lék
Ibuprofen ^[4]	Analgetikum, antipyretikum
Chloramfenicol ^[5]	Antibiotikum
Kodein ^[1]	Analgetikum
Valproová kyselina ^[6]	Antikonvulzivum
Diklofenak ^[7]	Antiflogistikum
Naproxen ^[8]	Antiflogistikum
Lorcaserin ^[9]	Lék na hubnutí

Mezi endogenní substráty tohoto enzymu patří některé deriváty estrogenu, estradiol, hyodeoxycholová kyselina (HDCA), androgeny a žlučové kyseliny (Hevir a kol., 2011; Lu a kol., 2005; Mackenzie a kol., 2003; Sten a kol., 2009). Má molekulovou hmotnost 52kDa (Ritter a kol., 1990).

U tohoto enzymu se vyskytuje několik polymorfismů. Některé z nich ovlivňují rychlost, s jakou je odbourávána určitá látka. Byl potvrzen vliv polymorfismů na rychlost odbourávání lamotriginu (Blanca Sánchez a kol., 2010; Singkham a kol., 2012), zidovudinu (Kwara a kol., 2009), silodosinu (Wang^[2] a kol., 2012) nebo i třeba flurbiprofenu (Wang a kol., 2011). Také byly zjištěny významné procentuální rozdíly mezi výskytem polymorfismů v porovnání různých druhů populací (Lampe a kol., 2000; Bhasker a kol., 2000).

Dále bylo prokázáno, že terciální butylhydrochinon (TBHQ) je induktorem UGT2B7. Jedná se o antioxidant používající se jako potravní aditivum. Po vystavení buněk této látce, se hladina mRNA pro UGT2B7 zvýšila až 10ti násobně (Münzel a kol., 1999). I některé ligandem aktivované transkripční faktory mohou ovlivnit hladinu tohoto enzymu. Mezi ně patří například FXR a PPAR α (Bock. 2012; Zollner a Trauner, 2009).

Byl potvrzen výskyt UGT2B7 v endoplasmatickém retikulu i v jaderném obalu a to jak na vnější tak i na vnitřní straně, což by mohlo značit ochranu jádra před toxickými látkami (Radomska-Pandya a kol., 2002; Radomska-Pandya a kol., 2001). Také bylo zjištěno, že v endoplasmatickém retikulu by mohl tvořit komplexy (dimery, tetramery,...) a interagovat s CYP3A4 za tvorby multiproteinového komplexu, který metabolizuje látky (Jacqueline a kol., 2005).

4. Regulace biotransformačních enzymů

Regulace biotransformačních enzymů probíhá převážně transkripčně. Bylo prokázáno, že velké množství receptorů ovlivňuje různé enzymy první, druhé a dokonce i proteiny třetí fáze. Tyto ligandem aktivované transkripční faktory se váží do vazebných míst na DNA ve formě monomerů jako třeba "estrogen receptor-related receptor" (ERR) a "retinoic acid-related orphan receptor" (ROR). Ve formě homodimerů se váže například glukokortikoidní receptor (GR), hepatocytární jaderný faktor 4 (HNF4) nebo zárodečný buněčný jaderný faktor (GCNF). Hodně receptorů se váže i ve formě heterodimerů. Mezi ně patří třeba pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), farnesoidní X receptor (FXR) nebo receptor pro kyselinu trans-retinovou (RAR). Po navázání buď spouští, nebo tlumí transkripci příslušných genů (Wang a LeCluyse, 2003). Dále jsou popsány některé významné receptory a jim regulované biotransformační enzymy.

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR):

Aryl uhlovodíkový receptor se vyskytuje v cytoplasmě v neaktivní formě v komplexu s chaperonovými proteiny (Hsp90 a ko-chaperon p23 a XAP2), které se odpojí po translokaci do jádra (Meyer a Perdew, 1999; Monostory a Pascussi, 2008). Velké množství látek, které patří mezi nebezpečné polutanty životního prostředí (polychlorované dibenzodioxiny, dibenzofurany, polycyklické aromatické uhlovodíky) se mohou na tento receptor navázat (jsou ligandy) a tak jej aktivovat. Po navázání ligandu se (AhR) translokuje do jádra, kde se spojí s AhR jaderným translokátorem (Arnt) a ve formě heterodimeru AhR-Arnt se naváže na xenobiotický responzivní element (XRE) obsahující sekvenci jaderné DNA (5'-CACGCNA-3') a poté spouští transkripci příslušných genů (Monostory a Pascussi, 2008; Wang a LeCluyse, 2003). Jeho exprese byla naměřena ve velkém množství tkání, jako jsou třeba plíce, placenta (nejvyšší množství), játra, ledviny a v tenké střevo (Pávek a Dvořák, 2008)

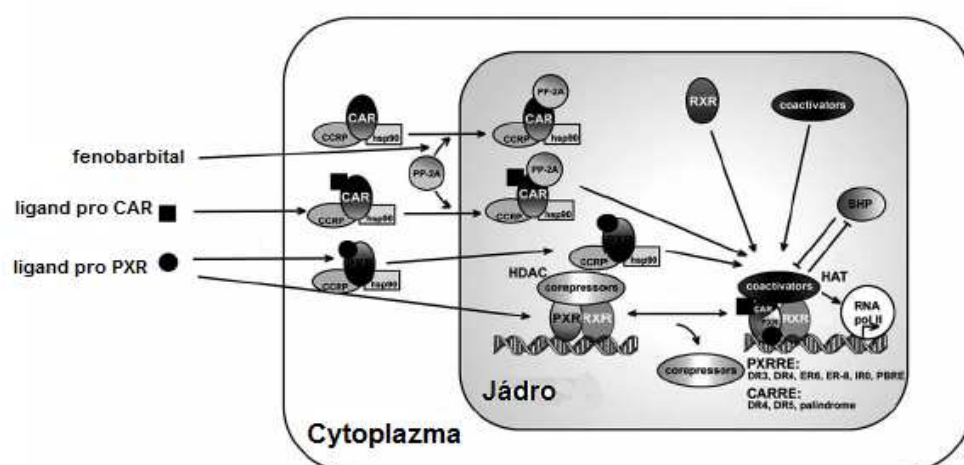
Tento receptor transkripčně ovlivňuje řadu biotransformačních enzymů první i druhé fáze jako třeba: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, GSTA2 (Kumagai a kol., 2012; Bock 2011; Pávek a Dvořák 2008; Monostory a Pascussi, 2008)

Konstitutivní androstanový receptor (CAR; NR1I3):

Jedná se o další cytosolický receptor, který je úzce spjat s pregnanovým X receptorem (PXR). V cytoplazmě je v komplexu s chaperonovým proteinem HSP90 a ko-chaperonem CCRP. Největší množství tohoto receptoru bylo zjištěno v játrech (Konno a kol., 2008; Monostory a Pascussi, 2008; Pávek a Dvořák 2008). Lidský CAR se skládá ze tří domén (většina jaderných receptorů obsahuje pět domén). Po translokaci do jádra se ke komplexu CAR-CCRP-HSP90-ligand naváže ještě proteinová fosfatáza 2A (PP-2A), která může po působení fenobarbitalů způsobit translokaci CAR do jádra i bez navázaného ligandu (Pávek a Dvořák, 2008). Poté dojde k připojení koaktivátorů a ve formě heterodimeru CAR-RXR α navázání do CAR responzivního elementu (CARRE, motivy DR4 a DR5) za současného uvolnění CCRP a HSP90. Koaktivátory pro CAR jsou NCOA1, PGC-1 a PPARPB (Pávek a Dvořák, 2008; Monostory a Pascussi, 2008). Je aktivován velkým množstvím strukturně různorodých xenobiotik jako je třeba chlorpromazin, chlorované bifenyly nebo metoxychlor (Monostory a Pascussi, 2008). Shrnutí aktivace receptoru CAR a PXR a jejich navázání na sekvenci v DNA je vidět na obrázku číslo 4.

CAR může ovlivňovat regulaci biotransformačních enzymů, ale i energetický metabolismus organismu a to pomocí ovlivnění metabolismu glukózy a lipidů. Často je toto ovlivnění navzájem provázáno (Gao a Xie, 2010; Konno a kol., 2008).

Některé z ovlivněných biotransformačních enzymů pomocí regulace transkripce jsou např.: CYP3A4, CYP3A5, CYP2A6, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, UGT1A1 (Monostory a Pascussi, 2008; Pávek a Dvořák, 2008; Muangmoonchai a kol., 2001)



Obr. č. 4: Aktivace CAR a PXR a spouštění transkripce příslušných genů (obrázek převzat z Pávek a Dvořák, 2008).

Pregnanový X receptor (PXR; NR1I2):

Největší výskyt tohoto receptoru byl stanoven v játrech (Pávek a Dvořák, 2008), ale byl nalezen v tenkém i tlustém střevě a ledvinách. Mezi jeho aktivátory patří mnoho užívaných léků (rifampicin, klotrimazol, mifepriston) a velké množství endogenních sloučenin (progesteron, estrogeny, androstenol, lithocholová kyselina) i složky potravy jako třeba hyperforin (Monostory a Pascussi, 2008; Maglich a kol., 2003). Tento receptor se vyskytuje v cytoplasmě a stejně jako CAR i on je před degradací chráněn vazbou s chaperonovým proteinem HSP90 a ko-chaperonem CCRP. Po navázání ligandu vstupuje do jádra ve formě heterodimeru PXR-RXR α . Společně s koaktivátory jako FOXO-1, NCOA1, NCOA2, PGC-1 se naváže na PXR responzivní element (PXRRE; motivy DR3, DR4, ER6, ER8 a IR0) a spustí transkripci příslušných genů (Konno a kol., 2008; Monostory a Pascussi, 2008). Stejně jako CAR tak i PXR se stále v poslední době ukazuje jako významná složka ovlivňující energetický metabolismus organismu především působením v játrech (Gao a Xie, 2010; Konno a kol., 2008).

Mezi biotransformační enzymy ovlivněné tímto receptorem patří CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, (Bock 2011; Pávek a Dvořák, 2008; Monostory a Pascussi, 2008).

Receptor pro vitamín D (VDR; NR1I1):

Bylo zjištěno, že i tento receptor se může podílet na regulaci biotransformačních enzymů. Podrobněji je tento receptor probrán v kapitole 5.

5. Receptor pro vitamín D (VDR; NR1H1):

Receptor pro vitamín D je hlavní faktor při udržování homeostázy vápníku a fosforu v těle. Při aktivaci tohoto receptoru jeho ligandem $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferolem (kalcitriol) dochází ve střevech ke stimulaci vstřebávání vápníku a fosforu a k reabsorpci těchto dvou minerálů z krve a jejich ukládání do kostí. Při nedostatku kalcitriolu (způsobeného nejčastěji nedostatkem slunečního světla) dochází u vystavených jedinců ke křivici, různým vývojovým poruchám a dalším onemocněním, z nichž se mnoho může vyvinout v raném věku (Torun a kol., 2013; Haussler a kol., 1998). VDR nezodpovídá jen za správnou mineralizaci kostí a za hospodaření s vápníkem a fosforem v těle, ale účastní se i mnoha dalších fyziologicky důležitých procesů jako je imunitní systém (Penna a Adorini, 2000). V nedávné době byla dokonce prokázána spojitost mezi polymorfismem VDR a diabetem typu 1 (García a kol., 2007). VDR je důležitý i v centrálním nervovém systému a srdeční tkáni, kde se pojí s různými onemocněními (Eloranta a kol., 2012; Haussler a kol., 1998) a důležitou roli hraje i při buněčném růstu a diferenciaci (Saini a kol., 2012).

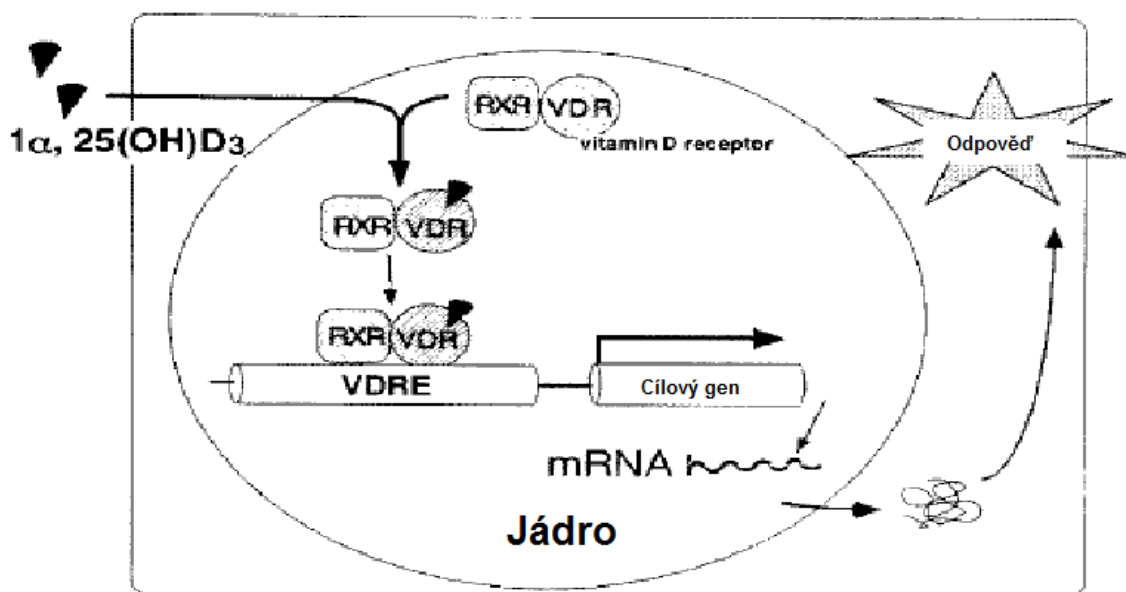


Schéma č. 3: Působení aktivovaného receptoru pro vitamín D (obrázek převzat z Kato, 2000).

VDR patří do superrodiny jaderných receptorů pro hormony a nachází se na dlouhém raménku chromozomu 12 (Haussler a kol., 1998). Je aktivován převážně kalcitriolem, ale může být aktivován i lithocholovou kyselinou (Monostory a Pascussi, 2008). Na vazebné místo na DNA se váže ve formě heterodimeru a to s jednou z forem RXR ($\text{RXR}\alpha$, $\text{RXR}\beta$, $\text{RXR}\gamma$)

(Kato, 2000). Myší VDR se může navázat i ve formě homodimeru (Ebihara a kol., 1996). Poté, co je ve formě heterodimeru s jednou z variant RXR se naváže na vitamín D responzivní element (VDRE), který má motiv přímých opakování (direct repeats; DR) hexameru odděleného třemi páry bází a spouští transkripci mnoha genů (Yang a kol., 2012; Kato, 2000).

Exprese VDR byla potvrzena skoro ve všech tkáních, výjimkou je jen několik málo tkání jako třeba Purkyňovy buňky v mozečku nebo zralá příčně pruhovaná svalovina (Wang^[1] a kol., 2012). Při molekulárních analýzách se zjistilo, že VDR patří do třídy jaderných ligandem aktivovaných transkripčních faktorů a strukturně je podobným receptorům jako PXR, CAR a farnesoidní X receptor (FXR). Všechny tyto receptory sdílejí schopnost vázat metabolity žlučových kyselin a ovlivňovat biotransformační enzymy skrz transkripci, jak je ukázáno na schématu č. 4 (Bouillon a kol., 2008; Eloranta a Kullak-Ublick, 2005).

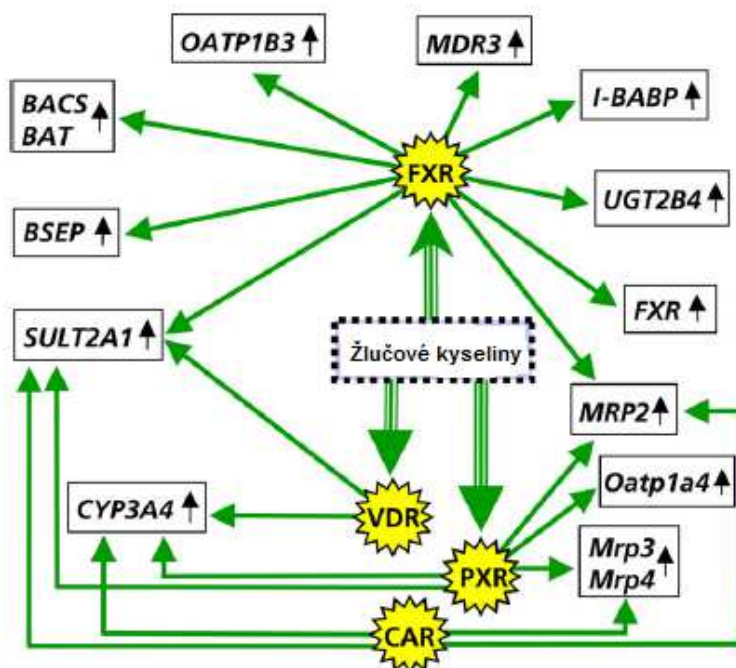


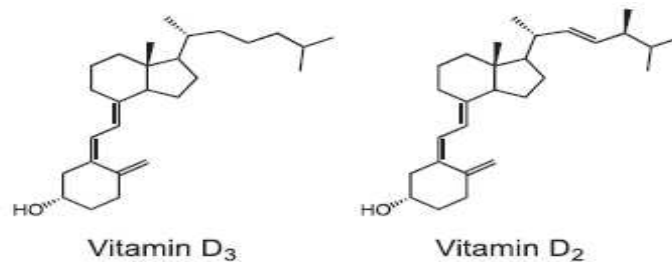
Schéma č. 4: Aktivace jaderných receptorů žlučovými kyselinami (schéma převzato z Eloranta a Kullak-Ublick, 2005).

VDR nemusí být aktivován jen kalcitriolem nebo žlučovými kyselinami. Bylo syntetizováno velké množství analogů kalcitriolu, které se uplatňují v léčbě a váží se na VDR s různou afinitou (Nagpal a kol., 2001). Po navázání ligandu je VDR transportován do jádra a ve formě heterodimeru s RXR transkripčně ovlivňuje enzymy první a druhé fáze jako například CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP24, SULT2A1 (Eloranta a Kullak-Ublick, 2005; Pascussi a kol., 2003; Tashiro a kol., 2007). Nedávno bylo zjištěno, že ovlivňuje i transportér

OATP1A2, který nachází uplatnění v třetí fázi biotransformace (Eloranta a kol., 2012). Po uvolnění z receptoru je kalcitriol znovu hydroxylován za vzniku $1\alpha,24,25$ (OH)₃ vitamínu D₃, který je posléze eliminován z těla ven (Holick, 2007). VDR je po odpojení z promotorové oblasti degradován pomocí ubiquitin-proteazomového systému (Chi a kol., 2009; Li a kol., 1999).

5. 1. Vitamín D:

Jedná se o jeden z nejstarších hormonů na zemi. Vitamín D tu mohl být již před 750 miliony let (Holick, 2003). Chemicky se rozlišují dva druhy vitamínu D a to vitamín D₃ (cholecalciferol) a vitamín D₂ (ergocalciferol). Vitamín D₃ se z velké části tvoří ze 7-dehydrocholesterolu působením UV-B (290 - 315 nm) záření, zbytek je získáván v potravě. Vitamín D₂ se nachází v rostlinách a můžeme ho tedy získat pouze v potravě. Obě dvě molekuly jsou na obrázku číslo 5 (Zhu a DeLuca, 2012; Holick, 2007).



Obr. č. 5: Struktura vitamínu D₃ a vitamínu D₂ (obrázek převzat z Zhu a DeLuca, 2012).

Aktivní forma vitamínu D₃ je 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol, který vzniká 25-hydroxylací pomocí CYP27A1, CYP2R1, CYP2J2/3, CYP3A4, CYP2D25, CYP2C11 (pouze CYP27A1 je mitochondriální enzym, ostatní jsou mikrosomální) a 1 α -hydroxylace (CYP27B1). Tento postup je popsán na schématu číslo 5. Produkce 25-hydroxyvitaminu D₃ probíhá v játrech a konečná forma je tvořena v ledvinách (Zhu a DeLuca, 2012).

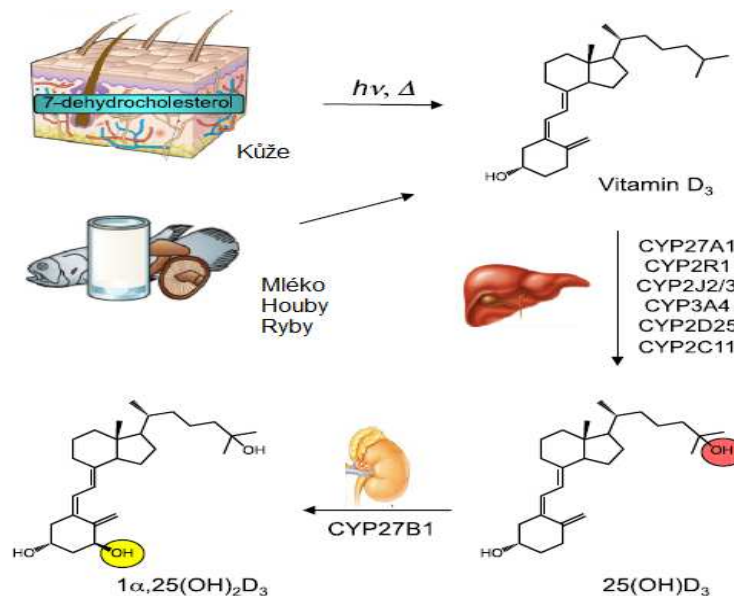


Schéma č. 5: Přeměna vitamínu D₃ na aktivní metabolit 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol (obrázek převzat ze Zhu a DeLuca, 2012).

Fyziologická hladina vitamínu D (25(OH)vitamin D₃) byla stanovena na 75 nmol/l (Holick, 2008). Hladina biologicky aktivní formy (1 α ,25-dihydroxycholecalciferol) je hlídána zpětnovazebnou regulací, aby nemohlo dojít (při zvýšeném příjmu vitamínu v potravě nebo dlouhodobějšímu pobytu na slunci) k hypervitaminóze (Holick, 2008; Zhu a DeLuca, 2012). Standardně se stanovuje hladina vitamínu D z množství 25(OH)vitaminu D₃ v krvi. Hladina 51 až 75 nmol/l je brána jako nedostatek vitamínu D a hodnoty pod 50 nmol/l jsou brány jako deficitní (Holick, 2008; Holick, 2007).

V několika studiích také byl prokázán pozitivní vliv příjmu vitamínu D₃ a snížení onemocnění. U mongolských dětí, které v zimních měsících pily mléko obohacené o vitamín D₃ (300 IU), prokazatelně došlo ke snížení respiračních onemocnění oproti kontrolní skupině (Camargo a kol., 2012). V další studii podávaly dětem vitamín D₃ (1200 IU) a placebo. Skupina dětí, které byl podáván vitamín D₃, onemocněla chřipkou méně, než děti, které pobírali jen placebo (Urashima kol., 2010).

6. Cíl práce:

Cílem této práce je zjistit roli receptoru pro vitamín D v expresi biotransformačního enzymu UGT2B7 na buněčné linii LS174T použitím metody Real Time PCR.

7. Materiál a přístroje:

Materiál:

- plastové špičky 0,1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l a 100 - 1000 μ l (Eppendorf)
- buněčná linie LS174T (ECACC, 87060401)
- komerční médium DMEM (Sigma Aldrich, D6546) obohaceno o 5 ml roztoku glutaminu 200 mM (Sigma Aldrich, G8540), 5ml neesenciálních aminokyselin (Sigma Aldrich, M7145), 50 ml fetálně bovinního séra, 5 ml roztoku antibiotik penicilinu a streptomycinu (Penicilin-10000 units/ml; Streptomycin-10000 mg/ml) (Gibco, 1221644)
- buničina (Vitrum)
- ddH₂O
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich)
- 1x fosfátový pufr (500 ml ddH₂O, 4 g NaCl, 0,1 g KCl, 1,605 g Na₂HPO₄ * 12H₂O, 0,1g KH₂PO₄)
- izopropanol (Lab-Nev s.r.o., 20037-AT0)
- 75% etanol (Sigma Aldrich, 459844)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- sérologické pipety 0,1 - 2 ml, 1 - 5 ml, 1 - 10 ml, 1 - 25 ml (Orange Scientific)
- 6-ti jamkové kultivační destičky (Orange Scientific)
- 96-ti jamkové bílé PCR destičky (Roche)
- UPL sondy 86 (Roche, 04689119001) a 60 (Roche, 04688589011)
- trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- Primery pro UGT2B7 (Forward (*495A5), Reverse (*495A6), Generi Biotech); GAPDH (Forward (**766S2), Reverse (*766S3), Generi Biotech); CYP24 (Forward (*728J7), Reverse (*728J6), Generi Biotech), sekvence jsou uvedeny v tabulce číslo 4
- 10x reakční pufr (Biolabs, F-572B)
- dNTP 10 mM (dCTP (B1058A); dTTP (B1048A); dCTP (B1050A); dATP (B1053A) TaKaRa)
- inhibitory RNAs (Biolabs, M0307L)
- M-MuLV (reverzní transkriptáza (200000 U/ml), Biolabs, M0253L)
- střední kultivační láhev o obsahu 25 cm² (Orange Scientific)
- plastová škrabka (Cell scraper, Sigma Aldrich)

- TRI reagent (Sigma Aldrich, T9424)
- random Primers (N2201FA)
- kalcitriol (Sigma Aldrich, D1530)
- resveratrol (Sigma Aldrich, R5010)
- dimetyl sulfooxid (Lach-Ner s.r.o., 20022-CT0)
- Probes Master (Roche, 04707494001)
- Sybr Green (04707516001)
- trypsin 0,25 % v EDTA (Sigma Aldrich, T4049)

Tabulka č. 4: Sekvence primerů pro různé geny

Gen	Sekvence primeru (Forward)	Sekvence primeru (Reverse)
UGT2B7	ACCAAATGTTGATTTTGTGGA	CACCACAACACCATTTTCTCC
GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC	ACGACCAAATCCGTTGACTC
CYP24	GTGGCTCCAGCCAGACCCTA	GGCGAGGTTGGTACGAGGTG

Přístroje:

- laminární box Bio II Advance 4 (TELSTAR Technologies)
- nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- stolní centrifuga Z 100 M (Hermle)
- termoblok dry bath incubator MD-02N (BioTech)
- vodní lázeň LCB22D (LabTech)
- LightCycler 480 II (Roche)
- mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- Pipety reference 0,1 - 2,5 µl, 1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 2 - 20 µl, 100 - 1000 µl (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld)
- FastPette (LabNet)

8. Metodika:

Vysetí buněk do 6-ti jamkových kultivačních desek:

- 1) Narostlou buněčnou linii LS174T ve střední kultivační láhvi jsem přenesl z inkubátoru do sterilního laminárního boxu.
- 2) Pomocí 10 ml sérologické pipety jsem odebral staré kultivační médium D6546 a poté kultivační láhev promyl roztokem 1x fosfátového pufru. Po promytí jsem pufr také odsál pomocí 10 ml sérologické pipety.
- 3) Do kultivační láhve jsem přidal 1 ml roztoku trypsinu a kultivační láhev přenesl do inkubátoru, kde jsem ji nechal 5 minut.
- 4) Po uplynutí 5 minut jsem přenesl kultivační láhev zpět do laminárního boxu a přidal 9 ml nového předeřátého kultivačního média.
- 5) Obsah kultivační lahve jsem přepipetoval do 15 ml plastové zkumavky. Z tohoto množství jsem odebral 10 μ l roztoku buněk a v plastové 1,5 ml mikrozukmavce jej smíchal s 90 μ l roztoku trypanové modři.
- 6) Roztok buněk smíchaný s trypanovou modří jsem nanesl do Bürkerovy komůrky a spočítal jsem množství buněk v 10-ti čtvercích. Po získání průměru jsem počet buněk ve čtverci vynásobil zředovacím faktorem 10^5 a získal množství buněk v 1 ml.
- 7) Poté jsem vysel 1 milion buněk na jamku v 2 ml média. Takto připravené kultivační desky jsem dal na 24h do inkubátoru.

Přidání chemikálií k buňkám:

- 1) Po 24h hodinách jsem vydělal 6-ti jamkové kultivační desky z inkubátoru a přenesl je do laminárního boxu.
- 2) Ze všech jamek jsem odebral staré kultivační médium a přidal nové, obsahující požadované chemikálie podle schématu číslo 6.
- 3) Po 24h nebo 48h jsem z jamek odsál médium a buňky opláchnul 1 ml vychlazeného 1x fosfátového pufru.
- 4) Poté jsem do každé jamky přidal 1 ml TRI Reagent. Buňky jsem z jamek seškrábnul do TRI Reagent pomocí plastové škrabky a přenesl do 2 ml mikrozukmavek.

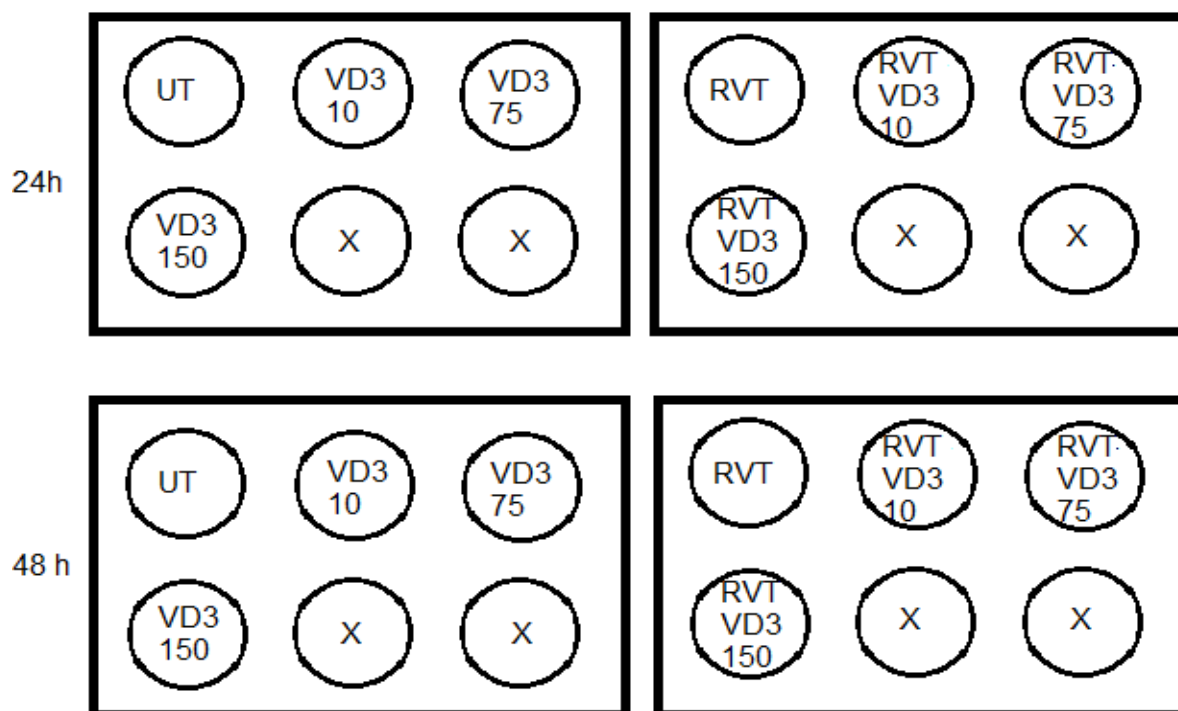


Schéma č. 6: Rozvržení 6-ti jamkových destiček. V každé jamce (kromě jamek s označením X, které jsou prázdné) je 1 milion buněk LS174T a 2 ml média D6546. Chemikálie byly do jamek přidány podle tabulky číslo 5. Buňky byly takto kultivovány buď 24 hodin nebo 48 hodin.

Tabulka č. 5: Obsah jednotlivých jamek v experimentu.

Označení jamky	Obsah jamky
UT (kontrola)	4 μ l DMSO
VD3 10	2 μ l DMSO + 2 μ l $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 (10 μM)
VD3 75	2 μ l DMSO + 2 μ l $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 (75 μM)
VD3 150	2 μ l DMSO + 2 μ l $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 (150 μM)
RVT	2 μ l DMSO + 2 μ l resveratrolu o koncentraci 100 mM
RVT VD3 10	2 μ l resveratrolu (100 mM) + 2 μ l $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 (10 μM)
RVT VD3 75	2 μ l resveratrolu (100 mM) + 2 μ l $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 (75 μM)
RVT VD3 150	2 μ l resveratrolu (100 mM) + 2 μ l $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamín D_3 (150 μM)
X	Prázdná jamka

Všechny jamky (kromě prázdných) dále obsahují 2 ml média D6546 a 1 milion buněk LS174T.

Izolace RNA z buněčného lyzátu a měření koncentrace:

- 1) Zlyzované buňky v TRI Reagent v mikrozkuřavkách jsem zhomogenizoval pomocí nasávání a vysávání do špičky.
- 2) Po homogenizaci jsem do každé mikrozkuřavky přidal 200 μ l chloroformu a obsah mikrozkuřavek protřepal po dobu 1 minuty. Poté jsem mikrozkuřavky nechal stát při laboratorní teplotě 10 minut.
- 3) Po uplynutí 10-ti minut jsem mikrozkuřavky centrifugoval 15 minut při 4°C na 13000 RPM.
- 4) Do čistých mikrozkuřavek chlazených na ledu jsem po centrifugaci přenesl 500 μ l vodné fáze, která byla po centrifugaci dobře viditelná na povrchu roztoku.
- 5) K vodné fázi v nových mikrozkuřavkách jsem přidal 500 μ l izopropanolu a obsah zkuřavek promíchal pomocí vortexu.
- 6) Po promíchání jsem nechal mikrozkuřavky 8 minut stát a poté je centrifugoval 13 minut při 4°C na 13000 RPM.
- 7) Po centrifugaci jsem odstranil supernatant a k peletu přidal 1 ml 75% etanolu vychlazeného na -20°C. Vzorek jsem lehce zvortexoval a poté centrifugoval 5 minut při 4°C na 13000 RPM.
- 8) Po centrifugaci jsem znovu odstranil supernatant a přidal 1 ml 75% etanolu vychlazeného na - 20°C. Vzorek jsem znovu lehce zvortexoval a centrifugoval za stejných podmínek jako v bodě 7.
- 9) Po centrifugaci jsem odebral supernatant a k peletu přidal 35 μ l vody. Všechny mikrozkuřavky jsem poté dal do termobloku nastaveného na 65°C na 5 minut.
- 10) Koncentraci RNA jednotlivých vzorků jsem poté změřil na přístroji NanoDrop1000.

Syntéza cDNA z mRNA:

- 1) Připravil jsem sadu nových mikrozkuřavek a pomocí změřené koncentrace RNA jsem naředil vodou jednotlivé vzorky tak, aby v každé mikrozkuřavce bylo 5 μ l vody a 1000 ng RNA vzorku. Mikrozkuřavky byly chlazeny na ledu.
- 2) Do každé mikrozkuřavky s RNA jsem přidal 1 μ l náhodných primerů o koncentraci 100 pmol/ μ l.
- 3) Mikrozkuřavky jsem vložil do termobloku a inkuboval 5 minut při 65°C. Poté jsem je zchlادil ledem a krátce stočil ve stolní centrifuze.

- 4) Ke každému vzorku v mikrozkušavce jsem přidal 6 μ l reakční směsi, připravené podle tabulky číslo 6.
- 5) Po přidání reakční směsi jsem mikrozkušavky stočil na stolní centrifuze.
- 6) Po centrifugaci jsem vložil mikrozkušavky do termobloku na 1 hodinu při 42 °C.
- 7) Po uplynutí hodiny jsem vložil mikrozkušavky do termobloku na 10 minut na 65 °C a po uplynutí této doby jsem je zchladil ledem.
- 8) K výsledné cDNA v mikrozkušavkách jsem přidal 48 μ l vody a mikrozkušavky promíchal pomocí vortexu.

Tabulka č. 6: Množství látek v reakční směsi pro jeden vzorek.

Použitá chemikálie	Objem [μ l]
M-MuLV (reverzní transkriptáza)	0,6
Inhibitor RNAas	0,3
dNTP (nukleotidy)	0,6
10x reakční pufr	1,2
Voda	3,3

Real Time PCR:

- 1) Vzorky pro PCR jsem nanášel na 96-ti jamkovou bílou PCR destičku. Do každé jamky jsem dal chemikálie podle tabulky číslo 7 (podle zjišťovaného genu).
- 2) Každý vzorek jsem dělal ve třech opakováních (triplikát).
- 3) Po napipetování jsem PCR destičku přelepil fólií a centrifugoval při 4°C, 3 minuty na 1500 RPM.
- 4) Po centrifugaci jsem PCR destičku vložil do LightCycler 480 II a nastavil program podle tabulky číslo 8.
- 5) Výsledná data jsem normalizoval na hodnotu GAPDH pomocí metody $\Delta\Delta C_t$. Hodnota $UT=1$. Experimenty jsem třikrát opakoval a výsledky vyhodnotil pomocí studentova Ttestu. Výsledky s $p<0,05$ jsou brány jako statisticky významné.

Tabulka č. 7: Směs pro PCR.

Detekovaný gen: UGT2B7	
Chemikálie	Objem [μl]
Směs primerů F + R pro UGT2B7	0,8
UPL 86	0,2
Probes Master	5
Voda	1
cDNA vzorku	3
Detekovaný gen: GAPDH	
Chemikálie	Objem [μl]
Směs primerů F + R pro GAPDH	0,8
UPL 60	0,2
Probes Master	5
Voda	1
cDNA vzorku	3
Detekovaný gen: CYP24	
Chemikálie	Objem [μl]
Směs primerů F + R pro CYP24	1
SyberGreen	5
Voda	1
cDNA vzorku	3

Uvedené objemy v tabulce jsou vždy pro jednu jamku na 96-ti jamkové destičce.

Tabulka č. 8: Nastavení PCR

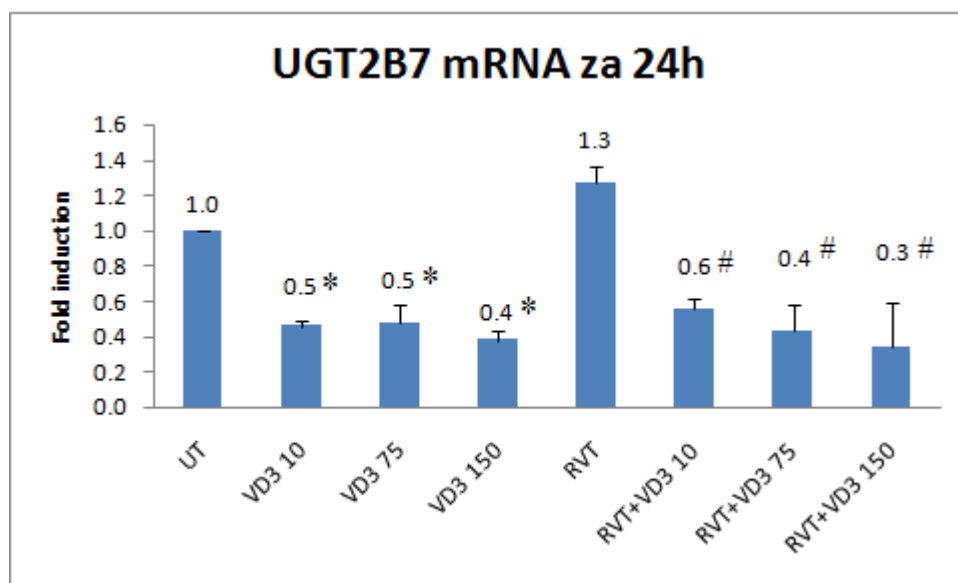
Detekovaný gen: UGT2B7, GAPDH			
Formát detekce	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Prob		
Objem	10 µl		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
<i>Preinkubace</i>	95	10 min	1
<i>Amplifikace</i>	95	10 s	45
	60	30 s	
<i>Chlazení</i>	40	30 s	1
Detekovaný gen: CYP24			
Formát detekce	Syber Green I/HRM Dye		
Objem	10 µl		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
<i>Preinkubace</i>	95	5 min	1
<i>Amplifikace</i>	95	10 s	40
	67	7 s	
	72	17 s	
<i>Křivka tání</i>	95	5 s	1
	65	1 min	
	97	1 s	
<i>Chlazení</i>	40	10 s	1

9. Výsledky:

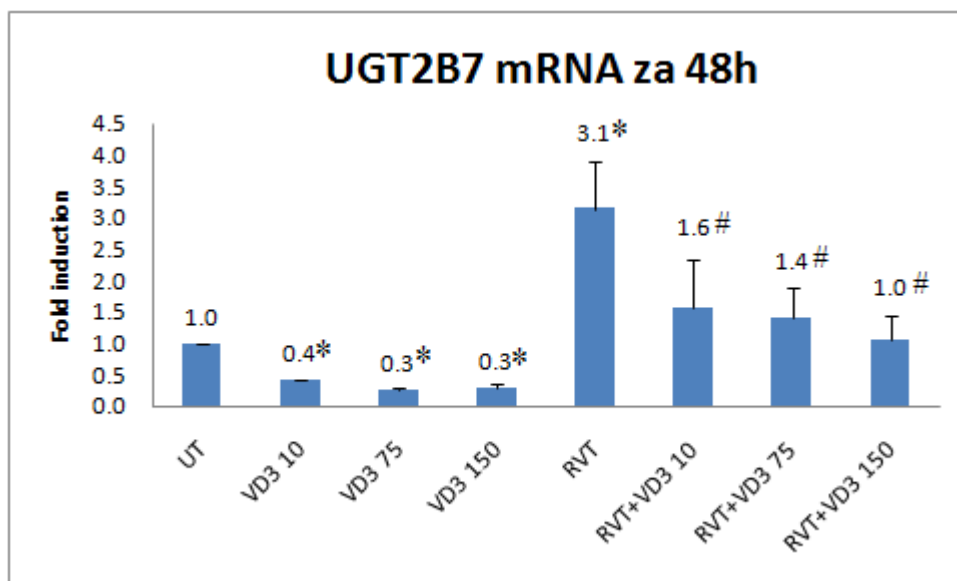
Některé ligandem aktivované transkripční faktory mohou ovlivňovat hladiny biotransformačních enzymů. Toto ovlivnění bylo prokázáno i u receptoru pro vitamín D. V této práci jsem se tedy rozhodl zjistit vztah mezi aktivovaným VDR a hladinou mRNA pro UGT2B7. K tomuto experimentu jsem použil nádorovou střevní linii, ve které je exprimován VDR i UGT2B7 a mohl jsem tedy snadno sledovat vztah mezi nimi.

Jelikož mi není známo, za jakou dobu může aktivovaný VDR transkripčně ovlivnit mRNA pro UGT2B7, rozhodl jsem se sledovat dva časy a to 24 hodin a 48 hodin. K aktivaci VDR jsem použil jeho přirozený ligand kalcitriol a to ve třech koncentracích, teoreticky reprezentující tři fyziologické stavy u člověka (hypovitaminózu, normální fyziologický stav a hypervitaminózu).

Jelikož již dříve Münzel a kol. prokázali, že terciální butylhydrochinon (TBHQ) indukuje hladinu mRNA pro UGT2B7 (Münzel a kol., 1999), rozhodl jsem se vyzkoušet další antioxidant a to resveratrol (RVT). Stejně jako TBHQ, je RVT antioxidant vyskytující se ve stravě, se kterým se můžeme denně setkat.



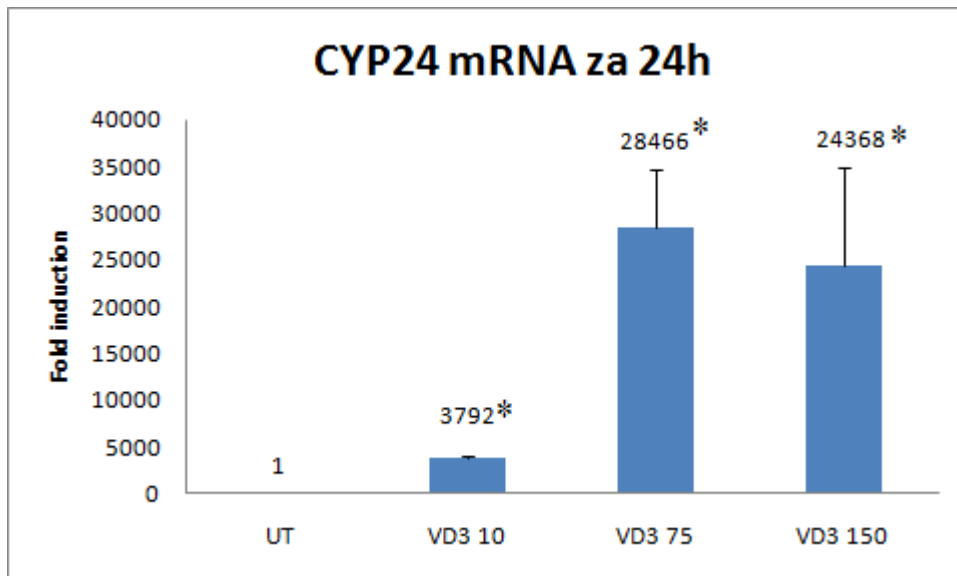
Graf č. 1: Expresa mRNA UGT2B7 za 24h. Data v grafu jsou průměrem ze tří experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (fold induction) oproti kontrolnímu vzorku (UT). Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) vůči UT. Hodnoty označené [#] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) vůči RVT. Kalcitriol ve vzorku byl v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol byl vždy v koncentraci 100 μ M.



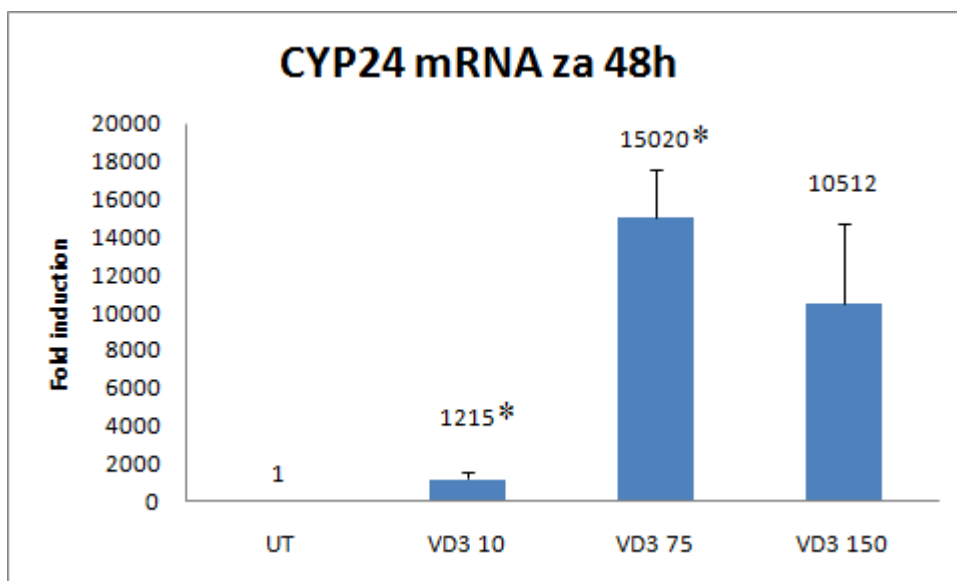
Graf č. 2: Expres mRNA UGT2B7 za 48h. Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) vůči UT. Hodnoty označené [#] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) vůči RVT. Kalcitriol ve vzorku byl v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM). Resveratrol byl vždy v koncentraci 100 μ M.

V grafu číslo 1 a 2 je vidět, že k potlačení hladiny mRNA došlo již za nejkratší sledovaný čas (24h). Již nejnižší koncentrace kalcitriolu způsobili maximální buněčnou odpověď. Došlo ke snížení hladiny mRNA přibližně na polovinu ve všech koncentracích a ve všech sledovaných časech. Kalcitriol také dokázal účinně potlačit zvýšenou expresi vyvolanou resveratrolem.

Abych potvrdil, že snížení hladiny mRNA pro enzym UGT2B7 souvisí s aktivovaným VDR, změřil jsem hladinu CYP24. Je známo, že aktivovaný VDR indukuje expresi mRNA pro CYP24. Pokud tedy bude ve vzorku aktivovaný VDR, musí se současně s ním zvednout množství mRNA pro CYP24 oproti kontrole. Taktéž jsem se rozhodl sledovat dva časy a to 24 hodin a 48 hodin.



Graf č. 3: Expres mRNA CYP24 za 24h. Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) vůči UT. Kalcitriol ve vzorku byl v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM).



Graf č. 4: Expres mRNA CYP24 za 48h. Data jsou normalizována na expresi GAPDH. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) vůči UT. Kalcitriol ve vzorku byl v nM koncentraci (10 nM, 75 nM nebo 150 nM).

V grafu 3 a 4 je vidět zvýšená hladina mRNA pro CYP24 v obou sledovaných časech a při hladině 75 nM ve vzorku dochází k maximálnímu zvýšení. Je tedy jasné, že VDR je ve vzorcích skutečně aktivován a může se vázat do promotorové oblasti genů a ty transkripčně ovlivňovat.

10. Diskuze:

V naší práci jsem se rozhodl zjistit možný vliv receptoru pro vitamín D na hladinu mRNA UGT2B7. VDR je exprimován skoro ve všech tkáních a enzym UGT2B7 metabolizuje širokou škálu léků a také se nachází v množství orgánů. Pokud by jeho hladina byla ovlivněna aktivovaným VDR, mohlo by se jednat o farmakologicky významný poznatek.

Vitamín D jsem buňkám podával v aktivní formě, protože k její konečné syntéze dochází v ledvinách a toho by moje střevní nádorová linie nebyla schopná. Hladinu vitamínu D (v již aktivní formě kalcitriolu) jsem zvolil ve třech koncentracích. Hladina 10 nM reprezentuje nedostatek vitamínu D, hladina 75 nM reprezentuje normální fyziologickou hladinu a 150 nM představuje nadbytek vitamínu D. Přirozená fyziologická hladina vitamínu D se stanovuje z 25(OH)vitaminu D₃ (Holick, 2008).

Již dříve bylo prokázáno, že hladinu biotransformačních enzymů lze ovlivnit různými látkami. Mezi látky pozitivně ovlivňující hladinu UGT2B7 patří například terciální butylhydrochinon (TBHQ), který v organismu funguje jako antioxidant (Münzel a kol., 1999). V experimentu jsem se rozhodl pro trans-3,4',5-trihydroxystilben (resveratrol), což je přírodní antioxidant, vyskytující se v mnoha potravinách jako třeba červené víno, borůvky, ostružiny, brusinky, hrozny nebo maliny (Szajdek a Borowska, 2008; Stervbo a kol., 2007). Na základě těchto informací jsem se jej rozhodl vyzkoušet jako předpokládaného induktora UGT2B7.

Statisticky významný nárůst byl pozorován ve vzorku obsahující resveratrol a to pouze po 48 hodinách. Indukce resveratrolem byla ovšem nižší než v experimentu, kde byl použit TBHQ, který provedl Münzel a kol.. Zatímco TBHQ zvednul jeho hladinu až 10ti násobně (Münzel a kol., 1999), indukce resveratrolem byla pouze trojnásobná oproti kontrolnímu vzorku. Ovšem je třeba zmínit, že indukce TBHQ byla měřena po 72 hodinách a já měřil indukci resveratrolem pouze po 48 hodinách, navíc používám též jinou nádorovou linii (LS174T místo CaCo-2) a trochu jinou metodiku.

Všechny tři koncentrace kalcitriolu vedly ke statisticky významnému ($P < 0,05$) snížení hladiny mRNA UGT2B7 a to jak po 24 hodinách, tak i po 48 hodinách. VDR dokázal snížit hladinu i přes působení resveratrolu a to také v obou stanovovaných časech (24h i 48h). Prokázal jsem tedy, že aktivovaný VDR ovlivňuje hladinu mRNA pro UGT2B7. Už dříve bylo popsáno, že VDR je aktivován i žlučovými kyselinami (což je významné ve střevech) a ovlivňuje hladinu některých enzymů jako podrodiny CYP3A4 a tím zrychluje odbourávání

toxických látek ve střevě, které ho aktivovaly (Makishima a kol., 2002). Před několika lety byl popsán i vliv lidského FXR na UGT2B7. Po jeho aktivaci žlučovými kyselinami docházelo ke snížení mRNA pro UGT2B7. Tento výzkum byl prováděn na nádorové linii CaCo-2, která je také odvozena od buněk střevního epitelu a sledovaný čas byl 48 hodin (Lu a kol., 2005).

Downregulace na úrovni mRNA se ovšem nedá považovat za farmakologicky významné zjištění, protože výkonnou funkci vytváří až enzym samotný. Proto by bylo dobré zjistit, jestli je pokles UGT2B7 i na úrovni proteinu a ne pouze na úrovni mRNA. Toto je tedy námět pro další výzkum.

11. Závěr:

V teoretické části této práce jsem popsal biotransformaci se zaměřením na UDP-glukuronosyl transferasy. Dále jsem popsal několik ligandem aktivovaných transkripčních faktorů, které mohou ovlivňovat některé enzymy a transportéry. Detailněji jsem se zaměřil na receptor pro vitamín D a na informace o samotném vitamínu D. Podrobnější informace jsem poskytnul také o samotném biotransformačním enzymu UGT2B7.

V experimentální části jsem se zaměřil na samotnou aktivaci VDR ve střevní nádorové linii a jeho vliv na hladinu UGT2B7. Jak VDR tak i UGT2B7 jsou normálně exprimovány ve střevě i v jiných tkáních. Po aktivaci receptoru jeho přirozeným ligandem kalcitriolem došlo již při nejnižších hladinách ke statisticky významnému snížení hladiny mRNA pro UGT2B7 a to v obou stanovených časech (za 24 i 48 hodin). Resveratrol jako induktor zapůsobil až po 48 hodinách. V experimentu jsem tedy prokázal, že aktivovaný VDR ovlivňuje hladinu mRNA pro UGT2B7.

Další studie by se mohla zabývat problémem, jestli se downregulace mRNA pro UGT2B7 dotýká o enzymu a jestli je i výrazně ovlivněna jeho katalytická aktivita. Pokud by se prokázalo snížení i na této úrovni, mohlo by to mít fyziologické důsledky.

12. Literatura:

Amin N., Byrne E., Johnson J., Chenevix-Trench G., Walter S., Nolte I.M., kConFab Investigators, Vink J.M., Rawal R., Mangino M., Teumer A., Keers J.C., Verwoert G., Baumeister S., Biffar R., Petersmann A., Dahmen N., Doering A., Isaacs A., Broer L., Wray N.R., Montgomery G.W., Levy D., Psaty B.M., Gudnason V., Chakravarti A., Sulem P., Gudbjartsson D.F., Kiemeny L.A., Thorsteinsdottir U., Stefansson K., van Rooij F.J., Aulchenko Y.S., Hottenga J.J., Rivadeneira F.R., Hofman A., Uitterlinden A.G., Hammond C.J., Shin S.Y., Ikram A., Witteman J.C., Janssens A.C., Snieder H., Tiemeier H., Wolfenbutter B.H., Oostra B.A., Heath A.C., Wichmann E., Spector T.D., Grabe H.J., Boomsma D.I., Martin N.G., van Duijn C.M. (2012): Genome-wide association analysis of coffee drinking suggests association with CYP1A1/CYP1A2 and NRCAM. *Mol psychiatry* 17:1116-29.

Hinrichs A.L., Murphy S.E., Wang J.C., Saccone S., Saccone N., Steinbach J.H., Goate A., Stevens V.L., Bierut L.J. (2011): Common polymorphisms in FMO1 are associated with nicotine dependence. *Pharmacogenet Genomics* 21:397-402

Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58:737-47

Armstrong R.N. (1997): Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 10:2-18

Bélangier A.S., Caron P., Harvey M., Zimmerman P.A., Mehlotra R.K., Guillemette C. (2009): Glucuronidation of the Antiretroviral Drug Efavirenz by UGT2B7 and an in Vitro Investigation of Drug-Drug Interaction with Zidovudine. *Drug Metab Dispos* 37:1793-6

Bhasker C.R., McKinnon W., Stone A., Lo A.C., Kubota T., Ishizaki T., Miners J.O. (2000): Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics.* 10:679-85

Blanca Sánchez M., Herranz J.L., Leno C., Arteaga R., Oterino A., Valdizán E.M., Nicolas J.M., Adín J., Shushtarian M., Armijo J.A. (2010): UGT2B7_-161C>T polymorphism is associated with lamotrigine concentration-to-dose ratio in a multivariate study. *Ther Drug Monit.* 32:177-84.

Bock K.W. (2003): Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem Pharmacol.* 66:691-6

Bock K.W. (2011): From differential induction of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver to characterization of responsible ligand-activated transcription factors, and their multilevel crosstalk in humans. *Biochem Pharmacol.* 82:9-16

Bock K.W. (2012): Human UDP-glucuronosyltransferases: Feedback loops between substrates and ligands of their transcription factors. *Biochem Pharmacol.* 84:1000-6

- Bock K.W., Köhle C. (2006): Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol.* 72:393-404
- Booth, J., Boyland, E., and Sims, P. (1961) An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem. J.* 79:516-24
- Bouillon R., Carmeliet G., Verlinden L., van Etten E., Verstuyf A., Luderer H.F., Lieben L., Mathieu C., Demay M. (2008): Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocr Rev.* 29:726-76
- Bowalgaha K., Elliot D.J., Mackenzie P.I., Knights K.M., Swedmark S., Miners J.O. (2005): S-Naproxen and desmethylnaproxen glucuronidation by human liver microsomes and recombinant human UDPglucuronosyltransferases (UGT): role of UGT2B7 in the elimination of naproxen. *Br J Clin Pharmacol.* 60:423-33
- Bowalgaha K., Elliot D.J., Mackenzie P.I., Knights K.M., Swedmark S., Miners J.O. (2005): Production of Ibuprofen Acyl Glucosides by Human UGT2B7. *Br J Clin Pharmacol.* 60:423-33
- Brentner L.B., Mukherji S.T., Merchie K.M., Yoon J.M., Schnoor J.L., Van Aken B. (2008): Expression of glutathione S-transferases in poplar trees (*Populus trichocarpa*) exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Chemosphere.* 73:657-62
- Burchell B., Brierley C.H., Rance D. (1995): Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci.* 57:1819-31
- Camargo C.A. Jr, Ganmaa D., Frazier A.L., Kirchberg F.F., Stuart J.J., Kleinman K., Sumberzul N., Rich-Edwards J.W. (2012): Randomized trial of vitamin D supplementation and risk of acute respiratory infection in Mongolia. *Pediatrics.* 130:e561-7
- Cashman JR. (200): Human Flavin-Containing Monooxygenase: Substrate Specificity and Role in Drug Metabolism. *Curr Drug Metab.* 1:181-91
- Court MH. (2005): Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol.* 400:104-16
- Ernest H. (2004): A textbook of modern toxicology. In: Ernest Hodgson (ed.), third edition, John Wiley & Sons, Canada.
- Ebihara K., Masuhiro Y., Kitamoto T., Suzawa M., Uematsu Y., Yoshizawa T., Ono T., Harada H., Matsuda K., Hasegawa T., Masushige S., Kato S. (1996): Intron Retention Generates a Novel Isoform of the Murine Vitamin D Receptor That Acts in a Dominant Negative Way on the Vitamin D Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.* 16:3393-400
- Eissing T., Lippert J., Willmann S. (2012): Pharmacogenomics of Codeine, Morphine and M6G: Model-Based Analysis of the Influence of CYP2D6 Activity, UGT2B7 Activity, Renal Impairment and CYP3A4 Inhibition. *Mol Diagn Ther.* 1;16:43-53

Ekström L, Johansson M, Rane A. (2013): Tissue Distribution and Relative Gene Expression of UDP-Glucuronosyltransferases (2B7, 2B15, 2B17) in the Human Fetus. *Drug Metab Dispos.* 41:291-5

Eloranta J.J., Hiller C., Jüttner M., Kullak-Ublick G.A. (2012): The SLCO1A2 gene, encoding the human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2), is transactivated by the vitamin D receptor (VDR). *Mol Pharmacol.* 82:37-46

Eloranta J.J., Kullak-Ublick G.A. (2005): Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 433:397-412

Eswaramoorthy S., Bonanno J.B., Burley S.K., Swaminathan S. (2006): Mechanism of action of a flavincontaining monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9832-7

Falany C.N., He D., Li L., Falany J.L., Wilborn T.W., Kocarek T.A., Runge-Morris M. (2009): Regulation of hepatic sulfotransferase (SULT) 1E1 expression and effects on estrogenic activity in cystic fibrosis (CF). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 114:113-9

Feltrer R., Alvarez-Rodríguez M.L., Barreiro C., Godio R.P., Coque J.J. (2010): Characterization of a novel 2,4,6-trichlorophenol-inducible gene encoding chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* responsible for the formation of chloroanisoles and detoxification of chlorophenols. *Fungal Genet Biol.* 47:458-67

Gamage N., Barnett A., Hempel N., Duggleby R.G., Windmill K.F., Martin J.L., McManus M.E. (2006): Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicol Sci.* 90:5-22

Gao J., Xie W. (2010): Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metab Dispos.* 38:2091-5

García D., Angel B., Carrasco E., Albala C., Santos J.L., Pérez-Bravo F. (2007): VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile. *Diabetes Res Clin Pract.* 77:134-40

Hagenbuch B., Meier P.J. (2003): The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta.* 1609:1-18

Haussler M.R., Whitfield G.K., Haussler 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. *J Bone Miner Res.* 13:325-49

Heit C., Dong H., Chen Y., Thompson D.C., Deitrich R.A., Vasiliou V.K. (2013): The Role of CYP2E1 in Alcohol Metabolism and Sensitivity in the Central Nervous System. *Subcell Biochem.* 67:235-47

Hevir N., Sinkovec J., Rižner T.L. (2011): Disturbed expression of phase I and phase II estrogen-metabolizing enzymes in endometrial cancer: Lower levels of CYP1B1 and increased expression of S-COMT. *Mol Cell Endocrinol.* 331:158-67

- Holick M.F. (2003): Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem.* 88:296-307
- Holick M.F. (2007): Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med.* 357:266-81
- Holick M.F. (2008): Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev.* 66:S182-94
- Chatzistefanidis D., Georgiou I., Kyritsis A.P., Markoula S. (2012): Functional impact and prevalence of polymorphisms involved in the hepatic glucuronidation of valproic acid. *Pharmacogenomics.* 13:1055-71
- Chen M., LeDuc B., Kerr S., Howe D., Williams D.A. (2010): Identification of Human UGT2B7 as the Major Isoform Involved in the O-Glucuronidation of Chloramphenicol. *Drug Metab Dispos.* 38:368-75
- Chen G., Giambrone N.E., Lazarus P. (2012): Glucuronidation of trans-3'-hydroxycotinine by UGT2B17 and UGT2B10. *Pharmacogenet Genomics.* 22:183-90
- Chenoweth M.J., O'Loughlin J., Sylvestre M.P., Tyndale R.F. (2013): CYP2A6 slow nicotine metabolism is associated with increased quitting by adolescent smokers. *Pharmacogenet Genomics.* 23:232-5
- Chi Y., Hong Y., Zong H., Wang Y., Zou W., Yang J., Kong X., Yun X., Gu J. (2009): CDK11p58 represses vitamin D receptor-mediated transcriptional activation through promoting its ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 386:493-8.
- Fremont J.J., Wang R.W., King C.D. (2005): Coimmunoprecipitation of UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms and Cytochrome P450 3A4. *Mol Pharmacol.* 67:260-2
- Jakobsson J., Ekström L., Inotsume N., Garle M., Lorentzon M., Ohlsson C., Roh H.K., Carlström K., Rane A. (2006): Large Differences in Testosterone Excretion in Korean and Swedish Men Are Strongly Associated with a UDP-Glucuronosyl Transferase 2B17 Polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:687-93
- Jin C.J., Miners J.O., Lillywhite K.J., Mackenzie P.I. (1993): cDNA cloning and expression of two new members of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily. *Biochem Biophys Res Commun.* 194:496-503
- Joseph P.D. (2010): Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology. *Hum Genomics Proteomics.* 2010:876940
- Kato S. (200): The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *J Biochem.* 127:717-22
- Kennedy M.J., Loehle J.A., Griffin A.R., Doll M.A., Kearns G.L., Sullivan J.E., Hein D.W. (2008): Association of the Histamine N-methyltransferase C314T (Thr105Ile) Polymorphism with Atopic Dermatitis in Caucasian Children. *Pharmacotherapy.* 28:1495-501

Khokhar J.Y., Miksys S.L., Tyndale R.F. (2010): Rat brain CYP2B induction by nicotine is persistent and does not involve nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 1348:1-9

Kim J., Hong S.J., Lim E.K., Yu Y.S., Kim S.W., Roh J.H., Do I.G., Joh J.W., Kim D.S. (2009): Expression of nicotinamide N-methyltransferase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 28:20.

Koepsell H. (1998): Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu Rev Physiol.* 60:243-66

Koepsell H., Lips K., Volk C. (2007): Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm Res.* 24:1227-51

König J., Nies A.T., Cui Y., Leier I., Keppler D. (1999): Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1461:377-94

Konno Y., Negishi M., Kodama S. (2008): The Roles of Nuclear Receptors CAR and PXR in Hepatic Energy Metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23:8-13

Kumagai T., Suzuki H., Sasaki T., Sakaguchi S., Miyairi S., Yamazoe Y., Nagata K. (2012): Polycyclic aromatic hydrocarbons activate CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27:200-6

Kwara A., Lartey M., Boamah I., Rezk N.L., Oliver-Commey J., Kenu E., Kashuba A.D., Court M.H. (2009): Interindividual Variability in Pharmacokinetics of Generic Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in TB/HIV Coinfected Ghanaian Patients: UGT2B7*1C is Associated with Faster Zidovudine Clearance and Glucuronidation. *J Clin Pharmacol.* 49:1079-90

Lampe J.W., Bigler J., Bush A.C., Potter J.D. (2000): Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y), and UGT2B15(D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:329-33

Li X.Y., Boudjelal M., Xiao J.H., Peng Z.H., Asuru A., Kang S., Fisher G.J., Voorhees J.J. (1999): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases nuclear vitamin D₃ receptors by blocking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. *Mol Endocrinol.* 13:1686-94

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

Mackenzie P., Little J.M., Radomska-Pandya A. (2003): Glucosidation of hyodeoxycholic acid by UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Biochem Pharmacol.* 65:417-21

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 glucosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics*. 15:677-85

Maglich J.M., Parks D.J., Moore L.B., Collins J.L., Goodwin B., Billin A.N., Stoltz C.A., Kliewer S.A., Lambert M.H., Willson T.M., Moore J.T. (2003). Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *J Biol Chem*. 278:17277-83

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

Meyer B.K., Perdew G.H. (1999): Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 Core Complex and the Role of the Immunophilin-Related Protein XAP2 in AhR Stabilization. *Biochemistry*. 38:8907-17

Monostory K., Pascussi (2008): J.M. Regulation of Drug-metabolizing Human Cytochrome P450s. *Acta Chim. Slov*. 55:20–37

Muangmoonchai R., Smirlis D., Wong S.C., Edwards M., Phillips I.R., Shephard E.A. (2001): Xenobiotic induction of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1. *Biochem J*. 355:71-8

Münzel P.A., Schmohl S., Heel H., Kälberer K., Bock-Hennig B.S., Bock K.W. (1999): Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos*. 27:569-73

Nagpal S., Lu J., Boehm M.F. (2001): Vitamin D analogs: mechanism of action and therapeutic applications. *Curr Med Chem*. 8:1661-79

Nakamura A., Nakajima M., Yamanaka H., Fujiwara R., Yokoi T. (2008): Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in Human Normal Tissues and Various Cell Lines. *Drug Metab Dispos*. 36:1461-4

Negishi M., Pedersen L.G., Petrotchenko E., Shevtsov S., Gorokhov A., Kakuta Y., Pedersen L.C. (2001): Structure and Function of Sulfotransferases. *Arch Biochem Biophys*. 390:149-57

Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6:1-42

Pascussi J.M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P., Vilarem M.J. (2003): The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1619:243-53

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

Pávek P., Dvořák Z. (2008): Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Curr Drug Metab.* 9:129-43

Penna G., Adorini L. (2000): $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *J Immunol.* 164:2405-11

Radomska-Pandya A., Czernik P.J., Little J.M., Battaglia E., Mackenzie P.I. (1999): Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev.* 31:817-99

Radomska-Pandya A., Little J.M., Czernik P.J. (2001): Human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Curr Drug Metab.* 2:283-98

Radomska-Pandya A., Pokrovskaya I.D., Xu J., Little J.M., Jude A.R., Kurten R.C., Czernik P.J. (2002): Nuclear UDP-Glucuronosyltransferases: Identification of UGT2B7 and UGT1A6 in Human Liver Nuclear Membranes. *Arch Biochem Biophys.* 399:37-48

Weinshilboum R.M. (2006): Pharmacogenomics: Catechol O-Methyltransferase to Thiopurine S-Methyltransferase. *Cell Mol Neurobiol.* 26:539-61

Ritter J.K., Sheen Y.Y., Owens I.S. (1990): Cloning and expression of human liver UDP-glucuronosyltransferase in COS-1 cells. 3,4-catechol estrogens and estriol as primary substrates. *J Biol Chem.* 265:7900-6

Rodrigues C., Vieira E., Santos R., de Carvalho J., Santos-Silva A., Costa E., Bronze-da-Rocha E. (2012): Impact of UGT1A1 gene variants on total bilirubin levels in Gilbert syndrome patients and in healthy subjects. *Blood Cells Mol Dis.* 48:166-72

Sadeque A.J., Usmani K.A., Palamar S., Cerny M.A., Chen W.G. (2012): Identification of Human UDP-Glucuronosyltransferases Involved in N-Carbamoyl Glucuronidation of Lorcaserin. *Drug Metab Dispos.* 40 :772-8

Senafi S.B., Clarke D.J., Burchell B. (1994): Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J.* 303:233-40

Saini R.K., Kaneko I., Jurutka P.W., Forster R., Hsieh A., Hsieh J.C., Haussler M.R., Whitfield G.K. (2013): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Expression in Bone Cells: Evidence for Primary and Secondary Mechanisms Modulated by Leptin and Interleukin-6. *Calcif Tissue Int.* 92:339-53

de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van den Anker J.N. (1999): Glucuronidation in Humans Pharmacogenetic and Developmental Aspects. *Clin Pharmacokinet.* 36:439-52.

Senafi S.B., Clarke D.J., Burchell B. (1994): Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J.* 303:233-40

Sim E., Walters K., Boukouvala S. (2008): Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab Rev.* 40:479-510

Singkhom N., Towanabut S., Lertkachatarn S., Punyawudho B. (2012): Influence of the UGT2B7 -161C>T polymorphism on the population pharmacokinetics of lamotrigine in Thai patients. *Eur J Clin Pharmacol* DOI 10.1007/s00228-012-1449-5

Sten T., Kurkela M., Kuuranne T., Leinonen A., Finel M. (2009): UDP-glucuronosyltransferases in conjugation of 5alpha- and 5beta-androstane steroids. *Drug Metab Dispos.* 37:2221-7

Stervbo U., Vang O., Bonnesen Ch.,(2007): A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry* 101:449–457

Szajdek A., Borowska E.J. (2008): Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods Hum Nutr.* 63:147-56

Sagud M., Mück-Seler D., Mihaljević-Peles A., Vuksan-Cusa B., Zivković M., Jakovljević M., Pivac N. (2010): Catechol-O-methyl transferase and schizophrenia. *Psychiatr Danub.* 22:270-4

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

Torun E., Genç H., Gönüllü E., Akovalı B., Ozgen I.T.(2013): The clinical and biochemical presentation of vitamin D deficiency and insufficiency in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 20:1-7

Treacy E.P., Akerman B.R., Chow L.M., Youil R., Bibeau C., Lin J., Bruce A.G., Knight M., Danks D.M., Cashman J.R., Forrest S.M.(1998): Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum Mol Genet.* 7:839-45

Uchaipichat V., Galetin A., Houston J.B., Mackenzie P.I., Williams J.A., Miners J.O.(2008): Kinetic Modeling of the Interactions between 4-Methylumbelliferone, 1-Naphthol, and

Zidovudine Glucuronidation by UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) Provides Evidence for Multiple Substrate Binding and Effector Sites. *Mol Pharmacol.* 74:1152-62

Urashima M., Segawa T., Okazaki M., Kurihara M., Wada Y., Ida H. (2010): Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 91:1255-60

Vaynshteyn D., Jeong H.(2012): Caffeine induces CYP1A2 expression in rat hepatocytes but not in human hepatocytes. *Drug Metab Lett.* 6:116-9

Liu S.P., Li Y.S., Chen Y.J., Chiang E.P., Li A.F., Lee Y.H., Tsai T.F., Hsiao M., Huang S.F., Chen Y.M. (2007): Glycine N-methyltransferase-/- mice develop chronic hepatitis and glycogen storage disease in the liver. *Hepatology.* 46:1413-25

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

Wang^[1] Y., Zhu J., DeLuca H.F. (2012): Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 523:123-33

Wang^[2] Z., Xiang Q., Cui Y., Zhao X., Zhou Y. (2012): The Influence of UGT2B7, UGT1A8, MDR1, ALDH, ADH, CYP3A4 and CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of silodosin in healthy Chinese volunteers. *Drug Metab Pharmacokinet.* DOI:10.2133

Wang H., LeCluyse E.L. (2003): Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet.* 42:1331-57

Wang L., Weinshilboum R. (2006): Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene.* 25:1629-38

de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van den Anker J.N. (1999): Glucuronidation in Humans Pharmacogenetic and Developmental Aspects. *Clin Pharmacokinet.* 36:439-52

Yang L., Ma J., Zhang X., Fan Y., Wang L. (2012): Protective role of the vitamin D receptor. *Cell Immunol.* 279:160-6

Zhong Y., Dong G., Luo H., Cao J., Wang C., Wu J., Feng Y.Q., Yue J. (2012): Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology.* 302:275-84

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

Zollner G, Trauner M. (2009): Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol.* 156:7-27

13. Seznam použitých zkratek a symbolů:

AhR	= aryl uhlovodíkový receptor
Arnt	= AhR jaderný translokátor
ATP	= adenosintrifosfát
CAR	= konstitutivní androstanový receptor
CARRE	= CAR responzivní element
CCRP	= CAR retenční protein
COMT	= katechol O-metyltransferasa
CYP	= cytochrom P450
DR	= direct repeat
ER	= everted repeat
ERR	= estrogen receptor-related receptor
FMO	= flavin obsahující monooxygenasa
FOXO-1	= forkhead box O1
FXR	= farnesoidní X receptor
GAPDH	= glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GCNF	= zárodečný buněčný jaderný faktor
GSH	= glutation
GST	= glutation-S-transferasy
GR	= glukokortikoidní receptor
HDCA	= hydeoxycholová kyselina
HNF4	= hepatocytární jaderný faktor 4
Hsp90	= protein teplotního šoku 90
IR	= inverted repeat
IU	= mezinárodní jednotka
mRNA	= mediátorová RNA
MRP	= multidrug resistance protein
NADPH	= nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NCOA1	= steroid receptor coactivator 1
NCOA2	= steroid receptor coactivator 2
OATPs	= organic anion transporting polypeptides
OCTN	= kationový a karnitinový transportér

OCTs	= organic cation transporters
PAPS	= 3'-fosfoadenin 5'-fosfosulfát
PCR	= polymerázová řetězová reakce
PGC-1	= Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1
PP-2A	= proteinová fosfatáza 2A
PPAR α	= Peroxisome proliferator activated receptor alpha
PPARPB	= PPAR vázající protein
PXR	= pregnanový X receptor
PXRRE	= PXR responzivní element
RAR	= receptor pro kyselinu trans-retinovou
ROR	= retinoic acid-related orphan receptor
SAH	= S-adenosyl homocystein
SAM	= S-adenosyl methionin
SULT	= sulfottransferasa
TBHQ	= terciální butylhydrochinon
TMPT	= thiopurin S-metyltransferasa
UDPGA	= uridin 5'-difosfoglukuronová kyselina
UGT	= UDP-glukuronosyl transferasa
UV-B	= ultrafialové záření B
VDR	= receptor pro vitamín D
VDRE	= vitamín D responzivní element
XAP2	= hepatitis virus B X-associated protein
XRE	= xenobiotický responzivní element